

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОПТИМАЛЬНЫХ КОНСТАНТ СКОРОСТЕЙ РЕАКЦИЙ
ПРЕОБРАЗОВАНИЙ В СИСТЕМАХ ГЕНЕТИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ КЛЕТОК В
СОСТОЯНИИ ПРОЛИФЕРАЦИИ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ**

И. Стадник, Д. Санагурский

Львовский национальный университет имени Ивана Франко

ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина

e-mail: irysjastadnyk@gmail.com

В работе представлены семнадцать поверхностей отклика для каждой из констант скоростей преобразований в системах генетического контроля клеток в состоянии пролиферации и дифференциации. На основе построенных поверхностей отклика установлено, какие из параметров кинетической модели вносят наибольший вклад в поведение динамической системы. Также определены конкретные значения констант скоростей реакций, при которых скорость преобразований в системах генетического контроля клеток является максимальной. Кроме того, графически показано изменение во времени интенсивности параметров кинетической модели систем генетического контроля клеток в состоянии пролиферации и дифференциации

Ключевые слова: поверхность отклика, константа скорости, генетический контроль, пролиферация, дифференциация.

УДК 577.323:576.08

**СВІДЧЕННЯ ІСНУВАННЯ ХРОМАТИНУ В СТАНІ ФРАКТАЛЬНОЇ ГЛОБУЛИ ЗА
ДАНИМИ КОМЕТНОГО ЕЛЕКТРОФОРЕЗУ**

К. Афанасьєва*, М. Чопей, А. Сиволоб

Київський національний університет імені Тараса Шевченка

вул. Володимирська, 64/13, Київ 01601, Україна

e-mail: aphon@ukr.net

Дослідження просторової організації інтерфазного хроматину методом картування контактів між окремими геномними локусами з розділенням у кілька мільйонів пар нуклеотидів свідчать, що конформація хроматинової фібрили відповідає стану фрактальної глобули. Такий стан характеризується певними закономірностями щодо ймовірності утворення контактів між віддаленими локусами, а контакти, у свою чергу, приводять до появи петельних доменів. У роботі досліджуємо кінетику виходу петель ДНК при кометному електрофорезі та розмір петельних доменів, що мігрують. Отримані результати щодо розподілу довжини петельних доменів, розміром до 100 тисяч пар нуклеотидів,

узгоджуються зі структурою фрактальної глобули. Отже, така модель організації хроматину є також справедливою для менших масштабів – на рівні кількох тисяч пар нуклеотидів.

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

Дослідження організації інтерфазного хроматину є одним із найбільш важливих і актуальних напрямів молекулярної біології та біофізики – знання структури і просторового розміщення хроматинових фібрил у клітинному ядрі дає можливість зрозуміти механізми основних функціональних процесів в інтерфазному хроматині: від транскрипції та її регуляції до реплікації та репарації ДНК. За останнє десятиліття значний прогрес у з'ясуванні просторової структури хроматину на найвищих рівнях його організації був досягнутий завдяки розробці методів фіксації конформації хромосом (chromosome conformation capture, 3C). Ці методи, зокрема, варіація 3C, відома як Hi-C, дають змогу визначати частоту контактів між дискретними локусами, що перебувають на різних відстанях уздовж хроматинової фібрили [6, 8]. Результати таких досліджень переконливо вказують, що, принаймні у масштабах кількох мільйонів пар нуклеотидів, хроматинові фібрили організовані як фрактальні глобули [11, 13]. Такий стан полімеру, на відміну від рівноважної глобули, передбачає відсутність вузлів, а також характеризується тим, що частота випадкових контактів між двома локусами є обернено пропорційною до контурної відстані між ними [7, 13]. Частина цих контактів може приводити до утворення хроматинових петель, різноманітних за способом фіксації їх кінців, розміром і стабільністю [9]. Наприклад, частина петель може з'являтися як наслідок транскрипційної активності – за рахунок об'єднання регуляторних елементів кількох генів у єдину транскрипційну фабрику. Інша частина петельних доменів може бути асоційована зі структурними білками ядра (ламіною та філаментами нуклеоплазми) або взагалі виникати в результаті ефектів молекулярного скупчення (molecular crowding) ділянок хроматинової фібрили у клітинному ядрі [5, 9, 10, 12].

