СТРЕССОВЫЕ ГРАНУЛЫ В КЛЕТКАХ С ИНТАКТНЫМИ ИЛИ РАЗРУШЕННЫМИ МИКРОТРУБОЧКАМИ: АНАЛИЗ С ПОМОЩЬЮ

© А. А. Саблина,¹ Е. М. Чудинова,² Е. С. Надеждина,² П. А. Иванов³

НОВОГО АЛГОРИТМА ОБРАБОТКИ ВИДЕОИЗОБРАЖЕНИЙ

¹Факультет биоинженерии и биоинформатики

Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, ² ФГБУН Институт белка РАН, Пущино-на-Оке, и

³ Биологический факультет Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, ² электронный адрес: chudiel@mail.ru

Стрессовые гранулы (СГ) — временные РНП-структуры, возникающие в клетках при стрессе. Для их изучения применяют в основном флуоресцентно-микроскопические методы с последующим количественным анализом клеточных изображений. Нами разработан новый алгоритм автоматического выявления СГ на неравномерном фоне цитоплазмы культивируемых животных клеток. С помощью этого алгоритма получены данные, свидетельствующие об образовании видимых СГ в клетках по принципу «все или ничего» и об относительном постоянстве их количества в клетках. Также показано, что разрушение клеточных микротрубочек приводит к уменьшению среднего размера СГ и увеличению их количества в клетке.

Ключевые слова: стрессовые гранулы, иммунофлуоресцентная микроскопия, анализ изображений, микротрубочки, РНП.

Стрессовые гранулы (СГ) — скопления РНП в цитоплазме животных клеток, наблюдающиеся после воздействия стрессовых факторов, например теплового шока, окислительного стресса и ультрафиолетового облучения (см. обзоры: Иванов, Надеждина, 2006; Thomas et al., 2011). После прекращения стрессирующего воздействия СГ рассасываются. В состав СГ входят мРНК, большое количество РНК-связывающих белков, факторы инициации трансляции eIF1, eIF3, eIF4F и малая рибосомная субъединица. Большая рибосомная субъединица, а также факторы инициации трансляции eIF5 и eIF2 исключаются из СГ. Предполагается, что образование СГ является следствием ингибирования трансляции на стадии инициации, в частности за счет фосфорилирования eIF2α. В результате этого фосфорилирования в клетке резко снижается количество тройственного комплекса и на 5'-концах мРНК собирается неканонический инициаторный комплекс, не содержащий тройственного комплекса. Получающиеся мРНП-частицы объединяются в цитоплазме в СГ (Kedersha et al., 2002). Несмотря на достаточно интенсивные исследования, механизмы объединения РНП при образовании СГ и биологический смысл образования СГ в клетках остаются непонятными.

СГ являются очень рыхлыми структурами. Несмотря на достаточно продолжительную историю их исследования, попытки выделить их in vitro оказались неудачными. СГ изучают в основном методами световой микроскопии, используя иммунофлуоресцентное окрашивание, экспрессию в клетках белков-маркеров СГ, слитых с флуоресцентными белками, гибридизацию с ДНК-зондами. Изучение числа, размера и расположения в клетке СГ при различных временах и интенсивностях стрессового воздействия, а также при дополнительных воздействиях на клетки, например при разрушении микротрубочек, играет основную роль в исследовании механизмов формирования СГ. Обычно при исследовании числа и размера СГ их либо подсчитывают вручную, что очень трудоемко и таит в себе опасность влияния человеческого фактора на результаты подсчета, либо применяют анализ микроскопических фотографий с помощью компьютерных программ.

К сожалению, основные существующие в настоящее время программы анализа изображений (ImageJ, открытая программа, http://imagej.nih.gov/ij) и MetaMorph (Molecular Devices, Inc., США) не используют алгоритмов, которые могли бы решить проблему подсчета СГ. При компьютерном анализе для подсчета частиц обычно бинаризуют фотографию при помощи постоянного для всего изображения порога, как, например, это сделано в работе (Zurla et al., 2011). Для реальных фотографий клеток с СГ это во многих случаях оказывается неприемлемым, поскольку большинство компонентов СГ локализуется также и диффузно в цитоплазме и яркость фонового окрашивания в центре клетки может быть выше, чем яркость видимой гранулы на периферии клетки (рис. 1, a, \hat{b}). При бинаризации подобной фотографии центрально расположенные гранулы сливаются друг с другом (рис. 1, а, б, стрелка) либо при выставлении другого порога пропадают периферические гранулы.

