



УКРАЇНА

(19) UA (11) 19657 (13) U
(51) МПК (2006)
G01N 33/48
G01N 33/49

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ МЕХАНІЗМУ ІНТЕРФАЗНОЇ ГЕТЕРОХРОМАТИНІЗАЦІЇ

1

(21) u200608228
(22) 21.07.2006
(24) 15.12.2006
(46) 15.12.2006, Бюл. № 12, 2006 р.
(72) Швачко Людмила Павлівна
(73) ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ, Швачко Людмила Павлівна
(57) Спосіб визначення механізму інтерфазної гетерохроматинізації, який включає операції отримання стабільної лінії мух *Drosophila virilis* з епігенетичним фенотипом, при дії ДНК-деметилуючого реагенту 5-аза-цитидину у складі поживного сере-

2

довища, відбирання *Drosophila virilis* личинок (передлялечок), препарування слинних залоз у фізіологічному розчині (0,15 M NaCl), витримувannya їх в ацетоорсеїновому барвнику протягом 2-3 годин, перенесення препаратів слинних залоз личинок *Drosophila virilis* на предметне скло у краплину 45% оцтової кислоти, накривання їх накривним скельцем з подальшим методом тиску препарату і отримання політених хромосом, виконання їх цитоморфологічного аналізу, за результатами якого визначають механізм інтерфазної гетерохроматинізації.

Пропонована корисна модель відноситься до досліджень, що стосуються онкології та онкогенетики. Вона може бути застосована для ранньої діагностики онкологічного захворювання.

Під час проведення патентно-інформаційних досліджень автором не виявлені способи визначення механізму інтерфазної гетерохроматинізації, що супроводжує онкологічну прогресію.

У основу пропонованої корисної моделі поставлено задачу створення способу визначення механізму інтерфазної гетерохроматинізації, який можна застосувати для виявлення механізму інтерфазної гетерохроматинізації, індукованої ДНК-деметилуванням (гіпометилуванням), зокрема, при онкологічній прогресії.

Пропонований спосіб визначення механізму інтерфазної гетерохроматинізації включає операції отримання стабільної лінії мух *Drosophila virilis* з епігенетичним фенотипом при дії ДНК-деметилуючого реагенту 5-аза-цитидину у складі поживного середовища, відбирання *Drosophila virilis* личинок (передлялечок), препарування слинних залоз у фізіологічному розчині (0,15 M NaCl), витримувannya їх в ацетоорсеїновому барвнику на протязі 2-3 годин, перенесення препаратів слинних залоз личинок *Drosophila virilis* на предметне скло у краплину 45% оцтової кислоти, накривання їх покривним скельцем з подальшим методом тиску препарату і отримання політених

хромосом, виконання їх цитоморфологічного аналізу, за результатами якого визначають механізм інтерфазної гетерохроматинізації.

Спосіб виявлення механізму специфічної інтерфазної гетерохроматинізації, пов'язаної з ДНК-гіпометилуванням при пухлинній прогресії та дії ДНК-деметилуючого реагенту 5'-аза-цитидину, полягає у виявленні механізму ектопічної кон'югації та екстраеплікації районів деконденсованого гетерохроматину (районів активного пуфінгу) на моделі політених хромосом слинних залоз *Drosophila virilis*. Виявлено, що ектопічна кон'югація та екстраеплікація деконденсованих гетерохроматинових пуфів політених хромосом специфічно індукуються дією ДНК-деметилуючого реагенту 5'-аза-цитидину, та призводить до явища гетеропікнозу (гетерохроматинізації). Таким чином, в основі аномального епігенетичного механізму інтерфазної гетерохроматинізації при пухлинній прогресії, що супроводжується глобальним ДНК-гіпометилуванням та деконденсацією перичентромерного/центромерного гетерохроматину [Декларційний патент на корисну модель No 15113, МПК (2006) A61B5/00, G01N33/49, G01N33/48, опубл. 15.06.2006. Бюл. №6], та виявленням явищем гетеропікнозу політених хромосом під дією ДНК-деметилуючого реагенту 5'-аза-цитидину, можуть лежати тотожні механізми екстраеплікації та ектопічної кон'югації блоків деконденсованого

(19) UA (11) 19657 (13) U

гетерохроматину, індукованого епігенетичним ДНК-деметилуючим чинником.

