

УДК 576.08

К.С. АФАНАСЬЕВА, М.О. ЗАЖИЦКАЯ, А.В. СИВОЛОБ

Киевский национальный университет им. Тараса Шевченко
E. mail: sivolob@univ.kiev.ua, aphon@ukr.net

МЕХАНИЗМЫ ВЫХОДА ДНК ПРИ НЕЙТРАЛЬНОМ И ЩЕЛОЧНОМ КОМЕТНОМ ЭЛЕКТРОФОРЕЗЕ



Представлены результаты по сравнительной кинетике выхода ДНК в хвост кометы при электрофорезе изолированных клеток в нейтральных и щелочных условиях. Показано, что предварительная инкубация препаратов в щелочи делает невозможным выход ДНК в нейтральных условиях электрофореза и, наоборот, эффективно способствует ему в щелочных. Сделан вывод о том, что действие щелочи приводит к нарушению связи петельных доменов ДНК с белками матрикса. Обсуждается возможная природа такой связи. Полученные результаты позволяют заключить, что механизмы выхода ДНК при нейтральном и щелочном кометном электрофорезе существенно различны. При нейтральном электрофорезе из клетки выходят релаксированные петли, при щелочном — одноцепочечные линейные фрагменты, которые силой электрического поля вытягиваются из уже не связанного с матриксом клубка.

© К.С. АФАНАСЬЕВА, М.О. ЗАЖИЦКАЯ, А.В. СИВОЛОБ,
2009

Введение. Среди различных методов оценки степени поврежденности ДНК особое внимание уделяется электрофорезу ДНК изолированных клеток — кометному электрофорезу [1]. Метод позволяет достаточно быстро и с высокой чувствительностью оценивать уровень одно- и двунитевых разрывов в ДНК отдельных клеток. На сегодняшний день широко используются два варианта кометного электрофореза (в обоих случаях клетки предварительно подвергаются лизису с целью удаления мембран и большинства белков) — нейтральный (при pH 7,5) и щелочной (в денатурирующих условиях — при pH > 13). Второй протокол применяется сегодня большинством лабораторий: популярность щелочного электрофореза связана с тем, что этот метод, по распространенному мнению, позволяет определять относительное количество так называемых щелочеллабильных сайтов — АП-сайтов (апуриновых/апиримидиновых), в которых индуцируются разрывы в щелочной среде [1–3].

Однако вопрос о механизме выхода ДНК из клеток (разумеется, здесь и далее имеются в виду лизированные клетки) в щелочных условиях до сих пор остается открытым, а следовательно, осложняется интерпретация полученных результатов. Во-первых, не вполне понятна природа ДНК, формирующей хвост кометы в денатурирующих условиях электрофореза. В принципе, при кометном электрофорезе хвост кометы формируется релаксированными петлевыми доменами и/или линейными фрагментами ДНК, либо сохранившимися (одним своим концом) связь с ядерным матриксом, либо утратившими ее [4]. Недавно мы представили доказательства релаксации петлевых доменов вследствие одноцепочечных разрывов как главного механизма выхода ДНК при нейтральном кометном электрофорезе [5]. В условиях же щелочного электрофореза из клетки должны выходить одонитевые молекулы ДНК — до какой степени при этом можно говорить о петлевых доменах, остается непонятным. Во-вторых, достоверно неизвестно влияние щелочи на частоту индукции разрывов в АП-сайтах. Какое минимальное время необходимо для такой индукции, зависит ли количество разрывов в АП-сайтах от длительности выдержки препаратов в щелочи, продолжается ли образование разрывов во время проведения электрофореза при высоких значениях pH —

все эти вопросы остаются без ответа. При этом рекомендуемое эмпирически подобранное время преинкубации препаратов в щелочи, необходимое для денатурации ДНК, и длительность электрофореза при высоких значениях рН варьируют в значительных пределах (от 10 до 40 мин и более) [2, 3, 6].

Одним из способов снять вопросы об особенностях выхода ДНК в денатурирующих условиях, сохранив при этом возможность индукции разрывов в АП-сайтах, могло бы являться проведение нейтрального электрофореза после предварительной выдержки препаратов в щелочи. В настоящей работе мы реализовали такой подход. Полученные результаты свидетельствуют о том, что предварительная обработка щелочью, по-видимому, нарушает связь петлевых доменов с матриксом. Это позволяет, во-первых, высказать предположение о природе такой связи, а во-вторых, сделать вывод, что при щелочном электрофорезе в отличие от нейтрального из клетки выходят линейные фрагменты ДНК, которые силой электрического поля вытягиваются из уже не связанного с матриксом клубка.

