

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЯЗКОУПРУГИХ СВОЙСТВ НУКЛЕОПЛАЗМЫ ООЦИТОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ С ПРИМЕНЕНИЕМ ОПТИЧЕСКОГО ЗАХВАТА

Сырчина М.С., Залесский А.Д., Осыченко А.А., Астафьев А.А., Айбуш А.В.,
Надточенко В.Н.

Институт химической физики им. Н.Н. Семенова (ИХФ РАН)
ул. Косыгина, 4, г. Москва, 119991, РФ; e-mail: wrongclue@gmail.com
Поступила в редакцию: 02.07.2018.

Аннотация. В настоящем исследовании демонстрируется новый малоинвазивный метод изучения вязкоупругих свойств надмолекулярных комплексов клетки (хроматина, ядрышка) с применением оптического лазерного захвата. В качестве объекта исследования были выбраны ооциты мыши, в связи с тем, что их биохимия и внутриклеточная организация хорошо изучена, а ядро и ядрышко имеют крупные размеры (10 мкм). Ядрышко используется в качестве «живого» микрозонда, а с помощью оптического захвата вызываем возмущение в системе ядрышко-хроматин. Полученные времена релаксации ядрышка при его смещении оптическим пинцетом в разных направлениях указывают на анизотропные свойства нуклеоплазмы. Кроме того, использование оптического захвата на живых системах позволяет визуализировать взаимодействие ядерных и цитоплазматических структур, не прибегая к цитохимическим методам.

Ключевые слова: оптический захват, ооцит мыши, микрореология, мягкие материалы, ядрышко, биополимеры.

ВВЕДЕНИЕ

Механические процессы, протекающие в клетках, наряду с молекулярными превращениями, играют колоссальную роль в реализации основных биологических процессов: эмбриогенезе, пролиферации, клеточной дифференцировке, генной экспрессии, адгезии, канцерогенезе [1-4]. На сегодняшний день широко распространены методы исследования клеточной механики в качестве маркера состояния отдельных живых клеток и потенциальных патологических процессов, протекающих в них. К ним относятся: атомно-силовая микроскопия, применение микропипеток, микроканалов, магнитной сепарации клеток. Основными преимуществами данных методов является возможность работы с живыми клетками и минимизации эффектов, связанных с химической модификацией клеточных структур, которые могут возникать, например, при работе с флуоресцентными красителями, флуоресцентными белками и т. д. Однако, существенным ограничением данных методов является их инвазивность. В ходе работы с биологическим материалом могут возникнуть механические повреждения клетки (перфорации при внедрении в клетку микросфер или повреждение поверхности клетки АФМ-зондом) [5-8].

Одной из наиболее прецизионных и малоинвазивных техник является метод оптических лазерных ловушек (оптический пинцет), позволяющий захватывать и манипулировать не только отдельными клетками, но и клеточными структурами – изолированными биополимерами, надмолекулярными комплексами и органеллами. При помощи оптического пинцета можно воздействовать на объекты размером от 0,01 до 10 мкм, а также прикладывать к объекту силу от одного до нескольких сотен пиконьютонов.

Оптический пинцет активно применяется в различных методиках, связанных с исследованием вязкоупругих свойств нуклеиновых кислот. Накопление знаний о микромеханических характеристиках ДНК/РНК – белковых комплексов чрезвычайно важно для более детального понимания механизмов реализации информации внутри клетки. Традиционно в подобных экспериментах осуществляют выделение изолированных молекул нуклеиновых кислот. В результате экспериментальная система значительно упрощается и получаемые результаты могут существенно отличаться от реальных процессов и эффектов, возникающих в клетке *in vivo* [9-12].

В ходе созревания ооциты претерпевают структурные и биохимические превращения. Рост ооцита и переход к первому мейотическому делению сопряжены с реорганизацией хроматина. Материал ядра подвергается модификациям – хроматин становится более компактным и транскрипционно неактивным, окружает плотным кольцом ядрышко. В связи с этим выделяют три основных конфигурации ядер ооцитов: NSN – «non-surrounded nucleolus» – хроматин диффузно располагается в карิโอплазме, SN – «surrounded nucleolus» – хроматин кольцом окружает ядрышко, pSN – «partly surrounded nucleolus» – хроматин частично окружает ядрышко (рис. 1). Все три состояния различаются по уровню транскрипционной активности ядра и, как следствие, по потенциалу к успешному завершению мейоза и оплодотворению [13, 14].

