МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ имени М.В. ЛОМОНОСОВА НИИ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ имени А.Н. БЕЛОЗЕРСКОГО МГУ

На правах рукописи

Стрелкова Ольга Сергеевна

ПРОСТРАНСТВЕННО-ВРЕМЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ВЫСШИХ УРОВНЕЙ КОМПАКТИЗАЦИИ ДНК ЭУКАРИОТ В КЛЕТОЧНОМ ЦИКЛЕ

03.03.04 - Клеточная биология, цитология и гистология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель - д.б.н. Киреев Игорь Игоревич

Москва-2018

Оглавление

1 Введение7
1.1 Актуальность темы исследования7
1.2 Цель работы
1.3 Задачи исследования
1.4 Новизна полученных результатов
1.5 Методология и методы диссертационного исследования 10
1.6 Апробация результатов исследования 10
2 Обзор литературы 11
2.1 Современные представления о пространственной организации
хроматина11
2.1.1 Нуклеосомная компактизация ДНК. Гистоны и их
модификации11
2.1.2 Структурная организация 30-нм фибриллы хроматина 13
2.1.3 Модели высших уровней организации хроматина
2.2 Организация генома во время максимальной конденсации
хроматина в митозе18
2.3 Влияние межгенных взаимодействий на физиологические
процессы в клетке 19
2.4 Методические подходы, используемые для изучения
организации генома в ядре20
2.4.1 Анализ поведения искусственных хроматиновых локусов в
живых клетках
2.4.2 Топология хромосомных территорий, визуализированных с
помощью FISH21

2.4.3	Молекулярные	С-методы	исследования,	выявляющие
геномные взаим	юдействия			23
2.4.4 Ka	артирование геном	ных взаимо	действий	25
2.5 0	Структурная орган	низация хр	оматина в то	опологически
ассоциированные	е домены			
2.6 CT	труктурные измене	ения топол	огически ассо	циированных
доменов во время	н митотической ком	ипактизации		
2.7 Гетер	огенная организац	ия различны	іх фракций хро	матина 33
2.8 Реп.	ликация ДНК в кле	тках эукари	ОТ	
2.8.1 M	олекулярные аспек	ты процессо	а репликации	
2.8.2 H	ачало и распростр	анение репли	икации на моле	куле ДНК 35
2.8.3 Ди	инамика репликаци	и эу- и гете	рохроматиновс	ой фракции36
Материалы	и методы			40
3.1 Работ	а с прокариотичеси	кими клетка	МИ	40
3.1.1 M	олекулярное клонир	рование		40
3.1.2 П	роверка эффектив	ности рестр	рикции	
3.1.3 Be	ыращивание бакте	риальной ку.	льтуры	
3.1.4 П	олучение компетен	тных клетс	Эк	
3.1.5 T _I	рансформация бакт	перий		43
3.2 Культ	гивирование эукари	иотических	клеток	44
3.2.1 Ky	ультура НТ1080			
3.2.2 Ky	ультура СНО			45
3.2.3 <i>3</i> 0	имораживание клеп	почных лини	ий эукариот	45
3.3 Транс	сфекция			
3.4 Репли	икативное мечение	и детекция	репликативной	метки 46
 2.8 Реп. 2.8.1 М 2.8.2 Н 2.8.3 Да Материалы 3.1 Работ 3.1 Работ 3.1.1 М 3.1.2 П 3.1.3 Ва 3.1.4 П 3.1.5 Т 3.2 Кулы 3.2.1 Ку 3.2.2 Ку 3.2.3 За 3.3 Трано 3.4 Репли 	ликация ДНК в кле Голекулярные аспект ачало и распростра инамика репликаци и методы са с прокариотичесн Голекулярное клонир роверка эффектив роверка эффектив ыращивание бактер олучение компетен олучение компетен олучение компетен олучение уфектив олучение компетен олучение компетен	етках эукари ты процесса анение репли и эу- и гетер кими клетка рование ности рестр риальной ку. тных клето перий иотических п почных лини и детекция р	от а репликации икации на моле рохроматиново рохроматиново ок ок клеток ий эукариот репликативной	34

3.5 Синхронизация клеточной популяции 47
3.6 Световая микроскопия 48
3.6.1 Прижизненные наблюдения
3.6.2 Микроскопия суперразрешения
3.7 Иммуноэлектронная микроскопия
<i>3.7.1 Фиксация с лизисом</i>
<i>3.7.2 Фиксация без лизиса52</i>
3.7.3 Процедура серебряного усиления
3.7.4 Обезвоживание, пропитка, изготовление срезов для
электронной микроскопии54
3.8 Микроинъекции 55
4. Результаты 57
4.1 Особенности структурной организации компактизованных
хроматиновых кластеров репликации во время S-фазы 57
4.1.1 Определение параметров клеточного цикла с помощью
прижизненных наблюдений57
4.1.2 Изучение пространственной организации репликации
хроматина с использованием микроскопии с суперразрешением 59
4.1.3 Исследование организации репликативных доменов с
помощью метода микроинъекции63
4.1.4 Ультраструктурная организация плотно конденсированных
кластеров хроматина во время репликативного синтеза
4.1.5 Высокоорганизованные хроматиновые локусы не
претерпевают глобальной деконденсации в процессе репликации 67
4.2 Способ укладки различных фракций хроматина в условиях
максимальной компактизации генома
4

8	Список сокращений	128
9	Список литературы	130

1 Введение

1.1 Актуальность темы исследования

Генетическая информация всех живых организмов закодирована в молекуле ДНК, которая обеспечивает не только хранение, но и реализацию этой информации. Молекула ДНК представляет собой матрицу, на которой записаны все данные, необходимые для функционирования живой системы. В эволюционно более прогрессивных организмах огромный по размеру геном упакован в специализированную клеточную органеллу - ядро. Это ДНК. требует высокой плотности упаковки что приводит К пространственным затруднениям, связанным с доступностью регуляторных факторов в процессах матричного синтеза. Дополнительной сложностью является гетерогенность упаковки ДНК, которая в значительной степени определяет статус транскрипционной активности.

На сегодняшний день с помощью методов молекулярной биологии подробно изучены строение и функции ДНК в системах *in vitro*, однако представление о ее поведении в нативных системах остается дискуссионным вопросом.

Для обеспечения передачи генетической информации из поколения в поколение, клетке необходимо пройти стадию удвоения генома с его последующим распределением в две дочерние клетки. Этот процесс, включающий раскручивание двуспиральной молекулы ДНК и синтез новых цепей по принципу комплементарности, подробно изучен на выделенной ДНК (Chagin et al., 2010). Однако каким образом происходит репликация в пространстве клеточного ядра на матрице ДНК, находящейся в сложно организованном комплексе с белками, остается непонятным. Особую сложность вносит то, что одновременно с репликацией, на матрице активных генов могут происходить процессы транскрипции, в то время как проблема неактивной гетерохроматиновой фракции заключается в плотной

упаковке хроматина, что может препятствовать доступу репликативных ферментов. На данный момент нет определенной точки зрения о том, что происходит со структурными доменами хроматина в процессе репликации, однако существуют различные гипотезы, требующие подтверждения (Голышев, Поляков, 2008; Blow, Ge, 2008).

1.2 Цель работы

Исследование пространственной организации репликативных доменов в процессе репликации и их реорганизации в ходе клеточного цикла.

1.3 Задачи исследования

- 1. Анализ ультраструктурных особенностей хроматина в момент репликативного синтеза
- Визуализация пространственно-временной динамики репликативных доменов для эухроматиновой фракции в интерфазе
- Анализ пространственного распределения сестринских хроматид в интерфазе
- 4. Анализ структурной организации хроматиновых доменов в составе конденсированных митотических хромосом

1.4 Новизна полученных результатов

В данной работе были изучены высшие уровни организации хроматина, вопрос о существовании которых в клетках животных на сегодняшний день подвергается сомнению. При помощи иммуноэлектронной микроскопии и оптической микроскопии суперразрешения было доказано, что эухроматин и гетерохроматин организованы в структуры высшего порядка - хромонемы. Было также показано, что в ходе синтеза ДНК репликативные домены не подвергаются глобальной декомпактизации. При этом репликация происходит по всей толщине этих доменов. Это наблюдение противоречит популярной гипотезе о существовании репликативных фабрик. В данной работе были разработаны наименее деструктивные методы пробоподготовки новосинтезированной ДНК для визуализации на ультраструктурном уровне, обеспечило что высокую достоверность полученных результатов.

В работе впервые была выдвинута и экспериментально доказана гипотеза динамической пластичности организации ДНК в составе эухроматиновой хромонемы в ходе репликации.

Результаты работы не просто описывают структурную организацию высших уровней компактизации генома, но и доказывают сохранение доменной организации в ходе клеточного цикла. Вопреки ранее высказанным предположениям об исчезновении топологически ассоциированных доменов (ТАД) во время митотической конденсации, нами было доказано, что такие ТАДы сохраняются как на ранних стадиях профазной компактизации, так и в метафазных хромосомах.

Результаты работы в полной мере доказывают существование высших уровней организации хроматина. Понимание принципов пространственной организации генома на разных уровнях упаковки ДНК, которая тесно связана с его функциональной активностью, является важным фактором при исследовании механизмов возникновения и развития патологических состояний, связанных с эпигенетической регуляцией. Таким образом, полученные в работе знания могут способствовать разработке новых терапевтических подходов.

1.5 Методология и методы диссертационного исследования

Используемые в данном исследовании методы являются одним из достоинств диссертационной работы. Благодаря разработке и использованию метода недеструктивного мечения ДНК, стало возможным наблюдать за пострепликативной фракцией хроматина, сохраняя нативную организацию ядра. Для ультраструктурного анализа был использован метод иммуноэлектронной микроскопии, a для получения статистически достоверных данных применялся метод высокопроизводительного анализа. Также в работе были использованы методы микроскопии суперразрешения, позволяющие наблюдать за объектами, находящимися за пределами разрешающей способности оптической микроскопии.

1.6 Апробация результатов исследования

Результаты данного исследования были представлены на двух всероссийских и пяти международных конференциях: международная конференция "EMBO Workshop Nuclear function and cell fate choice" (Киллини, 2016); международный симпозиум "Super-resolution in different dimensions" (Москва, 2015); международная конференция "Labeling and Nanoscopy" (Гейдельберг, 2014); XVII Всероссийский симпозиум "Структура и функции клеточного ядра " (Санкт-Петербург, 2014); Международная Научно-практическая конференция молодых ученых В РУДН "SCIENCE4HEALTH 2012" (Москва, 2012); международный симпозиум "Current Role of Histochemistry in Preclinical and Clinical Research" (Мюнхен, 2011); 1 Всероссийская конференция "Внутриклеточная сигнализация, транспорт, цитоскелет" (Санкт-Петербург, 2011).

2 Обзор литературы

2.1 Современные представления о пространственной организации хроматина

2.1.1 Нуклеосомная компактизация ДНК. Гистоны и их модификации

Размеры линейной молекулы ДНК значительно превышают объем эукариотического ядра. Вследствие этого возникает необходимость в плотной компактизации генома в ограниченном пространстве. Специальные ядерные белки осуществляют упаковку ДНК и, в совокупности с ней, образуют хроматин.

Конденсация такой сложной структуры происходит поэтапно. На сегодняшний день наиболее изучен первый уровень компактизации ДНК - упаковка в нуклеосомные фибриллы. Эти структуры диаметром 10 нм впервые увидели в электронный микроскоп и дали им название "бусины на нити" (Olins, Olins, 1974). На данном этапе в компактизации ДНК принимают участие гистоновые белки Н2А, Н2В, Н3 и Н4 (рис. 1). Они образуют октамерный комплекс, вокруг которого закручивается фрагмент ДНК размером 147 п.н. (Luger et al., 1997).

Нуклеосомные гистоны относятся к числу наиболее консервативных белков, однако на сегодняшний день известно большое число их вариантных форм (Volle, Dalal, 2014). Дополнительные различия между нуклеосомами вследствие посттрансляционных модификаций возникают гистонов. Основными модификациями являются метилирование, ацетилирование, фосфорилирование и убиквитинирование. Разнообразие нуклеосомных частиц. возникающее вследствие этого, определяет эпигенетическую регуляцию генома, а также влияет на функциональные свойства хроматина. Существует гипотеза "гистонового кода", В которой постулируется

регуляторная роль гистоновых модификаций в экспрессии генов (Jenuwein, Allis, 2001). Ряд современных исследований подтверждает истинность данной гипотезы. Было доказано, что нуклеосомы, содержащие H3K4me и H3K9me гистоны, ассоциированы с транскрипционными сайтами и локализованы на активных генах, в то время как неактивные гены содержат H3K27 метилированный и H4K20 метилированный гистоны (Gross et al., 2015). Таким образом, модификации гистонов влияют на функционирование процессов матричного синтеза и определяют степень компактизации хроматина.



Рисунок 1. Модель начального уровня организации ДНК. Показана сборка нуклеосомы (Shaytan et al., 2015).

Первый уровень компактизации ДНК в нуклеосомы уже создает пространственные затруднения для динамических процессов в клетке. Для осуществления матричного синтеза существуют комплексы белков, которые очищают ДНК от гистонов, делая ее доступной для факторов транскрипции или репликации. Комплексы ремоделирования хроматина обладают хеликазной активностью, а их главным элементом являются субъединицы, обладающие АТФазной активность, такие как SWI/SNF, NURF, ACF и другие (Bradley et al., 1996). Таким образом, матрица временно утрачивает нуклеосомную компактизацию и становится доступной для полимераз. Интересно, что гистоны не имеют сродства с определенными нуклеотидными последовательностями, а значит, и сборка нуклеосом после синтеза каждый раз будем происходить по-новому. Подобного рода пластичность, вероятно, влияет на принципы компактизации высших уровней организации хроматина.

2.1.2 Структурная организация 30-нм фибриллы хроматина

Последующие этапы компактизации на данный момент не доказаны и Некоторые являются дискуссионным вопросом. исследователи лаже постулируют полное отсутствие высших уровней орагнизаци генома. Опираясь на данные, полученные методами криоэлектронной микроскопии и рентгеноструктурного анализа, была выдвинута гипотеза "polymer melt", которая предполагает, что наивысший уровень упаковки хроматина представляет собой 10-нм фибриллу (Eltsov et al., 2008; Maeshima et al., 2014). Однако классическим взглядом на организацию хроматина является иерархическая модель упаковки генома (Felsenfeld, Groudine, 2003; Li, Reinberg, 2011). В этом случае следующим этапом в компактизации хроматина является укладка в 30-нм фибриллу. С помощью гистонового белка Н1 нуклеосомная фибрилла сворачивается в структуры заданного диаметра. Существует несколько точек зрения относительно того, как именно организована 30-нм фибрилла. Одна из моделей предполагает соленоидный тип укладки, в котором нить плотно упакованных нуклеосом образует спиральные витки. На один виток такой суперспирали приходится 6-7 нуклеосом. Считается, что гистон Н1 обеспечивает взаимодействия между соседними нуклеосомами, образуя плотную спираль, а его удаление

приводит к разворачиванию структуры до 10-нм фибриллы (Fang et al., 2016). По другой теории, на данном уровне компактизации существует некоторая дискретность, а 30-им фибрилла состоит из нуклеомеров. В составе нуклеомера образуются два витка нуклеосомной фибриллы, по 4 нуклеосомы в каждом. Эти структуры объединяются в 30-нм фибриллу, которая получила сверхбусины (супербиды) И преставляет собой линейное название чередование нуклеомеров (Ruo et al., 1997). Этот уровень компактизации уплотнение обеспечивает сорокократное ДНК, которого, вероятно, недостаточно для упаковки генов. Предположительно, существуют более высокие уровни компактизации хроматина, которые, в конечном счете, определяют его параметры в интерфазном ядре.

2.1.3 Модели высших уровней организации хроматина

На сегодняшний день не существует определенной точки зрения относительно организации высших уровней укладки хроматина. Неизвестно, как происходит компактизация сложноорганизованных хроматиновых элементов в пространстве ядра, а впоследствии и в митотических хромосомах.

работ Ряд указывает на существование высших уровней компактизации хроматина. Одной из предполагаемых моделей таких уровней организации является радиально-петлевая модель (Laemmli et al., 1992). В ней постулируется наличие специфических белков, которые связываются с участками ДНК и образуют гигантские петли, или домены. Таким образом, более высокий уровень организации хроматина связан не С его дополнительной спирализацией, а с образованием поперечной петлистой структуры. Развернутые петли ДНК можно увидеть, если выделенные ядра обработать 2 M NaCl. Это приводит к удалению всех гистонов, но целостность ядра при этом сохраняется. Визуально вокруг ядра появляется

"гало", состоящее из огромного числа петель ДНК. Основание этих петель закрепляется внутри ядра на участках негистоновых белков. Следовательно, после удаления гистонов основания петлевых доменов ДНК остаются связанными с остовом ядра - ядерным "скэффолдом". Оказалось, что участки начала репликации коррелируют с основаниями петель ДНК, а значит, существует прямая связь между упаковкой матрицы в петли и ее организацией в репликоны. Известны последовательности ДНК, которые отвечают за "заякоривание" хроматина на белковом остове, это так называемые MAR (matrix attachment region) или SAR (scaffold attachment region) элементы (Heng et al., 2004). В доказательство петлевой доменной организации хроматина также служат наблюдения, полученные с помощью электронной микроскопии. При помещении ядер в солевые растворы с низкой ионной силой в присутствии низких концентраций двухвалентных катионов происходит депротеинизация хроматина (Prusov et al., 1983). Он в значительной степени разрыхляется, что приводит к выявлению фибрилл толщиной 30 нм. Однако развернутые петли ДНК формируют розетковидные образования, соединяясь в общем плотном центре. Средний размер таких розеток равен 100-150 нм.

Другая модель, отражающая современные представления о высших уровнях организации хроматина, постулирует существование структуры диаметром 100 нм, так называемой хромонемы. Она впервые была обнаружена, когда клетки поместили в нефизиологичные буферные условия и визуализировали в присутствии повышенной концентрации двувалентных катионов Са и Mg (Zatsepina et al., 1983). Однако позднее удалось рассмотреть хромонемные элементы в буферных системах, максимально отражающих нормальные физиологические условия жизни клеток (Belmont et al., 1989; Belmont, Bruce, 1994; Kireeva et al., 2004; Kireev et al., 2008). Модель хромонемы предполагает последовательную организацию 10-нм и 30-нм структур в фибриллу высшего порядка диаметром 100 нм (рис. 2). Известно, что при этом транскрипция ДНК происходит в составе высокоорганизованной хромонемы, которая не претерпевает глобальной деконденсации.



Рисунок 2. Высшие уровни структурной организации хроматина. Показаны последовательные этапы упаковки ДНК в структуры высшего порядка (Lodish et al., 2007).

Для визуализации и последующего анализа хроматина используются методы световой и электронной микроскопии. Плотная упаковка генома препятствует визуализации структурных элементов, вследствие чего необходимо искусственно разворачивать хроматин для анализа его организации. Подобного рода воздействия негативно влияют на нативную сохранность генома, однако, благодаря полученным данным, становится возможным интерпретировать способы организации ДНК. Несмотря на это, условия фиксации и дальнейшей обработки препаратов часто вызывают дискуссию о сохранности его интактной структуры. Для того чтобы подобрать условия, максимально приближенные к нативным, тестировали различные протоколы фиксации с изменением проницаемости мембран (пермеабилизацией) (Belmont et al., 1989). Оказалось, что возможно понизить уровень детектируемого фонового сигнала, сохранив при этом структуру хроматина, если сделать короткую пермеабилизацию клеток до их фиксации. Благодаря полученным данным, было обнаружено, что область, занимаемая непосредственно хроматином в ядре, достаточно мала, а большая часть генома структурирована в высшие уровни организации. Кроме того, в случае анализа пермеабилизованных ядер становится возможным рассмотреть фибриллярную структуру высших уровней организации хроматина (Belmont, Bruce, 1994; Deng et al., 2016).

В 3D реконструкциях образцов, зафиксированных глутаровым классическом буфере Зеренсена альдегидом на для электронной микроскопии, не получилось различить структурные элементы высшего порядка (Ou et al., 2017). Исследования с помощью метода электронной томографии показали, что хроматин упакован в 30-нм фибриллы и не формирует высших уровней компактизации. Эти результаты позволяют усомниться в существовании высших уровней организации генома и критиковать применяемые раннее протоколы фиксации. Поэтому сомнению подверглось и существование хромонемных элементов, полученных в результате фиксации в присутствии солей Mg. На сегодняшний день этот вопрос остается дискуссионным в связи с тем, что оба метода исследования имеют ряд ограничений, в то время как применение метода прижизненных наблюдений наиболее точно отражает реальную конфигурацию живых клеток.

2.2 Организация генома во время максимальной конденсации хроматина в митозе

Во время митотической конденсации хроматин достигает своей максимальной степени компактизации. Несмотря на плотную упаковку, в хромосомах прослеживается гетерогенность распределения различных фракций хроматина, которая визуально отражается в чередовании G и R бэндов (Buckton, 1976). В настоящее время не существует единой точки зрения относительно способа организации хроматина в митотических хромосомах. Одна из популярных моделей постулирует образование петлевых доменов, прикрепленных к белковому скэффолду (Razin, 1996). Другая же предполагает существование последовательной иерархической укладки хроматина в высшие уровни организации (Belmont, Bruce, 1994). Для понимания механизмов упаковки генома в митотические хромосомы были проанализированы ранние стадии митоза (Kireeva et al., 2004).

В ходе профазной компактизации наблюдается гетерогенность в конденсации хроматина. С помощью метода электронной микроскопии были выявлены структуры высшего порядка размером около 100 нм в ранней профазе, которые впоследствии удваивались в диаметре (Kireeva et al., 2004). До сих пор остается неизвестным, является ли механизм компактизации универсальным для эу- и гетерохроматина или их структурная организация в митотических хромосомах различна.

Анализ распределения структурных белков конденсинов (SMC2), которые играют функциональную роль в стабилизации метафазных хромосом, показал их осевое положение в поздней профазе и дальнейших стадиях митоза (рис. 3). Это наблюдение не соответствует ожиданиям модели петлевых доменов, потому что вплоть до поздней профазы, когда формирование хромосом уже произошло, конденсины не демонстрировали предполагаемого распределения.



Рисунок 3. Митотическая укладка хроматина. На схеме показаны последовательные этапы профазной компактизации хроматина (А). На рисунке (Б) представлена возможная схема организации хромосом. Голубым обозначен хроматин, красным - распределение SMC II (Kireeva et al., 2004).

2.3 Влияние межгенных взаимодействий на физиологические процессы в клетке

Высокая степень компактизации в ядре эукариотической клетки неизбежно приводит к взаимодействиям внутри него. Некоторые из таких взаимодействий функционально не связаны (Splinter, Laat, 2011). Это объясняется тем, что очень небольшой объем генома кодирует белковые последовательности, а основная часть некодирующих генов является Дополнительную топологическую регуляторными элементами. задачу отдаленные внутрихромосомные межхромосомные создают И взаимодействия (Deng, Blobel, 2010). В количественном отношении известно больше внутрихромосомных контактов, чем межхромосомных. Однако межхромосомные взаимодействия играют большую роль в процессе хромосомных транслокаций. Хромосомные транслокации могут являться причиной канцерогенеза, что было показано на примере одного из изученных случаев слияния генов BCR-ABL (Klein et al., 2004). Вследствие мутации, вызванной такой транслокацией, активируется экспрессия онкобелка, что приводит к избыточной пролиферации клетки. Последствием данной мутации является хронический миелолейкоз и острый В-лимфобластный лейкоз.

