

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

ЧОПЕЙ МАР'ЯНА ІГОРІВНА

УДК 577.323:576.08

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

03.00.02 – біофізика

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2018

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано на кафедрі загальної та медичної генетики Навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка МОН України.

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор
Сиволоб Андрій Володимирович,
ННЦ «Інститут біології та медицини»,
Київський національний університет
імені Тараса Шевченка,
професор кафедри загальної та медичної генетики

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
Білан Павло Володимирович,
Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України,
завідувач відділу молекулярної біофізики;

доктор біологічних наук, старший науковий співробітник
Телегєєв Геннадій Дмитрович,
Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
завідувач відділу молекулярної генетики.

Захист відбудеться «28» лютого 2018 року о 16⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.001.38 ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: 03127, м. Київ, просп. Академіка Глушкова, 2, ННЦ «Інститут біології та медицини», ауд. 434.

Поштова адреса: 01601, м. Київ, вул. Володимирська, 64/13, Київський національний університет імені Тараса Шевченка, ННЦ «Інститут біології та медицини», спеціалізована вчена рада 26.001.38.

З дисертацією можна ознайомитися у Науковій бібліотеці імені М. Максимовича Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: м. Київ, вул. Володимирська, 58, зал № 12.

Автореферат розісланий «26» січня 2018 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради Д 26.001.38,
доктор біологічних наук

К.О. Дворщенко

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

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 [Croft J. et al., 1999; Cremer M. et al., 2001; Cremer T. et al., 2006]; отримано нові дані відносно механізмів компактизації хроматину на вищих рівнях його організації та динамічного характеру взаємодії між білковими компонентами хроматину (замість статичного ядерного матриксу) [Razin S. et al., 2014]; визначено велику кількість білків та ділянок ДНК, що залучені в процесах регуляції транскрипційної активності клітини [Phillips J. et al., 2009; Bulger M. et al., 2011; van Bortle K. et al., 2012].

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 напряму пов'язано з важливими функціональними процесами, які там відбуваються (транскрипція та її регуляція, реплікація та репарація ДНК) [Kadauke S. et al., 2009; Cook P., 2010; Tang Z. et al., 2015]. 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 [Cook P., 2010; Kind J. et al., 2010; van Bortle K. et al., 2012; Dixon J. et al., 2012]. Враховуючи таку різноманітність механізмів формування петель ДНК, виділяють різні типи петельних доменів, що відрізняються між собою за розмірами, стабільністю та функціональним значенням [Vickmore W., 2013; Gibcus J. et al., 2013]. Більше того, кількість петельних доменів та сам факт їх появи залежать від типу клітин, їх транскрипційної активності чи стадії диференціації [Vassetzky Y. et al., 2000; Rao S. et al., 2014; Tang Z. et al., 2015]. Описано також велику кількість білків, що можуть брати участь у закріпленні основ петель хроматину, та специфічних ділянок ДНК, з якими вони взаємодіють [Kadauke S. et al., 2009; Cook P., 2010; Bulger M. et al., 2011; Rao S. et al., 2014].

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 кометному 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 кометного 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 кометного електрофорезу з використанням ізольованих клітинних ядер буде корисною для розширення спектру клітин, які можна досліджувати за допомогою кометного 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.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи досліджень

Виділення лімфоцитів та ізолювання ядер лімфоцитів. Лімфоцити виділяли з периферичної крові здорових донорів шляхом зонального центрифугування в градієнті щільності Histopaque-1077. Виділення ядер лімфоцитів проводили за рахунок високошвидкісного центрифугування в градієнті сахарози протягом 90 хвилин при 15000 об/хв та температурі 4°C. Чистоту отриманих ядер контролювали за допомогою вестерн-блот-аналізу.

Бласттрансформація лімфоцитів. Для отримання бласттрансформованих лімфоцитів проводили реакцію активації виділених клітин за допомогою рекомбінантного інтерлейкіну-2 людини. Клітини інкубували в присутності 1000 од/мл інтерлейкіну-2 протягом 24 або 44 години при температурі 37°C. Стадії клітинного циклу бласттрансформованих клітин визначали за допомогою проточної цитофлуориметрії.

Приготування препаратів та лізис клітин. Виділені лімфоцити, їх ядра чи бласттрансформовані лімфоцити змішували з 1%-ою легкоплавкою агарозою у співвідношенні 1:2. Отриману суміш рівномірно розподіляли по поверхні предметного скельця. Таким чином, отримували слайди – предметні скельця, на поверхні яких розташований шар легкоплавкої агарози з імобілізованими в ньому клітинами. Надалі проводили лізис клітин в присутності 2,5 М NaCl, 1% Triton X-100, рН 7,5 від 2 до 5 годин при температурі 4°C. В результаті такої процедури лізису отримували нуклеоїди – залишкові структури, що містять негативно надспіралізовані петельні домени ДНК, закріплені на білкових компонентах ядра, які є стійкими до дії детергенту та високих концентрацій солей.

Обробка нуклеоїдів інтеркаляторами та денатуруючими агентами. В деяких експериментах після лізису клітин слайди додатково обробляли розчинами формальдегіду (індуктор ковалентних зшивок), білкових денатурантів (сечовина або додецилсульфат натрію) або інтеркалятора (хлорокін). Денатурацію білків, які залишилися у нуклеоїдах після лізису, проводили в присутності різних концентрацій сечовини (1, 2, 4 та 8 М) або 0,3% додецилсульфату натрію протягом 30 хвилин при температурі 4°C. Для індукції ковалентних зшивок між ДНК та білками нуклеоїду препарати інкубували в 75 мкМ водного розчину формальдегіду протягом 10 хвилин при температурі 4°C. Для дослідження впливу інтеркаляторів на стабільність закріплення основ петель ДНК слайди інкубували 10 хвилин в присутності 1000 мкг·мл⁻¹ хлорокіну при температурі 4°C.

Гель-електрофорез ізольованих клітин (кометний електрофорез). Електрофорез проводили в буфері ТБЕ (89 мМ Tris-HCl, 89 мМ H₃BO₃, 2 мМ Na₂EDTA, рН 7,5) при температурі 4°C та напруженості електричного поля 1 В/см. Для дослідження кінетики виходу ДНК у хвіст комети (електрофоретичний трек, що формується за рахунок міграції ДНК під дією струму) скельця аналізували послідовно через кожні 10 хвилин електрофорезу. В деяких експериментах в буфер ТБЕ додавали інтеркалятор хлорокін у певних концентраціях. Для дослідження оборотності виходу ДНК після закінчення електрофорезу струм вимикали та витримували скельця в буфері ТБЕ протягом 90 хвилин, аналізуючи їх через різні проміжки часу. В окремих експериментах після 70 хвилин електрофорезу 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 електрофорезу.

