

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ХАРАКТЕРА ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО МЕЧЕНИЯ ЯДЕР РАННИХ ЭМБРИОНОВ МЫШИ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ АНТИТЕЛ К РАЗЛИЧНЫМ УЧАСТКАМ МОЛЕКУЛЫ АКТИНА

© И. О. Боголюбова

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;
электронный адрес: ibogol@mail.ru*

Представлены новые данные об особенностях иммунофлуоресцентного выявления ядерного актина в двухклеточных эмбрионах мыши при использовании флуоресцентномеченных антител к С- и N-концевому домену молекулы. Изучено перераспределение актина при искусственном ингибировании транскрипции, а также после ферментативного расщепления ДНК. Визуальные наблюдения дополнены сравнительным количественным анализом интегральной интенсивности флуоресценции на конфокальных изображениях. В обеих экспериментальных группах как при использовании ингибиторов транскрипции, так и после обработки эмбрионов ДНКазой выявлено увеличение интенсивности флуоресценции по сравнению с контролем при использовании антител к С-концевому домену, но не к N-концевому домену актина. Полученные данные позволяют предположить, что антитела к С-концевому домену молекулы актина более эффективны при иммунофлуоресцентном выявлении актина в ядрах дробящихся эмбрионов мыши.

Ключевые слова: доимплантационные зародыши мыши, ядерный актин, транскрипция, лазерная сканирующая конфокальная микроскопия.

Несмотря на то что первые сообщения о выявлении ядерного актина (Clark, Rosenbaum, 1979; Nakayasu, Ueda, 1983; Парфенов, Галактионов, 1987) были встречены достаточно скептически, исследования последних десятилетий подтвердили присутствие актина в клеточном ядре. Более того, продемонстрировано участие актина в целом ряде ядерных функций, включая регуляцию основных этапов экспрессии генов (см. обзоры: Hofmann, 2009; Visa, Percipalle, 2010). К сожалению, сведения о месте и роли актина в пространственной организации клеточного ядра остаются немногочисленными. Объясняется это тем, что большинство экспериментальных данных о функциональной роли ядерного актина получено с использованием биохимических и молекулярно-биологических методик, зачастую в бесклеточных системах, тогда как визуализация актина в клеточном ядре с использованием классических морфологических подходов по ряду причин затруднена. Прежде всего, это связано с тем, что антитела к молекуле актина обладают высокой избирательностью и, по-видимому, выявляют различные формы ядерного актина (Milankov, De Boni, 1993; Gonsior et al., 1999). При этом данная избирательность наблюдается только в экспериментах с использованием непрямой иммунофлуоресценции, тогда как при использовании других молекулярно-биологических методик (например, иммуноблоттинга) те же антитела выявляют все изоформы актина (Gonsior et al., 1999). Описаны также случаи, когда разные антитела к актину успешно окрашивают клеточные ядра, однако наблюдаемые паттерны мечения различаются, как в случае с антителами 2G2 и 1C7 (Gonsior et al., 1999; Schoenberger et al., 2005). Наиболее вероятной гипотезой,

объясняющей данную ситуацию, можно считать возможность существования нескольких структурно-функциональных конформаций ядерного актина (Gonsior et al., 1999; Pederson, Aebi, 2005).

Ранее нами также были продемонстрированы существенные различия в паттернах окрашивания при использовании антител, полученных к С- и N-концевым фрагментам молекулы актина (Боголюбова, Боголюбова, 2009). На основании полученных ранее результатов было выдвинуто предположение о том, что данные антитела избирательно выявляют в ядрах эмбрионов две функционально различные формы олигомерного актина.

Цель настоящей работы заключалась в получении новых данных о возможном вовлечении выявляемых подобным образом функциональных форм ядерного актина в процессы транскрипции и пространственной организации хроматина. Для этого мы изучили изменение паттерна иммунофлуоресцентного окрашивания ядерного актина в двухклеточных эмбрионах мыши при искусственном ингибировании транскрипции и после ферментативного расщепления ДНК.

