

ФЛУОРИМЕТРИЧЕСКИЕ ИЗМЕРЕНИЯ ПОЗВОЛЯЮТ ВЫЯВИТЬ УРОВЕНЬ УПАКОВКИ ХРОМАТИНА, ЛЕЖАЩИЙ ЗА ПРЕДЕЛАМИ РАЗРЕШЕНИЯ СВЕТОВОЙ МИКРОСКОПИИ

© Л. И. Лебедева,¹ Т. Д. Дубатолова,¹ Л. В. Омельянчук^{1, 2}

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СОРАН, Новосибирск,

² Новосибирский государственный университет;
электронный адрес: ome@mcb.nsc.ru

Изучена динамика изменений интенсивности, объема и объемной плотности флуоресценции ДНК (окрашенной DAPI) и фосфорилированной формы гистона-H3 в ядрах делящихся клеток крыловых имагинальных дисков личинок третьего личиночного возраста *Drosophila melanogaster* линии дикого типа *Hikone AW* в норме и после воздействия колхицина. Количественный анализ плотности флуоресценции DAPI на стадиях профазы, прометафазы и метафазы позволил выявить существование двух специфических уровней структурной упаковки ДНК в нормальном митозе, из которых один уровень реализуется во время прометафазы, другой — в конце метафазы. Ни одного из указанных уровней упаковки ДНК не обнаружено при К-митозе. По совокупности результатов измерения флуоресценции H3-р-гистона и DAPI сделано заключение о том, что флуориметрические измерения позволяют выявить уровни упаковки хроматина, лежащие за пределами разрешения световой микроскопии.

Ключевые слова: конфокальная микроскопия, флуоресценция, H3-р-гистон, DAPI, *Drosophila melanogaster*, имагинальные диски.

Принятые сокращения: НК — нуклеиновый компонент, ННК — ненуклеиновый компонент, ФОД — флуоресцентный объем DAPI.

Упаковка ДНК меняется по ходу клеточного цикла. Наиболее высокие уровни упаковки ДНК реализуются во время митоза. В соматических клетках *Drosophila melanogaster* отношение длины молекулы ДНК к длине метафазной хромосомы составляет ~104 (Losada, Hirano, 2001). Интенсивная конденсация ДНК начинается с фосфорилирования N-терминального участка гистона H3 (Wei et al., 1999). По мере фосфорилирования гистона H3 ДНК становится более доступной для связывания с конденсином 13S (Hirano, 2000), связывание которого с ДНК существенно увеличивается во время митоза. Фосфорилируется гистон H3 киназой Aurora B; мутации в гене, кодирующем эту киназу, вызывают многочисленные нарушения митоза (Hsu et al., 2000; Spelioites et al., 2000).

Новые возможности для изучения структурной организации хроматина в делящихся клетках открывает конфокальная микроскопия. В этом случае структура хроматина исследуется с максимальным приближением к реальным условиям, без разрушения тканевой и клеточной архитектуры. Изображения являются трехмерными, как это и имеет место *in vivo*. Анализ флуориметрических измерений хроматина носит количественный характер, что исключает субъективность в оценке степени упаковки и текстуры хроматина.

Ранее с использованием метода конфокальной микроскопии в условиях, когда через ядро проходит 4—5 конфокальных срезов, нами было сопоставлено изменение уровня и объема флуоресценции H3-р-гистона с уровнем

и объемом флуоресценции DAPI в делящихся клетках крыловых имагинальных дисков личинок *D. melanogaster* (Лебедева и др., 2010). Исходили из того, что на стадиях профазы, прометафазы и метафазы количество ДНК в клетке не меняется, поэтому измерения объема, в котором сосредоточен хроматин, должны отражать степень упаковки ДНК в хромосомах. Ожидали также, что поскольку фосфорилирование гистона-H3 способствует конденсации ДНК, то по мере увеличения флуоресценции H3-р-антител (т. е. по мере нарастания уровня фосфорилированного гистона H3) будет нарастать компактизация хромосом и соответственно уменьшаться объем и увеличиваться плотность флуоресценции DAPI. Однако проявившаяся в этих опытах динамика флуоресцентного объема DAPI в делящихся клетках не совпала с известной динамикой конденсации хромосом.