Візуалізація та аналіз результатів. Для візуалізації слайди фарбували флуоресцентним барвником DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), фотографували за допомогою люмінесцентного мікроскопу Люмам РЗ, обладнаного фотокамерою Canon EOS 1000 D, та аналізували зображення за допомогою програмного забезпечення TriTek CometScore™. Визначали відносний вміст ДНК у хвості комети

і довжину хвоста. 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).

Аналіз кінетичних графіків та статистична обробка даних. Кожна точка на кінетичних графіках є результатом 5–10 незалежних експериментів, в кожному з яких аналізувалось по 100–200 нуклеоїдів (на графіках представлено середні значення і стандартні відхилення). Отримані в експериментах дані було проаналізовано методами варіаційної статистики (проводили тест на нормальність розподілу Шапіро-Уїлка). За умови нормального розподілу даних їх оцінювали за критерієм Стюдента (статистично значущими вважалися відмінності при $p < 0,05$).

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

$$F = A_1 F_1 + A_2 F_2, \quad (1)$$

де A_1 та A_2 – максимальні значення двох внесків (у деяких випадках $A_2 = 0$). Внесок F_1 описується стандартним рівнянням мономолекулярної кінетики:

$$F_1 = 1 - \exp(-t/\tau), \quad (2)$$

де τ – характеристичний час. Внесок F_2 задовольняє рівнянню Больцмана для сигмоїдальної функції:

$$F_2 = 1/[1 + \exp(k_2(t_0 - t))], \quad (3)$$

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

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

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Механізми виходу двох типів петельних доменів ДНК, що мігрують при кометному електрофорезі. *Кооперативність процесу формування електрофоретичного треку.* Кінетична крива виходу ДНК з нуклеоїдів, отриманих з лімфоцитів людини, мала двоступеневий характер (рис. 1): близько 7% ДНК мігрувала в хвіст комети вже на ранніх етапах електрофорезу, тоді як вихід більшої частини ДНК (приблизно 14%), відбувається при більш тривалому електрофорезі. Як було показано раніше [Afanasiyeva K. et al., 2010] і підтверджено в наших дослідженнях, перша частина ДНК представлена петельними доменами (ймовірно, релаксованими) міграція яких не залежить від рівня надспіралізації. Друга частина являє собою негативно надспіралізовані петлі ДНК, міграція яких полегшується при зниженні рівня надспіралізації (зокрема, за рахунок зв'язування інтеркаляторів у певних концентраціях). При цьому друга "сходінка" на рис. 1 має S-подібну форму, що свідчить про кооперативність процесу.

При витягуванні надспіралізованих петель в них повинна виникати еластична напруга, пов'язана з переходом надспіралізації у торсійну деформацію подвійної спіралі. Було встановлено, що при вимкненні струму після закінчення електрофорезу надспіралізовані петлі ДНК під дією еластичних сил дійсно мають

здатність до зворотного руху (рис. 1). Якщо після такої інкубації знову провести електрофорез, то петельні домени виходять досить швидко у хвіст комети (не спостерігається затримки виходу ДНК, як це відбувається при проведенні електрофорезу перший раз) (рис. 1).

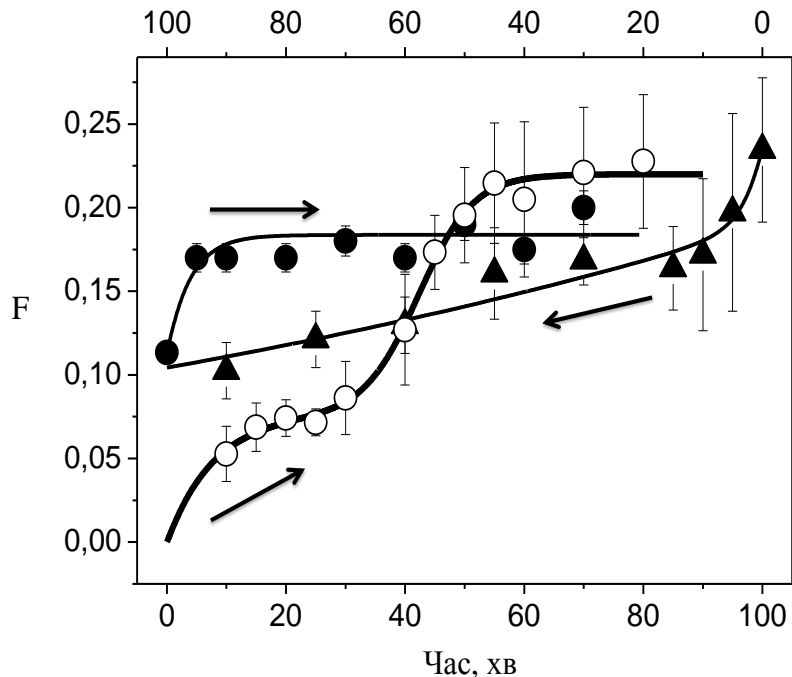


Рис. 1. Частка ДНК в хвостах комет (F) як функція часу електрофорезу (нижня абсциса) чи витримки в електрофоретичному буфері після вимкнення струму (верхня абсциса). Напрямок руху ДНК показано стрілками біля кривих: первинний електрофорез (\circ), зворотний рух після вимкнення струму (\blacktriangle), повторний електрофорез (\bullet). Тут і на всіх рисунках нижче суцільні криві – результат підгонки під відповідні теоретичні моделі, наведені похибки – стандартні відхилення; кожна точка на графіку – середнє значення 5-10 незалежних експериментів, для кожного з яких обраховували 100-200 випадково обраних клітин.

Така гістерезисна поведінка може бути пояснена тим, що при зворотному русі петлі не проникають всередину голови нуклеоїду, де концентрація ДНК дуже висока, а залишаються на її периферії. Отримані результати свідчать, що уповільнення виходу ДНК при первинному електрофорезі може бути пов'язано з необхідністю подолання певного бар'єру – тертя, зумовленого високою концентрацією ДНК всередині нуклеоїду. 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).

У найпростішій формі рівняння швидкості виходу для таких петельних доменів, міграція яких залежить від концентрації ДНК, може бути записано наступним чином:

$$\frac{dF_2}{dt} = \frac{k_2}{A_2} (A_2 - F_2) F_2, \quad (4)$$

де F_2 – частка ДНК у хвостах комет, що відповідає внутрішнім петельним доменам, k_2 – константа швидкості, A_2 – максимальна частка ДНК, що може виходити на другому етапі електрофорезу. Вирішенням даної залежності є рівняння Больцмана

(рівняння 3). Дане рівняння дуже точно описує отримані нами дані стосовно кінетики виходу надспіралізованих петель ДНК при кометному електрофорезі, тож можна зробити висновок, що кооперативність процесу їхнього виходу дійсно пов'язана із поступовим зниженням їх кількості (концентрації ДНК всередині голови нуклеоїду) протягом електрофорезу.

