

## МЕТОДЫ

УДК 577.212.3

**ФУТПРИНТИНГ ФЛУОРЕСЦЕНТНО-МЕЧЕНОЙ ДНК  
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГИДРОКСИЛЬНЫХ РАДИКАЛОВ****Н.С. Герасимова<sup>1</sup>, В.М. Студитский<sup>1,2,\*</sup>**

<sup>1</sup> *Кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова; Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;*

<sup>2</sup> *лаборатория эпигенетики рака, Центр исследований рака Фокс Чейз; США, штат Пенсильвания, 19111, г. Филадельфия, просп. Коттмана, д. 333*

*\*e-mail: vasily.studitsky@fcc.edu*

Футпринтинг является одним из наиболее простых и точных методов исследования укладки и взаимодействия биополимеров. Он основан на том, что места внутри- и межмолекулярных контактов оказываются недоступными для внешнего разрушающего воздействия. При проведении эксперимента на один из концов полимера вносится метка, затем проба инкубируется с повреждающим реактивом. По распределению длины продуктов расщепления делаются выводы о доступности его участков в тех или иных условиях. При футпринтинге ДНК применяются различные ферментативные и химические разрезающие агенты. На сегодняшний день наиболее высокое временное и пространственное разрешение без выраженной специфичности по отношению к последовательности нуклеотидов можно получить при использовании гидроксильных радикалов. В работе предлагается новый вариант этого экспериментального подхода с применением флуоресцентного мечения исследуемой ДНК и современных методов последующего количественного анализа, который позволит заметно расширить его возможности.

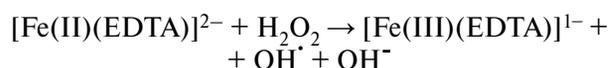
**Ключевые слова:** ДНК, футпринтинг, гидроксильные радикалы, нуклеосома, флуоресцентное мечение, ДНК-белковые взаимодействия.

В клетке ДНК функционирует совместно с многочисленными белками. Для изучения ДНК-белковых взаимодействий разработаны различные биохимические подходы. При футпринтинге на 5'- или 3'-конец одной из цепей вносят метку. ДНК инкубируют с белком, затем добавляют разрезающий агент. Связанные белки защищают участки дуплекса от эндонуклеаз и химических реагентов, поэтому вероятность внесения разрывов в сахарофосфатный остов в местах взаимодействия оказывается ниже, чем в свободных участках. Длину образующихся продуктов определяют методом разделения электрофорезом (ЭФ) в денатурирующих условиях с точностью до одного нуклеотидного остатка. По распределению длины восстанавливают пространственную картину укладки и взаимодействия ДНК [1].

Для получения достоверных данных необходимо, чтобы в среднем в каждую молекулу полимера вносилось не более одного разрыва. Ранее было показано, что в таких условиях 60–70% молекул остаются неповрежденными [2]. Поэтому при выборе разрезающего агента важно учитывать, чтобы реакцию можно было быстро остановить. Так, широкое распространение получил футпринтинг с помощью ДНКазы I, которую можно ингибировать добавлением ЭДТА. Этот фермент позволяет проводить хорошо воспроизводимые эксперименты с высоким разрешением, однако он имеет относи-

тельно большой размер и выраженную специфичность по отношению к разным структурам ДНК и последовательностям нуклеотидов, что затрудняет интерпретацию получаемых данных.

Химические агенты меньшего размера (перманганат-ион, диметилсульфат, активные формы кислорода и др.) в ряде случаев позволяют получить данные с менее выраженной специфичностью по отношению к нуклеотидной последовательности и большим разрешением. На сегодняшний день наилучшие результаты достигаются при использовании перекисного окисления гидроксильными радикалами [1]. Для получения радикалов в системах футпринтинга ДНК, РНК и белков применяют различные химические реакции, например, разложение пероксинитрита, фотолиз и радиолит воды [3]. Один из наиболее точно контролируемых методов гидроксильного футпринтинга основан на реакции Фентона-Габера-Вейса [4–6]:



Цепь химических реакций, возникающих при локальном взаимодействии ДНК с образующимся гидроксильным радикалом, приводит к разрушению сахарофосфатного остова.