Мы поставили перед собой задачу установить, не является ли наблюдаемый феномен следствием недостаточно тонкого сканирования препарата. Мы повторили эксперименты, увеличив число конфокальных срезов, проходящих через ядро, до 23—28. Это позволило получить более полную информацию о динамике упаковки хроматина во время деления клеток. Нам удалось обнаружить два специфических уровня структурной упаковки ДНК, из которых один реализуется во время прометафазы, другой — в конце метафазы. Они не могли быть выявлены при визуальном анализе препаратов хромосом.

Материал и методика

Исследование выполнено на крыловых имагинальных дисках личинок третьего возраста *D. melanogaster* линии *Hikone AW* в норме и после культивирования дисков в течение 1 ч при комнатной температуре в среде Shields and Sang M3 (Sigma, США) с колхицином в концентрации 0.1 %. К-митоз использован в качестве экспериментальной модели патологии, вызванной инактивацией митотического веретена.

Для визуализации делящихся клеток диски окрашивали с помощью антител к фосфорилированной форме гистона H3. Использовали антитела кролика (anti-H3-p, Upstate Biotechnology) в разведении 1 : 100 и вторичные меченные Alexa-568 антитела козы (goat-anti-rabbit IgG,A-11011, Molecular Probes, США) в разведении 1 : 200. Кроме того, препараты окрашивали красителем DAPI в концентрации 1 мг/мл в течение 2 мин и заключали в Mowiol, содержащий 5 % DABCO.

Для цитологического анализа использовали конфокальный микроскоп Zeiss LSM—510 со следующими параметрами. Размер сканируемой области — 0.26 мкм, Y — 0.26 мкм, Z — 0.27 мкм; объектив Plan-Apochromat 63×/1.4; фильтры: Ch2-1 — BP 420—480 нм IR, Ch3-2 — LP 650 нм; дихроические зеркала MBS:HFT 405/488/543 нм, DBS1 — NFT 545 нм, DBS2 — NFT 490 нм; длины волн лазеров: 405 нм — 23 %, 543 нм — 47 %. При выбранных параметрах через ядро клетки проходит в среднем 23—28 конфокальных срезов. Их цифровые изображения просматривали с помощью программы Zeiss LSM Image Browser и копировали для последующего анализа. Для каждого диска была построена карта, отражающая локализацию митотических фигур в диске и стадии митоза — профазу, прометафазу, метафазу и анафазу.

Для численного анализа результатов была разработана специальная компьютерная программа (на языке Mathcad), позволяющая интегрировать флуоресцентный сигнал по объему. При этом учитывали суммарную интенсивность и объем флуоресценции по слоям. Коррекцию фона осуществляли на каждом оптическом слое отдельно путем измерений интенсивности флуоресценции в участке, расположенном вблизи ядра, затем эту величину вычитали из значения интенсивности флуоресценции для данного оптического слоя. Границы ядра и фона выделяли вручную. Флуоресцентный объем рассчитывали как число элементарных объемов — пикселей, в объеме которых интенсивность флуоресценции превышала среднюю величину интенсивности флуоресценции пикселей фона. Если в пикселе интенсивность флуоресценции DAPI превышала фоновый уровень (т. е. если этот объем был занят заметным количеством ДНК), то его причисляли к объему, занятому ядерной ДНК, независимо от того, сколько цитоплазмы содержалось в этом объеме.

Таким образом, при использованном нами методе флуориметрии измеряли суммарную интенсивность флуоресценции DAPI в объеме всего ядра (уровень которой пропорционален содержанию ДНК в ядре) и определяли объем, в пределах которого присутствовала ДНК («охватывающий» объем). В общем случае в этот объем включается также часть объема кариоплазмы, находящейся рядом с хромосомами, но которая (на уровне световой микроскопии) пространственно не может быть отделена от ДНК, поскольку объем вокселя, определяемый длиной волны света, конечен.

