

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА
МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА
МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ**

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ЧОПЕЙ МАР'ЯНА ІГОРІВНА

УДК 577.323:576.08

ДИСЕРТАЦІЯ

**ОРГАНІЗАЦІЯ ПЕТЕЛЬНИХ ДОМЕНІВ ДНК У НУКЛЕОЇДАХ
ІНТАКТНИХ І БЛАСТТРАНСФОРМОВАНИХ ЛІМФОЦИТІВ**

03.00.02 – біофізика

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

М. І. Чопей

Науковий керівник

Сиволоб Андрій Володимирович,
доктор біологічних наук, професор

Київ – 2017

АНОТАЦІЯ

Чопей М.І. Організація петельних доменів ДНК у нуклеоїдах інтактних і бласттрансформованих лімфоцитів. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика. – Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Міністерство освіти і науки України. Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Міністерство освіти і науки України. Київ, 2017.

Дисертаційна робота присвячена дослідженню організації петельних доменів ДНК у клітинах з різною транскрипційною активністю, а також характеру взаємодій між ДНК та білками, що забезпечують закріплення основ таких петельних доменів. В ході роботи, за допомогою методу гел-електрофорезу ізольованих клітин (кометного електрофорезу), вперше було проведено порівняння кінетик міграції петельних доменів ДНК із нуклеоїдів, отриманих з інтактних лімфоцитів людини, їх ізольованих ядер та бласттрансформованих лімфоцитів на різних стадіях клітинного циклу. Для всіх цих типів нуклеоїдів проаналізовано розміри найдовших петельних доменів ДНК, що мігрують на різних етапах електрофорезу, та досліджено стабільність основ петельних доменів за умов впливу денатуруючих агентів білків, інтеркаляторів та формальдегіду. Це дозволило виділити три категорії петельних доменів, що наявні у нуклеоїдах після лізису клітин: відносно короткі (до 50 тисяч пар нуклеотидів) поверхневі петельні домени, які мігрують вже на ранніх етапах електрофорезу; внутрішні петельні домени розміром до 200 тисяч пар нуклеотидів, міграція яких відбувається у кооперативний спосіб; та великі петельні домени (понад 200 тисяч пар нуклеотидів), які взагалі нездатні мігрувати в хвіст комети при електрофорезі. Було встановлено, що кооперативність міграції петельних доменів пов'язана із зниженням концентрації ДНК всередині нуклеоїду під час електрофорезу, та показано, що

така кооперативність відсутня при використанні ізольованих ядер внаслідок відмінностей мікрооточення всередині таких нуклеоїдів. При дослідженні характеру взаємодій, які стабілізують основи петельних доменів, було встановлено, що основна частина петельних доменів хроматину залишається в нуклеоїді після лізису клітини. Аналіз кінетики міграції петельних доменів ДНК при використанні бласттрансформованих лімфоцитів на стадіях G_1 та G_2 клітинного циклу вказує, що у таких клітин відбувається перерозподіл різних категорій петельних доменів, у порівнянні з інтактними лімфоцитами. Це відкриває перспективу застосування кінетичного підходу методу кометного електрофорезу для досліджень змін петельної організації хроматину при функціональних змінах у клітинах. Співставлення значень відносного вмісту ДНК у хвостах комет та контурних розмірів найдовших петельних доменів ДНК, що там присутні, дозволило вперше підтвердити існування хроматину в стані фрактальної глобули для масштабів від 20 до 100 тисяч пар нуклеотидів.

Ключові слова: петельні домени ДНК, нуклеоїд, бласттрансформація лімфоцитів, фрактальна глобула, кометний електрофорез.

SUMMARY

Chopei M.I. DNA loop domain organization in nucleoids of intact and blast transformed lymphocytes. – Manuscript.

A dissertation submitted to acquire the degree of Candidate of Science in Biology (PhD), specialty 03.00.02 – Biophysics. - Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ministry of Education and Science of Ukraine. Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ministry of Education and Science of Ukraine. Kyiv, 2017.

The thesis is focused on the investigation of DNA loop domain organization in cells with different transcriptional activity and the nature of interactions between DNA and proteins that are involved in loop domain formation. Using the comet assay technique, we compared for the first time the kinetics of DNA loop domain migration

for nucleoids obtained from intact human lymphocytes, their isolated nuclei and blast transformed lymphocytes at different phases of cell cycle. For all types of nucleoids studied, the length of the longest DNA loop domains that migrate at different stages of electrophoresis was analyzed. The stability of loop domain ends under the influence of protein denaturants, intercalators and formaldehyde was also investigated. We were able to distinguish three categories of loop domains that existed in nucleoids after cell lysis: relatively small (up to 50 kilobases) surface loop domains that migrate at early stages of electrophoresis; inner loop domains with length up to 200 kilobases that migrate cooperatively; and large loop domains (over 200 kilobases) that cannot migrate into comet tail during electrophoresis. It has been shown that cooperativity during loop domain migration is associated with the decreasing of DNA concentration inside nucleoid during electrophoresis, and this cooperativity is missing in case of isolated nuclei due to the differences in microenvironment inside those nucleoids. The nature of interactions that stabilized loop domain ends has been investigated and it has been determined that most of chromatin loop domains remained in nucleoid after cell lysis. We analyzed the kinetics of DNA loop domain migration in blast transformed lymphocytes at G_1 and G_2 phases of cell cycle and discovered the redistribution between different categories of loop domains in these cells in comparison with lymphocytes at G_0 phase. These findings open a prospect of using the kinetic approach of comet assay to investigate the changes of chromatin loop domain organization during cell differentiation. The comparison of the values of DNA amount in the comet tails and contour length of the largest DNA loop domains in the tails allowed us to confirm the fractal globule model of chromatin organization for scales from 20 to 100 kilobases.

Keywords: DNA loop domains, nucleoid, lymphocyte blast transformation, fractal globule, comet assay.

Список опублікованих праць за темою дисертації

1. Afanasieva, K., Chopei, M., Zazhytska, M., Vikhрева, M. and Sivolob, A. (2013). DNA loop domain organization as revealed by single-cell gel electrophoresis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1833(12), pp. 3237-3244. **(Scopus)**. **(Impact Factor: 5.128)**.
2. Чопей, М., Афанасьєва, К. и Сиволоб, А. (2014). Интеркаляция белков в ДНК как один из основных способов фиксации наиболее стабильных петельных доменов хроматина. *The Ukrainian Biochemical Journal*, 86(4), pp.110-118. **(Scopus)**.
3. Афанасьєва, К., Чопей, М. та Сиволоб, А. (2014). Свідчення існування хроматину в стані фрактальної глобули за даними кометного електрофорезу. *Вісник Львівського університету. Серія біологічна*, 68, сс.181-189.
4. Afanasieva, K., Chopei, M. and Sivolob, A. (2015). Single nucleus versus single-cell gel electrophoresis: Kinetics of DNA track formation. *Electrophoresis*, 36(7-8), pp.973-977. **(Scopus)**. **(Impact Factor: 2.482)**.
5. Afanasieva, K., Chopei, M. and Sivolob, A. (2015). Chromatin in fractal globule state: evidence from comet assay. *Biopolymers and Cell*, 31(2), pp.97-103. **(Scopus)**.
6. Afanasieva, K., Chopei, M., Lozovik, A., Rushkovsky, S. and Sivolob, A. (2016). Redistribution of DNA loop domains in human lymphocytes under blast transformation with interleukin 2. *The Ukrainian Biochemical Journal*, 88(6), pp.45-51. **(Scopus)**.
7. Чопей, М., Олефіренко, В., Афанасьєва, К. та Сиволоб, А. (2016). Вплив ДНК-інтеркаляторів на стабільність петельних доменів ДНК. *Вісник Львівського університету. Серія біологічна*, 74, сс.12-19.
8. Чопей, М., Зажицька, М. та Афанасьєва, К. (2010). Кінетика виходу ДНК при кометному електрофорезі інтактних та бласттрансформованих лімфоцитів людини. В: *X Всеукраїнська наукова конференція студентів та молодих науковців «Біологічні дослідження молодих вчених в Україні»*. Київ: Київський національний університет імені Тараса Шевченка, сс.92-93.

9. Чопей, М., Вихрева, М., Сідляк, Г. та Афанасьєва, К. (2013). Зміна рівня надспіралізації петельних доменів ДНК в інтактних клітинах під впливом інтеркалятора. В: *IX Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології» приуроченої до 150-річчя від дня народження академіка В. Вернадського*. Львів: Львівський національний університет імені Івана Франка, сс.28-29.
10. Вихрева, М., Чопей, М., Сидорук, О. та Зажицька, М. (2013). Ефективність виходу ДНК під час кометного електрофорезу при індукції ковалентних зшивок ДНК-білок у присутності високих концентрацій інтеркалятора. В: *IX Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології» приуроченої до 150-річчя від дня народження академіка В. Вернадського*. Львів: Львівський національний університет імені Івана Франка Львівський національний університет імені Івана Франка, сс.366-367.
11. Afanasieva, K., Zazhytska, M., Chopei, M. and Sivolob, A. (2013). Comet assay as a tool to investigate topology of DNA loops in intact cells. In: *38th FEBS congress «Mechanisms in biology»*. St. Petersburg: FEBS Journal, 280(1), pp.13-14.
12. Чопей, М., Лозовик, О. та Афанасьєва, К. (2014). Вплив інтеркаляторів і денатуруючих агентів білків на організацію петельних доменів ДНК. В: *X Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології»*. Львів: Львівський національний університет імені Івана Франка, сс.220-221.
13. Сиволюб, А., Афанасьєва, К. та Чопей, М. (2014). Організація петельних доменів хроматину за даними кометного електрофорезу. В: *XI Український біохімічний конгрес*. Київ: Український біохімічний журнал, 86(5), с.36.
14. Chopei, M., Semenova, A., Politenkova, S. and Afanasieva, K. (2015). The fractal globule model of interphase chromatin organization as revealed by comet assay. In: *XI International scientific conference for students and PhD students «Youth and progress of biology»*. Lviv: Ivan Franko National University of Lviv, p.11.
15. Афанасьєва, К., Чопей, М. та Сиволюб А. (2015). Хроматин у стані фрактальної глобули: підтвердження за допомогою кометного електрофорезу. В: *VI з'їзд*

Українського біофізичного товариства. Луцьк: Східноєвропейський національний університет імені Лесі Українки, с.38.

16. Шкель, О., Чопей, М. та Афанасьева, К. (2016). Вплив високих концентрацій інтеркалятора хлорокіну на стабільність петельних доменів хроматину. В: *XIV Міжнародна наукова конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «Шевченківська весна 2016: біологічні науки»*. Київ: Київський національний університет імені Тараса Шевченка, сс.214-216.
17. Lozovik, A., Chopei, M., Olefirenko, V. and Afanasieva, K. (2016). DNA loop domain organization in lymphocytes and lymphoblasts as revealed by comet assay. In: *XII International scientific conference for students and PhD students «Youth and progress of biology»*. Lviv: Ivan Franko National University of Lviv, p.18.
18. Chopei, M. and Afanasieva, K. (2016). Organization of interphase chromatin in different cell types. In: *Conference of young scientists «Urgent problems of biochemistry and biotechnology - 2016»*. Kyiv: The Ukrainian Biochemical Journal, 88(4), p. 124.
19. Chopei, M., Olefirenko, V. and Afanasieva, K. (2017). Redistribution of DNA loop domains during transcription activation and malignant transformation as revealed by comet assay. In: *Joint meeting of the 25th annual conference “Modern aspects of biochemistry and biotechnology” and 2nd Conference for young scientists of the division of biochemistry, physiology and molecular biology National Academy of Sciences of Ukraine*. Kyiv: The Ukrainian Biochemical Journal, 89(3), p.113.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	11
ВСТУП	12
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	19
1.1. Механізми формування петельних доменів ДНК в ядрах еукаріотів	19
1.1.1. Конститутивні петельні домени ДНК	19
1.1.2. Петельні домени хроматину як результат функціональної активності ядра	22
1.2. Методи дослідження петельних доменів	27
1.2.1. Флуоресцентна гібридизація <i>in situ</i>	27
1.2.2. Методи фіксації конформації хромосом	28
1.2.3. Метод імунопреципітації хроматину	32
1.2.4. Гель-електрофорез ізольованих клітин	34
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	37
2.1. Матеріали та обладнання	37
2.2. Виділення лімфоцитів шляхом зонального центрифугування	37
2.3. Підрахунок кількості клітин та оцінка їх життєздатності	38
2.4. Виділення ядер лімфоцитів та аналіз якості виділеної фракції	39
2.5. Бласттрансформація лімфоцитів. Оцінка ефективності бласттрансформації	40
2.6. Приготування препаратів та лізис клітин	41
2.7. Обробка нуклеодів інтеркаляторами та денатуруючими агентами	42
2.8. Гель-електрофорез ізольованих клітин (кометний електрофорез)	43
2.9. Візуалізація та аналіз результатів	44

2.10. Аналіз кінетичних графіків та статистична обробка даних	45
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	47
3.1. Механізми виходу двох типів петельних доменів ДНК, що мігрують при кометному електрофорезі	47
3.1.1. Кооперативність процесу формування електрофоретичного треку	47
3.1.2. Кінетика виходу ДНК із нуклеоїдів, отриманих з ізольованих клітинних ядер	56
3.2. Механізми фіксації основ петельних доменів ДНК	63
3.2.1. Вплив денатуруючих агентів на рівень виходу ДНК при кометному електрофорезі	63
3.2.2. Вплив інтеркалятора хлорокіну на рівень виходу ДНК при кометному електрофорезі	66
3.2.3. Кінетика виходу ДНК після попередньої обробки нуклеоїдів хлорокіном	69
3.2.4. Вплив ковалентних зшивок за допомогою формальдегіду на кінетику виходу ДНК	73
3.3. Кінетика виходу ДНК із нуклеоїдів, отриманих з бласттрансформованих лімфоцитів	77
3.4. Розподіл петельних доменів ДНК за розміром	89
3.4.1. Контурні розміри петель ДНК при обробці нуклеоїдів денатурантами і хлорокіном	90
3.4.2. Контурні розміри петель ДНК при кометному електрофорезі нуклеоїдів, отриманих з ізольованих ядер лімфоцитів	92
3.4.3. Контурні розміри петель ДНК при кометному електрофорезі нуклеоїдів, отриманих з бласттрансформованих лімфоцитів	94
3.4.4. Фрактальна глобула як модель організації хроматину в інтерфазному ядрі	97

РОЗДІЛ 4. УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ	104
ВИСНОВКИ	116
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	118
ДОДАТКИ	134

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

М.п.н.	-	мільйонів пар нуклеотидів
ПЛР	-	полімеразна ланцюгова реакція
СТМК	-	буфер сахароза-трис-магній-калій
ТБЕ	-	буфер трис-борат-EDTA
Т.п.н.	-	тисяч пар нуклеотидів
ChIA	-	chromatin interaction analysis (аналіз хроматинових взаємодій)
ChIP	-	chromatin immunoprecipitation (імунопреципітація хроматину)
CTCF	-	СССТС-зв'язуючий фактор
DAPI	-	4',6-діамідино-2-феніліндол
EDTA	-	етилендіамінтетраоцтова кислота
FISH	-	fluorescence <i>in situ</i> hybridization (флуоресцентна гібридизація <i>in situ</i>)
PET	-	paired-end tag sequencing (секвенування спарених кінців)

ВСТУП

Актуальність теми. В останні десятиліття внаслідок бурхливого розвитку нових методів дослідження з'являється все більше інформації стосовно структурної організації та функціонування клітинного ядра. Так, було з'ясовано важливі аспекти розташування інтерфазних хромосом в межах ядра [1-3]; отримано нові дані відносно механізмів компактизації хроматину на вищих рівнях його організації та динамічного характеру взаємодії між білковими компонентами хроматину (замість статичного ядерного матриксу) [4, 5]; визначено велику кількість білків та ділянок ДНК, що залучені в процесах регуляції транскрипційної активності клітини [6-8].

Багато нової інформації з'явилося також і відносно організації та механізмів формування петельних доменів ДНК. Було встановлено, що утворення петельних доменів є не лише важливим етапом компактизації молекул ДНК у клітинному ядрі, але також напряду пов'язано з важливими функціональними процесами, які там відбуваються (транскрипція та її регуляція, реплікація та репарація ДНК) [9-11]. На сьогоднішній день серед основних способів утворення петель виділяють наступні: конститутивне закріплення ділянок хроматину на білках ядерної ламіни або інших білкових компонентах ядра, випетлювання в результаті організації транскрипційних фабрик чи ДНК-полімеразних комплексів, об'єднання енхансера та промотора за допомогою факторів регуляції транскрипції, взаємодії між інсуляторними елементами та багато інших [7-9, 12-14]. Враховуючи таку різноманітність механізмів формування петель ДНК, виділяють різні типи петельних доменів, що відрізняються між собою за розмірами, стабільністю та функціональним значенням [15, 16]. Більше того, кількість петельних доменів та сам факт їх появи залежать від типу клітин, їх транскрипційної активності чи стадії диференціації [11, 17, 18]. Описано також велику кількість білків, що можуть

брати участь у закріпленні основ петель хроматину, та специфічних ділянок ДНК, з якими вони взаємодіють [8-10, 17].

Однак, незважаючи на таке різноманіття наявних даних стосовно організації та формування петельних доменів, досі залишаються недостатньо дослідженими біофізичні аспекти закріплення та стабілізації петель ДНК (фізична природа міжмолекулярних взаємодій в основах петель та чутливість цих взаємодій до впливу зовнішніх факторів). Окрім цього, наразі відсутня детальна порівняльна характеристика петель ДНК (частка різних типів петельних доменів, рівень їх надспіралізації, розміри та розташування в межах ядра) для клітин з різною транскрипційною активністю. Така інформація є необхідною для розуміння специфіки проходження важливих фундаментальних процесів у ядрі і, особливо, способів їх регуляції. До того ж, виявлення відмінностей у організації, стабільності та різноманітності петельних доменів може бути передумовою для визначення способів дискримінації клітин з нормальним проходженням функціональних процесів та таких, у яких ці процеси порушені (як наприклад, при онкологічній трансформації).

Дана дисертація присвячена з'ясуванню питань організації петельних доменів ДНК у клітинах з різною транскрипційною активністю (неактивні та активовані лімфоцити людини). Серед досліджених питань - ідентифікація та кількісна характеристика різних типів петель ДНК, що присутні в клітинах, визначення рівня надспіралізації, розмірів та стабільності петельних доменів за умов дії різноманітних чинників. Проведені дослідження є важливими для розуміння ключових аспектів просторової організації клітинного ядра у взаємозв'язку з проходженням функціональних процесів у ньому, а також є перспективним для розробки нових підходів для визначення порушень у перебігу цих процесів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами. Робота була виконана на кафедрі загальної та медичної генетики Навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини» Київського

національного університету імені Тараса Шевченка у рамках бюджетних науково-дослідних тем №11БФ036-01 «Механізми реалізації адаптаційно-компенсаторних реакцій організму за умов розвитку різних патологій» (2011-2015 рр., № державної реєстрації 0111U004648) та № 16БФ036-01 «Механізми регуляції метаболічних процесів в організмі за умов розвитку патологічних станів» (2016-2018 рр. № державної реєстрації 0116U002527).

Мета і завдання дослідження. Метою роботи було встановити закономірності організації петельних доменів хроматину у інтактних та активованих лімфоцитах та визначити характер взаємодій, які забезпечують закріплення основ таких петельних доменів. Відповідно до мети вирішувались наступні *завдання*:

1. Дослідити кінетику міграції петельних доменів ДНК при кометному електрофорезі нуклеодів, отриманих із інтактних лімфоцитів людини, та з'ясувати механізми кооперативності виходу ДНК.
2. Дослідити особливості кінетики міграції петельних доменів ДНК при кометному електрофорезі нуклеодів, отриманих з ізольованих ядер лімфоцитів.
3. Дослідити вплив денатуруючих агентів (сечовина, додецилсульфат натрію) на стабільність взаємодій, які забезпечують закріплення основ петельних доменів, що мігрують при кометному електрофорезі.
4. Дослідити вплив сполук, що інтеркалюють в ДНК (хлорокін), а також ковалентних зшивок формальдегідом, на стабільність взаємодій, які забезпечують закріплення основ петельних доменів.
5. Визначити особливості кінетики міграції петельних доменів ДНК при кометному електрофорезі нуклеодів, отриманих із бласттрансформованих лімфоцитів людини на різних стадіях клітинного циклу.
6. Для всіх досліджених типів клітин проаналізувати можливий зв'язок між часткою ДНК, що здатна мігрувати під час електрофорезу, і розмірами петельних доменів.

Об'єкт дослідження – петельні домени ДНК.

Предмет дослідження – міграція цих доменів при кометному електрофорезі.

Методи дослідження. Зональне центрифугування в градієнті щільності та високошвидкісне центрифугування в градієнті сахарози (виділення лімфоцитів та виділення ядер лімфоцитів), вестерн-блот-аналіз (перевірка якості ядерної фракції), культивування клітин, цитологічні та цитогенетичні методи, проточна цитофлуориметрія (отримання бласттрансформованих лімфоцитів та оцінка ефективності бласттрансформації), гель-електрофорез ізольованих клітин (кометний електрофорез) (дослідження організації петельних доменів ДНК), флуоресцентна мікроскопія, методи математичної статистики.

Наукова новизна отриманих результатів. У дисертаційній роботі:

- вперше здійснено порівняння кінетики виходу ДНК при кометному електрофорезі нуклеодів, отриманих з клітин лімфоцитів і їх ізольованих ядер, та визначено особливості цієї кінетики, пов'язані з відмінностями мікрооточення всередині нуклеодів;
- вперше зареєстровано кінетику виходу петель ДНК при кометному електрофорезі для бласттрансформованих лімфоцитів людини після 24 та 44 годин активації та виявлено чіткі відмінності порівняно з інтактними лімфоцитами;
- вперше проаналізовано контурні розміри петельних доменів, що мігрують на різних етапах електрофорезу з нуклеодів різних типів;
- показано, що фрактальна глобула як модель організації інтерфазного хроматину є справедливою також для масштабів в декілька десятків тисяч пар нуклеотидів.

Практичне значення отриманих результатів. В ході даної роботи було адаптовано кінетичний підхід для аналізу як частки петель ДНК, що мігрують при коетному електрофорезі, так і розмірів таких доменів, що виходять до аноду на різних етапах електрофорезу. Було встановлено, що одночасний аналіз обох параметрів може бути використаний для дослідження важливих аспектів просторової організації хроматину у клітинному ядрі.

Виявлені відмінності у кінетиці виходу ДНК при електрофорезі із використанням різних типів нуклеодів або різних варіантів їх попередньої обробки надають важливу інформацію стосовно кількості різних типів петельних доменів у досліджуваних клітинах, особливостей їх організації та стабілізації за допомогою білкових компонентів ядра, рівня їх надспіралізації та контурних розмірів.

Отримані результати із застосуванням кінетичного підходу методу коетного електрофорезу можуть бути надалі використані для розробки методик для визначення рівня транскрипційної активності клітин, а також для дискримінації між клітинами з різним рівнем активності. Розроблена у роботі методика коетного електрофорезу з використанням ізольованих клітинних ядер буде корисною для розширення спектру клітин, які можна досліджувати за допомогою коетного електрофорезу.

Особистий внесок здобувача. Здобувачем особисто було отримано більшість експериментальних даних, що представлені в даній дисертації. Автор самостійно здійснювала обробку та первинний аналіз одержаних результатів, аналіз наукової літератури за темою дисертації. Формулювання теми роботи, планування експериментів та інтерпретація отриманих результатів, підготовка та написання наукових статей було здійснено спільно з науковим керівником д.б.н., проф. А. В. Сиволобом та доцентом кафедри загальної та медичної генетики, к.б.н. К. С. Афанасьєвою. Частина експериментів виконано спільно з іншими співавторами публікацій.

Апробація матеріалів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи були представлені на наукових конференціях: X Всеукраїнська наукова конференція студентів та молодих науковців «Біологічні дослідження молодих вчених в Україні» (28-29 жовтня 2010 року, Київ, Україна); IX Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології» приуроченої до 150-річчя від дня народження академіка В. Вернадського (16-19 квітня 2013 року, Львів, Україна); 38th FEBS congress «Mechanisms in biology» (July 6-11, 2013, St. Petersburg, Russia); X Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології» (8-11 квітня 2014 року, Львів, Україна); XI Український біохімічний конгрес (6-10 жовтня 2014 року, Київ, Україна); XI Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології» (20-23 квітня 2015 року, Львів, Україна); VI з'їзд Українського біофізичного товариства (28-30 травня 2015 року, Луцьк-Світязь, Україна); XIV Міжнародна наукова конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «Шевченківська весна 2016: біологічні науки» (6-8 квітня 2016, Київ, Україна); XII Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології» (19-21 квітня 2016 року, Львів, Україна); Conference of young scientists «Urgent problems of biochemistry and biotechnology - 2016» (26-27 May 2016, Kyiv, Ukraine); Joint meeting of the 25th annual conference «Modern aspects of biochemistry and biotechnology» and 2nd Conference for young scientists of the division of biochemistry, physiology and molecular biology National Academy of Sciences of Ukraine (6-9 June 2017, Kyiv, Ukraine).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 19 наукових праць, з яких 7 статей у фахових періодичних виданнях та 12 тез доповідей у збірниках матеріалів наукових конференцій та з'їздів. Серед статей, опублікованих за темою дисертації, 5 надруковано в журналах, що відображені у наукометричній базі даних Scopus, причому два журнали мають імпаکت-фактори на рівні 2,5 та 5,1.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається з анотації, вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів досліджень та їх обговорення, узагальнення отриманих результатів, висновків, списку використаних джерел, який складається з 146 найменувань, та додатків. Дисертаційна робота викладена на 139 сторінках машинописного тексту (з яких основна частина займає 133 сторінки), ілюстрована 25 рисунками та містить 1 таблицю.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Механізми формування петельних доменів ДНК в ядрах еукаріотів

Петельні домени ДНК є найвищим рівнем організації інтерфазного хроматину в ядрах еукаріотів. Утворення хроматинових структур забезпечує значну компактизацію лінійної ДНК, що дозволяє упакувати близько 2 м ДНК в ядро діаметром 10 мкм [19, 20]. Однак, в інтерфазному ядрі відбувається велика кількість ДНК-залежних процесів (транскрипція, реплікація ДНК, її репарація та ін.), що вимагає доступу різноманітних факторів до тих чи інших ділянок ДНК (особливо до регуляторних елементів) у відповідні проміжки часу. Тому петельні домени є не просто структурними компонентами ядра, а його динамічним функціональними елементами, і, враховуючи різноманітність функціональних процесів у ядрі та способів їх регуляції, можлива велика кількість механізмів формування петель ДНК [8-12].

1.1.1. Конститутивні петельні домени ДНК. В інтерфазному ядрі хромосоми займають чітко визначені окремі регіони – так звані хромосомні території. При цьому хромосоми в межах ядра розташовуються не випадково. Так, схожі за розміром та щільністю генів хромосоми мають тенденцію розташовуватися поряд у ядерному просторі: короткі хромосоми з високою щільністю генів групуються разом біля центру ядра, тоді як довші хромосоми з меншою щільністю генів частіше локалізуються на його периферії [1-3, 19, 21]. Хромосомні території є динамічними та пластичними структурами; окремі хромосомні регіони можуть динамічно репозиціонуватися [19, 22, 23]. На поверхні хромосомних територій виділяють чіткі межі із власною територією з однієї сторони, та міжхромосомним простором, що містить транскрипційну машинерію, з іншої. Таким чином, неактивні гени, загалом, мають тенденцію

розташовуватися у внутрішніх ділянках хромосомних територій, тоді як активні гени зазвичай концентруються вздовж периферії близько до міжхромосомного простору [1, 3, 24].

Внутрішня сторона ядерної оболонки вистелена філаментною сіткою з білків ламінів, яка називається ядерною ламіною. Білки ламіни (ламін А, ламін В1 та ламін В2), а також трансмембранні білки ядерного комплексу і білки ядерних пор (нуклеопорин), взаємодіють з великою кількістю різноманітних компонентів ядра, а саме – з ДНК, білками хроматину (наприклад, з гістонами), епігенетичними маркерами на хроматині та транскрипційними регуляторами [25].

Неактивні ділянки ДНК (гетерохроматин), що локалізується саме на периферії ядра, прямо (через центромери, теломери чи специфічні послідовності) або опосередковано через ламін-асоційовані білки (корові гістони, особливо H2A та H2B) взаємодіють з ядерною ламіною. Така асоціація зумовлює організацію специфічних хроматинових доменів. [16, 25, 26]. Були ідентифіковані великі ламін-асоційовані домени (0,1-10 мільйонів пар нуклеотидів (м.п.н.)), що розглядаються як гетерохроматинові і характеризуються низькою щільністю генів та відсутністю транскрипції. У деяких популяціях клітин майже половина геному організована у такі домени [27]. Однак, незважаючи на те, що даний тип петельних доменів є одним із найстабільніших, під час диференціації клітин деякі з цих доменів можуть втрачати зв'язок з ядерною ламіною, а інші ділянки ДНК, навпаки, – набувати. При цьому такі зміни узгоджуються із зміною профілю експресії генів, коли активовані гени рухаються всередину ядра, а інактивовані знаходять у нових ламін-асоційованих доменах [28]. Таким чином, ядерна ламіна служить місцем для заякорювання великих ділянок хроматину та забезпечує взаємодію розкиданих по геному гетерохроматинових локусів на периферії ядра. Даний тип петель забезпечує здебільшого структурну функцію – компактизацію неактивних ділянок ДНК. Ці петлі є досить стабільними, але при необхідності

(наприклад, при активації генів у відповідних ділянках) можлива їх реорганізація [15, 28].

Білок ядерних пор нуклеопорин безпосередньо не взаємодіє з ДНК, але він може зв'язуватися як з транскрипційними факторами (тобто взаємодіяти з активним хроматином), так і з епігенетичним маркерами сайленсингу, зумовлюючи організацію гетерохроматину [25]. Трансміембранні білки ядра, як і ламіни, можуть безпосередньо взаємодіяти з ДНК, однак більшість з них зв'язується опосередковано через хроматинові чи хроматин-асоційовані білки. Наприклад, рецептор ламіну В взаємодіє безпосередньо з коровими гістонами H3/H4, або може зв'язувати гетерохроматинові ділянки через пряму взаємодію з HP1 α і HP1 γ . Інші три трансміембранні білки (LAP2, емерин та MAN1), що формують LEM-домен, взаємодіють з хроматином через білок BAF (barrier-to autointegration factor), який зв'язаний ковалентно з молекулою ДНК. Даний білок BAF, окрім забезпечення зв'язків між хроматином і ядерною оболонкою, також бере участь у компактизації ДНК за рахунок стимулювання утворення петельних доменів [25, 29-31].

Гетерохроматинові локуси можуть концентруватися не лише на периферії ядра, але й також у інших суб'ядерних структурах, таких як ядерця. Ядерця – це підструктури у ядрі, призначені для експресії генів РНК-полімеразою I. Вони формуються навколо кластерів рибосомальних генів із декількох різних хромосом. Однак, окрім таких активних генів, у цих локусах були також виявлені неактивні гени РНК-полімерази II. При цьому теж формуються петельні домени (так звані ядерце-асоційовані домени), розміри яких співставні з розмірами ламін-асоційованих петель. Таким чином, і ядерна ламіна, і ядерця служать як структури, де гетерохроматинові локуси, що локалізовані на різних хромосомах, концентруються разом, формуючи спеціалізовані суб'ядерні структури [16, 32]. Такі структури є місцями фіксації петельних доменів, які є досить стабільними і можуть реорганізовуватися лише коли розташовані там гени стають активними в ході диференціації клітини.

За допомогою мікроскопії було показано, що і в інших частинах хромосом містяться чіткі структурні петельні домені, розміром від близько 100 тисяч пар нуклеотидів до декількох мільйонів пар нуклеотидів. Такі домени спостерігали на межі хромосомних територій, де вони випетлювалися у міжхромосомний простір [33]. Пізніше, за допомогою даних методів Ні-С та 5С такі петельні домени були також виявлені і в інших ділянках хромосомних територій, де вони існують на рівні з великими петельними доменами (гетеро- чи еухроматиновими) [14, 34, 35]. Такі домени були визначені як топологічно асоційовані домени, що характеризуються чітко вираженою довготривалою взаємодією між локусами, розташованими у тому ж самому домені, або рідше – в сусідніх доменах. Таким чином, хромосоми укладаються в серію доменів, що топологічно відділені один від одного. Окрім цього, гени, що розташовані в межах одного топологічно асоційованого домену, переважно мають скоординовану динаміку експресії протягом диференціації, підкреслюючи цим роль таких петель у координації активності групи сусідніх генів [14, 15]. Також знайдено докази ключової функціональної ролі даних петельних доменів і при реплікації ДНК [33]. Нещодавно було виявлено, що ділянки фіксації таких петель можуть бути збагачені, наприклад, сайтами початку транскрипції чи сайтами зв'язування для білка CTCF (CCCTC-зв'язуючий фактор) – архітектурного білка, що задіяний у різноманітних функціональних процесах в ядрі [6, 16]. Такі дані вказують на те, що топологічно асоційовані домени є досить неоднорідною групою петель ДНК, що включає як конститутивні петлі хроматину, так і петельні домени, які утворюються в результаті функціональних процесів у ядрі [16].

1.1.2. Петельні домени хроматину як результат функціональної активності ядра. Як було зазначено раніше, петлі ДНК можуть також утворюватися внаслідок перебігу різноманітних функціональних процесів у ядрі [10, 11, 17]. Дуже часто виникнення петельних доменів відбувається при активації чи репресії транскрипції або безпосередньо при її проходженні. Так,

транскрипція в еукаріотичному ядрі просторово організована в чітко виражені ядерні структури, де кратна кількість РНК-полімераз та активних генів (2 і більше) динамічно колокалізуються разом у так звані «транскрипційні фабрики». Утворення таких транскрипційно активних субкомпартментів, очевидно, забезпечує більш ефективне проходження транскрипції за рахунок концентрації усіх молекулярних учасників, реагентів та ДНК-субстратів в обмеженому просторі ядра [7, 9, 36]. Так, наприклад, ядра клітин HeLa містять 1 мкМ РНК-полімерази II, але всі транскрипти синтезуються в межах транскрипційних фабрик, де локальна концентрація приблизно в 1000 разів вища [9, 37].

Транскрипція рибосомальних генів за допомогою РНК-полімерази I відбувається у сильно консервативних і високо організованих ядерних субструктурах, що називаються ядерцями і представляють класичний приклад транскрипційної кластеризації у «фабричні» структури. Однак, більшість білок-кодуєчих генів транскрибуються за допомогою РНК-полімерази II, і нещодавні відкриття підтверджують моделі, які передбачають, що проходження транскрипції за допомогою цієї полімерази теж відбувається в аналогічних фабриках. Подальші дослідження встановили, що транскрипційні фабрики є великими і відносно фіксованими білковими структурами, кількість яких варіює в залежності від типу клітини та морфології ядра, а активні гени динамічно локалізуються у фабриках для експресії у визначені проміжки часу [7, 9, 38].

Існує щонайменше два загальні механізми, для формування петельних доменів за допомогою транскрипційної машинерії. Один з них діє тимчасово за рахунок приєднання транскрипційних факторів. Інший механізм більш довготривалий і передбачає збільшення розмірів активних полімеразних комплексів, що можуть містити мультисубодиничний фермент, РНК, яка синтезується, а також різноманітні асоційовані білки. Кожна транскрипційна фабрика містить лише один тип полімерази, а також характеристичний набір унікальних білків. Так, наприклад, фабрики РНК-полімерази II містять дві або

більше копії ферменту, загальний набір транскрипційних факторів, білок CTCF, репресуючі гістон-метилтрансферази, ДНК-топоізомерази та ін. При цьому дуже часто гени, задіяні в одному біохімічному каскаді колокалізуються і котранскрибуються в межах однієї транскрипційної фабрики [7, 9, 39-41].

Сусідні транскрипційні одиниці приєднуються до тієї ж самої фабрики, формуючи петельні домени, а приєднання декількох найближчих сусідів призводить до утворення чітких розеткових структур. Активні РНК-полімерази є головними зв'язуючими білками, що фіксують такі петельні домени [9, 42]. Різноманітні фактори зазвичай додатково стабілізують петлі, але можуть також забезпечувати їх формування за відсутності полімерази, або якщо вона неактивна. У клітинах, де взагалі відсутня транскрипційна активність (наприклад, сперматозоїди людини) постає потреба у присутності додаткових нейтралізуючих білків для упаковки ДНК [9]. Отже, утворення транскрипційних фабрик і формування таким чином петельних доменів є не лише зручним шляхом для оптимізації та збільшення ефективності процесу транскрипції, але й також важливим фактором компактизації хроматину.

Ще однією рушійною силою, що забезпечує утворення петельних доменів ДНК посередництвом транскрипції, є необхідність взаємодії віддалених регуляторних елементів (енхансери, сайленсери) з промоторами [8]. Енхансери – це регуляторні послідовності ДНК, що забезпечують активацію транскрипції. Вони зазвичай знаходяться на великих відстанях від промоторів, яких вони регулюють, а часом навіть і в інших хромосомах. Для ініціації транскрипції необхідна фізична взаємодія між енхансером і промотором, що відбувається за рахунок зв'язування специфічних до послідовностей транскрипційних факторів, які з'єднують обидва регуляторні елементи, а також міцно взаємодіють один з одним. Таким чином енхансер наближується до промотора гена, який він регулює, що в свою чергу часто колокалізований у транскрипційній фабриці [43-45]. При цьому ділянки ДНК, що знаходяться між енхансером і промотором та часто є досить великими за розміром, будуть формувати петельні домени, зафіксовані на транскрипційних фабриках [9, 46].

