

УДК 577.323:576.08

ИНТЕРКАЛЯЦИЯ ПРОТЕИНОВ В ДНК КАК ОДИН ИЗ ОСНОВНЫХ СПОСОБОВ ФИКСАЦИИ НАИБОЛЕЕ СТАБИЛЬНЫХ ПЕТЕЛЬНЫХ ДОМЕНОВ ХРОМАТИНА

М. И. ЧОПЕЙ, К. С. АФАНАСЬЕВА, А. В. СИВОЛОБ

Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Украина;
e-mail: aphon@ukr.net; sivolob@univ.kiev.ua

Основным механизмом формирования трека ДНК при кометном электрофорезе нуклеоидов, получаемых после лизиса клеток с удалением мембран и большинства протеинов, является вытягивание к аноду отрицательно сверхспирализованных петельных доменов ДНК, закрепленных на протеинах, остающихся в нуклеоиде после лизиса. И состав этих остаточных протеиновых структур, и природа их особо прочной связи с основаниями петельных доменов остаются до сих пор неизученными. В данной работе мы исследовали влияние хлорокина, интеркалирующего в двойную спираль ДНК, а также агентов, вызывающих денатурацию протеинов, на эффективность формирования трека ДНК при кометном электрофорезе нуклеоидов. Полученные результаты свидетельствуют, что даже незначительная денатурация протеинов вызывает существенное снижение эффективности миграции петель за счет увеличения их размера. Аналогичный эффект наблюдается при индукции локальной раскрутки ДНК в сайтах интеркаляции хлорокина. Обсуждается возможность топологического характера связи оснований петель ДНК с протеинами нуклеоида, при котором протеины интеркалируют в двойную спираль.

Ключевые слова: нуклеоид, петельные домены ДНК, кометный электрофорез, хлорокин, денатурация протеинов.

Исследования пространственной организации интерфазных хромосом однозначно указывают на существование в клеточном ядре относительно автономных хроматиновых структур – петельных (или топологических) доменов [1–6]. Механизмы формирования таких топологически обособленных друг от друга петель в клеточном ядре разнообразны – образование петель может быть результатом взаимодействия регуляторных элементов транскрипционной машинерии [2, 3], конститутивных контактов участков ДНК и структурных протеинов клеточного ядра (протеинов ламинны и нуклеоплазмы) [4, 5], случайных контактов между участками хроматиновой фибриллы в результате ее диффузии в пространстве ядра [6]. Такое разнообразие причин возникновения петель приводит к разнообразию петель как таковых: их количество, размер и сам факт появления в ядре зависят от типа клетки, ее транскрипционной активности, фазы клеточного цикла и т.д. [7, 8].

Одним из вопросов, возникающих при исследовании топологических доменов, является вопрос о механизмах фиксации оснований петель на тех или иных протеиновых структурах ядра: на сегодняшний день неизвестными остаются как протеины, обеспечивающие прикрепление петель, так и тип их взаимодействия с ДНК. Долгое время основной моделью, описывающей взаимодействие петельных доменов хроматина с субъядерными протеиновыми структурами, была модель ядерного матрикса, согласно которой концы петель жестко закрепляются на протеиновых филаментах, пронизывающих пространство ядра [4, 9]. Однако высокая скорость диффузии протеинов и молекул РНК в объеме ядра, а также тот факт, что детальный молекулярный состав компонентов ядерного матрикса до сих пор неизвестен, свидетельствуют против наличия в ядре разветвленной сетки протеиновых филаментов. Скорее всего точками крепления петель ДНК в клеточном ядре являются не конститутивные протеиновые

тяжи, протянутые от одной части ядра к другой, а разнообразные по своей природе и весьма динамичные протеиновые комплексы, связь которых с основаниями доменов при этом довольно прочна [10, 11].

Одним из свидетельств в пользу наличия таких протеиновых структур, служащих «креплениями» для петель ДНК, является образование гало вокруг ядра после обработки иммобилизованных в агарозе клеток детергентами в присутствии высоких концентраций соли [12]. Такая обработка лишает клетку большинства мембран и хроматиновых протеинов, однако при этом сохраняется прочная связь части петельных доменов (наиболее стабильных) с остаточными ядерными структурами, которые оказываются нечувствительными к подобным условиям лизиса. В процессе лизиса петли ДНК (отрицательно сверхспирализованные в результате диссоциации гистонов) диффундируют в поры агарозы, что и обеспечивает формирование гало [12].

