

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего профессионального образования  
«Санкт-Петербургский государственный политехнический университет»  
Кафедра «Биофизика»

Диссертация допущена к защите  
Зав.кафедрой, проф.  
\_\_\_\_\_ Орлов Ю.Н.  
"\_\_" \_\_\_\_\_ 2014 г.

**ДИССЕРТАЦИЯ**  
**на соискание ученой степени МАГИСТРА**

**Тема:** Фрактальность хроматина и точек начала репликации ДНК в клетках высших организмов

Направление: 011200.68 – Физика  
Магистерская программа: Биофизика

Выполнил студент гр. 63417

И.А. Юнг

(подпись)

Руководитель, к.ф-м.н.

Д.В. Лебедев

(подпись)

Рецензент, к.ф-м.н., доц.

Г.Н. Рычков

(подпись)

---

Санкт-Петербург 2014

## Реферат

Упаковка ДНК в ядрах клеток высших организмов обладает иерархической структурой. Уровень организации нити ДНК в нуклеосомную структуру, а также далее в фибриллярную структуру изучен достаточно хорошо, на этом уровне возможно изучение *in vitro*. Более высокие уровни организации хроматина изучены хуже, так как для их изучения желательнее работать *in vivo*. Но её изучение важно, так как в хроматине происходят такие ядерные процессы, как репликация, репарация и транскрипция. Структура хроматина влияет на доступ к молекулам ДНК ядерных белков, следовательно она непосредственно связана с функционированием ДНК.

Предложен ряд теоретических моделей для описания организации ДНК в ядре. Эти модели основаны на известной теории полимеров и при определенных условиях могут быть применены к описанию молекулы ДНК. Эти модели определяют некоторые топологические параметры системы, которые, могут быть проверены экспериментально. Для описания структуры хроматина часто применяют фрактальную теорию. [1,2]

В работе исследовалось распределение центров репликации ДНК в ядрах клеток высших организмов, как функциональное проявление физической организации хроматина. В работе были получены фрактальные характеристики хроматина в клетках HeLa, фибробластов, карциномы печени. Также были проведены эксперименты МУРН по непосредственному изучению распределения плотности в хроматине. Также был проведен анализ метода изучения центров репликации *in vivo* с помощью белка PCNA, связанного с GFP. Оказалось, что эта система распределена по ядру отличным образом от центров репликации, оопределённых с помощью флюоресцентного мечения BrdU.

Ключевые слова: ДНК, хроматин, центры репликации, фрактал.

стр. 49, рис. 21, форм. 22.

Принятые сокращения: FISH - флуоресцентная гибридизация *in situ*, FSC — флуоресцентная корреляционная спектроскопия, PBS - натрий-фосфатный буфер, БСА - бычий

сывороточный альбумин, GFP — зелёный флюоресцирующий белок, BrdU — бромдиокси уридин.

## **Содержание:**

i) Реферат.....	2
ii) Содержание.....	3
iii) Введение.....	4
1) Литературный обзор.....	5
1.1. Иерархия упаковки хроматина.....	5
1.2. Гетерохроматин и эухроматин.....	5
1.3. Хроматиновые петли.....	6
1.4. Динамика хроматина.....	8
1.5. Фрактальная структура.....	9
1.6. Фракталы, оптическая микроскопия.....	11
1.7. Фракталы, МУРН.....	13
1.8. Фракталы, биохимические методы.....	15
1.9. Теоретические модели.....	17
1.10. Фракталы, диффузия частиц.....	21
1.11. Теория макромолекулярного группирования.....	24
1.12. Сайты репликации ДНК.....	25
2) Материалы и методы.....	29
2.1. Конфокальная микроскопия.....	29
2.2. Приготовление клеток.....	31
2.3. Обработка конфокальных изображений.....	32
2.4. Приготовление клеток для измерений МУРН.....	36
2.5. Свойства функции парных расстояний.....	37
3) Результаты и обсуждение.....	39

3.1. Фрактальные свойства множества точек репликации на основе анализа функции парных расстояний.....	39
3.2. Распределение белка PCNA и репликационных центров.....	41
3.3 Определение фрактальных характеристик распределения центров репликации....	42
3.4. Данные измерений МУРН.....	45
4) Выводы.....	46
5) Список литературы.....	47

## **Введение.**

Упаковка ДНК в ядре тесно связана с ядерными функциями, такими как транскрипция, репарация, репликация. Для осуществления этих функций клетке нужен доступ к молекулам ДНК, поэтому, что бы система могла быть динамичной на малых размерах, позволяя ядерным белкам осуществлять свои функции, нужна определённая структура упаковки ДНК. Изменение структуры хроматина ведет к изменению функционирования этого участка хроматина. [1]

Для описания структуры ДНК применяют модели, справедливые для растворов полимеров. При определенных условиях они могут быть применены к описанию хроматина. Часто применяют теорию фракталов для описания свойств организации хроматина. Фрактальные свойства хроматина подтверждаются данными по диффузии частиц в хроматине, исследованием нейтронного рассеяния, методами конформационного захвата хромосомных взаимодействий (Hi-C, 3C).

В этой работе исследовалось распределение центров репликации ДНК в ядрах клеток высших организмов. Мы предположили, что распределение центров репликации может коррелировать с непосредственным распределением ДНК в ядре, являясь, таким образом, характеристикой организации хроматина. Целью работы было определение фрактальных свойств распределения центров репликации в ядре, а также измерение распределения плотности хроматина в ядре. Задачей, поставленной в работе стало определение фрактальных характеристик распределения центров репликации в разных типах клеток

методом конфокальной микроскопии, измерение распределения плотности хроматина методом МУРН, выяснения свойств распределения в ядре белка PCNA.

Были обнаружены фрактальные свойства распределения центров репликации в ядре, а так же рассмотрен метод для изучения распределения центров репликации в живой клетке с помощью белка PCNA.

## **1. Литературный обзор.**

### **1.1 Иерархия упаковки хроматина.**

Упаковка ДНК в ядре представляет собой иерархическую структуру, в которой происходят такие клеточные процессы, как транскрипция, репликация, рекомбинация и репарация. Для лучшего понимания этих процессов необходимо знание о структуре и динамике хроматина, в котором эти процессы происходят. Поэтому, определение структуры хроматина *in vivo* является одной из главных задач биологии.

Иерархия упаковки ДНК начинается с упаковки её в нуклеосомную структуру. Её структура была разрешена рентгеноструктурным анализом. Более высокий уровень организации ДНК уже не так хорошо описан. Предположена организация нуклеосом в 30 нм фибриллу, обнаруженную *in vitro* электронной микроскопией, однако *in vivo* эту структуру не наблюдали с помощью электронной микроскопии высокого разрешения, что может указывать на существование структур фибрилл с разными размерами. Из-за сложностей, возникающих при этих исследованиях *in situ*, много исследований проводилось на изолированном хроматине. Организация хроматина сильно зависит от окружающего ионного состава, так как отрицательный заряд ДНК не полностью ингибируется гистонами.

Принято считать, что ранняя стадия компактизации включает образование 30 нм фибрилл, и *in vitro* это установленная вторичная структура. Однако, организация нуклеосом и линкерной ДНК в 30 нм фибриллах остается спорной. (Vancaud A., 2012)

## **1.2 Гетерохроматин и эухроматин.**

Недостаток точной информации о вторичной структуре хроматина затрудняет вопрос о том, существует или нет определенная иерархия структур выше 30 нм фибрилл. Однако, наличие более высоких уровней организации очевидно, к примеру, структура метафазной хромосомы, хотя не установлено точно, какую структуру они имеют и действительно ли она иерархическая. Существуют данные о хромосомной организации, полученные световым микроскопом, хотя эти методы ограничены разрешением около 200 нм. Так же важно иметь в виду препаративный метод подготовки клеток, так как он может значительно изменять структуру хроматина. Исследования на живых клетках являются наиболее достоверными. Тогда как метод FISH (флюоресцентная *in situ* гибридизация) требует денатурации, что может вызвать изменения в структуре хроматина.

Понятие гетерохроматина и эухроматина больше относится к уровню компактизации и транскрипционной активности, чем к уровням организации хроматина как таковым. Гетерохроматин изначально описан как участок хроматина, который сильнее окрашивается классическими красителями ДНК. В основном, гетерохроматин локализуется в ядерной периферии, взаимодействуя с ядерным окружением. Это может быть легко видно в световой микроскоп. Транскрипция в основном происходит в эухроматине. Сейчас, понятие гетерохроматина используют более широко, обозначая транскрипционно молчащие участки ДНК, несмотря на их способность окрашиваться. Выделяют конституционный и факультативный гетерохроматин. Конституционный гетерохроматин всегда компактен, насыщен повторами, участками ДНК, обедненными генами, реплицируется поздно, тогда как факультативный гетерохроматин может обратимо менять форму с компактной, транскрипционно не активной, на более открытую, транскрибируемую форму ДНК. В течении эмбриогенеза, к примеру, количество факультативного гетерохроматина увеличивается, когда ненужные в этот период гены замолкают.

Недавние данные о свойствах гетерохроматина и эухроматина как диффузионных барьеров показали интересные результаты (Vancaud A., 2009). Измерения диффузионных констант больших полимеров в этих ядерных компартментах подтвердили, что гетерохроматин образует плотное, сгруппированное окружение, ведущее к эффективному задерживанию хроматин-связывающих белков. Предполагается, что эффект группирования макромолекул помогает поддерживать состояние гетерохроматина. Дальнейший кинетический анализ показал аномальные константы диффузии, что было интерпретировано в рамках фрактальной организации хроматина на размерах до 100 нм. Это предполагает физическую структуру, более близкую к структуре расплавленной глобулы, предположенную ввиду недостатка видимой структуры в крио-секциях, чем классическую форму 30 нм фибриллы.

### **1.3 Хроматиновые петли.**

Концепция больших хроматиновых петель важна для объяснения многих путей функционирования хроматина. Пока не ясно, формируют ли петли определенные уровни организации хроматина. Однако ясно, что петли различаются своей стабильностью. К примеру, петля энхансер-промотор, которая усиливает транскрипцию, временна и динамична, в то время как другие типы петель выглядят более стабильными. Петли могут участвовать в поддержании хроматиновой структуры, сближая далеко расположенные друг от друга участки ДНК, что позволяет происходить регуляторному взаимодействию между ними. Наоборот, петли могут пространственно разделять участки генома друг от друга, обеспечивая их независимое функционирование. (Рис.1)

Существуют данные о выпетливании частей генома из хромосомных территорий, которые связаны транскрипционной активностью. В петлях энхансер-промоторного типа, энхансер может находиться на расстоянии многих Кб от промотора, как сверху, так и снизу, а также на другой хромосоме. Сейчас пришли к заключению, что физическое взаимодействие между энхансером и промотором необходимо для инициации транскрипции, но как далеко расположенные участки ДНК приводятся в контакт друг с другом остается вопросом. Предположено, что специфичные транскрипционные факторы связываются и с промотором и энхансером, и также друг с другом (Woodcock C.L., 2010).

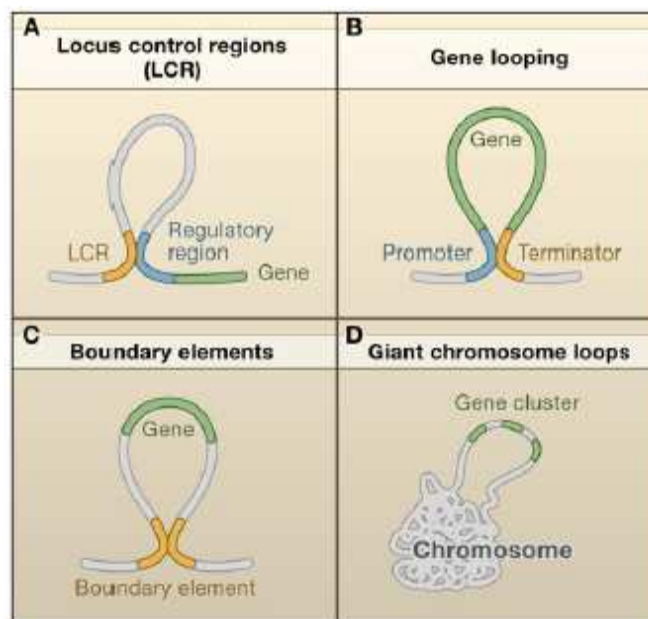


Рис.1: Локальная организация хроматина. (A) Локальные хроматиновые петли необходимы для транскрипционной активации и репрессии, (B) координации инициации и терминации, (C) граничных функций, а также гигантские петли могут выпетливать кластер генов из хромосомной территории (D). (Misteli T., 2008)

Недавно введенные техники захвата хромосомных конформаций (3C и аналоги), которые позволяют картировать физические взаимодействия в хроматине *in vivo*, дополняют данные о взаимодействии отдаленных участков ДНК, помимо энхансер-промоторных взаимодействий. Рак простаты является хорошей системой для наблюдения физического сближения участков ДНК. Гены *TMPRSS* и *ERG* расположены на расстоянии около 3 Мб друг от друга, но становятся соединенными в 50% случаев рака простаты. (Woodcock C.L., 2010)

В недавнем исследовании было показано, что активный и неактивный хроматин занимает разные домены внутри хромосомной территории. Также получено, что конформация хроматина соответствует модели незаузленной фрактальной глобулы. (Woodcock C.L., 2010) Интересно, что в этом исследовании была высказана фрактальная



модель на больших размерах, тогда как в упомянутой выше работе фрактальность организации также была предположена на малых размерах до 100 нм. (Vancaud A., 2009)

#### **1.4 Динамика хроматина.**

Световая микроскопия позволила исследовать динамику хроматина. Так, было обнаружено три типа движений, различающиеся амплитудой движения, энергетической зависимостью и временной шкалой. Ранние исследования показывали, что учитывая корректировку на вращение ядра, сегменты хроматина не передвигаются на расстояния, большие 0,4 мкм. Однако, более современные исследования показывают более сложную картину. Так, сегмент хроматина дрожжей, расположенный рядом с центромерой, претерпевает диффузионное движение с ограничивающим радиусом 0,3 мкм, независимо от метаболического состояния клетки. Уровень подвижности этого сегмента оказался в 3 раза меньше чем ожидаемый для свободной ДНК того же размера, что предполагает, что сегмент привязан в ядре, возможно к ядерному окружению или какой-то внутренней структуре. Исследования подвижности хроматина дрозофилы показали относительно большие движения в течении короткого времени в ранних ядрах. Движения такой амплитуды, предполагается, могут покрыть 4 мкм за 1 час. Однако, оказалось, что сегменты хроматина ограничены в движении размерами, соответствующими размерам хромосомной территории. (Woodcock C.L., 2010)

Можно сделать вывод, что все хромосомы совершают броуновское движение с схожими константами диффузии, но разным ограничивающим объемом. Показана сильная зависимость между размером ограничивающего объема и расстоянием до периферии ядра, причем хроматин, располагающийся ближе к периферии более ограничен в движении. Периферия ядра считается транскрипционно репрессивным окружением, что указывает на корреляцию между транскрипционной активностью и ограничением внутриядерной подвижности. Используя двух-фотонную микроскопию было показано, что ДНК повторы, меченные GFP, претерпевают периоды быстрой ограниченной диффузии с последовательными, энергозависимыми скачками на 150 нм, длящихся 0,3-2 секунды. Энергозависимость предполагает, что они нуждаются в работе хроматин-ремоделирующего

комплекса или других АТФ-зависимых механизмов, ведущих к таким событиям как деконденсация компактных 30 нм фибрилл, что ведет к быстрому движению.

