

МЕТОДЫ

УДК 577.214

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ УСТАНОВКА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ОДИНОЧНЫХ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ НУКЛЕОСОМ С ПОМОЩЬЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ ПОЛНОГО ВНУТРЕННЕГО ОТРАЖЕНИЯ**К.С. Кудряшова^{1,2}, О.В. Чертков^{1,2}, Я.О.Иванов¹, В.М. Студитский^{1,3}, А.В. Феофанов^{1,2*}**

¹ Кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова; Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

² Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; Россия, 117997, г. Москва, улица Миклухо-Маклая, дом 16/10;

³ лаборатория эпигенетики рака, Центр исследований рака Фокс Чейз; США, штат Пенсильвания, 19111, г. Филадельфия, просп. Коттмана, д. 333

*e-mail: avfeofanov@yandex.ru

Создана экспериментальная установка для изучения иммобилизованных молекул и их комплексов *in vitro* методом флуоресцентной микроскопии с чувствительностью на уровне одиночных флуорофоров. Установка регистрирует флуоресцентные изображения иммобилизованных молекул одновременно в двух спектральных диапазонах, обеспечивая анализ на основе эффекта Фёрстеровского резонансного переноса энергии. Возбуждение флуоресценции поверхностной световой волной, сформированной методом полного внутреннего отражения, и регистрация сигнала с помощью высокочувствительной системы детекции позволяют проводить измерения с временным разрешением около 100 мс. Разработан протокол модификации поверхности стекол для иммобилизации нуклеосом через высокоаффинные стрептавидин-биотиновые взаимодействия. Чтобы обеспечить иммобилизацию, один из концов ДНК флуоресцентно-меченых мономеров нуклеосом был биотинилирован. Разработан алгоритм обработки изображений для анализа структурных перестроек в одиночных нуклеосомах. Флуоресцентная микроскопия одиночных иммобилизованных молекул и их комплексов расширяет возможности изучения структурной динамики нуклеосом при транскрипции и взаимодействии с различными ядерными белками.

Ключевые слова: нуклеосома, хроматин, иммобилизация, флуоресценция, микроскопия, одиночная молекула.

Арсенал традиционных физико-химических и биохимических методов изучения структуры биополимеров и супрамолекулярных комплексов с недавнего времени пополнился методами флуоресцентной микроскопии одиночных молекул [1–2]. Новые методы доказали свою эффективность при изучении нуклеосом, а также комплексов и процессов с их участием [3–8] и требуют дальнейшего развития. Ранее нами на основе флуоресцентно-меченых промотор-содержащих матриц ДНК были получены точно позиционированные мономеров нуклеосомы [6–8], содержащие в нетранскрибируемой цепи ДНК флуорофоры циановый 3 (Cy3) и циановый 5 (Cy5). Было предложено два варианта мечения, при которых после укладки ДНК на октамере гистонов метки оказываются в положениях +35 и +113 [8] или +56 и +135 [6, 7] пар нуклеотидов от входа в нуклеосому на соседних участках ДНК (рис. 1, В), где между ними с эффективностью 50–90% реализуется Фёрстеровский резонансный перенос энергии (Förster resonance energy transfer, FRET). Показано, что изменение структуры нуклеосомы сопровождается изменением эффективности FRET, по величине которого можно судить

о масштабе перестроек в помеченной области нуклеосомы. При этом введение меток не повлияло на способность РНК-полимеразы транскрибировать нуклеосому [6, 8]. С применением меченых нуклеосом и флуоресцентной микроскопии одиночных комплексов нами начато изучение структурных изменений в хроматине, происходящих в процессе транскрипции [6–8]. Методика флуоресцентной микроскопии одиночных комплексов была реализована на основе анализа свободно диффундирующих в растворе нуклеосом, по одной пересекающих фокальный объем, из которого измеряются интенсивности сигналов донора (Cy3) и акцептора (Cy5). Такие измерения удобны для исследования равновесных состояний и комплексов или очень медленных (минуты и десятки минут) процессов. Ограничением этой методики является невозможность следить за изменениями, происходящими с индивидуальными нуклеосомами во времени. Данное ограничение можно преодолеть, если иммобилизовать нуклеосомы на поверхности и обеспечить быстрое измерение их флуоресцентных изображений с разделением сигналов донора и акцептора. В настоящей работе приводится инфор-

мация о разработке специальных вариантов нуклеосом, протоколов их иммобилизации, а также экспериментальной установки и методик для изучения одиночных иммобилизованных нуклеосом методом флуоресцентной микроскопии полного внутреннего отражения (ПВО).