Материал и методика

Получение эмбрионов. Работа выполнена на мышцах BALB/c из питомника РМН «Рапполово» (Санкт-Петербург). Для получения животных с датированным сроком беременности у самок индуцировали овуляцию последовательными однократными инъекциями сывороточного (Folligon, Intervet, Голландия) и хориони-

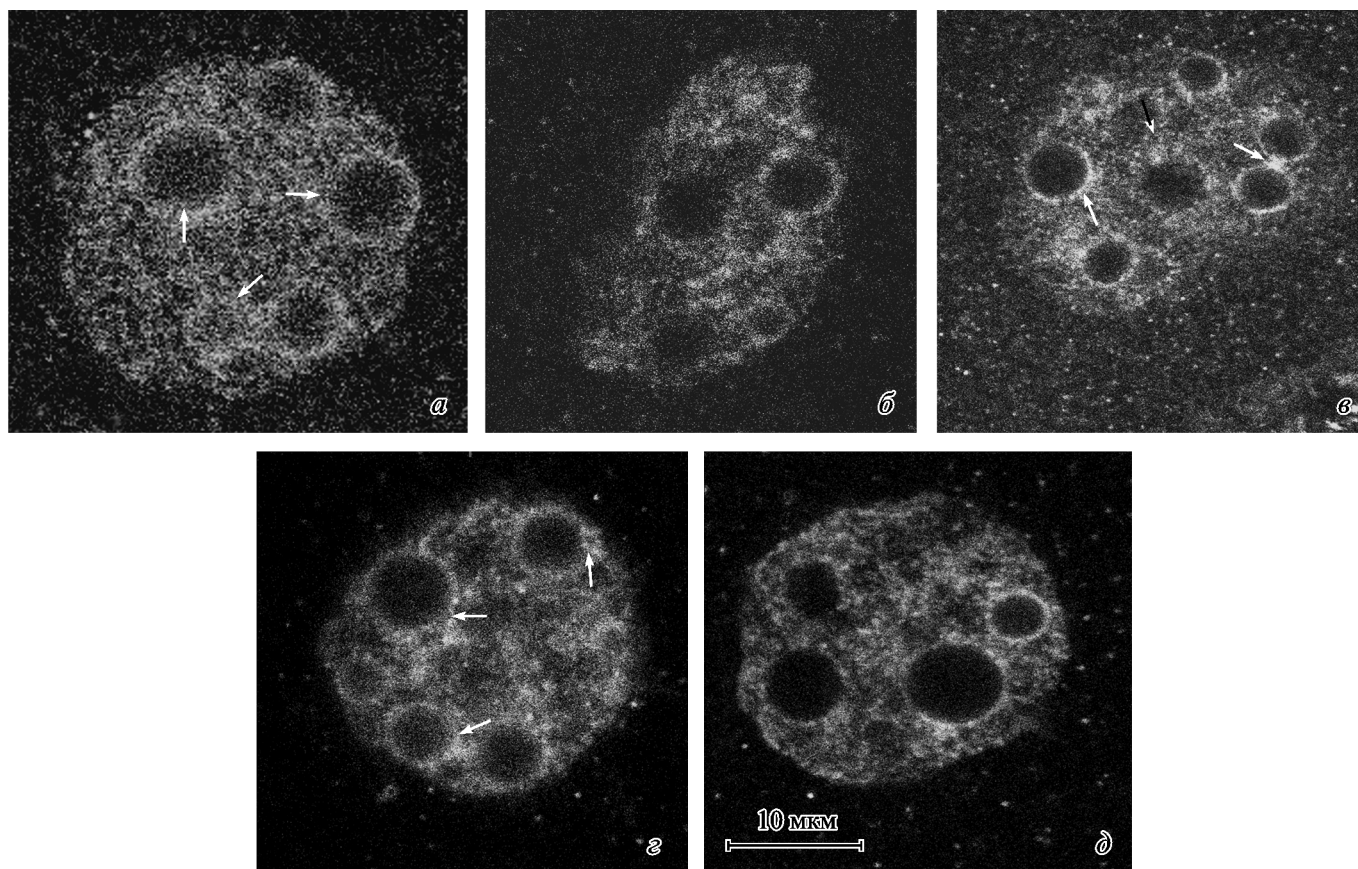


Рис. 1. Локализация актина в ядрах двухклеточных эмбрионов мыши при использовании антител к С-концевому домену.

