

С.М. ВИШНЕВСКАЯ, Н.В. АКУЛИЧ, А.Н. ОСИПЕНКО

ДВА УРОВНЯ ИЗУЧЕНИЯ ПЕРЕСТРОЕК ХРОМАТИНА ПРИ ДЕЙСТВИИ ФАКТОРОВ РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ

*В обзоре рассмотрены различные случаи структурной реорганизации хроматина при функциональных нагрузках в контексте концевых модификаций гистонов, а также субклеточных изменений, выявляемых микроскопически. Приводятся примеры молекулярных перестроек при метаболическом стрессе, гипоксии, "окислительном взрыве" лейкоцитов, ремоделинге сердечной мышцы при гипертрофии. В качестве иллюстраций применения микроскопической техники при изучении перестроек хроматина приведены результаты, полученные методом компьютерной морфоденситометрии, синхронного анализа изображений, гибридизации с флуоресцентной меткой *in situ* (FISH) в сочетании с методами анализа изображений. Обсуждаются возможности совместного использования молекулярных и цитоморфометрических методов, в частности, сочетания технологий введения флуоресцентных белков с визу-*

ализацией живой клетки в исследованиях реакций на воздействия различного рода в живой клетке в режиме реального времени.

Начиная с работ Р. Вирхова, клеточный уровень в некоторых случаях считается более предпочтительным для изучения как нормальных, так и патологических реакций целого организма; использование такого подхода позволило детализировать представления о механизмах возникновения и развития патологии, разработать чувствительные диагностические методики.

Несмотря на увеличение объема сведений о структурно-функциональных особенностях клеточного ядра в ответ на воздействие различных по природе факторов, следует отметить, что большинство публикаций касается молекулярных механизмов контроля активности генов. Это часто не позволяет получить целостную картину изменений наследственного материала клетки при реакции на внешние сигналы или реализации ее внутренней программы развития. Кроме того, следует учесть, что характер экспрессии генов может кодироваться не только последовательностями нуклеотидов в ДНК, но и целыми структурами хромосом – так называемое эпигенетическое регулирование [1], а его ключевыми механизмами считаются метилирование ДНК и перестройка хроматина.

Таким образом, назрела необходимость разработать методологию изучения структуры хроматина в ответ на действие факторов различной природы. Целью данной статьи является анализ подходов к изучению состояния структуры хроматина в контексте функциональных нагрузок и поиск возможных путей синтеза знаний о перестройках хроматина на двух уровнях – молекулярно-эпигенетическом и цитоморфологическом.

1. Молекулярно-эпигенетический подход

Элементарные структуры упаковки ДНК в хроматине образуются за счет ассоциации гистонов с ДНК. Транскрипционную активность генов в хроматине может регулировать как наличие либо отсутствие гистонов, так и их качественное состояние [2]. Посттрансляционные ковалентные модификации – ацетилирование и метилирование некоторых остатков лизина и фосфорилирование сериновых остатков – значительно меняют свойства гистонов, их способность связываться с ДНК, и таким образом участвуют в регуляции транскрипции, в том числе и в ответ на воздействия различной силы и характера.

Активный хроматин обладает повышенным уровнем модификации гистонов, особенно ацетилирования гистона H1, и известны примеры функциональных последствий, вызванных модификациями гистонов. В основном они касаются развития злокачественных новообразований, для которых доказана эпигенетическая природа и зависимость развития от неблагоприятных факторов окружающей среды [3]. Например, изменение модификаций гистонов в хроматине может вызывать метаболический стресс (нарушение обмена веществ). Показано, что употребление алкоголя коррелирует с повреждением клеток через эпигенетические изменения (ацетилирование, метилирование гистонов, гипо- и гиперметилирование ДНК), с развитием стеатоза и фиброза печени, вызванных этанолом, карциномой и язвой ЖКТ [4].