Концентруючись в інтерфазному ядрі (бласттрансформованого лімфоциту) на стадії максимальної декомпактизації та реплікації хроматину, мітотичні інтерфазні хромосоми, насамперед за розміром, лишаються за межею достатньо можливого цитоморфологічного структурного аналізу, в тому числі, дослідження механізму імовірних морфологічних змін гетерохроматину при виявленні нами специфічній інтерфазній гетерохроматинізації мітотичних лімфоцитів (за рівнем інтенсивності флуоресценції з DAPI та Hoechst 33258 - гетерохроматин-специфічними флюорохромами та суттєвою ампліфікацією перичентромерних сателітних Alu-ДНК повторів) у хворих на пухлинну прогресію, яка корелює з ДНК-деметилуванням та, поєднуючи з ним, деконденсацією конститутивного перичентромерного/центромерного гетерохроматину [Деклараційний патент на корисну модель No 15113, МПК (2006) A61B5/00, G01N33/49, G01N33/48, опубл. 15.06.2006. Бюл. №6].

Тому, вирішення поставлених питань з'ясувалось на моделі політених хромосом *Drosophila virilis*. По-перше, на підставі того, що політенні хромосоми *Drosophila* були та лишаються класичною моделлю структурно-генетичних досліджень геному еукаріот. По-друге, політенні хромосоми - це гігантські інтерфазні хромосоми, які володіють максимальною декомпактизацією, характерною для інтерфазних хромосом. Саме за цим принципом мітотичні хромосоми та політенні хромосоми є імовірно тотожними для з'ясування поставлених питань. По-третє, в політених хромосомах, як і в мітотичних, надзвичайно високий вміст гетерохроматину, з домінуючим конститутивним перичентромерним гетерохроматином, що доповнюється інтеркалярним гетерохроматином. Як у "мовчачому" конденсованому гетерохроматині мітотичних хромосом, у щільно компактизованих дисках конденсованого гетерохроматину політених хромосом відсутня генна експресія. Гетерохроматинові диски декомпактизуються і активуються лише на окремих стадіях розвитку *Drosophila*. Тому, імовірно, що саме перичентромерний конститутивний гетерохроматин, який на стадії інтерфазної клітини - стадії максимальної декомпактизації хроматину та S-фази реплікації ДНК, як мітотичних, так і політених хромосом, лишається висококомпактизованим, є вірогідним матеріальним носієм епігенетичного контролю клітини. В свою чергу, епігенетичні порушення в клітині, ключовим сигнальним фактором яких є зміни в ДНК- метилуванні, а саме, виявлене значне ДНК- деметилування при пухлинній прогресії, що корелює з деконденсацією конститутивного перичентромерного/центромерного гетерохроматину метафазних хромосом та інтерфазною гетерохроматинізацією [Деклараційний патент на корисну модель No 15113, МПК (2006) A61B5/00, G01N33/49, G01N33/48, опубл. 15.06.2006. Бюл. №6], мають, в свою чергу, імовірно реалізовуватись через структурно-морфологічні зміни в організації конститутивного гетерохроматину, як мітотичних хромосом, так і політених. Отже, показані ключові принципи зміни в конститутивному гетерохроматині полі-

тених хромосом *Drosophila virilis*, як перичентромерному так і інтеркалярному, індуковані ДНК-деметилуючим чинником 5'-аза-цитидином, мають вірогідно поєднуватись з механізмом інтерфазної гетерохроматинізації мітотичних хромосом, індукованої глобальним ДНК-гіпометилуванням при пухлинній прогресії, а саме з явищем гетеропікнозу (специфічної гетерохроматинізації), в основі якого лежать механізми ектопічної кон'югації та екстрареплікація активованих деконденсованих гетерохроматинових районів (пупів) політених хромосом. Таким чином, деконденсація конститутивного перичентромерного/центромерного гетерохроматину мітотичних хромосом, індукована глобальним ДНК-гіпометилуванням при пухлинній прогресії, як показано раніше [Деклараційний патент України на корисну модель No 13616, МПК (2006) A61K31/727 (2006.01), G01N33/48, опубл. 17.04.2006 р., Бюл. №4], вірогідно може асоціюватись з механізмами екстрареплікації та ектопічної кон'югації деконденсованого гетерохроматину, що лежать в основі інтерфазної гетерохроматинізації мітотичних хромосом при пухлинній прогресії та явища гетеропікнозу (гетерохроматинізації) на моделі гігантських інтерфазних політених хромосом, спричинених дією одного чинника - епігенетичного ДНК гіпометилування / деметилування.

