

## ВПЛИВ ДНК-ІНТЕРКАЛЯТОРІВ НА СТАБІЛЬНІСТЬ ПЕТЕЛЬНИХ ДОМЕНІВ ДНК

**М. Чопей, В. Олефіренко, К. Афанасьєва, А. Сиволоб**

*Київський національний університет імені Тараса Шевченка  
вул. Володимирська, 64/13, Київ 01601, Україна  
e-mail: aphon@ukr.net*

Петельні домени ДНК – основний компонент структури інтерфазного хроматину на вищих рівнях його організації – задіяні у багатьох функціональних процесах, що відбуваються в ядрі (транскрипція, її регуляція, реплікація та репарація ДНК). Дуже важливим є розуміння механізмів формування та стабілізації петель ДНК – взаємодій між ДНК і білками, які беруть у цьому участь, що на сьогоднішній день залишається досить погано вивченим. У нашій роботі ми зосередили увагу на дослідженні організації та особливостей стабілізації петельних доменів розміром до 200 тисяч пар нуклеотидів за допомогою методу кометного електрофорезу. Отримані результати показують, що при використанні високих концентрацій інтеркалюючого агента хлорокіну відбувається порушення ДНК-білкових взаємодій, які фіксують основи петель ДНК, що призводить до реорганізації хроматину і суттєво впливає на ефективність міграції ДНК під час електрофорезу. Однак така дестабілізація є оборотною: після припинення впливу інтеркалятора більшість взаємодій може відновлюватися. Наші результати узгоджуються з моделлю фіксації петельних доменів ДНК за допомогою комплексу білків CTCF та когезину.

*Ключові слова:* хроматин, петельні домени ДНК, кометний електрофорез, хлорокін.

Численні дослідження, присвячені вивченню особливостей організації клітинного ядра, показали, що ключовим елементом компактизації хроматину на стадії інтерфази є петельні домени ДНК [4, 6, 13]. Останніми роками було виявлено велику кількість білків і їхніх комплексів, що беруть участь у формуванні таких петель [6, 14]. Наприклад, фіксація петельних доменів може здійснюватися за рахунок взаємодії ділянок хроматину з білками ядерної ламіни, трансмембранними білками ядерної оболонки та білками ядерних пор (нуклеопорин) [15], компонентами транскрипційних фабрик чи ДНК-полімеразних комплексів (РНК- та ДНК-полімерази, топоізомерази, фактори транскрипції) та багатьма іншими [5, 7].

Останнім часом за допомогою новітніх методів дослідження було встановлено, що важливу роль у формуванні петельних доменів ДНК відіграє білок CTCF (СССТС-зв'язуючий фактор). Даний архітектурний білок зв'язується з ДНК у специфічних сайтах, що розкидані по всьому геному, та прямо чи опосередковано взаємодіє з білками, які задіяні в різноманітних функціональних процесах у ядрі, такими як транскрипція та її регуляція, реплікація чи репарація ДНК. Це забезпечує велику кількість внутрішньо- та міжхромосомних взаємодій, що призводить до утворення і стабілізації петельних доменів ДНК [9, 10]. Нещодавно було виявлено, що важливим фактором такої стабілізації є білок когезин, який на стадії інтерфази утворює комплекс із білком CTCF та взаємодіє з ДНК в основному в сайтах зв'язування цього білка [9, 11, 12]. На сьогоднішній день остаточно не з'ясовані особливості фіксації петельних доменів ДНК на тих чи інших білкових

структурах ядра. Дослідження ДНК-білкових взаємодій під час утворення петель ДНК і стабільності таких взаємодій за різних умов є надзвичайно важливим для розуміння просторової організації та функціонування ядра еукаріотичної клітини.

