

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

DNS folytonossághiányok vizsgálata *Saccharomyces cerevisiae* sejtekben

Hegedüs Éva

Témavezető: Prof. Dr. Szabó Gábor



DEBRECENI EGYETEM
MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIAI DOKTORI ISKOLA
Debrecen, 2010.

Tartalom

Rövidítések	4
1. Bevezetés.....	6
1. 1. Általános célkitűzések.....	7
1. 2. Konkrét célkitűzések	7
2. Irodalmi áttekintés.....	9
2. 1. Az eukarióta kromatin szerkezete – rövid áttekintés	9
2. 2. Nukleáris mátrix, S/MAR-ok	12
2. 3. DNáz I-szenzitív és hiperszenzitív helyek	14
2. 4. A <i>Saccharomyces cerevisiae</i> és <i>Schizosaccharomyces pombe</i> sajátosságai.....	16
2. 5. A szerkezeti hierarchia tükröződése DNS fragmentációs jelenségekben	20
2. 5. 1. Apoptózis során észlelt kromatin fragmentáció	20
2. 5. 2. Normál, életképes sejtekből izolált kromatin fragmentációs jelenségei – közvetlen előzmények	22
2. 6. Tranziens folytonosságihiányok előfordulása a genomi DNS-ben fiziológias működések során	26
2. 7. Tranziens DNS hasítást okozó enzimek: topoizomerázok.....	31
2. 8. A kromatin hurkok és kromoszóma transzlokációk kapcsolata: az MLL bcr.....	32
3. Anyagok és módszerek.....	35
3. 1. Élesztő sejtek genomi DNS-ének gélelektroforetikus vizsgálata.....	35
3. 1. 1. Élesztő törzsek, táptalajok és növekedési körülmények.....	35
3. 1. 2. Élesztő kromoszómákat tartalmazó agaróz blokkok készítése	35
3. 1. 3. <i>S. cerevisiae</i> sejtek szinkronizálása a sejtciklus különböző fázisaiban	36
3. 1. 4. Élesztősejtek előkészítése áramlási citometriás analízisre	36
3. 1. 5. <i>S. cerevisiae</i> kultúrák életképességének vizsgálata	36
3. 1. 6. Agaróz blokkok enzim kezelése.....	37
3. 1. 7. Tér-inverziós gélelektroforézis (field inversion gelelectrophoresis, FIGE)	37
3. 1. 8. Pulzáltatott-mezejű gélelektroforézis (Contour-clamped homogeneous electric field, CHEF).....	38
3. 1. 9. Kétdimenziós gélelektroforézis.....	39
3. 1. 10. Southern-blot	39
3. 1. 11. „Ab-Southern”	40
3. 2. Áramlási citometriás vizsgálatok	41

3. 2. 1. PCR körülményei.....	41
3. 2. 2. PCR termékek hibridizálása.....	42
3. 2. 3. Egyszálú DNS régiók hasítása.....	42
3. 2. 4. Nick-ek létrehozása és detektálása PCR termékeken.....	42
3. 2. 5. PCR termékek mikrogyöngyökre kötése és áramlási citometriás analízise.....	43
4. Eredmények.....	44
4. 1. Hurok-méretű fragmentáció vizsgálata élesztő sejtekben.....	44
4. 1. 1. Élesztő sejtek életképességének vizsgálata.....	44
4. 1. 2. Folytonossághiányok detektálása élesztő genomi DNS-ben enzimatikus és denaturáló kezelésekkel.....	45
4. 1. 3. Hurok-méretű fragmentáció növekedési fázis- és sejtciklus-függése.....	51
4. 1. 4. Hurok-méretű fragmentáció szuperhelicitás függése.....	54
4. 1. 5. Egyedi kromoszómák S1 kezelése és urea/hő-denaturációja.....	56
4. 1. 6. Töréspontok vizsgálata <i>S. cerevisiae</i> I. kromoszómáján.....	57
4. 1. 7. <i>S. cerevisiae</i> rDNS fragmentációjának vizsgálata.....	59
4. 1. 8. Egyszálú törések és RNS/DNS hibridek vizsgálata <i>S. cerevisiae</i> rDNS-ben „Ab-Southern” módszerrel.....	64
4. 2. Génátrendeződések és folytonossághiányok detektálására alkalmas módszerek fejlesztése.....	67
4. 2. 1. Folytonossághiány vizsgálatára alkalmas gélelektroforetikus módszer fejlesztése.....	67
4. 2. 2. Folytonossághiány vizsgálatára alkalmas áramlási citometriás módszerek fejlesztése.....	70
5. Megbeszélés.....	75
5.1. Hurok-méretű kromatin fragmentáció vizsgálata élesztő sejtekben.....	75
5. 2. 1. Folytonossághiányok detektálására alkalmas gélelektroforetikus módszer fejlesztése.....	80
5. 2. 2. Génátrendeződésre és folytonossághiányok detektálására alkalmas áramlási citometriás módszerek fejlesztése.....	81
6. Összefoglalás.....	83
7. Közlemények.....	85
8. Tárgyszavak.....	93
9. Köszönetnyilvánítás.....	93
10. Függelék.....	94

Rövidítések

ARS	Autonomously Replicating Sequences
ASF/SF2	Alternative Splicing Factor / Splicing Factor 2
bcr	breakpoint cluster region
BER	Base Excision Repair
BUR	Base Unpaired Region
bp	base pair
CHEF	Clamped Homogenous Electric Fields
DTT	dithiothreitol
ds	double strand
EDTA	etiléndiamin-tetraecetsav
EBr	Ethidium Bromide
FIGE	Field Inversion Gel Electrophoresis
FISH	Fluorescence In Situ Hybridisation
HTP	high throughput
IGS	intergenic spacer
kb	kilobase pair
LCR	Locus Control Region
LMP	low melting point
Mb	megabase pair
MLL	Mixed Lineage Leukemia
MMR	Mismatch Repair
mtDNS	mitokondriális DNS
NER	Nucleotide Excision Repair
NHEJ	Non-Homologous End-Joining
NTS	Non-Transcribed Spacer
PFGE	Pulse Field Gel Electrophoresis
PMSF	fenil-metil-szulfonil-fluorid
RAG	recombination-activating gene
rDNS	riboszómalis DNS
RFB	Replication Fork Barrier
ROS	Reactive Oxygen Species

S/MAR	Scaffold /Matrix Attachment Region
SMC	Structural Maintenance of Chromosome
SPB	Spindle Pole Body
ss	single strand
TdT	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase
Ty-element	Transposon of yeast
YAC	Yeast Artificial Chromosome

1. Bevezetés

A kromatinszerveződés alsóbb szintjeiről viszonylag sok ismerettel rendelkezünk, a kromatin magasabbrendű organizációjáról azonban kevésbé egyértelmű, gyakran ellentmondó információk állnak rendelkezésünkre. Munkacsoportunk a kromatinszerveződés magasabb szintjét képviselő kromatinhurkok sajátosságait az ebbe a mérettartományába eső fragmentációs jelenségeken keresztül vizsgálja. Az élő, nem-apoptotikus eukarióta sejtekből történő DNS izolálást követően a DNS ~50 kb körül fókuszálódó fragmentációját figyelhetjük meg, melyek mérete a kromatin funkcionális egységeivel (transzkripciós, ill. replikációs egység) azonos mérettartományába esik. Bár a DNS ezen gyakran látott fragmentációját általában mechanikai nyírás hatásának tulajdonítják, azzal összhangban, hogy a feltárást megelőzően az élő sejtek agarózba ágyázásával a DNS fragmentálódása kivédhető, munkacsoportunk megfigyelései így nem magyarázhatók. Korábbi adataink nincsenek összhangban számos egyéb potenciális artefaktuális tényező hurokméretű kromatin fragmentációhoz való esetleges hozzájárulásával sem. Azt a lehetőséget azonban, hogy létezhetnek olyan hiperszenzitív régiók, amelyek a kromatin hurkokat, ill. hurokméretű fragmentumokat határolnák és szuperhelicitás-függő hasítóhelyekként szolgálhatnak a sejtek feltárása során működésbe lépő endogén nukleázok számára, explicite még nem cáfoltuk. Izgalmas interpretációs lehetőség a DNS-ben már eleve létező egyszál- törések jelenléte, melyek csak a proteinek denaturációját követően manifesztálódnának és a genomon belüli fenntartásukban, maszkírozásukban más molekulák (fehérjék, RNS) is szerepet vállalhatnak. Eddigi megfigyeléseink legjobban az utóbbi modellbe illeszkednek (1). A sejtek programozott sejthalála során gyakran hasonló mintázatot adó DNS fragmentáció játszódik le. Felmerül tehát az a kérdés is, hogy a két jelenség – apoptotikus, ill. nem-apoptotikus DNS fragmentáció – háttérben hasonló mechanizmusok állnak-e? Mivel mind az egészséges sejtek kromatinja által mutatott, mind az apoptotikus DNS hurok-méretű fragmentációja esetén a töréspontok között a patológiás génátrendeződésekben szerepet játszó szekvenciák túlréprezentáltak, felmerült az a lehetőség is, hogy ezek a régiók a transzlokációk preferált szubsztrátjai lehetnek.

Az a tény, hogy analóg jelenségek élesztő kromatinon is megfigyelhetőek, lehetőséget teremt ezen alternatívák további vizsgálatára az élesztő sejtek kísérleti rendszerében. Mivel a *Schizosaccharomyces pombe* a magasabbrendű eukariótákhoz még közelebb áll, mint a *Saccharomyces cerevisiae*-hez, két igen különböző evolúciós lépcsőfokon álló eukarióta

organizmus hasonlítható össze azonos kísérleti körülmények között. Az élesztők kromatinszerkezetének egymáshoz képest ill. az emlős kromatinhoz képest mutatott különbségei alkalmat adnak annak a kérdésnek a vizsgálatára, hogy a kromatin mely tulajdonságai állhatnak a fragmentációs jelenség hátterében.

1. 1. Általános célkitűzések

- A. Munkám során a hurok-méretű kromatin fragmentáció mechanizmusával és biológiai jelentőségével kapcsolatos alapvető kérdésekre törekedtem választ adni - az élesztősejtek kísérleti rendszere kínálta lehetőségeket kihasználva.
- B. Céлом volt továbbá a folytonossághiányok vizsgálatára alkalmas módszertani repertoár bővítése, fejlesztése – gyakorlati alkalmazhatóságukra is tekintettel.

1. 2. Konkrét célkitűzések

A.

1. Céлом volt demonstrálni, hogy a kromatin fragmentáció tökéletesen életképes, egészséges, nem-apoptotikus élesztő sejtek esetében tapasztalható.
2. Céлом volt a két DNS szálon protein-denaturációval feltárt folytonossághiányok egymáshoz képesti viszonyának meghatározása.
3. Mivel a *S. cerevisiae* élesztősejtek viszonylag egyszerűen szinkronizálhatóak a sejtciklus különböző pontjaiban, az élesztőrendszer ezen előnyét kihasználva meg kívántuk vizsgálni, hogy a hurok-méretű kromatinfragmentáció mutat-e sejtciklusfüggő eltéréseket. A különböző sejtciklus fázisok esetleges eltérő fragmentációs mintázata a jelenség DNS replikációhoz való kapcsolódásának lehetőségét hordozza magában.
4. Céлом volt, a hurok-méretű fragmentáció szempontjából korábban még nem vizsgált másik élesztő faj, a *Schizosaccharomyces pombe* sejtek esetében is megvizsgálni a fragmentációs jelenséget. Az *S. pombe* sejtek sok tekintetben közelebb állnak a humán sejtekhez, mint a *S. cerevisiae* sejtekhez. Mivel a deproteinizált kromatin előállítását a kétféle élesztőben azonos kezeléseket kíván, így mód nyílna a jelenség összehasonlító vizsgálatára két távoli eukarióta fajban, azonos körülmények között. A fragmentáció

hasonló vagy eltérő mintázata a jelenség fajok közötti univerzális vagy egyedi jellegére utalhat, összevetve a korábbi, emlős sejteken kapott eredményekkel.

5. Célom volt a kromatinfragmentációnak a hurkokban lévő DNS szuperhelicitásától való függésének meghatározása.
6. Mindkét élesztő meglehetősen kis genommal rendelkezik, melyek kisebb-nagyobb kromoszómákba rendeződnek. Ezek a kromoszómák mindkét élesztő esetében feloldhatóak nagyobb molekulású DNS elválasztására alkalmas gélelektroforézis technikával, lehetőséget teremtve arra, hogy összehasonlítsuk az egyes kromoszómák fragmentációs mintázatát.
7. Célom volt a fragmentáció méreteloszlásának jellemzése.
8. A élesztő kromoszómák egyben a töréspontok térképezésére is alkalmas kísérleti felületet nyújtanak. A fragmentáció forrópontjainak replikációs vagy transzkripció szabályozó régiókkal való egybeesése alapján vizsgálhatóvá válhat a jelenség összefüggése a sejtek normális fiziológiai működésével.
9. *S. cerevisiae* riboszómális DNS klasztere egyetlen kromoszómán helyezkedik el. A tandem egységekből álló klaszter sajátos felépítése miatt azt várhatnánk, hogy a genom többi részéhez képest a hurok-méretű fragmentáció eltérő mintázatot eredményez. Azonos mintázat viszont epigenetikai jegyek szerepét veti fel. Továbbá, a 100-200 kópiában jelenlévő transzkripció egységek a folytonossághiányok térképezéséhez is kedvező terepet kínálnak.

B. Célom volt még

1. a fentiekkel kapcsolatban egyszál-folytonossághiányok kimutatására és térképezésére alkalmas új gélelektroforetikus módszer kidolgozása;
2. munkacsoportunk áramlási citometriás mikrogyöngy analízisen alapuló módszerfejlesztési törekvéseinek keretében egyszál-folytonossághiányok és egyes genetikai rendellenességek kimutatására alkalmas áramlási citometriás módszerek kidolgozása.

2. Irodalmi áttekintés

2. 1. Az eukarióta kromatin szerkezete – rövid áttekintés¹

Interfázisos eukarióta sejtben a DNS a hozzá kapcsolódó fehérjékkel együtt kromatint alkot a sejttagon belül, ebből alakulnak ki a mikroszkóppal jól látható kromoszómák a sejtosztódás kezdetén. Minden kromoszóma egy óriásmolekula lineáris duplaszálú DNS-t foglal magába. A DNS és a fehérjék közel egyenlő arányban járulnak hozzá a kromatin kialakításához. A kromatint alkotó fehérjék alapvetően két csoportra oszthatóak: egyrészt a kromatinban nagy számban előforduló hiszton fehérjékre, másrészt a sokkal nagyobb változatosságot mutató, különböző funkciókkal rendelkező nem hiszton fehérjék heterogén csoportjára. Ez utóbbi csoportba tartoznak például a DNS és RNS szintézisében résztvevő fehérjék és azok is, amelyek a génkifejeződés szabályozásában játszanak szerepet, (2,3). Ötféle hiszton molekulát különböztetünk meg, melyek közül a H2A, H2B, H3 és H4 alapvető fontossággal bírnak. Alapvető szerepüket támasztja alá, hogy általánosan jellemzőek az eukariótákra és hogy aminosav-sorrendjük nagyfokú konzervativizmust mutat az egész élővilágban. A H1 hiszton jelenléte ellenben nem esszenciális az egysejtű eukariótákban (4) és sokkal nagyobb variabilitást mutat mind méretben, mind aminosav-szekvenciában, mint a többi hiszton (5). Minden hiszton fehérje amino-terminális végén 15 – 30 aminosavból álló strukturálatlan hiszton-farok található; ezeknek alapvető szerepe van az epigenetikus szabályozásban, vagyis a hiszton-kód kialakításában és ezen keresztül a transzkripció szabályozásában (2).

A kromatin a sejtciklus folyamán eltérő mértékben, de mindig többszörösen feltekeredett állapotban van jelen (3). A DNS feltekeredése több célt szolgálhat. Egyrészt a hosszú DNS molekula összecsomagolását biztosítja, másrészt valószínű, hogy a lazább vagy tömörebb szerkezetek váltakozásának meghatározó szerepe van a génaktivitás szabályozásában. A kromatin feltekeredésének alapja a nukleoszóma. A nukleoszóma 2–2 molekula H2A, H2B, H3, H4 hisztonból álló henger alakú fehérjemagokból és az azon kétszer körülcsavaródó, 146 bázispárnyi (bp) DNS dupla hélixből épülnek fel. A hiszton oktamer alkotó proteinek ezért „core-hisztonok”-nak nevezzük. Két nukleoszóma között fajoként és egy egyedben belül szövetenként változó hosszúságú, 10 – 80 bp-ból álló internukleoszómalis

¹ A kromatinfragmentáció jelenségei olyan hipotézisek összefüggésében is értelmezhetők, melyek a klasszikus kromoszóma modellek egyes alapvetéseivel nem harmonizálnak – szükségesnek érzem tehát a „tankönyvi” ismeretek rövid áttekintését is.

összekötő DNS (linker DNS) helyezkedik el (3). A nukleoszómák mintegy 200 bp-ként követik egymást. A nukleoszóma-szerkezet a DNS teljes hossza mentén kialakult gyöngyfűzészerű képződmény (beads-on-a-string), melynek átmérője 11 nm. Ez jelenti az elsődleges szintet a rendkívül hosszú és vékony kromoszómafonalak kondenzálásában (3), a linker DNS hosszától függően 6 – 7-szeresére kondenzálva a DNS-t (6). A H1-hisztont, melyet linker hisztonnak is neveznek, részben a DNS-hez, részben a core-hisztontokhoz kapcsolódva, közel húzza egymáshoz és bonyolultabb szerkezetbe rendezi a nukleoszómákat, kialakítva ezzel egy magasabbrendű szerkezetet, melynek átmérője 30 nm, újabb 6–7-szeres kondenzálódást eredményezve (6). A DNS szerveződés második szintjét képviselő 30 nm-es kromatin szál kialakulására többféle modellt állítottak fel, melyek alapvetően két osztályba sorolhatók: 1.) A „one –start helix” modell görbített linker DNS-t tételez fel minden egymást követő két nukleoszóma-mag között, melynek eredményeként az egymást lineárisan követő nukleoszómák helikális szerkezetet alakítanak ki. A modell legismertebb képviselője a szolenoid-szerkezet, melyben a nukleoszómák egy centrális üreg körül tekerednek fel és a tekercs egy csavarulatát 6 – 8 nukleoszóma alkotja. 2.) A „two-start helix” modell, az előbbi modellel ellentétben, egyenes linker DNS-en alapszik, melyben a nukleoszómák egy cikk-cakk alakú elrendezésben gyűlnek össze. Ennek a modellnek több változata is létezik, pl. a „helical ribbon” modellben a linker DNS párhuzamos a DNS hélix tengelyével, a „crossed-linker” modellben viszont a linker DNS merőlegesen helyezkedik el a hélix tengelyére (4,7-9). A H1-hisztont globuláris doménja felelős a nukleoszómákhoz való kötődésért. N-terminális doménjának nincs kritikus szerepe a DNS feltekeredésében, azonban szerepe lehet a H1 hiszton kromatinhoz és/vagy a linker hisztonok fej – farokirányú kötődésében. A H1 hiszton szerin és treonin oldalláncai némelyikét különböző protein kináz enzimek foszforilálhatják. A foszforilációnak szabályozó szerepe van abban, hogy a H1 hiszton mennyire kompakt szerkezetet rögzít a sejtosztódás során (4).

A H1-hisztont által tömörített kromatinrost egymás mellé rendeződő 30 – 150 kb-os hurkokat formálhat. A kromatin hurkok kialakításában, melyeket hurkos doméneknek is nevezünk, szerepe lehet a sejtmag belső vázaként feltételezett nukleáris mátrixnak. Így minden egyes hurok funkcionálisan megfelel egy gyűrűnek, legalábbis az ún. szupertekercs (ld. később) kialakulása szempontjából. A struktúra átmérője hozzávetőlegesen 300 nm.

A sejtciklus során a legkompaktabb szerkezetet a mitózis metafázisából ismert tipikus kromoszóma mutatja, mely két molekula DNS-t (két kromatidot) tartalmaz, átmérője mintegy

1400 nm. A metafázisos kromoszóma szerveződésére is többféle modellt állítottak fel². 1.) A radiális hurok modellben a radiálisan szervezett 30 nm-es kromatin szálak hurkai egy axiális kromoszóma-struktúrához, a kromoszóma-scaffold-hoz kötődnek, mely speciális nem-hiszton fehérjékből épül fel, melyek között a topoizomeráz II-nek és a kondenzin komplexnek kiemelt szerepet tulajdonítanak. 2.) A hierarchikus feltekeredés modellben a kromoszóma kondenzáció nem függ a protein scaffold kialakulásától és ezért a kromoszóma kondenzáció temporális mintázata nem feltétlenül esik egybe a scaffold összeszerelődésével. A 10 – 30 nm-es kromatin szál nagyobb szálakba, kromonéma szálakba tekeredik, ami tovább tekeredve alakítja ki végül a mitotikus kromoszómát. 3.) A kromatin hálózat modellben a kromoszómát két szomszédos kromatin szál közötti protein keresztkötések stabilizálják, átlagosan 15 kb-ként. 4.) „Hierarchical folding, axial glue” modell az előző három modell kulcselemeit ötvözi. A 30 nm-es kromatin szál először 100 – 130 nm-es kromonéma szálba tekeredik a korai profázisban, majd 200 – 250 nm-es kromatid szálba a középső profázisban, végül az 500 – 750 nm-es metafázisos kromatidot alakítja ki. A szerkezetet az axiálisan elhelyezkedő kondenzin stabilizálja, mely keresztkötő ragasztóként van jelen (6,10). A kondenzáltság azonban fajoként különböző mértékű lehet.

