

УДК 57.043

СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ МЕХАНИЧЕСКИ ДЕФОРМИРОВАННЫХ ЯДЕР HeLa, НАБЛЮДАЕМЫЕ МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

© 2022 г. В. Ю. Байрамуков^{a, *}, М. В. Филатов^a, Р. А. Ковалев^a,
Р. А. Пантина^a, С. В. Григорьев^{a, b}, Е. Ю. Варфоломеева^a

^aПетербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова,
Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Гатчина, 188300 Россия

^bСанкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034 Россия

*e-mail: bayramukov_vy@pnpi.nrcki.ru

Поступила в редакцию 30.12.2021 г.

После доработки 25.03.2022 г.

Принята к публикации 28.03.2022 г.

Методом атомно-силовой микроскопии исследован рельеф поверхности ядер HeLa после их механической деформации. Ядра выделяли из клеток линии HeLa, деформировали под действием центробежного ускорения и фиксировали глутаральдегидом. Показано, что наблюдаемый рельеф поверхности обусловлен главным образом высокой устойчивостью хроматина к деформации. Природа этой устойчивости коррелирует с суперспирализацией ДНК. Действие ингибиторов топоизомераз I и II приводило к снятию суперскрученности и значительному уплощению ядер. Действие ДНК-интеркалятора, наоборот, приводило к увеличению жесткости ДНК и, как следствие, устойчивости хроматина к механическому воздействию. Таким образом, наблюдаемые изменения морфологии отражают функциональные особенности клеточного ядра.

Ключевые слова: атомно-силовая микроскопия, клеточное ядро, HeLa, механическое воздействие, хроматин, суперскрученность ДНК.

DOI: 10.31857/S1028096022100041

ВВЕДЕНИЕ

В клеточном ядре ДНК, РНК и белки расположены в макромолекулярных доменах, участвующих в различных этапах экспрессии генов, таких как транскрипция, репликация, репарация [1, 2]. Домены в ядрах клеток млекопитающих включают хроматин, ядерный матрикс, ядерную оболочку и ядерную ламину, поровые комплексы и ядрышки, которые можно наблюдать методами оптической и электронной микроскопии [3–6]. Использование дополнительных методов прямого наблюдения могло бы расширить возможности понимания принципов организации клеточных ядер.

Одним из технических достижений последних десятилетий является техника сканирующей зондовой микроскопии. В частности, атомно-силовая микроскопия (АСМ) используется для анализа морфологии поверхности с разрешением от десятков ангстрем вплоть до атомарного уровня [7]. Это позволяет визуализировать различные биологические объекты, такие как нуклеосомы, ДНК, которые можно выделить из биоматериала и исследовать, поместив на атомарно плоскую подложку [8–11].

Для выделенных клеточных ядер, фиксированных в суспензии и помещенных на подложку, зачастую характерна относительно гладкая форма без отличительных особенностей морфологии [12]. Очевидно, что в таком виде невозможно использовать АСМ для исследования структуры ядра. Показано, что фиксация ядер клеток *Lacandonia schismatica*, *Ginkgo biloba* и почки мыши с последующим получением тонких срезов и анализа материала методом АСМ выявляет различия в пространственном распределении хроматина [13]. В другом исследовании методом АСМ определили морфологию и уровни компактизации хроматина на масштабах от 15 до 110 нм в ядрах куриных эритроцитов, лизированных в гипотоническом растворе [14]. В [15] клетки HeLa подвергали действию детергентов и раствора высокой ионной силы, что приводило к удалению клеточной мембраны и возможности использования АСМ для анализа структуры клеточного ядра. Анализ морфологии позволил выявить базовые составляющие хроматина в ядре эукариотической клетки [16]. В [17] авторы исследовали изменение модуля Юнга ядер в зависимости от приложенной частоты.

ты колебания кантилевера методом микрореологии. Было показано, что для различных клеточных линий эластичность ядер увеличивается от центра к периферии, что авторы связывают с уменьшением степени сшивания в хроматине.

