ОСОБЕННОСТИ КОГЕЗИИ В ЭУ- И ГЕТЕРОХРОМАТИНЕ В КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА

© ***В. Д. Черепанинец***,[1, 2, *] ***О. А. Жиронкина***,[1, 2] ***О. С. Стрелкова***,[2, 3] ***С. Ю. Курчашова***,[2] ***И. И. Киреев***[1, 2]

[1] *Биологический факультет Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова*, [2] *Институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова* и [3] Факультет *биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова*; **электронный адрес*: *temchromatinlab@gmail.com*

Считается, что сестринские хроматиды сразу после репликации удерживаются рядом друг с другом до начала компактизации в профазе специализированным комплексом — когезином, состоящим из димера Smc1—Smc3 и двух дополнительных субъединиц Scc1 и Scc3, а сам процесс называют когезией. Нами охарактеризованы особенности связывания когезинового комплекса с рано- и позднореплицирующимся хроматином на различных стадиях клеточного цикла в клетках человека HeLa и HT1080 при помощи светооптической микроскопии с высоким разрешением (Structural Illumination Microscopy — SIM) и на ультраструктурном уровне с использованием метода иммуноэлектронной микроскопии. Показано, что в гетерохроматиновых доменах когезия, по всей видимости, обеспечивается практически без участия когезинов, а бóльшая часть связанных с хроматином когезинов обеспечивает когезию и организацию субдоменов в зонах эухроматина.

Ключевые слова: когезины, хроматин, эухроматин, гетерохроматин, сегрегация, сестринские хроматиды, микроскопия с суперразрешением, иммуноэлектроная микроскопия.

Принятые сокращения: EdU — 5-этинил-2′-дезоксиуридин (5-ethynyl-2′-deoxyuridine), HSR — гомогенно окрашиваемая область (homogenously stained region).

Жизненно важной для клетки задачей является безошибочная передача генетического материала в дочерние клетки в процессе клеточного деления. Каждый раз перед делением происходит репликация генома с образованием двух идентичных сестринских хроматид. Во время митоза хроматиды поровну распределяются между дочерними клетками. Для успешного разделения геномов идентичные хроматиды должны идентифицироваться как сестринские. Считается, что сестринские хроматиды сразу после репликации и до начала компактизации в профазе удерживаются рядом друг с другом специализированным комплексом — когезином, состоящим из димера Smc1—Smc3 и двух дополнительных субъединиц Scc1 и Scc3, а сам процесс называют когезией (Gerton, 2005). Общеизвестно, что хроматин неоднороден, но каковы особенности процесса когезии в хроматине с различным структурно-функциональным состоянием у высших эукариот, остается невыясненным. Ответ на вопрос осложняется также тем, что роль когезинов не ограничивается когезией, как предполагалось первоначально. Не менее важную роль они играют в организации субдоменов хроматина вне связи со сближением сестринских хроматид (Bose, Gerton, 2010).

Несмотря на заметные успехи в изучении структуры и функции этого комплекса, характер взаимодействия когезина с нативным хроматином в клетке, особенно в контексте высокой степени компактизации и сложной многоуровневой укладки ДНК в хромосомах, а также в условиях высококомпартментализированного интерфазного ядра, остается невыясненным. Отчасти это связано с полным отсутствием данных по локализации когезинов с высоким пространственным разрешением, в том числе на ультраструктурном уровне.

Хроматин в клетках высших эукариот по структурно-функциональному статусу можно разделить на раннереплицируемый эухроматин с активно транскрибируемыми генами и позднореплицируемый гетерохроматин, почти не содержащий активно работающих генов (Cremer et al., 2004; Hiratani, Gilbert, 2009). Используя методы широкопольной светооптической микроскопии с деконволюцией, микроскопию с высоким разрешением на основе структурированного освещения — structural illumination microscopy (SIM), а также иммуноэлектронную микроскопию, мы выявили особенности связывания когезинового комплекса с рано- и позднореплицирующимся хроматином на различных стадиях клеточного цикла в клетках человека HeLa и HT1080.

Материал и методика

Культура клеток. Работа выполнена на двух клеточных линиях человека — M-HeLa (эпителиоидная карцинома шейки матки, сублиния HeLa) и HT1080 (фибросаркома), полученных из Российской коллекции клеточных культур позвоночных Института цитологии РАН (Санкт-Петербург), и на культуре CHO_AO3 (происходит из линии CHO-DG44, полученной из яичника китайского хомячка), содержащей меченный GFP гетерохроматический локус Homogenios stain region (HSR) (Li et al., 1998), любезно предоставленной А. С. Бельмонтом (A. S. Belmont, UIUC, США).

Клетки HeLa и HT1080 культивировали в среде ДМЕМ (Панэко, Москва) с добавлением 10 % эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (HyClone, США), 50 ед./мл пенициллина и 50 ед./мл стрептомицина (Панэко, Москва) в атмосфере 5 % CO_2 при 37 °С. Для предупреждения потери клетками CHO_AO3 искусственного гетерохроматинового локуса их выращивали в среде F-12 без гипоксантина и тимидина (Gibco, США), содержащей 10 % эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота и 0.2 мМ гигромицина Б (Invitrogen, США).

Для приготовления препаратов для микроскопии клетки рассаживали на покровные стекла толщиной 0.17 мм (Corning, США) в чашках Петри (Corning, США).

Репликативная метка. Для мечения реплицирующегося хроматина к клеткам в среду культивирования добавляли на 10 мин аналог тимидина — EdU (5-ethynyl-2′-deoxyuridine, из набора Click-iT EdU Alexa Fluor® 594 HCS; Invitrogen, США) в конечной концетрации 10 мкМ, метку проявляли после фиксации клеток по стандартному протоколу фирмы-производителя. В экспериментах с отложенной меткой после инкубации с EdU клетки трижды промывали теплым раствором Хенкса, после чего помещали в чистую ростовую среду.

Синхронизация клеток. Для синхронизации клеток на границе G_1/S клетки культивировали во флаконе 125 см² (Corning, США) до 30 % конфлюэнтности, добавляли нокодазол (0.3 мкг/мл на 1 ч), резко встряхивали флакон с клетками, в результате чего митотические клетки отрывались от субстрата и находились в свободном состоянии в культуральной среде, которую отбирали в стерильную пробирку и центрифугировали 3 мин при 800 *g*. Осадок ресуспендировали в растворе Хенкса (Панэко, Москва) и переносили пробирки с клетками на лед. Процедуру стряхивания повторяли трижды в течение 2 ч, образцы объединяли, дважды промывали раствором Хенкса и высаживали клетки на покровные стекла в чашки Петри с ростовой средой. Через 2 ч добавляли 2 мМ N-оксимочевины (Sigma, США) на 16 ч. Клетки останавливали свое движение по клеточному циклу на границе G_1/S, их отмывали трижды теплым раствором Хенкса, помещали в ростовую среду, и дальше они синхронно следовали по циклу. Бóльшая часть клеток переходила в стадию митоза через 10—11 ч после удаления N-оксимочевины.