A kromoszóma kondenzáltsági foka az interfázisban nem mindenütt azonos. Fellazult szerkezetű, transzkripcionálisan aktív kromatin foglalja el a genom jelentős részét, ez az eukromatin. A genom fennmaradó része kondenzált, transzkripcionálisan csendes, heterokromatin állapotban van jelen, melynek két formája ismert: konstitutív és fakultatív. Az általában nukleáris periférián elhelyezkedő konstitutív heterokromatin szerepe valószínűleg elsősorban a genom stabilitásának biztosítása azáltal, hogy gátolja a rekombinációt a genom integritása szempontjából fontos repetitív elemek között, amelyeket például a telomereknél vagy centromereknél találunk (11,12). A fakultatív heterokromatin, mely átalakulhat eukromatinná, a sejtmagon belül bárhol előfordulhat. Szerepe elsősorban valószínűleg a gének transzkripcionálisan inaktív formában tartása, melyre az élesztők párosodási típust meghatározó csendes lókuszi szolgálnak példával (13). A heterokromatin-eukromatin átalakulásban szerepet játszó tényezők lehetnek az egyes hisztonmolekulák oldalláncainak kovalens módosulásai (acetiláció, metiláció, foszforiláció, ADP-riboziláció), az ubikvitin nevű fehérje kötődése, a hisztonmolekulák variációi (pl. H2A.Z, H2A.X, H3.3) és különböző nem hiszton fehérjék jelenléte (2,3,14,15). A „hiszton-kód” hipotézis szerint, specifikus, poszttranszlációs hiszton módosítások kombinációja hozza létre a kromatin reguláció

² Ezen modellekben hangsúlyozott molekuláris kölcsönhatási mozzanatok az interfázisos kromatin magasabbrendű struktúrájának kialakításához is hozzájárulhatnak.

komplex, funkcionális hierarchiáját, pozitívan vagy negatívan korrelálva egymással, pl. a promoterek H3 hiszton trimetilációja a Lys4-nél a transzkripcionálisan aktív kromatinra jellemző (15), míg a Lys27-nél történő trimetiláció a transzkripcionálisan csendes kromatin állapottal korrelál (3,16). Jelentős különbségek vannak emlős és élesztő sejtek epigenetikus szabályozása, a modifikációk jellemző lokalizációja között, az előbbi hiszton metilációkét is beleértve (15).

Az interfázisos kromoszómák sejttagon belüli elhelyezkedése emlős sejtekben, fluoreszcens *in situ* hibridizációs (FISH) vizsgálatok alapján territoriális szerveződést követ, azaz az individuális kromoszómák egymással nem átfedő diszkrét territóriumokat foglalnak el a nukleuszban (3,17). Az élesztő sejtek kromoszómái az ún. polarizált Rabl-konfigurációt mutatják, mely szerint a centromerek és a telomerek a nukleusz szemközti oldalán helyezkednek el (17).

2. 2. Nukleáris mátrix, S/MAR-ok³

A sejtek membrán-struktúráinak nem ionos detergenssel történő eltávolítása és a DNS állomány nukleáz emésztése, valamint a hiszton és nem hiszton fehérjék zömének ammónium-szulfáttal történő kivonása után a sejttagon belül hátra marad egy filamentózus rendszer, melyet az alkalmazott preparálástól függően nukleáris mátrixnak, ill. scaffoldnak neveznek. Előbbi esetben a hisztonok eltávolítását 2 M NaCl oldattal, utóbbiban 25 mM lítium 3,5-dijodoszalicilát oldattal végzik (18). (A metafázisos kromoszómából a hisztonok eltávolítása után szintén marad egy centrális helyzetű, a kromoszóma eredeti alakját megőrző scaffold, amely körül a kiterült DNS egy udvart alkot. A scaffold a DNS enzimatiszta eltávolítása után is megmarad. Valószínűsíthető, hogy az interfázisban jelenlévő nukleáris mátrixból származik (18,19).)

A fenti és más megfigyelések alapján a belső váz létezése valószínűsíthető a nukleuszban, de felépítése és szerepe még nem egészen tisztázott. A magban zajló legtöbb folyamat esetében feltételezik, hogy a nukleáris váz komponenseihez kötődve zajlanak le. Kísérleti megfigyelések utalnak arra is, hogy a magon belüli szállítási folyamatok sem véletlenszerűek, hanem egy adott útvonal mentén történhetnek, és ezeket az útvonalakat

³ Az általunk vizsgált jelenségek hurokméretű szakaszokat határoló struktúrákkal lehetnek kapcsolatosak – az irodalmi áttekintés ezért terjed ki a nukleáris mátrixra és a S/MAR-okra.

szintén ezek a fibrilláris fehérjék jelölhetik ki (20). Óvatosabb megfogalmazásban a mátrix egy olyan dinamikus nukleáris mikrokörnyezetnek tekinthető, amely magába foglalja a nukleáris lamina elemeit, a transzkripciós és replikációs komplexeket, valamint a DNS javításában és RNS splicingban résztvevő proteineket is (20).

Az emlős nukleuszban lévő mintegy 25 millió nukleoszóma kb. 60.000 kromatin hurokba szerveződik, amelyek a nukleáris mátrixhoz vagy scaffoldhoz periódikusan csatlakozhatnak átlagosan 70 – 220 kb-ként (20). A kialakult kromatin hurkoknak szerepe lehet a DNS replikációban, transzkripciós szabályozásban vagy a kromoszóma pakolódásban (18). A kromatin hurkok horgonyzó szekvenciáit MAR-nak (Matrix Attachment Region) vagy SAR-nak (Scaffold Attachment Region) nevezzük. A mátrixhoz kötött S/MAR-ok ellenállóbbak nukleáz emésztéssel szemben, a nukleázok csupán a hurkok szekvenciáit emésztik (21). A S/MAR-ok 600 – 3000 bp közötti hosszúságú, bizonyos szekvencia sajátosságok kombinációi alapján megkülönböztethető szakaszok (22), melyeknek 150 – 200 bp-os szubregiói egyszálúvá válhatnak torziós stressz hatására (18). A humán genom mintegy 30.000 – 80.000 S/MAR-t tartalmaz (23).

Lambda fág DNS 40 kópiás tandem ismétlődését, amely nem tartalmazott integrált S/MAR szekvenciát és endogén S/MAR-ral sem rendelkezett, meiotikus, ill. mitotikus egér kromoszómákba inszertálva, a bevitt konstrukció szabálytalanul nagy hurkokat hozott létre, míg az endogén S/MAR-ral rendelkező 36 kb-os humán interferon gén hasonló inszercióját követően jóval kisebb hurkok alakultak ki. A S/MAR-ok jelenléte tehát szükségesnek látszik a kromatin hurok kialakulásához mitotikus és meiotikus kromatin domének esetében egyaránt. (21). Szignifikánsan különbözött a hurokméret abban az esetben is, amikor ugyanazt a DNS szakaszt a kromoszóma különböző régióiba integrálták. Kisebb hurkokat figyeltek meg a telomer közelében és nagyobbakat a telomerikus pozícióból történő áthelyezés után (24). A sejt valószínűleg nem használja egyszerre az összes potenciális horgonyzó helyét. Ezt a hipotézist az eltérő hurokméret támasztja alá, valamint az a kísérlet is, amelyben a S/MAR szekvenciákat tandem sorként vitték be a genomba, ekkor ugyanis az inszertált S/MAR-nak jelentős mennyiségű kópiáját a kromatin hurkok részeként detektálták.

Bár a S/MAR-ok szükségesek a kromatin hurkok kialakulásához, jelenlétük nem elegendő a hurokképzéshez, használatuk valószínűleg alternatív és dinamikus. A sejt igényeinek megfelelően határozhatja meg, hogy melyik S/MAR szekvencia működjön horgonyzóhelyként (21). A hurkok transzkripciós és replikációs egységeknek tekinthetők. (21). Halo preparátumokon kimutatták, hogy a kromatin hurkok mérete változik a replikáció sebességétől függően: kisebb replikációs villa sebességnél a sejtek kompenzálni kezdik a

sebesség csökkenést a késői replikációs origók aktiválásával, így az iniciációs események nagyobb sűrűséggel fordulnak elő, mely a kisebb kromatin hurkok kialakulását eredményezi (25).

S/MAR-ok előfordulnak intronokban, centromerekben, telomerekben és a bcr-eknél (breakpoint cluster regions, kromoszóma törések forrópontjait magában foglaló szakaszok) is. A S/MAR-kötő proteinek között azonosították többek között a topoizomeráz II-t (26), H1 hisztont, lamin B-t, NuMa-t (27), valamint a SATB1-t (18), SAF-A-t (22).

A S/MAR-ok nem rendelkeznek tiszta konszenzus szekvenciákkal. Strukturális jellegzetességek és/vagy rövid szekvencia motívumok alapján ismerhetőek fel, amelyek megtalálhatóak a S/MAR-okban, de hiányoznak a nem-S/MAR DNS-ből (28). A bioinformatika a következők alapján valószínűsíti a S/MAR-ok jelenlétét („MAR-finder” algoritmusok): AT gazdag régiók, 3'-UTR-ben gazdag szekvenciák, hajlításokat tartalmazó motívumok, topoizomeráz II-felismerő helyek, a gén expresszióban és DNS replikációban is fontos szerepet játszó és kiemelten rekombinogén egyszálúvá váló ún. SIDD-helyek (stress induced duplex destabilization) (20). A S/MAR-ok előszeretettel alakítanak ki alternatív másodlagos struktúrákat, és maguk is tartalmaznak hajlított szekvenciákat, amelyek elősegítik a bázis párosítatlanság kialakulását szuperhelikális stressz alatt. Ezek az alternatív struktúrák és az egyszálú régiók felismerhetőek a DNázok, topoizomerázok és más struktúra-konvertáló enzimek számára.

2. 3. DNáz I-szenzitív és hiperszenzitív helyek

A transzkripcionálisan aktív gének az átlagos kromatinhoz képest érzékenyebbek egyes endonukleázokra, pl. a DNáz I enzimre, emésztésükhöz egy nagyságrenddel kevesebb enzim is elegendő, összehasonlítva a nem-átíródo kromatin régiókkal. Ez az érzékenység kiterjed a génre és teljes regulációs környezetére. A DNáz érzékenységnek ezt a típusát nem a nukleoszómák hiánya okozza. Egy másik DNáz, a micrococcus nukleáz, amely lebontja az internukleoszómális linker DNS-t is, szemben a DNáz I-gyel, és azt a DNS-t is, amely nem szerveződik nukleoszómákba, nem bontja jobban az aktív, DNáz I szenzitív géneket, mint az inaktívakat (2). Ezenkívül az elektronmikroszkópos felvételek egyértelműen arról tanúskodnak, hogy az aktív kromatin nukleoszómákat tartalmaz. Tehát a DNáz-érzékenység nem ezeknek a struktúráknak hiányával kapcsolatos. Az átírt gén környezetében csökken a

kromatin kondenzációja, talán ezzel magyarázható az adott szakasz magasabb fokú DNáz I-szenzitivitása.

A DNáz I hiperszenzitivitás az előbbtől eltérő jelenség. Az aktív kromatin bizonyos helyei fokozott érzékenységet mutatnak a DNáz I enzimmel történő emésztésre a transzkripcionálisan inaktív kromatin azonos régióhoz képest, emésztésükhöz akár százszor kisebb koncentrációjú DNáz I enzim elegendő lehet. A DNáz I érzékeny régiókkal ellentétben, a néhány száz bp hosszúságú hiperszenzitív szakaszokon nukleoszómák nem figyelhetők meg. A kromatin DNáz I túlérzékenysége oka minden esetben a nukleoszómák átmeneti vagy tartós hiánya (2). A microarray vizsgálatokkal CD4⁺ T sejtekben feltérképezett DNáz I hiperszenzitív helyeket különböző kromoszómális funkció, például a replikáció, transzkripció, rekombináció szabályozásában résztvevő helyeken, és minden aktív promóter és enhanser szekvenciánál találták (29).

A magasabbrendű eukarióta genomban található háztartási gének gyakorlatilag folyamatosan működnek, promotereik CG szekvenciái nem metiláltak. Ezek a régiók CpG szigetekként maradtak fenn a genomban - védve a C→T tranzícióval szemben, amikor a metilált citozin spontán dezaminálódásával timin keletkezne. A DNS demetilált régiói egybeesnek a DNáz I hiperszenzitív helyekkel. A CpG szigetek egymástól mintegy 50–300 kb-ra helyezkednek el, amely megfelel a hurok méretű tartománynak (30). A génekkel együttműködő régiók, például a CpG szigetek, a szekvencia-specifikus proteinekhez szükséges sokszoros kötőhelyeket tartalmaznak, és egyben, a proteinek kötődésével, rekombinációra hajlamos, hiperszenzitív helyeket alakíthatnak ki (31). *S. cerevisiae*-ben nincs citozin metiláció, de a DNáz I hiperszenzitív helyek megtalálhatóak.

β-globin tartalmú YAC-kal (yeast artificial chromosome) végzett kísérletek során azt tapasztalták, hogy az S₁ nukleáz-szenzitív helyek gyakran ugyanabban a kromoszómális régióban helyezkednek el, mint a DNáz I emésztés számára hozzáférhető helyek Mg²⁺ jelenlétében. Az egyszál-specifikus S₁ nukleáz-szenzitív helyek jelezhetik a DNS szokatlan másodlagos struktúráinak a jelenlétét, esetleges egyszál-folytonossághiányokat. A DNáz I és S₁ nukleáz hiperérzékeny helyek rendszerint funkcionálisan fontos régiókban helyezkednek el az eukarióta kromatinban (31).

2. 4. A *Saccharomyces cerevisiae* és *Schizosaccharomyces pombe* sajátosságai

Az élesztő gombákhoz tartozó *Saccharomyces cerevisiae* és *Schizosaccharomyces pombe* sejtfallal rendelkező egysejtű eukarióta élőlények, melyek heterotróf életmódot folytatnak. Gén szekvencia összehasonlítás és filogenetikai analízis alapján 330 – 420 millió éve válhattak el egymástól és 1000 – 1200 millió éve a metazoáktól és a növényektől (32,33). Sok *S. pombe* protein hasonlóbbnak bizonyult az emlős homológjaihoz, mint az *S. cerevisiae*-ben található homológjaihoz. Ennek egyik lehetséges oka, hogy a gombák evolúciója gyorsabb, mint a növényeké vagy az állatoké, és valószínűleg az *S. cerevisiae* evolúciója gyorsabb, mint az *S. pombe*-é, így nagyobb divergenciát mutat a magasabbrendűekkel összehasonlítva (33).

A sejtfal jelenléte teszi elviselhetővé a sejt számára az ozmotikus megterheléseket, valamint meghatározza a sejt alakját (34), ugyanakkor 4 – 5 kDa-os molekulák számára átjárható. Összetétele törzstől függően változik, valamint eltérés tapasztalható egy adott törzs különböző korú és különböző életciklusú sejtjeinek sejtfallösszetételében is. A sejtfal eredményesen eltávolítható különböző sejtfalbontó enzimekkel melyek a sejtfalban található különböző cukor-kötéseket hasítják (34). A sejtfaltól teljesen megszabadított protoplasztokon láthatóvá válik a plazmamembrán, a plazmalemma. A sejtfalbontó enzimek használatától függően azonban különböző sejtfal maradványok maradhatnak a sejteken, ekkor szferoplasztokról beszélünk.

A *S. cerevisiae* (szinonim neve: *Candida robusta*) jó erjesztő képességét sörélesztőként és pékélesztőként használja ki az ipar. Vegetatív sejtosztódása jellegzetesen sarjadással valósul meg, ezért sarjadó élesztőnek is nevezik. A sarjadó élesztőkben a kromoszómák mitotikus osztódása a maghártya felszakadása nélkül a sejtmagban történik, ezért azt zárt mitózisnak nevezzük. A *S. cerevisiae* sejtek haploid és diploid állapotban is fenntarthatóak. A haploid és diploid sejtek mérete törzsről törzsre változik, méretüket a növekedési fázis is befolyásolja. A diploid sejtek tipikus esetben 5×6 µm-es ellipszoidok, a haploid sejtek 4 µm-es szferoidok (35).

Laboratóriumi körülmények között az élesztő sejtek gyorsan növekednek mindaddig, amíg ki nem merítik a rendelkezésre álló tápanyagforrást. Ekkor a diploid sejtek stresszrezisztens spórákat hoznak létre, amelyek akár évekig is életképesek maradhatnak tápanyagok nélkül is. A haploid sejteknek azonban nincs meg ez a lehetőségük, helyette egy alacsony metabolikus állapotba lépnek, melyet stationer fázisnak nevezünk, melyben akár hónapokig is

túlélhetik a tápanyaghiányt. A stationer fázis G_0 állapotú sejtjei glikogént akumulálnak, vastag sejtfalat növesztenek, jelentősen nő a hő-toleranciájuk és rezisztenssé válnak az oxidatív stressz különböző formáira (36). Normál laboratóriumi haploid törzsek replikációs ideje megközelítőleg 90 perc YPD médiumon és kb. 140 perces szintetikus táptalajokon, a növekedés exponenciális fázisában, 30°C-os optimális hőmérsékleten. A sejtek $1 \times 10^7 - 5 \times 10^7$ sejt/ml koncentrációban közép-exponenciális növekedési fázisban vannak. Rendszerint a törzsek 2×10^8 sejt/ml maximális denzitást érnek el YPD táloldatban (35).

A Linder által 1893-ban leírt *S. pombe*, melyet borélesztőként is ismernek, vegetatív sejtosztódása hasadással valósul meg, ezért hasadó élesztőnek is nevezik. A pékélesztőhöz hasonlóan, a kromoszómák osztódása a maghártya felszakadása nélkül valósul meg a mitózis folyamán (6,33). Haploid és diploid formában is képes növekedni, és a sejtek mérete törzsenként eltérő lehet, melyet a növekedési fázis is befolyásol. A haploid sejtek tipikus esetben $14 \times 3,5$ μm átmérőjűek. A diploid sejtek nagyobbak, átmérőjük 24×5 μm . Normál laboratóriumi haploid törzsek replikációs ideje megközelítőleg 2,5 óra YEL médiumon és 3 óra minimál táptalajokon a növekedés exponenciális fázisában, 30°C-os optimális hőmérsékleten. A sejtek $2 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ sejt/ml koncentrációban közép-exponenciális növekedési fázisban vannak (35).

Az eukarióták közül elsőként a *S. cerevisiae* genomjának a nukleotid-sorrendjét fejtették meg. Az élesztő teljes genomja mindössze 0,5 %-a a humánénak (37), 12 Mb + rDNS. A *S. cerevisiae* 16 jól jellemzett metacentrikus kromoszóma haploid készletével rendelkezik, melyek mérete sorba állítva 230-tól 2200 kb-ig terjed (1. táblázat). Élesztőben a telomerek a nukleáris borítékhoz/ maghártyához kötöttek Ku heterodimeren keresztül, míg a centromerek SPB-hez (spindle pole body) horgonyzódnak, mikrotubulusok segítségével, a Rabl-elrendeződést követve (17). A sarjadóélesztő megközelítőleg 5700 génnel rendelkezik (38). Az élesztő gének átlagos mérete 2 kb (17), melyek egyenletesen oszlanak meg a genom mentén (39). A géneken belül rövid intronok viszonylag ritkán fordulnak elő, azok a teljes genom kevesebb, mint 1%-t teszik ki (35).

Összehasonlítva a magasabb eukariótákkal, az élesztő genom legnyilvánvalóbb sajátossága a tömörsége, amely az intergénikus régiók rövid méretéből, az intronok igen kis számából és a repetitív szekvenciák ritkaságából ered. A genomi DNS mintegy 85 %-a egyedi szekvenciából épül fel, csupán néhány gén fordul elő duplikátumban (pl. hisztonok génjei, az α - tubulin génje, párosodási feromonok génje, több riboszómális protein génje és a glikolízis néhány enzimjének génje) és mindössze 15 %-a áll ismétlődő szekvenciákból (40).

A legjelentősebb ismétlődést a riboszómális DNS (rDNS) mutatja, ugyanis az rDNS 9,1 kb-os ismétlődései egy hosszú, kb. 100 – 200 kópiából álló tandem elrendeződést alakítanak ki, amellyel hozzávetőlegesen a XII. kromoszóma felét foglalják el. Az ismétlődések számától függően az rDNS a teljes genom 9 – 10 %-t teszi ki (36,39,40).

Az ismétlődések másik csoportját képviselik a genomban előforduló mozgékony elemek. A retrotranszpozonok közé tartozó Ty-elemek (transposon of yeast) számukban és pozíciójukban eltérnek a *S. cerevisiae* különböző törzseiben. A legtöbb laboratóriumi törzs 30 – 35 kópiát tartalmaz a Ty1 és Ty2 elemek szorosan összekapcsolódó párjából, melyek a genomban szétszórva helyezkednek el, míg a Ty3 és Ty4 elemek 1 – 4 kópiában vannak jelen. A Ty elemek a végálló ismétlődéseik közötti homológ rekombinációval elveszhetnek a genomból, a terminális ismétlődések egy – egy kópiáját visszahagyva a genomban. Ez magyarázza az egyedülálló δ -szekvenciák (50 – 100 kópia), σ -szekvenciák (20 – 30 kópia) és τ -szekvenciák (15 – 25) jelenlétét, melyek minden törzsben megtalálhatóak. Szintén az ismétlődő szekvenciák közé tartoznak a 6,7 kb hosszúságú telomerikus Y' szekvenciák, melyek a 16 lineáris kromoszóma végein helyezkednek el egyesével vagy 3 – 4-es csoportokban (40). A Ty elemek lokalizációja nem mutat egyenletes elrendezést, a XI. kromoszóma például egyáltalán nem tartalmaz teljes Ty elemeket, bár δ -szekvenciák, LTR-ek előfordulnak rajta (41).