Таким образом показано, что хроматин в интерфазном ядре претерпевает постоянные динамические реорганизации посредством ограниченных диффузионных движений, уровни организации хроматина, участвующие в этом движении пока остаются неизвестными. (Woodcock C.L., 2010)

### **1.5 Фрактальная структура.**

Недавние исследования показали, что фрактальная модель структуры хроматина подтверждается данными о хромосомном смешивании, диффузионными и связывающими свойствами белков, взаимодействующих с хроматином. (Bancaud A., 2012)

Фрактальные структуры самоподобны, что значит, что их характерная архитектура может быть наблюдаема и после увеличения в любое число раз любых их частей. Фрактальной структурой обладают многие природные объекты, и существуют работы, применяющие фрактальный формализм к описанию содержимого клеточного ядра. (Bancaud A., 2012)

Была обнаружена корреляция между среднеквадратичным смещением концов ДНК и длиной отрезка ДНК, указывающие на фрактальное распределение некодирующих белки последовательностей. (Grosberg A.. 1993). Основываясь на гипотезе, что хромосомы не должны иметь узлов, которые привели бы к образованию смешанной стеклообразной структуры хроматина, не соответствующей динамическим свойствам ДНК, была предположена фрактальная структура трехмерной организации хроматина, при этом каждая хромосома принимает структуру фрактальной (смятой) глобулы.



**Рис.2:** Брокколи романеско является одним из самых популярных примеров природных фракталов.

На рис.2 представлен пример природного фрактала, в котором одна структурная организация наблюдается при любом увеличении. Если измерять длину контура такого объекта, то окажется, что при увеличении масштаба, то есть при уменьшении единицы измерения длины, длина контура будет неограниченно расти, таким образом, длина контура будет бесконечной. Строго говоря, это справедливо для математических моделей фракталов, для природных фракталов свойство самоподобия наблюдается лишь на определенном наборе масштабов. Морфологию таких объектов можно охарактеризовать с помощью фрактальной размерности Хаусдорфа. Её определение таково: пусть мы имеем объект с Евклидовой размерностью  $d$ , мы можем покрыть этот объект  $d$ -мерными 'шарами' радиуса  $r$ . В случае  $d$  равного 1,  $r$  – длина отрезка, если  $d$  равно 2, то  $r$  – сторона квадрата,  $d$  равно 3, то  $r$  – сторона куба, которым мы покрываем наш объект. Минимальное число таких  $d$ -мерных 'шаров'  $N(r)$ . Тогда, если при достаточно малых  $r$  величина  $N(r)$  меняется с  $r$  по степенному закону:

$$N(r) \propto \frac{1}{r^f} \quad (1)$$

То  $f$  – называется Хаусдорфовой или фрактальной размерностью этого объекта. Формулу (1) можно преобразовать к виду:

$$f = -\lim_{r \rightarrow 0} \frac{\ln N(r)}{\ln r} \quad (2)$$

Это определение фрактальной размерности  $f$ , которая является локальной характеристикой данного объекта.

Так, для множества, состоящего из конечного числа изолированных точек, минимальное число  $d$ -мерных шаров  $N$ , с помощью которых мы можем покрыть это множество, при достаточно малых  $r$  совпадает с количеством точек. То есть  $N(r)=N$ , не зависит от размера  $r$ , тогда согласно формуле (2)  $f$  равно 0, что совпадает с обычной Евклидовой размерностью изолированной точки. Для отрезка линии  $L$ , минимальное число  $N(r)$  одномерных отрезков размера  $r$ , с помощью которых мы можем покрыть данный отрезок целиком, равно  $N(r) = \frac{L}{r}$ . Согласно формуле (2) размерность  $f$  равна 1, совпадает с Евклидовой размерности линии. Для фрактальных объектов, Хаусдорфова размерность всегда больше их Евклидовой размерности. (Божокин С.В., Паршин Д.А., 2001)

Фрактальная размерность это статический архитектурный параметр, который не говорит о том, как динамические процессы, такие как молекулярный диффузионный транспорт, происходят во фрактальном окружении. В случае диффузии, которая, наряду с связывающими свойствами, определяет поведение практически каждого ядерного белка, анализ движения частиц во фрактальном окружении основан на рассмотрении временной зависимости среднего квадратичного смещения ( $L(\Delta t)$ ) для определенного временного интервала ( $\Delta t$ ):

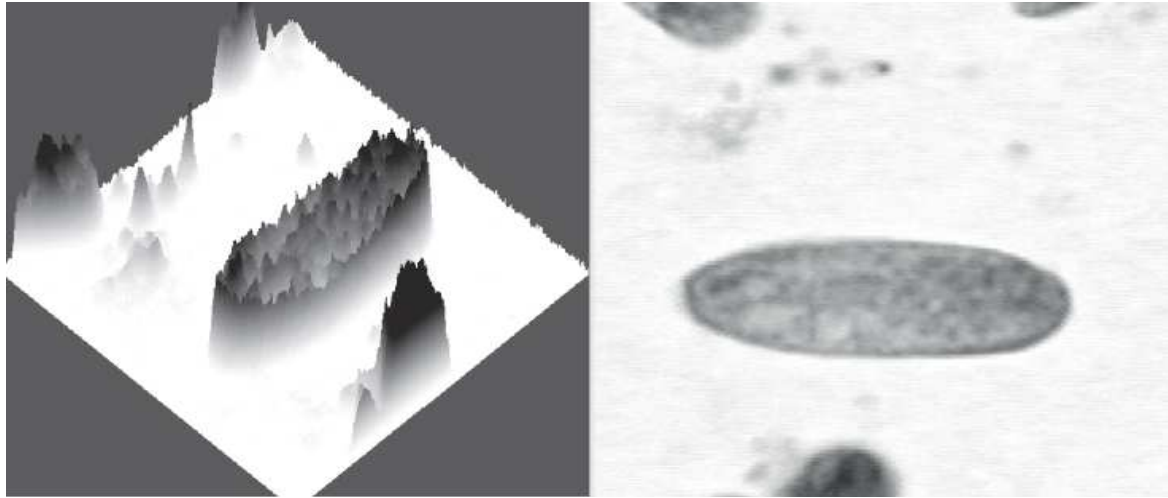
$$L(\Delta t) \propto \Delta t^{\frac{1}{\gamma}} \quad (3)$$

Где  $\gamma$  – аномальный параметр, причем  $\gamma \geq 2$ . Аномальный параметр равен 2 в случае нормальной диффузии в свободном пространстве. Аномальное поведение диффузии во фрактальном окружении обусловлено внутренней гетерогенностью, создающей препятствия на пути диффундирующих частиц. Таким образом, показатель  $f$  характеризует особенности геометрии структуры, тогда как  $\gamma$  относится к динамическим процессам внутри этой структуры.

## **1.6 Фракталы, оптическая микроскопия.**

Методы оптической спектроскопии позволяют исследовать фрактальную организацию хроматина. Исследования с использованием конфокального микроскопа подтверждают фрактальную организацию хроматина на больших размерах и дают примерную оценку фрактальной размерности хроматина 2,4-2,5.(Liberman-Aiden E., 2009)

Сейчас стало достаточно популярным в клиническом диагнозе использование фрактальных характеристик при анализе раковых клеток для их классификации. (Metze K., 2013) Для этого используют гистологические срезы клеток или цитологические снимки. Обработываемые фотографии являются соответственно секциями или проекциями трехмерных изображений окрашенного хроматина в фиксированных клетках. В некоторых исследованиях изучали фрактальные характеристики ядерных мембран, в этом случае интенсивность пикселей на изображении бинаризовалась выше и ниже определенного уровня, и с бинарного изображения можно получить показатель размерности. Наиболее популярная техника для фрактального анализа это *box counting*. В этом методе решетка с различной шириной ячейки чертится на бинарном изображении. Далее считается количество ячеек в сетке, покрывающей все изображение, содержащих не нулевые пиксели, при определенном размере её ширины. Далее ширина ячейки меняется и снова считается количество ячеек с ненулевыми пикселями. Эти итерации проводят для определенного набора размеров ячеек. Далее, построив зависимость числа ячеек с ненулевыми пикселями от размера ячейки в двойной логарифмической шкале, можно узнать по наклону регрессионной прямой, согласно формуле (2), размерность этого изображения. Так же применяют для анализа двумерных изображений псевдо-3D метод. (Рис.3) Он заключается в том, что изображение не бинаризуют, а оставляют прежний размер, например 256 разрядов интенсивности. Таким образом, изображение имеет координаты  $x, y, z$ , причем  $x, y$  соответствуют реальным координатам, а  $z$  координате интенсивности. Далее, по такому '3D' изображению считают фрактальную размерность трехмерным методом *box counting*. Таким образом, удастся избежать искажения изображения при выборе порога во время бинаризации.



**Рис.3:** *слева:* инвертированное изображение ядра клетки, ось  $z$  характеризует интенсивность пикселей оригинального изображения справа. **Справа:** изображение окрашенного ядра (гематоксилин-эозин краситель) клетки мышцы. (Metze K., 2013)

Было замечено, что фрактальная размерность изображения коррелирует с визуальным восприятием нерегулярностей изображения. Таким образом, размерность является математическим параметром нерегулярностей хроматина. Существует множество работ, использующих оба описанных метода, утверждающие, что фрактальная размерность изображения хроматина в раковых клетках увеличивается при увеличении степени заболевания. (Metze K., 2013) Так, при исследовании опухолевых клеток шейки матки, фрактальная размерность нормальных эпителиальных клеток равнялась 1.02, в то время как у клеток CIN1 – 1.32, CIN2 – 1.37, CIN3 – 1.40. В аналогичных исследованиях этих клеток трёхмерным методом, размерность менялась от 2.42 в случае нормальных клеток до 2.59 в случае раковых.

Так же изображения ядер клеток подвергают так называемому текстурному анализу, в котором оценивается ряд параметров изображения, в том числе и фрактальная размерность. В этой работе (Metze K., 2013) была показана возможность отличить клетки доброкачественной гиперплазии от аденокарциномы на основании текстурного анализа, и при этом параметр фрактальной размерности обладал большой чувствительностью. Таким

образом, показано, что фрактальная размерность изображений окрашенного хроматина увеличивается при развитии карциномы и дальнейшего роста опухоли.

В этих работах использовались двухмерные проекции ядер клеток или срезов этих ядер, при этом фрактальные свойства двухмерных изображений являются показателем фрактальной трехмерной организации. Как было показано, 2D изображения обладают фрактальными свойствами только в том случае, если соответствующие 3D изображения фрактальны, это верно в случае Броуновского самоподобия, которое применимо к полимерной модели хроматина. (Vancaud A., 2012)

### **1.7 Фракталы, МУРН.**

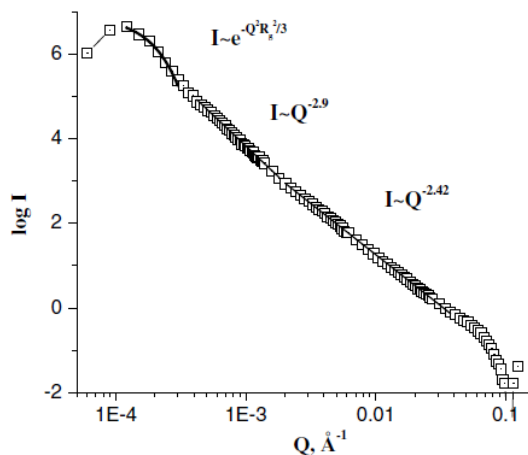
Малоугловое рассеяние нейтронов (МУРН) является одним из самых подходящих методов для определения фрактальных свойств, так как позволяет получать данные рассеяния частицами размером от 15 нм до 10 мкм. Однако, его нельзя использовать с живыми клетками, так как эксперимент требует выделения ядер клеток, чтобы рассеяние цитоплазмы не мешало. Фрактальная структура хроматина подразумевает свойство самоподобия, что в случае эксперимента МУРН означает, что взаимосвязь между размером рассеивающей частицы и размером неоднородностей внутри этой рассеивающей частицы остаётся одинаковой при изменении размера рассеивающей частицы. Изменение размера рассеивающей частицы значит изменение угла рассеяния (угол рассеяния обратно пропорционален размеру рассеивающей частицы) во всем диапазоне углов, в котором наблюдается степенной закон зависимости между интенсивностью рассеяния и углом рассеяния, что является признаком фрактальной структуры (Lebedev D.V. et al., 2005):

$$I \propto Q^{-D_m}$$

(4)

где  $D_m$  – фрактальная размерность масс-фрактала.

Так, были проведены измерения МУРН на ядрах куриных эритроцитов (Lebedev D.V. et al., 2005), при этом был обнаружен степенной закон (4) на размерах от 15 нм до 400 нм с показателем фрактальной размерности равной 2.4, а на размерах от 400 нм до 2 мкм с размерностью 2.9. Бифазная фрактальная структура, наблюдаемая по рассеивающей кривой,



означает двухфазную природу организации хроматина. (Рис.4)

**Рис.4:** Спектр МУРН ядер куриных эритроцитов, растворенных в 0.7% агарозном геле в  $D_2O$ . (Lebedev D.V. et al., 2005)

Из теории полимеров известно, что размерность масс-фрактала полимерных молекул длиной в  $N$  звеньев, с расстоянием  $R$  между концами полимера, связана соотношением:

$$R \propto N^{\frac{1}{D_m}} \quad (5)$$

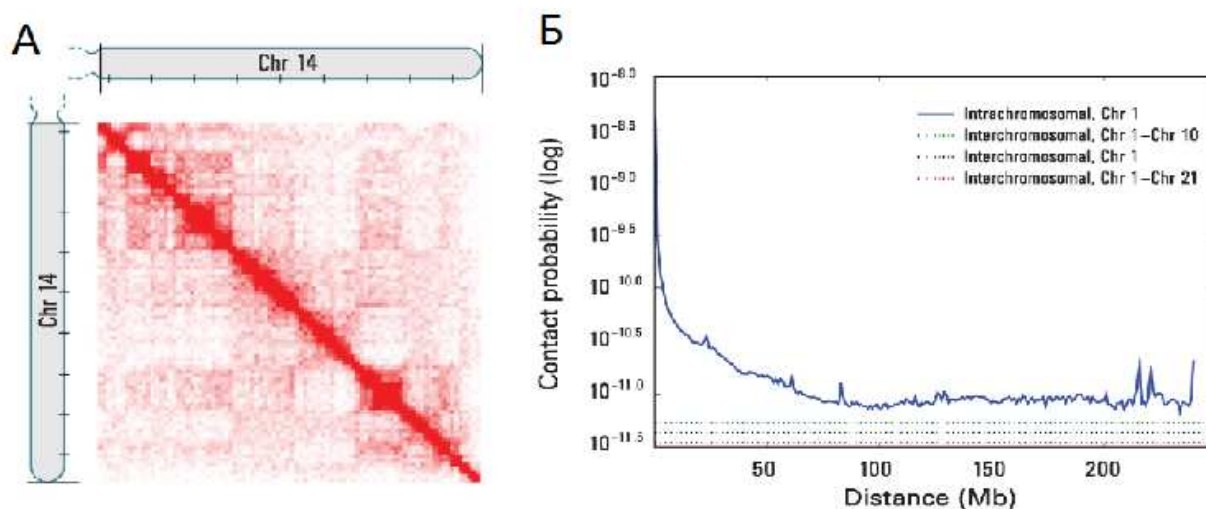
где соотношение  $\frac{1}{D} = \nu$  - называется показателем Флори. Тогда, применяя теорию полимеров к хроматину, были сосчитаны показатели Флори для малых размеров  $\nu = 0.45$ , и для больших размеров  $\nu = 0.31$ . Согласно теории Флори, это означает, что на размерах до 400 нм структура ДНК напоминает Гауссову цепь ( $\nu_G = 0.5$ ), на размерах больших 400 нм, упаковка ДНК в куриных эритроцитах становится глобулярной.



