

ВЫЯВЛЕНИЕ РЕПЛИКАЦИОННЫХ САЙТОВ В ЯДРАХ РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПОЛУТОНКИХ СРЕЗОВ

© М. А. Кузнецова,¹ Е. В. Шеваль^{2, *}

¹ Факультет биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова и ² Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова; * электронный адрес: sheval_e@genebee.msu.su

Описан новый метод выявления репликационных сайтов в ядрах растительных клеток, в котором включившийся нуклеотид (EdU) выявляется с помощью «click»-реакции на полутонких срезах материала, заключенного в акриловую смолу. Использование предлагаемого подхода позволяет: 1) добиться хорошей сохранности структуры клеток, 2) работать с любыми тканями и 3) получать высокое разрешение при микроскопии (особенно аксиальное).

Ключевые слова: ядро, хроматин, репликация, репликационные сайты, EdU, полутонкие срезы.

Дифференциальное выявление хроматина, включившего меченые нуклеотиды во время репликации, широко применяется для анализа пространственной организации процессов репликации (Sparvoli et al., 1994; Samaniego et al., 2002), трехмерной организации интерфазных ядер (Jasencakova et al., 2001), изучения структуры митотических хромосом (Jackson, Pombo, 1998; Shimizu, Shingaki, 2004), выявления пролиферирующей фракции в клеточных популяциях (Coltrera, Gown, 1991) и стволовых клеток в тканях (Poojan, Kumar, 2011). Достоинством метода является его универсальность, однако при работе с клетками растений данный метод не так прост, как при работе с клетками животных. Связано это с наличием клеточной стенки, что вынуждает проводить дополнительные обработки с целью ее удаления. В настоящее время для этого используется несколько подходов: обработка препаратов ферментами (целлюлазами и пектиназами) после фиксации (Amiard et al., 2010), гомогенизация ткани с целью разрушения клеточной стенки (Levi et al., 1987; Sparvoli et al., 1994; Samaniego et al., 2002) и использование изолированных ядер (Лазарева и др., 2005). В ряде случаев работу можно проводить на протопластах (Kotogany et al., 2010), однако это существенно ограничивает перечень доступных для работы объектов.

До недавнего времени для выявления реплицирующегося хроматина использовали галогенизированные нуклеотиды, например бромдезоксигуанидин (BrdU), которые можно выявлять с помощью специфических антител. Выявление реплицирующегося хроматина, включившего BrdU, требует проведения кислого гидролиза (или иной аналогичной обработки), что негативно влияет на сохранность структуры клеток. В последние годы получил широкое распространение метод мечения реплицирующегося хроматина с использованием «click»-реакции (Buck et al., 2008; Cappella et al., 2008; Salic, Mitchison, 2008; Chehrehasa et al., 2009; Diermeier-Daucher et al., 2009; Na-

melik, Krishan, 2009). Этот метод позволяет добиваться хорошей сохранности структуры хроматина, что делает актуальным разработку новых методов работы с растительным материалом.

В настоящей работе мы описываем разработанный нами подход к выявлению реплицирующегося хроматина с использованием растительного материала, заключенного в акриловую смолу.

Материал и методика

Семена томата *Solanum lycopersicum* L. проращивали в чашках Петри на влажной фильтровальной бумаге в темноте при 25 °С. Использовали корешки длиной 1 см. Пророщенные семена инкубировали в течение 30 мин в дистиллированной воде, содержащей 50 мкМ EdU (Invitrogen, США). Кончики корешков (1 мм) отрезали бритвой и фиксировали в 2%-ном параформальдегиде, приготовленном на 0.5-кратном фосфатно-солевом буферном растворе (PBS), в течение 1.5 ч. После отмывки в PBS корешки заключали в LR White (Sigma, США); полимеризацию проводили в течение 24 ч при 55 °С. Полутонкие срезы получали на ультратоме LKB-III. Наилучшее качество изображений было достигнуто при толщине срезов около 0.25 мкм (такая толщина позволяет получать примерно одинаковое разрешение как в плоскости X—Y, так и по оси Z). Однако удовлетворительного качества изображения были получены даже при использовании ультратонких срезов (~0.07 мкм). Срезы монтировали на покровные стекла, покрытые формваром (стекла опускали в 0.03%-ный раствор формвара в дихлорэтаноле и высушивали в течение ночи). Из ванночки с водой срезы переносили на поверхность стекла при помощи пегли Perfect Loop (Pelco, США). Полученные препараты высушивали в термостате при 37 °С в течение 2—3 ч, после чего меченый

