

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ ПРЕДОБРАБОТКИ ПРЕПАРАТОВ НА ВЫЯВЛЕНИЕ 5-МЕТИЛЦИТОЗИНА В МЕТАФАЗНЫХ ХРОМОСОМАХ И ИНТЕРФАЗНЫХ ЯДРАХ IN SITU

© Н. А. Грудина,¹ Л. К. Сасина,¹ Е. М. Нониашвили,¹ Е. Г. Неронова,²
Л. И. Павлинова,^{1, 3} И. О. Сучкова,¹ Г. А. Софронов,¹ Е. Л. Паткин^{1, *}

¹ Институт экспериментальной медицины РАН, Санкт-Петербург, 194376,

² Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А. М. Никифорова МЧС РФ, Санкт-Петербург, 197136, и ³ Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, 199034;

* электронный адрес: elr44@mail.ru

Качественный и количественный анализ метилирования ДНК *in situ* на уровне клетки, хромосомы и хромосомного домена крайне важен для диагностики и лечения различных заболеваний, изучения старения и последствий воздействия окружающей среды. При этом вопрос о том, насколько выявляемые *in situ* закономерности метилирования обусловлены собственно метилированием ДНК *per se* или (и) доступностью ДНК для антител, зависящей от особенностей структуры хроматина и конденсации хромосом, остается открытым. Указанные явления могут вести к неправильной оценке собственно паттерна метилирования ДНК. Чтобы избавиться, насколько возможно, от этого недостатка, мы модифицировали наиболее широко используемый метод выявления метилцитозина *in situ* с помощью моноклональных антител. В настоящей работе мы показали, что мечение 5-метилцитозина в центромерном гетерохроматине, хромосомных плечах и сестринских хроматидах при иммунохимическом исследовании с помощью флуоресцентных антител в значительной степени зависит от условий предобработки препаратов хромосом. На недифференцированных клетках эмбриональной тератокарциномы мыши линии F9 обнаружено, что изменение условий хранения препаратов ведет к резкому уменьшению, вплоть до исчезновения, интенсивности флуоресценции сигнала в центромерном гетерохроматине. С помощью описанного в работе метода на хромосомах клеток F9 и лимфоцитов периферической крови человека впервые было обнаружено наличие асимметрии метилирования сестринских хроматид. Это может приводить к асимметрическим клеточным делениям и асимметричному транскрипционному статусу дочерних клеток. Предлагаемые модификации метода выявления 5-метилцитозина *in situ* позволяют получить более полную характеристику метилирования хромосом и хромосомных участков.

Ключевые слова: клетки эмбриональной карциномы мыши линии F9, лимфоциты периферической крови человека, метилирование ДНК, гетерохроматин, метафазные хромосомы, эпигенетическая регуляция, *in situ*-анализ, иммуноцитохимия, моноклональные антитела к метилцитозину, асимметричное метилирование сестринских хроматид.

Принятые сокращения: БрДУ — 5-бромдезоксиуридин, ДНМТазы — ДНК метилтрансферазы, КТ — комнатная температура, МетЦит — 5-метилцитозин, СХ — сестринские хроматиды, Тел-Гет — теломерный гетерохроматин, ЦенГет — центромерный гетерохроматин.

Метилирование ДНК — наследуемый эпигенетический маркер, представляющий собой одну из наиболее важных эпигенетических модификаций генома в организме млекопитающих (Саложин, Прохорчук, 2005; Ванюшин, 2006). Эта модификация заключается в ковалентном переносе метильной группы в позицию С-5 цитозинового кольца ДНК с помощью ДНК-метилтрансфераз (ДНМТаз). У млекопитающих метилирование цитозинового участка ДНК может осуществляться в любом смысловом участке генома (Lister et al., 2009).

Метилирование большей части ДНК необходимо для нормального развития (Patkin, 2002; Naaf, 2006) и играет очень важную роль в ряде ключевых процессов, в том числе геномном импринтинге, инактивации X-хромосо-

мы, подавлении транскрипции и транспозиции повторяющихся элементов, нарушения регуляции которых связаны с возникновением многих заболеваний и процессом старения (Паткин, 2008; Kim et al., 2009). В этих случаях возникают стойкие изменения общего и ген-специфического метилирования ДНК, что требует качественного и количественного анализа метилирования ДНК *in situ* на уровне клетки, хромосомы и хромосомного домена. Кроме того, воздействие таких факторов, как ионизирующее излучение (Pogribny et al., 2004), гормоны (Xu et al., 2010) и различные экотоксиканты (Baccarelli, Bollati, 2009), может повлиять на изменение уровня общего метилирования ДНК, в особенности различных типов повторяющейся ДНК, что приводит к изменению молекулярных

связей как в молекуле ДНК, так и между ДНК и белками хроматина и повышает риск заболеваний.

На сегодняшний день опубликовано большое число работ, посвященных анализу метилирования *in situ* ДНК отдельных ядер и метафазных хромосом. В ранних публикациях было описано действие различных метил-чувствительных эндонуклеаз рестрикции на хромосомы (Паткин, Сорокин, 1992; Fernandez-Peralta et al., 1994). В дальнейшем для изучения метилирования ДНК *in situ* использовали иммунохимическое выявление при помощи первичных моноклональных антител к 5-метилцитозину (МетЦит) и вторичных флуоресцентно меченных антител к авидину (Barbin et al., 1994; Miniou et al., 1997; De Capoa et al., 1999; Santos, Dean, 2006; Zaitseva et al., 2007; Pendiña et al., 2011). Результаты такого анализа показывают общую картину метилирования генома, позволяя в отличие от биохимических и молекулярно-генетических методов выявить топологические различия между гетерохроматином и эухроматином.

Наибольшая трудность в проведении анализа метилирования ДНК на метафазных хромосомах *in situ* заключается в выборе адекватных условий эксперимента, которые, с одной стороны, сохраняли бы целостность и морфологию хромосом и обеспечивали бы оптимальную доступность для антител — с другой. Результаты выявления метилирования ДНК хромосом *in situ* могут зависеть как от собственно метилирования ДНК, так и от особенностей организации хроматина в метафазных хромосомах и ядрах, определяющих доступность ДНК-мишени для антител. Иными словами, наблюдаемая картина мечения МетЦит *in situ* будет определяться как нуклеотидным составом ДНК, так и белковым составом хроматина и степенью денатурации ДНК, на которые могут влиять условия предварительной обработки препаратов для иммуноцитохимического выявления. В результате картина мечения МетЦит в разных хромосомах и хромосомных участках может различаться.

Таким образом, результаты исследования метилирования ДНК *in situ* могут существенно зависеть от особенностей приготовления препаратов хромосом, способа хранения препаратов, условий предварительной обработки и обработки антителами к метилцитозину. Подобные проблемы также поднимались в связи с классическим бэндрингом хромосом и с обработкой хромосомных препаратов ферментами, чувствительными к метилированию цитозина (Bickmore, 2001).

Наиболее исчерпывающее описание методики выявления МетЦит с помощью специфических антител было дано Барбин с соавторами (Barbin et al., 1994). В более поздних работах использовали различные модификации этого метода. Однако в подобных работах отсутствует описание возможного влияния условий предварительной обработки препаратов на выявление метилирования ДНК при использовании флуоресцентно меченных антител. Таким образом, одной из задач нашего исследования стало изучение влияния условий хранения (старения) препаратов и денатурирования ДНК на иммунохимическое выявление МетЦит в метафазных хромосомах и интерфазных ядрах. Особое внимание было уделено выявлению МетЦит в центромерном (ЦенГет) и теломерном (ТелГет) гетерохроматине и обнаружению возможной асимметрии паттерна метилирования сестринских хроматид (СХ).

