

АФАНАСЬЄВА К.С.✉, **ЛОЗОВИК О.В.**, **ОЛЕФІРЕНКО В.В.**, **СИВОЛОБ А.В.***Київський національний університет імені Тараса Шевченка,**Україна, 01601, м. Київ, вул. Володимирська, 64/13, e-mail: aphon@ukr.net*✉ *aphon@ukr.net, (097) 308-76-45*

ЗМІНИ ПЕТЕЛЬНОЇ ОРГАНІЗАЦІЇ ХРОМАТИНУ НА РІЗНИХ СТАДІЯХ АКТИВАЦІЇ ЛІМФОЦИТІВ

В еукаріотичному ядрі довгі молекули ДНК існують у вигляді складного нуклеопротеїнового комплексу – хроматину. Найнижчий (нуклеосомний) рівень організації хроматину доволі добре охарактеризований: відома молекулярна організація нуклеосом, детально описані механізми взаємодії ДНК та білків у її складі, фактори, що впливають на такі взаємодії тощо. Наднуклеосомна упаковка хроматинової фібрили та її просторова організація, навпаки, залишаються чи не найбільшими загадками клітинного ядра. За останні десять років великий крок уперед у розумінні цих питань був зроблений завдяки розробці нових більш чутливих підходів, основними з яких є метод фіксації конформації хромосом (Chromosome Conformation Capture, 3C) та його численні варіації [1–3]. Дані, отримані за допомогою цих підходів, вказують на наявність у ядерному просторі відносно автономних компартментів хроматину, які складаються із топологічно-асоційованих доменів – ділянок фібрили (~0,5–1 млн пар основ), всередині яких спостерігається висока частота контактів [4, 5]. Значна частина таких доменів представлена петлями хроматину, які виникають в основному в результаті взаємодії енхансерів із відповідними промоторними ділянками і, як наслідок, можуть суттєво відрізнитися у різних типах клітин залежно від їх транскрипційної активності, стадії клітинного циклу тощо [4, 6, 7].

Одним із підходів, що дозволяє досліджувати петельні домени ДНК, є метод електрофорезу ізольованих клітин або кометного електрофорезу [8–10]. Після іммобілізації клітин у шарі легкоплавкої агарози та їх лізису при високій концентрації солі і за наявності детергентів у гелі залишаються структури – нуклеоїди, які містять негативно надспіралізовані (у результаті дисоціації гістонів) петельні домени ДНК, закріплені на нечутливих до умов лізису ядерних білках [10, 11]. Власне, такі нуклеоїди і піддаються електрофорезу: під дією електричного

струму спостерігається міграція ДНК до аноду (формується електрофоретичний трек, який називається «хвостом комети»). Результати дослідження кінетики формування електрофоретичного треку свідчать, що у випадку інтактних нуклеоїдів за нейтральних значень рН міграція ДНК при електрофорезі забезпечується витягуванням до аноду надспіралізованих петельних доменів [8, 9]. Аналіз кінетичних параметрів дозволяє встановити ряд важливих характеристик петель ДНК та дослідити особливості їх організації у клітинах різних типів та при різних функціональних станах [9, 12, 13].

У пропонованій роботі представлені результати експериментів, спрямованих на дослідження організації петель ДНК у лімфоцитах на різних етапах після їхньої стимуляції до поділу інтерлейкіном 2.

Матеріали і методи

Клітинну фракцію лімфоцитів отримували із цільної крові шляхом зонального центрифугування у градієнті щільності (Histopaque 1077, Sigma, США) відповідно до рекомендацій виробника. Ізольовані клітини двічі відмивали у 0,15 М NaCl та культивували у середовищі RPMI 1640 із антибіотиками та 10 % ембріональною телячою сироваткою (Gibco, США). Для активації лімфоцитів та стимуляції їх до поділу у культуральне середовище додавали рекомбінантний інтерлейкін 2 (1000 units/ml, Біотех-фарм, Росія). Клітини культивували при 37°C протягом 4, 16, 24 та 44 годин.

