

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ



УДК 576.315.42

Анализ архитектуры гетерохроматина с помощью криоэлектронной томографии

Е.П. Казаков^{1, 2, *} , Ю.М. Чесноков³ , И.И. Киреев^{1, 2} , С.А. Голышев¹

¹Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А. Н. Белозерского, МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, 119991, г. Москва, Ленинские горы 1, стр. 40;

²Кафедра клеточной биологии и гистологии, биологический факультет, МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы 1, стр. 12;

³Курчатовский комплекс НБИКС-природоподобных технологий, Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Россия, 123182, г. Москва, пл. Академика Курчатова, д. 1

*email: kazakov.evgeny.2016@post.bio.msu.ru

КЭТ (криоэлектронная томография) представляет собой мощный инструмент для изучения структуры биологических объектов в их нативном состоянии. Однако КЭТ до сих пор не получила широкого распространения для изучения клеточных органелл *in situ*, включая клеточное ядро и хроматин. В нашей работе мы стремились исследовать возможности применения КЭТ для изучения архитектуры хроматина, сосредоточив внимание на возможности использования метода криокорреляционной световой и электронной микроскопии для выбора областей интереса, а именно локусов гетерохроматина, при изготовлении ламелей с помощью травления фокусированным ионным пучком (ФИП).

Ключевые слова: криоэлектронная томография, корреляционная микроскопия, хроматин, гетерохроматин

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-80-3S-18

Список сокращений: КЭТ — криоэлектронная томография, крио-ФИП — фокусированный ионный пучок в криогенных условиях, СЭМ — сканирующая электронная микроскопия, ПЭМ — просвечивающая электронная микроскопия

Введение

Геномы эукариот отличаются значительными размерами и, в форме хроматина, компактно упакованы в ограниченном объеме клеточного ядра без ущерба для реализации геномных процессов и разделения реплицированных молекул ДНК между дочерними клетками [1, 2]. Гетерохроматические районы хромосом играют важнейшую роль в поддержании архитектуры ядра и в организации внутриядерного пространства через формирование контактов ДНК с ядерной оболочкой [3], в регуляции активности генов за счет поддержания локального репрессивного окружения [4] и в обеспечении стабильности хромосом в митозе [5]. Для понимания принципов структурирования самого хроматина необходимо детальное знание о его организации, начиная от уровня небольших групп нуклеосом, определяющих функционирование хроматина на молекулярном уровне и до уровня хромосомных территорий, на котором происхо-

дит цитологическое разделение эу- и гетерохроматина и неслучайное позиционирование геномных локусов в пространстве ядра. На самых нижних уровнях этой иерархии хроматин наиболее восприимчив к воздействиям процедур пробоподготовки — альдегидная фиксация считается причиной артефактной неспецифической агрегации, а контрастирование тяжелыми металлами маскирует детали тонкой структуры макромолекулярных комплексов хроматина [6, 7].

Геномные методы и применение субдифракционной микроскопии показывают, что геном организован в виде иерархии доменов с преобладающим взаимодействием *in cis*, начинающимся на уровне хромосомных территорий и продолжающимся до компактных кластеров («клатчей») из десятков нуклеосом [8–11], но геномные методы (3С и дериваты) ограничены в своей способности выявлять взаимодействия *in cis* между сегментами молекул ДНК в повторяющихся последовательностях. Когда событие приходится на повтор, невозможно точно локализовать местоположение этого повтора в геноме и результат приходится отбрасывать. Обогащенность повторами делает гетерохроматические зоны сложным объектом для такого изучения. Современные методы на основе *in situ*-

гибридизации ДНК, такие, как Oligopaint, в сочетании с субдифракционной микроскопией, позволяют визуализировать геометрию хроматиновых фибрилл с геномным разрешением до десятков тысяч пар оснований и с пространственным разрешением до десятков нанометров [9]. Но, несмотря на достигнутый прогресс, и гибридизация, и методы на основе 3С, требуют применения химической фиксации, неизбежно нарушающей исходную структуру хроматина. И, подобно 3С-методам, Oligopaint неприменим для анализа блоков повторяющихся последовательностей, что заставляет исследователей фокусировать внимание на геномных регионах, богатых генами.