Уникальной является экспериментальная метилдефицитная модель эндогенного гепатокарциногенеза у грызунов, так как здесь к формированию опухоли ведет диетическое исключение, а не добавление химических канцерогенов в пищу. Предрасположенность к раку в этом случае вызывается изменениями в глобальных паттернах модификации гистонов печени в течение карциногенеза. Продемонстрировано, что экспрессия некоторых гистоновых метилтрансфераз устой-

чиво уменьшалась в эксперименте по мере развития опухоли, тогда как экспрессия некоторых гистоновых ацетилтрансфераз в опухолях существенно увеличилась, приводя к изменениям соответствующих модификаций [5].

В работах последних лет установлена роль гипоксии в нарушении модификаций гистонов. Известно, что диметилированный по лизину-9 гистон H3 (H3K9me₂) принимает участие в эмбриогенезе и карциногенезе. Гипоксия увеличивает уровень общего H3K9me₂ в нескольких линиях клеток млекопитающих, и это коррелировало с ростом активности гистоновой метилтрансферазы G9a. Показано, что гипоксимиметики типа дефероксамина и диметилноксалилглицина также увеличивают долю H3K9me₂, как и G9a. Наконец, гипоксия приводит к росту H3K9me₂ в областях промоторов генов M1h1 и Dhfr, что сопровождается их репрессией. Совокупность приведенных данных позволяет сделать предположение, что G9a играет важную роль в вызванном гипоксией увеличении доли H3K9me₂, который мог бы ингибировать экспрессию нескольких генов, ведущих к росту опухоли [6].

Предполагается роль модификаций гистонов в процессах репарации. Как известно, ДНК в живых клетках подвергается непрерывному окислительному повреждению, что обусловлено действием экзо- и эндогенных окислителей и индукторов окисления. Совокупное окислительное повреждение ДНК считают ключевым фактором старения и может вызывать злокачественное перерождение клетки [7]. Фосфорилирование гистона H2AX по серину-139 способствует репарации двойных разрывов, образуя комплексы, сигнализирующие о повреждении ДНК, а также комплексы ремоделирования хроматина около мест повреждения [цит. по 8]. Показано, что индукция окислительного напряжения в лейкоцитах периферической крови человека форбол-миристан-ацетатом (РМА) была связана с интенсивным фосфорилированием (замеченным уже через 60 минут после подвергания РМА) гистона H2AX. Наблюдаемое в лимфоцитах фосфорилирование H2AX может свидетельствовать о повреждении ДНК супероксидными ионами, продуцируемыми соседними гранулоцитами и/или моноцитами в ходе "окислительного взрыва", что также приводит к повреждению ДНК фагоцитов [9].

Описаны случаи так называемого ремоделирования живой ткани в ответ на функциональное напряжение. Например, сердце отвечает на острый и хронический стресс гипертрофией миоцитов; это ухудшает сократимость, насосную функцию и часто приводит к внезапной смерти. Патологическая гиперплазия сердца часто сопровождается возобновлением эмбриональной программы генов сердечной ткани, и недавние исследования показали [10], что в контроле патологического увеличения сердца ключевая роль принадлежит гистоновой деацетилазе (HDAC).

У высших эукариот HDAC могут быть подразделены на классы I, II и III [11]. Класс II HDAC связывается с фактором транскрипции MEF2 и другими факторами, поддерживающими нормальный размер и функцию сердца. Сигналы напряжения ведут к фосфорилированию класса II HDAC и последующей активации генов, вовлеченных в рост сердечной ткани. Стратегии нормализации экспрессии гена при сердечных заболеваниях, регулируя функцию HDAC, представляют потенциально мощные терапевтические подходы [10]. К сожалению, до сих пор неизвестно значение участия многочисленных HDAC в едином регулирующем комплексе.

Таким образом, эпигенетические маркеры (в частности, модифицированные гистоны) являются показателями активации или блокировки (т. н. сайленсинга) экспрессии генов.

