



УДК 577.22

ПРИМЕНЕНИЕ БИМОЛЕКУЛЯРНОЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ КОМПЛЕМЕНТАЦИИ ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ГИСТОНОВЫХ МОДИФИКАЦИЙ В ЖИВЫХ КЛЕТКАХ

© 2025 г. А. И. Степанов*, **, Л. В. Путляева*, **, А. А. Шуваева****,
М. А. Андрушкин***, М. С. Баранов**, ***, Н. Г. Гурская*, **, ***, #, К. А. Лукьянов**

* Сколковский институт науки и технологий, Центр молекулярной и клеточной биологии,
Россия, 121205 Москва, Большой бульвар, 30/1

** Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

*** Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова,
Научно-исследовательский институт трансляционной медицины,
Россия, 117513 Москва, ул. Островитянова, 1

**** Московский физико-технический институт, Россия, 117303 Москва, Керченская улица, 1А, корп. 1

Поступила в редакцию 22.09.2024 г.

После доработки 02.10.2024 г.

Принята к публикации 04.10.2024 г.

Эпигенетические модификации гистонов в составе хроматина в клетках человека, животных и других эукариотических организмов играют ключевую роль в регуляции экспрессии генов. Гистоны могут подвергаться разнообразным посттрансляционным модификациям в различных комбинациях (включая метилирование, ацетилирование, фосфорилирование и др.) по различным аминокислотным остаткам, что определяет функциональное состояние данного локуса хроматина. Изменение эпигенетических модификаций сопровождает все нормальные и патологические клеточные процессы, включая пролиферацию, дифференцировку, раковую трансформацию и др. На сегодняшний день особенно актуальны разработка и применение новых методов анализа эпигенома на уровне единичных клеток, в том числе живых клеток. В данной работе были получены новые сенсорные системы для визуализации эпигенетических модификаций H3K9me3 (триметилированный Lys9), H3K9ac (ацетилированный Lys9) и пространственного сближения H3K9me3 с H3K9ac, основанные на флуорогенных красителях. Для создания сенсоров были использованы последовательности белка splitFAST, а также природные ридерные белковые домены MPP8 и AF9. Добавление в клеточную среду флуорогенов HMBR и N871b позволило детектировать ясно различимые паттерны флуоресценции в зеленом и красном каналах соответственно. Нами также был проведен обсчет полученных флуоресцентных изображений с помощью компьютерного метода анализа LiveMIEL (Live-cell Microscopic Imaging of Epigenetic Landscape). Кластеризация полученных данных показала хорошее согласование с предполагаемыми метками классов, соответствующих представленности H3K9me3, H3K9ac и пространственному сближению H3K9me3 и H3K9ac в ядре. Разработанные сенсоры могут быть эффективно использованы для изучения гистоновых модификаций в различных клеточных процессах, а также в исследовании механизмов развития заболеваний.

Ключевые слова: генетически кодируемый сенсор, H3K9me3, H3K9ac, эпигенетическая регуляция, splitFAST, FAST, флуороген-активирующие белки

DOI: 10.31857/S0132342325010074, **EDN:** LZMQKQ

Сокращения: H3K9me3 – триметилированный лизин 9 на гистоне H3; H3K9ac – ацетилированный лизин 9 на гистоне H3; HMBR – 4-гидрокси-3-метилбензильден-роданин; HMRD – домены, специфически связывающиеся с модифицированными гистонами (histone modification “reader” domains); LiveMIEL – микроскопия живых клеток для исследования эпигенетического ландшафта (Live-cell Microscopic Imaging of Epigenetic Landscape); MPP8 – М-фазный фосфопротеин 8; NLS – сигнал ядерной локализации; PCA – метод анализа главных компонент.

Автор для связи: (эл. почта: gurskayanadya@gmail.com).

ВВЕДЕНИЕ

На изучение посттрансляционных модификаций гистонов с использованием различных подходов (масс-спектрометрия, иммунопреципитация, глубокое секвенирование, электронная и флуоресцентная микроскопия и др.) направлены усилия многочисленных лабораторий во всем мире. Гистоны могут нести на себе множество модификаций боковых цепей аминокислотных остатков (моно-, ди- и триметилирование лизина, моно- и два типа диметилирования аргинина, ацетилирование лизина, фосфорилирование серина, треонина и гистидина и др.) [1]. Ключевую роль в “интерпретации” гистоновой модификации клеткой играют домены, специфически связывающиеся с модифицированными гистонами (histone modification “reader” domains, HMRD); они привлекают белки со специфическими активностями, необходимыми в данном локусе хроматина [2]. Внесение, распознавание и удаление гистоновых модификаций представляет собой динамическую и регулируемую на многих уровнях систему.

Одно из направлений в изучении эпигенетических модификаций гистонов – использование генетически кодируемых сенсоров на основе HMRD, которые специфически связываются с различными гистоновыми модификациями. Применение этих доменов показало успешные результаты и используется в различных исследованиях: HIMIDs (histone modification interacting domains) позволили одновременно детектировать модификации H3K9me3 и H3K36me2/3 [3, 4], cMAPs (chromatin-sensing multivalent probes) – распознавать H3K27me3 и H3K4me3 [5], eCRs (engineered chromatin readers) – визуализировать триметилирование гистонов по H3K4, H3K9 и H3K27 [6].