Материалы и методы

Экспериментальная установка. В состав разработанной экспериментальной установки (рис. 1, А) входит Ar^+ -лазер (LASOS 500 мВт, Lasertechnik GmbH, Германия) с прерывателем луча Uniblitz (VA Inc., США), инвертированный микроскоп AxioObserver (Zeiss, Германия) с оптическим модулем для микроскопии ПВО и объективом α Plan-Apochromat ($\times 100$, числовая апертура 1,46), модуль OptoSplit II (Cairn Research, Англия) и EMCCD-камера iXon Ultra 897 (512 $\times$ 512 пикселей, Andor, Англия) с программой iQ для регистрации изобра-

жений. Обработка изображений и представление данных реализованы с использованием программ Image J (National Institute of Health, США) и Prism (GraphPad, США). При исследовании нуклеосом, меченных Cy3 и Cy5, использовали длину волны возбуждения 514,5 нм (240 мкВт на образце), а спектральную фильтрацию и разделение сигналов флуорофоров осуществляли с помощью дихроичных зеркал Di01-R532 (DZ_1), FF635-Di01 (DZ_2), полосового фильтра FF01-571/72 (Φ_3) фирмы SemRock (США), длинноволнового барьерного фильтра ET525LP (Φ_2) фирмы Chroma Technology (США) и узкополосного фильтра BP514/10 (Φ_1) фирмы Zeiss.

Приготовление моонуклеосом. Для приготовления моонуклеосом использовали реагенты и специальные наборы реактивов, состав и происхождение которых описаны ранее [6, 8]. Флуоресцентно-меченую ДНК и моонуклеосомы на основе донорного хроматина из эритроцитов цыплят получали, как изложено в предыдущих работах [6, 8].