2.4 Методические подходы, используемые для изучения организации генома в ядре

2.4.1 Анализ поведения искусственных хроматиновых локусов в живых клетках

Вопрос об изучении интактной структуры живой клетки всегда остро стоял перед исследователями, поэтому широкое распространение получили системы, основанные на создании и анализе искусственных хроматиновых локусов. Один из подходов заключается в создании системы Lacpeпрессор/Lac-onepatop (Robinett et al., 1996). Встроенные в геном повторы Lac-onepatopa можно визуализировать с помощью экспрессии Lacpeпрессора-GFP, тем самым прижизненно наблюдая за высшими уровнями организации хроматина. Это позволило не только оценить характер упаковки, но и проанализировать динамику переупаковки искусственного хроматинового локуса во времени. Несмотря на то, что мультикопийные искусственные хроматиновые локусы отличаются по своей природе от нативных генов, характер их динамики может отражать естественные процессы в клетке. В ходе исследований было создано несколько генераций искусственных эндогенных локусов разного размера и конфигурации (Belmont et al., 2010). Оказалось, что транскрипционные факторы могут активировать деконденсацию высших форм организациии хроматина. В случае с большими искусственными гетерохроматиновыми локусами наблюдается частичное разворачивание этих структур, однако петлевых доменов не обнаруживается (Tumbar et al., 1999). Также была показана связь между активацией транскрипции и изменением положения искусственных локусов хроматина внутри ядра. Анализ мультикопийных локусов в митозе показал, что в состоянии максимальной конденсации хроматина можно обнаружить элементы размером 250 нм (Strukov et al., 2003). Эти данные высказанную позднее модель иерархической укладки подтверждают хроматина в митозе (Kireeva et al., 2004).

2.4.2 Топология хромосомных территорий, визуализированных с помощью FISH

Современные методы молекулярной биологии позволяют выявить дистантные межгенные взаимодействия. Наибольшее распространение получил метод FISH, флуоресцентная гибридизация *in situ* (Cremer et al., 2008). В ходе анализа используются ДНК-зонды, состоящие из меченых флуорохромами нуклеозидов. Эти последовательности связываются с комплементарными мишенями в образце и впоследствии детектируются с помощью флуоресцентной микроскопии (рис. 4). Значительным недостатком этого метода является процедура денатурации ДНК, что не позволяет в дальнейшем оценивать нативную структуру хроматина в клетках. Несмотря на это, благодаря методу гибридизации в интерфазном ядре были выявлены области, занимаемые хромосомами. Оказалось, что эти хромосомные территории почти не перекрываются друг с другом. При взаимодействии



Рисунок 4. Взаиморасположение хромосомных территорий в объеме ядра (Bolzer et al., 2005).

генов, находящихся на разных хромосомах, происходит выпетливание ДНК за границы хромосомной территории в пространство интерхроматинового домена. Также наблюдается корреляция в положении занимаемой хромосомой территории относительно центра ядра. Как правило, хромосомы, богатые активно транскрибируемыми генами, находятся в центре, в то время как неактивные гены демонстрируют периферическое расположение вблизи ядерной оболочки.

Дискуссионным остается вопрос о том, как происходит взаимодействие между хроматиновыми доменами в контексте плотной компактизации генов в процессе транскрипции, репликации и репарации, а также как они соотносятся с известными хромосомными территориями и с определенными генными локусами. Метод FISH не позволяет выявить нативную организацию генома из-за его деструктивного воздействия на структуру хроматина (Solovei et al., 2002).

На сегодняшний день особую популярность получили методы молекулярной биологии, с помощью которых можно детектировать взаимодействие определенных генных локусов друг с другом в трехмерном объеме ядра.

2.4.3 Молекулярные С-методы исследования, выявляющие геномные взаимодействия

Для выявления реального физического взаимодействия двух локусов повсеместно используется метод 3C, chromatin conformation capture (Dekker et al., 2002; van Steensel, Dekker, 2011; Hakim, Misteli, 2012). Этот метод позволяет изучать пространственное расположение генома в ядре и физические взаимодействия. Основными анализировать ИХ этапами фиксация параформальдегида, пробоподготовки являются раствором фрагментация ДНК с помощью рестриктаз, а затем лигирование при низкой концентрации ДНК. После этого убирают сшивки, повышая температуру до 95°С, и в финале производят анализ методом количественной ПЦР (полимеразной цепной реакции). В результате выявляются только те участки генома, которые были близко расположены друг к другу на момент фиксации. Впоследствии этот метод модифицировали и улучшили, благодаря чему новыми версиями стали 4С и 5С, которые отличаются способом детекции уже готовых продуктов лигирования. Для масштабного скрининга геномных взаимодействий друг с другом разработали другой вариант этого метода – Hi-C. С его помощью можно определить все существующие контакты внутри генома. Работы последних лет показали, что С-методы

имеют некоторые ограничения и не являются совершенными (Gavrilov et al., 2013). Однако грамотное использование комбинаций анализа С-методом и FISH, а также применение современных микроскопических техник позволяет изучать организацию хроматина в нативных структурах.

Обилие методов исследования высших уровней компактизации не дает однозначного ответа на вопрос об организации генома в ядре (Misteli, Soutoglou, 2009; Rajapakse, Groudine, 2011; Cavalli, Misteli, 2013). Все же существуют некоторые неоспоримые принципы структурно-функциональной организации генома. Так, известно, что в интерфазных клетках каждая занимает определенное положение хромосома В ядре, называемое хромосомной территорией (Cremer et al., 1982; Lanctot et al., 2007). Сложность заключается в том, что такая система не жестко детерминирована, ее пластичность наблюдается как в моменты взаимодействия генов, так и при прослеживании их поведения в течение клеточного цикла. В пользу этого наблюдение за участком связанного с ядерной оболочкой говорит гетерохроматина, который в определеных условиях мигрирует в центр ядра (Kosak et al., 2002). Такое поведение отражает не только структурные, но и функциональные особенности хроматина. Центральная или периферическая локализация гена не имеет отношения к его транскрипционному статусу, следовательно, положение гена не определяет его активность. Можно предположить, что тогда его активность детерминируется окружением. Действительно, в ряде работ было показано, что ядерная оболочка может обладать регуляторными свойствами (Kind, van Steensel, 2010; Egecioglu, Brickner, 2011).

Несмотря на то, что положение генов в пространстве не строго определено, есть два необходимых условия, которые должны выполняться. Во-первых, участки, находящиеся в контакте с ядерной оболочкой, должны располагаться вблизи нее, а во-вторых, должны успешно осуществляться

межгенные взаимодействия даже в случае их локализации на разных хромосомах.

Отсутствие статичной картины структурной организации подтверждают наблюдения за изменением положения генов во время дифференцировки клеток (Pueschel et al., 2016). В том случае, если гены релокализуются на периферию ядра и начинают взаимодействовать с ядерной ламиной, происходит их инактивация, или замолкание. Другим примером пластичности в организации генома является свойство некоторых генов образовывать петли вне своей хромосомной территории для осуществления необходимого взаимодействия.

2.4.4 Картирование геномных взаимодействий

Для выявления определенных генных локусов и проведения их количественной используются разнообразные оценки молекулярнобиологические методы. Для анализа ДНК-белковых взаимодействий применяют метод CHIP-seq, основанный на иммунопреципитации хроматина ДНК (Adli, Bernstein, высокоэффективном секвенировании 2011). И Благодаря данному подходу возможно выявить места связывания любого белка по всему геному. С помощью другой технологии, DamID, выявляют сайты ДНК, связанные с интересующими белками. В основе метода лежит идентификация сайтов связывания с белком с помощью фермента ДНКметилтрансферазы (van Steensel, Henikoff, 2000). Картирование генома с помощью CHIP-seq и DamID привело к тому, что были найдены участки, преимущественно взаимодействовавшие с ядерной ламиной (Pickersgill et al., 2006; Guelen et al., 2008; McCord et al., 2013). Так, у человека были идентифицированы более 1000 доменов, ассоциированных с ламиной, LADs (Lamin-associated damains). Размеры этих доменов варьируют от 0.1-1 Mb. В них преимущественно содержатся молчащие геномные последовательности

последовательности с или геномные низким уровнем экспрессии. Гистоновые маркеры активных генов, такие как H3K4me, в данных локусах не выявляются (Kind, van Steensel, 2010), зато они богаты маркерами транскрипционно позднереплицирующихся неактивных геномных последовательностей, такими как НЗК9те и НЗК27те. Выделяют два типа LADs. Конститутивные домены составляют 33% генома, у них небольшая вариабельность генов и они богаты А/Т элементами. Такие консервативные регионы составляют остов хромосомы. Другой, минорный, тип LADs представляет собой факультативные домены. Входящий в их состав хроматин меняет свою локализацию и перемещается от центра ядра на периферию с последующей репрессией в процессе дифференцировки клеток. Взаимодействие геномных последовательностей с ядерной оболочкой определяет не только их положение, но и их активность (Kumaran, Spector, 2008; Kosak et al., 2002).

Благодаря С-методам были выявлены не только топологические домены, ассоциированные с ядерной оболочкой, но и другие участки, формирующие высшие уровни конформации хроматина. Оказалось, что геном организован в топологически ассоциированные домены (Dixon et al., 2012). 2-5 В состав таких локусов входит порядка геномных последовательностей. Специальные участки LCRs (locus control region) осуществляют контроль всей структуры ТАДа. Весь геном подразделяют на субхромосомные компартменты A и B (Lieberman-Aiden et al., 2009; Zhang et al., 2012). Компартмент А представляет собой транскрипционно-активные локусы, богатые генами, в то время как компартмент В содержит мало генов и транскрипционно не активный (рис. 5).



Рисунок 5. Современные представления об организации генома в ядре (Ea et al., 2015).

С полученных молекулярно-биологическими помощью данных, методами, удалось картировать близлежащие и удаленные друг от друга межгенные взаимодействия, а также определить внутри- и межхромосомные контакты (Misteli, 2007; van Steensel, Dekker, 2011). Существуют предположения о том, как происходит активация генов, расположенных на значительном расстоянии друг от друга. Наиболее популярным является утверждение о наличии непосредственного физического контакта между ними, который и приводит к взаимодействию генов, а впоследствии определяет их регуляцию (Bulger, Groudine 2011). Одним из наиболее изученных примеров является взаимодействие альфа- и бэтта-глобиновых генов. Продуктами ИХ транскрипции являются глобиновые белки. формирующие гемоглобин. Как показали исследования с помощью метода 3C, бэтта-глобиновый локус активируется с помощью энхансера LCR с

образованием петли размером 40-80 Кб (Tolhuis et al., 2002). Это взаимодействие наблюдается только в том случае, если происходит экспрессия гена. В противоположном случае контакт между генами не наблюдается (Palstra et al., 2003). Такие же данные были получены и по альфа-глобиновому гену (Vernimmen et al., 2007; Bau et al., 2011). Однако подобного рода взаимодействия удаленными между генами могут регулировать не только активацию, но и их умолкание (Lanzuolo et al., 2007). Ha данный момент известны также примеры межхромосомного взаимодействия генов. дрозофил это происходит на политенных У хромосомах и называется трансвекция. В этом случае регуляторные активировать, либо репрессировать целевые гены, элементы могут находящиеся как в цис-контакте (внутри одной хромосомы), так и в трансконтакте (между разными хромосомами). Существует линейная зависимость между близким пространственным расположением генов и частотой транслокаций (Mathas et al., 2009). Ряд исследований показал, что активные гены находятся в пространственном контакте друг с другом (Osborne et al., 2004; Simonis et al., 2006). Существует гипотеза, которая предполагает активно-транскрибируемых пространстве локализацию генов В С формированием так называемых транскрипционных фабрик (Cook, 1999). В этих сайтах группы активных генов ассоциированы с локусами, богатыми РНК полимеразой и другими транскрипционными факторами (Osborne et al., 2004, Eskiw, Fraser, 2011). На сегодняшний день остается неизвестным, разделяются ли транскрипционные фабрики функционально, происходит ли взаимная регуляция генов или гены транскрибируются случайным образом.

2.5 Структурная организация хроматина в топологически ассоциированные домены

Благодаря анализу межгенных взаимодействий были обнаружены последовательностей, характеризующиеся большим группы геномных количеством контактов внутри конкретного домена и меньшей частотой встречаемости контактов с соседними локусами. Такое свойство топологически ассоциированных доменов было названо изоляцией. ТАДы представляют собой не только структурные, но и функциональные группы. Известно, что они разграничены между собой, и ключевую роль в этом играет белок CTCF (CCCTC-binding factor). Однако точный механизм формирования ТАДов на сегодняшний день не известен. Чаще всего ТАДы богаты транскрипционно неактивным хроматином, a также тканеспецифичными генами, в то время как гены "домашнего хозяйства" встречаются в интер-ТАДах (inter-TADs) и на границе ТАДов (TADs) boundaries). Однако существуют некоторые исключения: около 17% ТАДов содержат определенное количество транскрипционно-активного хроматина. Результатом подобного рода гетерогенности является разная степень упаковки геномных последовательностей внутри одного домена, что приводит впоследствии К различиям В размерах топологически ассоциированных доменов. Было показано, что локусы, содержащие демонстрируют меньший размер активные гены, ПО сравнению С неактивными (Hou et al., 2012). В том случае, если активно транскрибируемые гены локализованы в составе ТАДа, этот домен обладает меньшей плотностью по сравнению с обычным. Несмотря на существующие границы, топологически ассоциированные домены не имеют строгой структурной организации, а интер-ТАДы и пограничные участки ТАДов активность И переходить В топологически могут терять свою ассоциированные домены в ходе дифференцировки (Ulianov et al., 2016).

Современные знания о структуре и функции доменной организации базируются на методах молекулярной биологии. Одним из важнейших вопросов является поиск соответствия доменных локусов и морфологии нативной клетки. Используя хроматина в ядре модельный объект политенных хромосом дрозофилы, было показано, что интер-ТАДы и ТАДов пограничные участки соответствуют интер-бэндам, a непосредственно ТАДы соответствуют бэндам (рис. 6). Однако доменные были визуализированы элементы В эукариотических ядрах не И проанализированы с помощью методов микроскопии. Пластичность структурных вызывает вопросы элементов также 0 динамике перераспределения доменных локусов в ходе жизненного цикла клеток.



Рисунок 6. Соотношения топологически ассоциированных доменов с бэндами дрозофилы (Ulianov et al., 2016).

2.6 Структурные изменения топологически ассоциированных доменов во время митотической компактизации

В ходе клеточного цикла хроматин претерпевает конформационные изменения, достигая максимальной степени упаковки в митозе. Для сравнения структурной организации топологически ассоциированных доменов проводили их анализ с помощью метода Hi-C на разных стадиях интерфазы и во время митотической компактизации (Naumova et al., 2013). Оказалось, что выявляемые в интерфазных ядрах структурные домены перестают детектироваться в метафазных хромосомах (рис. 7). Упаковка генома во время митоза происходит на фоне остановки всех процессов матричного синтеза, что может влиять на характер взаимодействий между Параметры и расположение хроматиновыми локусами. структурных компартментов, выявляемых на разных стадиях интерфазы, не строго определены и могут меняться в зависимости от типа клеток, а также стадии дифференцировки. Однако отсутствие ТАДов в метафазных хромосомах наблюдается в каждом из этих случаев. На основе этих наблюдений была выдвинута гипотеза организации генома в метафазную хромосому, которая предполагает укладку интерфазного хроматина, формирующего петлевые домены, без образования высших уровней компактизации хроматина. В связи с тем, что в митозе не были найдены структуры, организованные в высшие уровни компактизации, возникло предположение об образовании таких элементов заново на стадии G1 клеточного цикла. Это предположение хорошо соотносится с рядом работ, постулирующих отсутствие высших уровней организации хроматина (Maeshima et al., 2014). Несмотря на это, другие исследования указывают на изменение динамики цис- и трансгенных контактов в ходе клеточного цикла с сохранением структурных элементов (Nagano et al., 2017). В этом случае применяли метод Hi-C на отдельных клетках с использованием высокопроизводительного скрининга,

исследуя структурную организацию генома на разных стадиях клеточного цикла. По частоте близлежащих и дальнедистантных контактов можно было определить стадию клеточного цикла. Наблюдения показали, что количество дальнедистантных взаимодействий значительно уменьшается при переходе от митоза к интерфазе, что говорит о декомпактизации хроматина.



Рисунок 7. Детекция топологически ассоциированных доменов на разных стадиях клеточного цикла (Naumova et al., 2013).

Также оказалось, что к началу S-фазы количество дистантных контактов увеличивается, что, возможно, связано с формированием репликативных кластеров. Однако уже к середине S-фазы частота контактов уменьшается, что говорит о перераспределении хроматина после синтеза ДНК. При подготовке к митозу наблюдалась конденсация хромосом, а во время максимальной компактизации возможно было выявить структуры размером в 100 Mb, схожие по размеру с хромонемой.

Такое отличие данных, возможно, связано с увеличением разрешающей способности применяемого во втором случае метода, а также анализом с использованием высокопроизводительного скрининга.

2.7 Гетерогенная организация различных фракций хроматина

Дополнительную сложность в организацию хроматина в клеточном ядре вносит его гетерогенная природа. Различия в активности генов определяют степень конденсации хроматина и его положение в ядре. Эухроматин диффузно распределен по ядру, тогда как гетерохроматин локализован по периферии ядра и ядрышек, либо формирует большие Эухроматин доменные локусы. характеризуется высокой степенью транскрипционной активности, что BO многом определяет его морфологические свойства. Необходимость обеспечения доступности ДНК эухроматина для транскрипционных факторов приводит к формированию развернутых фибрилл, занимающих большую часть объема ядра. В противоположность этому, гетерохроматин собирается в доменные кластеры и демонстрирует более высокую электронную плотность по сравнению с эухроматином. При переходе к митозу вся фракция хроматина неизбежно упаковывается в компактную структуру. Однако остается неизвестным, является ли укладка эухроматина одним из этапов иерархической укладки гетерохроматина, или же существуют два разных механизма компактизации различных фракций.

2.8 Репликация ДНК в клетках эукариот

2.8.1 Молекулярные аспекты процесса репликации

Одним из ключевых моментов в жизни клетки является процесс удвоения генетического материала с его последующей сегрегацией. Уже сразу после открытия двуспиральной структуры ДНК возникло предположение о ее дупликации, а впоследствии разделении на две дочерние копии.

В настоящее время для изучения механизмов репликации используют комбинацию различных методов. С одной стороны применяют молекулярные методы для того, чтобы выяснить подробности процесса на открытой, свободной от белков молекуле ДНК. С другой стороны, популярность приобрели методы микроскопии, которые позволяют следить за динамикой процесса репликации хроматина в живых клетках. Использование молекулярных методов позволило объяснить механизмы синтеза ДНК, а с помощью микроскопии был визуализирован процесс репликации хроматина в пространстве и времени в живых клетках.

Репликативные ферменты, принимающие участие в этом процессе, довольно консервативны, и на сегодняшний день подробно описаны и всесторонне изучены энзимы, принимающих участие в этом процессе (Perumal et al., 2009). В ходе клеточного цикла, после окончания стадии G1 начинается инициация ДНК репликации. Возникают дискретные сайты, называемые точками начала репликации, которые рассеяны по всему геному. В этих местах начинается процесс синтеза ДНК, в котором участвует комплекс белков, включающих в себя ДНК-полимеразы, ДНК-праймазу, ДНК-хеликазу, протеиновый комплекс SSB (single strand DNA binding protein complex), replication protein A (RPA), ДНК-топоизомеразу, clamp loading complex (replication factor C, RFC) и DNA polymerase clamp or progressive factor (prolifereiting cell nucleus antigene, PCNA). Синтез новой молекулы

ДНК происходит по направлению от 5' к 3'- концу, в таком случае направление лидирующей цепи совпадает с направлением синтеза. Другая же цепь, направление которой не совпадает, называется отстающей, и на ней происходит образование коротких фрагментов новосинтезированной ДНК, которые получили название фрагменты Оказаки (Okazaki et al., 1968). Эти короткие фрагменты быстро лигируются с помощью дополнительных ферментов, включающих в себя flap эндонуклеазу (FEN-1) и ДНК-лигазу I (Hubscher, Seo, 2001).

2.8.2 Начало и распространение репликации на молекуле ДНК

Для успешного прохождения репликации генома важно только один раз реплицировать ДНК в течение цикла до деления клетки. Поэтому возникает необходимость координировать активные репликативные единицы и контролировать динамику распространения синтеза в объеме клетки.

Процесс репликации у эукариотических организмов распространяется по всему геному планомерно (Dimitrova, Gilbert, 2000; Leonhard et al., 2000; Easwaran al.. 2005). Транскрипционно-активный et эухроматин реплицируется в ранней S-фазе, в то время как более конденсированный и молчащий гетерохроматин – в поздней S-фазе. Однако точки начала репликации заданы не жестко и возникают стохастически (Dijkwel et al., 2002; Patel et al., 2006). Более того, расположение активных точек начала репликации, которые инициируют начало синтеза ДНК, меняется в каждый клеточный цикл. Однако, несмотря на то, что данные точки начала репликации меняют свое расположение в каждую последующую фазу синтеза ДНК, клетка сохраняет тайминг репликации. Интересно, что такого эффекта не наблюдали при исследовании дрожжей и бактерий. У этих

объектов точки начала репликации демонстрируют стабильную локализацию и возникают в одних и тех же местах (Gilbert, 2001).

Чтобы исследовать динамику распространения репликации, можно световой микроскопии. Так. использовать метолы c помошью флуоресцентной микроскопии исследовали длинные индивидуальные молекулы ДНК, предварительно очищенные от белков (Bensimon et al., 1994). Из полученных результатов была предложена гипотеза, которая получила название "increasing efficiency model". Следуя этой гипотезе, предполагается, что репликоны, начавшие синтез первыми, впоследствии инициируют оставшуюся фракцию (Lucas et al., 2000, Hyrien et al., 2003). Однако в некоторых работах было показано, что фиксированное количество ДНКполимеразных комплексов также может координировать процесс репликации (Chagin et al., 2010).

2.8.3 Динамика репликации эу- и гетерохроматиновой фракции

Существует корреляция между структурной организацией хроматина и временем репликации (Donaldson, 2005). Эта корреляция становится очевидна на примере эухроматиновой фракции: транскрипционно-активные представляющие собой открытые локусы, хроматиновые структуры, реплицируются в начале S-фазы. Вероятно, это связано с тем, что в состоянии хроматин имеет большую развернутом доступность ДЛЯ репликативной "машинерии".

Сложность организации генома в ядре создает не только высокая степень компактизации ДНК или особенности функциональной активности генов, но и топология хроматина для создания необходимых межгенных взаимодействий. Таким образом, хромосомы занимают свои особые хромосомные территории в интерфазном ядре, а не беспорядочно расположены по всему его объему (Cremer, Cremer, 2001; Takizawa et al.,
2008). Для того, чтобы визуализировать и проанализировать организацию репликации в контексте архитектуры ядра, необходимо использовать методы микроскопии. Сайты репликации можно визуализировать с помощью меченых нуклеотидов, встраиваемых в новосинтезируемую ДНК во время репликации. В более ранних работах для этого использовали радиоактивную тимидиновую метку (Milner, 1969), а с появлением флуоресцентной микроскопии стало возможным проводить иммунофлуоресцентный анализ (Nakamura et al., 1986; Nakayasu, Berezney, 1989; O'Keefe et al., 1992). Позднее стал доступен метод прижизненной микроскопии, благодаря которому исследовали динамику накопления меченых нуклеодитов (Schermelleh et al., 2001), а также экспрессию флуоресцентно меченных репликативных факторов (Cardoso et al., 1997; Leonhardt et al., 2000). Благодаря этому методу, была исследована динамика репликации и обнаружены особые доменные структуры, получившие название фокусы репликации (Cardoso et al., 1993). Эти фокусы распределены по всему объему клетки и создают динамичный паттерн локализации (рис. 8). Таким образом, благодаря методам микроскопии, стало возможно проследить за динамикой изменения этих паттернов в течение репликации.