2. Цитоморфологический подход

Показателем интенсивности синтетических процессов в целом ядре является степень конденсации хроматина. Хроматин в интерфазных ядрах дифференцированных клеток может находиться в двух состояниях: конденсированном, неактивном или разрыхленном (диффузном), содержащем активные гены. Соотношение форм хроматина в ядре отражает его функциональную нагрузку [2].

При исследовании перестроек хроматина часто применяется компьютерная морфометрия изображений ядер. В совокупности с математической обработкой архивов изображений это позволяет осуществить переход от традиционного описания к строгой математической характеристике [12].

Анализ структуры хроматина в ядре клетки предполагает не только оценку его состояния в некоторый выбранный период времени при некоторых условиях, но и изучение динамики функциональных перестроек. Существует несколько подходов к такому анализу. Одним из них является метод компьютерной морфоденситометрии (КМДМ), разработанный в Институте физико-химической медицины для комплексного морфологического анализа структуры хроматина. С помощью этого метода были обнаружены сходные изменения в структурной организации хроматина интерфазного ядра при исследовании результатов действия генных индукторов (фенобарбитала и 3-метилхолантрена) на гепатоциты, несмотря на то, что эти генные индукторы обладают различным действием, вызывая синтез неидентичных спектров белков [13].

Ведущими процессами в индуцированных клетках являлись диспергирование, гомогенизация хроматина и изменение топографии ядра. Поскольку структурные показатели тесно коррелировали с содержанием РНК и ДНК, это дало основание предположить существование общего принципа структурных перестроек хроматина на раннем этапе индукции (15-30 мин.), не зависящего от типа индуктора, также как их общее регуляторное значение [13].

При исследовании действия на опухолевые клетки препарата хлорамбуцила было обнаружено, что хлорамбуцил затрагивает не только синтез ДНК, но и других ядерных элементов белковой природы, особенно гистонов. При исследовании структурных перестроек хроматина фиксированных клеток в ответ на действие хлорамбуцила, используя низкие дозы и синхронизированные популяции НEr-2 раковых клеток в S и G2 фазах цикла, на уровне световой и электронной микроскопии использовались методы синхронного анализа изображений. Было обнаружено, что хлорамбуцил затрагивает организацию хроматина, а также другие клеточные параметры, ведя к уменьшению агрессивности опухоли [14].

Мы также имеем опыт использования КМДМ в изучении структуры хроматина лимфоцитов и нейтрофилов периферической крови. Установлено, что воздействие неблагоприятных экологических факторов физической (ионизирующая радиация) и химической (промышленное загрязнение) природы приводит к существенным изменениям структурно-функционального состояния иммунокомпетентных клеток крови (ИКК), которые также имеют свои особенности в зависимости от характера воздействия.

У больных атеросклерозом в гетерохроматиновых областях ядер лимфоцитов обнаружено снижение дисперсности гетерохроматина, снижение суммарной площади и периметра перигранулярной зоны, увеличение ее изрезанности. У жителей территорий, подвергшихся длительному низкоуровневому радиационному воздействию, обнаружен феномен активации хроматина лимфоцитов, свидетельствующий о нарастании их транскрипционной активности.

Эксперименты *in vitro* с инкубацией цельной крови больных атеросклерозом с тромбоцитарным и трансформирующим факторами роста позволили выявить

измененный функциональный статус ИКК, проявляющийся в модификации структурно-функциональных характеристик лимфоцитов. Обнаружены также достоверные изменения в характере ответа лимфоцитов на тепловой стресс. Этот феномен представляет интерес потому, что белки теплового шока (БТШ) принимают участие в восстановлении повреждений, препятствующих нормальной конденсации хромосом, и в связи с тем, что повышенный синтез БТШ является необходимым условием реакции организма на стресс и служит защитным фактором, помогающим клетке выжить.

