

## ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЙ ТРАНСПОРТ В ООЦИТАХ МЫШИ ПРИ СЛИЯНИИ ФЕМТОСЕКУНДНЫМИ ЛАЗЕРНЫМИ ИМПУЛЬСАМИ

Шахов А.М., Осыченко А.А., Астафьев А.А., Серобян Г.А., Надточенко В.А.

Институт химической физики им. Н.Н. Семенова (ИХФ РАН)  
ул. Косыгина, 4, г. Москва, 119991, РФ; e-mail: physics2007@yandex.ru  
Поступила в редакцию: 01.07.2018.

**Аннотация.** В работе представлены результаты по отслеживанию внутриклеточного транспорта в клетках млекопитающих во время искусственного слияния. В качестве модельного объекта были использованы ооциты мыши, которые подвергались процедуре лазерного слияния. Воздействие фемтосекундными лазерными импульсами в месте контакта двух ооцитов приводило к перфорации и объединению мембран и медленному изменению формы слитого ооцита с эллипсоидной на сферическую. В результате слияния происходил сложный процесс перемешивания цитоплазмы исходных ооцитов, задействующий механизмы внутриклеточного транспорта и активной диффузии. Для визуализации данных механизмов были применены методы флуоресцентной микроскопии основанные на GFP и BODIPY. Установлено, что мелкие частицы в цитозоле ооцитов перемешиваются преимущественно диффузионно, в то время как органеллы и цитоскелет, не способные к диффузионному транспорту, не перемешиваются после окончания слияния в течении нескольких часов.

**Ключевые слова:** ооциты мыши, лазерное слияние клеток, фемтосекундные лазеры, GFP, BODIPY.

### ВВЕДЕНИЕ

Искусственное слияние клеток является широко применяемым подходом к изучению живых клеток, и позволяет получать уникальные знания о внутриклеточных процессах и клеточном цикле. Метод слияния клеток важен для фундаментальных исследований и биотехнологий в целом, он позволяет осуществлять как перенос генов, так и генетическую терапию, а также создание гибридных клеточных линий и репрограммирование клеток, производить клонирование и тетраплоидизацию [1].

На данный момент доступно множество методик искусственного слияния, которые включают в себя лазерное слияние [2-4], электрослияние [5, 6], применение осмотических агентов [7] и вирусов [8]. Среди других методов лазерное слияние клеток с использованием фемтосекундных световых импульсов с длиной волны, лежащей в ближнем инфракрасном диапазоне и попадающей в так называемое окно прозрачности ткани (700-1000 нм) [9], является минимально инвазивным и прецизионным методом [10]. Фемтосекундные лазерные импульсы локально воздействуют в месте контакта двух сливаемых клеток. Сверхмалая длительность и высокая пиковая интенсивность таких лазерных импульсов вызывает многофотонное поглощение в заданной области, за счет чего с субдифракционным разрешением [11] происходит перфорация липидного бислоя клеток и их объединение. За слиянием цитоплазматической мембраны непосредственно активируется процесс объединения цитоплазмы сливаемых клеток.

Все клетки эукариот включают в себя ядро с генетической информацией и цитоплазму, состоящую из органелл, различных везикул с веществами, цитоскелета и цитозоля. Известно, что транспорт крупных частиц внутри клетки (*i.a.* белков) происходит в везикулах, к которым крепятся специальные моторные белки двигающие контейнеры с липидной мембраной по микротрубочкам и актиновым филаментам в клетке [12]. Однако, более мелкие частицы, включающие в себя питательные вещества и некоторые белковые комплексы, могут передвигаться внутри клетки диффузионно или за счет так называемой активной внутриклеточной диффузии [13]. Одной из таких частиц, которая транспортируется во все части живых клеток, является зеленый флуоресцентный белок – GFP, повсеместно используемый во флуоресцентной микроскопии [14]. В то же время распределение везикул с ферментами, кофакторами и некоторыми белками с большим содержанием тиолов [15] внутри клетки легко детектируется с помощью специфичного на тиолы красителя BODIPY. В результате различные механизмы внутриклеточного транспорта, которые происходят после начала слияния клеток, можно визуализировать с помощью GFP и BODIPY красителей.