В нашей работе мы предлагаем алгоритм для автоматизированного распознавания изображения СГ, граница



Рис. 1. Стрессовые гранулы (СГ) в клетке HeLa, обработанной арсенитом.

а — исходное изображение, *б* — бинаризация изображения в программе ImageJ, *в* — бинаризация изображения после обработки по описываемому в статье алгоритму. Иммунофлуоресцентное окрашивание на белок eIF3a. Стрелкой указаны две СГ, слившиеся при простой бинаризации изображений. Масштабный отрезок — 5 мкм.

которого максимально близка к распознаваемой человеком, и приводим некоторые результаты, полученные при помощи этого алгоритма.

Мы ранее показали, что образование СГ в клетках под действием арсенита или арсената натрия, т.е. при окислительном стрессе, ингибируется при разрушении микротрубочек нокодазолом (Ivanov et al., 2003; Nadezhdina et al., 2010). По данным других авторов, при разрушении микротрубочек СГ все же образуются, но значительно меньшего размера, чем в контроле (Chernov et al., 2008; Kolobova et al., 2009). Скорее всего, механизм участия микротрубочек в сборке СГ состоит в том, что по микротрубочкам происходит транспорт компонентов СГ, облегчающий их встречу в пространстве клетки. Для доказательства этого механизма необходимо количественное изучение динамики сборки СГ в присутствии и в отсутствие клеточных микротрубочек. Существенным при этом является вопрос о том, достоверна ли оценка интенсивности образования СГ по доле клеток, в которых они образовались. Мы применили разработанный нами алгоритм анализа изображений для автоматизированного подсчета количества СГ, что позволило получить объективные данные и сделать соответствующие выволы.

Материал и методика

В работе использовали культивируемые клетки HeLa (человеческая карцинома шейки матки) и CV-1 (эпителий почки зеленой мартышки). Клетки выращивали на среде, содержащей 45 % среды F12, 45 % среды DMEM (Панэко, Россия), 10 % эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (Биолот, Россия) с добавлением гентамицина, на пластиковой культуральной посуде при стандартных условиях (температура 37 °С, содержание углекислого газа в среде 5 %). Для экспериментов культивируемые клетки рассаживали на покровные стекла.

Для разборки клеточных микротрубочек в среду добавляли нокодазол до конечной концентрации 6 мкг/мл на 2 ч. Для индукции СГ использовали арсенит натрия (NaH₂AsO₃); максимальная конечная концентрация арсенита в среде культивирования составляла 250 мкМ (для клеток HeLa) и 625 мкМ (для клеток CV-1). Время воздействия арсенитом составляло 30—60 мин. Клетки фиксировали в охлажденном до –20 °С абсолютном метаноле. Для иммунофлуоресцентного окрашивания покровные стекла с клетками инкубировали в течение 30 мин с первыми антителами, разведенными на PBS, промывали 2 раза по 5—7 мин PBS и инкубировали в течение 30 мин со вторыми антителами, конъюгированными с флуорохромами. После инкубации со вторыми антителами стекла промывали 3 раза по 5—7 мин буфером PBS и заключали в Aqua Poly/Mount (Polysciences, США).

В работе использовали поликлональные кроличьи антитела к eIF3a (Шанина и др., 2001) и моноклональные антитела к тубулину DM-1A (Sigma, CША), антитела против IgG кролика и IgG мыши, конъюгированные с тетраметилродаминизотиоцианатом (TRITC) или с флуоресцеинизотиоцианатом (FITC) (Molecular Probes, CША).

Препараты клеток просматривали в микроскопе Axiovert-200M (Carl Zeiss, Германия) с объективами Planapo 63× и 100×. Фотографии (16-битовые черно-белые изображения) получали с помощью цифровой видеокамеры AxioCam HRc, управляемой программным обеспечением AxioVision 3.1 (Carl Zeiss Vision, Германия).