Одним із підходів, що дає змогу вивчати різноманітність петель хроматину та механізми їхньої стабілізації, є метод кометного електрофорезу (гель-електрофорезу ізольованих клітин). У наших попередніх роботах, спрямованих на дослідження міграції петельних доменів під дією електричного струму, ми показали, що лише невелика частина петельних доменів (не більше 25 %) може формувати електрофоретичний трек – виходити у т. зв. хвіст комети [2]. При цьому після попередньої обробки клітин різноманітними білок-денатуруючими агентами (сечовина, додецилсульфат натрію) частка петель, які можуть мігрувати під час електрофорезу, суттєво знижується внаслідок дестабілізації ДНК-білкових взаємодій, що забезпечують фіксацію петельних доменів [1].

У наших попередніх дослідженнях [2, 3] ми припустили, що ДНК-інтеркалюючі агенти (бромистий етидій, хлорокін) можуть призводити до порушення взаємодій між ДНК та білками в точках фіксації петель хроматину за рахунок локального розкручування подвійної спіралі ДНК у процесі вбудовування цих сполук між парами азотистих основ. У даній роботі ми зосередили увагу на дослідженні стабільності петельних доменів ДНК за різних умов впливу інтеркалятора хлорокіну. Для цього ми використовували високі концентрації інтеркалятора, щоби підвищити ймовірність його вбудовування в сайти фіксації основ петель ДНК. Наші результати показали, що при додаванні хлорокіну відбувається суттєва дестабілізація петельних доменів ДНК внаслідок порушення зв'язків між ДНК та білками. Однак така дестабілізація є оборотною: при поверненні до вихідних умов після обробки інтеркалятором взаємодії між білками і ДНК в місцях фіксації петель можуть відновлюватися.

#### Матеріали та методи

Для досліджень використовували лімфоцити людини, ізольовані з периферичної крові здорових донорів за допомогою методу зонального центрифугування в градієнті щільності Histopaque 1077 (Sigma, США). Виділені клітини двічі відмивали в розчині Хенкса, після чого їх відразу ж використовували для приготування препаратів. Для цього суспензію лімфоцитів змішували з 1 % легкоплавкою агарозою при температурі 37 °С у співвідношенні 1:2. Далі 20 мкл отриманої суміші рівномірно наносили на предметне скельце, попередньо покриті тонким шаром 1 % тугоплавкої агарози, і витримували 5 хв при кімнатній температурі для полімеризації. Приготовані таким чином слайди переносили у лізуючий буфер (2,5 М NaCl, 0,01 М Tris-HCl (pH 8,0), 0,1 М Na<sub>2</sub>EDTA та 1 % Triton X-100), що був охолоджений до 4 °С. Triton X-100 додавали безпосередньо перед лізисом клітин. У лізуючому буфері препарати витримували 2–3 год при температурі 4 °С. Після лізису слайди двічі відмивали від лізуючого буферу в буфері TBE (0,089 М Tris, 0,089 М H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> та 0,002 М Na<sub>2</sub>EDTA, pH 7,5).

Надалі кілька препаратів поміщали в горизонтальний електрофоретичний апарат і проводили кометний електрофорез у буфері TBE при температурі 4 °С (напруженість електричного поля 1 В/см, сила струму 300 мА). У частині експериментів до електрофоретичного буферу додавали інтеркалюючий агент хлорокін (Sigma, США) у концентрації 1000 мкг/мл. Концентрація хлорокіну в стоковому розчині була визначена спектрофотометрично. Паралельно проводили експерименти, в яких слайди перед електрофорезом інкубували в розчині хлорокіну (концентрація 1000 мкг/мл) протягом 10 хв при температурі 4 °С. Після цього їх двічі відмивали в буфері TBE і проводили електрофорез без додавання інтеркалятора в електрофоретичний буфер.