Анализ выхода ДНК из полученных путем подобного лизиса клеток (нуклеоидов), лежит в основе метода кометного электрофореза (электрофореза ДНК изолированных клеток) [13, 14]. В наших предыдущих работах, сосредоточенных на механизмах формирования электрофоретического трека ДНК (хвоста кометы) при данном типе электрофореза, мы показали, что при нейтральных значениях рН к аноду мигрируют сверхспирализованные петли ДНК, а обязательным условием выхода является фиксация концов петель на протеинах, формирующих нуклеоид [15, 16]. При этом эффективность миграции петель зависит от уровня их сверхспирализации: добавление интеркалирующих агентов (бромистого этидия или хлорокина) в концентрациях, соответствующих релаксации петель, существенно облегчает формирование хвоста кометы; дальнейшее увеличение концентраций и преодоление точки релаксации приводит к накоплению положительной сверхспирализации и соответственно к затруднению миграции петель. Это затруднение сопровождается двумя эффектами: собственно торможением выхода ДНК и уменьшением максимально возможной ее доли в хвосте кометы [16, 17]. Если первый эффект можно объяснить постепенным накоплением в петлях торсионных напряжений, возникающих при высокой плотности связывания интеркаляторов с двойной спиралью, и наличи-

ем у интеркаляторов положительного заряда, то причины снижения максимально возможного выхода ДНК остаются неизвестными.

В этой статье представлены доказательства того, что основной причиной снижения доли ДНК в хвостах комет в присутствии высоких концентраций интеркаляторов является нарушение связи между основаниями петель ДНК и протеинами нуклеоида. В наших экспериментах исследовалась эффективность формирования трека ДНК при электрофорезе нуклеоидов, обработанных мочевиной и DSNa, а также в присутствии высоких концентраций хлорокина. Полученные результаты свидетельствуют о том, что даже незначительная денатурация протеинов нуклеоида вполне достаточна для существенного снижения максимально возможной доли ДНК в «хвостах комет» (аналогичный эффект наблюдается при добавлении хлорокина в высоких концентрациях). Одновременно со снижением этого показателя, уменьшается и размер петель, мигрирующих к аноду в конце электрофореза. Это позволяет сделать вывод, что нарушение в участках прикрепления петель протеин–протеиновых взаимодействий при действии денатурирующих агентов или ДНК–протеиновых взаимодействий при локальной раскрутке двойной спирали за счет интеркаляции приводит к увеличению размера петельных доменов, что делает невозможным их выход в поры агарозного геля. Полученные результаты также позволяют предположить природу особо прочной связи между основаниями петельных доменов ДНК и протеинами нуклеоида.

Материалы и методы

В работе использовали лимфоциты здоровых доноров, которые получали из цельной крови путем центрифугирования в градиенте плотности Histopaque 1077 (Sigma, США). Выделенные клетки отмывали два раза в растворе Хенкса и сразу после промывки 50 мкл полученной суспензии смешивали со 100 мкл 1%-й легкоплавкой агарозы при температуре 37 °С; 20 мкл смеси наносили на предметное стекло, предварительно покрытое слоем 1%-й тугоплавкой агарозы. После полимеризации агарозы, полученные таким образом слайды (заплавленные в агарозу клетки на предметных стеклах) переносили в охлажденный до 4 °С лизирующий буфер: 2,5 М NaCl, 100 мМ EDTA, 10 мМ трис-HCl

(рН 8,0), 1% тритон X-100 (Ferak, ФРГ), который добавляли непосредственно перед использованием буфера. Лизис проводили при 4 °С в течение 2 часов.

После лизиса слайды дважды отмывали в буфере TBE (89 мМ трис, 89 мМ H_3BO_3 , 2 мМ EDTA, рН 7,5). Для денатурации протеинов нуклеоида слайды затем выдерживали при температуре 4 °С 30 мин в следующих растворах: (1) в растворе мочевины разных концентраций; (2) в буфере, содержащем DSNa (40 мМ трис-HCl (рН 7,5), 120 мМ NaCl, 0,1% тритон X-100, 0,3% DSNa). После инкубации слайды снова отмывали дважды в буфере TBE.

Несколько слайдов помещали в горизонтальный электрофоретический аппарат, электрофорез проводили в буфере TBE при 4 °С при напряженности 1 В/см, силе тока 300 мА. В некоторых экспериментах в электрофоретический буфер добавляли хлорокин в разных концентрациях. Концентрацию хлорокина в маточном растворе определяли спектрофотометрически. Для измерения кинетики образования комет слайды извлекали из аппарата через разные проме-

жутки времени для последующего анализа, для чего их окрашивали в растворе 1,3 мкг/мл флуоресцентного красителя DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, Sigma, США), анализировали под люминесцентным микроскопом (ЛОМО, СССР), соединенным с цифровой фотокамерой Canon EOS 1000D. Фотографировали случайно выбранные 100–200 клеток, полученные изображения анализировали с помощью пакета программ CometScore (TriTek Corp., США), определяя долю ДНК в хвостах комет и длину хвостов.