Предложенная в работе новая модификация иммунохимического окрашивания позволяет получить более информативную картину, чем применение ранее описанных

методов, использование которых фактически выявляло дифференциальную окраску R-типа, т. е. отражало распределение GC-сайтов и не могло являться основанием для оценки функционально значимых изменений в уровне метилирования.

Материал и методика

Клетки и их культивирование. Клетки эмбриональной карциномы мыши линии F9 были получены из Российской коллекции клеточных культур Института цитологии РАН (Санкт-Петербург). Клетки F9 для получения препаратов культивировали при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂ в 6-луночных плоскодонных планшетах (Orange Scientific, Бельгия) либо в вентилируемых культуральных флаконах (25 см², Jet Biofil, Канада) в среде DMEM с добавлением 10 % эмбриональной сыворотки телят (Биолот, Россия; Jet Biofil, Канада). Планшеты и флаконы покрывали 0.2%-ным желатином. Клетки культивировали в течение 16 ч, затем рассевали с плотностью $1.8 \cdot 10^4$ кл./мл во флаконы со средой DMEM с добавлением 20 % эмбриональной сыворотки телят и инкубировали при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂. В работе также использовали лимфоциты периферической крови человека. Культивирование лимфоцитов и приготовление хромосомных препаратов проводили по общепринятым методикам (Баранов, Кузнецова, 2006).

Приготовление препаратов метафазных хромосом. Препараты метафазных хромосом из клеток F9 готовили по общепринятым методикам с описанными ранее модификациями (Сучкова и др., 2004). Клетки инкубировали в присутствии 100 нг/мл коллемеда (Gibco, США) 45 мин, снимали трипсином, затем подвергали гипотоническому шоку (0.075 М KCl при 37 °С в течение 15 мин) и фиксировали метанол-уксусным фиксатором (3 : 1, v/v). Культивирование лимфоцитов и приготовление хромосомных препаратов проводили по общепринятым методикам (Баранов, Кузнецова, 2006) с использованием метанол-уксусной фиксации. После хранения (различные условия хранения и старения препаратов детально описаны в разделе «Результаты») препараты дофиксировали смесью этанол—ледяная уксусная кислота (3 : 1) в течение 10 мин, дважды промывали 96%-ным этанолом по 10 мин и сушили на воздухе в течение 15 мин.

Имуноцитохимическое выявление паттерна метилирования ДНК. В качестве базовых использовали методы, описанные ранее (Santos, Dean, 2006; Pendiña et al., 2011) с некоторыми важными модификациями в предобработке препаратов. В первую очередь при культивировании клеток мы не применяли включения 5-бромдезоксигуанидина (БрДУ) в хромосомы, которое часто используют для улучшения качества получаемой картины. Мы также не использовали УФ-облучение препаратов и проводили окрашивание DAPI после обработки антителами к МетЦит. Мы использовали первичные антитела (АТ1) мыши к МетЦит (Abcam, США) и вторичные антитела (АТ2) козы F(ab')₂ к иммуноглобулинам IgM мыши, конъюгированные с флуоресцентной меткой +DyLight 550 (Abcam, США). Препараты хромосом инкубировали в 10 мМ HCl в течение 5 мин при комнатной температуре (КТ), обрабатывали пепсином (конечная концентрация 5—10 мкг/мл в 10 мМ HCl) в течение 10 мин при 37 °С во влажной камере. Промывали

дистиллированной водой в течение 1 мин при КТ. Обезвоживали этанолом (70, 90 и 96 %, по 3 мин в каждой концентрации). Сушили на воздухе в течение 15 мин. Затем препараты инкубировали 20 мин в 2 М HCl при КТ или при 26 °С и промывали в ледяном PBS в течение 1 мин, 2 раза в PBS в течение 3 мин и 2 раза в дистиллированной воде в течение 3 мин, после чего препараты сушили на воздухе в течение 15 мин. Препараты инкубировали 60 мин при 37 °С во влажной камере в блокирующем растворе — 1%-ный блокирующий реагент (Boehringer Mannheim GmbH) и 0.1%-ный Tween 20 в PBS, затем 60 мин с АТФ в PBStb (1 : 100) при 26 °С во влажной камере. Препараты промывали 3 раза в растворе PBSt (0.03 % Tween 20 в PBS) в течение 5 мин. Затем инкубировали 60 мин с АТФ в PBStb (1 : 250) при 26 °С. После промывания препаратов в растворе PBSt (3 раза в течение 5 мин) препараты обезвоживали этанолом (70, 90 и 96 %, по 3 мин в каждой концентрации) и сушили на воздухе в течение 15 мин в темноте. Препараты окрашивали DAPI (1 : 500 в PBS) в течение 4 мин при КТ в темноте, интенсивно промывали в PBS и заключали в среду DAKO.

Микроскопия и обработка изображений. Использовали стандартную методику микроскопии и обработки изображений (Sasina et al., 2013). Конфокальные изображения получали с использованием инвертированного конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM 510 Meta (Zeiss, Германия) с иммерсионным объективом PlanApochromat 63×/1.4 Oil. Флуоресценцию возбуждали лазером с длиной волны 561 нм. Препараты изучали при КТ. Размер объемной точки составлял 0.10×0.10×0.5 мкм. Изображения получали в проходящем свете при помощи метода дифференциально-интерференционного контраста. Обработку и анализ изображений осуществляли при помощи прилагаемого к микроскопу программного обеспечения LSM 510 и ImageJ

1.44p (<http://ImageJ.nih.gov/ij/>). Для каждого эксперимента получали не менее 10 изображений. Производили псевдоокраску флуоресцентных сигналов от DAPI и антител к MetЦит (+DyLight 550).

Использованные реактивы: фосфатно-солевой буферный раствор (PBS), натрий-фосфатный буфер и NaCl (Invitrogen, США); блокирующий реагент (Boehringer Mannheim GmbH, Германия); Tween20, пепсин и DAPI (Sigma, США); первичные антитела к MetЦит (ab73938) и антиавидиновые вторичные антитела козы к IgM мыши, конъюгированные с +DyLight 550 (ab98747) (Abcam, США); HCl (Sigma, США); этанол и ледяная уксусная кислота («Вектон», Россия); заключающая среда DAKO (An Agilent Technologies Company, США).

Результаты

В настоящей работе установили зависимость выявляемого при помощи иммуноцитохимической детекции паттерна метилирования ДНК хромосом и ядер от условий предварительной обработки препаратов. В зависимости от протокола предобработки препаратов наблюдали два основных типа метилирования главным образом центрального гетерохроматина. Основные результаты иммуноцитохимического выявления MetЦит в зависимости от условий предобработки суммированы ниже и в таблице.