Для получения детализированной информации о структуре хроматина мы использовали АТ-богатые гетерохроматические локусы в качестве ориентира для вытравливания ламелей единичных, по одной на клетку, пластинок толщиной 150–250 нм – и последующей криоэлектронной томографии (КЭТ), что позволяет изучить трехмерную структуру гетерохроматина на мезоуровне в состоянии, предельно близком к нативному, и напрямую наблюдать ее изменения при репликации и репарации ДНК. Культивируемые клетки мыши являются уникальной моделью для изучения поведения гетерохроматических локусов, так как помимо периферического гетерохроматина, содержащего репрессированные гены, содержат специфичные для этого вида «хромоцентры» – блоки коротких АТ-богатых высокоповторяющихся последовательностей в каждой хромоosome [13].

Материалы и методы

Культивирование клеток. Клетки линии 3Т3 (иммortalизованные мышинные фибробласты) культивировали на среде DMEM/F12 (ПанЭко, Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ глутамина и смеси антибиотика и антимикотика (все – Capricorn Scientific, Германия). Для экспериментов клетки высевали на покрытые поли-L-лизинном золотые сетки для электронно-микроскопических исследований с углеродной подложкой Quantifoil (R1/2 200 mesh) (EMS, США). Клетки фиксировали 1%-ным раствором глutarового альдегида в 100 мМ водном растворе какодилата натрия в течение 1 ч, дважды промывали и окрашивали в 10 мкг/мл растворе DAPI (Lumiprobe, Россия) на том же растворе.

Витрификация клеток и изготовление ламелей.

Витрификацию проводили, используя установку Vitrobot Mark IV (Thermo Fisher Scientific, США). Осушение проводили при 20°C и относительной влажности 85% с нижней стороны сетки, заменяя верхний осушающий фильтр на специально изготовленный тефлоновый диск. Сразу после осушения образцы замораживали погружением в жидкий этан. Для наведения сфокусированного

ионного пучка (ФИП) и травления ламелей в гетерохроматиновых зонах ядер проводили панорамную съемку витрифицированных образцов на флуоресцентном микроскопе THUNDER Imager EM cryoCLEM (Leica Microsystems, Германия), оснащенном крио-объективом 50× NA0.9. Ламели изготавливали на двухлучевом сканирующем электронном микроскопе Versa 3D DualBeam (Thermo Fisher Scientific, США), оснащенном системой крио-переноса PP3010 (Quorum Technologies, Великобритания) и встроенной системой ввода газа для металлизации поверхности образцов платиной. Ламели изготавливали травлением образца пучком ионов Ga⁺ с ускоряющим напряжением 30 кВ, постепенно понижая ток луча от 500 до 30 пА для получения ламелей толщиной порядка 150 нм.

КЭТ. Криоэлектронные томограммы были получены с помощью криоэлектронного микроскопа Titan Krios 60–300 (ThermoFisher, США), работающего при напряжении 300 кВ и оснащенного детектором прямых электронов K3 BioQuantum (Gatan, США). Серии угловых проекций были записаны с помощью SerialEM с использованием дозосимметричной схемы получения данных (от -54° до +66° с шагом 3°) при увеличении 26000× (2,68 Å/пиксель), при общей дозе ~140 е-/Å² и значениях дефокуса от -5 до -8 мкм. Томограммы были выровнены с помощью программного пакета IMOD версии 4.11 [14] с применением выравнивания методом отслеживания фрагментов изображения. При реконструкции изображений с 4-кратным биннингом использовалась взвешенная обратная проекция с фильтром типа SIRT, что привело к конечному разрешению 1,072 нм/пиксель. Окончательные томограммы были обработаны с использованием программного обеспечения IsoNet версии 0.3 [15].

Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ). Клетки растили на покровных стеклах и фиксировали 1%-ным раствором глutarового альдегида на 100 мМ какодилате натрия в течение 1 ч, затем постфиксировали 1%-ным раствором четырехоксида осмия на том же буфере в течение ночи при температуре 4°C и обезвоживали, проводя через серию растворов этанола с увеличением концентрации. Затем обезвоживали в ацетоне и пропитывали смесями эпон-ацетон с постепенным увеличением доли смолы. После замены смесей на чистую смолу Epon 812 образцы отверждали при температуре 60°C в течение 48 ч. Ультратонкие срезы изготавливали с помощью ультрамикротомы Ultracut E (Reichert-Jung, Австрия) и монтировали на медные бленды покрытые формваром. Срезы окрашивали 1%-ным водным раствором уранилацетата в течение 30 мин и цитратом свинца в течение 45–90 с и исследовали с помощью просвечивающего электронного микроскопа JEM-1400 (Jeol, Япония).

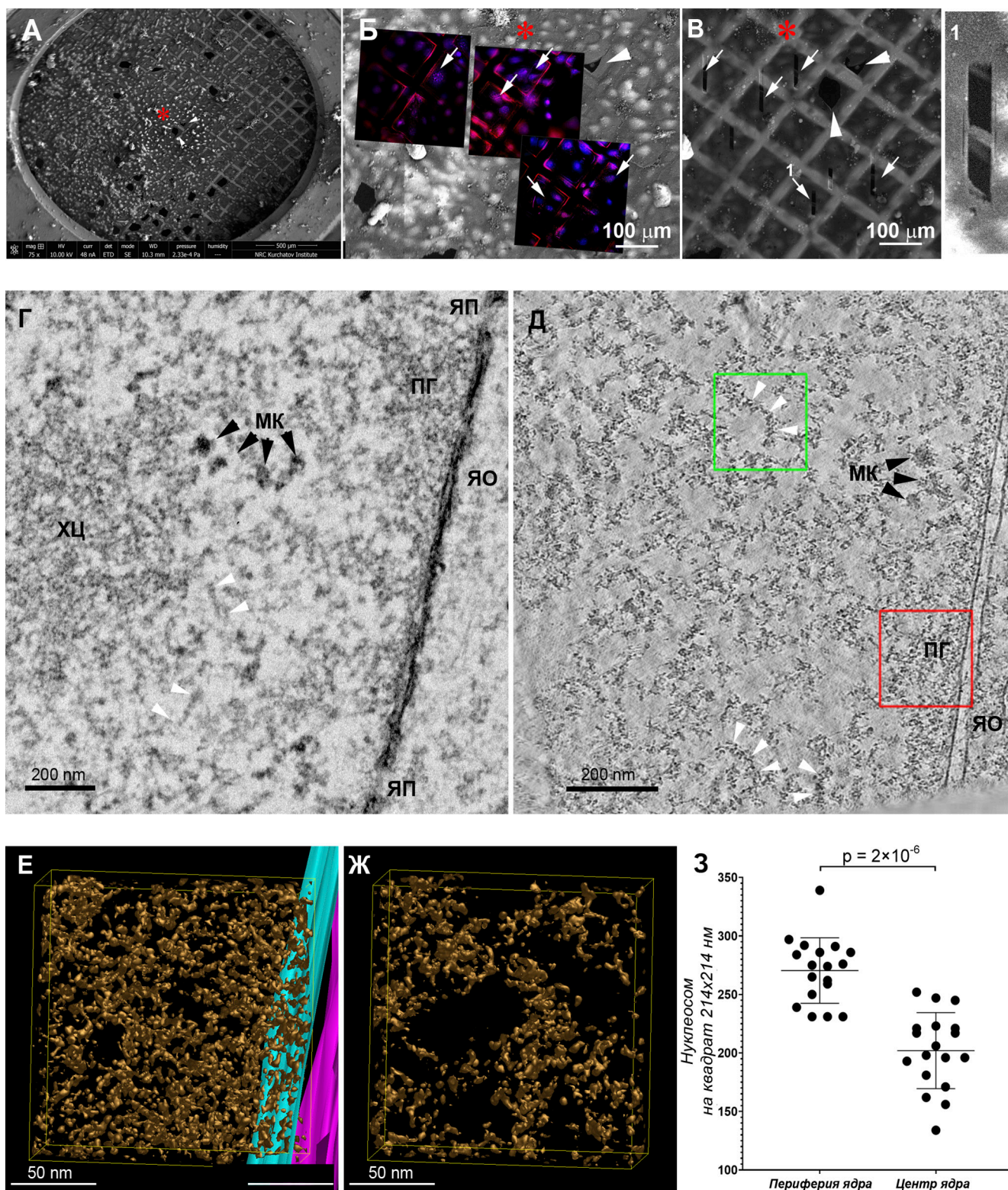


Рисунок. Строение периферических областей ядер мышечных фибробластов линии 3Т3. **А** – криостабилизированные («витрифицированные») на сетке, наблюдение в режиме СЭМ. Красный астериск – геометрический центр сетки, указатели – ориентиры. **Б** – совмещение флуоресцентной «карты» с СЭМ-изображением сетки, стрелки – выбранные клетки. **В** – подготовленные ламели (стрелки). Стрелка, отмеченная цифрой «1» указывает на ламель, показанную крупным планом на врезке справа. **Г** – ультратонкий срез (80 нм), заключенной в эпоксидную смолу клетки линии 3Т3. ПГ – периферический гетерохроматин, ХЦ – хромоцентр, ЯО – ядерная оболочка, ЯП – ядерная пора, МК – «мегакомплексы», указатели – фибриллярные структуры хроматина. **Д** – виртуальный срез толщиной 10 нм, полученный из криотомограммы зафиксированной глутаровым альдегидом клетки 3Т3, не подвергнутой химическому контрастированию. **Е, Ж** – трехмерные модели эу- и гетерохроматических зон, отмеченных красной и зеленой рамками на панели Д. Пурпурный и фиолетовый – внутренняя и внешняя ядерные мембраны соответственно. **З** – Локальная плотность популяции нуклеосом на периферии и в центральных районах ядра. Данные представлены, как среднее \pm стандартное отклонение.

