

## DETECTION OF ALKALI-LABILE SITES ON SATELLITE DNA BY DNA BREAKAGE COUPLED WITH FLUORESCENCE *IN SITU* HYBRIDIZATION (DNA-FISH) MONITOR DNA DAMAGE IN CERVICAL EPITHELIAL CELLS

C. GARCÍA-VIELMA<sup>1</sup>, E.I. CORTÉS-GUTIÉRREZ<sup>2\*</sup>, J.A. GARCÍA SALAS<sup>2</sup>, M.I. DÁVILA-RODRÍGUEZ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Genetics. Centro de Investigación Biomédica del Noreste, Instituto Mexicano del Seguro Social, IMSS. 64720 Monterrey, México

<sup>2</sup> Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México

E-mail: elvacortes@cibinmty.net

*Satellite DNA is the main component of functional centromeres and forms the main structural constituent of heterochromatin. The presence of alkali-labile sites (ALSs) is a feature inherent to chromatin structure. Here we aimed to characterize ALSs in different satellite DNA loci in cervical epithelial cells using DNA breakage detection coupled with fluorescence in situ hybridization (DBD-FISH). Cervical epithelial cells embedded in an agarose matrix were deproteinized and exposed to alkaline denaturation, which generated single-stranded DNA (ssDNA) starting from the ends of spontaneous basal DNA breaks and ALSs. The amount of ssDNA produced within a specific sequence area could be detected by DBD-FISH using specific probes. The DBD-FISH signals, which were corrected for respective FISH signals during metaphase, were remarkably stronger in the 5 bp classical satellite DNA domains analyzed (D1Z1, D9Z3, and D16Z3) compared with alphoid satellite regions (D3Z1, D8Z2, and DXZ1). D1Z1 locus of chromosome-1 being the most affected by alkali denaturation, and contrary, D3Z1 locus of chromosome – 3 was the least sensitive to alkali treatment. These findings suggest a high density of constitutive ALSs-probably abasic sites-within the 5 bp satellite DNA sequences in cervical epithelial cells. The presence and relative abundance of ALSs might help explain the high frequency of spontaneous breakage and rearrangements in the pericentromeric heterochromatin of chromosomes 1, 9, and 16 when this chromatin region is undercondensed spontaneously or via induction, such as following viral infections. ALSs in these sequences could be useful tools to monitor DNA damage in cases of cervical carcinogenesis., ALSs on these sequences could be useful*

© GARCÍA-VIELMA C., CORTÉS-GUTIÉRREZ E.I., GARCÍA SALAS J.A., DÁVILA-RODRÍGUEZ M.I., 2020

*tools to monitor DNA damage in cases of cervical carcinogenesis.*

**Key words:** Alkali-labile sites; ALS; DNA breakage detection; DBD-FISH, cervical epithelium.

ВИЯВЛЕННЯ ЛУЖНО-ЛАБІЛЬНИХ САЙТІВ НА САТЕЛІТНИХ ДНК ЗА РОЗРИВАМИ ДНК У ПОЄДНАННІ З ФЛУОРЕСЦЕНТНОЮ ГІБРИДИЗАЦІЄЮ *IN SITU* (DNA-FISH) ДЛЯ КОНТРОЛЮ ПОШКОДЖЕНЬ ДНК У ЦЕРВІКАЛЬНИХ ЕПІТЕЛІАЛЬНИХ КЛІТИНАХ

Сателітна ДНК – це головний компонент функціональних центромер, який утворює основну структурну складову гетерохроматину. Присутність лужно-лабільних сайтів (ЛЛС) – це властивість, притаманна структурі хроматину. Метою цієї роботи було охарактеризувати ЛЛС у різних локусах сателітних ДНК у цервікальних епітеліальних клітинах, використовуючи виявлення розривів ДНК у поєднанні з флуоресцентною гібридизацією *in situ* (DBD-FISH). Цервікальні епітеліальні клітини, вставлені в агарозну матрицю, були звільнені від білків і піддані впливу лужної денатурації, після чого були сформовані одностричкові ДНК (ssДНК), починаючи з кінців спонтанних розривів основних ДНК та ЛЛС. Кількість ssДНК, утворених в межах певної ділянки послідовності, визначали за методом DBD-FISH з використанням певних зондів. Сигнали DBD-FISH, скореговані щодо відповідних сигналів FISH під час метафази, були значно сильнішими у проаналізованих класичних доменах сателітних ДНК на 5 п.н. (D1Z1, D9Z3 та D16Z3) порівняно з альфа сателітними регіонами (D3Z1, D8Z2 та DXZ1). Лужна денатурація найбільше вплинула на D1Z1 локус хромосоми-1, і навпаки, локус D3Z1 хромосоми-3 був найменш чутливим до впливу лужного середовища. Ці результати демонструють високу щільність конститутивних ЛЛС – можливих AP-сайтів – у межах послідовностей сателітних ДНК на 5 п.н. у цервікальних епітеліальних клітинах. Присутність та відносна розповсюдженість ЛЛС може бути поясненням високої частотності спонтанних розривів та перебудов у перичентромерному гетерохроматині хромосом 1, 9 і 16, коли відбувається спонтанне або індуковане блокування конденсації цієї ділянки хроматину, подібно до наслідків вірусної інфекції. ЛЛС у таких послідовностях можуть бути корисним інструментом моніторингу пошкоджень ДНК у випадку цервікального канцерогенезу.