Материалы и методы. В опытах использовали лимфоциты человека, выделенные из цельной крови с помощью стандартного набора для выделения лимфоцитов (раствор Хенкса, градиент плотности фиколл-верографина, «Реакомплекс», Россия) в соответствии с рекомендациями изготовителя. Суспензию лимфоцитов дважды промывали раствором 0,15 М NaCl, сохраняя лимфоциты в 0,5 мл раствора после последней отмывки. Для приготовления препаратов-слайдов 50 мкл полученной суспензии лимфоцитов смешивали со 100 мкл 1%-ной легкоплавкой агарозы («Sigma», США) и 25 мкл смеси наносили на предметное стекло, покрытое слоем 1%-ной тугоплавкой агарозы. Лизис клеток проводили в буфере: 2,5 М NaCl, 100 мМ ЭДТА, 10 мМ Tris-HCl (рН 8,0), 1 % Triton X-100 («Ferak», Германия), который добавляли непосредственно перед использованием буфера. В лизирующем буфере слайды находились не менее 1 сут при температуре 4 °С.

Электрофорез в нейтральных условиях проводили в буфере TBE: 89 мМ Tris, 89 мМ H₃BO₃, 2 мМ ЭДТА (рН 7,5). Для денатурации

ДНК перед электрофорезом слайды выдерживали при 4 °С в щелочном буфере (300 мМ NaOH, 1 мМ ЭДТА, рН > 13) 10, 20, 30 или 40 мин. Кроме того, нейтральный электрофорез проводили в буфере TBE без предварительной выдержки слайдов в щелочном буфере. Щелочной электрофорез осуществляли в щелочном буфере с предварительной выдержкой препаратов в нем же. После щелочного электрофореза слайды трижды отмывали нейтрализующим буфером (0,4 М Tris-HCl, рН 7,5).

Максимальная длительность электрофореза (при 4 °С, напряженности 1 В/см и силе тока 300 мА) составляла 80 мин. Несколько предметных стекол со слайдами помещали в электрофоретический аппарат, и для измерения кинетики образования комет слайды извлекали из аппарата с интервалом в 10 мин.

Препараты окрашивали красителем DAPI («Sigma», США) и анализировали при помощи флуоресцентного микроскопа Люмам РЗ («ЛОМО», Россия). Оценивали частоту клеток с кометами на 100 лизированных клеток.

Результаты исследований и их обсуждение. При нейтральном электрофорезе без предварительной выдержки препаратов в щелочи доля клеток с кометами зависит от длительности электрофореза, а кинетика выхода ДНК соответствует описанной нами ранее: доля комет сохраняется на низком уровне до 30-й минуты электрофореза, после чего начинает возрастать и достигает практически 100 % через 80 мин (рис. 1). Наиболее резкое возрастание частоты комет наблюдается между 40 и 60 мин электрофореза.

При условии преинкубации клеток в щелочном буфере (независимо от времени инкубации от 10 до 40 мин) с последующим нейтральным электрофорезом выход комет не происходил даже при значительной длительности электрофореза (1 ч и более) (рис. 1). Таким образом, предшествующая электрофорезу обработка препаратов щелочью делает выход ДНК из клеток невозможным. Однако при проведении щелочного электрофореза после такой же преинкубации в щелочи выход ДНК в хвост кометы, в согласии с многочисленными данными других авторов, весьма эффективен (рис. 2). При этом кинетика образования комет зависит от длительности преинкубации,

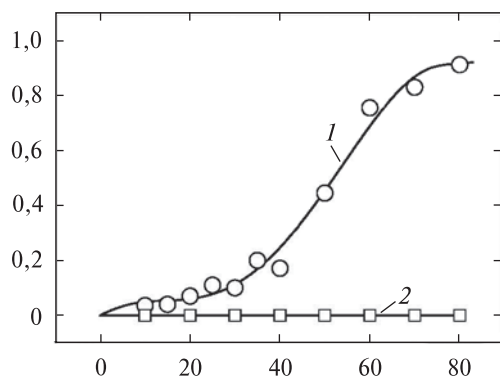


Рис. 1. Кинетика образования комет при нейтральном электрофорезе без (1) и после (2) предварительной выдержки клеток в щелочи: по вертикали – доля клеток с кометами, по горизонтали – время, мин. Точки представляют собой усредненные данные пяти независимых экспериментов