Обработка изображений и статистический анализ. Для построения трехмерных моделей в программном пакете IMOD изображения были сегментированы по порогу яркости, после чего были построены поверхности равной яркости. Мембраны ядерной оболочки были трассированы вручную. Анализ распределения локальной плотности популяции нуклеосом был осуществлен с помощью инструментов «Поиск локальных максимумов» и «Подсчет частиц» из пакета FIJI 2.16.0 [16] на фрагментах томограмм из 10 срезов в окнах размером 200×200 пикселей (214×214 нм) на периферии ядра (в непосредственной близости ядерной оболочки) и в центре ядра. Всего было посчитано 36 таких окон из трех томограмм. Для статистического анализа использовали пакет Prism 8.0.1 (GraphPad Software, США). Сравнение выборок проводили с применением U-теста Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,001$.

Результаты и обсуждение

Несмотря на то, что при окраске ДНК красителями DAPI или Hoechst блоки гетерохроматина хорошо различимы при использовании не иммерсионного объектива с числовой апертурой 0,6–0,9, идентификация предварительно выбранных для анализа клеток в режиме сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) является весьма затруднительной. Чтобы реализовать такую идентификацию, мы сопоставили полученную с помощью флуоресцентного микроскопа карту сетки с расположенными на ней клетками и изображение той же области, полученное в СЭМ, и использовали «естественные» ориентиры, в т. ч. повреждения подложки, для повторного обнаружения выбранных клеток (рисунок, А–В). Ламели вытравливали в зонах, демонстрирующих наиболее яркую флуоресценцию DAPI.

Благодаря этому удалось получить криотомограммы гетерохроматических районов ядер. На текущий момент попадание конкретного хромоцентра в изготавливаемую из криостабилизированного образца ламель является фактически случайным событием, так что основным объектом наших исследований стал периферический гетерохроматин. Разрешение результирующих томограмм не позволяет визуализировать детали строения индивидуальных нуклеосом, но большое поле зрения позволяет с высокой долей уверенности утверждать, что некоторые группы нуклеосом формируют рыхлые

фибриллы переменной толщины, наиболее заметные на удалении от ядерной оболочки (рисунок, Д–Ж). Локальная плотность популяции нуклеосом вблизи ядерной оболочки существенно выше, чем в центральных районах ядра, что было подтверждено статистическим анализом (рисунок, Е–З).