Были проведены прижизненные эксперименты, которые показали, что в ранней S-фазе появляется множество подобных сайтов репликации, они небольшого размера и занимают всю площадь ядра. В средней S-фазе они увеличиваются в размерах и локализуются по периферии ядерной оболочки и ядрышек. В конце S-фазы выявляется очень немногочисленные крупные репликативные сайты. Динамика распределения паттернов также коррелирует с типом реплицирующегося хроматина. Так, эухроматин представлен в ранних паттернах, в то время как гетеро- – в поздних.



Рисунок 8. Динамика распространения репликации от эухроматина к гетерохроматину, отражающаяся в смене паттерна (Dimitrova, Berezney, 2002).

Одним из актуальных вопросов является изучение роли модификаций хроматина в реорганизации репликации. Большой вклад в этот процесс вносят гистоновые модификации. Так, например, известно, что гистон НЗК9те (типичный эпигенетический маркер гетерохроматина) не играет важную роль на поздних стадиях репликации (Wu et al., 2006). Однако другие модификации, такие как фосфорилированный гистон H1, предположительно, влияют на деконденсацию высших уровней организации хроматина (Alexandrow, Hamlin, 2005). Изучение динамики репликативной "машинерии" в ходе синтеза ДНК позволяет детально проанализировать процесс репликации на клеточном уровне. Комбинация прижизненной микроскопии и фотообесцвечивания/фотоактивации выявила, что скорость взаимодействий репликации зависит ОТ различных репликативных ферментов с белками, являющимися основой посадки для других энзимов.

Одним из таких основных белков является PCNA (Gorisch et al., 2008). Анализ сборки PCNA показал, что после завершения репликации на одном сайте, новый репликативный фокус собирается заново (Sporbert et al., 2002; Sadoni et al., 2004). Дальнейшим направлением в исследовании динамики процесса стали эксперименты с импульсным мечением нуклеотидов (Manders et al., 1996). Было показано, что репликация в специальных геномных локусах облегчает последующее включение репликативных факторов в соседнем сайте. Одна из интерпретаций заключается в том, что во время репликации происходит изменение конденсации хроматина, что повышает доступ для репликативных факторов и влияет на дополнительную репликативного цикла. Репликация начинается с сайтов инициацию "открытой" конформации хроматина. Благодаря этому, хроматиновые участки, которые не могут обеспечить начало репликации, становятся деконденсированными, после чего на них возникают точки инициации репликации. Можно предположить, что активность репликативных хеликаз (таких как MCM protein) способствует локальной хроматиновой деконденсации. На геномном уровне была предложена модель домино (Chagin et al., 2010), которая постулирует, что точки начала репликации возникают на "открытых" сайтах. Эти участки способствуют инициации в средней S-фазе, которая потом влияет на позднюю S-фазу. В таком случае, даже высококонденсированные гетерохроматиновые локусы становятся более доступными для связывания белков репликативной "машинерии".

Помимо вопросов о динамике процесса репликации на молекулярнобиологическом уровне, все еще остается неясным, как происходит синтез плотнокомпактизованного хроматина в живой клетке. На сегодняшний день наиболее эффективным способом изучения этих процесов является совмещение методов молекулярной биологии и световой/электронной микроскопии.

Материалы и методы

3.1 Работа с прокариотическими клетками

Для визуализации репликативных паттернов на световом и электронно-микроскопическом уровнях мы использовали две генетические конструкции: mRFP-PCNA, которая была получена в лаборатории ранее и eGFP-PCNA, требующий конструирования.

3.1.1 Молекулярное клонирование

Для получения стабильной клеточной линии, экспрессирующей eGFP-PCNA, необходимо было создать генетическую конструкцию, которая содержит в себе ген устойчивости эукариотических клеток к антибиотику (пуромицину) и ген, кодирующий экспрессию белка eGFP-PCNA.

Мы использовали плазмиду pPUR (рис. 10), содержащую ген устойчивости к пуромицину в качестве вектора и плазмиду eGFP-PCNA (рис. 9) в качестве вставки. Сайтом рестрикции для pPUR стал EcoRI, а для eGFP-PCNA - PvuI и ApaI.

Необходимо было вырезать интересующие нас фрагменты из плазмидной ДНК. Для этого подбирали рестрикционную смесь и буфер в соответствии с рекомендациями производителя (Fermentas, Thermo Fisher Scientific), чтобы обеспечить максимально возможную реакционную способность ферментов. Приготовленную смесь оставляли в эппендорфах на ночь при температуре 37°C.

В связи с тем, что сайты рестрикции используемых плазмид не совпадали, не было возможности лигировать "по липким" концам, поэтому производили лигирование по тупым концам по стандартной методике.



Рисунок 9. Плазмида eGFP-PCNA. По сайтам рестрикции, выделенным красным, была вырезана вставка для дальнейшего клонирования



Рисунок 10. Плазмида pPUR. Использовалась в качестве вектора для eGFP-PCNA. Содержит в себе ген устойчивости к пуромицину, что позволяет в дальнейшем получить стабильную эукариотическую линию.

Затем осуществляли трансформацию прокариотических клеток данной плазмидой и отбирали бактерии, экспрессирующие плазмиду в составе своего генома, по гену устойчивости клеток к антибиотику ампицилину.

3.1.2 Проверка эффективности рестрикции

Одним из вариантов контроля на начальном этапе молекулярного клонирования была проверка работы рестриктазы. Анализ полученных после рестрикции фрагментов ДНК проводили в 1%-ом агарозном геле на буфере TAE (Tris base, acetic acid and EDTA). Для приготовления геля раствор агарозы на буфере ТАЕ нагревали в микроволновой печи до полного растворения, затем его остужали до 50-60°С при постоянном помешивании. Затем заливали остывший раствор в специальную ванночку ДЛЯ электрофореза (MP Biomedicals) с установленными гребенками. Через 30 минут, когда смесь застывала, в ванночку заливали буфер ТАЕ. В лунки, образовавшиеся после того как вынимали гребенки, наносили пробы, смешанные с 6x Loading Dye буфером (Fermentas), а в качестве маркера был использован Gene Ruler (Promega). Электрофорез проводили при силе тока 190 мА и напряжении 140 В. После разделения фрагмента, гель окрашивали бромистым этидием в течение получаса и наблюдали за результатом в ультрафиолетовом свете. Затем находили И вырезали необходимые фрагменты, после чего проводили очистку ДНК по стандартному протоколу.

3.1.3 Выращивание бактериальной культуры

Для молекулярного клонирования использовали бактерии E. coli штамма XL-1. Клетки выращивали на среде LB (10г/л триптона, 5 г/л

дрожжевого экстракта, 5 г/л NaCl, для твердой среды добавляли 2% агара) с добавлением 10 мкг/мл тетрациклина. В среду для трансформированных Е. coli добавляли селективный антибиотик ампицилин в концентрации 50 мкг/мл.

3.1.4 Получение компетентных клеток

- Колонию бактерий Е. coli штамма XL-1 со свежей чашки инокулировали в 3 мл жидкой среды и помещали на качалку при 37°С, 150 об/мин на ночь (12-16 часов).
- 2. В 3 мл жидкой среды добавляли 150-200 мкл ночной культуры и выращивали 1 час при 37°С, 150 об/мин.
- Разливали по 1,5 мл в эппендорфы и центрифугировали 45 секунд при 14 000 об/мин.
- 4. Супернатант удаляли, осадок ресуспендировали в 500 мкл 100 мМ CaCl₂.
- 5. Инкубировали 30 мин на льду.
- 6. Центрифугировали 45 секунд при 14 000 об/мин.
- Супернатант удаляли, осадок ресуспендировали в 100 мкл 100 мМ CaCl₂. Максимальная компетентность клеток наблюдается на вторые сутки.
 Клетки хранили при 4°С не более недели.

3.1.5 Трансформация бактерий

- К 100 мкл компетентных клеток добавляли 0,5 мкг плазмидной ДНК (2 мкл 0,33 мкг/мкл раствора). Осторожно перемешивали.
- 2. Инкубировали на льду 30 мин.
- Проводили тепловое воздействие, помещая эппендорфы с клетками на 1 минуту в 42°С воду.

- 4. Быстро переносили на лед на 2 мин.
- 5. Добавляли 400 мкл LB среды.
- 6. Выращивали 1 час на качалке при 37°С, 200 об/мин.
- Высевали по 100 мкл на чашки с ампицилином и культивировали при 37°С в течение ночи.
- Переносили отдельные колонии в 3 мл жидкой LB среды с ампицилином. Выращивали в течение ночи при 37°С, 150 об/мин.

3.2 Культивирование эукариотических клеток

Работа была выполнена на двух клеточных линиях: НТ1080 и СНО, которые культивировали в СО₂-инкубаторе при 37°С и 5% СО₂. Смену среды проводили каждые 3-4 дня. При достижении конфлюэнтного монослоя клетки пассировали с использованием смеси трипсина и раствора Версена (0,25% трипсин:раствор Версена в соотношении 1:3). Для микроскопии клетки высаживали в чашки Петри с покровными стеклами.

3.2.1 Культура НТ1080

Клетки линии HT1080 (фибросаркома человека) культивировали на среде Игла в модификации Дульбекко (Dulbecco's Modified Eagle's medium, DMEM), содержащей 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (fetal bovine serum, FBS), L-глутамин (150 мг на 450 мл), антибиотикантимикотик (Sigma).

3.2.2 Культура СНО

Клетки линии СНО (эпителиоидные клетки из яичника китайского хомячка) выращивали на среде F-12, содержащей 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (fetal bovine serum, FBS), L-глутамин (150 мг на 450 мл), антибиотик-антимикотик (Sigma).

3.2.3 Замораживание клеточных линий эукариот

Часть полученных популяций необходимо было сохранять для дальнейшей работы с ними, поэтому мы доращивали клетки в 10 см чашках до монослоя. Снимали смесью трипсин-раствор Версена (1:3). Полученную взвесь клеток центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 минут. Супернатант сливали. Клетки дважды отмывали от остатков трипсина: осадок ресуспендировали в 5 мл среды культивирования и центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 минут. Осажденные клетки тщательно ресуспендировали в 3 мл среды культивирования и 10% криопротектора DMSO. Полученную взвесь клеток разливали в криопробирки. Пробирки с подготовленными для заморозки клетками помещали в кельвинатор (-70°С) в сосуде с изопропиловым спиртом, обеспечивающим постепенное понижение температуры (около 1°/мин). В течение следующей недели криопробирки 196°С).

3.3 Трансфекция

Клетки культуры HT1080 предварительно высаживали в 2 мл чашки Петри с 8 мм покровными стеклами и доращивали до конфлюэнтного монослоя. В качестве трансфецирующего агента использовали TransIT-LT1 (Mirus Bio).

В день трансфекции в стерильный эппендорф со 100 мкл ростовой среды без сыворотки добавляли 3 мкл Trans IT, перемешивали и инкубировали 15 минут при комнатной температуре. Добавляли 1 мкг плазмидной ДНК (3 мкл с концентрацией 0,33 мг/мкл), перемешивали, инкубировали 45 минут при комнатной температуре. Полученную смесь из эппендорфа добавляли в чашку с клетками. Клетки оставляли в инкубаторе при 37° C и 5% CO₂ на 2 часа. За это время комплексы ДНК с трансфецирующим агентом прикреплялись к мембране клеток и переставали перемещаться в толще жидкости, что контролировали под микроскопом (при фазовом контрасте данные комплексы видны в виде мелких черных точек). Добавляли 2 мл полной ростовой среды. Контроль эффективности трансфекции производили через день.

3.4 Репликативное мечение и детекция репликативной метки

Мы использовали EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine, Click-iT EdU Imaging Kits, Invitrogen) для мечения новосинтезированной ДНК в процессе репликации. Он является аналогом BrdU (Bromodeoxyuridine), однако имеет определенные преимущества по сравнению с ним, связанные с сохранением нативной структуры хроматина. В случае с EdU для выявления репликативной метки не требуется производить гидролиз ДНК.

Для определения различных паттернов репликации клеткам в культуральную среду добавляли EdU в конечной концентрации 10 мМ. Время инкубации варьировало в зависимости от условий эксперимента.

Детекция метки основана на клик-реакции, где взаимодействие между алкин-содержащим EdU и азид-содержащим флуорохромом катализируется при помощи меди Cu (I) и приводит к образованию прочной связи между ДНК и флуорохромом посредством триазольного гетероцикла. Процедура проявления окраски с помощью Click-химии:

- За 15 мин до проявления готовили Click-iT реакционную смесь: в указанном порядке смешивали 430 мкл 1xClick-iT Reaction buffer, 20 мкл 100 мМ CuSO₄, 1,2 мкл AlexaFluor azide 488(либо AlexaFluor azide 594, либо AlexaFluor azide 647), 50 мкл 1xReaction buffer additive.
- Во влажной камере на стекла с клетками наливали Click-iT реакционную смесь. Инкубировали при комнатной температуре 30 мин.
- Отмывали клетки от реакционной смеси буфером PBS* с 0,1% TritonX-100 5 раз по 5 мин. Для световой микроскопии полученные образцы заключали в Mowiol с DAPI, для электронной микроскопии производили окраску антителами.
- Первичные антитела (АТ I): кроличьи моноклональные антитела против AlexaFluor-488, разведенные 1:1000 в PBS* с 0,1% Тритон Х-100 и 1% БСА. Инкубация с клетками в течение ночи при 4°С.
- 5. Отмывка от АТ I: PBS* с 0,1% Тритон X-100 5 раз по 5 мин.
- 6. Вторичные антитела (АТ II): козьи Ід против иммуноглобулинов кролика, конъюгированные с частицами золота диаметром 1,2 нм (Nanoprobes, USA), разведение 1:400 в PBS* с 0,1% Тритон X-100 и 1% БСА. Инкубация в течение ночи при 4°С.
- 7. Отмывка от АТ II: PBS* с 0,1% Тритон X-100 5 раз по 5 мин.
- 8. Далее проводка по стандартной методике для электронной микроскопии (см. ниже).

3.5 Синхронизация клеточной популяции

Клетки культивировали в 150 см² флаконе до достижения 30% конфлюэнтности.

1. Добавляли нокодазол (0.3 мкг/мл) на 1 час для накопления митозов.

- Через каждые полчаса-час в течение 4 часов снимали митозы механическим встряхиванием.
- Каждый раз после снятия митотических клеток их дважды центрифугировали, отмывали бессывороточной средой DMEM и оставляли на льду.
- 4. Клетки высаживали на стекла в культуральные чашки Петри.
- 5. Через 2 часа добавляли N-оксимочевину (2 мМ) на 16 часов, что вызывало остановку клеточного цикла на границе G1 и S фаз.
- 6. Отмывали от N-оксимочевины 3 раза стерильным PBS и добавляли ростовую среду.
- 7. Добавляли Click-EdU (10 мМ) на 10 минут через 1, 3, 5, 7 часов после снятия блока в G1 и S фазах.
- 8. Отмывали Click-EdU теплой бессывороточной средой.
- 9. Проводили лизис и фиксацию через каждые 0, 15, 30, 60 минут.
- 10. Далее проявляли Click-EdU по стандартному протоколу.
- 11. Визуализировали полученные препараты на светооптическом уровне, а для электронно-микроскопического детектировали Click-EdU при помощи антител (методика описана выше).

3.6 Световая микроскопия

3.6.1 Прижизненные наблюдения

Для наблюдений за клетками культуры HT1080, экспрессирующими mRFP-PCNA, использовали инвертированный флуоресцентный микроскоп Nikon Eclipse Ti-E с иммерсионным объективом 60x Plan Apo Oil (NA 1.4), регистрацию осуществляли с помощью EM-CCD камеры DU-897E iXon (Andor). Наблюдения за клетками проводили при 37°C и 5% CO₂ во влажной камере для прижизненных наблюдений (Tokai Hit).

3.6.2 Микроскопия суперразрешения

Благодаря микроскопии суперразрешения, возможно преодолеть дифракционный предел и визуализировать структуры, размером менее 200 нм. Одним из используемых в данной работе подходов является метод детекции индивидуальных молекул в пространстве изучаемого образца - STORM (Stochastic optical reconstruction microscopy). Для приготовления препаратов клетки выращивали на чашках Петри со стеклянным дном, толщина стекла – 0,17 мм (Corning). Время включения репликативной метки EdU составляло 10 минут. Затем клетки фиксировали 10-15 минут 3,7% раствором параформальдегида на буфере PBS* (PBS+5 мМ MgCl₂), после чего образцы отмывали от фиксатора раствором PBS 3 раза по 5 минут. Блокировали неспецифическое связывание антител с помощью PBS с 1% БСА, 0.1% Тритон X-100 в течение 30 минут. Репликативную метку выявляли по протоколу, описанному ранее. В данном случае использовали AlexaFluor-647. Данный метод требует использования особого буфера для визуализации образца (Dani et al., 2010).

Наблюдения проводили с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа Nikon N-STORM, используя иммерсионный объектив x100 (NA 1.49) и EM-CCD камеру DU-897E iXon (Andor). Анализ полученных данных производили в программе Nis-elements 4.6.

Разрешающая способность прибора в случае использования этого метода увеличивается на порядок. Благодаря этой технологии возможно с точностью до десятков нанометров определить локализацию отдельной молекулы. Необходимым условием для получения изображения является детекция определенного количества фотонов от одной точки. После этого происходит реконструкция флуоресцентной фотографии из информации о точечной локализации отдельных молекул флуорохрома. В ходе пробоподготовки необходимо избегать плотного мечения из-за того, что

сигналы от флуорохромов перекрываются друг с другом во время детекции, что может приводить к ошибкам в точности локализации структуры, меченной одиночными флуорохромами. В основе метода лежит особенность флуорохромов, которые в определенных условиях становятся неактивными и переходят в темновое состояние. В таком положении они не способны кванты испускать света. однако впоследствии ОНИ стохастически возбуждаются при облучении лазером. При повторении циклов, благодаря использованию временного разрешения, накапливается информация об единичных сигналах. В ходе автоматического анализа высветившиеся фоновые сигналы убираются из анализа данных.

Для 3D анализа структурных элементов хроматина размером менее 200 нм использовали метод микроскопии структурированного освещения – SIM (Structured Illumination Microscopy). Наблюдения проводили с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа Nikon N-SIM в 3D режиме структурированного освещения. Клетки фиксировали по стандартной методике для световой микроскопии.

Особенностью этого способа визуализации является наличие решетки в оптическом пути, сопряженной с фокальной плоскостью, которая создает определенный паттерн освещения на детектируемом изображении. Во время съемки происходит перемещение решеток, что вызывает изменение муарового рисунка на исследуемом объекте. Во время съемки фиксируется информация о различной ориентации структурного освещения муаровых изображений, которая впоследствии извлекается с помощью алгоритма реконструкции фотографий. Полученный объем информации анализируется математически в пространстве Фурье, а затем формирует изображение с улучшенным в два раза разрешением.

3.7 Иммуноэлектронная микроскопия

3.7.1 Фиксация с лизисом

Для иммунофлуоресцентной и иммуноэлектронной микроскопии клетки лизировали в 0.1% растворе неионного детергента Тритон X-100, приготовленном на буфере «50/5» (50 мМ PIPES, pH 7,2-7,4 + 5 мМ MgCl₂. В зависимости от задачи могли использовать буфер PBS* (PBS+5 мМ MgCl₂).

- Клетки дважды промывали 0,1 % раствором Тритон X-100 на буфере «50/5». Первый раз быстро – для удаления остатков культуральной среды, второй раз, в зависимости от условий эксперимента, 30 сек/1,5 мин/Змин.
- Фиксация: 3,7% раствор ПФА на буфере «50/5» (PBS*) в течение10-15 мин.
- 3. Промывали буфером «50/5» 3 раза по 5мин.
- Препараты заключали в Mowiol с DAPI.
 С использованием антител (для электронной микроскопии)
- 5. Поскольку используемые в работе антитела против GFP плохо связываются с антигенами в буфере «50/5», инкубацию с антителами проводили в буфере PBS*. Промывали PBS* 3 раза по 1 мин.
- Блокировка неспецифического связывания АТ: 1% БСА, 0,1 % Тритон X-100 в PBS* 1 час.
- Первичные антитела: мышиные моноклональные антитела против GFP (предоставлены A.Belmont, UIUC, USA) 1:1000, либо кроличьи моноклональные антитела Anti-AlexaFluor-488 (A-11094, Invitrogen) 1:1000 в PBS* с 0,1% Тритон X-100 и 1% БСА. Инкубация в течение ночи при 4°C.
- 8. Отмывка от AT I: PBS* с 0,1% Тритон X-100 5 раз по 5 мин.
- 9. Вторичные антитела: Nanogold, с наночастицами золота против мыши, либо козьи Ig против иммуноглобулинов кролика, конъюгированные с

частицами золота диаметром 1,2 нм (Nanoprobes, USA), разведение 1:400 в PBS* с 0,1% Тритон X-100 и 1% БСА. Инкубация в течение ночи при 4°С.

- 10. Отмывка от АТ II: PBS* с 0,1% Тритон X-100 5 раз по 5 мин.
- 11. Промывали PBS* 3 раза по 5 мин.
- 12. Промывали буфером «50/5» 3 раза по 5 мин.
- 13. Дополнительно фиксировали 1,25% глутарового альдегида на буфере «50/5» в течение 1 часа.
- 14. Промывали дистиллированной водой 3 смены по 10 минут.
- Восстанавливали альдегидные группы водным раствором боргидрида Na (1 мг/мл) 2 раза по 10 минут.
- 16. NaBH4 отмывали дистиллированной водой 3 раза по 10 мин.
- 17. Проводили процедуру серебряного усиления.

3.7.2 Фиксация без лизиса

В некоторых случаях для сохранения нативной организации хроматина применяли метод классической фиксации 2.5% глутаровым альдегидом на буфере Зеренсена. Клетки инкубировали с EdU в течение 2 часов, после чего отмывали теплым раствором Хэнкса, фиксировали сразу, либо через 4 часа после отмывки. Для последующей визуализации репликативного маркера клетки подвергали всем стадиям пробоподготовки для иммуноэлектронной микроскопии (см. ниже).

3.7.3 Процедура серебряного усиления

Серебряное усиление проводили по протоколу, разработанному Dancher (Dancher, 1981).

Реактивы

- 1. Деионизированный бидистиллят MilliQ (Millipore).
- Отмывочный буфер: 50 мМ MES (0,962 г/100 мл), 200 мМ сахарозы (6,846 г/100 мл), pH 5,8, отрегулированный 10 N NaOH.
- 3. 1 М раствор MES, pH 6,1 отрегулирован 10 N NaOH.
- Гуммиарабик, 50г в 100 мл milliQ, растворяли в течение 3 дней. После растворения дегазировали и разливали по 5 мл в 50 мл пробирки. Размораживали непосредственно перед применением.
- 5. NPG (н-пропил галлат) 10 мг растворяли в 250 мкл 96° этанола и доводили MilliQ до 5 мл.
- 36 мг лактата серебра в 15 мл пробирке (в фольге) смешивали с 5 мл milliQ в темноте непосредственно перед использованием. Процедура усиления
- 1. Смешивали 5 мл раствора гуммиарабика с 2 мл раствора MESa (pH 6,1), перемешивали.
- Споласкивали клетки отмывочным буфером (pH 5,8) 3 смены по 10 мин.
- 3. (В темноте) За 3 минуты до реакции добавляли 1,5 мл НПГ к гуммиарабику, перемешивали.
- (В темноте) За 1 минуту до реакции смешивали лактат серебра с водой и добавляли 1,5 мл полученного раствора к гуммиарабику.
- Выливали полученный раствор на стекла с клетками в чашках Петри (обязательно новые – реакция очень чувствительна к любым примесям). Реакцию проводили 2-5 минут.
- 6. Останавливали процесс milliQ промывали 2 раза по 1 мин, а затем еще 3 раза по 5 минут.

3.7.4 Обезвоживание, пропитка, изготовление срезов для электронной микроскопии

Обезвоживание спиртовое.