Кінетика виходу ДНК із нуклеоїдів, отриманих з ізольованих клітинних ядер. Для підтвердження описаного вище механізму кооперативності міграції петельних доменів, розташованих всередині нуклеоїду, було проведено кометний електрофорез із використанням ізольованих ядер лімфоцитів. Вигляд комет для обох типів нуклеоїдів практично не відрізнявся, однак були виявлені суттєві відмінності у кінетичних кривих, що описують вихід петель ДНК в хвіст комети при електрофорезі для двох типів нуклеоїдів: при використанні ядер лімфоцитів було виявлено втрату двоступеневості виходу ДНК (рис. 2).

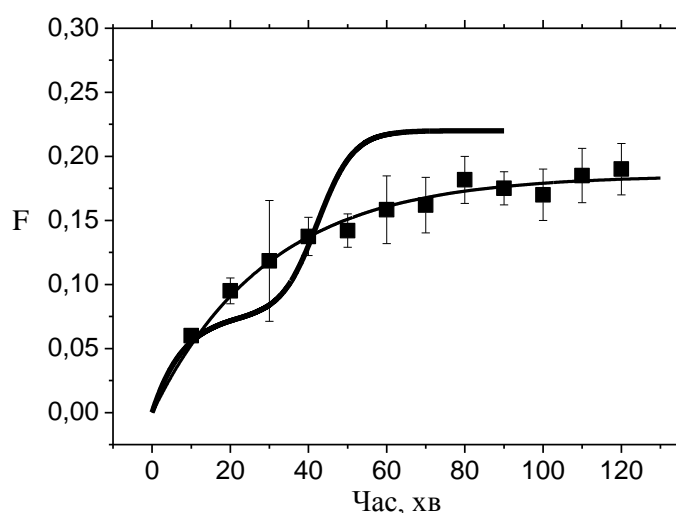


Рис. 2. Кінетика виходу ДНК при кометному електрофорезі нуклеоїдів, отриманих з ізольованих ядер лімфоцитів (■). F – частка ДНК в хвості комети. Товста суцільна лінія – кінетична крива для нуклеоїдів, отриманих з інтактних лімфоцитів, з рис. 1.

Така різниця може бути пояснена відмінностями внутрішнього середовища нуклеоїдів при використанні клітин та ядер лімфоцитів. При використанні ізольованих ядер всередині нуклеоїдів 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. На противагу цьому, при використанні клітин агароза застигає навколо плазматичної мембрани, і після лізису у внутрішньому середовищі міститься лише ДНК.

Отже, було показано, що кооперативність процесу міграції внутрішніх петель нуклеоїду визначається залежністю швидкості їх міграції від концентрації ДНК всередині нуклеоїду: зниження концентрації у процесі електрофорезу пришвидшує їх рух.

Механізми фіксації основ петельних доменів ДНК. У жодному з описаних вище експериментів, незалежно від швидкості міграції петельних доменів, максимальний вихід ДНК у хвості комет (рівень насичення) не перевищував 25%. Тобто, велика кількість петельних доменів не може мігрувати через пори агарозного гелю при кометному електрофорезі через занадто великі розміри цих петель. Отже, при руйнуванні відносно коротких петель повинна зростати кількість довгих

(знижуватись частка ДНК, що здатна мігрувати при електрофорезі), що дає можливість дослідження особливостей та стабільності взаємодій, які забезпечують закріплення основ петельних доменів ДНК.

Вплив денатуруючих агентів на рівень виходу ДНК при кометному електрофорезі. Для дослідження механізмів фіксації основ петельних доменів було проведено ряд експериментів з використанням неспецифічних денатуруючих агентів білків (сечовина, додецилсульфат натрію). Було виявлено, що при проведенні кометного електрофорезу після обробки нуклеоїдів у розчинах з 0,3% додецилсульфату натрію чи 8 М сечовини максимальний вихід ДНК становив приблизно 12%, що майже вдвічі нижче, ніж в контрольних експериментах. При цьому було встановлено, що при обробці нуклеоїдів у розчині з 4 М сечовини рівень насичення був не більше 14%, а при витримці їх з 2 М денатуранту – приблизно 16% (рис. 3).

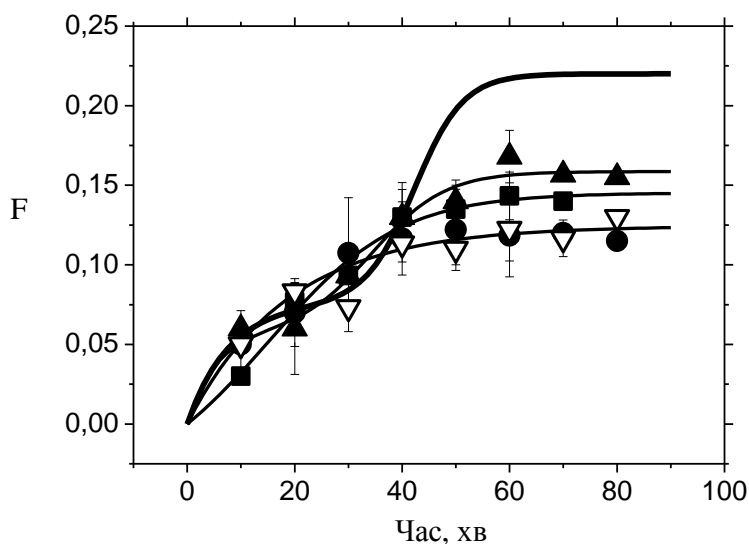


Рис. 3. Кінетика виходу ДНК при кометному електрофорезі після обробки нуклеоїдів 0,3% додецилсульфату натрію (▽), а також 2 М (▲), 4 М (■) та 8 М (●) сечовини. F – частка ДНК в хвості комети. Товста суцільна лінія – кінетична крива за відсутності попередньої обробки денатурантами.

Зниження рівня насичення при обробці нуклеоїдів денатурантами можна пояснити зростанням частки петель ДНК, що не можуть мігрувати в пори агарози при електрофорезі: відбувається руйнування білків, які забезпечують фіксацію основ петельних доменів, внаслідок чого з декількох невеликих петель ДНК, розташованих поряд, буде формуватися один великий домен, що втрачає здатність до міграції при кометному електрофорезі. При концентрації сечовини 8 М руйнується значна частка основ петельних доменів. Але цікаво, що менші концентрації (2 і 4 М), недостатні для повної денатурації білків, забезпечують приблизно 60 і 80% максимального ефекту. Це означає, що фіксація основ петель залежить від певних білок-білкових взаємодій, що можуть бути зруйновані при не надто високих концентраціях денатуранту.