Ранее нами был разработан новый метод анализа эпигенома LiveMIEL (Live-cell Microscopic Imaging of Epigenetic Landscape), позволяющий визуализировать эпигенетические модификации гистонов и их изменение в живых клетках [7]. LiveMIEL визуализирует эпигенетические ландшафты с помощью экспрессируемых в образцах флуоресцентных генетически кодируемых эпигенетических зондов на основе природных ридерных доменов и использует компьютерный анализ полученных изображений модификаций. Для практической реализации метода LiveMIEL нами были созданы различные генетически коди-

руемые эпигенетические сенсоры для визуализации эпигенетических модификаций, в частности сенсор MPP8-Green был создан для визуализации гистоновой модификации H3K9me3. Данный сенсор представляет собой генетическую конструкцию, состоящую из двух копий последовательности ридерного хромодомена М-фазного фосфопротейна 8 (MPP8) [8], и последовательности зеленого флуоресцентного белка mNeonGreen. Для проведения компьютерного анализа были получены *in vivo* флуоресцентные изображения модельных клеточных линий, несущих эпигенетические зонды. Проведенный компьютерный анализ изображений позволил успешно различить три стадии АТОН1-опосредованной дифференцировки [9] индуцированных плюрипотентных стволовых клеток в нейроны, тем самым подтвердив принципиальную возможность применения метода LiveMIEL в живых клетках.

В созданных нами сенсорах для визуализации процессов использованы различные флуоресцентные белки (mNeonGreen и др.), однако такие белки имеют множество внутренних неустранимых недостатков. Их хромофоры образуются из собственных аминокислотных остатков, поэтому созревание требует времени и присутствия молекулярного кислорода. Более того, при фотообесцвечивании эти хромофоры не могут восстановиться, и молекулы флуоресцентных белков становятся нефлуоресцентными.

В данной работе мы хотим представить другую тактику создания генетически кодируемых сенсоров, состоящих из последовательностей ридерных белковых доменов MPP8 и AF9 и разделенного флуоресцентной меткой splitFAST [10]. Система splitFAST основана на известном флуороген-активирующем белке FAST. В отличие от классических флуоресцентных белков, данная генетически-кодированная метка не имеет собственного хромофора и собственной флуоресценции, однако приобретает ее при обратимом связывании с низкомолекулярным соединением – флуорогеном. Такой подход стал особенно популярен в последнее время, т.к. позволяет избавиться от упомянутых недостатков флуоресцентных белков – флуороген-активирующий белок FAST не требует для своей работы кислорода, дополнительного времени на созревание, имеет заметно меньший размер, порой демонстрирует большую фотостабильность, а также не демонстрирует выраженного фонового

сигнала в отличие от других низкомолекулярных флуоресцентных меток [11–13]. Система splitFAST – представитель так называемых “расщепленных” или “split”-меток, она состоит из двух белковых фрагментов – NFAST и CFAST, которые приобретают способность к флуоресценции только при связывании двух фрагментов и наличии флуорогена.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Создание сенсора на основе белка FAST для визуализации гистоновых модификаций H3K9me3 и H3K9ac. Первым шагом работы было использование мономерного белка FAST [11] для визуализации гистоновых модификаций. Данный флуоресцентный репортер – это небольшая белковая метка (14 кДа), которая испускает флуоресценцию при введении флуорогена. В данной работе были использованы флуорогены HMBR [11] и N871b [12], у которых флуоресценция в растворе практически отсутствует, но становится яркой при связывании с белком FAST, с усилением в ~1000 раз. При этом HMBR и N871b легко проникают в клетку и не прокрашивают клеточные мембраны.

Для создания новых эпигенетических сенсоров были взяты ранее использованные нами домены MPP8 и AF9, специфически связывающиеся с модификациями гистона H3K9me3 и H3K9ac соответственно. Модификация H3K9me3 обычно коррелирует с репрессией транскрипции и образованием гетерохроматина [14], в то время как модификация H3K9ac ассоциирована с транскрипционно активным хроматином [15].

Ранее было показано, что димерное состояние домена играет важную роль в формировании четко детектируемых паттернов флуоресценции [6], вследствие чего нами были созданы следующие варианты сенсора: MPP8-FAST-NLS-MPP8 и

AF9-FAST-NLS-AF9 (рис. 1). Трансфекция этих конструкций в клетки HEK293T, с последующим добавлением флуорогена HMBR, продемонстрировала ожидаемые внутриядерные паттерны в виде ярких точек, отражающие представленность H3K9me3 и H3K9ac (рис. 1). Таким образом, мы разработали первые в мире варианты метода LiveMIEL с использованием белковых зондов, обратимо связывающих флуорогенные красители.

Создание сенсора на основе splitFAST для визуализации гистоновых модификаций H3K9me3 и H3K9ac. Следующим шагом работы стало создание сенсора для визуализации H3K9me3 и H3K9ac с использованием системы splitFAST. Сенсоры на основе splitFAST представляют собой последовательности доменов MPP8 или AF9, слитых с фрагментами белка FAST (NFAST или CFAST10/11), которые приобретают способность к флуоресценции только при одновременном попадании в клетку обоих фрагментов FAST и наличии флуорогена в среде. CFAST10 проявляет низкое сродство к NFAST по сравнению с CFAST11, что приводит к меньшему взаимодействию с NFAST, но к более широкому динамическому диапазону взаимодействий, вследствие чего мы решили использовать при создании сенсоров оба варианта: CFAST10 и CFAST11. Нами были созданы сенсоры с различными комбинациями CFAST10/11 с MPP8 и AF9 (рис. 2a). Для визуализации H3K9me3 мы провели котрансфекцию MPP8-NFAST-NLS и MPP8-CFAST10/11-NLS и обнаружили флуоресцентные паттерны, характерные для H3K9me3 (рис. 2б). В качестве контроля специфичности использовали мутантную версию MPP8-W80A, для которой было показано отсутствие специфичности к H3K9me3 [16]. Созданные конструкции MPP8-W80A-NFAST-NLS и MPP8-

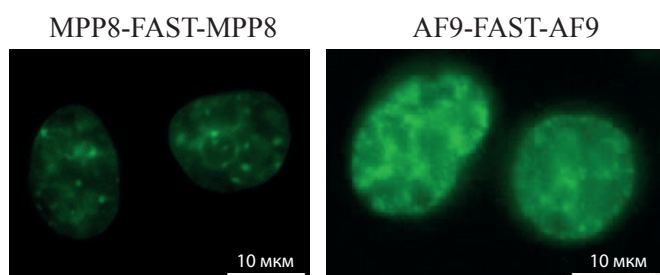


Рис. 1. Флуоресцентная микроскопия клеток HEK293T, трансфицированных сенсорами MPP8-FAST-NLS-MPP8 и AF9-FAST-NLS-AF9 (NLS для удобства убран из надписей на рисунках). Флуороген – HMBR.