Эмбрионы: *a* — контрольные, *b* — обработанные ДНКазой, *в* — после культивирования с 5,6-дихлор-1-β-Д-рибофуранозилбензимидазолом (DRB), *г* — после культивирования с актиномицином D, *д* — после культивирования с актиномицином D с последующей обработкой ДНКазой. Стрелками показано мечение на периферии проядрышек, интенсивность которого возрастает после искусственного подавления транскрипции и снижается после обработки эмбрионов ДНКазой.

ческого (Chorulon, Intervet, Голландия) гонадотропинов по 5—10 МЕ на животное с интервалом между инъекциями 44—48 ч. Возраст зародышей отсчитывали от времени инъекции хорионического гонадотропина. Эмбрионы извлекали из яйцеводов через 46 ч после инъекции хорионического гонадотропина в среду F10, содержащую NERES (25 мМ, pH 7.2—7.4). Для дальнейшей работы использовали зародыши, не имевшие видимых морфологических дефектов.

Для ингибирования транскрипции эмбрионы культивировали в CO₂-инкубаторе в стандартных условиях в течение 3 ч в среде M3 (Whittingham, 1971), содержащей 5,6-дихлор-1-β-Д-рибофуранозилбензимидазол (DRB; BIOMOL Research Labs) в концентрации 500 мкМ, или в течение 1 ч в среде M3, содержащей актиномицин D (Sigma, США) в концентрации 5 мкг/мл.

Иммунофлуоресцентная микроскопия. Использовали поликлональные кроличьи антитела, выработанные против фрагмента С-концевого домена молекулы актина (A 2066, Sigma, США) (разведение 1 : 100), либо поликлональные кроличьи антитела, выработанные против фрагмента N-концевого домена молекулы актина (A 2103, Sigma, США) (разведение 1 : 200). Специфичность связывания антител была проверена с помощью иммуноблоттинга. В качестве вторых антител использовали козы антитела против иммуноглобулинов кролика, конъюгированные с FITC (Sigma, США). Эмбрионы фиксировали в течение 40—60 мин в 4%-ном растворе пара-

формальдегида на PBS при комнатной температуре, после чего отмывали в трех порциях PBS. Далее клетки пермеабелизировали в 0.5%-ном растворе Тритона X-100 на PBS в течение 10 мин с последующей трехкратной отмывкой в PBS и 10-минутной инкубацией в 10%-ном растворе эмбриональной сыворотки на PBS для предотвращения неспецифического связывания антител. Затем эмбрионы помещали в раствор первых антител и инкубировали при 4 °С не менее 12 ч. После отмывки в PBS и 10-минутной инкубации в эмбриональной сыворотке зародыши помещали в раствор вторых антител на 60 мин при комнатной температуре. После отмывки в PBS эмбрионы заключали в среду VectaShield (Vector Laboratories, США). Анализ препаратов проводили с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа Leica TSC SL. В качестве контрольных использовали эмбрионы, обработанные только вторыми антителами. Обработку ДНКазой (0.5 МЕ/мкл, Sigma, США) проводили в течение 1 ч при 37 °С.

Интегральную интенсивность флуоресценции и на конфокальных изображениях определяли с помощью программы ImageJ. На каждом оптическом срезе производили замеры на 5 фрагментах ядра и 5 фрагментах фона вне клетки. Из каждой серии конфокальных изображений подобным образом анализировали по 5 оптических срезов. Затем данные усредняли и рассчитывали отношение интенсивности флуоресценции ядра к интенсивности фона. Для каждой экспериментальной