Szintén a pékélesztő DNS állománya részének tekinthető a ~80 kb-os mitokondriális DNS, amely a mitokondriális translációs mechanizmus komponenseit kódolja, illetve a mitokondriális proteinek kb. 15 %-át (42).

A legtöbb *S. cerevisiae* törzsben jelen vannak 2 μ m cirkuláris plazmidok, amelyek kizárólag a saját replikációjukhoz szükséges információkat hordozzák. Kópiaszámuk 50 – 100 között változik (40).

A *S. pombe* haploid genom mérete 13,8 Mb, mely mindössze három, 3,5 Mb, 4,6 Mb, ill. 5,7 Mb-os metacentrikus kromoszóma között oszlik meg. A hasadóélesztő sejtek, a pékélesztőhöz képest kevesebb, megközelítőleg 4900 génnel rendelkeznek, melyek átlagos gén mérete 1407 – 1446 bp (1. táblázat). A gének denzitása az I. és II. kromoszómákon hasonló, átlagosan 2,4 kb-ként fordulnak elő, a III. kromoszómán azonban kevésbé sűrűn, átlagosan 2,7 kb-ként találunk géneket. A genom szegény repetitív szekvenciákban, azok a genom mindössze 0,35%-t adják (38), mely szignifikánsan kisebb, mint a sarjadóélesztő 2,4 %-os aránya. A legjelentősebb ismétlődést itt is a — III. kromoszómán elhelyezkedő, 10,4 kb-os — rDNS 100 – 120 kópiás ismétlődései adják, melyek az 5,8 S, 18 S és 25S riboszómális RNS géneket kódolják. Végeredményben a genom 1,1 Mb-nyi részét teszik ki. Ugyanakkor az

5S rDNS ~30 kópiája szétszórva található a genomban. (32) Az ismétlődő elemek részét képezi a 11 transzpozon elem. Közülük némelyek LTR-rel rendelkeznek, ezek és a 180 egyedülálló LTR retrotranszpozícióval szaporodnak. Érdekes módon a transzpozonszerű elemek sűrűsége a III. kromoszómán kétszerese a többi kromoszómáénak (32).

Az intergénikus régiók átlagos hossza nagyobb (952 bp), mint a pékésztőé (515 bp). A genom 4730 intronja, melyek hossza 29 – 812 nukleotid, a gének 43%-a között oszlik meg. *S. cerevisiae*-ben csupán a gének 5 %-a tartalmaz intronokat. Az intronok viszonylag nagyobb száma valószínűleg alternatív splicing lehetőségét biztosítja, mellyel protein variánsok jöhetnek létre (32).

A hasadó élesztő DNS állománya részének tekinthető a 13 gént kódoló 20 kb-os mitokondriális DNS (32).

	Genom méret (Mb)	Kr. (1n) szám	Kr. méret	Gén szám	Ismétlődő szekvencia (%)	Átlagos transzkriptum / gén méret (kb)	GC tartalom
<i>H. sapiens</i>	3300	23	50-263 Mb	30000	46	25	41,5 %
<i>S. cerevisiae</i>	12 +rDNS	16	230-2200 Kb	5700	2,4	2	38,3 %
<i>S. pombe</i>	13,8	3	3,5-5,7 Mb	4900	0,35	1,4	36 %

1. táblázat: Humán és élesztő genomok összetételének összehasonlító táblázata (17,38,43,44) referencia alapján.

A nukleuszban elhelyezkedő lineáris DNS molekulák a core-hisztonokhoz kapcsolódva nukleoszóákat alakítanak ki mindkét élesztőben. Az *S. cerevisiae* genom mind a négy core-hiszton 2 – 2 génjét tartalmazza, ezen kívül olyan hisztonvariánsok is előfordulnak, mint pl. H2A.Z vagy a centromer-specifikus H3 variáns CENPA, valamint megtalálhatók az ATP-dependens kromatin remodelláló faktorok, valamint a hiszton farkak reverzibilis módosításai (acetiláció és deacetiláció, metiláció, foszforiláció, ubikvitináció), melyek ezáltal a DNS hozzáférhetőségének a szintjét is szabályozzák. Bár a hisztonok erősen konzerváltak, az élesztő hisztonok térnek el legjobban az emlős hisztonoktól (aminosav-hosszban; a hiszton farkakban szekvenciális eltérések lehetnek) (37). *S. cerevisiae*-ben a nukleoszóák nagyon közel helyezkednek el egymáshoz (átlagosan 162 ± 6 bp), a linker DNS hossza csupán 15 – 20 bp, szemben a metazoa átlagos 190 bp-os ismétlődésével (7,37).

Az élesztő mononukleoszóák destabilizálhatóak só-dependens és hőkezeléses eljárásokkal. A *S. cerevisiae* nukleoszóák valószínűleg kevésbé stabilak, összehasonlítva a magasabbrendű eukarióták nukleoszóáival. Ez összhangban áll azzal a feltételezéssel, hogy

genomjuk nagy része (~90 %) konstitutíven nyitott marad az élesztő élelciklusa nagyobb része alatt (37), azaz potenciálisan transzkripcióra alkalmas állapotban van, szemben az emlősök genomjával, ahol akár a genom 90 %-a is transzkripcionálisan csendes lehet teljesen differenciált szövetekben (17). Heterokromatin csak a telomereknél, az RDN1 lókuszban elhelyezkedő rDNS-nél és a párosodási típus csendes kazettáinál található (HML, HMR lókuszt) (36). A transzkripcióra nyitott genom dacára a géneknek csak kis százaléka íródik át (37).

A kromatin további feltekeredése mind *S. cerevisiae*-ben, mind *S. pombe*-ban linker hiszton nélkül valósulhat meg, ugyanis egyikükben sem detektálták a H1 hiszton jelenlétét (5,19), bár sarjadóélesztőben mostanában azonosították a HHO gént (Hho1p), amely homológiát mutat a linker hisztonnal, azonban valószínűleg nincs túl nagy szerepe az élesztő sejtekben, mivel deléciója sem a növekedést, sem a párosodást nem zavarja (37). Atomerő mikroszkópiás vizsgálatok alapján is az *S. pombe* kromatin hierarchiája hasonló a magasabbrendű eukariótákéhoz. A kromatin organizációjában a H1 hiszton hiányát mindkét élesztőben valószínűleg nem-hiszton fehérjék kompenzálhatják. (45).

A sarjadóélesztő interfázisos kromoszómái hosszukat tekintve kevesebb, mint felükre tömörödnek, amikor mitotikus kromoszómákká alakulnak át, szemben az emlősök 5 – 10-szeres kompaktálódásával (46).

2. 5. A szerkezeti hierarchia tükröződése DNS fragmentációs jelenségekben

A DNS oligonukleoszómális, ill. hurokméretű fragmentációja gyakran megfigyelt jelenség a sejtek apoptotikus folyamatai során. Hurokméretű DNS fragmentáció azonban nem apoptotikus sejtek esetében is detektálható.

2. 5. 1. Apoptózis során észlelt kromatin fragmentáció

Az apoptózis – annak sokféle formájától eltekintve, csak a fejlődésbiológiai jelenségre utalva - a sejtek genetikailag programozott halála, amely a sejt részéről aktív közreműködést igényel, szemben a nekrozissal (47). Az apoptózis lehetővé teszi a nem kívánt, potenciálisan veszélyes vagy helyrehozhatatlanul károsodott sejtek gyors eltávolítását, oly módon, hogy az

eliminációjuk a lehető legkisebb mértékben terhelje a szervezetet (48). Az apoptotikus sejthalálnak jellegzetes markere, az elektronmikroszkóppal megfigyelt morfológiai változások mellett, a nukleáris fragmentáció (49).

Az apoptózis kapcsán leírták mind a DNS, mind számos magi fehérje feldarabolódását. Az apoptotikus DNS degradáció három lépésben zajlik le egy lehetséges modell szerint. Előbbivel kapcsolatban gyakran szembesültek azzal a ténnyel, hogy a nukleoszómális DNS-fragmentáció nem feltétlenül jellemzője az apoptózisnak, máskor a DNS 50–300 kb-nyi darabokra való szétesése kíséri azt, ill. utóbbi, melynek vizsgálatát pulzáltatott mezejű gélelektroforézis (PFGE) teszi lehetővé (50), a nukleoszómális fragmentáció nélkül is megfigyelhető.

Az apoptotikus DNS degradációs folyamatok elindításában fontos szerepet játszik az un. kaszpázoknak nevezett cisztein-proteáz család. Ennek a komplexnek centrális komponense egy heterodimer protein, a DNS fragmentáló faktor (DFF). Egyik alegysége a Mg^{2+} -dependens CAD (Caspase Activated DNase) nukleáz, a másik a nukleáz aktivitású alegység inhibitora, az ICAD (Inhibitor of Caspase Activated DNase). Amikor a kaszpáz 3 vagy 7 hasítja az ICAD-ot, a CAD nukleáz szabaddá válik és a H1 hisztonhoz kötődve a DNS-hez kapcsolódik és a nukleáz-aktivitása stimulálódik (20,51,52).

A CAD-on kívül más DNáz-okról is kimutatták, hogy apoptotikus körülmények között hasítják a nukleáris DNS-t. Például a G-endonukleáz, egy mitokondriumban szekvesztrált nukleáz, mely apoptotikus szignál hatására a nukleuszba transzlokálódik és a kaszpázoktól független módon, nukleoszómális fragmentekre vágja a kromatint. Az enzim ugyanakkor RNáz H aktivitással is rendelkezik (53). További példák a GADD (granzyme A-activated DNase), mely aktiválódva egyszálú bemetszéseket hoz létre a DNS-ben, mely végül nagymolekulasúlyú fragmentumok kialakulásához vezet, és a savas pH-n aktiválódó DNáz II enzim (54).

Az egysejtű élesztő sejtek esetében szintén leírták az apoptotikus jelek megjelenését, habár az élesztősejtek – önzetlen - öngyilkossága relatíve ritka esemény fiziológiai feltételek alatt (55). Apoptózis indukálható élesztősejtekben UV sugárzással, alacsony koncentrációjú H_2O_2 -vel (56) és ecetsavval (47), a sejtöregedés (57),(58), ill. a párosodási feromonok magas koncentrációja is apoptózishoz vezethet élesztőben (55). Apoptotikus sejtekben egyéb markerek mellett megfigyelték a kromatin kondenzációját (58) és marginációját (56). Leírták a kromatin fragmentációját is (56), azonban *S. cerevisiae*-ben nem detektálható apoptotikus létra, amelyet valószínűleg a meglehetősen rövid linker DNS méret magyaráz (48,56). Az *S. cerevisiae*, ill. *S. pombe* élesztő nem tartalmazza az apoptotikus jelút emlős sejtek esetében jól

ismert szereplőit, sem az ICE proteáz család tagjait (kaspázok), sem a p53-t, sem pedig bcl-2-höz, vagy bax-hoz hasonló géneket (48). Bár az élesztő sejtekben nem találtak az emlősökre jellemző kaspázokat, azonosítottak egy kaspáz ortológot, a YCA1-t (yeast caspase), amely a metakaspázok családjába tartozik. A metakaspázok megtalálhatóak a gombákban, növényekben, protistákban, de nincsenek azokban az organizmusokban, amelyek a klasszikus kaspázokat tartalmazzák (59). A YCA1 inaktív formája 52 kDa, mely a 12 kDa-os alegység eltávolításával aktiválódik. Az aktiválódáshoz proapoptotikus szignál szükséges, pl. a kultúra öregedése (60), ugyanis overexpressziója önmagában nem okoz apoptózist, de növeli a sejtek érzékenységét az apoptotikus stimulusokra, mint pl. az oxigén stressz (59). Az emlős endonukleáz G-vel ortológ mitokondriális Nuc1 protein szerepét szintén leírták az élesztő apoptózis kapcsán (61,62).

2. 5. 2. Normál, életképes sejtekből izolált kromatin fragmentációs jelenségei – közvetlen előzmények

A DNS 50 kb körüli fragmentációja az apoptózis gyakran megfigyelt jelensége. A jelenség érdekessége, hogy a proteáz emésztés nélkül előállított sejt-lizátumban is megfigyelt fragmentumok hossza a kromatin szerveződés magasabb szintjét (valószínűleg) képviselő, elektronmikroszkópiával vagy fluoreszcens mikroszkópban egyaránt láthatóvá tehető kromatin-hurkok méretével megegyező tartományba esik.

Normál, nem apoptotikus humán vagy egér sejt-vonalakból izolált kromatin hasonló méretű fragmentációja figyelhető meg akkor, amikor izolált sejtmagokat vagy akár az élő sejteket magukat ionos detergensekkel (Sarkosyl vagy SDS) és proteázokkal (Proteináz K, pronáz) kezelünk kelátor jelenlétében, pulzáltatott mezejű gélelektroforézissel vizsgálva (63). Ez a fragmentum méret a DNS gélből történő elektroelúciója, majd fenol – kloroform extrakciója és etanol precipitációja után is megmarad (64).

Hasonló mintázat érhető el alacsony (10 U/ml körüli) koncentrációjú DNáz I kezeléssel a normál sejtek csak ionos detergensekkel előállított viszkózus lizátumában, mint a detergens + proteáz kezeléssel, arra utalva, hogy DNáz I hiperszenzitív helyek fordulnak elő ~50 kb-ként a vizsgált sejt-vonalak kromatinjában (64) és ezek szolgáltatják a proteináz emésztés során kialakuló duplaszál fragmentáció predilekciós pontjait.

A proteáz emésztés nyomán nyert fragmentek végei polinukleotid kinázzal és exonukleáz aktivitással nem rendelkező Klenow enzimmel jelölhetőek, ellenben terminális transzferázzal (TdT) nem, hacsak a DNS mintákat először 3' túlnyúló végeket generáló restriktációs enzimmel nem kezelték. Valószínűnek látszik a fentiek alapján, hogy a fragmentek jelentős része 5' túlnyúló véggel rendelkezik. Az egyöntetűnek tűnő végkonfiguráció valamilyen enzimatikus mechanizmust feltételez, szemben a mechanikai törés lehetőségével (65). Azonban a formaldehid- vagy etanol-fixált nem apoptotikus egér timocita sejtek kromatinja proteináz K kezelés után TdT enzimmel *in situ* jelölhető volt (hasonlóan az apoptotikus sejtekhez), mely szabad 3'-OH véget jelez (66). Mivel fixált sejtek szuszpenziójából izolált DNS esetében is tapasztaltak kiscokú TdT jelölődést, az izolált DNS és a tárgylemezre fixált sejtpreparátum eltérő végjelölődésének magyarázatára feltételezték, hogy a fixáció facilitálhatja a proteolitikus emésztést, hatékonyabban eliminálva az 5'-túlnyúló végek közelében lévő proteineket, amelyek egyébként meggátolhatják a DNS végek olvadását és így a TdT jelölést. Végeredményben az látszott a legvalószínűbbnek, hogy a fragmentek 5'-túlnyúló, ill. szabad 3'-OH végekkel rendelkeznek (65).

Az élő sejtek közvetlen lizálása lúggal és detergenssel egyidejűleg, szintén ~50 kb-os fragmentációt idézett elő. Az alkalikus pufferben végzett hosszabb idejű inkubáció nem degradálta tovább az ~50 kb-os fragmenteket. Ez felveti annak a lehetőségét, hogy a kromatinban egyszálú folytonosság hiányok vannak jelen, a komplementer szálakon „staggered” elrendezésben, amelyek megfelelhetnek a proteináz kezelés során megfigyelt nem random végeket eredményező dupla-szálú hasítási helyeknek (67).

Azok a kísérletek, amelyekben különböző kezelésekkkel megpróbálták befolyásolni a fragmentációt, nem vezettek eredményre. Ezekhez a kezelésekhöz topoizomeráz II és I inhibitorokat (mAMSA, VM-26, novobiocin és genisztein, ill. camptothecin), dinitrofenolt (ez kimeríti a sejt ATP tartalékát) és 3-aminobenzamidot (a poly(ADP-ribóz) inhibitora) és aurintrikarboxylsavat ill. Zn-ket (az apoptotikus nukleázok gátlására) használtak. A fragmentáció nem függött a pH-tól, ezért (is) a 3' túlnyúló véget eredményező, savas pH optimummal rendelkező, és más rendszerekben az apoptotikus fragmentációhoz valószínűleg hozzájáruló DNáz II szerepe valószínűtlennek látszott ebben a jelenségben (64). Megjegyzendő, hogy ezen kezdeti kísérletek során használt sejtek pusztán detergens jelenlétében készült lizátumában is megfigyelhető volt a kromatin 50 kb-os fragmentációjának jelensége, ehhez proteináz emésztésre egyáltalán nem volt szükség. (A kísérletek ezen fázisában is a frissen izolált *ex vivo* sejtek, pl. emberi limfociták, igényelték a proteázos lépést a fragmentáció bekövetkezéséhez.) A sejttenyésztési körülmények máig felderítetlen eredetű

megváltozása eredményezhette az azóta vizsgált bármely sejtvonal sejtjeinek esetében (azok bármilyen sejtciklusbeli állapotában) azt, hogy a detergens kezeléssel nyert lizátum extenzív proteáz emésztése szükséges a hurokméretű fragmentációs jelenség észleléséhez. A sejtek közötti, e tekintetben jelentkező különbségek okára azóta sem derült fény.

A mechanikai nyírás kivédése érdekében agarózba ágyazott, deproteinizált sejtek kromatinjának S_1 nukleáz kezelése is jellegzetes DNS fragmentációt idézett elő emlős és élesztő sejtek esetében egyaránt. 500 U/ml S_1 nukleáz emésztés az élesztő sejtek kromatinjában ~50 kb-os, míg az emlős sejtekben ~300 kb-os fragmentációt okozott. Az emlős DNS ~50 kb-os fragmentációját 1650 U/ml S_1 nukleáz emésztés váltotta ki. Az S_1 nukleázzal való emészthetőség helyileg denaturált régiókat vagy egyszálú folytonossághiányokat jelezhet a DNS-ben, azonban az eukarióta kromatin S_1 nukleáz érzékenységét általában inkább a DNS helyileg módosult struktúráinak tulajdonítják, mintsem a DNS szálban előforduló folytonosság hiányoknak (68).

A kromatinban esetlegesen előforduló egyszálú folytonossághiányok tanulmányozását egy módosított agaróz gélelektroforézis technika tette lehetővé, amely a DNS hődenaturálását és elektroforézisét foglalja magába, urea jelenlétében. Ezzel a technikával elkerülhető a DNS-ben esetlegesen előforduló lúg-érzékeny helyek detektálása. A 65°C-on végzett 4 órás hőkezelés nem okozott változást a kromatin integritásában, azonban az emlős sejtek esetében 95°C-on, élesztő protoplasztok esetében 80°C-on végzett rövid inkubálás nyomán 8 M urea jelenlétében 50–300 kb hosszúságú egyszálú DNS fragmenteket detektáltak urea tartalmú agaróz gélen. Utóbbi hőmérsékleten végzett rövid inkubáció valószínűleg nem okozhatja a DNS egy- vagy kétszálú artefaktuális törését/ hasadását annak tükrében, hogy viszonylag hosszú DNS fragmenteket lehet amplifikálni a sokszoros hődenaturációt igénylő PCR technikával. A mechanikai nyírás szerepe sem lehet a fő tényező a degradáció kialakításában, ugyanis a 65°C-on felolvasztott blokkok ismételt pipettázása sem váltott ki (önmagában) fragmentációt.

Az emlős sejtek agarózba ágyazása után a blokkokban lévő sejteket proteináz K-val, SDS-sel és EDTA-val lizálva (hőkezelés nélkül) Mb-méretű (vagyis az általam vizsgált jelenség szempontjából fragmentálatlan) DNS detektálható. A szuszpenzióban lévő ill. beágyazott sejtek esetében megfigyelt eltérő viselkedés egy lehetséges magyarázata, hogy a kromatinban a sejtízist megelőzően is jelen lévő, vagy akár annak pillanatában keletkező egyszálú folytonossághiányok sejtuszuszpenzióban az erőteljes protein denaturáció következtében manifesztálódnak, míg gélbe ágyazott sejtek esetében a széttekeredést az agaróz mátrix megakadályozza.

Amennyiben pre-exisztáló folytonossághiányokról van szó, azokat fehérjék maszkírozhatják, melyek eltávolítása a protein-denaturáló kezelés következménye lehet. Ilyen fehérjék lehetnek például a topoizomerázok vagy a szintén minden eukarióta sejtben megtalálható Ku proteinek (68). A 70 és 80 kDa-os alegységből álló Ku heterodimer szekvencia-független dupla-szálú DNS vég-kötő aktivitást mutat, és szintén kötődik a nick-ekhez és hosszabb folytonosság hiányokhoz (69).