Механізм дії сайленсера може полягати, наприклад, у приєднанні промотора однієї полімерази до транскрипційної фабрики іншої, де він буде неактивним. Проміжки між цими регуляторними послідовностями також можуть формувати петельні домени [7].

Енхансер-блокуючі інсулятори також відіграють важливу роль в регуляції транскрипційної активності та формуванні петельних доменів. Такі елементи послідовності перешкоджають взаємодії відповідних енхансера та промотора, що робить неможливою ініціацію транскрипції відповідного гена. При цьому енхансер-блокуючі інсулятори або взаємодіють один з одним, або приєднують хроматинову фібрилу до структурних елементів ядра. В обох випадках відбувається формування петельних доменів ДНК, в яких енхансер і промотор будуть розділені просторово [47]. Отже, при дії регуляторних елементів транскрипції відбувається не лише її активація чи інактивація, але й компактизація ДНК за рахунок формування динамічних петельних доменів.

Останнім часом за допомогою новітніх методів дослідження було встановлено, що важливу роль у формуванні петельних доменів ДНК відіграє білок CTCF (CCCTC-зв'язуючий фактор). Даний архітектурний білок забезпечує координацію структурної організації генів та їх регуляторних елементів за рахунок формування внутрішньо- та міжхромосомних взаємодій, що призводить до утворення і стабілізації петельних доменів ДНК. CTCF дуже консервативний для різних видів організмів і є ключовим фактором при регуляції активності генів, взаємодії інсуляторних елементів та визначенні меж петель ДНК [6, 48].

Білок CTCF зв'язується з ДНК в специфічних сайтах, що розкидані по всьому геному, та прямо чи опосередковано взаємодіє з білками, які задіяні у різноманітних функціональних процесах в ядрі. Так, даний білок бере участь у регуляції транскрипції (активація/репресія промоторів, блокування енхансерів), розділення активних і неактивних ділянок хроматину (взаємодія з бар'єрними інсуляторами), сайленсинг генів та ін. Результатом таких взаємодій є утворення великої кількості тимчасових функціональних петельних доменів ДНК [6].

Нещодавно було виявлено, що білок CTCF забезпечує не лише стабілізацію великої кількості петель ДНК, але також визначення їх меж. На стадії інтерфази клітинного циклу CTCF часто утворює комплекс з білком когезином. При цьому білок CTCF взаємодіє з ДНК в специфічних для нього сайтах зв'язування, а когезин замикається в кільце навколо подвійної спіралі в межах цих сайтів. Два такі комплекси можуть взаємодіяти між собою (взаємодія відбувається між когезинами), формуючи при цьому петельний домен. Стабільність такої петлі буде залежати від взаємного розташування двох CTCF-специфічних послідовностей ДНК. У випадку, коли дві послідовності орієнтовані конвергентно (напрявлені одна до одної) буде формуватися стабільний петельний домен ДНК [48-51].

Петельна організація хроматину зберігається також в період реплікації ДНК протягом S-фази клітинного циклу. Так, геномні карти високої роздільної здатності для періоду реплікації показують наявність петельних доменів розміром від 100 тисяч пар нуклеотидів (т.п.н.) до 1 мільйона пар нуклеотидів (м.п.н.) в ділянках ранньо- та пізньо-реплікованої ДНК. Ранньо-репліковані домени в основному містять активні гени, тоді як пізньо-репліковані петлі - переважно транскрипційно неактивні [15, 20, 52, 53]. У відповідності із загальною низькою щільністю генів та низьким рівнем транскрипції, такі пізньо-реплікативні домени мають тенденцію концентруватися на периферії ядра разом із ламін-асоційованими петлями [54].

Петельні домени періоду реплікації є досить стабільними фундаментальними структурами хромосомної організації. Так, при блокуванні реплікації в певних хромосомах чи їх ділянках там спостерігають досить масштабну структурну реорганізацію. Однак, приблизно в 50% геному такі петлі не ідентифіковані, що може бути пов'язано із транскрипційним станом таких ділянок [15, 55].

Таким чином, еу- та гетерохроматин (функціонально активні і неактивні ділянки хроматину) мають свої механізми формування та фіксації петельних доменів. Ці петлі можуть відрізнитися за розмірами чи стабільністю фіксації, а

при необхідності можлива також їх реорганізація. Спільною рисою таких хроматинових доменів є те, що їх формування здебільшого пов'язане із колокалізацією ділянок ДНК, які подібні за своєю активністю чи функціональністю.

1.2. Методи дослідження петельних доменів

Встановлення механізмів формування петельних доменів хроматину та визначення особливостей взаємодії ДНК з білками, які беруть в цьому участь, є дуже важливим не лише для розуміння трьохвимірної організації ДНК, а й для вивчення різноманітних процесів, що відбуваються в ядрі (транскрипція, реплікація, сайленсинг чи активація відповідних ділянок хроматину, регуляція цих функцій та ін.). Враховуючи всю різноманітність способів утворення петель в залежності від їх типу та функціонального призначення, використовуються різноманітні методики, розроблені чи адаптовані для таких досліджень. Серед найбільш сучасних та часто використовуваних підходів можна назвати такі, як група методів фіксації конформації хромосом (chromosome conformation capture - 3C, 4C, 5C та Hi-C), флуоресцентна гібридизація *in situ* (FISH – fluorescence in situ hybridization), імунопреципітація хроматину (ChIP assay - Chromatin Immunoprecipitation), метод гел-електрофорезу ізольованих клітин (single-cell gel electrophoresis) та інші [10, 56]. Така різноманітність методик дозволяє різнобічне дослідження особливостей формування та функціонування петельних доменів хроматину.

Одним з найголовніших питань, що постають при вивченні хроматинових доменів, є питання про природу білків та специфічних ділянок ДНК, які беруть участь у формуванні петель, тобто, які саме ключові елементи задіяні в цьому процесі. Відповідь на це питання можна отримати за допомогою таких методів, як ChIP, FISH, 3C, 4C, 5C та Hi-C.

1.2.1. Флуоресцентна гібридизація *in situ*. Досить потужним методом дослідження організації ядра є флуоресцентна гібридизація *in situ*. Даний підхід використовується для визначення наявності чи відсутності, а також локалізації специфічних послідовностей ДНК в межах ядра. При цьому використовують флуоресцентно мічені зонди РНК чи ДНК, що приєднуються лише до тих ділянок ДНК, з якими в них найбільший ступінь комплементарності. Після цього проводиться детекція за допомогою флуоресцентної мікроскопії [57].

За допомогою такого підходу, як багатоколірна флуоресцентна гібридизація *in situ* (multicolor FISH), коли використовувалися різні зонди для кожної хромосоми, було отримано прямі докази існування хромосомних територій в ядрі [58]. Окрім цього, FISH використовується також для визначення локалізації генів з різною транскрипційною активністю в межах хромосомних територій. Так, було показано, що гени, які активно транскрибуються, зазвичай випетлюються за межі їх хромосомних територій, а транскрипційно неактивні гени розташовуються переважно ближче до периферії [56]. Також за допомогою FISH було виявлено, що гени, розташовані далеко один від одного, при їх коактивації (наприклад, гени одного біохімічного каскаду) будуть колокалізуватися поряд, а це і є одним з механізмів формування петельних доменів хроматину [59]. Тобто, такі дані дозволяють визначати, які конкретно ділянки геному беруть участь у формуванні петель ДНК, і де саме в межах хромосомних територій такі петлі будуть розташовані. Однак, оскільки FISH вимагає фіксації клітин, за допомогою цього методу не можна достовірно встановити, чи є детектовані контакти загальною характеристикою клітин даного типу, чи це лише ті взаємодії, що були присутні в клітині у момент фіксації [56, 60]. Тому для отримання більш точних даних даний метод має використовуватися у комбінації з іншими підходами.

1.2.2. Методи фіксації конформації хромосом. Візуалізаційні підходи не дозволяють провести детальний аналіз 3D укладки на рівні всього геному чи

визначити організацію усієї хромосоми в межах її території з роздільною здатністю 1 т.п.н. Тому останнім часом були розроблені і широко впроваджені нові підходи для кількісного визначення взаємодій між дистантними ділянками ДНК, що базуються на технології фіксації конформації хромосом (chromosome conformation capture, 3C), які дозволяють картування укладки хромосом з роздільною здатністю, достатньою, щоб детектувати окремі гени та регуляторні елементи, які можуть взаємодіяти в масштабі цілого геному. В оригінальному протоколі, представленому Dekker та ін. [61], інтактні ядра ізолюють і піддають фіксації за допомогою формальдегіду, який ковалентно «пришиває» білки до інших білків чи ДНК. Загалом, в результаті цього отримують зшивки сегментів геному, які були фізично об'єднані за рахунок ДНК-білкових взаємодій. Після цього проводиться детекція відносної частоти, з якою різні сайти контактують. Такий аналіз повногеномних частот взаємодій надає інформацію про загальну організацію ядра, а також фізичні властивості конформацій хромосом [61, 62].

Для кількісного визначення частот взаємодій, після фіксації хроматин обробляється або набором з шести рестрикційних ферментів, таких як HindIII, BamHI і EcoRI, або чотирма ферментами, серед яких - DpnII, MboI та CspBI. Далі проводять лігування при дуже низьких концентраціях ДНК. За таких умов лігування з'єднаних внутрішньомолекулярних фрагментів є набагато ймовірнішим, ніж лігування випадкових міжмолекулярних фрагментів. Після цього ковалентні зшивки руйнуються, а окремі продукти лігування детектуються за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), використовуючи локус-специфічні праймери. В якості контрольного зразка використовують матрицю з усіма можливими продуктами лігування в рівних кількостях. Частота взаємодій двох специфічних локусів визначається за допомогою кількісної ПЛР, як співвідношення між кількістю продукту, отриманого з матриці після зшивок формальдегідом, до кількості продукту, отриманого з контрольної матриці. Ця частота буде прямо пропорційною до частоти, з якою два відповідні геномні сайти взаємодіють [56, 61].

Традиційний 3С підхід фіксує лише взаємодії «одна-до-одної», коли ген інтересу досліджується на рахунок взаємодій з можливими партнерами з найближчого оточення. Однак, у багатьох випадках немає чіткого визначення, де саме в межах геному знаходяться такі сайти взаємодій. Метод замкнутої фіксації конформації хромосом (circularized chromosome conformation capture, 4C), що базується на основі 3С процедури, дозволяє обрати конкретний регіон для визначення нових ділянок взаємодій. Суть методу полягає в тому, що після фіксації формальдегідом та обробки ферментами, аналогічно як і при 3С аналізі, після лігування також утворюються ще й циркулярні петлі ДНК. Далі проводиться інвертована ПЛР, у якій використовуються праймери, що дозволяють ампліфікувати всі невідомі послідовності, які були приєднані до визначеного регіону. Після цього продукти ампліфікації піддаються секвенуванню або дослідженню за допомогою ДНК-біочіпів [56, 63, 64]. Таким чином, метод 4C дозволяє встановлювати профілі взаємодії для окремих локусів, які можуть бути співставлені з профілями сайтів, гіперчутливих до ДНКаз I (які є маркерами регуляторних елементів генів) чи з самими генами [62].

Для аналізу всіх контактів між будь-якими двома точками в межах однієї великої ділянки геному було розроблено методику фіксації конформації хромосом «під копірку» (chromosome conformation capture carbon copy, 5C). Цей метод дає змогу створювати матрицю частот взаємодій, використовуючи олігонуклеотидні пари (праймери для інвертованої ПЛР), які комплементарні до кожного сайту лігування між 3С фрагментами, що взаємодіють. Після ампліфікації, реєстрація контактів за допомогою ДНК-біочіпів чи найновіших методів секвенування дає змогу створити тривимірну карту організації великих ділянок геному з високою роздільною здатністю. Метод 5C є досить потужним, оскільки з його допомогою теоретично можна виміряти ефективність взаємодії між будь-якими двома сайтами. Проте, використання його в повногеномних дослідженнях практично неможливе через велику вартість необхідних олігонуклеотидів [56, 65, 66].

Подібний до 5С, але ще більш потужний метод Ні-С дозволяє створити матрицю частот взаємодій «всі-до-всіх» в межах всього геному. Етапи фіксації та обробки ферментами є схожими на такі в базовому протоколі 3С. Проте, після розрізання, рестрикційні кінці мітяться біотин-міченими нуклеотидами, які після лігування по тупим кінцям можуть бути розділені для подальшого високопродуктивного секвенування. Це знімає необхідність створення специфічних олігонуклеотидних пар, а також збільшує роздільну здатність до приблизно 1 м.п.н. Однак, подальше збільшення роздільної здатності Ні-С є ускладненим, оскільки, лише десятикратне збільшення вимагає зростання глибини секвенування (кількість разів, які нуклеотид буде прочитаний протягом процесу секвенування) приблизно в 100 разів. Так як метод Ні-С дозволяє масштабування лише на рівні 1 м.п.н., кореляція із специфічними генами чи епігенетичними маркерами залишається нереалістичною. Незважаючи на це, Ні-С є досить потужним інструментом для дослідження хромосомних територій та компартменталізації геному [56, 66, 67].

Протокол *in situ* Ні-С – найбільш сучасна модифікація методик фіксації конформації хромосом. В цьому випадку процеси рестрикції та лігування проводяться безпосередньо в інтактному ядрі. Така модифікація забезпечує зниження частоти помилкових контактів внаслідок випадкового лігування і дозволяє масштабування на рівні тисяч пар нуклеотидів (має значно вищу роздільну здатність, ніж класична методика Ні-С [17].

Результати, отримані за допомогою методів фіксації конформації хромосом дозволяють не лише встановити частоти взаємодій тих чи інших ділянок ДНК з білками, але й проаналізувати, які з цих взаємодій беруть участь в формуванні петельних доменів хроматину. Так, коли при використанні 3С методики отримують взаємодію між двома віддаленими в просторі ділянками хроматину з частотою, вищою ніж очікувана, то це свідчить на користь саме формування петель при таких контактах. Загалом, було виявлено, що частота взаємодій експоненційно знижуються при збільшені відстані між локусами. Тому, в багатьох дослідженнях контакти, що беруть участь у формуванні

петель, вважаються такими, якщо їх локальні піки є набагато вищими, ніж загальний вихідний рівень інших взаємодій. Окрім цього, порівняння профілів взаємодій, отриманих з різних клітин або за різних умов, може забезпечити подальше підтвердження (в тому числі, і статистичне), що це дійсно взаємодії, які забезпечують формування петель, якщо такі великомасштабні контакти є специфічними для типу клітин чи відповідних умов [62].

1.2.3. Метод імунопреципітації хроматину. Імунопреципітація хроматину (chromatin immunoprecipitation, ChIP) є важливою та найбільш використовуваною методикою для дослідження ДНК-білкових взаємодій *in vivo*. В даній процедурі ДНК-білкові контакти в хроматині ковалентно зшиваються за рахунок обробки формальдегідом, після чого відбувається фрагментація хроматинових фібрил (зазвичай за допомогою ультразвуку, що випадково розрізає хроматин на фрагменти в декілька сотень пар нуклеотидів). На наступному етапі відбувається імунопреципітація білків, які зв'язані з хроматином, з використанням антитіл до цільових білкових факторів. Далі проводять зняття крос-лінків та детекцію [68, 69]. Фрагменти ДНК, на яких були знайдені сайти взаємодії відповідних білків, можуть бути визначені під час кількісної ПЛР, або картовані в масштабах всього геному за допомогою ДНК-біочіпів [69].

Метод імунопреципітації хроматину найчастіше використовують для виявлення сайтів зв'язування різноманітних транскрипційних факторів. Проте, дана методика надає лише лінійну інформацію про сайти приєднання білків вздовж хромосоми. В той же час, метод 3C дає можливість аналізувати великомасштабні взаємодії хроматину, які передбачають формування петельних доменів. Однак, через високий рівень фонових шумів, а також низьку роздільну здатність більшості методів фіксації конформації хромосом, вони не можуть використовуватися в масштабах цілого геному. Тому було розроблено методики, що поєднують протоколи методів імунопреципітації хроматину та фіксації конформації хромосом [69-71].

Так званий ChIP-3C метод (або ChIP-loop) знайшов своє застосування при дослідженні формування петель хроматину, як механізмів, за допомогою яких важливі білки можуть регулювати різноманітні клітинні функції, такі як транскрипція генів. Даний протокол передбачає обробку формальдегідом та рестриктазами, аналогічно як і при 3C методі, після чого проводиться імунопреципітація хроматину за допомогою антитіл. Впровадження цього етапу дозволяє виявляти петельні домени ДНК, межі яких зафіксовані конкретними білками. На наступних стадіях відбувається направлене лігування, зняття зшивок та детекція з використанням ПЛР. Інший варіант ChIP-3C, який також ще називають методом 6C, відрізняється тим, що для детекції використовується техніка клонування замість сайт-специфічної ПЛР, як в класичному варіанті методу [69, 72].

Проте, незважаючи на досить поширене використання даних підходів при різноманітних дослідженнях, час від часу постає питання про точність, з якою вони відрізняють специфічні взаємодії від неспецифічних. Вважається, що з використанням таких протоколів можлива детекція досить сильних фонових шумів. Тому були розроблені методики, що дозволяють більш точно визначення саме специфічних взаємодій. Перш за все, в класичному протоколі ChIP-3C етап розрізання рестриктазами був замінений обробкою ультразвуком. В результаті цього, замість фрагментів, розміром 3-4 т.п.н., отримують ділянки, завдовжки 200-1000 пар нуклеотидів. Передбачається, що менші за розміром фрагменти будуть з нижчою ймовірністю лігуватися з сайтами неспецифічних взаємодій. Іншою перевагою обробки ультразвуком є те, що можна відкинути неефективність розрізання у різних сайтах рестрикції, і, таким чином, знизити кількість фонових шумів при подальшій детекції [56, 69, 73].

Наступне проведення імунопреципітації хроматину ще далі збільшує кількість саме специфічних комплексів взаємодії хроматину та забезпечує відмивання неспецифічних. Такий підхід виявився досить зручним для використання його на рівні глобального *de novo* аналізу хроматинових взаємодій, оскільки забезпечує ефективне зниження фонових шумів.

Застосування для детекції найновіших методів секвенування (наприклад, секвенування спарених кінців (paired-end tag sequencing, PET) дозволяє значно підсилити специфічний сигнал, порівняно з фоновим [69].

Однією з найбільш сучасних методик такого типу є стратегія, що називається ChIA-PET (chromatin interaction analysis by paired-end tag sequencing), яка поєднує метод імунопреципітації хроматину (ChIP) та ЗС. В залежності від білкового фактору, який аналізується при імунопреципітації хроматину, за допомогою даного методу можна специфічно ідентифікувати будь-які хроматинові взаємодії, задіяні в окремому ядерному процесі. Тобто, більш конкретно, використання визначених білкових факторів для ChIA-PET аналізу дає змогу визначити які саме білки беруть участь в тих чи інших специфічних взаємодіях хроматину. А застосування методик фіксації конформації хромосом в ході цього протоколу дозволяє оцінити, з якою ймовірністю такі взаємодії призводять до утворення петельних доменів ДНК [56, 69].

1.2.4. Гель-електрофорез ізольованих клітин. Несподіваним підходом до вивчення особливостей петельних доменів хроматину в ядрах еукаріотів стало використання давно відомого методу гель-електрофорезу ізольованих клітин (метод кометного електрофорезу), що первинно був розроблений для детекції пошкоджень ДНК та швидкості їх репарації в індивідуальних клітинах [74-76]. Стандартний протокол методу передбачає іммобілізацію суспензії клітин в шарі легкоплавкої агарози на поверхні предметного скельця. Після цього проводять лізис в присутності невисоких концентрацій детергентів (наприклад, додецилсульфату натрію чи Triton X-100) та високої концентрації солі (близько 2,5М). Внаслідок застосування детергенту відбувається руйнування ліпідних мембран, а висока концентрація солі зумовлює від'єднання гістонових білків з ДНК, а також різноманітних розчинних компонентів клітини [77-78]. В результаті такої передобробки клітин отримують так звані нуклеоїди, які містять негативно надспіралізовані петельні

домени ДНК, закріплені на білкових структурах ядра, нечутливих до даних умов лізису [80].

Далі скельця поміщають в електрофоретичний апарат та проводять електрофорез за лужних або нейтральних умов. При цьому ДНК, що пошкоджена (лінійні фрагменти чи петлі, релаксовані за рахунок одноланцюгових розривів), буде мігрувати до аноду, формуючи характерний трек ДНК, який нагадує хвіст комети (звідси й назва методу). Після візуалізації (зазвичай, за допомогою флуоресцентних барвників) проводять оцінку рівня пошкоджень ДНК за допомогою відповідного програмного забезпечення на основі різноманітних показників, таких як довжина хвоста комети чи відносний вміст ДНК у ньому [76, 79, 81]. Для збільшення чутливості та селективності методу вводять додаткові чинники (сайт-специфічні ендонуклеази, протеїназа К), що мають здатність розпізнавати та вирізати модифіковані нуклеотиди чи ДНК-білкові зшивки, зумовлюючи таким чином більшу кількість розривів в молекулі ДНК. Відповідно, зростання відносного вмісту ДНК у хвостах комет після такої обробки буде свідчити на користь наявності того чи іншого типу мутацій [82, 83].

Використання інтактних (непошкоджених) клітин при нейтральному гель-електрофорезі ізольованих клітин дає змогу застосовувати даний метод для дослідження різноманітних характеристик петельних доменів ДНК. В цьому випадку після стандартної процедури лізису нуклеоїди містять лише негативно надспіралізовані петлі ДНК, які при певній тривалості електрофорезу також мають здатність мігрувати до аноду (набагато пізніше, ніж пошкоджена ДНК). Додаткове використання речовин-інтеркаляторів, таких як бромистий етидій чи хлорокін, які здатні релаксувати надспіралізовані петлі ДНК, дає змогу вивчати топологічні особливості петельних доменів хроматину чи оцінювати рівень їх надспіралізації у різних типах клітин, що напряму залежить від функціонального стану цих клітин [84-86]. Окрім цього, застосування різноманітних чинників, які можуть порушувати взаємодію ДНК з білками, що фіксують петельні домени (наприклад, додецилсульфат натрію, сечовина,

протеїнази чи РНКазі), чи, навпаки, стабілізують ці зв'язки (формальдегід), у комбінації з кометним електрофорезом дає змогу досліджувати властивості цих взаємодій, а також особливості молекул білків, які беруть участь у формуванні петель хроматину [87].

Отже, така різноманітність методів забезпечує досить різностороннє дослідження типів та способів формування петельних доменів ДНК. При цьому за допомогою підходів флуоресцентної гібридизації *in situ*, методик фіксації конформації хромосом та імунопреципітації хроматину можна отримати широкий спектр інформації стосовно білків та ділянок ДНК, що беруть участь у закріпленні основ петель ДНК, ймовірність появи та розміри тих чи інших петельних доменів у різних типах клітин, розташування їх в межах ядра чи хромосомних територій тощо. Такі дані дозволяють ідентифікувати різноманітні за походженням і, відповідно, за функціональним навантаженням петлі ДНК у ядрах клітин з відмінною активністю чи на різних стадіях клітинного циклу. Що ж стосується методу кометного електрофорезу, то його використання забезпечує отримання даних стосовно певних фізичних характеристик різних типів петель ДНК, особливостей білково-нуклеїнових взаємодій, що забезпечують їх стабілізацію, додаткову інформацію відносно просторової організації хроматину у ядрі та ін. Окрім цього, даний підхід може бути модифікований для дискримінації між типами клітин з різною транскрипційною активністю за наявності та кількості певних типів петель ДНК у них.

У даній роботі було застосовано кінетичний підхід методу кометного електрофорезу для встановлення особливостей організації петельних доменів ДНК у клітинах з відмінною транскрипційною активністю та на різних стадіях клітинного циклу (інтактні лімфоцити людини на стадії G_0 , бласттрансформовані лімфоцити на стадіях G_1 та G_2). Окрім цього, було досліджено деякі особливості закріплення та стабілізації основ петельних доменів, а також чутливість взаємодій, що забезпечують таку стабілізацію, до впливу різноманітних чинників.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Матеріали та обладнання

У роботі використовували лабораторне обладнання: центрифуги MPW – 340 та MPW – 310 (Mechanica, Польща), Allegra 64R (Beckman Coulter, США), термостат ТГУ-01-200 (Ветприбор, Україна), електрофоретичний апарат ДОМБІ (Діагностикум, ССРСР), камера Горяєва, рН-метр Hanna (Hanna Instruments, Німеччина), торсійні терези ТW-2 та Т3 (Techniprot, Польща), світлові мікроскопи PZO (Польща) та Biorex-3 (Konus, Італія), люмінесцентний мікроскоп Люмам Р3 (ЛОМО, ССРСР).

Для дослідження були використані наступні хімічні реактиви: хлорид натрію (NaCl), хлорид калію (KCl), дигідрофосфат калію (KH_2PO_4), гідрофосфат натрію (Na_2HPO_4), хлорид магнію (MgCl_2), борна кислота (H_3BO_3), метиленовий синій, карбамід (сечовина), стандарт-титри NaOH та HCl, оцтова кислота, етанол (Альфарус, Україна), динатрієва сіль етилендіамінтетраоцтової кислоти (Na_2EDTA), Тритон X-100 (AppliChem, Німеччина), тугоплавка агароза (Chemapol, Чехія), легкоплавка агароза (FMC, США), Tris-HCl (Amresco, США), градієнт щільності Histopaque 1077, 4',6-діамідіно-2-феніліндол (DAPI), хлорокін дифосфат, формальдегід, барвник Гімза, додецилсульфат натрію, етиленгліколь-біс(2-ефір)тетраоцтова кислота (EGTA), сахароза (Sigma, США), гепарин (Новофарм-Біосинтез, Україна), рекомбінантний інтерлейкін-2 людини (Біотех-фарм, Росія), розчин Хенкса (Біотестлаб, Україна), ембріональна бичача сироватка, поживне середовище RPMI 1640 (Gibco, США), стрептоміцин, канаміцин, бензилпеніцилін (Arterium, Україна).

2.2. Виділення лімфоцитів шляхом зонального центрифугування

Для дослідження використовували суспензію лімфоцитів людини, що були виділені із периферичної крові здорових донорів. Кров попередньо гепаринізували, щоб уникнути її згортання. Для отримання лімфоцитів 0,5 мл крові змішували з розчином Хенкса у співвідношенні 1:1. Цю суспензію нашаровували на 0,5 мл градієнта щільності Histopaque-1077 у пробірці. Суміш центрифугували 40 хвилин при 1500 об/хв, що забезпечує відділення лімфоцитів від усіх інших клітин крові, в тому числі і від решти лейкоцитів (лімфоцити утворювали кільце на поверхні градієнта щільності) [88, 89]. Отриману суспензію двічі відмивали в 4 мл розчину Хенкса, центрифугуючи по 10 хвилин при 1000 об/хв. Це забезпечувало видалення залишків градієнта, які можуть погіршувати процес візуалізації, утворюючи додатковий флуоресціюючий фон при розгляданні зразків під люмінесцентним мікроскопом. Після останньої відмивки та видалення надосаду було отримано близько 0,5 мл суспензії лімфоцитів, яка відразу ж використовувалася для подальших досліджень [77, 87].

2.3. Підрахунок кількості клітин та оцінка їх життєздатності

Невелика аліквота суспензії була відібрана для оцінки життєздатності клітин та підрахунку їх кількості. Життєздатність виділених лімфоцитів людини визначали за допомогою барвника метиленового синього, який може проникати тільки у мертві клітини після пошкодження їх оболонки. Таким чином, пофарбовані клітини є нежиттєздатними (пошкодженими). Для аналізу суспензію лімфоцитів змішували з 0,4%-м розчином барвника, приготованому на фосфатному буфері (137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 10 мМ Na₂HPO₄·2H₂O, 2 мМ KH₂PO₄, рН 7,4), у співвідношенні 1:1. Після цього 10 мкл суміші пофарбованих клітин переносили під покривне скельце камери Горяєва. Кількість клітин підраховували в п'яти великих (80 малих) квадратах під збільшенням мікроскопа x80. Враховувались лімфоцити, що знаходились всередині малого квадрату, а також на верхній і лівій його стінках, клітини на

нижній і правій стінках не враховувались. Для подальших досліджень використовувались суспензії, життєздатність клітин в яких становила не менше 95-97%.

Концентрація клітин у зразках розраховувалась за формулою:

$$C = 5 \cdot 10^5 n, \quad (2.1)$$

де C – концентрація (кількість клітин в 1 мл), n – кількість клітин в одному великому квадраті [90].

2.4. Виділення ядер лімфоцитів та аналіз якості виділеної фракції

В окремих експериментах для електрофорезу використовували ізольовані ядра лімфоцитів. З цією метою виділені з периферичної крові лімфоцити відмивали від градієнта щільності в 6 мл буферу СТМК (0,25 М сахарози, 50 мМ Tris-HCl, 5 мМ MgCl₂, 25 мМ KCl, 0,5 мМ Na₂EDTA, 0,5 мМ EGTA, рН 7,4), центрифугуючи 10 хвилин при 1000 об/хв. Після видалення супернатанту осад обережно ресуспендували у 2,5 мл буферу СТМК. Отриману суміш нашаровували на 1,5 мл 2,1 М розчину сахарози, приготованого на буфері СТМК [91, 92].

Виділення ядер проводили за рахунок високошвидкісного градієнтного центрифугування протягом 90 хвилин при 15000 об/хв та температурі 4°C. В результаті цього ядра «продавлювалися» через щільний шар сахарози, а цитоплазма клітин залишалася в надосаді. Після центрифугування відбирали супернатант, а осад дуже обережно, щоб не пошкодити мембрану ядра, ресуспендували в 1 мл буферу СТМК [91, 93, 94]. Суміш центрифугували 6 хвилин при 2000 об/хв, щоб відмити ядра від залишків сахарози, високі концентрації якої можуть створювати додатковий фон при візуалізації препаратів. Після видалення супернатанту ядра негайно використовували для приготування препаратів [94].

Перевірку якості виділення ядер проводили при використанні гіпотонічного розчину хлориду калію. Для цього невелику аліквоту суспензії,

отриманої після процедури виділення ядер, змішували з 10 мл 0,5%-го розчину KCl (0,067 M), попередньо нагрітого до 37°C. Після цього суміш інкубували 30 хвилин при температурі 37°C. По завершенні часу інкубації суспензію центрифугували 10 хвилин при 1000 об/хв, після чого отриманий осад фіксували протягом 20 хвилин при температурі -20°C у суміші 96% етанол: 100% оцтова кислота в співвідношенні 3:1 та фарбували 40 хвилин в 2% розчині барвника Гімза. При цьому, за наявності клітин, після такої обробки та пофарбування отримують добре помітні ядра і, в деяких випадках, зафарбовану цитоплазму, тоді як у випадку ядер отримують лише так звані їх «тіні» – погано профарбовані розмиті структури, без чітко сформованої округлої форми [94].

Якість отриманих ядер додатково перевіряли за допомогою вестерн-блот-аналізу. Для детекції використовували антитіла до полі(АДФ-рибозо) полімерази-1 (як маркер ядерної фракції) та до α -тубуліну (як маркер цитоплазматичної фракції) [93]. Аналіз показав, що у ядерній фракції був присутній ядерний і відсутній цитоплазматичний маркер.

2.5. Бласттрансформація лімфоцитів. Оцінка ефективності бласттрансформації

Для отримання бласттрансформованих лімфоцитів проводили реакцію активації виділених клітин за допомогою рекомбінантного інтерлейкіну-2 людини. Виділення лімфоцитів з периферичної крові людини (п. 2.2) було проведено в стерильних умовах. Після цього 500 мкл отриманої суспензії клітин змішували з 1750 мкл поживного середовища RPMI-1640 з антибіотиками (100 мкг/мл стрептоміцину, 100 мкг/мл канаміцину та 100 од/мл бензилпеніциліну), 250 мкл інактивованої ембріональної бичачої сироватки (кінцева концентрація сироватки становила 10%) та 500 мкл препарату рекомбінантного інтерлейкіну-2 людини, попередньо приготовано на середовищі RPMI-1640 [95]. Для дослідження було обрано інтерлейкін-2 людини, оскільки даний препарат здатний активувати транскрипцію великої

кількості генів у лімфоцитах, запускати їх проліферацію, а також є природнім компонентом сигнальних каскадів лімфоцитів, на відміну від багатьох інших мітогенів (як наприклад, фітогемаглютинін) [96, 97]. Кінцева концентрація інтерлейкіну в суміші становила 1000 од/мл. Така концентрація була підібрана відповідно до клінічних стандартів та даних наукових досліджень як найбільш оптимальна для максимальної активації клітин та запуску їх проліферації [98]. Отриману суміш інкубували протягом 24 або 44 години при температурі 37°C.

Після закінчення інкубації клітини відмивали розчином Хенкса та використовували для подальших досліджень. Невелику аліквоту отриманої суспензії було відібрано для перевірки ефективності бласттрансформації за допомогою цитологічних методів оцінки морфології клітин. З цією метою клітини інкубували з 0,5% розчином КСІ (гіпотонічний розчин) протягом 30 хвилин при температурі 37°C для дестабілізації мембрани лімфоцитів. Після цього проводили фіксацію у суміші 96% етанол: 100% оцтова кислота в співвідношенні 3:1 протягом 20 хвилин при температурі -20°C. По завершенні фіксації суспензію клітин наносили на предметне скло та фарбували 40 хвилин в 2% розчині барвника Гімза. Отримані препарати аналізували під світловим мікроскопом, підраховуючи частку бласттрансформованих клітин (великі еухроматинізовані ядра, діаметр яких не менш ніж в 2 рази перевищував діаметр ядер нетрансформованих лімфоцитів) [95]. Окремо за допомогою проточної цитометрії визначали частку клітин на різних стадіях клітинного циклу після проведення бласттрансформації.

2.6. Приготування препаратів та лізис клітин

Для приготування препаратів знежирені предметні скельця попередньо покривали з однієї сторони тонким шаром 1%-ої тугоплавкої агарози, температура плавлення якої близько 90°C, що забезпечує кращу фіксацію клітин на поверхні скельця. Виділені лімфоцити, їх ядра чи бласттрансформовані лімфоцити змішували з 1%-ою легкоплавкою агарозою у

співвідношенні 1:2 (до 50 мкл суспензії додавали 100 мкл агарози). При цьому температура легкоплавкої агарози в момент змішування була не вище 37°C, щоб уникнути індукції пошкоджень ДНК високими температурами. Далі на скельця наносили 20 мкл цієї суміші і рівномірно розподіляли її по поверхні за допомогою покривних скелець [79, 99, 100]. Таким чином, отримували слайди – предметні скельця, на поверхні яких розташований шар легкоплавкої агарози з імобілізованими в ньому клітинами.

На наступному етапі проводили лізис клітин. Для цього використовували лізуючий буфер (2,5 М NaCl, 0,01 М Tris-HCl, 0,1 М Na₂EDTA та 1% Triton X-100, рН 7,5), що був охолоджений до 4°C. Triton X-100 додавали безпосередньо перед лізисом клітин. В лізуючому буфері слайди витримували від 2 до 5 годин при температурі 4°C. Такі умови лізису забезпечували руйнування усіх мембран та дисоціацію від ДНК більшості білків, тоді як ДНК залишалася непошкодженою (м'які умови лізису). У дослідах з ядрами лімфоцитів лізис тривав від 1 до 3 годин при температурі 4°C [75, 99, 100].

В результаті такої процедури лізису отримували так звані нуклеоїди – залишкові структури, що містять ДНК, закріплену на білкових компонентах ядра, які є стійкими до дії детергенту та високих концентрацій солей. Такий комплекс ДНК з білками ядра в порі легкоплавкої агарози займає той об'єм, що займала клітина чи ядро перед початком лізису [80].

2.7. Обробка нуклеоїдів інтеркаляторами та денатуруючими агентами

З метою дослідження особливостей закріплення основ петельних доменів ДНК в деяких експериментах після лізису клітин слайди додатково обробляли розчинами формальдегіду (індуктор ковалентних зшивок), білкових денатурантів (сечовина або додецилсульфат натрію) або інтеркалятора (хлорокін) [101-104].

Денатурацію білків, які залишилися у нуклеоїдах після лізису, проводили в присутності різних концентрацій сечовини або 0,3% додецилсульфату натрію. Для цього по закінченні лізису препарати відмивали 10 хвилин в буфері ТБЕ (89 мМ Tris-HCl, 89 мМ H_3BO_3 , 2 мМ Na_2EDTA , рН 7,5) при 4°C, після чого інкубували їх в 1 М, 2 М, 4 М чи 8 М розчині сечовини, приготованому на буфері ТБЕ, або у буфері Triton X-100/SDS (40 мМ Tris-HCl, 120 мМ NaCl, 0,5% Triton X-100, 0,3% додецилсульфату натрію (SDS), рН 7,5) протягом 30 хвилин при температурі 4°C. Для індукції ковалентних зшивок між ДНК та білками нуклеоїду препарати витримували протягом 10 хвилин в буфері ТБЕ при 4°C, після чого інкубували в 75 μM водного розчину формальдегіду протягом 10 хвилин при температурі 4°C. В окремих експериментах досліджували вплив інтеркалятора хлорокіну на стабільність взаємодій між ДНК та білками, які беруть участь закріплені основ петельних доменів ДНК. Для цього після відмивання в буфері ТБЕ слайди інкубували 10 хвилин у розчині хлорокіну, приготованому на буфері ТБЕ (концентрація 1000 мкг/мл) при температурі 4°C. В кожному випадку після закінчення інкубації препарати двічі відмивали в буфері ТБЕ протягом 10 хвилин при 4°C [87, 105].