Для встановлення кінетичної залежності виходу ДНК у хвіст комети препарати діставали з апарата через рівномірні 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). Зразки фотографували камерою Canon EOS 1000 D, під'єднаною до мікроскопа, й аналізували зображення за допомогою програмного забезпечення TriTek CometScore™. Аналізували 100–200 випадково вибраних комет, визначаючи відносний вміст ДНК у хвості комети (відношення рівня інтенсивності флуоресценції у хвості комети до сумарної інтенсивності флуоресценції) та довжину хвоста (відстань від центру голови комети до кінця хвоста). Для визначення розмірів найдовших петель ДНК в парах нуклеотидів у хвостах комет на різних етапах електрофорезу отримане значення довжини хвоста у мікрометрах було помножено на 2 (контурна довжина петельного домену приблизно удвічі більша, ніж довжина витягнутої петлі) та поділено на 0,34 нм (відстань між сусідніми парами нуклеотидів).

### Результати і їхнє обговорення

У даному дослідженні було проаналізовано кінетику виходу петельних доменів ДНК під дією електричного струму у процесі кометного електрофорезу. Приклади типових комет на різних етапах електрофорезу представлені на рис. 1.

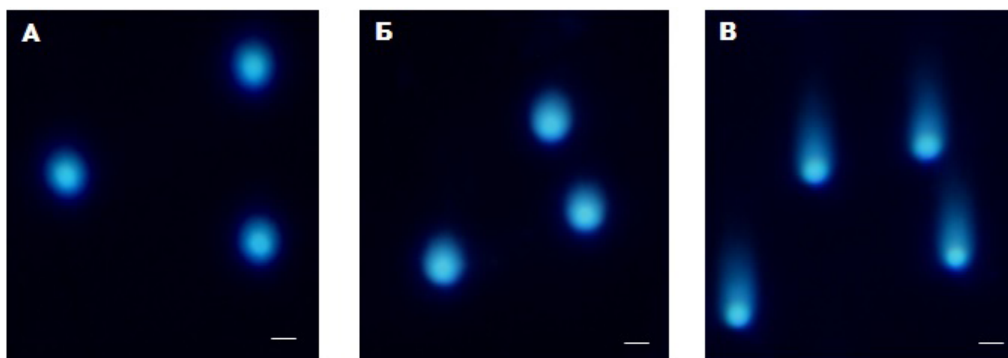


Рис. 1. Типові зображення комет після двадцятої (А), сорокової (Б) та шістдесятої (В) хвилини електрофорезу (шкала – 10 мкм)

У контрольних експериментах ми спостерігали двоступеневу залежність виходу ДНК у хвіст комети (рис. 2). Так, на ранніх етапах (10 хв електрофорезу) до анода мігрує лише близько 8 % від усіх петельних доменів і такий рівень зберігається аж до 30-ї хв електрофорезу (нижнє плато кривої). Вихід значно більшої частини петель є кооперативним і спостерігається в інтервалі від 30 до 50 хв електрофорезу. Частка ДНК у хвостах комет при цьому зростає до 22 % і залишається незмінною при подальшому проведенні електрофорезу (верхнє плато кривої). Таким чином, лише близько  $\frac{1}{4}$  частини від усіх петельних доменів можуть мігрувати до анода за даних умов електрофорезу. Ми проаналізували також розміри петель ДНК, що виходять у хвіст комети на різних етапах електрофорезу. Було виявлено, що нижнє плато кінетичної кривої формується петельними доменами, розмір яких не перевищує 25 тисяч пар нуклеотидів (т.п.н.). На пізніх етапах електрофорезу стає можливим вихід більш довгих петельних доменів: верхнє плато утворюється петлями розміром до  $\sim 130$  т.п.н. (вставка на рис. 2). При цьому великі петельні домени, контурна довжина яких становить більше 200 т.п.н., взагалі не можуть мігрувати крізь пори агарозного гелю при кометному електрофорезі: ми не спостерігали вихід таких петель у хвіст комети в жодному з варіантів експерименту.

