

ОБ ОСОБЕННОСТЯХ УКЛАДКИ ХРОМАТИНА В ЯДРЕ КЛЕТКИ БЕССМЕРТНОЙ ЛИНИИ HeLa ПО РЕЗУЛЬТАТАМ МАЛОУГЛОВОГО РАССЕЯНИЯ НЕЙТРОНОВ

С. В. Григорьев^{1,2}, Е. Варфоломеева¹, Р. Пантина¹, В. Ю. Байрамуков¹, Р. А. Ковалев¹,
Н. Д. Федорова¹, Ю. Е. Горшкова³, Е. Г. Яшина^{1,2}

¹Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, Россия

²Санкт-Петербургский Государственный Университет, Санкт-Петербург, Россия

³Объединенный институт ядерных исследований, Дубна, Россия

*E-mail: grigoryev_sv@pnpi.nrcki.ru

Выполнены уникальные эксперименты по малоугловому рассеянию нейтронов (МУРН) с использованием техники контрастирования D₂O-H₂O на изолированных ядрах клеток бессмертной линии HeLa. Уникальность экспериментов обусловлена широким диапазоном переданных импульсов ($Q \in [0.0015 - 2.0] \text{ нм}^{-1}$), проводимых на установках KWS-3 и KWS-2 нейтронного исследовательского центра MLZ (Гархинг, Германия). Эти три порядка на шкале размеров лежат в пределах от 6 нм до 6 мкм, т.е. охватывают весь диапазон больших и средних неоднородностей хроматина, составляющего материал ядра биологической клетки и состоящего из макромолекул ДНК и белков. Рекордным является объем образцов концентрированного раствора ядер HeLa, который достигает 1 см³, а в пересчете на количество ядер равен 10⁹ штук в образце. Именно такой колоссальный объем выделенных из клеток ядер и позволяет провести на них эксперименты МУРН в трех различных смесях D₂O-H₂O. 100% раствор D₂O используют для получения максимального контраста между хроматином внутри ядра и средой для получения картины рассеяния от всей совокупности неоднородностей в ядре. 60–40% раствор D₂O-H₂O используют для экранирования в ядре ДНК ($\Delta\rho_{\text{ДНК}} = 0$) и визуализации только его белковой составляющей. 40–60% раствор D₂O-H₂O используют для экранирования в ядре белков ($\Delta\rho_{\text{белки}} = 0$) и визуализации только ДНК макромолекул.

Обычно исследуемые образцы ядер делящихся клеток представляют собой ансамбль интерфазных ядер, которые распределены по всем фазам клеточного цикла. Так в работах [1–4] исследовали образцы, в которых 70% ядер находятся в фазе G₁, 10% — в фазе S и 20% — в фазе G₂. Такая смесь ядер клеток, находящихся в разных фазах цикла, усредняет особенности кривых рассеяния, характерные для укладки хроматина в фазах G₁, S и G₂. Между тем, в делящихся клетках хроматин претерпевает транскрипцию, репарацию, репликацию ДНК — три важных функции, необходимых для цикла деления клетки. Кроме того, клетка образует ядрышки — отдельные тельца внутри ядра, состоящие из РНК и белков. Чтобы исследовать отдельные функции и идентифицировать изменения структуры хроматина необходимо синхронизировать деление ансамбля клеток в пределах их цикла.

Мы использовали чувствительность клеток к ионизирующему излучению для их дифференциации по фазам цикла, поскольку, например, остановка деления в фазе G₂ является одним из основных механизмов ответа на повреждение ДНК клеток, вызванное заметной долей излучения. Рост репарационной активности является реакцией клетки на малые дозы излучения. Клетки после облучения снова помещали в условия, способствующие делению, но оказалось, что при облучении в 18 Gy любое деление останавливается, и большинство клеток остаются в фазе G₂, а при облучении в 3 Gy усиливается репарационная активность. Именно из таких клеток — необлученных, слабо (3Gy) и сильно (18 Gy) облученных — были извлечены ядра в достаточных количествах для проведения нейтронных экспериментов. Мы использовали гистограммы проточной цитометрии для того, чтобы определить количество ядер с единичным (фаза G₁) и двойным (фаза G₂) набором хромосом, и, тем самым, установили положение клетки в цикле деления.