Одним із підходів, який має стосунок до аналізу петельних доменів хроматину, є метод електрофорезу ДНК ізольованих клітин (метод кометного електрофорезу). В основі методу лежить аналіз міграції ДНК із нуклеотидів, отриманих шляхом стандартної процедури лізису клітин в агарозних блоках [4, 14]. За нейтральних значень рН під час електрофорезу нуклеотидів, отриманих з інтактних клітин, міграція ДНК забезпечується витягуванням до анода надспіралізованих петельних доменів [2, 3, 15]. Застосування кінетичного підходу для дослідження формування треку ДНК (так званого хвоста комети) при електрофорезі дало змогу встановити низку характеристик організації петельних доменів: оцінити рівень вихідної надспіралізації петель у нуклеотиді, кількісно оцінити частку петель, міграція яких виявляється чутливою до рівня їх надспіралізації, з'ясувати особливості взаємодії петельних доменів із білками нуклеоїда тощо [1, 16].

У даній роботі ми зосредили увагу на дослідженні розміру петельних доменів, які містяться у хвості комети на різних хвилинах електрофорезу. Результати розподілу довжини петельних доменів розміром до 100 тисяч пар нуклеотидів узгоджуються зі структурою фрактальної глобули. Таким чином, отримані дані вказують, що модель фрактальної глобули є справедливою не лише у масштабах великих відстаней, які вимірюються мільйонами пар нуклеотидів, а й на рівні відстаней між локусами, розташованими за кілька десятків тисяч пар нуклеотидів один від одного.

Матеріали та методи

У роботі використовували лімфоцити людини, які отримували з периферійної крові 5 здорових донорів. Клітини виділяли шляхом центрифугування у градієнті щільності Histopaque 1077 (Sigma, США), після чого двічі відмивали у розчині Хенкса. Отриману суспензію клітин (50 мкл) змішували з 100 мкл 1% легкоплавкої агарози при температурі 37°C, 20 мкл суміші наносили на предметне скельце, яке попередньо було вкрито тонким шаром 1% тугоплавкої агарози. Отримані таким чином слайди (заплавлені в агарозу клітини на поверхні предметного скла) витримували при кімнатній температурі впродовж 2–4 хв і після полімеризації агарози переносили в охолоджений до 4°C лізуючий буфер: 2,5 М NaCl, 100 мМ EDTA, 10 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 1% Triton X-100 ("Ferak", ФРГ), який додавали безпосередньо перед використанням буферу. Лізис проводили 2–3 год при 4°C.

Після лізису слайди відмивали у буфері TBE (89 мМ Tris, 89 мМ H₃BO₃, 2 мМ EDTA, pH 7,5) і кілька слайдів, які були приготовані одночасно, поміщали в горизонтальний електрофоретичний апарат. Електрофорез проводили в буфері TBE при 4°C (напруженість електричного поля 1 В/см, сила струму 300 мА). Для визначення кінетики утворення комет слайди діставали з апарату через різні проміжки часу, фарбували у розчині 1,3 мкг/мл флуоресцентного барвника DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, Sigma, США) й аналізували під люмінесцентним мікроскопом ("ЛОМО", СРСР), до якого була приєднана цифрова фотокамера Canon EOS 1000D. За допомогою пакету програм CometScore ("TriTek Corp.", США) на цифрових зображеннях для 100–150 клітин оцінювали частку ДНК у хвостах комет і довжину хвоста. Перший параметр визначали як відношення інтенсивності флуоресценції ДНК у хвості комети до загальної інтенсивності комети, другий – як відстань від центру голови комети до найвіддаленішого кінця хвоста.