## **1.8 Фракталы, биохимические методы.**

Существуют методы, позволяющие определить пространственно близкие участки хроматина. Так, взаимодействия между специфичными участками ДНК могут быть опознаны методом 3С (Chromosome Conformation Capture), используя лигирование участков и ПЦР данных участков. Хорошим примером таких исследований является исследование мышинового бета-глобинового локуса. Было показано, что *in vivo* контролирующей этот участок регион (LCR) непосредственно взаимодействует с активным бета-глобиновым геном и вовлечен в формирование петлевой структуры хроматина в кластере бета-глобинового гена. (Goetze S., 2007) Аналогично, петли хроматина были обнаружены и для цитокинового кластера в мышах. Белки, такие как SATB1 и CTCF, видимо, вовлечены в формирование таких хроматиновых петель. Эти примеры поддерживают идею, что организация хроматина на больших размерах важна в регуляции генов и коррелирует с транскрипцией. Другой аналогичный метод называется RNA TRAP (мечение РНК и обнаружение ассоциированных белков). Так же как и метод 3С, он позволяет *in vivo* усреднить структурную информацию от многих клеток, но отличие в том, что метод детектирует взаимодействия между локусами вовлеченными в активную транскрипцию, такими как взаимодействия между энхансером и промотером генов. (Goetze S., 2007)

Однако, эти техники нуждаются в выборе определенных участков ДНК и не позволяют провести анализ по всему геному. Существует метод Hi-C (Lieberman-Aiden E. et al., 2009), позволяющий определять взаимодействия хроматина вдоль всего генома. Он состоит в следующем: клетки фиксируют, затем ДНК разрушается рестриктазой, оставляющей 5'-перекрытие, которое заполняется с включением биотинированного остатка. Далее участки лигируются, отбираются биотин-содержащие фрагменты стрептовидин-содержащими бусинами. Такая библиотека анализируется путем параллельного ДНК секвенирования, результатом является информация о всех взаимодействующих участках. По этим данным строится матрица (Рис.5). Геном делится на регионы по 1 Мб и ячейка матрицы  $m_{ij}$  соответствует количеству лигированного продукта между участками  $i$  и  $j$  генома.



**Рис.5:** а) Результатом метода Hi-C является матрица взаимодействий участков ДНК между собой. Эта матрица отражает внутрихромосомные взаимодействия для 14 хромосомы. Каждый пиксель представляет собой все взаимодействия между 1 Мб участком и другим 1 Мб участком хромосомы. б) Вероятность контактов уменьшается как функция геномного расстояния на хромосоме 1. Участки на хромосоме 1 наиболее вероятно контактируют с участками хромосомы 10. Межхромосомные взаимодействия существенно меньше внутрихромосомных взаимодействий. (Lieberman-Aden E. et al., 2009)

Авторы определили среднюю вероятность внутрихромосомного взаимодействия  $I_n(s)$  для пар участков, разделенных геномным расстоянием  $s$  (расстояние в парах нуклеотидов вдоль нуклеотидной последовательности) на хромосоме  $n$ .  $I_n(s)$  уменьшается монотонно на каждой хромосоме, что предполагает аналогию с моделью полимера, в которой пространственное расстояние между участками увеличивается с увеличением геномного расстояния между ними. (Lieberman-Aiden E. et al., 2009) Даже на расстоянии большим 200 Мб,  $I_n(s)$  всегда сильно больше чем средняя вероятность контакта между разными хромосомами. Это подтверждает существование хромосомных территорий.

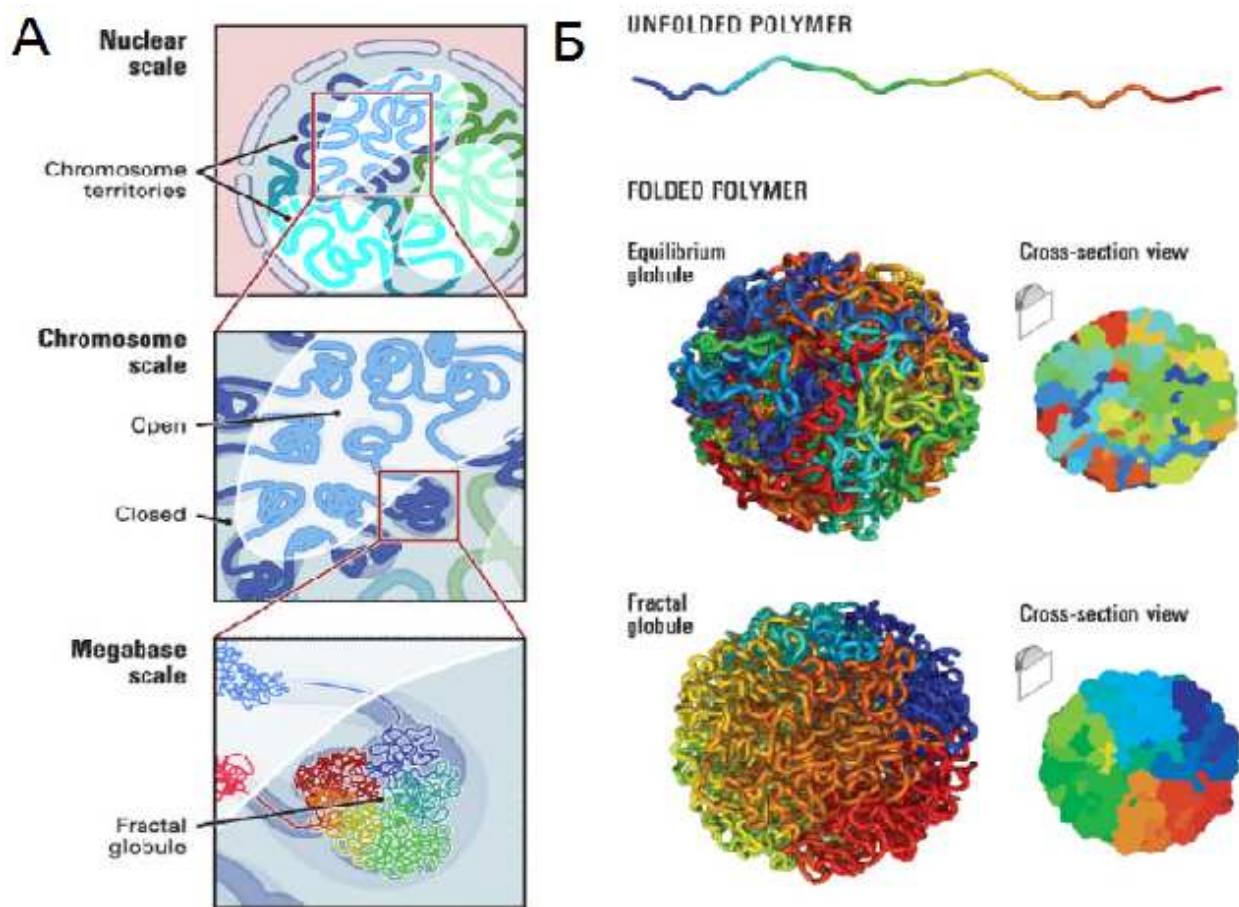
Матрица внутрихромосомных взаимодействий также показывает существование многих больших блоков усиленного и ослабленного взаимодействия, что дает 'клетчатость' матрицы (Рис.5а). Можно предположить, что каждая хромосома может быть разбита на два

набора участков, таких, что контакты внутри каждого набора усилены, а между этими наборами ослаблены. Было обнаружено, что в одном из наборов присутствуют гены, высокая экспрессия, более доступный хроматин. Таким образом, можно заключить, что один из наборов соответствует открытому, доступному для проникновения частиц состоянию хроматина. Это значит, что открытые и более компактизованные участки ДНК занимают разные пространственные домены.

Также обнаружено, что внутривромосомная вероятность контактов подчиняется степенному закону  $I(s) \sim s^{-1}$  от 500 кб до 7 Мб, что соответствует размеру открытого и закрытого состояния хроматина. (Lieberman-Aiden E. et al., 2009)

### **1.9 Теоретические модели.**

Многие авторы предлагают модель для хроматина, называемую *равновесной глобулой* — компактное, сильно переплетенное состояние, описывающее полимер в плохом растворителе. Однако, была предложена другая модель — *фрактальная глобула*, самоорганизующееся нестабильное состояние полимера. (Рис.6) Это компактное состояние сформировано 'не перепутанным', без узлов полимером, когда он складывается в серию небольших глобул по принципу, аналогичному бусинам на нити. Эти бусины служат мономерами в последующих циклах спонтанного складывания до тех пор, пока не останется одна глобула, состоящая из глобул, в свою очередь состоящих из меньших глобул и так далее. Фрактальная глобула интересна при описании хроматина, так как она не имеет узлов, точек пересечения, что облегчает её разворачивание и изменение конформации, в том числе в течении генной активации, репрессии, или в течении клеточного цикла. В этой структуре протяженные участки образуют пространственные сектора, размер которых определенным образом зависит от изначальной длины участка. В то время как в модели равновесной глобулы полимер сильно перепутан и не обладает подобными секторами, при этом линейная и пространственная позиция полимера не коррелирует уже после размера в несколько мегабаз.



**Рис.6:** а) Организация генома на трёх уровнях. **Сверху:** пространственное разделение генома. Хромосомы занимают разные территории. **Середина:** Индивидуальная хромосома содержит как участки открытого, так и закрытого состояния ДНК. **Снизу:** на размерах мегабаз, хромосома состоит из серии фрактальных глобул. б) **Сверху:** развернутый полимер длиной 4000 мономеров. **Середина:** равновесная глобула. Сильно спутанная структура. Участки, близкие вдоль цепи (одинаковые цвета) необязательно близки в пространстве. **Снизу:** фрактальная глобула. Расположенные близко в цепи полимера участки чаще оказываются сближенными в пространстве, что ведет к образованию монохроматических блоков и на поверхности, и в срезе. (Lieberman-Aiden E. et al. 2009)

Модель равновесной глобулы и фрактальной глобулы дают разные предсказания о изменении вероятности контактов с геномным расстоянием  $s$ . В равновесной глобуле

вероятность пропорциональна  $s^{-3/2}$ , что не наблюдали авторы, тогда как для фрактальной глобулы вероятность контакта убывает пропорционально  $s^{-1}$ , что подтверждается их экспериментом. (Lieberman-Aiden E. et al., 2009)

Таким образом, для исследования организации хроматина на больших размерах используют следующие характеристики: 1) среднее пространственное расстояние  $R(s)$  между двумя участками генома, разделёнными геномным расстоянием  $s$ , что может быть измерено экспериментом FISH (флюоресцентная гибридизация *in situ*), 2) вероятность контакта  $P(s)$  между двумя участками, разделёнными геномным расстоянием  $s$ , которая может быть измерена методами хромосомного захвата (3С, Hi-C). Обе величины усредняются в популяции клеток.

Рассмотрим существующие модели поведения полимера, применяемые к описанию хроматина.

#### *Случайная цепь.*

Полимер, в котором мономеры, расположенные достаточно далеко вдоль цепи не взаимодействуют, даже если приближаются друг к другу в пространстве, называется идеальной цепью. При определенных условиях поведение реальных цепей может быть аппроксимировано этой моделью. Независимо от механизма гибкости цепи, поведение достаточно длинных фрагментов цепи в пространстве напоминает трехмерные случайные блуждания. Характерный размер полимера, или его среднеквадратичное расстояние  $R$  от конца до конца меняется с длиной полимера  $N$  как:

$$R(N) \sim N^{1/2} \quad (6)$$

Пространственная длина участка цепи меняется аналогично:

$$R(s) \sim s^{1/2} \quad (7)$$

Это может быть измерено экспериментом FISH, где два участка, отстоящих друг от друга на расстоянии  $s$ , метятся и наблюдаются в клетке, где можно измерить пространственное расстояние между ними. Что и было сделано в работе (Yokota H. et al., 1995). В работе, использующей трёхмерный метод FISH была подтверждена пропорциональность пространственного расстояния геномному, как  $s^{1/3}$ , на размерах от 500 Кб до 2 Мб.

(Lieberman-Aiden E. et al., 2009) Однако в последствии предположили, что существенная вариация в клетках делает сложным получение достоверных значений для показателя степени в формуле (7). Метод хромосомного захвата предоставляет данные о вероятности контактов между участками. Для идеальной цепи:

$$P(s) \sim s^{-3/2} \quad (8)$$

Полимер в таком состоянии имеет маленькую плотность и занимает много места, что не похоже на упаковку ДНК.

#### *Равновесная глобула.*

Если притяжение между мономерами превалирует над силами отталкивания, или если полимер ограничен достаточно малым объемом, полимер принимает конформацию равновесной глобулы. Размер равновесной глобулы зависит от числа мономеров:

$$R \sim N^{1/3} \quad (9)$$

Поэтому объем, занимаемый полимером, увеличивается линейно с длиной полимера:  $V \sim R^3 \sim N$ , и плотность мономеров постоянна:  $\rho = N/V = const$ . Это отличает равновесную глобулу от идеальной цепи, так как для неё  $V \sim R^3 \sim N^{3/2}$  и плотность мономеров уменьшается с увеличением числа звеньев:  $\rho \sim N/V \sim N^{-1/2}$ . В равновесной глобуле цепь внутри её ведет себя как идеальная цепь ( $R(s) \sim s^{1/2}$ ), до тех пор, пока она не ударяется о ограничивающий объем и не начинает новую траекторию случайного блуждания. После нескольких таких отражений от границ глобулы (длина цепи, пропорциональная  $s^{1/2} > R \sim N^{1/3}$ ), объём становится заполненным не коррелирующими друг с другом цепями. Это значит, что после таких отражений, конец этой цепи может быть найден в любой точке объема, то есть:

$$R(s) \sim \begin{cases} s^{1/2} & \text{для } s \leq N^{2/3} \\ const & \text{для } s > N^{2/3} \end{cases} \quad (10)$$

Вероятность контактов:

$$P(s) \sim \begin{cases} s^{-3/2} & \text{для } s \leq N^{3/2} \\ const & \text{для } s > N^{3/2} \end{cases} \quad (11)$$

(Mirny L., 2011)

### *Фрактальная (смятая) глобула.*

Для достаточно длинного полимера большинство конформаций равновесной глобулы будет содержать очень большое число узлов, так что их количество может быть сравнимо с числом мономеров (Grosberg A., 1993). Но такая запутанная система хроматина вряд ли может доминировать в нативном состоянии функционирующего биополимера, так как узлы будут очень сильно уменьшать его способность отвечать на биохимические воздействия. Глобулярные белки, даже с четвертичной структурой, не имеют узлов. Конечно комплекс ДНК намного более сложный, чем белковая глобула, ввиду очень большого числа звеньев цепи. Однако, те же заключения можно сделать и для ДНК, так как если число узлов будет пропорционально числу звеньев, то структура становится кинетически замороженной, из-за чего многие мономерные единицы полимера будут вне доступности каких-либо биологических систем, вовлеченных в ДНК процессинг. *Поэтому, предположили, что ДНК глобула должна быть без узлов.* Это заключение сделано с учетом существования топоизомераз и других белков, способных разрезать ДНК, так как из-за малого размера они не могут распознать глобулярную упаковку ДНК, а следовательно, и значительно уменьшить число узлов.

Для достаточно длинного полимера, запрет на образование узлов ведет к сложной самоподобной структуре, фрактальной глобуле. При её образовании получаются 'складки' полимера увеличивающейся величины. (Grosberg A., 1993; Liberman-Aiden E. et al., 2009). Небольшие складки укладываются, становясь мономерами для новых складок большего размера и так далее. Поэтому эта структура обладает самоподобием. Эти складки полимера образуются в результате того, что каждая достаточно длинная цепь испытывает пространственные ограничения со стороны других цепей этого полимера и поэтому 'складывается'. Размер глобулы:

$$R \sim N^{1/3} \quad (12)$$

Размер участка цепи:

$$R(s) \sim s^{1/3} \quad (13)$$

Это сильно отличает фрактальную глобулу от равновесной, для которой справедлива формула (10).