На ультратонких срезах заключенных в смолу образцов мы также наблюдали фибриллы хроматина переменной толщины и более компактный периферический гетерохроматин (рисунок, Г), что полностью соответствует данным, полученным с применением метода селективного контрастирования ДНК на ультратонких срезах [17] и данным КЭТ [18]. И на ПЭМ-, и на КЭТ-изображениях мы обнаружили два типа структур: вышеупомянутые фибриллярные структуры и кластеры телец неправильной формы, идентичные «мегакомплексам» [19], предположительно, являющимся незрелыми рибосомами, идущими на экспорт из ядра.

Общее сходство картины хроматина, наблюдаемой в ядрах на ультратонких срезах заключенных в эпоксидную смолу и получаемой с криостабилизированных образцов после химической фиксации, позволяет утверждать, что обезвоживание и заключение образцов в смолу не наносит значительного ущерба ультраструктуре. В то же время мы не можем уверенно сказать, является ли наблюдаемое состояние хроматина следствием альдегидной фиксации или нет. Дальнейший анализ мезоструктуры хроматина методом КЭТ в клетках, не подвергнутых химической фиксации, позволит пролить новый свет на этот, пока еще дискуссионный, вопрос. Следующим этапом предполагается применение корреляционной световой микроскопии и КЭТ для прицельного изучения двух типов субхромосомных доменов — хромоцентров и зон репликации ДНК. Есть основания полагать, что новые сведения существенно дополняют данные об архитектуре ядра в целом и его отдельных зон, полученные методами стабилизации конформации хромосом (ЗС и производные) и методами световой микроскопии.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, проект № 23-74-00021. Часть работы выполнена с использованием оборудования, приобретенного в рамках программы развития МГУ ПНР5.13. Исследование проведено без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tark-Dame M., Jerabek H., Manders E.M., van der Wateren I.M., Heermann D.W., van Driel R. Depletion of the chromatin looping proteins CTCF and cohesin causes chromatin compaction: insight into chromatin folding by polymer modelling. *PLoS Comput. Biol.* 2014;10(10):e1003877.

2. Hoencamp C., Rowland B.D. Genome control by SMC complexes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2023;24(9):633–650.

3. Falk M., Feodorova Y., Naumova N., Imakaev M., Lajoie B.R., Leonhardt H., Joffe B., Dekker J., Fudenberg G., Solovei I., Mirny L.A. Heterochromatin drives

compartmentalization of inverted and conventional nuclei. *Nature*. 2019;570(7761):395–399.

4. Shatskikh A.S., Abramov Y.A., Lavrov S.A. Trans-inactivation: Repression in a wrong place. *Fly (Austin)*. 2017;11(2):96–103.

5. Weaver B.A., Cleveland D.W. Aneuploidy: instigator and inhibitor of tumorigenesis. *Cancer Res*. 2007;67(21):10103–10105.

6. Dubochet J., Sartori Blanc N. The cell in absence of aggregation artifacts. *Micron*. 2001;32(1):91–99.

7. Sengupta R., Poderycki M.J., Mattoo S. CryoAPEX – an electron tomography tool for subcellular localization of membrane proteins. *J. Cell Sci*. 2019;132(6):jcs222315.

8. Cremer T., Cremer M. Chromosome territories. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol*. 2010;2(3):a003889.

9. Bintu B., Mateo L.J., Su J.H., Sinnott-Armstrong N.A., Parker M., Kinrot S., Yamaya K., Boettger A.N., Zhuang X. Super-resolution chromatin tracing reveals domains and cooperative interactions in single cells. *Science*. 2018;362(6413):eaau1783.

10. Huang K., Li Y., Shim A.R., Virk R.K.A., Agrawal V., Eshein A., Nap R.J., Almassalha L.M., Backman V., Szleifer I. Physical and data structure of 3D genome. *Sci. Adv*. 2020;6(2):eaay4055.

11. Gómez-García P.A., Portillo-Ledesma S., Neguembor M.V., Pesaresi M., Oweis W., Rohrich T., Wieser S., Meshorer E., Schlick T., Cosma M.P., Lakadamyali M. Mesoscale Modeling and single-nucleosome tracking reveal remodeling of clutch folding and dynamics in stem cell differentiation. *Cell Rep*. 2021;34(2):108614.

12. Saksouk N., Simboeck E., Déjardin J. Constitutive heterochromatin formation and transcription in mammals. *Epigenetics Chromatin*. 2015;8:3.