Понимание механизмов взаимодействия компонентов ядра ооцитов может быть существенным для оценки потенциала ооцита к завершению мейоза, оплодотворению и дальнейшему успешному развитию.

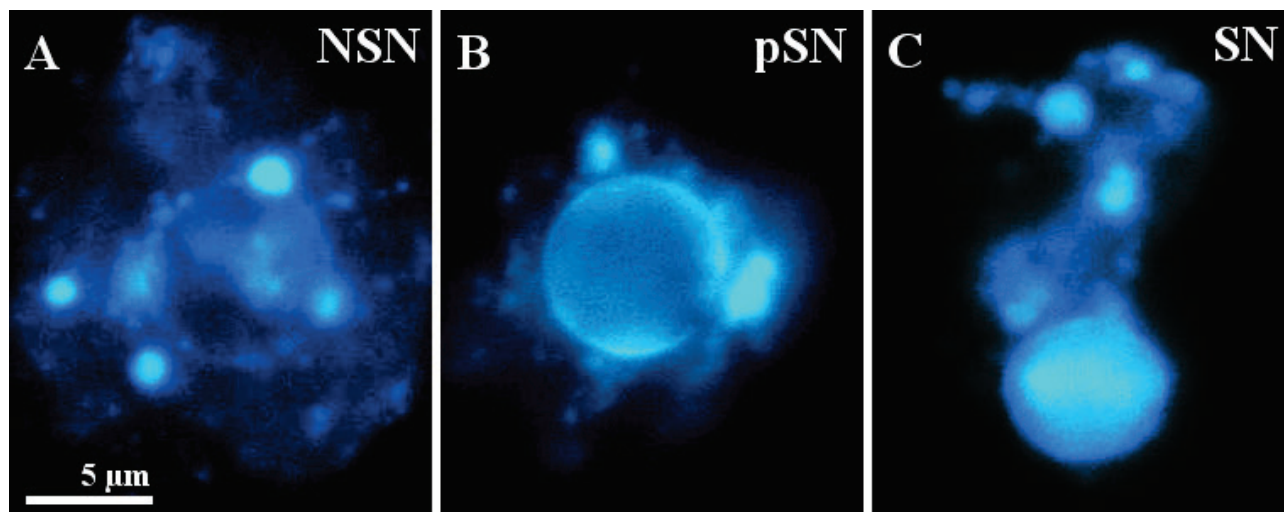


Рисунок 1. Основные типы конфигурации хроматина в ядре; А - хроматин диффузно располагается в кариоплазме; В - хроматин частично окружает ядрышко; С- хроматин кольцом окружает ядрышко. Ядрышко на изображении представлено светящимся кругом

В текущем исследовании мы воздействуем на систему ядрышко-хроматин, интегрированную в термодинамически неравновесную систему клетки – ооцита мыши, таким образом ДНК-белковый комплекс испытывает на себе действие ещё и со стороны цитоплазматических структур, в частности цитоскелета. Мы предлагаем новый метод, основанный на применении оптического захвата, для изучения взаимодействия ядрышка и хроматина в живых ооцитах мыши. Анализ динамики движения ядрышка внутри нуклеоплазмы позволит оценить вязкоупругие свойства хроматина и обнаружить особенности его взаимодействия с ядрышком.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы мыши возрастом 6-9 недель линии C57BL/СВА. Мышам внутрибрюшинно инъецировали 7,5 МЕ фолликулостимулирующий гормон ГСЖК (гонадотропин сыворотки жеребой кобылы). Через 48 часов ооциты извлекались из яичников путём пункции фолликулов в среде М2, очищались от кумулюсных клеток при помощи гиалуронидазы. Для выявления структуры хроматина был использован краситель Hoechst 33342, окрашивание производилось в течение 15 минут, концентрация красителя 1 мг/мл. Далее ооциты по одному переносили в каплю среды М2 объемом 30 мкл на покровное стекло. Работа осуществлялась на нагревательном столике, температура 37 °С.