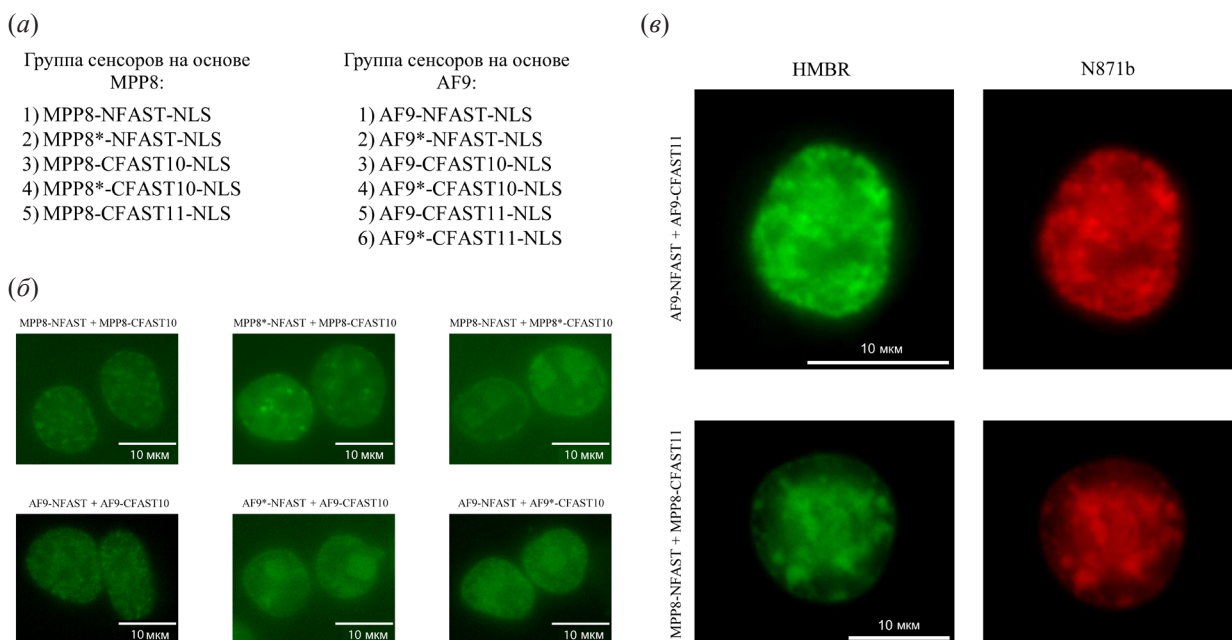


Рис. 2. (а) – Список созданных плазмид, разбитый по группам. Звездочка указывает на внесение мутаций MPP8 W80A и AF9 Y78A в соответствующие последовательности ДНК; (б) – флуоресцентная микроскопия котрансфицированных различными вариантами плазмид в клетки HEK293T. Флуороген – HMBR; (в) – флуоресцентная микроскопия котрансфицированных плазмид в клетках HEK293T в двух каналах, над изображениями указаны использованные флуорогены; NLS для удобства убран из надписей на рисунках.

W80A-CFAST10/11-NLS не демонстрировали специфического связывания с H3K9me3. Таким образом, мы показали, что splitFAST применим для визуализации эпигенетической модификации H3K9me3.

Для визуализации распределения H3K9ac в ядре живой клетки нами были созданы конструкции AF9-NFAST-NLS и AF9-CFAST10/11-NLS. Результатом котрансфекции данными плазмидами стали хорошо различимые внутриядерные паттерны, распределенные по объему ядра. В качестве отрицательного контроля была также проанализирована мутантная версия AF9 Y78A [17], продемонстрировавшая потерю специфичности связывания с H3K9ac и, как следствие, отсутствие специфических паттернов флуоресценции (рис. 2б). Было установлено, что наиболее подходящий вариант для визуализации – использование CFAST11 вместо CFAST10 (рис. 2в). Чтобы продемонстрировать преимущества системы splitFAST по сравнению с традиционными флуоресцентными белками, мы использовали красный флуороген N871b наряду с зеленым флуорогеном HMBR в одном и том же эксперименте. Таким образом, мы заклю-

чили, что, как и для MPP8, система splitFAST применима для визуализации H3K9ac.

Использование splitFAST для визуализации пространственного сближения гистоновых модификаций H3K9me3 и H3K9ac. Следующим этапом работы было создание сенсора для визуализации пространственного сближения H3K9me3 и H3K9ac. Нами был создан вектор MPP8-FAST-NLS-AF9, несущий одновременно последовательности MPP8 и AF9. Полученные в ходе флуоресцентной микроскопии в клетках HEK293T изображения паттернов эпигенетических модификаций в ядрах отличались от паттернов, характерных для H3K9me3 и H3K9ac (рис. 3а).

