

Τεχνικές ανίχνευσης του κερματισμένου DNA

Οι τεχνικές εντόπισης των αποπτωτικών κυττάρων βασίζονται σε μορφολογικές παρατηρήσεις, βιοχημικές και ανοσοϊστοχημικές μεθόδους και στην ανίχνευση του κερματισμένου DNA *in situ*. Η τεχνική TUNEL [Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP Nick End Labeling], που χρησιμοποιείται συχνότερα, στηρίζεται στη σύνδεση του ενζύμου TdT με τα 3'-OH άκρα των θραυσμάτων του DNA και στην προσθήκη βιοτινυλιωμένου νουκλεοτιδίου στις θέσεις εντομής. Παραλλαγή της μεθόδου είναι η τεχνική ISNT (*In Situ* Nick Translation), στην οποία χρησιμοποιείται το ένζυμο πολυμεράση I. Οι τεχνικές αυτές εφαρμόζονται σε τομές ψυκτικού μικροτόμου και παραφίνης. Για την επιτυχία της αντίδρασης πρέπει να αποφεύγονται οι παρατεταμένοι χρόνοι μονιμοποίησης, δεδομένου ότι ελαττώνουν την ευαισθησία. Παράγοντες σχετικοί με την αυτόλυση των ιστών, τη μονιμοποίηση, τη σκλήνωση, το κόψιμο, την εξουδετέρωση της ενδογενούς υπεροξειδάσης με H₂O₂, τις διάφορες προεργασίες και, κυρίως, η νέκρωση μπορούν να προκαλέσουν «μη αποπτωτικό» κερματισμό του DNA. Η προετοιμασία των ιστών πριν από την αντίδραση περιλαμβάνει επεξεργασία στο φούρνο μικροκυμάτων ή και πρωτεόλυση με πεψίνη ή πρωτεϊνάση K. Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων είναι απαραίτητη η χρήση μαρτύρων και η ποσοτική προσέγγιση, π.χ. TUNEL και ευρήματα μορφολογικά ή ανοσοϊστοχημικά, για την ανίχνευση των σχετικών με την απόπτωση πρωτεϊνών, ή *in situ* υβριδισμός. Οι αντιοροί κατά της ενεργοποιημένης κασπάσης-3 προτείνονται ως ειδικοί δείκτες για την ανίχνευση των αποπτωτικών κυττάρων, δεδομένου ότι κατά τη νέκρωση δεν παρατηρείται ενεργοποίηση των κασπασών. Η ανεξίνη V χρησιμοποιείται, επίσης, για την ανίχνευση των αποπτωτικών κυττάρων, στον κυτταρομετρητή ροής, επειδή συνδέεται με τη φωσφατιδυλοσερίνη που έχει μετατοπιστεί στο εξωτερικό πέταλο της κυτταρικής μεμβράνης, κατά τη διάρκεια της αποπτωτικής διεργασίας. Η μετατόπιση της φωσφατιδυλοσερίνης προηγείται του κερματισμού του DNA και, συνεπώς, επιτρέπει την ανίχνευση των αποπτωτικών κυττάρων στα αρχικά στάδια της διεργασίας. Με την τεχνική comet ανιχνεύεται το κερματισμένο DNA σε μεμονωμένα κύτταρα, με ηλεκτροφόρηση. Ονομάζεται έτσι λόγω του χαρακτηριστικού σχήματος που παρατηρείται, σε περίπτωση μεγάλης έκτασης βλάβης, κατά την έξοδο του κερματισμένου DNA από τον πυρήνα και το κύτταρο και τη μετανάστευσή του προς την άνοδο. Το βασικό πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι μετρά την απάντηση στη βλάβη του DNA σε μεμονωμένα κύτταρα και, συνεπώς, επιτρέπει τη μελέτη της ετερογένειας ενός δεδομένου κυτταρικού πληθυσμού. Ο συνδυασμός των αποτελεσμάτων που προκύπτουν από τις προαναφερθείσες τεχνικές επιτρέπει την ποσοτικοποίηση του κερματισμένου DNA και παρέχει ένα πληρέστερο συμπέρασμα για την κατανόηση της αποπτωτικής διεργασίας και της ανταπόκρισης του κυττάρου στη βλάβη του DNA.

Ρ. Αγγελιοπούλου,
Μ. Κυριαζόγλου

Εργαστήριο Ιστολογίας
και Εμβρυολογίας, Ιατρική Σχολή,
Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα

Techniques for the detection
of fragmented DNA

Abstract at the end of the article

Λέξεις ευρετηρίου

Απόπτωση
Κασπάσες
Κερματισμένο DNA
Comet
TUNEL

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα ευκαρυωτικά κύτταρα έχουν την ικανότητα να αυτοκαταστρέφονται όταν υφίστανται την επίδραση βλαπτικών παραγόντων. Αυτός ο μηχανισμός προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου είναι γνωστός ως απόπτωση και θεωρείται απαραίτητος για τη διατήρηση της ομοιόστασης των ιστών και την προστασία του οργανισμού από πλεονάζοντα ή ανώμαλα κύτταρα.^{1,2}

Τα αποτελέσματα της έρευνας για την εντόπιση των αποπτωτικών κυττάρων στους ιστούς βασίζονται, κυρίως, σε μορφολογικές παρατηρήσεις των μεταβολών της κυτταρικής αρχιτεκτονικής και στην ανίχνευση του κερματισμένου DNA με βιοχημικές και ιστοχημικές τεχνικές.¹⁻⁴ Παράλληλα, έχουν αναπτυχθεί και πιο ειδικές μέθοδοι, όπως, για παράδειγμα, η χρήση ειδικών αντιορών για την εντόπιση των πρωτεϊνών, αλλά και των πρωτεϊνικών κλασμάτων που δημιουργούνται στη διάρκεια της αποπτωτικής διεργασίας.⁵ Με αυτόν τον τρόπο διακρίνονται τα αποπτωτικά από τα νεκρωτικά κύτταρα. Επίσης, υπάρχουν ειδικοί αντιοροί για τους υποδοχείς «θανάτου» της κυτταρικής επιφάνειας ή για τα μόρια που δεσμεύουν και για τις προ- και αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες.⁴

Στην παρούσα ανασκόπηση, το ενδιαφέρον εστιάζεται στις κλασικές μεθόδους ανίχνευσης των αποπτωτικών κυττάρων στους ιστούς, στις βελτιώσεις αυτών με πρόσφατα αναφερόμενες τροποποιήσεις, καθώς και σε νέους τρόπους ανίχνευσης της βλάβης του DNA, στο επίπεδο του ενός κυττάρου.

2. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Η απόπτωση προσβάλλει συνήθως διάσπαρτα μονήρη κύτταρα και εκδηλώνεται ιστολογικά με τη δημιουργία μικρών, σφαιρικών ή ωοειδών σωματίων, τα οποία περιβάλλονται από μεμβράνη και περιέχουν κυτταροπλασματικά ή και πυρηνικά κατάλοιπα. Από τις παρατηρήσεις στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο φαίνεται ότι οι δομικές αλλαγές της απόπτωσης λαμβάνουν χώρα σε δύο στάδια: το πρώτο περιλαμβάνει το σχηματισμό των αποπτωτικών σωματίων και το δεύτερο τη φαγοκυττάρωση των σωματίων αυτών από άλλα κύτταρα. Του σχηματισμού των αποπτωτικών σωματίων προηγούνται η συμπύκνωση της χρωματίνης και ο κερματισμός του DNA, η συμπύκνωση του κυτταροπλάσματος, η διάσπαση του πυρήνα και η αποκόλληση των κυτταροπλασματικών αποφυάδων της κυτταρικής επιφάνειας.⁶⁻⁸ Ωστόσο, παρόλο που η εντόπιση των αποπτωτικών κυττάρων στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο επιτρέπει την παρατήρηση των λεπτομερειών της μορφολογίας και τη διάκριση

τους από τα γειτονικά ζωντανά κύτταρα, περιορίζει τη μελέτη σε μικρή έκταση του εξεταζόμενου ιστού.

Αποπτωτικά κύτταρα στους ιστούς έχουν περιγραφεί από τον προηγούμενο αιώνα και αναγνωρίζονται σε ερευνητικές και ιστοπαθολογικές μελέτες ως πυκνωτικά ή χρωματολυτικά.⁹ Ανιχνεύονται σε τομές παραφίνης χρωματισμένες με τις κλασικές χρώσεις αιματοξυλίνης, Nissl ή Luxol fast blue και με αρκετές πυρηνικές χρωστικές, όπως το πράσινο του μεθυλίου, DAPI ή Hoechst 33258, στο φωτομικροσκόπιο και το μικροσκόπιο φθορισμού. Ωστόσο, χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή, ώστε να μην εκλαμβάνονται ως αποπτωτικά τα κύτταρα που διανύουν τη φάση της μίτωσης ή τα κύτταρα που έχουν μικρούς πυκνωτικούς πυρήνες, όπως τα λεμφοκύτταρα και τα ολιγοδενδροκύτταρα. Με τις συνήθεις όμως χρώσεις, η ποσοτικοποίηση του αποπτωτικού φαινομένου είναι υποκειμενική και κοπιώδης. Γι' αυτό, απαιτείται ο συνδυασμός ειδικών τεχνικών, οι οποίες είναι πιο ασφαλείς και ευαίσθητες. Θα πρέπει, επίσης, να σημειωθεί ότι τα αποπτωτικά κύτταρα διατηρούνται στους ιστούς για μικρό χρονικό διάστημα, πριν να φαγοκυτταρωθούν, γεγονός που καθιστά επίπονη την ανίχνευσή τους, εκτός των περιπτώσεων εκείνων που αφορούν σε μαζική απόπτωση.⁶ Με το συνεσσιακό μικροσκόπιο ανιχνεύονται, συγχρόνως, οι χαρακτηριστικές αλλοιώσεις του πυρήνα και του κερματισμένου DNA και η ανοσοθετικότητα για πυρηνικά και κυτταροπλασματικά αντιγόνα.

3. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ ΚΕΡΜΑΤΙΣΜΕΝΟΥ DNA

Οι βιοχημικές μέθοδοι περιλαμβάνουν εκχύλιση του DNA, διαχωρισμό των κλασμάτων υψηλού και χαμηλού μοριακού βάρους και ανάλυση μετά από ηλεκτροφόρηση.¹⁰ Όμως, αυτός ο τρόπος δεν είναι μόνο χρονοβόρος, αλλά αποκλείει και κάθε ποσοτική εκτίμηση και δεν μπορεί να εφαρμοστεί ούτε σε μεμονωμένα κύτταρα ούτε σε τομές ιστών.

Μια άλλη προσέγγιση αφορά στην ενσωμάτωση [³H]θυμιδίνης στα 3'-άκρα των σπασμένων αλυσίδων του DNA και την παρατήρηση, με ραδιοαυτογραφία, του «κλιμακωτού» προτύπου των σχηματιζομένων θραυσμάτων. Η μέθοδος προϋποθέτει τη χρησιμοποίηση ραδιενεργών ουσιών και το γεγονός αυτό αποκλείει την εφαρμογή της στην καθημερινή πράξη.

Σήμερα, χρησιμοποιούνται μη ραδιενεργές ουσίες για την *in situ* σήμανση των εντομών του DNA, στους πυρήνες των αποπτωτικών κυττάρων. Ως γνωστό, ο κερματισμός του DNA προκαλείται από τη διάσπαση της I-CAD (Inhibitor of Caspase-Activated DNase), που οφείλεται στις κασπάσες και την ακολουθούσα ενεργο-

ποίηση της CAD (Caspase-Activated DNase), με αποτέλεσμα τις χαρακτηριστικές διανουκλεοσωματικές (180–200 ζεύγη βάσεων, bp) εντομές στο δίκλωνο DNA.^{11,12} Έχει, όμως, αναφερθεί ότι δημιουργούνται και μεγαλύτερα θραύσματα, της τάξης των 50–150 kbp, αλλά και περιπτώσεις στις οποίες δεν παρατηρείται το χαρακτηριστικό πρότυπο διανουκλεοσωματικής διάσπασης.¹³ Αλλά και κατά τη νέκρωση γίνεται κερματισμός του DNA από τις λυσοσωματικές DNάσες, αυτό όμως συμβαίνει στα τελικά στάδια της νεκρωτικής διεργασίας και σε τυχαίες θέσεις του μορίου.¹⁴ Συνεπώς, οι τεχνικές ανίχνευσης του κερματισμένου DNA δεν θα πρέπει να θεωρούνται ειδικές της απόπτωσης, δεδομένου ότι ανιχνεύουν βλάβες του DNA που οφείλονται σε ποικίλους παράγοντες. Ωστόσο, αυτό που εξειδικεύει τις τεχνικές της *in situ* ανίχνευσης των αποπτωτικών κυττάρων, εκτός από τη χαρακτηριστική ολιγονουκλεοσωματική διάσπαση, είναι, κυρίως, η τεράστια ποσότητα των εντομών του δίκλωνου DNA, που ανέρχεται σε αρκετά εκατομμύρια ανά κύτταρο.¹⁵

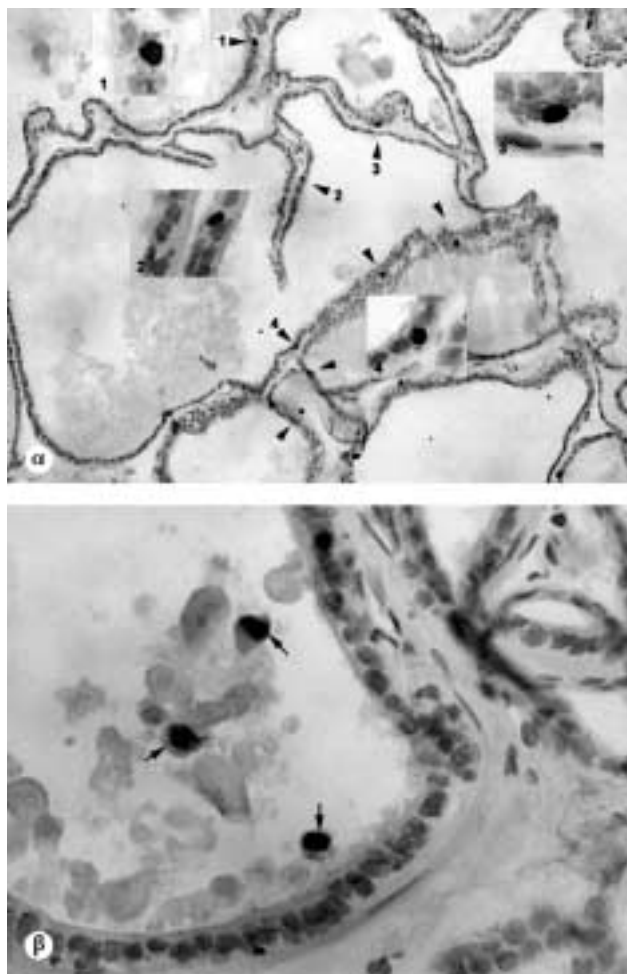
3.1. Ενζυμικές τεχνικές

Οι τεχνικές ISEL (*In Situ* End Labeling) και ISNT (*In Situ* Nick Translation) χρησιμοποιήθηκαν, παλαιότερα, για την ανίχνευση των μεταγραφικά ενεργών θέσεων, στα χρωμοσώματα¹⁶ ή στο κερματισμένο DNA, όχι μόνο κατά την εκφύλιση ή την κυτταρική βλάβη αλλά και για τη μελέτη της διαφοροποίησης των ιστών,^{17–19} σε κυτταρικές καλλιέργειες^{20,21} και σε τομές ιστών.^{21–23} Η τεχνική TUNEL [Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP Nick End Labeling] προτάθηκε από τους Gavrieli et al το 1992.²⁴ Στηρίζεται στην ειδική σύνδεση του ενζύμου τελική δεσοξυνουκλεοτιδυλοτρανσφεράση (TdT terminal deoxynucleotidyl transferase) με τα 3'-OH άκρα των θραυσμάτων του DNA και στην ενσωμάτωση τριφωσφορικής δεσοξουριδίνης, συνδεδεμένης με βιοτίνη (βιοτινυλιωμένη dUTP), στις εντομές του DNA. Το σήμα, στο σχηματιζόμενο πολυμερές πολυδεσοξυνουκλεοτιδικό μόριο, ενισχύεται συνδεδεμένο με αβιδίνη-υπεροξειδάση και ακολουθεί η ιστοχημική ανίχνευσή του. Μια ανάλογη αυτοραδιογραφική μέθοδος είχε προταθεί το 1970 από τους Modak και Bollum για την ανίχνευση των εκφυλιζόμενων κυττάρων του φακού.²⁵

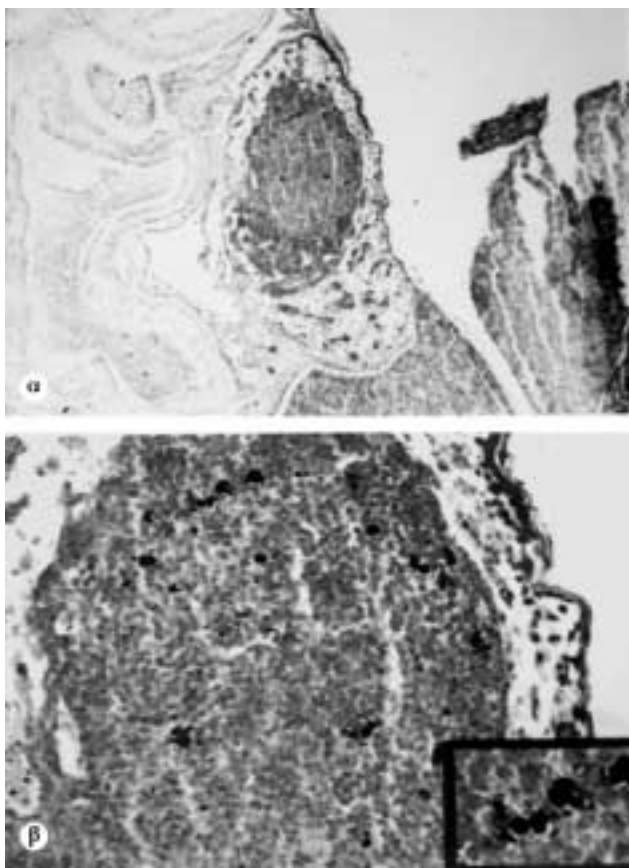
Η μέθοδος TUNEL εφαρμόστηκε με επιτυχία σε ιστούς που χαρακτηρίζονται από ταχύ ρυθμό κυτταρικής ανανέωσης, όπως στο επιθήλιο του λεπτού εντέρου και στην επιδερμίδα, στις πλάκες του Peyer, στο σπλήνα, στο φυσιολογικό θύμο αδένα, πριν ή μετά από χορήγηση δεξαμεθαζόνης,²⁴ ακτινοβολίας ή αντι-CD3 αντισωμάτων.²⁶ TUNEL-θετικά κύτταρα ανιχνεύθηκαν επίσης στα ατρη-

τικά θυλάκια στην ωοθήκη και στον οισοφάγο των τρωκτικών του εργαστηρίου, καθώς και σε ιστούς βραδείας ανανέωσης, όπως το πάγκρεας, το ήπαρ και ο νεφρός.²⁴