Вероятность контактов для фрактальной глобулы трудно вычислить аналитически, поэтому она была получена симуляцией полимера (Mirny L., 2011). В результате:

$$P(s) \sim s^{-1} \quad (14)$$

Размерность фрактальной глобулы 3, в то время как для идеальной цепи фрактальная размерность 2.

Таким образом, модель фрактальной глобулы в этих экспериментах подтверждается экспериментально 1) зависимостью  $s^{-1}$  для вероятности контактов между участками ДНК на длинах до 10 Мб, согласно формуле (14) (Lieberman-Aiden E. et al., 2009), 2) вероятность контактов  $P(s)$  не выходит на уровень постоянной величины, как было бы в случае равновесной глобулы, согласно формуле (11). (Mirny L., 2011)

### **1.10 Фракталы, диффузия частиц.**

Структурную информацию о организации хроматина можно получить также из экспериментов по диффузии, так как ядерные белки диффундируют во внутрехроматиновом пространстве и их движения ограничены хроматиновыми фибриллами.

Диффузия частиц в растворителе подчиняется Броуновскому движению и её среднеквадратичное смещение подчиняется закону:

$$\langle r^2 \rangle \sim Dt \quad (15)$$

где  $D$  — коэффициент диффузии, зависящий от свойств самой частицы и окружающей среды. Если среднеквадратичное смещение линейно от времени, то это называется нормальной диффузией.

В общем случае:

$$\langle r^2 \rangle \sim D_\gamma t^\gamma \quad (16)$$

$D_\gamma$  — аномальный коэффициент диффузии,  $\gamma$  — называется аномальным показателем экспоненты. Если  $\gamma \neq 1$ , то диффузия называется аномальной. В случае  $\gamma < 1$ , процесс называется суб-диффузией, в случае  $\gamma > 1$  - супер-диффузией. Супер-диффузия наблюдается в потоках, или при активном транспорте. Суб-диффузия наблюдается, в частности, в фрактальном окружении.

При исследовании диффузии методом флуоресцентной корреляционной спектроскопии (FCS), использовали мультимеры GFP (Bancaud A., 2009), состоящие из



1,2,5,10 единиц GFP. Все мультимеры подчинялись суб-диффузионному поведению. При построении регрессионной кривой для корреляционной функции было замечено, что аномальный показатель экспоненты не зависит от размера GFP мультимера. Коэффициент диффузии также оказался одинаков для всех размеров мультимера. Такие результаты были получены при исследовании диффузии в эухроматине и гетерохроматине, в то время как диффузионные свойства оказались зависимыми от размера GFP в ядрышках, в которых хроматин не является основным структурным компонентом.

Далее были проведены исследования диффузии с большей точностью для квантовых точек. Поведение квантовых точек также описывалось суб-диффузионной моделью, при этом аномальный показатель экспоненты оказался таким же, как и для мультимеров GFP. Также оказалось, что при смещении точки в течении большего 20 мкс времени, гистограмма смещения хорошо описывалась моделью нормальной диффузии, или моделью случайных блужданий. Это предполагает, что хроматин предоставляет случайные препятствия для частиц на размерах, больших 100 нм, то есть среднего расстояния смещения квантовой точки за это время. При анализе смещения точки за время, меньшее 20 мкс, модель случайных блужданий не могла описать гистограмму смещения, что говорит о том, что на размерах до 100 нм хроматин организован не случайным образом. Такие отклонения от нормальной диффузии схожи с предсказаниями симуляции движения частицы в фрактальном окружении (Vancsaud A. et al., 2009). Фрактальность подтверждается также наблюдениями независимости показателей аномальной диффузии от размера диффундирующих частиц. Фрактальные структуры не имеют характерных размеров, поэтому диффундирующие молекулы будут встречать одинаковые препятствия, независимо от их размера, что приводит к не меняющимся показателям аномальной диффузии.

В данном исследовании диффузии частиц в хроматине также были получены показатели фрактальности нуклеоплазмы. Так, по изучению движения квантовой точки, было получено значение фрактальной размерности 2.2 для нуклеоплазмы в гетерохроматине и 2.6 для нуклеоплазмы в эухроматине. Таким образом, структура хроматина согласуется с фрактальной моделью на размерах до 100 нм, что приводит к не зависимым от размера частиц препятствиям для большинства белков или нуклеопротеиновых комплексов, диффундирующих в ядре.

Структура хроматина, предполагается, состоит из динамических пор разных размеров. Эти поры могут существовать вследствие внутренней динамики на нуклеосомальном уровне, образования хроматиновых петель, нестабильности ДНК фибриллы. Эта структура предполагается фрактальной, в соответствии с известной фрактальной структурой полимеров в растворе. Таким образом, структура хроматина не может быть описана с помощью пор одного размера, но может быть описана с помощью фрактальной размерности. Размерность меняется от 2 до 3. Размерность 2 соответствует гладкой и регулярной поверхности, заполняющей небольшую часть занимаемого объёма, тогда как размерность, близкая к 3, характеризует фрактал, который почти полностью заполняет занимаемый объём. Полученная размерность в эухроматине 2.6 и в гетерохроматине 2.2, может говорить о том, что эухроматин предоставляет большую поверхность, доступную для ядерных белков. То есть гетерохроматин более компактен: морфология нуклеоплазмы в гетерохроматине гладкая и имеет мало ветвей, оставляя меньше поверхности хроматина для сканирования ядерными белками. Нуклеоплазма эухроматина обладает большей фрактальной размерностью, занимая больше объёма, давая доступ к большей части хроматина. (Vancaud A., 2009)

Интересно, что сравнение показателей экспоненты аномальной диффузии и фрактальной размерности дает предположения о механизме нахождения сайтов специфичности белками. Когда  $\gamma$  больше  $f$ , диффузия становится компактной, что значит, что белки часто посещают места, находящиеся рядом с их местом положения. В обратном случае  $\gamma$  меньше  $f$  время достижения цели не зависит от расстояния до начального положения белка, так что диффундирующие молекулы быстро посещают большее число сайтов. В соответствии со значениями экспоненты аномальной диффузии и фрактальной размерностью, в гетерохроматине ожидается компактная диффузия. Поэтому, белки, взаимодействующие с хроматином, будут в гетерохроматине связываться со всеми доступными сайтами связывания, что объясняет долгое пребывание ядерных белков в гетерохроматине. (Vancaud A., 2009) Также, такое усиление связывания, может участвовать в поддержании состояния гетерохроматина: специфические модификации гистонов необходимы для поддержания этого компартмента, и компактная диффузия может обеспечить усиление этих модификаций. Было предположено, что локальное изменение

фрактальной организации хроматина может повлиять на локальное привлечение белков, это оказывает влияние на репрессию или активацию этого участка хроматина. (Bancaud A., 2012)

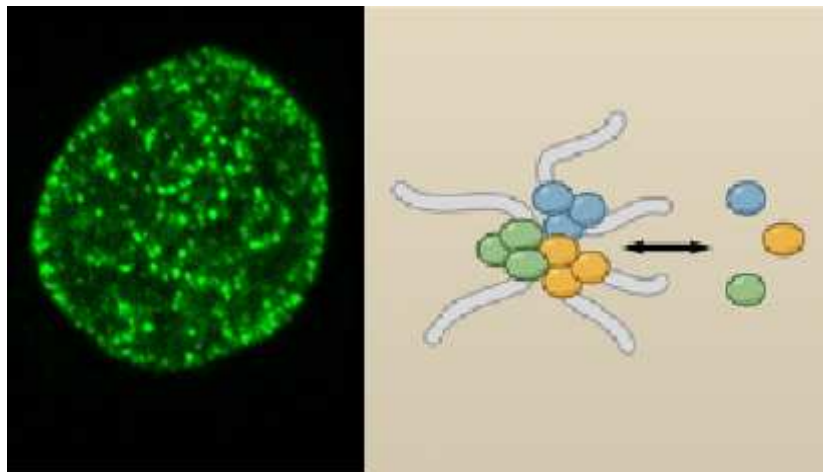
### **1.11 Теория макромолекулярного группирования.**

Структуры ядра, такие как гетерохроматин, который находится в конденсированном состоянии в течении клеточного цикла, эухроматин, находящийся в деконденсированном состоянии в течении интерфазы, стабильны долгое время. Несмотря на эту стабильность, ядерные компартменты очень динамичны на молекулярном уровне. Для разрешения этого вопроса, было предположено, что ядерные компоненты являются самоорганизующимися, образующимися в результате кооперативных стереоспецифических быстрых взаимодействий их компонентов. (Misteli T., 2005) Однако, это сложно проверить *in vivo*. Альтернативной моделью, возможно, не исключающую первую, является теория макромолекулярного группирования, как главной движущей силой в самоорганизации ядерных компартментов. Классически, теорию молекулярного группирования применяют для описания биофизических и биохимических свойств растворов с большим числом растворенных частиц, которые уменьшают свободный доступный объём стерическими взаимодействиями. Эта теория может быть применена для описания клеток, так как они содержат высокие концентрации биологических макромолекул. *In vitro* было показано, что молекулярное группирование сильно меняет биофизические и химические свойства белков. Во-первых, это приводит к уменьшению свободного объёма, то есть, объём, занимаемый растворенными молекулами не доступен для других белков, во-вторых, группирование снижает диффузию белков: частицы действуют как препятствия, специфически замедляя молекулярное движение. В-третьих, молекулярное группирование приводит к сдвигу реакций связывания в сторону связанных состояний. (Bancaud A. et al., 2009) Таким образом, молекулярное группирование определяет поведение ядерных белков. Так как механизм требует существования плотных компартментов, молекулярное группирование не замещает стереоспецифические взаимодействия, но оно может поддерживать такие взаимодействия локально. Поэтому, предполагается, что молекулярное группирование стабилизирует самоорганизацию ядерных компартментов. Компартмент начинает формироваться под

действием стереоспецифических взаимодействий, результирующие молекулярное группирование будет поддерживать структуру за счет смещения химического равновесия реакций в сторону связанных состояний. Это усиление молекулярных взаимодействий независимо от каких-либо биологических функций или структур взаимодействующих молекул. Оно может поддерживать существование компартментов при использовании минимальной энергии и не нуждается в отдельных структурах, ограничивающих компартмент, таких как мембраны. (Vancaud A., 2009)

### **1.12 Сайты репликации ДНК.**

ДНК репликация происходит в определенных сайтах — вилках репликации, или в пространстве — репликационных центрах.



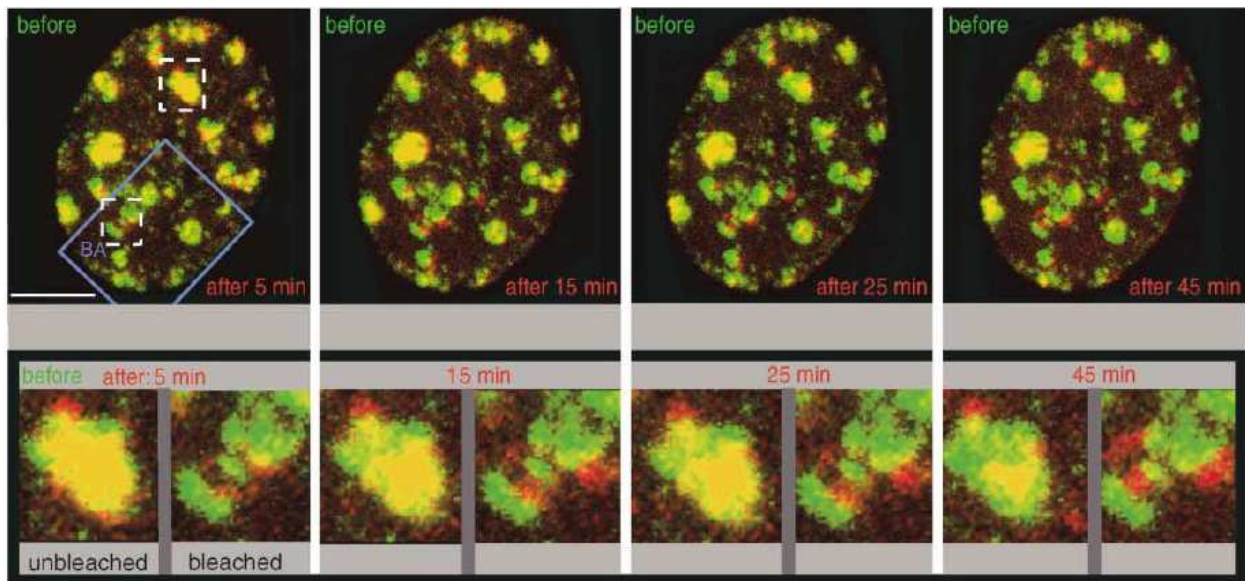
*Рис.7: Компартамелизация репликации: репликационные сайты, флуоресцентно меченые BrdU (Misteli T., 2008)*

Эти центры (Рис.7) ассоциированы со многими вилками репликации и содержат всю необходимую машинерию, включая дополнительные факторы, вовлеченные в сборку хроматина и регуляцию клеточного цикла. Репликационные центры формируются привлечением репликационных факторов из числа свободных, диффундирующих в нуклеоплазме в течении S фазы. Сборка происходит стохастическим методом из одной субъединицы. После сборки, некоторые компоненты репликационной машины, включая белок PCNA, стабильно встроены на протяжении всего репликационного цикла, другие

компоненты могут быстро диссоциировать и замещаться факторами из нуклеоплазмы. (Misteli T., 2008) Разница в во времени пребывания факторов в комплексе скорее всего отражает специфичные временные требования к каждому фактору в репликационной машине. Образование и поддержание репликационных центров полностью контролируется исключительно репликационным процессом, что требует того, чтобы репликационные центры были самоорганизующимися структурами. (Misteli T., 2008)

Высокая динамическая природа репликационных центров необходима для правильного функционирования, так как пластичность этих сайтов требуется для прохождения репликации вдоль хромосомы. Было показано, что репликационные центры существуют только несколько минут, потом исчезают. (Sporbert A. et al., 2002) Новые центры затем вновь создаются *de novo* из пула несвязанных факторов. Интересно, что новые центры формируются точно рядом с местом предыдущих, продолжая репликацию.

Интересным наблюдением является то, что при репликации ДНК происходит последовательная активация ориджинов репликации в клетках высших. Каждый ориджин, видимо, имеет своё специфическое и повторяющееся в поколениях время активации в течении S фазы, которое может меняться в течении развития вместе с изменением транскрипционной активности. Так как ранние ориджины в основном в транскрипционно активных участках ДНК с открытой структурой хроматина, то возможно, состояние хроматина отвечает за то, что они первые реплицируются в течении S фазы. Изучая восстановление флюоресценции белка GFP-PCNA в репликационных сайтах после выгорания флюорофора (Sporbert A. et al., 2002), не было обнаружено никакого опознаваемого восстановления флюоресценции, а скорее наблюдалась сборка *de novo* реплисом на соседних участках. (Рис.8)



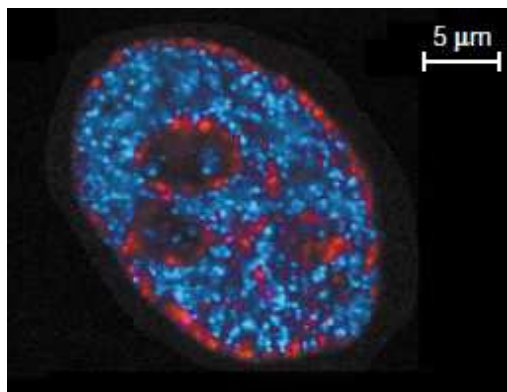
**Рис.8:** Пространственная организация, меченных системой GFP-PCNA, репликационных центров до и после импульсного выжигания флюорофора в поздней S фазе. Репликационные факторы не напрямую переходят на вновь активированный репликон. Конфокальные проекции до и после фото-выжигания были наложены друг на друга, при этом зелёный цвет отражает изображение до выжигания, красный цвет — после выжигания флюорофора в разные промежутки времени. Серия участков в и вне выжженной территории показана с большим увеличением. Возникновение флюоресценции происходит не в изначальном центре, а в соседних участках. В не выжженном участке наблюдается тот же эффект, вместе с уменьшением флюоресценции в репликационном центре до и после фото-выжигания, что предполагает что флюоресцирующий GFP-PCNA, существующий в начале, медленно диссоциирует с изначальных репликационных сайтов. (Sporbert A. et al., 2002)

Так как восстановление флюоресценции наблюдалось рядом с местом выгорания флюорофора, репликационные факторы должны набираться из числа свободно диффундирующих в нуклеоплазме молекул GFP-PCNA. Поэтому, наблюдаемые небольшие сдвиги репликационных центров происходят не из-за локальных сдвигов репликационной машины, а в следствии новой сборки новых репликационных центров из нуклеоплазмы.