Вплив інтеркалятора хлорокіну на рівень виходу ДНК при кометному електрофорезі. Подібне зниження максимального виходу ДНК спостерігали також і при проведенні кометного електрофорезу в присутності високих концентрацій інтеркалятора хлорокіну. Так, при додаванні 1000 мкг·мл⁻¹ хлорокіну максимальний вихід ДНК становив приблизно 8% порівняно з контролем, де рівень насичення

сягає майже 22%. Для $500 \text{ мкг}\cdot\text{мл}^{-1}$ інтеркалятора максимальний вихід ДНК був приблизно 15%, а для $250 \text{ мкг}\cdot\text{мл}^{-1}$ – 16% (рис. 4).

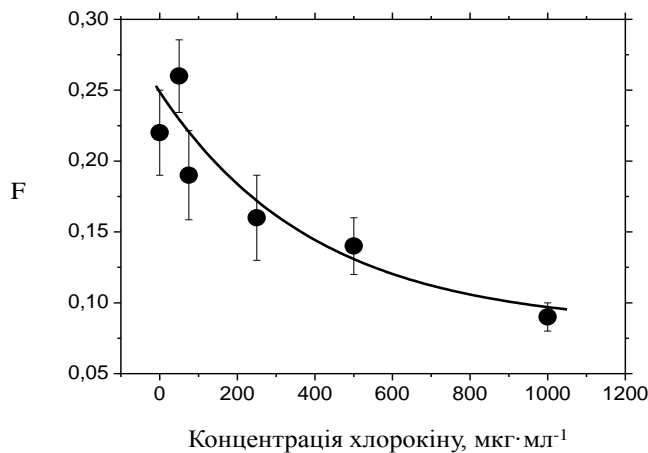


Рис. 4. Максимальна частка ДНК у хвостах комет (F) як функція концентрації хлорокіну.

Причиною зниження 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 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. Очевидно, що ймовірність вбудовування інтеркалятора саме в такі сайти зростає при збільшенні його концентрації. 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.

Кінетика виходу ДНК після попередньої обробки нуклеїдів хлорокіном. Було встановлено, що в експериментах, коли препарати нуклеїдів попередньо витримували в розчині з $1000 \text{ мкг}\cdot\text{мл}^{-1}$ хлорокіну, після чого проводили електрофорез без додавання інтеркалятора, 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. 5).

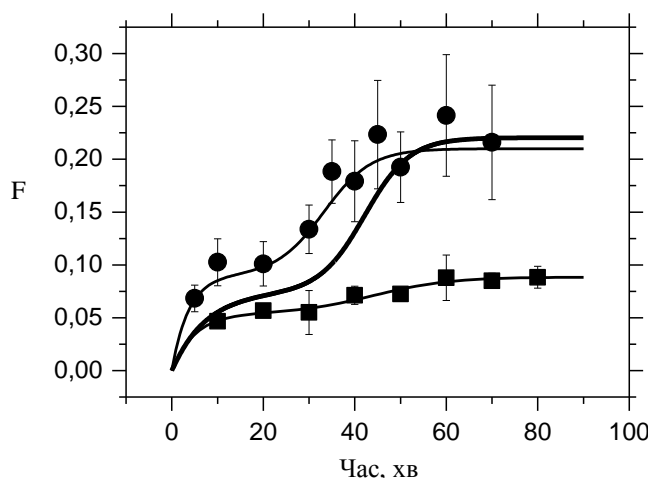


Рис. 5. Кінетика виходу ДНК при кометному електрофорезі в присутності $1000 \text{ мкг}\cdot\text{мл}^{-1}$ хлорокіну (■) або після попередньої обробки нуклеїдів $1000 \text{ мкг}\cdot\text{мл}^{-1}$ хлорокіну (●). F – частка ДНК в хвості комети. Товста суцільна лінія – кінетична крива з рис. 1 за відсутності дії хлорокіну.

Тобто, після припинення впливу хлорокіну можливе практично повне відновлення усіх зв'язків між ДНК та білками, що стабілізують петельні домени.

Прикладом таких зв'язків можуть бути взаємодії типу «ДНК-СТСФ-когезин», коли білок СТСФ (СССТС-зв'язуючий фактор) 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 [Sanborn A. et al., 2015]. Внаслідок локального розкручування подвійної спіралі при вбудовуванні інтеркалятора відбувається порушення зв'язків між ДНК і білком СТСФ, але не між СТСФ та когезином. Тому після припинення впливу інтеркалятора досить легко відновлюється зв'язок між білком СТСФ та його специфічним сайтом зв'язування на ДНК, а відповідно, відновлюється і петельний домен, який стабілізується за рахунок такої взаємодії. Аналогічний ефект повинен мати місце і після лізису клітин у присутності високої концентрації солі: при дії 2,5 М NaCl будуть руйнуватися взаємодії СТСФ з ДНК, але не з когезином, який залишається на ДНК за таких умов [Onn I. et al., 2011].

Таким чином, було встановлено, що фіксація основ петель ДНК, які містяться в нуклеоді, залежить від двох типів взаємодій: білок-білкових і ДНК-білкових. Такі взаємодії можуть бути зруйновані при обробці нуклеодів денатуруючими агентами білків або за умов постійного впливу високої концентрації інтеркалятора протягом електрофорезу. Однак, за умов тимчасової дії інтеркалятора відбувається наступне відновлення таких взаємодій. 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 нуклеоді, відповідають петельним доменам хроматину.

Вплив ковалентних зшивок за допомогою формальдегіду на кінетику виходу ДНК. Для підтвердження описаних вище результатів ми провели кометний електрофорез після попередньої обробки нуклеодів 75 мкМ розчином формальдегіду. Незважаючи на певні відмінності, за відсутності хлорокіну обробка формальдегідом суттєво не впливає на кінетику виходу петель ДНК у хвіст комети (рис. 6).