Στο Εργαστήριο Ιστολογίας και Εμβρυολογίας εξετάσαμε τομές παραφίνης από ώριμο προστάτη αρουραίου, 7 ημέρες μετά από ευνουχισμό (εικ. 1), και μεσεντέριο λεμφαδένα ποντικού (εικ. 2). Στις τομές-μάρτυρες που επεξεργάστηκαν με DNάση, πριν από την επώαση με το μίγμα τελικής τρανσφεράσης/νουκλεοτιδίου (TdT/dUTP), χρωματίστηκαν, ανεξαρτήτως ιστού, όλοι οι πυρήνες. Σε ορισμένες περιπτώσεις, όταν η πρωτεόλυση ήταν ατελής, παρατηρήθηκαν μερικοί πυρήνες TUNEL-αρνητικοί (εικ. 3). Η έλλειψη της TdT ή της



Εικόνα 1. Χρώση TUNEL σε τομή παραφίνης ώριμου προστάτη αρουραίου, 7 ημέρες μετά από ευνουχισμό. Μεγέθυνση: 100× (α), 400× (β, ένθετα της α). (α) Αποπτωτικά κύτταρα με ομοιόμορφα χρωματισμένους πυρήνες παρατηρούνται μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων των πόρων του αδένα (βέλη). (β) Ορισμένα αποπτωτικά κύτταρα έχουν ήδη αποκολληθεί από το επιθήλιο και διακρίνονται μέσα στον αυλό (κεφαλή βέλους). Οι πυρήνες των περισσότερων επιθηλιακών κυττάρων είναι TUNEL-αρνητικοί και χρωματίζονται κυανοί με την αιματοξυλίνη.

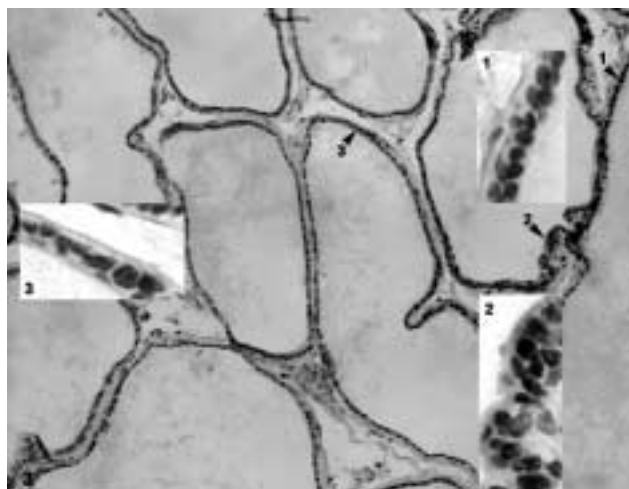


Εικόνα 2. Χρώση TUNEL σε τομή παραφίνης από μεσεντήριο λεμφαδένα ποντικού. Μεγέθυνση 100× (α) και 250× (β). TUNEL-θετικά αποπτωτικά κύτταρα διακρίνονται στο παρέγχυμα και τον υποκαψικό κόλπο, διάσπαρτα ή κατά ομάδες. Η χρώση των πυρήνων είναι έντονη και ομοιογενής. Στο ένθετο της εικόνας β διακρίνονται αθροίσματα αποπτωτικών κυττάρων. Είναι εμφανής η διαυγής άλω του κυτταροπλάσματος, που τα περιβάλλει. Οι πυρήνες των TUNEL-αρνητικών κυττάρων χρωματίζονται με το πράσινο του μεθυλίου.

dUTP από το ρυθμιστικό διάλυμα TdT οδήγησε σε αρνητικά αποτελέσματα.

Το παρατηρούμενο πρότυπο κατανομής διάσπαρτων αποπτωτικών κυττάρων στο λεμφαδένα είναι ανάλογο με αυτό που περιγράφεται στο σπλήνα.²⁴ TUNEL-θετικά κύτταρα ανιχνεύονται στα βλαστικά κέντρα, περιοχή που είναι γνωστή ως θέση αποπτωτικών κυττάρων και έχει προταθεί ότι η απόπτωση σε αυτή τη θέση αποτελεί αναπόφευκτη συνέπεια του έντονου ρυθμού κυτταρικού πολλαπλασιασμού⁶ ή, κατ' άλλους, της εκφύλισης των πλασματοκυττάρων, μετά την αντιγονική διέγερση και την έκκριση των ανοσοσφαιρινών.²⁷

Εξάλλου, τα παρατηρούμενα TUNEL-θετικά συσσωματώματα αντιπροσωπεύουν πιθανώς αποπτωτικά σωματίδια που έχουν ήδη φαγοκυτταρωθεί από τα μακρο-



Εικόνα 3. Χρώση TUNEL σε τομή παραφίνης ώριμου προστάτη αρουραίου, 7 ημέρες μετά από ευνουχισμό. Μεγέθυνση: 100× (3), 400× (ένθετα 1, 2, 3). Επεξεργασία με DNάση. Οι πυρήνες των περισσότερων επιθηλιακών κυττάρων χρωματίζονται έντονα. Μερικοί πυρήνες είναι TUNEL-αρνητικοί.

φάγα του φλοιού των λεμφαδένων και ο διαυγής δακτύλιος που τα περιβάλλει ανήκει στο κυτταρόπλασμα αυτών των κυττάρων. Ήδη από το 1963 έχουν περιγραφεί, μετά από παρατηρήσεις στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, κυτταρικά κατάλοιπα (tingible bodies) στο κυτταρόπλασμα των μακροφάγων, που παρουσιάζουν τα τυπικά χαρακτηριστικά των αποπτωτικών σωματίων που αποδομούνται.^{6,27} Στη διεργασία της φαγοκυττάρωσης συμμετέχουν ο υποδοχέας της βιτρονεκτίνης ή αυτός της φωσφατιδυλοσερίνης.^{28,29}

Παρόμοια TUNEL-θετικά συσσωματώματα ανιχνεύονται στις πλάκες του Peyer²⁴ και στο φλοιό του φυσιολογικού θύμου αδένου.²⁶ Διπλή χρώση για TUNEL και F4/80 δείκτη των μακροφάγων αποκαλύπτει ότι τα TUNEL-θετικά συσσωματώματα περιέχονται σε F4/80⁺ μακροφάγα.

Συνεπώς, η χρησιμότητα της μεθόδου TUNEL δεν περιορίζεται μόνο στην εντόπιση των κυττάρων που διανύουν τα αρχικά στάδια της απόπτωσης, όπως αναφέρει ο Woo,³⁰ αλλά επεκτείνεται και στην ανίχνευση των αποπτωτικών κυττάρων τα οποία έχουν φαγοκυτταρωθεί από τα μακροφάγα.

3.2. Τα ένζυμα

Οι μέθοδοι της *in situ* ανίχνευσης του κερματισμένου DNA βασίζονται στη χρήση της πολυμεράσης Kornberg,³¹ του τμήματος Klenow της DNA-πολυμεράσης I³² και της TdT,³³ για την προσθήκη βιοτινυλιωμένου νου-

κλεοτιδίου στα προεξέχοντα άκρα των εντομών του μονόκλωνου ή του δίκλωνου DNA. Για το λόγο αυτόν, έχουν χρησιμοποιηθεί οι όροι *In Situ* Nick-End Labeling (ISEL),^{23,24} TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling (TUNEL),²⁴ *In Situ* tailing και Nick Translation (ISNT).^{21,34,35} Ο τελευταίος όρος αποδίδει μόνο την ενζυμική δραστηριότητα της πολυμεράσης I του DNA, που μεταφράζει την εντομή προς την κατεύθυνση 5'→3'.

Η TdT είναι πιο αποτελεσματική για τα προεξέχοντα 3'-άκρα και δρα ανεξάρτητα από το υπόστρωμα.³⁶ Για την καταλυτική της δραστηριότητα είναι απαραίτητη η παρουσία διδύναμων καπόντων (το Co²⁺ απαιτείται για την προσθήκη πυριμιδινών).

3.3. Η ενζυμική αντίδραση

Το ένζυμο, διαλυμένο στο κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει το νουκλεοτίδιο, δρα σε τομές ιστών ή σε κυτταρικά παρασκευάσματα. Τα ενσωματωθέντα νουκλεοτίδια ανιχνεύονται αμέσως όταν χρησιμοποιείται dUTP συνδεδεμένη με φλουορεσεΐνη ή εμμέσως, με αντισώματα αντι-διγοξιγενίνης συνδεδεμένα με φλουορεσεΐνη, όταν η dUTP έχει σημανθεί με διγοξιγενίνη.²⁴ Αυτή η παραλλαγή της μεθόδου παρουσιάζει μεγαλύτερη ευαισθησία.³⁶

Σε άλλες παραλλαγές, τα αντισώματα αντι-διγοξιγενίνης είναι συνδεδεμένα με αλκαλική φωσφατάση, βιοτίνη ή υπεροξειδάση. Το προϊόν της αντίδρασης χρωματίζεται με nitro-blue tetrazolium και υπόστρωμα 5-βρωμο-4-χλωρο-3-ινδολυλ-φωσφορικό, παρουσία λεβαμιζόλης (για την αλκαλική φωσφατάση) ή με διαμινοβενζιδίνη (για την υπεροξειδάση). Η αντίδραση αναδεικνύεται όταν η χρώση TUNEL ή ISNT (*In Situ* Nick Translation) συνδυαστούν με χρώση αιματοξυλίνης, πράσινο του μεθυλίου ή DAPI.