Результаты и обсуждение

Кривая кинетики выхода ДНК из нуклеоидов, полученных путем стандартного лизиса интактных лимфоцитов, имеет двухступенчатый характер (рис. 1, а). На первом этапе (примерно до 30-й минуты электрофореза) в хвост кометы выходит небольшое количество ДНК, относительная доля которой не превышает 1/10 от содержащейся в нуклеоиде. Выход большей части ДНК наблюдается примерно между 30 и 50 минутами электрофореза, после чего относительное содержание ДНК в хвостах остается посто-

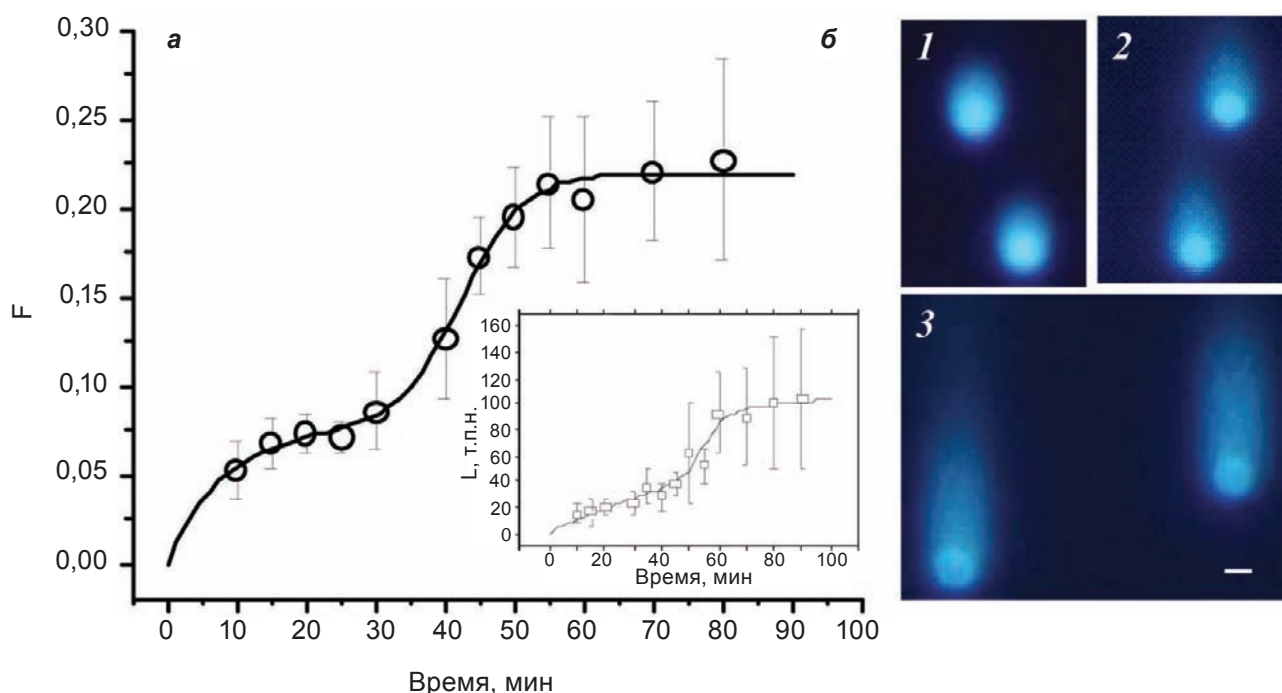


Рис. 1. а: зависимость относительного содержания F ДНК в хвостах комет и среднего значения конформной длины L в тысячах пар нуклеотидов (т.п.н.) наиболее длинных петель ДНК в хвосте (на вставке) от времени электрофореза; б: типичные изображения нуклеоидов после двадцатой (1), сороковой (2) и шестидесятой (3) минуты электрофореза. Сплошные кривые – результат интерполяции, приведенные погрешности (здесь и на всех рисунках ниже) – стандартные отклонения.

янным (среднее значение доли ДНК в хвостах на верхнем плато кинетической кривой составляет 0,22).

Как было упомянуто выше, при электрофорезе интактных нуклеоидов в условиях нейтральных значений pH хвост кометы формируют петли ДНК, концы которых зафиксированы на довольно стабильных протеиновых структурах, остающихся в нуклеоиде даже после лизиса клеток. В предыдущих работах [16–18] мы показали, что нижнее плато кинетической кривой сформировано петлями, предположительно находящимися на поверхности нуклеоида и релаксированными за счет наличия в них однонитевых разрывов ДНК, что весьма характерно для терминально дифференцированных клеток. Верхнее плато формируют сверхспирализованные петли, выход которых существенно зависит от уровня их торсионных напряжений [16–18].