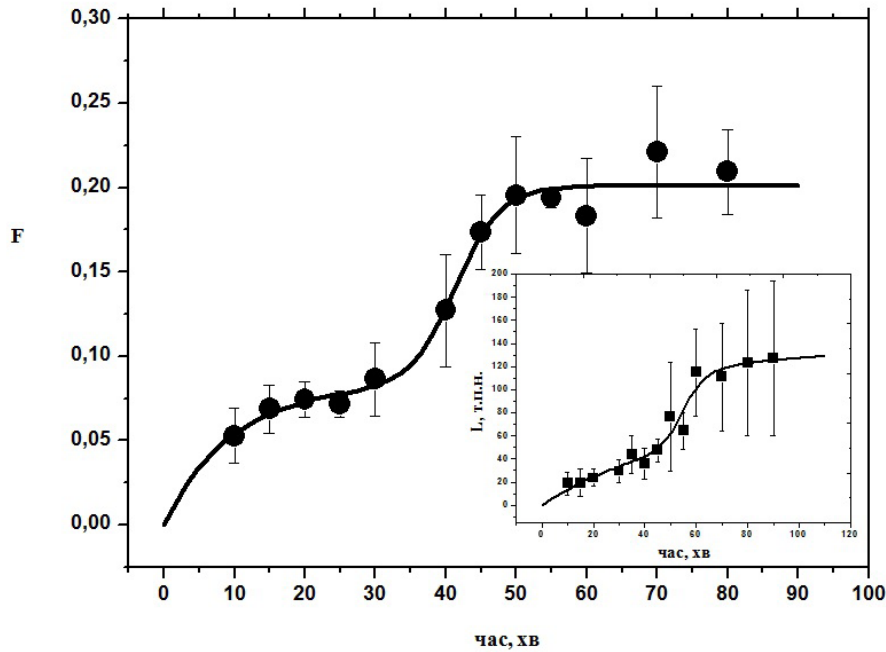


Рис. 2. Залежність відносного вмісту  $F$  ДНК у хвостах комет і середнього значення контурної довжини  $L$  у тисячах пар нуклеотидів (т.п.н.) найдовших петель ДНК у хвостах комет (на вставці) від часу електрофорезу. Суцільні криві – результат інтерполяції, наведені похибки (тут і далі) – стандартні відхилення

У попередній роботі [2] ми встановили, що за умов проведення кометного електрофорезу константа зв'язування хлорокіну з ДНК становить  $3 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ , а розмір сайту зв'язування – 4,4 пари основ. Згідно з відомим рівнянням МакГі та фон Хішпеля [8]:

$$\frac{\nu}{L} = K \frac{(1 - n\nu)^n}{(1 - n\nu + \nu)^{n-1}},$$

де  $\nu$  – щільність зв'язування;  $L$  – молярна концентрація вільного ліганду;  $K$  – константа зв'язування;  $n$  – розмір сайту зв'язування, за таких параметрів і концентрації 1000 мкг/мл щільність зв'язування хлорокіну близька до максимального насичення. Тому для даних експериментів було обрано саме цю концентрацію інтеркалюючого агента. При проведенні електрофорезу за наявності 1000 мкг/мл хлорокіну (інтеркалятор додавали безпосередньо в електрофоретичний буфер) було виявлено суттєве зниження відносного вмісту ДНК у хвостах комет порівняно з контрольними дослідями без інтеркалятора. Так, при додаванні хлорокіну максимальний вихід ДНК становив лише близько 10 % від загальної кількості навіть на пізніх етапах (60–90 хв) електрофорезу (рис. 3). Аналогічний, але менш виражений ефект спостерігали також під час проведення кометного електрофорезу за наявності 500 мкг/мл інтеркалятора (результати не представлені). Максимальна частка ДНК при цьому становила приблизно 13 %. Тобто в цих експериментах удвічі менше петельних доменів можуть мігрувати крізь пори агарозного гелю під час електрофорезу. На нашу думку, це може бути пов'язано з тим, що при вбудовуванні інтеркалятора між парами азотистих основ у місцях фіксації петельних доменів відбувається локальне розкручування