3.4. Καταλληλότητα των ιστών

Οι τεχνικές ανίχνευσης του κερματισμένου DNA εφαρμόζονται σε τομές ψυκτικού μικροτόμου αλλά και σε τομές παραφίνης.^{22-24,37} Για την επιτυχία της αντίδρασης οι ιστοί πρέπει να μονιμοποιούνται αμέσως και να αποφεύγονται οι παρατεταμένοι χρόνοι μονιμοποίησης, δεδομένου ότι ελατώνουν την ευαισθησία.^{21,38} Καλά αποτελέσματα λαμβάνονται μετά από μονιμοποίηση σε διάλυμα φορμόλης σε PBS (phosphate-buffered formalin, pH 7,2), αλλά και η χρησιμοποίηση διαλύματος παραφορμαλδεΐδης σε PBS θεωρείται ικανοποιητική. Οποσδήποτε, όμως, δεν πρέπει να χρησιμοποιείται διάλυμα Bouin's, επειδή περιέχει 5% οξικό οξύ και, όπως είναι γνωστό, το χαμηλό pH προκαλεί μη ειδικές εγκοπές στο DNA. Δείγματα ιστών που μονιμοποιήθηκαν σε

διάλυμα Bouin's παρουσίασαν απaráδεκτα υψηλή χρώση υποστρώματος, κατά την αντίδραση της τελικής τρανσφεράσης. Στο παθολογοανατομικό υλικό, χρόνοι μονιμοποίησης μεγαλύτεροι των 6 ωρών επιτείνουν την αυτόλυση και οδηγούν σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα.^{39,40} Στους ιστούς των τρωκτικών, χρόνοι μονιμοποίησης μέχρι 24 ώρες δεν επηρεάζουν τη χρώση ISEL.⁴¹ Σε κυτταρικές καλλιέργειες, η βραχεία μονιμοποίηση στη φορμόλη ή την παραφορμαλδεΐδη εμποδίζει την απόλεια μικρών κλασμάτων DNA.³⁹ Η τεχνική ISEL μπορεί να εφαρμοστεί και σε τομές που επεξεργάζονται για πατήρηση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.⁴²

3.5. Προετοιμασία

Όταν ο ιστός έχει παραμείνει επί μακρόν στο μονιμοποιητικό διάλυμα, είναι δυνατό να βελτιωθεί μετά από επεξεργασία στο φούρνο μικροκυμάτων ή μετά από πρωτεόλυση με πρωτεΐνάση K. Η συγκέντρωση και η διάρκεια επίδρασης της πρωτεΐνάσης K πρέπει να καθορίζονται για κάθε ιστό. Η πρωτεόλυση θεωρείται ανεπαρκής, όταν δεν χρωματίζονται οι πυρήνες στα βαθύτερα στρώματα των τομών που επεξεργάζονται με D-Νάση και χρησιμοποιούνται ως μάρτυρες. Αντίθετα, η ισχυρή πρωτεόλυση ακολουθείται από αλλοίωση της ιστικής μορφολογίας έως και πλήρη διάλυση του ιστού. Ο Wijnsman χρησιμοποιεί πεψίνη, αντί της πρωτεΐνάσης K, με καλά αποτελέσματα, σε όλους σχεδόν τους ιστούς.²³

Η πρωτεόλυση με πεψίνη,^{15,23} πρωτεΐνάση K,^{15,21-24} S1 νουκλεάση ή νουκλεάση mung bean⁴³ διευκολύνει την πρόσβαση στο DNA, επειδή διασπά τους διασταυρούμενους δεσμούς, που δημιουργούνται κατά τη μονιμοποίηση στις πυρηνικές πρωτεΐνες. Έτσι, γίνεται προσπελάσιμη η συμπυκνωμένη –κατά την απόπτωση– χρωματίνη. Επιπλέον, η νουκλεάση mung bean διασπά τα προεξέχοντα 5'- και 3'-άκρα και διευκολύνει τη δράση της TdT. Η επεξεργασία με πρωτεΐνάση K (25 μg/mL για 15 min στους 37 °C) είναι αποτελεσματικότερη για την αύξηση της ευαισθησίας, σε ιστούς που έχουν παραμείνει στο μονιμοποιητικό μέσο για μεγάλο χρονικό διάστημα.

Η αποκάλυψη των αντιγόνων (antigen retrieval), που εφαρμόζεται στην ανοσοϊστοχημεία,⁴⁴ για αύξηση της ευαισθησίας, έχει δοκιμαστεί και στις τεχνικές ISNT και TUNEL.⁴⁵ Δίνει καλά αποτελέσματα, όταν υλικό αρχείου επεξεργάζεται στο φούρνο μικροκυμάτων με ρυθμιστικό διάλυμα κητρικού, προκαλείται όμως μη ειδική χρώση σε ιστούς που έχουν διατηρηθεί στο μονιμοποιητικό για μικρότερο διάστημα, δηλαδή έως 3 ημέρες.^{37,38}

Σύμφωνα με τους Lucassen et al, η επεξεργασία στο φούρνο μικροκυμάτων προκαλεί μη ειδική χρώση σε ιστούς αρουραίου και ανθρώπου, ακόμη και μετά από μακρά περίοδο μονιμοποίησης.³⁸ Γίνεται, συνήθως, για 1–10 min σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού (pH 3,0–6,0, 10 mM), αλλά έχουν αναφερθεί και παραλλαγές της μεθόδου, διαφορετικής διάρκειας, έντασης και pH (μέχρι 10,6 βασικού διαλύματος TRIS), σε συνδυασμό με συγκεκριμένα μονιμοποιητικά υγρά.^{37,38,45} Ορισμένοι είχαν καλά αποτελέσματα όταν εφάρμοσαν συνδυασμό επεξεργασίας στο φούρνο μικροκυμάτων και πρωτεόλυσης.^{23,37,45} Σημειώνεται ότι, για τους ιστούς που έχουν μονιμοποιηθεί σε παραφορμαλδεύδη, δεν απαιτείται καμία προεργασία για τις τεχνικές ISNT/TUNEL, επειδή ο χρόνος παραμονής στο μονιμοποιητικό είναι μικρός. Αν γίνει προεργασία, τότε τα μορφολογικά χαρακτηριστικά αλλοιώνονται και η αντίδραση του υποστρώματος επιτείνεται.³⁸

Στο στάδιο της ενσωμάτωσης του νουκλεοτιδίου θα πρέπει να εξετασθεί η συγκέντρωση της τελικής τρανσφεράσης, για κάθε ιστό. Μεγαλύτερη συγκέντρωση του ενζύμου προκαλεί αμυδρή χρώση και των φυσιολογικών πυρήνων. Ανάλογο εύρημα αναφέρεται και από ερευνητές που χρησιμοποιούν το ένζυμο DNA-πολυμεράση αντί της TdT.¹⁵

3.6. Ανίχνευση αποπτωτικών ή νεκρωτικών κυττάρων;

Ο κερματισμός του DNA δεν είναι ειδικό χαρακτηριστικό της απόπτωσης και οι τεχνικές ανίχνευσης του κερματισμού *in situ* θα πρέπει να χαρακτηρίζονται ανάλογα με τη δυνατότητά τους να διακρίνουν, κατά πρότιμηση, τα αποπτωτικά από τα νεκρωτικά κύτταρα.^{15,21,34,36,46} Λόγω του μεγάλου αριθμού των εντομών στο DNA, τα αποπτωτικά κύτταρα διακρίνονται και με τις δύο μεθόδους. Στη νέκρωση, ο κερματισμός είναι τυχαίος, όψιμος και αφορά κυρίως στο μονόκλωνο DNA. Συνήθως, τα νεκρωτικά κύτταρα χρωματίζονται αμυδρά με την τεχνική της TdT και πιο έντονα με την τεχνική της DNA πολυμεράσης, λόγω της ενίσχυσης που δημιουργείται από την προοδευτική μετακίνηση της εντομής κατά μήκος της αλυσίδας του DNA (nick translation).^{21,36} Καμία, όμως, από τις δύο τεχνικές δεν θεωρείται ειδική της νέκρωσης ή της απόπτωσης. Μόνον όταν γίνεται συνδυασμός των αποτελεσμάτων με παρατήρηση των μορφολογικών ευρημάτων ή με ανίχνευση των αποπτωτικών πρωτεϊνών, επιβεβαιώνεται ότι πρόκειται για αποπτωτικά κύτταρα.^{15,21,23,42,47,48}

3.7. Προφυλάξεις

Ενώ οι τεχνικές *in situ* χρησιμοποιήθηκαν ευρύτατα μέχρι σήμερα για την ανίχνευση των παθολογικών κυττάρων, σε πολλαπλές παθολογικές καταστάσεις, αναπτύχθηκε παράλληλα και η επιφύλαξη ότι ο κερματισμός του DNA δεν ισοδυναμεί απαραίτητα με απόπτωση.^{39,49,50} Παράγοντες σχετικοί με την αυτόλυση των ιστών, τη μονιμοποίηση, τη σκόνωση, το κόψιμο, την εξουδετέρωση της ενδογενούς υπεροξειδάσης με H₂O₂, τις διάφορες προεργασίες και, κυρίως, η νέκρωση μπορούν να προκαλέσουν «μη αποπτωτικό» κερματισμό του DNA.