Суть пропозиції пояснюється за допомогою графічних матеріалів.

На Фіг.1 показана деконденсація гетерохроматину політених хромосом у вигляді активного пупінгу, при дії ДНК деметилуючого реагенту 5'-аза-цитидину.

На Фіг.2 показана ектопічна кон'югація деконденсованих гетерохроматинових пупів політених хромосом у вигляді ектопічного тяжу, при дії ДНК деметилуючого реагенту 5'-аза-цитидину.

На Фіг.3 показана гетерохроматинізація фрагментів деконденсованого гетерохроматину політених хромосом у вигляді краплин "помпон", при дії ДНК деметилуючого реагенту 5'-аза-цитидину.

На Фіг.4 показана екстрареплікація і ектопічна кон'югація блоків неконденсованого гетерохроматину політених хромосом у вигляді гетеропікнозу, при дії ДНК-деметилуючого реагенту 5'-аза-цитидину.

На Фіг.5 методом електрофорезу в агарозному гелі (1.2%) показана поява фракції екстрареплікованої ДНК гетерохроматину політених хромосом при гетеропікнозі (гетерохроматинізації), індукованої дією ДНК-деметилуючого реагенту 5'-аза-цитидину.

1. Хромоносомна ДНК людини

2. ДНК політених хромосом без дії деметилуючого реагенту 5'-аза-цитидину.

3. ДНК політених хромосом після дії 5'-аза-цитидину 10^{-8} М.

4. ДНК політених хромосом після дії 5'-аза-цитидину 10^{-6} М.

На Фіг.6 показана глобальна гетерохроматинізація політених хромосом у вигляді масивних районів гетеропікнозу, при дії ДНК-деметилуючого реагенту 5'-аза-цитидину.

Приклад. Отримували стабільну лінію мух *Drosophila virilis* з індукованим епігенетичним фенотипом. Об'єктом досліджень були політенні хро-

мосоми лінії дикого типу K9 *Drosophila virilis*. Мухи утримувались на стандартному поживному середовищі (манна каша, пивні дріжджі, ізюм, з додаванням пропіонової кислоти, як антимікробного засобу) при +24...+25°C. Контрольною групою слугували мухи лінії дикого типу K9 *Drosophila virilis* (15 самок і 15 самців), які утримувались, на протязі 21 пасажів, на поживному середовищі без ДНК-деметилуючого реагенту - 5'-аза-цитидину. Другою групою слугували мухи лінії дикого типу K9 *Drosophila virilis* (15 самок і 15 самців), які утримувались на поживному середовищі з 5'-аза-цитидином, в кінцевій концентрації 10^{-4} М та 10^{-6} М на протязі першої генерації мух. Наступні генерації мух з індукованим епігенетичним фенотипом підтримувались на поживному середовищі без 5'-аза-цитидину на протязі 20 пасажів. Личинки (передлялечки) відбирали на кінці третьої личинкової стадії, коли хромосоми в клітинах слинних залоз *Drosophila* проходять максимальний цикл ендоредуплікації і, таким чином, досягають максимального ступеня політенії. Застосовували стандартну методику давлених ацетоорсеїнових препаратів інтерфазних ядер клітин слинних залоз для отримання політенних хромосом: слинні залози личинок препарували у фізіологічному розчині (0,15М NaCl), витримували в ацетоорсеїновому барвнику на протязі 2-3 годин, та переносили на предметне скло в краплину 45% уксусної кислоти, накривали покривним скельцем та обережно давили поверх фільтрувального папірця. Проводили цитоморфологічний аналіз інтенсивно забарвлених ацетоорсеїном політенних хромосом за допомогою світлової мікроскопії при збільшенні 25х1,25 та 40х1,25 [Жимулев И. Ф. Политенные хромосомы: морфология и структура. - Новосибирск: "Наука", Сибирское отд-ние. -1992,480 с.. Политенные хромосомы: морфология и структура. - Новосибирск: "Наука", Сибирское отд-ние. -1992,480 с.].