A fenti jelenségekört az egyedi sejt szintjén vizsgálandó, munkacsoportunk térinverziós egy-sejt gélelektroforézis (FI-SCGE) technikát fejlesztett ki, melynek segítségével kimutatták, hogy alkalikus körülmények között a nem apoptotikus nyugvó vagy proliferáló humán sejtek és sarjadó élesztő szferoplasztok kromatinja granulumokra esik szét. Kvantitatív képanalízis alapján a granulumok ~48 kb-os átlagos DNS méretnek felelnek meg (1). Ez a szétesés nem tapasztalható neutrális körülmények során, amikor is csupán a DNS szálak párhuzamos kifeszülése volt detektálható.

Ezen kísérletekben, elektroforézis nélkül, neutrális körülmények között, a preparátumok sókezelése után a nukleáris „halo”-k hatékonyan jelölhetőek voltak DNS polimeráz I enzimmel, azonban Klenow enzimmel és TdT-vel sokkal kevésbé. Ez arra utalt, hogy szabad 3'-OH végekkel rendelkező nick-ek lehetnek jelen, szemben a ds törések és „gap”-ek lehetőségével. A TdT és a Klenow enzim egyaránt képes volt biotin-dUTP-t hatékonyan beépíteni abban az esetben, amikor a mintákat előzőleg Exonukleáz III-nak, RNáz A-nak vagy alkáli kezelésnek tették ki. Az adott körülmények között RNáz H aktivitással is rendelkező RNáz A hatását speciális RNáz inhibitor jelenléte megszüntette. Az RNáz szenzitivitás azt valószínűsíti, hogy a nick-eknél RNS/DNS hibridek fordulnak elő, melyekből az RNS szálat a DNS polimeráz I és az Exonukleáz III enzim RNáz H aktivitásuk révén degradálják. Az RNS/DNS hibridek jelenlétét anti-RNS/DNS hibrid-specifikus monoklonális antitest jelölésével megerősítették (1). A nick-ek, ill. RNS / DNS hibridek főként a nukleáris halo-k centrális területén mutatkoztak, míg a kiterülő hurkok alig jelölődtek (1), összhangban azzal a feltételezéssel, hogy a jelenség kapcsolatos a hurok szerveződéssel.

A fragmentumok végeit klónozva és szekvencia analízisnek alávetve azt találták, hogy repetitív elemek gyakran vannak jelen a töréspont-szekvenciákban. A fragilis/hiperszenzitiv régiókban találtak olyan konszenzus motívumokat, melyek kromoszómális átrendeződések forrópontjaiban helyezkednek el. Az analizált szekvenciák között megtalált rövid CCAGCCTGG palindróma az MLL gén gyermekkori akut leukémiában és posztterápiás leukémiában gyakori átrendeződési régiójának (breakpoint cluster region, bcr) egyik forrópontja, egy topoizomeráz II kötőhely szekvenciájában is megtalálható (65), és ugyanezen

bcr a hurok-méretű apoptotikus DNS fragmentáció során hiperszenzitvitást mutat. Ennek nyomán az MLL génre specifikus szondával végzett FISH (Fluorescence In Situ Hybridisation) kísérletek eredménye azt mutatta, hogy alkalikus FI-SCGE során az MLL régió több diszkrét részre esett szét, bár a kromoszóma territóriumok viszonylag jól megőrződtek; neutrális FI-SCGE során azonban kompakt, nem fragmentált szignálhoz vezetett a FISH vizsgálat (1).

2. 6. Tranziens folytonossághiányok előfordulása a genomi DNS-ben fiziológias működések során

Tranziens folytonossághiányok, amelyek a genom instabilitásának forrásai lehetnek, a sejtciklus során gyakran fordulnak elő. Ezek a folytonossághiányok érinthetik a DNS hélix egyik (nick, gap) vagy mindkét szálát, és kapcsolatosak lehetnek a replikáció, transzkripció, DNS repair és rekombináció folyamataival.

A DNS replikációja teszi lehetővé a biológiai információ egyik generációról a másik generációjára történő átadását. A replikáció a lineáris molekulán egyszerre több start ponton (replikációs origó) indul meg eukariótákban. *S. cerevisiae*-ben a replikációs origókat a ~200 bp-os ARS (Autonomously Replicating Sequences) jelöli ki; genomjában ~400 aktív replikációs origót detektáltak, melyek főleg intergénikus régiókban fekszenek (70). *S. pombe*-ben hasonló mennyiségű replikációs origót találtak, azonban a hasadó élesztőben, az emlősökhöz hasonlóan, hiányzik a sarjadó élesztőben megfigyelt konszenzus szekvencia; replikációs origóik AT-gazdagok és szintén intergénikus területeken helyezkednek el, az origók aktivitásban fontos szereppel bír a kromoszómális kontextus is (71).

A replikáció általában két irányba halad, kialakítva a replikációs buborékot. Kivételt jelent a *S. cerevisiae* rDNS-e, ahol a replikáció unidirekcionális módon valósul meg, melyet a 9,1 kb-os egységek egyik végén elhelyezkedő replikációs villa barrier jelenléte magyaráz (36,72).

Az interfázisos DNS-molekula szuperhelikális formában van jelen. A replikáció kezdetekor a DNS kettős spirálja fellazul, denaturálódik, mely a molekula szomszédos részeinek szuperspirális feltekeredésével jár együtt. A feltekeredést követően jelentkező torziós stressz feloldását a topoizomeráz enzimek végzik a DNS egyik vagy mindkét szálának bemetszésével. A folyamatos replikáció tehát azt feltételezi, hogy a DNS-en bevágások (nick-ek) jönnek létre. A nick-ek jelenléte a replikációs villák közelében nem szerencsés, mivel

ezeknél a replikációs villa leállhat és akár duplaszálú (ds) DNS törés is kialakulhat (73), helyette ezért a replikálódó részekről távolabb jönnek létre topoizomeráz-mediált, rövid idejűnek gondolt bemetszések (74).

A genomi DNS szemikonzervatív módon zajló replikációja során a szintézist rövid RNS primerek indítják el, melyek lebomlását követően végül az 100 – 1000 nukleotidnyi DNS szakaszok (Okazaki fragmentumok) ligációjával alakul ki a folytonos DNS lánc. Az *S. cerevisiae* meglehetősen kis genomjában pl. ~100000 Okazaki fragmentum keletkezik sejtciklusonként, a humán sejtekben pedig 100 – 1000-szer több (75). Az Okazaki fragmentumok keletkezése során — összeligálódásukat megelőzően — tehát egyszálú folytonossághiányok generálódnak minden sejtciklusban, a késlekedő szál természete miatt⁴ (76). A replikációt követően nick-ek, gap-ek maradhatnak vissza (77), amelyek ds DNS töréseket eredményezhetnek a következő sejtciklusban. A sejtek csak korlátozott kapacitással képesek a ds törések kijavítására. *S. cerevisiae* sejtek pl. ~30 ds törés kijavítására képesek. A sejt halála akkor következik be, amikor a ds törések száma meghaladja a sejt javító képességét (75). Kimutatták, hogy amikor a nick-ek fenntartásában a hibák túllépik a ~0,02 %-ot, az a haploid élesztő sejtek letalitását okozza. (76). A hátramaradó nick-ek a két DNS szál megkülönböztetésében játszhatnak szerepet. A vezető szálát iniciáló RNS primer sorsáról ugyanakkor keveset tudunk.

Hasonlóan a replikációhoz, a transzkripció is a dsDNS széttekeredésével indul. A keletkező buborékban megindul a templát szállal komplementer RNS szál átírása RNS polimeráz segítségével. A transzkripció 6 – 8 aktív RNS polimeráz II enzimet magába foglaló „transzkripciós gyárakban” zajlik, ahol egyszerre akár több gén átíródása is lehetséges. A transzkripcióhoz hasonlóan valószínűleg a replikáció folyamata is a — még kevésbé ismert — „replikációs gyárakban” történik (78). Az RNS polimeráz működése következtében a transzkripciós gépezet előtt a DNS tranziens pozitív, mögötte pedig negatív szuperhelikális tekeredése alakul ki. Ez a szuperhelikális tekeredés képezi az alapját a topoizomerázok működésének a transzkripciós elongáció során (74). A transzkripció-indukálta negatív-szuperhelikális állapot elősegíti az R-hurokok (RNS/DNS hibridek) kialakulását⁵, ami egy, a keletkezésükre felállított modell szerint a keletkező RNS szál DNS templáthoz történő visszakapcsolódása révén alakul ki, aminek kedvez a nyitottabb kromatin szerkezet. A

⁴ Emlős mitokondriális DNS-ben (mtDNS), mely replikációs mechanizmusa eltér a genomi DNS-étől, permanensen jelenlévő nick-ek jelölik ki a replikáció kezdő pontját a replikációs origóknál.

⁵ Az R-hurokok funkcionális jelentőségét mutatja az emlős mtDNS-ben, a transzkripció-aktivált replikáció, ahol a transzkripció során keletkezett RNS, a templát DNS-sel RNS/DNS hibridet alkotva, szolgál primerként a replikációhoz.

topoizomeráz I enzim közvetve gátolja az R-hurok kialakulását, mert amellett, hogy relaxálja a negatív szuperterkeresztet (79), az ASF/SF2-hez (alternative splicing factor / splicing factor 2) közvetlenül kötődve és aktiválva azt, elősegíti az mRNS-érést, amely így nem képes a DNS templáthoz visszakötődni (80). ASF/SF2 hiánya (közvetlenül vagy valamilyen, még feltáratlan folyamat során) ds töréseket okoz, mely végül nagymolekula-súlyú DNS fragmentumok (~50 kb) megjelenését eredményezi (81).

A DNS replikáció rendszere átlagosan 10^6 bp-ként hibát ejt (82), melyek kijavítása elengedhetetlen a pontos genetikai információ átadásához. A DNS-ben megjelenő hibáknak csak egy része köthető a replikációs eseményekhez. Különböző külső és belső tényezők szintén okozhatnak hibákat a DNS-ben. Ilyen hatások például az ionizáló sugárzás, UV fény, különböző kémiai ágensek. A leggyakoribb hibák közé tartozik a depurináció, dezamináció, timin-dimer képződés, nukleotid kiesés vagy beékelődés, DNS szál törés, a láncok keresztkötései. A DNS-ben felgyülemlett hibákat a különböző javító (repair) mechanizmusoknak a következő replikációig ki kell javítaniuk, különben a hibák rögzülnek és mutációk jönnek létre. A DNS-t ért károsodás típusától függően többféle javítórendszer létezik. A javító mechanizmusok egyik típusába azok a rendszerek tartoznak, amelyekben a károsodás a DNS egyik szálát érinti. A hiba javításakor a DNS-nek csak az egyik szála hasítódik a javító enzimek a DNS másik szálát használják templátként. Ebbe a csoportba tartozik a bázis excíziós repair (BER – base excision repair), a nukleotid excíziós repair (NER – nucleotide excision repair), és a mismatch repair (MMR). A reparáló rendszerek másik típusát azok alkotják, amelyek a DNS mindkét szálát érintő károsodását javítják. Ezek hibahajlammal járó javító mechanizmusok, melyek a DNS ds törésével járnak és alapvetően két stratégiát követnek: az egyik stratégiában a replikációt követően a testvér kromatid homológ szakaszát használja fel a rekombinációs javítás enzimapparátusa. E javítórendszer számára problémát jelenthet azonban a genomban több példányban jelenlévő vagy ismétlődő szakaszok javítása, mivel ilyenkor a templát DNS több forrásból származhat, amely akár kromoszómális transzlokációkhoz is vezethet. Ettől eltérő megoldást nyújthat a nem-homológ végek összekapcsolása (NHEJ – non-homologous end-joining). Ekkor a törések végei mintaszekvencia nélkül religálódnak. (83). A DNS különböző károsodása, ill. azok javítása során tehát ss vagy ds folytonossághiányok fordulhatnak elő a genomban.

Az élő szervezetek bár igyekeznek stabilizálni genetikai állományukat, megtartani a meglévő génkombinációjukat, mégis az evolúciós erők hatására kénytelenek mutációkkal és új gén kombinációkkal biztosítani a faj genetikai variabilitását. Ez utóbbi megvalósításához, a

kromoszómák átrendeződéséhez, járul hozzá a DNS szakaszok kicserélésével a genetikai rekombináció.

A rekombinációnak alapvetően két típusát különböztetjük meg: 1.) általános rekombináció, amely a meiózis alatt két homológ kromoszóma között zajlik az ivarsejtek képzése során. 2.) helyspecifikus vagy illegitim rekombináció, melyhez nem feltétel a két DNS közötti kiterjedt homológia.

Az általános rekombináció feltétele a homológ kromoszómák párosodása, melyet a szinaptonémás komplex kialakulása tesz lehetővé. Az általános rekombináció kezdeti lépéseként a DNS molekulák egyik szála hasítódik, amely szükséges egyrészt a DNS letekeredéséhez, másrészt a másik DNS-sel való összekötődéshez. A letekeredő ssDNS szál, kiszorítva a másik kromoszóma homológ szakaszát, átkereszteződik (crossing over), azaz a homológ kromoszóma komplementer szakaszához kapcsolódik. A másik kromoszóma kiszorított szakasza szintén összekapcsolódik a párjával, heteroduplex szakaszokat kialakítva. A teljes átkereszteződéshez szükséges a kiszorított szál bemetszése is. A kicserélődött szálak kereszteződési pontja a kiazma. A kiazma elmozdulása valamelyik irányba folyamatos szálcserére kényszeríti a kromoszómákat, ezzel megnövelve a heteroduplex régió hosszát. Végül kialakul a Holliday-struktúra, amelyben az átkereszteződött szálakkal a két rekombinációban részt vevő DNS-szál összekapcsolt helyzetben van. Ez az állapot azonban hosszú távon nem fenntartható, megszüntetése a vágás helyétől függően kétféleképpen mehet végbe. Az egyik esetben a két kromatida nagyobb része változatlan marad, a kiazma hasításával csak a heteroduplex szakaszok maradnak a DNS-ben. A heteroduplex állapot megszüntetését javító mechanizmusok (mismatch repair) végzik. Attól függően, hogy a javítórendszerek az eredeti vagy az átkeresztezett szálakat használják-e templátként, nem történik változás, ill. génkonverzió történik a kromatidában. A másik esetben két rotálásból álló izomer átalakulás után történik a kiazma átvágása, amely eredménye a teljes rekombináció, azaz teljes DNS szakaszok cseréje.

A *S. cerevisiae* és a *S. pombe* haploid törzsei között találunk olyanokat, amelyek képesek a párosodási típusukat megváltoztatni a mitotikus sejtosztódásuk alatt. Mindkét élesztő három-három párosodási típus lókuszt tartalmaz, melyek közül csak egy működik aktívan, a másik kettő transzkripcionálisan csendes állapotban van. A párosodási típust meghatározó lókusztok a *S. cerevisiae* esetében a III. kromoszómán, az *S. pombe* esetében pedig a II. kromoszómán helyezkednek el. A párosodási típus-váltás mindkét esetben génkonverzióval valósul meg. *S. cerevisiae* sejtek párosodási típusa lehet „a” vagy „ α ” (MATa vagy MAT α). A génkonverzió kezdeti lépésekor a hely-specifikus HO endonukleáz

ds törést hoz létre a MAT lókusznál, a másik két, donorként szolgáló lókuszt (HML α és HMRA) viszont érzéketlen marad a HO hasítással szemben, mivel azok heterokromatinba ágyazottak a III. kromoszóma két ellentétes végén. *S. pombe* sejtek párosodási típusát a mat1 lókusztartalmának határozza meg, mely lehet P (plusz) és M (mínusz). A párosodási típusváltást ss bemetszések inicializálják a mat1 lókusznál, melyek a következő S-fázisban ds törésbe konvertálódnak át. A sejt génekonverzió által javítja a törött DNS-t, a heterokromatinba ágyazott, mat2 (plusz) vagy mat3 (mínusz) lókusztartalmának alapján. *S. pombe* esetében a három párosodási lókuszt egymás közelében helyezkedik el: a mat2 a mat1-től 15 kb-ra, a mat3 pedig a mat2-től 11 kb-ra helyezkedik el.

Az illegitim rekombinációt több rendszer is használja. Az egyik legismertebb rendszer a programozott V(D)J rekombinációs útvonal, mely bevezető lépésénél ds törések alakulnak ki. Ezt a mechanizmust a limfociták használják a variábilis (V), diverzitás (D) és kapcsoló (J – joining) gén szegmensek összeillesztésénél, melyek az antitestek és antigén receptorok variábilis régióit kódolják (84). A folyamat során a ds törést a RAG1 és RAG2 (recombination-activating gene) proteinek generálják a konzervált rekombinációs szignál szekvenciánál. Ez a rendszer nagyfokú hasonlóságot mutat az élesztő NHEJ repair folyamatával (84). Az immunoglobulinok (Ig) diverzifikációja során a B-sejtekben az Ig-gének VDJ szegmensének átrendeződése mellett szomatikus mutációk is növelik a szerkezeti sokféleséget, melyben az AID-nek (Activation-induced Cytidine Deaminase) kulcsszerepe van. Emellett ugyanez az enzim a class switch rekombinációban is alapvető szereppel bír, mely meglepő, mivel a két mechanizmus jelentősen különbözik egymástól. A szomatikus rekombinációban az AID csak a variábilis régióhoz (VDJ exonok) kötődik és pontmutációkat hoz létre, melyet BER, ill. MMR repair rendszerek javítanak. A class switch rekombinációban kötődése kizárólag a switch régióra korlátozódik, ahol ds törések kialakulását és rekombinációt indukál. A switch régió transzkripciója során keletkező G-gazdag transzkriptum RNS/DNS hibridet (R-hurok) alakít ki, ami egy stabil ssDNS szubsztrátot hoz létre az AID számára (85).

Szintén az illegitim rekombinációt használják a mozgékony elemek, a genomban történő áthelyeződésük során.

Az illegitim rekombinációnak szerepe lehet bizonyos tumorok kialakulásában is. Jó példa lehet erre a gyermekkori akut leukémiák hátterében gyakran álló MLL gén átrendeződése.

A sejtciklus S-fázisa alatt, a DNS replikáció következtében minden kromoszóma duplikálódik, centromerükön keresztül szorosan kapcsolódó testvér kromatidát kialakítva.

BrdU inkorporációs kísérletekkel kimutatták, hogy a testvér kromatid kicserélődés folyamata során a testvér kromatidok törése és egymással újra kapcsolódása következtében DNS szakaszok cserélődnek ki a két kromatidaszál között (sister chromatid exchange).

2. 7. *Tranziens DNS hasítást okozó enzimek: topoizomerázok*

A topoizomerázok a DNS dupla hélix egyik vagy mindkét szálát vágják el ideiglenesen. A topoizomeráz I a DNS egyik szálán hoz létre tranziens folytonossághiányt, a topoizomeráz II reakció tipikusan átmeneti duplaszáltöréssel jár. Mindkét topoizomeráz képes módosítani a szuperhelicitás mértékét a sejten belül (86).

Az eukarióta topoizomeráz II egy heterodimer nukleáris enzim, amely mindkét DNS szálát hasítja, amely hasításhoz szükséges energiát ATP hidrolízis szolgáltatja. Miután Mg^{2+} jelenlétében a topoizomeráz II dimer átmenetileg, kovalensen, hozzákötődik a törött szál 5'-foszfát végéhez, egy specifikus tirozin maradékon keresztül. A topoizomeráz dimerek igen stabilak. A két alegység közötti protein – protein interakciók közel tartják egymáshoz a törött DNS szálak végeit, amíg a duplex DNS egy hurka a törésen keresztül transzportálódik a DNS végek religálódása előtt (20). Az enzim által hasított és újra ligált DNS szegmentet G-szegmentnek (gate-segment), míg a G-szegmenten keresztül átadott DNS részletet T-szegmentnek (transient segment) nevezzük (87).

A topoizomeráz II enzimek egyrészt módosítják a DNS domének szuperhelikális szerkezetét, másrészt szétfűzik az egybefont DNS hurkokat. Ezek a folyamatok fenntartják a DNS integritását a replikáció, valamint a mitotikus és meiotikus kromoszóma szegregáció alatt (20). A topoizomeráz II enzimeknek a DNS rekombinációs eseményeiben is szerepet tulajdonítanak (88). A *S. cerevisiae* DNS-ben a topoizomeráz II a topoizomeráz I-gyel együttműködve gátolja a pozitív szupertekercs kialakulását a DNS replikációs villa elején. Az élesztőben olyan feltételek alatt, ahol a topoizomeráz I és a topoizomeráz II is gátolva van, a DNS replikáció gyorsan megáll, az új DNS láncok elongációja csak néhány ezer nukleotidig folytatódik (74).

A topoizomeráz I enzim a topoizomeráz II-höz hasonló módon működik, bár csak egy szálát hasít és az enzim monomer a törött DNS 3'-végéhez kapcsolódik átmenetileg (20). Amíg a topoizomeráz II működéséhez ATP-t igényel, az I-es típusú topoizomeráz működése ATP-independens folyamat (89).

A II-es típusú topoizomeráz alapvető fontosságú a sejt életében, minden élőlényben (74,87), azonban a topoizomeráz I nem esszenciális sem a *S. cerevisiae*-ben, sem a *S. pombe*-ben, a topoizomeráz II ugyanis helyettesítheti néhány funkcióban a topoizomeráz I-et, annak funkció vesztese esetén (74).