2.8. Гель-електрофорез ізольованих клітин (кометний електрофорез)

Перед проведенням електрофорезу слайди двічі відмивали в буфері ТБЕ. Далі декілька препаратів, приготованих одночасно з однієї суспензії клітин, поміщали в електрофоретичний апарат і повністю покривали їх невеликою кількістю буферу ТБЕ, після чого витримували 10 хвилин, щоб буфер рівномірно заповнив усі пори агарози. Електрофорез проводили за нейтральних рН при температурі 4°C та напруженості електричного поля 1 В/см [79, 99, 106]. Тривалість електрофорезу становила не більше 120 хв. Для дослідження кінетики виходу ДНК у хвіст комети приготовані одночасно скельця аналізували послідовно через кожні 10 хвилин (в окремих випадках – через

кожні 5 хвилин електрофореzu). В деяких експериментах в буфер ТБЕ додавали інтеркалятор хлорокін у певних концентраціях.

Для дослідження оборотності виходу ДНК проводили електрофорез за нейтральних рН, тривалість якого становила 70 хв. По закінченні електрофореzu струм вимикали та витримували скельця в буфері ТБЕ протягом 90 хвилин. Аналіз проводили через різні проміжки часу (до 90 хвилин) після закінчення електрофореzu. В окремих експериментах після 70 хвилин електрофореzu та 90 хвилин витримки в буфері ТБЕ після вимкнення електричного струму, повторно вмикали струм та проводили аналіз скелець через відповідні проміжки часу протягом 70 хвилин електрофореzu.

2.9. Візуалізація та аналіз результатів

Слайди аналізували під люмінесцентним мікроскопом Люмам Р3 при збільшенні в 100 разів. Для візуалізації слайди фарбували флуоресцентним барвником DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) концентрацією 1,3 мкг/мл, що має сильні основні властивості. Барвник має переважну спорідненість до дволанцюгової ДНК (лише до В-форми), тоді як з одноланцюговими молекулами зв'язується слабо, а з РНК взагалі не взаємодіє. DAPI взаємодіє з малим жолобком ДНК, переважно в АТ-збагачених ділянках. При цьому відбувається значне зростання інтенсивності його флуоресценції порівняно з інтенсивністю вільного DAPI, що дозволяє використовувати цю сполуку в якості барвника при візуалізації ДНК [107-109].

Зразки фотографували камерою Canon EOS 1000 D, під'єднаною до мікроскопа, та аналізували зображення за допомогою програмного забезпечення TriTek CometScoreTM. Визначали відносний вміст ДНК у хвості комети і довжину хвоста. Відносний вміст ДНК в хвості комети визначали як відношення рівня інтенсивності флуоресценції у хвості до загального рівня інтенсивності флуоресценції комети. Довжина хвоста (у пікселях) визначалась як відстань від центру мас голови комети до дистального кінця хвоста комети.

Аналізували 100-200 випадково вибраних комет та підраховували середні значення двох зазначених параметрів.

Значення довжини хвоста комети (у пікселях), отримані за допомогою програми CometScore, далі переводили у мікрметри. Для цього за допомогою окуляр-мікрометра вимірювали довжину комет (у мікрметрах) під мікроскопом. Одержані дані були співставленні з результатами обробки цих самих клітин за допомогою програмного забезпечення CometScore (у пікселях). Таким чином, було отримано співвідношення між двома величинами, при якому $1 \text{ піксель} = 0,192 \text{ мкм}$. В подальшому дане співвідношення використовувалося для переведення результатів аналізу довжини хвоста комети за допомогою програми у довжину петельного домену ДНК, виражену в мікрметрах. Для визначення розмірів найдовших петель ДНК (в парах нуклеотидів) у хвостах комет на різних етапах електрофорезу значення довжини хвоста було помножено на 2 (контурна довжина петельного домену приблизно в два рази більша, ніж довжина витягнутої петлі) та поділено на 0,34 нм (відстань між сусідніми парами нуклеотидів).

2.10. Аналіз кінетичних графіків та статистична обробка даних

Кожен варіант експерименту було проведено від п'яти до десяти разів. Після цього обраховували середнє значення по всім незалежним експериментам та стандартне відхилення (SD).

Отримані в експериментах дані було проаналізовано методами варіаційної статистики. Проводився тест на нормальність розподілу Шапіро-Уїлка. За умови нормального розподілу даних їх оцінювали за критерієм Стьюдента. Статистично значущими вважалися відмінності при $p < 0,05$. Для обробки результатів використовували програми Excel ("Microsoft") та Statistica ("StatSoft").

Кінетичні графіки залежності відносного вмісту ДНК у хвостах комет (F) від тривалості електрофорезу (t) були апроксимовані за допомогою рівняння:

$$F = A_1 F_1 + A_2 F_2, \quad (2.2)$$

де A_1 та A_2 – максимальні значення відповідних параметрів. У випадку відсутності двоступеневої залежності A_2 дорівнювало нулю. Функція F_1 описується стандартним рівнянням мономолекулярної кінетики:

$$F_1 = 1 - \exp(-t/\tau), \quad (2.3)$$

де τ – характеристичний час (τ^{-1} – константа швидкості). Функція F_2 задовольняє рівнянню Больцмана для сигмоїдальної функції:

$$F_2 = 1/[1 + \exp(k_2(t_0 - t))], \quad (2.4)$$

де k_2 – константа швидкості, а t_0 – час напівпереходу.

Залежність відносного вмісту ДНК у хвостах комет як функції від часу інкубації в електрофоретичному буфері після вимкнення тривалого електрофорезу були апроксимовані за допомогою рівняння двоекспоненційного затухання:

$$F = A_1 \exp(-t/\tau_1) + A_2 \exp(-t/\tau_2) + A_0, \quad (2.5)$$

де A_1 , A_2 – амплітуди двох експоненційних внесків, A_0 – мінімальне значення вмісту ДНК при $t = \infty$.

Для підгонки теоретичних моделей під експериментальні результати використовували метод Левенберга-Маркардта за допомогою програмного забезпечення Origin 8 ("OriginLab"). Проводили нелінійну регресію методом найменших квадратів (здійснювали пошук значень параметрів та оцінку похибки цих значень). Якість підгонки було оцінено за критерієм χ^2 (критерієм узгодженості Пірсона).

Статистичну відмінність між кінетичними кривими різних експериментів оцінювали за допомогою пермутаційного тесту [110]. Відмінність між двома кривими вважалася достовірною, якщо p -значення було менше 0,05.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Механізми виходу двох типів петельних доменів ДНК, що мігрують при кометному електрофорезі

3.1.1. Кооперативність процесу формування електрофоретичного треку. Було досліджено кінетику виходу ДНК із нуклеодів, отриманих шляхом лізису клітин в присутності високої концентрації солі та детергентів, протягом гель-електрофорезу ізольованих клітин (кометного електрофорезу). Даний метод первинно був розроблений для детекції пошкоджень ДНК у різних типах клітин [75]. При цьому можливе використання двох варіантів кометного електрофорезу (нейтральний та лужний протокол методу), які з відмінною точністю забезпечують визначення різноманітних типів пошкоджень (одно- чи дволанцюгові розриви ДНК, тимінові димери та ін.) [111-114]. У попередніх роботах було показано, що нейтральний варіант кометного електрофорезу можна також застосовувати для дослідження особливостей організації петельних доменів ДНК [84-86]. В наших експериментах ми використовували інтактні лімфоцити здорових донорів, що дозволяє мінімізувати базовий рівень пошкоджень ДНК у нуклеодах. Таким чином, в наших дослідах формування електрофоретичного треку (хвоста комети) протягом електрофорезу відбувалося в основному за рахунок виходу петельних доменів ДНК [87].

Дослідження кінетики виходу петельних доменів ДНК, що присутні в ядрах еукаріотів, здійснювали шляхом аналізу відносного вмісту ДНК в хвостах комет протягом 90 хвилин електрофорезу з інтервалом у 5 або 10 хв. На рис. 3.1 представлено розподіл значень даного параметру в залежності від часу електрофорезу (10, 30 та 80 хв) та типові приклади комет для кожного етапу.

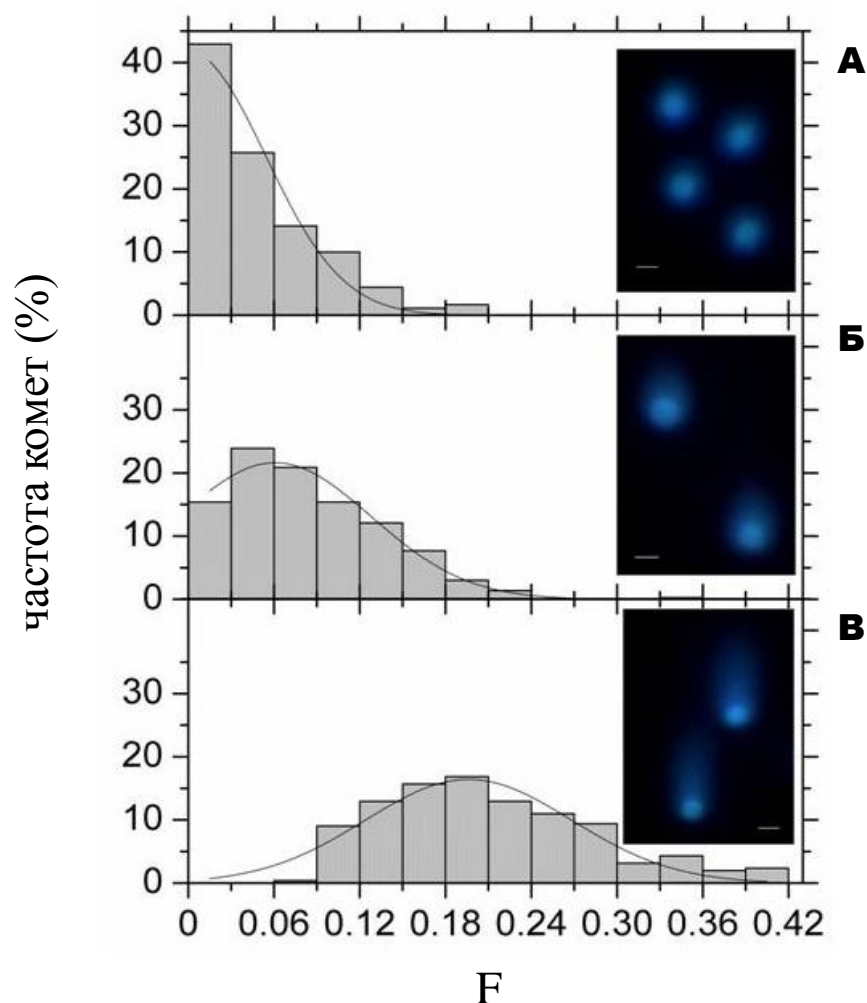


Рис. 3.1. Розподіл відносного вмісту ДНК у хвостах комет після 10-ої (А), 30-ої (Б) та 80-ої (В) хвилини електрофорезу; приклади типових комет для кожного етапу (шкала – 10 мкм). F – частка ДНК в хвості комети. Суцільні лінії – апроксимація нормального розподілу.

Було виявлено, що на ранніх етапах (10 хв) переважна більшість комет була з невисоким вмістом ДНК у хвостах, і лише менше 10% комет були з часткою ДНК у хвостах вище 0,12 (ймовірно, це клітини з високим рівнем пошкоджень ДНК, невелика частина яких може бути присутня в крові здорових донорів). При подальшому зростанні часу електрофорезу до 60-ої хвилини пік розподілу зміщувався вздовж осі абсцис, тоді як ширина розподілу у всіх випадках була практично однаковою. Тобто, на наступних етапах електрофорезу відбувалося збільшення частки комет з високим вмістом ДНК у

хвостах та зменшувалася частка комет із низьким вмістом ДНК. Після 60-ї хвилини електрофорезу розподіл практично не змінювався [87].

При цьому кінетична крива виходу ДНК у хвіст комети протягом електрофорезу мала двоступеневий характер. Так, незначна кількість ДНК (до 8%) виходить у хвіст комети вже через 10 хвилин і такий рівень зберігається аж до 30-ї хвилини електрофорезу (нижнє плато кривої). Після цього в інтервалі між 30-ю та 50-ю хвилинами спостерігається помітне зростання вмісту ДНК, що на 50-й хвилині становить 22% від загальної кількості. При подальшому проведенні електрофорезу (до 90-ї хв) рівень ДНК у хвостах комет залишається незмінним (верхнє плато кривої) (рис 3.2) [87, 115].

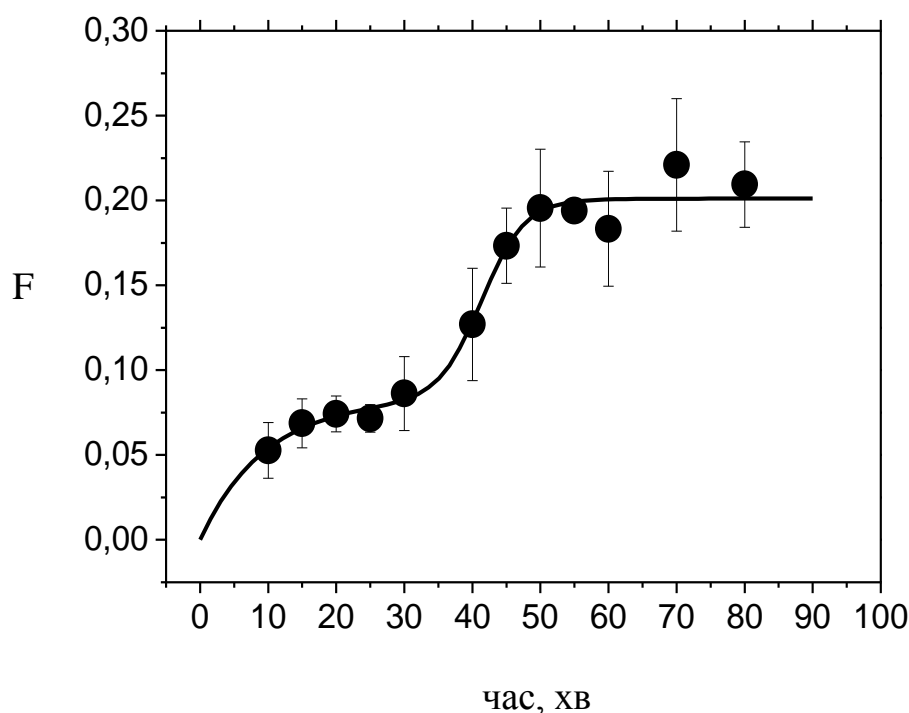


Рис. 3.2. Кінетика виходу ДНК при кометному електрофорезі нуклеоїдів, отриманих з інтактних лімфоцитів людини. F – частка ДНК в хвості комети. Тут і на всіх рисунках нижче (якщо не зазначено особливо) суцільна крива – результат підгонки під відповідні теоретичні моделі (див. підрозділ 2.10), наведені похибки – стандартні відхилення. Тут і на всіх рисунках нижче кожна точка на графіку – середнє значення 5-10 незалежних експериментів, для кожного з яких обраховували 100-200 випадково обраних клітин.

Подібну двоступеневість виходу ДНК спостерігали також в ряді попередніх робіт, присвячених дослідженню механізмів формування електрофоретичного треку при кометному електрофорезі [84-86, 116]. При цьому уповільнення виходу ДНК на пізніх етапах електрофорезу пояснювали наявністю в ядрах інтактних клітин двох типів петель ДНК - так званих «швидких» та «повільних» петельних доменів, які можуть відрізнятися між собою за ступенем надспіралізації, через що й рухаються з різною швидкістю при проведенні електрофорезу. Припускали, що «швидкі» петлі – це петельні домени ДНК, релаксовані за рахунок одноланцюгових розривів, що значно полегшує їх рух під час електрофорезу. В інтактних диференційованих клітинах може бути присутня незначна кількість таких петель, але їх число суттєво зростає в разі пошкодження ДНК клітин під впливом певних факторів (наприклад, невисокі дози опромінення) [84]. Очевидно, що саме такі «швидкі» петлі будуть виходити на ранніх хвилинах електрофорезу. При тривалішому застосуванні електричної сили стає можливим вихід «повільних» надспіралізованих петельних доменів [85, 86].

Внаслідок обробки клітин високими концентраціями солей (наприклад, 2,5 М NaCl) відбувається дисоціація гістонових білків від молекули ДНК, яка при цьому стає негативно надспіралізованою [80, 84]. Таким чином, при проведенні лізису клітин більшість петель ДНК набуває негативно надспіралізації. Вихід їх у хвіст комети стає можливим лише після подолання торсійної напруги, яка виникає при витягуванні такої петлі під дією електричного поля, що і відбувається на пізніших етапах електрофорезу (30-50 хв). Окрім цього, у попередніх роботах було показано, що такі петельні домени є чутливими до дії інтеркалюючих агентів. Так, при певних концентраціях інтеркаляторів (наприклад, бромистого етидію чи хлорокіну) відбувається релаксація цих петель ДНК, що призводить до полегшення їх виходу при електрофорезі, а збільшення концентрації інтеркаляторів призводить до накопичення в них надспіралізації протилежного знаку (позитивної надспіралізації), що, як і в контрольних експериментах, зумовлює уповільнення

їх міграції під дією електричного струму [84, 116]. В наших експериментах також було підтверджено наявність надспіралізованих петельних доменів, чутливих до впливу інтеркалятора. Зокрема, додавання 25 мкг/мл хлорокіну суттєво пришвидшує вихід «повільних» петель у хвіст комети, а 1000 мкг/мл - гальмує міграцію петельних доменів під дією електричного струму (рис.3.3) [87, 117, 118].

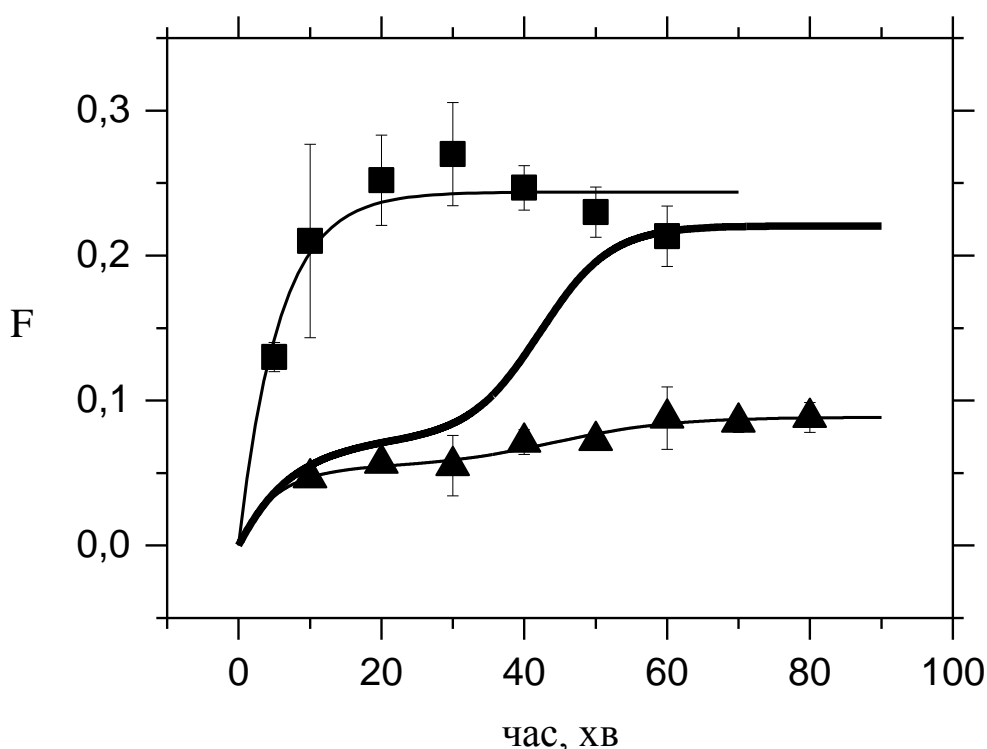


Рис. 3.3. Кінетика виходу ДНК в присутності 25 мкг/мл (■) та 1000 (▲) мкг/мл хлорокіну. F – частка ДНК в хвості комети. Товста суцільна лінія – кінетична крива за відсутності хлорокіну з рис. 3.2.

При цьому, кінетична крива виходу «повільних» петель (друга «сходінка» на рис. 3.2) має характерну S-подібну форму, що свідчить про кооперативність процесу міграції таких петель. Наші подальші дослідження були зосереджені на встановленні механізмів такої кооперативності.

Наявність петельних доменів ДНК, вихід яких під дією електричного струму значно уповільнений саме за рахунок їх надспіралізації (тобто вони не

мають одноланцюгових розривів, які могли б викликати їх релаксацію), дозволяє припустити, що після припинення дії струму такі петельні домени порівняно легко можуть повернутися у вихідне положення, оскільки це для них більш енергетично вигідно. Для перевірки цього було досліджено оборотність виходу петельних доменів ДНК при коетному електрофорезі та пораховано відносний вміст ДНК в хвості комети відразу по закінченні електрофорезу (0 хв) та через певні проміжки часу після цього (5, 10, 15, 30, 45, 60, 75 та 90 хв) (рис. 3.4).

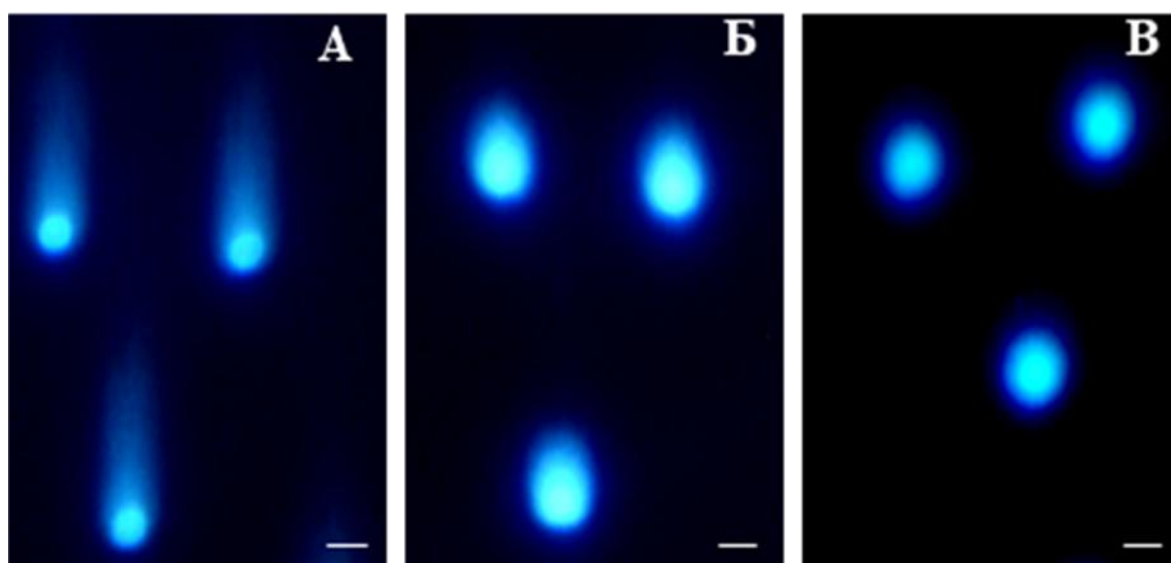


Рис. 3.4. Фотографії комет через 0 (А), 45 (Б) та 90 (В) хвилин після закінчення електрофорезу (шкала – 10 мкм).

Отримані результати показують, що вже через 5 хв спостерігалось зменшення вмісту ДНК у хвостах комет до 19%, при тому, що вихідне значення відразу після електрофорезу було 22%. Через 45 хвилин вміст ДНК зменшився до 15%, а через 90 хв – до 10%. Такі дані свідчать на користь того, що справді, в нуклеоїдах після лізису присутні два типи петельних доменів: надспіралізовані петлі, які під дією еластичних сил мають здатність до зворотного руху, та приблизно 10% релаксованих петельних доменів ДНК, які не мають таких еластичних властивостей і тому навіть через 90 хвилин після вимкнення струму залишаються у хвостах комет (рис. 3.5) [87, 118].

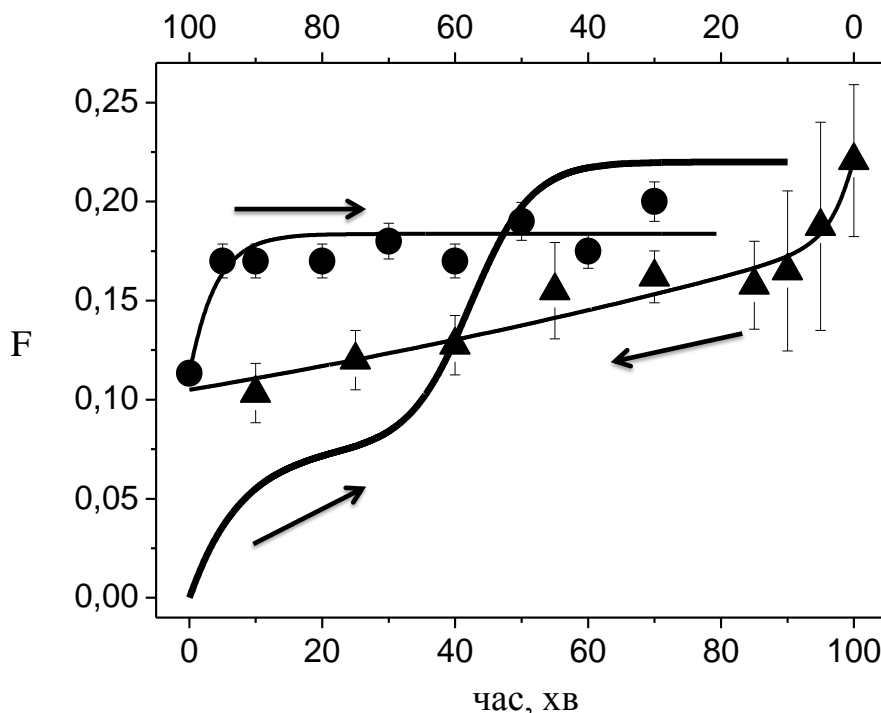


Рис. 3.5. Частка ДНК в хвостах комет (F) як функція часу електрофорезу (нижня абсциса) чи витримки в електрофоретичному буфері після вимкнення струму (верхня абсциса). Напрямок руху ДНК показано стрілками біля кривих: первинний електрофорез (суцільна крива з рис. 3.2), зворотний рух після вимкнення струму (\blacktriangle), повторний електрофорез (\bullet).

Якщо після такої інкубації знову провести електрофорез, то спостерігається гістерезисна поведінка петельних доменів: вони виходять досить швидко і рівень плато досягається вже через 5 хвилин після ввімкнення струму. При цьому не спостерігається затримки виходу ДНК, як це відбувається при проведенні електрофорезу перший раз. Це може бути пов'язано з тим, що при зворотному русі петлі, хоч і повертаються назад в голову нуклеїду, але, ймовірно, не проникають всередину голови, де концентрація ДНК дуже висока, а залишаються на її периферії. Таким чином, при повторному проведенні електрофорезу надспіралізовані петельні домени поведуть себе так само, як «швидкі» петлі ДНК (рис. 3.5) [87].

Таким чином, постає питання, чому «повільні» петлі так довго виходять при першому електрофорезі, тоді як гістерезис показує, що вони можуть виходити досить швидко, незважаючи на наявність надспіралізації. Отримані результати свідчать на користь того, що уповільнення виходу ДНК при первинному електрофорезі може бути пов'язано не лише з необхідністю подолання власних торсійних напруг надспіралізованими петлями ДНК, але й з необхідністю пройти певний бар'єр при їх русі всередині голови нуклеоїду (ймовірно, зумовлений високою концентрацією ДНК). Як було зазначено вище, S-подібний характер кінетики при першому електрофорезі передбачає наявність кооперативності виходу петель ДНК. Тобто, при зменшенні кількості петель ДНК всередині голови нуклеоїду за рахунок їх виходу в хвіст комети відбувається суттєве полегшення міграції решти петельних доменів. При повторному електрофорезі, коли надспіралізовані петлі розташовані на периферії нуклеоїду, спостерігається відсутність затримки їх виходу (відсутність бар'єру на шляху їх міграції в хвіст комети). Це дає змогу також зробити висновки, що серед «швидких» петельних доменів, які виявляються при проведенні електрофорезу перший раз, можуть бути не лише релаксовані петлі, але й деяка частина надспіралізованих, які знаходяться на поверхні голови нуклеоїду. Такі результати узгоджуються з наявними даними стосовно організації хроматину в ядрі, що передбачають існування як петельних доменів, закріплених на периферичних структур ядра, так і петель, що фіксуються в його центральних частинах [7, 16].

Теорія електрофорезу гнучкого поліелектроліту (наприклад, молекули ДНК), який іммобілізований в гелі, показує, що час, необхідний на витягування ланцюга цього поліелектроліту до його контурної довжини, є дуже малим [119]. Це означає, що кінетична крива на рис. 3.2 відображає накопичення у хвостах комет певної кількості витягнутих петельних доменів (з урахуванням їх контурної довжини), а не сам процес їх витягування. При цьому залежність від часу відносної кількості ДНК у хвостах комет для першого кроку кінетичної кривої на рис. 3.2 буде задовольняти добре відомому співвідношенню:

$$\frac{dF_1}{dt} = \tau^{-1}(A_1 - F_1), \quad (3.1)$$

де F_1 – це частка ДНК у хвостах комет, що відповідає «швидким» петлям (переважно, поверхневі релаксовані петельні домени), τ^{-1} – константа швидкості, тоді як τ – характеристичний час, A_1 – максимальна частка ДНК, що може виходити на даному етапі електрофорезу. Рішенням цього співвідношення є рівняння 2.3, яке наведено у підрозділі 2.10.

У випадку «повільних» петельних доменів, перш ніж проникнути в агарозний гель навколо нуклеоїду, вони повинні подолати бар'єр всередині голови нуклеоїду, що становить собою середовище з дуже високою концентрацією ДНК. Це середовище зумовлює значну додаткову затримку виходу даного типу петельних доменів у хвіст комети при електрофорезі. Зрозуміло, що затримка руху внутрішніх петельних доменів напряму залежить від концентрації ДНК (кількості петельних доменів, що «лежать» на шляху їх руху до аноду). Тобто, чим більше петельних доменів вийде у хвіст комети, що, в свою чергу, призведе до зменшення концентрації ДНК в голові, тим швидше будуть виходити внутрішні петлі під дією електричного струму. Саме цей ефект і буде тоді лежати в основі кооперативності виходу внутрішніх петель у хвіст комети при електрофорезі (рис. 3.2). У найпростішій формі рівняння швидкості виходу для «повільних» петельних доменів, міграція яких залежить від концентрації ДНК, може бути записано наступним чином:

$$\frac{dF_2}{dt} = \frac{k_2}{A_2} (A_2 - F_2)F_2, \quad (3.2)$$

де F_2 – це частка ДНК у хвостах комет, що відповідає «повільним» (внутрішнім) петельним доменам, k_2 – константа швидкості, A_2 – максимальна частка ДНК, що може виходити на другому етапі електрофорезу. Рішенням цього диференційного рівняння є рівняння Больцмана (рівняння 2.4), наведене в підрозділі 2.10. Оскільки, це рівняння дуже точно описує отримані нами дані стосовно кінетики виходу «повільних» петель ДНК при кометному електрофорезі, то можна зробити висновок, що наявність кооперативності при

їх виході дійсно пов'язана із поступовим зниженням їх кількості (концентрації ДНК всередині голови нуклеоїду) протягом електрофорезу.

Таким чином, було виявлено два типи петельних доменів, що наявні у нуклеоїдах, отриманих після лізису лімфоцитів людини в присутності детергентів та високої концентрації солі. До першої групи належать поверхневі та/або релаксовані петлі, які дуже швидко мігрують у хвіст комети під дією електричного струму. Друга група – це «повільні» надспіралізовані петельні домени, що знаходяться всередині нуклеоїду. Їх вихід є значно уповільненим та залежить від концентрації ДНК всередині голови (вихід таких петель при електрофорезі описується рівнянням Больцмана (рівняння 2.5)). Окрім цього, «повільні» петельні домени можуть «повертатися» до голови нуклеоїду після вимкнення електричного струму. При цьому вони вже не проникають всередину голови комети, а залишаються на її поверхні. За рахунок цього, при повторному ввімкненні струму та подальшому проведенні електрофорезу вони поведуться аналогічно «швидким» петельним доменам – майже відразу ж виходять у хвіст комети. Це дозволяє припустити, що саме розташування петель в межах голови нуклеоїду (наявність чи відсутність ДНК-бар'єру на шляху руху до аноду) є визначальним для швидкості їх виходу при електрофорезі.

3.1.2. Кінетика виходу ДНК із нуклеоїдів, отриманих з ізольованих клітинних ядер. Для детального дослідження причин уповільнення виходу петельних доменів, розташованих всередині голови нуклеоїду, було проведено кометний електрофорез із використанням ізольованих ядер лімфоцитів. У цьому випадку перед процедурою лізису в агарозі іммобілізували не всю клітину лімфоцита, а лише його ядро. При такому приготуванні препаратів нуклеоїдів агароза здатна проникати крізь ядерні пори [120]. Таким чином, внутрішнє середовище нуклеоїдів формується за рахунок ДНК та агарозного гелю. На противагу цьому, при використанні клітин агароза застигає навколо плазматичної мембрани, і після лізису у внутрішньому середовищі міститься

лише ДНК. Типові приклади нуклеоїдів, приготованих з ядер та клітин лімфоцитів, до та після проведення електрофорезу представлені на рис. 3.6.

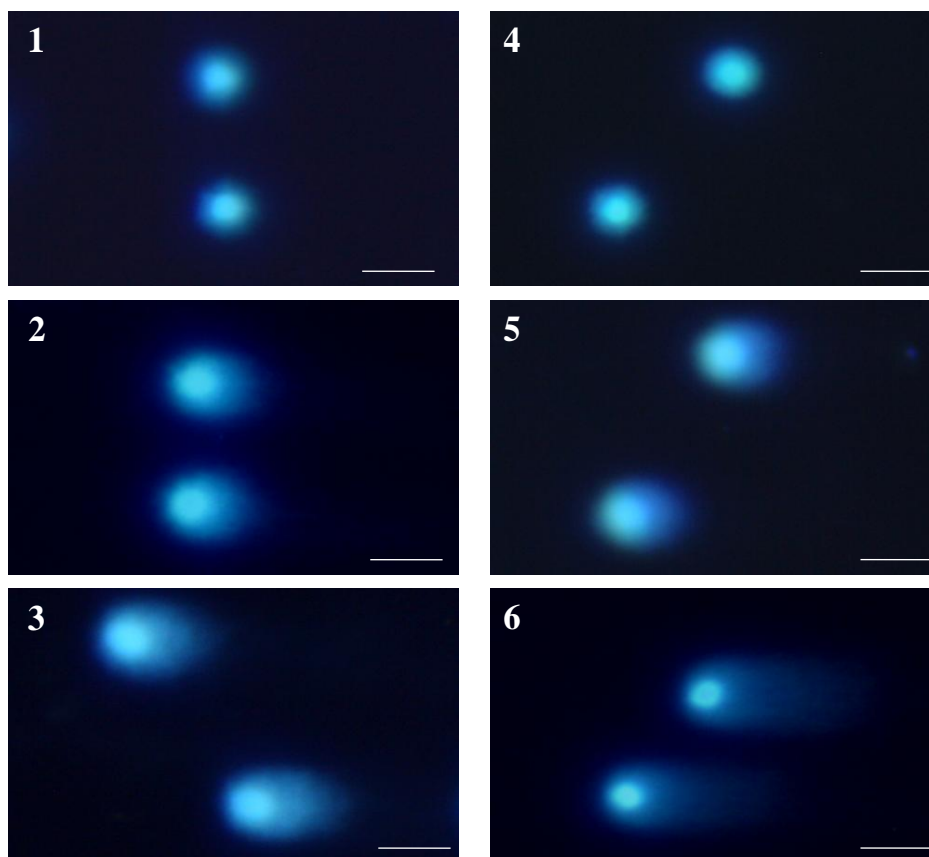


Рис. 3.6. Типові фотографії комет після 0 хв (1; 4), 20 хв (2; 5) та 60 хв (3; 6) електрофорезу нуклеоїдів, отриманих з клітин лімфоцитів (1-3) або ізольованих ядер лімфоцитів (4-6). Шкала – 10 мкм.

Вигляд комет для обох типів нуклеоїдів практично не відрізнявся, однак були виявлені суттєві відмінності у кінетичних кривих, що описують вихід петельних доменів в хвіст комети при електрофорезі. Так, при дослідженні міграції петель ДНК з використанням ядер лімфоцитів було виявлено втрату двоступеневості виходу ДНК. В цьому випадку на ранніх етапах електрофорезу (10-50 хвилин) спостерігали поступове збільшення відносного вмісту ДНК в хвостах комет, а починаючи з 60-ї хвилини це значення практично не змінюється і залишається на рівні приблизно 19% ДНК у хвостах (рис. 3.7) [94].