13. Maison C., Quivy J.P., Probst A.V., Almouzni G. Heterochromatin at mouse pericentromeres: a model for *de novo* heterochromatin formation and duplication during replication. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol*. 2010;75:155–165.

14. Mastronarde D.N. Dual-axis tomography: An approach with alignment methods that preserve resolution. *J. Struct. Biol*. 1997;120(3):343–352.

15. Liu Y.T., Zhang H., Wang H., Tao C.L., Bi G.Q., Zhou Z.H. Isotropic reconstruction for electron tomography with deep learning. *Nat. Commun*. 2022;13(1):6482.

16. Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E., Kaynig V., Longair M., Pietzsch T., Preibisch S., Rueden C., Saalfeld S., Schmid B., Tinevez J.Y., White D.J., Hartenstein V., Eliceiri K., Tomancak P., Cardona A. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods*. 2012;9(7):676–682.

17. Ou H.D., Phan S., Deerinck T.J., Inagaki A., Ellisman M.H., O'Shea C.C. ChromEMT: visualizing and reconstructing chromatin ultrastructure and 3D organization in situ. *Nat. Protoc*. 2025;20(4):934–966.

18. Hou Z., Nightingale F., Zhu Y., MacGregor-Chatwin C., Zhang P. Structure of native chromatin fibres revealed by Cryo-ET in situ. *Nat. Commun*. 2023;14(1):6324.

19. Chen J.K., Liu T., Cai S., Ruan W., Ng C.T., Shi J., Surana U., Gan L. Nanoscale analysis of human G1 and metaphase chromatin in situ. *EMBO J*. 2025;44(9):2658–2694.

Поступила в редакцию 30.06.2025

После доработки 24.08.2025

Принята в печать 05.09.2025

SHORT COMMUNICATION

Analysis of heterochromatin mesoscale architecture by cryo-electron tomography

E.P. Kazakov^{1, 2, *} , Y.M. Chesnokov³ , I.I. Kireev^{1, 2} , S.A. Golyshev¹ 

¹Belozersky Research Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 1–40 Leninskie gory, Moscow, 119991, Russia;

²Department of Cell Biology and Histology, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, 1–12 Leninskie gory, Moscow, 119234, Russia;

³Kurchatov Complex of NBICS Nature-Like Technologies, National Research Center “Kurchatov Institute,” Russian Federation, 1 Academician Kurchatov Sq., Moscow, 123182, Russia

*e-mail: kazakov.evgeny.2016@post.bio.msu.ru

Cryo-ET (cryo-electron tomography) is a powerful tool for studying the structure of biological objects in their native state. However, Cryo-ET is still not widely used to study cellular organelles including cell nucleus and chromatin *in situ*. In our work, we aimed to investigate the possibilities of employing Cryo-ET for studying the architecture of natively preserved chromatin, focusing on the possibility of using a cryoCLEM (cryo-correlative light and electron microscopy) approach to target final steps of sample preparation by focused ion beam (FIB) milling exactly to the area of interest – specifically, heterochromatin loci.

Keywords: cryo-electron tomography, correlation microscopy, chromatin, heterochromatin

Funding: This work was supported by the Russian Science Foundation, project no. 23-74-00021.

Сведения об авторах

Казаков Евгений Павлович — аспирант, мл. науч. сотр. отдела электронной микроскопии НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ. Тел.: 8-495-939-10-00; e-mail: kazakov.evgeny.2016@post.bio.msu.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0959-1348>

Чесноков Юрий Михайлович — канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории электронной микроскопии Курчатовского комплекса НБИКС-природоподобных технологий НИЦ «Курчатовский институт». Тел.: 8-499-196-95-39; e-mail: chesnokov_ym@nrcki.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8365-4699>

Киреев Игорь Игоревич — докт. биол. наук, зав. отделом электронной микроскопии, НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ. Тел.: 8-495-939-10-00; e-mail: kireev@belozersky.msu.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9252-6808>

Голышев Сергей Александрович — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. отдела электронной микроскопии НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ. Тел.: 8-495-939-10-00; e-mail: sergei.a.golyshev@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4877-1061>