Оптический захват ЯПТ осуществляли непрерывным излучением из титан-сапфирового лазера на длине волны 790 нм. Излучение лазера заводилось в микроскоп и далее фокусировалось в ооцит объективом 60x0,7 NA. Мощность излучения в фокусе объектива составляла 280 мВт, что примерно соответствовало максимальной силе в 10 пн прикладываемой к ядрышку, которая была измерена в микрофлюидной системе. Смещение ЯПТ с помощью оптического захвата и его релаксация после выключения захвата записывались на видео с помощью высокоскоростной камеры. Смещения ЯПТ производились последовательно в разных направлениях с интервалом в несколько десятков секунд, что позволяло системе полностью релаксировать. Сразу после окончания экспериментов со смещением ЯПТ регистрировали конфигурацию конденсации хроматина в ядре с помощью флуоресцентной микроскопии с использованием красителя Hoechst 33342. Полученные видеоизображения обрабатывали с помощью специально написанного программного обеспечения, которое позволяло зафиксировать положение центра ооцита и ЯПТ и с субдифракционным разрешением детектировать смещение ЯПТ с помощью математического алгоритма.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для исследования динамики и траектории движения ядрышка в нуклеоплазме живого ооцита мыши, использовался оптический захват, причём ядрышко выполняло роль микрозонда. При включении лазера, ядрышко затягивалось в оптическую ловушку и его можно было перемещать в пространстве нуклеоплазмы. Смещения ядрышка производились в разных направлениях. После выключения захвата ядрышко релаксировало, в некоторых случаях не возвращаясь в исходное положение; затем выявляли конфигурацию ядра ооцита при помощи флуоресцентной микроскопии, детектируя свечение и распределение хроматина в ядре.

При помощи специально разработанного программного обеспечения для каждого ооцита были получены следующие данные: абсолютное время в секундах, относительное время в секундах, позиция X центра ядрышка, позиция Y центра ядрышка. При обработке полученных видеоизображений для каждого ооцита (всего было исследовано 70 ооцитов) были получены данные о времени релаксации ядрышка после выключения оптической ловушки (рис. 2).

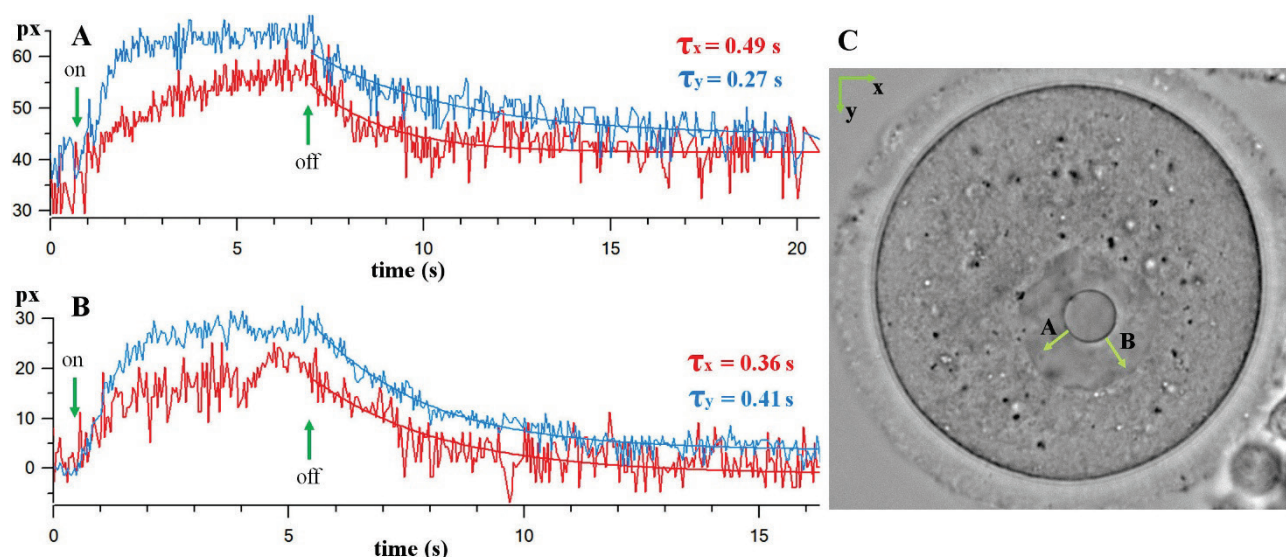


Рисунок 2. На графиках показано изменение координат ядрышка по осям X и Y (пиксели) во времени (секунды), а также соответствующие времена релаксации τ_x и τ_y . Зелёными стрелками на рисунках А и В обозначены моменты включения (on) и выключения (off) оптической ловушки. Стрелками на рисунке С обозначены направления смещения ядрышка