Иммунофлуоресцентная и иммуноэлектронная микроскопия. Клетки на стеклах лизировали 90 с в 0.1%-ном растворе Тритона X-100, приготовленном на PBS* (PBS pH 7.2—7.4 с 5 мМ $MgCl_2$, который добавляли для лучшей сохранности компактной структуры хроматина) (Strukov et al., 2003). Клетки фиксировали 3.7%-ным раствором формальдегида на PBS* в течение 15 мин и промывали PBS* 3 раза по 5 мин. Неспецифическое связывание антител блокировали в PBS* с 1 % BSA и 0.1 % Тритона X-100 в течение 1 ч. Клетки окрашивали первичными антителами, разведенными в PBS* с 1 % BSA и 0.1 % Тритона X-100, в течение ночи при 4 °С. Клетки отмывали от антител тем же раствором 5 раз по 5 мин и окрашивали вторичными антителами, конъюгированными с флуорохромом AlexaFluor-488 (Invitrogen, США) или наночастицами золота (Nanoprobes, США). Для светооптической микроскопии препараты заключали в Mowiol 4-88 (Calbiochem, США) с 1 мг/мл DAPI (Sigma-Aldrich, США) (Harlow, Lane, 2006). Для электронной микроскопии клетки дополнительно фиксировали 1.25%-ным раствором глутарового альдегида на PBS* в течение 1 ч, промывали в 2 сменах дистиллированной воды по 10 мин и восстанавливали альдегидные группы водным раствором $NaBH_4$ 1 мг/мл 2 раза по 10 мин. Боргидрид отмывали дистиллированной водой 3 раза по 10 мин. Проводили процедуру серебряного усиления по протоколу, разработанному Данчер (Dancher, 1981). Препараты обезвоживали в серии спиртов повышающейся концентрации и заключали в Эпон-812 (Fluka, Германия), как описано ранее (Rego et al., 2008). Тонкие (90—120 нм) и полутонкие (250 нм) срезы, полученные на ультрамикротоме Ultracut E (Reichert-Jung, Австрия), контрастировали 1%-ным водным уранил-ацетатом 20—30 мин и цитратом свинца (Reynolds, 1963) и исследовали в электронных микроскопах H-700 (Hitachi, Япония) и JEM-1400 (JEOL, Япония), работающих при ускоряющем напряжении 75 и 100 кВ соответственно.

Антитела. Первичные — кроличьи поликлональные против Smc3 (IHC-00054, Bethyl laboratories, США), разведение 1 : 1000. Вторичные антитела для светооптической микроскопии — козьи против иммуноглобулинов кролика, конъюгированные с AlexaFluor-488 (Invitrogen, США), разведение 1 : 1000. Вторичные антитела для электронной микроскопии — козьи против иммуноглобулинов кролика с наночастицами золота 1.2 нм (Nanoprobes, США), разведение 1 : 400.

Светооптическая микроскопия. Светооптические изображения получали на микроскопах Eclipse Ti-E (объектив ×60/NA = 1.4) (Nikon, Япония) и Nikon N-SIM/N-STORM (объектив ×100/NA = 1.49) (Nikon, Япония) и проводили деконволюцию с использованием итеративного лимитирующего алгоритма и теоретической функции рассеяния. Обработку и анализ изображений проводили при помощи программы ImageJ 1.46 (Rasband, http://rsb.info.nih.gov/ij/) с использованием модулей 3D Deconvolution (Dougherty, Optinav, США).

Использованные реактивы: DMEM, глутамин, пенициллин, стрептомицин, раствор Хенкса и BSA (ПанЭко, Россия); эмбриональная телячья сыворотка и F-12 без гипоксантина и тимидина (Gibco, США); гигромицин Б и набор Click-iT EdU Alexa Fluor® 594 HCS (Invitrogen, США); Mowiol 4-88 (Calbiochem, США); нокодазол, PIPES, N-оксимочевина, DAPI, лактат серебра и пропил галат (Sigma, США); глутаровый альдегид (Ted Pella Inc, США); $MgCl_2$ и Тритон X-100 (Хеликон, Россия); PBS и параформальдегид (MP Biomedicals, Франция); $NaBH_4$ (Panreac, Испания); Эпон-812, DDSA, DMP-30 и цитрат свинца (Fluka, Швейцария); уранил-ацетат (Serva, Германия).

Результаты и обсуждение

Локализация когезинов на светооптическом уровне. Первую часть работы выполняли на клетках культуры HeLa. Для иммунолокализации когези-

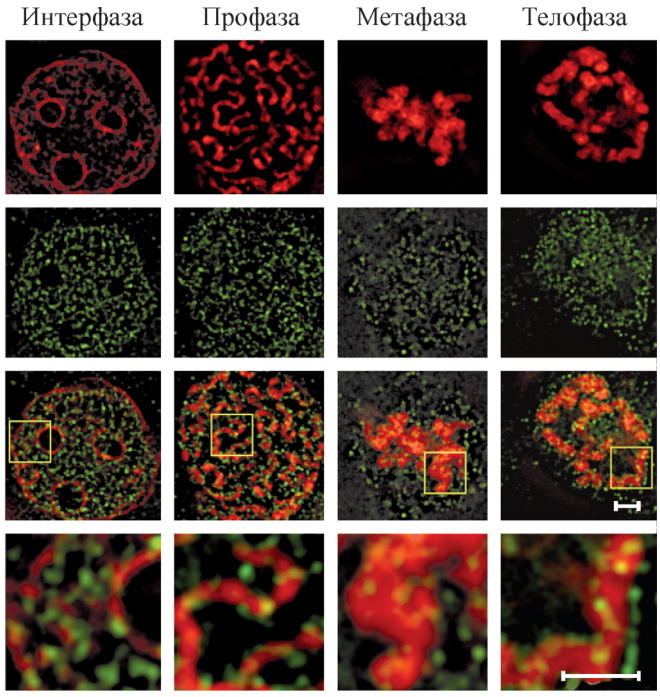

Рис. 1. Распределение Smc3 в клетках HeLa на различных стадиях клеточного цикла.

Иммунофлуоресценция: *красный* — выявление ДНК с помощью DAPI (*первый ряд*); *зеленый* — выявление Smc3 с помощью соответствующих антител (*второй ряд*). *Третий ряд* — совмещение сигналов; *нижний ряд* — увеличенные фрагменты ядер. *Масштабные отрезоки* — 2 мкм.

нов в клетках культуры HeLa были использованы кроличьи поликлональные антитела против субъединицы когезина Smc3. Поскольку нас в первую очередь интересовала связанная с хроматином фракция когезинов, перед фиксацией клетки 90 с лизировали в 0.1%-ном растворе тритона X-100 на PBS с 5 мМ $MgCl_2$ для вымывания растворимой фракции комплекса.