**Ключові слова:** лужно-лабільні сайти; ЛЛС; виявлення розривів ДНК; DBD-FISH, цервікальний епітелій.

REFERENCES

1. Tyler-Smith, C., Willard, H.F., Mammalian chromosome structure, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 1993, vol. 3, no. 3, pp. 390–97. doi: 10.1016/0959-437x(93)90110-b.
2. Meyne, J., Goodwin, E.H., and Moyzis, R.K., Chromosome localization and orientation of the simple sequence repeat of human satellite I DNA, *Chromosoma*, 1994, vol. 103, no. 2, pp. 99–103. doi: 10.1007/bf00352318.
3. Moyzis, R.K., Albright, K.L., Bartholdi, M.F., Cram, L.S., Deaven, L.L., Hildebrand, C.E., Joste, E.N., Longmire, J.L., Meyne, J., and Schwarzbach-Robinson, T., Human chromosome-specific repetitive DNA sequences: novel markers for genetic analysis, *Chromosoma*, 1987, vol. 95, no. 6, pp. 375–86. doi: 10.1007/bf00333988.
4. Jeanpierre, M., Human satellite 2 and 3, *Ann. Génét.*, 1994, vol. 37, no. 4, pp. 163–71.
5. Aze, A., Sannino, V., Soffientini, P., Bachi, A., and Costanzo, V., Centromeric DNA replication reconstitution reveals DNA loops and ATR checkpoint suppression, *Nat. Cell Biol.*, 2016, vol. 18, no. 6, pp. 8684–91. doi: 10.1038/ncb3344.
6. Fernández, J.L., Goyanes, V., Ramiro-Díaz, J., and Gosálvez, J., Application of FISH for in situ detection and quantification of DNA breaks, *Cytogenet. Cell Genet.*, 1998, vol. 82, no. 3–4, pp. 251–6. doi: 10.1159/000015112.
7. Cortés-Gutiérrez, E.I., Dávila-Rodríguez, M.I., Fernández, J.L., Lypez-Fernández, C., and Gosálvez, J., DNA damage in women with cervical neoplasia evaluated by DNA breakage detection-fluorescence in situ hybridization, *Anal. Quant. Cytol. Histol.*, 2011, vol. 33, no. 3, pp. 175–81.
8. Vogt, P., Code domains in tandem repetitive DNA sequence structures, *Chromosoma*, 1992, vol. 101, no. 10, pp. 585–9. doi: 10.1007/bf00360534.
9. Fernández, J.L., Valverde, D., Goyanes, V., Bucu, I., and Gosálvez, J., Alu I *in situ* digestion of human alphoid and classical satellite DNA regions: high-resolution digital image analysis of FISH signals from condensed and extended chromatin, *Cytogen. Cell Genet.*, 1997, vol. 76, no. 1–2, pp. 94–100. doi: 10.1159/000134522.
10. Gosálvez, J., Lypez-Fernández, C., Goyanes, V., and Mezzanotte, R., Chromosome differentiation using nucleases: an overview, in: N. Henriques-Gil, J.S. Parker, M.J. Puertas (Eds.). *Chromosomes Today*, Chapman and Hall, London, 1997, vol. 12, pp. 23–49. doi: 10.1007/978-94-009-1537-4\_2.
11. Darzynkiewicz, Z., Huang, X., and Okafuji, M., Detection of DNA strand breaks by flow and laser scanning cytometry in studies of apoptosis and cell proliferation (DNA replication). *Meth. Mol. Biol.*, 2006, vol. 314, pp., 81–93. doi: 10.1385/1-59259-973-7:081.
12. Gore, J., Bryant, Z., Nollmann, M., Le, M.U., Cozzarelli, N.R., and Bustamante, C., DNA overwinds when stretched, *Nature*, 2006, vol. 442, no. 7104, pp. 836–9. doi: 10.1038/nature04974.
13. Fernández, J.L., Vázquez-Gundín, F., Rivero, M.T., Genescá, A., Gosálvez, J., Goyanes, V., DBD-FISH on neutral comets: Simultaneous analysis of DNA single- and double-strand breaks in individual cells. *Exp. Cell Res.*, 2001, vol. 270, no. 1, 102–9. doi: 10.1007/978-1-60327-409-8\_11.
14. Cortés-Gutiérrez, E.I., Ortiz-Hernández, B.L., Dávila-Rodríguez, M.I., Cerda-Flores, R.M., Fernández, J.L., Lypez-Fernández, C., and Gosálvez, J., 5-bp Classical Satellite DNA Loci from Chromosome-1 Instability in Cervical Neoplasia Detected by DNA Breakage Detection/Fluorescence in Situ Hybridization (DBD-FISH)., *Int. J. Mol. Sci.*, 2013, vol. 14, no. 2, pp. 4135–47. doi: 10.3390/ijms14024135.
15. Cortés-Gutiérrez, E.I., Dávila-Rodríguez, M.I., Fernández J.L., Lypez-Fernández, C., and Gosálvez, J., Koilocytes are enriched for alkaline-labile sites., *Eur. J. Histochem.*, 2010, vol. 54, no.4, p. e32. doi: 10.4081/ejh.2010.e32.
16. Fernández, J.L., Vazquez-Gundin, F., Rivero, M.T., Goyanes, V., and Gosálvez, J., Evidence of abundant constitutive alkali-labile sites in human 5 bp classical satellite DNA loci by DBD-FISH. *Mutation. Res.*, 2001, vol. 473, no. 2, pp. 163–8. doi: 10.1016/s0027-5107(00)00146-9.
17. Cortés-Gutiérrez, E.I., Dávila-Rodríguez, M.I., Lypez-Fernández, C., Fernández, J.L., and Gosálvez, J., Alkali-labile sites in sperm cells from *Sus* and *Ovis* species., *Int. J. Androl.*, 2008, vol. 31, no. 3, pp.354–63. doi: 10.1111/j.1365-2605.2007.00781.x.
18. Rivero, M.T., Vazquez-Gundin, F., Goyanes, V., Campos, A., Blasco, M., Gosálvez, J., and Fernández, J.L., High frequency of constitutive alkali-labile sites in mouse major satellite DNA, detected by DNA breakage detection-fluorescence in situ hybridization., *Mutation. Res.*, 2001, vol. 483, no. 1–2, pp. 43–50. doi: 10.1016/s0027-5107(01)00218-4.
19. Rivero, M.T., Mosquera, A., Goyanes, V., Slijepcevic, P., and Fernández, J.L., Differences in repair profiles of interstitial telomeric sites between normal and DNA double-strand ALS in mammalian sperm break repair deficient Chinese hamster cells., *Exp. Cell Res.*, 2004, vol. 295, no. 1, pp. 161–72. doi: 10.1016/j.yexcr.2003.12.031.
20. Lypez-Fernández, C., Arroyo, F., Fernández, J.L., and Gosálvez, J. Interstitial telomeric sequence blocks in constitutive pericentromeric heterochromatin from *Pyrgomorpha conica* (Orthoptera) are