Необходимо заметить, что задача определения флуоресцентного объема по серии конфокальных срезов не является тривиальной. В общем случае для этого надо было бы вначале построить поверхность, ограничивающую область, где сосредоточена флуоресценция, а затем суммировать объем элементов, находящихся внутри этой области. Введенное нами понятие «охватывающего» объема является упрощением, которое, тем не менее, позволило использовать непосредственно процедуру конфокального сканирования препарата для измерения объема, являющегося источником флуоресценции. Поскольку количество ДНК в клетке во время профазы, прометафазы и метафазы не меняется, изменения «охватывающего» объема, получаемые в результате наших измерений, должны быть отнесены к изменениям количества кариоплазмы, окружающей хромосомы. Это дает возможность косвенно исследовать события, которые не обнаруживаются на уровне световой микроскопии, поскольку разворачиваются на расстояниях меньше длины волны света.

В разных повторах опыта абсолютная величина интенсивности флуоресценции DAPI варьировала, но во всех случаях можно было различить две группы ядер, отличающиеся между собой в 2 раза по интенсивности флуоресценции DAPI. Это ядра профазы, прометафазы и метафазы, характеризующиеся тетраплоидным количеством ДНК, и диплоидные ядра анафазы и телофазы. Поэтому далее интенсивность (I) флуоресценции DAPI и анти-H3-p-антител приведена в относительных единицах (отн. ед.), рассчитанных по формуле $I = I_i / I_{4n}$, где I_i — интенсивность флуоресценции ядра в любой, отдельно взятой клетке, I_{4n} — средняя величина интенсивности флуоресценции, определенная в клетках с тетраплоидным набором ДНК. Использование относительных единиц позволило учесть варьирование окрашивания ядер на разных препаратах и таким образом уменьшить ошибку метода. Это дало возможность изучить динамику содержания ДНК, ее пространственной упаковки и содержания фосфорилированного гистона H3 в ядре во всех фазах нормального и колхицинового митоза.

В контроле учтено 45 тетраплоидных ядер и 22 диплоидных. По использованным критериям 11 тетраплоидных ядер были отнесены к профазе, 4 — к прометафазе, 30 — к метафазе. Диплоидные ядра отнесены к анафазе. В К-митозе учтено 28 ядер. Статистическая обработка результатов выполнена согласно руководству (Урбах, 1963).

Результаты и обсуждение

Высокая скорость фосфорилирования гистона H3 в ранней стадии митоза. Принято считать, что начало фосфорилирования гистона H3 совпадает с началом митотической конденсации хроматина. Использованный нами метод флуориметрии позволяет детектировать уровень флуоресценции H3-p-гистона, соответствующий 0.1 отн. ед. (рис. 1). Однако, как и в предыдущем исследовании (Лебедева и др., 2010), среди ядер, которые по тетраплоидному содержанию ДНК потенциально можно было бы соотнести с профазой, не обнаружено ядер с флуоресценцией H3-p-гистона ниже 0.6 отн. ед. (рис. 1). Эти данные в совокупности с полученными нами ранее указывают на то, что в начальный период митотической конденсации хроматина имеет место относительно короткая по времени стадия, характеризующаяся избирательно высокой скоростью фосфорилирования гис-