Значительный вклад в развитие представлений о регуляции генов внесли цитогенетические исследования интерфазных хромосом. Иммуноцитогенетический и молекулярно-цитогенетический методы являются мощными инструментами детального изучения структуры ядра, а также соотношения ковалентных модификаций хроматина, биохимических процессов транскрипции и репликации с субструктурами хромосом на уровне световой микроскопии.

Показано, что ковалентные модификации в цитозиновых остатках ДНК и концевые модификации гистонов (гистоновый код) являются признаками, устанавливающими функциональное состояние областей хроматина. Изменение в ядерной архитектуре позволило выявить те цитологические характеристики, которые отражают структурно-функциональные характеристики генома. К ним относят как количественные, так и качественные параметры [15]: размер и форма ядра, относительное содержание и распределение гетерохроматина в ядре, глобальный паттерн модификации хроматина (метилование ДНК и концевые модификации гистонов), присутствие ядерных компартментов (число и форма ядрышек, хромоцентров, территории хромосом, ядерные тельца), организация хромосом (положение и ориентация хромосом и местные различия в уплотнении хроматина).

Известно, что хромосомы занимают ядерные территории, которые изменяются по форме и положению [15]. Метод гибридизации с флюоресцентной меткой *in situ* (FISH) вместе с цитометрией высокого разрешения позволил установить топографические особенности хроматина, в том числе особенности расположения отдельных генов при различных воздействиях. Это продемонстрировано, например, при экспериментальном стимулировании к дифференцировке в гранулоциты лейкемических клеток линий HL-60 и U-937 [16].

Определяемые структурные параметры, по сути, отражают так называемый процесс ремоделирования хроматина. Однако точные параметры этого процесса определить довольно трудно, поскольку существует ряд ограничений, связанных с фиксацией препарата, и даже максимально щадящие режимы пробоподготовки могут вносить артефакты. К тому же морфологический метод основан на оценке статических моментов, соответствующих отдельным срокам исследования и взятию материала [12]. Поэтому для точной качественной и количественной характеристики наблюдаемых изменений хроматина клетки при действии некоторого фактора требуется сопоставление структурных параметров с локализацией и поведением определенных генов, активация которых происходит в ответ на данное воздействие. Это решается, например, введением флуоресцентных белков в живой организм. Показано, что присоединение флуоресцирующего зеленого белка (GFP) к белкам хроматина позволяет контролировать хроматин в живых клетках млекопитающих. Аналогично, комплекс YFP::H2B, который содержит желтый флуоресцентный белок, присоединенный к гистону H2B, был применен для исследования ядерного деления в живой ткани эндосперма *Arabidopsis* с помощью трехмерной конфокальной микроскопии.

Сочетание флуоресцентных технологий белка с визуализацией живой клетки позволяет контролировать динамику подобластей хроматина в режиме реального времени. Возможность определять количество флуоресценции во времени и пространстве и служит для измерения динамических свойств многочисленных белков хроматина. В сочетании с компьютерным моделированием, это позволит устанавливать кинетическую структуру взаимодействий между молекулярными компонентами эпигенетики и механизмами регулирования генов [15].

Заключение

Очевидно, что благодаря внедрению в биологию и медицину современных методов экспериментальных исследований изучение механизмов функционирования организма человека в настоящее время перешло на клеточный и субклеточный уровни. При этом реализованы различные подходы, которые позволяют оценить даже самые незначительные нарушения гомеостаза. Анализ существующих методов и результатов экспериментальных исследований в области изучения структуры хроматина в ответ на действие факторов различной природы позволяет сделать вывод, что современные подходы и методики отражают научные предпочтения тех или иных научных школ, либо ставят своей целью объективизировать ту или иную патологию.