Получены зависимости интенсивности МУРН от переданного импульса Q для хроматина, а также парциальные сечения МУРН для ДНК и белков, характерные для: (1) фазы G1 с одинарным набором хромосом и обычной транскрипционной активностью, (2) фазы G2 с двойным набором хромосом, и (3) фазы G1 с мощной репарационной активностью. Показано, что крупномасштабная структура ядер HeLa для этих трех образцов качественно не отличается. Во всех случаях показано наличие трехуровневой иерархической структуры с характерными размерами для целого ядра $\sim 5\mu\text{m}$, для крупномасштабного однородного тела внутри ядра $\sim 1,5\mu\text{m}$, а так же объемных фрактальных объектов $\sim 150\text{ nm}$. Трехмерная визуализация ядер, расположенных на подложке, выполненная методом атомно-силовой микроскопии, подтверждает наличие внутри ядра жестких объектов с размерами в $1,5\mu\text{m}$ и 150 nm .

Мы заключаем, во-первых, что парциальные сечения рассеяния как на ДНК, так и на белках на крупных масштабах интерпретируется как рассеяние нейтронов на однородных телах с размерами $5\mu\text{m}$ и $1,5\mu\text{m}$, то есть оба вклада описываются двумя зависимостями характерным породовским спадом $\sim Q^{-4}$. Хроматин, хотя и является комбинацией ДНК и белков, демонстрирует рассеяние на логарифмической фрактальной структуре на масштабах от $5\mu\text{m}$ до 100 nm , с законом рассеяния Q^{-3} . Эта основная тенденция для хроматина сопровождается рассеянием на однородном теле с размером $1,5\mu\text{m}$. Наблюдаемая логарифмическая фрактальная структура хроматина обеспечивает равномерное распределение пустот-каналов на разных масштабах, потенциально необходимых для обеспечения инфраструктуры ядерного транспорта и пространства для биологической активности ДНК. Таким образом показано, что эта структура присутствует в фазах G1 и G2 клеточного цикла. Однородное тело с характерным размером в $1,5\mu\text{m}$ может быть ядрышком, состоящим из РНК и белков и непременно появляющемся внутри ядра делящейся клетки.

Во-вторых, и ДНК, и белки, и хроматин имеют схожую объемную фрактальную структуру (ОФС) с фрактальной размерностью $D = 2.5$ на масштабах от десятков до сотен нанометров. Структуры ДНК, белка и хроматина в фазе G1 качественно подобны структурам фазы G2. Однако, если в фазе G2 ОФС белков и ДНК совпадают с хорошей точностью, то в фазе G1 ОФС белков превосходит почти в 1.5–2 раза ОФС ДНК по интенсивности рассеяния. Наличие ОФС в ядре мы связываем с транскрипционной активностью клетки [5]. Особо отметим, что для образца фазы G1, предварительно подвергнутого облучению мощностью 3 Gy , наблюдается колоссальный рост ОФС белков до размеров в 350 nm и на порядок большей интенсивностью по сравнению с ОФС для ДНК, рассеяние на которой осталось на том же уровне, как и в необлученной клетке. Мы связываем этот рост с мощной репарационной активностью клетки. Колоссальный рост рассеяния на ОФС для этого образца так же наблюдается в экспериментах МУРН.

В третьих, отметим корреляцию интенсивностей рассеяния на белках между ОФС и однородным телом с размером в $1,5\mu\text{m}$, предположительно, ядрышком, что, возможно, указывает на принадлежность этих белковых комплексов к внутренней структуре ядрышка, а возможно и к образованию нескольких ядрышек внутри ядра.

В целом работа демонстрирует важность использования МУРН в широком диапазоне переданных импульсов, использования техники контрастирования растворов тяжелой и легкой воды, и техники синхронизации фаз клеточного цикла с помощью облучения, а так же открывает пути исследования структуры хроматина в различных и многочисленных линиях раковых клеток.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 20-12-00188).

1. E. G. Iashina, et al, Phys. Rev. E **96**, 012411 (2017).
2. E. G. Iashina, et al, J. Appl. Cryst. **52**, 844–853 (2019).
3. D. V. Lebedev, et al, BBRC **520**, 136 (2019).
4. S. V. Grigoriev, et al, Phys. Rev. E **104**, 044404 (2021).
5. Е. Г. Яшина, и др., Письма в ЖЭТФ **118**, 10, 776 – 781 (2023).