- 1. 50% спирт 3 смены по 15 мин.
- 2. 70% спирт 3 смены по 15 мин.
- 3. 80% спирт 3 смены по 15 минут.
- 4. 96% спирт 1 час.

Замещение-пропитка. В качестве заливочной среды использовали эпон 812 (Epon-812:DDSA:MNA:DMP=9:6:4:0,23) (Fluka).

- 5. Смесь 96% спирт эпон 3:1 1,5 час.
- 6. Смесь 96% спирт эпон 1:1 1 час.
- 7. Смесь 96% спирт эпон 1:3 на ночь при комнатной температуре.
- 8. Чистый эпон сутки при комнатной температуре.
- Стекла с клетками вверх клали на полимерную пленку (Aclar, EMS, USA), заливали сверху эпоном, сверху клали вторую пластинку и полимеризовали сутки при 60°С.
- 10. Стекла отделяли от смолы после разогрева в кипящей воде для размягчения эпона.
- 11. Под микроскопом самодельным жестяным метчиком, надетым на объектив, отмечали меченые клетки.
- 12. Под бинокуляром вырезали нужные кусочки материала, приклеивали их цианакрилатным клеем к пустым эпоновым заливкам для удобства закрепления в ультрамикротоме.
- Ультратонкие (90-120 нм) и полутонкие (250-300 нм) срезы приготавливали при помощи ультрамикротома Ultracut-E (Reichert-Jung, Австрия) и вылавливали на бленды с формваровой пленкой (0.35 %).

- 14. Срезы контрастировали 1% водным уранилацетатом в течение 10-20 мин, промывали дистиллированной водой и высушивали.
- Контрастировали цитратом свинца по Рейнольдсу (Reynolds, 1969) 5 мин, промывали дистиллированной водой и высушивали.

Контрастированные срезы исследовали с помощью электронного микроскопа JEM-1400 (Jeol) с использованием высокоуглового держателя при ускоряющем напряжении 100-120 kV.



Рисунок 11. Разработанный способ детекции новосинтезированной ДНК для последующей визуализации на электронно-микроскопическом уровне.

3.8 Микроинъекции

Для *in vivo* мечения использовали первичные мышиные моноклональные антитела против GFP, ковалентно связанные с частицами золота, размером 1.4 нм (Nanoprobes, USA). Антитела разводили на буфере 10 мМ Na₂PO₄, pH 7.4, 100 мМ KCL, содержащем 1.5 нг/мкл декстрана (70 кДа), конъюгированного Texas Red (Sigma), до концентрации 25-50 нг/мкл. Агрегаты антител удаляли центрифугированием при 16 000 g в течение 10

минут при 4°C и супернатант помещали в стеклянную микропипетку, изготовленную с помощью горизонтального пуллера (Flaming). Микроинъекцию проводили при постоянном давлении 2.5 атм для предотвращения засорения пипетки агрегатами антител.

За сутки до инъекции клетки выращивали на покровных стеклах в чашках Петри. Инъекцию осуществляли при поддержании температуры 37°С и 5% СО₂ в камере для прижизненных наблюдений. После инъекции клетки возвращали в инкубатор на 15-60 минут, затем фиксировали 2.5% глутаровым альдегидом на буфере Зеренсена в течение 1 часа. После чего делали стандартную пробоподготовку для электронной микроскопии.

4. Результаты

4.1 Особенности структурной организации компактизованных хроматиновых кластеров репликации во время S-фазы

4.1.1 Определение параметров клеточного цикла с помощью прижизненных наблюдений

Репликация динамически распространяется по всему объему ядра от эухроматина к гетерохроматину. Гетерогенность процесса очевидна, благодаря разному рисунку распределения репликативных фабрик, так называемым паттернам репликации (Rhind, Gilbert, 2013). Благодаря такому визуальному различию легко определить, какая из фракций хроматина в данный момент осуществляет процесс репликативного синтеза. Для анализа временной динамики синтеза ДНК мы использовали клеточную линию фибросаркомы человека – НТ1080. Для наблюдения за процессом репликации хроматина с использованием флуоресцентной микроскопии необходимо было получить клеточную популяцию с флуоресцентным маркером. Для этих целей клетки трансфецировали плазмидой mRFP-PCNA и получали стабильную клеточную линию с экспрессией белка mRFP-PCNA, который локализован в вилке репликации и отображает распределение репликативных фокусов.

С помощью прижизненных наблюдений мы проследили за динамикой процесса синтеза ДНК (рис. 12) и определили параметры определенных фаз клеточного цикла (S, G2, M) (рис. 13).



Рисунок 12. Динамика изменения экспрессии mRFP-PCNA, отображающая смену поздних паттернов репликации в клеточной культуре HT1080 (А-К). Прижизненное наблюдение, интервалы между кадрами 30 минут. Флуоресцентная микроскопия.

временные параметры прижизненной Анализируя съемки, МЫ HT1080, показали, что клеток время репликации для культуры экспрессирующих mRFP-PCNA, В среднем составляет 8 часов И распределяется следующим образом: 1 паттерн, отражающий раннюю Sдиффузным фазу, распределением малоразмерных характеризуется репликативных кластеров и длится 2,3 часа; 2 паттерн, представленный более крупными кластерами, которые локализованы ближе к периферии ядра длится 1,9 часа; 3 паттерн характерен для средней S-фазы и представлен крупными репликативными доменами, выявляющимися на периферии ядра и ядрышек, его время составляет 1,88 часа; в 4 паттерне видны крупные синтезирующиеся гетерохроматиновых домены, а время репликации длится 0,77 часа; 5 паттерн, или поздняя S-фаза, отражает завершение репликации и представлена несколькими крупными локусами конститутивного гетерохроматина, время этой фазы синтеза составляет 0,69 часа. В ходе прижизненных наблюдений также были проанализированы длительность G2 фазы и митоза, они составили, соответственно, 3,2 и 1,3 часа (рис. 13). Эти параметры были необходимы для того, чтобы аккуратно различать эу- и гетерохроматиновую природу синтезируемой ДНК, а также для оценки скорости движения клеток по циклу после процедуры синхронизации.



Рисунок 13. Среднее время прохождения разных фаз клеточного цикла в клеточной популяции HT1080- mRFP-PCNA.

4.1.2 Изучение пространственной организации репликации хроматина с использованием микроскопии с суперразрешением

Динамика удвоения ДНК на данный момент подробно изучена. Известен не только полуконсервативный механизм репликации, но также ферменты, принимающие участие в этом процессе (Perumal et al., 2009). Однако поведение ДНК в контексте сложно компактизованного хроматина во время репликации до сих пор остается неизвестным. Одним из способов анализа организации высокоструктурированных доменов гетерохроматина было создание и изучение искусственных трансгенных локусов (Strukov, 2003). С помощью подобной модельной системы было доказано, что после транскрипции происходит глобальная инициации декомпактизация искусственного гетерохроматинового локуса (Belmont, 2010), однако при ЭТОМ сохраняется локальная структурированность, выражающаяся В сохранении хромонемного уровня компактизации (Tumbar et al., 1999). При анализе трансгенных локусов во время репликации было замечено аналогичное поведение (Li, Reinberg, 2011).

Необходимо было проверить, является ли это необходимым условием для синтеза ДНК, или репликация осуществляется по другому пути.

Изучаемые в данной работе структуры находятся за пределами разрешающей способности световой микроскопии, поэтому для детального анализа тонкой организации хроматина В ходе репликации были использованы методы флуоресцентной микроскопии с суперразрешением, а также методы иммуноэлектронной микроскопии. Современные достижения световой микроскопии позволяют преодолеть дифракционный барьер и анализировать интересующие структуры, используя наименее деструктивные способы фиксации клеток. Для этого используют методы суперразрешения (Gustafsson MG, 2000; Baddeley et al., 2009). Необходимым условием получения качественных изображений ДЛЯ такого метода является использование устойчивых флуоресцентных красителей. Поэтому вместо белка mRFP-PCNA мы использовали маркер новосинтезированнной ДНК -EdU, который является аналогом тимидина и встраивается в ДНК во время ее синтеза. Для его детекциии использовали Click-реакцию с азидо-производной AlexaFluor-647. флуорохрома Данный флуорохром по своим фотохимическим свойствам является оптимальным для метода STORM (Stochastic optical reconstruction microscopy). Этот метод позволяет в значительной степени улучшить разрешение и оценить размер и морфологию репликативных кластеров.

На рисунке 14 продемонстрировано распределение метки в ядрах, находящихся в 3 паттерне S-фазы.

Визуально различимы овальные структуры размером около 200 нм, которые представляют собой гетерохроматиновые репликативные домены в момент синтеза ДНК. Репликативная метка распределена по всему объему фокусов репликации и отображает пространственную организацию поздно реплицирующегося хроматина.

Однако с помощью световой микроскопии мы можем наблюдать только за распределением метки в пространстве ядра и не имеем возможность анализировать поведение немеченой ДНК. Такое ограничение метода создает иллюзию плотно организованного кластера в то время, как, возможно, происходит реогранизация недетектируемого хроматина. Для того, чтобы анализировать распределение меченой ДНК в контексте визуально различимых хроматиновых доменов, мы использовали метод электронной микроскопии. Как известно, этот метод имеет некоторые ограничения. Так, например, фиксация с последующей дегидратацией образца вызывает вопросы о сохранении нативности наблюдаемых структур. Кроме того, в компактизованном хроматине происходит маскирование антигена, что в паре с ограниченной диффузией зондов к мишеням приводит к затруднениям в исследовании. Поэтому мы использовали различные электронно-микроскопических наиболее варианты подходов для достоверного описания выявляемых структур.



Рисунок 14. Визуализация кластеров репликонов на светооптическом уровне с использование микроскопии с суперразрешением (STORM). А, Б - общий вид ядер, находящихся в средней фазе репликации. Метка распределена по периферии ядер и ядрышек. В-З - Гетерохроматиновые репликативные домены, размер которых равен 200 нм. Увеличенные изображения репликативных фабрик в ядрах, представленных на панели A, Б. Репликативный маркер - EdU-AlexaFluor-647.

4.1.3 Исследование организации репликативных доменов с помощью метода микроинъекции

В связи с плотной укладкой хроматиновых доменов, а также с образованием межбелковых сшивок после фиксации может возникнуть проблема доступности антигена, что способно привести к низкой эффективности связывания антител. Чтобы избежать этих проблем, мы применили метод прижизненных микроинъекций с последующей фиксацией для электронной микроскопии, чтобы проанализировать истинную структуру хроматиновых локусов с максимально доступным разрешением.

Для этого была использована клеточная культура СНО, стабильно экспрессирующая белок eGFP-PCNA. Детекцию репликативных доменов на электронно-микроскопическом уровне проводили с помощью антител против GFP, конъюгированных с 1.4 нм частицами золота. Инъекции антител в ядро не нарушали физиологические процессы клетки, так как в течение нескольких часов после ЭТОГО клетки сохраняли жизнеспособность. Поскольку связывание антител происходило в живой клетке еще до фиксацией глутаровым фиксации, этот метод оказался совместим с альдегидом. В таком случае локализация метки в контексте плотного гетерохроматинового локуса в большей степени отражает нативную организацию репликативных доменов. На рисунке 15 можно наблюдать кластеры серебряных частиц в компактизованных хроматиновых структурах. При ЭТОМ наночастицы распределяются по всему объему ЭТИХ гетерохроматиновых доменов, которые представляют собой высшие уровни организации хроматина. Полученные результаты подтверждают высказанное ранее предположение о сохранении плотно конденсированной организации время гетерохроматина репликативного BO синтеза. а также 0 пространственном распределении новосинтезированной ДНК в объеме

сложно структурированных доменов. Однако такой характер распределения метки не вписывается в концепцию существования репликативных фабрик.



Рисунок 15. Распределение репликативного маркера в объеме конденсированных хроматиновых доменов. А – общий вид клеточного ядра, находящегося в средней S-фазе. Б, В – репликативные домены хроматина, в которых частицы серебра распределены по всему объему доменов размером 200 нм. Увеличенные изображения доменов, представленных на панели А. Метод микроинъекции антител к GFP, конъюгированных с золотом. Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ). Размер масштабного отрезка 1 мкм (А) и 0.2 мкм (Б, В).

4.1.4 Ультраструктурная организация плотно конденсированных кластеров хроматина во время репликативного синтеза

Несмотря на неоспоримые преимущества, метод микроинъекций все же имеет ряд существенных недостатков. Трудоемкость этой процедуры приводит к получению ограниченного количества результатов и отражает индивидуальное состояние выбранной для инъекции клетки. Для того чтобы оценивать репликативные процессы, происходящие в клеточной популяции, больше классической окраски подходит метод антителами, конъюгированными золотом, которой предшествует фиксация клеток. параформальдегидной фиксации Применение приводит к появлению межмолекулярных сшивок, что может влиять на доступность антигена в компактных гетерохроматиновых доменах. Для тестирования эффективности данного метода применительно к нашим объектам, как и в предыдущих CHO. экспериментах, была использована клеточная культура экспрессирующая eGFP-PCNA. С помощью окраски первичными антителами к GFP, а затем вторичными антителами, конъюгированными с золотом, были участки реплицирующегося гетерохроматина, выявлены связанного с ядерной оболочкой (рис. 16), что соответствует 3 паттерну репликации. Как и в экспериментах с микроинъекциями, детектируемый маркер репликации занимает весь объем гетерохроматиновых доменов. Таким образом, выбранный способ пробоподготовки не вызывает значительных нарушений в характере мечения реплицирующегося хроматина и может быть использован для систематического исследования.

Такой способ детекции приводит к более высокой плотности мечения хроматина по сравнению с иммуноокрашиванием ультратонких срезов. В связи с этим, происходит экранирование меткой самой структуры компактизованной ДНК, однако в некоторых случаях, при невысокой плотности мечения (указано стрелкой), удалось визуализировать электронноплотный хроматин. На рисунке 16 Г видно, что домен, в котором происходит синтез ДНК (указано стрелкой), менее электронноплотен, чем соседний локус. Из этого наблюдения можно предположить, что в процессе репликации происходит локальная декомпактизация гетеродоменов, которая не приводит к глобальной деконденсации всего локуса.



Рисунок 16. Ультраструктурная организация хроматиновых доменов. А, Б – общий вид ядра клетки, находящегося в 3 паттерне репликации. В, Г – репликативные домены гетерохроматина, локализованные вблизи ядерной оболочки. Стрелкой указан домен, в котором происходит репликация. Его электронная плотность отличается от соседнего домена. Увеличенные изображения доменов, представленных на панелях А, Б. ТЭМ. Масштабный отрезок – 1 мкм (А, Б) и 0.2 мкм (В, Г).

4.1.5 Высокоорганизованные хроматиновые локусы не претерпевают глобальной деконденсации в процессе репликации

Детекция репликативных локусов на ультраструктурном уровне посредством белка PCNA позволяет анализировать распределение меченой фракции в момент синтеза ДНК. Чтобы смотреть за поведением хроматина, прошедшего репликацию, необходимо было изменить способ визуализации. Для этого мы использовали маркер новосинтезированной ДНК – EdU, который является аналогом BrdU. В отличие от BrdU в ходе пробоподготовки не происходит повреждения нативной структуры для визуализации меченой ДНК. Для последующего анализа организации пострепликативной фракции хроматина необходимо было протестировать комбинацию Click-химии и иммунодетекции на ультраструктурном уровне.

Кроме того, в ходе исследования такого фундаментального процесса, как репликация хроматина эукариот, необходимо было убедиться в воспроизводимости результатов на разных модельных системах, а также проверить поведение разных клеточных культур.

была использована клеточная популяция HT1080. Для ЭТОГО Встраиваемая метка впоследствии выявлялась с помощью click-реакции с флуорохромом AlexaFluor-488. На электронно-микроскопическом уровне этот маркер визуализируется с помощью окраски первичными антителами к флуорохрому, а затем вторичными антителами, конъюгированными с золотом. Этот способ детекции называют иммуноголдингом. С его помощью удалось выявить репликативную метку в объеме синтезирующихся гетерохроматиновых локусов, локализованных по переферии ядра (рис. 17). Эти данные соответствуют ранее изложенным результатам, полученным с помощью микроскопии С суперразрешенияем и иммуноэлектронной микроскопией PCNA. Меченая ДНК так же локализована равномерно в объеме плотно конденсированных гетерохроматиновых локусов, которые не

претерпевают глобальной декомпактизации во время репликативного синтеза.



Рисунок 17. Распределение репликативной объеме метки В конденсированных хроматиновых локусов. А – общий вид клеточного ядра, находящегося в средней S-фазе. Б-Г – гетерохроматиновые репликативные домены, демонстрирующие распределение репликативной метки в объеме конденсированного хроматина. Увеличенные изображения доменов, представленных на панели А. Иммуноцитохимия с использованием антител, конъюгированных золотом. ТЭМ. Масштабный отрезок – 1 мкм (А) и 0.2 мкм (Б-Г).

Использование многообразных методических подходов позволило проанализировать и суммировать данные об ультраструктурной организации гетерохроматиновых доменов во время репликации. Результаты, полученные на светооптическом и электронно-микроскопическом уровнях исследования, позволяют утверждать, что во время репликации гетерохроматиновых локусов сохраняется их высокоструктурированная организация, и процесс синтеза происходит по всему объему плотно упакованных гетерохроматиновых доменов.

4.2 Способ укладки различных фракций хроматина в условиях максимальной компактизации генома

Высокая степень компактизации генома приводит к топологическому сближению различных генных локусов. Некоторые из них функционально формируют специфические связаны друг с другом И межгенные взаимодействия. С помощью молекулярно-биологических С-методов было показано существование ТАДов – протяженных сегментов хромосомной ДНК, которые характеризуются высоким уровнем взаимодействия генов внутри них (Gibcus, Dekker, 2013). На сегодняшний день нет определенной точки зрения о том, как именно формируются эти домены и как меняется их структура и функциональная активность в зависимости от фазы клеточного цикла. Однако с помощью Hi-C техники было показано, что во время митоза, максимальной компактизации хроматина, ТАДы, раннее в момент выявляемые в интерфазе, перестают детектироваться (Naumova et al., 2013).

Это можно объяснить тем, что во время компактизации происходит переупаковка ДНК, которая приводит к потере контактов между генными локусами, ранее формировавшими ТАД. Однако другой причиной отсутствия ТАДов в митозе может являться ограничение метода, связанное с пробоподготовкой, или же низким разрешением. В таком случае можно предположить существование иерархической укладки хроматина, которая не выявляется вследствие плотной упаковки. Чтобы прояснить этот вопрос, необходимо было детектировать хроматиновые домены в ходе митотической компактизации. Для этого использовали ΜЫ методы световой И иммуноэлектронной микроскопии, чтобы визуализировать топологию структурных элементов в контексте высоко компактизованных митотических хромосом. Следуя гипотезе, которая постулирует соответствие между репликативными доменами S-фазы и структурными ТАДами (Dileep et al., 2015), мы использовали отложенную репликативную метку для визуализации структурных элементов в ходе митотической компактизации хроматина.

4.2.1 Структурная организация хроматиновых доменов, соответствующих репликативным единицам генома, в контексте плотно компактизованных профазных хромосом

Для того, чтобы проанализировать особенности укладки хроматина в условиях максимальной компактизации, мы провели серию экспериментов с отложенной меткой.

Клеткам культуры HT1080 давали репликативный маркер EdU, который встраивался в ДНК находящихся в S-фазе клеток в течение 1 часа. Время импульса репликативной метки определяли, исходя из полученных раннее молекулярных данных о скорости движения репликативной вилки (Conti et al., 2007), а также из наблюдений с помощью конфокальной микроскопии за временем синтеза одного кластера репликации (Ma et al., 1998).

Для анализа распределения разных фракций хроматина в объеме профазных ядер клетки фиксировали через 4 и 8 часов после включения метки. Таким образом, меченый эухроматин выявлялся в митотических хромосомах клеток, зафиксированных через 8 часов после включения маркера (рис. 18А), а в клетках, зафиксированные через 4 часа после включения EdU, демонстрировалась локализация гетерохроматина (рис. 18Г). Детальных различий для двух фракций на светооптическом уровне не наблюдалось, однако было видно дискретное распределение метки по всему объему компактизующегося хроматина в обоих случаях. В некоторых профазных хромосомах можно было видеть две отдельные точки пострепликативного меченого хроматина (рис. 18Е, указано стрелкой), что возможно указывает на сегрегацию сестринских хроматид. Однако нет

доказательств, что этот процесс происходит именно во время профазной конденсации.



Рисунок 18. Анализ распределения эухроматиновых (A, B) и гетерохроматиновых (Г, E) репликативных доменов во время профазной компактизации. Наблюдается дискретное распределение репликативной метки в профазных хромосомах. В некоторых случаях можно наблюдать две точки, которые, возможно, отражают сегрегацию сестринских хроматид (E, указано стрелкой). SIM. Масштабный отрезок 5 мкм. EdU – зеленый (A, Г), DAPI – синий (Б, Д), совмещение каналов (B, E).

Несмотря на все достоинства микроскопии суперразрешения, в данном эксперименте ее возможности не позволяют выявить и проанализировать распределение меченой пострепликативной фракции хроматина. Поэтому в последующих экспериментах мы использовали разработанный нами ранее метод визуализации новосинтезированной ДНК
на ультраструктурном уровне для более детального анализа структурной организации репликативных доменов в профазных и метафазных хромосомах.

4.2.2 Ультраструктурный анализ эу- и гетерохроматина на разных стадиях митотической компактизации

Результаты, полученные молекулярно-биологическими методами, указывают на то, что структурные элементы, ТАДы, распадаются во время митоза (Naumova et al., 2013). Нашей целью было визуализировать возможные структурные изменения хроматиновых доменов в ходе митотической компактизации на электронно-микроскопическом уровне.

Для анализа ТАДов с помощью Hi-C в ходе пробоподготовки фиксацию образцов производят на буфере PBS. Для того, чтобы сравнивать данные, полученные разными методами, мы использовали буфер PbBS* (PBS, pH 7,2-7,4, 5 mM MgCl₂) для фиксации в экспериментах с отложенной меткой с последующей визуализацией на ультраструктурном уровне. В такой ситуации хроматин частично разворачивается и теряет свою нативную плотность, однако эти условия наиболее близки к фиксации на буфере PBS, используемом для анализа ТАДов в Hi-C.

Изучение ультраструктурной организации компактизующегося хроматина с помощью метода иммуноэлектронной микроскопии необходимо было начать с исследования его профазной конденсации. Для визуализации структурных доменов хроматина мы использовали различия во времени репликации эу- и гетерохроматиновых районов хромосом. Так же, как и в предыдущих экспериментах, для репликативного мечения мы использовали EdU, который встраивался в ДНК во время репликации в течение 1 часа, затем его отмывали и инкубировали клетки в среде культивирования. Фиксацию образцов проводили через 4 часа для анализа гетерохроматиновой

фракции и через 8 часов для анализа эухроматиновой фракции. Таким образом, в митотических хромосомах можно было наблюдать те же самые хроматиновые домены, которые находились в состоянии репликации в момент мечения.

В отличие от световой микроскопии полученные результаты демонстрируют значительные различия в пострепликативной организации для эу- и гетерохроматина в профазе. Для сравнения разных фракций – эухроматиновой и гетерохроматиновой – были выбраны одинаковые стадии профазы митоза (рис. 19 А, Г). Таким образом, степень компактизации хромосом в обоих случаях была одинакова, однако характер распределения метки отличался. В случае с эухроматиновой фракцией меченые локусы распределяются диффузно в объеме конденсированного хроматина (рис. 19) А-В). Однако в случае с гетерохроматиновой фракцией можно наблюдать плотно конденсированные хроматиновые локусы, собранные в небольшие локально расположенные и пространственно разобщенные кластеры (рис. 19 Г-Е). Также следует отметить, что плотность распределения метки в эухроматиновой фракции гораздо ниже, чем в гетерохроматиновой. Возможно, это связано с различной степенью компактизации эу- и гетерохроматина на данной стадии митотической компактизации.