подвійної спіралі ДНК (використання концентрації хлорокіну 1000 мкг/мл забезпечує підвищення ймовірності його вбудовування саме в такі сайти). Це призводить до повної або часткової дестабілізації взаємодій між ДНК та білками, які закріплюють ці петлі. Унаслідок цього відбувається зменшення кількості петельних доменів при збільшенні їхніх розмірів – кілька менших петель, розташованих поряд, сформують одну велику. Як зазначено вище, петельні домени розміром понад 200 т.п.н. не можуть мігрувати в порах агарози під час кометного електрофорезу. Очевидно, що при додаванні 1000 мкг/мл хлорокіну зростає частка саме таких петель ДНК, у результаті чого ми спостерігаємо значне зниження виходу ДНК у хвіст комети. Отже, наші результати свідчать, що фіксація великої кількості петельних доменів здійснюється за рахунок слабких взаємодій між білками та ДНК. Ці взаємодії відносно легко порушуються за рахунок локального розкручування подвійної спіралі при вбудовуванні інтеркалятора.

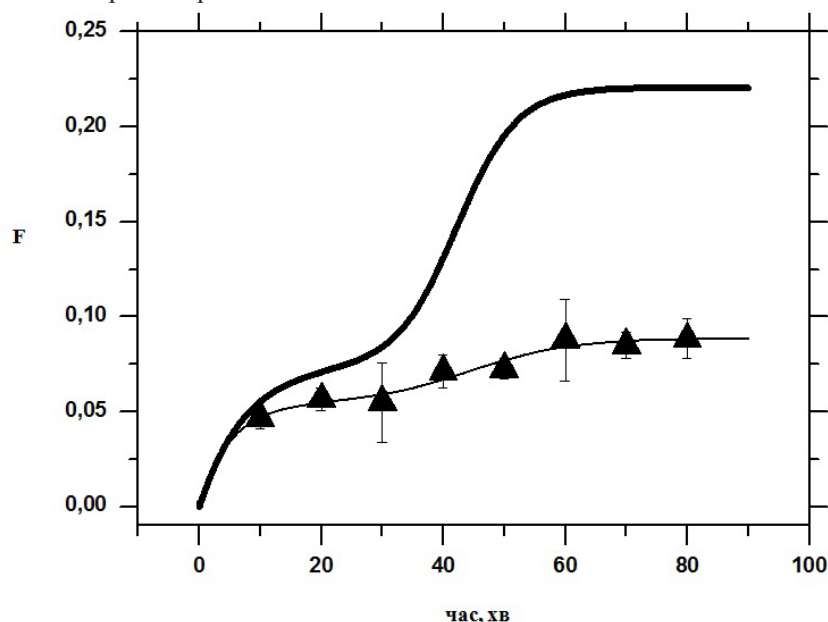


Рис. 3. Залежність відносного вмісту  $F$  ДНК у хвостах комет від часу електрофорезу при додаванні 1000 мкг/мл хлорокіну. Суцільні криві – результат інтерполяції. Для порівняння наведена кінетична крива (жирна) за відсутності інтеркалятора

Окремо були проведені експерименти, в яких препарати попередньо витримували в розчині з 1000 мкг/мл хлорокіну, після чого здійснювали стандартний кометний електрофорез без додавання інтеркалятора до електрофоретичного буферу. Цікаво, що в цьому разі 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. 4). Тобто за таких умов експерименту ми практично не спостерігаємо ефекту дії інтеркалятора. На відміну від попередніх дослідів, коли хлорокін був наявний протягом усього часу електрофорезу, забезпечуючи постійну дестабілізацію ДНК-білкових взаємодій у місцях фіксації петель, у цих експериментах дія інтеркалятора є тимчасовою. Виходячи з отриманих результатів, ми бачимо, що за таких умов можливе практично повне відновлення усіх зв'язків між ДНК та білками, що стабілізують петельні домени.