Факт того, что практически все вновь собранные центры репликации находятся рядом с предыдущими, говорит о связи текущей репликации и активации прилегающих ориджинов репликации. (A.Sporbert et al., 2002)

Важным фактором, усиливающим стохастическую сборку комплексов, является молекулярное группирование. Оценочная концентрация белков в ядре составляет 100-400 мг/мл. Молекулярное группирование сильно увеличивает эффективную концентрацию компонентов и уровень белок-белковых и белок-ДНК взаимодействий сильно увеличивается. Молекулярное группирование приводит к формированию динамических белковых агрегатов. Поэтому молекулярное группирование может быть движущей силой в формировании репликационных фабрик. (Misteli T., 2007)

Мечение ДНК тимидиновыми аналогами дает информацию об агрегировании хроматина при синтезе ДНК в репликационных центрах. Каждый репликационный центр содержит кластер репликаонов вместе с репликационными факторами и содержит около 1 Мб ДНК. В течении S фазы, репликационная машина связана с репликационным локусом на время, необходимое для его репликации. Интересным фактом является то, что меченый репликационный локус, то есть участок ДНК около 1 Мб, остается видимым после завершения репликации и наблюдается в течении нескольких последующих клеточных циклов. (Рис.9)



**Рис.9:** Ранние и средние репликационные центры. Ядра SH-EP N14 нейробластомы, фиксированные через 20 часов после двухцветного мечения ДНК Су3- и Су5-связанными нуклеотидами в ранних (голубой цвет) и средних по времени (красный цвет) репликационных центрах. Показанная клетка является дочерней клеткой к крашенной после одного

*клеточного деления. Эксперимент показывает, что структура ранних и средних по времени репликационных центров сохраняется из одного клеточного цикла к другому. (Cremer T., Cremer C., 2001)*

Это говорит о том, что эти домены представляют собой высокий уровень хромосомной организации, который может включать ряд факторов для репликации, транскрипции и репарации, стабильный в течении клеточного цикла. (Cremer C., 2001)

## **2. Материалы и методы.**

### **2.1 Конфокальная микроскопия.**

В работе снимки ядер клеток были получены на конфокальном флуоресцентном микроскопе Leica TCS SP5 (Leica, Germany), использовался стандартный объектив х63 с масляной иммерсией.

Конфокальный микроскоп обладает некоторыми особенностями по сравнению с обычным световым микроскопом, позволяющими получать высокое разрешение вдоль фокальной оси (глубине изображения), убирая при этом лучи света из не фокальных плоскостей, что дает возможность получать изображения срезов с образцов. Когда флуоресцирующий образец изучают в обычном световом микроскопе, флуоресцентные лучи из областей, расположенных рядом с изучаемой областью, также проходят в объектив, ухудшая при этом разрешение в рассматриваемой области.



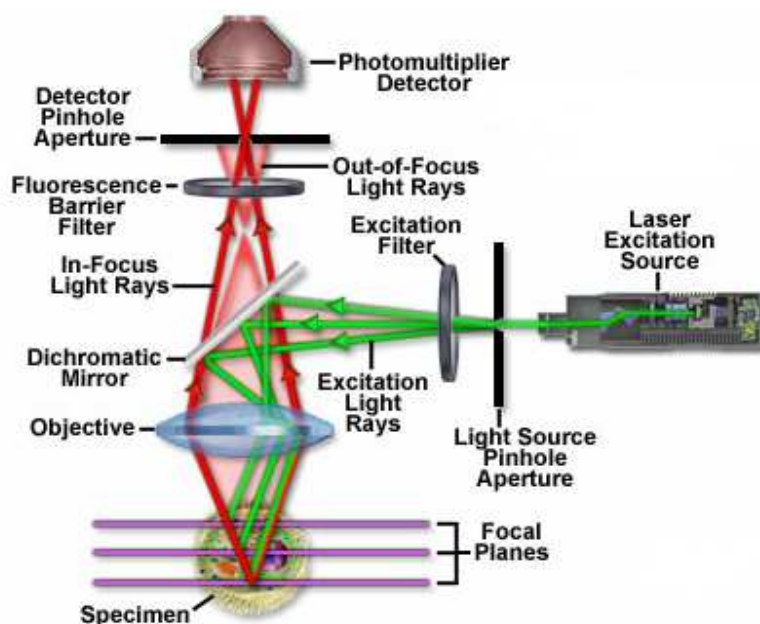
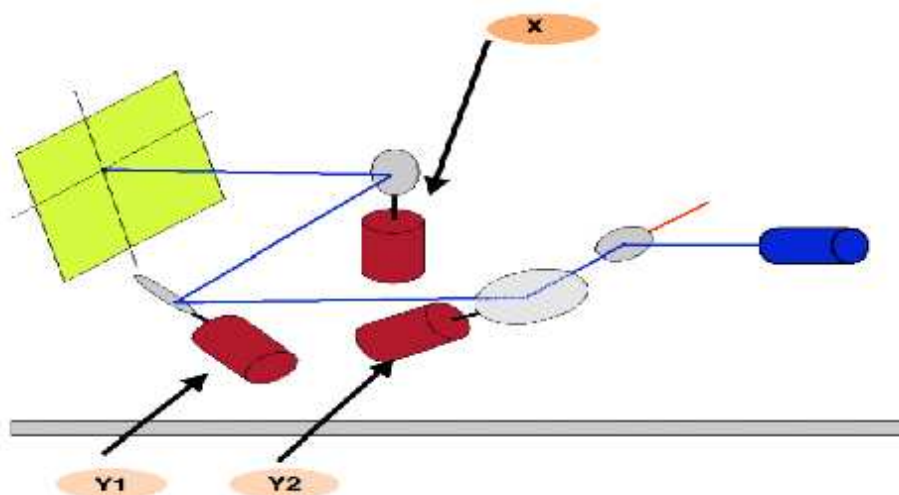


Рис.10: Схема принципа работы конфокального микроскопа. Благодаря использованию конфокальной диафрагмы, лучи, идущие не из фокальной плоскости, не попадают на детектор.

На Рис.10 схематично изображен принцип конфокальной микроскопии. Возбуждающий пучок света с лазера проходит через диафрагму (*pinhole*), расположенную в соответствии с фокальной плоскостью, луч отражается дихроичным зеркалом и попадает на образец, флуоресцентный свет от образца проходит через дихроичное зеркало и через еще одну диафрагму (*pinhole*) попадает на детектор. Лучи от не фокальных плоскостей будут не в фокусе с отверстием диафрагмы, поэтому не попадают на детектор.

В традиционном световом микроскопе, образец облучается не когерентными пучками света от лампы и флуоресценция образца наблюдается через окуляры. В конфокальном микроскопе иной принцип. Изображение получается путем возбуждения образца лазерным светом, флуоресцирующий образец сканируется сканирующим устройством, полученный сигнал попадает на детектор, обычно фотоумножитель. Сканирующее устройство состоит из набора световых фильтров, дихроичных зеркал и сканирующих зеркал, управляемых

гальваническими моторами. Изображение получается сканированием сфокусированного луча вдоль рассматриваемой области с помощью подвижных зеркал, осуществляющих сканирование по  $x$  и  $y$  координатам. (Рис.11)



*Рис.11: Принцип работы сканирующих зеркал. С помощью изменения наклона двух (часто используют три для увеличения скорости) зеркал, отражающих луч от лазера, можно сканировать образец вдоль оси  $x$  и  $y$ .*

В используемом микроскопе сканирование производится с помощью одного зеркала по оси  $x$  и двух зеркал по оси  $y$  ( $y1$  и  $y2$ ), это позволяет увеличить скорость сканирования.

Таким образом, доступно разрешение до 250 нм в фокальной плоскости ( $xy$ ) и до 0,5 мкм вдоль фокальной оси  $z$ . Учитывая, что толщина наблюдаемых ядер клеток была не меньше 3 мкм, то для этих ядер можно получить пространственное изображение.

## **2.2 Приготовление клеток.**

### *Мечение сайтов репликации ДНК.*

К клеткам (HeLa, лимфоциты, глиома, карцинома, фибробласты) в логарифмической фазе при 37°C добавлялся BrdU (0,1μM на 10 мин.). Клетки суспензировались раствором версена (2-3мин.), отмывались один раз в PBS (натрий-фосфатный буфер).

Фиксация клеток спиртом проводилась в два последовательных этапа: 1) клетки перфорировали водой, добавляли несколько капель спирта и откручивали, 2) в осадок снова добавляли несколько капель спирта. Второй пункт проводили не меньше двух раз. Для расплетения нитей к клеткам добавляли 1-2 мл HCl на 1 час. Далее, для восстановления pH клетки промывались 3-4 раза по 15 минут в PBS.

#### *Иммунофлуоресцентное окрашивание.*

Для блокирования не специфических сайтов связывания ДНК, клетки инкубировались 15 минут в 3% растворе БСА (бычий сывороточный альбумин). В качестве первых антител использовали коммерческие мышинные моноклональные антитела к BrdU. Антитела добавлялись в разведении 1:300 (в 1% БСА на 17 часов при 4°C). Образцы промывали 3 раза в 0,03 % БСА в PBS.

Далее клетки обрабатывались вторыми антителами, специфичными к первым антителам. Вторые антитела были мечены флуорофором Alexa 488 (в разведении 1:1000 на 1 час при 22°C).

Образцы промывали 3-5 раз в 0,03 % БСА в PBS. После окрашивания препараты заключали в раствор VECTASHIELD, препятствующий выгоранию флуоресценции.

#### *Система PCNA-GFP.*

Использовалась культура клеток человеческой карциномы печени. Был отобран клон после электропорации плазмидой, содержащей ген связанных белков PCNA и GFP. Выращивались в среде DMEM/F12 с 10% сывороткой крови. Снимали клетки раствором версен-трипсин в отношении 1:1. Далее 3 раза промывались раствором PBS. Фиксация клеток производилась формальдегидом в течении 10 минут при 4 градусах Цельсия. После фиксации промывали клетки 3 раза раствором PBS. Для измерений переводили клетки в глицерин.

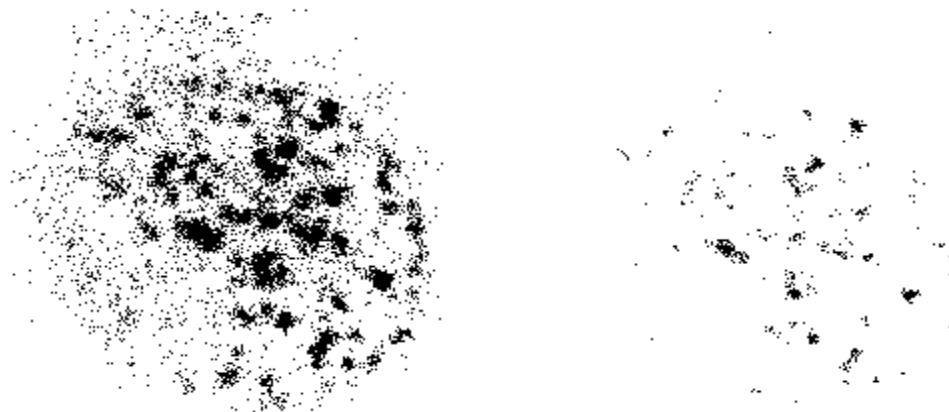
### **2.3 Обработка конфокальных изображений.**

На конфокальном микроскопе получали изображения ядер клеток — набор срезов ядер, в большинстве случаев, сделанные с шагом 0,29 мкм. Полученный набор обрабатывался на программном обеспечении ImageJ 1,44p (Wayne Rasband, USA). В программе использовались дополнительные плагины:

- 1) Iterative deconvolve 3D (*Dougherty, R.P., "Extensions of DAMAS and benefits and limitations of deconvolution in beamforming", AIAA Paper 2005-2961, May, 2005*)
- 2) PSF Generator (*H. Kirshner, F. Aguet, D. Sage, M. Unser, "[3-D PSF Fitting for Fluorescence Microscopy: Implementation and Localization Application](#)," Journal of Microscopy, vol. 249, no. 1, pp. 13-25, January 2013*)
- 3) 3D Cross Correlation (*E. Iannuccelli, F. Mompert, J. Gellin, Y. Lahbib, M. Yerle et T. Boudier. NEMO: a tool for analyzing gene and chromosome territory distributions from 3D-FISH experiments. Bioinformatics Jan. 14, 2010. )*
- 4) Radial Profile Angle (*Philippe Carl*).
- 5) Volumest (*Merzin, Markko. "Applying stereological method in radiology. Volume measurement." Bachelor's thesis. University of Tartu. 2008.*)

### **Построение функции парных расстояний.**

В бакалаврской работе функция парных расстояний измерялась на прямую. Убирался шум изображения. Это происходило путем выбора порога чувствительности. В пикселях, интенсивность которых была ниже порога, интенсивность приравнивалась нулю, оставались ненулевыми только те пиксели, интенсивность в которых была выше порога чувствительности.



*Рис.12: Отсечка шума происходила выбором порога чувствительности, значение всех пикселей, интенсивность в которых ниже порога, приравнивалась нулю.*

На Рис.12 приведен пример такой обработки. При этом видно, что часть полезного сигнала утрачивается. Было показано (бакалаврская работа), что при понижении порога чувствительности функция распределения по расстояниям заметно не менялась, но время обсчета увеличивалось заметно.

Чтобы увеличить точность метода обработки и свести к минимуму возможность искажения информации, был предложен иной метод обработки конфокальных трёхмерных изображений.

В двухмерных снимках, составляющих трёхмерное изображение, убиралась ненужная информация, то есть шум. Это производилось с помощью алгоритма катящегося шара. Он заключается в следующем: двухмерное изображение представляется трёхмерным, где третья координата — интенсивность, таким образом создается некая поверхность в пространстве. Далее, шар заданного радиуса 'катится' по внутренней стороне этой поверхности. То значение интенсивности, которое соответствует нижней части этого шара при его качении по поверхности, и есть порог чувствительности. Этот алгоритм осуществлен в встроенной функции программы Imagej — Subtract background.