Фиксация клеток на буфере PBS* приводит к разрыхлению нативной структуры хроматина (Belmont et al., 1989), и за счет этого кластерная организация ДНК может не выявляться. Однако при импульсном мечении и последующей фиксации на PBS* в новых буферных условиях также можно наблюдать репликативные кластеры хроматина (рис. 20).

Для того, чтобы проследить за изменениями, происходящими с хроматиновыми доменами во время компактизации, мы проанализировали ультраструктурную организацию хроматина на разных стадиях профазной конденсации для эухроматиновой (рис. 21) и гетерохроматиновой (рис. 22)

фракций. Прогрессию митотической компактизации определяли по изменению морфологии хроматина (Kireeva et al., 2004)



Рисунок 19. Различия в организации эухроматиновых (А-В) и гетерохроматиновых (Г-Е) репликативных доменов в профазе митоза. А, Г – общий вид профазных ядер. Б, В – репликативные домены, включившие метку в начале S-фазы, теряют свою организацию в профазе митоза. Д, Е – репликативные домены, включившие метку в конце S-фазы, сохраняют свою организацию в профазе митоза. Б, В и Д, Е – увеличенные изображения доменов, представленных на панелях А и Г, соответственно. Эксперименты с отложенной меткой. Репликативный маркер EdU выявляли с помощью антител, конъюгированных с золотом. ТЭМ. Толщина среза 100 нм. Масштабный отрезок 1 мкм.



Рисунок 20. Распределение репликативных кластеров в интерфазе при фиксации на буфере PBS*. Сохранение кластерной организации репликативных доменов при данном типе фиксации. А – общий вид интерфазного ядра; Б-Г – распределение реплицирующейся ДНК в объеме ядра. Изображения доменов, представленных на панели А, снятые на различных увеличениях. ТЭМ. Толщина среза – 250 нм. Масштабный отрезок 1 мкм.

Оказалось, что по сравнению с интерфазой, в ранней профазе не наблюдается кластерного распределения хроматина (рис. 21 Б, В). Однако дальнейшей компактизации переходе поздней профазе при И К меченой пострепликативной фракции гетерогенность эухроматина становится более очевидна (рис. 21 Д, Е). Несмотря на то, что вместе с конденсацией хроматина также возрастает плотность метки, в ходе наблюдения за эухроматиновой фракцией не было выявлено локального распределения меченого хроматина в объеме ядра на ультраструктурном уровне. Меченый эухроматин распределяется по всему объему ядра, не формируя ярко выраженных кластеров. Такая особенность расположения разных репликативных доменов может влиять на детекцию структурных элементов при использовании молекулярно-биологических С-методов.

В случае с гетерохроматиновой фракцией меченные частицами серебра крупные плотно упакованные хроматиновые домены выявляются на всех стадия митотической компактизации (рис. 22). Анализ распределения хроматина внутри этих доменов затруднен в связи с плотной профазной конденсацией хромосом. Поэтому мы фокусируемся на наблюдении и оценке плотности и распределения золотой метки, усиленной серебром, внутри При гетерохроматиновых доменов. детальном рассмотрении областей ультраструктурной организации меченых выявляется гетерогенность в плотности расположения частиц серебра в плотно конденсированных гетерохроматиновых доменах (рис. 22 Д, И). Такое распределение может свидетельствовать в пользу сохранности хроматиновых доменов высшего порядка, выявляемых в интерфазном хроматине, в составе митотических хромосом.



Рисунок 21. Прогрессия компактизации эухроматина на различных стадиях профазной конденсации. Характер распределения пострепликативного эухроматина в пространстве ядра в ранней (А-В) и поздней (Г-Е) профазе митоза. А, Г – общий вид профазных ядер. Б, В – Отсутствие структурной доменной организации. Д, Е – в ходе профазной конденсации наблюдается структурированность репликативных кластеров. Б, В и Д, Е – увеличенные изображения участков ядер, представленных на панелях А и Г, соответственно. ТЭМ. Толщина среза 250 нм. Масштабный отрезок 1 мкм.



Рисунок 22. Перераспределение гетерохроматиновой фракции в ранней профазе (А-В), поздней профазе (Г-Е) и в митозе (Ж-И). А, Г, Ж – общий вид профазных ядер. Б, В; Д, Е и З, И – распределение хроматина, реплицированного в поздней S-фазе. Увеличенные изображения хроматина, представленного на панелях А, Г и Ж, соответственно. Сохраняется доменная организация (Д). Наблюдается гетерогенность в митотической хромосоме (И). ТЭМ. Толщина среза 250 нм. Масштабный отрезок 1 мкм.

4.2.3 Дискретная организация эухроматиновых доменов в составе высоко компактизованных митотических хромосом

Использование буфера PBS* (PBS, pH 7,2-7,4, 5 mM MgCl₂) в было экспериментах, описанных раннее, обусловлено желанием воспроизвести условия фиксации, выбранные для анализа пространственной организации хроматина 3С-методами. Однако В ЭТОМ случае ультраструктурная организация хроматина становится более рыхлой и теряет свою нативную организацию. Поэтому для выявления высших уровней организации эухроматина были изменены буферные системы и протоколы фиксации. При этом мы ориентировались на литературные данные по определению оптимальных условий стабилизации структуры хроматина in situ (Belmont et al., 1989). В последующих экспериментах в качестве буфера для параформальдегидной фиксации был использован буфер 50/5 (50 мМ PIPES, 5мM MgCl₂, pH 7,2-7,4), который наименее деструктивно влияет на морфологию хроматина.

В предыдущих экспериментах мы использовали включение EdU в течение 1 часа. Этот выбор обусловлен средним временем репликации индивидуальных репликативных доменов (Conti et al., 2007; Ma et al., 1998). В то же время, возможно, что сохранение внутриклеточного пула невключившегося в ДНК EdU после отмывки приводит к фактическому удлинению времени мечения и активации соседних репликативных доменов. Вероятно, этот эффект в сочетании с частичной декомпактизацией хроматина при фиксации на PBS* может являться причиной того, что дискретность в распределении частиц серебра в экспериментах с отложенной меткой не очевидна (рис. 19 Б, В; рис. 21 Б, В). Поэтому в следующей серии экспериментов мы уменьшили время мечения EdU до 10 мин. Исходя из данных экспериментов по *in vivo* наблюдениям включения флуоресцентно меченных нуклеотидов в ДНК во время репликации (Manders et al., 1996),

истощение внутриклеточного пула нуклеотидов происходит в течение 15-20 минут. За это время метка накапливается в реплицирующемся кластере, но не успевает перейти на соседний. В остальном схема эксперимента с отложенной меткой осталась прежней: после 10 минутного включения репликативного маркера производились многочисленные отмывки, а через 8 часов клетки фиксировали.

Полученные результаты сильно отличаются от описанной ранее ультраструктуры профазных хромосом. Измененный протокол фиксации приводит к сохранению более плотной степени компактизации хроматина в новых условиях. В то же время повышенная степень компактизации не мешает проведению Click-реакции и последующей детекции при помощи антител внутри плотно упакованных структурных доменов хроматина как в интерфазных ядрах (рис. 23 В, Г), так и в митотических хромосомах (рис. 23 А, Б). Использование стабилизирующих хроматин условий фиксации не изменило глобальной организации хроматина в интерфазных ядрах. Попрежнему, основными мотивами компактизации ДНК являются фибриллы высшего порядка – хромонемы (рис. 23 Б, Г). Однако по сравнению с фиксацией на PBS* плотность упаковки ДНК в них повышается.

При анализе распределения репликативной метки в ядрах, находящихся в ранней S-фазе, оказалось, что EdU выявляется в виде плотных кластеров наночастиц серебра, декорирующих сегменты хромонем. Таким образом, транскрипционно-активный хроматин в интерфазе упакован в структура высшего порядка (рис. 23 В, Г).

Эксперименты с отложенной меткой, проведенные с использованием модифицированного протокола фиксации, показали, что в ходе митотической компактизации, дискретное распределение репликативной метки в виде компактных кластеров сохраняется. При этом в составе хромосом можно выявить сегменты хромонемных фибрилл, которые выявляются во всем объеме профазных хромосом (рис. 23 Б).



Рисунок 23. Визуализация фибриллярных хроматиновых элементов эухроматина в поздней профазе (А, Б) и в интерфазе (В, Г). А – общий вид профазного ядра. Б – визуализация фибриллоподобных хроматиновых элементов во время митотической компактизации. Дискретное распределение репликативной метки. Увеличенное изображение участка ядра, представленного на панели А. В – общий вид клеточного ядра, находящегося в фазе репликации. Г – распределение репликативной метки вдоль упакованных эухроматиновых фибрилл. Увеличенное изображение участка ядра, представленного на панели В. ТЭМ. Толщина среза 100 нм. Масштабный отрезок 1 мкм (А, В) и 0.5 мкм (Б, Г).

Для подтверждения тезиса о сохранении высших уровней организации хроматина в митозе необходимо было визуализировать меченую фракцию пострепликативного эухроматина в максимально

компактизованных метафазных хромосомах. Анализ фотографий ультратонких срезов показал, что, несмотря на высокую плотность компактизации, которая не позволяет визуализировать в метафазных хромосомах хромонемные фибриллы, метка EdU детектируется по всему объему хромосом (рис. 24). Таким образом, высокая плотность упаковки хроматина не является диффузионным барьером для используемых нами зондов. При этом наблюдаются четкие дискретные кластеры серебряных частиц, сходные по плотности и размерам с интерфазными репликативными доменами (рис. 24 Б-Г).



Рисунок 24. Дискретное распределение репликативно меченных доменов в метафазных хромосомах. А – общий вид метафазных хромосом. Б-Г – визуализация дискретного распределения эухроматиновой фракции в контексте плотно компактизованных митотических хромосом. Увеличенные изображения хромосом, представленных на панели А. Метод иммунодетекции. ТЭМ. Масштабный отрезок 1 мкм. Таким образом, наши результаты не указывают на диффузное перераспределение структурных элементов во время митотической компактизации, что противоречит молекулярным Hi-C наблюдениям об отсутствии ТАДов в митозе. Можно предположить, что плотность компактизации приводит к сближению соседних структурных элементов, что препятствует их выявлению с помощью молекулярно-биологических методов.

4.3 Исследование динамики пострепликативной реорганизации транскрипционно активного хроматина

Традиционно считается, что структурная организация хроматина претерпевает конформационные изменения в ходе клеточного цикла. Отсутствие стабильной компактной системы укладки связано с активными процессами, происходящими на матрице ДНК. Во время репликации неизбежно происходит декомпактизация хроматина с последующей упаковкой уже удвоенного материала. Характер компактизации активно транскрибируемого хроматина обусловлен его функциональной нагрузкой. Доступность факторов транскрипции и репликации к матрице ДНК является необходимым условием для этих процессов. Общепринято, что вследствие постоянного матричного синтеза эухроматин имеет меньшую степень компактизации в интерфазе по сравнению с транскрипционно неактивным гетерохроматином. Несмотря на это, вопрос о его пространственной организации В процессе клеточного цикла сих пор ДО остается дискуссионным. Одна из гипотез постулирует декомпактизацию высших уровней организации хроматина в момент репликации до 30-нм или 10-нм фибриллы (Голышев, Поляков, 2008). В предложенной схеме компактизация хроматина происходит сразу после окончания синтеза ДНК. Однако в которой предполагается существует другая гипотеза, сохранение компактизации хроматина (Blow, Ge, 2008). В этом случае процесс репликации происходит на участках локально деконденсированных "хроматиновых петель", в то время как организация хроматина не претерпевает глобальной реогранизации.

Рассмотрение конформационных изменений организации эухроматина невозможно без обсуждения динамики самого процесса репликации. В данной теме также отсутствует консенсус об организации удвоения ДНК в пространстве и во времени. Исследования с высоким

пространственным разрешением структурной организации транскрипционноактивного хроматина с использованием маркера новосинтезированной ДНК впоследствии позволят проанализировать динамику самого процесса.

4.3.1 Ультраструктурная организация эухроматина в процессе репликативного синтеза

Для понимания изменения архитектуры механизма пострепликативного хроматина в ходе S-фазы необходимо было исследовать его динамику на электронно-микроскопическом уровне. Такой способ изучить структурную анализа позволяет не только организацию с максимально доступным на сегодняшний день разрешением, но и наблюдать за распределением метки в объеме электронно-плотного хроматина.

На данный момент все еще остаются дискуссионными вопросы о том, как происходит компактизация хроматина после удвоения ДНК и дальнейшая сегрегация сестринских хроматид в объеме клеточного ядра. Для того, чтобы ответить на них, необходимо было исследовать изменения в ультраструктурной организации пострепликативного хроматина. Как и в предыдущих экспериментах, в качестве маркера был использован EdU, Click-реакции выявляемый впоследствии методом С флуорохромом AlexaFluor-488. Для детекции метки на электронно-микроскопическом уровне использовался описанный ранее метод иммунодетекции. Преимущество предложенного протокола состоит в том, что он, помимо обеспечения хорошей сохранности структуры хроматина, позволяет прицельно выбирать для ультраструктурного анализа клетки в интересующей нас фазе репликации при помощи оптической микроскопии. Тем не менее, из-за лимитированного размера образца для ТЭМ для повышения эффективности анализа мы использовали предварительную синхронизацию клеточной популяции. Для этого использовали блокирование на границе

G1/S, инкубируя клетки в течение 16 часов с 1 мМ гидроксимочевиной. После синхронизации клетки отмывали теплым раствором Хэнкса и инкубировали в полной среде в течение 1 часа. Такой метод приводит к обогащению клеточной популяции клетками, находящимися в ранней S-фазе. После того, как клетки входили в фазу синтеза, мы добавляли EdU и отмывали его через 10 минут. Эксперименты проводили как в режиме импульсного мечения (с фиксацией сразу после инкубации с EdU), так и с фиксацией через разные промежутки времени после отмывки EdU.

При импульсном мечении с длительностью пульса 10 минут, в клетках, находящихся в ранней S-фазе, наблюдается типичная картина расположения многочисленных мелких репликативных фокусов, распределенных по всему объему ядра за исключением ядрышка и ядерной периферии (рис. 25 A). Именно такие клетки мы выбирали для ультрамикротомии.

Контрастирование образцов солями тяжелых металлов позволяет также визуализировать хроматин в сайтах репликации и таким образом анализировать его структурное состояние в момент синтеза ДНК. Оказалось, что репликативные кластеры в ранней S-фазе располагаются в составе электронно-плотных хромонемных фибрилл (рис. 25). В случаях, когда ориентация фибрилл параллельна плоскости среза, удается проследить сегменты хромонемы на значительном расстоянии. При этом можно наблюдать цепочки кластеров, расположенных на одной фибрилле на некотором расстоянии друг от друга (рис. 25 Б, указано стрелкой). Таким образом, данные наблюдения указывают на то, что, вопреки общепринятому транскрипционно-активный эухроматин, мнению, который ΜЫ визуализируем, благодаря его свойству реплицироваться в ранней S-фазе, находится в достаточно компактизованном состоянии и организован в виде хроматиновых фибрилл высшего порядка. Ранее подобное структурное состояние транскрипционно-активных хромосомных доменов было показано на модели трансгенных конструкций, содержащих повторы протяженных фрагментов генома, соответствующих эухроматиновым локусам и сайтам Lac-оператора (Hu et al., 2009). В наших экспериментах мы продемонстрировали, что подобная организация характерна не только для искусственных хромосомных локусов, но и для эндогенного эухроматина.

Сопоставимые размеры репликативных кластеров и диаметры хромонем (в том числе и в участках, непосредственно соседствующих с репликативными кластерами) указывают на то, что значительных изменений в степени компактизации ДНК в процессе репликации эухроматиновых районов не происходит, аналогично тому, что мы наблюдали ранее для гетерохроматиновых доменов. Более того, т.к. в эухроматине хромонемные фибриллы располагаются преимущественно на некотором расстоянии друг от друга, в отличие от гетерохроматина, где они дополнительно укладываются в домены высшего порядка, этот факт становится более очевидным.



Рисунок 25. Паттерн распределения эухроматиновой репликативной метки на ультраструктурном уровне. А – общий вид ядра клетки, находящейся на ранней стадии репликации. Б-Г – распределение репликативных кластеров в контексте электронноплотных эухроматиновых фибрилл. Увеличенные изображения участков ядра, представленного на панели А. Толщина среза 300 нм. Масштабный отрезок 1 мкм.

4.3.2 Взаимораспределение фракций хроматина, находящихся на разных этапах синтеза

Для оценки динамических процессов репликативного синтеза, происходящих с эухроматином, необходимо было исследовать как структуру хроматина в момент синтеза ДНК, так и организацию пострепликативного хроматина. На сегодняшний день одна из основных гипотез о распространении процесса репликации постулирует последовательную активацию кластеров репликонов, при которой соседние кластеры могут активироваться только после завершения работы предыдущих (Sporbert et al., 2002; Sadoni et al., 2004).

Мы отложенной меткой, чтобы проводили эксперименты С анализировать характер перераспределения пострепликативной ДНК в контексте высших уровней организации хроматина. Для ЭТОГО ΜЫ использовали комбинацию из двух маркеров: локализованный в вилке репликации белок eGFP-PCNA отражал морфологию эухроматина в момент синтеза, а встраиваемый в цепочку ДНК-маркер EdU-AlexaFluor-594 отражал поведение эухроматина уже после репликации. В том случае, если гипотеза о кластерной активации верна, мы сможем наблюдать сегрегацию двух маркеров только после завершения синтеза одного репликона, что составляет 45-60 минут (Conti et al., 2007; Ma et al., 1998).

В ходе эксперимента клеткам культуры HT1080, экспрессирующим eGFP-PCNA, добавляли EdU, который встраивался в течение 10 минут. Спустя это время, производили множественные отмывки интеркалирующего агента и фиксировали клетки через разные промежутки времени. Визуализация паттернов репликации по локализации eGFP- PCNA позволила точно определить ранне реплицирующуюся эухроматиновую фракцию и оценить распределение уже закончившего синтез хроматина (рис. 26).

Полученные данные наглядно демонстрируют динамику смены локализации репликативных кластеров, однако временная прогрессия не соответствует ожидаемому результату. С помощью молекулярнобиологических методов было рассчитано, что время синтеза репликона составляет 45-60 минут. Исходя из этих данных, можно было предположить, что пространственное разобщение соседних репликативных кластеров будет длиться примерно такое же время. Однако, опираясь на полученные нами

результаты, можно сказать, что сегрегация происходит уже через 20 минут после завершения синтеза ДНК, меченной с помощью EdU.



Рисунок 26. Динамика перераспределения пострепликативного хроматина в ходе S-фазы. А – колокализация репликативного маркера EdU и белка PCNA, находящегося в репликативной вилке. Б – перераспределение фракции хроматина, закончившего репликацию. В – визуализация хроматина, находящегося на стадии синтеза (зеленый) и закончившего репликацию (красный). РСЛА зеленый, EdU красный, DAPI _ голубой. — Флуоресцентная микроскопия.

Полученные результаты отражают динамику распространения процесса репликации по эухроматину, что ставит под сомнение высказанные раннее предположения о дискретности процесса репликации.

4.3.3 Ультраструктурная реорганизация пострепликативного эухроматина

Для детального анализа организации эухроматина после репликативного синтеза необходимо было исследовать его ультраструктуру. В таком случае есть возможность проследить за реорганизацией ДНК, происходящей в контексте высших уровней организации хроматина. Несмотря на то, что в предыдущем эксперименте мы наблюдали перераспределение пострепликативной фракции хроматина до того, как заканчивается синтез одного репликативного кластера, хроматиновая доменная организация может сохраняться.

Наблюдая за организацией пострепликативного хроматина через 30 минут (рис. 27) и через час (рис. 28) после удвоения ДНК, можно заметить, что характер распределения метки в пространстве эухроматиновых фибрилл меняется. Происходит реорганизация эухроматина в заданном объеме этих структур. Ранее плотно локализованная в кластерах метка перераспределяется в составе электронноплотных фибрилл, при этом плотность мечения снижается.

Исходя из полученных данных, очевидно, что в ходе S-фазы кластерность паттернов пропадает. Локализация метки перестает быть точечной и распределяется по объему эухроматиновых структур (рис. 29).



Рисунок 27. Перераспределение репликативной метки в процессе синтеза ДНК через 30 мин после ее удвоения. А – общий вид ядра клетки, находящейся на ранней стадии репликации. Б-Г – распределение посрепликативного хроматина вдоль электронноплотных эухроматиновых фибрилл. Увеличенные изображения участков ядра, представленного на панели А. ТЭМ. Толщина среза 300 нм. Масштабный отрезок 1 мкм.



Рисунок 28. Перераспределение репликативной метки в процессе синтеза ДНК через 1 час после ее удвоения. А, Б – общий вид ядра клетки, находящейся на ранней стадии репликации. В, Г – пострепликативная фракция эухроматина в контексте электронноплотных фибриллоподобных элементов. Низкая плотность мечения, отражающая перераспределение фракции хроматина после репликации. Увеличенные изображения участков ядра, представленных на панелях А, Б. ТЭМ. Толщина среза 300 нм. Масштабный отрезок 1 мкм.

Полученные результаты также демонстрируют, что процесс синтеза ДНК происходит в составе упакованных структурных эухроматиновых элементов. В ходе синтеза мы не наблюдаем глобальной деконденсации и изменения электронной плотности в составе эухроматиновых фибрилл. Подобная пластичность эухроматиновой фракции позволяет предположить, что структурной иерархии с жестко заданными уровнями компактизации в такой системе нет.



Рисунок 29. Реорганизация пострепликативной фракции эухроматина в ходе S-фазы. А-В – репликативная метка, отражающая распределение хроматина в момент репликативного синтеза. В ходе S-фазы происходит перераспределение пострепликативной хроматиновой фракции в составе электронноплотных фибрилл. Фиксация меченного эухроматина через 30 минут (Г-Е) и 1 час (Ж-И) после удвоения ДНК. ТЭМ. Толщина срезов 300 нм. Масштабный отрезок 0.5 мкм.

4.3.4 Организация хроматиновых структур высшего порядка в ходе репликативного синтеза

B процессе репликативного синтеза происходит удвоение генетического материала. Этот факт создает дополнительные трудности для пространственной организации генома. Увеличение количества ДНК неизбежно должно приводить к изменению организации высших уровней компактизации хроматина. Чтобы определить, как именно происходит реорганизация упакованных элементов в пространстве, мы проанализировали морфологию эухроматиновых структур, количественно измерив их толщину. Если предположить, что сегрегация сестринских хроматид происходит вскоре после репликации и две хромонемы остаются рядом друг с другом, тогда толщина фибрилл, детектируемых на электронно-микроскопическом уровне, будет меняться. Для статистического анализа был написан плагин в программе ImageJ, благодаря которому в полуавтоматическом режиме измеряли толщину фибрилл в области расположения метки.

Результаты статистического анализа оказались неожиданными, так как показали, что параметры фибрилл остаются неизменными в процессе репликативного синтеза (рис. 30). Оказалось, что, несмотря на удвоение генетического материала, физически занимаемый им объем на протяжении S-фазы не меняется и равен 100-120 нм. По-видимому, происходит реорганизация пострепликативного хроматина вдоль длины фибриллярных структур, что позволяет оставить параметр толщины неизменным.



Рисунок 30. Статистический подсчет толщины фибрилл эухроматина на разных стадиях синтеза. 10p0ch – фибриллы, в составе которых происходит репликативный синтез; 10p30ch и 10p60ch – фибриллы, содержащие в себе меченую пострепликативную фракцию, зафиксированные через 30 минут и 1 час после отмывки репликативного маркера EdU, соответственно.