Поскольку предполагаемое взаимодействие между H3K9me3 и H3K9ac динамическое, мы также решили использовать систему splitFAST, оптимальную для визуализации белок-белковых динамических взаимодействий. Мы провели ряд котрансфекций с комбинациями различных вариантов сенсоров MPP8 и AF9 с NFAST и CFAST10/11. Полученные изображения показали разнообразие распределений, характерных для различных вариантов гистоновых модификаций (рис. 3б). Стоит отметить, что MPP8 имеет более

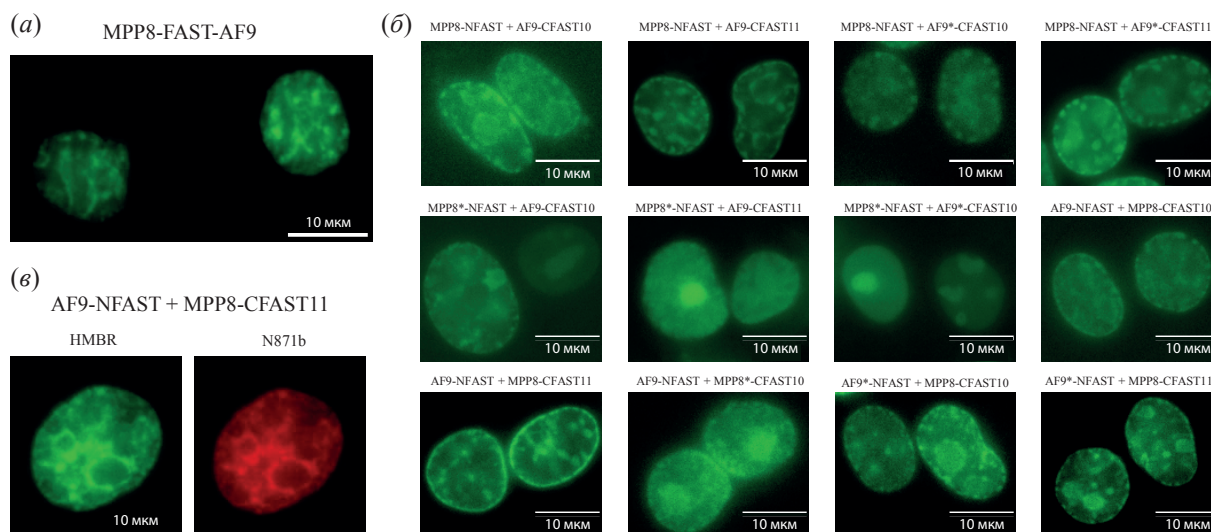


Рис. 3. (а) – Флуоресцентная микроскопия клеток HEK293Т, экспрессирующих MPP8-FAST-NLS-AF9. Флуороген – HMBR; (б) – флуоресцентная микроскопия клеток HEK293Т, экспрессирующих различные комбинации плазмид системы splitFAST. Флуороген – HMBR. Звездочка указывает на то, что домены имеют мутацию MPP8 W80A и AF9 Y78A; (в) – флуоресцентная микроскопия HEK293 AF9-NFAST-NLS и MPP8-CFAST11-NLS в двух каналах, над изображениями указаны использованные флуорогены. NLS для удобства убран из надписей на рисунках.

высокое сродство к H3K9me3, чем AF9 к H3K9ac. Возможно, поэтому при трансфекции комбинации MPP8-NFAST-NLS с AF9-CFAST10/11-NLS мы наблюдали распределение, характерное для H3K9me3. На основании этого мы предположили, что использование MPP8-CFAST10/11-NLS в сочетании с AF9-NFAST-NLS может компенсировать разницу в аффинности между доменами, учитывая, что NFAST состоит из более чем 100 а.о., а CFAST10/11 – из 10 и 11 а.о. соответственно. Только при котрансфекции AF9-NFAST-NLS и MPP8-CFAST11-NLS было получено специфическое распределение паттернов, в котором хроматиновые точки формировали протяженные структуры. Также стоит отметить, что мутации в MPP8 W80A приводили к потере специфического распределения, но изображения с мутациями в AF9 Y78A больше соответствовали распределению H3K9me3. Таким образом мы предполагаем, что использование пары AF9-NFAST-NLS и MPP8-CFAST11-NLS позволяет визуализировать точки пространственного сближения H3K9me3 и H3K9ac (рис. 3в).

Анализ распределения модификаций гистонов с помощью метода анализа изображений LiveMIEL. Для изучения пространственного распределения модификаций H3K9me3 и H3K9ac мы применили метод анализа изображений LiveMIEL [7]. Для этого мы получили флуоресцентные изображения клеток HEK293Т, экспрессирующих

следующие пары плазмид: 1) MPP8-NFAST + MPP8-CFAST11, 2) AF9-NFAST + AF9-CFAST11, 3) AF9-NFAST + MPP8-CFAST11. Из исходных микроскопных флуоресцентных изображений были сегментированы ядра и получен набор одиночных изображений ядер. Из одиночных изображений ядер были извлечены признаки – текстурные и морфологические особенности изображений (признаки Харалика, статистика пороговой смежности (TAS), моменты Цернике, координаты центра масс изображения ядра и статистика распределения хроматина). Таким образом, нами был получен набор 98-мерных векторов признаков, описывающих одиночные изображения ядер для каждой проанализированной пары плазмид; результаты обсчета были спроецированы в низкоразмерное (2D) пространство с использованием метода анализа главных компонент (PCA) (рис. 4а, б).

Проекция PCA сохранила 70.81% исходной информации. При кластеризации было выявлено три кластера (определенные с помощью анализа коэффициента силуэта) в данных PCA (рис. 4в, г), соответствующих визуализации модификации H3K9me3, H3K9ac и пространственному сближению H3K9me3 и H3K9ac. Оценка тенденции к кластеризации в данных PCA была выполнена с использованием статистики Хопкинса ($H = 0.18$).

