Афанасьєва Катерина Сергіївна, доцент кафедри загальної та медичної генетики ННЦ &laquo;Інститут біології та медицини&raquo; Київського національного університету імені Тараса Шевченка: &laquo;Організація петельних доменів ДНК при різних функціональних станах клітин&raquo; (03.00.02 - біофізика). Спецрада Д 26.001.38 у Київському на&shy;ціональному університеті імені Тараса Шевченка МОН України

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

АФАНАСЬЄВА КАТЕРИНА СЕРГІЇВНА

УДК 577.323:576.08

ДИСЕРТАЦІЯ

ОРГАНІЗАЦІЯ ПЕТЕЛЬНИХ ДОМЕНІВ ДНК ПРИ РІЗНИХ

ФУНКЦІОНАЛЬНИХ СТАНАХ КЛІТИН

03.00.02 – біофізика

Подається на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,

результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

К. С. Афанасьєва

Київ – 2019

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ 19

ВСТУП 20

РОЗДІЛ 1. ПРОСТОРОВА ОРГАНІЗАЦІЯ ХРОМАТИНУ У

КЛІТИННОМУ ЯДРІ ТА МЕТОДИ ЇЇ ДОСЛІДЖЕННЯ

29

1.1. Нуклеосома та наднуклеосомна організація хроматину 30

1.1.1. Структура нуклеосоми 30

1.1.2. Наднуклеосомна організація хроматину 34

1.1.3. Петельні домени хроматину 37

1.1.4. Просторова організація інтерфазних хромосом 43

1.2 Сучасні підходи до аналізу просторової організації ДНК у

хроматині

46

1.3. Принципи електрофорезу ДНК ізольованих клітин (кометного

електрофорезу)

53

1.3.1. Методика кометного електрофорезу 53

1.3.2. Сфери застосування методу кометного електрофорезу 56

1.3.3. Теоретичні уявлення про формування треку ДНК при

кометному електрофорезі

60

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ 66

2.1. Клітини, що були використані у роботі 67

2.1.1. Виділення лімфоцитів із периферійної крові людини 67

2.1.2. Методи роботи із клітинами лінії T98G 68

2.1.3. Виділення нейронів дорсальних корінцевих гангліїв щурів 70

2.1.4. Оцінка життєздатності виділених клітин 71

2.2. Активація лімфоцитів периферійної крові людини інтерлейкіном

2 та фітогемаглютиніном Р

72

2.2.1. Культивування лімфоцитів 72

2.2.2. Оцінка мітотичного індексу лімфоцитарних культур та 73

16

ефективності бласттрансформації лімфоцитів

2.3. Опромінення клітин рентгенівськими променями та

ультрафіолетом С

74

2.4. Ізолювання клітинних ядер та аналіз якості виділеної фракції 75

2.4.1. Виділення клітинних ядер методом зонального

центрифугування

75

2.4.2. Аналіз якості виділеної ядерної фракції 76

2.5. Електрофорез ДНК ізольованих клітин (кометний електрофорез) 77

2.5.1. Приготування препаратів для кометного електрофорезу та лізис

клітин

77

2.5.2. Обробка нуклеоїдів білковими денатурантами 78

2.5.3. Індукція ковалентних зшивок формальдегідом 78

2.5.4. Проведення кометного електрофорезу ізольованих клітин 79

2.5.5. Аналіз препаратів 80

2.5.6. Визначення довжини петельних доменів 81

2.6. Кометний електрофорез у пульсуючому полі (кометний пульселектрофорез)