В интерфазе Smc3 локализуется преимущественно в ядре, за исключением ядрышка. При этом ядро окрашивается не гомогенно, а в виде многочисленных мелких фокусов или тяжей. Анализ колокализации Smc3 с хроматином, окрашенным DAPI, показывает, что Smc3 связан с хроматином неравномерно. Только незначительная фракция когезинов связана с гетерохроматином, интенсивно окрашенным DAPI, по большей части в околоядрышковой зоне (рис. 1, *первый столбец*). Основная масса Smc3 колокализуется с диффузным, слабоокрашенным эухроматином, а также располагается в DAPI-негативной нуклеоплазме. На самом деле, можно предположить наличие хроматина и в этих областях, однако его плотность упаковки здесь достаточно низкая, что не позволяет надежно визуализовать ДНК методами флуоресцентной микроскопии. Кроме того, известно, что эффективность связывания DAPI с GC-богатой ДНК, характерной для эухроматина, существенно ниже, чем с AT-богатой ДНК гетерохроматина (Kapuscinski, 1995; Sadoni et al., 2001).

На стадии профазы интенсивность окрашивания антителами против Smc3 заметно снижается по сравнению с интерфазой. Это выражается в первую очередь в уменьшении числа Smc3-позитивных фокусов. Smc3 в основном ассоциирован с конденсирующимися хромосомами, причем распределяется по периферии хроматид. Также наблюдается неравномерное распределение Smc3 по длине хромосом (рис. 1, *второй столбец*).

На стадии метафазы (рис. 1, *третий столбец*) количество выявляемого Smc3 еще более снижается, на хромосомах видны лишь небольшие редкие когезиновые центры. К сожалению, нам пришлось использовать при фиксации PBS с добавлением 5 мМ $MgCl_2$, в котором хроматин частично разворачивается, поскольку в условиях фиксации, лучше сохраняющих нативную структуру, флуоресцентный сигнал был сравним с уровнем шума (не иллюстрировано), по всей видимости из-за недоступности антигенов для антител. Подобная ситуация описана для родственного когезинам конденсинового комплекса (Kireeva et al., 2004). Необходимо отметить, что в используемых нами условиях частичной декомпактизации гетерохроматические участки оказываются более доступными для антител (Strukov et al., 2003; Kireeva et al., 2004). Таким образом, выявляемая низкая концентрация Smc3 в плотноупакованных участках хроматина не связана с недоступностью антигена, а отражает функциональные особенности когезинового комплекса.

На стадии телофазы (рис. 1, *четвертый столбец*) количество Smc3 вновь возрастает, вокруг хромосом можно наблюдать протяженные области, содержащие этот белок, особенно на периферии реконструирующегося ядра. Выявляемое распределение в целом хорошо соответствует опубликованным данным, показывающим, что связывание когезинов с хромосомами начинается в телофазе (Sumara et al., 2000).

Таким образом, в наших экспериментах наблюдалось неравномерное распределение когезинов по длине хромосом в профазе и метафазе, что полностью совпадает с наблюдениями других авторов (Waizenegger et al., 2000; Gandhi et al., 2006). Однако функциональное значение такого неоднородного распределения остается неясным. Возможно, когезины по-разному взаимодействуют с разными структурно-функциональными субдоменами хромосом.

К о г е з и я в э у- и г е т е р о х р о м а т и н е. Митотическая конденсация индивидуальных хроматид невозможна при сохранении когезии по всей длине хромосомы по топологическим причинам, поэтому наблюдаемое постепенное уменьшение количества выявленного антителами Smc3 от профазы к метафазе, коррелирующее с прогрессивной упаковкой хроматина, связано с диссоциацией когезина в области плеч хромосом. Представляется вполне логичным, что неравномерное распределение когезинового комплекса по длине хромосом коррелирует с неоднородностью компактизации. Еще в первых экспериментах обращал на себя внимание факт, что Smc3 слабо связан с гетрохроматином в интерфазе. Поэтому мы решили более точно установить, существует ли связь между структурным статусом хроматина и характером распределения когезинового комплекса.

Во-первых, мы решили проанализировать взаимодействие когезинов с искусственным гетерохроматиновым локусом, полученным в результате амплификации трансгенной конструкции, содержащей тандемные повторы Lac-репрессора и гена дигидрофолат редуктазы (Robinett et al., 1996). В линии CHO_AO3 амплифицированый участок формирует гетерохроматический гомогенно окрашенный район (homogenously stained region — HSR) (Li et al., 1998). В наших экспериментах во всех интерфазных клетках с компактным локусом когезиновый комплекс с ним не связан (рис. 2, *первый ряд*). Только при частичной

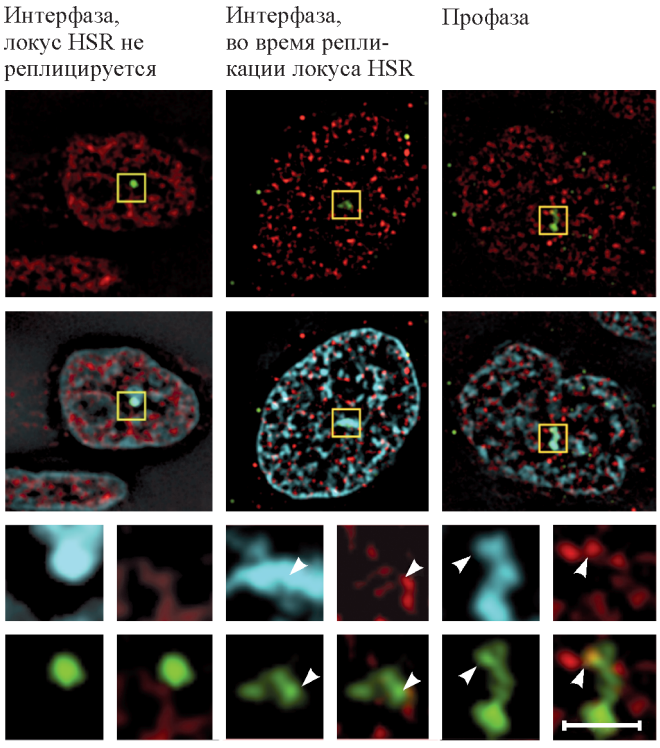

Рис. 2. Распределение Smc3 в клетках CHO_AO3.

Иммунофлуоресценция: *голубой* — выявление ДНК с помощью DAPI; *зеленый* — локус HSR; *красный* — выявление Smc3 с помощью соответствующих антител. *Нижние ряды* — увеличенные фрагменты изображения с локусом HSR. *Стрелками* показаны зоны колокализации локуса HSR и Smc3. *Масштабный отрезок* — 2 мкм.