что подтверждает данные работы [6]. После предварительной инкубации клеток в щелочи в течение 20 и 40 мин мы получили схожие зависимости (на рис. 2 приведена усредненная доля клеток с кометами для этих двух вариантов инкубации): наиболее резкое увеличение числа клеток с кометами происходит на 20–40-й минуте электрофореза. Преинкубация клеток в щелочи в течение 10 мин приводит к несколько более медленному нарастанию доли комет – резкое увеличение наблюдается между 40 и 60 мин (рис. 2). Таким образом, при щелочном электрофорезе в отличие от нейтрального предварительная инкубация препаратов в щелочи не вызывает затруднения выхода ДНК в хвост кометы.

Как было показано в нашей предыдущей работе, в нейтральных условиях хвост кометы представляет собой главным образом вытянутые под действием электрического поля петлевые домены ДНК [5]. На ранних стадиях электрофореза хвост формируется релаксированными петельными доменами, содержащими хотя бы один одноцепочечный разрыв (ник) на петлю, а также линейными фрагментами ДНК, которые закреплены на ядерном матриксе (рис. 3). Выходя из клетки, эти фрагменты и петли преодолевают только сопротивление агарозы, так что для образования комет достаточно незначительной длительности электрофореза. Количество таких фрагментов

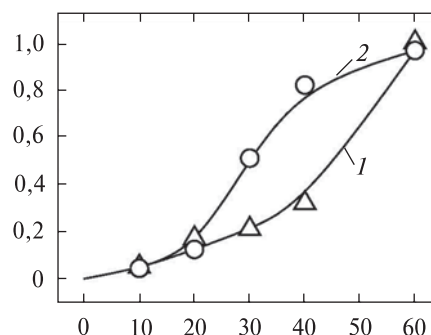


Рис. 2. Кинетика образования комет при щелочном электрофорезе после предварительной инкубации в щелочном буфере: по вертикали – доля клеток с кометами, по горизонтали – время, мин; 1 – инкубация в течение 10 мин; 2 – средние значения для инкубации в течение 20 и 40 мин

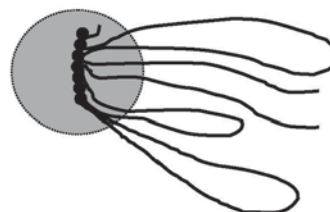


Рис. 3. Схематическое изображение клеток с кометами в условиях нейтрального электрофореза. Хвост кометы сформирован релаксированными петельными доменами и/или линейными фрагментами ДНК, прикрепленными к ядерному матриксу

и петель в интактных клетках невелико и относительно постоянно – соответственно, не наблюдается существенного увеличения доли комет с 10-й по 40-ю минуту (рис. 1). Продолжение электрофореза приводит к выходу из клетки петельных доменов, которые не содержат ников. Таким петлям для образования зоны хвоста кометы, кроме сопротивления агарозы, необходимо преодолеть собственное торсионное напряжение – отрицательную сверхспирализацию, возникшую после лизиса клеток и удаления белков хроматина [7].

Совершенно ясно, что фиксация хотя бы одного конца петельного домена или крупного по размеру линейного фрагмента ДНК на белках ядерного матрикса является необходимым условием образования хвоста кометы, связанного с основной частью нуклеоида. В противном случае огромная по размеру молекула (ДНК целой хромосомы) должна была бы

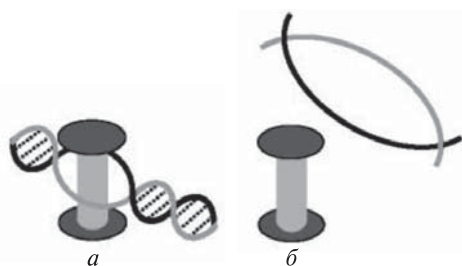


Рис. 4. Модель связи белков ядерного матрикса с ДНК в основании петельных доменов, адаптированная из работы [13]: *а* – нативная ДНК; *б* – ДНК после денатурации

мигрировать сплошным фронтом – понятно, что такая миграция вряд ли возможна. Потому что в большинстве протоколов по использованию кометного электрофореза условия лизиса клеток таковы, что при удалении всех белков хроматина белки ядерного матрикса остаются связанными с ДНК [1, 2, 8].