Η μεταγραφή του RNA και η επιδιόρθωση του DNA ανιχνεύονται, επίσης, με την τεχνική ISEL.^{50–52} Το μέγεθος του ανιχνευόμενου κερματισμού του DNA εξαρτάται από τεχνικές παραμέτρους, π.χ. τη συγκέντρωση, τον τύπο και τη δραστικότητα του χρησιμοποιούμενου ενζύμου, τη διάρκεια δράσης του και από άλλες συνθήκες προεργασίας. Συνήθως, είναι απαραίτητη η χρήση μαρτύρων, αρνητικών και θετικών, για την αξιολόγηση της τεχνικής και θεωρείται ιδιαίτερα χρήσιμη η πολυπαραμετρική προσέγγιση για την εντόπιση των αποπτωτικών κυττάρων, π.χ. ISEL και μορφολογικά κριτήρια,^{15,23} ISEL και ανοσοϊστοχημεία για τις αποπτωτικές πρωτεΐνες^{48,53–55} ή ISEL και υβριδισμός *in situ*.⁵⁶

3.8. Υβριδισμός *in situ* για την ανίχνευση των αποπτωτικών κυττάρων

Η ευαισθησία του αποπτωτικού DNA στη μετουσίωση αποτελεί τη βάση χρησιμοποίησης σημανθέντων ανιχνευτών poly(A) για τον εντοπισμό των αποπτωτικών κυττάρων σε ιστούς που έχουν μονιμοποιηθεί σε φορμόλη και σκηνωθεί σε παραφίνη.⁵⁷

Οι ανιχνευτές poly(A) συνδέονται με τις επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες Alu, οι οποίες είναι πιο ευαίσθητες στη μετουσίωση λόγω του χαμηλότερου σημείου τήξης των A-T και της πρωιμότερης πρωτεόλυσης των ιστονών. Με την τεχνική αυτή εντοπίζονται κύτταρα, των οποίων ο κερματισμός του DNA βρίσκεται στα αρχικά στάδια. Έχει, επίσης, περιγραφεί και μια μέθοδος για την ανίχνευση των εντομών του δίκλωνου DNA.⁵⁸

4. ΣΗΜΑΝΣΗ *in vivo* ΜΕ ΑΝΕΞΙΝΗ

Η ανεξίνη V χρησιμοποιείται ευρέως για την ανίχνευση των αποπτωτικών κυττάρων στον κυτταρομετρική ροής και συνδέεται με τη φωσφατιδυλοσερίνη, που έχει μετατοπιστεί στο εξωτερικό πέταλο της κυτταρικής μεμβράνης, κατά τη διάρκεια της αποπτωτικής διεργασίας.⁵⁹ Αν χορηγηθεί, *in vivo*, σημανθείσα (π.χ. βιοτι-

υλιωμένη) ανεξίτη V, επιτρέπεται η εντόπιση των αποπτωτικών κυττάρων στους ιστούς, μετά τη θυσία του πειραματοζώου.⁶⁰⁻⁶² Όμως, η σήμανση με ανεξίτη V δεν μπορεί να γίνει σε τομές ιστών, δεδομένου ότι, στην περίπτωση αυτή, εκτίθενται και τα δύο πέταλα της κυτταρικής μεμβράνης.^{60,61}

Σημειώνεται ότι η μετατόπιση της φωσφατιδυλοσερίνης προηγείται του κερματισμού του DNA⁶³ και, συνεπώς, επιτρέπει την ανίχνευση των αποπτωτικών κυττάρων στα αρχικά στάδια της διεργασίας, παρόλο που, τελευταία, αυτή η άποψη δεν φαίνεται να ισχύει για τα νευρικά κύτταρα.⁶⁴

5. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΣΧΕΤΙΚΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Τα μόρια-κλειδιά της αποπτωτικής διεργασίας είναι ήδη γνωστά και η ανίχνευσή τους *in situ* δεν είναι απλώς ειδική, αλλά δείχνει και σε ποια φάση της απόπτωσης βρίσκεται το εξεταζόμενο κύτταρο. Οι πρωτεΐνες που εντοπίζονται συχνότερα, ανιχνεύουν αποπτωτικά κύτταρα σε προχωρημένο στάδιο. Από τους χρησιμοποιούμενους αντιορούς αναφέρονται εκείνοι που εντοπίζουν τα προϊόντα διάσπασης, τα οποία δημιουργούνται από τη δράση των κασπασών. Άλλοι είναι ειδικοί για την ανίχνευση της ενεργοποιημένης κασπάσης-3 και για ορισμένα στοιχεία του κυτταροσκελετού (“apoptosis specific protein”, ASP). Οι Grand et al ετοίμασαν έναν πολυκλωνικό αντιορό, ο οποίος αναγνωρίζει τα αμινοξέα 73–87 του αμινοτελικού άκρου του παράγοντα μεταγραφής c-Jun και ανιχνεύει ειδικά τα αποπτωτικά κύτταρα *in vitro*.⁶⁵ Επιπλέον, φαίνεται ότι ο συγκεκριμένος αντιορός ανιχνεύει, εκτός από το c-Jun, και ένα (ακόμη μη χαρακτηρισθέν) κυτταροπλασματικό νεοεπιτόπιο, που εμφανίζεται κατά την απόπτωση, αλλά ίσως να πρόκειται για ένα τροποποιημένο μόριο ή σύμπλοκο του μεταγραφικού παράγοντα c-Jun.⁶⁵⁻⁶⁷ Πρόσφατα, αναφέρθηκε ότι ο αντιορός c-Jun/AP-1(N), sc45 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz Calif) κατά των αμινοξέων 91–105 του c-Jun του ποντικού είναι, επίσης, ειδικός για τα αποπτωτικά κύτταρα και αντιστοιχεί στην αλληλουχία που χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή του c-Jun/AP-1, Ab-2.^{66,67}

5.1. Αντιοροί κατά της ενεργοποιημένης κασπάσης-3

Οι κασπάσες είναι πρωτεάσες της κυστεΐνης, ειδικές του ασπαρτικού και ανήκουν στην οικογένεια ICE/CED-3.⁶⁸ Όπως και οι άλλες πρωτεάσες συντίθενται ως ανενεργά προένζυμα, που αποτελούνται από το αμινοτελικό (-NH₂)

άκρο, τη μεγάλη (p18) και τη μικρή (p12) υπομονάδα. Οι κασπάσες λειτουργούν ως «εκτελεστές» (κασπάση-2, -3, -4, -5, -6, -7, -11, -12, -13, -14), αλλά και ως «εισαγωγικά» μόρια (initiators) (κασπάση-8, -9, -10), στην αποπτωτική διεργασία. Δηλαδή, μετά την εφαρμογή του αποπτωτικού ερεθίσματος, ενεργοποιούν τις κασπάσες «εκτελεστές», π.χ. την κασπάση-3, η οποία ακολουθώντας διασπά μια μεγάλη ποικιλία κυτταρικών υποστρωμάτων, μεταξύ των οποίων τη φοδρίνη, την ακτίνη, την γκελζολίνη, την πολυ(ADP-ριβόζη)-πολυμεράση (PARP) και μια εστιακή κινάση. Μέχρι σήμερα, έχουν αναγνωριστεί περισσότερα από 40 υποστρώματα δράσης των κασπασών.^{69,70}

Ο αντιορός CM-1 αναγνωρίζει αποκλειστικά τη μεγάλη υπομονάδα της κασπάσης-3 και συνεπώς είναι ειδικός για την ενεργοποιημένη μορφή της. Επομένως, αποτελεί έναν ευαίσθητο και ειδικό δείκτη των αποπτωτικών κυττάρων.^{2,5,71-73} Εκτός αυτού, υπάρχουν και άλλοι αντιοροί κατά της ενεργοποιημένης κασπάσης-3,⁷⁴⁻⁷⁶ οι οποίοι επίσης προτείνονται ως ειδικοί δείκτες για την ανίχνευση των αποπτωτικών κυττάρων, δεδομένου ότι κατά τη νέκρωση δεν παρατηρείται ενεργοποίηση των κασπασών.^{14,77} Άρα, η ανίχνευση της ενεργοποιημένης κασπάσης-3 αποτελεί τον καλύτερο τρόπο αναγνώρισης των αποπτωτικών κυττάρων και μάλιστα πριν από την εμφάνιση των υπόλοιπων χαρακτηριστικών της απόπτωσης, π.χ. του κερματισμού του DNA.

5.2. Ανίχνευση των πρωτεϊνικών κλασμάτων δράσης των κασπασών

Με ειδικούς αντιορούς κατά των προϊόντων διάσπασης των κασπασών ανιχνεύονται οι κασπάσες στα αποπτωτικά κύτταρα. Αναφέρονται ειδικά τα προϊόντα διάσπασης της κυτοκερατίνης-18, με την οποία αναγνωρίζονται τα αποπτωτικά επιθηλιακά κύτταρα,⁷⁸ της ακτίνης («φρακτίνης»), που ανιχνεύεται στα κύτταρα του νευροβλαστώματος και στους νευρώνες που συνδυάζονται με τις πλάκες στη νόσο Alzheimer, ενώ, ακόμα, υπάρχουν και αντιοροί κατά της πρόδρομος πρωτεΐνης του αμυλοειδούς⁷⁶ και κατά του κλάσματος των 85 kDa της PARP.⁷⁹ Τα αντισώματα κατά της ιστικής τρανσγλουταμίνης ανιχνεύουν, επίσης, αποπτωτικά κύτταρα. Στην κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιείται το μονοκλωνικό αντίσωμα αρ2.4, το οποίο συνδέεται με μια αποπτωτική πρωτεΐνη των μιτοχονδρίων.⁸⁰ Τέλος, ένας γενικός δείκτης της βλάβης του DNA, με μεγάλη ευαισθησία για τα αποπτωτικά κύτταρα, είναι η ανίχνευση των πολυμερών της ADP-ριβόζης, τα οποία συντίθενται από την PARP ως απάντηση στη βλάβη του γενετικού υλικού.⁴⁸

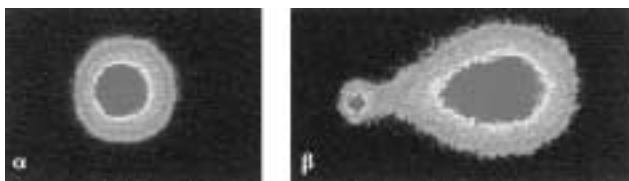
6. Η ΜΕΘΟΔΟΣ SCGE (SINGLE-CELL GEL ELECTROPHORESIS) Ή COMET

Πρόκειται για μια δοκιμασία ανίχνευσης του κερματισμένου DNA σε μεμονωμένα κύτταρα, με ηλεκτροφόρηση. Ονομάζεται έτσι λόγω του χαρακτηριστικού σχήματος που παρατηρείται, σε περίπτωση μεγάλης έκτασης βλάβης, κατά την έξοδο του κερματισμένου DNA από τον πυρήνα και το κύτταρο και τη μετανάστευσή του προς την άνοδο.⁸¹⁻⁸⁵

Όσον αφορά στις λεπτομέρειες, η τεχνική μπορεί να παρουσιάζει διαφορές από το ένα εργαστήριο στο άλλο, αλλά στην ουσία περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα: προετοιμασία εναιωρήματος κυττάρων, προετοιμασία πηκτώματος αгарόζης, κυτταρόλυση, ξετύλιγμα του DNA, ηλεκτροφόρηση, χρώση του DNA και μικροσκοπική ανάλυση της εικόνας.