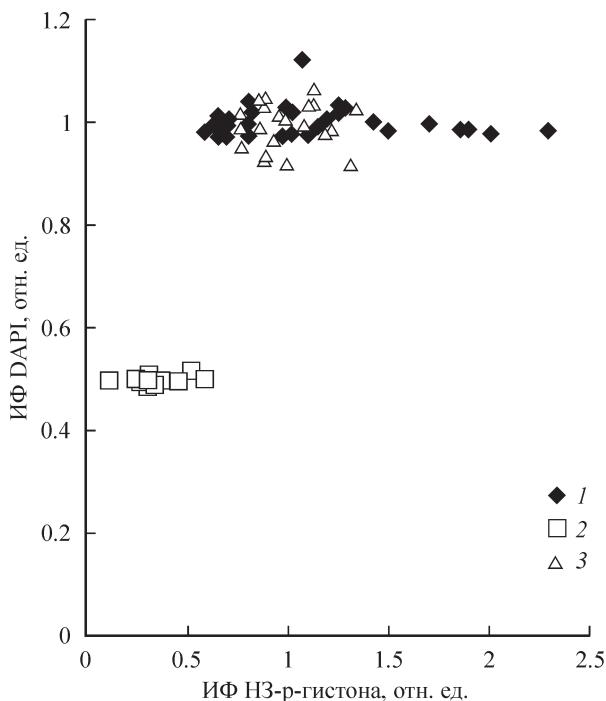


Рис. 1. Интенсивность флуоресценции (ИФ) DAPI как функция пloidности ядра и интенсивности флуоресценции H3-р-гистона (иллюстрируется отсутствие зависимости в последнем случае).

1 — профаза, прометафаза, метафаза и 2 — анафаза, 3 — К-митоз.

тона H3. В это время фосфорилируется примерно до 60 % фосфорилируемого в митозе гистона H3.

Динамика флуоресценции DAPI. Из данных, приведенных на рис. 1, видно, что интенсивность флуоресценции DAPI определяется только пloidностью ДНК. В тетраплоидных ядрах (в профазе, прометафазе и метафазе) она в 2 раза выше, чем в диплоидных полюсах анафазы. Среди ядер одной и той же пloidности величина интенсивности флуоресценции DAPI не зависит от интенсивности флуоресценции H3-р-гистона и остается постоянной. В тетраплоидных ядрах контроля она равна 1.00 ± 0.02 отн. ед., в диплоидных — 0.50 ± 0.01 и в ядрах К-митоза — 1.00 ± 0.04 отн. ед. Низкая величина стандартных отклонений позволяет исключить возможное влияние побочных факторов, в том числе паразитарной засветки H3-р-гистона в канале флуоресценции DAPI, на флуоресценцию DAPI.

Величина флуоресцентного объема DAPI (ФОД) тоже зависит от пloidности ядра, но не только (рис. 2). Две особенности характерны для ФОД. 1. В диплоидных ядрах анафазы величина ФОД не уменьшается адекватно уменьшению в 2 раза пloidности ядер по сравнению с тетраплоидными ядрами профазы—метафазы. В 30 % ядер, учтенных в анафазе, величина ФОД перекрывает с таковой в ядрах, учтенных в профазе—метафазе (рис. 2). 2. Величина ФОД изменяется в широких пределах среди ядер одной и той же пloidности: от 0.38 до 2.15 отн. ед. в профазе—метафазе, от 0.26 до 0.73 отн. ед. в анафазе. Изменения ФОД значительно превышают отмеченные выше величины стандартных отклонений интенсивности флуоресценции DAPI.

Мы определили ФОД как «охватывающий» объем, состоящий из двух компонентов — нуклеинового (НК) и

ненуклеинового (ННК). Физический объем, занимаемый молекулами ДНК, зависит только от пloidности ядра и не зависит от уровня компактизации хромосом. Отмеченный выше факт изменений величины ФОД указывает на изменения объема ННК. Одним из наиболее вероятных ННК, варьирующих в ходе митоза, мы предполагаем кариоплазму, замкнутую в петлях ДНК. В рамках этого предположения динамику ФОД в митозе можно следующим образом непротиворечиво объяснить изменениями числа и размера петель.

Известно, что митотическая конденсация хроматина начинается в профазе с момента начала фосфорилирования гистона H3 и укладки ДНК в относительно крупные петли. По ходу митоза число и размер петель увеличиваются до некоего максимального уровня, которому в нашем исследовании соответствует максимальная величина ФОД. Ранее (Лебедева и др., 2010) максимальный уровень ФОД мы наблюдали в прометафазе митоза. По аналогии с этими данными, в настоящем исследовании мы также соотнесли максимальный уровень ФОД с прометафазой. Свообразным «отрицательным» критерием прометафазы в контроле служило также отсутствие этой фазы при К-митозе. На рис. 3 к прометафазе отнесены ядра с ФОД 1.5—2.1 отн. ед. при интенсивности флуоресценции H3-р-гистона около 1 отн. ед.