Протокол 1. Препараты хранили при 4 °С в течение 5—15 сут (рис. 1, а). Обработку 2 М HCl проводили при КТ. После мечения MetЦит на препаратах, хранившихся в течение 5 сут, наблюдали сильный сигнал в С-гетерохроматине и более слабый сигнал на большей части ТелГет. Хромосомные плечи метилились слабо, но при этом было выявлено несколько ярко флуоресцирующих отдельных точек, расположенных симметрично и асиммет-

Влияние условий предобработки цитологических препаратов хромосом и ядер на результаты иммуномечения метилированной ДНК in situ

Номер протокола	Условия предобработки препаратов			Особенности выявляемого паттерна метилированной ДНК при использовании антител к MetЦит					
	сроки и условия хранения препаратов	температура хранения	температура обработки 2 М HCl	интерфазные ядра	ЦенГет	ТелГет	хромосомные плечи	асимметричное метилирование сестринских хроматид	
								точечные области	протяженные участки
1	5—15 сут	4 °С	КТ	Частичная колокализация областей мечения антителами и DAPI	Метятся	Метятся	Слабое мечение	Четко выражены	Не выражены
2	3 мес	4 °С	КТ	Однородное мечение	Не метятся	»	Неоднородное мечение	Нет	Отдельные участки
3	3 мес, затем еще 3 мес	4 °С –20 °С	26 °С	То же	» »	»	Однородное мечение	»	Очень слабое мечение
4	2—3 сут (пленка с осушителем), 19—20 ч, 2—3 ч, 1 нед—3 мес	КТ 55 °С КТ –20 °С	26 °С	» »	» »	»	Неоднородное мечение	Четко выражены	Четко выражены

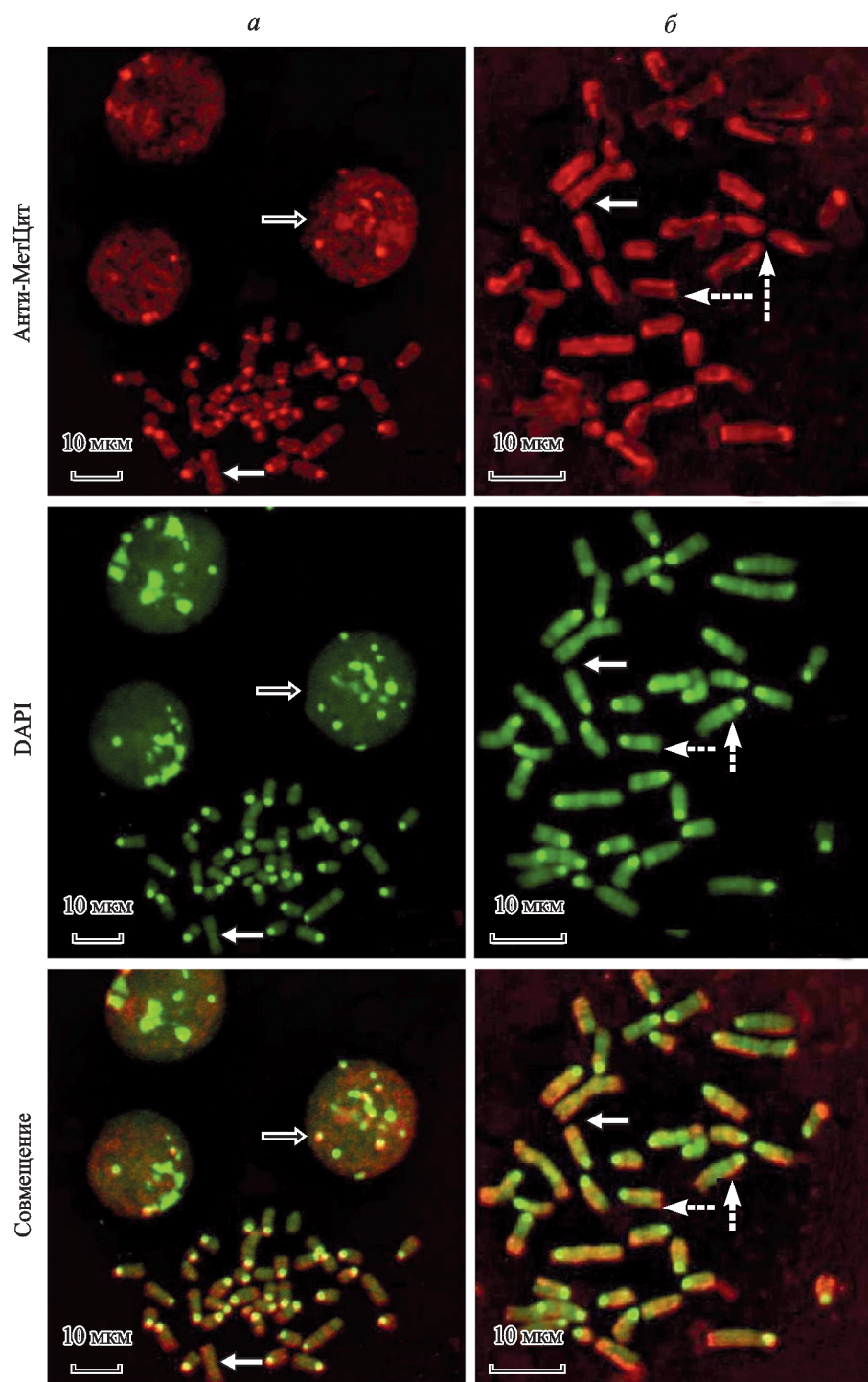


Рис. 1. Паттерны мечения МетЦит в хромосомах и ядрах недифференцированных клеток линии F9 в соответствии с 1-м и 2-м протоколами предварительной обработки препаратов.

а — использование протокола 1. Интенсивное мечение МетЦит и слабое ТелГет. На плечах хромосом наблюдаются асимметрично расположенные точки, интенсивно меченные антителами к МетЦит. В интерфазных ядрах видно мечение МетЦит, а при окраске DAPI выявляется гетерохроматин (отмечено двойными стрелками). При совмещении в отличие от метафазных хромосом только часть блоков гетерохроматина колокализована с областями метилирования. *б* — использование протокола 2. В компактизированных метафазных хромосомах видно четкое различие CX по уровню метилирования. На CX наблюдаются асимметричные протяженные участки, различающиеся по уровню метилирования (показаны пунктирными стрелками). В ЦенГет сигнал отсутствует, ТелГет позитивно мечается. После окрашивания DAPI отмечали слабые, но видимые G-бэнды и положительное окрашивание ЦенГет. На обоих рисунках стрелкой показана Робертсоновская хромосома (rob 2;8, центрическое слияние), на которой отсутствует мечение ЦенГет антителами к МетЦит, ЦенГет не окрашивается DAPI. Красный сигнал — антитела к МетЦит, зеленый сигнал — DAPI.