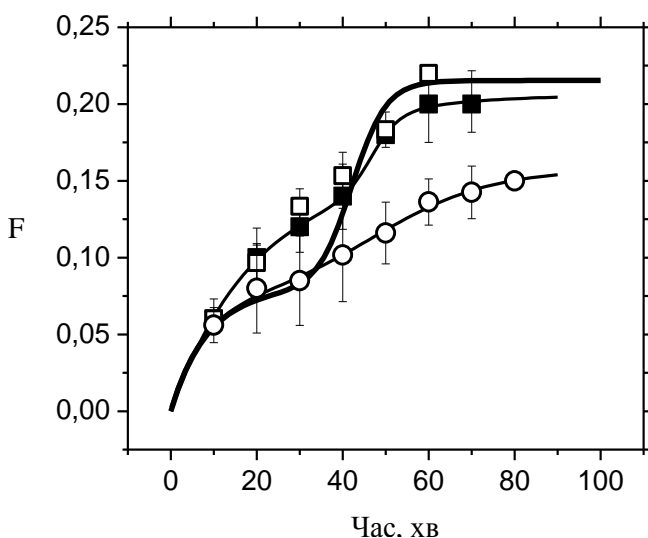


Рис. 6. Кінетика виходу ДНК при кометному електрофорезі після попередньої обробки нуклеодів 75 мкМ формальдегіду за відсутності (■) та в присутності 500 мкг·мл⁻¹ хлорокіну (□) протягом електрофорезу. Для порівняння наведені кінетичні криві за відсутності (товста суцільна лінія) та в присутності 500 мкг·мл⁻¹ хлорокіну (○) без обробки формальдегідом. F – частка ДНК в хвості комети.

Однак, у присутності 500 мкг·мл⁻¹ хлорокіну вплив формальдегіду стає суттєвим. Як було зазначено раніше, при додаванні 500 мкг·мл⁻¹ хлорокіну в буфер при електрофорезі відбувається зниження рівня насичення виходу ДНК приблизно

до 15%, тоді як в контролі це значення сягає близько 22%. Проте, при обробці нуклеоїдів розчином формальдегіду та подальшим проведенням електрофорезу в присутності $500 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$ інтеркалятора не спостерігається зниження максимального виходу ДНК: рівень насичення становить приблизно 19%, а кінетична крива загалом нагадує кінетику виходу ДНК після обробки нуклеоїдів формальдегідом, але за відсутності хлорокіну (рис. 6).

Таким чином, індукція ковалентних зшивок між ДНК та білками в місцях фіксації основ петельних доменів забезпечує їх надійну стабілізацію та нечутливість до впливу інтеркалятора. Тому при вбудовуванні молекул хлорокіну між парами азотистих основ локальне розкручування подвійної спіралі ДНК не буде супроводжуватися порушенням взаємодій між ДНК та білками, а отже, не відбувається збільшення розмірів петельних доменів, а відповідно, практично не змінюється частка петельних доменів, що можуть мігрувати в пори агарозного гелю при електрофорезі.

Кінетика виходу ДНК із нуклеоїдів, отриманих з бласттрансформованих лімфоцитів. Лімфоцити людини, які використовували у всіх вищеописаних експериментах, знаходяться на стадії G_0 клітинного циклу та характеризуються дуже низьким рівнем транскрипції [Darzykiewicz Z. et al., 1982]. Ми провели реакцію бласттрансформації за допомогою рекомбінантного інтерлейкіну-2 людини протягом 24 і 44 годин. За даними цитофлуориметрії, після 24 годин більшість клітин (приблизно 75%) знаходиться на стадіях G_0/G_1 клітинного циклу; за даними літератури – відбувається перехід багатьох клітин на стадію G_1 із суттєвою активацією загального рівня транскрипції [Mookerjee B. et al., 1990], за даними цитологічного аналізу – рівень такого переходу становить в середньому 45%. Після 44 годин бласттрансформації з інтерлейкіном-2, за даними цитофлуориметрії, близько 55% клітин переходить на стадію G_2 .

Було виявлено, що при кометному електрофорезі кінетична крива виходу ДНК для бласттрансформованих лімфоцитів на стадії G_1 (після 24 годин активації інтерлейкіном-2) має двоступеневий характер, однак, спостерігаються певні відмінності у порівнянні з кінетичною кривою лімфоцитів на стадії G_0 . Так, нижнє плато кривої досягається 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. Окрім цього, на даному етапі в хвіст комети виходить лише близько 8% ДНК, в той час як у випадку лімфоцитів на стадії G_0 це значення становило приблизно 14%. Таким чином, внески нижнього та верхнього плато у формування кінетичної кривої є взаємно зміненими для цих двох типів клітин, в той час як загальний вихід ДНК (рівень насичення) практично не відрізняється і становить близько 22% (рис. 7, таблиця 1).

Представлені результати свідчать на користь того, що ступінь кооперативності виходу петель ДНК при електрофорезі нуклеоїдів, отриманих з бласттрансформованих лімфоцитів, стає помітно нижчим. Це пов'язано з тим, що вихідна концентрація ДНК в нуклеоїдах, отриманих з активованих клітин, є значно нижчою порівняно з лімфоцитами на стадії G_0 : об'єм ядра бласттрансформованих клітин майже вдвічі більший, ніж у лімфоцитів, а кількість ДНК на даному етапі їх

активації є такою ж (на 24-й годині інкубації 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.

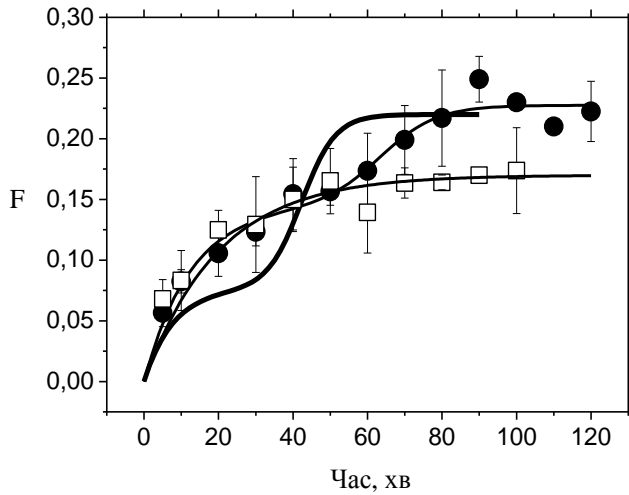


Рис. 7. Кінетика виходу ДНК при кометному електрофорезі нуклеоїдів, отриманих з бласттрансформованих лімфоцитів після 24 годин (●) або 44 годин бласттрансформації (□). F – частка ДНК в хвості комети. Товста суцільна лінія – кінетична крива для нуклеоїдів, отриманих з лімфоцитів на стадії G₀.

Отримані дані вказують, що при трансформації лімфоцитів за допомогою інтерлейкіну-2 відбувається реорганізація петельних доменів ДНК. При цьому у бласттрансформованих клітинах значно зростає кількість поверхневих петельних доменів (практично в 2 рази, порівняно з лімфоцитами), що виходять на ранніх етапах електрофорезу, і зменшується кількість внутрішніх петель, які мігрують в хвіст комети набагато пізніше.