Таким чином, в результаті досліджень було:

1. Отримано стабільну лінію мух *Drosophila virilis* з епігенетичним мутаторним фенотипом по-

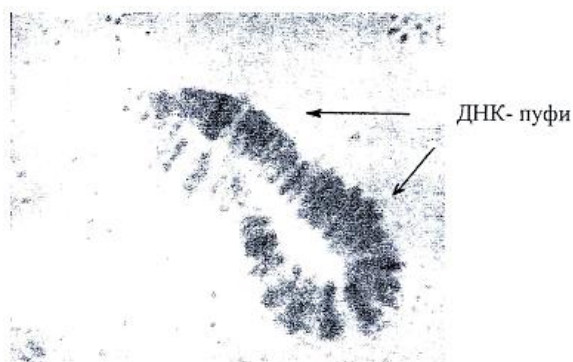
літенних хромосом, індукованим дією ДНК деметилуючого чинника (5'-аза-цитидин), що передається від першої генерації мух до наступної (на протязі 21 пасажів).

2. Виявлена специфічна епігенетична нестабільність гетерохроматину, що обумовлюється дією ДНК деметилуючого чинника: показано, що при дії специфічного ДНК-деметилуючого реагенту 5'-аза-цитидину має місце індукція активної деконденсації перицентромерного та інтеркалярного гетерохроматину політенних хромосом, що асоціюється з активним пуфінгом (Фіг.1).

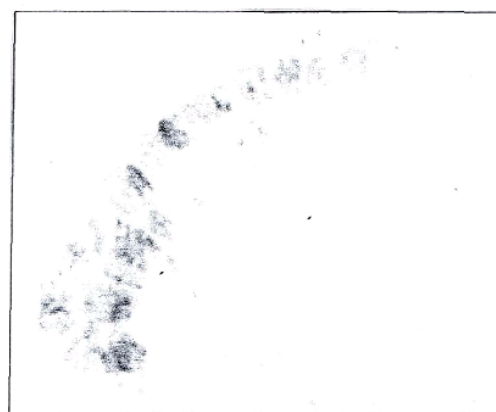
3. На моделі політенних хромосом вперше показано, що при дії ДНК-деметилуючого реагенту має місце специфічна індукція ектопічної кон'югації деконденсованих гетерохроматинових районів, як між хромосомами, так і в межах окремих хромосом (Фіг.2, Фіг.4).

4. На моделі інтерфазних політенних хромосом вперше показано, що при дії ДНК-деметилуючого чинника поряд з ектопічною кон'югацією районів деконденсованого гетерохроматину має місце значна гетерохроматинізація за рахунок екстраєплікації ДНК районів деконденсованого гетерохроматину (Фіг. 5), що супроводжується появою "ектопічних тяжів" (Фіг.2), краплин "помпонів" (Фіг.3) та масивних районів гетеропікнозу (Фіг.4, Фіг.6). Таким чином, показано, що інтерфазна гетерохроматинізація політенних хромосом, індукована дією ДНК деметилуючого чинника - 5'-аза-цитидину, асоціюється з явищем гетеропікнозу, що безпосередньо поєднується з механізмами екстраєплікації ДНК та ектопічної кон'югації районів деконденсованого гетерохроматину.

5. Вперше проводиться експериментальна екстраполяція між, індукованим ДНК-деметилуючим чинником, гетеропікнозом деконденсованого гетерохроматину інтерфазних політенних хромосом та інтерфазною гетерохроматинізацією деконденсованого гетерохроматину мітотичних хромосом, індуковану глобальним ДНК-гіпометилуванням при пухлинній прогресії.