Анализ длины хвоста кометы позволяет приблизительно оценить максимальный размер петель, способных выйти к аноду на данный момент времени электрофореза (размер петель в парах нуклеотидов определяется как удвоенная длина хвоста, разделенная на 0,34 нм – длина, приходящаяся на одну пару). Вначале (нижнее плато) хвост формируется петлями ДНК, не превышающими по размеру 25 т.п.н. (тысяч пар нуклеотидов), выход более длинных петель, до 100 т.п.н., наблюдается только в конце электрофореза (вставка на рис. 1, а, типичные примеры комет в разное время электрофореза представлены на рис. 1, б). При этом максимальный размер петель, для которых выход в принципе возможен, не превышает 180 т.п.н. Видимо, такой размер представляет собой предел разрешения метода. Именно таким ограничением метода в отношении размера петельных доменов объясняется, вероятно, тот факт, что, независимо от длительности электрофореза, хвост кометы формирует лишь приблизительно 25% ДНК от содержащейся в нуклеоиде: большая часть петель просто слишком велика по размеру и их миграция в геле невозможна.

Добавление в электрофоретический буфер хлорокина в концентрациях, превышающих 50 мкг/мл, приводит к снижению среднего значения доли ДНК в хвостах комет на верхнем плато (называемого далее уровнем насыщения), причем эффективность такого снижения зависит от концентрации интеркалятора (рис. 2). Ло-

гично предположить, что снижение уровня насыщения в присутствии высоких концентраций хлорокина связано с увеличением количества петель, размер которых превышает разрешающую способность агарозного геля – другими словами, способных к миграции петель становится все меньше.

Такое перераспределение петель по длине было бы невозможным при абсолютно жесткой фиксации их концов на протеинах нуклеоида. Увеличение размера части петельных доменов можно достичь только одним путем: нарушив связь оснований петель ДНК с протеинами, к которым они крепятся. Это приведет к тому, что несколько небольших петель, расположенных рядом, сформируют одну, размер которой не позволит ей мигрировать в порах агарозы. Наиболее простым способом индуцировать такое «отстегивание» петель является денатурация тех протеинов, которые служат платформой для их прикрепления (см. рис. 5, а).

В нашей работе мы исследовали кинетику формирования трека ДНК при электрофорезе нуклеоидов, обработанных мочевиной в концентрациях от 1 до 8 М либо 0,3% DSNa. В полном соответствии с нашим предположением, обработка нуклеоидов DSNa приводит к существенному снижению уровня насыщения по сравнению с контролем – максимально возможная доля ДНК в хвостах комет составляет приблизительно

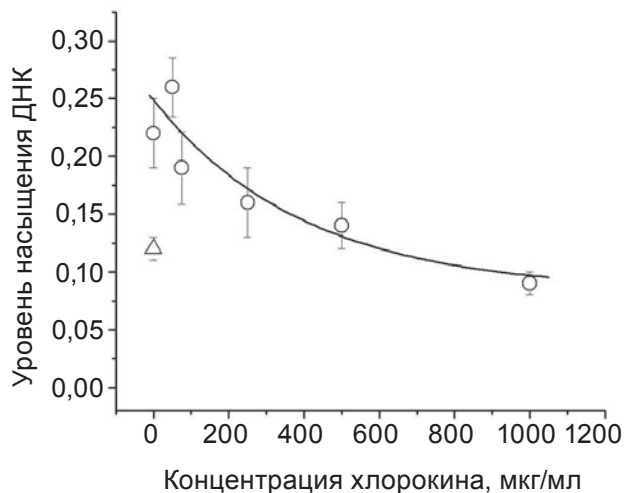


Рис. 2. Максимальная доля ДНК в хвостах комет (уровень насыщения) как функция концентрации хлорокина (○). Приведено также значение уровня насыщения при обработке нуклеоидов 8 М мочевиной или 0,3% DSNa (Δ)

но 0,12 (это значение совпадает с таковым при электрофорезе нуклеоидов в присутствии хлорокина в концентрации 1 мг/мл) (рис. 3, см. также рис. 2). Подобный результат также получен и при исследовании кинетики выхода ДНК после инкубации лизированных клеток в 8 М мочевины. Интересным представляется тот факт, что при обработке нуклеоидов раствором мочевины, как и в случае хлорокина, уровень насыщения обратно пропорционален концентрации денатуранта. Выдержка нуклеоидов в 4 М растворе мочевины снижает уровень насыщения до 0,14, что соответствует концентрации хлорокина 500 мкг/мл, а в растворе мочевины 2 М – до 0,16 (такой уровень насыщения наблюдается при добавлении хлорокина 250 мкг/мл) (рис. 3, см. также рис. 2). Более низкие концентрации мочевины не влияют на эффективность выхода ДНК в хвост кометы по отношению к контролю. Таким образом, даже незначительная денатурация протеинов, вызывающая, скорее, нарушение протеин-протеиновых взаимодействий, достаточна для существенного снижения максимально возможного выхода ДНК в хвост кометы.