Отсутствию выхода ДНК из клеток, которое наблюдается в опыте при выдержке препаратов в щелочи перед нейтральным электрофорезом, можно дать два возможных объяснения: обработка щелочью либо создает дополнительные торсионные напряжения в петле, либо освобождает ДНК от связи с матриксом. В нашем эксперименте предшествующая нейтральному электрофорезу обработка клеток щелочным буфером, вызывая локальную денатурацию ДНК в закрепленном на ядерном матриксе интактном петельном домене, тем самым действительно должна приводить к возникновению дополнительного напряжения, компенсирующего такую локальную раскрутку двойной спирали. Однако, во-первых, после обработки клеток щелочным буфером слайды помещают в буфер с нейтральным рН, в результате чего происходит ренатурация ДНК и устранение возникшего дополнительного напряжения в петле, а во-вторых, индуцированные выдержкой в щелочи ники в АП-сайтах должны приводить к релаксации части петельных доменов и возникновению линейных одноцепочечных фрагментов ДНК. Действительно, наши результаты указывают на высокую эффективность выхода ДНК и зависимость доли комет от длительности преинкубации препаратов в щелочи при последующем щелочном электрофорезе (рис. 2). Таким образом, остается одно

объяснение: нарушение щелочью связи петельного домена с белками ядерного матрикса.

После лизиса клеток свободная от нуклеосом ДНК сохраняет связь с матриксом в основании петельных доменов. Механизм такой прочной связи до сих пор не ясен, однако известно, что связанная с матриксом ДНК отличается повышенным АТ-содержанием и, следовательно, пониженной стабильностью двойной спирали [9, 10]. При этом матрикс-ассоциированные зоны отличаются чувствительностью к нуклеазам, специфичным к одноцепочечной ДНК [11], и повышенной способностью к раскручиванию двойной спирали под действием отрицательной сверхспирализации [10, 12]. Особо прочно связанная с матриксом ДНК может быть отделена от белков матрикса только при весьма экстремальных воздействиях – при обработке высокими концентрациями мочевины и LiCl при высокой температуре [13].

Авторы работы [13] высказали предположение о топологической природе связи между ДНК и матриксом: белки ядерного матрикса, имея форму заклепки, располагаются внутри спирали ДНК, интеркалируя в нее (рис. 4, *а*). Прочная структура дуплекса с обеих сторон от заклепки стабилизирует такое взаимодействие, и в нативных условиях петельные домены прочно закреплены на ядерном матриксе. Фиксация обоих концов петельных доменов обеспечивает возможность выхода петель в направлении анода, фиксация одного конца – эффективное движение линейного фрагмента (рис. 3). При выдержке клеток в щелочи дуплекс денатурирует, и белки матрикса получают способность диссоциировать, а молекулы хромосомных ДНК теряют доменную организацию (рис. 4, *б*). Следовательно, после ренатурации ДНК, которая происходит при проведении нейтрального электрофореза, каждая хромосома представляет собой огромную по размеру двунитевую молекулу ДНК, выход которой к аноду через поры агарозного геля невозможен.

При щелочном электрофорезе ДНК, утрачившая связь с матриксом, находится в одноцепочечном состоянии. При этом после электрофореза и нейтрализации препаратов ДНК в хвосте кометы (в отличие от ядра) остается одноцепочечной [14], т.е. в денатурирующей

условиях электрофореза формирование зоны хвоста кометы осуществляется за счет движения к аноду линейных одностранных фрагментов: разрывы в щелочеллабильных сайтах создают сравнительно большое количество концов полинуклеотидных цепей, за которые эти цепи вытягиваются из уже не связанного с матриксом клубка силой электрического поля.

Таким образом, механизмы выхода ДНК при нейтральном и щелочном кометном электрофорезе существенно различны. Нейтральный вариант следует признать более чувствительным методом для оценки незначительного количества разрывов в ДНК: достаточно одного одноцепочечного разрыва на петлю для облегчения ее выхода за счет релаксации. Щелочной электрофорез позволяет выявить большое количество денатурированных линейных фрагментов, появляющихся как в результате собственно разрывов, так и отражающих содержание АП-сайтов.