Фіг. 1



Фіг. 2

7

19657

8

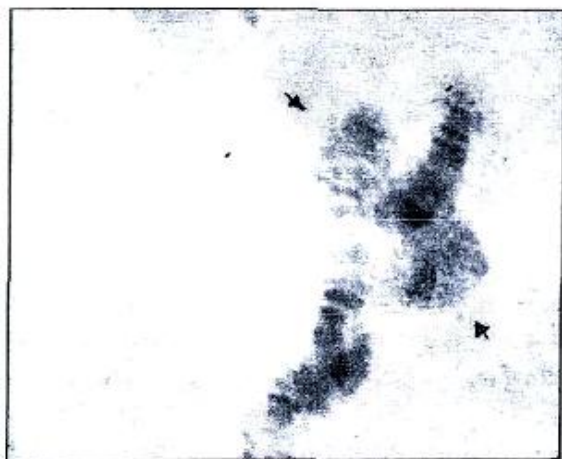


Fig. 3

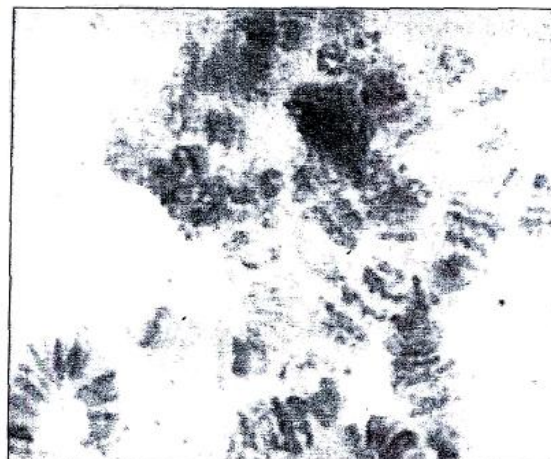


Fig. 4

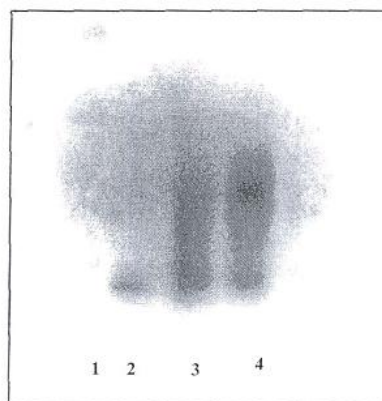
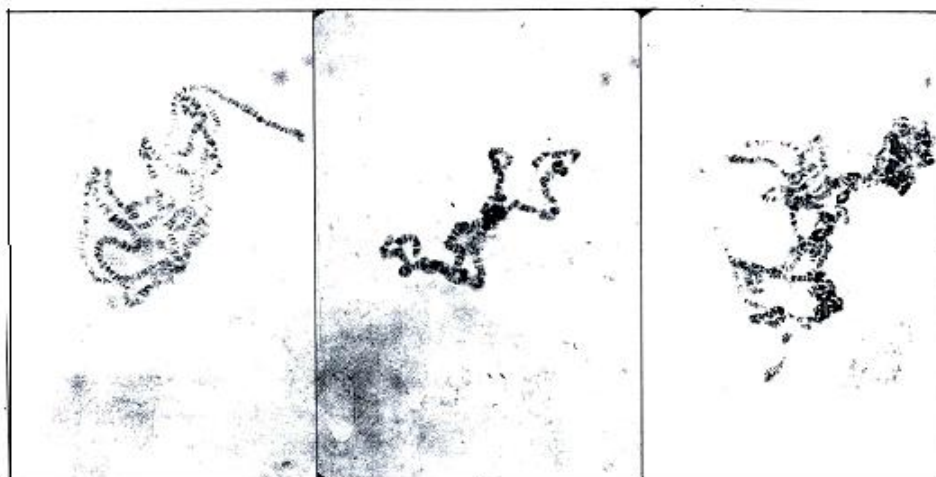


Fig. 5



Контроль

5-аза-цитидин 10^{-8} М5-аза-цитидин 10^{-6} М

Fig. 6