Після завершення культивування лімфоцити осаджували центрифугуванням, відмивали у розчині Хенкса і отриману суспензію використовували для приготування слайдів – іммобілізованих на поверхні предметного скла клітин в агарозних блоках. Для цього 50 мкл суспензії інтактних або активованих (бласттрансформованих) лімфоцитів змішували із 100 мкл 1 % легкоплавкої агарози (Sigma, США), 25 мкл суміші наносили на предметні скельця, покриті

тонким шаром 1 %-го розчину тугоплавкої агарози. Після полімеризації агарози слайди переносили у лізуючий буфер (2,5 М NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 % Triton X-100 (Ferak, Німеччина)) на 2–3 години. Після завершення процедури лізису слайди інкубували у буфері TBE протягом 10 хв (89 mM Tris-borat, 2 mM EDTA, pH 7,5), декілька слайдів поміщали у горизонтальний електрофоретичний апарат і проводили електрофорез у тому ж буфері при напруженні 1 В/см та силі струму 300 мА. Для аналізу кінетики міграції петель ДНК під час електрофорезу слайди виймали через кожні 5 або 10 хвилин – електрофорез продовжували до тих пір, поки досліджувані параметри (див. нижче) не переставали змінюватися.

Препарати фарбували барвником DAPI (Sigma, США) і аналізували під флуоресцентним мікроскопом, приєднаним до камери Canon EOS 1000 D. За допомогою пакету програм CometScore (TriTec, США) з кожного слайда для 100–200 випадково обраних клітин оцінювали частку ДНК у хвостах комет та 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 най-

віддаленішого кінця хвоста. Для визначення розмірів найдовших петель ДНК в парах нуклеотидів у хвостах комет отримане значення довжини хвоста у мікрометрах 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).

Результати та обговорення

У цій роботі ми досліджували кінетику виходу петель ДНК при кометному електрофорезі лімфоцитів периферичної крові людини, які були стимульовані до поділу *in vitro* рекомбінантним інтерлейкіном 2. Для дослідів були обрані клітини, що культивувалися у середовищі з цитокіном протягом 4, 16, 24 та 44 годин. Вибір такого часу зумовлений особливостями клітинних процесів, що відбуваються в лімфоцитах у відповідь на їх бласттрансформацію інтерлейкіном 2 (див. далі).

На рис. 1 наведена крива кінетики виходу петель ДНК в інтактних нестимульованих до поділу лімфоцитах, а також приклади типових зображень комет на різних етапах електрофорезу.

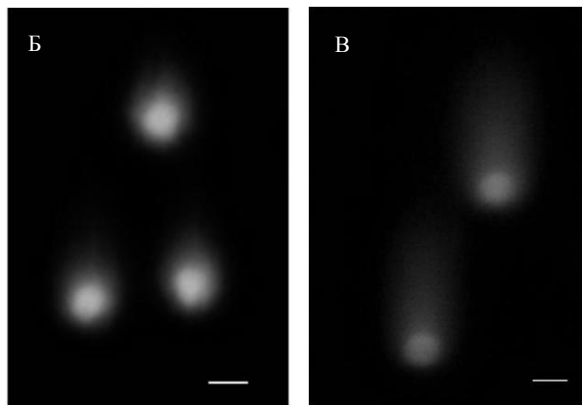
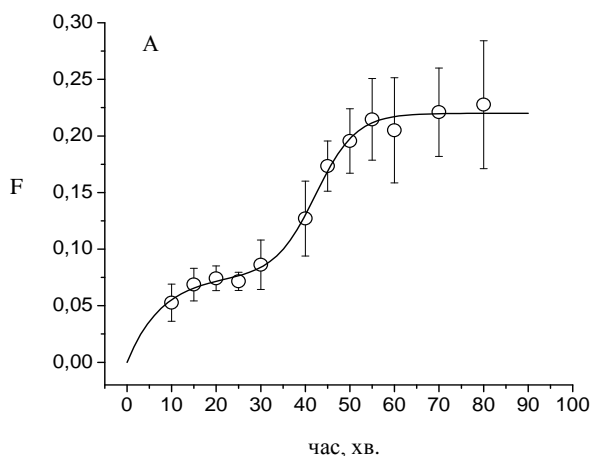


Рис. 1. Кінетика виходу ДНК при електрофорезі інтактних лімфоцитарних нуклеоїдів (А) та приклади їх типових зображень після 30 (Б) та 70 (В) хвилин електрофорезу. F – відносна частка ДНК у хвостах комет. Суцільна лінія – результат інтерполяції. Шкала – 10 мкм.