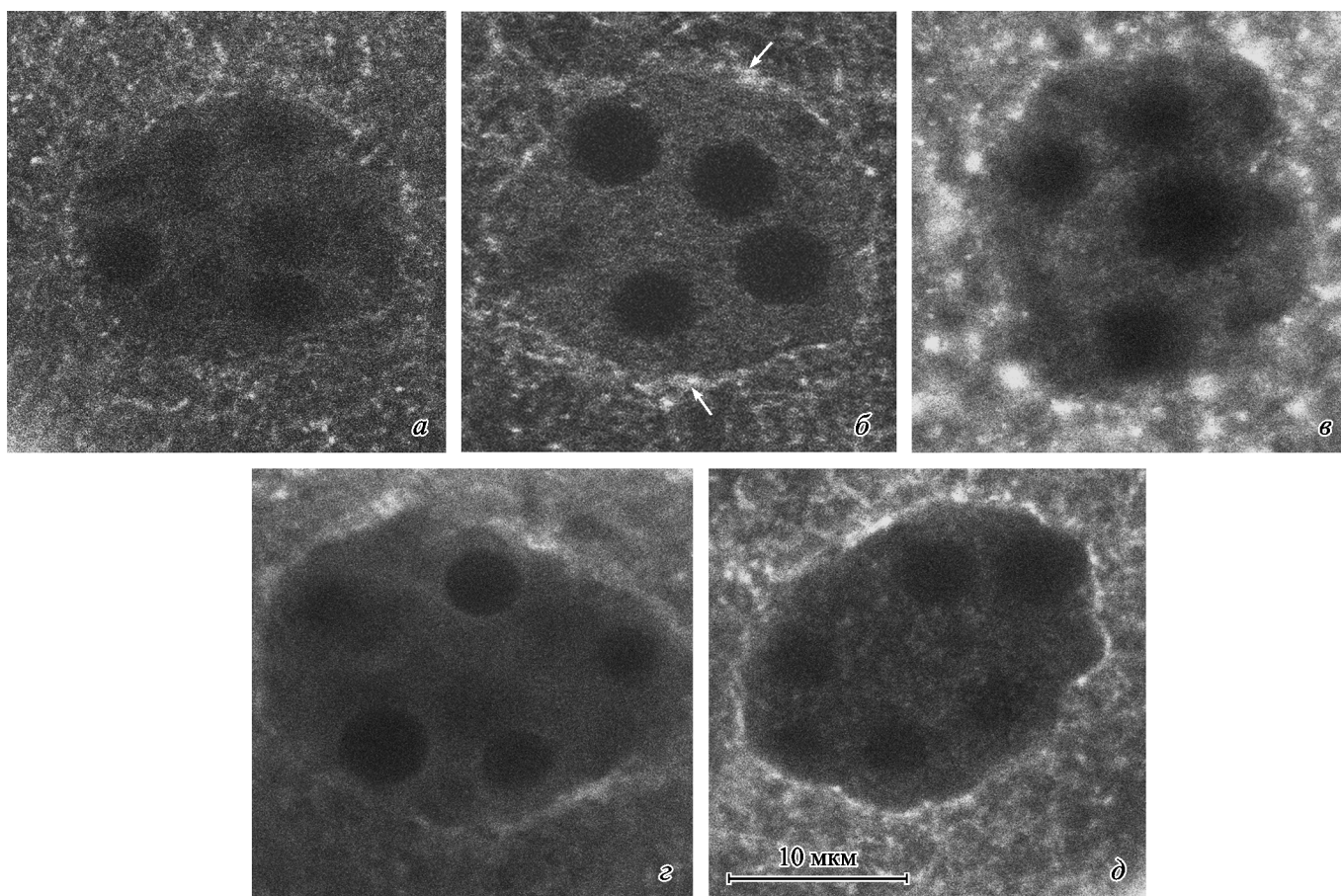


Рис. 2. Локализация актина в ядрах двухклеточных эмбрионов мыши при использовании антител к N-концевому домену. Эмбрионы: *a* — контрольные, *б* — культивированные 3 ч *in vitro*, *в* — обработанные ДНКазой, *г* — после культивирования с DRB, *д* — после культивирования с актиномицином D. Стрелками показано мечение околоядерной зоны цитоплазмы, возникающее при культивировании эмбрионов *in vitro*.

группы анализировали не менее 30 эмбрионов. Для подтверждения достоверности разницы между выборками использовали *t*-критерий Стьюдента.