В настоящей работе естественная эластичность ядер позволила реализовать новый подход к исследованию организации ядерной структуры посредством АСМ. На примере ядер HeLa показано, что механическое воздействие (центробежное ускорение) преобразует особенности внутриядерной организации в изменение рельефа поверхности ядра. Экспериментально подтверждено, что наблюдаемая морфология коррелирует с функциональными особенностями ядра, обусловлена суперскручиванием ДНК и изменяется в ответ на действие веществ, подавляющих суперскручивание, либо, наоборот, увеличивающих жесткость ДНК и, как следствие, устойчивости хроматина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные ядра выделены из культуры HeLa по стандартной методике, а именно путем воздействия неионного детергента TritonX-100 (0.15%), отмыты от остатков клеточной мембраны в процессе центрифугирования в 10 мл полифосфатного буфера.

В качестве химических соединений-ингибиторов топоизомераз были выбраны камптотecin (ингибитор топоизомеразы I) и этопозид (ингибитор топоизомеразы II), которые инкубировали с клеточной культурой в течение суток в концентрациях 40 и 80 мкг/мл соответственно. ДНК-интеркалятор, бромистый этидий ($C_{21}H_{20}BrN_3$), добавляли сразу после выделения ядер в концентрации 10 мкг/мл и инкубировали в течение 5 мин.

Механическая деформация ядер включала следующие действия. В чашку Петри помещали подложку из предметного стекла, покрытого 0.001% полилизинном. На подложку наносили суспензию (1 мкл) ядер и незамедлительно чашку Петри помещали в бакет-ротатор, установленный в центрифуге UNION 5KR. Ядра откручивали при минимально возможном центробежном ускорении (60g) в течение 5 мин, после чего незамедлительно фиксировали с помощью 0.5% глутаральдегида. После 10 мин инкубации стекло промывали в потоке дистиллированной воды и оставляли для естественного высушивания.

АСМ-исследования проводили с помощью микроскопа Solver BIO (NT-MDT, Россия), оснащенного инвертированным оптическим микроскопом Olimpus. Использовали зонды NSG03 (NT-MDT, Россия) с радиусом закругления 10 нм в полуконтактном режиме сканирования с частотой 0.9 Гц и амплитудой 25 нм. Размер записыва-

емого изображения составлял 29×29 мкм, число точек 512×512 .

Для получения изображений конфокальной микроскопии фиксированные клеточные ядра окрашивали флуоресцентным красителем Hoechst 33342 (10 мкг/мл) в фосфатном буфере. Использовали микроскоп Leica TCS SP5X SP5 (Leica, Германия), длина волны возбуждения составляла 405 нм. Обработку изображений проводили в программе Gwyddion 2.56.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Подходы оптической микроскопии, в частности конфокальной микроскопии, позволяют получить изображения ядра как в проходящем свете, так и при окрашивании ДНК. Разрешение таких изображений ограничено длиной волны света. Соответственно, оптически плотные ядрышки размером несколько микрометров хорошо различимы на изображениях ядра HeLa (на рис. 1а и далее ядрышки показаны стрелками), в то время как детальная структура хроматина неразличима (рис. 1б). Морфология при механической деформации, наблюдаемая на двумерном АСМ-изображении ядра (рис. 1в), схожа с морфологией, визуализируемой в случае оптической микроскопии, однако обусловлена совершенно иным физическим явлением — устойчивостью внутриядерных компонент к деформации. Так, значительно увеличивается латеральный размер ядра, и наиболее ярким внутриядерным объектом являются ядрышки размером $\sim 1\text{--}5$ мкм, возвышающиеся над базовой структурой деформированного ядра (~ 200 нм), что отчетливо видно на трехмерном изображении (рис. 1г) и соответствующем профиле рельефа поверхности.

По-видимому, в случае ядер HeLa с высокой транскрипционной активностью [18], подвергнутых механической деформации, наблюдается тенденция образования плоской (~ 200 нм) рельефной базовой структуры механически устойчивого хроматина с сохранением ядрышковой структуры [19]. Напротив, в случае ядер куриных эритроцитов с минимальным уровнем транскрипции не наблюдались ярко выраженные особенности морфологии ядра при механической деформации [20].