Ядра, в которых ФОД был хотя и высоким, но ниже чем в прометафазе, и более низкой была интенсивность флуоресценции H3-р-гистона, отнесены нами к профазе. На рис. 3 это ядра с ФОД 0.9—1.5 отн. ед. и интенсивностью флуоресценции H3-р-гистона ниже 1 отн. ед. По полученным ранее данным (Лебедева и др., 2010), в метафазе начинается дефосфорилирование гистона H3. На рис. 3 видно, что в метафазе ФОД уменьшается по мере снижения флуоресценции H3-р-гистона. В рамках нашего

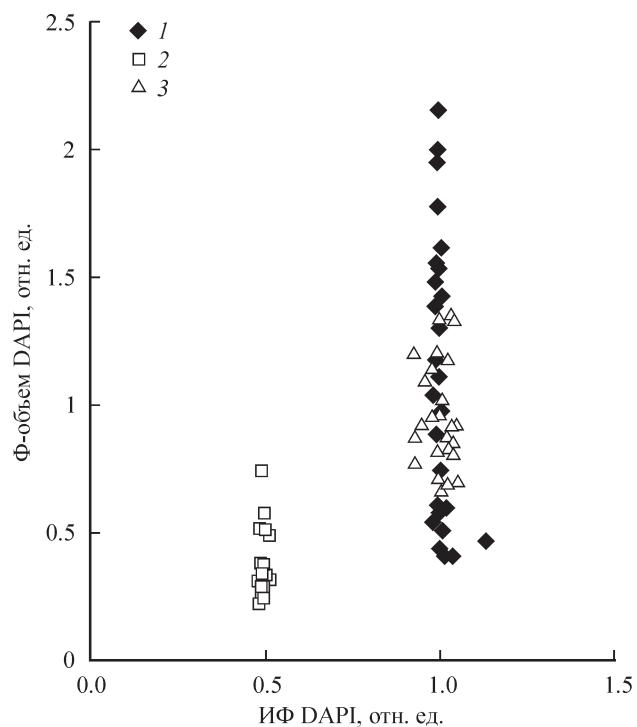


Рис. 2. Изменения величины флуоресцентного (Ф) объема DAPI в митозе.

1—3 — то же, что и на рис. 1.

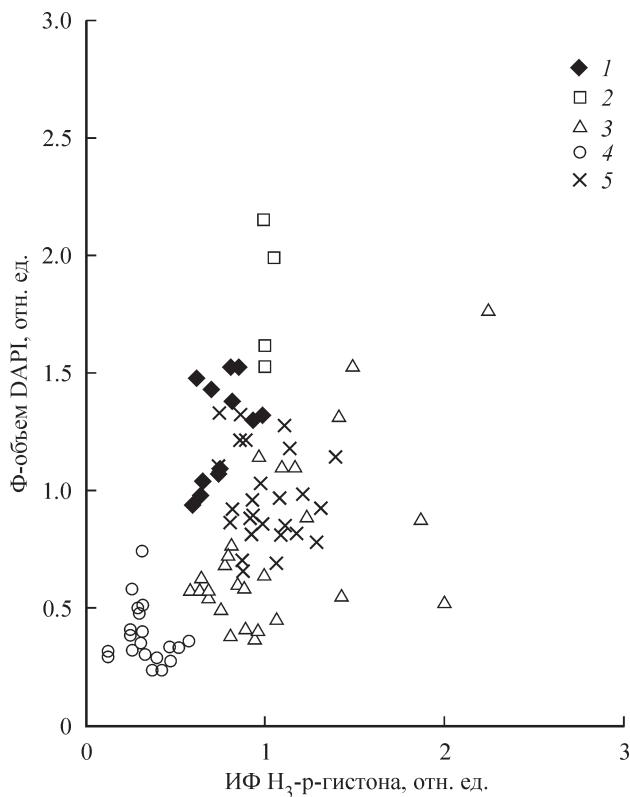


Рис. 3. Динамика флуоресцентного (Ф) объема DAPI в митозе. 1 — профаза, 2 — прометафаза, 3 — метафаза, 4 — анафаза, 5 — К-митоз.