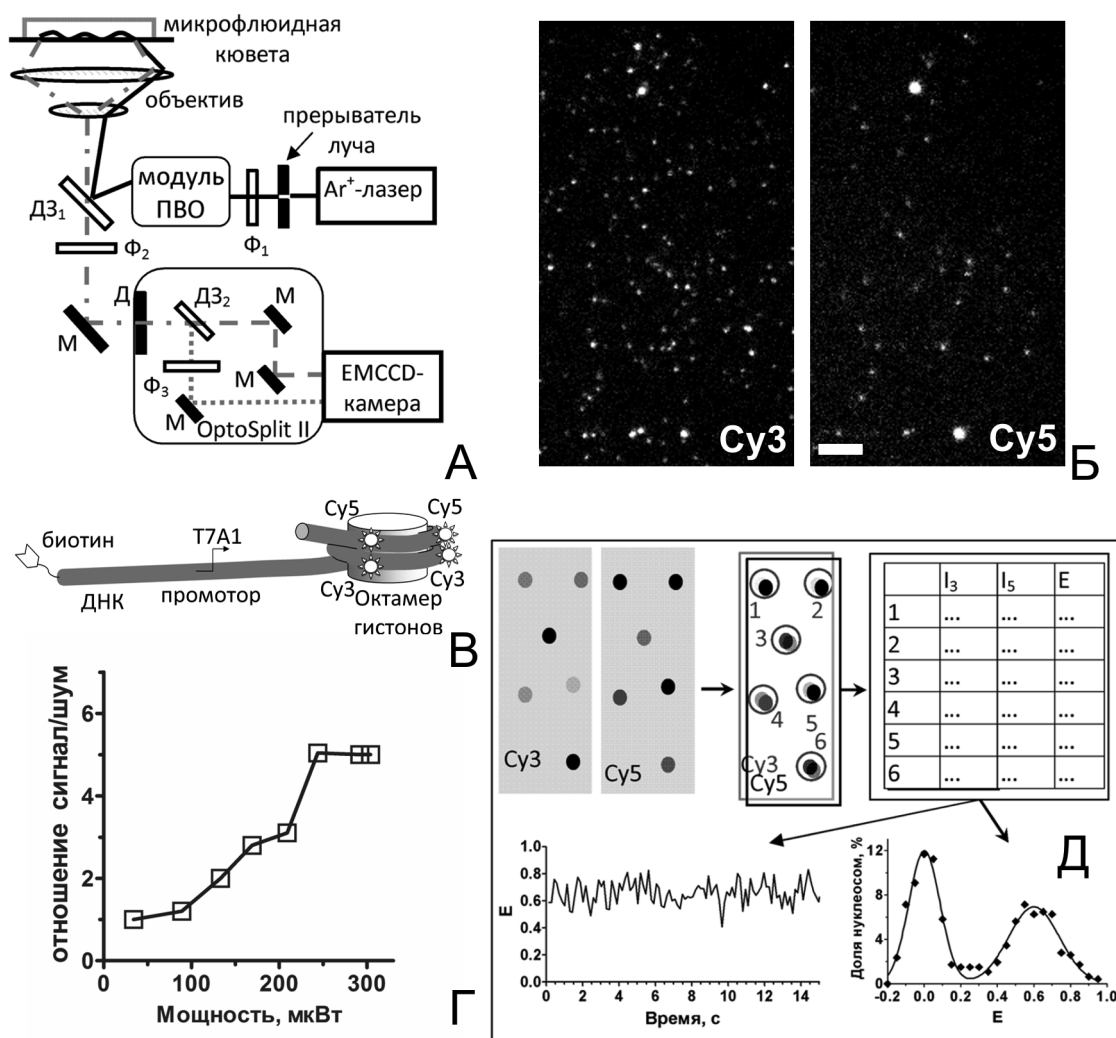


Рис. 1. А — принципиальная схема установки для флуоресцентной микроскопии иммобилизованных одиночных нуклеосом на основе эффекта ПВО. Д — апертурная диафрагма, DZ_1 , DZ_2 — дихроичные зеркала, М — зеркало, Φ_1 , Φ_2 , Φ_3 — фильтры. Б — типичные изображения иммобилизованных одиночных нуклеосом с разделением флуоресценции Cy3 и Cy5. Метка масштаба — 3 мкм. В — структура биотинилированной флуоресцентно меченой моонуклеосомы. Показаны два возможных положения меток Cy3 и Cy5 в соседних участках ДНК: +35 и +113 или +56 и +135 пар нуклеотидов от входа в нуклеосому. Г — зависимость отношения сигнал/шум в изображениях иммобилизованных одиночных молекул Cy3-авидина от мощности лазера на образце. Д — схема этапов обработки изображений и представления данных (детали описаны в тексте статьи)

Для целей иммобилизации нуклеосомы дополнительно лигировали с биотинилированным по 5'-концевому цитозину фрагментом ДНК длиной 178 п.н. (рис. 1, В). Лигирование проводили по сайту рестрикции TSPRI. Нуклеосомы и биотинилированный фрагмент смешивали в эквимольном соотношении в растворе, содержащем ДНК-лигазный буфер фага Т4, 5% полиэтиленгликоля (4 кДа), 100 мМ бычьего сывороточного альбумина и ДНК-лигазу фага Т4 в количестве, определяемом инструкцией производителя (все компоненты фирмы Fermentas). Реакции проводили в течение 12 ч при 16°C. Эффективность лигирования контролировали с помощью нативного электрофореза в 4%-ном полиакриламидном геле по изменению подвижности полосы нуклеосом и дополнительно впоследствии по способности продукта реакции к иммобилизации.

Модификация стекол и сборка микрофлюидной кюветы. Покровные (25×50 мм, толщина 175±15 мкм) и предметные стекла (Menzel-Glaser, Германия) очищали хромпиком, многократно промывали дистиллированной водой, выдерживали в 1М растворе КОН в течение 1 ч, промывали дистиллированной водой и высушивали при 50°C. На стекла наносили по 50 мкл 2%-ного раствора смеси (100:1 по весу) полиэтиленгликоль-силана (ПЭГ-силан, 2 кДа) и биотин-ПЭГ-силана (2 или 5 кДа, Nanocs, США) в 97%-ном этаноле и инкубировали их 25 мин при 20°C. Затем стекла промывали этанолом и водой, высушивали при 50°C. Из покровного и предметного стекол, ориентированных модифицированными поверхностями друг к другу, формировали микрофлюидную кювету с размером канала 20×25×0,1 мм. Собранные кюветы хранили при –20°C.