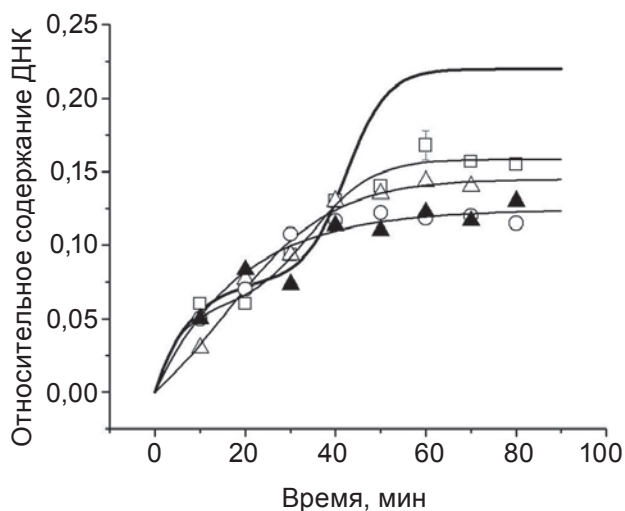


Рис. 3. Относительное содержание ДНК в хвостах комет после обработки нуклеоидов 0,3% DSNa (▲), а также растворами мочевины в концентрациях 2 (□), 4 (Δ) и 8 М (○). Сплошные кривые – результат интерполяции. Для сравнения приведена кинетическая кривая (жирная) в отсутствие денатурантов (рис. 1, а). С целью облегчить восприятие рисунка показана погрешность (типичная) только для одной точки

Наблюдаемое в присутствии денатурантов снижение уровня насыщения сопровождается уменьшением длины хвоста кометы. При обработке нуклеоидов 8 М мочевиной или 0,3% DSNa среднее значение контурной длины наиболее длинных петель ДНК в хвостах в конце электрофореза в среднем составляет ~ 68 т.п.н., при обработке мочевиной в концентрациях 2 и 4 М – приблизительно 86 т.п.н. (рис. 4). При этом в случае обработки нуклеоидов мочевиной в концентрации 2 и 4 М кинетические кривые выхода ДНК имеют двухступенчатый характер, подобный контрольной кривой. В случае обработки нуклеоидов 8 М мочевиной или 0,3% DSNa уровень насыщения достигается в один шаг, при этом относительное содержание ДНК в хвостах комет в конце электрофореза практически совпадает с нижним плато контрольной кривой. Поскольку второй этап выхода ДНК в интактных клетках обусловлен вытягиванием к аноду больших по размеру сверхспирализованных петель ДНК [16, 18], можно предположить, что отсутствие двухступенчатости выхода свидетельствует об исчезновении в нуклеоидах пе-

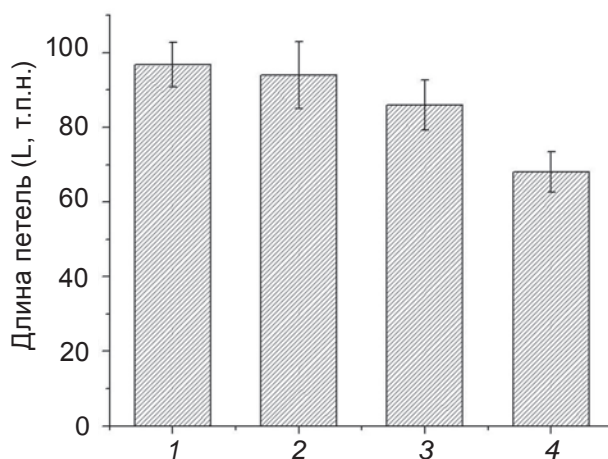


Рис. 4. Средние значения контурной длины наибольших петель ДНК в хвостах комет L в тысячах пар нуклеотидов (т.п.н.) в контрольном эксперименте (1), при добавлении хлорокина в концентрации 1 мг/мл (2), при обработке нуклеоидов растворами мочевины в концентрациях 2 или 4 М (3), а также при обработке нуклеоидов 0,3% DSNa или раствором мочевины в концентрации 8 М (4)

тель подобного типа после сильной денатурации протеина.