Чаще всего в качестве метки для ДНК применяют радиоактивные изотопы фосфора. Современ-

ные методы детекции очень чувствительны и позволяют проводить исследования с использованием очень малых количеств ДНК (десятки аттомолей макромолекул в полосе, соответствующей фрагменту одной длины на ЭФ-дорожке) [7]. Тем не менее, работа с открытыми источниками ионизирующего излучения требует специальных предосторожностей, а из-за постоянного распада метки приготовленную пробу ДНК можно использовать лишь ограниченное время. Более удобными являются флуоресцентные метки, хотя их использование и приводит к уменьшению чувствительности метода. Так, при использовании автоматических секвенаторов с системой капиллярного ЭФ чувствительность детекции может достигать 0,1 фемтомоля молекул в полосе, что на порядок ниже возможностей подхода с использованием радиоактивного фосфора [8]. В данной работе мы оптимизировали условия футпринтинга с применением флуоресцентных меток при использовании более распространенного и технически простого метода анализа продуктов реакции — ЭФ в денатурирующем полиакриламидном геле (ПААГ).

В исследовании были использованы фрагменты, которые в ходе полимеразной цепной реакции метили по одному из 5'-концов с помощью флуоресцеина (FAM). На дуплексах были собраны нуклеосомы — мономеры структурной организации хроматина — комплексы, состоящие из октамера белков-гистонов и уложенного на его поверхности участка ДНК длиной 145–148 п.н. [9]. Нуклеосомная ДНК в значительной степени недоступна для

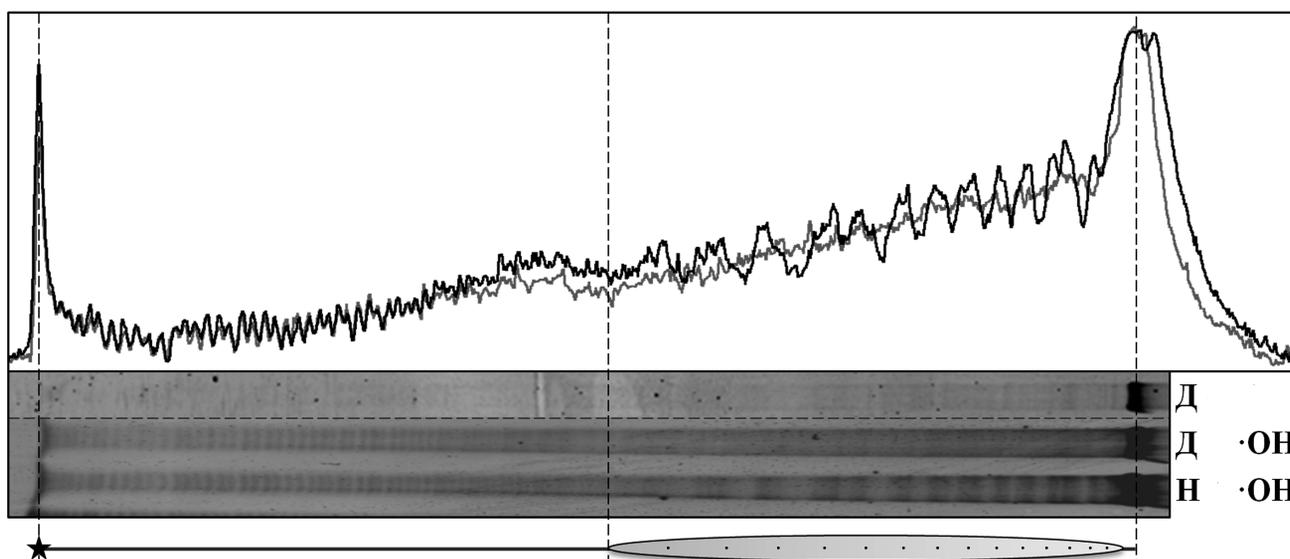
нуклеаз и других повреждающих агентов [10–12]. За счет спиральной структуры дуплекса и его плотных контактов с гистоновыми белками при футпринтинге нуклеосомной ДНК с использованием гидроксильных радикалов наблюдается характерная картина с перемежающимися участками чувствительности длиной около 5 п.н. [12].