В настоящей работе показано, что наблюдаемая морфология является следствием функциональных особенностей клеточного ядра. В [21] предложена модель транскрипции, обусловленной суперскручиванием ДНК. Так, при активной транскрипции экспрессия генов сильно коррелирует и жестко регулируется суперспирализацией. Модель предсказывает, что ферменты, изменяющие топологию, нарушают суперскручивание и, как следствие, подавляют транскрипцию. Данное

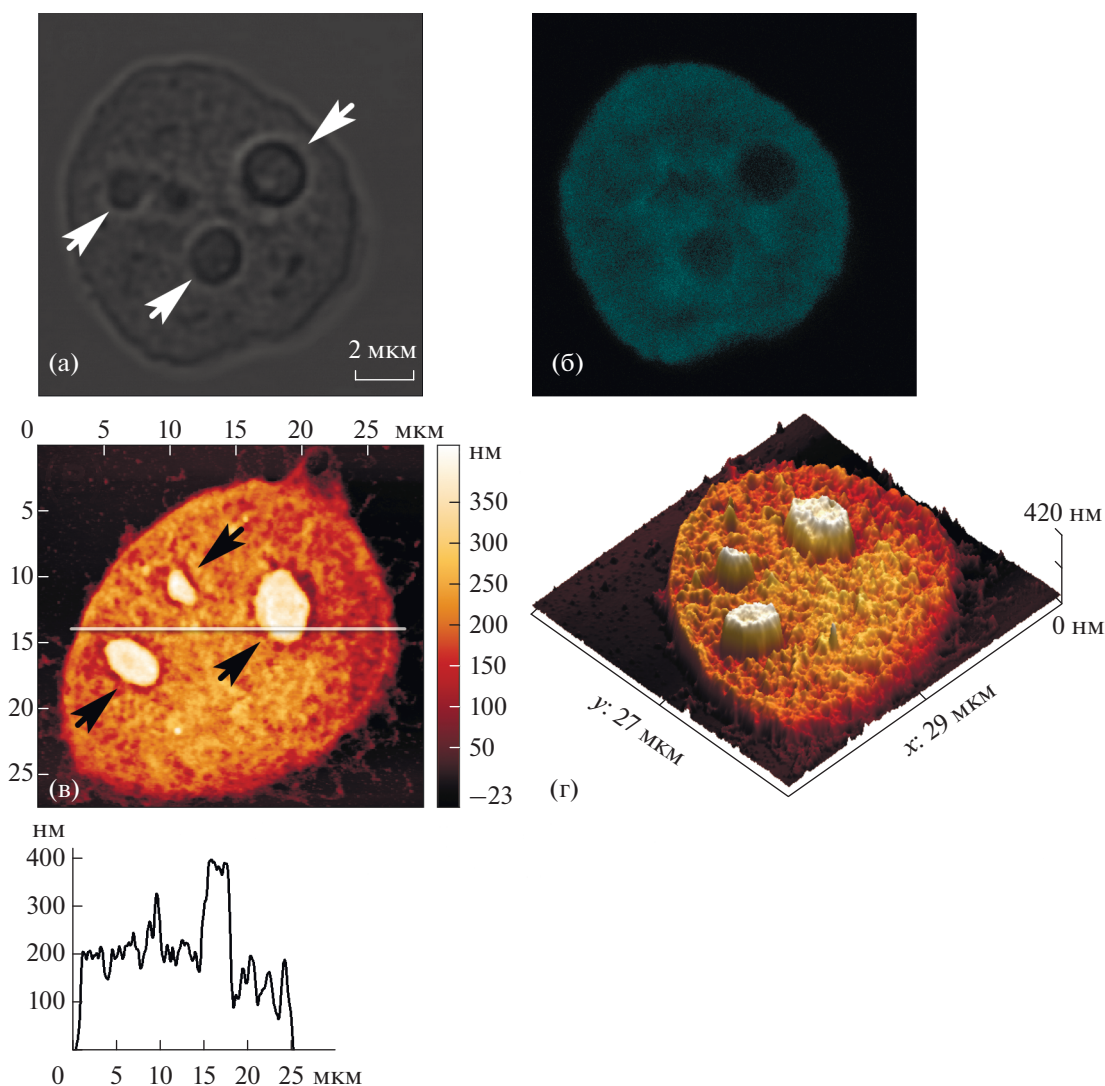


Рис. 1. Двумерные (а–в) и трехмерное (г) изображения ядер HeLa, полученные методами конфокальной микроскопии в проходящем свете и при окрашивании ядерной ДНК (а, б) и АСМ (в, г) при механической деформации ядер. Профиль сечения деформированного ядра приведен внизу рисунка.

утверждение проверено экспериментально на ядрах HeLa. В клеточном ядре присутствуют ферменты-топоизомеразы, поддерживающие суперскручивание ДНК, обеспечивая процессы репликации и транскрипции [22]. Очевидно, подавление (ингибирование) ферментов отразится на морфологии, наблюдаемой методом АСМ.