Иммобилизация нуклеосом. Для иммобилизации нуклеосом в кювету вводили 30 мкл водного раствора стрептавидина (1 мг/л, Sigma), инкубировали ее 5 мин при комнатной температуре, промывали буфером TB150 (20 мМ Tris–HCl (pH 8,0), 5 мМ MgCl₂, 2 мМ 2-меркаптоэтанол и 150 мМ KCl), вводили 30 мкл раствора нуклеосом (10^{–4} нг/мкл по ДНК) в TB150, снова инкубировали 5 мин при комнатной температуре и промывали TB150 от несвязавшихся нуклеосом. Для иммобилизации меченного Cy3 авидина (Cy3-авидин, Sigma) в кювету вводили 30 мкл его водного раствора (10 мкг/л), инкубировали смесь 5 мин при комнатной температуре и отмывали водой от несвязавшегося белка.

Результаты и их обсуждение

В созданной экспериментальной установке (рис. 1, А) модуль ПВО используется для направления лазерного луча через объектив в микрофлюидную кювету под углом ПВО и создания поверхностной световой волны в слое толщиной ~100 нм на границе воды и стекла с иммобилизованными нуклеосомами. Узкополосный фильтр Φ_1 подавляет неиспользуемые лазерные линии Ar⁺-лазера. Дихроичное зеркало ДЗ₁ отражает в объектив излучение

лазера и пропускает флуоресценцию к системе детекции. Световая волна возбуждает флуоресценцию всех иммобилизованных нуклеосом, находящихся в поле зрения. За пределами 100-нанометрового поверхностного слоя флуоресценция не возбуждается. Собранный объективом, флуоресценция нуклеосом проходит через ДЗ₁, фильтруется дополнительно от упруго рассеянного света длинноволновым барьерным фильтром Φ_2 с границей 525 нм и делится дихроичным зеркалом ДЗ₂ на два пучка с длинами волн короче и длиннее 635 нм. Дополнительный фильтр Φ_3 выделяет из коротковолнового пучка флуоресценцию с длинами волн 535–607 нм. Для установки подобраны специальные фильтры и дихроичные зеркала с высоким (>94%) пропусканием света в заданных областях и повышенным (10⁶) коэффициентом подавления света на длине волны 514,5 нм (фильтры Φ_2 , Φ_3). С помощью системы зеркал модуля OptoSplit II коротковолновая (Cy3) и длинноволновая (Cy5) флуоресценции проецируются каждая на свою половину сенсора высокочувствительной EMCCD-камеры, что обеспечивает одновременное измерение пространственного распределения сигналов донора и акцептора (рис. 1, Б).

Разработанный протокол модификации поверхности стекла смесью ПЭГ-силана и биотин-ПЭГ-силана обеспечивает формирование однородного монослоя ПЭГ с равномерным и плотным распределением биотинилированных молекул (данные не представлены). Установлено, что модифицированные стекла сохраняют свои свойства в течение 4–6 мес. Необходимая для регистрации одиночных молекул плотность распределения (<1 молекулы на 1 мкм²) достигнута путем оптимизации времени инкубации и концентрации иммобилизуемых молекул (рис. 1, Б). С использованием одиночных иммобилизованных молекул Cy3-авидина установлено, что максимальные интенсивность сигнала и отношение сигнал/шум достигаются при мощности лазера на образце больше 240 мВт (рис. 1, Д). Эта мощность обеспечивает близкую к 100% вероятность возбуждения Cy3, как только флуорофор возвращается в основное электронное состояние после испускания флуоресценции.

Разработанная процедура обработки данных включает в себя (рис. 1, Д) разделение изображения, полученного с EMCCD-камеры, на изображения распределения сигналов Cy3 и Cy5, измерение интенсивности фона в обоих изображениях и вычитание его, совмещение изображений с последующим распознаванием положения и границ одиночных нуклеосом, измерение интенсивностей флуоресценции Cy3 и Cy5 и расчет эффективности FRET (Е) по формуле (1) для каждой из распознанных нуклеосом:

$$E = (I_5 - 0,14 \times I_3) / (I_5 + 0,86 \times I_3) \quad (1),$$

где I_3 и I_5 — это интенсивности сигналов Cy3 и Cy5, а коэффициенты 0,14 и 0,86 учитывают частичное перекрывание флуоресценции Cy3 и Cy5

в области 635–750 нм. Набор значений E для выборки нуклеосом графически представляется в виде гистограммы относительной частоты распределения этой величины (рис. 1, Д). При анализе динамики структуры для каждой нуклеосомы строится зависимость E от времени или гистограмма относительной частоты распределения величины E за измеренный промежуток времени (рис. 1, Д).