Таким образом, в данной работе исследуются процессы транспорта вещества и органелл внутри сливаемых клеток при лазерном слиянии ооцитов мыши. Для слияния используются фемтосекундные лазерные импульсы, а для визуализации внутриклеточного транспорта используются GFP и подкрашенные BODIPY ооциты мыши на стадии МП. Экспериментальные данные по флуоресценции красителей показывают, что GFP, отображающий преимущественно распределение мелких частиц внутри ооцита, перераспределяется с большой скоростью между двумя сливающимися ооцитами по диффузионному механизму. С другой стороны, подкрашенные BODIPY части цитоплазмы, отображающие распределение органелл, везикул и крупных частиц цитоплазмы, привязанных к цитоскелету, практически не перераспределяются после слияния, демонстрируя неравномерность флуоресценции даже после нескольких часов от момента слияния ооцитов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовалась линия мышей C57BL/6 (без GFP), а также линия трансгенных GFP мышей C57BL/6-Tgn(АСТbEGFP)10sbJ в возрасте 6-8 недель. Мыши стимулировались для суперовуляции стандартным методом внутривенной инъекции 10 МЕ фолликулостимулирующего гормона с последующей инъекцией 10 МЕ хорионического гонадотропина через 48 часов после первой.

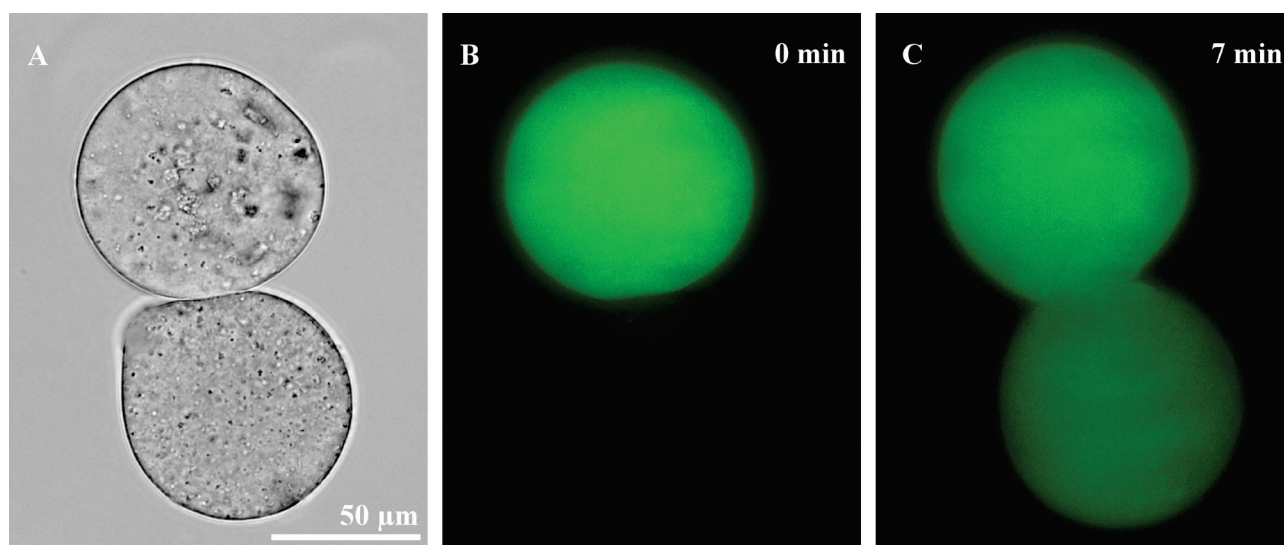
Для проведения процедуры лазерного слияния ооциты мыши очищали от блестящей оболочки и попарно склеивали в отдельной лунке в течение 15 минут с помощью лектина (L8902, Sigma), где в каждой паре был GFP-положительный и GFP-отрицательный ооцит. В случае подкраски BODIPY 493/503 склеивался один окрашенный и один неокрашенный ооцит линии C57BL/6. При этом для подкраски BODIPY (B2103, Invitrogen) ооциты предварительно помещались в краситель (3 мкг/мл) на 15 минут.