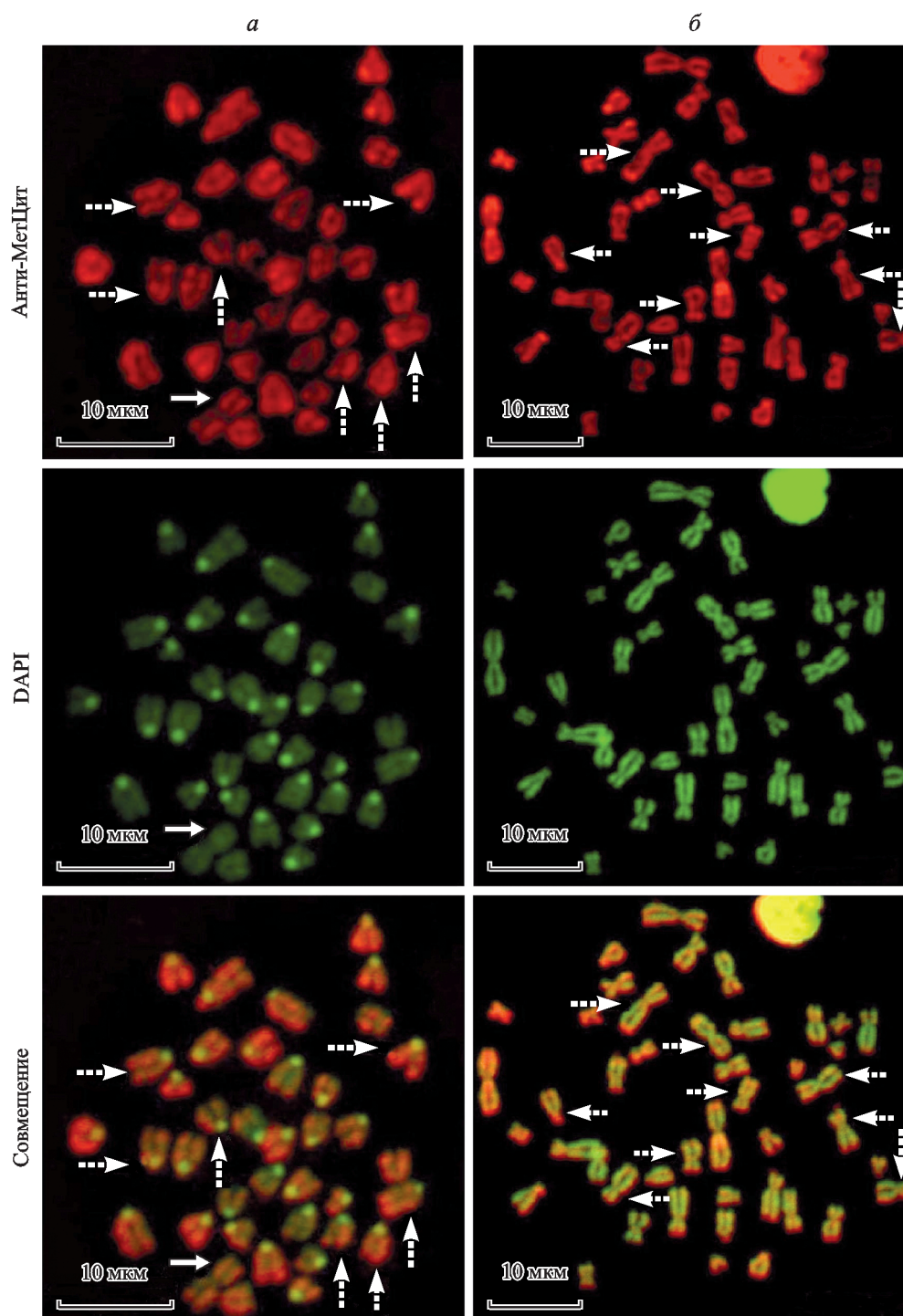


Рис. 2. Иммунохимическое мечение МетЦит в хромосомах и ядрах недифференцированных клеток линии F9 (а) и в хромосомах лимфоцитов периферической крови человека (б) в соответствии с протоколом 4.

Пунктирными стрелками отмечены асимметрично метилированные сестринские хроматиды (СХ) на многих хромосомах. На СХ видны симметрично и асимметрично расположенные яркие точки и длинные асимметрично расположенные метилированные сегменты. Стрелкой показана Робертсоновская хромосома (rob 2;8, центрическое слияние).

рично на СХ. Центромеры субметацентрической Робертсоновской транслоцированной хромосомы линии F9 не метилились, а теломеры метилились слабо. После окрашивания DAPI отмечали интенсивное окрашивание ЦентГет и слабое окрашивание хромосомных плеч для всех хромосом, кроме Робертсоновской транслокации. При более продолжительном хранении препаратов (до 15 сут) Мет-

Цит хромосомных плеч метился слабее, чем на препаратах, хранившихся в течение 5 сут. После окрашивания DAPI выявляли С-бэндинг, сравнимое с таковым при хранении препаратов в течение 5 сут. В интерфазных ядрах (рис. 1, а) в основном наблюдали колокализацию зон интенсивного окрашивания DAPI и мечения МетЦит, однако присутствовало и несколько дополнительных об-

ластей мечения МетЦит, не колокализованных с областями окрашивания DAPI.

Протокол 2. Препараты хранили в течение 3 мес при 4 °С. Обработку 2 М HCl проводили при КТ. После иммуноцитохимического мечения МетЦит менее конденсированных метафазных хромосом паттерн мечения был сходен с картиной R-бэндирирования без заметного мечения С-гетерохроматина. Окрашивание DAPI выявило картину G-бэндирирования. Совмещение этих изображений дало картину R—G-бэндирирования. После использования антител к МетЦит при сравнении более конденсированных коротких метафазных хромосом наблюдали заметные различия в метилировании СХ (рис. 1, б). В отличие от картины, получаемой после мечения препаратов, подготовленных по протоколу 1, где наблюдали отдельные асимметрично расположенные ярко флуоресцирующие точки на СХ, в случае использования протокола 2 паттерны метилирования на СХ представляли собой протяженные дифференциально метилированные участки. В центромерных районах положительных сигналов не обнаруживали, несмотря на то что в теломерных районах гетерохроматин метился. Окраска DAPI была слабой, окрашивались G-бэнды и ЦенГет.

Протокол 3. Препараты хранили в течение 3 мес при 4 °С, а затем 3 мес при –20 °С. Обработку 2М HCl проводили при 26 °С. При такой подготовке препаратов после иммунохимического мечения не выявили МетЦит в ЦенГет, в то время как в теломерных участках гетерохроматина наблюдали флуоресцентный сигнал. Хромосомные плечи были более или менее однородно слабо окрашены, однако наряду с этим присутствовали более ярко окрашенные асимметрично расположенные точки. Интерфазные ядра были однородно окрашены, однако присутствовало нескольких ярких сигналов, которые не были колокализованы с блоками гетерохроматина. При окрашивании DAPI в ЦенГет наблюдали яркое окрашивание, но бэндирирование было выражено слабо. В интерфазных ядрах при окрашивании DAPI были видны яркие и крупные блоки. При окрашивании DAPI не наблюдали различий между препаратами обработанными кислотой при разной температуре.

Протокол 4. Препараты после приготовления упаковывали в пленку с поглотителем и индикатором влаги и хранили в течение 2—3 сут при КТ. Затем препараты прогревали в течение 19—20 ч при 55 °С и выдерживали в течение 2—3 ч при КТ. После этого препараты хранили от 1 нед до нескольких месяцев при –20 °С. Обработку 2 М HCl проводили при 26 °С. При мечении МетЦит картина в целом была аналогична картине, описанной при использовании протокола 3. МетЦит в ЦенГет не выявлялся, в то время как МетЦит в ТелГет метился антителами (рис. 2, а). На метафазных хромосомах отмечали симметрично и асимметрично расположенные яркие точки и более длинные асимметрично расположенные флуоресцентно меченные сегменты (рис. 2, а). Длинные слабо конденсированные хромосомы метилились гетерогенно вдоль плеч хромосом и асимметрично на СХ, хотя и не столь выражено, как в случае более конденсированных метафазных хромосом. В интерфазных ядрах наблюдали однородное мечение. При окрашивании DAPI на хромосомах выявляли относительно слабые бэнды, а ЦенГет был ярко окрашен.