Сравнение частотных распределений величины E для нуклеосом, иммобилизованных с помощью биотин-ПЭГ-силана 2 и 5 кДа (в обоих случаях основным компонентом монослоя был ПЭГ-силан 2 кДа) выявило существенную дестабилизацию структуры нуклеосом при использовании биотин-ПЭГ-силана 2 кДа. Дестабилизация наблюдалась как в области, близкой к выходу ДНК из контакта с гистоновым октамером, так и в области метки, отстоящей на 35 пар нуклеотидов от входа в нуклеосому (рис. 2, А, Б). Таким образом, использование более длинного биотин-ПЭГ-силана 5 кДа

в комбинации с ПЭГ-силаном 2 кДа является существенным для сохранения нативной структуры нуклеосом при иммобилизации. Этот вывод подтверждает сравнение частотных распределений величины E для иммобилизованных и свободно диффундирующих нуклеосом (рис. 2, А, Б). Измерения свободно диффундирующих нуклеосом выполняли, как описано в предыдущих работах [6–8]. Близкие величины максимумов распределения указывают на сходную укладку ДНК у иммобилизованных и свободно диффундирующих нуклеосом, а отличия в ширине профилей, скорее всего, связаны с различиями во времени накопления сигнала: соответственно 2,4 с и 3 мс. Для иммобилизованных нуклеосом флуктуации E , связанные с подвижностью флуорофоров на сравнительно длинных линкерах, усредняются за 2,4 с интегрирования сигнала, чего не происходит при измерении флуоресценции нуклеосом в растворе с временной константой 3 мс.