Предлагаемая нами методология исследования позволяет интегрировать даже в рамках одного исследования как морфологические, так и молекулярно-биологические методы. Такой синтетический подход, на наш взгляд, сочетает в себе достоинства каждого подхода и позволяет выявлять более тонкие механизмы функционирования клеточного ядра.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Чуриков, Н.А.** Молекулярные механизмы эпигенетики / Н.А. Чуриков // Биохимия. – 2005. – Том 70. – Вып. 4. – С. 493-513.
2. **Ченцов, Ю.С.** Введение в клеточную биологию / Ю.С. Ченцов. – М.: ИКЦ "Академия", 2004. – 495 с.
3. **Alison, M.** Cancer [Electronic resource] – 2001. – Mode of access: www.els.net. – Date of access: 14.12.2006.
4. **Shukla S.D.** [et al]. Epigenetic effects of ethanol on liver and gastrointestinal injury [Electronic resource]. – 2006. – Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?DB=pubmed>. – Date of access: 03.02.2007.
5. **Pogribny I.P.** [et al]. Methyl deficiency, alterations in global histone modifications, and carcinogenesis [Electronic resource]. – 2007. – Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?DB=pubmed>. – Date of access: 03.02.2007.
6. **Chen H.** [et al]. Hypoxic stress induces dimethylated histone H3 lysine 9 through histone methyltransferase G9a in mammalian cells [Electronic resource]. – 2006. – Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?DB=pubmed>. – Date of access: 03.02.2007.
7. **Tanaka T.** [et al]. Constitutive histone H2AX phosphorylation and ATM activation, the reporters of DNA damage by endogenous oxidants [Electronic resource]. – 2006. – Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?DB=pubmed>. – Date of access: 03.02.2007.
8. **Kruhlak M.J.** [et al]. Changes in chromatin structure and mobility in living cells at sites of DNA double-strand breaks [Electronic resource]. – 2006. – Mode of access: <http://www.jcb.org/cgi/doi/10.1083/jcb.200510015>. – Date of access: 23.12.2006.
9. **Tanaka T.** [et al]. Phosphorylation of Histone H2AX on Ser 139 and Activation of ATM During Oxidative Burst in Phorbol Ester-Treated Human Leukocytes [Electronic resource]. – 2006. – Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?DB=pubmed>. – Date of access: 23.12.2006.

10. **Olson E.N.** [et al]. Control of cardiac hypertrophy and heart failure by histone acetylation/deacetylation [Electronic resource]. – 2006. – Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?DB=pubmed>. – Date of access: 23.12.2006.
11. **Khochbin S.** [et al]. Histone deacetylase complexes: functional entities or molecular reservoirs [Electronic resource]. – 2001. – Mode of access: <http://www.sciencedirect.com>. – Date of access: 23.12.2006.
12. **Автандилов, Т.Г.** Медицинская морфометрия. Руководство / Т.Г. Автандилов. – М.: Медицина, 1990. – 384 с.: ил.
13. **Жукоцкий, А.В.** Микрофотометрический анализ интерфазных ядер гепатоцитов в норме и при функциональных нагрузках: автореф. ... дис. канд. мед. наук: 14.00.23 – 03.00.02 / А.В. Жукоцкий; 2-й Моск. гос. мед. инст. – М, 1984. – 32 с.
14. **Zotos A.** [et al]. A morphological study of the effect of chlorambucil during the S and G2 phases of the cell cycle of synchronized HEP-2 cancer cell populations using computerized morphometry [Electronic resource]. – 2001. – Mode of access: <http://www.sciencedirect.com>. – Date of access: 23.12.2006.
15. **Tessadori F.** [et al]. Cytogenetics as a tool to study gene regulation [Electronic resource]. – 2001. – Mode of access: <http://www.sciencedirect.com>. – Date of access: 14.12.2006.
16. **Bartova E.** [et al]. Nuclear topography of the c-myc gene in human leukemic cells [Electronic resource]. – 2001. – Mode of access: <http://www.sciencedirect.com>. – Date of access: 14.12.2006.

Поступила в редакцию 22.03.2007 г.