Результаты

Как описано ранее (Боголюбова, Боголюбова, 2009; Боголюбова, Парфенов, 2012), при использовании антител к С-концевому домену молекулы актина интенсивность окрашивания ядер эмбрионов мыши выше, чем интенсивность окрашивания цитоплазмы, при этом обращает на себя внимание ассоциация актина с периферией проядрышек (рис. 1, *a*). При культивировании контрольных эмбрионов в течение 3 ч *in vitro* характер мечения не изменяется (не показано). При обработке эмбрионов ДНКазой окрашивание ядер антителами к С-концевому домену молекулы актина сохраняется, однако характер его несколько видоизменяется (рис. 1, *б*). Прежде всего, значительно снижается интенсивность мечения на периферии проядрышек. Распределение актина в нуклеоплазме приобретает менее диффузный характер, в ряде случаев можно наблюдать появление отдельных областей более интенсивного мечения. Следует также отметить, что в большинстве случаев ядра эмбрионов, обработанных ДНКазой, теряют округлую форму (рис. 1, *б*).

При ингибировании транскрипции как с помощью DRB (рис. 1, *в*), так и с помощью актиномицина D (рис. 1,

г) обращает на себя внимание усиление флуоресценции на периферии проядрышек. При этом меняется не только ее визуальная интенсивность, но и сам характер мечения. Вблизи проядрышек начинают выявляться многочисленные плотные округлые области более интенсивной флуоресценции (рис. 1, *в*, *г*). После обработки ДНКазой количество подобных структур и интенсивность их флуоресценции уменьшаются (рис. 1, *д*). Сходные по форме и размерам структуры в большом количестве встречаются и в центральных областях нуклеоплазмы (рис. 1, *д*), которая полностью теряет диффузный характер мечения, наблюдаемый в контроле (рис. 1, *a*).

После окрашивания контрольных эмбрионов антителами, выработанными к N-концевому домену молекулы актина (рис. 2, *a*), напротив, как уже сообщалось, интенсивность флуоресценции цитоплазмы выше, чем ядра (Боголюбова, Боголюбова, 2009). Мечение нуклеоплазмы имеет мелкодисперсный характер, ассоциация выявляемого актина с периферией проядрышек не выражена. При культивировании эмбрионов в течение 3 ч *in vitro* паттерн мечения нуклеоплазмы не меняется, однако в области цитоплазмы, пограничной с ядром, мечение становится более интенсивным (рис. 2, *б*), чего никогда не наблюдается у контрольных эмбрионов, развивающихся *in vivo*. При обработке эмбрионов ДНКазой также отмечается изменение формы ядер, однако какого-либо изменения паттерна окрашивания нами не выявлено (рис. 2, *в*). При искусственном подавлении транскрипционной активности неза-

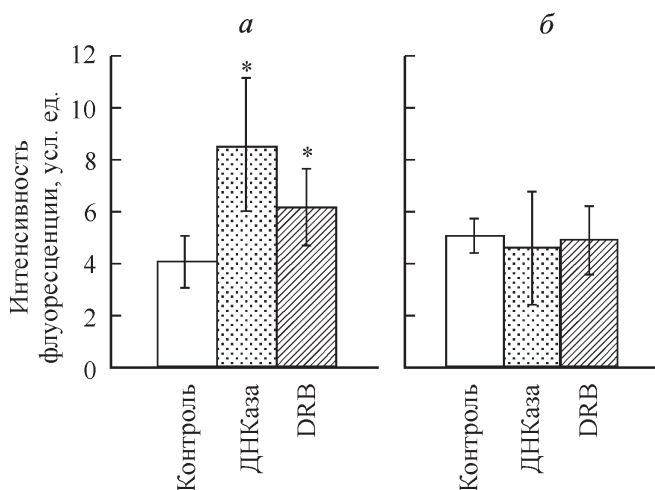


Рис. 3. Изменение интенсивности флуоресценции ядер двухклеточных эмбрионов мыши на конфокальных изображениях после воздействия DRB и ДНКазы.

а — антитела к С-концевому домену молекулы актина, *б* — антитела к N-концевому домену молекулы актина. Вертикальные отрезки соответствуют границам доверительных интервалов для уровня значимости 0.05. Звездочками обозначены значения, достоверно отличающиеся от контроля.