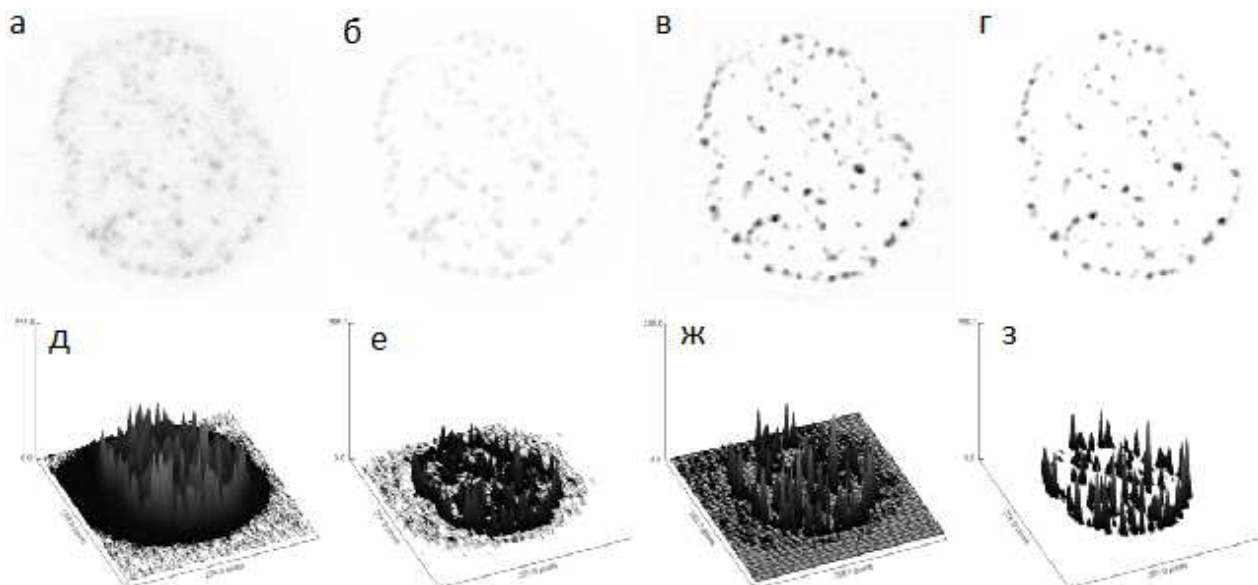


Рис.13: Процесс обработки изображений ядер клеток с целью уменьшения шума. Из исходного изображения (а) вычитался шум методом катящегося шара, полученное изображение (б) подвергалось трехмерной деконволюции (в), затем вычитался равномерный плоский фон после деконволюции (г). На псевдо-трёхмерных изображениях снизу (д,е,ж,з) показаны поверхности интенсивности на соответствующих стадиях обработки.

Эта стадия отражена на рис.13б,е. После отсечки шума, проводилась трёхмерная деконволюция плагином Iterative deconvolve 3D. После чего проводилось вычитание равномерного фона, конечный результат отображен на рис.13г,з.

Далее считалась автокорреляционная функция полученного трёхмерного изображения, используя плагин 3D Cross Correlation. Получившуюся трехмерную автокорреляционную функцию усредняли по радиусу с помощью плагина Radial Profile Angle и обработки в программе Microsoft Excel. При этом усреднении корреляционная функция умножалась на  $r^2$ , что приводит к функции парных расстояний.

Усреднённая по углам автокорреляционная функция, домноженная на  $r^2$ , называется функцией парных расстояний:

$$\gamma(r) = \frac{1}{4\pi} \int_0^{4\pi} P(\vec{r}) d\omega \quad (17)$$

$$p(r) = r^2 \gamma(r) \quad (18)$$

Эта функция количественно описывает набор отрезков, соединяющих элементы в объеме.

(Свергун Д.И., Фейгин Л.А., 1986)

**Сравнение результатов двух методов получения функции парных расстояний.**

Для использования нового метода получения парной функции, необходимо было подтвердить, что она дает те же результаты, что и непосредственно сосчитанная функция парных расстояний при хороших условиях, то есть при достаточном количестве точек и невысоком уровне шума.

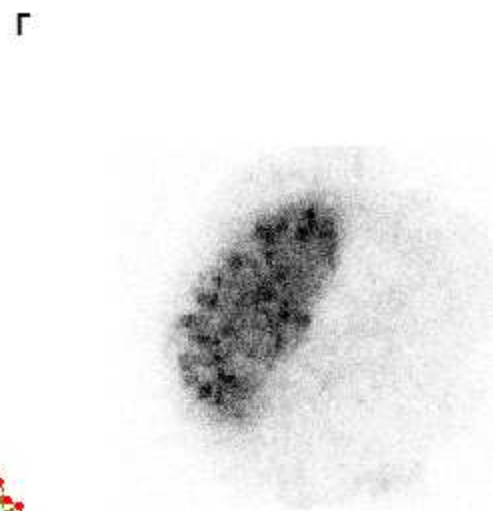
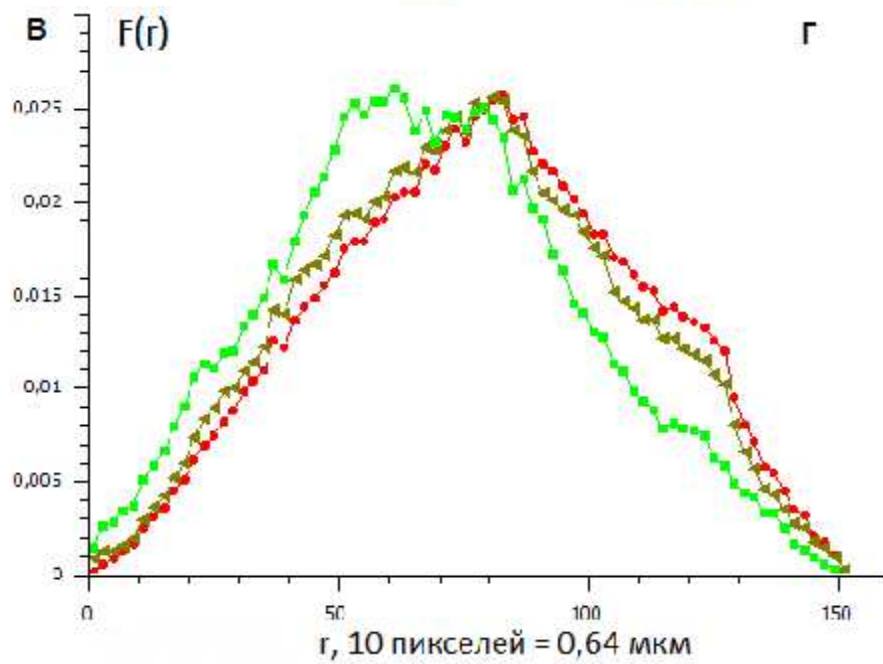
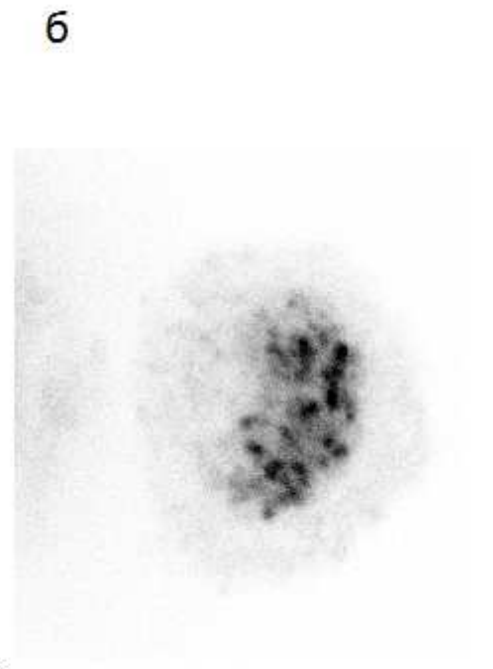
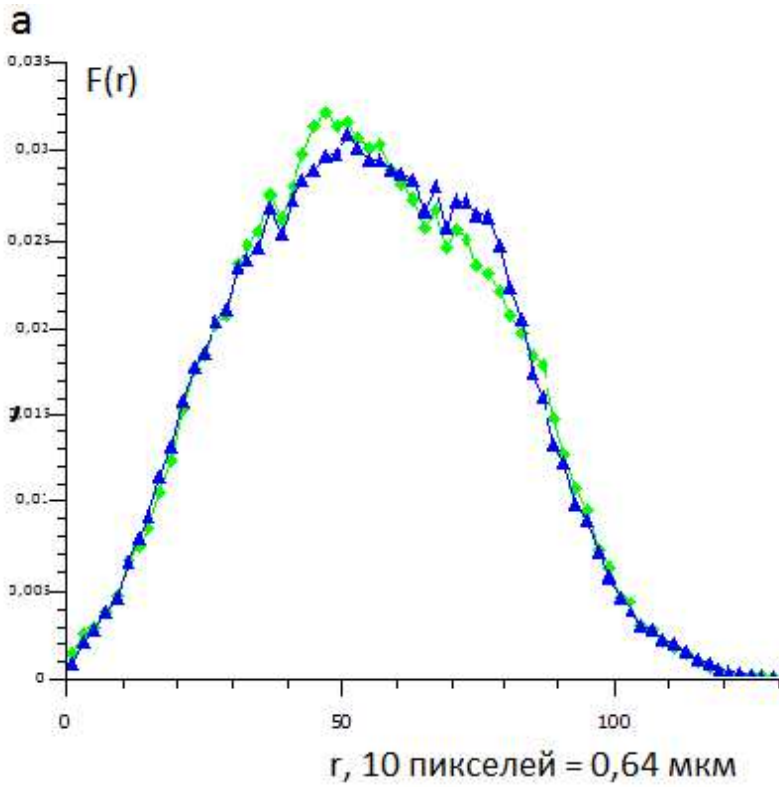


Рис.14: Сравнение методов получения функции парных расстояний (а,в) для ядер клеток фибробластов (б,г). а) Функция парных расстояний, полученная методом непосредственного измерения расстояний (зелёный цвет, ромб) или через расчет автокорреляционной функции (синий цвет, треугольник). б) Точки репликации хорошо



различимы. в) Функция парных расстояний, полученная методом непосредственного измерения расстояний (бежевый цвет, треугольник) и новым методом (красный цвет, круг) совпадают. При меньшем числе точек (зелёный цвет, квадрат)(г) первый метод дает отклонения в значениях функции. г) На изображении, центры репликации менее выражены, чем в случае (б).

На рис.14а видно, что обе функции практически совпадают для данных ядер. Однако, при уменьшении количества хорошо различимых центров репликации первый метод дает отклонения в значениях функции парных расстояний. При этом первый метод на начальной участке имеет более выраженную зависимость от размера детектируемого центра репликации.

### **Измерение объема ядер клеток.**

Объем ядер клеток измерялся с помощью плагина Volumest.

### **2.4 Приготовление клеток для измерений МУРН.**

Для эксперимента МУРН использовались клетки карциномы шейки матки человека – HeLa и глиомы крысы (С6), которые находятся в фазе G0 клеточного цикла. Клетки HeLa и С6 выращивались в DMEM культуральной среде, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки. После перевода в суспензию в изотоничном фосфатном буфере pH 7,4, ядра приготавливали путем лизиса мембран неионным детергентом Тритон X-100 (0.2 % раствор в фосфатном буфере pH 7,4). В результате 5 минут обработки этим детергентом происходило растворение цитоплазматической и ядерной мембран. Выделенные ядра фиксировали обработкой 0.05 % раствором глутарового альдегида в течение 10 минут, после чего фиксатор отмывали центрифугированием в фосфатном буфере pH 7,8.

Контроль целостности и гомогенности ядер осуществляется на проточном цитофлуориметре Cell Lab Quanta Beckman Coulter на стандартном протоколе для анализа клеточного цикла, при этом фиксированные клетки окрашивались этидием бромидом 20 мкг/мл.

За сутки перед измерениями МУРН, препараты ядер клеток выдерживались в 99,5% D<sub>2</sub>O, осаждались центрифугированием при 3000 об/мин и снова переводились в 99,5% D<sub>2</sub>O.

Аналогичная процедура проводилась при вариации контраста для различного соотношения D<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O. Измерения проводились в буферном растворе при температуре 15<sup>o</sup>C.

Измерения кривых малоуглового рассеяния нейтронов в диапазоне рассеянных векторов от 10<sup>-1</sup> Å<sup>-1</sup> до 10<sup>-4</sup> Å<sup>-1</sup> с вариацией контраста проводятся на спектрометрах KWS-2 и KWS-3, расположенных на исследовательских пучках реактора FRM-II в Мюнхене (Германия). Данные, полученные на спектрометре KWS-2, измеряются при трех положениях детектора (2, 8 и 20 м.), причем в первых двух позициях длина волны нейтронов составляет 4 – 8 Å, а в третьей 8 – 12 Å. Данные с KWS-2 нормируются с использованием Lupolen™ стандарта с целью получения интенсивности рассеяния нейтронов в абсолютных единицах. Интенсивность рассеяния нейтронов с KWS-3 нормируется по участку перекрытия данных со спектрометром KWS-2. В области перекрытия данных зависимость интенсивности рассеяния от величины переданного вектора линеаризуется в двойных логарифмических координатах. При этом для KWS-3 используются данные в области  $Q = 2,24 \cdot 10^{-4} - 1,3 \cdot 10^{-3} \text{ \AA}^{-1}$ , а со стороны спектрометра KWS-2 используются данные от  $Q = 1,3 \cdot 10^{-3} - 0,25 \text{ \AA}^{-1}$ . Интенсивность рассеяния, даваемая спектрометром KWS-3 умножается на коэффициент, который бы давал совпадение кривых рассеяния при значении  $Q = 1,3 \cdot 10^{-3} \text{ \AA}^{-1}$ , что соответствует диапазону линейных размеров рассеивателя  $L = 2,5 \text{ нм} - 2,8 \text{ мкм}$ . Измерения кривых рассеяния проводилось при двух значениях содержания D<sub>2</sub>O в H<sub>2</sub>O - 99% и 40%. Кривые рассеяния, полученные при 40% D<sub>2</sub>O, характеризуют структуру нуклеиновой компоненты хроматина ядер (DNA+RNA).

## **2.5 Свойства функции парных расстояний.**

### *Нормировка.*

Функция парных расстояний нормировалась, как описано в бакалаврской работе. Нормировка проводилась с той целью, чтобы, независимо от вариации метода обработки и интенсивности возбуждающего света лазера, функция распределения парных расстояний для одного и того же распределения центров репликации в ядре, имела бы одинаковый вид. С этой целью, кривые нормируем так, чтобы вероятность нахождения всех пар расстояний

между  $N$  точками (центрами репликации) в пространстве, была бы равна единице, то есть нормируется на величину, равную интегралу функции на всем диапазоне размеров.

#### *Фрактальное распределение.*

Центры репликации распределены в ядре с определенной локальной плотностью. Их распределение можно охарактеризовать фрактальной размерностью Хаусдорфа. В том случае, если эта размерность не целочисленна и наблюдается масштабирование по степенному закону какой-либо характеристики этого распределения, то можно сказать, что это распределение фрактально.

Число точек  $n$  (центров репликации) зависит от размера системы:

$$n = \mu r^d \quad (19)$$

где  $d$  — фрактальная размерность распределения,  $r$  — расстояние между центрами внутри ядра,  $\mu$  — локальная величина, имеющая смысл пропорциональности между числом центров в определенном объеме и этим объемом, в случае не фрактального распределения это величина - плотность.

В бакалаврской работе было показано, что функция парных расстояний на начальном участке, где ещё не оказывает влияние форма ядра, имеет вид:

$$F(r_i) \approx \frac{d}{N} \mu r_i^{d-1} \Delta r \quad (20)$$

где  $N$  — полное число центров репликации в ядре.

Таким образом, определив зависимость функции распределения от расстояния между центрами, можно определить показатель степени  $(d-1)$  и саму размерность распределения  $d$ . Формула (20) справедлива для распределения точек в пространстве любой размерности (целой и дробной) на начальном участке, то есть имеет наиболее общий вид. В случае трехмерного распределения получается квадратичная зависимость, в двумерном распределении получаем линейную зависимость от радиуса.

#### *Зависимость распределения от размера объекта.*

В случае, если размерность системы центров репликации сохраняется во всем диапазоне размеров вплоть до размеров ядра, зависимость (19) будет верна и для всего ансамбля центров репликации, то есть:

$$N \sim R^d \quad (21)$$

где  $R$  - радиус ядра. В этом случае из формулы (20):

$$F(r_i) \propto \frac{d}{R^d} \mu r_i^{d-1} \Delta r \quad (22)$$

Из этого следует, что для объектов с одинаковой плотностью  $\mu$  амплитуда функции распределения в малых  $r_i$  обратно пропорциональна размеру объекта в степени  $d$ .