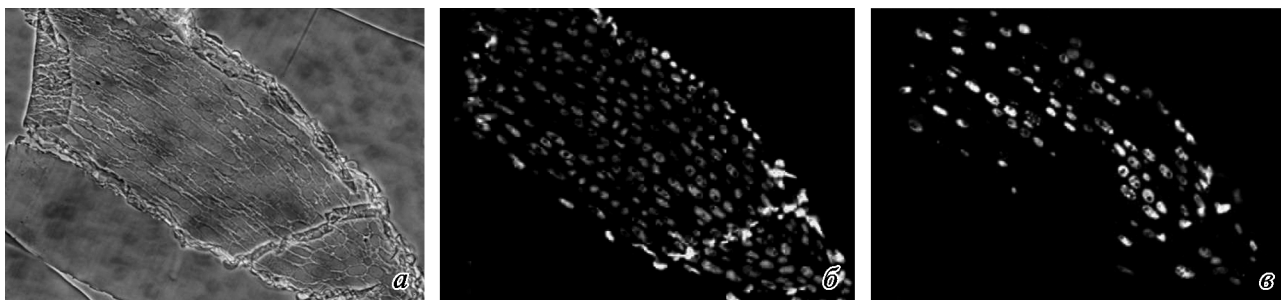


Рис. 1. Выявление реплицирующихся клеток в корешке томата.

a — общий вид полутонкого среза (толщина 0.25 мкм) в режиме фазового контраста; *б* — ядра, выявленные с использованием ДНК-связывающего флуорохрома DAPI; *в* — реплицирующиеся ядра, включившие модифицированный нуклеотид (EdU). Об. 10×.

нуклеотид выявляли с использованием набора Click-iT фирмы Invitrogen (США). Были использованы два красителя — Alexa488 и Alexa555. Более качественные изображения были получены в последнем случае. После отмычки срезы окрашивали красителем DAPI (Sigma, США) и заключали в Mowiol (Calbiochem, США) с добавлением DABCO (Sigma, США).

Полученные препараты изучали с использованием микроскопа Axiovert 200M с объективом Plan-Apochromat 100/1.4 (Carl Zeiss, Германия), оборудованного цифровой камерой ORCA II-ERG2 (Hamamatsu, Япония). Деконволюцию серий оптических срезов по алгоритму Constrained Iterative проводили с использованием программы AxioVision 3.1 (Carl Zeiss).

Результаты и обсуждение

Для выявления репликационных сайтов в ядрах клеток корешка томата проводили выявление включившегося нуклеотида (EdU) с помощью «click»-реакции на полутонких срезах. При изучении препаратов корешка томата импульсная метка включается в часть ядер, в которых в момент внесения нуклеотида происходит репликация (рис. 1). Использование полутонких срезов позволяет добиться хорошей сохранности структуры интерфазных ядер. Для томата характерно присутствие в ядре крупных блоков гетерохроматина (хромоцентров). По локализации метки вне или в составе хромоцентров можно определить фракцию хроматина (эухроматин или гете-