декомпактизации локуса наблюдается неполная колокализация (рис. 2, *второй ряд*). Согласно литературным данным, в таком полуразвернутом состоянии локус находится только во время репликации в поздней S-фазе (Li et al., 1998), после которой он вновь конденсируется и приобретает вид одиночного гомогенно окрашенного локуса. Можно предположить, что сразу же после репликации две новосинтезированные сестринские хроматиды временно скрепляются когезиновым комплексом, но вскоре, перед последующей компактизацией, когезия прекращается и сестринские хроматиды локуса HSR еще в интерфазе до митоза компактизируются независимо, лежат рядом друг с другом и лишь морфологически образуют единый гомогенный конденсированный домен. В таком случае вскоре после репликации разрешение когезии необходимо для того, чтобы позволить двум сестринским хроматидам локуса компактизироваться независимо внутри единого домена. Нельзя исключить и второй вариант: если сестринские хроматиды упаковываются в HSR после репликации, не отделяясь друг от друга по всей длине, то их когезия будет обеспечиваться уже самим фактом их совместной упаковки, поэтому когезинов для поддержания когезии в составе такой структуры не требуется и они диссоциируют. В пользу второго предположения говорит следующее наблюдение: перед митотической упаковкой локус на очень короткое время слегка разворачивается, и только после этого наступает митотическая компактизация (рис. 2, *третий ряд*). Правомерен вопрос о том, что дает деконденсация уже компактизированного гетерохроматинового локуса перед митотической компактизацией. Долгое время считалось, что гетерохроматические участки только усиливают свою компактизацию при вступлении в митоз, при этом не происходит их принципиальной переупаковки (Woodcock, Ghosh, 2010). Но если она действительно имеет место, самым простейшим объяснением будет предположение о том, что декомпактизация необходима для расхождения совместно свернутых сестринских хроматид, которым в митозе необходимо компактизироваться независимо (рис. 3).

В профазе HSR выявляется в виде вытянутой вдоль плеча хромосомы структуры и вновь частично колокализуется с когезиновым комплексом. Возможно, когезины действительно снова находятся с ним в ассоциации, но более вероятным представляется другое объяснение. Во время митотической компактизации происходит значительная реорганизация хроматина (Strukov, Belmont, 2009), и последовательности HSR могут сближаться с обогащенными когезином локусами, но из-за ограниченности разрешения световой микроскопии мы не можем их различить.

Таким образом, бóльшую часть клеточного цикла когезиновый комплекс не ассоциирован с искусственным гетерохроматическим локусом HSR в культуре CHO_AO3 и связан с ним в интерфазе лишь непродолжительное время в период репликации.

Считается, что когезиновый комплекс удерживает две сестринские хроматиды рядом друг с другом сразу после репликации (Gerton, 2005). Мы предположили, что по крайней мере в период репликации когезины должны выявляться, по аналогии с HSR клеток CHO_AO3, и в областях гетерохроматина, а после репликации когезия сестринских хроматид может обеспечиваться самой упаковкой каждого гетерохроматинового субдомена в единый домен. Таким образом, нет необходимости в наличии значительного количества когезинов. Мы проверили, происходит ли временное накопление когезинового комплекса в зоне реплицирующегося хроматина. Для этой цели мы использовали в качестве репликативной метки EdU — аналог тимидина, не требующий, в отличие от BrdU, для своего выявления гидролиза ДНК и нарушения структуры хроматина.

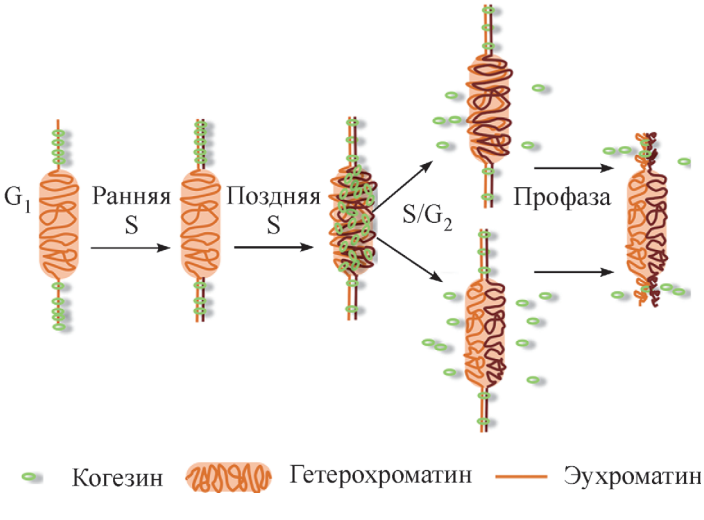

Рис. 3. Схема взаимосвязи когезии и сегрегации сестринских хроматид с митотической конденсацией эу- и гетерохроматиновых доменов.

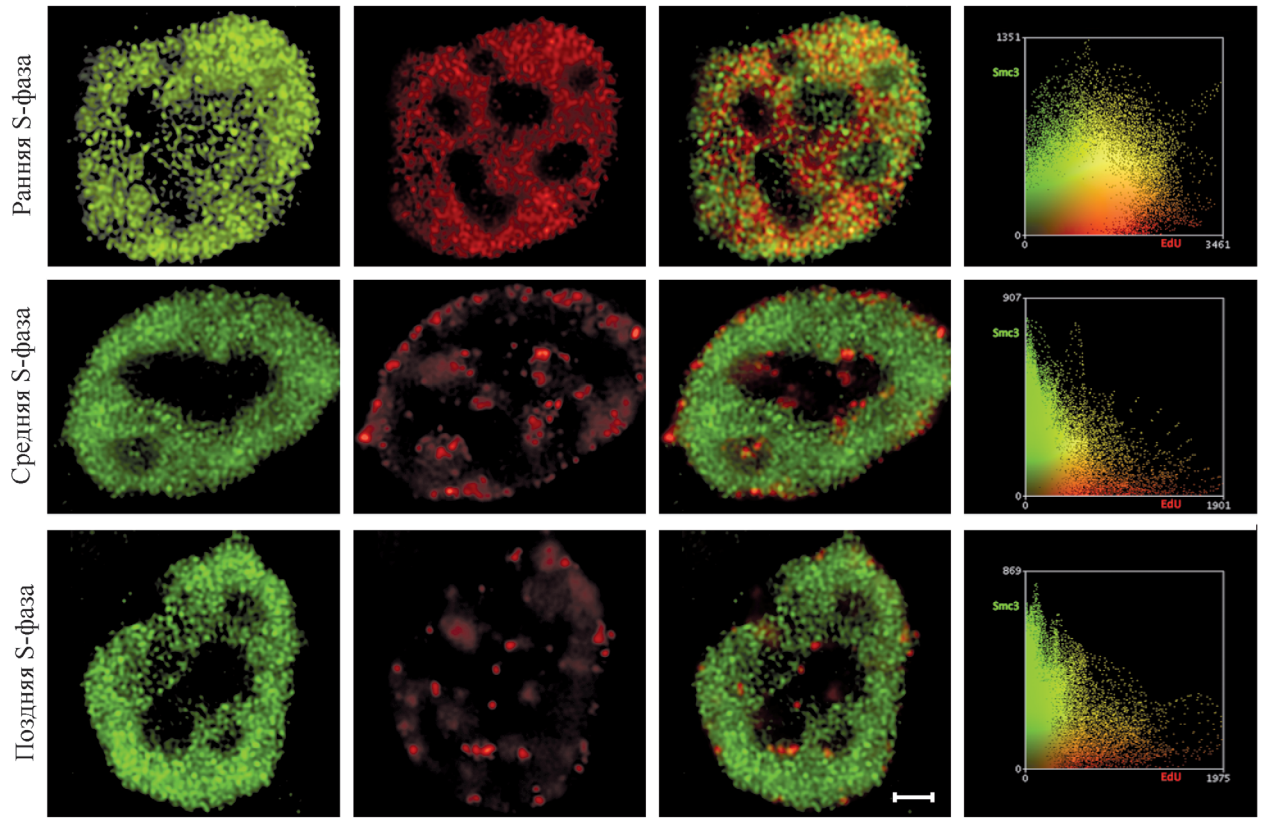

Рис. 4. Распределение Smc3 в S-фазе в клетках HT1080, культивировавшихся с репликативной меткой EdU в течение 10 мин.