Последовательные смещения ядрышка в различных направлениях позволили выявить анизотропный характер материала ядра, о чем свидетельствуют характерные времена релаксации. Это может свидетельствовать о гетерогенности вязкоупругих свойств плазмы ядра. Такие эффекты наблюдались преимущественно в ооцитах с ядрами, имеющими pSN и NSN конфигурацию. В случае с ооцитами, имеющими SN конфигурацию, наблюдалась следующая картина: ядрышко, как правило, оказывалось малоподвижным, закреплённым на ядерной мембране, в результате чего выявлялась лишь его деформация. Кроме того, возмущение ядрышка приводило к смещению мембраны ядра и цитоплазмы, что лишний раз доказывает связь структур ядра с компонентами цитоскелета цитозоля без применения дополнительных цитохимических методов. Анизотропные свойства нуклеоплазмы можно связать с тем, что ооцит, являясь термодинамически неравновесной системой, в каждый отдельный момент времени совершает морфогенетические превращения – распределение хроматина изменяется от условно «гомогенного» к формированию отдельных компактных хромосом. Аналогичная ситуация наблюдается с цитоскелетом. В ранней профазе распределение микротрубочек более гомогенно, они образуют плотную равномерную цитоплазматическую сеть. По мере развития ооцита формируются крупные центры, состоящие из тубулина и перичентрина, располагающиеся преимущественно вокруг ядра [15]. Установление более конкретных причин возникновения анизотропии требует дополнительных исследований, так как оогенез представляет собой сложный, многофакторный процесс и характер смещения ядрышка определяется своими собственными свойствами и свойствами микроокружения.

Таким образом, данным экспериментом мы проиллюстрировали, что движение ядрышка в нуклеоплазме может быть исследовано при помощи оптического захвата. Времена релаксации ядрышка при действии оптического пинцета указывают на анизотропные свойства материала ядра; использование ядрышка в качестве микрозонда делает данную методику малоинвазивной. Кроме того, использование оптического захвата позволяет визуализировать взаимодействие ядерных и цитоплазматических структур. Полученные сведения о динамике движения ядрышка в живых ооцитах могут послужить основой для новой классификации ооцитов и использоваться для предопределения их потенциала к успешному завершению мейотического созревания и оплодотворения.

Работа частично выполнена за счет субсидии, выделенной ИХФ РАН на выполнение государственного задания, тема 0082-2018-0005 (код АААА-А18-118020690203-8) в части флуоресцентной микроскопии с использованием оборудования ЦКП ИХФ РАН № 506694. Работа по исследованию вязкоупругих свойств нуклеоплазмы с помощью оптического захвата выполнена за счет гранта РФФИ 18-33-01080.

Список литературы / References:

1. Stamenovic D., Wang N. Cellular Response to Mechanical Stress – Invited Review: Engineering Approaches to Cytoskeletal Mechanics. *Journal of Applied Physiology*, 2000, vol. 89, pp. 2085-2090.
2. Vincent J.-P., Fletcher A.G., Baena-Lopez L.A. Mechanisms and Mechanics of Cell Competition in Epithelia. *Nature Review Molecular Cell Biology*, 2013, vol. 14, no. 9, pp. 581-591.
3. Chen C.S., Tan J., Tien J. Mechanotransduction at Cell-Matrix and Cell-Cell Contacts. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 2004, vol. 6, no. 1, pp. 275-302.