K.S. Afanasieva, M.O. Zazhytska, A.V. Sivolob

MECHANISMS OF DNA EXIT DURING NEUTRAL AND ALKALINE COMET ASSAY

The results are presented on comparison of the kinetics of DNA exit during neutral and alkaline variants of single cell gel electrophoresis. It has been shown that pre-incubation of samples in alkaline buffer makes impossible DNA exit during the neutral electrophoresis, in contrast to the alkaline conditions where DNA exit is very efficient. The conclusion has been made that the alkaline conditions induce a disruption of DNA matrix interactions. The hypothetical nature of these interactions is discussed. The results obtained suggest that the mechanisms of DNA exit in the course of neutral and alkaline electrophoresis are essentially different. In the case of the neutral electrophoresis the comet tails are formed by the relaxed loop domains while during the alkaline electrophoresis they are formed by single stranded DNA fragments, which are pulled out by one and from the coil that is not bound to the matrix.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Collins A. R.* The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations // *Mol. Biotechnol.* – 2004. – **26**. – P. 249–261.
2. *Olive P. L.* The comet assay. An overview of techniques // *Meth. Mol. Biol.* – 2002. – **203**. – P. 179–194.
3. *Møller P.* The alkaline comet assay: towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures // *Basic and Clin. Pharmacol. and Toxicol.* – 2006. – **98**. – P. 336–345.
4. *Collins A. R., Oscoz A. A., Brunborg G., Gaivao I., Giovannelli L., Kruszewski M., Smith C. C., Stetina R.* The comet assay: topical issues // *Mutagenesis.* – 2008. – **23**. – P. 143–151.
5. *Афанасьева К.С., Шувалова Т.А., Зажицкая М.О., Сиволоб А.В.* Обратимость выхода петель ДНК при «кометном» электрофорезе изолированных клеток // *Біополімери і клітина.* – 2008. – **24**. – С. 105–111.
6. *Yendle J.E., Tinwell H., Elliott B.M., Ashby J.* The genetic toxicity of time : Importance of DNA-unwinding time to the outcome of single-cell gel electrophoresis assays // *Mutat. Res.* – 1997. – **375**. – P. 125–136.
7. *Cook P.R., Brazell I.A., Jost E.* Characterization of nuclear structures containing superhelical DNA // *J. Cell Sci.* – 1976. – **22**. – P. 303–324.
8. *Hartmann A., Agurell E., Beevers C., Brendler-Schwaab S., Burlinson B., Clay P., Collins A., Smith A., Speit G., Thybaud V., Tice R.R.* Recommendations for conducting the in vivo alkaline comet assay // *Mutagenesis.* – 2003. – **18**. – P. 45–51.
9. *Kohwi-Shigematsu T., Kohwi Y.* Torsional stress stabilizes extended base unpairing in suppresser sites flanking immunoglobulin heavy chain enhancer // *Biochemistry.* – 1990. – **29**. – P. 9551–9560.
10. *Bode J., Kohwi Y., Dickinson L., Joh T., Klehr D., Mielke C., Kohwi-Shigematsu T.* Biological significance of unwinding capability of nuclear matrix-associating DNAs // *Science.* – 1992. – **255**. – P. 195–197.
11. *Probst H., Herzog R.* DNA regions associated with the nuclear matrix of Ehrlich ascites cells expose single-stranded sites after deproteinization // *Eur. J. Biochem.* – 1985. – **146**. – P. 167–171.
12. *Dickinson L.A., Joh T., Kohwi Y., Kohwi-Shigematsu T.* A tissue-specific MAR/SAR DNA-binding protein with unusual binding site recognition // *Cell.* – 1992. – **70**. – P. 631–645.
13. *Lichtenstein A.V., Zaboikin M.M., Sjakste N.I., Alechina R.P.* Differential dissociation of chromatin digests: a novel approach revealing a hierarchy of DNA-protein interactions within chromatin domains // *J. Cell Sci.* – 1991. – **99**. – P. 603–513.
14. *Collins A.R., Dobson V.L., Dusinska M., Kennedy G., Stetina R.* The comet assay: what can it really tell us? // *Mutat. Res.* – 1997. – **375**. – P. 183–193.

Поступила 17.11.08