Результати і їхнє обговорення

У даній роботі ми реєстрували кінетику виходу петель ДНК та їх розмір під час електрофорезу нуклеотидів, отриманих шляхом лізису іммобілізованих в агарозі інтактних лімфоцитів людини. Крива залежності відносної частки ДНК у хвостах комет від часу електрофорезу має двоступеневий характер (рис. 1, а): незначна частка петель ДНК (не більше 1/10 від загальної кількості ДНК нуклеоїда) мігрує до анода вже на перших хвилинах електрофорезу і формує нижнє плато кривої, вихід значно більшої частини петель спостерігається

в інтервалі від 30 до 50 хв електрофорезу. У подальшого електрофорезу частка ДНК у хвостах комет залишається сталою – на верхньому плато кривої цей показник фіксується на рівні 0,22. Паралельно зі збільшенням частки ДНК у хвостах комет збільшується і довжина хвоста комети, яка відображає розмір найдовших петель, що формують електрофоретичний трек (рис. 1, б). Приклади типових комет на різних хвилинах електрофорезу представлені на рис. 2. Так само, як і крива кінетики виходу ДНК у хвіст комети, залежність, що описує зміну довжини хвоста комети протягом електрофорезу, має двоступеневий характер. Такий паралелізм у зміні цих двох показників дає змогу припустити, що на різних хвилинах електрофорезу ми спостерігаємо міграцію різних за розміром петель: якби приріст відносної кількості ДНК у хвостах комет в процесі електрофорезу не супроводжувався збільшенням довжини хвоста комети, це свідчило би про можливість виходу у пори агарози лише петельних доменів фіксованого розміру.

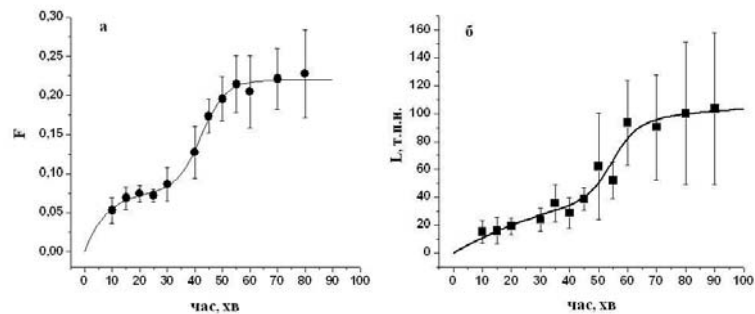
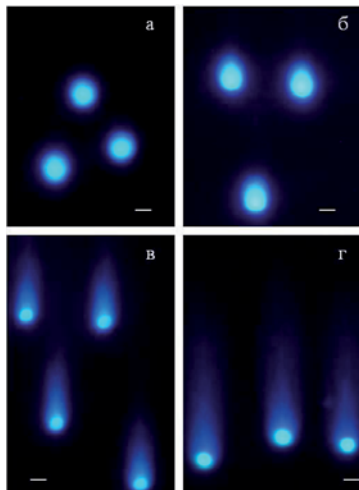


Рис. 1. Залежність відносного вмісту F ДНК у хвостах комет (а) та середнього значення контурної довжини L у тисячах пар нуклеотидів (т.п.н.) найбільш довгих петель ДНК у хвостах комет (б) від часу електрофорезу.



Суцільні криві – результат інтерполяції, наведені похибки (тут і на рис. 3) – стандартні відхилення.

Рис. 2. Типові зображення нуклеїдів після двадцятої (а), сорокової (б), п'ятдесятої (в) та дев'янової (г) хвилини електрофорезу (шкала – 10 мкм).

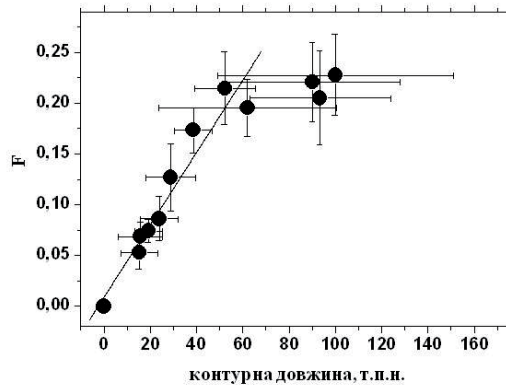


Рис. 3. Кореляція між середнім значенням відносного вмісту ДНК у хвостах комет F та середнім значенням контурної довжини найбільш довгих петель у хвостах комет.