Так, клетки HeLa инкубировали с ингибиторами топоизомераз I и II (камптотecin и этопозид). АСМ-изображения механически деформированных ядер представлены на рис. 2. В обоих случаях воздействие ингибиторов на ядра HeLa ведет к значительному уменьшению высоты (от ~200 до 50 нм), что следует из приведенного профиля поверхности. Можно заключить, что воздействие ингибиторов привело к кардинальному уменьшению

степени суперскручивания вследствие подавления транскрипции, что отразилось на рельефе поверхности деформированных ядер.

Обратная картина должна наблюдаться, если внести в укладку ДНК такие изменения, при которых торсионные напряжения, присущие суперскрученной ДНК, не будут скомпенсированы. Это приведет к увеличению жесткости ДНК, и, как следствие, к сопротивлению деформации. Бромистый этидий – широко применяемый ДНК-интеркалятор, нарушающий структуру хроматина [23]. Его добавление к ядрам с последующей механической деформацией действительно приводит к изменению наблюдаемого рельефа (рис. 3).

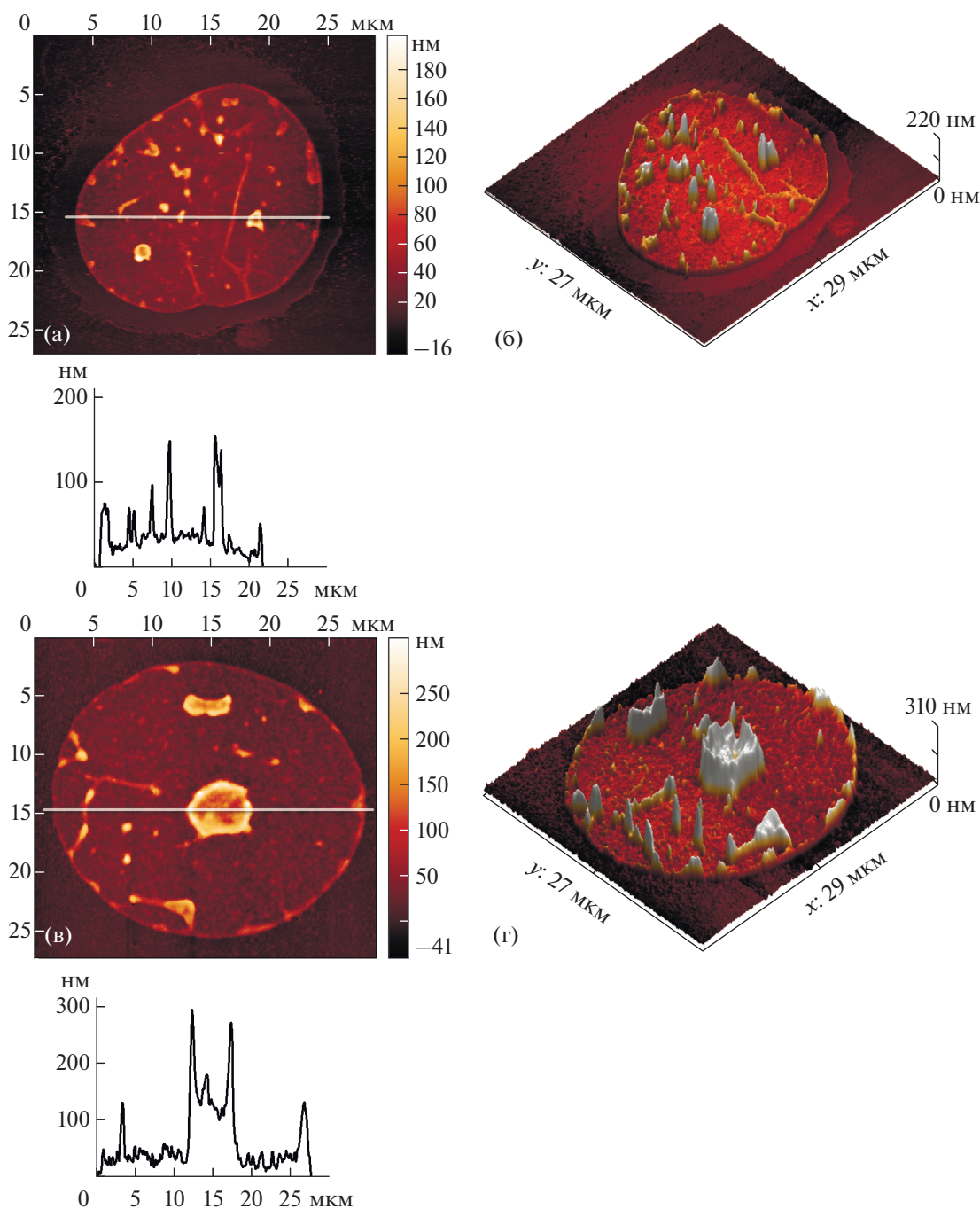