Міграція до аноду невеликих петель ДНК з контурною довжиною до 40 тис. пар основ спостерігається на ранніх хвилинах електрофо-

резу (перше плато кривої на рис. 1а); другий етап виходу забезпечується витягуванням довгих (понад 100 тис. пар основ) петельних доме-

нів. У попередніх дослідженнях нами було показано, що двоступеневість виходу ДНК у хвіст комети відображає особливості організації петель у нуклеоїді: перший швидкий рух здійснюють петлі, розміщені на поверхні нуклеоїду [9, 12]. Їх міграція не залежить від рівня надспіралізації, що може свідчити про наявність одно- або дволанцюгових розривів у таких поверхневих петлях. Великі за розміром петельні домени розташовуються всередині нуклеоїда, їх вихід суттєво залежить від топологічного стану: релаксація петель суттєво пришвидшує їх рух [9, 13]. Слід зазначити, що навіть при тривалому електрофорезі здатною до міграції залишається невелика кількість петель – частка ДНК у хвостах комет не перевищує 1/4 від усього геному. Вірогідно, решта ДНК представлена занадто великими петлями, розмір яких перевищує роздільну здатність гелю.

Кінетика формування хвоста комети при електрофорезі клітин чотиригодинної та шістнадцятигодинної культури не відрізнялася від такої ж, отриманої для інтактних лімфоцитів (дані не наведено). Відомо, що на 4-й годині після взаємодії інтерлейкіну 2 із відповідними рецепторами на поверхні Т-клітин спостерігається зміна експресії значної кількості генів, які першими «реагують» на цей стимул. Серед них, зокрема, ті, що кодують білки-рецептори клітинної поверхні, фактори сигнальної трансдукції та білки, що забезпечують підготовку клітини до G1-стадії клітинного циклу [14, 15]. Через 16 годин стимуляції цитокіном у клітинах накопичуються білкові продукти цих генів – клітини вступили в пресинтетичну стадію. Очевидно, що така початкова зміна метаболізму клітини не відображається на організації петельних домів ДНК нуклеоїду – принаймні, у межах розділення кометного електрофорезу.

Цікавіше поведуть себе нуклеоїди, отримані після лізису 24-годинної лімфоцитарної культури: зберігаючи характерну для інтактних лімфоцитів двоступеневість виходу петель ДНК під час електрофорезу, такі нуклеоїди характеризуються збільшеною у порівнянні з лімфоцитами часткою поверхневих петель, що мігрують до аноду на ранніх хвилинах електрофорезу (рис. 2). Відносна кількість внутрішніх петель у лімфоцитах зменшується майже вдвічі (сумарна частка ДНК, яка здатна до міграції під час електрофорезу, залишається однаковою для двох типів клітин).

На 24-й годині культивування більшість

лімфоцитів, що були бласттрансформовані, знаходяться на пізній G1-стадії і лише незначна їх частка може розпочинати синтез ДНК [16]. Активний синтез РНК та білків у цей період зумовлює збільшення розмірів цитоплазми та ядра клітин, крім того, спостерігається еухроматинізація ядер [17]. Таким чином, у процесі активації лімфоцитів все більше ділянок ДНК переміщуються на периферію ядра, а отже, вони можуть швидко рухатися до аноду: спостерігається збільшення частки ДНК на першій стадії електрофорезу. Очевидно, що такий перерозподіл супроводжується зменшенням кількості петель, які розміщуються всередині нуклеоїду.