Если денатурация протеинов нуклеоида и обусловленное этим нарушение связи между ними и основаниями петель ДНК закономерно приводят как к снижению максимально возможной доли ДНК в хвостах комет, так и к уменьшению длины хвоста по сравнению с контролем, то эффект высоких концентраций хлорокина проявляется практически только в снижении уровня насыщения. Длина наибольших петель в хвостах комет в присутствии максимальной концентрации интеркалятора не сильно отличается от контроля и составляет в среднем ~94 т.п.н. (рис. 4) при относительном содержании ДНК 0,12 (значение, совпадающее с долей ДНК в хвостах после обработки нуклеоидов 0,3% DSNa или 8 М мочевиной). Таким образом, снижение уровня насыщения в присутствии интеркалятора не связано с уменьшением размера петель, выходящих в хвост кометы.

Возникает вопрос: почему один и тот же эффект снижения уровня насыщения в случае денатурации протеинов сопровождается умень-

шением длины хвоста кометы, а в случае интеркаляции хлорокина – нет? Чтобы ответить на этот вопрос, необходимо рассмотреть, каким образом взаимодействие хлорокина с ДНК может приводить к нарушению связи между протеинами нуклеоида и основаниями петельных доменов. Как и другие интеркалирующие агенты, хлорокин, взаимодействуя с двойной спиралью, локально раскручивает ее в сайтах интеркаляции [19]. В случае, когда взаимодействие хлорокина с ДНК происходит в сайте присоединения петли к протеинам нуклеоида, такая раскрутка может способствовать нарушению связи и «отстегиванию» части петель от участков их прикрепления. Также, как и при денатурации протеинов, это приводит к увеличению размера петель до такой степени, что делает невозможным их выход при электрофорезе (рис. 5, б). Однако при денатурации протеинов исчезают, по-видимому, практически все закрепленные на них петлевые домены, что приводит к синхронному снижению и доли ДНК в хвостах, и длины хвостов. Вероятно, остаточные короткие хвосты после воздействия денатурантов в вы-

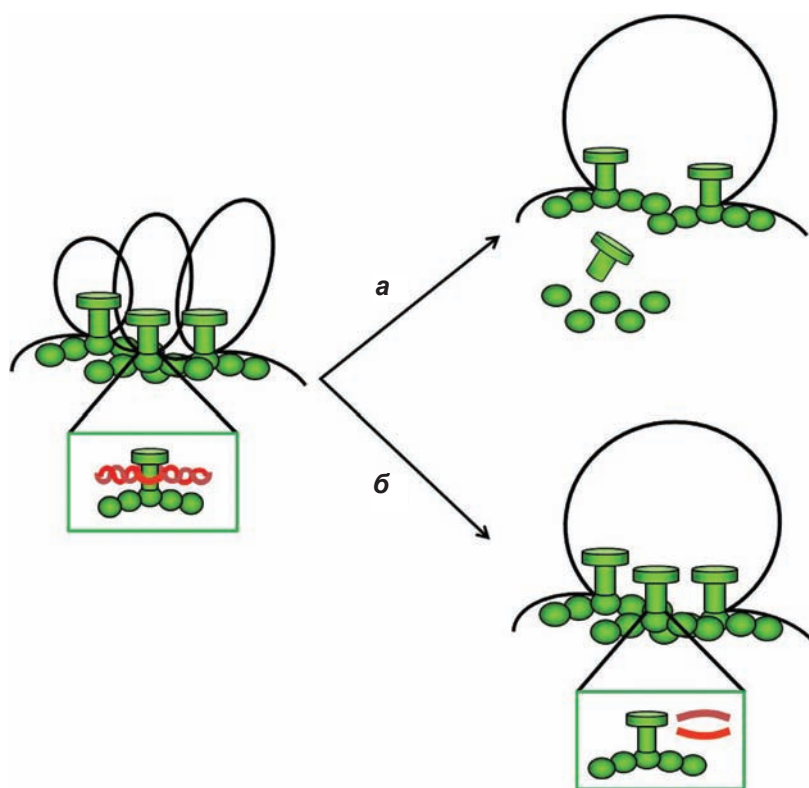


Рис. 5. Модель прикрепления оснований петельных доменов ДНК к протеинам нуклеоида и нарушение связи между ними в результате денатурации протеинов нуклеоида (а) или локальной раскрутки ДНК (б)

соких концентрациях сформированы поверхностной ДНК, которая уже вообще ни на чем не закреплена и вытягивается с поверхности нуклеоида под действием силы электрического поля. В отличие от эффекта денатурации протеинов, воздействие интеркаляторов приводит к «отстеживанию» только части петель. Поскольку доля ДНК в хвостах в присутствии высоких концентраций интеркалятора снижается так же, как и в условиях полной денатурации протеинов, эта часть чувствительных к интеркалятору петель весьма значительна. Тем не менее, при этом остаются достаточно длинные петли, которые обеспечивают сохранение длины хвоста на уровне контрольных значений (следует подчеркнуть, что доля ДНК в хвосте характеризует общее содержание вытянутой при электрофорезе ДНК, а длина хвоста – только контурную длину максимально больших петель, способных двигаться в агарозе).