Возбуждение флуоресценции производилось на длине волны 462 нм с помощью лазерного диода (Nichia NDB7675), излучение которого заводилось в боковой порт инвертированного микроскопа Olympus IX71 и фокусировалось объективом 40x, 0,75 NA на образец. Образец представлял собой 35 мм пластиковую чашу петри с покровным стеклом в центре, на котором в капле PBS под маслом находились попарно склеенные ооциты. Изображения в видимом свете и флуоресценция регистрировались с помощью ПЗС камеры Ximea xiD MD061CU-SY.

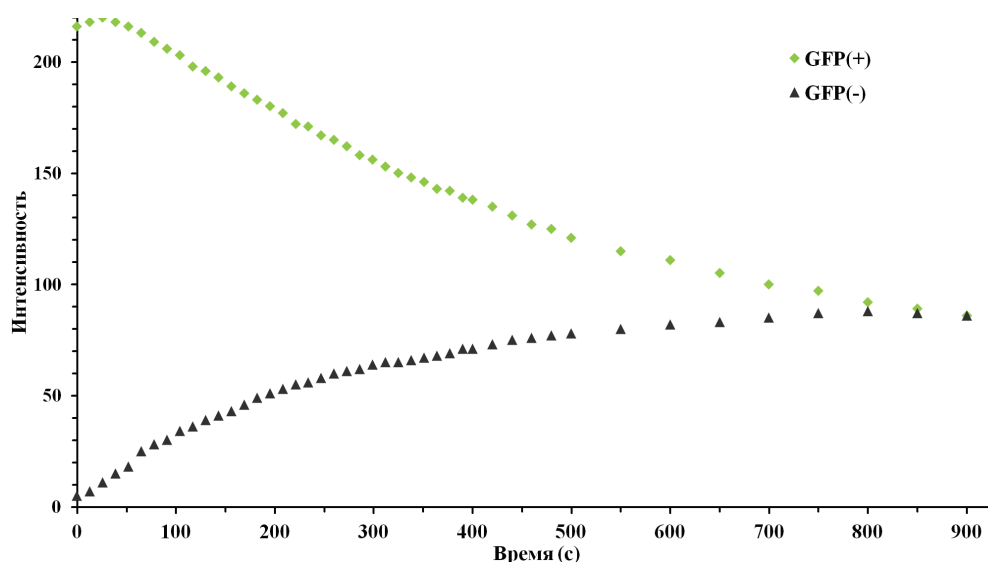
Для лазерного слияния ооцитов использовались цуги лазерных импульсов из Ti:Sapphire осциллятора (Tsunami, Spectra-Physics) на длине волны 790 нм, имеющие длительность 30 фс и частоту повторения 80 МГц. Длительность цуга регулировалась с помощью механического затвора и составляла 15 мс ( $\sim 10^6$  импульсов в цуге), при этом энергия в лазерном импульсе точно подстраивалась с помощью поляризационного аттенуатора и составляла 1,5 нДж. Далее лазерное излучение заводилось в микроскоп и фокусировалось объективом (40x, 0,75 NA) в ооцит. Место попадания лазера в контакт мембран ооцитов точно подстраивалось с помощью 3-координатной пьезоплатформы.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для изучения перераспределения мелких частиц в цитоплазме во время лазерного слияния была разработана модельная система, которая включала GFP-положительный (+) и GFP-отрицательный (-) ооциты на стадии МП, очищенные от блестящей оболочки и приклеенные друг к другу лектином. Цуг фемтосекундных импульсов попадал точно в место контакта двух ооцитов, после чего происходила локальная перфорация мембраны обоих ооцитов, и возникал расширяющийся канал, через который было возможно перетекание цитоплазмы. В первом случае канал со временем расширялся, а центры исходных ооцитов сближались, что приводило к образованию сначала объединенного ооцита эллипсоидной формы, и, далее, ооцита сферической формы. Во втором случае происходила перфорация мембраны, которая не приводила к слиянию ооцитов и изменению их формы, однако позволяла веществу перетекать. В обоих случаях на временном масштабе в несколько минут происходило перераспределение флуоресцентного белка GFP между GFP(+) и GFP(-) ооцитами. На рисунке 1 представлены изображения ооцитов при слиянии и видно, что перетекание GFP происходит за достаточно малое время. Интенсивности свечения ооцитов уравнивались в обоих случаях за время порядка 5-10 мин, при этом время было тем меньше чем быстрее потом сливались исходные ооциты. Максимальное время наблюдалось при частичной