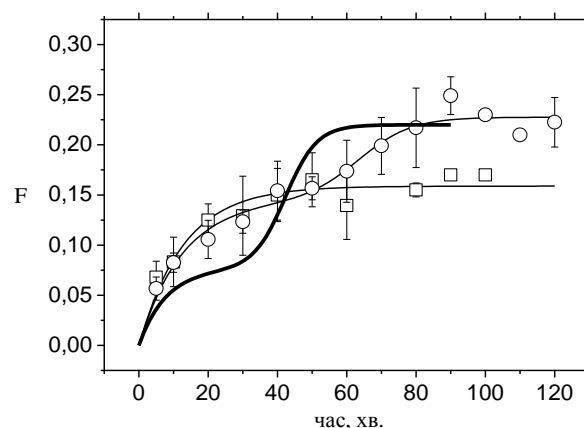


Рис. 2. Кінетика виходу петель у лімфоцитах після їх культивування з інтерлейкіном 2 протягом 24 (○) та 44 (□) годин. Суцільна жирна крива – неактивовані лімфоцити (з рис. 1).

Підвищена, у порівнянні з інтактними лімфоцитами, частка ДНК у хвостах комет на ранніх хвилинах електрофорезу зберігається і для нуклеоїдів, отриманих після лізису клітин довготривалої культури (44 години) (рис. 2). Проте, незважаючи на те, що клітини на цьому етапі вже пройшли S-фазу і кількість ДНК в нуклеоїдах в два рази більша ніж у тих, що були отримані після лізису клітин стадії G1 (24-годинна культура), вихід ДНК є доволі низьким. Довготривала дія електричного поля забезпечує міграцію незначної кількості петель ДНК – фактично навіть на пізніх хвилинах електрофорезу хвіст комети формують лише поверхневі петлі. Цей результат може бути свідченням того, що у клітин, які готуються до вступу в мітотичний поділ, внутрішні петлі (якщо такі залишаються взагалі) мають розмір, що значно перевищує 150 тис. пар основ.

Висновки

Результати оцінки кінетики виходу ДНК при кометному електрофорезі інтактних та активованих до поділу лімфоцитів свідчать, що на пізній G1-стадії клітинного циклу спостерігається перерозподіл петельних доменів ДНК: зростає частка невеликих за розміром поверхневих петель на фоні зменшення петель внутрішніх. У клітин, які перебувають на стадії G2, залишається підвищена, у порівнянні з нестимульова-

ними лімфоцитами, частка поверхневих петель. Проте особливістю таких клітин є майже повна відсутність внутрішніх петель такого розміру, що здатні мігрувати під час електрофорезу. Таким чином, зміна функціонального стану клітини супроводжується масштабними змінами у петельній організації, і такі зміни можуть бути зареєстровані за допомогою кометного електрофорезу.