Протокол 4 использовали для выявления МетЦит в хромосомах лимфоцитов периферической крови человека (рис. 2, б). В отличие от хромосом, полученных из

клеток F9, на хромосомах человека МетЦит достаточно ярко выявлялся в ЦенГет нескольких хромосом. Наиболее вероятно, что это были хромосомы 1, 9 и 16, так как ранее было показано, что при окрашивании DAPI выявляется ЦенГет этих хромосом (Баранов, Кузнецова, 2006). Кроме этого, на ряде препаратов, полученных из лимфоцитов человека, мы наблюдали асимметричное метилирование СХ многих хромосом (рис. 2, б).

Таким образом, наиболее важными факторами, определяющим паттерн мечения МетЦит *in situ* при помощи моноклональных антител, являются продолжительность и температурный режим хранения препаратов.

Обсуждение

Адекватность оценки физиологически важных изменений метилирования ДНК на уровне хромосом, хромосомных участков и интерфазных ядер крайне важна при изучении механизмов клеточной памяти. Учитывая современные данные, касающиеся быстрого изменения метилирования ДНК при транскрипции (Metivier et al., 2008), это важно и при изучении различных внешних воздействий, включая действие экотоксикантов (Patkin, Quinn, 2011). Особенности паттернов мечения антителами, специфическими к МетЦит, могут зависеть как от метилирования ДНК *per se*, так и от доступности метилированной ДНК для антител, которая обусловлена структурой хроматина. Последняя определяется модификациями белков хроматина, характером взаимодействия метилированной ДНК и метил-специфическими белками, в первую очередь MeCP2 (Lewis et al., 1992), степенью денатурированности ДНК и ее нуклеотидным составом. Как было продемонстрировано в работах, посвященных изучению механизмов бэндирирования, условия предобработки фиксированных цитологических препаратов могут оказывать значительное влияние на наблюдаемую картину дифференциального окрашивания (Bickmore, 2001). Т. е. можно предполагать, что модификации в обработке фиксированных хромосом, изменяя указанные выше параметры хроматина, будут влиять на картину метилирования, выявляемую с помощью иммунохимических методов, отражая при этом как собственно уровень метилирования ДНК, так и доступность мишени — метилированной ДНК для связывания с антителами.

В связи с перечисленными выше соображениями было изучено влияние в первую очередь условий хранения препаратов, а также денатурации ДНК на морфологию хромосом и выявляемость МетЦит *in situ*. В отличие от большинства работ мы исключили применение БрДУ в процессе культивирования клеток, поскольку было показано, что его присутствие изменяет уровень метилирования ДНК (Schneider, d'Adda di Fagagna, 2012). Более того, исключение БрДУ позволяет избежать культивирования клеток *in vitro*, которое в ряде случаев, особенно в клинической практике, затруднено. Кроме того, мы исключили УФ-облучение, которое часто используется для увеличения уровня сигнала при иммунохимическом мечении антителами к МетЦит. Известно, что УФ-облучение ведет к возникновению ковалентных связей между белками и между белками и ДНК внутри хроматина (Bianchi, Morgan, 1985), т. е. и включение в состав ДНК БрДУ и УФ-облучение могут приводить к ложноположительным или ложноотрицательным результатам. Также во всех случаях окрашивание DAPI проводили уже после окрашивания

на МетЦит, что позволило совместить паттерн метилирования и дифференциальную окраску хромосом. Применение описанных методических модификаций позволило выявить несколько закономерностей в выявлении МетЦит *in situ*, связанных с использованием различных протоколов предобработки фиксированных препаратов перед иммунохимической детекцией МетЦит.

Было установлено, что при самом непродолжительном времени хранения (протокол 1) ЦенГет метился специфическими антителами к МетЦит и достаточно ярко окрашивался DAPI (рис. 1; см. таблицу). Такие результаты можно объяснить тем, что мажорные и минорные сателлиты ЦенГет клеток мыши, включая клеточную линию F9, сильно метилированы (Joseph et al., 1989; Teubner, Schulz, 1994). В свою очередь повышенная плотность МетЦит в районе ЦенГет обусловлена локализацией высокоповторяющихся сателлитов в этом регионе, содержащем множество потенциальных сайтов CpG для метилирования и сайтов AT, окрашивающихся DAPI.

В отличие от центромерных повторов теломерные TTAGGG-повторы позвоночных не содержат CpG-последовательностей, которые потенциально могут метилироваться ДНМТазы, тогда как в соматических клетках человека и грызунов прилегающие субтеломерные регионы с высокой плотностью CpG-последовательностей метилированы (Brock et al., 1999; Gonzalo et al., 2006). На связь наблюдаемого паттерна мечения метилцитозина с локализацией различных типов повторяющейся ДНК указывает характер мечения ЦенГет субметацентрической хромосомы, образовавшейся в результате Робертсоновской транслокации [rob 2;8] (Alonso et al., 1991), характерной для линии F9. При использовании протокола 1 в центромерах этой хромосомы наблюдали очень слабый сигнал при использовании как антител к МетЦит, так и DAPI. Это можно объяснить тем, что центромеры Робертсоновской метацентрической хромосомы в отличие от центромерных районов остальных хромосом, представляющих собой консервативные, тандемно повторяющиеся последовательности минорных и мажорных сателлитов (Komissarov et al., 2011), формируются минорными сателлитными ДНК слитых телоцентрических хромосом (Gargna et al., 2001). При кратковременном хранении препаратов (протокол 1) МетЦит хромосомных плеч выявлялся слабо, а на СХ наблюдали более яркие сигналы, представленные в виде симметрично и асимметрично расположенных точек. В то же время окрашивание хроматид DAPI было слабым, но всегда симметричным и напоминающим классическое С-бэндинг. Хотя механизм наблюдаемых особенностей выявления МетЦит согласно протоколу 1 остается не до конца ясным, надо отметить, что анализ метилирования ДНК в ЦенГет и ТелГет важен. Это связано с тем, что именно эти регионы хромосом чрезвычайно значимы для жизнедеятельности клетки, кроме того, вероятно их участие в патологических процессах (Plohl et al., 2008; Kim et al., 2009; Henikoff, Furuyama, 2012).

Увеличение времени и изменение температурного режима хранения вели к резкому уменьшению интенсивности сигнала от МетЦит в ЦенГет при одновременном увеличении интенсивности мечения плеч хромосом и более выраженной асимметричности метилирования СХ (рис. 2; см. таблицу). Эти изменения можно объяснить тем, что хранение (старение) фиксированных препаратов хромосом приводит к деградации хромосомной ДНК (Mezzanotte et al., 1988), денатурации ДНК (Darzynkie-

wicz et al., 1976) и возникновению ковалентных сшивок белков хромосом между собой и с ДНК (Mezzanotte et al., 1988). Таким образом, происходит два разнонаправленных процесса. Такие сшивки могут предотвращать потерю даже деградированной ДНК «состаренных» хромосом при последующих инкубациях, создавая эффект стабилизации хроматина, и конечный видимый паттерн будет определяться, видимо, плотностью метилированных GC-сайтов в ДНК. При кратковременном хранении (протокол 1) препараты более сильно подвержены воздействию HCl и пепсина, которые ведут к депротенизации хроматина и денатурации ДНК, что обеспечивает лучшую доступность МетЦит для специфических антител и соответственно обуславливает интенсивное мечение. При этом на плечах хромосом, видимо, происходит более выраженная по сравнению с гетерохроматином потеря ДНК, в том числе метилированной, что ведет к уменьшению связывания антител и DAPI, в результате чего формируется картина, напоминающая С-бэндинг. Интенсивно меченные асимметричные точки могут представлять собой сайты с высокой плотностью метилированной ДНК.