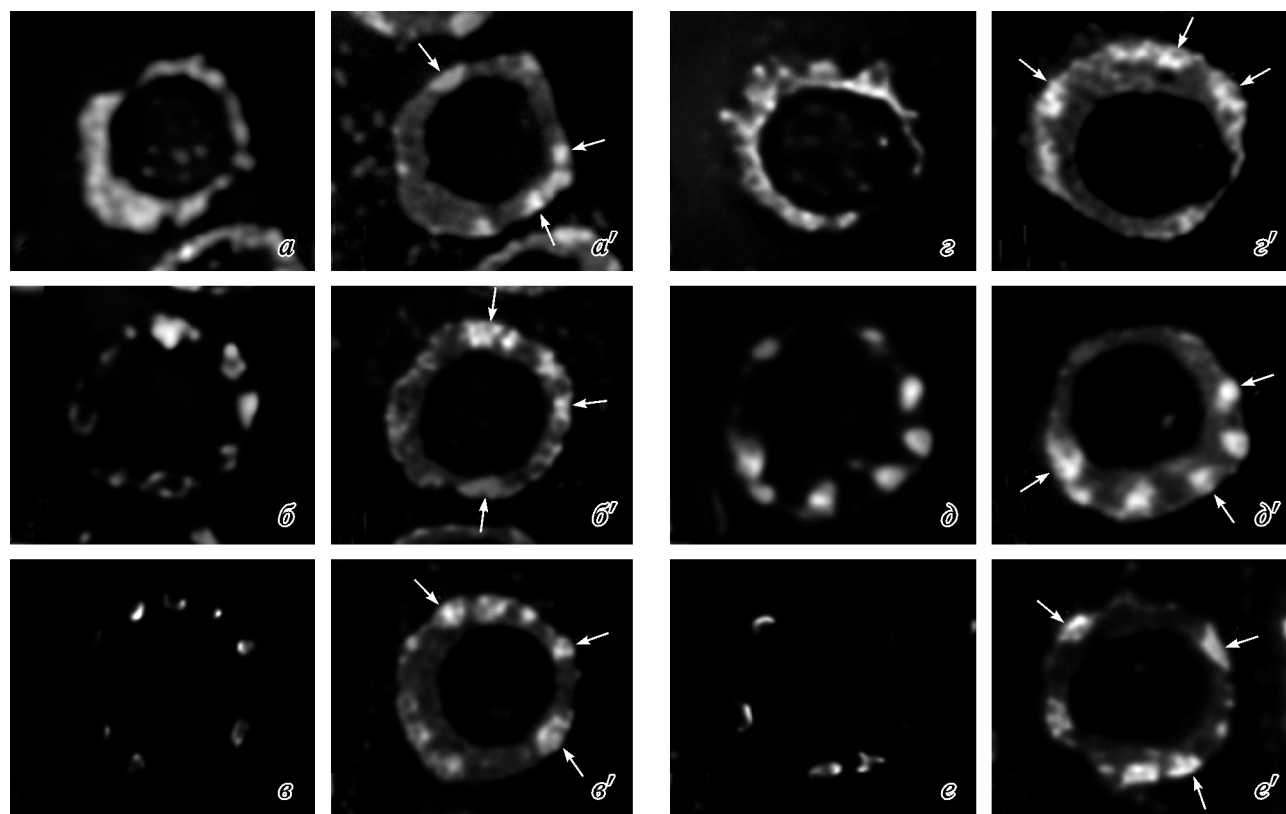


Рис. 2. Морфологические варианты локализации реплицирующегося хроматина (полутонкие срезы, толщина 0.25 мкм).

a—в — импульсное включение метки (выявление репликационных сайтов); *з—е* — отложенная метка (локализация хроматина, включившего метку в ходе предшествующей репликации). *a—e* — выявление модифицированного нуклеотида (EdU); *a'—e'* — выявление хроматина с помощью ДНК-связывающего флуорохрома DAPI (стрелки указывают на хромоцентры). Об. 100×.

рохроматин), которая реплицировалась в момент внесения метки.

Анализ распределения метки позволяет выявить три варианта локализации репликационных сайтов (рис. 2). Первый вариант характеризуется нахождением метки только в эухроматических районах (рис. 2, а). Обращает на себя внимание то, что в ядрах не выявляются отдельные репликационные сайты в виде дискретных гранул, как это характерно для животных. Это может свидетельствовать об особой организации хроматина у растений, например об одновременности репликации протяженных участков хромосом из-за отсутствия гетерохроматина, разделяющего блоки эухроматина, либо о небольшом размере блоков гетерохроматина. Такой особенности распределения репликации ранее в литературе описано не было. Интересно, что репликационные сайты в виде отдельных точек выявляются внутри ядрышка, что может соответствовать репликации рибосомных генов. Второй вариант характеризуется нахождением метки в хромоцентрах. При этом метка распределена не гомогенно, а преимущественно по периферии хромоцентров (рис. 2, б). Для третьего варианта характерно наличие немногочисленных реплицирующихся гранул внутри хромоцентров (рис. 2, в).

При анализе ядер корешков, которые после включения метки 2 ч инкубировались в дистиллированной воде (отложенная метка), выявляются те же три типа ядер (рис. 2, з—е). Однако метка во втором типе распределена в хромоцентрах гомогенно, что может быть связано с перепаковкой хроматина после репликации (рис. 2, д).

По аналогии с локализацией метки в ядрах животных эти три типа могут быть отнесены к ядрам с меткой, включенной в раннюю (репликация эухроматина), среднюю (репликация гетерохроматина) и позднюю (репликация центрального гетерохроматина) S-фазы.

Предложенный метод позволяет с меньшими усилиями, чем традиционные подходы, выявлять репликационные сайты в ядрах растений. При этом качество изображений существенно выше, чем при традиционной микроскопии, из-за отсутствия внефокусного свечения. Особенно важна возможность получать высокое аксиальное разрешение (по оси Z). Это может быть ценно для видов с крупными ядрами, а также при анализе крупных объектов (например, политенных хромосом). Кроме того, необходимо отметить, что предлагаемый подход позволяет работать с тканевыми образцами (как растений, так и животных), которые при использовании более традиционных методов могут быть малодоступны для исследования.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства по науке и образованию РФ (проект 2012-1.2.2-12-000-1013-078).