Таблиця 1

Кінетичні параметри для інтактних та бласттрансформованих лімфоцитів

Кінетичні параметри	Інтактні лімфоцити	Бласттрансформовані лімфоцити
A_1	$0,07 \pm 0,01$	$0,14 \pm 0,01$
τ_1 , хв	$7,8 \pm 2,9$	$12,5 \pm 3,9$
A_2	$0,14 \pm 0,01$	$0,08 \pm 0,01$
k_2 , хв ⁻¹	$0,22 \pm 0,08$	$0,13 \pm 0,08$
t_0 , хв	$42,5 \pm 1,0$	$63,5 \pm 5,0$

A_1 , A_2 – максимальні частки ДНК у хвостах комет для першого та другого етапу електрофорезу відповідно, τ_1 – характеристичний час для першого етапу електрофорезу, k_2 – константа швидкості для другого етапу електрофорезу, t_0 – час напівпереходу для другого етапу електрофорезу.

Після активації лімфоцитів за допомогою інтерлейкіну-2 протягом 44 годин більшість лімфоцитів переходять на стадію G₂ клітинного циклу, тобто кількість ДНК у них стає вдвічі більшою. Однак, незважаючи на таку суттєву відмінність, частка поверхневих петельних доменів, що мігрують на ранніх етапах електрофорезу, була практично такою ж, як і для клітин після 24 годин активації.

Проте, було виявлено істотне зниження кількості внутрішніх петель ДНК, що можуть виходити в хвіст комети при електрофорезі: практично, друга "сходінка" кінетичної кривої просто зникає (рис. 7).

Такі результати свідчать на користь того, що при переході клітин на стадію G_2 клітинного циклу відбувається ще одна суттєва реорганізація внутрішніх петельних доменів ДНК (ймовірно, пов'язана з початком компактизації 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

Таким чином, було здійснено порівняння міграції петельних доменів ДНК для трьох типів нуклеодів, 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 кінетичного варіанту методу кометного електрофорезу для дискримінації між клітинами з різною транскрипційною активністю або на різних стадіях клітинного циклу.

Розподіл петельних доменів ДНК за розміром. Для всіх досліджених типів нуклеодів було також проаналізовано кінетику змін довжини хвоста комети - параметру, що дозволяє приблизно оцінити розмір найдовших петель ДНК у складі хвоста. Було встановлено, що у випадку лімфоцитів на стадії G_0 залежність довжини хвоста комети від тривалості електрофорезу, як і залежність частки ДНК у хвостах комет від часу електрофорезу, має двоступеневий характер: на ранніх хвилинах електрофорезу хвіст комети формується петлями розміром до 25 тисяч пар нуклеотидів (нижнє плато кривої), а на пізніх хвилинах стає можливим вихід більш довгих петельних доменів, контурна довжина яких становить близько 130 т.п.н. (верхнє плато) Тобто, швидкість виходу різноманітних петель залежить не лише від їх розташування в межах нуклеоїду та рівня надспіралізації, але й також від їх контурних розмірів (рис. 8).

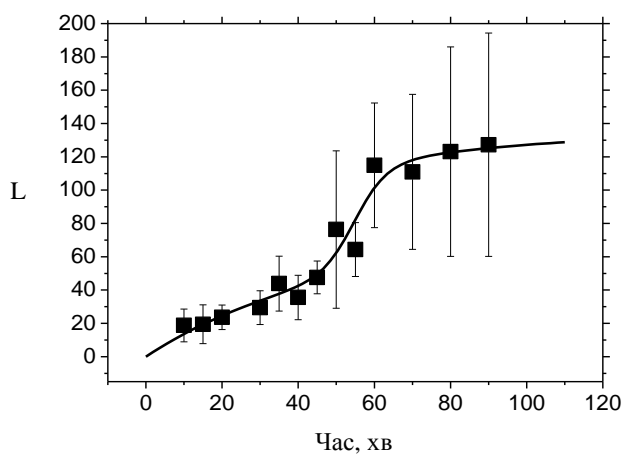


Рис. 8. Залежність середньої контурної довжини найдовших петельних доменів у хвостах комет від тривалості електрофорезу для нуклеодів, отриманих з лімфоцитів людини на стадії G_0 . L – контурна довжина петельних доменів, виражена в тисячах пар нуклеотидів.

Контурні розміри петель ДНК при кометному електрофорезі нуклеодів, отриманих з ізолюваних ядер лімфоцитів. У досліджах, в яких використовували ядра лімфоцитів для приготування нуклеодів, було виявлено збільшення розмірів

найдовших петель ДНК, що виходять у хвіст комети на різних етапах електрофорезу. Так, на ранніх хвилинах спостерігали міграцію петельних доменів розміром 50-70 тисяч пар нуклеотидів, тоді як у випадку клітин на даному етапі електрофорезу мігрують петлі розміром до 25 т.п.н.. Подібна тенденція зберігається і надалі при проведенні електрофорезу. Такі відмінності, очевидно, пов'язані з особливостями внутрішнього середовища нуклеоїду та його мікрооточення (більша однорідність середовища всередині та зовні у випадку нуклеоїдів, отриманих із ядер, сприяє полегшенню міграції великих петельних доменів при кометному електрофорезі).

Контурні розміри петель ДНК при кометному електрофорезі нуклеоїдів, отриманих з бласттрансформованих лімфоцитів. Було виявлено, що при бласттрансформації клітин протягом 24 годин максимальні розміри петельних доменів ДНК, що можуть формувати хвіст комети на пізніх етапах електрофорезу, 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 (ймовірно, пов'язано із збільшенням частки поверхневих петельних доменів (в тому числі, і відносно великих розмірів), які набагато легше мігрують при електрофорезі, ніж внутрішні петлі ДНК).

У випадку бласттрансформованих лімфоцитів після 44 годин активації були отримані подібні результати, як і після 24 годин культивування, тоді як рівень насичення для них був набагато нижчим). Такі дані свідчать про реорганізацію петельних доменів ДНК протягом клітинного циклу: при переході клітин на стадію G_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).

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. У наших експериментах було виявлено майже лінійну кореляцію між зміною цих параметрів (рис. 9).

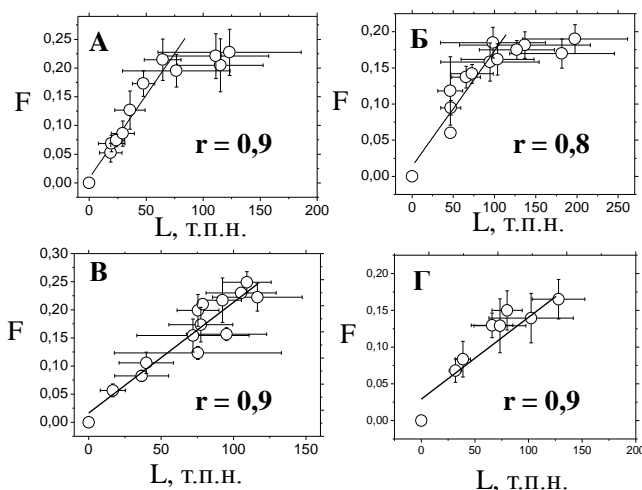


Рис. 9. Кореляційна залежність між відносним вмістом ДНК у хвостах комет (F) та контурною довжиною найдовших петель у хвості (L), вираженою в тисячах пар нуклеотидів, при кометному електрофорезі нуклеоїдів, отриманих з лімфоцитів на стадії G_0 (А), їх ізольованих ядер (Б), бласттрансформованих лімфоцитів після 24 годин активації (В) чи 44 годин активації (Г). r – коефіцієнт кореляції.