II-es típusú topoizomeráz enzimet a sarjadó élesztőben egyedül a Top2 gén kódol. Az evolúció folyamán az alacsonyabbrendű eukariótákban létező egyedüli topoizomeráz II gén duplikálódott, melynek eredménye topoizomeráz II α és II β gén lett az emlősökben. A humán DNS topoizomeráz II α és II β képes fenntartani az top2 mutáns élesztők vegetatív növekedését azáltal, hogy komplementálja a mutáns top 2 defektusát (88). Az élesztőből vagy humán sejtekből származó topoizomeráz II proteinek in vivo más nukleáris proteinekkel is kapcsolatban állnak.

A topoizomeráz II enzimeket néhány, a klinikumban használt rák elleni gyógyszer targetjeiként is számontartják. Ezek a gyógyszerek stabilizálják a kovalens kapcsolatot a topoizomerázok és a DNS között és gátolják a DNS religációját. A topoizomeráz II inhibitorok (anthraciklinek, epipodophyllotoxinok, stb.) hatékonyak a tumorok néhány típusával szemben, bár gyakran multidrog rezisztencia kifejlődését vagy a terápiához kapcsolódó másodlagos tumorokat indukálnak (20,74,87), pl. topoizomeráz II-inhibitorokkal történő kezeléseket követően gyakran figyelték meg az MLL gén átrendeződését, mely poszterapiás leukémiák kialakulásához vezet.

A topoizomeráz I-nek fontos szerepet tulajdonítanak a polimeráz II enzim promoter-közeli „pausing” állapotból való „kiszabadulásának” szabályozásában (90). Prokariótákban a transzkripció kapcsán keletkező R-loop-ok RNáz H általi eliminációja és az ugyanekkor generálódó szuperhelicitás-többlet relaxálása topoizomeráz I-szerű enzimaktivitás által szintén izgalmasan kapcsolható az általunk vizsgált jelenségkörhöz.

2. 8. A kromatin hurkok és kromoszóma transzlokációk kapcsolata: az MLL bcr⁶

Az MLL (Mixed Lineage Leukemia) génátrendeződése az egyik leggyakrabban megfigyelt genetikai módosulás az akut leukémiában szenvedő, egy év alatti gyerekek esetében. Leírták a

⁶ A Célkitűzések „B” részének háttéréül.

gén átrendeződését poszterápiás leukémiák esetében is. A tritorax családba tartozó MLL gén (amelyet HTRX-nek, HRX-nek, TRX1-nek, valamint ALL1-nek is neveznek) a 11. humán kromoszóma hosszú karján helyezkedik el (11q23). A viszonylag nagy gén (89 kb hosszúságú) 37 exont tartalmaz és egy 3969 aminosavból álló proteint kódol (91). Az MLL fehérje egy hiszton metiltransferáz (92). Az MLL gén átrendeződése általában egy 8,3 kb-os BamH1 restrikciós helyek által határolt fragmentumon belül fordul elő. Ezt a töréspont régiót MLL bcr-nek (breakpoint cluster region) nevezzük. (91) A de novo leukémiák esetében a töréspontok főleg a bcr centromerikus régiójában helyezkednek el, a poszterápiás leukémiákban azonban a töréspontok főleg a telomerikus részen fordulnak elő.

A pontos molekuláris mechanizmus, amely az MLL gén átrendeződését okozza, nem ismert. Felvetődött a topoizomeráz II közvetítő szerepe az MLL transzlokációkban, ugyanis a bcr-en belül azonosítottak topoizomeráz II konszenzus helyeket, ráadásul a primer tumorok topoizomeráz II-inhibitorokkal történő kezelését követően kialakuló szekunder leukémiák jelentős részében az MLL gén átrendeződését figyelték meg. Az epipodophyllotoxinok és más topoizomeráz II-inhibitorok az enzimhez kapcsolódva meggátolják a DNS újra kapcsolódását és ezáltal duplaszálú törést idéznek elő a DNS-ben, többek között az MLL bcr-en belül is. Ez a folyamat vezethet a MLL gén transzlokációjához és végül poszterápiás leukémiák kialakulásához. Egy kisebb affinitású S/MAR helyezkedik el a bcr centromerikus felén és egy erős S/MAR található a telomerikus részén. A telomerikus S/MAR feltételezhetően egy protein-gazdag régió, mely a kromatin hurkok horgonyzó helyeként szolgálhat. A hét topoizomeráz II konszenzus hely közül hatot a telomerikus S/MAR-on belül találtak meg (93). Szerepe lehet az Alu szekvenciák közötti homológ rekombinációnak is (94). A bcr-ben 8 Alu szekvencia helyezkedik el, melyből öt a bcr centromerikus részére esik. Becslések szerint a repetitív elemek közé tartozó, 100 – 300 bp hosszúságú, Alu szekvenciák átlagosan 3 kb-ként fordulnak elő a humán genomban.

A MLL bcr törését detektálták humán és egér sejtvonalak citotoxikus ágensekkel (etopozid, N-metilformamid, melfalan, citozin arabinozid) történő kezelését követően is (50,95) Kimutatták, hogy az apoptotikus program beindítása anti-CD95 antitesttel és más genotoxikus ágensekkel önmagában elegendő az MLL bcr hasításához, mely a S/MAR szekvenciáknál valósul meg. A kezeléseket egyben a nagy molekulásúlyú (~50 kb) DNS fragmentumok keletkezését is okozták. Az MLL bcr hasítódik a hurok-méretű fragmentumokat generáló apoptotikus program során a nukleáris mátrix közelében (96). A hasításban szerepe lehet apoptotikus nukleázoknak is, mivel az kaszpáz inhibitorokkal gátolható volt (1,97).

Munkám módszerfejlesztési részében az MLL bcr topoizomeráz II gátlószeres kezelések nyomán kialakuló leukemiák keletkezésében gyakran érintett centromerikus topoizomeráz II konszenzus szekvencia környezetének PCR-amplifikált fragmentumaival dolgoztam.

3. Anyagok és módszerek

3. 1. Élesztő sejtek genomi DNS-ének gélelektroforetikus vizsgálata

3. 1. 1. Élesztő törzsek, táptalajok és növekedési körülmények

Kísérleteimhez a *Saccharomyces cerevisiae* sarjadó élesztő WDHY 199 törzsét (MATa, leu 2-3 112 trp1-289ura3-52 his7-2 lys1-1), valamint a *Schizosaccharomyces pombe* hasadó élesztő L972 h⁻ törzsét (vad típus) használtam.

A *S. cerevisiae* sejteket egyetlen telepből folyékony YPD tápoldatba (1% yeast extract, 2 % bactopecton, 2 % glükóz, pH 5) oltottam le és nem-szelektív körülmények között növesztettem 30°C-on logaritmusos kultúra esetén OD₆₀₀ = 1 állapotig, amely ~2×10⁷ sejt/ml koncentrációt jelent, stacioner kultúra esetén OD₆₀₀ = 3,5 állapotig, amely ~4×10⁹ sejt/ml koncentrációt jelent.

A *S. pombe* sejteket folyékony YEL tápoldatba (0,5 % yeast extract, 3 % glükóz, pH 5) oltottam le és nem-szelektív körülmények között növesztettem 30°C-on logaritmusos kultúra esetén OD₆₀₀ = 0,75 állapotig, amely ~5×10⁶ sejt/ml koncentrációt jelent, stacioner kultúra esetén OD₆₀₀ = 3,5 állapotig, amely ~2×10⁸ sejt/ml koncentrációnak felel meg.

3. 1. 2. Élesztő kromoszómákat tartalmazó agaróz blokkok készítése

A *S. cerevisiae* sejteket centrifugálással összegyűjtöttem és kétszer mostam 50 mM EDTA-ban (pH 8), majd reszuszpendáltam 2 mg/ml Lyticase enzimet tartalmazó szferoplasztáló oldatban (0,9 M szorbit, 0,125 M EDTA, 100 mM dithiothreitol (DTT)). A sejszuszpenziót összekevertem azonos térfogatú 1,5 %-os alacsony olvadáspontú (LMP) agarózzal, amelyet 0,9 M szorbit / 0,125 M EDTA-ban oldottam fel 80°C-on. A mintákat 80 µl-ként formába öntöttem és 4°C-on 5 percig dermedni hagytam. Az így kapott agaróz blokkokat 0,9 M szorbit / 0,125 M EDTA-ban 37°C-on 6 órán keresztül inkubáltam. Minden minta ~3×10⁸ sejtet tartalmazott.

A *S. pombe* sejteket centrifugálással összegyűjtöttem és kétszer mostam 50 mM EDTA-ban (pH 8), majd reszuszpendáltam 15 mg/ml Lysing enzimet tartalmazó CPES oldatban (25 mM citromsav, 0,12 M Na₂HPO₄, 20 mM EDTA, 1,2 M szorbitol). A sejszuszpenziót összekevertem azonos térfogatú 1,5 %-os alacsony olvadáspontú (LMP) agarózzal, amelyet CPES oldatban oldottam fel. A mintákat 80 µl-ként formába öntöttem és

4°C-on 5 percig dermedni hagytam. Az így kapott agaróz blokkokat CPES oldatban 37°C-on 6 órán keresztül inkubáltam. Minden minta $\sim 1,5 \times 10^7$ sejtet tartalmazott.

Mind a *S. cerevisiae*, mind az *S. pombe* szferoplasztokat tartalmazó agaróz blokkokat 54°C-on 2 napig emésztettem lízis oldatban, amely 0,5 mg/ml proteináz K-t, 0,5 M EDTA-t (pH 8), 10 mM Tris-HCl-t és 1 % SDS-t tartalmazott, majd háromszor mostam TE-vel (10 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, pH8). Az így kapott intakt DNS-t tartalmazó agaróz blokkokat izopropanolban feloldott 0,75 mM fenil-metil-szulfonil-fluoriddal (PMSF) kezeltem 37°C-on 10 percig, azért, hogy inaktiváljam a reziduális proteáz aktivitást, majd háromszor mostam TE-vel és TE-ben tároltam 4°C-on.

3. 1. 3. *S. cerevisiae* sejtek szinkronizálása a sejtciklus különböző fázisaiban

Szinkronizálás G₁ fázisban: A sejteket OD = 1-ig növesztettem YPD tápoldatban, majd α -faktort (Sigma) adtam a tápoldathoz 20 μ g/ml végkoncentrációban. A szinkronizálást mikroszkóp segítségével ellenőriztem.

Szinkronizálás S fázisban: A sejteket OD = 1-ig növesztettem YPD tápoldatban, majd 200 mM hidroxüreát (Sigma) adtam a tápoldathoz és 1,5 órán keresztül inkubáltam.

Szinkronizálás G₂/M fázisban: A sejteket OD = 1-ig növesztettem YPD tápoldatban, majd nokodazolt (Sigma) adtam a tápoldathoz 20 μ g/ml végkoncentrációban és 1,5 órán keresztül inkubáltam.

A szinkronizálások eredményét áramlási citométer segítségével ellenőriztem.

3. 1. 4. Élesztősejtek előkészítése áramlási citometriás analízisre

Az élesztősejteket összegyűjtöttem és reszuszpendáltam azonos térfogatú 70 %-os etanolban, majd összegyűjtöttem a sejteket centrifugálással. A pelletet kétszer mostam 50 mM Tris-HCl-lel (pH 7,8), majd 100 μ g/ml RNáz-zal (Sigma) emésztettem 37°C-on 2 óráig. A sejteket centrifugálással összegyűjtöttem és reszuszpendáltam FACS pufferben (200 mM Tris-HCl (pH 7,5), 200 mM NaCl, 78 mM MgCl₂), amely 30 μ g/ml propidium jodidot (Sigma) tartalmazott. A mintákat azonnal analizáltam vagy néhány napig 4°C-on tároltam. A vizsgálat előtt 10 s-ig szonikáltam a mintákat.

3. 1. 5. *S. cerevisiae* kultúrák életképességének vizsgálata

Az *S. cerevisiae* sejtek életképességének meghatározásához a kolónia-képzési tesztet használtam, melynek során azt a ténytet használtam ki, hogy az életképes sejtek szilárd táptalajon telepet formálnak. A sejtek számát Bürker-kamra segítségével határoztam meg és 100 – 100 sejt / Petri-csésze koncentrációban szélesztettem ki YPDA táptalajra (YPD tápoldat, 2% agar) logaritmusos, illetve stacioner növekedési fázisban lévő kultúrákból, majd 3 napig inkubáltam 30°C-on. Az életképes kolóniák számát öt párhuzamos kísérlet átlaga alapján számítottam.

3. 1. 6. Agaróz blokkok enzim kezelése

S₁ nukleáz emésztés: A blokkokat 3×20 percig mostam S₁ pufferben (0,2 M NaCl, 50 mM Na-acetát, 1 mM ZnSO₄, 0,5 % glicerol) és 1,5 óráig emésztettem 500 U/ml S₁ nukleázzal (Promega Biosciences Inc.) S₁ pufferben 37°C-on.

DNS polimeráz I kezelés: A blokkokat mostam 1×polimeráz pufferben (50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT) 3×20 percig, majd 1,5 óráig kezeltem 150 U/ml DNS polimeráz I enzimmal (Fermentas Life Sciences Inc.), 37°C-on, 1×polimeráz pufferben kiegészítve 2,5 μM dATP / dCTP / ddGTP / biotin-dUTP-vel vagy 2,5 μM dATP / dGTP / ddCTP / biotin-dUTP-vel, ill. 2,5 μM dCTP / dGTP / ddATP / biotin-dUTP-vel.

Sfi I emésztés: A blokkokat 1× G pufferben (10mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 0,1 mg/ml BSA) mostam, majd 150 U/ml *Sfi* I restrikciós endonukleázzal (Fermentas) emésztettem 16 órán át, 50°C-on.

Sma I emésztés: A blokkokat 1× Tango pufferben (33mM Tris-acetát (pH 7,9),10 mM Mg-acetát, 66 mM K-acetát, 0,1 mg/ml BSA) mostam, majd 150 U/ml *Sma* I restrikciós endonukleázzal (Fermentas) emésztettem 16 órán át, 30°C-on.

Pvu II emésztés: A blokkokat 1× G pufferben mostam, majd 150 U/ml *Pvu* II restrikciós endonukleázzal (Fermentas) emésztettem 16 órán át, 37°C-on.

3. 1. 7. Tér-inverziós gélelektroforézis (*field inversion gelelectrophoresis, FIGE*)

A FIGE módszerét használtam az agarózba ágyazott kromoszómális DNS vizsgálatára, amelyhez MJ Research PPI 200 invertert alkalmaztam. Munkámban főleg az 5-ös programot használtam, mely az 50 – 400 kb mérettartományban biztosít megfelelő feloldást, ill. a 9-es programot, mely nagyobb molekulaméretű feloldást (2000 kb-ig) tesz lehetővé. A futtatás minden esetben hidegszobában, általában 5 V/cm erőterben zajlott.

Neutrális FIGE: A futtatásokat 1×TAE pufferben (40 mM Tris-acetát, 1 mM EDTA), 1 % agarózgélben végeztem. A futtást követően a géleket 0,5 µg/ml etidium-bromiddal festettem meg.

Urea/hő denaturáló FIGE: Az élesztőkromatint tartalmazó blokkokat 8M ureát tartalmazó TE pufferben áztattam 1 órán át szobahőmérsékleten, majd a blokkokat további kezelés nélkül, ill. 80°C-on 5 percig történő hő-denaturálás után vittem fel a géltre. A futtatásokat 1×TAE pufferben elkészített 1 % agarózgélben végeztem, amely 1 M ureát tartalmazott, amelyet az agaróz feloldása után, a gél 60°C-ra történő hűlése után adtam az elegyhez. Elektroforetikus pufferként 1×TAE puffert használtam, amely szintén 1 M ureát tartalmazott. Az ureát tartalmazó oldatokat minden esetben frissen készítettem. A futtatást követően a géleket 0,5 µg/ml etidium-bromiddal festettem meg.

Alkalikus FIGE: Az alkalikus futtatásokat 0,8 %-os agaróz gélben végeztem 1×alkalikus agaróz gélelektroforézis pufferben (50 mM NaOH, 1 mM EDTA). A futtatás után a géleket neutralizáló pufferben (1 M Tris-HCl (pH 7,6), 1,5 M NaCl) 2 órán át, szobahőmérsékleten neutralizáltam, majd SybrGold-dal festettem 30 percig a gyártó ajánlása szerint.

3. 1. 8. Pulzálatott-mezejű gélelektroforézis (*Contour-clamped homogeneous electric field, CHEF*)

A kromoszómális DNS molekulák szétválasztására CHEF-DR III PFGE rendszert (BioRad) használtam. A gélelektroforézist 0,5×TBE pufferben (45 mM Tris-borát, 1 mM EDTA, pH 8,3) 14°C-on végeztem. A mintákat minden esetben 1 %-os agarózgélben futtattam, 0,5×TBE pufferben.

S. cerevisiae minták esetében a futtatás körülményei a következők voltak:

	<u>220-2200 kb</u>	<u>400 kb-ig</u>
Inicial switch time	: 60 s	1 s
Final switch time	: 90 s	25 s
Run Time	: 24 h	24 h
Angle	: 120°	120°
Voltage gradient	: 6 V/cm	6 V/cm

A *S. pombe* kromoszómák szeparációjához a következő programot (A+B) használtam:

	<u>Program A</u>	<u>Program B</u>
Inicial switch time	: 5,4 E s	100 s
Final switch time	: 5,4 E s	4,7 E s
Run Time	: 70 h	50 h
Angle	: 120°	120°
Voltage gradient	: 1,2 V/cm	1,2 V/cm

3. 1. 9. Kétdimenziós gélelektroforézis

Az élesztő kromoszómákat először CHEF-DR III PFGE rendszerrel szeparáltam el egymástól az első dimenzióban, majd a kromoszómákat tartalmazó gél darabot 500 U/ml S1 nukleázzal kezeltem, ill. az egyes kromoszómákat külön választva hővel denaturáltam 8 M urea jelenlétében 80°C-on 5 percig. A kezeléseket követően a mintákat egy második dimenzióban futtattam tovább, FIGE-t használva. A CHEF és FIGE körülményei a fent leírtakkal azonosak voltak.

3. 1. 10. Southern-blot

Hagyományos és urea-agaróz géleket Hybond-N⁺ nylon membránra (Amersham Pharmacia Biotech) blottoltuk át BIO-RAD vacuum blotter segítségével. A membránokat 30 percig 80°C-on szárítottuk, majd UV-keresztkötöttük ($1,2 \times 10^5 \mu\text{J}/\text{cm}^2$). A blottolt, denaturált DNS-t prehibridizáltuk 3 órán át 55°C-on 30 ml prehibridizációs oldatban (1 % BSA, 0.5 M Na₂HPO₄, 7 % SDS, 1 mM EDTA, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ hering sperma DNS), és 15 órán át hibridizáltuk az rDNS gén klaszterre specifikus szondákkal. Az 1405 bp-os ds PCR terméket használtuk templátként a további szondák preparálásához. A ³²P jelölést vagy random primer jelöléssel (ds szonda; RediPrime Kit, Amersham) vagy egyszál-specifikus szonda preparálásához „lineáris amplifikációval” (egy primert használva) végeztük: A p1F primert alkalmaztuk a szensz szál-specifikus és p1R primert az antiszensz szál-specifikus szonda preparálásához. A PCR reakciókat 2.5 U Taq polimeráz enzimmal, 1xreakció pufferben (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 0.08 % N P-40, pH 8.8) hajtottuk végre, kiegészítve 3 mM MgCl₂-dal, 50 ng templát DNS-sel, 20 pmol primerrel, 5 μM dATP / dTTP / dGTP-vel, valamint 5 μl [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP (6000 Ci/mmol, 10 mCi/ml; Institute of Isotopes LTD, Hungary).

Neve	Primer típusa	Primer szekvenciája	Templát
p1F	<i>forward</i>	5' – GGG GAT CGA AGA TGA TCA GA – 3'	<i>S. cerevisiae</i> rDNS
p2F	<i>forward</i>	5' – CAA ACT CCC CAC CTG ACA AT – 3'	
p3F	<i>forward</i>	5' – TTT ACT TCG CCA ACC ATT CC – 3'	
p4F	<i>forward</i>	5' – TCG CCG AGA AAA ACT TCA AT – 3'	
p5F	<i>forward</i>	5' – CTT GGA TGT GGT AGC CGT TT – 3'	
p1R	<i>reverse</i>	5' – GAA AAG GCC AGC AAT TTC AA – 3'	

A következő PCR termékeket kaptuk:

Primerek		Amplikon hossza
p1F	p1R	1405 bp
p2F		4182 bp
p3F		5664 bp
p4F		7326 bp
p5F		8573 bp

Az amplifikációt a következő paraméterek szerint végeztük:

1 ciklus	94°C	3 perc
	60°C	1,5 perc
	72°C	1,5 perc
45 ciklus	94°C	50 s
	60°C	50 s
	72°C	1,5 perc
1 ciklus	72°C	10 perc

A szondák tisztítását Sephadex G-25 oszlopon végeztük (Amersham). A hibridizáció után a membránokat háromszor mostuk 60 °C-on mosó folyadékkal (40 mM Na₂HPO₄, 1 % SDS, 1 mM EDTA). A jelet BIO-RAD Phospho-Imager segítségével detektáltuk.