Необходимость раскрутки ДНК для отсоединения части петельных доменов от связанных с их основаниями протеинов позволяет предположить особый – топологический – характер такой связи: протеины нуклеоида располагаются внутри двойной спирали ДНК, интеркалируя в нее (рис. 5). Очевидно, что интеркаляция хлорокина в основания петель и индуцированная этим локальная раскрутка дуплекса приводят к «отстеживанию» тех (и только тех) петельных доменов, связь которых с протеинами нуклеоида обеспечивается таким способом. В случае, если фиксация петли на протеинах обеспечена другими типами связей, влияние интеркалятора отсутствует: в результате в нуклеоиде остается некоторое количество длинных сверхспирализованных петель, выход которых наблюдается в конце электрофореза. Следует еще раз отметить, что вклад этих длинных петель в формирование хвоста кометы в присутствии высоких концентраций хлорокина незначителен, поскольку доля ДНК остается на довольно низком уровне. Низкое содержание ДНК в хвосте, в свою очередь, может быть свидетельством того, что большая часть петель взаимодействует с протеинами нуклеоида именно за счет топологической связи.

Таким образом, представленные результаты указывают на то, что отсоединение оснований петель ДНК от протеинов нуклеоида довольно эффективно происходит даже при незначительной их денатурации. Вероятно, такая денатурация протеинами, приводит к наруше-

нию взаимодействий между ними, служащими средством крепления петель в ядре. Подобный эффект «отстеживания» петель также индуцируется вызванной интеркаляцией хлорокина локальной раскруткой ДНК в сайте взаимодействия с протеинами, что позволяет предположить топологическую связь – протеины интеркалируют в двойную спираль, стабилизируя основания петельных доменов. Независимо от того, чем вызвано нарушение связи между основаниями петель ДНК и протеинами, с которыми они взаимодействуют, это приводит к существенному увеличению размера оставшихся в нуклеоиде петель, выход которых при электрофорезе становится невозможен.

ІНТЕРКАЛЯЦІЯ ПРОТЕЇНІВ У ДНК ЯК ОДИН З ОСНОВНИХ СПОСОБІВ ФІКСАЦІЇ НАЙСТАБІЛЬНІШИХ ПЕТЕЛЬНИХ ДОМЕНІВ ХРОМАТИНУ

М. І. Чопей, К. С. Афанасьєва, А. В. Сиволоб

Київський національний університет
імені Тараса Шевченка, Україна;
e-mail: aphon@ukr.net; sivolob@univ.kiev.ua

Основний механізм формування треку ДНК за кометного електрофорезу нуклеоїдів, одержаних після лізису клітин із видаленням мембран та більшості протеїнів, полягає у витягуванні до анода негативно надспіралізованих петельних доменів ДНК, закріплених на протеїнах, що залишилися в нуклеоїді після лізису. Як склад цих залишкових протеїнових структур, так і природа їх особливо міцного зв'язку з основами петельних доменів до цього часу залишаються нез'ясованими. У цій роботі ми досліджували вплив хлорокіну, що інтеркалює в подвійну спіраль ДНК, а також агентів, що зумовлюють денатурацію протеїнів, на ефективність формування треку ДНК за кометного електрофорезу нуклеоїдів. Одержані результати свідчать, що навіть незначна денатурація протеїнів спричинює істотне зниження ефективності міграції петель за рахунок збільшення їхнього розміру. Аналогічний ефект має місце під час індукції локального розкручування ДНК у сайтах інтеркаляції хлорокіну. Обговорюється можливість топологічного характеру зв'язку основ петель ДНК із протеїнами нуклеоїда, за якого вони інтеркалюють у подвійну спіраль.

Ключові слова: нуклеоїд, петельні домени ДНК, кометний електрофорез, хлорокін, денатурація протеїнів.