Література

1. Dekker J., Marti-Renom M.A., Mirny L.A. Exploring the three-dimensional organization of genomes: interpreting chromatin interaction data // *Nat. Rev. Genet.* – 2013. – V. 14. – P. 390–403. doi: 10.1038/nrg3454.
2. Dekker J., Mirny L. The 3D genome as moderator of chromosomal communication // *Cell.* – 2016. – V. 164. – P. 1110–1121. doi: 10.1016/j.cell.2016.02.007.
3. Dixon J.R., Gorkin D.U., Ren B. Chromatin domains: the unit of chromosome organization // *Mol. Cell.* – 2016. – V. 62. – P. 668–680. doi: 10.1016/j.molcel.2016.05.018.
4. Rao S.S.P., Huntley M.H., Durand N.C., Stamenova E.K., Bochkov I.D., Robinson J.T., Sanborn A.L., Machol I., Omer A.D., Lander E.S., Aiden E.L. A 3D map of the human genome at kilobase resolution reveals principles of chromatin looping // *Cell.* – 2014. – V. 159. – P. 1665–1680. doi: 10.1016/j.cell.2014.11.021.
5. Dixon J.R., Selvaraj S., Yue F., Kim A., Li Y., Shen Y., Hu M., Liu J.S., Ren B. Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions // *Nature.* – 2012. – V. 485. – P. 376–380. doi: 10.1038/nature11082.
6. Cook P.R. A model for all genomes: the role of transcription factories // *J. Mol. Biol.* – 2010. – V. 395. – P. 1–10. doi: 10.1016/j.jmb.2009.10.031.
7. Tang Z., Luo O. J., Li X., Plewczynski D., Li G., Ruan Y. CTCF-Mediated Human 3D Genome Architecture Reveals Chromatin Topology for Transcription // *Cell.* – 2015. – V. 163. – P. 1611–1627. doi: 10.1016/j.cell.2015.11.024.
8. Afanasieva K., Zazhytska M., Sivolob A. Kinetics of comet formation in single-cell gel electrophoresis: loops and fragments // *Electrophoresis.* – 2010. – V. 31. – P. 512–519. doi: 10.1002/elps.200900421.
9. Afanasieva K., Chopei M., Zazhytska M., Vikhрева M., Sivolob A. DNA loop domain organization as revealed by single-cell gel electrophoresis. *Biochim. Biophys. Acta.* – 2013. – V. 1833. – P. 3237–3244. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.09.021.
10. Shaposhnikov S.A., Salenko V.B., Brunborg G., Nygren J., Collins A.R. Single-cell gel electrophoresis (the comet assay): loops or fragments // *Electrophoresis.* – 2008. – V. 29. – P. 3005–3012. doi: 10.1002/elps.200700921.
11. Collins A.R., Oscoz A.A., Brunborg G., Gaivao I., Giovannelli L., Kruszewski M., Stetina R., Smith C.C. The comet assay: topical issues // *Mutagenesis.* – 2008. – V. 23. – P. 143–151. doi: 10.1093/mutage/gem051.
12. Afanasieva K., Chopei M., Lozovik A., Semenova A., Lukash L., Sivolob A. DNA loop domain organization in nucleoids from cells of different types // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2017. – V. 483. – P. 142–146. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.12.177.
13. Zazhytska M., Afanasieva K., Chopei M., Vikhрева M., Sivolob A. Influence of chloroquine on kinetics of single-cell gel electrophoresis // *Biopolym.Cell.* – 2012. – V. 28. – P. 292–297. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000062>.
14. Mzali R., Seguin L., Liot C., Auger A., Pacaud P., Loirand G., Thibault C., Pierre J., Bertoglio J. Regulation of Rho signaling pathways in interleukin-2-stimulated human T-lymphocytes. *FASEB J.* – 2005. – V. 219. – P. 1911–1933. doi: 10.1096/fj.05-4030fje.
15. Kaplan O., Aebersold P., Cohen J.S. Metabolism of peripheral lymphocytes, interleukin-2 activated lymphocytes and tumor-infiltrating lymphocytes from 31P NMR studies // *FEBS Lett.* – 1989. – V. 258. – P. 55–58.
16. Bender M.A., Prescott D.M. DNA synthesis and mitosis in cultures of human peripheral leukocytes // *Exp. Cell Res.* – 1962. – V. 27. – P. 221–229.
17. Bain B.J. *Blood cells: a practical guide.* – Oxford: Blackwell Publishing, 2006. – 476 p.

AFANASIEVA K.S., LOZOVIK O.V., OLEFIRENKO V.V., SIVOLOB A.V.

Taras Shevchenko National University of Kyiv,

Ukraine, 01601, Kyiv, Volodymyrska str., 64/13, e-mail: aphon@ukr.net

CHANGES IN LOOP ORGANIZATION OF CHROMATIN AT DIFFERENT STAGES OF LYMPHOCYTE ACTIVATION

Aim. Aim was to investigate possible changes in the DNA loop domain organization upon activation of human lymphocytes. The rationale for this task is the knowledge that the chromatin looping plays an important role in transcription regulation and thus may vary depending on cell functional state. **Methods.** The kinetics of DNA loop migration during single cell gel electrophoresis (the comet assay) was studied for nucleoids obtained from human lymphocytes and lym-

phoblasts activated to proliferation by interleukin 2. **Results.** Three part of DNA were observed in nucleoids: DNA on the nucleoid surface, loops up to ~150 kb inside the nucleoid, and larger loops that cannot migrate. An essential redistribution of the loop domains between the inside and surface fractions occurs upon activation (at G1 phase). Later on (at the end of S phase) the inside fraction becomes lower in favor of the large loops. **Conclusions.** Changes in the cell functional state are accompanied by large-scale changes in the loop domain organization that can be detected by the comet assay.

Keywords: DNA loops, nucleoid, comet assay, lymphocytes, lymphoblasts.