Ο κομήτης που παρατηρείται κατά την ανάλυση της εικόνας αποτελείται από κεφαλή και ουρά (εικ. 4). Η περιοχή της κεφαλής αντιπροσωπεύει το DNA που δεν μεταναστεύει έξω από τον πυρήνα, ενώ στην ουρά βρίσκονται τα θραύσματα του DNA που εξέρχονται από τον πυρήνα και το κυτταρικό σώμα. Σε μια δεδομένη θέση, το ποσό του DNA είναι ανάλογο της έντασης φθορισμού. Οι συνθετέστερες παράμετροι είναι η ποσοστιαία αναλογία των κυττάρων με ουρά, η εκατοστιαία αναλογία του DNA στην ουρά, το μήκος της ουράς και η τάση για κίνηση της ουράς.⁸⁶⁻⁸⁸

Ανάλογα με τις συνθήκες, ελέγχεται αν η βλάβη αφορά στο μονόκλωνο ή δίκλωνο DNA. Σε αλκαλικό pH γίνεται το ξετύλιγμα και η μετουσίωση του DNA και ανιχνεύεται η βλάβη στο μονόκλωνο, ενώ σε ουδέτερο pH δεν γίνεται μετουσίωση και, επομένως, ανιχνεύονται οι βλάβες της διπλής αλυσίδας. Η λύση των κυττάρων γίνεται σε ουδέτερο ή αλκαλικό περιβάλλον και οι συνδεόμενες στο DNA πρωτεΐνες απομακρύνονται, ώστε να μην παρεμβάλλονται κατά τη μετανάστευση στο ηλεκτρικό πεδίο. Η προσεκτική έκπλυση του πηκτώματος



Εικόνα 4. Κύτταρα HL-60 σε πηκτώμα αгарόζης και αλκαλικό pH μετά από χρώση με propidium iodide. Στο α φαίνεται ένα κύτταρο με ελάχιστο βαθμό κερματισμού, με αποτέλεσμα το DNA να παραμένει στον πυρήνα. Αντίθετα, στο β, όπου το αποπτωτικό κύτταρο έχει υποστεί εκτεταμένο κερματισμό, το DNA μεταναστεύει έξω από το κυτταρικό σώμα (κεφαλή του κομήτη) και μέσα στο πηκτώμα της αгарόζης (ουρά του κομήτη).⁸⁷

σε διαλύματα κατάλληλου pH συντελεί στην απομάκρυνση και άλλων ιόντων, που, πιθανώς, θα μετέβαλλαν τις συνθήκες ηλεκτροφόρησης.

6.1. Εφαρμογές – Πλεονεκτήματα

Μεταξύ άλλων, η μέθοδος εφαρμόζεται για (α) τη μελέτη του μηχανισμού βλάβης του DNA και της βιολογικής σημασίας αυτής, (β) την καταγραφή των μεταλλάξεων και των καρκινογόνων ουσιών *in vivo* και *in vitro*, (γ) τον έλεγχο της δράσης των αντιοξειδωτικών ουσιών. Τροποποιήσεις και παραλλαγές της αρχικής μεθόδου με χρήση ενζύμων επιδιόρθωσης, εξωγενών και ενδογενών, πολλαπλασιάζουν τις δυνατότητες εφαρμογής της. Σε σύγκριση με τις άλλες δοκιμασίες ανίχνευσης της βλάβης στο DNA, η μέθοδος comet υπερέρχει, διότι εμφανίζει μεγάλη ευαισθησία, είναι σχετικά εύκολη και απαιτεί μικρό χρόνο προετοιμασίας. Δίνει πληροφορίες για την κατάσταση κάθε κυττάρου και, συνεπώς, επιτρέπει λεπτομερή στατιστική ανάλυση. Μπορεί να εφαρμοστεί στα περισσότερα ευκαρυωτικά κύτταρα και σε δείγματα που περιέχουν μικρό αριθμό κυττάρων (<10.000).

Το βασικό πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι μετρά την απάντηση στη βλάβη του DNA σε μεμονωμένα κύτταρα και, συνεπώς, επιτρέπει τη μελέτη της ετερογένειας ενός δεδομένου κυτταρικού πληθυσμού. Για το λόγο αυτόν, η μέθοδος είναι σημαντική στη διερεύνηση και μέτρηση της δράσης παραμέτρων όπως η υποξία ή η ακτινοβολία, που συντελούν στην επαγωγή της βλάβης του DNA.⁸⁷

Λόγω του εκτεταμένου κερματισμού του DNA, που χαρακτηρίζει την αποπτωτική διεργασία, και με τη βοήθεια της τεχνολογίας, που επιτρέπει τη χρήση ψηφιακής εικόνας για την παρατήρηση, η εφαρμογή της τεχνικής comet διευκολύνει την αναγνώριση των αποπτωτικών κυττάρων, δεδομένου ότι το σύνολο του DNA μεταναστεύει έξω από την κεφαλή του κομήτη. Στην εικόνα 4 φαίνεται στο Α ένα κύτταρο με ελάχιστο βαθμό κερματισμού, με αποτέλεσμα το DNA να παραμένει μέσα στον πυρήνα. Αντίθετα, στο Β, όπου το αποπτωτικό κύτταρο έχει υποστεί εκτεταμένο κερματισμό, το DNA μεταναστεύει έξω από το κυτταρικό σώμα (κεφαλή του κομήτη) και μέσα στο πηκτώμα της αгарόζης (ουρά του κομήτη).⁸⁷

7. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Αρκετοί ιστοί και κυτταρικοί πληθυσμοί υφίστανται αποπτωση, είτε κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης είτε στον ώριμο οργανισμό. Η ανάλυση του φαινομένου του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου διευκολύνει την κατανόηση των μηχανισμών που επιστρατεύονται όταν το

κύτταρο καλείται να απαντήσει σε αποπτωτικά ερεθίσματα. Οι τεχνικές TUNEL και comet αποτελούν δύο εξαιρετικά εργαλεία, που επιτρέπουν στους ερευνητές να αναλύσουν σε βάθος αυτό το φαινόμενο, μέσω της διαφορετικής συμπεριφοράς και εμφάνισης των ζωντανών και των αποπτωτικών κυττάρων. Οι δύο τεχνικές αλληλοσυμπληρώνονται και μπορούν να χρησιμοποιούνται συγχρόνως, πρώτον, για να διαπιστωθεί αν πράγματι πρόκειται για απόπτωση και, δεύτερον, για να καταγραφεί λεπτομερώς η κυτταρική ετερογένεια σε ένα δεδομένο κυτταρικό πληθυσμό. Εξαπτίας των εγγενών τεχνικών δυσκολιών, που παρουσιάζονται σε κάθε μια από τις προαναφερθείσες τεχνικές, είναι προφανές ότι ο συνδυασμός των αποτελεσμάτων, που προκύπτουν από

αυτές, οδηγεί σε ένα πληρέστερο συμπέρασμα για την καλύτερη κατανόηση της αποπτωτικής διεργασίας και της ανταπόκρισης του κυττάρου στη βλάβη του DNA.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Απευθύνονται στον Πρόεδρο της Ιατρικής Σχολής και Διευθυντή του Εργαστηρίου Ιστολογίας και Εμβρυολογίας Καθηγητή κ. Χρήστο Κίττα, που επέτρεψε να πραγματοποιηθεί η παρούσα εργασία και διευκόλυνε ουσιαστικά την ολοκλήρωσή της. Η λήψη και η επεξεργασία των εικόνων στον Η/Υ έγινε από την κα Πηνελόπη Τσιάρα, την οποία ευχαριστούμε θερμά.

ABSTRACT

Techniques for the detection of fragmented DNA

R. ANGELOPOULOU, M. KYRIAZOGLOU

Laboratory of Histology and Embryology, Medical School, University of Athens, Athens, Greece

Archives of Hellenic Medicine 2002, 19(2):167-178

The localization of apoptotic cells, which was previously based on morphology and the detection of DNA fragmentation by biochemical or histochemical techniques, is now performed by more specific enzymatic methods for the *in situ* visualization of fragmented DNA. These methods rely on the use of DNA polymerase I (ISNT, *in situ* Nick Translation) or TdT (TUNEL, Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick End Labeling). The basic principle is the insertion or addition of labeled (biotinylated) nucleotides in sites of single- and/or double-strand breaks. The DNA fragmentation techniques are applied to frozen or paraffin-embedded tissue sections. Long fixation times should be avoided because they reduce sensitivity. Factors such as autolysis, fixation, embedding, sectioning, quenching of endogenous peroxidase and necrosis may cause "non-apoptotic" DNA fragmentation. Pretreatment procedures include microwaving and/or predigestion with pepsin or proteinase K. For validating the technique the use of appropriate positive and negative control tissue samples is indispensable, and the multiparametric approach, i.e. TUNEL and morphological or immunohistochemical data, is applied for detection of apoptosis-related proteins, or *in situ* hybridization. Antisera against activated caspase-3 are considered to be specific markers for apoptotic cells because no activation of the caspase cascade has been found in necrotic cell death. Annexin V is used for flow-cytometric detection of apoptotic cells; it binds to phosphatidylserine transposed to the outer membrane leaflet during the apoptotic process. Phosphatidylserine externalization precedes DNA fragmentation, thus allowing the detection of apoptotic cells in the early stages of apoptosis. Comet assay detects fragmented DNA at the single cell level by electrophoresis. The technique was named according to the characteristic shape seen when the DNA exits the nucleus and cell body and migrates towards the anode. Different conditions allow the study of either single- or double-strand DNA breaks. The foremost advantage of the comet assay is that it measures the response of individual cells, thus allowing one to study heterogeneity within a cell population. Combination of the results of the above mentioned techniques permits the detailed and extensive analysis of cell death phenomenon and allows the quantification of the amount of fragmented DNA and cellular response to DNA damage.