### Материалы и методы

Работу проводили на полученной в ходе полимеразной цепной реакции (ПЦР) ДНК с позиционирующей нуклеосому последовательностью нуклеотидов 603, характеризующейся высокой афинностью к гистоновым белкам [13]. Фрагменты содержали два дополнительных участка ДНК: первый, длиной 123 п.н. с введенной на 5'-конец флуоресцентной меткой FAM (схема приведена на рисунке), — с одной стороны; второй, 13 п.н., — с другой стороны:

5'-FAM-d(CCGGGATCCAGATCCCGAAAATTTA  
TCAAAAAGAGTATTGACTTAAAGTCTAACCTAT  
AGGATACTTACAGCCATCGAGAGGGACACGG  
CGAAAGGCCAACCCAAGCGACACCGGCACTG  
GGGCCAGTTCGCGCGCCCACCTACCGTGTG  
AAGTCGTCACCTCGGGCTTCTAAGTACGCTTAG  
CGCACGGTAGAGCGCAATCCAAGGCTAACCA  
CCGTGCATCGATGTTGGAAGAGGCCCTCCGT  
CCTGAATTCTTCAAGTCCCTGGGGTACGGATC  
CGACG)-3' (позиционирующая нуклеосому  
последовательность подчеркнута).

Фрагменты ДНК получали на указанной синтетической матрице с использованием меченого



**Рисунок.** Профили футпринтинга флуоресцентно-меченой нуклеосомной и свободной от белков ДНК с использованием гидроксильных радикалов. В нижней части рисунка представлен снимок флуоресцентного сигнала ДНК и продуктов ее деградации, разделенных методом ЭФ в денатурирующем 8%-ном ПААГ (Д — ДНК, Н — нуклеосома; ·OH — воздействие гидроксильными радикалами). Звездочкой указано расположение флуоресцентной метки FAM в исследуемой ДНК. В верхней части рисунка приведены графики распределения сигнала в ЭФ-дорожках с ДНК-фрагментами (серая линия) и нуклеосомами (черная линия), подвергнутыми воздействию гидроксильных радикалов. Графики получены с помощью компьютерной программы OptiQuant. Схематически показано положение нуклеосомы (серый овал; черными точками показана периодичность ДНК-гистоновых контактов, соответствующая одному витку спирали дуплекса длиной около 10 п.н.).

олигонуклеотида FAM-282Forwhst (5'-FAM-d(CCGGGATCCAGATCCCGAAAATTТА)-3') и немеченого олигонуклеотида 282Revwhst (5'-d(CGTCGGATCCGTACCCCGAGGGACTT)-3') (0,5 мкМ каждый; Синтол, Россия). Реакцию проводили в программируемом термостате Veriti Thermal Cycler (Life Technologies, США) в 1-кратном буферном растворе для Taq-ДНК-полимеразы (Евроген, Россия), содержащем 3 мМ MgCl<sub>2</sub>, все дезоксирибонуклеотиды (каждый в концентрации 0,2 мМ) и Taq-ДНК-полимеразу (Евроген, Россия; 0,05 ед. акт./мкл). Первичную денатурацию матричной ДНК проводили в течение 3 мин при 95°C. 30 циклов ПЦР состояли из последовательных этапов инкубации при разной температуре (10 с при 93°C, 20 с при 63°C; 20 с при 72°C). Реакцию завершали 7-минутным прогреванием при 72°C. Продукты амплификации ожидаемой длины (282 п.н.) очищали от компонентов реакции с помощью ЭФ в 1%-ном агарозном геле в 0,5-кратном трис-боратном электродном буфере (tris/borate/EDTA, TBE) в камере для горизонтального ЭФ Mini-Sub Cell GT (Bio-Rad Laboratories, США). Для экстракции ДНК из геля использовали коммерческий набор реагентов QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Концентрацию ДНК измеряли спектрофотометрически на приборе Nanodrop 2000c UV-Vis CC (Thermo Fisher Scientific, США).

Сборку нуклеосом на анализируемых фрагментах ДНК проводили методом ступенчатого диализа против буферных растворов с уменьшающейся ионной силой, описанным в работе [14]. В качестве источника октамеров гистонов использовали хроматин без линкерных гистонов, который выделяли из эритроцитов цыплят, как описано ранее [14]. Анализ продуктов сборки проводили методом ЭФ-разделения в 4,5%-ном ПААГ в 0,5-кратном буфере TBE в камере для вертикального ЭФ Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories, США).