**Рисунок 1.** Перераспределение материала, подкрашенного с помощью GFP, во время лазерного слияния. А – в изображение исходных ооцитов, GFP(+) – верхний, а GFP(-) – нижний ооцит. В – флуоресценция ооцитов до слияния, зеленым светом светится только GFP(+) ооцит. С – свечение ооцитов через 7 минут после слияния



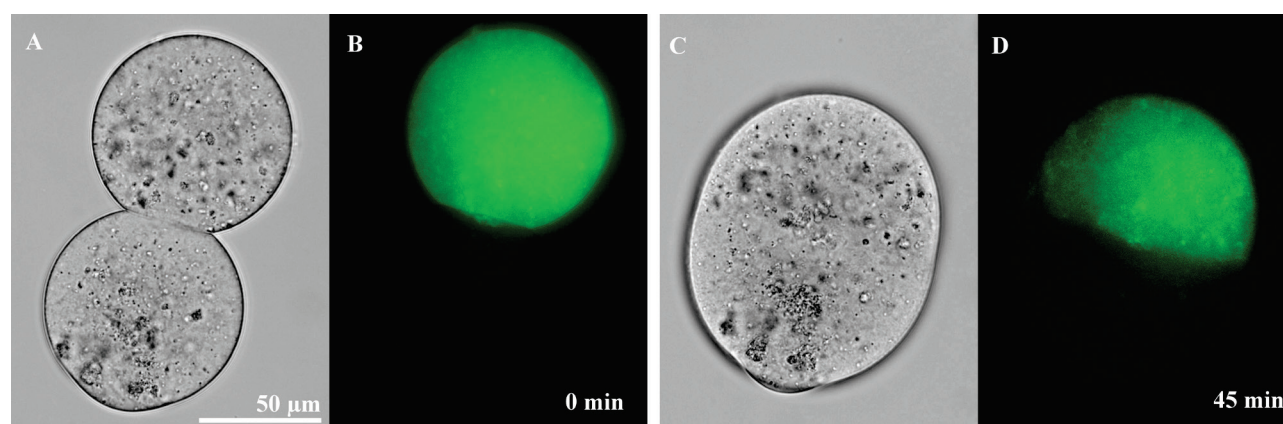
**Рисунок 2.** График изменения интенсивности флуоресценции GFP(+) и GFP(-) ооцитов после перфорации цитоплазматической мембраны и начала внутриклеточного транспорта GFP

перфорации мембраны, когда исходные ооциты не сливались, но происходил обмен компонентами цитозоля. Окончательное слияние в первой группе, как правило, происходило за 1 ч.

На рисунке 2 приведен график изменения интенсивности свечения GFP(+) и GFP(-) ооцитов после перфорации мембраны. Видно, что нарастание флуоресценции в GFP(-) ооците происходит сразу после перфорации мембраны и постепенно замедляется, с другой стороны свечение GFP(+) ооцита спадает достаточно быстро, что вызвано не только перетеканием цитозоля, но и выцветанием GFP. Из полученных данных о скорости перераспределения GFP можно сделать вывод, что при перфорации мембраны начинается интенсивный обмен мелкими частицами в цитозоле ооцитов, который идет по диффузионному механизму.

Другая часть работы включала эксперименты с модельной системой, состоящей из двух склеенных лектином ооцитов GFP(-) (то есть без GFP гена), один из которых предварительно подкрашивался с помощью специфичного на тиолы красителя BODIPY 493/503. Использование этого красителя позволяло детектировать различные белки, ферменты и кофакторы преимущественно находящиеся в активном состоянии и встроенные в крупные органеллы ооцита. Таким образом, подкраска BODIPY фактически позволяла отслеживать передвижение крупных частиц, прикрепленных к цитоскелету, между слитыми клетками. Краситель BODIPY 493/503 был выбран благодаря его малому стоксовому сдвигу, высокому квантовому выходу, низкому выцветанию и яркой флуоресценции в зеленой области спектра.