3. 1. 11. „Ab-Southern”

Nick-ek kimutatására: A *S. cerevisiae* kromatint tartalmazó blokkokba nick translációval biotin-dUTP-t építettem be, majd *Pvu* II restrikciós endonukleázzal emésztettem. Ezt követően az urea/hő-denaturált és denaturálatlan mintákat urea-agaróz gélen megfuttattam, majd a mintákat Hybond-N⁺ nylon membránra blottoltam. A membránt hibridizációs oldatban (5 % tejpor, 0,2 % Tween-20 / PBS) prehibridizáltam 1 órán át, szobahőmérsékleten, majd egér anti-biotin antitesttel (Sigma) jelöltem 1:1000 hígításban, hibridizációs oldatban, 16 órán át 4°C-on. A membránt 5×5 percig mostam 0,2 % Tween-20 / PBS-ben, majd torna-peroxidázzal konjugált kecske anti-egér IgG poliklonális antitesttel

jelöltem, 1:2000 hígításban, 1,5 órát szobahőmérsékleten. A detektálást kemiluminescens filmmel (Amersham) végeztem.

RNS/DNS hibrid kimutatására: A restriktív endonukleázokkal emésztett, majd agaróz gélelektroforézissal megfuttatott mintákat Hybond-N⁺ nylon membránra blottoltam. A membránt 1 órán át tartó prehibridizációját követően 1,5 µg/ml egér anti-RNS/DNS hibrid antitesttel (S9.6 antitest) jelöltem hibridizációs oldatban, 16 órán át 4°C-on. A membránt 5×5 percig mostam 0,2 % Tween-20 / PBS-ben, majd torna-peroxidázzal konjugált kecske anti-egér IgG poliklonális antitesttel jelöltem, 1:2000 hígításban, 1,5 órát szobahőmérsékleten. A detektálást kemiluminescens filmmel (Amersham) végeztem.

3. 2. Áramálsi citometriás vizsgálatok

3. 2. 1. PCR körülményei

A PCR reakciót 50 µl reakció pufferben végeztem (10 mM Tris –HCL, 50 mM KCl, 0,08 % Nonidet P-40, pH 8,8), amely 200 ng templát DNS-t, 20-20 pmol szensz, ill. antiszensz primert, 2,5 mM 4dNTP-t, 1,5 mM MgCl₂-t és 2,5 U Taq polimeráz enzimet (Fermentas Life Science) tartalmazott. Templátként a humán Mixed Lineage Leukemia (MLL) gén töréspont cluster régióját (bcr) tartalmazó pMEP4 plazmidot használtam. Az általam használt primereket (Integrated DNA Technologies) a következő táblázatban listázom:

pleft	<i>sense</i>	5' – CTC TGA ATC TCC CGC AAT GT – 3'
pleft-FITC	<i>sense</i>	5' – (FITC)- CTC TGA ATC TCC CGC AAT GT – 3'
pleft-6FAM	<i>sense</i>	5' – (6FAM)- CTC TGA ATC TCC CGC AAT GT – 3'
p3.2	<i>sense</i>	5' – GTG TAT TGC CAA GTC TGT TGT GAG – 3'
p3.2-Cy3	<i>sense</i>	5' – (Cy3)-GTG TAT TGC CAA GTC TGT TGT GAG – 3'
p4.2	<i>antisense</i>	5' – TCT GCC TCC AAA GTT CAA GCG ATT – 3'
p4.2-biotin	<i>antisense</i>	5' – (biotin)-TCT GCC TCC AAA GTT CAA GCG ATT – 3'

Az amplifikációt a következő paraméterek szerint végeztem:

1 ciklus	94°C	3 perc
35 ciklus	94°C	50 mp
	61/62°C 72°C	2 perc 1,5 perc
1 ciklus	72°C	10 perc

Az amplifikációt követően kétféle méretű terméket kaptam: egy hosszabb 725 bp-os terméket (pleft – p4.2) és egy rövidebb 541 bp-os terméket (p3.2 – p4.2)

A keletkezett termékeket QIAquick PCR Purification Kit-tel (Qiagen, Valencia, CA, USA) tisztítottam, 50 µl steril TE pufferben vettem fel és 1% -os, etidium bromid festett agaróz gélen ellenőriztem 1×TAE pufferben futtatva.

3. 2. 2. PCR termékek hibridizálása

A 6FAM-, Cy3-jelölt, ill. jelöletlen PCR termékeket összekevertem azonos mennyiségű biotin-jelölt PCR termékkel TE pufferben, amely 1M NaCl-ot tartalmazott. A mintákat 95°C-on 5 percig denaturáltam, majd szobahőmérsékleten 2 óráig reanneáltam. Az ennek során kialakult dupla-szálú molekulák konformációját DINAMelt programmal (<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/hybrid>) jósoltattam meg.

3. 2. 3. Egyszálú DNS régiók hasítása

Enzimatis hasítás S₁ nukleázzal: 100 ng PCR terméket emésztettem 0.00001 – 1 U S₁ nukleázzal (Promega Life Science, Madison, USA) 50 µl 1×S₁ pufferben (50 mM Na-acetát (pH 4,5), 280 mM NaCl, 4.5 mM ZnSO₄) 20°C-on 40 percig, sötétben. A reakciót 125 µl 100 mM-os EDTA-val állítottam le. A DNS-t precipitáltam 125 µl 0,3 M-os Na-acetát és 750 µl abszolút etanol hozzáadásával és -20°C-on tartottam 2 óráig. Centrifugálás után (15000rpm, 10 perc, 4°C) a DNS-t 50 µl PBS-ben (pH 7,4) oldottam fel.

Kémiai hasítás hidroxilamin / piperidin kezeléssel: 2 µl TE-ben feloldott 100 ng PCR termékhez különböző mennyiségű 0,5 M-os hidroxilamint adtam, melyet 100 µl végtérfogatra egészítettem ki PBS-sel (pH 6,0). A 0,5 M-os hidroxilamin törzsoldatot 2 M-os tetraetilammónium-klorid oldatban preparáltam (pH 6,0; dietilaminnal beállítva). A reakciót 125 µl 100 mM-os EDTA-val állítottam le. A DNS-t precipitálás után 50 µl steril dH₂O-ban vettem fel és azonos térfogatú 1%-os piperidinnel összekeverve 90°C-on 30 percig inkubáltam, sötétben. Végül a DNS-t precipitáltam és 50 µl PBS-ben vettem fel.

3. 2. 4. Nick-ek létrehozása és detektálása PCR termékeken

2 µg jelöletlen, vagy néhány kísérletben FITC jelölt PCR terméket emésztettem 10 U *Xba* I restrikciós enzimmel (Promega Life Science, Madison, USA) 50 µl D pufferben (6 mM Tris-HCl, 6 mM MgCl₂, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, pH 7,9). Azonos mennyiségű *Xba* I emésztett (FITC-jelölt vagy jelöletlen) és biotin-jelölt, emésztetlen PCR terméket összekevertem olyan TE pufferben, amely 1M NaCl-ot is tartalmazott. A mintákat 95°C-on 5 percig denaturáltam, majd szobahőmérsékleten 2 óráig inkubáltam. A keletkezett hibridek 1 µg-ját 10 U *E. coli* DNS polimeráz I holoenzimmel (Fermentas Life Science, Maryland, USA) kezeltem 25 µl 1×polimeráz pufferben (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT), amely végkoncentrációban 40 – 40 µM dATP-t, dCTP-t, dGTP-t, valamint 2 µM dTTP-t és 40 µM fluoreszcein – 12 – dUTP-t tartalmazott, 16°C-on 2 óráig.

3. 2. 5. PCR termékek mikrogyöngyökre kötése és áramlási citometriás analízise

10000 streptavidinált polimer mikrogyöngyöt (Polyscience Inc., Warrington, PA, USA; átmérő: 6 µm) adtam 50 µl DNS oldathoz (PBS-ben oldva) és szobahőmérsékleten 40 percig inkubáltam sötétben. A mikrogyöngyöket kétszer mostam 500 µl PBS-ben, majd reszuszpendáltam 500 µl PBS-ben. A fluoreszcens festékekkel jelölt primer-tartalmú PCR termékeket hordozó mikrogyöngyöket Becton-Dickinson FACSan áramlási citométeren (Mountain View, CA, USA) mértem. A fluoreszcens jeleket a műszer 530/30 és 585/42 interferencia szűrőjén keresztül detektáltam, melyeket FL1, ill. FL2 csatornának nevezünk. Az alkalmazott lézer teljesítménye 15 mW volt. Az összegyűjtött adatokat BDIS Cell Quest 3.3 szoftverrel elemeztem. Az átlagos fluoreszcencia intenzitást legalább 3 független mérés alapján határoztam meg. Az egyes minták átlagos fluoreszcencia intenzitását kétoldali t-teszt segítségével hasonlítottam össze, miután F-teszttel ellenőriztem, hogy a vizsgált minták varianciája között nincs szignifikáns eltérés. Az ábrákon a <0,05 szignifikancia szintet *, a <0,01 szignifikancia szintet ** és a <0,001 szignifikancia szintet *** jelzi.

4. Eredmények

Az általánosan elfogadott elképzelés szerint normál, életképes sejtekben minden egyes kromoszómát egyetlen, folytonos, hosszú ds DNS molekula épít fel, a hozzá kapcsolódó fehérjékkel együtt. Ennek ellenére, az izolálás során a DNS-en hurok méretű fragmenteket generáló duplaszálú folytonossághiányok jelentkeznek. Hasonló méretű fragmentációt tapasztalhatunk apoptotikus sejtek esetében is. Eredményeim első felében, egészséges, nem apoptotikus élesztősejtek hurok-méretű fragmentációs jelenségeit, ill. az azok háttérben valószínűsíthető egyszálú folytonossághiányok jelenlétét, szerepét vizsgálom. A fejezet második felében pedig folytonossághiányok és génátrendeződések detektálására alkalmas gélelektroforetikus, ill. áramlási citometriás módszerek fejlesztésére irányuló törekvéseim eredményeit mutatom be.

4. 1. Hurok-méretű fragmentáció vizsgálata élesztő sejtekben

Kísérleteimhez *S. cerevisiae* sarjadóélesztő és *S. pombe* hasadóélesztő egy-egy törzsét használtam. Az általam használt törzsekre (*S. cerevisiae*: WDHY 199 és *S. pombe*: L972 h-) általánosan jellemző, hogy haploidok, heterotallikusak és csak auxotróf mutációkat hordoznak.

A kísérletek során a jelenségkörre vonatkozó korábbi következtetések helyességének ellenőrzése is céлом volt. Ezért a hurok-méretű fragmentációs jelenségeket – a részletesen ebből a szempontból először általam vizsgált élesztő rendszeren - az alapvető alternatívák, esetleges artefaktumok szempontjából is újrvizsgáltam és újragondoltam. A kísérletek tervezésénél tehát a Bevezetésben ismertetett közvetlen előzmények premisszáira minél kevésbé igyekeztem támaszkodni.

4. 1. 1. Élesztő sejtek életképességének vizsgálata

Kolónia-képzési teszttel ellenőriztem logaritmikus és stacioner növekedési fázisból származó élesztő sejtek életképességét. A logaritmikus és stacioner fázist OD alapján határoztam meg. Mind logaritmikus, mind stacioner fázisból származó sejtek esetében azt tapasztaltam, hogy a sejtek közel 100 %-a egészséges telepet hozott létre. Az általam detektált

~100 %-os életképesség azt támasztja alá, hogy valóban normál, egészséges és nem apoptotikus sejtekkel végeztem további kísérleteimet.

4. 1. 2. Folytonossághiányok detektálása élesztő genomi DNS-ben enzimátikus és denaturáló kezelésekkel

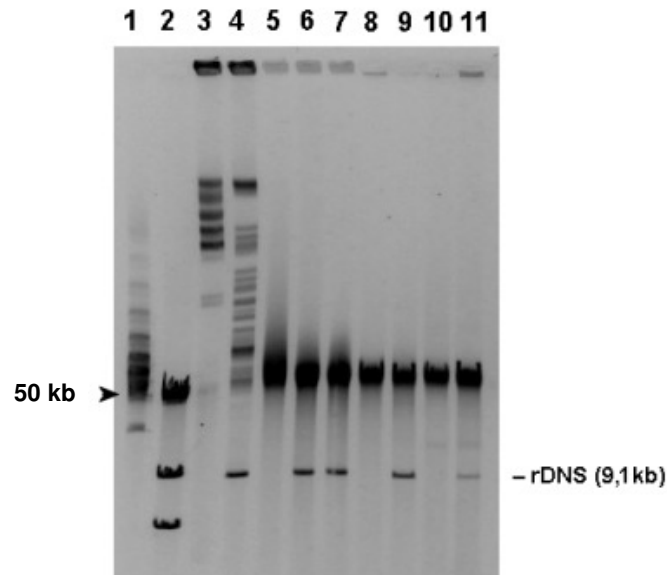
Amikor *S. cerevisiae* élesztő sejtekből, a sejtfal eltávolítása után genomi DNS-t izoláltam, a DNS fragmentációját figyeltem meg. A fragmentumok mérete 50 kb körül fókuszálódott (1. ábra, 9. minta). Amennyiben a sejteket alacsony olvadáspontú (LMP) agaróz-blokkokba ágyaztam, és a blokkokat vettem alá proteolízisnek, a fenti fragmentáció nem jött létre (1. ábra, 3. minta⁷). A fragmentumok fókuszáltnál 50 kb körül helyezkedtek el - a DNS random törése esetén azt várnánk, hogy a fragmentumok mérete fókuszálatlan, egy felső határtól a kisebb mérettartományok felé elkenődött eloszlást mutasson.

A fragment méreteloszlás jellege predilekciós helyek létezésére utal. Ilyenek lehetnek a DNS duplaszálaban előforduló egyszálú folytonossághiányok, melyeknél a szuperhelikális DNS-ben deproteinizálás kapcsán felszabaduló torziós erők hatására dupla-szálú törések alakulhatnak ki. Az ekkor feltételezhető egyszálú DNS törések kimutatására denaturáló és enzimátikus kezeléseket alkalmaztam, melyeket gélelektroforetikus módszerekkel kombináltam.

Agaróz blokkokba ágyazott, deproteinizált *S. cerevisiae* kromatin S₁ nukleázzal történő emésztése a kromatin fragmentációját idézte elő, munkacsoportunk ezen élesztő egy másik törzsére korlátozódó korábbi eredményeivel (68) összhangban (1. ábra, 5. minta). Hasonló eredményre jutottam *S. pombe* élesztősejtek esetében is. A fragmentumok mérete ebben az esetben is ~50 kb körül fókuszálódott (6. ábra, 4. minta). Ez alapján elmondható,

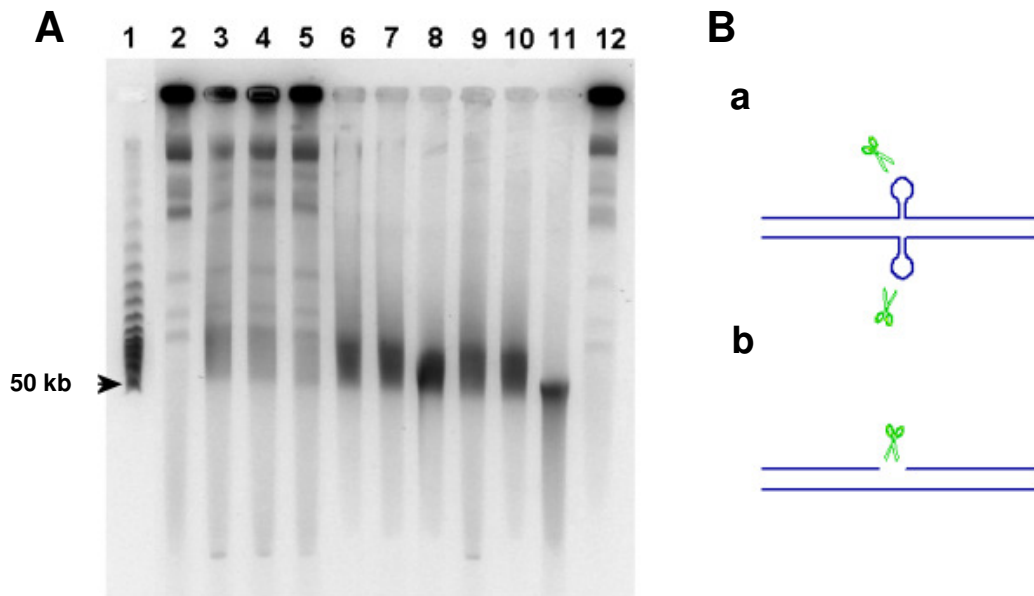
⁷ A kromoszóma méretű DNS-ek FIGE gélen történő szeparációjukkor is látunk halványan jelölődő, 50 kb körül elkenődött DNS-t, mely valószínűleg a mitokondriális DNS-t tartalmazza (1. ábra 3. minta). Vad típusú *S. cerevisiae* mitokondriális genom (mtDNS) mérete ~80 kb. Bendich és mts. kimutatták, hogy a cirkuláris mtDNS nagy része belép a PFGE gélbe és ott lineáris DNS markerhez viszonyítva 50 – 100 kb között elkenődött megjelenést mutat. Az 50 – 100 kb közötti elkenődés hiányzott abban az esetben, amikor PFGE-vel rho⁰ petite mutánsokat vizsgáltak, melyek nem tartalmaztak mtDNS-t. A vad típusú sejtekben a cirkuláris mtDNS előfordulása függ a sejt kultúra növekedési fázisától: stationer fázisnál nem vagy csak csökkent mennyiségben találtak mitokondriális gyűrűket. *S. pombe* mtDNS-e szintén belép a gélbe és ott szintén az 50 – 100 kb régióban fut lineáris markerekkel összehasonlítva, bár cirkuláris mitokondriális genom mérete jóval kisebb, 19, 4 kb (42)

hogyan az intakt DNS-ben átlagosan 50 kb-ként S₁-érzékeny helyek találhatóak mindkét élesztőfaj esetében.



1. ábra: *S. cerevisiae* agarózba ágyazott, ill. izolált genomi DNS-ének FIGE analízise. **1.** Midrange marker; **2.** λ DNS *Hind* III fragmentjei; **3.** agarózba ágyazott genomi DNS, **4.** agarózba ágyazott genomi DNS *Sfi* I fragmentjei; **5.** S₁ nukleáz emésztett genomi DNS agaróz blokkban; **6.** *Sfi* I és S₁ nukleáz emésztett genomi DNS agaróz blokkban; **7.** S₁ és *Sfi* I emésztett genomi DNS agaróz blokkban; **8.** S₁ emésztést követően DNS izolálás agaróz blokkból; **9.** S₁ emésztést követően izolált DNS *Sfi* I emésztése; **10.** izolált genomi DNS; **11.** izolált genomi DNS *Sfi* I emésztése. (A futtatást 5-ös programot használva, 1%-os agarózgélben, 1×TAE pufferben, 5 V/cm-es erőterben 18 órán keresztül, hidegszobában végeztük. A gélt EBr-dal festettük (lásd. Anyagok és módszerek).)

Az agarózba ágyazott, deproteinizált élesztő kromatint általában 500 U/ml S₁ nukleázzal emésztetem, amely a kromatin masszív fragmentációját idézte elő mindkét élesztőben. A ds DNS fragmentek 50 kb körül fókuszálódtak. Hasonló fragmentációt eredményez azonban az S₁ nukleáz viszonylag széles koncentráció tartományával történő kezelés is. Amennyiben az emésztéshez használt S₁ nukleáz koncentrációját tízszeresére (5000 U/ml) emeltem, a fragmentáció mértéke fokozódott, és a DNS aspecifikusnak tűnő darabolódása vette kezdetét. Ez valószínűleg azzal magyarázható, hogy az S₁ nukleáz nagy koncentrációban a ds DNS-t is képes hasítani (2. ábra). Az S₁ pufferben végzett inkubálás 24 óra elteltével sem vezetett fragmentációhoz, az elektroforetikus kép a kezeletlen DNS-ével volt azonos.



2. ábra: Agarózba ágyazott WDHY199 DNS FIGE analízise S1 nukleáz kezelést követően. **A.** Az agarózba ágyazott *S. cerevisiae* DNS-t különböző koncentrációjú S1 nukleáz kezelésnek vetettük alá. **1.** Pulse marker (50 – 1000 kb); **2.** S1 pufferben inkubált agaróz blokk; **3-11.** 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500, ill. 5000 U/ml S1 nukleáz kezelés; **12.** kezeletlen kontroll. (A futtatást 1%-os agarózgélben, 1×TAE pufferben, 4 V/cm-es erőterben, 5-ös programmal 4 órán, majd 9-es programmal 13 órán keresztül végeztük hidegszobában. A gélt EBr-dal festettük.) **B.** Az ssDNS-t preferenciálisan hasítja az S1 nukleáz a DNS-ben lévő másodlagos struktúráknál (a) a hosszabb-rövidebb folytonossághiányokkal szemben (b).

Annak eldöntésére, hogy a genomban folytonossághiányok vagy lokálisan denaturált régiók fordulnak-e elő, egy másik módszert, az urea/hő-denaturáló gélelektroforézist használtam. Ez a technika az urea dupla szál destabilizáló hatásán alapul. A blokkokat 8 M urea jelenlétében hőkezelésnek vettem alá, amelynek hatására a DNS denaturálódott. A hőkezelés hatására keletkező ss DNS renaturációja urea jelenlétében nem valósul meg. A hődenaturálás nélkül a DNS dupla szálú állapota ugyanakkor urea jelenlétében is megmarad⁸. A futtatást 1 M ureát tartalmazó agarózgélen végeztem. Ez az urea mennyiség elegendő volt a renaturáció megakadályozására, ill. az első lépésben nem denaturált minták dupla-szálúak maradtak. A módszer alkalmas egyszálú folytonossághiányok kimutatására az életképes eukarióta sejtekből származó agarózba ágyazott, deproteinizált kromatinban (68,98), és lehetőséget teremtett arra, hogy dupla és egyszálú DNS-t egyazon gélben, egy időben vizsgáljam.