Анализ положения октамера гистонов на флуоресцентно-меченой ДНК проводили методом гидроксильного футпринтинга по схеме, предложенной в работе [6]. Реакционная смесь общим объемом 30 мкл содержала 20 мМ трис-HCl (рН 8,0), 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 2 мМ 2-меркаптоэтанол, 150 мМ KCl, хроматин без линкерных гистонов в концентрации 30 нг/мкл, 1 мМ аскорбиновую кислоту, 0,1 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, 0,1 мМ ЭДТА (рН 8,0), 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и 100 нг исследуемой ДНК. Смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 15 с, реакцию останавливали добавлением глицерина до концентрации 2%. Реакционную смесь обрабатывали взбалтыванием с фенолом, насыщенным буфером трис-ЭДТА (Phenol solution P4557, Sigma-Aldrich, США). После центрифугирования пробы в течение 10 мин при 13200 об/мин в настольной центрифуге MiniSpin (Eppendorf, Германия) водную фазу отбирали, добавляли 1/10 объема 3М ацетата натрия (рН 5,2), гликоген (Thermo Fisher Scientific, США)

до концентрации 0,2 мг/мл. К полученному раствору приливали три объема 96%-ного этилового спирта. После 18-часовой инкубации проб при -20°C ДНК осаждали центрифугированием при +4°C в течение 20 мин при 13200 об/мин в настольной центрифуге 5415R (Eppendorf, Германия).

Продукты деградации ДНК анализировали методом ЭФ-разделения в 8%-ном ПААГ в денатурирующих условиях в присутствии мочевины в концентрации 8М в 0,5-кратном буфере TBE в камере для вертикального ЭФ Sequi-Gen GT Sequencing Cell (Bio-Rad Laboratories, США). Распределение продуктов в геле анализировали с помощью системы детекции флуоресценции Turphoon Trio (General Electric, Англия). Для возбуждения флуоресценции использовали лазер с длиной волны 532 нм, сигнал считывали через фильтр, пропускающий световые волны длиной более 526 нм. Результаты обрабатывали с помощью компьютерной программы OptiQuant (Packard Instruments Company, США).

### Результаты и обсуждение

Результаты футпринтинга флуоресцентно-меченых проб с использованием гидроксильных радикалов представлены на рисунке. В свободных от гистонов участках ДНК под действием гидроксильных радикалов образуются разрывы сахаро-фосфатного остова равновероятно после каждого нуклеотидного остатка. Для нуклеосомных фрагментов наблюдается характерная картина с периодическими пиками чувствительности на расстоянии около 10 п.н., которая не наблюдается на свободной ДНК с такой же последовательностью нуклеотидов (для случая радиоактивного мечения см. [12]).

Под действием гидроксильных радикалов может происходить разрушение не только исследуемого полимера, но и флуоресцирующего соединения, использованного для мечения ДНК. Тем не менее, в подобранных условиях при стандартных настройках детектора флуоресценции чувствительность метода составила менее одного фемтомоля FAM-меченых цепей ДНК в ЭФ-полосе, а линейное возрастание детектируемого сигнала наблюдалось при увеличении количества метки вплоть до 1 пикомоля. Достижимая чувствительность оказалась сравнимой с получаемой на автоматических секвенаторах. Разработанная методика позволяет проводить опыты с использованием установок для изучения кинетики реакций методом остановленной струи (например, с использованием прибора KinTek, США) и получать данные об исследуемых процессах с миллисекундным разрешением. При подходящих условиях – в буфере с ЭДТА (для инактивации нуклеаз) в замороженном состоянии (для уменьшения частоты спонтанного гидролиза) и с минимальным доступом света (для замедления разрушения флуоресцентного соединения) – ме-

ченная ДНК может храниться по крайней мере в течение нескольких лет без заметной потери интенсивности сигнала.

Введение флуорофоров с неперекрывающимися спектрами излучаемых длин волн в каждую из цепей ДНК позволяет анализировать роль обеих цепей ДНК в исследуемом взаимодействии с белками в одном эксперименте. Использование таких же меток в разных молекулах ДНК может быть использовано для изучения конкурентного связывания различных фрагментов методом футпринтинга.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Sclavi B.* Time-resolved footprinting for the study of the structural dynamics of DNA-protein interactions // *Biochem. Soc. Trans.* 2008. Vol. 36. N 4. P. 745–748.

2. *Brenowitz M., Senear D.F., Shea M.A., Ackers G.K.* Quantitative DNase footprint titration: a method for studying protein-DNA interactions // *Meth. Enzymol.* 1986. Vol. 130. P. 132–181.

3. *Shcherbakova I., Mitra S., Beer R.H., Brenowitz M.* Fast Fenton footprinting: a laboratory-based method for the time-resolved analysis of DNA, RNA and proteins // *Nucleic Acids Res.* 2006. Vol. 34. N 6. e48.

4. *Fenton H.J.H.* Oxidation of tartaric acid in the presence of iron // *J. Chem. Soc.* 1894. Vol. 65. P. 899–910.