Первые три столбца — SIM-микроскопия с суперразрешением. Иммунофлуоресценция: *зеленый* — выявление Smc3 с помощью соответствующих антител (*первый столбец*); *красный* — репликативная метка EdU (*второй столбец*). *Третий столбец* — совмещение сигналов. *Масштабный отрезок* — 2 мкм. *Последний столбец* — скаттер-плот пикселей в зависимости от интенсивности флуоресценции сигнала Smc3 и EdU в соответствующих клетках.

Клетки HeLa и HT1080 инкубировали с EdU в течение 10 мин и анализировали колокализацию Smc3 с сайтами репликации. В зависимости от паттерна репликации можно было разбить клетки на группы — находящиеся в ранней, средней и поздней S-фазах (Dimitrova, Gilbert, 1999). Эухроматин преимущественно реплицируется в начале S-фазы, гетерохроматин — в конце (Hiratani, Gilbert, 2009). И клетки HT1080, и клетки HeLa показывают идентичный характер распределения когезинов и репликативной метки. На рис. 4 показаны результаты анализа колокализации когезинов и репликативных сайтов методом SIM-микроскопии. Данные анализа колокализации Smc3 с зонами репликации также представлены в виде графиков распределения пикселей по интенсивностям сигнала Smc3 и EdU. Значительная колокализация Smc3 с фокусами репликации имеется только в клетках в начале S-фазы, когда реплицируется эухроматин, с середины S-фазы, во время репликации пристеночного и околоядрышкового гетерохроматина, когезины практически не выявляются в реплицируемых локусах (рис. 4).

Следующий эксперимент показал, что и после завершения репликации когезины не ассоциированы с гетерохроматином. Мы синхронизировали клетки HeLa и использовали 10 мин метку EdU либо через 1 ч после начала S-фазы (ранняя S), либо через 6 ч (поздняя S). При этом метится часть эу- или гетерохроматина соответственно. Через 10 ч после начала S-фазы бóльшая часть клеток была в процессе митоза. На этой стадии клетки фиксировали, окрашивали антителами к Smc3 и осуществляли детекцию EdU. Для анализа колокализации когезинового комплекса с эу- или гетерохроматином строили графики распределения пикселей по интенсивностям сигнала Smc3 и EdU для клеток, находящихся к моменту фиксации в профазе митоза или в интерфазе, наиболее вероятно, в фазе G_2. Для профазных клеток графики практически идентичны, но распределения для интерфазных клеток не совпадают. В интерфазных клетках наблюдается высокая степень колокализации Smc3 и метки EdU, включившейся в начале S-фазы (не иллюстрировано, практически идентично с распределением Smc 3 и EdU при фиксации в начале S-фазы, рис. 4, *верхний ряд*). Эксперименты по колокализации позднореплицирующегося хроматина и Smc3, напротив, подтверждают высказанное ранее предположение об отсутствии связи когезинов с гетерохроматином (не иллюстрировано, практически идентично с распределением Smc3 и EdU при фиксации в конце S-фазы, рис. 4, *нижний ряд*).

На основании полученных данных можно предположить, что когезия сестринских хроматид может осуществляться в гетерохроматиновых областях практически в отсутствие когезинов. Связывание большого количества когезинов с эухроматином может быть вызвано как обеспечением когезии, так и, возможно, участием когезинов в период интерфазы в процессах регуляции экспрессии генов и организации субдоменов хроматина (Sofueva et al., 2013; Yan et al., 2013; Zuin et al., 2013). В пользу этого