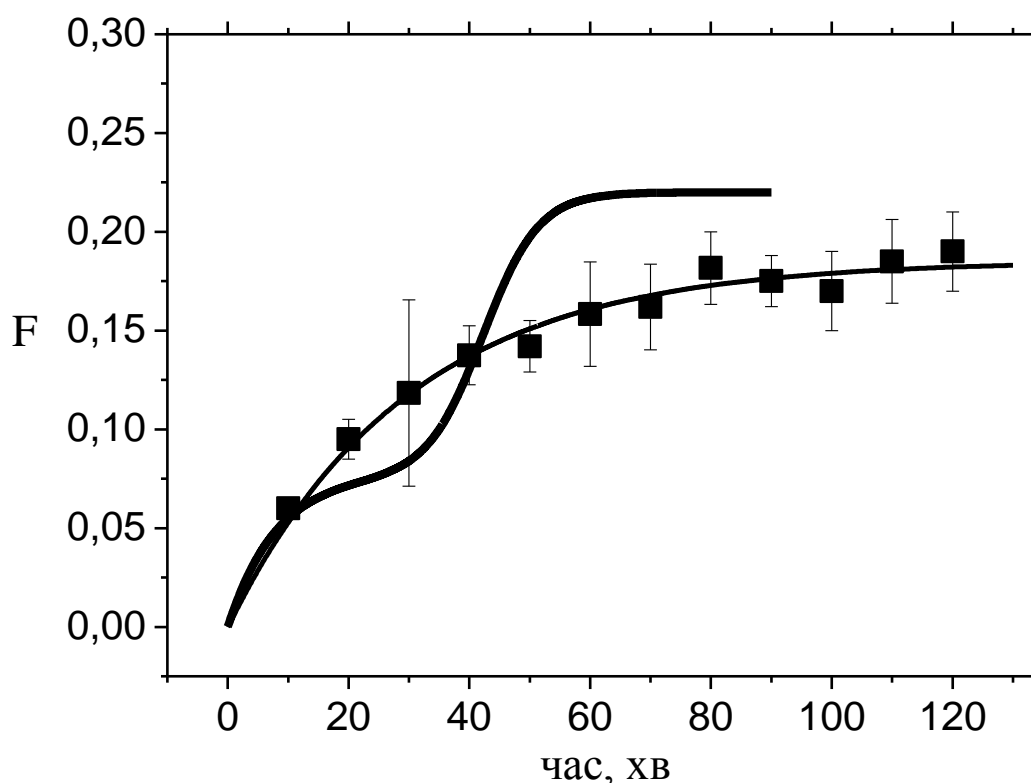


Рис. 3.7. Кінетика виходу ДНК при кометному електрофорезі нуклеїдів, отриманих з ізольованих ядер лімфоцитів (■). F – частка ДНК в хвості комети. Товста суцільна лінія – кінетична крива для нуклеїдів, отриманих з інтактних лімфоцитів, з рис. 3.2. $p = 0,05$, пермутаційний тест.

Таким чином, при використанні замість клітин ядер лімфоцитів для кометного електрофорезу кінетична крива може бути описана рівнянням простої мономолекулярної кінетики (див. рівняння 2.3), при підгонці якого під експериментальні дані отримуємо $A = 0,19 \pm 0,01$, а характеристичний час $\tau = 29,7 \pm 2,0$ хв. Отже, в цьому випадку не спостерігається окремого другого кооперативного етапу, тобто немає чіткого розподілу на «швидкі» та «повільні» петельні домени.

Така закономірність може бути пояснена відмінностями внутрішнього середовища нуклеїдів при використанні клітин та ядер лімфоцитів. В першому випадку, воно складається лише з ДНК, концентрація якої досить висока перед

початком електрофорезу. Так, враховуючи загальну кількість ДНК в ядрі $6,6 \cdot 10^9$ пар нуклеотидів та діаметр клітини 10 мкм, що у випадку лімфоцитів приблизно дорівнює діаметру ядра, концентрація ДНК буде дорівнювати приблизно 14 мг/мл. Така концентрація, що має такий самий порядок, як і концентрація агарозного гелю навколо нуклеїдів (приблизно 7 мг/мл), буде зумовлювати суттєве уповільнення руху петельних доменів. Внаслідок виходу частини петель (поверхневих та релаксованих) на ранніх етапах електрофорезу, концентрація ДНК в нуклеїді зменшується і стає можливим рух петельних доменів, що розташовані всередині (кооперативність виходу). При використанні ізольованих ядер всередині нуклеїдів формується більш однорідне середовище за рахунок проникання агарози через ядерні пори перед процедурою лізису. Концентрація агарози не змінюється протягом електрофорезу, що зумовлює постійну (рівномірну) затримку виходу ДНК, але виключає ефект кооперативності. Таким чином, хоча вихід ДНК є одноступеневим, він не є миттєвим (одномоментним), як це спостерігалось, наприклад, при повторному проведенні електрофорезу після вимкнення електричного струму (гістерезисна поведінка), чи при додаванні невисоких концентрацій інтеркаляторів, що здатні релаксувати переважну більшість петельних доменів [94].

Для встановлення впливу надспіралізації петельних доменів на швидкість їх виходу в хвіст комети у випадку використання ізольованих ядер лімфоцитів було проведено кометний електрофорез в присутності інтеркалятора хлорокіну. Були обрані концентрації 25 мкг/мл, яка забезпечує максимальну релаксацію петельних доменів ДНК, та 1000 мкг/мл, що зумовлює накопичення в них позитивної надспіралізації. Подібно як і в досліджах з використанням нуклеїдів, отриманих з клітин лімфоцитів, при додаванні 25 мкг/мл хлорокіну в електрофоретичний буфер вихід ДНК під дією струму значного полегшується у порівнянні з дослідом без інтеркалятора і максимально можливий вміст ДНК у хвостах комет спостерігається вже на 10-ій хвилині електрофорезу ($A = 0,18 \pm 0,01$, $\tau = 6,2 \pm 1,6$ хв). При використанні 1000 мкг/мл хлорокіну відбувалося

уповільнення виходу ДНК під час електрофорезу, а також незначне зниження максимально можливої частки ДНК у хвостах комет ($A = 0,13 \pm 0,01$, $\tau = 17,7 \pm 3,5$ хв) (рис. 3.8) [94].

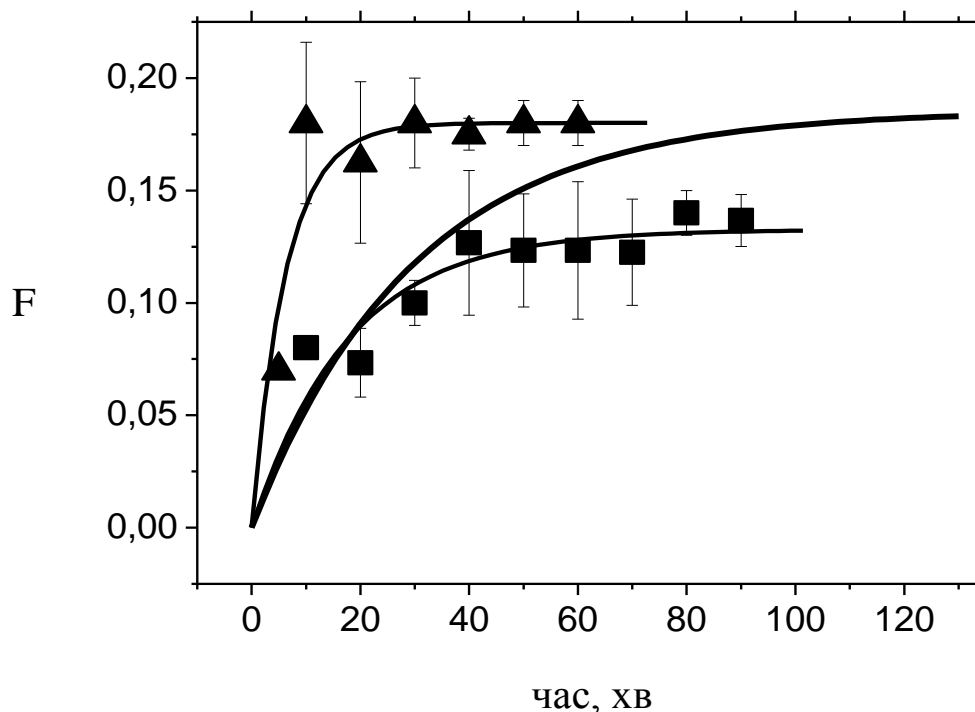


Рис. 3.8. Кінетика виходу ДНК за відсутності (суцільна крива) та в присутності 25 мкг/мл (▲) та 1000 мкг/мл (■) хлорокіну при використанні виділених ядер лімфоцитів. F – частка ДНК в хвості комети. $p = 0,005$ (25 мкг/мл хлорокіну порівняно з контрольним експериментом), $p = 0,0004$ (1000 мкг/мл хлорокіну порівняно з контрольним експериментом), пермутаційний тест.

Таким чином, було показано, що в нуклеоїдах, отриманих з ізольованих ядер лімфоцитів, наявні петлі ДНК, чутливі до дії інтеркалятора. Релаксація таких петель при додаванні 25 мкг/мл хлорокіну призводить до значного полегшення їх виходу при електрофорезі, тоді як накопичення позитивної надспіралізації в присутності 1000 мкг/мл інтеркалятора зумовлює ускладнення їх руху під дією електричного струму. Дані експерименти підтверджують, що наявність надспіралізації будь-якого знаку також є важливим фактором, що впливає на швидкість міграції петель ДНК при електрофорезі (на рівні із

розташуванням петель в межах нуклеоїду та особливостями середовища в голові нуклеоїду). Враховуючи той факт, що при використанні ізольованих ядер для кометного електрофорезу вдалося мінімізувати вплив концентрації ДНК на ефективність міграції внутрішніх петельних доменів, даний підхід дозволяє більш чітко оцінювати саме вплив надспіралізації на вихід петель ДНК при кометному електрофорезі.

Отже, було досліджено фактори, що впливають на швидкість міграції петельних доменів ДНК при гель-електрофорезі ізольованих клітин. В даній роботі вперше було показано, що одним з таких факторів є розташування петельних доменів – всередині або на поверхні нуклеоїду. Рух петельних доменів, розташованих на поверхні нуклеоїду, не залежить від їхньої надспіралізації, а опором для цього руху слугує тільки агарозний гель у мікрооточенні нуклеоїду. Внутрішні петельні домени змушені долати додатковий опір, що створюється самою ДНК всередині нуклеоїду. Окрім цього, було з'ясовано механізм, що лежить в основі кооперативності процесу виходу внутрішніх петельних доменів. Кооперативність пов'язана зі зниженням концентрації ДНК всередині голови нуклеоїду протягом електрофорезу (при використанні нуклеоїдів, отриманих з клітин лімфоцитів). При цьому, кооперативність відсутня у випадку приготування нуклеоїдів з ізольованих ядер лімфоцитів, коли внутрішнє середовище в голові нуклеоїду формується за рахунок агарози та ДНК, а тому є більш стабільним (концентрація агарози не змінюється протягом електрофорезу). Отримані результати також вказують, що для внутрішніх петельних доменів надспіралізація є іншим важливим фактором, який впливає на швидкість руху. Було показано, що використання ядер лімфоцитів для проведення кометного електрофорезу є більш оптимальним протоколом для оцінки рівня надспіралізації та його впливу на вихід петель ДНК.

Висновки:

1. Встановлено, що два етапи міграції ДНК при кометному електрофорезі відображають два типи петельних доменів. На першому етапі мігрують поверхневі петлі, рух яких не залежить від рівня надспіралізації. На другому етапі, у кооперативний спосіб, мігрують внутрішні петлі нуклеоїду, рух яких гальмується їхньою власною торсійною напругою при витягуванні петель і силами тертя, що створюються масою ДНК нуклеоїду.
2. Показано, що кооперативність процесу міграції внутрішніх петель нуклеоїду визначається залежністю швидкості міграції від концентрації ДНК всередині нуклеоїду: зниження концентрації у процесі електрофорезу пришвидшує рух.
3. Вперше було досліджено кінетику виходу петель ДНК з нуклеоїдів, отриманих з ізольованих ядер лімфоцитів, та показано відсутність кооперативності виходу. Це пояснюється особливостями формування агарозного гелю навколо клітинних ядер та підтверджує висновок щодо причин кооперативності у випадку нуклеоїдів, отриманих із цілих клітин.

Результати досліджень, поданих у даному підрозділі, опубліковані у працях [87, 94, 115, 117, 118].

3.2. Механізми фіксації основ петельних доменів ДНК

Було виявлено, що у жодному з описаних вище експериментів, незалежно від швидкості міграції петельних доменів, максимальний вихід ДНК у хвості комет (рівень насичення) не перевищував 25% (навіть у дослідях з найбільш оптимальною для релаксації петель концентрацією інтеркаляторів). Можна припустити, що велика кількість петельних доменів в міру роздільної здатності методу не може мігрувати через пори агарозного гелю при кометному електрофорезі (ймовірно, через занадто великі розміри цих петель). При цьому в окремих випадках частка петельних доменів, які взагалі не можуть виходити в хвіст комети, була навіть набагато нижча, ніж в контрольних експериментах (наприклад, як при додаванні дуже високих концентрацій хлорокіну). Отже, за певних умов можливе збільшення кількості великих петельних доменів ДНК, які не будуть виходити в хвіст комети при електрофорезі. Найбільш логічним поясненням цього є утворення більших за розміром петель ДНК із декількох менших за рахунок руйнування білково-нуклеїнових взаємодій в основах петель.

3.2.1. Вплив денатуруючих агентів на рівень виходу ДНК при кометному електрофорезі. Для дослідження механізмів фіксації основ петельних доменів було проведено ряд експериментів з використанням різноманітних білкових денатуруючих агентів (сечовина, додецилсульфат натрію). Обидва денатуранти є неспецифічними по відношенню до різних типів білків [102, 103, 121, 122]. Було виявлено, що при проведенні кометного електрофорезу після обробки нуклеоїдів у розчинах з 0,3% додецилсульфату натрію чи 8 М сечовини відбувається суттєве зниження максимального виходу ДНК при кометному електрофорезі. Рівень насичення для обох денатуруючих агентів становив приблизно 12% (кінетичні криві для двох випадків були

практично ідентичні), що майже вдвічі нижче, ніж в контрольних експериментах (рис. 3.9) [87, 105, 115, 123].

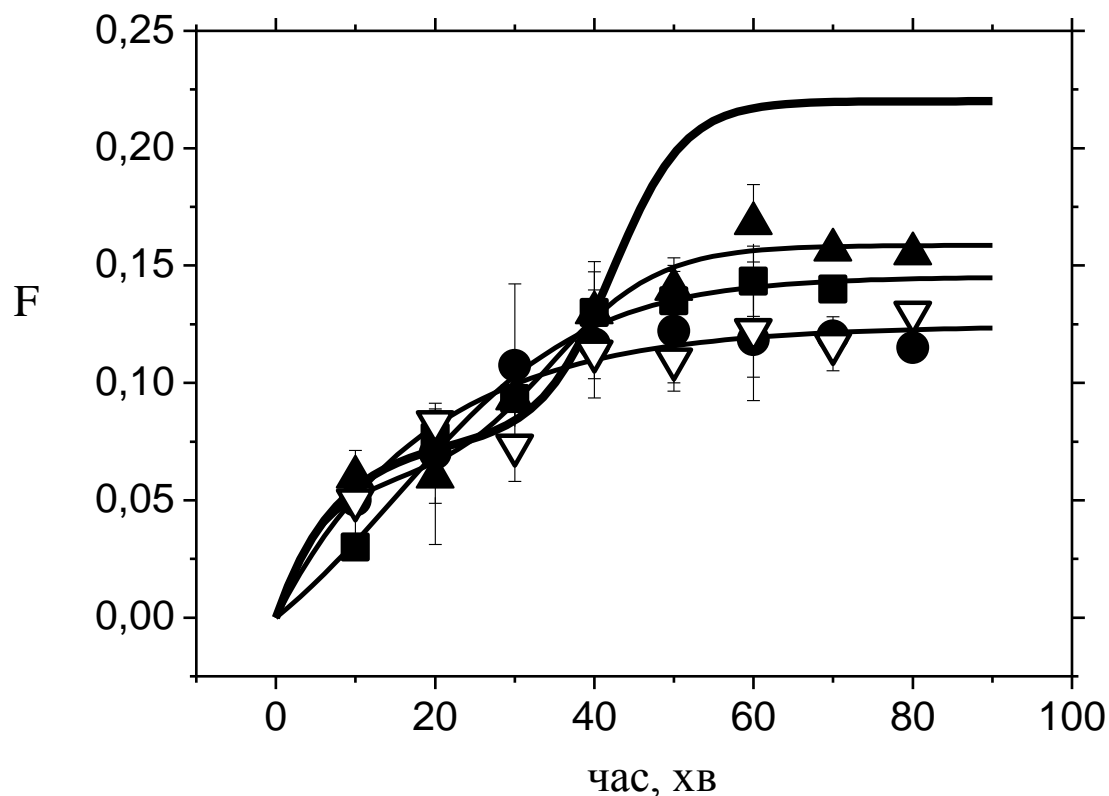


Рис. 3.9. Кінетика виходу ДНК при кометному електрофорезі після обробки нуклеїдів 0,3% додецилсульфату натрію (▽), а також 2 М (▲), 4 М (■) та 8 М (●) сечовини. F – частка ДНК в хвості комети. Товста суцільна лінія – кінетична крива за відсутності попередньої обробки денатурантами з рис. 3.2. $p = 0,0009$ (8 М сечовини та 0,3% додецилсульфату натрію порівняно з контрольним експериментом), пермутаційний тест.

Додатково були проведені аналогічні експерименти з 1 М, 2 М та 4 М сечовини. При цьому було встановлено, що при обробці нуклеїдів у розчині з 4 М денатуруючого агенту максимальний вихід ДНК при електрофорезі становив не більше 14%, а при витримці їх з 2 М сечовини рівень насичення був приблизно 16% (рис. 3.9). При обробці клітин 1 М сечовини ефекту

зниження рівня насичення практично не спостерігалось (результати не наведені) [87, 105, 123].

Найбільш ймовірним поясненням зниження рівня насичення при обробці нуклеодів денатурантами є зростання частки петель ДНК, що не можуть мігрувати в пори агарози при кометному електрофорезі. Як вже було зазначено, нездатність виходити в хвіст комети пов'язана із занадто великими розмірами таких петельних доменів. Очевидно, що при тотальній денатурації білків буде відбуватися порушення взаємодій між ДНК та білками, які забезпечують фіксацію основ петельних доменів. Внаслідок цього з декількох невеликих петель ДНК, розташованих поряд, буде формуватися один великий петельний домен, який втрачає здатність до міграції при кометному електрофорезі.

Таким чином, було встановлено, що при концентрації сечовини 8 М руйнується значна частка основ петельних доменів. Цікаво, що менші концентрації (2 і 4 М), недостатні для повної денатурації білків [121], забезпечують руйнування, відповідно, приблизно 60 і 80 % таких петель. Це означає, що фіксація основ петель залежить від певних білок-білкових взаємодій, що можуть бути зруйновані при не надто високих концентраціях денатуранту.

Однак, не зважаючи на той факт, що обрані денатуранти є неспецифічними до різних типів білків, навіть при їх високих концентраціях близько 12% ДНК може виходити у хвіст комети при електрофорезі. Більше того, були проведені експерименти, у яких після інкубації нуклеодів з 8 М сечовини проводили електрофорез (70 хвилин), а потім вимикали струм та аналізували відносний вміст ДНК у хвостах комет через певні проміжки часу (15, 30, 60 та 90 хвилин). У таких експериментах не спостерігали зниження частки ДНК у хвостах комет (оборотності виходу петель ДНК), як це було виявлено у контрольних експериментах. Так, навіть через 90 хвилин після вимкнення струму відносний вміст ДНК у хвостах комет залишався таким, як і відразу по закінченні електрофорезу. Такі результати вказують, що хвіст комети після денатурації білків формується переважно поверхневими та

релаксованими петельними доменами (описані раніше «швидкі» петлі, які виходять на ранніх етапах електрофорезу в контрольних експериментах без обробки нуклеїдів денатуруючими агентами). Оскільки, міграція таких петель не залежить від рівня їх надспіралізації, вони не можуть повертатися в голову комети після вимкнення електричного струму.

Отже, було показано, що денатурація білків за допомогою 8 М сечовини призводить до дестабілізації практично усіх надспіралізованих петельних доменів, які надалі не можуть мігрувати у хвіст комети при електрофорезі. При цьому така попередня обробка нуклеїдів практично не впливає на вихід поверхневих петель ДНК. Можливо, дестабілізація основ таких (не дуже великих, див. підрозділ 3.4) петельних доменів не призводить до суттєвого збільшення їх контурних розмірів. Інша можливість полягає в тому, основи таких доменів фіксуються за рахунок якихось інших механізмів, що потребують подальшого дослідження.

3.2.2. Вплив інтеркалятора хлорокіну на рівень виходу ДНК при кометному електрофорезі. Подібно до експериментів з використанням денатуруючих агентів, зниження максимального виходу ДНК (рівня насичення) спостерігали також і при проведенні кометного електрофорезу в присутності високих концентрацій інтеркалятора хлорокіну (наприклад, 1000 мкг/мл), порівняно з контрольними експериментами. При чому, даний ефект спостерігається як при використанні нуклеїдів, отриманих з клітин лімфоцитів, так і при використанні ізольованих ядер. Так, у першому випадку при додаванні 1000 мкг/мл хлорокіну максимальний вихід ДНК становив приблизно 8%, порівняно з контролем, де рівень насичення сягає майже 22% (рис. 3.10, а). В експериментах з використанням ядер лімфоцитів для приготування нуклеїдів ефект концентрації 1000 мкг/мл хлорокіну хоч і є дещо менш драматичним, але теж чітко проявляється. Так, в контрольному досліді максимальний вихід ДНК становить близько 19%, в той час як при додаванні хлорокіну цей показник був лише 13% (рис 3.10, б) [87, 94, 105, 123].

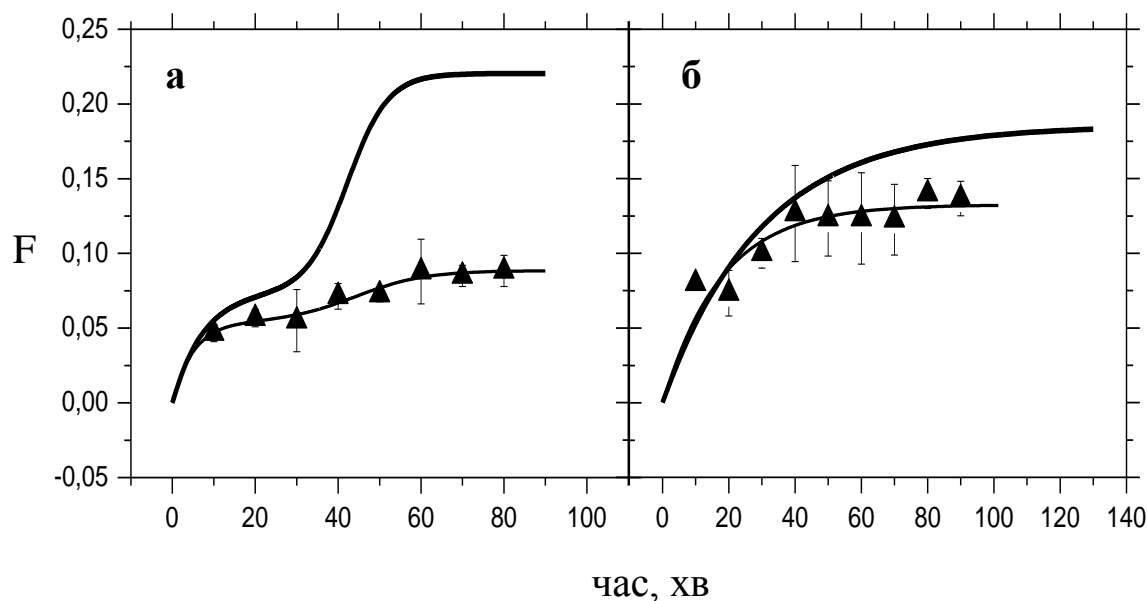


Рис. 3.10. Кінетика виходу ДНК за відсутності (товста суцільна лінія) та в присутності 1000 мкг/мл (\blacktriangle) хлорокіну при електрофорезі нуклеоїдів, отриманих з клітин лімфоцитів (а) або ізольованих ядер лімфоцитів (б). F – частка ДНК в хвості комети. $p = 0,0001$ (а), $p = 0,0004$ (б), пермутаційний тест.

Зниження рівня насичення при електрофорезі в присутності інтеркалятора не можна пояснити лише за рахунок зростання рівня позитивної надспіралізації у нуклеоїдах, оскільки при додаванні 1000 мкг/мл абсолютне значення рівня надспіралізації дорівнює такому, як за відсутності хлорокіну (тільки з протилежним знаком) [116]. Позитивний заряд хлорокіну (молекула інтеркалятора має заряд +2) навіть за такої концентрації також не зможе забезпечити таке суттєве зниження виходу ДНК. Ці два фактори в основному будуть впливати лише на затримку міграції петельних доменів при електрофорезі. Причиною зниження саме рівня насичення при додаванні високих концентрацій хлорокіну, як і у випадку з денатурантами, є зростання частки петель ДНК, які не можуть мігрувати в пори агарози при кометному електрофорезі. Очевидно, що при інтеркаляції хлорокіну в сайти фіксації основ петель ДНК відбувається локальне розкручування молекули ДНК, що може призводити до порушення взаємодій між ДНК та білками, які забезпечують

таку фіксацію. Зрозуміло, що ймовірність вбудовування інтеркалятора саме в такі сайти зростає при збільшенні його концентрації. Саме тому максимальний ефект зниження рівня насичення спостерігається при додаванні 1000 мкг/мл хлорокіну.

Менш показовими є концентрації 500 мкг/мл (максимальний вихід ДНК становить приблизно 15%) та 250 мкг/мл (рівень насичення складає 16%) на противагу контрольним експериментам з максимальним виходом на рівні 22%. При нижчих концентраціях інтеркалятора суттєвого зниження виходу ДНК не спостерігається (рис. 3.11) [105, 123].

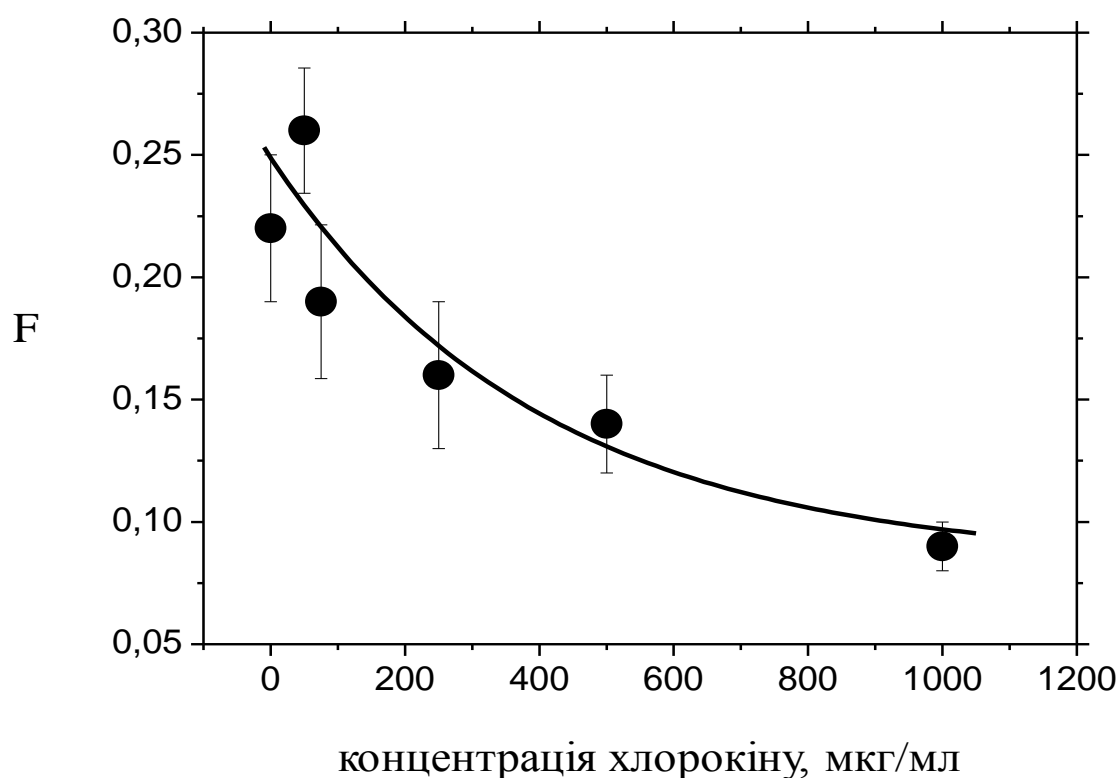


Рис. 3.11. Максимальна частка ДНК у хвостах комет (F) як функція концентрації хлорокіну. Суцільна крива – результат інтерполяції.

Отже, можна припустити, що основи петельних доменів зафіксовані за допомогою таких взаємодій між ДНК та білками, які можуть бути легко зруйновані за рахунок локального розкручування молекули ДНК внаслідок

вбудовування молекули інтеркалятора. Водночас, як показано у попередньому пункті, фіксація основ петель залежить від білок-білкових взаємодій.

Таким чином, було показано, що високі концентрації інтеркалятора хлорокіну та білкові денатуранти (сечовина, додецилсульфат натрію) зумовлюють порушення основ петельних доменів. Внаслідок цього з таких петель формуються набагато більші домени, які не можуть мігрувати в пори агарозного гелю за описаних умов електрофорезу. Тому у таких експериментах спостерігається суттєве зниження рівня насичення ДНК (максимально можливого виходу ДНК у хвості комет).

3.2.3. Кінетика виходу ДНК після попередньої обробки нуклеоїдів хлорокіном. Як було описано вище, при проведенні електрофорезу в присутності 1000 мкг/мл хлорокіну, коли інтеркалятор додавали безпосередньо в електрофоретичний буфер, спостерігалось зниження рівня насичення виходу ДНК у порівнянні з контрольними дослідженнями без інтеркалятора. В цих експериментах було виявлено, що вбудовування інтеркалятора в сайти фіксації основ петельних доменів зумовлює локальне розкручування подвійної спіралі ДНК в цих сайтах, що призводить до дестабілізації білково-нуклеїнових взаємодій, які закріплюють основи петель ДНК. Така дестабілізація супроводжується руйнуванням невеликих петельних доменів, що розташовані поряд, та формуванням з них набагато більших петель ДНК, які не можуть мігрувати при кометному електрофорезі. Отримані результати свідчать, що за таких умов більше половини петельних доменів втрачають здатність виходити у хвіст комети під дією електричного струму (рівень насичення при проведенні електрофорезу в присутності 1000 мкг/мл хлорокіну вдвічі нижчий ніж за відсутності інтеркалятора) [87, 105].

Отже, фіксація великої кількості петельних доменів здійснюється за рахунок слабких взаємодій між білками та ДНК, що відносно легко порушуються за рахунок локального розкручування подвійної спіралі при вбудовуванні інтеркалятора. Для подальшого дослідження особливостей таких

взаємодій, що беруть участь у фіксації основ петельних доменів були проведені експерименти, в яких препарати нуклеоїдів попередньо витримували в розчині з 1000 мкг/мл хлорокіну, після чого здійснювали стандартний кометний електрофорез без додавання інтеркалятора до електрофоретичного буферу. Цікаво, що в цьому випадку кінетична крива залежності частки ДНК у хвостах комет досить схожа до контрольної кривої: вона також має двоступеневий характер, а максимальний вихід ДНК на верхньому плато становить близько 23% (рис. 3.12) [124, 125].

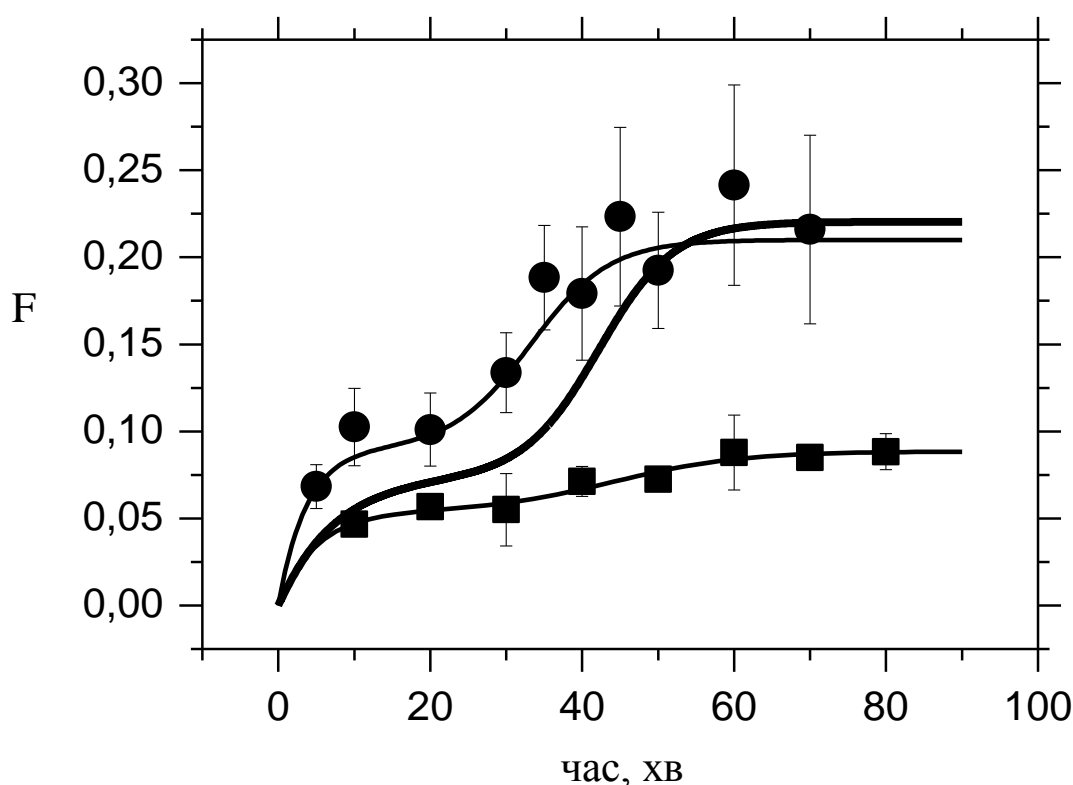


Рис. 3.12. Кінетика виходу ДНК при кометному електрофорезі в присутності 1000 мкг/мл хлорокіну (■) або після попередньої обробки нуклеоїдів 1000 мкг/мл хлорокіну (●). F – частка ДНК в хвості комети. Товста суцільна лінія - кінетична крива за відсутності дії хлорокіну з рис. 3.2. $p = 0,0001$ (■ відносно контролю), $p = 0,2$ (● відносно контролю), пермутаційний тест.

Тобто, за таких умов експерименту практично не спостерігається ефекту дії інтеркалятора. На відміну від попередніх дослідів, коли хлорокін був

присутній протягом всього часу електрофорезу, забезпечуючи постійну дестабілізацію ДНК-білкових взаємодій у місцях фіксації петель, в цих експериментах дія інтеркалятора є тимчасовою. Можна припустити, що після припинення впливу хлорокіну можливе практично повне відновлення усіх зв'язків між ДНК та білками, що стабілізують петельні домени.

Наші експерименти показують, що більшість петель стабілізується відносно слабкими зв'язками між ДНК і білками, які можуть бути порушені за рахунок локального розкручування подвійної спіралі в місцях таких взаємодій. Саме це і спостерігається при додаванні високих концентрацій інтеркалятора хлорокіну. Однак, було виявлено, що така дестабілізація є оборотною: після припинення дії інтеркалятора дані зв'язки можуть відновлюватися, а відповідно, відновлюються також петельні домени, що стабілізуються за рахунок цих взаємодій.

Прикладом таких зв'язків можуть бути нещодавно описані в літературі взаємодії типу «ДНК-СТСФ-когезин», що забезпечують фіксацію досить великої кількості петельних доменів. В цьому випадку білок СТСФ взаємодіє з ДНК в специфічних сайтах зв'язування, а когезин замикається в кільце навколо подвійної спіралі в межах цих сайтів. При цьому обидва білки також взаємодіють між собою [51]. Внаслідок локального розкручування подвійної спіралі при вбудовуванні інтеркалятора відбувається порушення зв'язків між ДНК і білком СТСФ, але не між СТСФ та когезином. Оскільки СТСФ та когезин залишаються фізично зв'язаними між собою, після припинення впливу інтеркалятора досить легко відновлюється зв'язок між білком СТСФ та його специфічним сайтом зв'язування на ДНК, а відповідно, відновлюється і власне петельний домен, який стабілізується за рахунок такої взаємодії.

Аналогічний ефект спостерігається після лізису клітин в присутності високої концентрації солі (наприклад, як при лізисі клітин для кометного електрофорезу). При обробці 2,5 М NaCl повинна відбуватись дисоціація білка СТСФ від ДНК, але не порушення його взаємодії з когезином. Відповідно, після повернення до фізіологічних умов відновлюється як взаємодія СТСФ з ДНК, так

і петельні домени, які він стабілізує. Це дає відповідь на давнє питання, чому після лізису клітин при приготуванні нуклеодів в них залишаються надспіралізовані петлі ДНК: висока іона сила (як і інтеркалятори) порушує взаємодії CTCF з ДНК, але, ймовірно, не впливає на взаємодії цього білка з когезином і не здатна зняти когезин з ДНК; зниження іонної сили після процедури лізису відновлює взаємодії CTCF з ДНК, а отже і самі петлі. На противагу цьому, у випадку тотальної білкової денатурації (наприклад, сечовиною чи додецилсульфатом натрію) руйнування петель ДНК є необоротним: кінетика виходу ДНК при електрофорезі подібна до такої, як за умов постійної присутності 1000 мкг/мл хлорокіну протягом електрофорезу [105].