Key words: Apoptosis, Caspases, Comet, Fragmented DNA, TUNEL

Βιβλιογραφία

1. ΑΓΓΕΛΟΠΟΥΛΟΥ Ρ, ΛΕΒΕΝΤΗΣ Α. Απόπτωση. *Ιατρική* 1997, 71: 562–572
2. STADELMANN C, LASSMANN H. Detection of apoptosis in tissue sections. *Cell Tissue Res* 2000, 301:19–31
3. WILLINGHAM MC. Cytochemical methods for the detection of apoptosis. *J Histochem Cytochem* 1999, 47:1101–1109
4. HUPPERTZ B, FRANK H-G, KAUFMAN P. The apoptosis cascade—morphological and immunohistochemical methods for its visualization. *Anat Embryol* 1999, 200:1–18
5. SRINIVASAN A, ROTH KA, SAVERS RO, SHINDLER KS, WONG AM, FRITZ LC ET AL. *In situ* immunodetection of activated caspase-3 in apoptotic neurons in the developing nervous system. *Cell Death Differ* 1998, 5:1004–1016
6. KERR JFR, WYLLIE AH, CURRIE AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972, 26:239–257
7. WYLLIE AH. Cell death. *Int Rev Cytol* 1987, 17(Suppl):755–785
8. KERR JFR, GOBE GC, WINTERFORD CM, HARMON BV. Anatomical methods in cell death. In: Schwartz LM, Osborne BA (eds) *Methods in Cell Biology. Cell death*. Academic Press, San Diego, 1995, 46:1–26
9. CLARKE PGH, CLARKE S. Nineteenth century research on naturally occurring cell death and related phenomena. *Anat Embryol* 1996, 193:923–934
10. COHEN JJ, DUKE RC. Glucocorticoid activation of a calcium-dependent endonuclease in thymocyte nuclei leads to cell death. *J Immunol* 1984, 132:38–42
11. ARENDS MJ, MORRIS RG, WYLLIE AH. Apoptosis. The role of the endonuclease. *Am J Pathol* 1990, 136:593–608
12. SAKAHIRA H, ENARI M, NAGATA S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 1998, 391:96–99
13. BORTNER CD, OLDENBURG NBE, CIDLOWSKI JA. The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends Cell Biol* 1995, 5:21–26
14. DONG Z, SAIKUMAR P, WEINBERG JM, VENKATACHALAM MA. Internucleosomal DNA cleavage triggered by plasma membrane damage during necrotic cell death: involvement of serine but not cysteine proteases. *Am J Pathol* 1997, 151:1205–1213
15. ANSARI B, COATES PJ, GREENSTEIN BD, HALL PA. *In situ* end-labelling detects DNA strand breaks in apoptosis and other physiological and pathological states. *Am J Pathol* 1993, 136:593–608
16. GAZIT B, CEDAR H, LERER I, VOSS R. Active genes are sensitive to deoxyribonuclease I during metaphase. *Science* 1982, 217: 648–650
17. MODAK SP, BOLLUM FJ. Detection and measurement of single-strand breaks in nuclear DNA in fixed lens sections. *Exp Cell Res* 1972, 75:307–313
18. MURER-ORLANDO ML, RETERSON AC. *In situ* nick translation of human and mouse chromosomes detected with biotinylated nucleotide. *Exp Cell Res* 1985, 157:322–334
19. DAWSON BA, LOUGH J. Immunocytochemical localization of transient DNA strand breaks in differentiating myotubes using *in situ* nick-translation. *Dev Biol* 1988, 127:362–367
20. FEHSEL K, BACHOFEN-KOLB V, KOLB H. Analysis of TNF α induced DNA strand breaks at the single cell level. *Am J Pathol* 1991, 139: 251–254
21. GOLD R, SCHMIED M, ROTHE G, ZISCHLER H, BREITSCHOPF H, WEKERLE H ET AL. Detection of DNA fragmentation in apoptosis: application of *in situ* nick translation to cell culture systems and tissue sections. *J Histochem Cytochem* 1993, 41:1023–1030
22. ISEKI S. DNA strand breaks in rat tissues as detected by *in situ* nick translation. *Exp Cell Res* 1986, 167:311–326
23. WIJSMAN JH, JONKER RR, KEIJZER R, VELDE CJ VAN DE, CORNELISSE CJ, DIERENDONCK JH VAN. A new method to detect apoptosis in paraffin sections: *in situ* end-labeling of fragmented DNA. *J Histochem Cytochem* 1993, 41:7–12
24. GAVRIELI Y, SHERMAN Y, BEN-SASSON SA. Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992, 119:493–501
25. MODAK SP, BOLLUM FJ. Terminal lens differentiation III. Initiator activity of DNA during nuclear degeneration. *Exp Cell Res* 1970, 62:421–432
26. SURH CD, SPRENT J. T-cell apoptosis detected *in situ* during positive and negative selection in the thymus. *Nature* 1994, 372:100–103
27. SWARTZENDRUBER DC, CONGDON CC. Electron microscope observations on tingible body macrophages in mouse spleen. *J Cell Biol* 1963, 19:641–646
28. SAVILL JS, DRANSFIELD I, HOGG N, HASLETT C. Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Nature* 1990, 343:170–173
29. FADOK VA, SAVILL JS, HASLETT C, BRATTON DL, DOHERTY DL, CAMPBELL PA ET AL. Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells. *J Immunol* 1992, 149:4029–4035
30. WOO D. Apoptosis and loss of renal tissue in polycystic kidney disease. *N Engl J Med* 1995, 333:18–25
31. KELLEY WS, STUMP KH. A rapid procedure for isolation of large quantities of *Escherichia coli* DNA polymerase I utilizing a λ polA transducing phage. *J Biol Chem* 1979, 254:3206–3210
32. KLENOW H, HENNINGSEN I. Selective elimination of the exonuclease activity of the deoxyribonucleic acid polymerase from *Escherichia coli* B by limited proteolysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1970, 65:168–175
33. ROYCHOUDHURY R, JAY E, WU R. Terminal labeling and addition of homopolymer tracts to duplex DNA fragments by terminal deoxynucleotidyl transferase. *Nucl Acid Res* 1976, 3:863–877
34. GOLD R, SCHMIED M, GIEGERICH G, BREITSCHOPF H, HARTUNG HP, TOYKA KV ET AL. Differentiation between cellular apoptosis and necrosis by the combined use of *in situ* tailing and nick translation techniques. *Lab Invest* 1994, 71:219–225
35. DENG GR, WU R. Terminal transferase: use in the tailing of DNA and for *in vitro* mutagenesis. *Methods Enzymol* 1983, 100:96–116
36. GORCZYCA W, GONG J, DARZYNKIEWICZ Z. Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the *in situ* terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translations assays. *Cancer Res* 1993, 53:1945–1951
37. LABAT-MOLEUR F, GUILLERMET C, LORIMIER P, ROBERT C, LANTUEJOL S, BRAMBILLA E ET AL. TUNEL apoptotic cell detection in tissue sections: critical evaluation and improvement. *J Histochem Cytochem* 1998, 46:327–334

38. LUCASSEN PJ, CHUNG WCJ, VERMEULEN JP, VAN LOKEREN CAMPAGNE M, DIERENDONCK JH, SWAAB DF. Microwave-enhanced *in situ* end-labeling of fragmented DNA: parametric studies in relation to postmortem delay and fixation of rat and human brain. *J Histochem Cytochem* 1995, 43:1163–1171

39. GRASL-KRAUPP B, RUTTKAY-NEDECKY B, KOUDELKA H, BYKO-WSKA K, BURSCH W, SCHULTE-HERMANN R. *In situ* detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note. *Hepatology* 1995, 21:1465–1468

40. LUCASSEN PJ, CHUNG WCJ, KAMPHORST W, SWAAB DF. DNA damage distribution in the human brain as shown by *in situ* end labeling; area-specific differences in aging and Alzheimer's disease in the absence of apoptotic morphology. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997, 56:887–900

41. PETITO CK, ROBERTS B. Effect of postmortem interval on *in situ* end-labeling of DNA oligonucleosomes. *J Neuropathol Exp Neurol* 1995, 54:761–765

42. GOPING G, WOOD KA, SEI Y, POLLARD HB. Detection of fragmented DNA in apoptotic cells embedded in LR White: a combined histochemical (LM) and ultrastructural (EM) study. *J Histochem Cytochem* 1999, 47:561–568

43. UMEMURA S, YASUDA M, OSAMURA RY, KAWARADA Y, SUGIYAMA T, TSUTSUMI Y. Enhancement of TdT mediated dUTP-biotin nick end-labeling (TUNEL) method using mung bean nuclease, a single-stranded DNA digestion enzyme. *J Histochem Cytochem* 1996, 44:125–132

44. SHI S-R, COTE RJ, TAYLOR CR. Antigen retrieval immunohistochemistry: past, present, and future. *J Histochem Cytochem* 1997, 45:327–343

45. STRATER J, GUNTHER AR, BRUDERLEIN S, MOLLER P. Microwave irradiation of paraffin-embedded tissue sensitizes the TUNEL method for *in situ* detection of apoptotic cells. *Histochemistry* 1995, 103:157–160