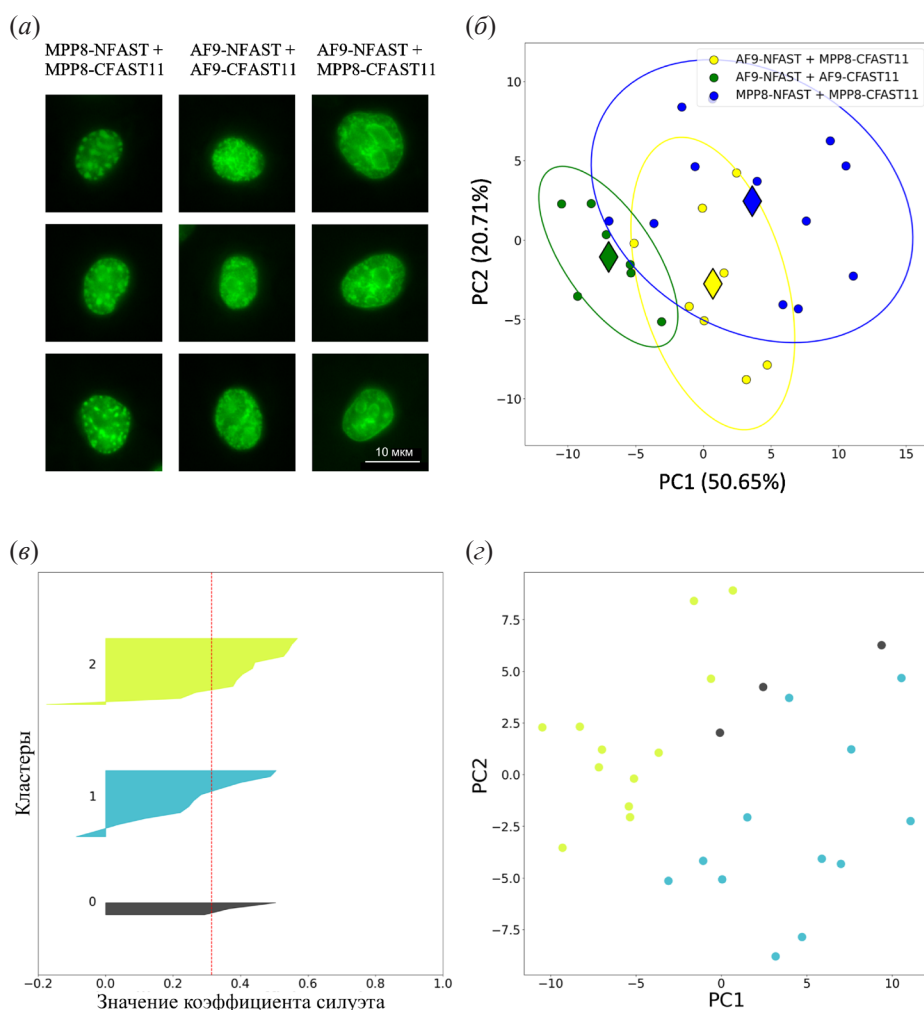


Рис. 4. (a) – Анализ эпигенетических модификаций H3K9me3, H3K9ac и H3K9me3-H3K9ac методом LiveMIEL. Сегментированные ядра клеток HEK293T, экспрессирующие MPP8-NFAST + MPP8-CFAST11, AF9-NFAST + AF9-CFAST11 и AF9-NFAST + MPP8-CFAST11; (б) – анализ текстурных особенностей, извлеченных из одиночных изображений ядер, методом главных компонент (PCA) (значения признаков были усреднены по $n = 40$ ядер); (в) – значения коэффициента силуэта s_i для EM-кластеризации данных PCA ($n = 3$). Красная линия соответствует среднему значению коэффициента силуэта $s = 0.31$ в наборе данных; (г) – визуализация кластеризации EM для $n = 3$ кластеров. Точки представляют текстурные особенности, полученные на основе изображений, визуализирующих представленность H3K9me3, H3K9ac и H3K9me3-H3K9ac в ядрах. NLS для удобства убран из надписей на рисунках.

Согласно анализу LiveMIEL, разработанные нами сенсоры на основе белка splitFAST и природных ридерных белковых доменов MPP8 и AF9 позволили нам получить данные, достоверно иллюстрирующие взаимное расположение H3K9ac и H3K9me3 в ядре клетки. Паттерны пары сенсоров AF9-NFAST + MPP8-CFAST11, отображающие пространственное сближение H3K9me3 и H3K9ac, представляют собой вытянутые структуры, которые отсутствуют как в MPP8-NFAST + MPP8-CFAST11, так и в AF9-NFAST + AF9-CFAST11 по отдельности (рис. 4а). Евклидовы расстояния между центроидами кластеров подтвердили эту гипотезу и показали существенные различия между всеми

кластерами: 11.19 между MPP8-NFAST + MPP8-CFAST11 и AF9-NFAST + AF9-CFAST11, 7.9 для AF9-NFAST + AF9-CFAST11 и AF9-NFAST + MPP8-CFAST11, 5.94 для MPP8-NFAST + MPP8-CFAST11 и AF9-NFAST + MPP8-CFAST11.

Обсуждение полученных результатов. Гистоновые модификации – это один из ключевых механизмов эпигенетической регуляции. Наиболее распространенным методом визуализации этих модификаций выступает использование антител, направленных на различные гистоновые модификации. Однако использование антител требует фиксации клеток, что не позволяет наблюдать за

динамикой гистоновых модификаций в живых клетках. Чтобы преодолеть это ограничение, были созданы различные сенсоры, начиная с уменьшенных версий антител, которые могут проникать через ядерные поры, и заканчивая природными гистоновыми доменами [18]. Эти домены представляют собой “ридерные” домены, которые специфически связываются с различными гистоновыми модификациями и участвуют в различных внутриклеточных процессах.

Мы продемонстрировали различные применения таких доменов, как MPP8 и AF9, для визуализации гистоновых модификаций H3K9me3 и H3K9ac соответственно [7, 19]. Также была показана функциональность метода LiveMIEL, который позволяет анализировать эпигенетический ландшафт с помощью мультипараметрического анализа изображений. Созданные нами сенсоры представляют собой комбинацию доменов и флуоресцентного белка в различных вариантах.