PROTEIN INTERCALATION IN DNA AS ONE OF MAIN MODES OF FIXATION OF THE MOST STABLE CHROMATIN LOOP DOMAINS

M. I. Chopei, K. S. Afanasieva, A. V. Sivolob

Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ukraine;
e-mail: aphon@ukr.net; sivolob@univ.kiev.ua

The main mechanism of DNA track formation during comet assay of nucleoids, obtained after removal of cell membranes and most of proteins, is the extension to anode of negatively supercoiled DNA loops attached to proteins, remaining in nucleoid after lysis treatment. The composition of these residual protein structures and the nature of their strong interaction with the loop ends remain poorly studied. In this work we investigated the influence of chloroquine intercalation and denaturation of nucleoid proteins on the efficiency of electrophoretic track formation during comet assay. The results obtained suggest that even gentle protein denaturation is sufficient to reduce considerably the effectiveness of the DNA loop migration due to an increase in the loops size. The same effect was observed under local DNA unwinding upon chloroquine intercalation around the sites of the attachment of DNA to proteins. The topological interaction (protein intercalation into the double helix) between DNA loop ends and nucleoid proteins is discussed.

Key words: nucleoid, DNA loop domains, comet assay, chloroquine, protein denaturation.

References

1. *Bortle van K., Corces V. G.* Nuclear organization and genome function // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* – 2012. – **28**. – P. 163–187.
2. *Kadauke S., Blobel G. A.* Chromatin loops in gene regulation // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2009. – **1789**. – P. 17–25.
3. *Cook P. R.* A model for all genomes: the role of transcription factories // *J. Mol. Biol.* – 2010. – **395**. – P. 1–10.
4. *Cremer T., Cremer C.* Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells // *Nat. Rev. Genet.* – 2001. – **2**. – P. 292–301.
5. *Malyavantham K. S., Bhattacharya S., Bezrezney R.* The architecture of functional neighborhoods within the mammalian cell nucleus // *Adv. Enzyme Regul.* – 2010. – **50**. – P. 126–134.
6. *Bohn M., Heermann D. W.* Diffusion-driven looping provides a consistent framework for chromatin organization // *PLoS ONE.* – 2010. – **5**. – e12218.
7. *Iarovaia O. V., Lagarkova M. A., Razin S. V.* The specificity of human lymphocyte nucleolar DNA long-range fragmentation by endogenous topoisomerase II and exogenous Bal 31 nuclease depends on cell proliferation status // *Biochemistry.* – 1995. – **34**. – P. 4133–4138.
8. *Vassetzky Y., Hair A., Mechali M.* Rearrangement of chromatin domains during development in *Xenopus* // *Genes Dev.* – 2000. – **14**. – P. 541–552.
9. *Hancock R.* Internal organization of the nucleus: assembly of compartments by macromolecular crowding and the nuclear matrix model // *Biol. Cell.* – 2004. – **96**. – P. 595–601.
10. *Pederson T.* Half a century of “the nuclear matrix” // *Mol. Biol. Cell.* – 2000. – **11**. – P. 799–805.
11. *Hancock R.* A new look at the nuclear matrix // *Chromosoma.* – 2000. – **109**. – P. 219–225.
12. *Cook P. R., Brazell I. A.* Supercoils in human DNA // *J. Cell Sci.* – 1975. – **19**. – P. 261–279.
13. *Olive P. L.* The comet assay. An overview of techniques // *Meth. Mol. Biol.* – 2002. – **203**. – P. 179–194.
14. *Collins A. R., Osoz A. A., Brunborg G., Gaivao I., Giovannelli L., Kruszewski M., Stetina R., Smith C. C.* The comet assay: topical issues // *Mutagenesis.* – 2008. – **23**, N 3. – P. 143–151.
15. *Afanasieva K. S., Zazhytska M. O., Sivolob A. V.* Mechanisms of DNA exit during neutral and alkaline comet assay // *Cytol. Genet.* – 2009. – **43**, N 6. – P. 367–370. (In Russian).
16. *Afanasieva K., Zazhytska M., Sivolob A.* Kinetics of comet formation in single-cell gel electrophoresis: loops and fragments // *Electrophoresis.* – 2010. – **31**. – P. 512–519.

17. *Zazhytska M., Afanasieva K., Chopei M., Vikhрева M., Sivolob A.* Influence of chloroquine on kinetics of single-cell gel electrophoresis // *Biopolymers and Cell.* – 2012. – **28**, N 4. – P. 292–297.
18. *Afanasieva K., Chopei M., Zazhytska M., Vikhрева M., Sivolob A.* DNA Loop Domain Organization as Revealed by Single-Cell Gel Electrophoresis // *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* – 2013. – **1833**, N 4. – P. 3237–3244.
19. *Jones R. L., Lanier A. C., Keel R. A., Wilson W. D.* The effect of ionic strength on DNA–ligand unwinding angles for acridine and quinoline derivatives // *Nucl. Acids Res.* – 1980. – **8**. – P. 1613–1624.

Отримано 22.01.2014