предположения это означает, что уменьшается объем за-ключенной в петлях кариоплазмы.

Обособленно от «плотного облака», охватывающего результаты флуориметрических измерений подавляюще-го числа учтенных ядер, расположены результаты измере-ний шести ядер (рис. 3, справа). Для них характерен вы-сокий уровень флуоресценции H3-р-гистона. Условно ядра соотнесены с метафазой. Возможно, они принадле-жат к особому типу адэпителиальных клеток имагиналь-ного диска. Флуориметрические параметры этих ядер нуждаются в дополнительном изучении, поэтому далее они не обсуждаются нами.

В анафазе за время расхождения хромосом к полюсам ФОД увеличивается примерно в 2 раза (рис. 3). Предполо-жительно увеличивается объем кариоплазмы в петлях ДНК. Скорость этого процесса сопоставима со скоростью расхождения хромосом к полюсам.

Из совокупности приведенных выше данных следует, что в ходе последовательной компактизации хроматина во время митоза ФОД сначала увеличивается до макси-мального уровня в прометафазе, затем уменьшается до минимума в конце метафазы и снова увеличивается в ана-фазе. Иными словами, динамика упаковки ДНК в хрома-тине, выявляемая при флуориметрических измерениях, и известная из светомикроскопических исследований дина-мика компактизации хроматина в митозе различаются. Это дает нам основание заключить, что флуориметриче-ские измерения позволяют выявить уровень упаковки хроматина, лежащий за пределами разрешения световой микроскопии.

Участвует ли митотическое веретено в упаковке хромосом во время митоза? Три осо-

бенности характерны для делящихся клеток, обработан-ных колхицином. Первая особенность — отсутствие анафазы (рис. 2). Это хорошо известное последствие об-работки клеток цитостатиками. В наших опытах оно указы-вало на инактивацию митотического веретена. Вторая осо-бенность — отсутствие ядер в прометафазе с харак-терным для этой фазы высоким ФОД (рис. 3) или, что по су-ществу то же самое, отсутствие ядер с низкой объемной плотностью флуоресценции DAPI (рис. 4). Это означает, что для прометафазы нормального митоза характерен не-кий специфический уровень упаковки ДНК, который не реализуется при инактивации митотического веретена колхицином, что дает основание предположить участие веретена в упаковке ДНК на ранних стадиях митоза. Тре-тья особенность — отсутствие ядер с низким ФОД (рис. 3), т. е. с высокой плотностью упаковки ДНК (рис. 4), характерной для завершающей стадии метафазы нормального митоза. Это может означать, что реализация высоких уровней упаковки ДНК в конце митоза тоже кон-тролируется митотическим веретеном.

Таким образом, сравнительный количественный ана-лиз динамики флуоресценции DAPI в нормальном и кол-хициновом митозе позволил обнаружить специфиче-ские уровни митотической упаковки хроматина, кото-рые реализуются при активном функционировании митотического веретена. Предположение об участии ве-ретена в митотической упаковке ДНК мы надеемся прове-рить при исследовании динамики текстуры ДНК, резуль-таты которого будут представлены в следующем сооб-щении.