В данной работе мы показали возможность создания аналогичного сенсора с использованием флуоресцентного репортера FAST [11] и его разделенного варианта splitFAST [10]. FAST представляет собой маленький флуоресцентный репортер, который испускает флуоресценцию при введении флуорогенного лиганда. Важное преимущество использования FAST – это возможность выбора флуорогенного лиганда нужного цвета, что значительно упрощает его использование для разноцветного мечения по сравнению с традиционными флуоресцентными белками.

Мы создали два сенсора с использованием белка FAST: AF9-FAST-NLS-AF9 для визуализации H3K9ac и MPP8-FAST-NLS-MPP8 для визуализации H3K9me3. Эти сенсоры показали специфическое распределение, характерное для гистоновых модификаций H3K9ac и H3K9me3 соответственно. Помимо FAST, мы продемонстрировали использование системы splitFAST, которая представляет собой вариант флуоресцентного репортера FAST, разделенного на две части: NFAST и CFAST. Эти части испускают флуоресценцию только при пространственном сближении и взаимодействии в присутствии флуорогена. Таким образом, эта система представляет собой идеальный сенсор для белок-белковых взаимодействий, позволяющий визуализировать гистоновые модификации, снижая неспецифическую флуоресценцию и взаимодействие. В рам-

ках системы splitFAST мы создали сенсоры с использованием доменов AF9 и MPP8, которые показали специфическое распределение H3K9ac и H3K9me3 соответственно. Варианты с мутантными версиями доменов не продемонстрировали соответствующие паттерны, что подтвердило специфичность системы.

Сенсорная пара AF9-NFAST + MPP8-CFAST11 представляет особый интерес, поскольку является сенсором со специфичностью на сочетание эпигенетических маркеров H3K9me3 и H3K9ac. Поскольку это альтернативные модификации одного и того же остатка лизина (Lys9 гистона H3), они не могут находиться на одной молекуле гистона. Более того, эти модификации характерны для “противоположных” состояний хроматина: H3K9me3 обогащена в неактивном хроматине, а H3K9ac – в активном. Очевидно, пара сенсоров AF9-NFAST + MPP8-CFAST11 связывается с локусами, обогащенными обеими целевыми модификациями, возможно, на границах между участками активного и неактивного хроматина. Такие районы не выявлялись ранее существовавшими методами и теперь становятся доступны для визуализации и отслеживания их изменений в ходе различных нормальных и патологических процессов, таких как раковая трансформация клеток, ответ раковых клеток на воздействия лекарственных препаратов или ионизирующего облучения и т.д.

Таким образом, примененное нами в данной работе сочетание метода LiveMIEL с новыми генетически кодируемыми сенсорами на основе флуорогенных красителей расширит возможности выявлять изменения эпигенома при различных биологических процессах на живых клетках в режиме реального времени, т.к. использование флуорогена позволяет проводить мечение путем добавления флуорогена в клеточную среду и его последующей отмывки.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Молекулярное клонирование. Системы клонирования Golden Gate использовали для всех процедур клонирования ДНК. Конструкции ДНК были вставлены в векторы level 0 и level 1, полученные с помощью MoClo Toolkit (Kit#1000000044, AddGene, США). Эндонуклеазные рестриктазы BpiI (BbsI) и Eco31I (BsaI) (Thermo Scientific, США) вместе с ДНК-лигазой T4 (Евроген, Россия) использовали для процесса клонирования MoClo. Были использо-

ваны ДНК доменов AF9 и MPP8 из предыдущих работ [7, 19]. FAST, NFAST и CFAST10/11 были клонированы в векторы level 0. Все плазмиды были сконструированы с использованием специализированного вектора, адаптированного для клонирования по технологии Golden Gate, который был получен из вектора pRRLSIN.cPPT.EF1, любезно предоставленного доктором Д. Троно из Лозанны.

Работа с клеточной линией. Клетки HEK293T культивировали при 37°C (5% CO₂) в среде DMEM (ПанЭко, Россия) с 10%-ной фетальной бычьей сывороткой (BioSera, Франция), 100 ед./мл пенициллина и 100 мг/мл стрептомицина (ПанЭко, Россия). Для транзientной трансфекции клеток HEK293T плазмидами использовали PEI 25K (Polysciences, США), следуя инструкциям производителя. За 24 ч до трансфекции 0.3×10^6 клеток HEK293T высевали в культуральную чашку со стеклянным дном диаметром 35 мм. Для трансфекции использовали 1 мкг плазмиды. Смесь ДНК-PEI инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре, а затем по каплям добавляли к клеткам. Через 4 ч среду заменяли 2 мл свежей DMEM. Спустя 24 ч клетки наблюдали под микроскопом.

Микроскопия живых клеток. Микроскопия живых клеток проходила в специальной среде MEM (ПанЭко, Россия) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (BioSera, Франция) и 20 mM HEPES (Corning, США). Непосредственно перед съемкой в клетки добавляли флуорогены HMBR и N871b до конечной концентрации 10 мкМ. Микроскопию выполняли с использованием инвертированного флуоресцентного микроскопа BZ-9000 (Keyence, Япония), оснащенного масляным объективом PlanApo 1.40 NA 60× (Nikon, США). Фильтр TexasRed OP66838 BZ (Keyence, Япония) использовали для индуцирования красной флуоресценции, а фильтр GFP-BP OP66836 BZ (Keyence) – для индуцирования зеленой флуоресценции.

Компьютерный анализ изображений с помощью алгоритма LiveMIEL. Компьютерный анализ флуоресцентных изображений включал в себя следующие этапы: 1) сегментацию объектов, 2) извлечение признаков из изображений сегментированных объектов и 3) кластеризацию объектов на основе выделенных признаков. Из исходных микроскопных флуоресцентных изображений сегментировали ядра, получили набор одиночных изображений ядер, а также набор меток классов этих ядер. Из одиночных изображений ядер были

извлечены признаки – текстурные и морфологические особенности изображений. Таким образом был получен набор 98-мерных векторов признаков, описывающих одиночные изображения ядер. Для улучшения кластеризации вектора признаков усредняли по n ядрам в пределах одного класса.