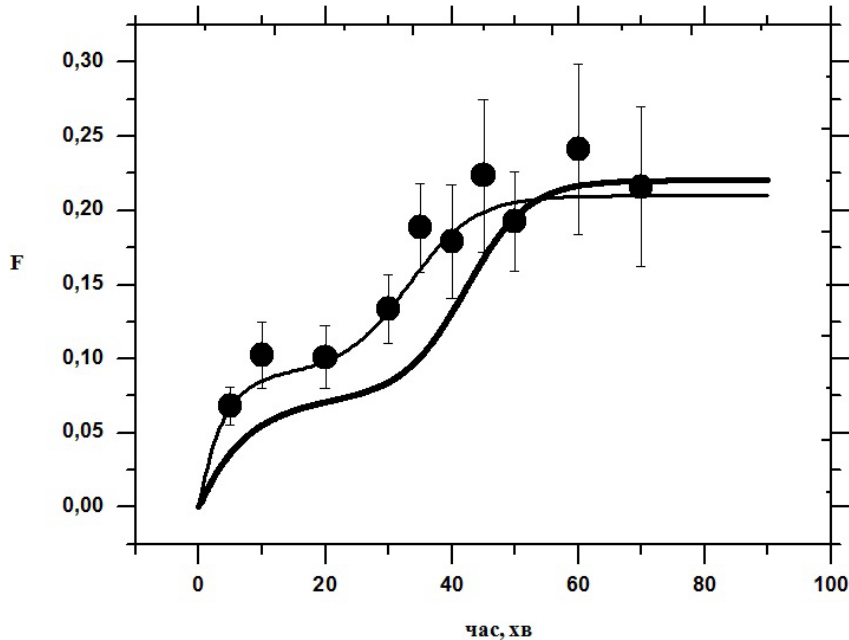


Рис. 4. Залежність відносного вмісту  $F$  ДНК у хвостах комет від часу електрофорезу після попередньої обробки 1000 мкг/мл хлорокіну. Суцільні криві – результат інтерполяції. Для порівняння наведена кінетична крива (жирна) за відсутності інтеркалятора

Отже, частина петельних доменів ДНК, розміри яких не перевищують 200 тисяч пар нуклеотидів, можуть мігрувати під дією електричного струму під час кометного електрофорезу. Наші експерименти показують, що більшість таких петель стабілізується відносно слабкими зв'язками між ДНК і білками, які можуть бути порушені за рахунок локального розкручування подвійної спіралі в місцях таких взаємодій. Саме це і спостерігається при додаванні високих концентрацій інтеркалятора хлорокіну. Однак було виявлено, що така дестабілізація є оборотною: після припинення дії інтеркалятора дані зв'язки можуть відновлюватись, а відповідно, відновлюються також петельні домени, що стабілізуються за рахунок цих взаємодій.

Прикладом таких зв'язків можуть бути нещодавно описані в літературі взаємодії типу «ДНК-СТCF-когезин», що забезпечують фіксацію досить великої кількості петельних доменів. У цьому разі білок СТCF взаємодіє з ДНК у специфічних сайтах зв'язування, а когезин замикається в кільце навколо подвійної спіралі в межах цих сайтів. При цьому обидва білки також взаємодіють між собою [11, 12]. Унаслідок локального розкручування подвійної спіралі при вбудовуванні інтеркалятора відбувається порушення зв'язків між ДНК і білком СТCF, але не між СТCF та когезином. Оскільки СТCF і когезин залишаються фізично зв'язаними між собою, після припинення впливу інтеркалятора досить легко відновлюється зв'язок між білком СТCF і його специфічним сайтом зв'язування на ДНК, а відповідно, відновлюється і власне петельний домен, який стабілізується за рахунок такої взаємодії.

Аналогічний ефект спостерігається після лізису клітин за наявності високої концентрації солі (наприклад, як при лізисі клітин для кометного електрофорезу). При обробці 2,5 М NaCl має відбуватися дисоціація білка СТCF від ДНК, але не порушення його взаємодії

з когезином. Відповідно, після повернення до фізіологічних умов відновлюється як взаємодія CTCF з ДНК, так і петельні домени. На противагу цьому, у разі тотальної білкової денатурації (наприклад, сечовиною чи додецилсульфатом натрію) руйнування петель ДНК є необоротним: кінетика виходу ДНК під час електрофорезу подібна до такої, як за умов постійної наявності 1000 мкг/мл хлорокіну протягом електрофорезу [1]. Таким чином, отримані нами результати узгоджуються з моделлю фіксації петельних доменів ДНК за допомогою комплексу білків CTCF та когезину [12].