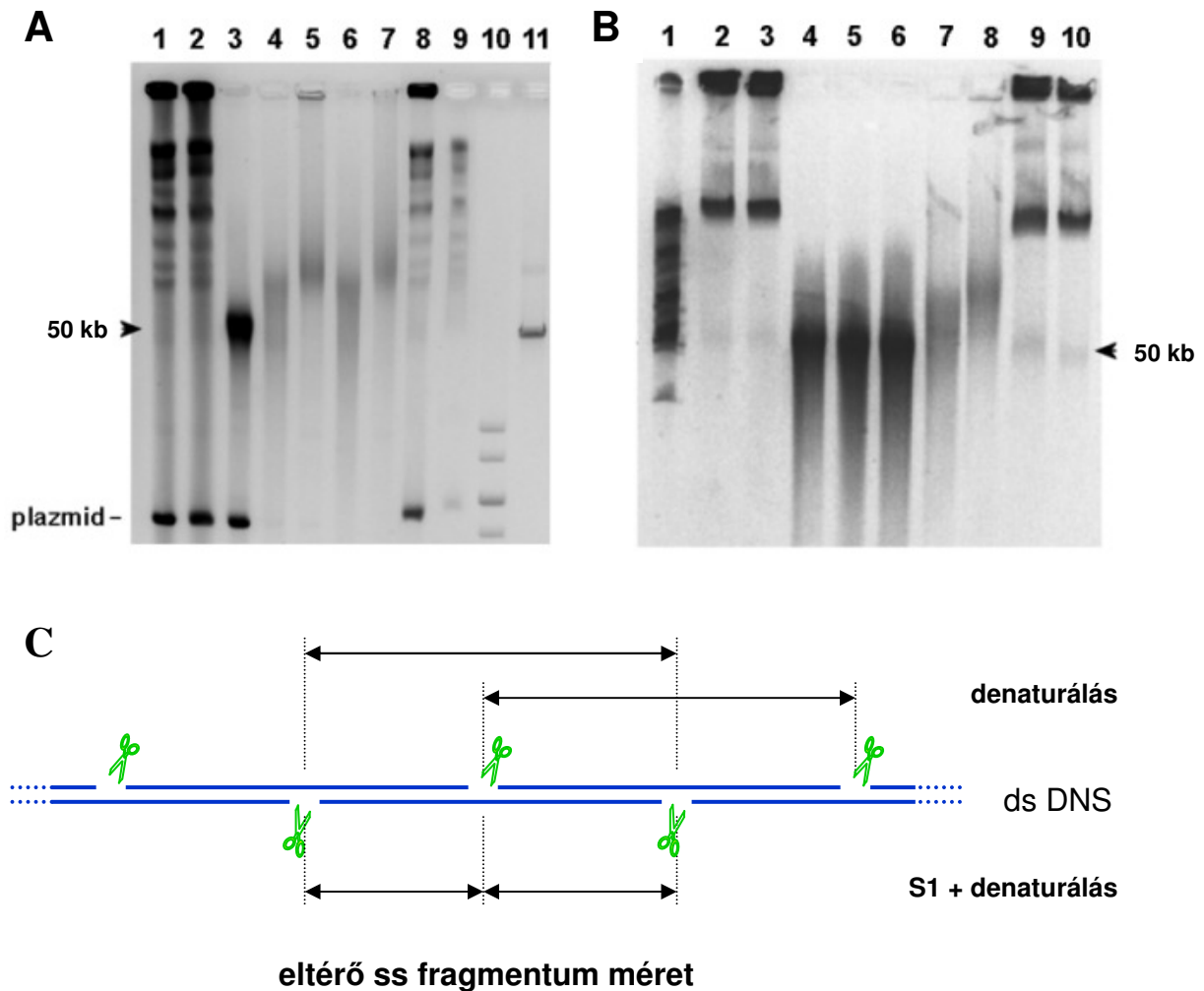
⁸ Ezt a tényt a Célkitűzések „B” részének keretében leírt gélelektroforetikus eljárás jellemzése során tapasztaltak is megerősítik.

Urea/hő-denaturálást követően az agarózba ágyazott, addig intakt, kromoszómális méretű ds molekulák kisebb, egyszálú fragmentekre való szétesését figyeltem meg mindkét élesztő esetében (3.A ábra 5. minta és 3.B ábra 8.minta). A hőkezelést 80°C-on végeztem öt percre vagy negyedóraig. A különböző időtartamú kezelések között nem tapasztaltam különbséget. Mivel a módszer érzéketlen a DNS-ben előforduló másodlagos struktúrákra, ezért valószínűsíthető a folytonossághiányok jelenléte a genomban. A 160 kb méretű T4 fág DNS-t alkalmazva egyszálú markerként (nem bemutatott adatok) bizonyítható volt, hogy az urea-denaturáció során kapott nagy molekulású DNS fragmentek átlagos ss mérete nagyjából 100-150 kb közé esik.

Az S1 nukleáz érzékeny területek és az urea/hő-denaturációval kimutatott folytonossághiányok egymáshoz viszonyított pozícióját vizsgáltam a következő kísérletben: az S1 nukleázzal kezelt mintát urea/hő-denaturáló gélelektroforézisnek vetettem alá, és az így kapott egyszálú fragmentumok méretét hasonlítottam össze az S1 nukleáz kezelést nem kapott urea/hő-denaturált minták méretével. A két minta gélelektroforetikus képe eltérő fragmentum méretet eredményezett (3.A ábra 4-5. minta; 3.B ábra 7-8. minta). Ez alapján azt gondolhattuk, hogy a DNS mindkét szálán előforduló egyszálú törések a két szálon alternálva, egymástól távol helyezkednek el (3.C ábra).

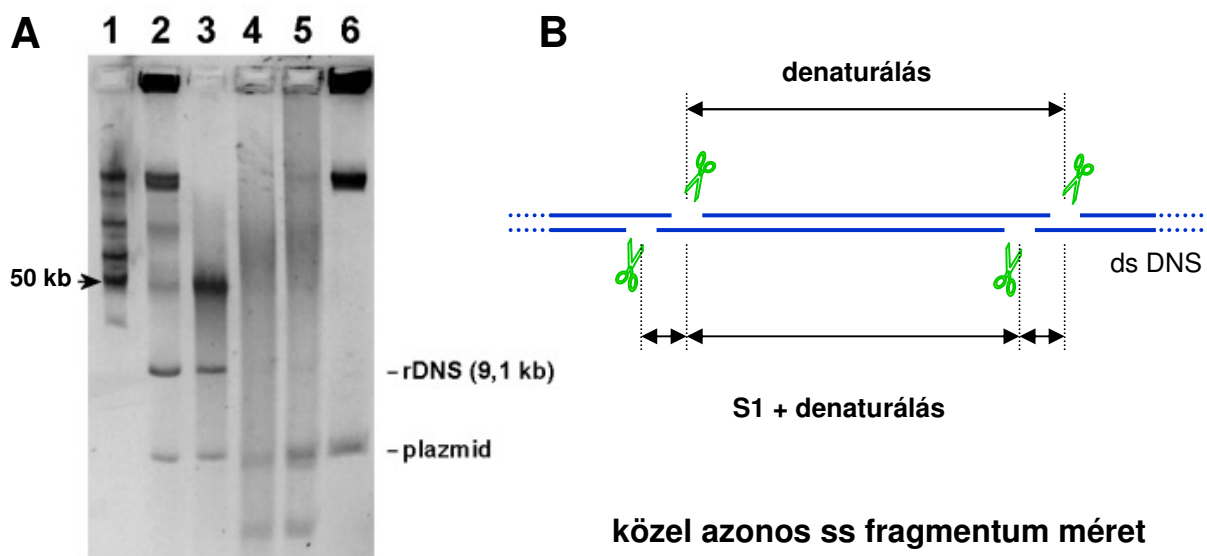
A DNS dupla hélix, a hőkezelés mellett, lúgos kezelésekkel is széttekerhető, és ilyenkor a parciális denaturáció lehetősége jóval kisebb (ugyanakkor a DNS másodlagos lánctörése alkali-labíl helyeken előfordulhat). Magas pH-n a timin és guanin maradékok elveszítenek egy protont, így nem alakulhat ki a H-híd az adenin ill. citozin partnerekkel. Az alkalikusan denaturált minták esetében az urea/hő-denaturáláshoz hasonló mintázatot figyeltem meg az S1 nukleáz kezelt és kezeletlen minták esetében (3.A ábra 6-7. minta).

Felmerül a kérdés, hogy az S1 nukleáz emésztett, majd denaturált, és az emésztetlen, denaturált minták közötti futási különbség valódi méret különbséget jelent-e, vagy az eltérést a két minta eltérő hosszúságú DNS duplaszállainak különböző denaturációs képessége okozza, hiszen az S1 nukleáz-emésztett minta esetében ~50 kb-os ds fragmentumokat, míg az S1 nukleáz kezelést nem kapott minta esetében kromoszómális méretű (220 – 2200 kb) dsDNS-nek kell vagy kellene széttekerednie a hődenaturáció során. Az eltérés tehát abból is fakadhat, hogy a hosszabb DNS molekula nehezebben tekeredik szét és az általunk használt urea/hő kondíciók mellett csupán parciális denaturáció valósult meg az S1 nukleáz kezelést nem kapott minták esetében.



3. ábra: S1 nukleáz-emésztett és denaturált minták FIGE analízise. Az agarózba ágyazott *S. cerevisiae* (A), ill. *S. pombe* (B) DNS-t S1 nukleázzal emésztettük, és/vagy denaturáltuk alkalikusán vagy urea jelenlétében hővel. **A.** 1. kezeletlen kontroll; 2. S1 pufferben inkubált blokk 3. S1 nukleázzal emésztett blokk; 4. S1 nukleázzal emésztett blokk urea/hő-denaturálása; 5. urea/hő-denaturált blokk; 6. alkalikusán denaturált blokk; 7. S1 nukleáz emésztett blokk alkalikus denaturálása; 8. urea-TE pufferben inkubált blokk; 9. Pulse marker (220-2200); 10. 1 kb-os marker; 11. λ DNS. **B.** 1. Midrange marker; 2. kezeletlen kontroll; 3. S1 pufferben inkubált blokk; 4. S1 nukleázzal emésztett blokk; 5. S1 nukleázzal emésztett blokk urea-TE pufferben történő inkubálást követően; 6. S1 nukleáz emésztést követően urea-TE pufferben inkubált blokk; 7. S1 nukleázzal emésztett blokk urea/hő-denaturálása; 8. urea/hő-denaturált blokk; 9. urea-TE pufferben inkubált blokk; 10. urea hiányában hődenaturált blokk. (A futtatást 1%-os urea-agarózgélben, urea-TAE pufferben, 4 V/cm-es erőterben, 5-ös programmal 5 órán át, majd 9-es programmal 12 órán át (A), ill. 5-ös programmal 16 órán át (B) hidegszobában végeztük. A gélt EBr-dal festettük.) **C.** Modell az egyszálú törések elhelyezkedésére a kromatinban. Az ábra adatai alapján az egyszálú törések a két szálon felváltva, egymástól távolabb helyezkedhetnek el, mely az S1 nukleáz emésztett és emésztetlen denaturált minták különböző fragmentum méretét eredményezheti. A DNS ds integritása megmaradhat a nick-ekkel szemben lévő folytonos komplementer szálak révén.

A teljesen, ill. parciálisan denaturálódott DNS fragmentumoktól azt várjuk, hogy eltérő sebességgel haladjanak a gélben. Ennek eldöntésére az agarózba ágyazott genomi DNS-t ritkán hasító restriktív enzimmel (*Sfi* I) emésztettem, majd ezt követően hasonlítottam össze az S1 kezelt és nem kezelt mintákat urea/hő-denaturálásukat követően. A 4. ábrán látható, hogy ebben az esetben az S1 nukleáz emésztett és nem emésztett minták hasonló ss migrációs mintázatot mutattak urea-agaróz gélen. Ez az eredmény arra utal, hogy a S1 nukleáz által kimutatott szenzitív területek és az urea/hő-denaturációval detektált ss folytonossághiányok a DNS két szálán mégis egymás közelében helyezkedhetnek el.



4. ábra: WDHY 199 blokkok FIGE analízise. **A.** Az élesztő DNS-t tartalmazó agaróz blokkokat ritkán hasító restriktív endonukleáz kezelésnek vetettük alá, majd S1 nukleáz kezelést, ill. urea/hő-denaturációt végeztünk. **1.** Midrange marker; **2.** *Sfi* I emésztett blokk; **3.** *Sfi* I emésztett blokk S1 emésztése; **4.** *Sfi* I emésztett blokk S1 emésztése és urea/hő-denaturálása; **5.** *Sfi* I emésztett blokk urea/hő-denaturálása; **6.** emésztetlen blokk. (A futtatást 5-ös programmal, 1%-os urea-agarózgélben, urea-TAE pufferben, 3 V/cm-es erőterben, hidegszobában végeztük 16 órán át. A gélt EBr-dal festettük.) **B.** Modell, az egyszálú törések elhelyezkedésére a kromatinban. Az egyszálú törések a kromatinban egymás közelében helyezkedhetnek el a két szálon, mely az S1 nukleáz emésztett és emésztetlen denaturált minták hasonló fragmentum méretét eredményezheti.

Elképzeltető, hogy a kapott eredmények az élesztő sejtek feltárása, deproteinizációja, DNS denaturációja, illetve a gélelektroforézise során fellépő mechanikai vagy enzimikus károsító ágensek hatásának tulajdoníthatók. A mechanikai nyíróerők szerepét a sejtek agarózba ágyazásával – a felolvasztás pillanatáig - jelentős mértékben csökkentettem. A DNS-t károsító enzimek két potenciális helyről származhatnak. Egyrészt, lehetnek a kísérlet

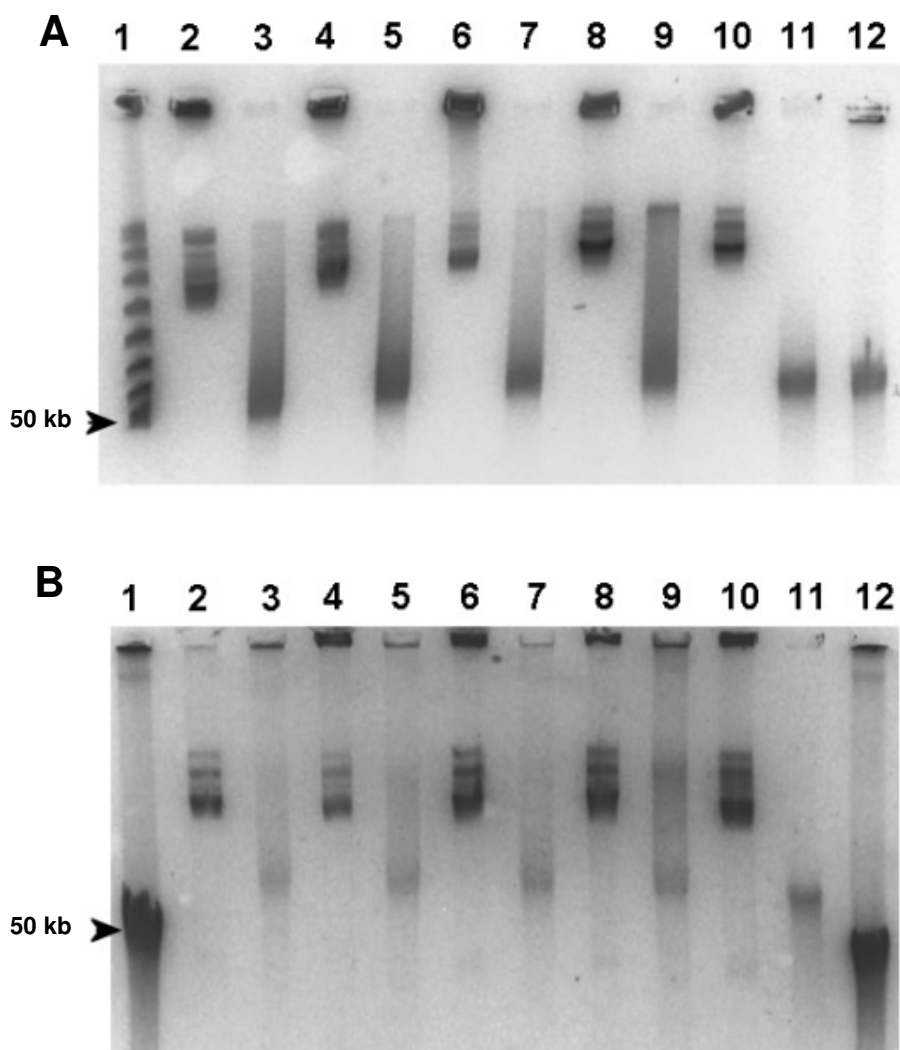
során kívülről szennyeződésként bekerült nukleázok; ezt a lehetőséget molekuláris biológiai minőségű anyagok használatával feltehetően kiküszöböltem. Másrészt lehetnek endogén nukleázok, amelyek szerepe szintén nem kizárható. Az élesztősejtek feltárását és deproteinizációját végig EDTA mellett végeztem. Az általam alkalmazott jelentős mennyiségű kelátor jelenlétében az endonukleázok szerepe szintén eléggé valószínűtlennek tűnik.

A mechanikai hatások szerepének ellenőrzéséhez a hődenaturálást urea jelenléte nélkül elvégeztem (3.B ábra 10. minta). A hőkezelést követően azonban nem tapasztaltam a DNS fragmentációját, azaz a hőkezelés, ill. az azt követő pipettázás (széles szájú pipettahegyet használva) önmagában nem okozza a DNS mechanikai törését. Ráadásul, az alkalikus denaturáció, mely nem igényli az agaróz blokkok felolvasztását, hasonló mintázatot mutatott, mint az urea/hő-denaturáció.

Munkám során megvizsgáltam az urea szerepét is a DNS fragmentáció jelenségében. Azt tapasztaltam, hogy az urea kezelés nem okozott sem egyszálú, sem dupla szálú törést a genomi DNS-ben, hiszen nem detektáltunk DNS fragmentációt urea-tartalmú pufferben való hosszabb inkubálás során sem, és nem fokozódott a fragmentáció mértéke abban az esetben sem, amikor az S1 nukleáz kezelést megelőzően, a mintákat urea-pufferben inkubáltam (3.B ábra 5-6. minta).

4. 1. 3. Hurok-méretű fragmentáció növekedési fázis- és sejtciklus-függése

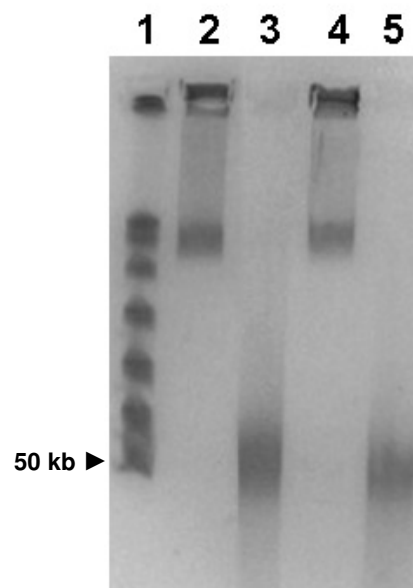
S. cerevisiae élesztő sejtek viszonylag könnyen szinkronizálhatóak a sejtciklus különböző pontjaiban, lehetőséget nyújtva arra, hogy megvizsgáljam a hurok-méretű



5. ábra: Különböző sejtciklus fázisban szinkronizált WDHY199 blokkok FIGE analízise. **A.** Az élesztő sejteket az Anyagok és Módszerekben leírt módon különböző fázisokban szinkronizáltuk, majd a sejteket agaróz blokkokba ágyazva feltártuk, deproteinizáltuk, végül a mintákat S1 nukleáz kezelésnek vetettük alá. **1.** Pulse marker (50-1000 kb); **2.** logaritmusos kultúrából készített blokk; **3.** logaritmusos kultúrából készített blokk S1 nukleáz emésztése; **4.** S-fázisú blokk; **5.** S-fázisú blokk S1 nukleáz emésztése; **6.** G1-fázisú blokk; **7.** G1-fázisú blokk S1 nukleáz emésztése; **8.** G2/M-fázisú blokk; **9.** G2/M-fázisú blokk S1 nukleáz emésztése; **10.** stacioner fázisú blokk; **11.** stacioner fázisú blokk S1 nukleáz emésztése; **12.** λ DNS. **B.** Különböző sejtciklus fázisban szinkronizált blokkok urea/hő-denaturálása. **1.** λ DNS; **2.** logaritmusos kultúrából készített blokk; **3.** logaritmusos kultúrából készített blokk urea/hő-denaturálása; **4.** S-fázisú blokk; **5.** S-fázisú blokk urea/hő-denaturálása; **6.** G1-fázisú blokk; **7.** G1-fázisú blokk urea/hő-denaturálása; **8.** G2/M-fázisú blokk; **9.** G2/M-fázisú blokk urea/hő-denaturálása; **10.** stacioner fázisú blokk; **11.** stacioner fázisú blokk urea/hő-denaturálása. (A futtatást 5-ös programmal, 1%-os agarózgélben, 1 \times TAE pufferben (A), ill. 1%-os urea-agarózgélben, urea-TAE pufferben (B), 5 V/cm-es erőterben, hidegszobában végeztük 16 órán át. A gélt EBr-dal festettük a futtatást követően.)

fragmentáció sejtciklus-függését. Munkám során a logaritmusos fázisú sejteket G1-, S-, ill. G2/M-fázisban szinkronizáltam. A szinkronizálás eredményét áramlási citométeren ellenőriztem. A különböző sejtciklus fázisú sejteket, szinkronizálatlan logaritmusos sejteket, valamint stacioner kultúrából származó DNS-t tartalmazó agaróz blokkokat emésztettem S1 nukleázzal. A kezelések eredménye minden esetben egységesen 50 kb körül fókuszálódó fragmentáció volt (5.A ábra). Hasonlóan egységes képet kaptam az urea/hő-denaturálásnak alávetett minták gélelektroforézise során is (5.B ábra). A hurok-méretű fragmentációban tehát nem tapasztaltam sejtciklus függést, ami arra utal, hogy valamilyen, a sejtcikluson átívelő strukturális jelenségről van szó. (Egyedül a stacioner kultúra esetében figyeltem meg változást: a fragmentáció komplettebbnek tűnt mind az S1, mind az urea/hő-kezelés után. Ennek okait még nem vizsgáltam, mert a *S. pombe* esetén a stacioner kultúrák nem mutattak eltérést a logaritmusos fázis sejtjeihez képest.)