Список литературы

- Лазарева Е. М., Наджип Г. А., Голышев С. А., Поляков В. Ю. 2005. Динамика репликационных сайтов и макромолекулярных комплексов хроматина (хромоном) в клетках *Allium cepa* L. Биол. мембр. 22 (3) : 188—195.
- Amiard S., Charbonnel C., Allain E., Depeiges A., White C. I., Gallego M. E. 2010. Distinct roles of the ATR kinase and the Mre11-Rad50-Nbs1 complex in the maintenance of chromosomal stability in *Arabidopsis*. Plant Cell. 22 : 3020—3033.
- Buck S. B., Bradford J., Gee K. R., Agnew B. J., Clarke S. T., Salic A. 2008. Detection of S-phase cell cycle progression using 5-ethynyl-2'-deoxyuridine incorporation with click chemistry, an alternative to using 5-bromo-2'-deoxyuridine antibodies. Biotechniques. 44 : 927—929.
- Cappella P., Gasparri F., Pulici M., Moll J. 2008. A novel method based on click chemistry, which overcomes limitations of cell cycle analysis by classical determination of BrdU incorporation, allowing multiplex antibody staining. Cytometry A. 73 : 626—636.
- Chehrehasa F., Meedeniya A. C., Dwyer P., Abrahamsen G., Mackay-Sim A. 2009. EdU, a new thymidine analogue for labelling proliferating cells in the nervous system. J. Neurosci. Methods. 177 : 122—130.
- Coltrera M. D., Gown A. M. 1991. PCNA/cyclin expression and BrdU uptake define different subpopulations in different cell lines. J. Histochem. Cytochem. 39 : 23—30.
- Diermeier-Daucher S., Clarke S. T., Hill D., Vollmann-Zwenz A., Bradford J. A., Brockhoff G. 2009. Cell type specific applicability of 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) for dynamic proliferation assessment in flow cytometry. Cytometry A. 75 : 535—546.
- Hamelik R. M., Krishan A. 2009. Click-iT assay with improved DNA distribution histograms. Cytometry A. 75 : 862—865.
- Jackson D. A., Pombo A. 1998. Replicon clusters are stable units of chromosome structure: evidence that nuclear organization contributes to the efficient activation and propagation of S phase in human cells. J. Cell Biol. 140 : 1285—1295.
- Jasencakova Z., Meister A., Schubert I. 2001. Chromatin organization and its relation to replication and histone acetylation during the cell cycle in barley. Chromosoma. 110 : 83—92.
- Kotogány E., Dudits D., Horváth G. V., Ayaydin F. 2010. A rapid and robust assay for detection of S-phase cell cycle progression in plant cells and tissues by using ethynyl deoxyuridine. Plant Methods. 28 : 5—20.
- Levi M., Sparvoli E., Sgorbati S., Chiatante D. 1987. Rapid immunofluorescent determination of cells in the S phase in pea root meristems: an alternative to autoradiography. Physiol. Plantarum. 71 : 68—72.
- Poojan S., Kumar S. 2011. Flow cytometry-based characterization of label-retaining stem cells following transplacental BrdU labeling. Cell Biol. Int. 35 : 147—151.
- Salic A., Mitchison T. J. 2008. A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 105 : 2415—2420.
- Samaniego R., de la Torre C., Moreno Diaz de la Espina S. 2002. Dynamics of replication foci and nuclear matrix during S phase in *Allium cepa* L. cells. Planta. 215 : 195—204.
- Shimizu N., Shingaki K. 2004. Macroscopic folding and replication of the homogeneously staining region in late S phase leads to the appearance of replication bands in mitotic chromosomes. J. Cell Sci. 117 : 5303—5312.
- Sparvoli E., Levi M., Rossi E. 1994. Replicon clusters may form structurally stable complexes of chromatin and chromosomes. J. Cell Sci. 107 : 3097—3103.

DETECTION OF REPLICATION SITES IN THE NUCLEI OF PLANT CELLS
USING SEMITHIN SECTIONS

M. A. Kuznetsova,¹ E. V. Sheval^{2,}*

¹ Department of Bioengineering and Bioinformatics, M. V. Lomonosov Moscow State University,
and ² A. N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology M. V. Lomonosov Moscow State University;
* e-mail: sheval_e@genebee.msu.su

A novel approach for the detection of replication sites in plant cells nuclei is described. Included nucleotide (EdU) was detected using «click»-chemistry in semithin sections of the material embedded in acrylic resin. The usage of the protocol introduced allows: 1) to preserve the intact morphology of cells, 2) to work with any tissue, and 3) to obtain high-resolution microscopy (especially, axial).

Key words: nuclei, chromatin, replication, replication sites, EdU, semithin sections.