Таким чином, отримані результати чудово узгоджуються з уявленням, що значна частина петельних доменів ДНК, які мігрують при кометному електрофорезі, стабілізуються за допомогою взаємодії комплексу білків CTCF та когезину з молекулою ДНК. Такі взаємодії можуть бути зруйновані при обробці нуклеодів денатуруючими агентами (сечовиною, додецилсульфатом натрію) або у випадку постійного впливу високої концентрації інтеркалятора протягом електрофорезу. При цьому дестабілізація даних зв'язків призводить до руйнування невеликих петель ДНК і утворення набагато більших за розміром доменів, що зумовлює значне зниження максимального виходу ДНК при кометному електрофорезі. Однак, за умов тимчасової дії інтеркалятора (до початку електрофорезу) відбувається наступне відновлення вищезазначених взаємодій, що проявляється у подібності кінетики виходу ДНК та рівня насичення, як це було характерно для контрольних експериментів за відсутності будь-яких додаткових впливів на нуклеодиди до початку чи під час проведення кометного електрофорезу. Аналогічно, петлі відновлюються і після лізису за умов високої концентрації солі із наступним поверненням до фізіологічної іонної сили. Отже, найбільш важливий висновок із наших спостережень полягає в тому, що петлі ДНК, наявні в нуклеодиді, відповідають петельним доменам хроматину.

3.2.4. Вплив ковалентних зшивок за допомогою формальдегіду на кінетику виходу ДНК. У подальших експериментах було проведено гелелектрофорез ізольованих клітин після попередньої обробки нуклеїдів $75 \mu\text{M}$ розчином формальдегіду. Було виявлено, що за таких умов кінетична крива виходу ДНК втрачає чіткий двоступеневий характер: зростання частки ДНК у хвостах комет відбувається поступово між 10 та 50 хвилинами електрофорезу, після чого досягається плато кривої приблизно на рівні 19% (рис. 3.13) [87].

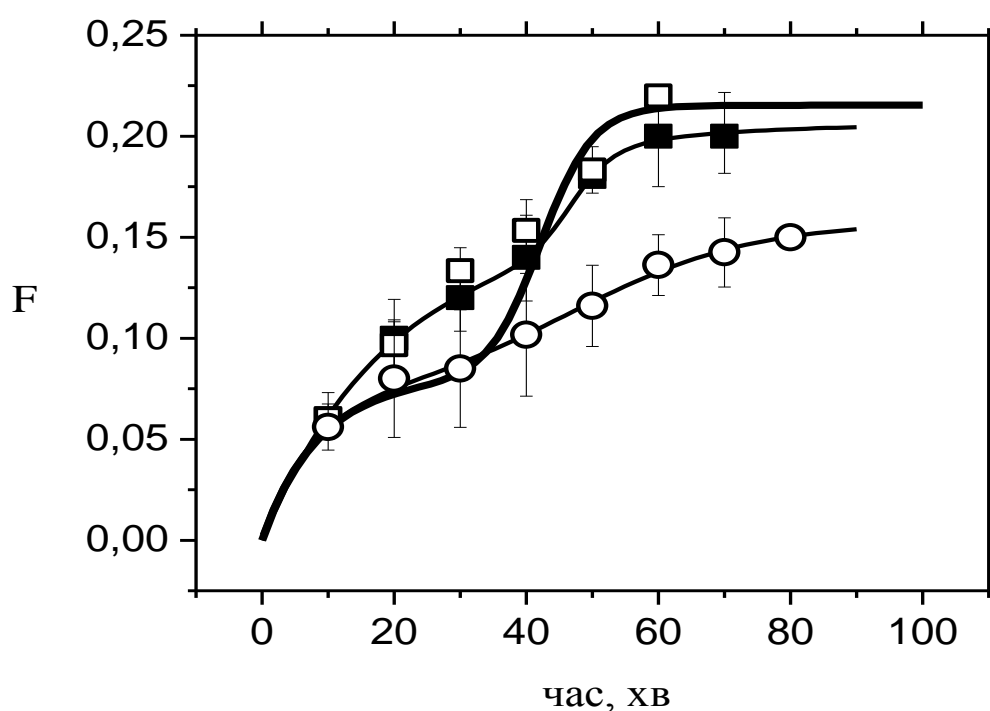


Рис. 3.13. Кінетика виходу ДНК при кометному електрофорезі після попередньої обробки нуклеїдів $75 \mu\text{M}$ формальдегіду за відсутності (■) та в присутності 500 мкг/мл хлорокіну (□) протягом електрофорезу. Для порівняння наведені кінетичні криві за відсутності (товста суцільна лінія) та в присутності 500 мкг/мл хлорокіну (○) без попередньої обробки нуклеїдів формальдегідом. F – частка ДНК в хвості комети. $p = 0,0002$ (500 мкг/мл хлорокіну без та з попередньою обробкою формальдегідом), $p = 0,9$ (після попередньої обробки формальдегідом за відсутності та в присутності 500 мкг/мл хлорокіну), пермутаційний тест.

Відомо, що формальдегід може індукувати ковалентні зшивки типу «ДНК-ДНК», «ДНК-білок» або «білок-білок» [101]. При цьому обробка клітин концентраціями формальдегіду вище 50 μM забезпечує переважне формування саме зшивок «ДНК-білок», тоді як інші типи зшивок, а також невелика кількість односторонніх розривів молекули ДНК можуть індукуватися при концентраціях нижче 30 μM [126]. Наші експерименти були спрямовані на індукцію стабільних зшивок між ДНК та білками у нуклеїдах перед проведенням кометного електрофорезу. Тому використовували концентрацію 75 μM формальдегіду. Індукція таких зшивок може зумовлювати певні перебудови у структурі нуклеїдів (об'єднання декількох петельних доменів з утворенням структур, що не можуть мігрувати при електрофорезі, реорганізація поверхневих та внутрішніх петель тощо). Тому після обробки нуклеїдів формальдегідом спостерігаються певні відмінності в кінетиці виходу петельних доменів у хвіст комети при електрофорезі у порівнянні з контрольними дослідженнями. Однак, загалом при використанні 75 μM формальдегіду основні особливості організації нуклеїду (наявність «швидких» та «повільних» петельних доменів, кількість петель ДНК, що можуть мігрувати в хвіст комети) практично не змінюються. Тобто, індукція ковалентних зшивок «ДНК-білок» кардинально не змінює організацію петельних доменів в межах нуклеїду [87, 127].

Більш суттєві відмінності були виявлені при проведенні кометного електрофорезу в присутності 500 мкг/мл інтеркалятора хлорокіну після попередньої обробки нуклеїдів 75 μM формальдегіду порівняно з дослідженнями, де така обробка не проводилася. Як було описано вище, додавання високих концентрацій хлорокіну (250, 500, 1000 мкг/мл) в електрофоретичний буфер призводить до значимого зниження максимального виходу ДНК при електрофорезі, на відміну від контрольних експериментів без інтеркалятора. Так, у випадку 500 мкг/мл хлорокіну рівень насичення виходу ДНК становить приблизно 14%, тоді як в контролі це значення сягає близько 22%. Проте, при обробці нуклеїдів розчином формальдегіду та подальшим проведенням

електрофорезу в присутності 500 мкг/мл інтеркалятора не спостерігається зниження максимального виходу ДНК: рівень насичення становить приблизно 19%, а кінетична крива загалом нагадує кінетику виходу ДНК після обробки нуклеодів формальдегідом, але за відсутності хлорокіну (рис. 3.13). Аналогічний ефект було виявлено при додаванні 250 мкг/мл інтеркалятора після попередньої обробки 75 μ M формальдегіду чи без такої обробки [87, 127].

Такі результати можна пояснити властивістю формальдегіду індукувати ковалентні зшивки «ДНК-білок» за обраної концентрації. Такі зшивки в місцях фіксації основ петельних доменів будуть забезпечувати їх надійну стабілізацію та нечутливість до впливу інтеркалятора. В цьому випадку при вбудовуванні молекул хлорокіну між парами азотистих основ буде відбуватися локальне розкручування подвійної спіралі ДНК, однак це не буде супроводжуватися порушенням взаємодій між ДНК та білками (за рахунок ковалентних зшивок між ними), на відміну від дослідів з інтеркалятором без попередньої обробки формальдегідом. Таким чином, в даних експериментах не відбувається збільшення розмірів петельних доменів, а відповідно, практично не змінюється частка петельних доменів, що можуть мігрувати в пори агарозного гелю при електрофорезі.

Отже, було досліджено деякі особливості закріплення основ петельних доменів та взаємодій між ДНК та білками, що їх стабілізують. Було встановлено, що більшість таких взаємодій є відносно нестабільними і можуть бути зруйнованими за рахунок локального розкручування подвійної спіралі ДНК при вбудовуванні інтеркалятора в місця фіксації основ петель ДНК, або внаслідок тотальної білкової денатурації за допомогою сечовини чи додецилсульфату натрію (навіть при використанні низьких концентрацій денатурантів). Порушення таких взаємодій призводить до збільшення частки великих за розмірами петель ДНК, які не можуть проходити крізь пори агарозного гелю при кометному електрофорезі, що проявляється у зниженні ефективності виходу ДНК. Однак, було показано, що після припинення дії інтеркалятора можливе відновлення даних взаємодій, а відповідно і петельних

доменів, які вони стабілізують. Такий ефект не спостерігається при використанні денатуруючих агентів, оскільки, в цьому випадку не відбувається збереження нативної структури білків. Окрім цього, стабілізація взаємодій, що забезпечують фіксацію основ петельних доменів, за допомогою ковалентних зшивок «ДНК-білок», індукованих формальдегідом, робить їх нечутливими до впливу високих концентрацій інтеркалятора: локальне розкручування подвійної спіралі ДНК не призводить до руйнування даних взаємодій.

Висновки:

1. Було виявлено суттєве зниження рівня максимального виходу ДНК при кометному електрофорезі в присутності високих концентрацій інтеркалятора хлорокіну або після попередньої обробки нуклеїдів денатуруючими агентами, що пов'язано з руйнуванням взаємодій, які забезпечують закріплення петельних доменів ДНК;
2. Дестабілізація взаємодій є оборотною у випадку використання інтеркалятора: після припинення його впливу зв'язки між ДНК і білками можуть відновлюватися;
3. Індукція ковалентних зшивок між ДНК та білками у місцях фіксації основ петельних доменів робить їх нечутливими до впливу високих концентрацій інтеркалятора.

Результати досліджень, поданих у даному підрозділі, опубліковані у працях [87, 94, 105, 115, 123-125, 127].

3.3. Кінетика виходу ДНК із нуклеоїдів, отриманих з бласттрансформованих лімфоцитів

На наступному етапі дослідження було проаналізовано відмінності в організації петельних доменів ДНК у транскрипційно активних клітинах. Як відомо, лімфоцити людини, які використовували для дослідження організації петель ДНК у всіх вищеописаних експериментах, знаходяться на стадії G_0 клітинного циклу та характеризуються дуже низьким рівнем транскрипції [128]. Для активації транскрипційних процесів у лімфоцитах було проведено реакцію бласттрансформації за допомогою рекомбінантного інтерлейкіну-2 людини. Даний цитокін є природнім фізіологічним стимулятором лімфоцитів, що в нормі синтезується Т-лімфоцитами людини у відповідь на імунний стимул. При зв'язуванні інтерлейкіну-2 з відповідними рецепторами на поверхні лімфоцитів відбувається стимуляція проліферації клітин (лімфоцити переходять з стадії G_0 на стадію G_1 клітинного циклу), а також запускається ряд сигнальних каскадів, що відповідають за підтримання життєздатності клітин (антиапоптичні сигнальні шляхи, активація репараційних систем та ін.) [96, 97, 129]. Всі ці процеси супроводжуються активацією транскрипції відповідних генів (описано близько 1500 генів, що можуть бути активовані під дією інтерлейкіну-2). Окрім цього, даний цитокін може також пригнічувати експресію великої кількості генів (переважно генів антипроліферативних та апоптичних сигнальних шляхів, як наприклад, гени-супресори пухлин, каспаза 8 та багато інших) [96]. Як було зазначено у попередніх розділах, регуляція транскрипції (її активація чи репресія) є одним з основних механізмів формування та реорганізації петельних доменів ДНК [10, 16, 17]. Таким чином, можна припустити, що внаслідок трансформації практично неактивних лімфоцитів під дією інтерлейкіну-2 будуть відбуватися певні зміни в організації петель ДНК.

Ефективність бласттрансформації була оцінена за допомогою цитологічного аналізу морфології клітин. Було виявлено, що трансформовані

клітини чітко відрізняються від неактивованих лімфоцитів: вони мають досить велике за розміром ядро (практично вдвічі більше, ніж ядро інтактного лімфоцита), яке до того ж набагато гірше профарбовується (ймовірно, за рахунок еухроматизації в ядрах бласттрансформованих лімфоцитів), а також відмінне ядерно-цитоплазматичне співвідношення, більше зсунуте у бік ядра (в у трансформованих клітинах це співвідношення становить 4:1, тоді як у лімфоцитів воно дорівнює близько 2:1) (рис 3.14) [95, 130]. На основі такого аналізу було встановлено, що в наших експериментах ефективність трансформації була досить високою: частка бласттрансформованих клітин становила в середньому 45%, а в окремих експериментах сягала близько 70% (експерименти з рівнем трансформації нижче 40% в подальшому не враховувалися).

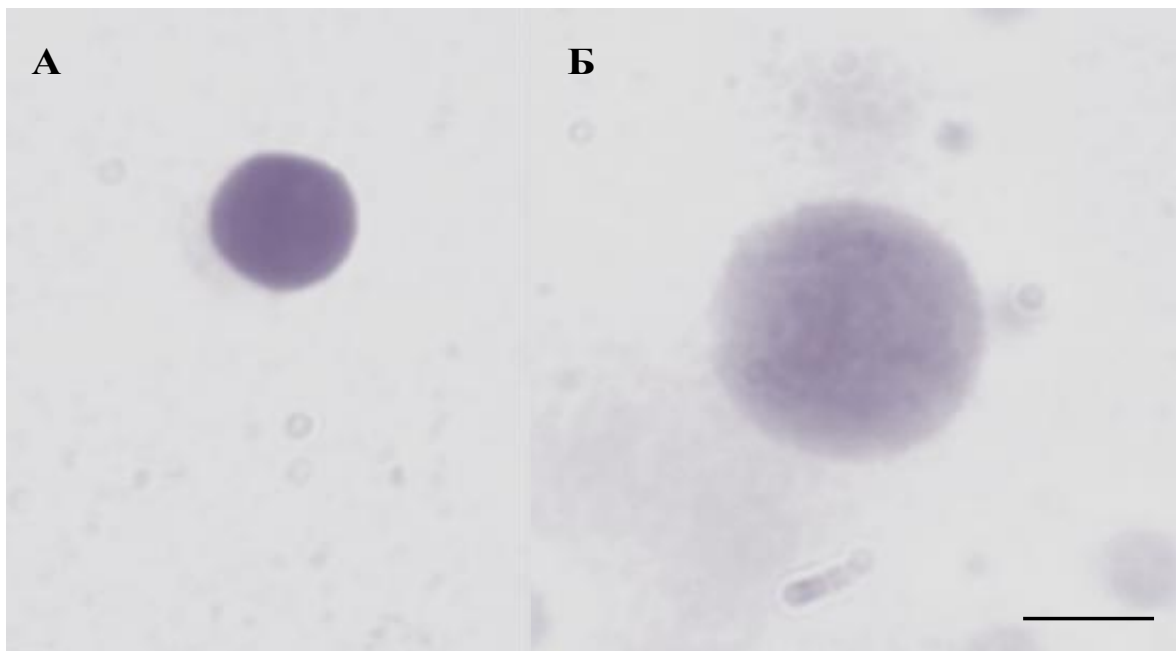


Рис. 3.14. Фотографії інтактного (А) та бласттрансформованого (Б) лімфоцитів людини. Шкала – 10 мкм.

Бласттрансформацію лімфоцитів за допомогою інтерлейкіну-2 проводили протягом 24 та 44 годин. Такий час був обраний не випадково: за даними [131, 132] саме після 24 годин інкубації більшість клітин знаходиться на стадії G_1 і

лише незначна кількість лімфоцитів переходить в S-фазу клітинного циклу, тоді як після 44 годин активації більшість клітин вже знаходиться на стадії G_2 . За даними проточної цитометрії було встановлено, що в наших експериментах після 24 годин бласттрансформації лімфоцитів приблизно 75% клітин знаходиться на стадіях G_0/G_1 клітинного циклу (враховуючи дані [131, 132], можна вважати, що клітини знаходяться на стадії G_1), а після 44 годин інкубації з інтерлейкіном-2 близько 55% клітин переходить на стадію G_2 (рис. 3.15).

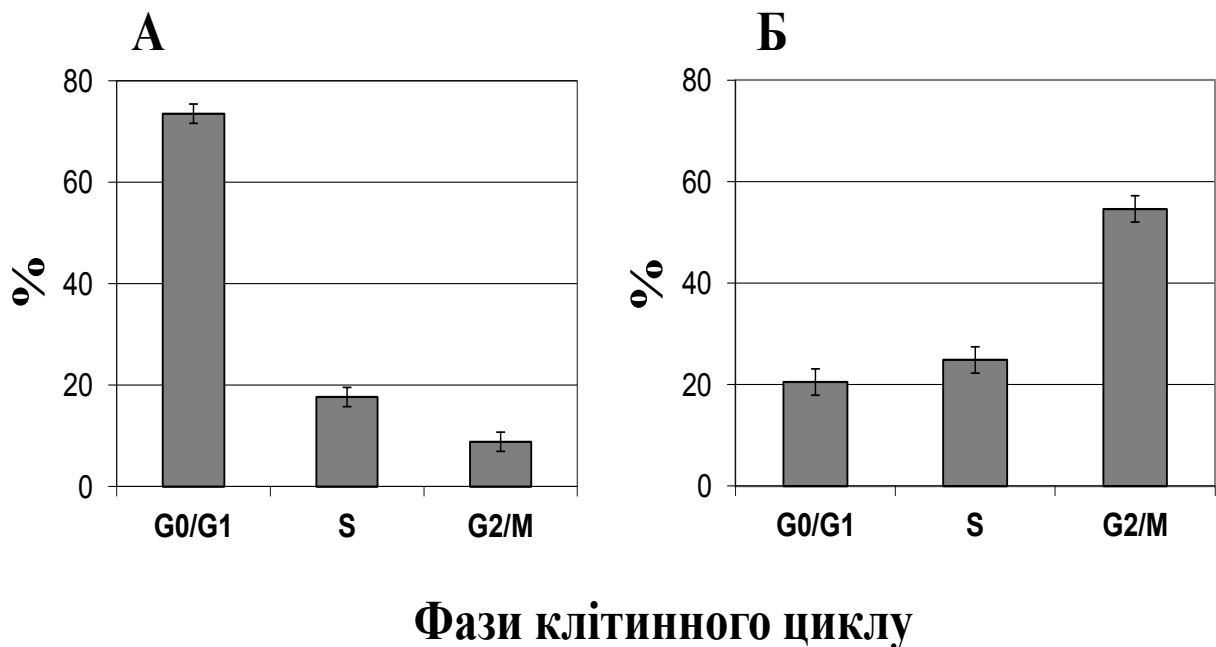


Рис. 3.15. Розподіл за фазами клітинного циклу після 24 годин (А) та 44 годин (Б) активації лімфоцитів.

Було досліджено кінетику виходу ДНК із нуклеоїдів, отриманих після бласттрансформації лімфоцитів протягом 24 годин в присутності інтерлейкіну-2. Типові приклади комет на різних етапах електрофорезу (у порівнянні з кометами, отриманими при електрофорезі неактивованих лімфоцитів) представлені на рис. 3.16; в обох випадках загальна морфологія комет практично не відрізняється.

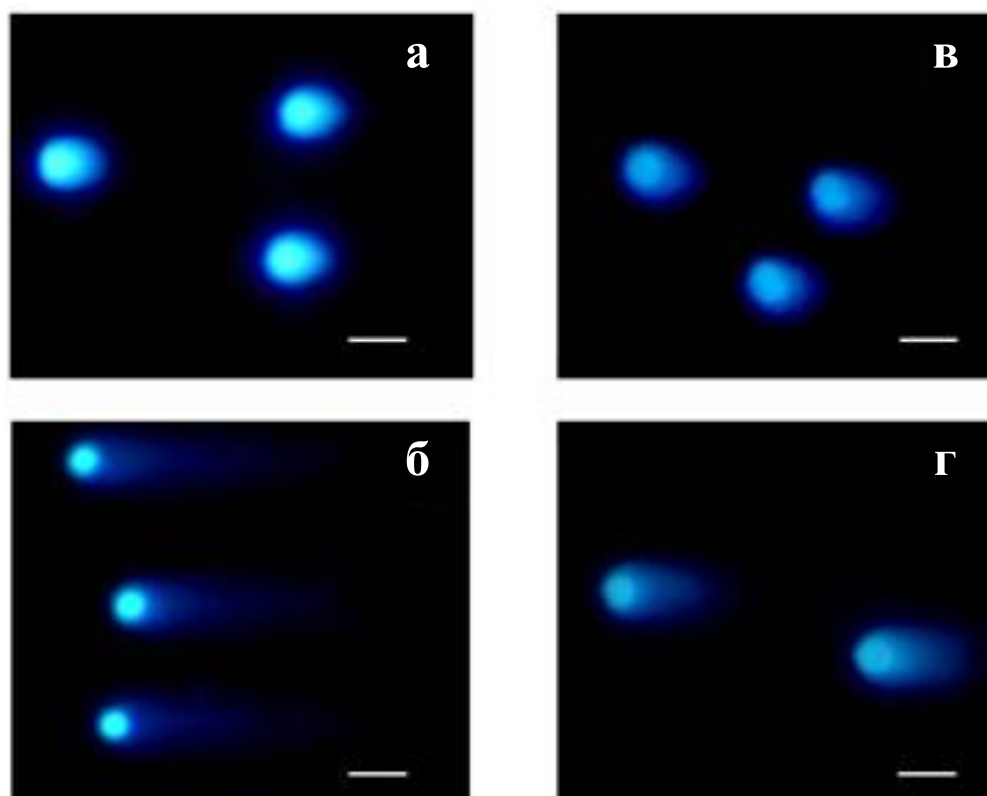


Рис. 3.16. Фотографії комет після 20-ї (а, в) та 60-ї (б, г) хвилин електрофорезу нуклеїдів, отриманих з інтактних (а, б) та бласттрансформованих (в, г) лімфоцитів. Шкала – 10 мкм.

Кінетична крива виходу ДНК при кометному електрофорезі бласттрансформованих лімфоцитів має двоступеневий характер, однак, спостерігаються певні відмінності у порівнянні з кінетичною кривою інтактних лімфоцитів. Так, нижнє плато кривої досягається трохи повільніше, ніж у випадку лімфоцитів, а максимальний вихід ДНК на даному етапі вдвічі вищий для трансформованих клітин (становить близько 14% ДНК у хвостах комет). Подальший вихід ДНК також відбувається повільніше у випадку активованих лімфоцитів: верхнє плато формується тільки після 80-ї хвилини електрофорезу, тоді як для лімфоцитів максимальний вихід спостерігається вже на 60-й хвилині. Окрім цього, на даному етапі в хвіст комети виходить лише близько 8% ДНК, в той час як у випадку інтактних лімфоцитів це значення становило приблизно 14% (рис. 3.17) [95, 133, 134].

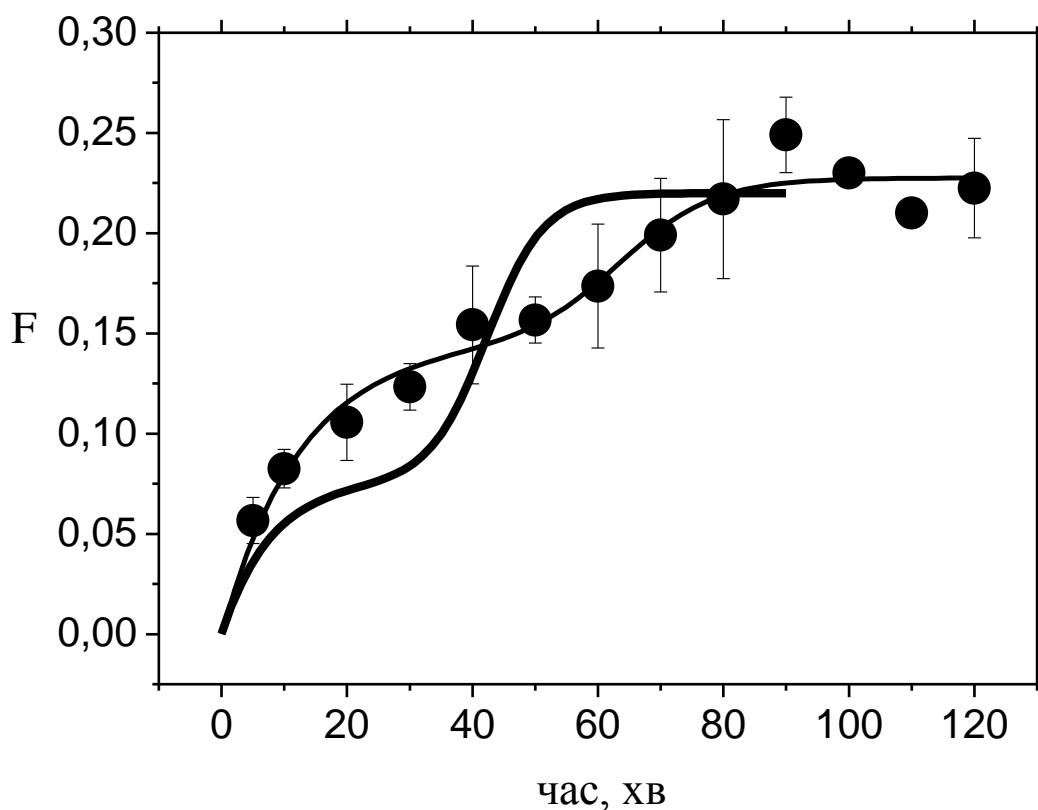


Рис. 3.17. Кінетика виходу ДНК при кометному електрофорезі нуклеоїдів, отриманих з бласттрансформованих лімфоцитів людини після 24 годин активації. F – частка ДНК в хвості комети. Товста суцільна лінія – кінетична крива для нуклеоїдів, отриманих з інтактних лімфоцитів, з рис. 3.2. $p = 0,04$, пермутаційний тест.

Таким чином, внески нижнього та верхнього плато у формування кінетичної кривої є взаємно зміненими у випадку інтактних та бласттрансформованих лімфоцитів, в той час як загальний вихід ДНК (рівень насичення) практично не відрізняється і становить близько 22%. Більше того, були виявлені суттєві відмінності у значеннях кінетичних параметрів для обох типів клітин. Особливо сильно ці відмінності проявляються для верхнього плато кінетичної кривої. Так, час напівпереходу t_0 є значно вищим у випадку активованих клітин, а константа швидкості k_2 має помітно нижче значення, ніж для інтактних лімфоцитів (Таблиця 3.1) [95].

Таблиця 3.1

**Кінетичні параметри для інтактних та бласттрансформованих
лімфоцитів**

Кінетичні параметри	Інтактні лімфоцити	Бласттрансформовані лімфоцити
A_1 (максимальна частка ДНК для першого етапу електрофорезу)	0,07±0,01	0,14±0,01
τ_1, хв (характеристичний час для першого етапу електрофорезу)	7,8±2,9	12,5±3,9
A_2 (максимальна частка ДНК для другого етапу електрофорезу)	0,14±0,01	0,08±0,01
k_2, хв⁻¹ (константа швидкості для другого етапу електрофорезу)	0,22±0,08	0,13±0,08
t_0, хв (час напівпереходу для другого етапу електрофорезу)	42,5±1,0	63,5±5,0

Такі результати свідчать на користь того, що ступінь кооперативності виходу петель ДНК при електрофорезі нуклеодів, отриманих з бласттрансформованих лімфоцитів, стає помітно нижчим. Як було аргументовано раніше, ефект кооперативності на даному етапі електрофорезу пояснюється залежністю швидкості виходу ДНК від її сумарної концентрації в голові комети (при зниженні частки ДНК в голові комети протягом електрофорезу відбувається підвищення швидкості виходу). При цьому кооперативність очікувано буде слабшою, якщо вихідна концентрація ДНК є нижчою. Саме це і спостерігається у випадку бласттрансформованих клітин:

об'єм їх ядра є майже вдвічі більший, ніж у лімфоцитів, а кількість ДНК на даному етапі їх активації є такою ж (на 24-й годині інкубації з інтерлейкіном-2 більшість клітин залишаються на стадії G_1 клітинного циклу, тобто подвоєння кількості ДНК ще не відбулося). Таким чином, концентрація ДНК в нуклеоїдах, отриманих з трансформованих клітин, приблизно у 8 разів нижча, ніж у випадку інтактних лімфоцитів.

Отримані дані вказують, що при трансформації лімфоцитів за допомогою інтерлейкіну-2 відбувається реорганізація петельних доменів ДНК. При цьому у бласттрансформованих клітинах значно зростає кількість «швидких» петельних доменів (практично в 2 рази, порівняно з лімфоцитами), що виходять на ранніх етапах електрофорезу, і зменшується кількість «повільних» петель, які мігрують в хвіст комети набагато пізніше. Як було зазначено у попередніх підрозділах, до «швидких» петель ДНК відносяться переважно поверхневі та/або релаксовані петельні домени. Враховуючи той факт, що ядра бласттрансформованих клітин майже вдвічі більші, ніж ядра лімфоцитів, логічно припустити, що кількість поверхневих петель також буде вищою. Власне це і спостерігається на початкових етапах електрофорезу: частка «швидких» поверхневих петельних доменів є помітно більшою, ніж у випадку інтактних лімфоцитів. При цьому загальна кількість петель ДНК, що можуть виходити у хвіст комети під дією електричного струму є практично однаковою для обох типів клітин (приблизно 22%). Отже, збільшення частки поверхневих петельних доменів відбувається саме за рахунок «повільних» внутрішніх петель ДНК: їх кількість знижується практично вдвічі, порівняно з неактивованими лімфоцитами.

Тобто, при бласттрансформації лімфоцитів у зв'язку із збільшенням об'єму ядра відбувається переміщення частини внутрішніх петельних доменів на периферію ядра, що суттєво полегшує їх міграцію в хвіст комети при електрофорезі. Такі результати узгоджуються з даними, згідно яких при активації чи репресії транскрипції можлива реорганізація хроматину, що проявляється у руйнуванні одних петельних доменів та формуванні нових, а

також у зміні їх розташування в межах ядра [10, 18, 19]. Однак, навіть за умов масштабної активації лімфоцитів лише близько 23% петельних доменів можуть виходити в хвіст комети під дією електричного струму. Раніше було аргументовано, що решта петель ДНК - це, ймовірно, дуже великі за розміром петельні домени, які не можуть проходити через пори агарозного гелю. Отже, активація лімфоцитів за допомогою інтерлейкіну-2 протягом 24 годин не призводить до змін у кількості чи організації петельних доменів даного типу, які можна було б детектувати за допомогою кометного електрофорезу.

Для дослідження впливу надспіралізації на ефективність міграції петельних доменів ДНК із нуклеоїдів, отриманих з бласттрансформованих лімфоцитів, було проведено кометний електрофорез в присутності 25 та 1000 мкг/мл інтеркалятора хлорокіну (інтеркалятор додавали безпосередньо в електрофоретичний буфер). Було показано, що при додаванні 25 мкг/мл хлорокіну вихід ДНК у хвіст комети значно полегшується, порівняно з дослідом без інтеркалятора. При цьому втрачається двоступеневість виходу ДНК, а максимальна частка ДНК у хвостах комет (приблизно 22%) досягається вже на 20-ій хвилині електрофорезу (рис. 3.18) [134]. Аналогічний ефект такої концентрації інтеркалятора раніше було показано при кометному електрофорезі із використанням інтактних лімфоцитів або їх ізольованих ядер. Отримані результати пояснюються тим, що дана концентрація хлорокіну забезпечує максимальну релаксацію петельних доменів ДНК, які надалі досить легко мігрують під дією електричного струму, що й проявляється у полегшенні їх виходу в хвіст комети при електрофорезі.

У експериментах з додаванням 1000 мкг/мл хлорокіну не спостерігали значного уповільнення виходу петельних доменів при електрофорезі, як це було характерно для інтактних лімфоцитів (рис. 3.18). Така висока концентрація інтеркалятора забезпечує накопичення позитивної надспіралізації в нуклеоїдах, що ускладнює міграцію петельних доменів при електрофорезі. Очевидно, що при бласттрансформації лімфоцитів зменшується кількість петель ДНК, які чутливі до дії інтеркалятора. Ймовірно, петельні домени,

розташовані на поверхні нуклеоїду можуть досить легко мігрувати під дією електричного струму навіть при наявності високого рівня надспіралізації. Подібний ефект спостерігали, коли при вимкненні струму після проведення електрофорезу надспіралізовані петельні домени поверталися на поверхню голови комети, а при повторному електрофорезі дуже легко і швидко виходили у хвіст комети (гістерезисна поведінка петель ДНК).

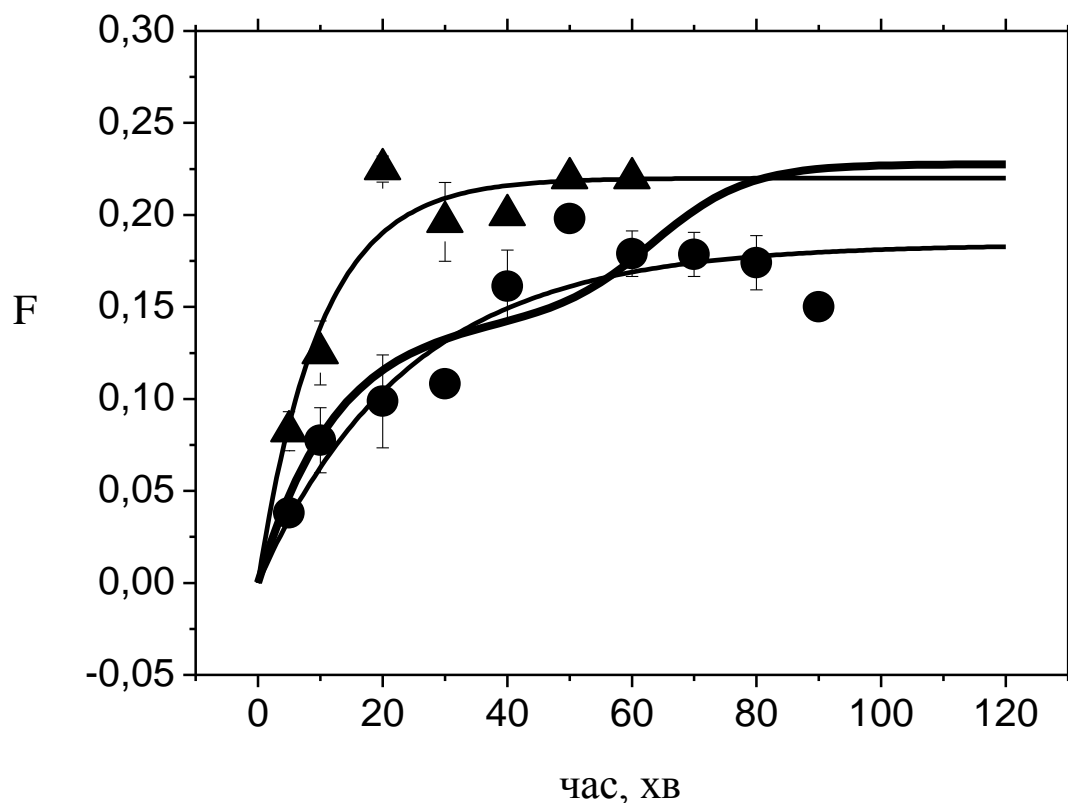


Рис. 3.18. Кінетика виходу ДНК при кометному електрофорезі нуклеоїдів, отриманих з бласттрансформованих лімфоцитів людини в присутності 25 мкг/мл (▲) та 1000 мкг/мл (●) інтеркалятора хлорокіну. F – частка ДНК в хвості комети. Для порівняння наведена контрольна кінетична крива для бласттрансформованих лімфоцитів, отримана при електрофорезі за відсутності інтеркалятора. $p = 0,0002$ (▲ відносно контролю), $p = 0,02$ (● відносно контролю), пермутаційний тест.

У випадку лімфоцитів ще одним ефектом високої концентрації хлорокіну було суттєве зниження максимального виходу ДНК (рівня насичення) при електрофорезі. Це було пояснено збільшенням контурних розмірів петельних доменів за рахунок порушення взаємодій, що їх стабілізують, внаслідок локального розкручування подвійної спіралі ДНК при вбудовуванні молекули хлорокіну між парами азотистих основ. Аналогічний ефект спостерігається і для трансформованих клітин: друга сходинка кінетичної кривої практично зникає (рис. 3.18).

Отже, згідно даних кометного електрофорезу при бласттрансформації лімфоцитів протягом 24 годин в присутності інтерлейкіну-2 відбувається перерозподіл петельних доменів ДНК в межах нуклеоїду: зростає кількість поверхневих петель за рахунок зниження частки внутрішніх доменів. При цьому кількість великих петель ДНК, що не можуть мігрувати протягом електрофорезу, практично не змінюється у порівнянні з інтактними лімфоцитами.

Окремо було досліджено особливості організації петельних доменів ДНК після активації лімфоцитів за допомогою інтерлейкіну-2 протягом 44 годин. В цьому випадку більшість лімфоцитів переходять на стадію G_2 клітинного циклу, тобто кількість ДНК у них вдвічі більша, ніж в інтактних (стадія G_0) та бласттрансформованих (стадія G_1) клітинах [131, 132]. За даними проточної цитометрії, в наших експериментах частка клітин на стадії G_2 становила близько 55% (рис. 3.15, Б). Однак, незважаючи на суттєву відмінність в кількості ДНК для даного типу клітин, частка поверхневих петельних доменів, що мігрують на ранніх етапах електрофорезу, була практично такою ж, як і для клітин після 24 годин активації (рис. 3.19). Окрім цього, було також виявлено істотне зниження кількості «повільних» (внутрішніх) петель ДНК, що можуть виходити в хвіст комети при електрофорезі. Так, навіть на пізніх хвилинах частка ДНК у хвостах не перевищувала 17%, тоді як для інших типів клітин це значення становило близько 23% (рис. 3.19) [135].