46. MUNDLE SD, RAZA A. The two *in situ* techniques do not differentiate between apoptosis and necrosis but rather reveal distinct patterns of DNA fragmentation in apoptosis. *Lab Invest* 1995, 72:611–613

47. COLLINS JA, SCHANDL CA, YOUNG KK, VESELY J, WILLINGHAM MC. Major DNA fragmentation is a late event in apoptosis. *J Histochem Cytochem* 1997, 45:923–934

48. NEGRI C, DONZELLI M, BERNARDI R, ROSSI L, BURKLE A, SCOVASSI AI. Multiparametric staining to identify apoptotic human cells. *Exp Cell Res* 1997, 234:174–177

49. CHARRIAUT-MARLANGUE C, BEN-ARI Y. A cautionary note on the use of the TUNEL stain to determine apoptosis. *Neuroreport* 1995, 7:61–64

50. CERVOS-NAVARRO J, SCHUBERT TEO. Pitfalls in the evaluation of apoptosis using TUNEL. *Brain Pathol* 1996, 6:347–348

51. COATES PJ, SAVE V, ANSARI B, HALL PA. Demonstration of DNA damage/repair in individual cells using *in situ* end labelling: association of p53 with sites of DNA damage. *J Pathol* 1995, 176:19–26

52. KOCHX MM, MUHRING J, KNAAPEN MWM, DE MEYER GRY. RNA synthesis and splicing interferes with DNA *in situ* end labeling techniques used to detect apoptosis. *Am J Pathol* 1998, 152:885–888

53. BJORKERUD S, BJORKERUD B. Apoptosis is abundant in human atherosclerotic lesions, especially in inflammatory cells (macrophages and T cells), and may contribute to the accumulation of gruel and plaque instability. *Am J Pathol* 1996, 149:367–380

54. STADELMANN C, BRUCK W, BANCHER C, JELLINGER K, LASSMANN H. Alzheimer disease: DNA fragmentation indicates increased neuronal vulnerability, but not apoptosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 1998, 5:456–464

55. WHITESIDE G, MUNGLANI R. Hoechst and immunohistochemistry triple-labelling: an improved method for detection of apoptosis in tissue sections—an update. *Brain Res Brain Res Protoc* 1998, 3:52–53

56. STRATER J, WALCZAK H, KRAMMER PH, MOLLER P. Simultaneous *in situ* detection of mRNA and apoptotic cells by combined hybridization and TUNEL. *J Histochem Cytochem* 1996, 44:1497–1499

57. HILTON DA, LOVE S, BARBER R. Demonstration of apoptotic cells in tissue sections by *in situ* hybridization using digoxigenin-labeled poly(A) oligonucleotide probes to detect thymidine-rich DNA sequences. *J Histochem Cytochem* 1997, 45:13–20

58. DIDENKO VV, TUNSTEAD JR, HORNSBY PJ. Biotin-labeled hairpin oligonucleotides: probes to detect double-strand breaks in DNA in apoptotic cells. *Am J Pathol* 1998, 152:897–902

59. VAN ENGELAND M, NIELAND IJW, RAMAEKERS FCS, SCHUTTE B, REUTELINGSPERGER CPM. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* 1998, 31:1–9

60. VAN DEN EIJNDE SM, BOSHART L, REUTELINGSPERGER CPM, DE ZEEUW CI, VERMEIJ-KEERS C. Phosphatidylserine plasma membrane asymmetry *in vivo*: a pancellular phenomenon which alters during apoptosis. *Cell Death Differ* 1997, 4:311–316

61. VAN DEN EIJNDE SM, LUIJSTERBURG AJM, BOSHART L, DE ZEEUW CI, DIERENDONCK JH, VAN REUTELINGSPERGER CPM ET AL. *In situ* detection of apoptosis during embryogenesis with annexin V: from whole mount to ultrastructure. *Cytometry* 1997, 29:313–320

62. BLANKENBERG FG, KATSIKIS PD, TAIT JF, DAVIS RE, NAUMOVSKI L, OHTSUKI K ET AL. *In vivo* detection and imaging of phosphatidylserine expression during programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, 95:6349–6354

63. MARTIN SJ, REUTELINGSPERGER CP, McGAHON AJ, RADER AJ, VAN SHIE RC, LAFACE DM ET AL. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med* 1995, 182:1545–1556

64. ADAYEV T, ESTEPHAN R, MESEROLE S, MAZZA B, YURKOW EJ, BANERJEE P. Externalization of phosphatidylserine may not be an early signal of apoptosis in neuronal cells, but only phosphatidylserine-apoptotic cells are phagocytosed by microglia. *J Neurochem* 1998, 71:1854–1864

65. GRAND RJA, MILNER AE, MUSTOE T, JOHNSON GD, OWEN D, GRAND ML ET AL. A novel protein expressed in mammalian cells undergoing apoptosis. *Exp Cell Res* 1995, 218:439–441

66. FERRER I, POZAS E, MARTI M, BLANCO R, PLANAS AM. Methylazoxymethanol acetate-induced apoptosis in the external granule layer of the developing cerebellum of the rat is associated with strong c-Jun expression and formation of high molecular weight c-Jun complexes. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997, 56:1–9

67. POZAS E, AGUADO E, FERRER I. Localization and expression of Jun-like immunoreactivity in apoptotic neurons induced by colchi-

- cine administration *in vivo* and *in vitro* depends on the antisera used. *Acta Neuropathol* 1999, 98:119–127
68. THORNBERRY NA, LAZEBNIK Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998, 281:1312–1316
 69. KOTHAKOTA S, AZUMA T, REINHARD C, KLIPPEL A, TANG J, CHU K ET AL. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological changes in apoptosis. *Science* 1997, 278:294–298
 70. RUDEL T, BOKOCH GM. Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2. *Science* 1997, 276:1571–1574
 71. CHENGHUA C, CASACCIA-BONNEFIL P, SRINIVASAN A, CHAO MV. Oligodendrocyte apoptosis mediated by caspase activation. *J Neurosci* 1999, 19:3043–3049
 72. JEON BS, KHOLODIV NG, OO TF, KIM SY, TOMASELI KJ, SRINIVASAN A ET AL. Activation of caspase-3 in developmental models of programmed cell death in neurons of the substantia nigra. *J Neurochem* 1999, 73:322–333
 73. STADELMAN C, DECKWERTH TL, SRINIVASAN A, BANCHER C, BRUCK W, JELLINGER K ET AL. Activation of caspase-3 in single neurons and autophagic granules of granulovacuolar degeneration in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 1999, 155:1459–1466
 74. KOUROKU Y, URASE K, FUJITA E, ISAHARA K, OHASAWA Y, UCHIYAMA Y ET AL. Detection of activated caspase-3 by a cleavage site directed antiserum during naturally occurring DRG neurons apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 1998, 247:780–784
 75. URASE K, FUJITA E, MIHO Y, KOUROKU Y, MUKASA T, YAGI Y ET AL. Detection of activated caspase-3 (CPP32) in the vertebrate nervous system during development by a cleavage site-directed antiserum. *Brain Res Dev Brain Res* 1998, 111:77–87
 76. GERVAIS FG, XU D, ROBERTSON GS, BAILLANCOURT JP, ZHU Y, HUANG JQ ET AL. Involvement of caspases in proteolytic cleavage of Alzheimer's amyloid- β precursor and amyloidogenic A β peptide formation. *Cell* 1999, 97:395–406
 77. ARMSTRONG RC, AJA TJ, HOANG KD, GAUR S, BAI X, ALNEMRI ES ET AL. Activation of the CED3/ICE-related protease CPP32 in cerebellar granule neurons undergoing apoptosis but not necrosis. *J Neurosci* 1997, 17:553–562
 78. LEERS MPG, KOLGEN W, BJORKLUND V, BERGMAN T, TRIBBICK G, PERSSON B ET AL. Immunocytochemical detection and mapping of a cytokeratin 18 neo-epitope exposed during early apoptosis. *J Pathol* 1999, 187:567–572
 79. KNAAPEN M, DE BIE M, MUHRING J, KOCKX M. Cleaved PARP as a marker for apoptosis in tissue sections. *Promega Notes* 1999, 72: 7–9
 80. KOESTER SK, ROTH P, MIKULKA WR, SCHLOSSMANN SF, ZHANG C, BOLTON WE. Monitoring early cellular responses in apoptosis is aided by the mitochondrial membrane protein-specific monoclonal antibody APO 2.7. *Cytometry* 1997, 29:306–312
 81. OSTLUNG O, JOHANSON KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damage in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1984, 123:291–298
 82. SINGH NP, McCOY MT, TICE RR, SCHNEIDER EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988, 175:184–191
 83. OLIVE PL, BANATH JP, DURAND RE. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet assay". *Radiat Res* 1990, 122:86–94
 84. TICE RR, ANDREWS PW, SINGH NP. The single cell gel assay: a sensitive technique for evaluating intercellular differences in DNA damage and repair. *Basic Life Sci* 1990, 53:291–301
 85. TICE RR. The single cell gel/comet assay: a microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells. In: Philips DH, Venitt S (eds) *Environmental Mutagenesis*. Bios Scientific Publ, Oxford, 1995:315–339
 86. KLAUDE M, ERIKSSON S, NYGREN J, AHNSTROM G. The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutat Res* 1996, 363: 86–89
 87. NELMS B. Measuring apoptosis in individual cells with the comet assay. *Promega Notes* 1997, 64:13–16
 88. COLLINS AR, DOBSON VL, DUSINSKA M, KENNEDY G, STETINA R. The comet assay: what can it really tell us? *Mutat Res* 1997, 375: 183–193
- Corresponding author:*
R. Angelopoulou, 54 Anagnostopoulou street, GR-106 72 Athens, Greece
-