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Чопей М. И., Афанасьєва К. С., Сиволоб А. В. Интеркаляция белков в ДНК как один из основных способов фиксации наиболее стабильных петельных доменов хроматина // Укр. биохим. журнал. 2014. Т. 86. № 4. С. 110–118.
2. Afanasieva K., Chopoi 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.
3. Afanasieva 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. Bickmore W. A. The spatial organization of the human genome // Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 2013. Vol. 14. N 19. P. 67–84.
5. Cook P. R. A model for all genomes: the role of transcription factories // J. Mol. Biol. 2010. Vol. 395. N 1. P. 1–10.
6. Kadauke S., Blobel G. A. Chromatin loops in gene regulation // Biochim. Biophys. Acta. 2009. Vol. 1789. N 1. P. 17–25.
7. Markaki Y., Gunkel M., Schermelleh L. et al. Functional nuclear organization of transcription and DNA replication: a topographical marriage between chromatin domains and the interchromatin compartment // Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 2010. Vol. 75. P. 475–492.
8. McGhee J. D., von Hippel P. H. Theoretical aspects of DNA-protein interactions: cooperative and noncooperative binding of large ligands to a one-dimensional homogeneous lattice // J. Mol. Biol. 1974. Vol. 86. P. 469–489.
9. Millau J-F., Gaudreau L. CTCF, cohesin, and histone variants: connecting the genome // Biochem. Cell Biol. 2011. Vol. 89. P. 505–513.
10. Phillips J. E., Corces V. G. CTCF: master weaver of the genome // Cell. 2009. Vol. 137. N 7. P. 1194–1211.
11. Rubio E. D., Reiss D. J., Welsh P. L. et al. CTCF physically links cohesin to chromatin // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2008. Vol. 105. N 24. P. 8309–8314.
12. Sanborn A. L., Rao S. S. P., Huang S. et al. Chromatin extrusion explains key features of loop and domain formation in wild-type and engineered genomes // Proc. Natl. Acad. Sci USA. 2015. Vol. 112. N 47. E6456–E6465.
13. Schneider R., Grosschedl R. Dynamics and interplay of nuclear architecture, genome organization, and gene expression // Genes Dev. 2007. Vol. 21. N 3. P. 3027–3043.
14. Van Bortle K., Corces V. G. Nuclear organization and genome function // Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 2012. Vol. 28. P. 163–187.
15. Zuleger N., Robson M. I., Schirmer E. C. The nuclear envelope as a chromatin organizer // Nucleus. 2011. Vol. 2. N 5. P. 339–349.

Стаття: надійшла до редакції 05.10.16

доопрацьована 24.11.16

прийнята до друку 29.11.16

## INFLUENCE OF DNA-INTERCALATORS ON STABILITY OF DNA LOOP DOMAINS

**M. Chopei, V. Olefirenko, K. Afanasieva, A. Sivolob**

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

DNA loop domains as key element at higher levels of interphase chromatin organization are involved in a number of activities within cell nucleus (transcription, its regulation, DNA replication and repair). It is very important to understand the mechanisms of loop formation and stabilization, DNA-protein interactions that involved in those processes – the issues which remain far from being clear. In our study we focused on investigation of organization and stabilization of DNA loop domains with contour length up to 200 kilobases using the comet assay technique. The results show that applying of high concentration of intercalating agent chloroquine caused the disruption of DNA-protein interactions involved in the loop domain formation that resulted in chromatin reorganization and significantly affected DNA migration during electrophoresis. However, such destabilization is reversible: most of interactions can be restored after chloroquine removal. Our results are consistent with the model of DNA loop domain stabilization by complex of CTCF and cohesin proteins.

*Keywords:* chromatin, DNA loop domains, comet assay, chloroquine.