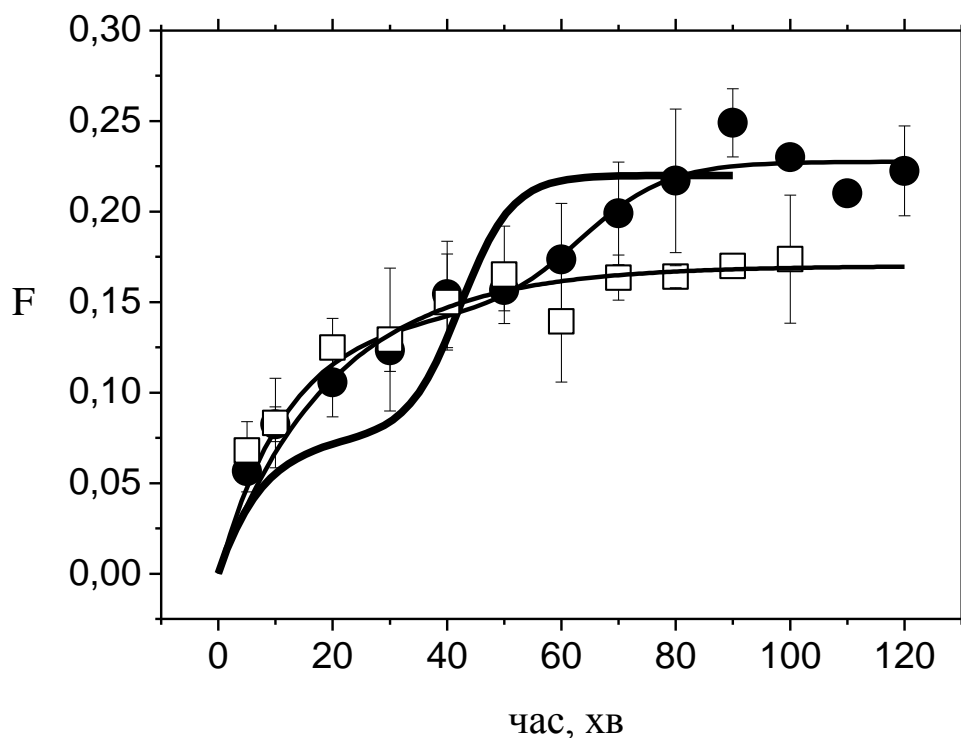


Рис. 3.19. Кінетика виходу ДНК при кометному електрофорезі нуклеоїдів, отриманих з бласттрансформованих лімфоцитів після 44 годин активації (\square) та після 24 годин активації (\bullet). F – частка ДНК в хвості комети. Товста суцільна лінія – кінетична крива для нуклеоїдів, отриманих з інтактних лімфоцитів, з рис. 3.2. $p = 0,04$ (клітини після 44 годин активації відносно інтактних лімфоцитів), $p = 0,06$ (лімфоцити після 44 годин активації відносно клітин після 24 годин активації), пермутаційний тест.

Такі результати свідчать на користь того, що при переході клітин на стадію G_2 клітинного циклу, відбувається суттєва реорганізація внутрішніх петельних доменів ДНК (ймовірно, пов'язана з компактизацією хромосом для проходження мітотичного поділу). Внаслідок цього лише невелика кількість таких петель зберігає здатність до міграції при кометному електрофорезі, і тому навіть на пізніх етапах хвіст комети в основному формується за рахунок поверхневих петельних доменів, що й проявляється у відмінностях кінетики виходу ДНК для даного типу клітин.

Таким чином, було здійснено порівняння міграції петельних доменів ДНК для трьох типів нуклеоїдів, отриманих з клітин, що перебувають на різних стадіях клітинного циклу. В кожному випадку було виявлено характерні особливості кінетичних кривих виходу ДНК, що пов'язані із відмінностями в організації петельних доменів для цих типів клітин. Отримані результати вказують на можливість використання такого варіанту методу кометного електрофорезу для дискримінації між клітинами з відмінною транскрипційною активністю або на різних стадіях клітинного циклу.

Висновки:

1. Вперше було досліджено особливості кінетики виходу ДНК при електрофорезі нуклеоїдів, отриманих з бласттрансформованих лімфоцитів на різних стадіях клітинного циклу (G_1 та G_2), та продемонстровано можливість використання кометного електрофорезу для дослідження реорганізації петельних доменів ДНК при змінах функціональних станів клітин;
2. Було показано, що при активації лімфоцитів на стадії G_1 відбувається збільшення частки поверхневих петель та зменшення кількості внутрішніх петель, чутливих до впливу інтеркаляторів;
3. На стадії G_2 клітинного циклу відбувається ще більш суттєве зниження кількості внутрішніх петельних доменів, тоді як частка поверхневих петель ДНК є подібною як і для клітин на стадії G_1 .

Результати досліджень, поданих у даному підрозділі, опубліковані у працях [95, 130, 133-135].

3.4. Розподіл петельних доменів ДНК за розміром

На наступному етапі дослідження було проведено аналіз кінетики змін довжини хвоста комети - параметру, що дозволяє приблизно оцінити розмір найдовших петель ДНК у складі хвоста. Було встановлено, що у випадку лімфоцитів залежність довжини хвоста комети від тривалості електрофорезу, аналогічно як і залежність частки ДНК у хвостах комет від часу електрофорезу, також має двоступеневий характер. Так, на ранніх хвилинах електрофорезу (10-30 хв) хвіст комети формується петлями розміром до 25 тисяч пар нуклеотидів (нижнє плато кривої), а на пізніх хвилинах (60-90 хв) стає можливим вихід більш довгих петельних доменів, контурна довжина яких становить близько 130 т.п.н. (верхнє плато) (рис. 3.20) [87, 136, 137].

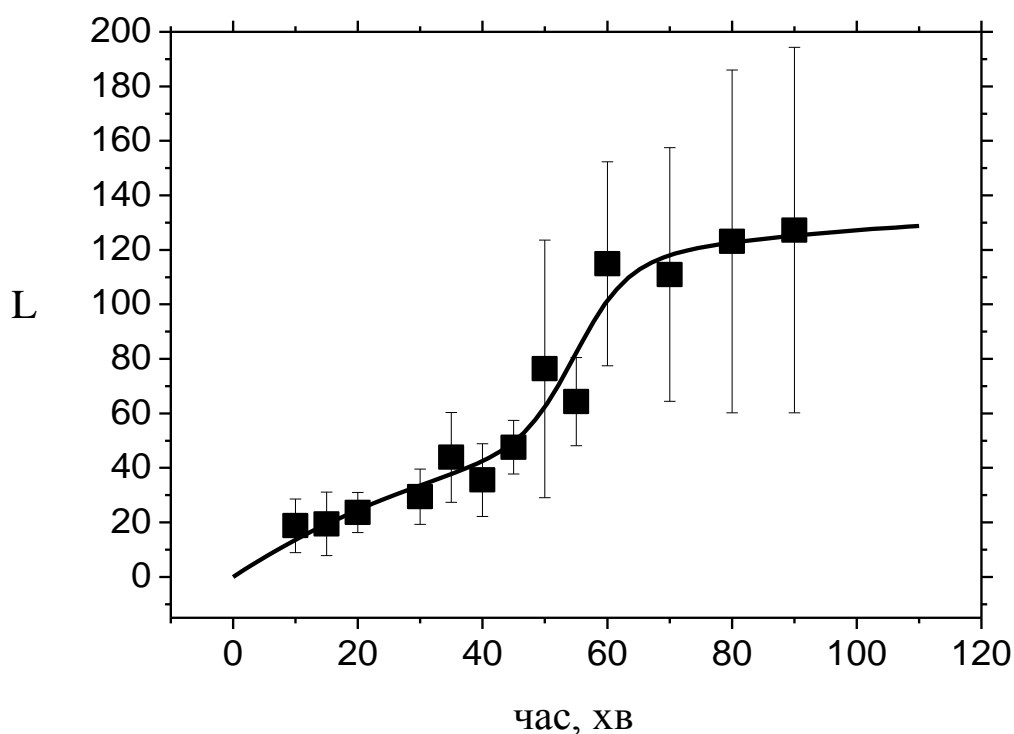


Рис. 3.20. Залежність середньої контурної довжини найдовших петельних доменів у хвостах комет від тривалості електрофорезу для нуклеоїдів, отриманих з інтактних лімфоцитів людини. L – контурна довжина петельних доменів, виражена в тисячах пар нуклеотидів.

Тобто, швидкість виходу різноманітних петель залежить не лише від їх розташування в межах нуклеоїду та рівня надспіралізації, але й також від їх контурних розмірів. З рис. 3.20 видно, що невеликі петельні домени ДНК можуть виходити досить легко вже на ранніх хвилинах електрофорезу, тоді як більші петлі рухаються значно повільніше (їх можна виявляти у хвостах комет лише на пізніх етапах електрофорезу). При цьому для великих петельних доменів було виявлено досить значні відхилення від середніх значень. Це може бути пов'язано з особливостями агарозного гелю, в якому рухаються петлі, що дещо варіюють в межах окремих нуклеоїдів та при проведенні повторностей експериментів [87].

3.4.1. Контурні розміри петель ДНК при обробці нуклеоїдів денатурантами і хлорокіном. Було також оцінено розміри найдовших петельних доменів, що можуть мігрувати при електрофорезі у випадку попередньої обробки нуклеоїдів 2 М, 4 М або 8 М сечовини. Як було зазначено раніше, такі концентрації даного денатуруючого агенту зумовлюють порушення зв'язків, що забезпечують закріплення основ петель ДНК, за рахунок денатурації білків, які задіяні в цих взаємодіях. Це призводить до суттєвого збільшення кількості великих петельних доменів, які не здатні проходити крізь пори агарозного гелю при кометному електрофорезі. Внаслідок цього ми спостерігали зниження максимального виходу ДНК у хвостах комет, а також середні значення контурної довжини найдовших петель ДНК в хвостах комет, що мігрують під дією електричного струму, порівняно з контрольним експериментам. Так при денатурації білків за допомогою 8 М даного денатуруючого агенту, коли зниження рівня насичення відносно контрольних дослідів було найвищим у порівнянні з іншими концентраціями сечовини, максимальні розміри петель ДНК, що виходили у хвіст комети становили лише близько 85 тисяч пар нуклеотидів (у контролі цей параметр становив приблизно 130 т.п.н.) (рис. 3.21) [105].

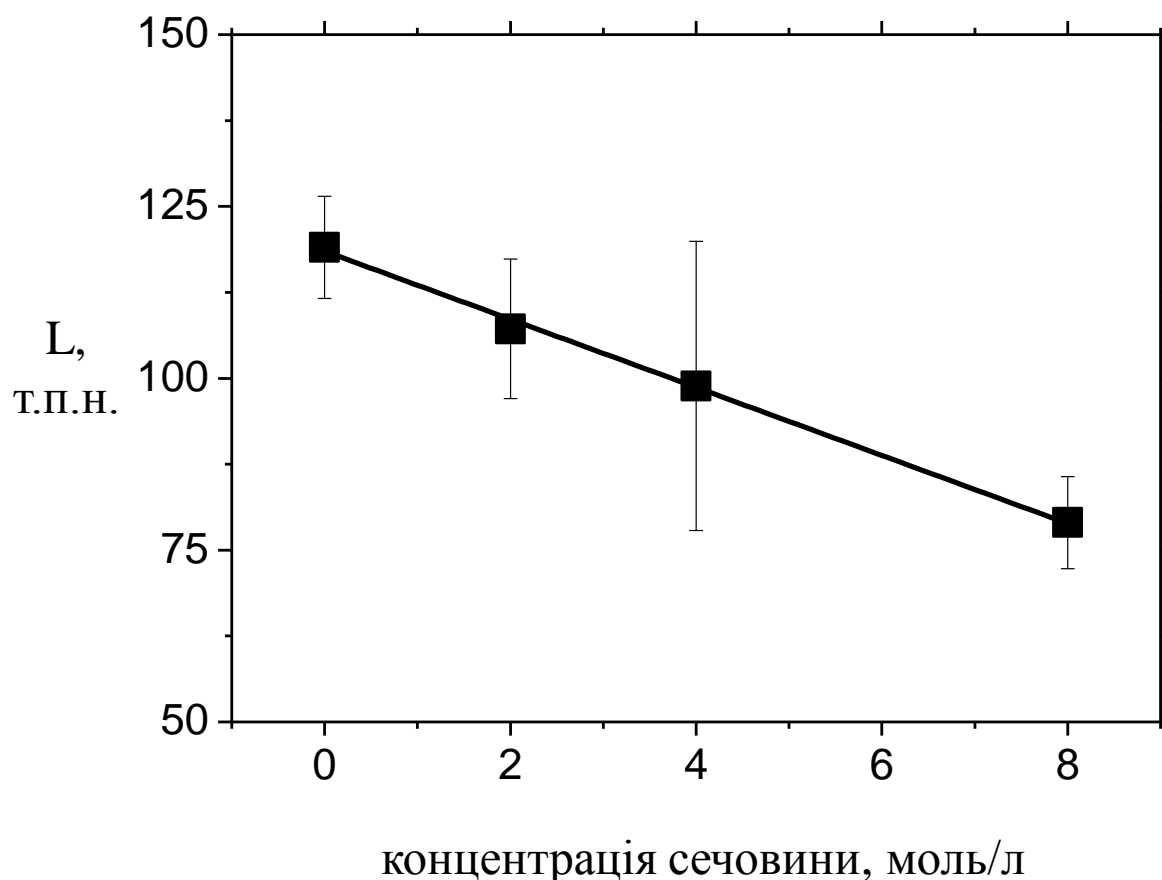


Рис. 3.21. Залежність середнього значення контурної довжини найдовших петель ДНК в хвостах комет (L) в тисячах пар нуклеотидів (т.п.н.) від концентрації сечовини (моль/л).

При обробці нуклеоїдів нижчими концентраціями сечовини у формуванні електрофоретичного треку брали участь петельні домени з контурними розмірами приблизно 100-110 тисяч пар нуклеотидів. Тобто, за таких умов відбувається дещо слабша денатурація білків, задіяних у фіксації основ петель ДНК. Таким чином, аналіз розмірів найбільших петельних доменів, які можуть мігрувати у хвіст комети при електрофорезі, за умов попередньої обробки нуклеоїдів сечовиною підтверджує, що зниження максимального виходу ДНК протягом кометного електрофорезу пов'язано із збільшенням кількості великих

петель ДНК, які не можуть мігрувати при електрофорезі. Саме тому формування електрофоретичного треку буде забезпечуватися петельними доменами, середні значення контурних розмірів яких порівняно менші, ніж це спостерігалось у контрольних експериментах (петельні домени, утворені об'єднанням дуже малих петель ДНК). Цікаво, що при проведенні електрофорезу в присутності високих концентрацій хлорокіну, коли також відбувалося помітне зниження максимального виходу ДНК у хвостах комет, розміри найдовших петельних доменів, які можуть мігрувати при електрофорезі, практично не відрізняються від контрольних дослідів. Це може бути пов'язано із тим, що певна кількість петель ДНК (в тому числі, і відносно великих за розмірами – близько 130 т.п.н.) є нечутливими до впливу інтеркалятора (за рахунок відмінності в типі взаємодій, що їх стабілізують, порівняно з рештою петельних доменів). Очевидно, що частка таких петель є відносно невисокою, тому їх вихід при електрофорезі не буде сильно впливати на значення відносного вмісту ДНК у хвостах комет.

3.4.2. Контурні розміри петель ДНК при кометному електрофорезі нуклеоїдів, отриманих з ізольованих ядер лімфоцитів. У експериментах, в яких для приготування нуклеоїдів використовували ізольовані ядра лімфоцитів, при аналізі розмірів найдовших петель, що виходять у хвіст комети на різних етапах електрофорезу, було виявлено деякі відмінності у порівнянні з дослідями, проведеними на клітинах лімфоцитів. Так, вже на ранніх хвилинах у хвіст комети виходять петлі ДНК розміром 50-70 тисяч пар нуклеотидів (у випадку клітин на даному етапі електрофорезу спостерігали міграцію петель розміром до 25 т.п.н.). Подібна тенденція зберігається і надалі при проведенні електрофорезу. Більше того, на пізніших хвилинах стає можливим вихід петельних доменів розміром до 200 т.п.н., що практично ніколи не спостерігалось для клітин лімфоцитів (рис. 3.22) [94, 137].

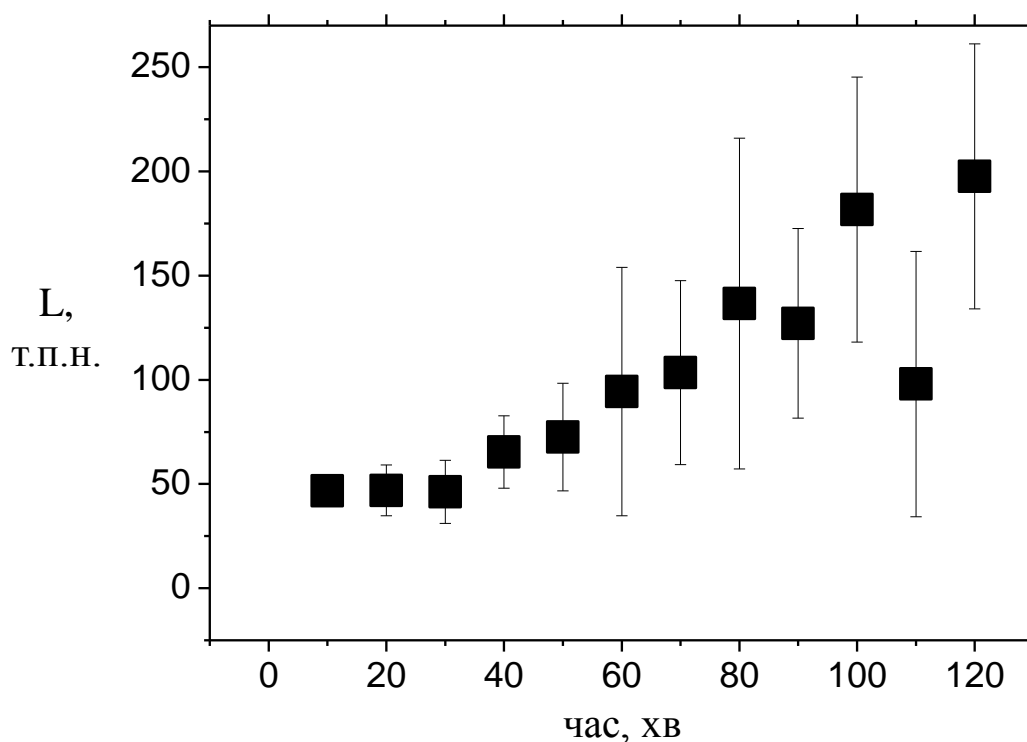


Рис. 3.22. Залежність середньої контурної довжини найдовших петельних доменів у хвостах комет від тривалості електрофорезу для нуклеоїдів, отриманих з ізольованих ядер лімфоцитів. L – контурна довжина петельних доменів, виражена в тисячах пар нуклеотидів.

Такі відмінності, очевидно, пов'язані з особливостями внутрішнього середовища нуклеоїду та його мікрооточення. Як було описано вище у пункті 3.1.2, у випадку експериментів з використанням цілих клітин внутрішнє середовище нуклеоїду складається з ДНК, тоді як при приготуванні нуклеоїдів із ядер воно формується за рахунок як ДНК, так і агарозного гелю - того, що в обох випадках формує мікрооточення нуклеоїдів. Ймовірно, більша однорідність середовища всередині та зовні у випадку нуклеоїдів, отриманих із ядер сприяє полегшенню міграції великих петельних доменів при кометному електрофорезі (вихід петель ДНК, розміром до 70 тисяч пар нуклеотидів вже на початку електрофорезу, можливість міграції петельних доменів з контурною довжиною до 200 т.п.н.). Однак, аналіз довжини хвостів комет дозволяє оцінити

лише розміри найдовших петельних доменів, які формують електрофоретичний трек на різних етапах електрофореzu, але не їх внесок у загальну частку ДНК у хвостах комет (на різних хвилинах електрофореzu електрофоретичний трек може формуватися за рахунок різноманітних за розміром петель ДНК). Враховуючи той факт, що максимальний вихід ДНК при використанні ізольованих ядер залишається порівняно на низькому рівні (дещо нижче, ніж у випадку клітин лімфоцитів), можна зробити висновок, що лише незначна кількість великих за розміром петель ДНК будуть мігрувати у хвіст комети за таких умов електрофореzu (ймовірно, розташовані поблизу поверхні нуклеоїду).

Отже, як і у випадку з клітинами, при використанні ядер було показано, що великі петельні домени (150-200 т.п.н.) рухаються набагато повільніше, ніж менші петлі ДНК (50-70 т.п.н.). Тобто, контурні розміри петельних доменів також є важливим фактором, що впливає на швидкість та ефективність (можливість або неможливість) їх міграції при кометному електрофореzі (разом з впливом надспіралізації та розташування петель в межах нуклеоїду).

3.4.3. Контурні розміри петель ДНК при кометному електрофореzі нуклеоїдів, отриманих з бласттрансформованих лімфоцитів. Було також досліджено контурну довжину найдовших петельних доменів ДНК, що виходять на кожному етапі електрофореzu, у випадку активації лімфоцитів за рахунок інкубації з інтрлейкіном-2 протягом 24 та 44 годин (у першому варіанті більшість лімфоцитів перебувають на стадії G_1 клітинного циклу, а після 44 годин культивування з цитокіном переважають клітини на стадії G_2). На рис. 3.23 представлено залежність розмірів найдовших петель ДНК від тривалості електрофореzu для двох варіантів активованих клітин у порівнянні з нетрансформованими лімфоцитами. Було виявлено, що при активації клітин протягом 24 годин максимальні розміри петельних доменів ДНК, що можуть формувати хвіст комети на пізніх етапах електрофореzu, практично не відрізняються від розмірів петель ДНК у випадку інтактних лімфоцитів (116

т.п.н. для бласттрансформованих клітин та 127 т.п.н. для неактивованих лімфоцитів). Однак, у експериментах із бласттрансформованими лімфоцитами спостерігали більш ранню міграцію великих за розміром петельних доменів (більше 70 тисяч пар нуклеотидів), у порівнянні з інтактними клітинами (рис. 3.23) [95, 133-135].

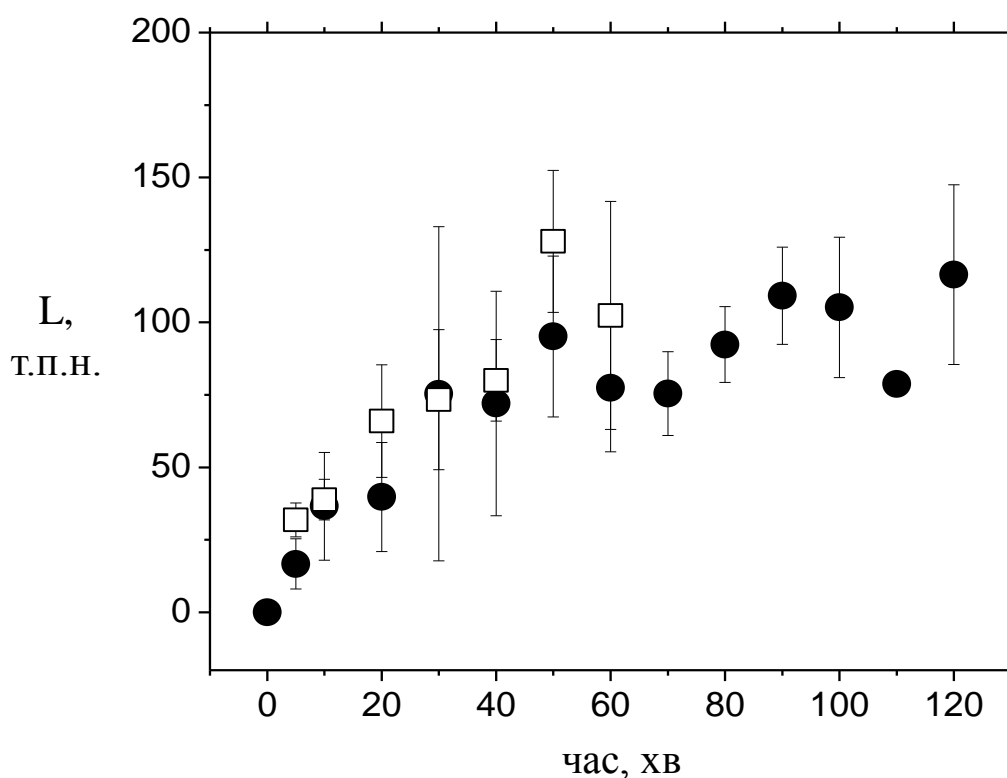


Рис. 3.23. Залежність середньої контурної довжини найдовших петельних доменів у хвостах комет від тривалості електрофорезу для нуклеоїдів, отриманих з бласттрансформованих лімфоцитів після 24 (●) та 44 (□) годин культивування. L – контурна довжина петельних доменів, виражена в тисячах пар нуклеотидів.

Таку закономірність можна пояснити тим, що внаслідок активації лімфоцитів зростає частка поверхневих петельних доменів за рахунок збільшення об'єму ядра (кількість ДНК при цьому на даному етапі активації не змінюється). Як було встановлено раніше (див. підрозділ 3.3), збільшення кількості поверхневих петель відбувається за рахунок переміщення на

поверхню внутрішніх надспіралізованих петельних доменів, що суттєво полегшує їх міграцію при електрофорезі (вони виходять в хвіст комети вже на ранніх хвилинах, не спостерігається затримки їх міграції під дією електричного струму), порівняно з неактивованими лімфоцитами. Тобто, відбувається зменшення частки так званих «повільних» петель ДНК. Очевидно, що серед таких петельних доменів виявляються також петлі відносно великих розмірів (40-70 тисяч пар нуклеотидів), переміщення яких на поверхню нуклеоїду значно пришвидшує їх вихід в хвіст комети при електрофорезі (у випадку лімфоцитів такі петлі починають мігрувати до аноду набагато пізніше). Таким чином, дані результати ще раз підкреслюють важливість локального розташування петельних доменів в межах нуклеоїду в контексті ефективності їх міграції протягом кометного електрофорезу.

Цікаво, що при дослідженні залежності контурної довжини петель ДНК від часу електрофорезу після 44 годин інкубації з інтерлейкіном-2 були отримані подібні результати, як і після 24 годин культивування (рис. 3.23). Як було описано раніше, залежність відносного вмісту ДНК у хвостах комет від тривалості електрофорезу принципово відрізняється для цих двох типів активованих клітин. Так, при бласттрансформації лімфоцитів протягом 24 годин кінетика виходу ДНК має двоступеневий характер, а у випадку 44 годин інкубації спостерігається одноступеневість виходу петель при електрофорезі. Окрім цього, наявні також відмінності у рівні насичення (максимально можливій частці ДНК у хвостах комет) для обох варіантів експерименту: 23% для 24 годин інкубації та 17% для 44 годин [135]. Такі дані переконливо свідчать про реорганізацію петельних доменів ДНК протягом клітинного циклу. Зокрема, як було попередньо аргументовано, при переході клітин в стадію G_2 клітинного циклу (активація лімфоцитів протягом 44 годин з інтерлейкіном-2) внутрішні петельні домени втрачають здатність виходити в хвіст комети при електрофорезі (можливе збільшення їх розмірів понад роздільну здатність методу або початок їх реорганізації при підготовці до утворення метафазних хромосом). Таким чином, під дією електричного струму можуть мігрувати

лише поверхневі петлі ДНК, частка яких майже така ж, як і в бласттрансформованих лімфоцитів після 24 годин активації (стадія G_1 клітинного циклу). Враховуючи той факт, що розміри найдовших петель на різних етапах електрофорезу дуже схожі для обох типів клітин, можна зробити висновок, що при активації лімфоцитів значна частка великих за розміром петель (до 70-120 тисяч пар нуклеотидів) переміщується на поверхню нуклеоїду.

3.4.4. Фрактальна глобула як модель організації хроматину в інтерфазному ядрі. Незважаючи на відмінності, описані вище, два параметри (відносний вміст ДНК у хвостах комет та розміри найдовших петельних доменів на різних етапах електрофорезу) змінюються паралельно для всіх типів нуклеоїдів (отриманих з клітин лімфоцитів, їх ізольованих ядер або двох типів бласттрансформованих лімфоцитів). Так, у кожному випадку відбувається збільшення значень цих параметрів з часом. На основі цього можна припустити про наявність певної кореляції у зміні обох параметрів протягом електрофорезу. У наших експериментах було виявлено майже лінійну кореляцію між зміною відносної частки ДНК у хвостах комет та розмірами найдовших петельних доменів у всіх варіантах експерименту (рис. 3.24) [87, 94, 95, 115, 136-139].

Лінійна залежність є дещо порушеною для пізніх етапів електрофорезу, коли відбувається міграція великих за розмірами петель ДНК. Це може бути пов'язано з тим, що розміри таких петельних доменів знаходяться на межі роздільної здатності агарозного гелю при кометному електрофорезі (як було зазначено раніше, більшість великих за розмірами петель ДНК не можуть мігрувати крізь пори агарози за умов проведення кометного електрофорезу). Порушення лінійності можна пояснити тим, що на пізніх хвилинах електрофорезу, коли починається вихід відносно великих петельних доменів, хвіст комети складається переважно з петель ДНК, які вже мігрували до аноду на початкових етапах електрофорезу. Отже, петельні домени розміром від 100

тисяч пар нуклеотидів представлені лише незначною часткою у хвостах комет (їх внесок є помітним лише для зміни довжини хвоста комети, але не для відносної кількості ДНК у ньому) [87].

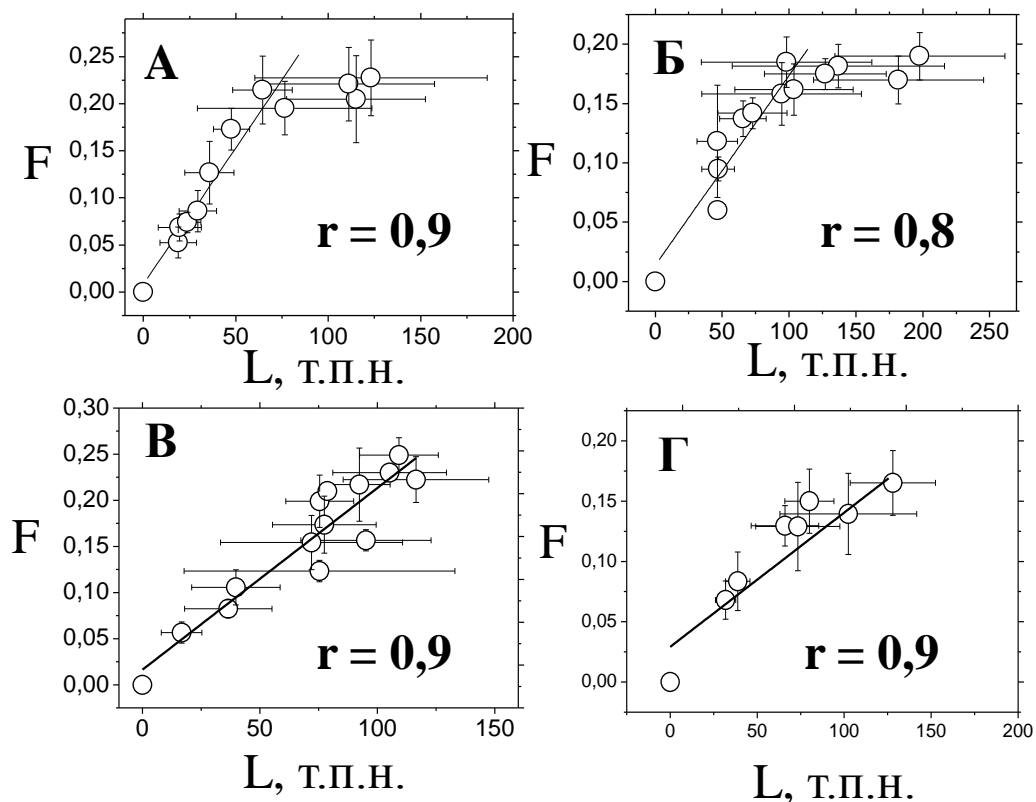


Рис. 3.24. Кореляційна залежність між відносним вмістом ДНК у хвостах комет (F) та контурною довжиною найдовших петель у хвості (L), вираженою в тисячах пар нуклеотидів, при кометному електрофорезі нуклеотидів, отриманих з інтактних лімфоцитів (А), їх ізольованих ядер (Б), бласттрансформованих лімфоцитів після 24 годин активації (В) чи 44 годин активації (Г). r – коефіцієнт кореляції.

Кореляційна залежність між часткою ДНК у хвостах комет та розмірами найдовших петельних доменів, що мігрують при кометному електрофорезі, представлена на рис. 3.24, являє собою кумулятивну ймовірність присутності у нуклеотиді (а відповідно, і в хвості комети) петель ДНК із контурною довжиною,

не більше даної. Тобто, частка ДНК у хвості комети (F) у даний момент часу може бути записана наступним чином:

$$F \propto \int_0^{s_m} s p_s ds, \quad (3.3)$$

де s – це контурна довжина петельного домену, p_s – ймовірність появи петлі розміром s у хвості комети (фактично, частка таких петельних доменів), s_m – максимальний розмір петель ДНК, що присутні у хвості комети в конкретний момент часу. Таким чином, значення p_s відображає ймовірність контакту між двома локусами, що знаходяться на відстані s один від одного.

Лінійна залежність F від s_m означає, що частка ДНК у хвості комети, яка відповідає петлям певної контурної довжини, не залежить від цієї довжини. Тобто, загальна частка ДНК, що відповідає коротким петельним доменам, дорівнює частці ДНК довгих петель (приріст до відносного вмісту ДНК у хвості комети за рахунок виходу довгих петельних доменів компенсується зменшенням їх кількості у хвості, порівняно з короткими петлями). Отже, частка ДНК повинна бути прямо пропорційна розміру найдовших петельних доменів, які присутні у хвості комети на певному етапі електрофорезу. З рівняння 3.3 очевидно, що найпростішим способом для досягнення прямої пропорційності між параметрами F та s_m є припущення, що ймовірність появи петлі ДНК певного розміру у хвості комети є обернено пропорційна контурному розміру такого петельного домену ($p_s \sim s^{-1}$) [87, 136, 137].

Така залежність ймовірності контактів між двома локусами (частки петельних доменів певних розмірів у хвостах комет, p_s) від відстані між цими локусами (контурні розміри таких петель, s) відповідає стану так званої фрактальної глобули. Фрактальна глобула характеризується декількома властивостями, найбільш важливими з яких є обернена пропорційність частоти випадкових контактів між двома локусами контурній відстані між ними ($p_s \sim s^{-1}$), а також відсутність вузлів [140-143]. Остання властивість є особливо необхідною та критичною для ефективного проходження різноманітних процесів у ядрі: відсутність вузлів (переплетень чи зачеплень) між різними

ділянками хроматину дозволяє при потребі (наприклад, при активації окремих генів протягом клітинного циклу) досить легко «витягнути» необхідну ділянку ДНК (і відповідно, зробити її доступною для різноманітних ферментів та білкових факторів) навіть із дуже компактизованих ділянок хроматину [140]. Такий довгоіснуючий інтермедіатний стан полімеру при його компактизації був теоретично описаний ще у 1988 році [144], однак, перші експериментальні підтвердження перебування інтерфазного хроматину в стані фрактальної глобули були отримані лише недавно за допомогою найточніших варіантів методу фіксації конформації хромосом, як наприклад, методика Ні-С (див. пункт 1.2.2.) [62, 66]. Так, за допомогою даного методу було показано, що ймовірність контакту між двома локусами як функція відстані між ними узгоджується із організацією хроматину в стані фрактальної глобули на рівні декількох мільйонів пар нуклеотидів (між 0,7 та 7 м.п.н.), тоді як для менших відстаней (сотні тисяч пар нуклеотидів) метод не дозволяв отримати достатньо точні дані [66]. Отримані нами результати для різних типів нуклеоїдів (лімфоцити, їх ізольовані ядра чи бласттрансформовані лімфоцити на стадіях G_1 та G_2 клітинного циклу) дозволяють підтвердити існування хроматину в стані фрактальної глобули у масштабах декількох десятків тисяч пар нуклеотидів (від 20 до 100 т.п.н.) [87, 137-139].

Враховуючи зазначені масштаби (20-100 т.п.н.), та прийнявши максимально можливу для наших експериментів частку ДНК у хвостах комет $F \approx 0,25$, а контурну довжину найдовших петель ДНК $s_m \approx 10^5$ пар нуклеотидів, то з рівняння 3.3 можна вирахувати приблизне співвідношення між ймовірністю появи петлі у хвості комети та розміром цієї петлі: $p_s \approx 2,5 \cdot 10^{-6} s^{-1}$. Згідно результатів, отриманих за допомогою методу Ні-С, ймовірність появи контакту p залежно від відстані між локусами s (для відстаней в діапазоні між 500 т.п.н. та 7 м.п.н.) буде приблизно становити: $p \approx 1,5 \cdot 10^{-3} s^{-1,08}$ [66]. Співставлення цих двох коефіцієнтів показує, що приблизно 10^{-3} контактів між локусами ДНК забезпечує формування дуже стабільних петельних доменів, які зберігаються у

нуклеоїді навіть після лізису клітин та можуть мігрувати під дією електричного струму при коетному електрофорезі.