Реализация алгоритма автоматизированного подсчета СГ была осуществлена на языке Java в виде класса-плагина для программы ImageJ при помощи IDE Eclipse. Плагин работает с 16-битными изображениями. Для запуска плагина изображение интересующей нас клетки нужно обвести по контуру.

Результаты и обсуждение

Граница СГ является наиболее четким и резким переходом яркости флуоресценции при иммунофлуоресцентном окрашивании на СГ или при экспрессии белкамаркера СГ, слитого с флуоресцентным белком. Яркость фона может больше измениться при переходе из одной части клетки в другую, чем при переходе из цитоплазмы на СГ, однако пройденное расстояние при переходе между разными частями фона будет больше.

Для выделения СГ из фонового свечения маркера мы использовали вычитание из исходного 16-битового изображения его копии, подвергнутой гауссовскому размыванию, повторенному несколько раз. Гауссовское размывание — стандартная функция Gaussian blur программы ImageJ. Поскольку СГ резко выделяются из фона сте-



Рис. 2. Схема обработки изображения по описываемому в тексте алгоритму.

a — исходное изображение; иммунофлуоресцентное окрашивание на белок eIF3a; указана линия, вдоль которой проводили линейное сканирование изображения с указанием расстояния в отн. ед.; *Масштабный отрезок* — 5 мкм. *б*—*г* — линейные сканы изображения вдоль линии, показанной на рис. 2, *a*; *б* — скан исходного изображения, *в* — скан после 70 размываний, *г* — скан после вычитания размытого изображения из исходного и его нормализации.

пенью своей яркости, при размывании изображения яркость тех пикселей, которые соответствуют их расположению, падает, и именно в этих местах достигается максимальная разность яркости между исходным и размытым изображениями (рис. 2).

После вычитания размытого изображения из исходного мы еще раз размывали изображение небольшое количество раз, для того чтобы нейтрализовать воздействие шума. Шум на изображении может вызвать распознавание в качестве гранул случайно возникших ярких

Таблица 1

Число определяемых в клетке гранул: пример подбора числа размываний изображения клетки HeLa

до и после вычитания исходного изображения

Число раз- мытий до вычитания	Число размываний после вычитания				
	2	3	4	5	
5	94	78	63	57	
6	85	76	64	59	
10	78	66	59	55	
30	58	51	49	47	
70	43	43	43 ^a	42	
100	41	40	35	32	

точек, особенно при обработке изображений клеток, в которых гранул нет, а также распознавание границы гранулы как более изрезанной, чем в действительности. В программе предусмотрено также нормирование общей яркости, т. е. суммарная яркость окончательной картинки с отдельными пятнами гранул такая же, как исходной картинки клетки. Поскольку площадь гранул мала, они становятся ярче, чем любой элемент исходной картинки (рис. 2, ε).

На финальной стадии мы бинаризовали изображение на основе того, больше или меньше яркость исходного пикселя определенного порога. После второго размывания и выставления порога получалось изображение (рис. 1, в), в котором были отчетливо видны СГ во всех частях клетки — и в центре, и на периферии. Бинаризованное изображение обрабатывали стандартным функционалом класса Particle Analyser программы ImageJ для подсчета количества СГ и измерения их площади. Мы обнаружили, что количества гауссовских размываний до вычитания изображений и после него, а также значение порога нуждаются в подборе вручную для каждой серии изображений и по меньшей мере для каждой линии клеток. Оптимальное количество размытий и значение порога зависят от яркости фона и соотношения яркости между фоном и гранулой.

Мы подбирали количество размываний так, чтобы количество СГ, подсчитанное программой, максимально соответствовало таковому, подсчитанному вручную, на примере хотя бы одной клетки (табл. 1, 2). Конечно, руч-

Таблица 2

Число определяемых в клетке гранул: пример подбора числа размываний изображения клетки CV-1 до и после вычитания исходного изображения

Число раз- мытий до вычитания	Число размываний после вычитания				
	2	3	4	5	
5	152	127	119	105	
6	148	128 ^a	118	108	
10	141	126	116	105	
30	118	99	95	89	
70	78	71	66	68	

Примечание. ^а Оптимальное соотношение. Визуально в клетке определили 129 гранул.



Рис. 3. Гистограмма распределения клеток HeLa по числу в них СГ.

Светлые столбики — клетки, отнесенные к клеткам без СГ, темные столбики — клетки с СГ.