Сегментация изображений. Сегментацию одиночных объектов (ядер, клеток) из флуоресцентных микроскопных изображений проводили путем последовательного применения к исходным изображениям методов полосовой фильтрации (bandpass segmentation), сегментации по морфологическим границам водоразделов (watershed segmentation) и удаления ложноположительных объектов. При полосовой фильтрации значения пикселей изображения нормализовали по интенсивности на $[0; 1]$, проводили удаление шума (сглаживание изображения) и вычитание фона с использованием размытия по Гауссу: свёртку изображения с ядром размытия для удаления шума (низкие значения) и с ядром размытия для вычитания фона (высокие значения).

Извлечение признаков из изображений сегментированных объектов. Из одиночных изображений ядер выделяли текстурные и морфологические особенности (статистические данные) изображений, описывающие эпигенетические паттерны. В качестве характерных особенностей были выбраны текстурные особенности Харалика (Haralick features, 13 особенностей), статистика пороговой смежности – TAS (Threshold Adjacency Statistic, 54 особенности), моменты Цернике (Zernike moments, 25 особенностей), координаты x , y центра масс изображения ядра (две особенности) и оригинальная статистика особенностей распределения хроматина – минимальная, максимальная, средняя и суммарная площади хроматиновых точек в ядре, нормированные на площадь ядра (четыре особенности). Сегментацию хроматиновых точек внутри одиночного изображения ядра производили аналогично сегментации объектов (ядер, клеток) из исходных изображений. Суммарно для каждого ядра было выделено 98 особенностей. Выделенные особенности были нормализованы с применением стандартной оценки (z -score normalization).

В работе использовали библиотеки scikit и mahotas, загруженные из официальных репозиториях Python для анализа данных и обработки изображений.

Кластеризация на основе выделенных признаков. Перед кластеризацией было проведено уменьшение размерности данных о паттернах флуоресценции (набор векторов из 98 признаков) с использованием метода анализа главных компонент (РСА). Кластеризацию данных РСА выполняли с использованием алгоритмов K-means и ЕМ (реализация библиотеки scikit-learn) [20]. Соответствующее количество кластеров n было определено с помощью анализа коэффициента силуэта для данных РСА. Статистику Хопкинса рассчитывали для оценки кластерной структуры полученных данных по формуле:

$$H = \frac{\sum_{i=1}^p u_i}{\sum_{i=1}^p u_i + \sum_{i=1}^p w_i},$$

где u_i – расстояние от i -го объекта из исследуемых данных до следующего ближайшего объекта из тех же данных (p объектов), w_i – расстояние от i -го объекта до ближайшего при равномерном распределении данных по p объектам. Если данные распределены равномерно, значение H будет близко к 0.5. Для неравномерно распределенных данных значение H будет близко к 0.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Созданы новые генетически кодируемые сенсоры для прижизненной визуализации эпигенетических модификаций H3K9me3 (триметилированный Lys9), H3K9ac (ацетилированный Lys9) и пространственного сближения H3K9me3 с H3K9ac. Уникальность созданных конструкций состоит в использовании последовательности белка splitFAST, природных ридерных белковых доменов MPP8 и AF9 и флуорогенных красителей HMBR и N871b. Добавление в клеточную среду флуорогенов позволило детектировать ясно различимые паттерны флуоресценции в зеленом и красном каналах соответственно. Обсчет полученных флуоресцентных изображений с помощью компьютерного метода анализа LiveMIEL позволил нам провести кластеризацию полученных данных и продемонстрировать статистически достоверное различие между классами, соответствующими представленности гистоновых модификаций H3K9me3, H3K9ac и пространственному сближению H3K9me3 и H3K9ac в ядре. Созданные сенсоры могут быть успешно применены для анализа гистоновых модификаций в различных клеточных процессах и для изучения механизмов, лежащих в основе развития заболеваний.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-14-00141).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Концептуализация – АИС, КАЛ, НГГ; экспериментальные работы – АИС, МСБ; написание статьи – АИС, ЛВП, НГГ; анализ данных – ЛВП, ААШ, МАА; администрирование проекта – НГГ, КАЛ.

Все авторы дали одобрение на окончательный вариант рукописи.

ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

Данные, подтверждающие выводы настоящего исследования, можно получить у корреспондирующего автора по обоснованному запросу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Millán-Zambrano G., Burton A., Bannister A.J., Schneider R. // Nat. Rev. Genet. 2022. V. 23. P. 563–580.
<https://doi.org/10.1038/s41576-022-00468-7>
2. Yun M., Wu J., Workman J.L., Li B. // Cell Res. 2011. V. 21. P. 564–578.
<https://doi.org/10.1038/cr.2011.42>
3. Kungulovski G., Kycia I., Tamas R., Jurkowska R.Z., Kudithipudi S., Henry C., Reinhardt R., Labhart P., Jeltsch A. // Genome Res. 2014. V. 24. P. 1842–1853.
<https://doi.org/10.1101/gr.170985.113>
4. Mauser R., Kungulovski G., Keup C., Reinhardt R., Jeltsch A. // Epigenetics Chromatin. 2017. V. 10. P. 45.
<https://doi.org/10.1186/s13072-017-0153-1>
5. Delachat A.M.-F., Guidotti N., Bachmann A.L., Meireles-Filho A.C.A., Pick H., Lechner C.C., Deluz C., Deplancke B., Suter D.M., Fierz B. // Cell Chem. Biol. 2018. V. 25. P. 51–56.e6.
<https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2017.10.008>
6. Villaseñor R., Pfaendler R., Ambrosi C., Butz S., Giuliani S., Bryan E., Sheahan T.W., Hélène D. // Nat. Biotechnol. 2020. V. 38. P. 728–736.
<https://doi.org/10.1038/s41587-020-0434-2>
7. Stepanov A.I., Shuvaeva A.A., Putlyaeva L.V., Lukyanov D.K., Galiakberova A.A., Gorbachev D.A., Maltsev D.I., Pronina V., Dylov D.V., Tersikh A.V., Lukyanov K.A., Gurskaya N.G. // Cell Mol. Life Sci. 2024. V. 81. P. 381.
<https://doi.org/10.1007/s00018-024-05359-0>

