Чопей Мар&rsquo;яна Ігорівна, аспірант кафедри загальної та медичної генетики ННЦ &laquo;Інститут біології та медицини&raquo; Київського національного університету імені Тараса Шевченка: &laquo;Організація петельних доме&shy;нів ДНК у нуклеоїдах інтактних і бласттрансформова- них лімфоцитів&raquo; (03.00.02 - біофізика). Спецрада Д 26.001.38 у Київському національному університеті імені Тараса Шевченка

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

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ВСТУП

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Механізми формування петельних доменів ДНК в ядрах

еукаріотів

1.1.1. Конститутивні петельні домени ДНК

1.1.2. Петельні домени хроматину як результат функціональної

активності ядра

1.2 Методи дослідження петельних доменів

1.2.1. Флуоресцентна гібридизація in situ

1.2.2. Методи фіксації конформації хромосом

1.2.3. Метод імунопреципітації хроматину

1.2.4. Гель-електрофорез ізольованих клітин

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Матеріали та обладнання

2.2. Виділення лімфоцитів шляхом зонального центрифугування

2.3. Підрахунок кількості клітин та оцінка їх життєздатності

2.4. Виділення ядер лімфоцитів та аналіз якості виділеної фракції

2.5. Бласттрансформація лімфоцитів. Оцінка ефективності

бласттрансформації

2.6. Приготування препаратів та лізис клітин

2.7. Обробка нуклеоїдів інтеркаляторами та денатуруючими

агентами

2.8. Гель-електрофорез ізольованих клітин (кометний електрофорез)

2.9. Візуалізація та аналіз результатів

2.10. Аналіз кінетичних графіків та статистична обробка даних

11

12

19

19

19

22

27

27

28

32

34

37

37

37

38

39

40

41

42

43

44

45

9

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

3.1.2. Кінетика виходу ДНК із нуклеоїдів, отриманих з ізольованих

клітинних ядер

3.2. Механізми фіксації основ петельних доменів ДНК

3.2.1. Вплив денатуруючих агентів на рівень виходу ДНК при

кометному електрофорезі

3.2.2. Вплив інтеркалятора хлорокіну на рівень виходу ДНК при

кометному електрофорезі

3.2.3. Кінетика виходу ДНК після попередньої обробки нуклеоїдів

хлорокіном

3.2.4.Вплив ковалентних зшивок за допомогою формальдегіду на

кінетику виходу ДНК

3.3. Кінетика виходу ДНК із нуклеоїдів, отриманих з

бласттрансформованих лімфоцитів

3.4. Розподіл петельних доменів ДНК за розміром

3.4.1. Контурні розміри петель ДНК при обробці нуклеоїдів

денатурантами і хлорокіном

3.4.2. Контурні розміри петель ДНК при кометному електрофорезі

нуклеоїдів, отриманих з ізольованих ядер лімфоцитів

3.4.3. Контурні розміри петель ДНК при кометному електрофорезі

нуклеоїдів, отриманих з бласттрансформованих лімфоцитів

3.4.4. Фрактальна глобула як модель організації хроматину в

інтерфазному ядрі

РОЗДІЛ 4. УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

47

47

47

56

63

63

66

69

73

77

89

90

92

94

97

104

10

ВИСНОВКИ

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

ДОДАТКИ

116

118

134

11

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

М.п.н. - мільйонів пар нуклеотидів

ПЛР - полімеразна ланцюгова реакція

СТМК - буфер сахароза-тріс-магній-калій

ТБЕ - буфер тріс-борат-ЕDТА

Т.п.н. - тисяч пар нуклеотидів

ChIA - chromatin interaction analysis (аналіз хроматинових

взаємодій)

ChIP - сhromatin іmmunoprecipitation (імунопреципітація

хроматину)

СTCF - СССТС-зв’язуючий фактор

DAPI - 4',6-диамідино-2-феніліндол

EDTA - етилендиамінтетраоцтова кислота

FISH - fluorescence in situ hybridization (флуоресцентна

гібридизація in situ)

PET - paired-end tag sequencing (секвенування спарених

кінців)

12

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 напряму 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].

13

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-

14

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 нуклеоїдів, отриманих із інтактних лімфоцитів людини, та

з’ясувати механізми кооперативності виходу ДНК.

2. Дослідити особливості кінетики міграції петельних доменів ДНК

при кометному електрофорезі нуклеоїдів, 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 нуклеоїдів, 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.

15

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 нуклеоїдів, отриманих з клітин лімфоцитів і їх ізольованих ядер,

та визначено особливості цієї кінетики, пов’язані з відмінностями

мікрооточення всередині нуклеоїдів;

 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 нуклеоїдів 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

16

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 нуклеоїдів 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. Частину експериментів виконано спільно з

іншими співавторами публікацій.

Апробація матеріалів дисертації. Основні положення дисертаційної

роботи були представлені на наукових конференціях: Х Всеукраїнська наукова

17

конференція студентів та молодих науковців «Біологічні дослідження молодих

вчених в Україні» (28-29 жовтня 2010 року, Київ, Україна); IХ 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); Х 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); ХІ 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); ХІІ 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 2

nd 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 імпакт-фактори на рівні 2,5 та

5,1.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається з анотації,

вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів

18

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

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

МіграціяпетельнихдоменівДНКдовжиноюдо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

МіграціяпетельнихдоменівДНКрозміромдо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

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заплавленихвгельклітиннихядер

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

АналізкінетикивиходуДНКприкометномуелектрофорезівказує

щоубласттрансформованихтранскрипційноактивнихлімфоцитахнастадії

клітинногоциклуупорівняннізлімфоцитаминастадіївідбувається

збільшенняудваразикількостіДНКускладіповерхневихпетельнихдоменів

притакомужодночасномузменшеннікількостіДНКускладівнутрішніх

доменів

Убласттрансформованихлімфоцитахнастадіїклітинногоциклу

кількістьДНКускладіповерхневихпетельнихдоменівзростаєприблизнотак

самоякінастадії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

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