висимо от использованного ингибитора также не наблюдается изменения характера флуоресцентного мечения нуклеоплазмы (рис. 2, з, д). Отмечается только уже описанная выше флуоресценция околядерной области цитоплазмы, что, как показывают контрольные эксперименты, связано с условиями *in vitro*, а не с действием ингибиторов транскрипции.

В дополнение к визуальным наблюдениям нами был проведен сравнительный анализ интегральной интенсивности флуоресценции на конфокальных изображениях (рис. 3). После ингибирования транскрипции с помощью DRB в случае использования антител к N-концевому домену изменений интенсивности флуоресценции ядер эмбрионов по сравнению с контролем не выявлено (4.69 ± 0.57 и 4.89 ± 0.30 соответственно). При использовании антител к С-концевому домену выявлено существенное увеличение интенсивности флуоресценции по сравнению с контролем (6.23 ± 0.66 и 4.10 ± 0.46 соответственно). Интенсивность флуоресценции ядер, меченных с помощью антител к N-концевому домену, не менялась после обработки эмбрионов ДНКазой (4.42 ± 0.76 против 4.89 ± 0.30 в контроле). Напротив, интенсивность флуоресценции ядер, окрашенных с помощью антител к С-концевому домену, увеличивалась после обработки ДНКазой по сравнению с контролем почти в 2 раза (8.62 ± 0.98 и 4.10 ± 0.46 соответственно).

Обсуждение

Следует отметить, что подавляющая часть исследований, в центре внимания которых находится ядерный актин, проводится на культурах соматических клеток с применением в первую очередь биохимических и молекулярно-биологических методик. Поэтому, несмотря на активные исследования роли актина в процессах ядерного метаболизма, данные о распределении этого белка в системе трехмерной ядерной архитектоники эмбрионов или ооцитов млекопитающих остаются крайне скудными

и разрозненными (Nguyen et al., 1998; Johnson et al., 2003; Bohnsack et al., 2006; Боголюбова, Боголюбова, 2009; Боголюбова, Парфенов, 2012).

Для соматических клеток млекопитающих убедительно продемонстрировано участие актина в процессах транскрипции, в том числе с участием РНК-полимеразы II (Miralles, Visa, 2006; Obrdlik et al., 2007; Pederson, 2008; Hofmann 2009; Visa, Percipalle, 2010). Что касается сведений о перераспределении актина в условиях снижения транскрипционной активности, то они крайне немногочисленны. В частности, показано появление в ядре сети актиновых филаментов при искусственном подавлении транскрипции в ооцитах амфибий (Scheer et al., 1984). Имеются сведения о накоплении актина в кластерах интерхроматиновых гранул в аналогичных условиях (Wang et al., 2006). В нашей работе изменение внутриядерного паттерна распределения актина при искусственном подавлении транскрипции можно было наблюдать при использовании антител к С-концевому, но не к N-концевому домену молекулы актина. При использовании DRB и актиномицина D — ингибиторов транскрипции с разными механизмами действия (Perry, Kelley, 1970; Sehgal et al., 1976; Zandomeni, Weinmann, 1984) — распределение актина в ядрах эмбрионов изменялось сходным образом. В обоих случаях отмечалась концентрация актина в зонах, ассоциированных с периферией проядрышек. На соматических клетках млекопитающих было показано, что при естественном замедлении процессов транскрипции (в состоянии зимней спячки) имеет место тесное взаимодействие между тельцами Кахала и ядрышками (Malatesta et al., 1994). Проядрышки — своеобразные структуры, характерные для ранних стадий развития млекопитающих, впоследствии дающие начало транскрипционно активным ядрышкам (Fléchon, Koresny, 1998). Кроме того, продемонстрировано их участие в процессах биогенеза телец Кахала (Ferreira, Carmo-Fonseca, 1995). Не исключено, что спектр функций этих ядерных доменов значительно шире, чем предполагается сегодня.