Можно предположить, что при более длительном хранении происходят сшивки белков хроматина между собой и белков с ДНК, что уменьшает доступность денатурированной ДНК для специфических антител, но одновременно имеет место лучшая сохранность ДНК, что ведет к более интенсивному мечению плеч хромосом. При этом процесс маскировки ДНК-мишени, затрудняющий связывание антител, будет наиболее выражен именно в ЦенГет, в связи с тем что в районе центромер находится большое количество белков и РНК (Кленов, Гвоздев, 2005). Сильное окрашивание DAPI обусловлено, скорее всего, конденсацией хроматина (Mascetti et al., 2001). Также возможно, что наблюдаемая высокая интенсивность мечения антителами к МетЦит плеч хромосом зависит от того, что связывание антител происходило не только в «CpG-островках», но и в повторяющихся последовательностях (Jones, Baylin, 2002; Gupta et al., 2010), включая транспозоны и тандемные повторы (Kim et al., 2009), которые составляют большую часть генома. В частности, в геноме мыши метилирование повторяющихся элементов B1, аналогичных Alu-повторам у человека, наряду с транспозонами и мини-сателлитами может определять наблюдаемое глобальное метилирование ДНК в хромосомах (Yates et al., 1999; Jeong, Lee, 2005). Вполне вероятно, что метилирование повторов определяет фоновую окраску хромосом и ядер.

Таким образом, влияние различных способов хранения препаратов на выявляемую при помощи иммуномечения *in situ* картину метилирования ДНК может быть обусловлено воздействием перечисленных выше факторов на ДНК и метил-специфические белки хроматина (Sasai, Defossez, 2009), а также на их взаимодействие. Содержание таких белков в различных областях хроматина обусловлено уровнем метилирования повторов ДНК *per se* и упомянутыми сшивками этих, а возможно, и других белков между собой и с ДНК, локализованными в ЦенГет и эухроматине плеч хромосом. Перекрестные сшивки сохраняются на препаратах хромосом и уменьшают доступность даже денатурированной ДНК для специфических антител. При разных способах предварительной обработки препаратов взаимоотношение между неравномерным распределением метилированной ДНК и хромосомных белков может стать определяющим в выявляемой картине метилирования *in situ*, включая различия в метилирова-

нии СХ. При использовании протоколов 2—4 паттерны метилирования на СХ представляли собой как асимметричные точки, так и протяженные асимметрично расположенные участки (рис. 2; см. таблицу), при этом последние, вероятно, выявляются вследствие лучшей сохранности ДНК.

Ранее мы наблюдали подобные различия между СХ при окрашивании фиксированных хромосомных препаратов предимплантационных эмбрионов красителем Гимза без использования БрДУ и после краткого УФ-облучения (Patkin et al., 1994). Такой паттерн хромосомного окрашивания можно рассматривать как гетерохроматиноподобное состояние. В дальнейшем при использовании метил-чувствительных рестрикционных эндонуклеаз (Patkin, 1997) и флуоресцентно меченных моноклональных антител к МетЦит (Rougier et al., 1998) было показано, что СХ доимплантационных зародышей мышей различаются по уровню метилирования. Такая асимметрия, вероятно, связана с процессом первичной дифференцировки в начальном эмбриогенезе, определяющим потенциальную асимметричность транскриптома дочерних клеток (Patkin, 2002). В настоящей работе нами обнаружен феномен асимметрии метилирования СХ без использования включения БрДУ для недифференцированных клеток мышечной эмбриональной карциномы линии F9 и для лимфоцитов периферической крови человека. Это позволяет предположить, что данный феномен, видимо, характерен не только для эмбриональных клеток, но и для других потенциально способных к дифференцировке клеток.

Как различия СХ по уровню метилирования, так и возможные биологические следствия этого феномена в последнее время активно обсуждаются в связи с изучением процесса дифференцировки в эмбриогенезе (Patkin, 2002), дифференцировки тканеспецифичных стволовых клеток (Tan et al., 2013) и — более широко — в связи с асимметрией клеточных делений (Bell, 2005; Tajbakhsh et al., 2009; Lansdorp et al., 2012). Можно предположить, что, несмотря на неясность механизма, частота хромосом с асимметрией СХ и уровень межхроматидных различий по уровню метилирования могут служить в качестве дополнительного критерия в исследованиях патогенеза опухолей и при сравнительных исследованиях влияния различных внешних воздействий. Хромосомные и хроматидные статусы метилирования можно рассматривать как своего рода bookmarks (Kadauke, Blobel, 2013), которые могут определять активное или потенциально активное (репрессированное) состояние кластеров генов, например импринтированных в дочерних клетках после деления.

Изучение уровня метилирования интерфазных ядер может быть использовано для оценки динамических изменений при транскрипции в непродлиферирующих или слабо пролиферирующих клетках, например в нейронах. Во всех этих случаях крайне важно наличие стандартизированной методики, подобной использованной в настоящей работе. Кроме того, описанное влияние условий предобработки может проявляться не только при выявлении метилированной ДНК, но и при других исследованиях хроматина с использованием иммунохимического окрашивания. При этом, как показывают полученные данные, наиболее критичными факторами при мечении метилированной ДНК *in situ* при помощи специфических антител являются длительность и температурный режим хранения. Краткосрочное хранение может быть использовано в том случае, если необходимо исследование метилирования центромерного гетерохроматина. Если же необходима оценка метилирования ДНК в плечах хромосом и в

особенности оценка латеральной асимметрии сестринских хроматид, более предпочтительным является протокол 4, который позволяет выявить как точечные, так и протяженные области асимметричного метилирования. Для получения более достоверных результатов при исследовании *in situ* необходимо по возможности дополнять цитологические исследования молекулярным анализом выделенной ДНК хроматина.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 15-04-04642-а).