В нещодавніх дослідженнях, присвячених вивченню 3D організації інтерфазного хроматину в масштабах тисяч пар нуклеотидів, за допомогою найновішої модифікації методу фіксації конформації хромосом – методики *in situ* Hi-C, було ідентифіковано 9448 петельних доменів розміром від 40 т.п.н. до 3 м.п.н. з медіанною довжиною 185 тисяч пар нуклеотидів (так звані, контактні домени). При цьому близько 86% таких петель були закріплені за допомогою комплексу білків CTCF та когезину [17]. Враховуючи розмір диплоїдного геному $6,6 \cdot 10^6$ тисяч пар нуклеотидів, можна підрахувати частку ДНК таких петельних доменів: $F \approx 9448 \cdot 185 \cdot 0,86 / 6,6 \cdot 10^6 = 0,23$. Отримане значення є співставним з максимальною часткою ДНК у хвостах комет, що спостерігалася на рівні насичення кінетичних кривих в наших експериментах. Такі дані свідчать на користь того, що в нуклеоїдах після лізису клітин (або ізольованих ядер) зберігаються переважно петельні домени, які закріплені за допомогою комплексу білків CTCF та когезину (ймовірно, за рахунок того, що когезин формує велике кільце навколо двох ланцюгів молекули ДНК без безпосереднього контакту з нею [51], що робить такі петлі нечутливими до умов лізису). Саме ці петельні домени можуть виходити у хвіст комети при електрофорезі, тоді як решта петель ДНК, що були присутні *in vivo*, очевидно, не можуть мігрувати в пори агарозного гелю через занадто великі їх розміри внаслідок порушення зв'язків, що їх стабілізують. Ще одним підтвердженням такого припущення є результати, отримані в експериментах з високою концентрацією хлорокіну, коли інтеркалятор додавали безпосередньо в електрофоретичний буфер, або обробляли ним нуклеоїди перед проведенням електрофорезу. За таких умов відбувалася дестабілізація взаємодій між основами петельних доменів та білком CTCF, але не між комплексом CTCF та когезину. Тому після припинення впливу інтеркалятора відбувалося відновлення зазначених петельних доменів, а зниження максимального виходу ДНК у хвіст комети (внаслідок суттєвого збільшення контурних розмірів цих

петель при порушенні ДНК-білкових взаємодій) спостерігалось лише за умов постійного впливу високої концентрації хлорокіну (див. п.п. 3.2.2 і 3.2.3).

Отже, було проаналізовано розміри найдовших петельних доменів, що мігрують у хвіст комети при електрофорезі для чотирьох типів нуклеодів (отриманих з лімфоцитів, їх ізольованих ядер чи бласттрансформованих клітин після 24-ї та 44-ї годин трансформації) та за різних умов проведення експерименту. Було виявлено, що контурні розміри (як і розташування петель в межах нуклеоїду та рівень їх надспіралізації) впливають на швидкість та ефективність міграції петельних доменів при електрофорезі. Окрім цього, у випадку використання нуклеодів, отриманих з ізольованих ядер, було показано полегшення міграції навіть великих петельних доменів, починаючи вже з ранніх хвилин електрофорезу, за рахунок зміни внутрішнього середовища нуклеоїду. Для активованих клітин (бласттрансформованих лімфоцитів) було виявлено перерозподіл петельних доменів в межах нуклеоїду (збільшення частки поверхневих петель та зменшення кількості внутрішніх), що забезпечує більш ранню міграцію великих за розмірами петель ДНК (від 70 т.п.н.), порівняно з інтактними лімфоцитами. При цьому у всіх варіантах експериментів максимальні розміри петельних доменів, що можуть мігрувати у хвіст комети при електрофорезі не перевищували 200 тисяч пар нуклеотидів, що узгоджується з нашим припущенням про неможливість виходу дуже великих петель ДНК в пори агарозного гелю за умов проведення кометного електрофорезу. Завдяки аналізу залежності між часткою ДНК у хвостах комет та розмірами найдовших петельних доменів в них на різних етапах електрофорезу було встановлено, що теоретично описана модель організації інтерфазного хроматину в стані фрактальної глобули є справедливою на рівні декількох десятків тисяч пар нуклеотидів.

Висновки:

1. Було встановлено, що контурні розміри петельних доменів ДНК є важливим чинником, що впливає на швидкість та ефективність їх міграції при коетному електрофорезі: невеликі петлі виходять на ранніх етапах електрофорезу, більші за розмірами петельні домени (до 200 т.п.н.) починають мігрувати набагато пізніше, а великі петлі ДНК, розміром понад 200 т.п.н. взагалі не можуть мігрувати в хвіст комети ;
2. Було виявлено, що при активації лімфоцитів відбувається переміщення частини петельних доменів, розмірами від 70 тисяч пар нуклеотидів, на поверхню нуклеоїду, що забезпечує полегшення їх виходу при електрофорезі;
3. Вперше було підтверджено справедливість моделі фрактальної глобули у масштабах декількох десятків тисяч пар нуклеотидів (від 20 до 100 т.п.н.) для інтактних (G_0) та бласттрансформованих (G_1 та G_2) лімфоцитів.

Результати досліджень, поданих у даному підрозділі, опубліковані у працях [87, 94, 95, 105, 115, 133-139].

РОЗДІЛ 4. УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

Петельні домени ДНК є важливим структурним та функціональним компонентом хроматину у клітинному ядрі. Так, закріплення ділянок молекули ДНК на різноманітних білкових структурах ядра і утворення при цьому петельних доменів забезпечує найвищий рівень компактизації хроматину на стадії інтерфази клітинного циклу [7]. Однак, на сьогоднішній день показано також необхідність формування петель ДНК для проходження багатьох функціональних процесів у ядрі, як наприклад, реплікація та репарація ДНК [10, 20], а особливо, транскрипція та її регуляція [17, 19, 29]. Зокрема, було встановлено, що утворення або руйнування петельних доменів дуже часто пов'язано з взаємодією тих чи інших регуляторних елементів транскрипційної машинерії (енхансерів та промоторів, інсуляторних елементів, факторів транскрипції з відповідними ділянками на молекулі ДНК) [8, 36]. Більше того, об'єднання таких елементів разом з ферментом РНК-полімеразою у так звані «транскрипційні фабрики» забезпечує набагато ефективніше і більш точне проходження процесу транскрипції [9]. Точність перебігу зазначених процесів є надзвичайно важливою для нормального функціонування клітини, тоді як при будь-яких порушеннях у правильній організації та взаємодії усіх компонентів може відбуватися загибель клітин або перетворення їх на шкідливі для організму (як наприклад, при злоякісній трансформації) [145, 146].

На сьогоднішній день виділяють велику кількість різних типів петельних доменів ДНК. В першу чергу, їх розрізняють за механізмами формування, тобто за тим, які саме білки та ділянки ДНК беруть участь у закріпленні основ петельних доменів. Серед основних способів фіксації петель ДНК виділяють наступні: закріплення їх на білках ядерної ламіни та ядерних пор [25-31]; взаємодія з компонентами ядерця [25, 32]; об'єднання регуляторних елементів при транскрипції та утворення транскрипційних фабрик [9, 36-38]; взаємодія з ДНК-полімеразою та іншими компонентами реплісоми [19, 20]; закріплення за

допомогою комплексу білків CTCF та когезину [48-51] та інші. Окрім цього, було показано не випадкове розташування різних типів петельних доменів ДНК в межах ядра та в межах окремих хромосомних територій. Так, петлі ДНК, які не містять активних генів, розташовуються переважно на периферії ядра (більшість таких петель – це домени, закріплені за допомогою білкових компонентів ядерної оболонки) [19, 21], а також всередині хромосомних територій [24]. Петельні домени з наявними активними генами знаходяться всередині ядра та на периферії хромосомних територій, що робить їх максимально доступними для факторів регуляції та ферментів, необхідних для проходження відповідних процесів [1, 3, 24]. Зрозуміло, що при зміні транскрипційної активності клітини чи переході її на інші стадії клітинного циклу буде відбуватися реорганізація петельних доменів (руйнування одних та утворення інших, переміщення в межах хромосомних територій чи ядра) [15, 28].

Очевидно, що дослідження організації та різноманітності петель хроматину є надзвичайно важливим для розуміння особливостей проходження функціональних процесів у ядрі, механізмів їх регулювання (вмикання чи вимикання відповідних генів на певному етапі життя клітини), визначення принципових відмінностей для нормальних та патологічних станів клітини та ін. Широкий спектр новітніх методів забезпечує різнобічне вивчення структури та функціонального значення тих чи інших петельних доменів, що присутні у різних типах клітин. Наприклад, флуоресцентна гібридизація *in situ* надає інформацію стосовно специфічних ділянок ДНК, які беруть участь у закріпленні основ петельних доменів або є частиною таких петель; розташування активних та неактивних генів в межах ядра чи хромосомних територій; їх переміщення при зміні активності клітини [57-60]. Різноманітні методики фіксації конформації хромосом (3C, 4C, 5C, Hi-C, *in situ* Hi-C) забезпечують визначення різних локусів ДНК, що беруть участь в утворенні петельних доменів хроматину, контурних розмірів цих петель, просторової організації хроматину у клітинному ядрі [61-67]. Методи імунопреципітації

хроматину дозволяють охарактеризувати різноманітність білків, які забезпечують закріплення петельних доменів [68-73]. Окрім цього, нещодавно було показано, що при нейтральному гель-електрофорезі ізольованих клітин (кометному електрофорезі) до аноду також можуть мігрувати петлі ДНК [80-87], що відкриває потенційні можливості використовувати даний підхід для дослідження особливостей організації петельних доменів ДНК в різних типах клітин.

В даній роботі було зосереджено увагу на визначення особливостей організації петельних доменів хроматину у клітин з різним рівнем транскрипційної активності та дослідження властивостей взаємодій, які беруть участь в утворенні цих петель. Для цього, використовуючи кінетичний підхід кометного електрофорезу, аналізували особливості міграції петельних доменів для інтактних лімфоцитів, їх ізольованих ядер та бласттрансформованих лімфоцитів (на різних стадіях трансформації). Окремо досліджували стабільність петельних доменів ДНК та здатність їх до міграції при електрофорезі за умов обробки їх формальдегідом, денатуруючими агентами або інтеркалятором хлорокіном. Додатково було досліджено оборотність виходу петель ДНК після вимкнення електричного струму та особливості їх міграції при повторному проведенні електрофорезу. Також було проаналізовано контурні розміри петельних доменів, які мігрують на кожному етапі електрофорезу, для усіх варіантів експерименту.

Аналіз кінетики виходу ДНК в хвіст комети при електрофорезі у випадку інтактних лімфоцитів (термінально диференційовані клітини, що перебувають на стадії G_0 клітинного циклу, характеризуються слабкою транскрипційною активністю) виявив наявність двох типів петельних доменів, що присутні у таких нуклеоїдах, - «швидкі» (відразу мігрують в хвіст комети) та «повільні» петлі, вихід яких є кооперативним. Було виявлено, що після вимкнення струму «повільні» петельні домени можуть повертатися назад в голову нуклеоїду, а при повторному проведенні електрофорезу вони досить швидко, без затримки виходять в хвіст комети. Такі результати свідчать на користь того, що «швидкі»

петельні домени розташовані переважно на поверхні голови нуклеоїду і тому вони практично відразу ж мігрують під дією електричної сили, а «повільні» петлі знаходяться всередині нуклеоїду і їх міграція стає можливою лише після зниження концентрації ДНК внаслідок її виходу на попередніх етапах електрофорезу (ефект кооперативності). Якщо вимкнути струм, то ці петельні домени повертаються на поверхню голови нуклеоїду, і тому їх вихід при повторному проведенні електрофорезу значно полегшений – максимальна частка ДНК у хвостах комет досягається вже на ранніх хвилинах електрофорезу [87].

Для подальшого дослідження чинників, що впливають на вихід «повільних» петельних доменів при електрофорезі, було проаналізовано кінетику виходу ДНК в хвіст комети при використанні нуклеоїдів, отриманих з ізольованих ядер лімфоцитів. В цьому випадку спостерігали відсутність кооперативного виходу «повільних» петельних доменів: їх міграція у хвіст комети відбувалася поступово і повільно, без пришвидшення. Такий ефект пов'язаний з відмінностями середовища всередині голови нуклеоїду (при використанні клітин воно формується лише за рахунок ДНК, а при заплавланні ізольованих ядер агароза проникає всередину нуклеоїду і забезпечує формування більш однорідного середовища) [94].

Незважаючи на зазначені відмінності, в обох випадках було виявлено наявність частини петель ДНК, що чутливі до впливу інтеркалятора. Так при додаванні до електрофоретичного буферу низької концентрації (25 мкг/мл) хлорокіну, що забезпечує максимальну релаксацію молекули ДНК за таких умов, спостерігали суттєве пришвидшення міграції обох типів петельних доменів. При проведенні електрофорезу в присутності 1000 мкг/мл інтеркалятора вихід петель ДНК був значно уповільненим (за рахунок накопичення позитивної надспіралізації). В контрольних експериментах без додавання інтеркалятора більшість петельних доменів були негативно надспіралізовані внаслідок дисоціації нуклеосом при дії високої концентрації солі. Таким чином, дані результати показують, що наявність надспіралізації (як негативної, так і

позитивної) також певною мірою впливає на швидкість міграції петельних доменів при електрофорезі (разом з впливом їх вихідного положенням в межах нуклеоїду перед проведенням електрофорезу) [87].

Було також виявлено, що в жодному з проведених експериментів максимальна частка ДНК у хвостах комет не перевищувала 25%. Це дозволяє виділити, окрім «швидких» та «повільних» петельних доменів, також петлі третього типу, які взагалі не можуть мігрувати при кометному електрофорезі (найбільш ймовірно, вони мають дуже великі контурні розміри і тому не можуть проходити через пори агарозного гелю). Більше того, кількість петельних доменів, які здатні виходити у хвіст комети, значно знижується при проведенні електрофорезу в присутності високих концентрацій інтеркалятора. Так, при додаванні 1000 мкг/мл хлорокіну максимально можливий вихід ДНК у хвостах комет (рівень насичення) становить лише 8%, тоді як в контрольних експериментах це значення було приблизно 22%. Таке явище можна пояснити тим, що при достатньо високій концентрації інтеркалятора значно зростає ймовірність його вбудовування між парами азотистих основ в сайти фіксації петельних доменів. Це зумовлює локальне розкручування подвійної спіралі, що призводить до порушення взаємодій між ДНК та білками, які стабілізують петельні домени. При цьому відбувається збільшення контурних розмірів петель, які втрачають можливість мігрувати при кометному електрофорезі. Саме це й зумовлює зниження максимального виходу ДНК при додаванні високих концентрацій інтеркалятора в електрофоретичний буфер [105].

Подібний ефект зниження рівня насичення можна також досягнути, якщо обробити нуклеоїди перед проведенням електрофорезу денатуруючими агентами, такими як сечовина або додецилсульфат натрію. В цьому випадку дестабілізація основ петельних доменів здійснюється за рахунок денатурації білків, які закріплюють ці петлі. Як і у випадку з інтеркалятором, руйнування таких взаємодій (а відповідно, і петельних доменів) призводить до збільшення розмірів останніх, що робить неможливим їх вихід в пори агарозного гелю при електрофорезі [105].

Для подальшого дослідження особливостей взаємодій, що закріплюють петельні домени, нуклеоїди перед проведенням електрофорезу обробляли високою концентрацією (1000 мкг/мл) інтеркалятора хлорокіну, після чого проводили електрофорез без інтеркалятора. За таких умов кінетична залежність виходу петельних доменів ДНК при коетному електрофорезі практично не відрізнялася від контрольного експерименту [124]. Такий результат свідчить про те, що дестабілізація основ петель ДНК під впливом інтеркалюючого агенту має тимчасовий характер: при поверненні до вихідних умов взаємодії між ДНК та білками, що закріплюють петельні домени, відновлюються, і тому зниження рівня насичення можливе лише за умови постійного впливу інтеркалятора. Тобто, при локальному розкручуванні подвійної спіралі за рахунок вбудовування інтеркалятора в сайти фіксації основ петель зв'язки між ДНК та білками повністю не втрачаються і після припинення впливу інтеркалятора можливе їх відновлення. Зрозуміло, що при дії денатуруючих агентів, коли відбувається повне руйнування молекул білка, такого ефекту не спостерігається. Прикладом петельних доменів, які можуть стабілізуватися за рахунок такого типу взаємодій, є петлі ДНК, закріплені за допомогою комплексу білків CTCF та когезину (CTCF взаємодіє із специфічною послідовністю на молекулі ДНК, а когезин замикається навколо ДНК у кільце) (рис.4.1.).

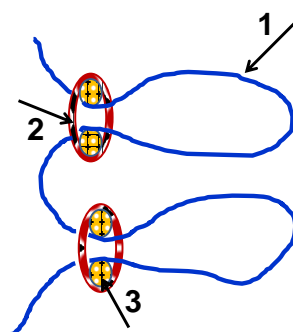


Рис. 4.1. Схема закріплення петельних доменів ДНК за допомогою комплексу білків CTCF та когезину. 1 - петельний домен, 2 – когезин, 3 – білок CTCF.

Відсутність ефекту високих концентрацій інтеркалятора спостерігали також у випадку, якщо перед проведенням електрофорезу нуклеоїди обробляли розчином формальдегіду, який забезпечує утворення ковалентних зшивок між ДНК та білками. За таких умов відбувається додаткова міцна стабілізація в місцях закріплення основ петельних доменів за рахунок ковалентних зшивок між білками і ДНК. Тому вбудовування молекули інтеркалятора і локальне розкручування подвійної спіралі ДНК в цих сайтах стає неможливим. Таким чином, не відбувається руйнування петельних доменів, і тому вони не втрачають здатність мігрувати при електрофорезі. За рахунок цього кінетика виходу ДНК в хвіст комети подібна до контрольного експерименту і не спостерігається зниження рівня насичення [87].

Отже, при використанні клітин лімфоцитів або їх ізольованих ядер для кометного електрофорезу було виявлено наявність трьох типів петельних доменів ДНК в отриманих після лізису нуклеоїдах: «швидкі», «повільні» та взагалі не здатні до міграції петлі. Було показано вплив середовища всередині нуклеоїду (однорідне середовище за умови проникнення агарози всередину нуклеоїду та неоднорідне середовище, сформоване лише високою концентрацією ДНК, що змінюється протягом проведення електрофорезу і тому зумовлює ефект кооперативності) та надспіралізації петельних доменів на швидкість їх міграції (в основному, «повільних» петель) при електрофорезі. При дослідженні взаємодій, що стабілізують основи петельних доменів, за рахунок впливу на них денатуруючими агентами, високими концентраціями хлорокіну (до або під час електрофорезу) або індуктором ковалентних зшивок формальдегідом вдалося показати можливість повного руйнування таких взаємодій в більшості петельних доменів (при дії денатурантів), їх здатність до відновлення (за умови тимчасової дії хлорокіну) та додаткової стабілізації (після обробки формальдегідом) [87, 94, 105, 124].

На наступному етапі роботи було здійснено дослідження деяких особливостей організації петельних доменів ДНК у лімфоцитах після їх бласттрансформації за допомогою інтерлейкіну-2. Трансформацію проводили

протягом 24 годин для переведення клітин в G_1 стадію клітинного циклу, що супроводжується суттєвим підвищенням рівня їх транскрипційної активності, а також протягом 44 годин для забезпечення переходу клітин на G_2 стадію клітинного циклу. Таким чином, в ході даної роботи за допомогою кометного електрофорезу було проаналізовано клітини на трьох стадіях клітинного циклу, що відрізняються рівнем транскрипційної активності, а в останньому випадку, також і кількістю молекул ДНК.

При дослідженні кінетики виходу ДНК при електрофорезі бласттрансформованих лімфоцитів після 24 годин інкубації (G_1 стадія) було виявлено певні відмінності в кількості «швидких» та «повільних» петельних доменів, порівняно з нетрансформованими лімфоцитами. Так, в даному випадку частка ДНК у складі «швидких» поверхневих петель становила приблизно 14% (у лімфоцитів це значення було на рівні 7%), а частка ДНК у «повільних» петлях, навпаки, знизилася порівняно з лімфоцитами (у бласттрансформованих клітинах - 8%, а в інтактних лімфоцитах – 14%). Такі дані узгоджуються з уявленням про те, що внаслідок бласттрансформації та тотальної активації транскрипції відбувається збільшення загального об'єму ядра клітини, тоді як кількість ДНК на цьому етапі не змінюється. Відповідно, в цьому випадку набагато більше петельних доменів розташовується на поверхні нуклеоїду, що й зумовлює їх швидшу міграцію при електрофорезі і зростання їх частки відносно загальної кількості петель ДНК. При цьому максимально можливий вихід ДНК в хвіст комети як і у випадку лімфоцитів, не перевищує 25%. Отже, збільшення частки поверхневих петельних доменів здійснюється лише за рахунок зменшення кількості «повільних» петель; частка петельних доменів третього типу, які не можуть мігрувати при електрофорезі, при бласттрансформації не змінюється. Також було виявлено, що при проведенні кометного електрофорезу в присутності 25 та 1000 мкг/мл хлорокіну основні ефекти інтеркалятора проявляються і для бласттрансформованих лімфоцитів: пришвидшення виходу петельних доменів в хвіст комети при низькій концентрації (за рахунок їх релаксації) та уповільнення міграції при високій

концентрації (внаслідок накопичення позитивної надспіралізації). Однак, кількість петель ДНК, чутливих до дії інтеркалятора порівняно нижча, ніж у випадку інтактних лімфоцитів, що також пов'язано з переміщенням частини петельних доменів на периферію нуклеоїду при бласттрансформації (вихід таких петель ДНК неможливо модулювати за допомогою інтеркалюючих агентів) [95].

У випадку використання бласттрансформованих лімфоцитів після 44 годин інкубації з інтерлейкіном-2, коли значна частина клітин переходить на G₂ стадію клітинного циклу, було виявлено втрату двоступеневості виходу ДНК та зниження частки петель ДНК, які здатні мігрувати при кометному електрофорезі (рівень насичення для таких нуклеоїдів становив лише близько 17%). При цьому, кількість поверхневих петель ДНК була практично такою ж, як і у випадку бласттрансформованих лімфоцитів після 24 годин інкубації. Такі результати можуть бути пов'язані з суттєвою реорганізацією петельних доменів ДНК в ядрах клітин на даній стадії клітинного циклу (ймовірно, за рахунок компактизації хромосом для проходження мітотичного поділу) [135].

Окремо для усіх чотирьох типів нуклеоїдів (отриманих з інтактних лімфоцитів, їх ізольованих ядер та бласттрансформованих лімфоцитів після 24 та 44 годин трансформації) було проаналізовано контурні розміри найбільших петельних доменів, що формують хвіст комети на різних етапах електрофорезу. Було виявлено, що розміри петель ДНК також є важливим фактором, що впливає на швидкість та ефективність їх міграції при кометному електрофорезі (поряд з рівнем їх надспіралізації та розташуванням в межах нуклеоїда). Так, було показано, що невеликі за розміром петельні домени (до 50 т.п.н.) мігрують вже на ранніх етапах електрофорезу, тоді як вихід більших петель ДНК (до 200 т.п.н.) може відбуватися тільки набагато пізніше. При цьому були виявлені певні відмінності у розмірах петельних доменів, що можуть мігрувати на кожному етапі електрофорезу, для різних типів нуклеоїдів. Так, при використанні ізольованих ядер лімфоцитів або обох варіантів бласттрансформованих клітин на ранніх хвилинах електрофорезу відбувається

міграція більших за розміром петельних доменів (50-70 т.п.н.), ніж це було характерно для інтактних лімфоцитів (приблизно 20-30 т.п.н.). Такі результати можуть бути пов'язані з особливостями середовища всередині нуклеоїдів, отриманих з ізольованих ядер, що сприяє полегшенню міграції відносно великих петельних доменів вже на початкових етапах електрофорезу. Така думка підтверджується тим, що для ізольованих ядер спостерігається міграція порівняно більших за розміром петель ДНК також і на пізніх хвилинах (приблизно 150 т.п.н., тоді як для інших типів нуклеоїдів це значення сягає лише 120-130 т.п.н.). Що стосується бласттрансформованих лімфоцитів, то тут зростання розмірів петельних доменів, що мігрують на початку електрофорезу, пов'язано в основному з переміщенням таких петель на периферію нуклеоїду. При цьому вихід більших петель, як і у лімфоцитах, ускладнений у зв'язку з розташуванням їх всередині нуклеоїду [87, 94, 95].

Було також встановлено, що міграція петельних доменів, розміром понад 200 тисяч пар нуклеотидів взагалі не можлива в жодному з варіантів експерименту. Очевидно, що саме такі петельні домени належать до третього типу петель ДНК, що виділяються в нуклеоїдах при кометному електрофорезі, розміри яких є занадто великими і тому вони не можуть проходити через пори агарозного гелю. Цікаво, що у випадку обробки нуклеоїдів денатуруючими агентами спостерігається зменшення розмірів петельних доменів, які можуть виходити в хвіст комети при електрофорезі, порівняно з контрольними дослідженнями. Така закономірність пов'язана з тим, що внаслідок денатурації білків відбувається руйнування основ петель ДНК з подальшим об'єднанням сусідніх невеликих петельних доменів в один домен більшого розміру. Зрозуміло, що при об'єднанні декількох петель ДНК, розміром близько 100 т.п.н., будуть утворюватися петлі, які не зможуть мігрувати при електрофорезі (третій тип петель ДНК), тоді як при об'єднанні невеликих петельних доменів формуються петлі дещо більших розмірів (80-100 т.п.н.), які і виявляються у хвостах комет на пізніх етапах електрофорезу. Таким чином, було показано суттєвий вплив контурних розмірів петель ДНК на швидкість та ефективність їх

міграції при кометному електрофорезі та встановлено, що «швидкі» петельні домени – це петлі, розміром до 50 т.п.н., «повільні» домени – розміром не більше 200 т.п.н. (в середньому – 110-150 т.п.н.) і петлі, які не можуть мігрувати при електрофорезі, розміром понад 200 т.п.н. [87, 105].

Додатково було досліджено кореляцію між відносним вмістом ДНК у хвостах комет та розмірами найдовших петельних доменів у них на різних етапах електрофорезу для нуклеоїдів, отриманих з лімфоцитів, їх ізольованих ядер або бласттрансформованих клітин на стадії G_1 та G_2 . Незважаючи на наявність специфічних відмінностей в кінетичних кривих залежності цих двох параметрів від часу для кожного типу клітин, при їх співставленні між собою було виявлено майже лінійну залежність у всіх варіантах експерименту [87, 136, 137]. Така залежність відповідає стану фрактальної глобули – стан полімеру, для якого характерна відсутність вузлів між локусами та частота випадкових контактів між двома локусами обернено пропорційна відстані між ними [140, 142]. Таким чином, в наших експериментах було показано існування хроматину в стані фрактальної глобули у масштабах декількох десятків тисяч пар нуклеотидів (згідно даних, отриманих за допомогою методу Ні-С, така модель була також підтверджена і для масштабів 0,7-7 мільйонів пар нуклеотидів [66]). Отже, незважаючи на зміни в організації та розподілі різних типів петель ДНК для трьох типів нуклеоїдів, загальна модель організації хроматину (модель фрактальної глобули) справджується для кожного випадку.

Таким чином, отримані в ході роботи результати показують, що на швидкість та ефективність міграції петельних доменів ДНК при кометному електрофорезі впливають сумарно три фактори: розташування їх меж нуклеоїду, контурні розміри та рівень надспіралізації. На основі цього можна умовно розділити петлі ДНК, які виявляються за допомогою кометного електрофорезу на три типи: «швидкі», «повільні» і такі, що взагалі не можуть мігрувати в хвіст комети. У клітинах з різною транскрипційною активністю та на різних етапах клітинного циклу (інтактні лімфоцити на стадії G_0 та два типи бласттрансформованих лімфоцитів на стадіях G_1 та G_2) спостерігаються

характерні відмінності у кількості кожного з типів петельних доменів, що можна виявляти за допомогою кінетичного підходу методу кометного електрофорезу. Такі дані дозволяють використовувати даний підхід для дискримінації між різними типами клітин, що відрізняються за активністю або стадією клітинного циклу. Також досліджено властивості взаємодій, що закріплюють основи петельних доменів, які виходять в хвіст комети при електрофорезі, і показано, що значна частина з них забезпечується за допомогою комплексу білків CTCF та когезину. Окрім цього, було показано організацію хроматину у вигляді фрактальної глобули для масштабів в декілька десятків тисяч пар нуклеотидів.

ВИСНОВКИ

Було продемонстровано, що у нуклеоїдах, отриманих з інтактних і бласттрансформованих лімфоцитів, наявні три основні типи петельних доменів ДНК, які відрізняються між собою особливостями міграції при кометному електрофорезі: короткі поверхневі петельні домени, внутрішні петельні домени нуклеоїду, а також великі петельні домени, що не здатні мігрувати в хвіст комети при електрофорезі. У клітинах з різною транскрипційною активністю та на різних стадіях клітинного циклу відбувається перерозподіл петельних доменів між трьома вказаними типами.

1. Міграція петельних доменів ДНК довжиною до 50 тисяч пар нуклеотидів, розташованих на поверхні нуклеоїду, у хвіст комети відбувається на ранніх етапах електрофорезу, причому швидкість їх руху не залежить від рівня надспіралізації ДНК у них.

2. Міграція петельних доменів ДНК розміром до 200 тисяч пар нуклеотидів, розташованих всередині нуклеоїду, суттєво пришвидшується при зниженні рівня надспіралізації і відбувається у кооперативний спосіб – швидкість руху зростає у процесі електрофорезу. Механізм кооперативності базується на зменшенні тертя, що створюється ДНК всередині нуклеоїду, внаслідок зниження її концентрації під час електрофорезу.

3. Вперше досліджено кінетику виходу ДНК при електрофорезі нуклеоїдів, отриманих з ізольованих ядер лімфоцитів. Показано, що в цьому випадку кооперативні ефекти зникають внаслідок того, що основне гальмування руху петельних доменів створюється не ДНК, а агарозним гелем, який проникає всередину заплвлених в гель клітинних ядер.

4. Закріплення основ петельних доменів залежить від білок-білкових і ДНК-білкових взаємодій. Взаємодії першого типу можуть бути зруйновані денатуруючими агентами сечовиною та додецилсульфатом натрію, другого – сполуками, що інтеркалюють в ДНК. В обох випадках спостерігається

зменшення кількості петельних доменів, здатних до міграції, на користь петельних доменів великого розміру, що проявляється у зниженні рівня максимального виходу ДНК при тривалому кометному електрофорезі.

5. Аналіз кінетики виходу ДНК при кометному електрофорезі вказує, що у бласттрансформованих транскрипційно-активних лімфоцитах на стадії G_1 клітинного циклу, у порівнянні з лімфоцитами на стадії G_0 , відбувається збільшення у два рази кількості ДНК у складі поверхневих петельних доменів при такому ж одночасному зменшенні кількості ДНК у складі внутрішніх доменів.

6. У бласттрансформованих лімфоцитах на стадії G_2 клітинного циклу кількість ДНК у складі поверхневих петельних доменів зростає приблизно так само, як і на стадії G_1 , тоді як внутрішні петельні домени, що можуть рухатись при електрофорезі, практично зникають взагалі. Можливість реєстрації вказаних перерозподілів типів петельних доменів за допомогою методу кометного електрофорезу відкриває перспективу використання даного підходу для досліджень змін петельної організації хроматину при функціональних змінах у клітинах.

7. Співставлення значень відносного вмісту ДНК у хвостах комет та контурних розмірів найдовших петель ДНК, що там присутні, вказує на те, що ділянки хроматинової фібрили розміром до кількох десятків тисяч пар нуклеотидів знаходяться у стані фрактальної глобули.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Cremer, M., von Hase, J., Volm, T., Brero, A., Kreth, G., Walter, J., Fischer, C., Solovei, I., Cremer, C. and Cremer, T. (2001). Non-random radial higher-order chromatin arrangements in nuclei of diploid human cells. *Chromosome Research*, 9(7), pp. 541–567.
2. Cremer, T., Cremer, M., Dietzel, S., Müller, S., Solovei, I. and Fakan, S. (2006). Chromosome territories – a functional nuclear landscape. *Current Opinion in Cell Biology*, 18(3), pp.307-316.
3. Croft, J., Bridger, J., Boyle, S., Perry, P., Teague, P. and Bickmore, W. (1999). Differences in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus. *The Journal of Cell Biology*, 145(6), pp.1119–1131.
4. Razin, S., Iarovaia, O. and Vassetzky, Y. (2014). A requiem to the nuclear matrix: from a controversial concept to 3D organization of the nucleus. *Chromosoma*, 123(3), pp.217-224
5. Razin, S. and Gavrilov, A. (2014). Chromatin without the 30-nm fiber: constrained disorder instead of hierarchical folding. *Epigenetics*, 9(5), pp.653-657.
6. Phillips, J. and Corces, V. (2009). CTCF: Master Weaver of the Genome. *Cell*, 137(7), pp.1194-1211.
7. Van Bortle, K. and Corces, V. (2012). Nuclear organization and genome function. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 28, pp.163-187.
8. Bulger, M. and Groudine, M. (2011). Functional and mechanistic diversity of distal transcription enhancers. *Cell*, 144(3), pp.327–339.
9. Cook, P. (2010). A model for all genomes: the role of transcription factories. *Journal of Molecular Biology*, 395(1), pp.1-10.
10. Kadauke, S. and Blobel, G. (2009). Chromatin loops in gene regulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1789(1), pp.17-25.
11. Tang, Z., Luo, O., Li, X., Zheng, M., Zhu, J., Szalaj, P., Trzaskoma, P., Magalska, A., Włodarczyk, J., Ruszczycki, B., Michalski, P., Piecuch, E., Wang, P., Wang, D.,

- Tian, S., Penrad-Mobayed, M., Sachs, L., Ruan, X., Wei, C., Liu, E., Wilczynski, G., Plewczynski, D., Li, G. and Ruan, Y. (2015). CTCF-Mediated Human 3D Genome Architecture Reveals Chromatin Topology for Transcription. *Cell*, 163(7), pp.1611-1627.
12. Kind, J. and van Steensel, B. (2010). Genome–nuclear lamina interactions and gene regulation. *Current Opinion in Cell Biology*, 22(3), pp.320-325.
13. Sparmann, A. and van Lohuizen, M. (2006). Polycomb silencers control cell fate, development and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 6(11), pp.846-856.
14. Dixon, J., Selvaraj, S., Yue, F., Kim, A., Li, Y., Shen, Y., Hu, M., Liu, J. and Ren, B. (2012). Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature*, 485(7398), pp.376–380.
15. Bickmore, W. (2013). The Spatial Organization of the Human Genome. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 14(1), pp.67-84.
16. Gibcus, J. and Dekker, J. (2013). The Hierarchy of the 3D Genome. *Molecular Cell*, 49(5), pp.773-782.
17. Rao, S., Huntley, M., Durand, N., Stamenova, E., Bochkov, I., Robinson, J., Sanborn, A., Machol, I., Omer, A., Lander, E. and Aiden, E. (2014). A 3D map of the human genome at kilobase resolution reveals principles of chromatin looping. *Cell*, 159(7), pp.1665–1680.
18. Vassetzky, Y., Hair, A. and Mechali, M. (2000). Rearrangement of chromatin domains during development in *Xenopus*. *Genes & Development*, 14(12), pp.1541-1552.
19. Schneider, R. and Grosschedl, R. (2007). Dynamics and interplay of nuclear architecture, genome organization, and gene expression. *Genes & Development*, 21(23), pp.3027-3043.
20. Wilson, R. and Coverley, D. (2013). Relationship between DNA replication and the nuclear matrix. *Genes to Cells*, 18(1), pp.17–31.
21. Heard, E. and Bickmore, W. (2007). The ins and outs of gene regulation and chromosome territory organisation. *Current Opinion in Cell Biology*, 19(3), pp.311-316.