8. Müller I., Moroni A.S., Shlyueva D., Sahadevan S., Schoof E.M., Radzishheuskaya A., Højfeldt J.W., Pedersen D.S., Trifonov M., Mikkelsen J.G. // *Nat. Commun.* 2021. V. 12. P. 3034.
<https://doi.org/10.1038/s41467-021-23308-4>
9. Ng A.H.M., Khoshakhlagh P., Rojo Arias J.E., Pasquini G., Wang K., Swiersy A., Shipman S.L., Tian C., Miller D.M. // *Nat. Biotechnol.* 2021. V. 39. P. 510–519.
<https://doi.org/10.1038/s41587-020-0742-6>
10. Tebo A.G., Gautier A. // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. P. 2822.
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-10855-0>
11. Plamont M.-A., Billon-Denis E., Maurin S., Gauron C., Pimenta F.M., Specht C.G., Shi J., Lamberti A., Carlier A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2016. V. 113. P. 497–502.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1513094113>
12. Povarova N.V., Zaitseva S.O., Baleeva N.S., Smirnov A.Y., Myasnyanko I.N., Zagudaylova M.B., Bozhanova N.G., Yegorov A.Y., Mikhaylov A.D. // *Chemistry.* 2019. V. 25. P. 9592–9596.
<https://doi.org/10.1002/chem.201901151>
13. Benaissa H., Ounoughi K., Aujard I., Fischer E., Goïame R., Nguyen J., Tebo A.G., Pimentel C., Nicolas C. // *Nat. Commun.* 2021. V. 12. P. 6989.
<https://doi.org/10.1038/s41467-021-27334-0>
14. Padeken J., Methot S.P., Gasser S.M. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2022. V. 23. P. 623–640.
<https://doi.org/10.1038/s41580-022-00483-w>
15. Gates L.A., Shi J., Rohira A.D., Feng Q., Zhu B., Bedford M.T., Sagum C.A., Hewitt M.J., Cai Z. // *J. Biol. Chem.* 2017. V. 292. P. 14456–14472.
<https://doi.org/10.1074/jbc.m117.802074>
16. Kokura K., Sun L., Bedford M.T., Fang J. // *EMBO J.* 2010. V. 29. P. 3673–3687.
<https://doi.org/10.1038/emboj.2010.239>
17. Li Y., Wen H., Xi Y., Tanaka K., Wang H., Peng D., Ren Y., Li Z., Liu C. // *Cell.* 2014. V. 159. P. 558–571.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.049>
18. Stepanov A.I., Besedovskaia Z.V., Moshareva M.A., Lukyanov K.A., Putlyaeva L.V. // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. P. 8988.
<https://doi.org/10.3390/ijms23168988>
19. Stepanov A.I., Zhurlova P.A., Shuvaeva A.A., Sokolinskaya E.L., Gurskaya N.G., Lukyanov K.A., Putlyaeva L.V. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2023. V. 687. P. 149174.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2023.149174>
20. Pedregosa F., Varoquaux G., Gramfort A., Michel V., Thirion B., Grisel O., Blondel M., Linh H., Poggio T. // *J. Machine Learning Res.* 2012. V. 12. P. 2825–2830.
<https://doi.org/10.48550/arXiv.1201.0490>

Live-Cell Visualization of Histone Modification Using Bimolecular Complementation

A. I. Stepanov^{*, **}, L. V. Putlyaeva^{*, **}, A. A. Shuvaeva^{****}, M. A. Andrushkin^{***},
M. S. Baranov^{***}, N. G. Gurskaya^{*, **, ***, #}, and K. A. Lukyanov^{**}

[#] E-mail: gurskayanadya@gmail.com

^{*} Skolkovo Institute of Science and Technology, Bolshoi bul. 30/1, Moscow, 121205 Russia

^{**} Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

^{***} Pirogov Russian National Research Medical University, ul. Ostrovityanova 1, Moscow, 117997 Russia

^{****} Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, 141701 Russia

Epigenetic modifications of histones in human, animal, and other eukaryotic cells play a crucial role in regulating gene expression. Histones can undergo a variety of post-translational modifications in different combinations, including methylation, acetylation, phosphorylation, and others at various amino acid residues, which determine the functional state of a given chromatin locus. Changes in epigenetic modifications accompany all normal and pathological cellular processes, including proliferation, differentiation, cancer transformation, and more. Currently, the development and application of new methods for analyzing the epigenome at the single-cell level, including in live cells, are particularly relevant. In this study, new sensor systems were developed for visualizing epigenetic modifications H3K9me3 (trimethylated Lys9), H3K9ac (acetylated Lys9), and the spatial colocalization of H3K9me3 with H3K9ac, based on fluorogenic dyes. The creation of these sensors involved the use of splitFAST system as well as the histone natural reader domains MPP8 and AF9. Adding the fluorogens HMBR and N871b to the cell medium allowed for the detection of clearly distinguishable fluorescence patterns in the green and red channels, respectively. We also performed the analysis of the obtained fluorescent images using the LiveMIEL (Live-cell Microscopic Imaging of Epigenetic Landscape) computational method. Clustering of the resulting data showed agreement with the expected class labels corresponding to the presence of H3K9me3, H3K9ac, and the spatial colocalization of H3K9me3 and H3K9ac in the nucleus. The developed sensors can be effectively used to study histone modifications in various cellular processes, as well as in investigating disease development mechanisms.

Keywords: genetically encoded sensor, H3K9me3, H3K9ac, epigenetic regulation, splitFAST, FAST