Мы также не наблюдали индивидуальных хромонем, что позволяет предположить отсутствие сегрегации сразу после окончания синтеза ДНК. Необходимо было проверить, что происходит с эухроматиновыми фибриллами в других фазах клеточного цикла.

4.3.5 Структурная организация эухроматиновых фибрилл на разных стадиях клеточного цикла

Для оценки параметров эухроматиновых фибрилл на разных стадиях клеточного цикла уже после синтеза ДНК важно было произвести высокопроизводительный скрининговый анализ. Для этой цели был выбран

(SIM). метод микроскопии co структурированным освещением Преимуществом данного способа визуализации является возможность детекции структур, находящихся за пределами дифракционного предела, в то разрешающая способность классической флуоресцентной время как микроскопия ограничена 200 нм. Поэтому для оценки параметров интересующих нас фибрилл, которые находятся в пределах 100-200 нм, мы получали данные с помощью микроскопии суперразрешения.

В качестве маркера эухроматина мы использовали EdU, который встраивался в клетки в течение 10 минут. Сразу после этого производились множественные отмывки и последующая фиксация через 5, 7, 8, 12 и 16 часов после отмывки. Мы выбрали такие временные промежутки, опираясь на ранее полученные данные о параметрах клеточного цикла (рис. 13). Исходя из наших расчетов, меченая фракция эухроматина должна была оказаться в поздней S-фазе через 5 часов, в G2 – через 7 и 8 часов, а в G1 – через 12 и 16 часов. Клеточная культура HT1080 экспрессировала mRFP-PCNA, поэтому на момент фиксации мы могли определять стадию клеточного цикла, в которой находятся исследуемые клетки. Так же, как и при анализе на электронно-микроскопическом уровне, измерения показали, что толщина эухроматиновых фибрилл остается неизменной на разных стадиях клеточного цикла (рис. 31). Абсолютные значения, извлеченные из анализа изображений, полученных с помощью метода микроскопии суперразрешения, отличаются от описанных ранее результатов, основанных на электронно-микроскопических данных. Это связано с относительно пространственным низким разрешением метода микроскопии суперразрешения. Из этого следует, что данные, полученные методом световой микроскопии, демонстрируют динамическую стабильность элементов, однако их нельзя использовать для точного описания параметров исследуемых элементов.



Рисунок 31. Сохранение морфологических параметров эухроматиновых фибрилл на разных стадиях клеточного цикла.

Совокупность полученных результатов свидетельствует о том, что на протяжении всей жизни клетки, включая фазу репликации, существуют высокоорганизованные структуры эухроматиновой фракции генома. Они представляют собой фибриллы толщиной порядка 120 нм, в которые упаковываются транскрипционно-активные гены.

Полученные нами данные указывают на то, что существует общий алгоритм для компактизации эухроматина, который, возможно, основан на его физико-химических свойствах, либо поддерживается с помощью структурных белков.

4.3.6 Трехмерная организация процесса репликации в составе фибрилл транскрипционно-активного хроматина

изображения Двумерные не позволяют оценивать взаимное расположение хроматиновых структур, соответствующих сестринским хроматидам, в объеме электронноплотных фибрилл хроматина, поэтому для оценки распределения маркера пострепликативного хроматина в объеме упакованных "эуфибрилл" мы исследовали угловые проекции сегментов меченых хромонемных фибрилл методом стереопар. На рисунке 32 представлены создающие объем стереопары, на которых визуализированы частицы золота, отражающие распределение уже удвоенной ДНК в пространстве электронноплотных хромонемных структур. Анализ стереопар что метка локализована равномерно по показывает, всему объему эухроматиновых фибрилл. При этом в их составе не наблюдается структурно обособленных «субхромонем», ЧТО указывает на перераспределение пострепликативного хроматина В 3D-пространстве без видимой морфологической перестройки высших уровней организации эухроматина. Полученные результаты свидетельствуют в пользу гипотезы о хромонемной организации хроматина, В которой предполагается последовательная упаковка 10-нм и 30-нм фибрилл в фибриллу диаметром около 100 нм (Belmont et al., 1989).



Рисунок 32. 3D-распределение репликативной метки в объеме электронноплотных эухроматиновых фибрилл. Маркер EdU включался в хроматин во время репликации в течении 10 минут. Фиксацию препарата производили через 30 минут после отмывки EdU. Последующая визуализация осуществлялась посредством антител, конъюгированных с золотыми наночастицами. Стереопары. ТЭМ. Толщина среза 300 нм.

4.3.7 Влияние ионных условий на морфологию фибрилл эухроматина

В ходе пробоподготовки препаратов для визуализации фибриллярных структур эухроматина были использованы методы, изменяющие нативную организацию ядра. Предшествующий фиксации лизис был необходим, чтобы освободить пространство ядра от нехроматиновых элементов и оставить только интересующую нас фракцию. Этапы фиксации и последующей иммунодетекции сопровождались добавлением в растворы солей двухвалентных катионов. Такой способ обработки сохраняет высшие уровни организации хроматина, не давая ему претерпеть конформационных изменений (Belmont et al., 1989). В связи с этим, исследование, в ходе которого нарушается нормальная ультраструктурная организация, нередко подвергается критике за изучение артефактов, формирующихся вследствие добавления солей магния в ходе фиксации и дальнейшей пробоподготовки (Ou et al., 2017).

Для того, чтобы визуализовать характер структурной организации протяженных участков ДНК на фоне малоконтрастного хроматина в неэкстагированном интерфазном ядре, мы использовали разработанный нами метод репликативного мечения ДНК на ультраструктурном уровне. При этом мы использовали классические методы фиксации для электронной микроскопии без добавления солей двувалетных катионов, чтобы исключить потенциальные артефактные изменения хроматина при пермеабилизации клеток.

фибриллярной Визуализация организации транскрипционно активного хроматина возможна, благодаря последовательной активации репликации соседних участков ДНК. Поэтому мы увеличили время включения репликативной метки до 2 часов, чтобы пометить протяженные участки ДНК. С другой стороны, поскольку сам процесс репликации ДНК по некоторым представлениям может приводить К кластеризации генома, реплицирующихся участков осложняет интерпретацию что результатов, в данном эксперименте мы увеличили время после отмывки от EdU до 4 часов. Таким образом, мы исследовали структурную организацию эухроматина во время, когда его репликация уже закончилась.

На рисунке 33 мы наблюдаем неравномерное распределение метки в объеме ядра. При этом частицы золота группируются в виде протяженных структур, более всего напоминающих сегменты хромонем.



Рисунок 33. Визуализация эухроматиновых фибрилл с сохранением нативной организации хроматина на электронно-микроскопическом уровне. А, Б – репликативная метка в течение 2 часов с последующей фиксацией. В, Г – встраивание EdU в течение 2 часов с последующей фиксацией после отмывки маркера через 4 часа. Меченая фракция представлена в виде фибриллоподобных элементов. Наблюдается сохранение структурной организации ядра и цитоплазмы. ТЭМ. Масштабный отрезок 1 мкм. Толщина срезов 100 нм.

Такое встраивание метки подтверждает пространственную организацию ДНК в виде сложно организованных эухроматиновых фибрилл. фибриллы В отсутствии двухвалентных катионов становятся менее компактными, а в связи с особенностью фиксации без лизиса их можно выявить только благодаря репликативной метке. Несмотря на это, оказалось, что вне зависимости от ионного состава фиксатора в ядре выявляются фибриллы высших уровней организации эухроматина. Полученные данные полностью подтверждают существование принципа иерархической укладки ДНК, а также нашу гипотезу о сохранении эухроматиновых структурных элементов высшего порядка в клеточном цикле.

5 Обсуждение результатов

Исследование особенностей организации генома представляет собой фундаментальную задачу и позволяет не только выяснить характер укладки гигантской молекулы ДНК в ограниченном объеме интерфазного ядра, но и структурным состоянием установить СВЯЗЬ между хромосом И ИХ функциональным статусом, как на локальном уровне (отдельные гены или так и на глобальном (сегрегация хромосомные домены), геномов. митотическая компактизация хромосом). Подробное изучение структурной ДНК vitro, организации in проводимое на простых системах, представляющих собой олигонуклеосомы (Luger et al., 1997), не позволяет в полной мере понять комплексную динамику процессов матричного синтеза и сегрегации в клеточном цикле, протекающую в пространстве сложно организованной системы нативного хроматина. Поэтому на сегодняшний день вопрос о глобальных и локальных особенностях организации хроматина с различным функциональным статусом in situ все еще остается открытым. Для решения такой задачи необходимо применение комплекса методов, среди которых выжнейшее место занимают методы прямой визуализации структурной организации хроматина С высоким пространственным разрешением. К ним относятся методы микроскопии с суперразрешением и электроной микроскопии.

Следует, однако, отметить, что одним из главных свойств хроматина, существенно затрудняющих получение непротиворечивых результатов микроскопического анализа, является его чувствительность к условиям внешней среды. Даже незначительные изменения в ионном составе, происходящие при выделении хроматина из ядра, или при помещении живых клеток в гипо- или гипертоническую среду, приводит к драматическим изменениям структуры хромосом и интерфазного хроматина. Проще всего эти изменения детектируются на макроуровне, выражаясь в нарушении степени компактизации митотических хромосом (Zelenin et al., 1982; Zatsepina et al., 1983; Киреев и др., 1988; Киреев и др., 1990). Гораздо сложнее оценить эффекты состава среды на интерфазный хроматин, в котором затруднительно выделить структурные мотивы, детектируемые на уровне разрешения оптической микроскопии. Тем не менее, корреляционный анализ структуры хроматина в интактных и пермеабилизованных клетках, проведенный с помощь 3D-флуоресцентной микроскопии с деконволюцией (Belmont et al., 1989), позволил подобрать наиболее оптимальные буферные условия для стабилизации структуры интерфазных и митотических хромосом in vitro. К недостаткам предложенных буферных систем следует отнести их плохую совместимость с альдегидными фиксаторами, используемыми для электронной микроскопии. Действительно, использование полиаминов в качестве стабилизаторов хроматина, делает протокол фиксации плохо воспроизводимым из-за титрования фиксатора и снижения эффективной концентрации полиаминов, приводит к частичной, что а часто неравномерной деконденсации хроматина. Основываясь на этих данных, в нашей работе мы использовали модифицированные буферные системы, в которых полиамины заменены на ионы магния. Этот подход традиционно используется в различных молекулярно-биологических экспериментах, поскольку Mg++ является необходимым кофактором для многих ферментов, участвующих в метаболизме ДНК. В ряде работ вместо/вместе с Mg++, используются ионы Са++, однако следует учесть, что концентрации Са++, необходимые для стабилизации хроматина in vitro, на несколько порядков превышают концентрации свободного Са++ в клетке, и таким образом могут быть потенциальным источником артефактов. Действительно, одним из признаков неадекватного эффекта ионов Са++ может рассматриваться необратимый эффект действия высоких концентраций Са++ на митотические хромосомы, в результате которого обратная деконденсация хромосом при удалении Са++ является неполной (Киреев и др., 1990). Мы же использовали такие буферные системы (PBS + 5 mM MgCl₂, 50 mM PIPES pH 7 + 5 mM MgCl₂), которые воспроизводят стабилизирующий эффект буферных смесей на основе полиаминов, но не интерферируют с фиксацией для электронной микроскопии и не вызывают необратимой компактизации хроматина.

Необходимость использования методических подходов, связанных с предварительной пермеабилизацией клеток была обусловлена стремлением повышения контраста хроматиновых структур при ультраструктурном анализе, В сочетании С необходимостью анализа пространственной организации хроматина. Основным объектом наших исследований являлись хроматиновые структуры высшего порядка, размеры которых находятся на границе разрешающей способности оптической микроскопии, но являются методами просвечивающей значительными ДЛЯ анализа электронной микроскопии. Применение методов иммуноэлектронной микроскопии для маркирования отдельных типов хроматиновых доменов, использовавшиеся в нашей работе, накладывает определенные ограничения на способы анализа таких структур. Так, методы реконструкции по серийным срезам обладают недостаточным разрешением в аксиальном направлении и представляют определенные сложности при совмещении срезов для анализа структур размерами до 300 нм. Тем не менее, использование данных методов эффективным оказалось достаточно при анализе митотической компактизации/декомпактизации хроматина (Зацепина и др., 1985, Belmont, Bruce, 1994, Stukov et al., 2003, Kireeva et al., 2004) и исследовании архитектуры целых хромосомных территорий (Rego et al., 2008). С другой стороны, анализ угловых проекций объектов, находящихся в достаточно толстых срезах (300-500 нм) (в том числе и методом электронной томографии), может дать более точную информацию о пространственной организации хроматиновых доменов высшего порядка И характере распределения специфических маркеров в их составе (Kireeva et al., 2004). Однако данный подход требует введения электронно-плотных меток в

хроматин до заключения в смолу (т.н. техника пре-эмбеддинга), что и вызывает необходимость предварительной пермеабилизации клеток в буферах, стабилизирующих хроматин. С другой стороны, доступность мишеней (специфических хромосомных молекулярных белков или последовательностей ДНК) в условиях фиксации клеток для электронной микроскопии может быть ограничена как из-за интенсивного образования межмолекулярных сшивок, препятствующих диффузии ЗОНДОВ В центральные участки плотно упакованных хроматиновых доменов, так и изза химической модификации мишеней. Степень компактизации исследуемых хроматиновых структур также может быть фактором, ограничивающим диффузию зондов. Действительно, существующая в литературе точка зрения указывает на роль компактизации хроматина как фактора регуляции генной именно счет создания диффузионных барьеров активности за ДЛЯ регуляторных факторов и компонентов транскрипционной машинерии. В соответствие с этой точной зрения, именно гетерохроматин, обладающий повышенной степенью компактизации, будет представлять наибольшую проблему при использовании метода преэмбеддинга. В связи с этим, в настоящей работе мы стремились минимизировать размеры использованных маркеров репликации. Мы зондов ДЛЯ детекции использовали не полноразмерные антитела, а Fab-фрагменты, а также применяли коньюгаты антител с частицами золота размером 1.4 нм (т.н. Nanogold). Ввиду низкого контраста столь мелких золотых частиц на фоне хроматина, окрашенного солями тяжелых металлов, мы использовали технику Ag-амплификации (Danscher, 1984). Этот комплекс мер оказался достаточно продуктивным для маркирования сайтов репликации внутри компактных крупных гетерохроматиновых доменов (рис. 17) и в митотических хромосомах (рис. 24). Равномерное распределение наночастиц серебра в толще метафазных хромосом является, на наш взгляд, оптимальным критерием эффективности предложенного методического подхода.
Следует также отдельно остановиться на способе визуализации репликативных доменов, специально разработанном и реализованном в Использовавшиеся данном исследовании. ранее методы детекции новосинтезированной ЛНК либо обладали низкой разрешающей способностью (как В случае использования радиоактивных предшественников синтеза ДНК на основе трития), либо требовали для эффективной детекции денатурации ДНК, что неизбежно приводило к нарушению нативной структуры хроматина (как в случае иммунодетекции галогенпроизводных дезоксиуридина). Последний метод, тем не менее, был достаточно широко распространен для ультраструктурных исследований процесса репликации, в первую очередь, для детекции сайтов репликации, однако хроматиновый контекст в этих экспериментах был в основном настоящем исследовании мы разработали новый утрачен. В метод визуализации новосинтезированной ДНК на ультраструктурном уровне, основанный на детекции алкин-производных дезоксиуридина (этинидилдезоксиуридин, EdU) методами click-химии (Salic, Mitchison, 2008). Основное преимущество данного метода состоит в возможности осуществлять clickреакцию между EdU и азидом флуорохрома AlexaFluor-488 без денатурации ДНК, что обеспечивает наилучшую сохранность структуры хроматина. Вофлуоресцентной последующей вторых, использование метки для иммунодетекции на ультраструктурном уровне позволяет легко проводить коррелятивный анализ. И, в-третьих, Click-реакция происходит уже после альдегидной фиксации, благодаря чему хроматин подвергается не химической модификации, эффективность иммуномечения существенно возрастает по стравнению с мечением белковых антигенов. Однако, использование в качестве зондов антител приводит к падению разрешения из-за длины линкера, поэтому В ряде случаев МЫ использовали одностадийную детекцию, используя азид биотина и стрептавидин-Nanogold. Мы не получили значительного выигрыша, поскольку размеры наночастиц серебра, получаемых в результате Ag-амплификации, были сопоставимы с длиной иммуноглобулинового линкера. Тем не менее, данный метод давал удовлетворительное разрешение при анализе структур размером более 100 нм. Таким образом, разработанный нами метод позволяет с высокой эффективностью визуализовать новосинтезированную ДНК в условиях сохранения нативной структуры хроматина на ультраструктурном уровне, что обеспечивает достаточно высокое структурное разрешение за счет значительной локальной концентрации наночастиц серебра и уменьшения средних расстояний между соседними частицами.

Несмотря долгую историю исследований пространственой на организации генома эукариот и особенностей организации хроматина, на сегодняшних день единой гипотезы о его структуре и динамической реорганизации в связи с функциональной активностью не существует. Ряд работ указывает на существование иерархии высших уровней организации в компактизации ДНК (Felsenfeld, Groudine, 2003; Li, Reinberg, 2011). С другой стороны, некоторые современные методы исследования, такие как криоэлектронная микроскопия и рентгеновская спектроскопия, ставят под сомнение само существование высших уровней организации хроматина, подтверждая наличие только 10-нм фибрилл (Eltsov et al., 2008; Maeshima et al., 2014; Ou et al., 2017). Следует, однако, отметить, что в обоих случаях выводы делаются на основе анализа тотального хроматина, в то время как ситуация осложняется наличием гетерогенных по составу и структуре фракций хроматина – транскрипционно активного менее конденсированного транскрипционно-неактивного эухроматина И плотно упакованного гетерохроматина, а также неизбежными изменениями структуры хроматина в ходе клеточного цикла, связанными как с митотической компактизацией, так и с репликативной активностью. В свою очередь функциональная активность хроматина коррелирует с плотностью упаковки генов, а также меняется в ходе клеточной дифференцировки (Peric-Hupkes et al., 2010). В связи с этим,

формулирования представлений о пространственной организации для представляется необходимым детальный структурный анализ хроматина всех вышеописанных функциональных доменов по отдельности. Для этой цели важно иметь возможность анализировать строго определенные генные локусы разного масштаба. Как уже было отмечено выше, при этом важно сохранять максимально нативную структур хроматина, поэтому классические методы мечения отдельных участков генома на основе гибридизации in situ, что требует денатурации ДНК, не представляются эффективными, поскольку приводят К драматическим изменениям ультраструктуры хроматина.

Одним ИЗ успешных методов анализа было использование инженерных хромосомных локусов на основе интегрированных в геном повторов Lac-оператора и экспрессии lac-репрессора, слитого с GFP (Robinett et al., 1996). При использовании антител против GFP, коньюгированных с золотом, эта технология позволила вызуализировать коллоидным на ультраструктурном уровне индивидуальне генные локусы и исследовать локальный характер упаковки хроматина (Strukov et al., 2003, Kireev et al., 2008, Hu et al., 2009, Жиронкина и др., 2014). Все полученные данные указывают на существование в составе интерфазных и митотических хромосом хромонемных фибрилл толщиной около 130-200 нм (в зависимости от природы хромосомного локуса, в который интегрироваласт исходная конструкция и используемого метода пробоподготовки). При этом в большинстве случаев. качестве мишени использовались когда В эухроматические локусы, содержащие индуцибельные гены, либо индукция оуществлялась при помощи рекрутирования на повторы lac-оператора вирусных активаторных белков, активация транскрипции приводила лишь к частичной деконденсации хроматина. При этом активно транскрибрующиеся локусы оставались упакованными в виде хромонемных фибрилл (Tumbar et al., 1999; Memedula, Belmont, 2003; Carpenter et al., 2005; Hu et al., 2009), a степень линейной компактизации ДНК в них, вычисленная на основе информации о копийности трансгенов и их размерах, составляла от 400 до 1000 раз, что существенно превышает степень компактизации 30-нм фибриллы хроматина (около 40).

Тем не менее, несмотря на достаточно убедительные результаты, полученные в том числе и при помощи *in vivo* визуализации трансгенов за счет флуоресценции GFP, подвергались справедливой критике из-за возможной артефактности наблюдаемых структур, связанной с высоким содержанием бактериальной ДНК в составе трансгенных конструкций. Это еще раз подчеркивает важность исследования структурной организации нативных эухроматиновых локусов.

В связи с этим, в настоящем исследовании был реализован эксперименальный подход, позволяющий визуализировать эндогенные хромосомные локусы, содержащие транскрибирующиеся гены (т.е. эухроматин), основываясь на тайминге их репликации. Известно, что существует корреляция структурой хроматина, между его транскрипционным статусом, И временной прогрессией репликации (Donaldson, 2005). Транскрипционно-активный эухроматин проходит стадию синтеза ДНК раньше, чем гетерохроматин. Предполагается, что это связано с большей конформационной доступностью его для репликационной машинерии по сравнению с упакованным молчащим гетерохроматином. С пространственной организации процесса репликации, точки зрения многочисленные исследования показали, что в ходе S-фазы происходит закономерная смена паттернов распределения репликативных сайтов в пространстве интерфазного ядра (Nakamura et al., 1986, O'Keefe et al., 1992; Dimitrova, Berezney, 2002). Это обстоятельство позволило нам легко идентифицировать и выбирать для ультраструктурного анализа клетки, в которых происходит репликация эухроматиновых доменов, а также на

112

ультраструктурном уровне идентифицировать эухроматические домены по наличию в них кластеров наночастиц.

Ультраструктурный анализ клеток, демонстрирующий первый и второй паттерны репликации, что соответствует репликации эухроматина, показал, что репликативная метка локализуется кластерами, маркирующими сегменты хроматиновых фибрилл высшего порядка. Таким образом, ранее предположения об организации транскрибирующегося высказанные хроматина в хромонемы полностью подтвердилось и для эндогенных хромосомных локусов. Однако параметры визуализуемых хромонемных фибрилл могли отличаться из-за использования Мд-содержащих буферных систем, которые, по мнению некоторых исследователей, могут вызывать неспецифическую агрегацию нуклеосом (Ou et al., 2017). Тем не менее, в эксперименах, использующих прямую фиксацию клеток глутаровым без предварительной пермеабилизации, альдегидом что исключает искусственную агрегацию, при длительном мечении EdU нам удалось осуществить детекцию новосинтезированной ДНК. Хотя в этих условиях без применения селективного контрастирования ДНК структуру хроматина идентифицировать не удается, его организацию можно оценивать по характеру распределения метки. В интерфазных ядрах выявлялись протяженные кластеры наночастиц, маркирующих крупные домены хроматина, толщина которых близко соответствует размерам хромонемных фибрилл, выявляемых после пермеабилизации.

Существует несколько гипотез о пространственной организации хроматина во время репликации. Одной из наиболее популярных является гипотеза "репликативных фабрик". Следуя этой гипотезе, факторы, необходимые для синтеза новой нуклеотидной цепочки, объединяются в плотные белковые скопления, через которые В ходе репликации протаскивается ДНК (Hozak et al., 1994). Такая модель предполагает прикрепление специфичных ДЛЯ репликации белковых структур К

диффузному ядерному матриксу. Такого рода взаимодействия сильно ограничивают пластичность процесса. Более того, на сегодняшний день существование ядерного белкового матрикса находится под сомнением (Razin et al., 2014).

Другая гипотеза постулирует наличие плотноупакованных хроматиновых репликативных доменов, по периферии которых происходит процесс синтеза ДНК (Jaunin, Fakan, 2002). В этой модельной системе ДНК входит в состав хроматиновых блоков и по мере репликации уходит внутрь упакованных доменов, в то время как репликативные факторы остаются локализованы по периферии (рис. 34).