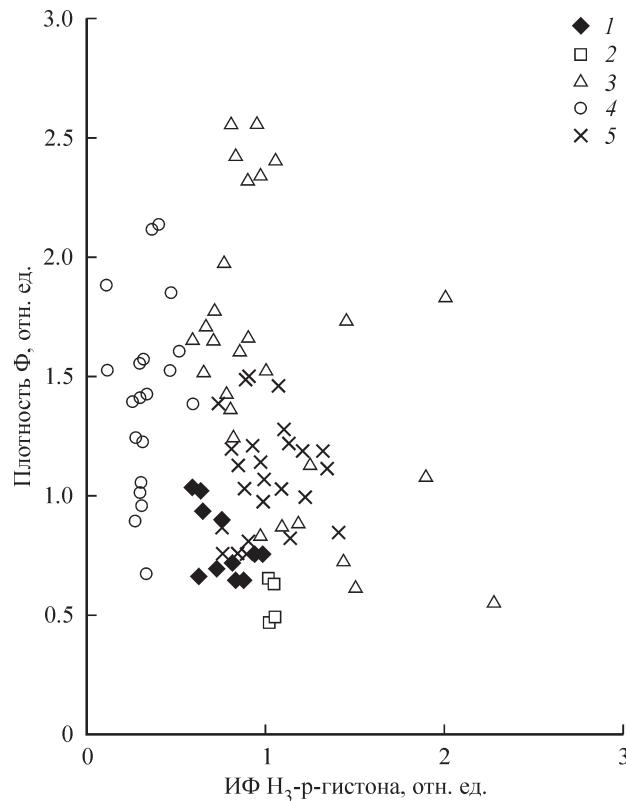


Рис. 4. Динамика объемной плотности флуоресценции DAPI в митозе.

Объемная плотность флуоресценции DAPI как функция интенсивности флуоресценции H3-р-гистона (иллюстрируется отсутствие таковой). 1—5 — то же, что и на рис. 3.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российской фонда фундаментальных исследований (проект 08-04-00265-а).

Список литературы

- Лебедева Л. И., Ахмаметьева Е. М., Омельянчук Л. В. 2010. Динамика пространственной организации хромосомного набора в клетках имагинальных дисков *Drosophila melanogaster* в норме и при действии опухолеродной мутации *Merlin*. Генетика. 46 (2) : 180—186.
- Урбах Б. Ю. 1963. Математическая статистика для биологов и медиков. М.: Изд. АН СССР. 323 с.
- Hirano T. 2000. Chromosome cogenesis, condensation, and separation. Annu. Rev. Biochem. 69 : 115—144.
- Hsu J. Y., Sun Z. W., Li X., Rouben M., Tatchell K., Bishop D. K., Grushcow J. M., Brame C. J., Culdwell J. A., Hunt D. F., Lin R., Smith M. M., Alles C. D. 2000. Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ip11/aurora kinase and glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes. Cell. 102 : 279—291.
- Losada A., Hirano T. 2001. Shaping the metaphase chromosome: coordination of cohesion and condensation. BioEssays. 23 : 924—936.
- Speliotes E. K., Uren A., Vaux D., Horvitz H. R. 2000. The surviving-like *C. elegans* DIR-1 protein acts with the aurora-like kinase AIR-2 to control chromosome behavior and spindle midzone organization. Mol. Cell. 6 : 211—223.
- Wei Y. Yu. I., Bowen J., Gorovsky M. A., Allios C. D. 1999. Phosphorylation of histone H3 is required to proper chromosome condensation and segregation. Cell. 97 : 99—109.

Поступила 22 IV 2010

FLUOROMETRIC IDENTIFICATION OF CHROMATIN PACKING LEVEL LAYING OUT OF THE LIGHT MICROSCOPY RESOLUTION

L. I. Lebedeva,¹ T. D. Dubatolova,¹ L. V. Omelyanchuk,^{1,2}

¹ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS Novosibirsk
and ² Novosibirsk State University;
e-mail: ome@mcb.nsc.ru

Confocal microscopy permits to perform quantitative analysis of the fluorescent signals of the nuclei. We determined the level of DAPI and phosphorylated histone-H3 fluorescence, the volume of DAPI and phosphorylated histone-H3 fluorescence in normal (*Hikone AW*) and colchicine treated third instar *Drosophila melanogaster* wing imaginal disc mitotic cells. Our analysis permitted to identify two unknown levels of chromatin package; one in the prometaphase and another at the end of metaphase. These levels disappeared in colchicine treated mitoses. We conclude that quantitative analysis of confocal images is able to detect the differences in chromatin package laying over the resolution of light microscopy.

Key words: confocal microscopy, fluorescence, H3-p-histone, DAPI, *Drosophila melanogaster*, imaginal disc.