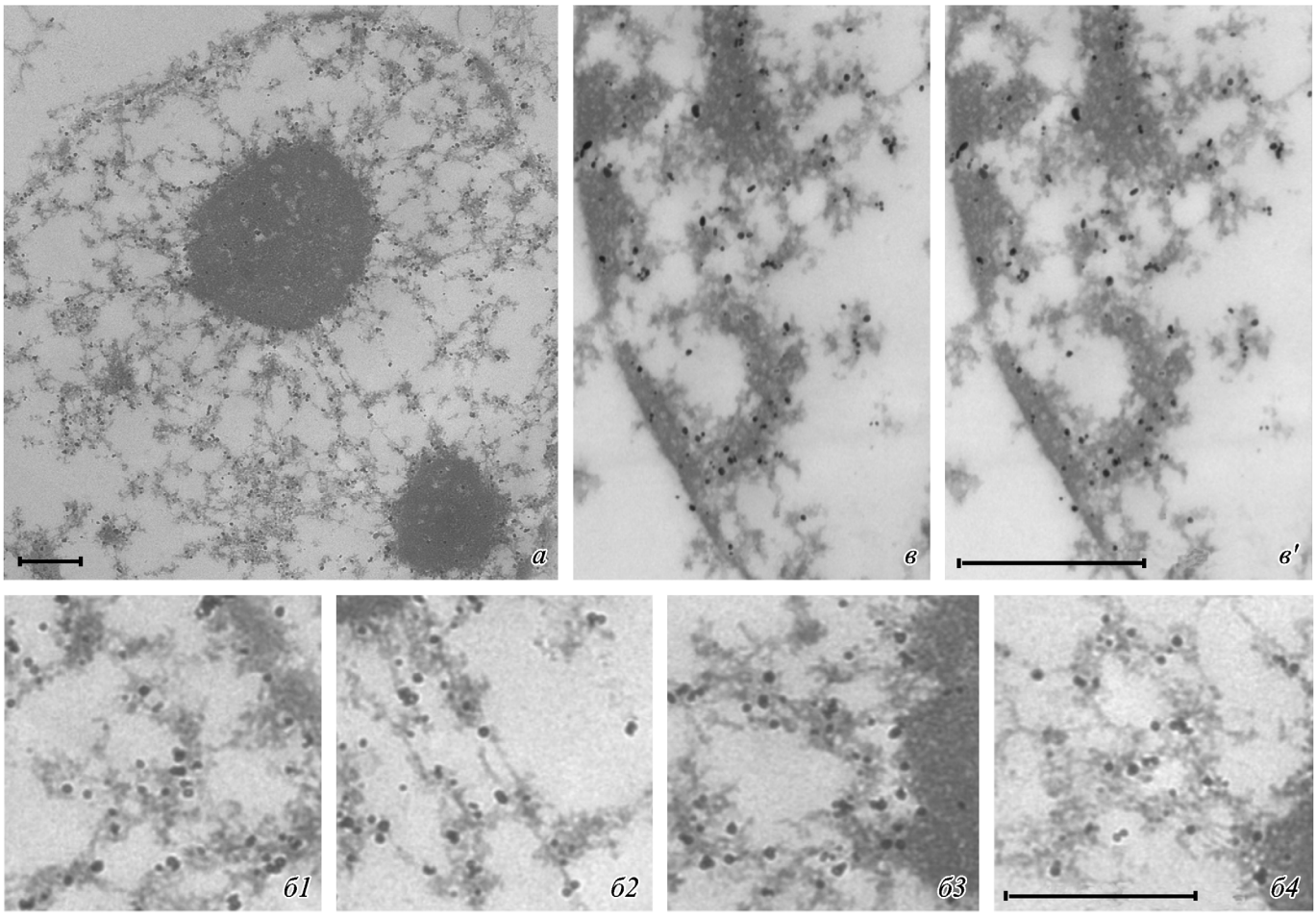

Рис. 5. Распределение Smc3 в интерфазной клетке HeLa. Иммуноэлектронная микроскопия.

а — общий вид ядра, срез толщиной 100 нм; *б1—б4* — увеличенные фрагменты ядра; *в*, *в'* — стереопара, срез толщиной 250 нм. *Масштабные отрезки* — 1 мкм.

предположения говорит и частичная колокализация когезинов с регулятором экспрессии CTCF (Parelho et al., 2008; Rubio et al., 2008; Stedman et al., 2008; Wendt, Peters, 2009; Zuin et al., 2013).

Таким образом, отсутствие ассоциации когезинов с гетерохроматизированным HSR в клетках CHO_AO3 не является уникальным для этого искусственного локуса, а отражает неоднородность распределения когезинов по длине хромосом.

Ультраструктурная локализация когезинов. Анализ локализации когезинового комплекса на ультраструктурном уровне может непосредственно выявить особенности его распределения в связи с характером организации хроматина. Для наилучших результатов необходимо сохранить хроматин в максимально близком к нативному состоянии. К сожалению, на ультраструктурном уровне нам не удалось эффективно визуализировать когезины в условиях, стабилизирующих ультраструктуру хроматина (50 мМ PIPES и 5 мМ $MgCl_2$; Kireev et al., 2008). По-видимому, это связано с высокой плотностью упаковки хроматина, которая препятствует диффузии антител. В пользу данного предположения свидетельствует тот факт, что в условиях частичной декомпактизации в PBS с добавлением 5 мМ $MgCl_2$ (Strukov et al., 2003; Kireeva et al., 2004) отчетливо проявляется локализация Smc3 на хроматине, кроме особенно плотно упакованных участков (рис. 5).

Результаты локализации Smc3 методами иммуноэлектронной микроскопии показывают, что в интерфазе когезиновый комплекс главным образом располагается в эухроматине вдоль 30-нанометровых фибрилл и вокруг 130—200-нанометровых хромонем. В блоках пристеночного и околоядрышкового гетерохроматина сигнал выявляется только по периферии, где хроматин частично развернут. В ядрышке Smc3 практически отсутствует. При удачном экваториальном срезе ядра, можно проследить за тонкими 10—30-нанометровыми фибриллами, тянущимися от ядрышка к периферии ядра, вдоль них локализуются и когезины (рис. 5).

В профазе компактизация хромосом проходит неравномерно по длине (Kireeva et al., 2004). Неоднородно распределены и когезины, в целом они выявляются в областях развернутого хроматина (рис. 6, *а*, *б*). Обращает на себя внимание, что даже на толстых 250-нанометровых срезах они нередко локализованы только с одной стороны 200-нанометровой хроматиды.

Визуальный анализ колокализации Smc3 с хроматином разной степени конденсации в профазе не давал возможности однозначно выявить зоны предпочтительной локализации когезинов, поэтому мы сегментировали

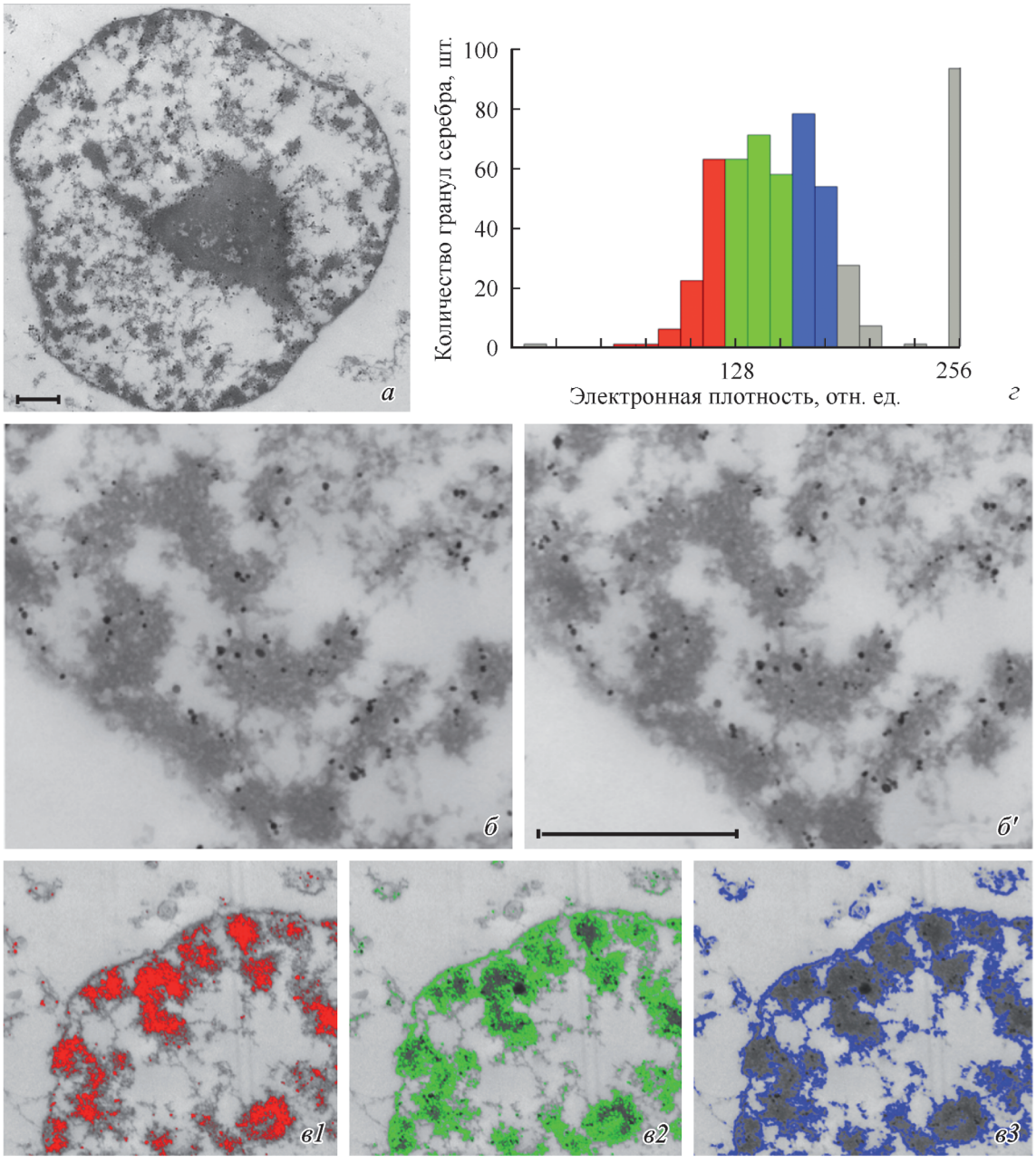

Рис. 6. Распределение Smc3 в профазной клетке HeLa.