Поэтому изучение особенностей пространственной реорганизации высших уровней компактизации генома в процессе удвоения ДНК мы начали с транскрипционно-неактивной хроматиновой фракции. Мы рассматривали структурную организацию гетерохроматиновых локусов, находящихся на световой стадии репликации с помощью методов И электронной микроскопии. Комбинация методических подходов позволила нам с одной стороны сохранить нативную организацию изучаемых локусов и в тоже время анализировать их ультраструктуру с максимально доступным на сегодняшний день разрешением. В ходе наших исследований удалось визуализировать репликативные домены, соответствующие размерам раннее выявляемых репликативных фабрик. Мы визуализировали эти структуры после вымывания большей части нехроматиновых растворимых компонентов ядра с помощью лизиса. Таким образом, репликативные домены имеют хроматиновую природу, что также подтверждают электронные фотографии. В пробоподготовки электронной микроскопии ходе ДЛЯ срезы контрастировали уранилацетатом. Благодаря этому мы визуализируем электронноплотный хроматин и золотую метку, отражающую распределение реплицирующейся ДНК. Из полученных данных видно, что электронная плотность доменов коррелирует с наличием репликативной метки в них. При этом глобальной реорганизации гетерохроматина в ходе синтеза ДНК не происходит. По-видимому происходит локальная декомпактизация хроматиновых доменов в процессе репликации. Более того, репликативный маркер локализуется по всему объему репликативных доменов, а не только по их периферии.



Рисунок 34. Модели пространственной организации репликации хроматина. А - модель репликативных фабрик (Hozak et al., 1994). Б - модель переферической локализации репликативной "машинерии" относительно доменов хроматина (Jaunin, Fakan, 2002). В – модель глобальной деконденсации хроматина во время репликации (Голышев, Поляков, 2008).

Полученные результаты не подтверждают ни одну из представленных выше гипотез. Это может быть связано с особенностями применяемых раннее деструктивных методов. Так, в работе Hozak et al., описывающей репликативные фабрики, была экстрагирована большая часть хроматина в электрическом поле. Фактически, чтруктурная организация хроматина в этой работе не анализировалась. В случае с исследованием репликативных доменов ограничением оказалась доступность антигенов, локализованных внутри хроматиновых кластеров. Возможно, поэтому метка располагалась по периферии этих структур. Это, возможно, связано с условиями фиксации и визуализации путем постэмбеддинга.

В нашем случае, совокупность методов световой микроскопии суперразрешения и иммуноэлектронной микроскопии с различными модификациями позволяет достоверно утверждать о сохранении нативной структуры хроматина. Из полученных нами данных можно сделать несколько выводов. Во-первых, во время репликации гетерохроматиновых локусов сохраняется их высокоструктурированная организация без претерпевания глобальной хроматина. Во-вторых, деконденсации процесс синтеза происходит всему объему плотноупакованных ПО реплицирующихся гетерохроматиновых доменов.

Наши данные указывают не только на существование высших уровней организации хроматина, но и на их стабильность в процессе матричного синтеза. Однако неизвестно что происходит с такой устойчивой структурой в других фазах клеточного цикла.

Максимальной степени компактизации хроматин достигает на стадии митотических хромосом, что совпадает со временем сегрегации сестринских хроматид. Опираясь на иерархическую модель укладки генома (Sadoni et al., 1999) можно предположить сохранение высших уровней организации хроматина в митозе, при максимальной степени упаковки.

Благодаря молекулярно-биологическому методу Hi-C были выявлены структурные элементы, ТАДы, которые соответствуют репликативным доменам S-фазы (рис. 35)(Dileep et al., 2015). Однако в митозе эти элементы обнаружены не были, что привело к предположению об их реорганизации на этой стадии клеточного цикла (Naumova et al., 2013). Целью нашего исследования было визуализировать структурные домены на разных стадиях митотической компактизации с использованием микроскопических методов.



Рисунок 35. Взаимосвязь репликативных доменов и структурных доменов хроматина (Dileep et al., 2015).

В ходе процессинга Hi-C в качестве буфера для фиксации используют PBS, в котором хроматин частично теряет свою компактность. Мы выбрали компромиссный буфер PBS* (PBS, pH 7,2-7,4, 5 mM MgCl₂), который в большей степени сохраняет нативную природу хроматина, но при этом условия фиксации остаются приближены к молекулярно-биологическим протоколам.

Из литературных данных известно наличие гетерогенного распределения эу и гетерохроматина в митотической хромосоме, что на микроскопическом уровне визуализируется как чередование R и G бэндов (Buckton, 1976; Strukov et al., 2003). Такая укладка может коррелировать с функциональным статусом хроматина, поэтому В данной серии экспериментов мы рассматривали и сравнивали между собой гетеро и эухроматиновые фракции. Используя репликативную метку, мы маркировали 1 хроматин В течение часа, чтобы впоследствии оценивать его пострепликативную организацию В составе плотноконденсированной Оказалось, структуры. что на начальных стадиях митотической компактизации гетерохроматиновые домены сохраняют свою структурную организацию, В то время как для эухроматина невозможно было детектировать наличие структур высшего порядка. Очевидно, что эу и гетерохроматиновыми структурные элементы имеют различия в организации хромосомной укладки. У эухроматина метка демонстрирует распределение по всему объему профазного ядра, но ее локальная структура соответствует фибриллярным элементам. При визуализации гетерохроматиновых доменов наблюдаются четко ограниченные плотные скопления, внутри которых присутствует гетерогенное распределение метки. Высокая степень упаковки ДНК не позволяет различить структуру хроматина, однако перераспределение метки внутри плотных доменов говорит о пластичности гетерохроматиновых фракций в процессе компактизации.

Полученные результаты демонстрируют сохранение структурной организации высших уровней компактизации гетерохроматиновой фракции. При детальном рассмотрении ультраструктуры эухроматина также можно было наблюдать существование определенной упорядоченной укладки. Из анализа полученных электронно-микроскопических фотографий можно сделать предположение о сохранении структурных элементов в процессе митотической компактизации компактно уложенной не только ДЛЯ гетерохроматиновой фракции, но И для эухроматина, традиционно рассматриваемого как открытую систему, не имеющую высших уровней организации (Голышев, Поляков, 2008). Однако в работе Naumova et al. была выдвинута гипотеза 0 разборке структурных элементов на этапе максимальной компактизации в метафазных хромосомах, поэтому нам необходимо было доказать существование упакованных структурных

клеточного цикла. Оказалось, элементов на данном этапе что эухроматиновые фибриллярные структуры, наблюдаемые В профазе, становятся не видны на митотических хромосомах. Несмотря на это, объеме В хромосом остается, дискретность метки что позволяет предположить сохранение структурных доменов, ТАДов, на данном этапе клеточного цикла (рис. 36).



Рисунок 36. Схема организации укладки хроматина в митотических хромосомах. А – Перераспределение структурных хроматиновых элементов в объеме митотических хромосом без сохранения ТАДов. Б – Сохранение дискретной организации хроматиновых доменов высшего порядка сохраняется во время митотической компактизации.

Все эти наблюдения противоречат гипотезе об исчезновении структурных элементов высшего порядка (ТАДов) в митозе. Данные о разборке структурных элементов на молекулярно-биологическом уровне, возможно, связаны с ограничениями применяемого метода. При высокой степени компактизации гены сближаются, а межгенные контакты детектируются не по функциональному, а по пространственному положению. Такое уплотнение приводит к высокому уровню межгенных взаимодействий внутри ядра, вследствии чего структурные домены не детектируются.

Действительно, благодаря улучшенному разрешению метода Hi-C было показано, что детекция ТАДов зависит от положения клетки в клеточном цикле (Nagano et al., 2017). Новые молекулярно-биологические изменение ланные также указывают на характера листантных взаимодействий в ходе прогрессии S-фазы. Сразу после окончания G1 были коротко-дистантные взаимодействия, выявлены которые ПО мере синтеза переставали детектироваться. Это наблюдение прохождения позволяет предположить существование пластичной системы организации, что отличается от классического представления об иерархической укладки хроматина в пространстве ядра (Li, Reinberg, 2011).

Известно, что точками начала репликации являются ориджины, которые стохастически активируются в клетке (Patel et al., 2006). В каждой следующей фазе синтеза положение точек начала инициации изменяется при сохранении временной прогрессии. Одна из моделей распространения репликативной волны постулирует гипотезу об активации соседних ориджинов в ходе процесса, что получает отражение в эффекте "домино" (Sporbert et al., 2002). Другая же гипотеза утверждает наличие дискретных кластеров репликации, где происходит синтез ДНК (Masata et al., 2005). В таком случае начало синтеза нового кластера репликонов возможно только после окончания предыдущего (рис. 37).

120



Рисунок 37. Схемы прогрессии репликации в соответствие с моделью кластеров (А) и модифицированной модели домино (Б). В модели А активация соседнего (красного) кластера репликонов (зеленые кружки) происходит только после завершения репликации предыдущего (синего), т.е. через 45-60 мин. В модели Б происходит волнообразная активация индивидуальных репликонов, соответственно, кластеры репликонов, не имеют фиксированного состава. Миграция меченой ДНК от сайтов репликации в этом случае происходит не скачкообразно, а постепенно.

Если обсуждать высшие уровни организации хроматина, то в противоположность теории о существовании фабрик репликации (Cook, 1999), есть предположение о глобальной деконденсации хроматина во время синтеза ДНК (Голышев, Поляков, 2008).

Благодаря экспериментам с отложенной меткой мы исследовали высшие уровни организации эухроматина на разных стадиях S-фазы (рис. 28). Оказалось, что несмотря на свой транскрипционно-активный статус, эухроматин демонстрирует укладку в структуры высшего порядка, сохраняющиеся на протяжении всей стадии репликации. Более того, мы не наблюдали сохранение высших уровней организации эухроматина, без глобальной декомпактизации в течение всей S-фазы.

При коротком времени мечения ДНК, с последующей фиксацией наблюдается распределение маркера в объеме упакованных эухроматиновых доменов (рис. 29). Однако при дальнейшем исследовании пострепликативной организации ДНК были получены данные о перераспределении метки вдоль фибриллоподобных структур. Результаты экспериментов с отложенной меткой демонстрируют изменения плотности детектируемой маркера вдоль фибрилл. эффект электронноплотных эухроматиновых Этот можно объяснить распределением удвоенного количества ДНК вдоль структур высшего порядка, либо размыванием метки из-за включения немеченой фракции ДНК в ходе синтеза. Так как после репликации количество хроматина удваивается, мы предположили что также меняются параметры фибрилл, отражающие перераспределение ДНК в составе высших уровней организации хроматина. Однако статистический анализ измерения диаметра фибрилл на ультраструктурном уровне показал, что он остается неизменным в течении S-фазы и равен 120 нм (рис. 30). Более того, оценка параметров высших уровней упаковки эухроматина на разных стадиях клеточного цикла использованием микроскопии суперразрешения подтвердила С предположение о сохранении его структурной организации.

Очевидно, что полученные данные доказывают гипотезу о существовании и сохранении высших уровней организации эухроматина на протяжении всего жизненного цикла клетки. Также наши наблюдения хорошо согласуются с гипотезой о существовании хромонемы, которая более всего напоминает выявляемые нами фибриллярные структуры (Zatsepina et al., 1983; Belmont, 2014).

Суммируя полученные нами данных, можно сделать предположение о существовании жестко детерминированной иерархической организации в структуре генома. Однако остается непонятным как протекает процесс

репликации хроматина в составе жестко заданных элементов и как соотносятся друг с другом посрепликативная и репликативная фракция хроматина. Для того чтобы ответить на этот вопрос, необходимо было исследовать динамику изменения пространственной организации хроматина во время синтеза. Мы провели серию экспериментов с отложенной меткой EdU на культуре клеток, экспрессирующих белок PCNA, локализующийся в вилке репликации. Благодаря этому впоследствии у нас была возможность анализировать и сравнивать структуру репликативной и пострепликативной фракций. Оказалось, что их сегрегация не коррелирует с временем, необходимым для синтеза одного кластера репликонов (Schermelleh et al., 2001). Хроматин, закончивший репликацию, начинает перемещаться из фокуса вдоль упакованной эухроматиновой фибриллы. Такое поведение невозможно при наличии жесткой регулярной организации.

Из полученных результатов можно сделать вывод о динамической пластичности эухроматиновых доменов высшего порядка. Несмотря на то, что после удвоения генома размер компактизованных фибрилл, вдоль которых происходит перераспределение ДНК, остается прежним, жестко заданной структурной организации репликативных доменов не наблюдается. Можно предположить наличие иерархии в упаковке хроматина, которая определяется физико-химическими свойствами, а не структурными элементами. Такой тип организации оставляет возможность для динамики внутри высших уровней компактизации генома (рис. 38).

Следуя предложенной модели, сегрегации сестринских хроматид на высшем уровне организации сразу после репликации не происходит. Мы не наблюдаем ни двух рядом лежащих фибрилл, ни утолщения эухроматиновой фибриллы в ходе синтеза. Поэтому, вероятнее всего, разделение двух сестринских хроматид происходит на более поздних стадиях клеточного цикла. Возможно, это связано с тем, что физически ДНК представляет собой

123

нить, в которой соседние реплицирующиеся локусы сдерживают уже отреплицированные от расхождения в пространстве ядра.



Рисунок 38. Модели организация процесса репликации и сегрегации сестринских хроматид в контексте хроматиновых фибрилл высшего порядка. (А) синтетическая модель на основе концепции струтурно-функциональных доменов, соответствующих кластерам репликонов, и репликативных фабрик (Hozak et al., 1994) и (Б) модель динамической пластичности ДНК в составе хромонем (см. объяснение в тексте).

6 Заключение

Выяснение принципов пространственной организации генетического материала является ключевым аспектом для понимания механизмов регуляции его функционирования, в первую очередь процессов матричного синтеза, а также корректного распределения генома в процессе клеточного деления. Считается, что сложная структурная организация генома приводит к пространственным затруднениям в ходе реализации его функций, а также существенно осложняет исследование особенностей топологии ДНК в составе его структурных доменов.

В данной работе мы показали, что процесс репликативного синтеза ДНК может осуществляться на достаточно компактной хроматиновой матрице, без глобальной деконденсации высших уровней компактизации хроматина. Это справедливо как для транскрипционно-неактивного высоко компактизованного гетерохроматина, так и для транскрибирующейся эухроматиновой фракции. Эти результаты были получены благодаря разработанным нами методам недеструктивной визуализации новосинтезированной ДНК на ультраструктурном уровне при помощи комбинации Click-химии и иммуноэлектронной микроскопии.

Обнаруженная нами организация транскрипционно-активного хроматина в виде хроматиновых фибрилл высшего порядка – хромонем, визуализируемых в контексте сохранения нативной структуры хроматина, является сильным аргументом в пользу гипотезы о иерархической организации генетического материала в клетках эукариот.

Данная иерархическая структура сохраняется на протяжении всего хромосомного цикла, что выражается в сохранность структурной организации хроматиновых доменов высшего порядка в максимально компактизованных метафазных хромосомах. Эти наблюдения важны для критического анализа результатов, полученных с помощью 3С-методов. Исследования реорганизации высших уровней компактизации хроматина продемонстрировали отсутствие жестко детерминированных параметров структурных доменов высшего порядка. Кроме того, было обнаружено, что ДНК в их составе обладает определенной степенью структурной пластичности. Эти наблюдения противоречат концепции существования дискретных доменов хроматина, а также гипотезе об отсутствии наднуклеосомных уровней организации хроматина. Наши наблюдения позволили создать синтетическую модель, в которой поведение ДНК по принципу "polymer melt" происходит внутри хромонемных структурных элементов, являющихся часть иерархической системы.

Многие аспекты организации высших уровней, например, топология ДНК в составе хромонемных фибрилл, остаются невыясненными в связи с отсутствием адекватных методов исследования. Определенного прогресса добиться при разработке новых методических можно подходов, комбинирующих *in vivo* мечение индивидуальных генных локусов с возможностью анализа нативного состояния хроматина методами криоэлектронной томографии. Работа в этом направлении позволит создать наиболее картину структурно-функциональной полную организации генетического аппарата эукариотических организмов. Эти сведения могут иметь огромное значение для понимания механизмов возникновения и состояний, развития патологических связанных с эпигенетической регуляцией, дифференцировки, таких как нарушение процессов канцерогенез, старение и т.д., и могут способствовать разработке новых терапевтических подходов.

126

7 Выводы

- Во время репликации эухроматиновые и гетерохроматиновые домены сохраняют высшие уровни организации, не претерпевая глобальной декомпактизации
- Процесс репликации гетерохроматина осуществляется по всему объему структурных доменов (репликативные домены)
- Рано реплицирующиеся домены, соответствующие транскрипционно активному эухроматину, упакованы в фибриллы высшего порядка хромонемы
- Толщина эухроматиновых фибрилл на разных стадиях клеточного цикла остается неизменной, а обособления сестринских хроматид в интерфазе не происходит
- 5. ДНК в составе хроматиновых доменов высшего порядка демонстрирует структурную пластичность, выражающуюся в ее пострепликативном перераспределении в составе хромонем.
- Структурные домены хроматина, соответствующие высшим уровням компактизации, сохраняют свою дискретность в процессе митотической компактизации хромосом
- Паттерн распределения пострепликативного хроматина в профазе митоза отличается для разных фракций хроматина

8 Список сокращений

3-C	Chromosome conformation capture	
BrdU	Bromodeoxyuridine	
CHIP-seq	Chromatin immunoprecipitation with massively parallel	
DNA sequencing		
СНО	Chinese hamster ovary	
CTCF	CCCTC-binding factor	
DamID	DNA adenine methyltransferase identification	
EdU	5-ethynyl-2'deoxyuridine	
FBS	Fetal bovine serum	
FISH	Fluorescent in situ hybridization	
GFP	Green fluorescent protein	
HT1080	Fibrosarcoma cell line	
Kb	Kilobase	
LAD	Lamina associated domains	
LCR	Locus control region	
Mb	Megabase	
PBS	Phosphate-buffered saline	
PCNA	Prolifereiting cell nucleus antigene	
RFP	Red fluorescent protein	
SIM	Structured Illumination Microscopy	
STORM	Stochastic Optical Reconstruction Microscopy	
TAE	Tris base, acetic acid and EDTA	
TEM	Transmission electron microscopy	
ΑΤΦ	аденозинтрифосфат	
БСА	Бычий сывороточный альбумин	
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота	

МКМ	микрометр
НМ	нанометр
п.н.	пар нуклеотидов
ПЦР	полимеразная цепная реакция
ТАД	топологически ассоциированный домен
ТЭМ	трансмиссионная электронная микроскопия

9 Список литературы

1. Голышев С.А., Поляков В.Ю. Ультраструктура хроматина в сайтах репликации // Цитология. 2008. Т.50 №1:29-39.

2. Жиронкина О.А., Курчашова С.Ю., Братцева А.Л., Черепанинец В.Д., Стрелкова О.С., Бельмонт А.С., Киреев И.И. Разрешение пространственных затруднений при репликации периферического гетерохроматина // Цитология, 2014, том 56, № 12, с. 899-906.

3. Зацепина О.В., Поляков В.Ю., Ченцов Ю.С. Различия в структурной организации G и R сегментов ,выявляемые в процессе дифференциальной деконденсации хромосом// Цитология. 1985. Т. 27. С. 865-871.

4. Киреев И.И., Зацепина О.В., Поляков В.Ю., Ченцов Ю.С. Динамика структурной реконструкции митотических хромосом после их искусственной деконденсации in vitro // Цитология. 1990. Т. 32. № 5. С. 449-454.

5. Киреев И.И., Зацепина О.В., Поляков В.Ю., Ченцов Ю.С. Ультраструктура митотических хромосом клеток СПЭВ в ходе их обратимой искусственной деконденсации In vivo // Цитология. 1988. Т. 30. № 8. С. 926-932.

6. Adli M., Bernstein B.E. Whole-genome chromatin profiling from limited numbers of cells using nano-ChIP-seq // Nat Protoc. 2011. V. 6. № 10. P. 1656-68.

7. Alexandrow M.G., Hamlin J.L. Chromatin decondensation in S-phase involves recruitment of Cdk2 by Cdc45 and histone H1 phosphorylation // J Cell Biol. 2005. V. 168. № 6. P. 875–886.

8. Baddeley D., Jayasinghe I.D., Cremer C., Cannell M.B., Soeller C. Light-induced dark states of organic fluochromes enable 30 nm resolution imaging in standard media // Biophys J. 2009. V. 96. № 2. P 22-4.

9. Bau D., Sanyal A., Lajoie B.R., Capriotti E., Byron M., Lawrence J.B., Dekker J., Marti-Renom M.A. The three-dimensional folding of the alpha-globin gene domain reveals formation of chromatin globules // Nature structural & molecular biology. 2011. V. 18. № 1. P. 107–114.

10. Belmont A., Hu Y., Sinclair P., Wu W., Bian Q., Kireev I. Insights into interphase large-scale chromatin structure from analysis of engineered chromosome regions // Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 2010. V. 75. P. 453–460.

11. Belmont A. Large-scale Chromatin Organization: The Good, the Surprising, and the Still Perplexing // Curr Opin Cell Biol. 2014. V. 26. P. 69–78.

12. Belmont A.S., Braunfeld M.B., Sedat J.W., Agard D.A. Large-scale chromatin structural domains within mitotic and interphase chromosomes in vivo and in vitro // Chromosoma. 1989. V. 98. №2. P. 129-43.

13. Belmont A.S., Bruce K. Visualization of G1 chromosomes: a folded, twisted, supercoiled chromonema model of interphase chromatid structure // J Cell Biol. 1994. V. 127. P. 287–302.

14. Bensimon A., Simon A., Chiffaudel A., Croquette V., Heslot F., Bensimon D. Alignment and sensitive detection of DNA by a moving interface // Science. 1994. V. 265. P. 2096–2098.

15. Blow J.J., Ge X.Q. Replication forks, chromatin loops and dormant replication origins // Genome Biol. 2008. V. 9. №12. P.244.

16. Bolzer A., Kreth G., Solovei I., Koehler D., Saracoglu K., Fauth C., Müller S., Eils R., Cremer C., Speicher M. and Cremer T. Three-Dimensional Maps of All Chromosomes in Human Male Fibroblast Nuclei and Prometaphase Rosettes // PLoS Biol. 2005. V. 3. № 5. P. 157.

17. Bradley R. C., Lorch Y., Li Y., Zhang M., Lacomis L., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Du J., Laurent B., Komberg R. D. RSC, an Essential, Abundant Chromatin-Remodeling Complex // Cell 1996. V. 87. P 1249-1260.

18. Buckton K.E. Identification with G and R banding of the position of breakage points induced in human chromosomes by in vitro x-irradiation // Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med. 1976. V. 29. № 5. P. 475-88.

19. Bulger M., Groudine M. Functional and mechanistic diversity of distal transcription enhancers // Cell. 2011. V. 144. P. 327–339.

20. Cardoso M.C., Leonhardt H., Nadal-Ginard B. Reversal of terminal differentiation and control of DNA replication: Cyclin A and Cdk2 specifically localize at subnuclear sites of DNA replication // Cell. 1993. V. 74. P. 979–992.

21. Cardoso M.C., Joseph C., Rahn H.P., Reusch R., Nadal-Ginard B., Leonhardt H. Mapping and use of a sequence that targets DNA ligase I to sites of DNA replication in vivo // J Cell Biol. 1997. V. 139. № 3. P. 579-87.

22. Carpenter A.E., Memedula S., Plutz M.J., Belmont A.S. Common effects of acidic activators on large-scale chromatin structure and transcription // Mol Cell Biol. 2005. V. 25. № 3. P. 958-68.

23. Cavalli G., Misteli T. Functional implications of genome topology // Nat Struct Mol Biol. 2013. V. 20. P. 290–299.

24. Chagin V., Stear J., Cardoso C. Organization of DNA Replication // Cold Spring Harb Perspect Biol. 2010. V. 2. № 4. P. a000737.