4. Tapley E.C., Starr D.A. Connecting the Nucleus to the Cytoskeleton by Sun-Kash Bridges across the Nuclear Envelope. *Current opinion in cell biology*, 2013, vol. 25, no. 1, pp. 57-62.
5. Guo M., Ehrlicher A.J., Mahammad S., Fabich H., Jensen M.H., Moore J.R., Fredberg J.J., Goldman R.D., Weitz D.A. The Role of Vimentin Intermediate Filaments in Cortical and Cytoplasmic Mechanics. *Biophysical Journal*, 2013, vol. 105, no. 7, pp. 1562-1568.
6. Haase K., Pelling A.E. Investigating Cell Mechanics with Atomic Force Microscopy. *Journal of the Royal Society Interface*, 2015, vol. 12, no. 104, pp. 20140970.
7. Guevorkian K., Maître J.L. Chapter 10 – Micropipette Aspiration: A unique Tool for Exploring Cell and Tissue Mechanics *in vivo*. In *Methods in Cell Biology*, Lecuit T., Ed. Academic Press: 2017, vol. 139, pp. 187-201.
8. Hu S., Liu G., Chen W., Li X., Lu W., Lam R.H.W., Fu J. Multiparametric Biomechanical and Biochemical Phenotypic Profiling of Single Cancer Cells Using an Elasticity Microcytometer. *Small*, 2016, vol. 12, no. 17, pp. 2300-2311.
9. Fisher J.K., Ballenger M., O'Brien E.T., Haase J., Superfine R., Bloom K. DNA Relaxation Dynamics as a Probe for the Intracellular Environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, vol. 106, no. 23, pp. 9250-9255.
10. Jiang Y., Matsumoto Y., Hosokawa Y., Masuhara H., Oh I. Trapping and Manipulation of a Single Micro-Object in Solution with Femtosecond Laser-Induced Mechanical Force. *Applied Physics Letters*, 2007, vol. 90, no. 6, pp. 061107.
11. Lang M.J., Fordyce P.M., Block S.M. Combined Optical Trapping and Single-Molecule Fluorescence. *Journal of biology*, 2003, vol. 2, no. 1, pp. 6.
12. Neuman K.C., Lionnet T., Allemand J.F. Single-Molecule Micromanipulation Techniques. *Annual Review of Materials Research*, 2007, vol. 37, no. 1, pp. 33-67.
13. Tan J.-H., Wang H.-L., Sun X.-S., Liu Y., Sui H.-S., Zhang J. Chromatin Configurations in the Germinal Vesicle of Mammalian Oocytes. *MHR: Basic science of reproductive medicine*, 2009, vol. 15, no. 1, pp. 1-9.
14. Ma J.-Y., Li M., Luo Y.-B., Song S., Tian D., Yang J., Zhang B., Hou Y., Schatten H., Liu Z., Sun Q.-Y. Maternal Factors Required for Oocyte Developmental Competence in Mice: Transcriptome Analysis of Non-Surrounded Nucleolus (Nsn) and Surrounded Nucleolus (Sn) Oocytes. *Cell Cycle*, 2013, vol. 12, no. 12, pp. 1928-1938.
15. Schuh M., Ellenberg J. Self-Organization of Mtocs Replaces Centrosome Function During Acentrosomal Spindle Assembly in Live Mouse Oocytes. *Cell*, 2007, vol. 130, no. 3, pp. 484-498.

INVESTIGATING VISCOELASTIC PROPERTIES OF MAMMALIAN OOCYTES NUCLEOPLASM WITH OPTICAL TRAPPING

Syrchina M.S., Zalesskii A.D., Osychenko A.A., Astafiev A.A., Aybush A.V., Nadtochenko V.A

Semenov institute of chemical physics (ICP RAS)

Kosygina st., 4, Moscow, 119991, Russia; e-mail: wrongclue@gmail.com

Abstract. We suggest a new non-invasive method, based on applying of optical trapping for viscoelastic properties investigation of cellular supramolecular complexes (chromatin, nucleolus). As a model object, we used mice oocytes because of their well-known biochemistry, intracellular organization and large size of nuclei (10 μm). Nucleoli were supposed to be natural microspheres, so it was possible to catch them by optical tweezers and create deformations of nuclei matter. Based on our data, measured relaxation time of nucleoli could be an indicator of spatial viscoelastic properties changes. Also, optical trapping is a powerful tool for visualization of interactions between nucleus and cytoplasm.

Key words: optical trapping, mouse oocyte, microrheology, soft matter, nucleolus, biopolymers