Иммуноэлектронная микроскопия, полутонкий срез толщиной 250 нм. *а* — общий вид ядра; *б*, *б'* — стереопара увеличенного фрагмента; *в1*—*в3* — результат сегментирования изображения в зависимости от электронной плотности; *г* — гистограмма распределения иммуноэлектронной метки в зависимости от электронной плотности прилегающей области. *Масштабные отрезки* — 1 мкм. *Красный* — сильноконденсированный хроматин, *зеленый* — периферия сильно конденсированного хроматина, *синий* — тонкие эухроматические фибриллы. *Серый цвет* на гистограмме соответствует не относящимся к хроматину областям, имеющим либо очень высокую, либо очень низкую электронную плотность.

изображение по уровню электронной плотности, связанной со степенью конденсации хроматина, на области высококонденсированного гетерохроматина с максимальными значениями электронной плотности, зоны с менее конденсированным хроматином, имевшие меньшую электронную плотность, и наиболее прозрачные для электронов участки хроматина из тонких эухроматических фибрилл (рис. 6, *в*) и построили гистограмму зависимости распределения гранул серебра, отражающих локализацию когезинов, от электронной плотности ближайшего окружения (рис. 6, *г*). Полученное распределение согласуется с вышеизложенными соображениями о первоочередной ассоциации когезинового комплекса со слабоконденсированными участками хроматина. В анафазе митоза, как и ожидалось, уровень мечения хромосом сравним с уровнем шума (не иллюстрировано).

Таким образом, бóльшая часть связанных с хроматином когезинов обеспечивает когезию и организацию субдоменов в эухроматиновых зонах, в то время как в гетерохроматиновых доменах когезия, по всей видимости, обеспечивается другими механизмами. В связи с этим можно выдвинуть две гипотезы (рис. 3).

Во-первых, можно предположить, что после репликации две сестринские хроматиды образуют единый гетерохроматиновый домен и таким образом удерживаются рядом друг с другом. В таком случае в начале компактизации в профазе для независимой конденсации сестринских хроматид этих доменов, вероятно, необходима их предварительная частичная декомпактизация. Остается непонятным, на каком уровне при этом может происходить сегрегация сестринских хроматид в составе единого гетерохроматинового домена. Очевидно, что сегрегация имеет место на уровне 10-нанометровых нуклеосомных фибрилл, но происходит ли она на более высоких уровнях организации хроматина (30-нанометровые фибриллы и 120—200-нанометровые хромонемы), на каком именно и каковы ее механизмы, остается неясным. Необходимо отметить, что некоторые исследователи на основе анализа данных криоэлектронной микроскопии и рентгеноструктурного анализа интерфазного хроматина и митотических хромосом делают вывод об отсутствии каких-либо других уровней организации хроматина, кроме динамичных 10-нанометровых фибрилл (Maeshima et al., 2014), что не предполагает заметной сегрегации хроматид в интерфазе. В то же время последние данные группы Хирано (Hirano) противоречат такому представлению. Действительно, было показано, что активность комплекса конденсина II еще в S-фазе приводит к сегрегации субдоменов хроматина уже в интерфазе и необходима для дальнейшей нормальной сегрегации в митозе (Ono et al., 2013).

Возможен и второй вариант, согласно которому сестринские хроматиды сразу же после репликации сегрегируются друг от друга и компактизируются, образуя в интерфазе два независимых гетерохроматиновых домена, которые и переходят без значительных структурных перестроек в состав митотической хромосомы. Однако интерфазная сегрегация сестринских хроматид может существенно осложнить процесс репарации ДНК путем гомологичной рекомбинации, протекающий в G_2-фазе при индукции двухцепочечных разрывов (Downs et al., 2007). При этом наблюдаются деконденсация поврежденных гетерохроматиновых доменов (Cann, Dellaire, 2011), а также локальная аккумуляция когезинов для обеспечения сближения сестринских хроматид на время репарации. При этом остается неясным, за счет чего в период репарации может быть корректно восстановлена когезия локально сегрегировавших сестринских хроматид в условиях наличия большого количества повторов (Slotkin, Martienssen, 2007). В связи с этим нам представляется более вероятным, что когезия в гетерохроматиновых районах хромосом осуществляется без участия когезинов и сегрегация сестринских хроматид в них происходит непосредственно перед или в процессе компактизации хромосом в профазе.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 13-04-00885 И. И. К.).

Список литературы

Bose T., *Gerton J. L. 2010.* Cohesinopathies, gene expression, and chromatin organization. J. Cell Biol. 189 : 201—210.

Cann K. L., *Dellaire G. 2011.* Heterochromatin and the DNA damage response: the need to relax. Biochem. Cell Biol. 89 : 45—60.

Cremer T., *Küpper K.*, *Dietzel S.*, *Fakan S. 2004.* Higher order chromatin architecture in the cell nucleus: on the way from structure to function. Biol. Cell. 96 : 555—567.

Danscher G. 1981. Localization of gold in biological tissue. A photochemical method for light and electron microscopy. Histochemistry. 71 : 81—88.

Dimitrova D. S., *Gilbert D. M. 1999.* The spatial position and replication timing of chromosomal domains are both established in early G_1 phase. Mol. Cell. 4 : 983—993.

Downs J., *Nussenzweig M. C.*, *Nussenzweig A. 2007.* Chromatin dynamics and the preservation of genetic information. Nature. 447 : 951—958.

Gandhi R., *Gillespie P.*, *Hirano T. 2006.* Human Wapl is a cohesin-binding protein that promotes sister chromatid resolution in mitotic prophase. Curr. Biol. 24 : 2406—2417.

Gerton J. 2005. Chromosome cohesion: a cycle of holding together and falling apart. PLoS Biol. 3 : 371—374.

Harlow E., *Lane D. 2006.* Mounting samples in gelvatol or mowiol. CSH Protoc. 4461.

Hiratani I., *Gilbert D. 2009.* Replication timing as an epigenetic mark. Epigenetics. 4 : 93—97.

Kapuscinski J. 1995. DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. Biotech. Histochem. 70 : 220—233.