Рис. 2. Двумерные (а, в) и трехмерные (б, г) АСМ-изображения механически деформированных ядер HeLa при действии ингибиторов топоизомеразы I (а, б) и топоизомеразы II (в, г). Профили сечений деформированных ядер приведены внизу соответствующих рисунков.

Обобщенная картина вариации высоты профиля ядер HeLa при деформации в зависимости от типа воздействия на упаковку хроматина представлена на рис. 4. Так, в случае контрольного образца (кривая 1) базисная высота деформированного ядра составила ~200 нм, наблюдалось отличительное ядрышковое образование. Добавление ингибиторов топоизомераз к клет-

кам в обоих случаях приводило к снижению высоты до значений ~40 нм (кривые 2 и 3), на фоне которых выделялись одно или несколько ядрышковых образований. Использование ДНК-интеркалятора, напротив, значительно увеличивало высоту профиля при деформации ядра (~600 нм) из-за возрастания жесткости хроматина (кривая 4).

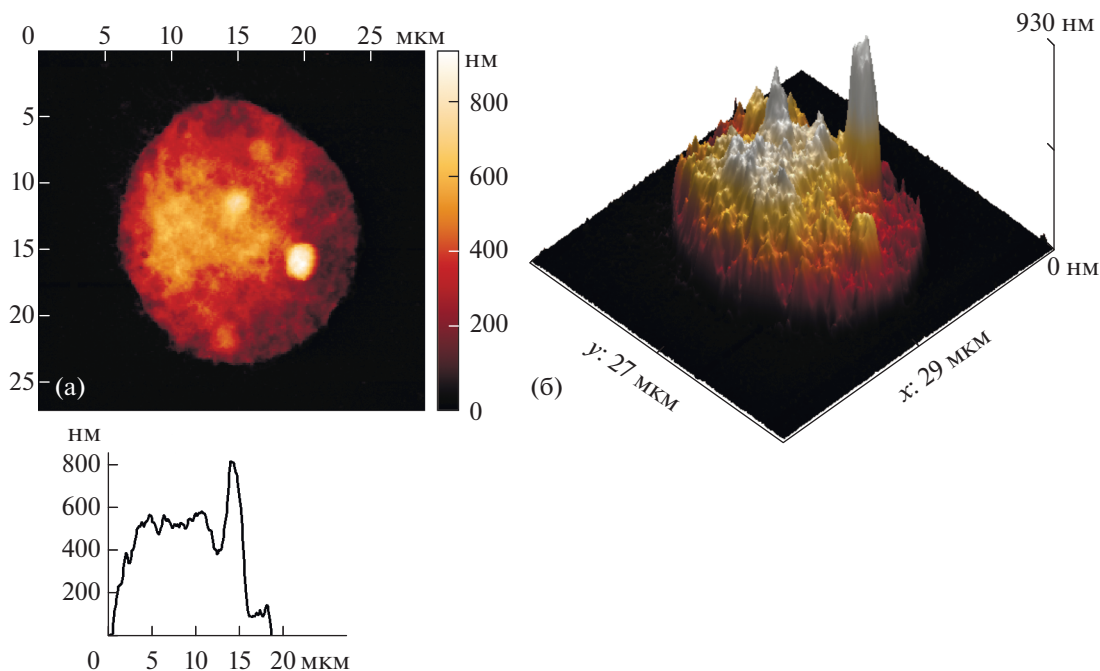


Рис. 3. Двумерное (а) и трехмерное (б) АСМ-изображения ядер HeLa после воздействия бромистого этидия. Профиль сечения деформированного ядра приведен внизу рисунка.