б а в г 300 0.16 Средняя площадь СГ, мкм2 0.12 Число СГ в клетке 200 0.08 100 0.04 0 0 А H + AА H + A

Рис. 4. Стрессовые гранулы в клетках CV-1, обработанных арсенитом или арсенитом на фоне нокодазола.

a, *б* — изображения клеток; иммунофлуоресцентное окрашивание на белок eIF3a: *a* — клетка, обработанная арсенитом (A); *б* — клетка, обработанная арсенитом на фоне нокодазола (A + H); *в*, *г* — подсчеты, выполненные с помощью описываемого алгоритма — соответственно среднее число СГ на клетку и средний размер СГ. Об. 63×.

ной подбор параметров привносит субъективный момент в разработанный алгоритм, но внутри каждой серии измерений подсчеты остаются унифицированными. Для клеток CV-1 оптимальное количество размываний оказалось 6 до вычитания и 3 после вычитания, а для клеток HeLa оптимальное количество размываний было определено как 70 до вычитания и 4 после вычитания (табл. 1, 2). Необходимо было также подобрать порог для бинаризации конечного изображения. Для клеток CV-1 порог составил 4500 единиц оптической плотности, а для клеток HeLa — 3000.

В итоге в клетках CV-1, обработанных 375 мкМ арсенита, при автоматическом подсчете было определено в среднем 142 ± 21 СГ, а при ручном подсчете в той же выборке клеток — 148 ± 22 СГ, т. е. результаты практически совпали. Похожий результат был получен и для клеток HeLa. Наш плагин был включен в список плагинов программы ImageJ и размещен по адресу http://rsb.info.nih.gov/ij/plugins/stress_granule_counter/index.html. Плагин, вероятно, можно использовать для подсчета любых гранул на непостоянном фоне. На обработанных изображениях клеток можно оценить также и средний размер гранул, правда, как всегда при флуоресцентной микроскопии, измерения линейного размера объекта имеют значительную погрешность и носят оценочный характер.

В своих предыдущих работах по изучению механизма формирования СГ мы использовали такой параметр, как доля клеток, имеющих или не имеющих СГ. Возникает вопрос: содержат ли клетки все варианты возможного количества СГ, и тогда выделение двух классов клеток субъективно, или действительно существуют клетки, содержащие или не содержащие СГ? Для ответа на этот вопрос мы построили гистограммы количества элементов изображения, распознанных алгоритмом как СГ, для клеток HeLa, обработанных 100 мкМ арсенита в течение 30 мин, как для целой группы, так и предварительно разбив их на группы содержащих и не содержащих СГ по субъективному восприятию.

На суммарной гистограмме можно видеть два максимума клеток: при количестве СГ меньше 5 и около 30 (рис. 3). Из этого можно сделать заключение о том, что СГ образуются в клетках не постепенно, а по принципу «все или ничего» — если их формирование началось в конкретной клетке, то в ней сразу образуется 20—35 гранул. Это может объясняться быстрым переходом всего цитоплазматического материала клетки, способного к формированию СГ, в состояние, способствующее их образованию, причем этот переход асинхронен у разных клеток в одном и том же препарате. Таким образом, оценка доли клеток, имеющих СГ, вполне правомочна для оценки характера воздействия.

Подробные характеристики количества и размера СГ при разрушении микротрубочек или при их стабилизации действием таксола, а также при разной продолжительности воздействия, полученные с помощью описанного алгоритма, мы собираемся обсудить в статье, подготавливаемой к печати. Здесь же мы приведем предварительные данные по количеству и размеру СГ в клетках CV-1 при интактных микротрубочках и после обработки нокодазолом, разрушающим микротрубочки, при одной концентрации арсенита — 375 мкМ (рис. 4). Мы предварительно удостоверились, что арсенит заметно не влияет на микротрубочки, а использованная нами обработка нокодазолом приводит к практически полному разрушению микротрубочек (данные не показаны). На фотографиях видно, что при разобранных микротрубочках формирующиеся СГ оказываются достоверно меньшего размера, а также образуются в достоверно большем количестве, чем при интактных микротрубочках. Интересно, что суммарная площадь СГ, отражающая суммарное количество включенного в них материала, остается практически постоянной. Это свидетельствует об участии микротрубочек в укрупнении СГ, вероятно, при их слиянии друг с другом (Nadezhdina et al., 2010).