Kireev I., *Lakonishok M.*, *Liu W.*, *Joshi V. N.*, *Powell R.*, *Belmont A. S. 2008*. *In vivo* immunogold labeling confirms large-scale chromatin folding motifs. Nature meth. 5 : 311—313.

Kireeva N., *Lakonishok M.*, *Kireev I.*, *Hirano T.*, *Belmont A. S. 2004.* Visualization of early chromosome condensation: a hierarchical folding, axial glue model of chromosome structure. J. Cell Biol. 166 : 775—785.

Li G., *Sudlow G.*, *Belmont A. S. 1998.* Interphase cell cycle dynamics of a late-replicating, heterochromatic homogeneously staining region: precise choreography of condensation/decondensation and nuclear positioning. J. Cell Biol. 140 : 975—989.

Maeshima K., *Imai R.*, *Tamura S.*, *Nozaki T. 2014.* Chromatin as dynamic 10-nm fibers. Chromosoma. 123 : 225—237.

Ono T., *Yamashita D.*, *Hirano T. 2013.* Condensin II initiates sister chromatid resolution during S phase. J. Cell Biol. 200 : 429—441.

Parelho V., *Hadjur S.*, *Spivakov M.*, *Leleu M.*, *Sauer S.*, *Gregson H. C.*, *Jarmuz A.*, *Canzonetta C.*, *Webster Z.*, *Nesterova T.*, *Cobb B. S.*, *Yokomori K.*, *Dillon N.*, *Aragon L.*, *Fisher A. G.*, *Merkenschlager M. 2008.* Cohesins functionally associate with CTCF on mammalian chromosome arms. Cell. 132 : 422—433.

Rego A., *Sinclair P. B.*, *Tao W.*, *Kireev I.*, *Belmont A. S. 2008.* The facultative heterochromatin of the inactive X chromosome has a distinctive condensed ultrastructure. J. Cell Sci. 121 : 1119—1127.

Reynolds E. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electronmicroscopy. J. Cell Biol. 17 : 208—212.

Robinett C. C., *Straight A.*, *Li G.*, *Willhelm C.*, *Sudlow G.*, *Murray A.*, *Belmont A. S. 1996.* In vivo localization of DNA sequences and visualization of large-scale chromatin organization using lac operator/repressor recognition. J. Cell Biol. 135 : 1685—1700.

Rubio E. D., *Reiss D. J.*, *Welcsh P. L.*, *Disteche C. M.*, *Filippova G. N.*, *Baliga N. S.*, *Aebersold R.*, *Ranish J.*, *Krumm A. 2008.* CTCF physically links cohesin to chromatin. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 105 : 8309—8314.

Sadoni N., *Sullivan K. F.*, *Weinzierl P.*, *Stelzer E. H. K.*, *Zink D. 2001.* Large-scale chromatin fibers of living cells display a discontinuous functional organization. Chromosoma. 110 : 39—51.

Slotkin R. K., *Martienssen R. 2007.* Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. Nature Rev. Genet. 8 : 272—285.

Sofueva S., *Yaffe E.*, *Chan W. C.*, *Georgopoulou D.*, *Vietri Rudan M.*, *Mira-Bontenbal H.*, *Pollard S. M.*, *Schroth G. P.*, *Tanay A.*, *Hadjur S. 2013.* Cohesin-mediated interactions organize chromosomal domain architecture. EMBO J. 32 : 3119—3129.

Stedman W., *Kang H.*, *Lin S.*, *Kissil J. L.*, *Bartolomei M. S.*, *Lieberman P. M. 2008.* Cohesins localize with CTCF at the KSHV latency control region and at cellular c-myc and H19/Igf2 insulators. EMBO J. 27 : 654—664.

Strukov Y. G., *Belmont A. S. 2009.* Mitotic chromosome structure: reproducibility of folding and symmetry between sister chromatids. Biophys. J. 96 : 1617—1628.

Strukov Y. G., *Wang Y.*, *Belmont A. S. 2003.* Engineered chromosome regions with altered sequence composition demonstrate hierarchical large-scale folding within metaphase chromosomes. J. Cell Biol. 162 : 23—35.

Sumara I., *Vorlaufer E.*, *Gieffers C.*, *Peters B. H.*, *Peters J. M. 2000.* Characterization of vertebrate cohesin complexes and their regulation in prophase. J. Cell Biol. 151 : 749—762.

Waizenegger I. C., *Hauf S.*, *Meinke A.*, *Peters J. 2000.* Two distinct pathways remove mammalian cohesin from chromosome arms in prophase and from centromeres in anaphase. Cell. 103 : 399—410.

Wendt K. S., *Peters J.-M. 2009.* How cohesin and CTCF cooperate in regulating gene expression. Chromosome Res. 17 : 201—214.

Woodcock C. L., *Ghosh R. P. 2010.* Chromatin higher-order structure and dynamics. CSH Perspect. Biol. 2 : a000596.

Yan J., *Enge M.*, *Whitington T.*, *Dave K.*, *Liu J.*, *Sur I.*, *Schmierer B.*, *Jolma A.*, *Kivioja T.*, *Taipale M.*, *Taipale J. 2013.* Transcription factor binding in human cells occurs in dense clusters formed around cohesin anchor sites. Cell. 154 : 801—813.

Zuin J., *Dixon J. R.*, *van der Reijden M.*, *Ye Z.*, *Kolovos P.*, *Brouwer R.*, *Corput M.*, *Werken H.*, *Knoch T.*, *Ijcken W.*, *Grosveld F.*, *Ren B.*, *Wendt K. 2013.* Cohesin and CTCF differentially affect chromatin architecture and gene expression in human cells. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 111 : 996—1001.

Поступила 8 VII 2014

COHESION INSIDE EU- AND HETEROCHROMATIN IN HUMAN CELLS

V. D. Cherepanynets,[1, 2, *] *O. A. Zhironkina*,[1, 2] *O. S. Strelkova*,[2, 3] *S. Yu. Kurchashova*,[2] *I. I. Kireev*[1, 2]

[1] *Faculty of Biology*, *M. V. Lomonosov Moscow State University*, [2] *A. N. Belozersky Institute of Physical and Chemical Biology*, *M. V. Lomonosov Moscow State University*, *and* [3] *Faculty of Bioengineering and Bioinformatics*, *M. V. Lomonosov Moscow State University*; * *e-mail*: *temchromatinlab@gmail.com*

It is considered that sister chromatids are held together immediately after replication by special protein complex — cohesin that consists of Smc1—Smc3 core dimer and two additional subunits, Scc1 and Scc3. This process is called cohesion. We have characterized binding of cohesin complex to early- and late-replicated chromatin at different stages of the cell cycle in human cells HeLa and HT1080 using superresolution microscopy (based on Structural ilumination microscopy — SIM) and immunoelectron microscopy. It has been shown that cohesins do not play important role in cohesion of heterochromatic domains, but they provide cohesion and organization of subdomains in euchromatic regions.

K e y w o r d s: cohesin, chromatin, euchromatin, heterochromatin, segregation, sister chromatids, superresolution microscopy, immunoelectron microscopy.