Список литературы

- Баранов В. С., Кузнецова Т. В. 2006. Цитогенетика эмбрионального развития человека. СПб.: Наука. 640 с. (Baranov V. S., Kuznetsova T. V. 2006. Cytogenetics of the human embryonal development. SPb.: Nauka. 640 p.)
- Ваниушин Б. Ф. 2006. Метилирование ДНК и эпигенетика. Генетика. 42 (9) : 1186—1199. (Vaniushin B. F. 2006. DNA methylation and epigenetics. Genetika. 42 (9) : 1186—1199.)
- Кленов М. С., Гвоздев В. А. 2005. Формирование гетерохроматина: роль коротких РНК и метилирования ДНК. Биохимия. 70 (11) : 1445—1458. (Klenov M. S., Gvozdev V. A. 2005. Heterochromatin formation: role of short RNAs and DNA methylation. Biochemistry (Mosc.). 70 (11) : 1187—1198.)
- Паткин Е. Л. 2008. Эпигенетические механизмы распространенных заболеваний человека. СПб.: Нестор-История. 200 с. (Patkin E. L. Epigenetic mechanisms of the common human diseases. SPb.: Nestor-Istoria. 200 p.)
- Паткин Е. Л., Сорокин А. В. 1992. Изучение метилирования генома лабораторной мыши при помощи рестрикционных эндонуклеаз *in situ*. Цитология. 34 (1) : 65—69. (Patkin E. L., Sorokin A. V. 1992. The level of chromosomal DNA methylation in mice in the early stages of embryogenesis studied by the action of restriction endonucleases on the chromosomes. Tsitologiya. 34 (1) : 65—69.)
- Саложин С. В., Прохорчук Е. Б., Георгиев Г. П. 2005. Метилирование ДНК как один из основных эпигенетических маркеров. Биохимия. 70 (5) : 641—650. (Salozhin S. V., Prokhorchuk E. B., Georgiev G. P. 2005. Methylation of DNA — one of the major epigenetic markers. Biochemistry (Mosc.). 70 (5) : 525—532.)
- Сучкова И. О., Баранова Т. В., Кустова М. Е., Кислякова Т. В., Васильев В. Б., Сломинская Н. А., Аленина Н. В., Паткин Е. Л. 2004. Сателлитная ДНК быка индуцирует гетерохроматинизацию хромосомной ДНК реципиента в клетках трансателлитной мышью эмбриональной тератокарциномы. Цитология. 46 (1) : 53—61. (Suchkova I. O., Baranova T. V., Kustova M. E., Kisljakova T. V., Vassiliev V. B., Slominskaja N. O., Alenina N. V., Patkin E. L. 2004. Bovine satellite DNA induces heterochromatinization of host chromosomal DNA in cells of transsatellite mouse embryonal carcinoma. Tsitologiya. 46 : 53—61.)
- Alonso A., Breuer B., Steuer B., Fischer J. 1991. The F9-EC cell line as a model for the analysis of differentiation. Int. J. Develop. Biol. 35 : 389—397.
- Baccarelli A., Bollati V. 2009. Epigenetics and environmental chemicals. Curr. Opin. Pediatr. 21 : 243—251.
- Barbin A., Montpellier C., Kokalj-Vokac N., Gibaud A., Niveleau A., Malfoy B., Dutrillaux B., Bourgeois C. A. 1994. New sites of methylcytosine-rich DNA detected on metaphase chromosomes. Hum. Genet. 94 : 684—692. ew sites of methylcytosine-rich DNA detected on metaphase chromosomes.
- Bell C. D. 2005. Is mitotic chromatid segregation random? Histol. Histopathol. 20 : 1313—1320.
- Bianchi N. O., Morgan W. F., Cleaver J. E. 1985. Relationship of ultraviolet light-induced DNA-protein cross-linkage to chromatin structure. Exp. Cell Res. 156 : 405—418.