### **3. Результаты и обсуждение.**

#### **3.1 Фрактальные свойства множества точек репликации на основе анализа функции парных расстояний.**

Распределение репликационных центров исследовалось в клетках с помощью встроенного в эти сайты BrdU. Функции парных расстояний для распределения центров репликации были построены для клеток аденокарциномы HeLa\*, глиомы человека\*, лимфоцитов крысы\*, фибробластов и карциномы печени человека.

В бакалаврской работе было замечено, что, в особенности, для клеток HeLa, функция парных расстояний имеет начальный участок, близкий к линейному (рис.15). На основании этого наблюдения в бакалаврской работе был сделан вывод о том, что на малых размерах (до 2 мкм) функция парных расстояний описывается размерностью, близкой к 2.

---

\* часть материалов бакалаврской работы

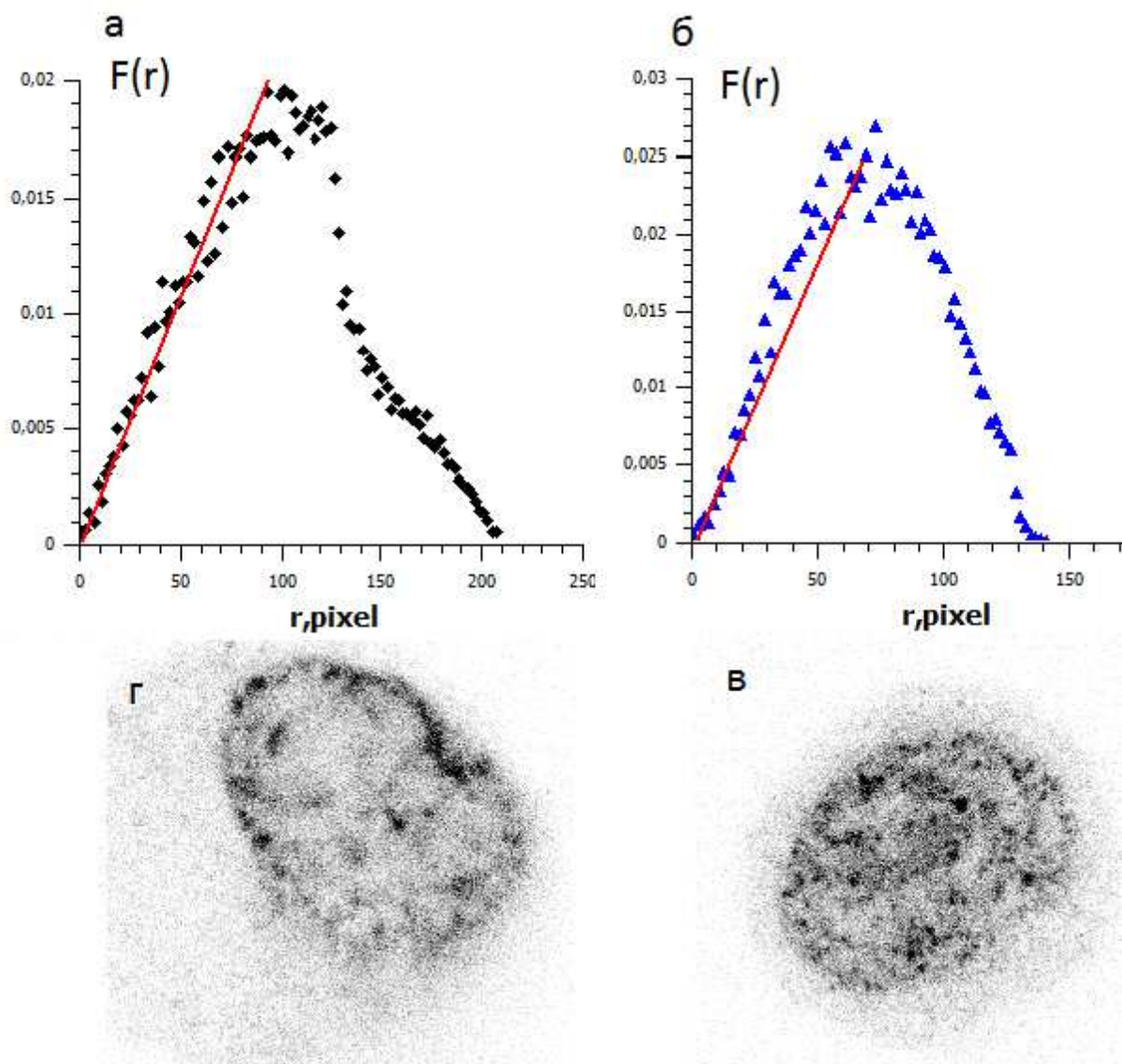


Рис.15: Функция парных расстояний для ядер клеток HeLa. Отмечен линейный начальный участок функций. 10 пикселей равны 0,64 мкм. Представлены ядра с средними по времени центрами репликации (г,а) и ранними центрами репликации (в,б).

Другим исследуемым свойством распределения точек репликации являлась масштабируемость амплитуды функции распределения по расстояниям при изменении объема ядра. Было показано (бакалаврская работа), что, если набор точек фрактален, и размерность  $d$  и коэффициент  $\mu$  в формуле (22) не зависят от радиуса, то зависимость

амплитуды функции распределения от объема носит степенной характер, где показатель степени характеризует фрактальную размерность пространственного распределения на больших размерах. Было показано (бакалаврская работа), что амплитуда функции распределения точек репликации по расстояниям на начальном участке имеет степенную зависимость от объема ядра для всех трех исследуемых типов клеток (Рис.16).

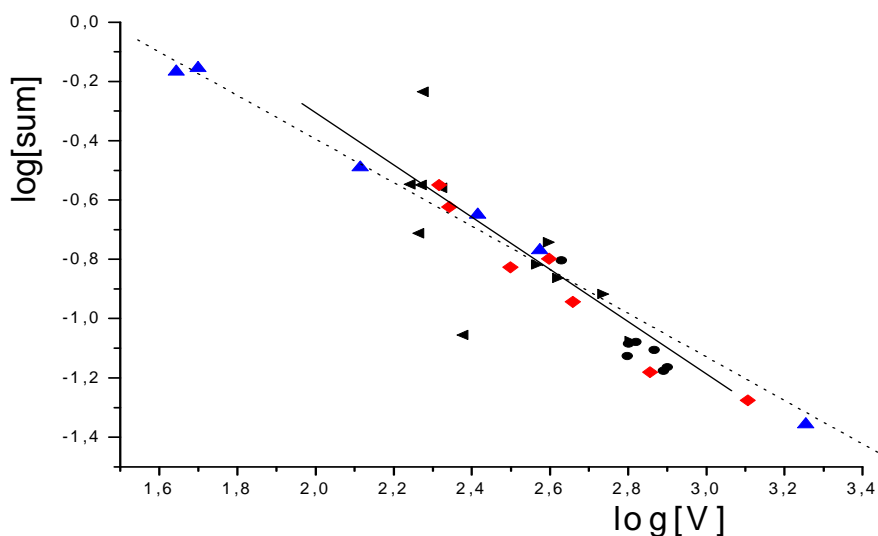


Рис.16: Зависимость функции парных расстояний от размера ядра в клетках HeLa (черные), лимфоцитов (синие) и клеток глиомы (красные) в двойной логарифмической шкале. Наклон регрессионной прямой для клеток HeLa (сплошная линия) равен минус  $0,9 \pm 0,2$  (бакалаврская работа).

### **3.2 Распределение белка PCNA и репликационных центров.**

Визуализация репликационных центров с помощью BrdU происходит после фиксации клеток. Для получения информации о распределении локусов репликации *in vivo* была использована линия клеток карциномы печени со встроенной плазмидой,

экспрессирующей белок PCNA, связанный с зелёным флюоресцентным белком. Для этой системы методом конфокальной микроскопии измерялось распределение белка PCNA. В отдельной серии измерений точки репликации регистрировались стандартным методом с использованием BrdU и флюоресцентных антител.

Результаты измерений показали, что белок PCNA и точки репликации, меченые антителами к BrDU имеют разную зависимость амплитуды начального участка функции распределения по расстояниям от объема (рис.17). Коэффициенты линейной регрессии в двойных логарифмических координатах для двух методов заметно различались, при этом коэффициент детерминации был хуже для данных по белку PCNA, что связано с большим разбросом данных для белка. Вероятно, белок PCNA локализуется в ядре не только в репликационных центрах, что оказывает влияние на функцию парных расстояний.

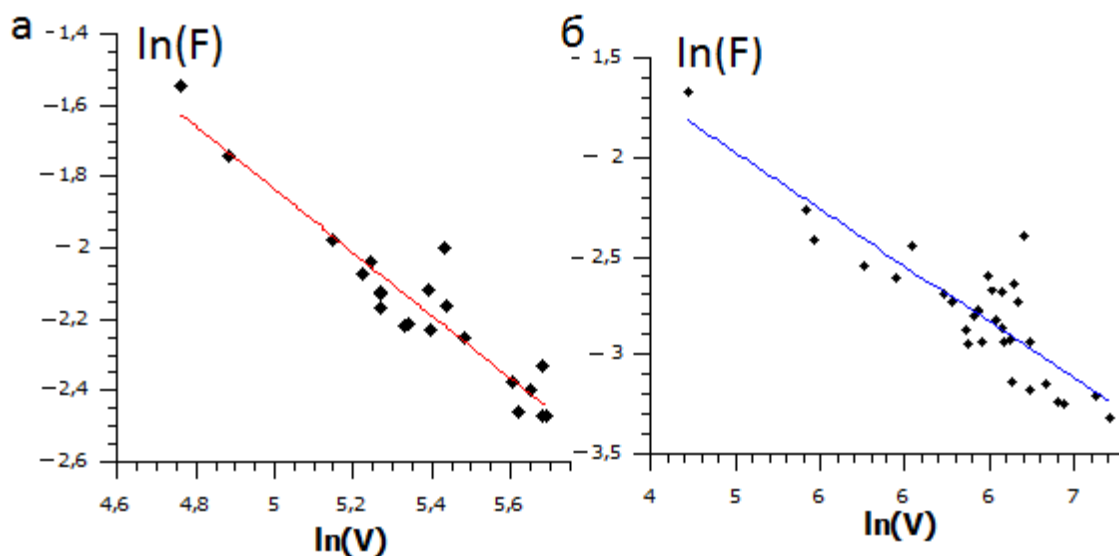


Рис.17: Зависимость функции парных расстояний от размера ядра в клетках карциномы для центров репликации (а) и для распределения белка PCNA (б). Наклон регрессионной прямой для центров репликации (а):  $0,88 \pm 0,07$ . Коэффициент детерминации  $R^2=0,89$ . Наклон регрессионной прямой для белка PCNA (б):  $0,57 \pm 0,06$ .  $R^2=0,73$ .

### 3.3 Определение фрактальных характеристик распределения центров репликации.

Функция распределения точек репликации по расстояниям для клеток карциномы (рис.18) и фибробластов имела линейный участок на малых размерах, аналогичный наблюдавшемуся ранее для ряда других клеток (п. 3.1).

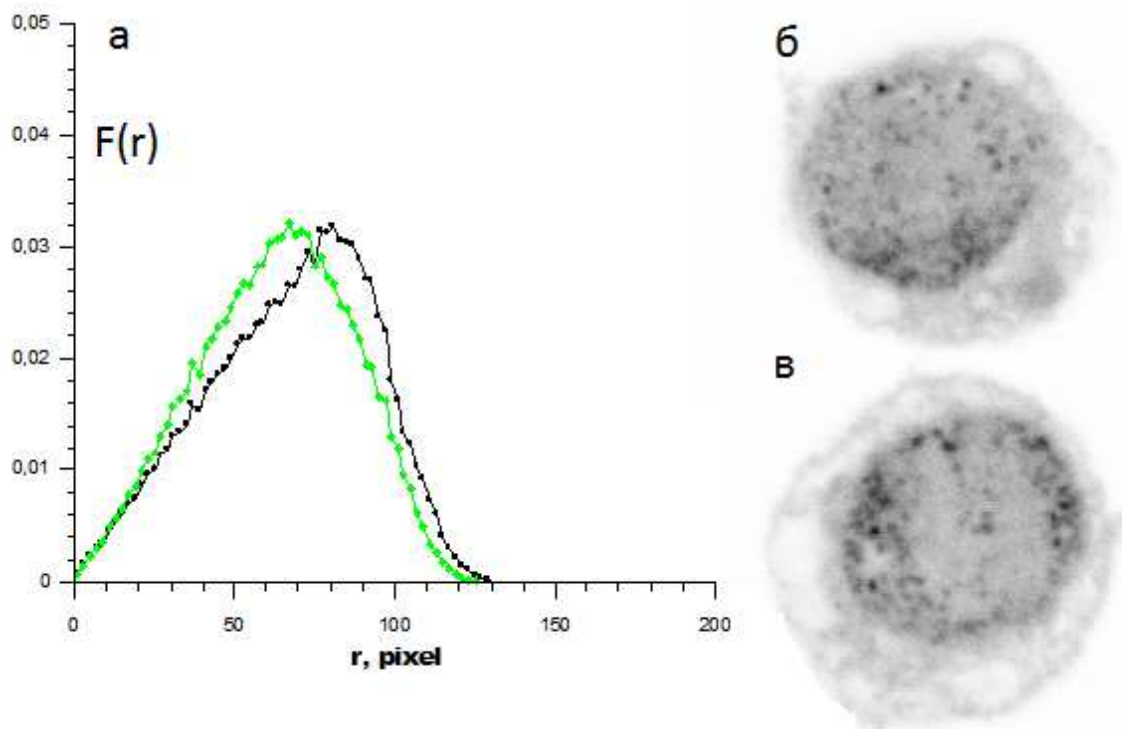
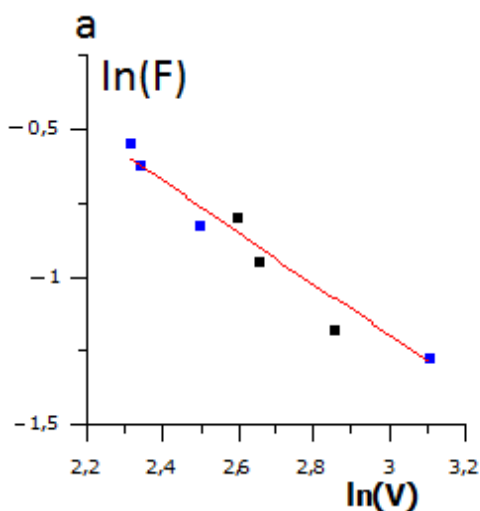


Рис.18: Функция парных расстояний для ядер клеток карциномы. Функция (а) зеленого цвета соответствует ядру клетки (б), черного цвета — ядру клетки(в).

Фрактальные характеристики распределения на масштабах целого ядра для клеток HeLa, глиомы, карциномы, фибробластов определялись по зависимости амплитуды функции парных расстояний на начальном участке от объема ядер в двойной логарифмической шкале. Данные представлены на рис.19 и рис.17 и в таблице 1.