Аналіз довжини хвоста комети дає приблизну оцінку максимального розміру петель, міграція яких у хвіст комети формує нижнє плато, в межах 25 т.п.н. (тисяч пар нуклеотидів). Вихід більш довгих петель, до 100 т.п.н., спостерігається лише на пізніх хвилинах електрофорезу (рис. 1, б), максимальний розмір петельних доменів у хвостах комет не перевищує 180 т.п.н. Такий ліміт, найімовірніше, відображає межі роздільної здатності методу і, в першу чергу, залежить від локальної структури агарозного гелю навколо кожного нуклеоїда. Слід зазначити, що саме нерівномірністю такої структури пояснюється значний розкид у значеннях довжини хвоста комети, отриманих для кожного окремого нуклеоїда, які відображені у вигляді стандартних відхилень на кривій рис. 1, б.

Порівняння розміру найдовших петель і відносного вмісту ДНК у хвостах комет свідчить про майже лінійну кореляцію між цими показниками (рис. 3). Лінійність є трохи порушеною для найдовших петель, тобто для тих, розмір яких перебуває на межі роздільної здатності агарозного гелю. Це означає, що на пізніх хвилинах електрофорезу, тобто у момент, коли починається вихід найбільш довгих петель, хвіст комети в основному складається із петель, які *вже* мігрували до анода на початкових етапах. Отже, петлі великого розміру (від 100 т.п.н. і більше) представлені незначною часткою у хвостах комет: їх вклад є помітним лише для зміни довжини хвоста комети, але не для кількості ДНК у ньому.

Частку ДНК f у хвостах комет в заданий момент електрофорезу можна записати як:

$$f \propto \int_0^{s_m} s p_s ds,$$

де s – контурна довжина петлі у хвості комети; p_s – імовірність появи петлі розміром s у хвості комети (фактично, частка таких петель); s_m – максимальний розмір петельних доменів

у конкретний момент часу. Інакше кажучи, величина p_s відображає імовірність контакту між двома локусами, що перебувають на відстані s один від одного.

Лінійна залежність f від s_m означає, що частка ДНК у хвості, яка відповідає петлям певного розміру, не залежить від цього розміру: загальна частка ДНК у коротких петлях дорівнює такій у довгих (зростання довжини петель точно компенсується зменшенням їхньої кількості). З наведеного вище рівняння очевидно, що найпростішим шляхом для досягнення прямої пропорційності між двома параметрами f та s_m є припущення, що $p_s \sim s^{-1}$. Саме така залежність частоти контактів від контурної відстані між двома точками відповідає стану фрактальної глобули – стану, існування в якому інтерфазного хроматину було продемонстровано раніше методом Ні-С для масштабів у кілька мегабаз (мільйонів пар основ) [7, 11, 13]. Наші результати підтверджують наявність цього полімерного стану і для значно менших відстаней.

У клітинному ядрі такі випадкові контакти можуть бути зафіксовані на певний час за рахунок білок-білкових взаємодій, що й приводить до утворення петельних доменів. Після лізису клітин частина цих контактів (а отже, і петельних доменів) виявляється «замороженою» і при електрофорезі нуклеоїдів спостерігається міграція цих «надстабільних» петель у хвіст комети.

Прийнявши максимальну частку ДНК у хвостах комет $f \approx 0,25$ і контурну довжину найдовших петель $s_m \approx 10^5$ пар нуклеотидів, можна вирахувати приблизне співвідношення між імовірністю появи петлі у хвості комети та розміром цієї петлі: $p_s \approx 2,5 \cdot 10^{-6} s^{-1}$. Результати Ні-С методу дають оцінку імовірності появи контакту p залежно від відстані між локусами s $p \approx 1,5 \cdot 10^{-3} s^{-1,08}$ [11]. Отже, приблизно 10^{-3} усіх контактів дає надстабільні петлі, що зберігаються у нуклеоїді навіть після лізису клітини.