81

2.7. Визначення параметрів зв'язування інтеркалятору хлорокіну із

ДНК

82

2.8. Аналіз кінетики міграції ДНК при кометному електрофорезі 84

2.9. Біоінформатичний аналіз даних Ні-С 85

2.10. Апроксимація графіків і статистичний аналіз 86

РОЗДІЛ 3. ФІЗИЧНІ ЗАКОНОМІРНОСТІ МІГРАЦІЇ ДНК ПРИ

КОМЕТНОМУ ЕЛЕКТРОФОРЕЗІ ТА ПРИНЦИПИ

ПЕТЕЛЬНОЇ ОРГАНІЗАЦІЇ НУКЛЕОЇДІВ ЛІЗОВАНИХ

КЛІТИН

88

3.1. Фізичні принципи міграції ДНК при кометному електрофорезі 89

3.1.1. Кінетика виходу ДНК при нейтральному та лужному варіантах

кометного електрофорезу

90

17

3.1.2. Кінетичні моделі для опису міграції петель ДНК за

нейтральних умов при кометному електрофорезі нуклеоїдів,

отриманих з інтактних лімфоцитів та їх ізольованих ядер

101

3.1.3. Вплив надспіралізації петель на кінетику формування треку

ДНК при кометному електрофорезі

114

3.2. Фізичні характеристики петельних доменів ДНК, оцінені за

допомогою кометного електрофорезу

123

3.2.1. Оцінка топологічного стану петель ДНК 123

3.2.2. Основи петельних доменів ДНК нуклеоїду: взаємодії, що їх

забезпечують

130

3.2.3. Характеристика міграції петель ДНК, що містять нуклеосоми 138

РОЗДІЛ 4. ДОВЖИНА ПЕТЕЛЬНИХ ДОМЕНІВ ДНК ТА ЇХ

ФУНКЦІОНАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА

147

4.1. Біоінформатичний аналіз петельної організації хроматину за

даними Hi-C

148

4.2. Оцінка розподілу петель ДНК за контурною довжиною за

допомогою кометного електрофорезу

164

РОЗДІЛ 5. ЗМІНИ ПЕТЕЛЬНОЇ ОРГАНІЗАЦІЇ ДНК ПРИ

АКТИВАЦІЇ ЛІМФОЦИТІВ

180

5.1. Особливості організації петель ДНК нуклеоїдів, отриманих із

лімфоцитів на різних годинах їх культивування із рекомбінантним

інтерлейкіном 2

181

5.1.1. Характеристика активації лімфоцитів інтерлейкіном 2 181

5.1.2. Кінетика виходу петель ДНК із нуклеоїдів, отриманих із

активованих лімфоцитів на стадії G1 клітинного циклу

188

5.1.3. Кінетика виходу петель ДНК із нуклеоїдів, отриманих із

активованих лімфоцитів на стадії G2 клітинного циклу

201

5.2. Розподіл петель ДНК за контурною довжиною в активованих

лімфоцитах

206

18

РОЗДІЛ 6. ОСОБЛИВОСТІ ОРГАНІЗАЦІЇ ПЕТЕЛЬНИХ

ДОМЕНІВ ДНК У КЛІТИНАХ ГЛІОБЛАСТОМИ НА

НЕЙРОНАЛЬНИХ КЛІТИНАХ

219

6.1. Характеристика організації петель ДНК нуклеоїдів, отриманих із

клітин лінії T98G за різних умов культивування

221

6.2. Петельні домени ДНК у нейрональних клітинах 238

РОЗДІЛ 7. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ

РЕЗУЛЬТАТІВ

252

ВИСНОВКИ 280

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ 283

ДОДАТКИ 325

ВИСНОВКИ

З’ясованіфізичніпринципипетельноїорганізаціїДНКуядрах

еукаріотичнихклітинтавстановленіособливостіцієїорганізаціїуклітинах

різнихтипіватакожзакономірностідинамікипетельДНКпризміні

функціональногостануклітинКрімтогорозробленотавалідованоновий

методаналізупетельноїорганізаціїДНКуядрахеукаріотичнихклітинна

основікометногоелектрофорезунуклеоїдівотриманихшляхомлізисуклітин

уприсутностідетергентіввумовахвисокоїіонноїсили

НаосновіаналізукінетикиміграціїДНКприкометному

електрофорезізворотноїміграціїпривимкненніелектричногострумута

впливунакінетикуінтеркаляторівДНКвстановленощозанейтральних