Тесное функциональное взаимодействие актина с хроматином продемонстрировано в целом ряде работ, прежде всего на соматических клетках млекопитающих (Papoulas et al., 1998; Zhao et al., 1998; Shen et al., 2000; Hofmann, 2009; Visa, Percipalle, 2010). Можно было ожидать, что при обработке препаратов ДНКазой интенсивность мечения ядерного актина будет снижаться за счет удаления пула молекул, находящихся в прямой ассоциации с ДНК. Однако мы наблюдали прямо противоположный результат: интенсивность мечения актина при использовании антител к С-концевому домену молекулы увеличивалась. Данное наблюдение можно объяснить тем, что в нативном состоянии часть молекул актина, находящихся в прямом взаимодействии не с ДНК, а с белками хроматина, может быть закрыта для взаимодействия с антителами. При удалении ДНК сайты связывания становятся более доступными для действия антител, и интенсивность мечения возрастает.

В заключение следует отметить, что все наблюдаемые изменения распределения актина в ядрах эмбрионов отмечались только при использовании антител к С-концевому домену молекулы. Ранее мы предполагали, что антитела к С- и N-концевому доменам молекулы актина выявляют разные функциональные формы актина, находящиеся в функциональных взаимосвязях с хроматином и с аппаратом транскрипции соответственно (Боголюбова, Боголюбова, 2009). Данные, полученные в настоящей

работе, свидетельствуют против данного предположения. Более вероятно, что, несмотря на сходную интенсивность связывания данных антител с актином на иммуноблотах (Боголюбова, Парфенов, 2012), антитела к N-концевому домену в силу своих физико-химических особенностей обладают меньшей способностью связываться с ядерным актином при мечении тотальных препаратов эмбрионов мыши.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 10-04-00757) и программы РАН «Молекулярная и клеточная биология».