Таким чином, представлені результати свідчать, що у просторі ядра хроматинові фібрили організовані як фрактальні глобули також на рівні значно менших масштабів, ніж попередньо були продемонстровані методами Ні-С. Аналіз співвідношення між імовірністю появи петлі у хвості комети і розміром цієї петлі дає можливість виділити частку надстабільних контактів (а отже, і петель), які залишаються в нуклеоїді після лізису клітин. Це, у свою чергу, розкриває нові можливості застосування методу кометного електрофорезу для дослідження організації петельних доменів ДНК.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Afanasieva K., Chopei M., Zazhytska M. et al. DNA Loop Domain Organization as Revealed by Single-Cell Gel Electrophoresis // Biochim. Biophys Acta-Mol. Cell Res. 2013. Vol. 1833. N 4. P. 3237–3244.

2. *Afanasyeva K. S., Zazhytska M. O., Sivolob A. V.* Mechanisms of DNA exit during neutral and alkaline comet assay // *Cytology and Genetics*. 2009. Vol. 43. N 6. P. 367–370.
3. *Afanasyeva K., Zazhytska M., Sivolob A.* Kinetics of comet formation in single-cell gel electrophoresis: loops and fragments // *Electrophoresis*. 2010. Vol. 31. P. 512–519.
4. *Collins A. R., Osoz A. A., Brunborg G.* et al. The comet assay: topical issues // *Mutagenesis*. 2008. Vol. 23. N 3. P. 143–151.
5. *Cook P. R.* A model for all genomes: the role of transcription factories // *J. Mol. Biol.* 2010. Vol. 395. P. 1–10.
6. *Dekker J., Marti-Renom M. A., Mirny L. A.* Exploring the three-dimensional organization of genomes: interpreting chromatin interaction data // *Nat. Rev. Genet.* 2013. Vol. 14. P. 390–403.
7. *Fudenberg G., Mirny L. A.* Higher-order chromatin structure: bridging physics and biology // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2012. Vol. 22. P. 115–124.
8. *Gibcus J. H., Dekker J.* The hierarchy of the 3D genome // *Mol. Cell*. 2013. Vol. 49. P. 773–782.
9. *Kadauke S., Blobel G. A.* Chromatin loops in gene regulation // *Biochim. Biophys. Acta*. 2009. Vol. 1789. P. 17–25.
10. *Kind J., van Steensel B.* Genome-nuclear lamina interactions and gene regulation // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2010. Vol. 22. P. 320–325.
11. *Lieberman-Aiden E., van Berkum N. L., Williams L.* et al. Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome // *Sci.* 2009. Vol. 326. P. 289–293.
12. *Marenduzzo D., Micheletti C., Cook P. R.* Entropy-driven genome organization // *Biophys. J.* 2006. Vol. 90. P. 3712–3721.
13. *Mirny L. A.* The fractal globule as a model of chromatin architecture in the cell // *Chromosome Res.* 2011. Vol. 19. P. 37–51.
14. *Olive P. L.* The comet assay. An overview of techniques // *Meth. Mol. Biol.* 2002. Vol. 203. P. 179–194.
15. *Shaposhnikov S. A., Salenko V. B., Brunborg G.* et al. Single-cell gel electrophoresis (the comet assay): loops or fragments? // *Electrophoresis*. 2008. Vol. 29. P. 3005–3012.
16. *Zazhytska M., Afanasyeva K., Chopei M., Vikhreva M., Sivolob A.* Influence of chloroquine on kinetics of single-cell gel electrophoresis // *Biopolymers and Cell*. 2012. Vol. 28. N 4. P. 292–297.