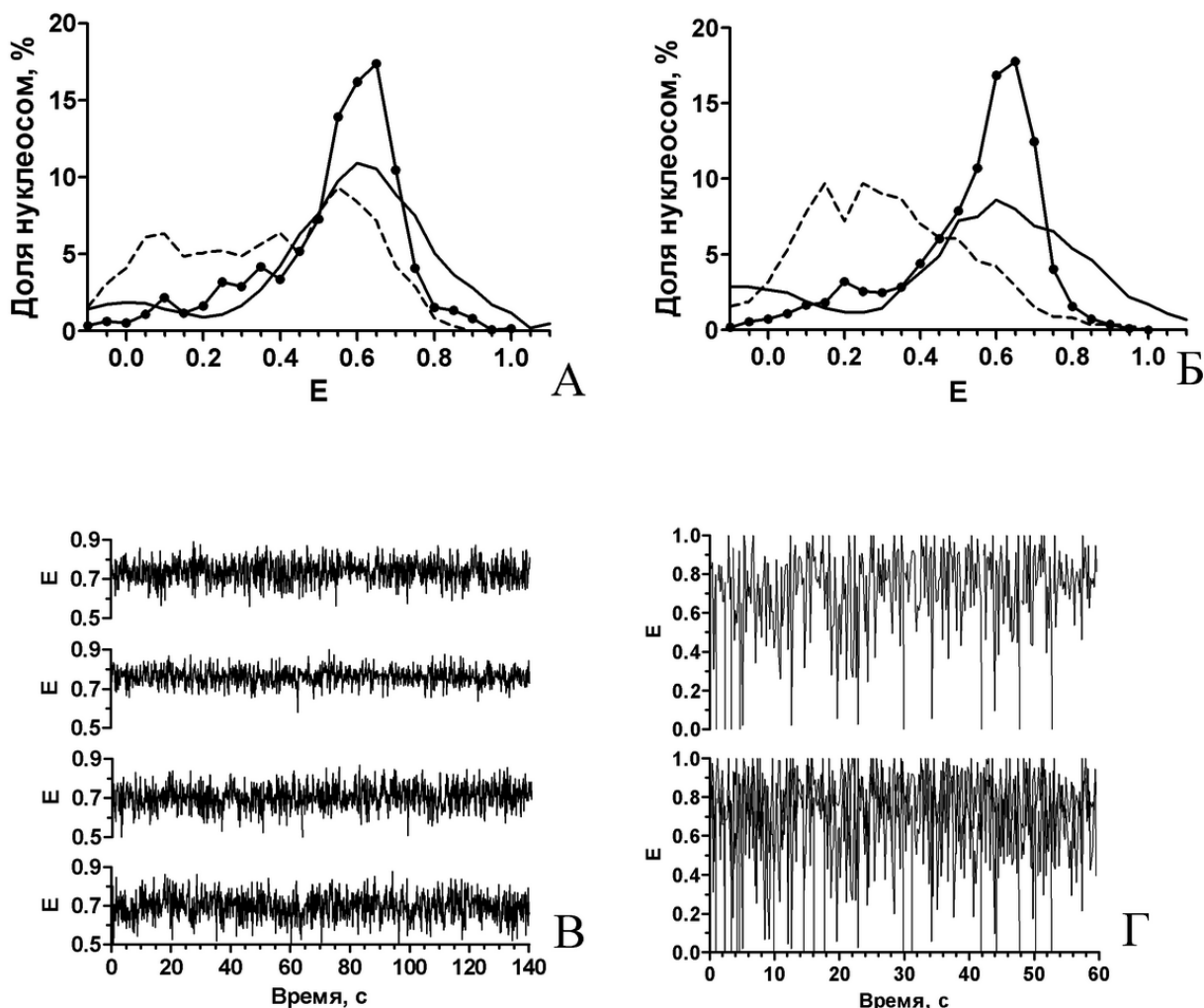


Рис. 2. А, Б — частотные распределения биотинилированных нуклеосом с метками в положениях +35, +113 (А) и +56, +135 (Б) пар нуклеотидов от входа в нуклеосому. Непрерывная линия — нуклеосомы, свободно диффундирующие в растворе. Прерывистая линия — нуклеосомы на поверхности, модифицированной ПЭГ-силаном 2 кДа и биотин-ПЭГ-силаном. Сплошная линия с точками — нуклеосомы на поверхности, модифицированной ПЭГ-силаном 2 кДа и биотин-ПЭГ-силаном 5 кДа. В, Г — типичные примеры динамики величины E для одиночных иммобилизованных нуклеосом с метками в положениях +35, +113 в буфере с 150 (В) и 600 (Г) мМ КСl

Существенным преимуществом иммобилизованных нуклеосом является возможность изучения изменений их структуры в динамике. Показано, что фотостабильность СуЗ и Су5 в условиях проводимых экспериментов достаточна для непрерывного наблюдения за нуклеосомами в течение 2–3 мин (рис. 2, В). При этом чувствительность экспериментальной установки и скорость считывания ЕМССД-камерой позволяют получать изображения нуклеосом каждые 120 мс. Анализ временных зависимостей величины Е для отдельных нуклеосом дает возможность изучать подвижность ДНК в области расположения меток. В удаленной от концов ДНК области нативных нуклеосом ДНК особенно прочно связана с гистоновым октамером, и ее укладка не меняется во времени, на что указывает узкий диапазон флуктуаций величины Е у нуклеосом, меченых в положениях +35 и +113 (рис. 2, В). Высокая ионная сила (600 мМ КСl) вызывает дестабилизацию структуры нуклеосом, что регистрируется как значительное возрастание амплитуды изменений величины Е (рис. 2, Г). Эти изменения Е свидетельствуют о том, что в условиях высокой ионной силы происходит периодическое

откручивание ДНК от гистонового кодра, которое имеет масштабный характер, затрагивая до 35 пар нуклеотидов, находящихся в контакте с октамером гистонов. При этом полной потери гистонов не происходит. Отметим, что анализ структурной динамики возможен только при изучении одиночных нуклеосом, так как в ансамбле нуклеосом разнонаправленные изменения структуры и, соответственно, величины Е будут усредняться.