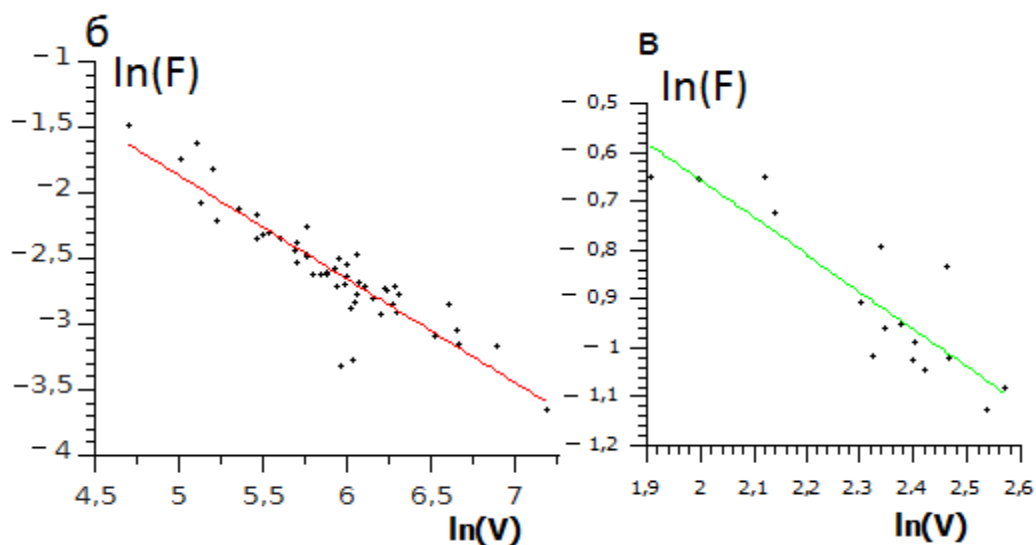


Рис.19: Зависимость функции парных расстояний от размера ядра в двойной логарифмической шкале в клетках глиомы (а), в клетках HeLa (б) и в клетках фибробластов (в). Наклон регрессионной прямой для центров репликации в клетках глиомы (а):  $0.87 \pm 0.09$ ,  $R^2=0.89$ , в клетках HeLa:  $0.78 \pm 0.05$ ,  $R^2=0.83$ , в клетках фибробластов:  $0.76 \pm 0.11$ ,  $R^2=0.74$ .

Таблица 1

Клетки:	$d/3$	$d$	$R^2$
HeLa	$0,78 \pm 0,05$	$2,34 \pm 0,15$	0,83
глиома	$0,87 \pm 0,09$	$2,61 \pm 0,27$	0,98
фибробласты	$0,76 \pm 0,11$	$2,28 \pm 0,33$	0,74
карцинома	$0,88 \pm 0,07$	$2,64 \pm 0,21$	0,89
карцинома -PCNA	$0,57 \pm 0,06$	$1,68 \pm 0,18$	0,73

Во всех исследованных клетках масштабируемость распределения точек репликации с размером ядра имела дробный показатель степени между 2 и 3, что указывает на фрактальные свойства этого распределения на больших размерах. При этом в клетках HeLa и фибробластов показатель степени был близок к 2, в то время как для клеток глиомы и карциномы печени он был несколько больше (около 2,6). Значительный разброс данных

привел к высокой погрешности определения этого параметра. Свойства распределения флуоресцентного белка GFP-PCNA, как указывалось ранее, заметно отличалось от распределения BrdU.

Можно предположить, что центры репликации в клетках HeLa и фибробластов распределены по поверхности ядра, а в клетках глиомы и карциномы по объему. Это может быть связано с преобладанием в выборках клеток в определенной стадии S фазы, то есть ранней или средней.

Выборку клеток фибробластов оказалось возможным визуально разделить по стадии S фазы (Рис.20). Регрессионная прямая для распределения точек репликации по всему объему ядра, характерному для ранней S фазы (Рис.20в), имеет наклон  $0.70 \pm 0.15$ , а в случае, когда центры репликации распределены по поверхности ядра и вокруг ядрышек (Рис.20б), что характерно для средней стадии S фазы, наклон регрессионной прямой равен  $0.60 \pm 0.22$ . Таким образом, в случае средней S-фазы размерность пространственного распределения точек репликации ( $\sim 1,8$ ) соответствовала размерности поверхности ядра. Однако и для ранней S фазы размерность распределения была близка к 2, несмотря на присутствие точек репликации во всем объеме ядра.

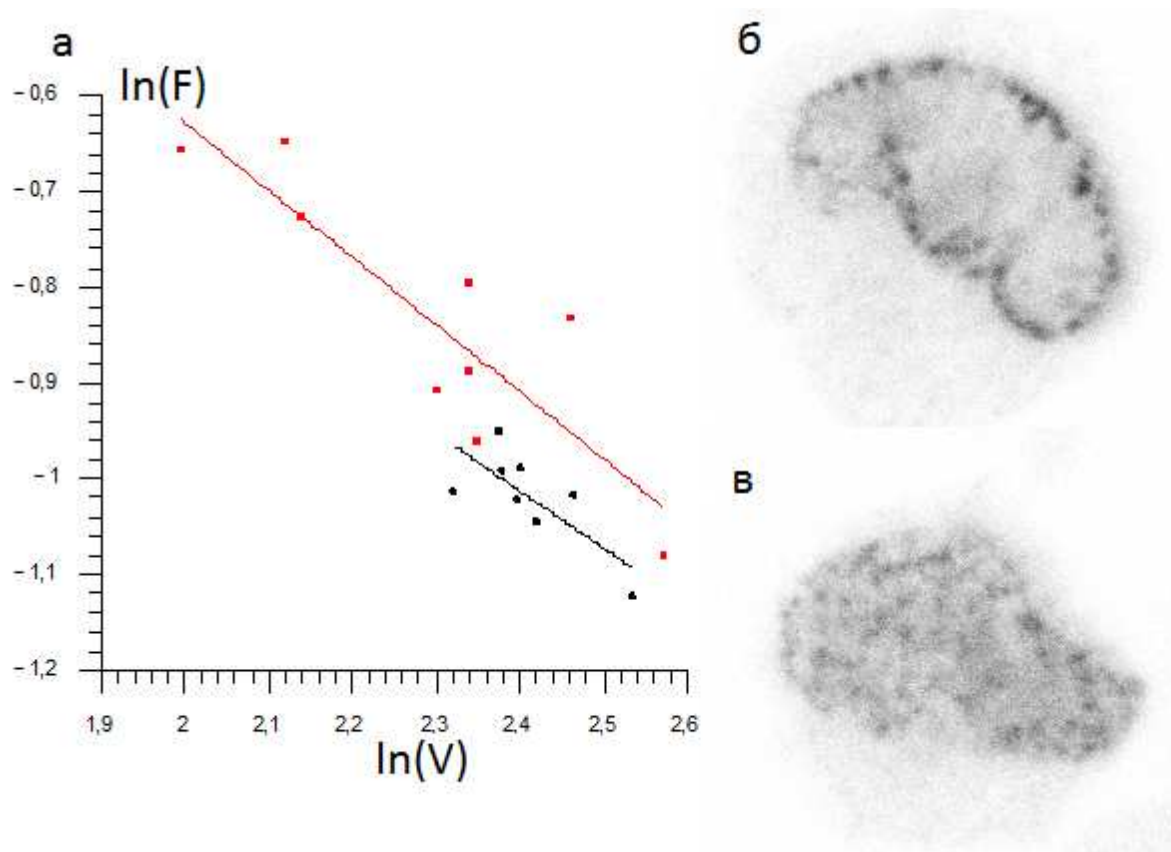


Рис.20: а) Зависимость функции парных расстояний от размера ядра в клетках фибробластов. Разделение клеток визуально на принадлежащие к ранней S фазе, где центры репликации распределены по всему ядру (красный цвет) и средней S фазе, где центры репликации распределены по поверхности ядра и вокруг ядрышек (черный цвет). Наклон регрессионной прямой для ранней S фазы:  $0.70 \pm 0.15$ ,  $R^2 = 0.76$ , для средней стадии S фазы:  $0.60 \pm 0.22$ ,  $R^2 = 0.56$ . Центры репликации ранней S фазы (в) и средней S фазы (б).

### 3.4 Данные измерений МУРН.

Были измерены спектры МУРН для ядер клеток HeLa и глиомы. Данные представлены на рис.21.

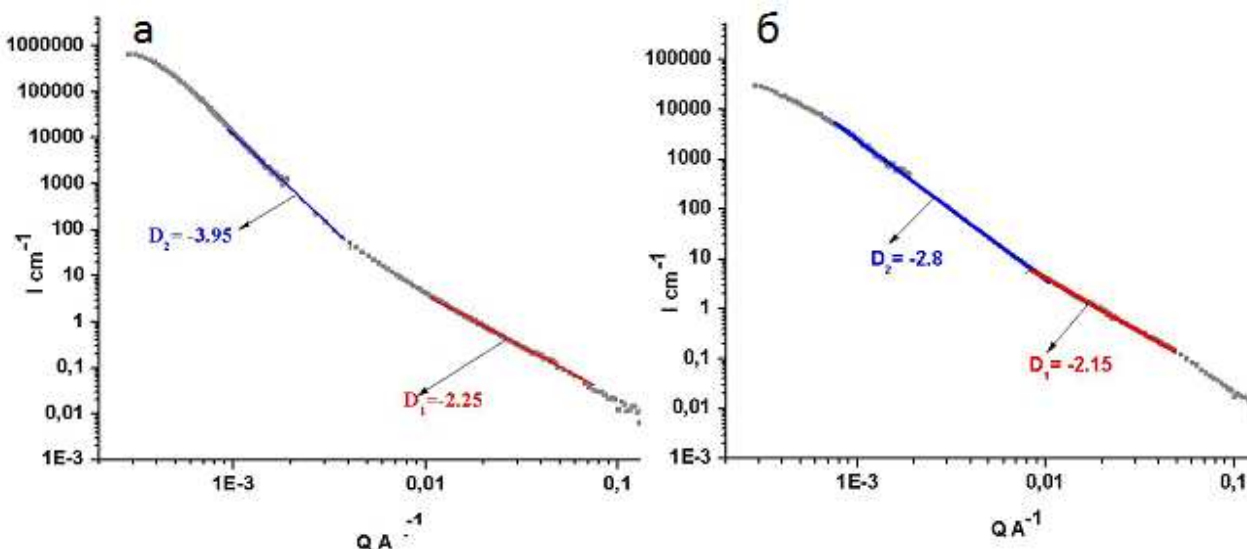


Рис.21: Спектры МУРН для ядер клеток HeLa (а) и глиомы (б). Измерения проводились в 40% D<sub>2</sub>O, рассеяние только от нуклеиновой компоненты хроматина. Линии отмечают участки со степенной зависимостью интенсивности от величины вектора рассеяния.

Степенная зависимость интенсивности рассеяния от величины вектора рассеяния (4), говорит о фрактальных свойствах структуры. Для Клеток HeLa было обнаружено, что на больших размерах (на размерах, доступных конфокальному микроскопу — от 150 нм) показатель степени в формуле (4) равен 3.95.

В случае, если показатель степени в формуле (4) больше 3, это указывает на существование поверхностного фрактала. Если есть резкие перепады плотности, может образоваться поверхность фаз с разной плотностью рассеяния. Эта поверхность может иметь самоподобную фрактальную структуру, в этом случае данную систему называют поверхностным фракталом. Если показатель степени меньше трех, то это масс-фрактал. То есть структура обладает фрактальным распределением её массы.

В случае поверхностного фрактала размерность фрактала вычисляется разностью:

$$d = 6 - \text{показатель степени}$$

Поэтому, структура хроматина в ядрах клеток HeLa является поверхностным фракталом с размерностью 2.05. На меньших размерах (меньше 150 нм) структура соответствует масс-фракталу с размерностью 2.25.

Хроматин в ядрах клеток глиомы также распределен фрактально. На больших размерах его распределение является масс-фракталом с размерностью 2.8, что близко к характеристикам фрактальной глобулы. На малых размерах структура также фрактальна с размерностью масс-фрактала 2.15.

Таким образом, как данные измерений МУРН, так и данные распределения центров репликации в ядрах клеток HeLa и глиомы указывают на фрактальную организацию генетического материала клеток на размерах ядра. Фрактальная размерность хроматина в клетках глиомы (2.8) близка к размерности, полученной из зависимости функции парных расстояний от объема для точек репликации в этих клетках (~2.6). Близкие значения размерности получены этими двумя методами и для клеток HeLa (2.05 и 2.3).

## **Выводы.**

- 1) Методом конфокальной микроскопии было показано, что распределение центров репликации в клетках HeLa, фибробластов, карциномы печени и глиомы имеет свойства фрактала с размерностью на масштабах, близких к размеру ядра, между 2 и 3.
- 2) Методом МУРН было показано, что распределение плотности хроматина в клетках HeLa и глиомы человека фрактально. На размерах, близких к размеру ядра, хроматин клеток глиомы имеет свойства масс-фрактала с размерностью 2.8, а хроматин клеток HeLa — поверхностного фрактала с размерностью 2.05.
- 3) Фрактальные характеристики распределений центров репликации в клетках HeLa и глиомы хорошо соотносятся с данными измерения МУРН для распределения плотности хроматина в ядрах этих клеток.

### **Список используемой литературы.**

- 1) Bancaud A., Lavelle C., Huet S., Ellenberg J.. A fractal model for nuclear organization: current evidence and biological implications.//Nucleic Acid Research. 2012. Vol.40. No.18. P. 8783-8792.
- 2) Bancaud A., Huet S., Daigle N., Mozziconacci J., Beodouin J., Ellenberg J.. Molecular crowding affects diffusion and binding of nuclear proteins in heterochromatin and reveals the fractal organization of chromatin. // The EMBO Journal. 2009. Vol. 28. P. 3785-3798.
- 3) Woodcock C.L., Ghosh R.P.. Chromatin Higher-order structure and dynamics.// Cold spring harb perspect biol. 2010. 2:a000596.
- 4) Takizawa T., Meaburn K.J., Misteli T.. The meaning of gene positioning.// Cell 135. 2008.
- 5) Grosberg A., Rabin Y., Halvin S., Neer A..Crumple globule model of three-dimensional structure of DNA.// Europhys.Letter. 1993. Vol. 23.P.373-378.
- 6) Божокин С.В., Паршин Д.А., Фракталы и мультифракталы.// НИЦ «Регулярная и хаотическая динамика». 2001. P.128.
- 7) 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., Sandstrom R., Bernstein B., Bender M.A., Groudine M., Gnirke A., Stamatoyannopoulos J., Mirny L.A., Lander E.S., Dekker J.. Comprehensive mapping of long range interactions reveals folding principles of human genom.// Science. 2009. 326(5950).P.289-293.
- 8) Metze K.. Fractal dimension of chromatin: potential molecular diagnostic applications for cancer prognosis.// Expert Rev.Mol.Diagn. 2013. 13(7). P. 719-135.
- 9) Lebedev d.V., filatov M.V., Kuklin A.V., Islamov aA.Kh., Kentsinger E., Pantina R., Toperverg B.P., Isaev-Ivanov V.V.. Fractal nature of chromatin organization in interphase chicken erythrocyte nuclei: DNA structure exhibits biphasic fractal properties. // FEBS Letters. 2005. Vol. 29310.
- 10) Goetze S., Mateos-Langerak J., van Driel R.. Tree-demensional genome organization in interphase and its relation to genome function. // Seminars in Cell & Development Biology. 2007. Vol. 18. P. 707-714.

- 11) Mirny L.A.. The fractal globule as a model of chromatin architecture in the cell.// *Chromosome res.* 2011. Vol. 19. P. 37-51.
- 12) Sporbert A., Gahl A., Ankerhold R., Leonhardt H., Cardoso M.C.. DNA polymerase clamp shows turnover at established replication sites but sequential de novo assembly at adjacent origin clusters.// *Molecular Cell.* 2002. Vol. 10. P. 1355-1365.
- 13) Cremer T., Cremer C.. Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells.// *Nature.* 2001. Vol. 2.P. 292-301.
- 14) Yung I.A., Pantina R.A., Lebedev D.V., Isaev-Ivanov V.V.. Distance distribution functions of replication origins in HeLa and glioma human cells according to the data of confocal microscopy.// *Journal of Surface Investigation.* 2013. Vol. 7, issue 6. P.1137-1142.
- 15) Свергун Д.И., Фейгин Л.А.. Рентгеновское и нейтронное малоугловое рассеяние.// *Наука, Гл.ред.физ.-мат.лит.* 1986. стр.40.