22. Wilmut, I. and Campbell, K. (1998). Quiescence in Nuclear Transfer. *Science*, 281(5383), p.1611.
23. Bridger, J., Boyle, S., Kill, I. and Bickmore, W. (2000). Re-modelling of nuclear architecture in quiescent and senescent human fibroblasts. *Current Biology*, 10(3), pp.149–152.
24. Boyle, S., Gilchrist, S., Bridger, J., Mahy, N., Ellis, J. and Bickmore, W. (2001). The spatial organization of human chromosomes within the nuclei of normal and emerin-mutant cells. *Human Molecular Genetics*, 10(3), pp.211–219.
25. Zuleger, N., Robson, M. and Schirmer, E. (2011). The nuclear envelope as a chromatin organizer. *Nucleus*, 2(5), pp.339-349.
26. Goldman, R. (2002). Nuclear lamins: building blocks of nuclear architecture. *Genes & Development*, 16(5), pp.533-547.
27. Guelen, L., Pagie, L., Brasset, E., Meuleman, W., Faza, M., Talhout, W., Eussen, B., de Klein, A., Wessels, L., de Laat, W. and van Steensel, B. (2008). Domain organization of human chromosomes revealed by mapping of nuclear lamina interactions. *Nature*, 453(7197), pp.948-951.
28. Peric-Hupkes, D., Meuleman, W., Pagie, L., Bruggeman, S., Solovei, I., Brugman, W., Gräf, S., Flicek, P., Kerkhoven, R., van Lohuizen, M., Reinders, M., Wessels, L. and van Steensel, B. (2010). Molecular Maps of the Reorganization of Genome-Nuclear Lamina Interactions during Differentiation. *Molecular Cell*, 38(4), pp.603-613.
29. Mattout-Drubezki, A. and Gruenbaum, Y. (2003). Dynamic interactions of nuclear lamina proteins with chromatin and transcriptional machinery. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60(10), pp.2053-2063.
30. Furukawa, K. (1999). LAP2 binding protein 1 (L2BP1/BAF) is a candidate mediator of LAP2-chromatin interaction. *Journal of Cell Science*, 112(Pt 15), pp.2485-2492.
31. Lee, K., Haraguchi, T., Lee, R., Koujin, T., Hiraoka, Y. and Wilson, K. (2001). Distinct functional domains in emerin bind lamin A and DNA-bridging protein BAF. *Journal of Cell Science*, 114(Pt 24), pp.4567-4573

32. Németh, A., Conesa, A., Santoyo-Lopez, J., Medina, I., Montaner, D., Péterfia, B., Solovei, I., Cremer, T., Dopazo, J. and Längst, G. (2010). Initial Genomics of the Human Nucleolus. *PLoS Genetics*, 6(3), p.e1000889.
33. Markaki, Y., Gunkel, M., Schermelleh, L., Beichmanis, S., Neumann, J., Heidemann, M., Leonhardt, H., Eick, D., Cremer, C. and Cremer, T. (2010). Functional Nuclear Organization of Transcription and DNA Replication: A Topographical Marriage between Chromatin Domains and the Interchromatin Compartment. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 75(0), pp.475-492.
34. Nora, E., Lajoie, B., Schulz, E., Giorgetti, L., Okamoto, I., Servant, N., Piolot, T., van Berkum, N., Meisig, J., Sedat, J., Gribnau, J., Barillot, E., Blüthgen, N., Dekker, J. and Heard, E. (2012). Spatial partitioning of the regulatory landscape of the X-inactivation centre. *Nature*, 485(7398), pp.381-385.
35. Sexton, T., Yaffe, E., Kenigsberg, E., Bantignies, F., Leblanc, B., Hoichman, M., Parrinello, H., Tanay, A. and Cavalli, G. (2012). Three-Dimensional Folding and Functional Organization Principles of the Drosophila Genome. *Cell*, 148(3), pp.458-472.
36. Jackson, D., Hassan, A., Errington, R. and Cook, P. (1993). Visualization of focal sites of transcription within human nuclei. *The EMBO Journal*, 12(3), pp.1059–1065.
37. Cook, P. (2002). Predicting three-dimensional genome structure from transcriptional activity. *Nature Genetics*, 32(3), pp.347-352.
38. Pombo, A., Jackson, D., Hollinshead, M., Wang, Z., Roeder, R. and Cook, P. (1999). Regional specialization in human nuclei: visualization of discrete sites of transcription by RNA polymerase III. *The EMBO Journal*, 18(8), pp.2241-2253.
39. Rippe, K. (2001). Making contacts on a nucleic acid polymer. *Trends in Biochemical Sciences*, 26(12), pp.733-740.
40. Marenduzzo, D., Finan, K. and Cook, P. (2006). The depletion attraction: an underappreciated force driving cellular organization. *The Journal of Cell Biology*, 175(5), pp.681-686.

41. Marenduzzo, D., Micheletti, C. and Cook, P. (2006). Entropy-Driven Genome Organization. *Biophysical Journal*, 90(10), pp.3712-3721.
42. Cook, P. (2003). Nongenic transcription, gene regulation and action at a distance. *Journal of Cell Science*, 116(22), pp.4483-4491.
43. Banerji, J., Rusconi, S. and Schaffner, W. (1981). Expression of a β -globin gene is enhanced by remote SV40 DNA sequences. *Cell*, 27(2), pp.299-308.
44. Woodcock, C. and Ghosh, R. (2010). Chromatin Higher-order Structure and Dynamics. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(5), pp.a000596-a000596.
45. Ong, C. and Corces, V. (2011). Enhancer function: new insights into the regulation of tissue-specific gene expression. *Nature Reviews Genetics*, 12(4), pp.283-293.
46. Maston, G., Evans, S. and Green, M. (2006). Transcriptional regulatory elements in the human genome. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 7, pp.29-59.
47. Gaszner, M. and Felsenfeld, G. (2006). Insulators: exploiting transcriptional and epigenetic mechanisms. *Nature Reviews Genetics*, 7(9), pp.703-713.
48. Millau, J. and Gaudreau, L. (2011). CTCF, cohesin, and histone variants: connecting the genome. *Biochemistry and Cell Biology*, 89(5), pp.505-513.
49. Parelho, V., Hadjur, S., Spivakov, M., Leleu, M., Sauer, S., Gregson, H., Jarmuz, A., Canzonetta, C., Webster, Z., Nesterova, T., Cobb, B., Yokomori, K., Dillon, N., Aragon, L., Fisher, A. and Merkenschlager, M. (2008). Cohesins functionally associate with CTCF on mammalian chromosome arms. *Cell*, 132(3), pp.422-433.
50. Rubio, E., Reiss, D., Welch, P., Disteche, C., Filippova, G., Baliga, N., Aebersold, R., Ranish, J. and Krumm, A. (2008). CTCF physically links cohesin to chromatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 105(24), pp.8309-8314.
51. Sanborn, A., Rao, S., Huang, S., Durand, N., Huntley, M., Jewett, A., Bochkov, I., Chinnappan, D., Cutkosky, A., Li, J., Geeting, K., Gnirke, A., Melnikov, A., McKenna, D., Stamenova, E., Lander, E. and Aiden, E. (2015). Chromatin extrusion explains key features of loop and domain formation in wild-type and

- engineered genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 112(47), pp.E6456-E6465.
- 52.Desprat, R., Thierry-Mieg, D., Lailier, N., Lajugie, J., Schildkraut, C., Thierry-Mieg, J. and Bouhassira, E. (2009). Predictable dynamic program of timing of DNA replication in human cells. *Genome Research*, 19(12), pp.2288-2299.
- 53.Hiratani, I., Ryba, T., Itoh, M., Yokochi, T., Schwaiger, M., Chang, C., Lyou, Y., Townes, T., Schübeler, D. and Gilbert, D. (2008). Global Reorganization of Replication Domains During Embryonic Stem Cell Differentiation. *PLoS Biology*, 6(10), p.e245.
- 54.O'Keefe, R., Henderson, S. and Spector, D. (1992). Dynamic organization of DNA replication in mammalian cell nuclei: spatially and temporally defined replication of chromosome-specific alpha-satellite DNA sequences. *The Journal of Cell Biology*, 116(5), pp.1095–1110
- 55.Ryba, T., Hiratani, I., Lu, J., Itoh, M., Kulik, M., Zhang, J., Schulz, T., Robins, A., Dalton, S. and Gilbert, D. (2010). Evolutionarily conserved replication timing profiles predict long-range chromatin interactions and distinguish closely related cell types. *Genome Research*, 20(6), pp.761–770
- 56.Wei, Z., Huang, D., Gao F., Chang, W., An, W., Coetzee, G., Wang, K. and Lu, W. (2013). Biological implications and regulatory mechanisms of long-range chromosomal interactions. *Journal of Biological Chemistry*, 288(31), pp.22369-22377.
- 57.Amann, R. and Fuchs, B. (2008). Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence in situ hybridization techniques. *Nature Reviews Microbiology*, 6(5), pp.339-348.
- 58.Cremer, T. and Cremer, M. (2010). Chromosome Territories. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(3), pp.a003889-a003889.
- 59.Osborne, C., Chakalova, L., Brown, K., Carter, D., Horton, A., Debrand, E., Goyenechea, B., Mitchell, J., Lopes, S., Reik, W. and Fraser, P. (2004). Active genes dynamically colocalize to shared sites of ongoing transcription. *Nature Genetics*, 36(10), pp.1065-1071

- 60.Noordermeer, D., de Wit, E., Klous, P., van de Werken, H., Simonis, M., Lopez-Jones, M., Eussen, B., de Klein, A., Singer, R. H. and de Laat, W. (2011). Variegated gene expression caused by cell-specific long-range DNA interactions. *Nature Cell Biology*, 13(8), pp.944-951.
- 61.Dekker, J., Rippe, K., Dekker, M. and Kleckner, N. (2002). Capturing Chromosome Conformation. *Science*, 295(5558), pp.1306-1311.
- 62.Dekker, J., Marti-Renom, M. and Mirny, L. (2013). Exploring the three-dimensional organization of genomes: interpreting chromatin interaction data. *Nature Reviews Genetics*, 14(6), pp.390-403.
- 63.Simonis, M., Klous, P., Splinter, E., Moshkin, Y., Willemsen, R., de Wit, E., van Steensel, B. and de Laat, W. (2006). Nuclear organization of active and inactive chromatin domains uncovered by chromosome conformation capture–on-chip (4C). *Nature Genetics*, 38(11), pp.1348-1354.
- 64.Zhao, Z., Tavoosidana, G., Sjölander, M., Göndör, A., Mariano, P., Wang, S., Kanduri, C., Lezcano, M., Singh Sandhu, K., Singh, U., Pant, V., Tiwari, V., Kurukuti, S. and Ohlsson, R. (2006). Circular chromosome conformation capture (4C) uncovers extensive networks of epigenetically regulated intra- and interchromosomal interactions. *Nature Genetics*, 38(11), pp.1341-1347.
- 65.Dostie, J., Richmond, T., Arnaout, R., Selzer, R., Lee, W., Honan, T., Rubio, E., Krumm, A., Lamb, J., Nusbaum, C., Green, R. and Dekker, J. (2006). Chromosome Conformation Capture Carbon Copy (5C): A massively parallel solution for mapping interactions between genomic elements. *Genome Research*, 16(10), pp.1299-1309.
- 66.Lieberman-Aiden, E., van Berkum, N., Williams, L., Imakaev, M., Ragoczy, T., Telling, A., Amit, I., Lajoie, B., Sabo, P., Dorschner, M., Sandstorm, R., Bernstein, B., Bender, M., Groudine, M. and Gnirke, A., Stamatoyannopoulos, J., Mirny, L., Lander, E. and Dekker, J. (2009). Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science*, 326(5950), pp.289-293.

67. De Wit, E. and de Laat, W. (2012). A decade of 3C technologies: insights into nuclear organization. *Genes & Development*, 26(1), pp.11-24.
68. Kuo, M. and Allis, C. (1999). In Vivo Cross-Linking and Immunoprecipitation for Studying Dynamic Protein: DNA Associations in a Chromatin Environment. *Methods*, 19(3), pp.425-433.
69. Fullwood, M. and Ruan, Y. (2009). ChIP-based methods for the identification of long-range chromatin interactions. *Journal of Cellular Biochemistry*, 107(1), pp.30-39
70. Wei, C., Wu, Q., Vega, V., Chiu, K., Ng, P., Zhang, T., Shahab, A., Yong, H., Fu, Y., Weng, Z., Liu, J., Zhao, X., Chew, J., Lee, Y., Kuznetsov, V., Sung, W., Miller, L., Lim, B., Liu, E., Yu, Q., Ng, H. and Ruan, Y. (2006). A global map of p53 transcription-factor binding sites in the human genome. *Cell*, 124(1), pp.207-219.
71. Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T., Schones, D., Wang, Z., Wei, G., Chepelev, I. and Zhao, K. (2007). High-Resolution Profiling of Histone Methylations in the Human Genome. *Cell*, 129(4), pp.823-837.
72. Tiwari, V., Cope, L., McGarvey, K., Ohm, J. and Baylin, S. (2008). A novel 6C assay uncovers Polycomb-mediated higher order chromatin conformations. *Genome Research*, 18(7), pp.1171-1179.
73. Simonis, M., Kooren, J. and de Laat, W. (2007). An evaluation of 3C-based methods to capture DNA interactions. *Nature Methods*, 4(11), pp.895-901.
74. Ostling, O. and Johanson, K. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 123(1), pp.291-298.
75. Olive, P. (1999). DNA damage and repair in individual cells: applications of the comet assay in radiobiology. *International Journal of Radiation Biology*, 75(4), pp.395-405.
76. 30 years of the Comet Assay: an overview with some new insights. (2015). 1st ed. Lausanne: Frontiers Media S.A, 174 p.

77. De Boeck, M., Touil, N., De Visscher, G., Vande, P. and Kirsch-Volders, M. (2000). Validation and implementation of an internal standard in comet assay analysis. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 469(2), pp.181-197.
78. Dusinska, M. and Collins, A. (2008). The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions. *Mutagenesis*, 23(3), pp.191-205.
79. Olive, P. (2002). The Comet Assay: An Overview of Techniques. *Methods in Molecular Biology*, 203, pp.179-194.
80. Cook, P., Brazell, I. and Jost, E. (1976). Characterization of nuclear structures containing superhelical DNA. *Journal of Cell Science*, 22(2), pp.303-324.
81. - - , P. (1999). Repair kinetics of gamma-ray induced DNA damage determined by the single cell gel electrophoresis assay in murine leukocytes in vivo. *Mutation Research/DNA Repair*, 433(1), pp.45-52.
82. Angelis, K., Dušinská, M. and Collins, A. (1999). Single cell gel electrophoresis: Detection of DNA damage at different levels of sensitivity. *Electrophoresis*, 20(10), pp.2133-2138.
83. Collins, A., Dobson, V., Dušinská, M., Kennedy, G. and Štětina, R. (1997). The comet assay: what can it really tell us? *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 375(2), pp.183-193.
84. Afanasieva, K., Zazhytska, M. and Sivolob, A. (2010). Kinetics of comet formation in single-cell gel electrophoresis: Loops and fragments *Electrophoresis*, 31(3), pp.512-519.
85. Афанасьева, К., Шувалова, Т., Зажицкая, М. и Сиволоб, А. (2008). Обратимость выхода петель ДНК при «кометном» электрофорезе изолированных клеток. *Біополімери і клітина*, 24(2), сс.105-111.
86. Афанасьева, К., Зажицкая, М. и Сиволоб, А. (2009). Механизмы выхода ДНК при нейтральном и щелочном кометном электрофорезе. *Цитология и генетика*, 6, сс.3-7.
87. Afanasieva, K., Chopei, M., Zazhytska, M., Vikhрева, M. and Sivolob, A. (2013). DNA loop domain organization as revealed by single-cell gel

- electrophoresis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1833(12), pp.3237-3244.
88. Winchester, R. J., and Ross, G. (1976). Methods for enumerating lymphocyte populations. In: N.R. Rose and H. Friedman, eds., *Manual of Clinical Immunology*, 1st ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, pp. 64-76.
89. Evans, C. and Middleton, V. (1970). Evaluation of methods for preparing pure lymphocyte suspensions from peripheral blood. *Journal of Clinical Pathology*, 23(9), pp.822-823.
90. Klein, A., Ramcharitar, S., Christeff, N., Nisbett-Brown, E., Nunez, E. and Malkin, A. (1991). Effect of anticoagulants in vitro on the viability of lymphocytes and content of free fatty acids in plasma. *In Vitro Cell Development Biology*, 27A(4), pp.307-311
91. Franco-Obregón, A., Wang, H. and Clapham, D. (2000). Distinct Ion Channel Classes Are Expressed on the Outer Nuclear Envelope of T- and B-Lymphocyte Cell Lines. *Biophysical Journal*, 79(1), pp.202-214.
92. Mazzanti, M., DeFelice, L., Cohen, J. and Malter, H. (1990). Ion channels in the nuclear envelope. *Nature*, 343(6260), pp.764-767.
93. Wilkie, G. and Schirmer, E. (2008). Purification of nuclei and preparation of nuclear envelopes from skeletal muscle. *Methods in Molecular Biology*, 463, pp.23-41.
94. Afanasieva, K., Chopei, M. and Sivolob, A. (2015). Single nucleus versus single-cell gel electrophoresis: Kinetics of DNA track formation. *Electrophoresis*, 36(7-8), pp.973-977.
95. Afanasieva, K., Chopei, M., Lozovik, A., Rushkovsky, S. and Sivolob, A. (2016). Redistribution of DNA loop domains in human lymphocytes under blast transformation with interleukin 2. *The Ukrainian Biochemical Journal*, 88(6), pp.45-51.
96. Mzali, R., Seguin, L., Liot, C., Auger, A., Pacaud, P., Loirand, G., Thibault, C., Pierre, J., and Bertoglio, J. (2005). Regulation of Rho signaling pathways in

- interleukin-2-stimulated human T-lymphocytes. *The FASEB Journal*, 19(13), pp.1911-1913.
97. Kaplan, O., Aebersold, P. and Cohen, J. (1989). Metabolism of peripheral lymphocytes, interleukin-2-activated lymphocytes and tumor-infiltrating lymphocytes from ^{31}NMR studies. *FEBS Letters*, 258(1), pp.55-58.
98. Watt, J. and Stephen, G. (1986). Lymphocyte culture for chromosome analysis. In: D. Rooney and B. Czepulkowski, eds., *Human Cytogenetics. A practical approach*, 1st ed. Oxford: IRL Press, pp. 39-55.
99. Olive, P. and Banáth, J. (2006). The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nature Protocols*, 1(1), pp.23-29.
100. Liao, W., McNutt, M. and Zhu, W. (2009). The comet assay: A sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. *Methods*, 48(1), pp.46-53.
101. Solomon, M. and Varshavsky, A. (1985). Formaldehyde-mediated DNA-protein crosslinking: A probe for in vivo chromatin structures. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 82(19), pp.6470-6474.
102. Bennion, B. and Dagget, V. (2003). The molecular basis for the chemical denaturation of proteins by urea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 100(9), pp.5142–5147.
103. Tanford, C., Fish, W. and Reynolds, J. (1970). Gel Chromatography of Proteins in Denaturing Solvents: comparison between sodium dodecyl sulfate and guanidine hydrochloride as denaturants. *The Journal of Biological Chemistry*, 245(19), pp.5166-5168.
104. Cohen, N. and Yielding, L. (1965). Spectrophotometric Studies of the Interaction of Chloroquine with Deoxyribonucleic Acid. *The Journal of Biological Chemistry*, 240(7), pp.3123-3131.
105. Чопей, М., Афанасьева, К. и Сиволюб, А. (2014). Интеркаляция белков в ДНК как один из основных способов фиксации наиболее стабильных петельных доменов хроматина. *The Ukrainian Biochemical Journal*, 86(4), pp.110-118.
106. Anderson, D. and Laubenthal, J. (2013). Analysis of DNA damage via single-cell electrophoresis. *Methods in Molecular Biology*, 1054, pp. 209-218.

107. Manzini, G., Barcellona, M., Avitabile, M. and Quadrifoglio, F. (1983). Interaction of diamidino-2-phenylindole (DAPI) with natural and synthetic nucleic acid. *Nucleic Acids Research*, 11(24), pp.8861-8876.
108. Kapuscinski, J. and Skoczylas, B. (1978). Fluorescent complex of DNA with DAPI 4',6-diamidine-2-phenyl indole.2HCl or DCI 4',6-dicarboxyamide-2-phenyl indole. *Nucleic Acids Research*, 5(10), pp.3775-3799.
109. Kubota, Y., Kubota, K. and Tani, S. (2000). DNA binding properties of DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) analogs having an imidazoline ring or a tetrahydropyrimidine ring: Groove-binding and intercalation. *Nucleic Acids Symposium Series*, 44(1), pp.53-54.
110. Phipson, B. and Smyth, G. (2010). Permutation *P*-values should never be zero: calculating exact *P*-values when permutations are randomly drawn. *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology*, 9(1), Article 39.
111. Collins, A., Oscoz, A., Brunborg, G., Gaivão, I., Giovannelli, L., Kruszewski, M., Smith, C. and Stetina, R. (2008). The comet assay: topical issues. *Mutagenesis*, 23(3), pp.143-151.
112. Collins, A. (2002). The comet assay. Principles, applications, and limitations. *Methods in Molecular Biology*, 203, pp.163-177.
113. Moller, P. (2006). The alkaline comet assay: towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 98(4), pp.336-345.
114. Ribas-Maynou, J., García-Peiró, A., Abad, C., Amengual, M., Navarro, J. and Benet, J. (2012). Alkaline and neutral comet assay profiles of sperm DNA damage in clinical groups. *Human Reproduction*, 27(3), pp.652-658.
115. Сиволоб, А., Афанасьєва, К. та Чопей, М. (2014). Організація петельних доменів хроматину за даними кометного електрофорезу. В: *XI Український біохімічний конгрес*. Київ: Український біохімічний журнал, 86(5), с.36.
116. Zazhytska, M., Afanasieva, K., Chopei, M., Vikhрева, M. and Sivolob, A. (2012). Influence of chloroquine on kinetics of single-cell gel electrophoresis. *Biopolymers and Cell*, 28(4), pp.292-297.

117. Чопей, М., Вихрева, М., Сідляк, Г. та Афанасьєва, К. (2013). Зміна рівня надспіралізації петельних доменів ДНК в інтактних клітинах під впливом інтеркалятора. В: *IX Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології» приуроченої до 150-річчя від дня народження академіка В. Вернадського*. Львів: Львівський національний університет імені Івана Франка, сс.28-29.
118. Afanasieva, K., Zazhytska, M., Chopei, M. and Sivolob, A. (2013). Comet assay as a tool to investigate topology of DNA loops in intact cells. In: *38th FEBS congress «Mechanisms in biology»*. St. Petersburg: FEBS Journal, 280(1), pp.13-14.
119. Défontaines, A. and Viovy, J. (1993). Gel electrophoresis of an end-labeled DNA I. Dynamics and trapping in constant fields. *Electrophoresis*, 14(1), pp.8-17.
120. Ribbeck, K. and Görlich, D. (2001). Kinetic analysis of translocation through nuclear pore complexes. *The EMBO Journal*, 20(6), pp.1320-1330.
121. Liepinsh, E. and Otting, G. (1994). Specificity of Urea Binding to Proteins. *Journal of American Chemical Society*, 116(21), pp.9670-9674.
122. Pitt-Rivers, R. and Impombato, F. (1968). The binding of sodium dodecyl sulphate to various proteins. *Biochemical Journal*, 109(5), pp.109-115.
123. Чопей, М., Лозовик, О. та Афанасьєва, К. (2014). Вплив інтеркаляторів і денатуруючих агентів білків на організацію петельних доменів ДНК. В: *X Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології»*. Львів: Львівський національний університет імені Івана Франка, сс.220-221.
124. Чопей, М., Олефіренко, В., Афанасьєва, К. та Сиволоб, А. (2016). Вплив ДНК-інтеркаляторів на стабільність петельних доменів ДНК. *Вісник Львівського університету. Серія біологічна*, 74, сс.12-19.
125. Шкель, О., Чопей, М. та Афанасьєва, К. (2016). Вплив високих концентрацій інтеркалятора хлорокіну на стабільність петельних доменів хроматину. В: *XIV Міжнародна наукова конференція студентів, аспірантів та молодих*

- вчених «Шевченківська весна 2016: біологічні науки». Київ: Київський національний університет імені Тараса Шевченка, сс.214-216.
126. Liu, Y., Li, C., Lu, Z., Ding, S., Yang, X. and Mo, J. (2006). Studies on formation and repair of formaldehyde-damaged DNA by detection of DNA-protein crosslinks and DNA breaks. *Frontiers in Bioscience*, 11, pp.991-997.
127. Вихрєва, М., Чопей, М., Сидорук, О. та Зажицька, М. (2013). Ефективність виходу ДНК під час кометного електрофорезу при індукції ковалентних зшивок ДНК-білок у присутності високих концентрацій інтеркалятора. В: *IX Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології» приуроченої до 150-річчя від дня народження академіка В. Вернадського*. Львів: Львівський національний університет імені Івана Франка Львівський національний університет імені Івана Франка, сс.366-367.
128. Darzykiewicz, Z. and Traganos, F. (1982). RNA content and chromatin structure in cycling and noncycling cell populations studied by flow cytometry. In: Padilla, G. and McCanty, K., eds., *Genetic Expression in the Cell Cycle*, 1st ed. New York: Academic, pp. 103-128.
129. Beadling, C. and Smith, K. (2002). DNA array analysis of interleukin-2-regulated immediate/early genes. *Medical Immunology*, 1(1), p.2.
130. Чопей, М., Зажицька, М. та Афанасьєва, К. (2010). Кінетика виходу ДНК при кометному електрофорезі інтактних та бласттрансформованих лімфоцитів людини. В: *X Всеукраїнська наукова конференція студентів та молодих науковців «Біологічні дослідження молодих вчених в Україні»*. Київ: Київський національний університет імені Тараса Шевченка, сс.92-93.
131. Bender, M. and Prescott, D. (1962). DNA synthesis and mitosis in cultures of human peripheral leukocytes. *Experimental Cell Research*, 27, pp.221-229.
132. Mookerjee, B. and Pauly, J. (1990). Mitogenic effect of interleukin-2 on unstimulated human T cells: an editorial review. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 4(2), pp. 138-149.

133. Lozovik, A., Chopei, M., Olefirenko, V. and Afanasieva, K. (2016). DNA loop domain organization in lymphocytes and lymphoblasts as revealed by comet assay. In: *XII International scientific conference for students and PhD students «Youth and progress of biology»*. Lviv: Ivan Franko National University of Lviv, p.18.
134. Chopei, M. and Afanasieva, K. (2016). Organization of interphase chromatin in different cell types. In: *Conference of young scientists «Urgent problems of biochemistry and biotechnology - 2016»*. Kyiv: The Ukrainian Biochemical Journal, 88(4), p. 124.
135. Chopei, M., Olefirenko, V. and Afanasieva, K. (2017). Redistribution of DNA loop domains during transcription activation and malignant transformation as revealed by comet assay. In: *Joint meeting of the 25th annual conference “Modern aspects of biochemistry and biotechnology” and 2nd Conference for young scientists of the division of biochemistry, physiology and molecular biology National Academy of Sciences of Ukraine*. Kyiv: The Ukrainian Biochemical Journal, 89(3), p.113.
136. Афанасьева, К., Чопей, М. та Сиволоб, А. (2014). Свідчення існування хроматину в стані фрактальної глобули за даними кометного електрофорезу. *Вісник Львівського університету. Серія біологічна*, 68, сс.181-189.
137. Afanasieva, K., Chopei, M. and Sivolob, A. (2015). Chromatin in fractal globule state: evidence from comet assay. *Biopolymers and Cell*, 31(2), pp.97-103.
138. Chopei, M., Semenova, A., Politenkova, S. and Afanasieva, K. (2015). The fractal globule model of interphase chromatin organization as revealed by comet assay. In: *XI International scientific conference for students and PhD students «Youth and progress of biology»*. Lviv: Ivan Franko National University of Lviv, p.11.
139. Афанасьева, К., Чопей, М. та Сиволоб А. (2015). Хроматин у стані фрактальної глобули: підтвердження за допомогою кометного електрофорезу. В: *VI з'їзд Українського біофізичного товариства*. Луцьк: Східноєвропейський національний університет імені Лесі Українки, с.38.

140. Mirny, L. (2011). The fractal globule as a model of chromatin architecture in the cell. *Chromosome Research*, 19, pp.37-51.
141. Fudenberg, G. and Mirny, L. (2012). Higher-order chromatin structure: bridging physics and biology. *Current Opinion in Genetics & Development*, 22, pp.115–124.
142. Bancaud, A., Lavelle, C., Huet, S. and Ellenberg, J. (2012). A fractal model for nuclear organization: current evidence and biological implications. *Nucleic Acids Research*, 40(18), pp.8783-8792.
143. McNally, J. and Mazza, D. (2010). Fractal geometry in the nucleus. *The EMBO Journal*, 29(1), pp.2-3.
144. Grosberg, A., Nechaev, S. and Shakhnovich, E. (1988). The role of topological constraints in the kinetics of collapse of macromolecules. *Journal de Physique*, 49(12), pp.2095-2100.
145. Ross, D., Scherf, U., Eisen, M., Perou, C., Rees, C., Spellman, P., Iyer, V., Jeffrey, S., Van de Rijn, M., Waltham, M., Pergamenschikov, A., Lee, J., Lashkari, D., Shalon, D., Myers, T., Weinstein, J., Botstein, D. and Brown, P. (2000). Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. *Nature Genetics*, 24(3), pp.227-235.
146. Liotta, L. and Petricoin, E. (2000). Molecular profiling of human cancer. *Nature Reviews Genetics*, 1, pp.48-56.

ДОДАТОК А

Список опублікованих праць за темою дисертації

1. Afanasieva, K., Chopei, M., Zazhytska, M., Vikhрева, M. and Sivolob, A. (2013). DNA loop domain organization as revealed by single-cell gel electrophoresis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1833(12), pp. 3237-3244. **(Scopus)**. **(Impact Factor: 5.128)**. (Особистий внесок здобувача: проведення кометного електрофорезу, дослідження ефекту сечовини та додецилсульфату натрію на міграцію ДНК при кометному електрофорезі, аналіз отриманих даних, участь в обговоренні результатів).
2. Чопей, М., Афанасьєва, К. и Сиволоб, А. (2014). Интеркаляция белков в ДНК как один из основных способов фиксации наиболее стабильных петельных доменов хроматина. *The Ukrainian Biochemical Journal*, 86(4), pp.110-118. **(Scopus)**. (Особистий внесок здобувача: дослідження впливу інтеркалятора на міграцію петельних доменів ДНК при кометному електрофорезі, аналіз отриманих результатів, участь в обговоренні результатів).
3. Афанасьєва, К., Чопей, М. та Сиволоб, А. (2014). Свідчення існування хроматину в стані фрактальної глобули за даними кометного електрофорезу. *Вісник Львівського університету. Серія біологічна*, 68, сс.181-189. (Особистий внесок здобувача: проведення експериментальних досліджень і аналіз отриманих результатів, участь в обговоренні результатів та підготовці статті до друку).
4. Afanasieva, K., Chopei, M. and Sivolob, A. (2015). Single nucleus versus single-cell gel electrophoresis: Kinetics of DNA track formation. *Electrophoresis*, 36(7-8), pp.973-977. **(Scopus)**. **(Impact Factor: 2.482)**. (Особистий внесок здобувача: отримання та характеристика фракції ізольованих ядер лімфоцитів, проведення кометного електрофорезу в присутності хлорокіну, участь в обговоренні результатів).

5. Afanasieva, K., Chopei, M. and Sivolob, A. (2015). Chromatin in fractal globule state: evidence from comet assay. *Biopolymers and Cell*, 31(2), pp.97-103. **(Scopus)**. (Особистий внесок здобувача: дослідження кінетики зміни довжини електрофоретичного треку при кометному електрофорезі, участь в обговоренні результатів).
6. Afanasieva, K., Chopei, M., Lozovik, A., Rushkovsky, S. and Sivolob, A. (2016). Redistribution of DNA loop domains in human lymphocytes under blast transformation with interleukin 2. *The Ukrainian Biochemical Journal*, 88(6), pp.45-51. **(Scopus)**. (Особистий внесок здобувача: проведення реакції бласттрансформації лімфоцитів та оцінка її ефективності, дослідження кінетики зміни довжини електрофоретичного треку при кометному електрофорезі, аналіз отриманих результатів, участь в обговоренні результатів).
7. Чопей, М., Олефіренко, В., Афанасьєва, К. та Сиволоб, А. (2016). Вплив ДНК-інтеркаляторів на стабільність петельних доменів ДНК. *Вісник Львівського університету. Серія біологічна*, 74, сс.12-19. (Особистий внесок здобувача: проведення експериментальних досліджень і аналіз отриманих результатів, участь в обговоренні результатів та підготовці статті до друку).
8. Чопей, М., Зажицька, М. та Афанасьєва, К. (2010). Кінетика виходу ДНК при кометному електрофорезі інтактних та бласттрансформованих лімфоцитів людини. В: *X Всеукраїнська наукова конференція студентів та молодих науковців «Біологічні дослідження молодих вчених в Україні»*. Київ: Київський національний університет імені Тараса Шевченка, сс.92-93. (Особистий внесок здобувача: проведення експериментальних досліджень, підготовка тез до друку).
9. Чопей, М., Вихрева, М., Сідляк, Г. та Афанасьєва, К. (2013). Зміна рівня надспіралізації петельних доменів ДНК в інтактних клітинах під впливом інтеркалятора. В: *IX Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології» приуроченої до 150-річчя від дня народження академіка В. Вернадського*. Львів: Львівський національний

університет імені Івана Франка, сс.28-29. *(Особистий внесок здобувача: проведення експериментальних досліджень, підготовка тез до друку).*

10. Вихрєва, М., Чопей, М., Сидорук, О. та Зажицька, М. (2013). Ефективність виходу ДНК під час кометного електрофорезу при індукції ковалентних зшивок ДНК-білок у присутності високих концентрацій інтеркалятора. В: *IX Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології»* приуроченої до 150-річчя від дня народження академіка В. Вернадського. Львів: Львівський національний університет імені Івана Франка Львівський національний університет імені Івана Франка, сс.366-367. *(Особистий внесок здобувача: проведення експериментальних досліджень, підготовка тез до друку).*
11. Afanasieva, K., Zazhytska, M., Chopei, M. and Sivolob, A. (2013). Comet assay as a tool to investigate topology of DNA loops in intact cells. In: *38th FEBS congress «Mechanisms in biology»*. St. Petersburg: FEBS Journal, 280(1), pp.13-14. *(Особистий внесок здобувача: проведення експериментальних досліджень, підготовка тез до друку).*
12. Чопей, М., Лозовик, О. та Афанасьєва, К. (2014). Вплив інтеркаляторів і денатуруючих агентів білків на організацію петельних доменів ДНК. В: *X Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології»*. Львів: Львівський національний університет імені Івана Франка, сс.220-221. *(Особистий внесок здобувача: проведення експериментальних досліджень, підготовка тез до друку).*
13. Сиволоб, А., Афанасьєва, К. та Чопей, М. (2014). Організація петельних доменів хроматину за даними кометного електрофорезу. В: *XI Український біохімічний конгрес*. Київ: Український біохімічний журнал, 86(5), с.36. *(Особистий внесок здобувача: проведення експериментальних досліджень, підготовка тез до друку).*
14. Chopei, M., Semenova, A., Politenkova, S. and Afanasieva, K. (2015). The fractal globule model of interphase chromatin organization as revealed by comet assay. In: *XI International scientific conference for students and PhD students «Youth*

and progress of biology». Lviv: Ivan Franko National University of Lviv, p.11. (Особистий внесок здобувача: проведення експериментальних досліджень, підготовка тез до друку).

15. Афанасьєва, К., Чопей, М. та Сиволоб А. (2015). Хроматин у стані фрактальної глобули: підтвердження за допомогою кометного електрофорезу. В: *VI з'їзд Українського біофізичного товариства*. Луцьк: Східноєвропейський національний університет імені Лесі Українки, с.38. (Особистий внесок здобувача: проведення експериментальних досліджень, підготовка тез до друку).
16. Шкель, О., Чопей, М. та Афанасьєва, К. (2016). Вплив високих концентрацій інтеркалятора хлорокіну на стабільність петельних доменів хроматину. В: *XIV Міжнародна наукова конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «Шевченківська весна 2016: біологічні науки»*. Київ: Київський національний університет імені Тараса Шевченка, сс.214-216. (Особистий внесок здобувача: проведення експериментальних досліджень, підготовка тез до друку).
17. Lozovik, A., Chopei, M., Olefirenko, V. and Afanasieva, K. (2016). DNA loop domain organization in lymphocytes and lymphoblasts as revealed by comet assay. In: *XII International scientific conference for students and PhD students «Youth and progress of biology»*. Lviv: Ivan Franko National University of Lviv, p.18. (Особистий внесок здобувача: проведення експериментальних досліджень, підготовка тез до друку).
18. Chopei, M. and Afanasieva, K. (2016). Organization of interphase chromatin in different cell types. In: *Conference of young scientists «Urgent problems of biochemistry and biotechnology - 2016»*. Kyiv: The Ukrainian Biochemical Journal, 88(4), p. 124. (Особистий внесок здобувача: проведення експериментальних досліджень, підготовка тез до друку).
19. Chopei, M., Olefirenko, V. and Afanasieva, K. (2017). Redistribution of DNA loop domains during transcription activation and malignant transformation as revealed by comet assay. In: *Joint meeting of the 25th annual conference “Modern aspects*

of biochemistry and biotechnology” and 2nd Conference for young scientists of the division of biochemistry, physiology and molecular biology National Academy of Sciences of Ukraine. Kyiv: The Ukrainian Biochemical Journal, 89(3), p.113. (Особистий внесок здобувача: проведення експериментальних досліджень, підготовка тез до друку).

Апробація матеріалів дисертації

1. X Всеукраїнська наукова конференція студентів та молодих науковців «Біологічні дослідження молодих вчених в Україні», 28-29 жовтня 2010 року, Київ, Україна (*усна доповідь*).
2. IX Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології» приуроченої до 150-річчя від дня народження академіка В. Вернадського, 16-19 квітня 2013 року, Львів, Україна (*усна доповідь*).
3. 38th FEBS congress «Mechanisms in biology», July 6-11, 2013, St. Petersburg, Russia (*стендова доповідь*).
4. X Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології», 8-11 квітня 2014 року, Львів, Україна (*усна доповідь*).
5. XI Український біохімічний конгрес, 6-10 жовтня 2014 року, Київ, Україна (*усна доповідь*).
6. XI Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології», 20-23 квітня 2015 року, Львів, Україна (*усна доповідь*).
7. VI з'їзд Українського біофізичного товариства, 28-30 травня 2015 року, Луцьк-Світязь, Україна, (*усна доповідь*).
8. XIV Міжнародна наукова конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «Шевченківська весна 2016: біологічні науки», 6-8 квітня 2016, Київ, Україна (*стендова доповідь*).
9. XII Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології», 19-21 квітня 2016 року, Львів, Україна (*усна доповідь*).

10. Conference of young scientists «Urgent problems of biochemistry and biotechnology - 2016», 26-27 May 2016, Kyiv, Ukraine (*усна доповідь*).
11. Joint meeting of the 25th annual conference «Modern aspects of biochemistry and biotechnology» and 2nd Conference for young scientists of the division of biochemistry, physiology and molecular biology National Academy of Sciences of Ukraine, 6-9 June 2017, Kyiv, Ukraine (*усна доповідь*).