Частка ДНК у хвості комети (F) у даний момент часу електрофорезу може бути записана як:

$$F \propto \int_0^{s_m} s p_s ds, \quad (5)$$

де s – це контурна довжина петельного домену, p_s – частка петель такого розміру, 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 (загальна частка ДНК, що відповідає коротким петельним доменам, дорівнює частці ДНК довгих петель). Отже, частка ДНК повинна бути прямо пропорційна розміру найдовших петельних доменів, які присутні у хвості комети на певному етапі електрофорезу. З рівняння 5 очевидно, що найпростішим способом для досягнення прямої пропорційності між параметрами F та s_m є припущення, що частка петель ДНК певного розміру обернено пропорційна контурному розміру такого петельного домену ($p_s \sim s^{-1}$).

Можна припустити, що петлі виникають внаслідок випадкових контактів між різними локусами і фіксуються, якщо в таких локусах знаходяться відповідні білки. А вищезазначена залежність ймовірності контактів між двома локусами від відстані між цими локусами ($p_s \sim s^{-1}$) 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, а також відсутність вузлів [Mirny L., 2011]. Існування хроматину у стані фрактальної глобули було показано раніше для масштабів контурної довжини вище 1 мільйона пар нуклеотидів [Lieberman-Aiden E. et al., 2009]. Отримані нами результати для різних типів нуклеоїдів (лімфоцити, їх ізольовані ядра чи бласттрансформовані лімфоцити на стадіях G_1 та G_2 клітинного циклу) дозволили вперше підтвердити існування хроматину в стані фрактальної глобули у масштабах декількох десятків тисяч пар нуклеотидів (від 20 до 100 т.п.н.).

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.

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у наукових фахових виданнях:

1. Chopei M. DNA loop domain organization as revealed by single-cell gel electrophoresis / Afanasieva K., Chopei M., Zazhytska M., Vikhрева M., Sivolob A. // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2013. – Vol. 1833, №12. – P. 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. Интеркаляция белков в ДНК как один из основных способов фиксации наиболее стабильных петельных доменов хроматина / Чопей М.И., Афанасьева К.С., Сиволоб А.В. // The Ukrainian Biochemical Journal. – 2014. – Т. 86, №4. – С.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. Чопей М. Свідчення існування хроматину в стані фрактальної глобули за даними кометного електрофорезу / Афанасьєва К., Чопей М., Сиволоб А. // Вісник Львівського університету. Серія біологічна. – 2014. – Т. 68. – С.181-189. *(Особистий внесок здобувача: проведення експериментальних досліджень і аналіз отриманих результатів, участь в обговоренні результатів та підготовці статті до друку)*.
 4. Chopei M. Single nucleus versus single-cell gel electrophoresis: Kinetics of DNA track formation / Afanasieva K., Chopei M., Sivolob A. // Electrophoresis. – 2015. – Vol. 36, №7-8. – P.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. Chopei M. Chromatin in fractal globule state: evidence from comet assay / Afanasieva K. S., Chopei M., Sivolob A. V. // Biopolymers and Cell. – 2015. – Vol. 31, №2. – P.97-103. **(Scopus)**. *(Особистий внесок здобувача: дослідження кінетики зміни довжини електрофоретичного треку при кометному електрофорезі, участь в обговоренні результатів)*.
 6. Chopei M. Redistribution of DNA loop domains in human lymphocytes under blast transformation with interleukin 2 / Afanasieva K. S., Chopei M. I., Lozovik A. V., Rushkovsky S. R., Sivolob A. V. // The Ukrainian Biochemical Journal. – 2016. – Vol. 88, №6.– P.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. Вплив ДНК-інтеркаляторів на стабільність петельних доменів ДНК / Чопей М., Олефіренко В., Афанасьєва К., Сиволоб А. // Вісник Львівського університету. Серія біологічна. – 2016. – Т. 74. – С.12-19. *(Особистий внесок здобувача: проведення експериментальних досліджень і аналіз отриманих результатів, участь в обговоренні результатів та підготовці статті до друку)*.

Тези наукових доповідей:

8. Чопей М. Кінетика виходу ДНК при кометному електрофорезі інтактних та бласттрансформованих лімфоцитів людини / Чопей М. І., Зажицька М. О.,

- Афанасьєва К. С. // X Всеукраїнська наукова конференція студентів та молодих науковців «Біологічні дослідження молодих вчених в Україні», 28-29 жовтня 2010 року: матер. конфер. – Київ, Україна, 2010. – С. 92-93. *(Особистий внесок здобувача: проведення експериментальних досліджень, підготовка тез до друку).*
9. Чопей М. Зміна рівня надспіралізації петельних доменів ДНК в інтактних клітинах під впливом інтеркалятора / Чопей М., Вихрєва М., Сідляк Г., Афанасьєва К. // 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: матер. конфер. – Львів, Україна, 2013. – С. 28-29. *(Особистий внесок здобувача: проведення експериментальних досліджень, підготовка тез до друку).*
 10. Чопей М. Ефективність виходу ДНК під час кометного електрофорезу при індукції ковалентних зшивок ДНК-білок у присутності високих концентрацій інтеркалятора / Вихрєва М., Чопей М., Сидорук О., Зажицька М. // 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: матер. конфер. – Львів, Україна, 2013. – С. 366-367. *(Особистий внесок здобувача: проведення експериментальних досліджень, підготовка тез до друку).*
 11. Chopei M. Comet assay as a tool to investigate topology of DNA loops in intact cells / Afanasieva K., Zazhytska M., Chopei M., Sivolob A. // 38th FEBS congress «Mechanisms in biology», July 6th-11th, 2013. – St. Petersburg, Russia. – 2013. – Vol. 280 (Suppl. 1). – P. 13-14. *(Особистий внесок здобувача: проведення експериментальних досліджень, підготовка тез до друку).*
 12. Чопей М. Вплив інтеркаляторів і денатуруючих агентів білків на організацію петельних доменів ДНК / Чопей М., Лозовик О., Афанасьєва К. // X Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології», 8-11 квітня 2014 року: матер. конфер. – Львів, Україна, 2014. – С. 220-221. *(Особистий внесок здобувача: проведення експериментальних досліджень, підготовка тез до друку).*
 13. Чопей М. Організація петельних доменів хроматину за даними кометного електрофорезу / Сиволоб А. В., Афанасьєва К. С., Чопей М. І. // XI Український біохімічний конгрес, 6-10 жовтня 2014 року. – Київ, Україна. – Український біохімічний журнал. – 2014. – Т.86, №5(1). – С. 36. *(Особистий внесок здобувача: проведення експериментальних досліджень, підготовка тез до друку).*
 14. Chopei M. The fractal globule model of interphase chromatin organization as revealed by comet assay / Chopei M., Semenova A., Politenkova S., Afanasieva K. // XI International scientific conference for students and PhD students «Youth and progress of biology», 20-23 April, 2015: abstracts of the conference. – Lviv, Ukraine, 2015. – P. 11. *(Особистий внесок здобувача: проведення експериментальних досліджень, підготовка тез до друку).*