При лазерном слиянии ооцитов так же было два случая: в первом происходила перфорация мембраны и, далее, происходило полное слияние исходных ооцитов, а во втором происходила только перфорация мембраны без объединения пары клеток в одну. В обоих случаях, в отличие от эксперимента с GFP ооцитами, наблюдалось отсутствие обмена подкрашенным веществом между клетками. Как видно из рисунка 3 даже при полном слиянии двух ооцитов не наблюдалось перемешивания цитоплазмы подкрашенного и не подкрашенного ооцита – на



**Рисунок 3.** Перераспределение материала, подкрашенного с помощью BODIPY, во время лазерного слияния. А – в изображение исходных ооцитов: только верхний ооцит подкрашен BODIPY; В – флуоресценция ооцитов до слияния, зеленым светом светится только окрашенный BODIPY ооцит; С – форма слитого ооцита через 1 ч после перфорации цитоплазматической мембраны фемтосекундным лазером; D – флуоресценция слитого ооцита, отображающая распределение органелл и везикул через 45 мин после слияния

флуоресцентном изображении регистрировалась светящаяся полусфера (рис. 3D). Из полученных данных по распределению флуоресценции тиолов после лазерного слияния можно сделать вывод, что органеллы и везикулы, которые двигаются за счет специальных моторных белков, и цитоскелет ооцитов не подвержен перемешиванию при слиянии.

Таким образом, эксперимент с GFP(+) и GFP(-) ооцитами показал, что при лазерном слиянии происходит перемешивание мелких частиц в цитоплазме и цитозоля между ооцитами, причем на временах соответствующих скорости диффузионного транспорта. С другой стороны белки, ферменты и кофакторы, задействованные в электрон-транспортных цепях и окислительном фосфорилировании и связанные с крупными органеллами клетки не перераспределяются даже за времена в несколько часов, что говорит об устойчивости цитоскелета клеток после слияния и отсутствии транспорта органелл.

В итоге установлено, что при слиянии ооцитов цитоскелет исходных клеток практически не претерпевает изменений и происходит только диффузионный обмен мелкими частицами в цитоплазме ооцитов.

*Работа частично выполнена за счет субсидии, выделенной ИХФ РАН на выполнение государственного задания, тема 0082-2018-0005 (код АААА-А18-118020690203-8) в части лазерного слияния клеток, с использованием оборудования ЦКП ИХФ РАН № 506694. Работа по исследованию внутриклеточного транспорта с помощью GFP белков выполнена за счет гранта РФФИ 17-00-00403, а работа с использованием красителя BODIPY поддержана за счет средств гранта РФФИ 16-53-52046.*