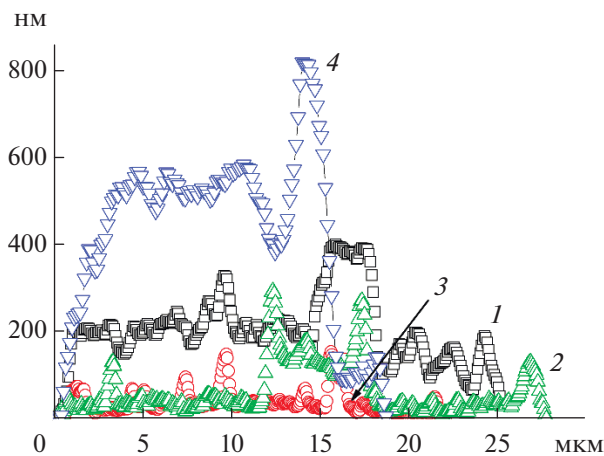


Рис. 4. Высота профиля деформированных ядер HeLa: контрольный образец (1); подвергнутый воздействию ингибитора топоизомеразы I (2); ингибитора топоизомеразы II (3); ДНК-интеркалятора (4).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ядре клетки содержится чрезвычайно большая концентрация высокополимерных молекул: ДНК, РНК, белка. Концентрация каждого из этих компонентов так высока, что трудно, если вообще возможно, искусственно создать раствор соответствующей концентрации. По существующим оценкам, общая концентрация макромолекул в ядре может превышать 100 мг/мл [24, 25].

Любые небιологические образования, содержащие столь высокие концентрации макромолекул, обладали бы чрезвычайной вязкостью и представляли собой упругий гель, устойчивый к деформации. Нужно полагать, что организация материала ядер в значительной мере уникальна, что может быть связано со значительным снижением вязкости, так что большая часть макромолекул может диффундировать сквозь скопления других молекул без заметного трения. Природа этого необычного поведения нуклеоплазмы не может быть предметом рассмотрения настоящей работы. Однако следствием его является возможность реализовать предлагаемый метод визуализации внутриядерной организации с помощью АСМ. Суть метода заключается в том, чтобы преобразовать неоднородности внутриядерной организации в поверхностные явления посредством их механической деформации. Результатом являются наблюдаемые изменения морфологии, которые отражают функциональные особенности клеточного ядра.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы признательны заведующему лабораторией биофизики макромолекул ОМРБ ПИЯФ Исаеву В.В. за предоставленное время работы на атомно-силовом микроскопе. Работа поддержана РНФ (грант № 20-12-00188).