значеньрНіпривідсутностівпливівздатнихпошкоджуватиДНКосновним

компонентомелектрофоретичноготрекуєпетельнідомениДНК

Показанощоосновнимифізичнимихарактеристикамипетель

ДНКяківпливаютьнашвидкістьїхньоїміграціїіяківідповідноможуть

бутивстановленішляхоманалізуцієїкінетикиєконтурнадовжинапетель

рівеньїхньоїнадспіралізаціїтаїхнялокалізаціявсерединічинаповерхні

ядра

Шляхоманалізувпливунакінетикуформування

електрофоретичноготрекуінтеркаляторівДНКтаденатурантівбілківа

такожвпершепроведеногокометногоелектрофорезунуклеоїдівщозначною

міроюзберігаютьнуклеосомнуструктурудоведенощопетельнідомениякі

залишаютьсяунуклеоїдахпіслялізисуклітинвідповідаютьпетельним

доменамхроматинущоприсутніуядрахклітин

Встановленощовсіпетельнідомениядереукаріотичнихклітин

можнарозділитинатриосновнігрупипетлінапериферіїядраізконтурною

довжиноюдотиспарнуклеотидіввнутрішніпетліізконтурною



довжиноюдотиспарнуклеотидіввнутрішніпетлінабагатобільшого

розмірунездатнірухатисьприелектрофорезі

Наосновіаналізукінетикиформуванняелектрофоретичного

трекутабіоінформатичногоаналізуданихіншихавторівотриманихметодом

НіСвпершепоказанощовусіхдослідженихтипахклітинрозподілпетель

ДНКзаїхконтурноюдовжиноюпідпорядковуєтьсязаконуекспоненційного

затуханняПрицьомуабсолютнакількістьпетельнихдоменівтаїхнялінійна

щільністьуздовжгеномуєклітиноспецифічними

Задопомогоюбіоінформатичногоаналізувстановлено

особливостірозподілупетельДНКподілянкаххроматинузрізною

функціональноюактивністюеухроматиновізонимістятьмайжевдвічі

більшепетельнихдоменівніжгетерохроматиновіприцьомумедіанний

контурнийрозміргетерохроматиновихпетельєприблизновдвічібільшиму

порівняннізеухроматиновимиВодночасактиваціятранскрипційних

процесівприводитьдопідвищенняякзагальноїкількостіпетельтакіїхніх

розмірів

Задопомогоюреєстраціїкінетикиформування

електрофоретичноготрекуприкометномуелектрофорезівпершепроведено

порівняльнийаналізособливостейпетельноїорганізаціїДНКвлімфоцитах

людининастадіїклітинногоциклуактивованихлімфоцитахнастадіях

іклітинахнейробластомиустаніспокоютапісляактиваціїїхньої

проліфераціїінейронахдорсальнихкорінцевихгангліївспинногомозку

щурівтапоказанощозмінафункціональногостануклітинзавжди

супроводжуєтьсяреорганізацієюпетельнихдоменівДНКТакареорганізація

восновномуполягаєузмінівідносноїкількостітрьохвищезгаданихтипів

петельнихдоменівзовнішнівнутрішнітавнутрішнівеликогорозміруїх

розмірівталінійноїщільностіугеномахдосліджуванихклітин

Доведенощоклітинизвисокимрівнемтранскрипційних

процесівлімфоцитинастадіїклітинногоциклуактивованіклітини

нейронихарактеризуютьсяпідвищеннямсередньоїконтурної



довжинипетельнихдоменіватакожзростаннямчасткиДНКускладі

поверхневихпетельтапетельнихдоменіввеликогорозмірупонад–

тиспарнуклеотидівщознаходятьсявсерединіядра

Показанощовклітинахізнизькоютранскрипційноюактивністю

лімфоцитинастадіяхіклітинногоциклуклітиниустані

спокоющільністьпетельрозміромдо–тиспарнуклеотидів

приблизновдвічівищаніждлябільшактивнихклітин

Обґрунтованощорозробленийуроботіпідхідєшвидкимі

кориснимметодомоцінкизмінструктурихроматинунанайвищихрівнях

йогоорганізаціїприпереходахклітинурізніфункціональністани