Таким образом, нами разработан и реализован алгоритм, позволяющий в автоматическом режиме определять границы, площадь и расположение индивидуальных СГ на изображениях эукариотических клеток, распластанных по субстрату, даже если яркость фона в одних местах клетки больше, чем яркость гранул в других. Подобраны оптимальные параметры для работы этого плагина на изображениях клеток CV-1 и HeLa. С помощью алгоритма получен значительный объем данных, свидетельствующих об образовании СГ по принципу «все или ничего» и о необходимости присутствия в клетках микротрубочек для укрупнения и уменьшения числа СГ в клетках.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 10-04-01107).

Список литературы

Иванов П. А., Надеждина Е. С. 2006. Стресс-гранулы: РНП-содержащие цитоплазматические тельца, возникающие в ответ на стресс. Молекуляр. биол. 40 (6) : 844—850.

Шанина Н. А., Иванов П. А., Чудинова Е. М., Северин Ф. Ф., Надеждина Е. С. 2001. Фактор инициации трансляции eIF3 способен связываться с микротрубочками в клетках млекопитающих. Молекуляр. биол. 35 (4): 638—646.

Chernov K. G., Barbet A., Hamon L., Ovchinnikov L. P., Curmi P. A., Pastre D. 2008. Role of microtubules in stress granule assembly: microtubule dynamical instability favors the formation of micrometric stress granules in cells. J. Biol. Chem. 284 : 36 569— 36 580.

Ivanov P.A., Chudinova E.M., Nadezhdina E.S. 2003. Disruption of microtubules inhibits cytoplasmic ribonucleoprotein stress granule formation. Exp. Cell Res. 290 : 227–233.

Kedersha N., Chen S., Gilks N., Li W., Miller I. J., Stahl J., Anderson P. 2002. Evidence that ternary complex (eIF2-GTPtRNA(i)(Met))-deficient preinitiation complexes are core constituents of mammalian stress granules. Mol. Biol. Cell. 13 : 195—210.

Kolobova E., Efimov A., Kaverina I., Rishi A. K., Schrader J. W., Ham A. J., Larocca M. C., Goldenring J. R. 2009. Microtubule-dependent association of AKAP350A and CCAR1 with RNA stress granules. Exp. Cell Res. 315 : 542—555.

Nadezhdina E. S., Lomakin A. J., Shpilman A. A., Chudinova E. M., Ivanov P. A. 2010. Microtubules govern stress granule mobility and dynamics. Biochim. biophys. acta — Mol. Cell Res. 1803: 361—371.

Thomas M. G., Loschi M., Desbats M. A., Boccaccio G. L. 2011. RNA granules: the good, the bad and the ugly. Cell Signal. 23 : 324—334.

Zurla C., Lifland A. W., Santangelo P. J. 2011. Characterizing mRNA interactions with RNA granules during translation initiation inhibition. PLoS One. 6 : e19727.

Поступила 27 II 2012

STRESS GRANULES IN THE CELLS WITH INTACT AND DISCRUPTED MICROTUBULES: ANALYSIS WITH NEW ALGORITHM OF IMAGE PROCESSING

A. A. Sablina,¹ E. M. Chudinov,² E. S. Nadezhdina,² P. A. Ivanov³

¹ Bioengineering and Bioinformatics Faculty of M. V. Lomonosov Moscow State University,
² Institute of Protein Research RAS, Pushchino-na-Oke,
³ Biological Faculty of M. V. Lomonosov Moscow State University;
e-mail: chudiel@mail.ru

Stress granules — temporary RNP structures that are formed in cells under stress. They are studied mainly by means of fluorescence microscopy with the quantitative analysis of cell images. We have developed a new algorithm for automatic detection of stress granules in the cytoplasm of cultured animal cells having non-uniform cytoplasmic background. Using this approach, we have found that visible stress granules are formed in cells as «all or nothing», and their number in cells is rather constant. We also show that disruption of cellular microtubules lead to a decrease in the average size of stress granules and an increase in their number in the cell.

Key words: stress granules, immunofluorescence microscopy, image analysis, microtubules, RNP.