Стаття: надійшла до редакції 12.05.14

доопрацьована 19.09.14

прийнята до друку 22.09.14

**EVIDENCE FROM COMET ASSAY FOR CHROMATIN EXISTENCE
IN FRACTAL GLOBULE STATE****К. Afanasieva*, М. Chopei, А. Sivolob**

*Taras Shevchenko National University of Kyiv
64/13, Volodymyrska St., Kyiv 01601, Ukraine
e-mail: aphon@ukr.net*

The investigation of interphase chromatin spatial organization by genome-wide interaction mapping demonstrated that at the level of megabase scale resolution the chromatin conformation is consistent with a fractal globule organization. This state is characterized by some special low of the probability of contact formation between distant loci. These contacts, in turn, lead to appearance of DNA loop domains. In our work we have measured the kinetics of the exit of DNA loops during the comet assay and the length of these loops. The results on distribution of the loop length up to 100 kb appear to be consistent with the fractal globule organization. Therefore, the fractal globule model can be valid not only at the scale of several megabases but also at the scale of several tens of kilobases.

Key words: fractal globule, DNA loop domains, comet assay.

**СВИДЕТЕЛЬСТВА СУЩЕСТВОВАНИЯ ХРОМАТИНА В СОСТОЯНИИ
ФРАКТАЛЬНОЙ ГЛОБУЛЫ ПО ДАННЫМ КОМЕТНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА****К. Афанасьева*, М. Чопей, А. Сиволоб**

*Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко
ул. Владимирская, 64/13, Киев 01601, Украина
e-mail: aphon@ukr.net*

Исследования пространственной организации интерфазного хроматина методом картирования контактов между отдельными локусами с разрешением в несколько миллионов пар нуклеотидов указывают, что конформация хроматиновой фибриллы соответствует состоянию фрактальной глобулы. Такое состояние характеризуется определенными закономерностями в отношении вероятности образования контактов между удаленными локусами, а контакты, в свою очередь, приводят к появлению петельных доменов. В нашей работе мы исследовали кинетику выхода петель ДНК при кометном электрофорезе и размер мигрирующих петельных доменов. Полученные результаты

распределения длины петельных доменов, размером до 100 тысяч пар нуклеотидов, согласуются со структурой фрактальной глобулы. Таким образом, такая модель организации хроматина является справедливой также и для меньших масштабов – на уровне нескольких тысяч пар нуклеотидов.

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

УДК 577.37

ASSOCIATION OF NOVEL BENZANTHRONE DYES WITH AMYLOID FIBRILS: A RESONANCE ENERGY TRANSFER STUDY

**К. Vus¹, М. Girych¹, G. Gorbenko¹, P. Kinnunen², E. Kirilova³, G. Kirilov³, E. Adachi⁴,
H. Saito⁴**

¹*V.N. Karazin Kharkiv National University*

4, Svobody Sq., Kharkiv 61022, Ukraine

e-mail: kateryna_yus@yahoo.com

²*Aalto University*

3, Otakaari St., Espoo FI-00076, Finland

³*Daugavpils University*

13, Vienibas St., Daugavpils LV5401, Latvia

⁴*The University of Tokushima*

Shomachi, 1-78-1, Tokushima 770-8505, Japan

Quantitative analysis of resonance energy transfer between amyloid-specific fluorophore Thioflavin T and novel benzanthrone dyes showed that the binding sites of fibrillar lysozyme, insulin and apolipoprotein A-I variants for the novel probes are represented by the fibril grooves separated from those of Thioflavin T by the distances falling in the range 2.1–6.2 nm. It is demonstrated that RET technique may prove suitable for both detection and characterization of amyloid fibrils.

Keywords: amyloid fibrils, benzanthrone dyes, resonance energy transfer, Thioflavin T.

Amyloid fibrils are protein aggregates sharing a common cross- β conformation, in which β -sheets are parallel to fibril axis, with β -strands running perpendicular to this axis. In view of the well recognized pathogenic and functional role of this kind of protein aggregates, there exists a