Список литературы

- Боголюбова Н. А., Боголюбова И. О. 2009. Локализация актина в ядрах двухклеточных зародышей мыши. Цитология. 51 (8) : 663—669.
- Боголюбова И. О., Парфенов В. Н. 2012. Особенности иммунофлуоресцентного выявления ядерного актина в ранних эмбрионах мыши. Цитология. 54 (7) : 541—548.
- Парфенов В. Н., Галактионов К. И. 1987. Внутрядерные актиновые микрофиламенты в ооцитах травяной лягушки. Цитология. 29(2) : 142—149.
- Bohnsack M. T., Stuken T., Kuhn C., Cordes V. C, Golrich D. 2006. A selective block of nuclear actin export stabilizes the giant nuclei of *Xenopus* oocytes. Nat. Cell Biol. 8 : 257—263.
- Clark T. G., Rosenbaum J. L. 1979. An actin filament matrix in hand-isolated nuclei of *X. laevis* oocytes. Cell. 18 : 1101—1108.
- Ferreira J., Carmo-Fonseca M. 1995. The biogenesis of the coiled body during early mouse development. Development. 121 : 601—612.
- Fléchon J. E., Kopecny V. 1998. The nature of the «nucleolus precursor body» in early preimplantation embryos: a review of fine-structure cytochemical, immunocytochemical and autoradiographic data related to nucleolar function. Zygote. 6 : 183—191.
- Gonsior S. M., Platz S., Buchmeier S., Scheer U., Jockusch B. M., Hinssen H. 1999. Conformation difference between nuclear and cytoplasmic actin as detected by a monoclonal antibody. J. Cell Sci. 112 : 797—809.
- Hofmann W. A. 2009. Cell and molecular biology of nuclear actin. Int. Rev. Cell Mol. Biol. 273 : 219—263.
- Johnson N., Krebs M., Boudreau R., Giorgi G. et al. 2003. Actin-filled nuclear invaginations indicate degree of cell de-differentiation. Differentiation. 71 : 414—424.
- Malatesta M., Zancanaro C., Tamburini M., Martin T. E., Fu X. -D., Vogel P., Fakan S. 1994. Is the coiled bodies involved in nucleolar function? Exp. Cell Res. 211 : 415—419.
- Milankov K., De Boni U. 1993. Cytochemical localization of actin and myosin aggregates in interphase nuclei *in situ*. Exp. Cell Res. 209 : 189—195.
- Miralles F., Visa N. 2006. Actin in transcription and transcription regulation. Curr. Opin. Cell Biol. 18 : 261—266.
- Nakayasu H., Ueda K. 1983. Association of actin with the nuclear matrix from bovine lymphocytes. Exp. Cell Res. 143 : 55—62.
- Nguyen E., Besombes D., Debey P. 1998. Immunofluorescent localization of actin in relation to transcription sites in mouse nuclei. Mol. Reprod. Develop. 50 : 263—272.
- Obrdlik A., Kukalev A., Percipalle P. 2007. The function of actin in gene transcription. Histol. Histopathol. 22 : 1051—1055.
- Papoulas O., Beck S. J., Moseley S. L., McCallum C. M., Sarthe M., Shearn A., Tamkun J. W. 1998. The *Drosophila trithorax* group proteins BRM, ASH1 and ASH2 are subunits of distinct protein complexes. Development. 125 : 3955—3966.
- Pederson T. 2008. As functional nuclear actin comes into view, is it globular, filamentous, or both? J. Cell Biol. 180 : 1061—1064.
- Pederson T., Aebi U. 2005. Nuclear actin extends, with no contraction in sight. Mol. Biol. Cell. 16 : 5055—5060.
- Perry R. P., Kelley D. E. 1970. Inhibition of RNA synthesis by actinomycin D: characteristic dose — response of different RNA species. J. Cell. Physiol. 76 : 127—139.
- Schoenenberger C. A., Buchmeier S., Boerries M., Sutterlin R., Aebi U., Jockusch B. M. 2005. Conformation-specific antibodies reveal distinct actin structures in the nucleus and the cytoplasm. J. Struct. Biol. 152 : 157—168.
- Sehgal P. B., Derman E., Molloy G. R., Tamm I., Darnell J. E. 1976. 5,6-Dichloro-1-Beta-D-ribofuranosylbenzimidazole inhibits initiation of nuclear heterogeneous RNA chains in HeLa cells. Science. 194 : 431—433.
- Sheer U., Hinssen H., Franke W. W., Jockusch B. M. 1984. Microinjection of actin-binding proteins and actin antibodies demonstrate involvement of nuclear actin in transcription of lampbrush chromosomes. Cell. 39 : 111—122.
- Shen X., Mizuguchi G., Hamiche A., Wu C. 2000. A chromatin remodelling complex involved in transcription and RNA processing. Nature. 406 : 541—544.
- Visa N., Percipalle P. 2010. Nuclear functions of actin. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2 : a000620.
- Wang I.-F., Chang H. -Y., Shen C. -K. J. 2006. Actin-based modeling of a transcriptionally competent nuclear substructure induced by transcription inhibition. Exp. Cell Res. 312 : 3799—3807.
- Whittingham D. G. 1971. Culture of mouse ova. J. Reprod. Fertil. Suppl. 14 : 7—21.
- Zandomeni R., Weinmann R. 1984. Inhibitory effect of 5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole on a protein kinase. J. Biol. Chem. 259 : 14 804—14 811.
- Zhao K., Wang W., Rando O. J., Xue Y., Swiderek K., Kuo A., Cradtree G. R. 1998. Rapid and phosphoinositol-dependent binding of the SWI/SNF-like BAF complex to chromatin after T-lymphocyte receptor signalling. Cell. 95 : 625—636.

Поступила 2 VII 2012

A COMPARATIVE STUDY OF FLUORESCENT PATTERNS IN THE NUCLEI OF EARLY MOUSE EMBRYOS USING ANTIBODIES AGAINST DIFFERENT DOMAINS OF THE ACTIN MOLECULE

I. O. Bogolyubova

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg; mail: ibogol@mail.ru

In this work, new data on the peculiarities of actin immunofluorescent detection in 2-cell mouse embryos using antibodies against C- and N-terminal domains are presented. We studied the distribution of nuclear actin after artificial suppression of transcription and after enzymatic digestion of DNA. The visual observations were

supplemented with morphometric analyses of confocal images. In both experimental groups (treated by transcription inhibitors or DNase) the reliable increasing of fluorescence intensity is revealed when antibody against C-, but not against N-terminal domain of actin was used. These finding allows to suppose that antibody against C-terminal domain of actin is suitable with a high efficiency for immunofluorescent studies on the nuclei of cleavage mouse embryo.

Key words: preimplantation mouse embryos, nuclear actin, transcription, laser scanning confocal microscopy.