15. Чопей М. Хроматин у стані фрактальної глобули: підтвердження за допомогою кометного електрофорезу / Афанасьєва К. С., Чопей М. І., Сиволоб А. В. // VI з'їзд Українського біофізичного товариства, 28-30 травня 2015 року: матеріали з'їзду. – Луцьк-Світязь, Україна, 2015. – С. 38. *(Особистий внесок здобувача: проведення експериментальних досліджень, підготовка тез до друку).*
16. Чопей М. Вплив високих концентрацій інтеркалятора хлорокіну на стабільність петельних доменів хроматину / Шкель О.В., Чопей М.І., Афанасьєва К.С. // XIV Міжнародна наукова конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «Шевченківська весна 2016: біологічні науки», 6-8 квітня 2016 року: матер. конфер. – Київ, Україна, 2016. – С. 214-216. *(Особистий внесок здобувача: проведення експериментальних досліджень, підготовка тез до друку).*
17. Chopei M. DNA loop domain organization in lymphocytes and lymphoblasts as revealed by comet assay / Lozovik A., Chopei M., Olefirenko V., Afanasieva K. // XII International scientific conference for students and PhD students «Youth and progress of biology», 19-21 April, 2016: abstracts of the conference. – Lviv, Ukraine, 2016. – P. 18. *(Особистий внесок здобувача: проведення експериментальних досліджень, підготовка тез до друку).*
18. Chopei M. Organization of interphase chromatin in different cell types / Chopei M., Afanasieva K. // Conference of young scientists «Urgent problems of biochemistry and biotechnology – 2016», 26-27 May 2016. – Kyiv, Ukraine. – The Ukrainian Biochemical Journal. – 2016. – Vol. 88, №4. – P. 124. *(Особистий внесок здобувача: проведення експериментальних досліджень, підготовка тез до друку).*
19. Chopei M. Redistribution of DNA loop domains during transcription activation and malignant transformation as revealed by comet assay / Chopei M., Olefirenko V., Afanasieva K. // 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. – The Ukrainian Biochemical Journal – 2017. – Vol. 89, №3. – P. 113. *(Особистий внесок здобувача: проведення експериментальних досліджень, підготовка тез до друку).*

АНОТАЦІЯ

Чопей М.І. Організація петельних доменів ДНК у нуклеоїдах інтактних і бласттрансформованих лімфоцитів. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика. – Київський національний університет імені Тараса Шевченка МОН України, Київ, 2018.

Дисертація присвячена дослідженню організації петельних доменів ДНК у клітинах з різною транскрипційною активністю. Проведено порівняння кінетик міграції петельних доменів ДНК при кометному електрофорезі із нуклеоїдів,

отриманих з інтактних лімфоцитів людини, їх ізольованих ядер та бласттрансформованих лімфоцитів. Було виявлено три категорії петельних доменів: відносно короткі (до 50 тисяч пар нуклеотидів) поверхневі петельні домени, які мігрують 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 при електрофорезі. Встановлено, що кооперативність міграції петельних доменів пов'язана із зниженням концентрації ДНК всередині нуклеоїду під час електрофорезу. Було виявлено, що основна частина петельних доменів хроматину залишається в нуклеоїді після лізису клітини. Показано, що у бласттрансформованих лімфоцитах на стадіях G_1 та G_2 клітинного циклу відбувається перерозподіл різних категорій петельних доменів, у порівнянні з лімфоцитами на стадії G_0 . Це відкриває перспективу застосування кінетичного варіанту кометного електрофорезу для досліджень змін петельної організації хроматину при функціональних змінах у клітинах. Для всіх типів клітин вперше було підтверджено 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.

АННОТАЦІЯ

Чопей М.И. Организация петельных доменов ДНК в нуклеоидах интактных и бласттрансформированных лимфоцитов. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.02 – биофизика. – Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко МОН Украины, Киев, 2018.

Диссертация посвящена исследованию организации петельных доменов ДНК в клетках с разной транскрипционной активностью. Проведено сравнение кинетик миграции петельных доменов ДНК при кометном электрофорезе нуклеоидов, полученных из интактных лимфоцитов человека, их изолированных ядер и бласттрансформированных лимфоцитов. Было выявлено три категории петельных доменов: относительно короткие (до 50 тысяч пар нуклеотидов) поверхностные петельные домены, которые мигрируют на ранних этапах электрофореза; внутренние петельные домены размером до 200 тысяч пар нуклеотидов, миграция которых происходит кооперативно; и большие петельные домены (больше 200 тысяч пар нуклеотидов), которые неспособны мигрировать при электрофорезе. Установлено, что кооперативность миграции петельных доменов связана со снижением концентрации ДНК внутри нуклеоида во время электрофореза. Было выявлено, что большинство петельных доменов хроматина остается в нуклеоиде после лизиса клетки. Показано, что в бласттрансформированных лимфоцитах на стадиях G_1 и G_2 клеточного цикла происходит перераспределение разных категорий петельных доменов по сравнению с лимфоцитами на стадии G_0 . Это открывает перспективу использования кинетического варианта кометного электрофореза для исследования изменений петельной организации хроматина при функциональных изменениях в клетках. Для всех типов клеток впервые было подтверждено

пребывание хроматина в состоянии фрактальной глобулы для масштабов от 20 до 100 тысяч пар нуклеотидов.

Ключевые слова: петельные домены ДНК, нуклеоид, бласттрансформация лимфоцитов, фрактальная глобула, кометный электрофорез.

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, Kyiv, 2018.

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 kilobase) surface loop domains that migrate at early stages of electrophoresis; inner loop domains with length up to 200 kilobase that migrate cooperatively; and large loop domains (over 200 kilobase) 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.