- Bickmore W. A. 2001. Karyotype analysis and chromosome banding. Encyclopedia of life sciences. Internet references. Retrieved from Nature Publishing Group, 1—6. www.els.net.
- Brock G. J., Charlton J., Bird A. 1999. Densely methylated sequences that are preferentially localized at telomere-proximal regions of human chromosomes. *Gene*. 240 : 269—277.
- Darzynkiewicz Z., Traganos F., Sharpless T., Melamed M. R. 1976. DNA denaturation *in situ*. Effect of divalent cations and alcohols. *J. Cell Biol.* 68 : 1—10.
- De Capoa A., Grappelli C., Febbo F. R., Spanò A., Niveleau A., Cafolla A., Cordone I., Foa R. 1999. Methylation levels of normal and chronic lymphocytic leukemia B lymphocytes: computer-assisted quantitative analysis of anti-5-methylcytosine antibody binding to individual nuclei. *Cytometry*. 36 : 157—159.
- Fernandez-Peralta A. M., Navarro P., Tagarro I., Gonzalez-Aguilera J. J. 1994. Digestion of human chromosomes by means of the isoschizomers MspI and HpaII. *Genome*. 37 : 770—774.
- Garagna S., Marziliano N., Zuccotti M., Searle J. B., Capanna E., Redi C. A. 2001. Pericentromeric organization at the fusion point of mouse Robertsonian translocation chromosomes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 98 : 171—175.
- Gonzalo S., Jaco I., Fraga M. F., Chen T., Li E., Esteller M., Blasco M. A. 2006. DNA methyltransferases control telomere length and telomere recombination in mammalian cells. *Nat. Cell Biol.* 8 : 414—426.
- Gupta R., Nagarajan A., Wajapeyee N. 2010. Advances in genome-wide DNA methylation analysis. *Biotechniques*. 49 (4) : iii—xi; doi.10.2144/000113493.
- Haaf T. 2006. Methylation dynamics in the early mammalian embryo: implications of genome reprogramming defects for development. *Curr. Top Microbiol. Immunol.* 310 : 13—22.
- Henikoff S., Furuyama T. 2012. The unconventional structure of centromeric nucleosomes. *Chromosoma*. 121 : 341—350.
- Jeong K.-S., Lee S. 2005. Estimating the total mouse DNA methylation according to the B1 repetitive elements. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 335 : 1211—1216.
- Jones P. A., Baylin S. B. 2002. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat. Rev. Genet.* 3 : 415—428.
- Joseph A., Mitchell A. R., Miller O. 1989. The organization of the mouse satellite DNA at centromeres. *Exp. Cell Res.* 183 : 494—500.
- Kadauke S., Blobel G. A. 2013. Mitotic bookmarking by transcription factors. *Epigenet. Chromatin*. 6 : 6.
- Kim J., Kim J.-Y., Issa J. P. 2009. Aging and DNA methylation. *Curr. Chem. Biol.* 3 : 321—329.
- Komissarov A. S., Gavrilova E. V., Demin S. J., Ishov A. M., Podgornaya O. I. 2011. Tandemly repeated DNA families in the mouse genome. *BMC Genomics*. 12 : 531—552.
- Lansdorp P. M., Falconer E., Tao J., Brind'Amour J., Naumann U. 2012. Epigenetic differences between sister chromatids? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1266 : 1—6.
- Lewis J. D., Meehan R. R., Henzel W. J., Maurer-Fogy I., Jepsen P., Klein F., Bird A. 1992. Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosome protein that binds to methylated DNA. *Cell*. 69 : 905—914.
- Lister R., Pelizzola M., Dowen R. H., Hawkins R. D., Hon G., Tonti-Filippini J., Nery J. R., Lee L., Ye Z., Ngo Q. M., Edsall L., Antosiewicz-Bourget J., Stewart R., Ruotti V., Millar A. H., Thomson J. A., Ren B., Ecker J. R. 2009. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature*. 462 : 315—322.
- Mascetti G., Carrara S., Vergani L. 2001. Relationship between chromatin compactness and dye uptake for *in situ* chromatin stained with DAPI. *Cytometry*. 44 : 113—119.
- Metivier R., Gallais R., Tiffocche C., Le Péron C., Jurkowska R. Z., Carmouche R. P., Ibberson D., Barath P., Demay F., Reid G., Benes V., Jeltsch A., Gannon F., Salbert G. 2008. Cyclical DNA methylation of a transcriptionally active promoter. *Nature*. 452 : 45—52.
- Mezzanotte R., Vanni R., Flore O., Ferrucci L., Sumner A. T. 1988. Ageing of fixed cytological preparations produces gradation of chromosomal DNA. *Cytogenet. Cell Genet.* 48 : 60—62.
- Miniou P., Jeanpierre M., Bourc'his D., Coutinho Barbosa A. C., Blanquet V., Viegas-Péquignot E. 1997. Alpha-satellite DNA methylation in normal individuals and in ICF patients: heterogeneous methylation of constitutive heterochromatin in adult and fetal samples. *Hum. Genet.* 99 : 738—745.
- Patkin E. L. 1997. Asymmetry of sister chromatids methylation of preimplantation mouse embryo chromosomes as revealed by nick translation *in situ*. *Cytogenet. Cell Genet.* 77 : 82.
- Patkin E. L. 2002. Epigenetic mechanisms for primary differentiation in mammalian embryos. *Int. Rev. Cytol.* 216 : 81—129.
- Patkin E. L., Kustova M. E., Dyban A. P. 1994. Spontaneous sister chromatid differentiation (SCD) and sister chromatid exchange (SCE) in mouse blastocyst chromosomes. *Cytogenet. Cell Genet.* 66 : 31—32.
- Patkin E. L., Quinn J. 2011. Epigenetical mechanisms of susceptibility to complex human diseases. *Russ. J. Genet.: Appl. Res.* 1 : 436—447.
- Pendina A. A., Efimova O. A., Fedorova I. D., Leont'eva O. A., Shilnikova E. M., Lezhnina J. G., Kuznetsova T. V., Baranov V. S. 2011. DNA methylation patterns of metaphase chromosomes in human preimplantation embryos. *Cytogenet. Genome Res.* 132 : 1—7.
- Plohl M., Luchetti A., Meštrović N., Mantovani B. 2008. Satellite DNAs between selfishness and functionality: structure, genomics and evolution of tandem repeats in centromeric (hetero) chromatin. *Gene*. 409 : 72—82.
- Pogribny I., Raiche J., Slovack M., Kovalchuk O. 2004. Dose-dependence, sex- and tissue-specificity, and persistence of radiation-induced genomic DNA methylation changes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320 : 1253—1261.
- Rougier N., Bourchis D., Gomes D. M., Niveleau A., Plachot M., Paldi A., Viegas-Péquignot E. 1998. Chromosome methylation patterns during mammalian preimplantation development. *Genes Develop.* 12 : 2108—2113.
- Santos F., Dean W. 2006. Using immunofluorescence to observe methylation changes in mammalian preimplantation embryos. *Methods Mol. Biol.* 325 : 129—137.
- Sasai N., Defossez P. A. 2009. Many paths to one goal? The proteins that recognize methylated DNA in eukaryotes. *Int. J. Develop. Biol.* 53 : 323—334.
- Sasina L. K., Fedorova E. M., Grudinina N. A., Belotserkovskaya E. V., Solovyov K. V., Suchkova I. O., Patkin E. L. 2013. Modulation of reporter EGFP gene expression by a disease-associated human intra-intronic minisatellite upon transient and stable transfection. *Int. J. Biol. Engineering*. 3 : 1—10.
- Schneider L., d'Adda di Fagagna F. 2012. Neural stem cells exposed to BrdU lose their global DNA methylation and undergo astrocytic differentiation. *Nucl. Acids Res.* 40 : 5332—5342.
- Tajbakhsh S., Rocheteau P., Le Roux I. 2009. Asymmetric cell divisions and asymmetric cell fates. *Annu. Rev. Cell Develop. Biol.* 25 : 671—699.
- Teubner B., Schulz W. A. 1994. Exemption of satellite DNA from demethylation in immortalized differentiated derivatives of F9 mouse embryonal carcinoma cells. *Exp. Cell Res.* 210 : 192—200.
- Tran V., Feng L., Chen X. 2013. Asymmetric distribution of histones during *Drosophila* male germline stem cell asymmetric divisions. *Chromosome Res.* 21 : 255—269.
- Xu N., Azziz R., Goodarzi M. O. 2010. Epigenetics in polycystic ovary syndrome: a pilot study of global DNA methylation. *Fertil. Steril.* 94 : 781—783.
- Yates P. A., Robert W., Burman R. W., Mummaneni P., Krusell S., Turker M. S. 1999. Turker Tandem B1 elements located in a mouse methylation center provide a target for de novo DNA methylation. *J. Biol. Chem.* 274 : 36 357—36 361.
- Zaitseva I., Zaitsev S., Alenina N., Bader M., Krivokharchenko A. 2007. Dynamics of DNA-demethylation in early mouse and rat embryos developed *in vivo* and *in vitro*. *Mol. Reprod. Develop.* 74 : 1255—1261.

THE INFLUENCE OF THE PREPARATION PRETREATMENT ON *IN SITU* DETECTION OF 5-METHYLCYTOSINE IN METAPHASE CHROMOSOMES AND IN INTERPHASE NUCLEI

N. A. Grudinina,¹ L. K. Sasina,¹ E. M. Noniashvili,¹ E. G. Neronova,² L. I. Pavlina,^{1,3}
I. O. Suchkova,¹ G. A. Sofronov,¹ E. L. Patkin¹, *

¹ Department of Molecular Genetics, Institute of Experimental Medicine of the North West Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, St. Petersburg, 194376,

² A. M. Nikiforov All-Russian Center of Emergency and Radiation Medicine, EMERCOM of Russia, St. Petersburg, 197136, and ³ I. P. Pavlov Institute of Physiology RAS, St. Petersburg, 199034;

* e-mail: elp44@mail.ru

Qualitative and quantitative analysis of DNA methylation *in situ* at the level of cells, chromosomes and chromosomal domains is extremely important for the diagnosis and treatment of various diseases, the study of ageing and the consequences of environmental impacts. An important question arises, whether the revealed *in situ* methylation pattern reflects DNA methylation per se and (or) availability of the DNA for antibodies, which in turn depends on the peculiarities of chromatin structure and chromosome condensation. These events can lead to an incorrect evaluation of the actual pattern of DNA methylation. To avoid this shortcoming as far as possible, we have modified the most widely used method of revealing 5-methylcytosine *in situ* with monoclonal antibodies. Here we have shown that the detection of DNA methylation staining of chromosomes including C-heterochromatin, chromosomal arms and sister chromatids is drastically dependent on pretreatment of chromosomal preparations for immunocytochemical study using fluorescent antibodies. Using undifferentiated stem cells of mouse embryonal carcinoma line F9, it has been found that change in preparations storage results in a sharp fluorescence decrease up to complete disappearance of the signal in centromeric heterochromatin. With the help of the method described in the work, we have first revealed the asymmetry of sister chromatids methylation in metaphase chromosomes of F9 cell and lymphocytes of human periphery blood. This may lead to asymmetry of transcriptional signature of daughter cells after division. The proposed here modification of 5-methylcytosine detection *in situ* provides a more complete characterization of methylation of chromosomes and chromosomal domains, compared to previously published methods.

Key words: overall DNA methylation, chromatin, heterochromatin, metaphase chromosomes, epigenetic regulation, *in situ* analysis, immunocytochemistry, chromosomal domains, monoclonal antibodies against methylcytosine, asymmetric sister chromatids methylation.