5. *Haber F., Weiss J.* The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts // *Proc. R. Soc. Lond. A.* 1934. Vol. 147. N 861. P. 332–351.

6. *Tullius T.D., Dombroski B.A.* Hydroxyl radical “footprinting”: high-resolution information about DNA-protein contacts and application to  $\lambda$  repressor and Cro protein // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1986. Vol. 83. N 15. P. 5469–5473.

7. *Jain S.S., Tullius T.D.* Footprinting protein-DNA complexes using the hydroxyl radical // *Nat. Protoc.* 2008. Vol. 3. N 6. P. 1092–1100.

8. *Woger J.W., Koraimann G.* Hydroxyl radical footprinting using PCR-generated fluorescent-labelled DNA fragments

Применение предложенных в [15] алгоритмов анализа конформации ДНК по профилям деградации позволяет получать структурные модели взаимодействующих комплексов с атомарным разрешением методом компьютерного молекулярного моделирования. Таким образом, использование флуоресцентных меток в футпринтинге может заметно расширить область применения этого метода для анализа ДНК-белковых взаимодействий.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-24-00031).

and the ALFexpress DNA sequencer // *Tech. Tips Online.* 1997. Vol. 2. N 1. P. 167–168.

9. *Luger K., Mäder A.W., Richmond R.K., Sargent D.F., Richmond T.J.* Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution // *Nature.* 1997. Vol. 389. N 6648. P. 251–260.

10. *Noll M.* Internal structure of the chromatin subunit // *Nucleic Acids Res.* 1974. Vol. 1. N 11. P. 1573–1578.

11. *Wigler M.H., Axel R.* Nucleosomes in metaphase chromosomes // *Nucleic Acids Res.* 1976. Vol. 3. N 6. P. 1463–1471.

12. *Hayes J.J., Tullius T.D., Wolffe A.P.* The structure of DNA in a nucleosome // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990. Vol. 87. N 19. P. 7405–7409.

13. *Lowary P.T., Widom J.* New DNA sequence rules for high affinity binding to histone octamer and sequence-directed nucleosome positioning // *J. Mol. Biol.* 1998. Vol. 276. N 1. P. 19–42.

14. *Gaykalova D.A., Kulaeva O.I., Bondarenko V.A., Studitsky V.M.* Preparation and analysis of uniquely positioned mononucleosomes // *Methods Mol. Biol.* 2009. Vol. 523. P. 109–123.

15. *Armeev G.A., Gorkovets T.K., Efimova D.A., Shaitan K.V., Shaytan A.K.* Modeling of protein – DNA complexes geometry utilising FRET and footprinting data // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2015. Vol. 71. N 1. P. 29–33.

Поступила в редакцию

16.09.15

#### HYDROXYL RADICAL FOOTPRINTING OF FLUORESCENT-LABELED DNA

*N.S. Gerasimova<sup>1</sup>, V.M. Studitsky<sup>1,2,\*</sup>*

<sup>1</sup> *Department of Bioengineering, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;*

<sup>2</sup> *Cancer Epigenetics Program Team, Fox Chase Cancer Center, Cottman Avenue 333, Philadelphia, PA 19111, USA*

\* *e-mail: vasily.studitsky@fcc.edu*

Footprinting is one of the simplest and most accurate approaches to investigate structure and interaction of biopolymers. It is based on the accessibility of intra- and intermolecular contacts for external damaging agents. In the method, one end of the polymer is labeled, and then the sample is incubated in cutting medium. Length distribution of the products allows to reveal the accessibility of different regions of polymer in the corresponding conditions. In DNA footprinting various enzymes and chemical reagents can be used. The highest temporal and spatial resolution without sequence specificity can be obtained with hydroxyl radicals. In this paper we present a new modification of the experimental approach using fluorescent-labeled DNA fragments and up-to-date methods of quantitative analysis, which can considerably increase its applicability.

**Key words:** *DNA, footprinting, hydroxyl radicals, nucleosome, fluorescent labeling, DNA-protein interactions.*

**Сведения об авторах:**

*Герасимова Надежда Сергеевна* — мл. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-938-22-91; e-mail: gerasimova@mail.bio.msu.ru

*Студитский Василий Михайлович* — докт. биол. наук, гл. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ; руководитель лаборатории эпигенетики рака Центра исследований рака Фокс Чейз (Филадельфия, США). Тел.: 8-495-938-22-91; e-mail: vasily.studitsky@fccc.edu