25. Conti C., Saccà B., Herrick J., Lalou C., Pommier Y. and Bensimon A. Replication Fork Velocities at Adjacent Replication Origins Are Coordinately Modified during DNA Replication in Human Cells // Mol Biol Cell. 2007. V. 18. № 8. P. 3059–3067.

26. Cook P.R. The organization of replication and transcription // Science. 1999. V. 284. № 5421. P. 1790-5.

27. Cremer M., Grasser F., Lanctôt C., Müller S., Neusser M., Zinner R., Solovei I., Cremer T. Multicolor 3D fluorescence in situ hybridization for imaging interphase chromosomes // Methods Mol Biol. 2008. V. 463. P. 205-39.

28. Cremer T., Cremer C. Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells // Nat Rev Genet. 2001. V. 2. P. 292–301.

29. Cremer T., Cremer C., Schneider T., Baumann H., Hens L., Kirsch-Volders M. Analysis of chromosome positions in the interphase nucleus of Chinese hamster cells by laser-UV-microirradiation experiments // Hum Genet. 1982. V. 62. P. 201–209. 30. Dani A., Huang B., Bergan J., Dulac C., Zhuang X. Superresolution imaging of chemical synapses in the brain // Neuron. 2010. V. 68. P. 843–856.

31. Danscher G. Autometallography. A new technique for light and electron microscopic visualization of metals in biological tissues (gold, silver, metal sulphides and metal selenides) // Histochemistry. 1984. V. 81. № 4. P. 331-5.

32. Dekker J., Rippe K., Dekker M., Kleckner N. Capturing chromosome conformation // Science. 2002. V. 295. P. 1306–1311.

33. Deng W., Blobel G.A. Do chromatin loops provide epigenetic gene expression states? // Curr Opin Genet Dev. 2010. V. 20. P. 548–554.

34. Deng X., Zhironkina O.A., Cherepanynets V.D., Strelkova O.S., Kireev I.I., Belmont A.S. Cytology of DNA Replication Reveals Dynamic Plasticity of Large-Scale Chromatin Fibers // Curr Biol. 2016. V. 26. № 18. P. 2527-2534.

35. Dijkwel P.A., Wang S., Hamlin J.L. Initiation sites are distributed at frequent intervals in the Chinese hamster dihydrofolate reductase origin of replication but are used with very different efficiencies // Mol Cell Biol. 2002. V. 22. P. 3053–3065.

36. Dileep V., Rivera-Mulia J.C., Sima J., Gilbert D.M. Large-Scale Chromatin Structure-Function Relationships during the Cell Cycle and Development: Insights from Replication Timing // Cold Spring Harb Symp Quant Biol..2015. V. 80. P. 53-63. 37. Dimitrova D.S., Gilbert D.M. Temporally coordinated assembly and disassembly of replication factories in the absence of DNA synthesis // Nat Cell Biol. 2000. V. 2. P. 686–694.

38. Dimitrova D.S., Berezney R. The spatio-temporal organization of DNA replication sites is identical in primary, immortalized and transformed mammalian cells // J Cell Sci. 2002. V.115. № 21. P. 4037-51.

39. 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. № 7398. P. 376-380.

40. Donaldson A.D. Shaping time: Chromatin structure and the DNA replication programme // Trends Genet. 2005. V. 21. P. 444–449.

41. Easwaran H.P., Leonhardt H., Cardoso M.C. Cell cycle markers for live cell analyses // Cell Cycle. 2005. V. 4. P. 453–455.

42. Egecioglu D., Brickner J.H. Gene positioning and expression // Curr Opin Cell Biol. 2011. V. 23. P. 338–345.

43. Eltsov M., Maclellan K.M., Maeshima K., Frangakis A.S., Dubochet J. Analysis of cryo-electron microscopy images does not support the existence of 30nm chromatin fibers in mitotic chromosomes in situ // Proc Natl Acad Sci U S A. 2008. V. 105. P. 19732–19737.

44. Eskiw C.H., Fraser P. Ultrastructural study of transcription factories in mouse erythroblasts // J Cell Sci. 2011. V. 124. № 21. P. 3676-83.

45. Fang H., Wei S., Lee T.H., Hayes J.J. Chromatin structure-dependent conformations of the H1 CTD // Nucleic Acids Res. 2016. P. 44. № 19. P. 9131-9141.

46. Felsenfeld G., Groudine M. Controlling the double helix // Nature. 2003. V. 421. P. 448–453.

47. Gavrilov A.A., Gushchanskaya E.S., Strelkova O., Zhironkina O., Kireev I.I., Iarovaia O.V., Razin S.V. Disclosure of a structural milieu for the proximity ligation reveals the elusive nature of an active chromatin hub // Nucleic Acids Res. 2013. V. 41. N_{0} 6. P. 3563-3575.

48. Gibcus J., Dekker J. Connecting the genome: dynamics and stochasticity in a new hierarchy for chromosome conformation // Mol Cell. 2013. P. 49. № 5. P. 773–782.

49. Gilbert D.M. Nuclear position leaves its mark on replication timing // J Cell Biol. 2001. V. 152. № 2. P. 11-5.

50. Gorisch S.M., Sporbert A., Stear J.H., Grunewald I., Nowak D., Warbrick E., Leonhardt H., Cardoso M.C. Uncoupling the replication machinery: Replication fork progression in the absence of processive DNA synthesis // Cell Cycle. 2008. V. 7. P. 1983–1990.

51. Gross D.S., Chowdhary S., Anandhakumar J. and Kainth A.S. Chromatin // Current Biology. 2015. V. 25. P. 1151-1165.

52. Guelen L., Pagie L., Brasset E., Meuleman W., Faza M.B., Talhout W., Eussen B.H., de Klein A., Wessels L., de Laat W. Domain organization of human chromosomes revealed by mapping of nuclear lamina interactions // Nature. 2008. V. 453. P. 948–951.

53. Gustafsson M.G. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy // J Microsc. 2000. V. 198. № 2. P. 82-7.

54. Hakim O., Misteli T. Chromosome conformation techniques // Cell. 2012. V. 148. P. 1068.

55. Heng H.H., Goetze S., Ye .C.J., Liu G., Stevens J.B., Bremer S.W., Wykes S.M., Bode J., Krawetz S.A. Chromatin loops are selectively anchored using scaffold/matrix-attachment regions // J. Cell. Sci. 2004. V. 117. № 7. P. 999–1008.

56. Hou W.H., Yeh T.S., Liang H.W. Reliability and validity of the Taiwan Chinese version of the Lower Extremity Functional Scale // J Formos Med Assoc. 2014. V. 113. № 5. P. 313-20.

57. Hozák P., Cook P.R. Replication factories. // Trends Cell Biol. 1994. V.
4. № 2. P. 48-52.

58. Hu Y., Kireev I., Plutz M.J., Ashourian N., Belmont A.S. Large-scale chromatin structure of inducible genes- transcription on a linear template // J Cell Biol. 2009. V. 185. P. 87–100.

59. Hübscher U., Seo Y.S. Replication of the lagging strand: a concert of at least 23 polypeptides // Mol Cells. 2001. V. 12. № 2. P. 149-57.

60. Hyrien O., Marheineke K., Goldar A. Paradoxes of eukaryotic DNA replication: MCM proteins and the random completion problem // Bioessays. 2003. V. 25. P. 116–125.

61. Jaunin F., Fakan S. DNA replication and nuclear architecture // Journal of Cellular Biochemistry. 2002. V. 85. P. 1-9.

62. Jenuwein T., Allis C. Translating the histone code // Science. 2001. V. 293. № 5532. P. 1074–80.

63. Kind J., van Steensel B. Genome-nuclear lamina interactions and gene regulation // Curr Opin Cell Biol. 2010. V. 22. P. 320–325.

64. Kireev I., Lakonishok M., Liu W., Joshi V.N., Powell R., Belmont A.S. In vivo immunogold labeling confirms large-scale chromatin folding motifs // Nat Methods. 2008. V. 5. P. 311–3.

65. Kireeva N., Lakonishok M., Kireev I., Hirano T., Belmont A.S. Visualization of early chromosome condensation: a hierarchical folding, axial glue model of chromosome structure // J Cell Biol. 2004. V. 166. P. 775–85.

66. Klein F., Feldhahn N., Müschen M. Interference of BCR-ABL1 kinase activity with antigen receptor signaling in B cell precursor leukemia cells // Cell Cycle. 2004. V. 3. № 7. P. 858-60.

67. Kosak S.T., Skok J.A., Medina K.L., Riblet R., Le Beau M.M., Fisher A.G., Singh H. Subnuclear compartmentalization of immunoglobulin loci during lymphocyte development // Science. 2002. V. 296. P. 158–162.

68. Kumaran R.I., Spector D.L. A genetic locus targeted to the nuclear periphery in living cells maintains its transcriptional competence // J Cell Biol. 2008. V. 180. P. 51–65.

69. Laemmli U.K., Käs E., Poljak L., Adachi Y. Scaffold-associated regions: cis-acting determinants of chromatin structural loops and functional domains // Curr Opin Genet Dev. 1992. V. 2. № 2. P. 275-85.

70. Lanctot C., Cheutin T., Cremer M., Cavalli G., Cremer T. Dynamic genome architecture in the nuclear space: Regulation of gene expression in three dimensions // Nat Rev Genet. 2007. V. 8. P. 104–115.

71. Lanzuolo C., Roure V., Dekker J., Bantignies F., Orlando V. Polycomb response elements mediate the formation of chromosome higher-order structures in the bithorax complex // Nature cell biology. 2007. V. 9. P. 1167–1174.

72. Leonhardt H., Rahn H.P., Weinzierl P., Sporbert A., Cremer T., Zink D., Cardoso M.C. Dynamics of DNA replication factories in living cells // J Cell Biol. 2000. V. 149. P. 271–280.

73. Li G., Reinberg D. Chromatin higher-order structures and gene regulation // Curr Opin Genet Dev. 2011. V. 21. P. 175–186.

74. Lieberman-Aiden E., van Berkum N.L., Williams L., Imakaev M., Ragoczy T., Telling A., Amit I., Lajoie B.R., Sabo P.J., Dorschner M.O. Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome // Science. 2009. V. 326. P. 289–293. 75. Lodish H., Berk A., Kaiser C. A., Krieger M., Scott M. P., Bretscher A., Ploegh H., Matsudaira P. Molecular Cell Biology 6th Edition. 2007.

76. Lucas I., Chevrier-Miller M., Sogo J.M., Hyrien O. Mechanisms ensuring rapid and complete DNA replication despite random initiation in Xenopus early embryos // J Mol Biol. 2000. V. 296. P. 769–786.

77. Luger K., Mader A.W., Richmond R.K., Sargent D.F., Richmond T.J. Crystal structure of the nucleo some core particle at 2.8 A resolution // Nature. 1997. V. 389. P. 251-260.

78. Ma H., Samarabandu J., Devdhar S. R., Acharya R., Cheng P., Meng C. and Berezney R. Spatial and Temporal Dynamics of DNA Replication Sites in Mammalian Cells // J Cell Biol. 1998. V. 143. № 6. P. 1415–1425.

79. Maeshima K., Imai R., Tamura S., Nozaki T. Chromatin as dynamic 10-nm fibers // Chromosoma. 2014. V. 123. № 3. P. 225-37.

80. Manders E.M., Stap J., Strackee J., van Driel R., Aten J.A. Dynamic behavior of DNA replication domains // Exp Cell Res. 1996. V. 226. P. 328–335.

81. Masata M., Malínský J., Fidlerová H., Smirnov E., Raska I. Dynamics of replication foci in early S phase as visualized by cross-correlation function // J Struct Biol. 2005. V. 151. № 1. P. 61-8.

82. Mathas S., Kreher S., Meaburn K.J., Jöhrens K., Lamprecht B., Assaf C., Sterry W., Kadin M.E., Daibata M., Joos S., Hummel M., Stein H., Janz M., Anagnostopoulos I., Schrock E., Misteli T., Dörken B. Gene deregulation and spatial genome reorganization near breakpoints prior to formation of translocations

in anaplastic large cell lymphoma // Proc Natl Acad Sci U S A. 2009. V. 106. № 14. P. 5831-6.

83. McCord R.P., Nazario-Toole A., Zhang H., Chines P.S., Zhan Y., Erdos M.R., Collins F.S., Dekker J., Cao K. Correlated alterations in genome organization, histone methylation, and DNA-lamin A/C interactions in Hutchinson-Gilford progeria syndrome // Genome Res. 2013. V. 23. P. 260–269.

84. Memedula S., Belmont A.S. Sequential recruitment of HAT and SWI/SNF components to condensed chromatin by VP16 // Curr Biol. 2003. V. 13. № 3. P. 241-6.

85. Milner G.R. Nuclear morphology and the ultrastructural localization of deoxyribonucleic acid synthesis during interphase // J Cell Sci. 1969. V. 4. № 3. P. 569-82.

86. Misteli T., Soutoglou E. The emerging role of nuclear architecture in DNA repair and genome maintenance // Nat Rev Mol Cell Biol. 2009. V. 10. P. 243–254.

87. Misteli T. Beyond the sequence: cellular organization of genome function // Cell. 2007.;128:787-800

88. Nagano T., Lubling Y., Várnai C., Dudley C., Leung W., Baran Y., Mendelson N. C., Wingett S., Fraser P., Tanay A. Cell-cycle dynamics of chromosomal organization at single-cell resolution // Nature. 2017. V. 547. P. 61-67. 89. Nakamura H., Morita T., Sato C. Structural organizations of replicon domains during DNA synthetic phase in the mammalian nucleus // Exp Cell Res. 1986. V. 165. P. 291–297.

90. Nakayasu H., Berezney R. Mapping replicational sites in the eucaryotic cell nucleus // J Cell Biol. 1989. V. 108. P. 1–11.

91. Naumova N., Imakaev M., Fudenberg G., Zhan Y., Lajoie B.R., Mirny L.A., Dekker J. Organization of the mitotic chromosome // Science. 2013. V. 342. № 6161. P. 948-53.

92. O'Keefe R.T., Henderson S.C., Spector D.L. Dynamic organization of DNA replication in mammalian cell nuclei: Spatially and temporally defined replication of chromosome-specific alpha-satellite DNA sequences // J Cell Biol. 1992. V. 116. P. 1095–1110

93. Okazaki R., Okazaki T., Sakabe K., Sugimoto K., Sugino A. Mechanism of DNA chain growth. Possible discontinuity and unusual secondary structure of newly synthesized chains // Proc Natl Acad Sci. 1968. V. 59. P. 598–605.

94. Olins A.L., Olins D.E. Spheroid chromatin units (v bodies) // Science. 1974. V. 183. № 4122. P. 330–2.

95. Osborne C.S., Chakalova L., Brown K.E., Carter D., Horton A., Debrand E., Goyenechea B., Mitchell J.A., Lopes S., Reik W. Active genes dynamically colocalize to shared sites of ongoing transcription // Nature genetics. 2004. V. 36. P. 1065–1071.

96. Ou H.D., Phan S., Deerinck T.J., Thor A., Ellisman M.H., O'Shea C.C. ChromEMT: Visualizing 3D chromatin structure and compaction in interphase and mitotic cells // Science. V. 357. P. 6349

97. Palstra R.J., Tolhuis B., Splinter E., Nijmeijer R., Grosveld F., de Laat W. The beta-globin nuclear compartment in development and erythroid differentiation // Nature genetics. 2003. V. 35. P. 190–194.

98. Patel P.K., Arcangioli B., Baker S.P., Bensimon A., Rhind N. DNA replication origins fire stochastically in fission yeast // Mol Biol Cell. 2006. V. 17. P. 308–316.

99. Peric-Hupkes D., Meuleman W., Pagie L., Bruggeman S.W., Solovei I., Brugman W., Gräf S., Flicek P., Kerkhoven R.M., van Lohuizen M., Reinders M., Wessels L., van Steensel B. Molecular maps of the reorganization of genomenuclear lamina interactions during differentiation // Mol Cell. 2010. V. 38. № 4. P. 603-13.

100. Perumal S.K., Yue H., Hu Z., Spiering M.M., Benkovic S.J. Singlemolecule studies of DNA replisome function // Biochim Biophys Acta. 2009. V. 1804. № 5. P. 1094-112.

101. Pickersgill H., Kalverda B., de Wit E., Talhout W., Fornerod M., van Steensel B. Characterization of the Drosophila melanogaster genome at the nuclear lamina // Nat Genet. 2006. V. 38. P. 1005–1014.

102. Prusov A.N., Polyakov V.Yu., Zatsepina O.V., Chentsov Yu.S., FaisD. Rosette-like structures from nuclei with condensed

(chromomeric) chromatin but not from nuclei with diffuse (nucleomeric or nucleosomic) chromatin // Cell Biol Int Rep. 1983. V.7. № 10. P. 849-58.

103. Pueschel R., Coraggio F., Meister P. From single genes to entire genomes: the search for a function of nuclear organization // Development. 2016.V. 143. P. 910-923.

104. Rajapakse I, Groudine M. On emerging nuclear order // J Cell Biol. 2011. V.192. P. 711–721.

105. Razin S.V. Functional architecture of chromosomal DNA domains // Crit Rev Eukaryot Gene Expr. 1996. V. 6. №2-3. P. 247-69.

106. Razin S.V., Iarovaia O.V., Vassetzky Y.S. A requiem to the nuclear matrix: from a controversial concept to 3D organization of the nucleus // Chromosoma. 2014. V. 123. № 3. P. 217-24.

107. Rego A., Sinclair P., Tao W., Kireev I., Belmont A. The facultative heterochromatin of the inactive x chromosome has a distinctive condensed ultrastructure // Journal of Cell Science. 2008. V. 121. № 7. P. 1119–1127.

108. Rhind N., Gilbert D. DNA Replication Timing //Cold Spring Harb Perspect Biol. 2013. V. 5. P. 010132.

109. Robinett C.C., Straight A., Li G., Willhelm C., Sudlow G., Murray A., Belmont A.S. In vivo localization of DNA sequences and visualization of largescale chromatin organization using lac operator/repressor recognition // J Cell Biol. 1996. V. 135. P. 1685–1700.
110. Ruo L., Zheng X. L., Mei Y. Z., Hen Y. X., Chu J., Zhi J. Y., Li M. Q., Yi Z., Jun H.. Visualization of chromatin folding patterns in chicken erythrocytes by atomic force microscopy (AFM) // Cell Research. 1997. V. 7. P. 143–150;

111. Sadoni N., Cardoso M.C., Stelzer E.H., Leonhardt H., Zink D. Stable chromosomal units determine the spatial and temporal organization of DNA replication // J Cell Sci. 2004. V. 117. P. 5353–5365.

112. Sadoni N., Langer S., Fauth C., Bernardi G., Cremer T., Turner B.M., Zink D. Nuclear organization of mammalian genomes. Polar chromosome territories build upfunctionally distinct higher order compartment // J Cell Biol. 1999. V. 146. № 6. P. 1211-26.

113. Salic A., Mitchison T.J. A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo // Proc Natl Acad Sci U S A. 2008. V. 105. № 7. P. 2415-20.

114. Schermelleh L., Solovei I., Zink D., Cremer T. Two-color fluorescence labeling of early and mid-to-late replicating chromatin in living cells // Chromosome Res. 2001. V. 9. P. 77–80.

115. Shaytan A.K., Landsman D., Panchenko A.R. Nucleosome adaptability conferred by sequence and structural variations in histone H2A-H2B dimers // Curr Opin Struct Biol. 2015. V. 32. P. 48-57.

116. Simonis M., Klous P., Splinter E., Moshkin Y., Willemsen R., de Wit E., van Steensel B., de Laat W. Nuclear organization of active and inactive

chromatin domains uncovered by chromosome conformation capture-on-chip (4C) // Nature genetics. 2006. V. 38. P. 1348–1354.

117. Solovei I., Cavallo A., Schermelleh L., Jaunin F., Scasselati C., Cmarko D., Cremer C., Fakan S., Cremer T. Spatial preservation of nuclear chromatin architecture during three-dimensional fluorescence in situ hybridization (3D-FISH) // Exp Cell Res. 2002. V. 276. P. 10–23.

118. Splinter E., de Laat W. The complex transcription regulatory landscape of our genome: Control in three dimensions // EMBO J. 2011. V. 30. P. 4345–4355.

119. Sporbert A., Gahl A., Ankerhold R., Leonhardt H., Cardoso M.C. DNA polymerase clamp shows little turnover at established replication sites but sequential de novo assembly at adjacent origin clusters // Mol Cell. 2002. V. 10. P. 1355–1365.

120. Strukov Y., Wang Y., Belmont A. Engineered chromosome regions with altered sequence composition demonstrate hierarchical large-scale folding within metaphase chromosomes // J Cell Biol. 2003. V. 162. № 1. P. 23–35.

121. Takizawa T., Meaburn K.J., Misteli T. The meaning of gene positioning // Cell. 2008. V. 135. P. 9–13.

122. Tolhuis B., Palstra R.J., Splinter E., Grosveld F., de Laat W. Looping and interaction between hypersensitive sites in the active beta-globin locus // Molecular cell. 2002. V. 10. P. 1453–1465.

123. Tumbar T., Sudlow G., Belmont A.S. Large-scale chromatin unfolding and remodeling induced by VP16 acidic activation domain // J Cell Bio. 1999. V. 145. P. 1341–1354.

124. Ulianov S.V., Khrameeva E.E., Gavrilov A.A., Flyamer I.M., Kos P., Mikhaleva E.A., Penin A.A., Logacheva M.D., Imakaev M.V., Chertovich A., Gelfand M.S., Shevelyov Y.Y., Razin S.V. Active chromatin and transcription play a key role in chromosome partitioning into topologically associating domains // Genome Res. 2016. V. 26. № 1. P. 70-84.

125. van Steensel B., Dekker J. Genomics tools for unraveling chromosome architecture // Nat Biotechnol. 2011. V. 28. P. 1089–1095.

126. van Steensel B., Henikoff S. Identification of in vivo DNA targets of chromatin proteins using tethered dammethyltransferase // Nat Biotechnol. 2000.
V. 18. № 4. P. 424-8.

127. Vernimmen D., De Gobbi M., Sloane-Stanley J.A., Wood W.G., Higgs D.R. Long-range chromosomal interactions regulate the timing of the transition between poised and active gene expression // The EMBO journal. 2007. V. 26. P. 2041–2051.

128. Volle C., Dalal Y. Histone variants: the tricksters of the chromatin world // Current Opinion in Genetics and Development. 2014. V. 25. P. 8-14.

129. Ea Vuthy, Baudement Marie-Odile, Lesne Annick, Forné Thierry. Contribution of Topological Domains and Loop Formation to 3D Chromatin Organization // Genes (Basel). 2015. V. 6. № 3. P. 734–750. 130. Wu R., Singh P.B., Gilbert D.M. Uncoupling global and fine-tuning replication timing determinants for mouse pericentric heterochromatin // J Cell Biol. 2006. V. 174. P. 185–194.

131. Zatsepina O.V., Polyakov V. Yu., Chentsov Yu. S. Chromonema and chromomere. Structural units of mitotic and interphase chromosomes // Chromosoma. 1983. V. 88. P. 91-97.

132. Zatsepina O.V., Poliakov V.Iu., Chentsov Iu.S. Electron microscopic study of the chromonema and chromomeres in mitotic and interphase chromosomes // Tsitologiia. 1983. V. 25. № 2. P. 123-9.

133. Zelenin M.G., Zakharov A.F., Zatsepina O.V., Polijakov V. Yu., Chentsov Yu.S., Reversible differential decondensation of unfixed Chinese hamster chromosomes induced by change in calcium ion concentration of the medium // Chromosoma. 1982. V. 84. P. 729-736.

134. Zhang Y., McCord R.P., Ho Y.J., Lajoie B.R., Hildebrand D.G., Simon A.C., Becker M.S., Alt F.W., Dekker J. Spatial organization of the mouse genome and its role in recurrent chromosomal translocations // Cell. 2012. V. 148. P. 908–921.