- enriched in constitutive alkali-labile sites. *Mutation. Res.*, 2006, vol. 599, no. 1–2, pp. 36–44. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2006.01.004.
21. Cortés-Gutiérrez, E.I., Lypez-Fernández, C., Fernández J.L., Dávila-Rodríguez, M.I., Johnston, S.D., and Gosálvez, J., Interpreting sperm DNA damage in a diverse range of mammalian sperm by means of the two-tailed comet assay. *Front Genet.*, 2014, vol. 27, no. 5, pp. 404. doi: 10.3389/fgene.2014.00404.
22. Von, Sonntag, C., Carbohydrate radicals: from ethylene glycol to DNA strand breakage. *Int. J. Radiat. Biol.*, 2014, vol. 90, no. 6, pp. 416–22. doi: 10.3109/09553002.2014.908040.
23. Bandyopadhyay, R., Berend, S.A., Page, S.L., Choo, K.H., and Shaffer, L.G., Satellite III sequences on 14p and their relevance to Robertsonian translocation formation. *Chromosome Res.*, 2001, vol. 9, no. 3, pp. 235–42. doi: 10.1023/a:1016652621226.
24. Lana, E., Mégarbané, A., Tourrière, H., Sarda, P., Lefranc, G., and Claustres, M., De Sario A. DNA replication is altered in Immunodeficiency Centromeric instability Facial anomalies (ICF) cells carrying DNMT3B mutations. *Eur. J. Hum. Genet.*, 2012, vol. 20, no. 1, pp. 1044–50. doi: 10.1038/ejhg.2012.41.
25. Jefferson, A., Colella, S., Moralli, D., Wilson, N., Yusuf, M., Gimelli, G., Ragoussis, J., and Volpi, E.V. Altered intra-nuclear organisation of heterochromatin and genes in ICF syndrome. *PLoS One.*, 2010, vol. 5, no. 6, pp. e11364. doi: 10.1371/journal.pone.0011364.
26. Toubiana, S., Velasco, G., Chityat, A., Kaindl, A.M., Hershtig, N., Tzur-Gilat, A., and Francastel, C., Subtelomeric methylation distinguishes between subtypes of Immunodeficiency, Centromeric Instability and Facial Anomalies (ICF) syndrome. *Hum. Mol. Genet.*, 2018, vol. 27, no. 20, pp. 3568–81. doi: 10.1093/hmg/ddy265.

Received July 25, 2018  
Received September 02, 2018  
Accepted March 18, 2020