#### **Список литературы / References:**

1. Alvarez-Dolado M. Cell Fusion: Biological Perspectives and Potential for Regenerative Medicine. *Frontiers in Bioscience*, 2007, vol. 1, no. 12, pp. 1-12.
2. Karmenyan A.V., Shakhbazyan A.K., Sviridova-Chailakhyan T.A., Krivokharchenko A.S., Chiou A.E., Chailakhyan L.M. Use of Picosecond Infrared Laser for Micromanipulation of Early Mammalian Embryos. *Molecular Reproduction and Development*, 2009, vol. 75, pp. 975-983.
3. Krivokharchenko A.K., Sarkisov O.M., Bader M., Chiou A., Shakhbazyan A. Laser Fusion of Mouse Embryonic Cells and Intra-Embryonic Fusion of Blastomeres without Affecting the Embryo Integrity. *PLoS One*, 2012, vol. 7, no. 12, p. e50029.
4. Kuetemeyer K., Rezgui R., Lubatschowski H., Heisterkamp A. Mechanisms of Femtosecond Laser Cell Surgery in the Low-Density Plasma Regime. *Optical Interactions with Tissue and Cells Xxii*, 2011, vol. 7897.
5. Popova E., Krivokharchenko A. Effects of Electric Field on Early Preimplantation Development in Vitro in Mice and Rats. *Human Reproduction*, 2011, vol. 26, no. 3, pp. 662-670.
6. Rems L., Ušaj M., Kanduđer M., Reberšek M., Miklavčič D., Pucihar G. Cell Electrofusion Using Nanosecond Electric Pulses. *Scientific Reports*, 2013, vol. 3, p. 3382.
7. Pontecorvo G., Hales A. Time and Mode of Fusion of Human Fibroblasts Treated with Polyethylene Glycol (Peg) *Nature*, 1997, vol. 265, pp. 257-258.
8. Gottesman A., Milazzo J., Lazebnik Y. V-Fusion: A Convenient, Nontoxic Method for Cell Fusion. *Biotechniques*, 2010, vol. 49, no. 4, pp. 747-750.
9. Smith A.M., Mancini M.C., Nie S. Bioimaging: Second Window for in Vivo Imaging. *Nat Nano*, 2009, vol. 4, no. 11, pp. 710-711.
10. Osychenko A.A., Tochilo U.A., Astafiev A.A., Zalessky A.D., Shakhov A.M., Krivokharchenko A.S., Nadtochenko V.A. Determining the Range of Noninvasive near-Infrared Femtosecond Laser Pulses for Mammalian Oocyte Nanosurgery. *Sovremennye tehnologii v medicine*, 2017, vol. 9, no. 1, pp. 21-27.
11. Astaf'ev A.A., Zalesskii A.D., Shakhov A.M., Osychenko A.A., Nadtochenko V.A. Formation of Light-Absorbing Centers Induced in Cytoplasm of Mouse Embryos by Femtosecond Pulsed near-Infrared Radiation. *High Energy Chemistry*, 2016, vol. 50, no. 5, pp. 421-423.
12. Hirokawa N., Noda Y., Tanaka Y., Niwa S. Kinesin Superfamily Motor Proteins and Intracellular Transport. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2009, vol. 10, p. 682.
13. Brangwynne C.P., Koenderink G.H., MacKintosh F.C., Weitz D.A. Intracellular Transport by Active Diffusion. *Trends in Cell Biology*, 2009, vol. 19, no. 9, pp. 423-427.
14. Visser A.J.W.G., Westphal A.H., Skakun V.V., Borst J.W. Gfp as Potential Cellular Viscosimeter. *Methods and Applications in Fluorescence*, 2016, vol. 4, no. 3, p. 035002.
15. Brandes N., Schmitt S., Jakob U. Thiol-Based Redox Switches in Eukaryotic Proteins. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2009, vol. 11, no. 5, pp. 997-1014.

## INTRACELLULAR TRANSPORT IN MOUSE OOCYTES DURING FEMTOSECOND LASER CELL FUSION

Shakhov A.M., Osychenko A.A., Astafiev A.A., Serobyay G.A., Nadtochenko V.A.

Semenov Institute of Chemical Physics (ICP RAS)

*Kosygina st., 4, Moscow, 119991, Russia; e-mail: physics2007@yandex.ru*

**Abstract.** Here we demonstrate intracellular transport in fused mammalian cells. Mouse oocytes as a model system were subjected to the laser cell fusion. The contact point of the two oocytes cytoplasmic membranes was exposed to femtosecond laser pulses, which produce the membrane perforation and fusion and a slow change in the shape of the fused oocyte from ellipsoidal to spherical. A complex process of original oocytes cytoplasm mixing took place as a result of the fusion, involving mechanisms of intracellular transport and active diffusion. Fluorescence microscopy methods based on GFP and BODIPY staining were applied to visualize these mechanisms. We revealed that the small particles in cytosol of the oocytes are mixed almost diffusively, while the organelles and cytoskeleton, that are incapable of diffusion, are not mixed even within several hours after the very end of the oocyte fusion.

**Key words:** *mouse oocytes, laser cell fusion, femtosecond laser, GFP, BODIPY.*