Конфликт интересов: авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Spector D.L. // Annu. Rev. Cell Biol. 1993. V. 9. P. 265. <https://doi.org/10.1146/annurev.cb.09.110193.001405>
2. Lamond A.I., Earnshaw W.C. // Science. 1998. V. 280. P. 547. <https://doi.org/10.1126/science.280.5363.547>
3. Cohen M., Tzur Y.B., Neufeld E., Feinstein N., Delannoy M.R., Wilson K.L., Gruenbaum Y. // J. Struct. Biol. 2002. V. 140. P. 232. [https://doi.org/10.1016/S1047-8477\(02\)00516-6](https://doi.org/10.1016/S1047-8477(02)00516-6)
4. Wachtler F., Stahl A. // Micron. 1993. V. 24. P. 473. [https://doi.org/10.1016/0968-4328\(93\)90026-W](https://doi.org/10.1016/0968-4328(93)90026-W)
5. Tchélidzé P., Chatron-Colliet A., Thiry M., Lalun N., Bobichon H., Ploton D. // Crit. Rev. Oncol. Hematol. 2008 V. 69. P. 127. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2008.07.022>
6. Gulka M., Salehi H., Varga B. et al. // Sci. Rep. 2020. V. 10. P. 9791. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66593-7>
7. Binnig G., Quate C.F., Gerber Ch. // Phys. Rev. Lett. 1986. V. 56. P. 930. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.56.930>
8. Lyubchenko Y.L., Oden P.I., Lampner D., Lindsay S.M., Dunker K.A. // Nucl. Acids Res. 1993. V. 21. P. 1117. <https://doi.org/10.1093/nar/21.5.1117>
9. Hansma H.G., Vesenka J., Siegerist C., Kelderman G., Morrett H., Sinsheimer R.L., Elings V., Bustamante C., Hansma P.K. // Science. 1992. V. 256. P. 1180. <https://doi.org/10.1126/science.256.5060.1180>
10. Lyubchenko Y.L., Gall A.A., Shlyakhtenko L.S., Harrington R.E., Jacobs B.L., Oden P.I., Lindsay S.M. // J. Biomol. Struct. Dyn. 1992. V. 10. P. 598. <https://doi.org/10.1080/07391102.1992.10508670>
11. Shlyakhtenko L.S., Lushnikov A.Y., Lyubchenko Y.L. // Biochem. 2009. V. 48. P. 7842. <https://doi.org/10.1021/bi900977t>
12. Isaev-Ivanov V.V., Lebedev D.V., Lauter H. et al. // Phys. Solid State. 2010. V. 52. P. 1063. <https://doi.org/10.1134/S1063783410050379>
13. Jiménez-García L.F., Fragoso-Soriano R. // J. Struct. Biol. 2000. V. 129. P. 218. <https://doi.org/10.1006/jsbi.2000.4233>
14. Qian R., Liu Z., Zhou M. et al. // Cell Res. 1997. V. 7. P. 143. <https://doi.org/10.1038/cr.1997.15>
15. Yoshimura S.H., Kim J., Takeyasu K. // J. Electron Microsc. (Tokyo) 2003. V. 52. P. 415. <https://doi.org/10.1093/jmicro/52.4.415>
16. Hirano Y., Takahashi H., Kumeta M. et al. // Pflugers Arch. — Eur. J. Physiol. 2008. V. 456. P. 139. <https://doi.org/10.1007/s00424-007-0431-z>
17. Lherbette M., dos Santos Á. // Sci. Rep. 2017. V. 7. P. 8116. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08517-6>
18. Rahbari R., Sheahan T., Modes V., Collier P., Macfarlane C., Badge R.M. // Biotech. 2009. V. 46. P. 277. <https://doi.org/10.2144/000113089>
19. Grigoriev S.V., Iashina E.G., Wu B., Pipich V., Lang Ch., Radulescu A., Bairamukov V.Yu., Filatov M.V., Pantina R.A., Varfolomeeva E.Yu. // Phys. Rev. E. 2021. V. 104. P. 044404. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.104.044404>
20. Grigoriev S.V., Iashina E.G., Bairamukov V.Yu., Pipich V., Radulescu A., Filatov M.V., Pantina R.A., Varfolomeeva E.Yu. // Phys. Rev. E. 2020. V. 102. P. 032415. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.102.032415>
21. Brackley C.A., Johnson J., Bentivoglio A., Corless S., Gilbert N., Gonnella G., Marenduzzo D. // Phys. Rev. Lett. 2016. V. 117. P. 018101 <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.117.018101>
22. Champoux J.J. // Annu. Rev. Biochem. 2001. V. 70. P. 369. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.70.1.369>
23. Garbett N.C., Hammond N.B., Graves D.E. // Biophys. J. 2004. V. 87. P. 3974. <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.047415>
24. Hancock R. // Biol. Cell. 2004. V. 96. P. 595. <https://doi.org/10.1016/j.biolcel.2004.05.003>
25. Hancock R. // J. Struct. Biol. 2004. V. 146. P. 281. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2003.12.008>

Structural Peculiarities of Mechanically Deformed HeLa Nuclei Observed by Atomic Force Microscopy

V. Yu. Bairamukov^{1,*}, M. V. Filatov¹, R. A. Kovalev¹, R. A. Pantina¹,
S. V. Grigoriev^{1,2}, E. Yu. Varfolomeeva¹

¹Petersburg Nuclear Physics Institute Named by B.P. Konstantinov, NRC “Kurchatov Institute”, Gatchina, 188300 Russia

²Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, 199034 Russia

*e-mail: bayramukov_vy@pnpi.nrcki.ru

The surface relief of HeLa nuclei after their mechanical stress was studied by atomic force microscopy. Nuclei were isolated from HeLa cells, deformed under centrifugal forces, and fixed with glutaraldehyde. The resulting relief was shown to be mainly due to the high resistance of chromatin to deformation. The nature of this stability correlates with DNA supercoiling. Cell exposure to topoisomerases inhibitors I and II led to the relaxation of supercoiling and significant flattening of the nuclei. On the contrary, cell exposure to DNA intercalator led to an increase in the DNA rigidity and, as a result, the resistance of chromatin to mechanical stress. Thus, the observed changes in morphology reflect the functional features of the cell nucleus.

Keywords: atomic force microscopy, cell nucleus, HeLa, mechanical stress, chromatin, DNA supercoiling.