Созданная экспериментальная установка в сочетании с разработанными методиками иммобилизации и исследования одиночных нуклеосом позволит изучать изменения в структуре нуклеосом, происходящие при их взаимодействии с разнообразными ядерными белками в динамике. Благодаря наличию в структуре иммобилизованных нуклеосом промотора и отсутствию влияния меток на транскрипцию [6, 8] в описанной системе возможно также проведение экспериментов по изучению структурных изменений, которые вызывает РНК-полимераза в нуклеосоме в процессе транскрипции в реальном времени.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-24-00031).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sustarsic M., Kapanidis A.N. Taking the ruler to the jungle: single-molecule FRET for understanding biomolecular structure and dynamics in live cells // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2015. Vol. 34. P. 52–59.
2. Juette M.F., Terry D.S., Wasserman M.R., Zhou Z., Altman R.B., Zheng Q., Blanchard S.C. The bright future of single-molecule fluorescence imaging // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2014. Vol. 20. P. 103–111.
3. Luo Y., North J.A., Poirier M.G. Single molecule fluorescence methodologies for investigating transcription factor binding kinetics to nucleosomes and DNA // *Methods.* 2014. Vol. 70. N 2–3. P. 108–118.
4. Ngo T.T., Ha T. Nucleosomes undergo slow spontaneous gaping // *Nucleic Acids Res.* 2015. Vol. 43. N 8. P. 3964–3971.
5. Ngo T.T., Zhang Q., Zhou R., Yodh J.G., Ha T. Asymmetric unwrapping of nucleosomes under tension directed by DNA local flexibility // *Cell.* 2015. Vol. 160. N 6. P. 1135–1144.
6. Kudryashova K.S., Chertkov O.V., Nikitin D.V., Pestov N.A., Kulaeva O.I., Efremenko A.V., Solonin A.S., Kirpichnikov M.P., Studitsky V.M., Feofanov A.V. Preparation of mononucleosomal templates for analysis of transcription with RNA polymerase using spFRET // *Methods Mol. Biol.* 2015. Vol. 1288. P. 395–412.
7. Feofanov A.V., Kudryashova K.S., Chertkov O.V., Nikitin D.V., Pestov N.A., Kulaeva O.I., Studitsky V.M., Kirpichnikov M.P. Analysis of nucleosome transcription using single-particle FRET // *Springer Proc. Phys.* 2015. Vol. 164. P. 255–260.
8. Kudryashova K.S., Nikitin D.V., Chertkov O.V., Gerasimova N.S., Valieva M.E., Studitsky V.M., Feofanov A.V. Development of fluorescently labeled mononucleosomes for the investigation of transcription mechanisms by single complex microscopy // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2015. Vol. 70. N 4. P. 189–193.

Поступила в редакцию
16.09.15

EXPERIMENTAL SETUP FOR STUDY OF IMMOBILIZED SINGLE NUCLEOSOMES USING TOTAL INTERNAL REFLECTION FLUORESCENCE MICROSCOPY

K.S. Kudryashova^{1,2}, O.V. Chertkov^{1,2}, Y.O. Ivanov¹, V.M. Studitsky^{1,3}, A.V. Feofanov^{1,2,*}

¹ Bioengineering Department, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiyegory 1-12, Moscow, 119234, Russia;

² Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Miklukho-Maklaya ul. 16/10, GSP-7, 117997, Moscow, Russia;

³ Cancer Epigenetics Program Team, Fox Chase Cancer Center; Cottman Avenue 333, Philadelphia, PA 19111, USA

* e-mail: avfeofanov@yandex.ru

An experimental setup for study of immobilized molecules and their complexes by fluorescence microscopy with sensitivity at the single fluorophore level was developed. The installation records fluorescence images of immobilized molecules in two spectral ranges simultaneously, al-

lowing analysis based on the Förster resonance energy transfer effect. The fluorescence excitation is caused by evanescent light wave formed by the total internal reflection technique, and registration of signal with a highly sensitive detection system allows conducting measurements with a temporal resolution of about 100 ms. The glass surface modification protocol was developed for immobilization of nucleosomes via the high-affinity streptavidin-biotin interactions. To ensure immobilization, one of the DNA ends of fluorescently labelled nucleosomal DNA was biotinylated. The algorithm of image processing for analysis of structural rearrangements in single nucleosomes was developed. Fluorescence microscopy of single immobilized molecules and their complexes allows the analysis of nucleosome structural dynamics during transcription and its interaction with various nuclear proteins.

Key words: *nucleosome, chromotine, immobilization, fluorescence, microscopy, single molecule.*

Сведения об авторах:

Кудряшова Ксения Сергеевна — мл. науч. сотр. ИБХ РАН, вед. инженер кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-336-64-55; e-mail: rekamoskva@mail.ru

Чертков Олег Валерьевич — вед. инженер кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-938-22-91; e-mail: o_chertkov@mail.ru

Иванов Ярослав Олегович — студент кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-336-64-55; e-mail: dopellgunger@gmail.com

Студитский Василий Михайлович — докт. биол. наук, гл. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ; руководитель лаборатории эпигенетики рака Центра исследований рака Фокс Чейз (Филадельфия, США). Тел.: 8-495-938-22-91; e-mail: vasily.studitsky@fccc.edu

Феофанов Алексей Валерьевич — докт. биол. наук, руководитель лаборатории оптической микроскопии и спектроскопии биомолекул ИБХ РАН, проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-336-64-55; e-mail: avfeofanov@yandex.ru