S. pombe esetében szintén nem tapasztaltam különbséget a logaritmusos és stacioner fázisú sejtek hurok-méretű fragmentációjában (6. ábra).

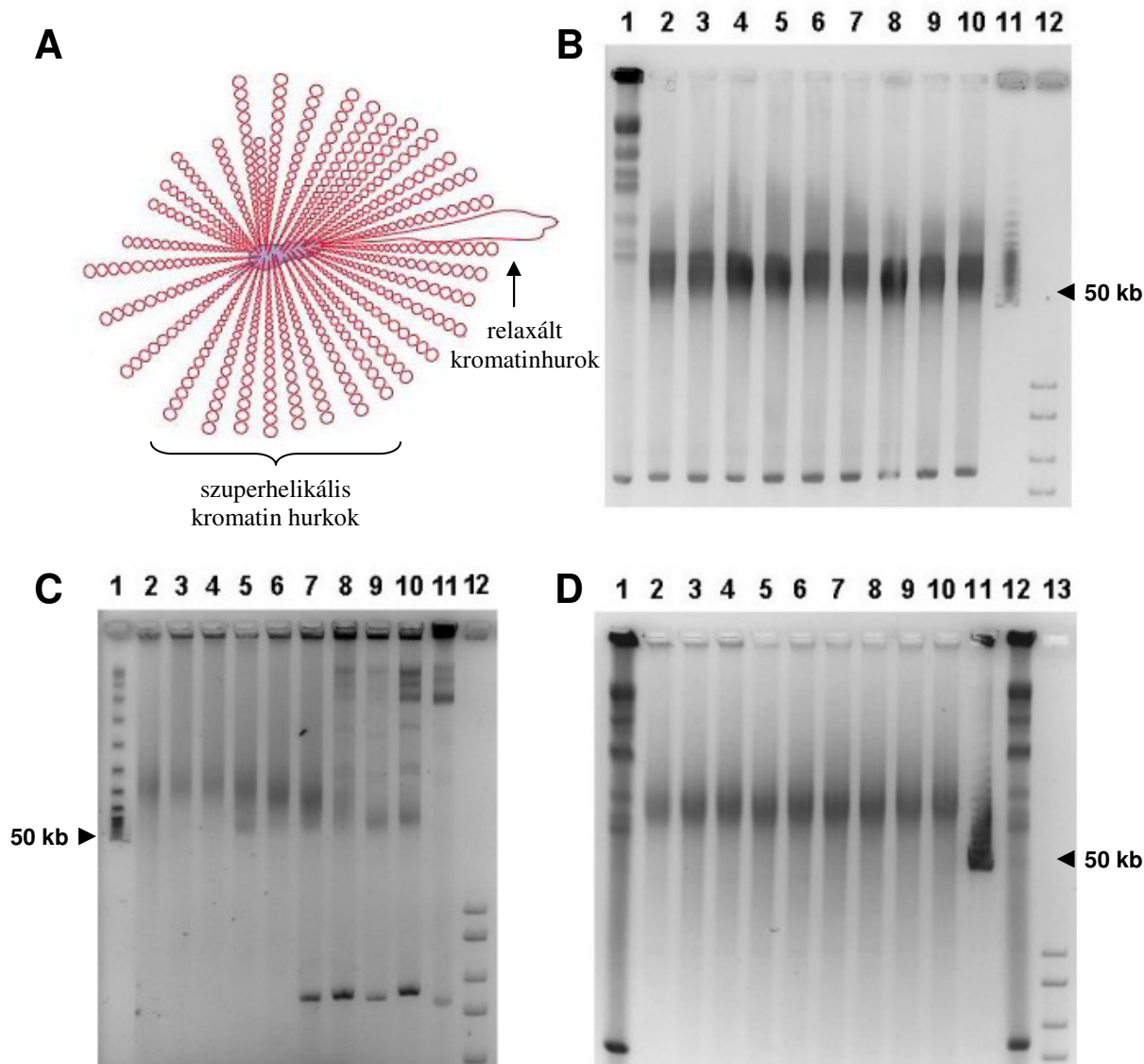


6. ábra: Logaritmusos és stacioner fázisú *S. pombe* sejtek blokkok PFGE analízise. **1.** Pulse marker (50-1000 kb); **2.** logaritmusos kultúrából készített blokk; **3.** logaritmusos kultúrából készített blokk S1 nukleáz emésztése; **4.** stacioner kultúrából készített blokk; **5.** stacioner kultúrából készített blokk S1 nukleáz emésztése;

Munkám további részéhez logaritmusos fázisban lévő sejteket használtam.

4. 1. 4. Hurok-méretű fragmentáció szuperhelicitás függése

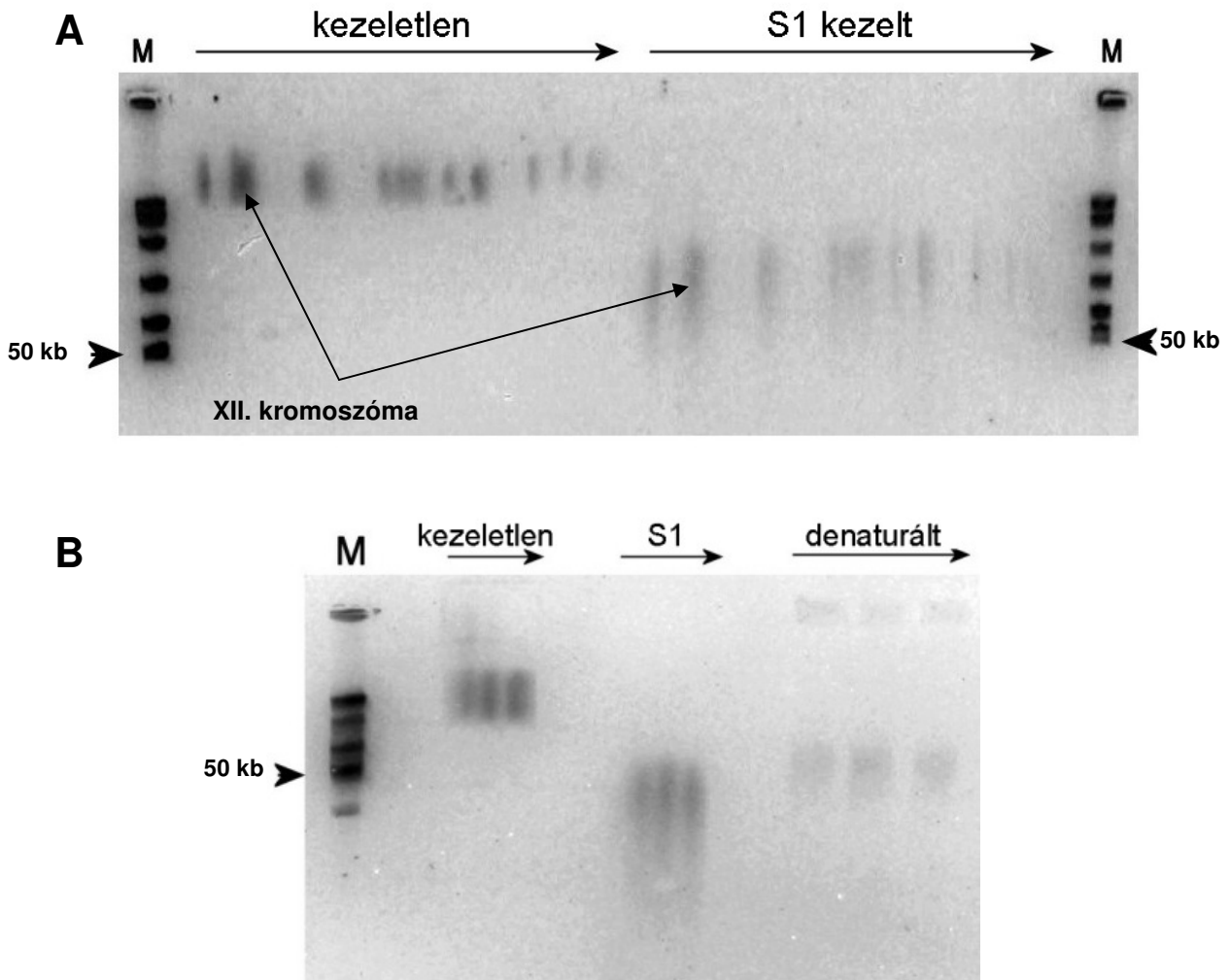
Hurkonként átlagosan egy folytonosságihiány létrejöhet aspecifikus módon, pl. nukleázok hatására úgy is, ha feltételezzük, hogy ezek hatása szuperhelicitás-függő. A kontamináló vagy endogén nukleázok hathatnak bárhol a hurkon belül, vagy a negatív szuperhelikális stressz következtében a BUR-oknál (base unpaired region) egyszálúvá vált DNS-en, feltehetően a hurkok alapjánál. Kromatin hurkonként az első nick létrejötte - a BUR-oknál vagy bárhol - megszünteti a szuperhelicitást és ezáltal a stressz-indukálta DNS denaturációt és így egy második egyszálú törés kialakulásának a valószínűségét. Ebben az esetben a sejtek feltárását megelőzően a kromatin hurkokba szerveződött DNS szuperhelikális állapotának kísérletes változtatásával az S1 nukleázzal vagy urea/hő-denaturációval kimutatható, a feltáráskor keletkező nick-ek száma és elhelyezkedése is változtatható lenne. Relaxált állapotban például a szuperhelikális deformáció hiánya miatt nem lenne várható az egyszálú-törések megjelenése a DNS-ben, aminek a fragmentumméretben is tükröződnie kellene. Ezen gondolatmenet mentén WDHY 199 sejtek agarózba ágyazását követően eltávolítottam a sejtfalat, majd a szferoplasztokat tartalmazó blokkokat különböző koncentrációjú EBr-dal kiegészített izotóniás oldatban inkubáltam 20 percig, sötétben. Az interkalálódó EBr növekvő koncentrációjánál a negatív szuperhelikális állapotú DNS először kitekerődik, majd túltekert állapotba kerül (99). Fluoreszcens mikroszkóppal ellenőriztem, hogy már néhány perc is elegendő az EBr számára, hogy az a szferoplasztokba bejusson. A mintákat ezt követően végig sötétben kezelve lizáltam és deproteinizáltam úgy, hogy az EBr sor mind a feltárásnál, mind a további kezelésnél vagy végig jelen volt, vagy pedig további EBr hozzáadása nélkül végeztem a kezeléseket. Az agaróz blokkokat ezután S1 nukleáz kezelésnek vettem alá (7.A ábra), ill. urea/hő-denaturálással (7.B ábra) hasonlítottam össze a mintákat. Az urea/hő-denaturálást ebben az esetben 95°C-on végeztem, a korábban alkalmazott 80°C helyett, mivel kísérleteim alapján az EBr interkalálódása az alkalmazott legnagyobb koncentrációnál (100 µg/ml) a pékésztő DNS T_m hőmérsékletét mintegy 15°C-kal megemelte. Az összehasonlítás eredménye, hogy a különböző EBr koncentrációk jelenléte, azaz a DNS különböző szuperhelikális állapota a sejtek feltárásának pillanatában, nem befolyásolta a hurok-méretű fragmentumok kialakulását. Ez a megfigyelés abba a modellbe illeszkedik, mely szerint a nick-ek már a feltárás előtt jelen lehettek a DNS-ben.



7. ábra: *S. cerevisiae* kromatin hurkainak szuperhelicitás változtatása interkalálódó festék hatására. **A.** A kromatinhurkok szuperhelikális, ill. relaxált állapota. A sejtek agarózba ágyazását, majd szferoplasztálását követően a szferoplasztokat növekvő koncentrációjú EBr-dal kezeltem, majd a feltárásukat követően S1 nukleázzal emésztettem (**B**), ill. urea/hő-denaturáltam 80°C-on (**C**), ill. 95°C-on (**D**). **B.** **1.** kezeletlen kontroll; **2-10.** 0; 0,5, 1; 2,5; 5; 10; 25; 50; 100 µg/ml EBr és S1 nukleáz kezelése; **11.** Pulse marker (50-1000 kb), **12.** 1 kb-os marker. **C.** **1.** Pulse marker (50-1000 kb); **2-10.** 0; 0,5, 1; 2,5; 5; 10; 25; 50; 100 µg/ml EBr és urea/hő-denaturálása 80°C-on; **11.** kezeletlen kontroll; **12.** 1 kb-os marker. **D.** **1.** kezeletlen kontroll; **2-10.** 0; 0,5, 1; 2,5; 5; 10; 25; 50; 100 µg/ml EBr és urea/hő-denaturálása 95°C-on; **11.** Pulse marker (50-1000 kb); **12.** kezeletlen kontroll; **13.** 1 kb-os marker. (A futtatást 1%-os agarózzgélben, 1× TAE-ban (**B**), ill. urea-agarózzgélben, urea-TAE pufferben (**C, D**), 4 V/cm-es erőterben, hidegszobában végeztem 5-ös programmal 5 órán, majd 9-es programmal 16 órán át. A gélt EBr-dal festettem a futtatást követően.)

4. 1. 5. Egyedi kromoszómák S1 kezelése és urea/hő-denaturációja

Az élesztő kromoszómák CHEF technikával elkülöníthetők egymástól, lehetőséget teremtve a hurok-méretű fragmentáció kromoszómánkénti vizsgálatára.



8. ábra: Élesztő kromoszómák fragmentációs vizsgálata. **A.** Az agarózba ágyazott *S. cerevisiae* kromoszómákat CHEF segítségével szeparáltuk egymástól, majd a méret szerint elválasztott kromoszómákat tartalmazó agaróz darabot egyben kivágtuk, majd egy második dimenzióban kezelés nélkül (**kezeletlen**), ill. S1 nukleáz kezelést követően (**S1 kezelt**) újabb gélelektroforézisnek (FIGE) vetettük alá. A nyilak az első dimenzióban történő futtatás irányát mutatják. A nyílhegyek jelzik az 50 kb-os fragmentumok helyét. **M:** Pulse marker (50 – 1000 kb). **B.** Az első dimenzióban elválasztjuk egymástól *S. pombe* három kromoszómáját CHEF segítségével, majd egy második dimenzióban vizsgáljuk az S1 nukleáz kezelés és urea/hő-denaturálás eredményeként kapott, különböző kromoszómákból származó fragmentumok méretmegoszlását. Az urea/hő-denaturált kromoszómák (**denaturált**) esetében a szeparált kromoszómákat külön-külön vágtuk ki és denaturáltuk, szemben a kezeletlen és S1 kezelt mintákkal, melyeket együtt vágunk ki és kezeltünk S1 nukleázzal. A nyilak az első dimenzióban történő futtatás irányát mutatják. **M:** Pulse marker (50 – 1000 kb).

Agarózgélben elválasztottam az egyes kromoszómákat egymástól és eredeti környezetüktől, majd a szeparált kromoszómákat tartalmazó agaróz darabot egyben kivágtam és S1 nukleáz kezelésnek vettem alá. Ezt követően egy második dimenzióban újabb gélelektroforézist végeztem FIGE segítségével. Az így kivitelezett 2D-gélelektroforézis mindegyik kromoszóma nagyjából 50 kb körül fókuszálódó DNS fragmentációját eredményezte mindkét élesztő esetében (8. ábra). A *S. pombe* három kromoszómáját külön-külön hő-denaturáltam urea jeleléteben, ami, az S1 nukleáz kezeléshez hasonlóan, a kromoszómák egyöntetű, hurok-méretű fragmentumok megjelenését eredményezte. Ez a tény a kromoszómák közötti, ill. a két élesztőfaj közötti genetikai és epigenetikai különbségek ismeretében ezen tényezőket kizárja a fragmentáció létrejöttét meghatározó fő faktorok köréből.

Mivel a kromoszómák nagyjából egységesen viselkedtek, a továbbiakban egy-egy kromoszómán tett megfigyelésektől azt várhattam, hogy azok alapján a teljes genomra érvényes megállapításokat tehetek.

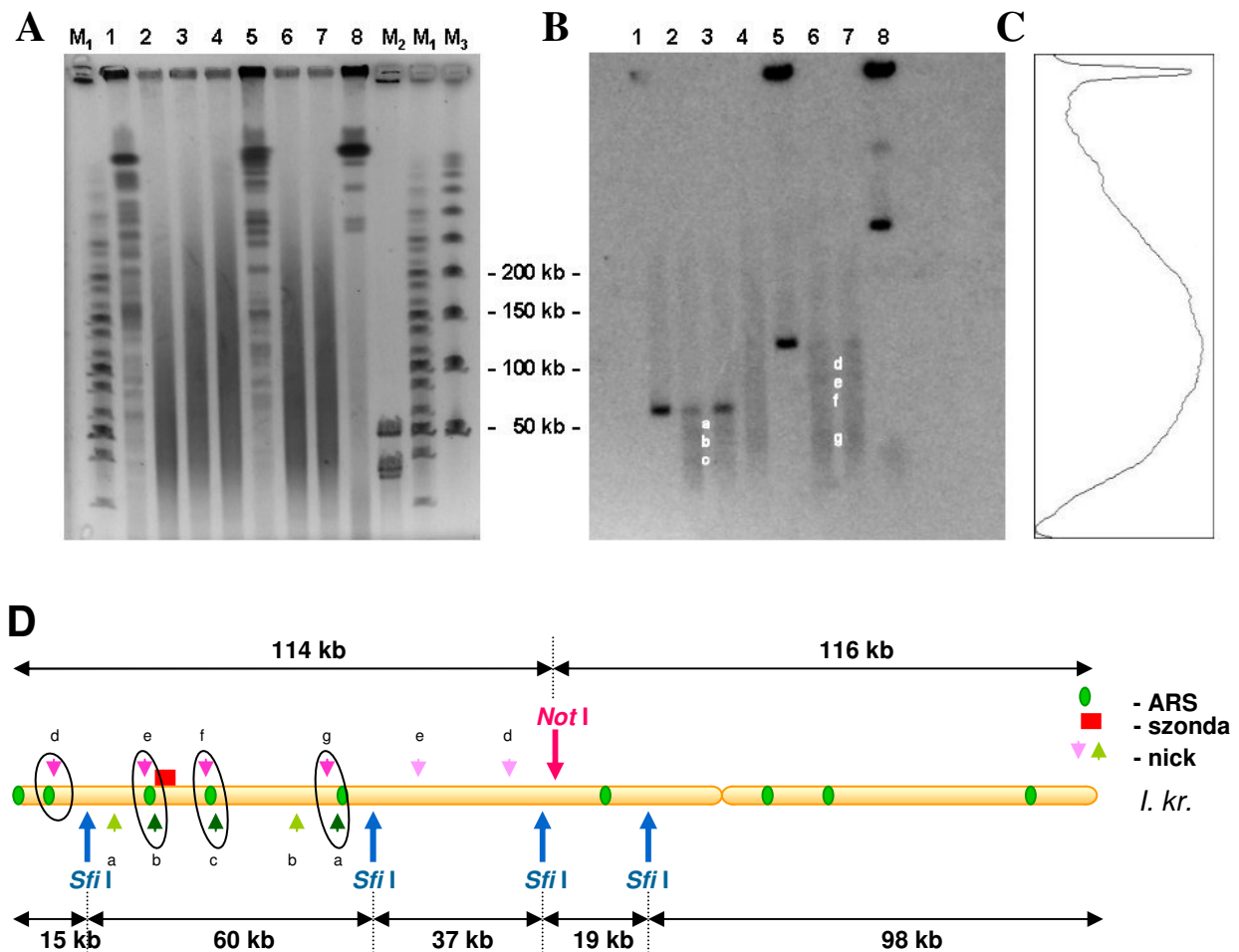
4. 1. 6. Töréspontok vizsgálata *S. cerevisiae* I. kromoszómáján

A globálisan észlelt hurok-méretű fragmentációs jelenség vizsgálatát két DNS régióra szűkítettem. Az egyik terület a *S. cerevisiae* I. kromoszómája, mely a mindössze 230 kb-os hosszával a pékélesztő legkisebb kromoszómája, a másik pedig a pékélesztő riboszómális klaszter régiója volt.

Mint korábban láttuk, az élesztő genom átlagosan 50 kb-ként folytonosságihányokat tartalmaz, mely jelenség az egyes kromoszómákra külön-külön is jellemző. Indokolt azonban megjegyezni, hogy a használt FIGE program ebben a mérettartományban jelentősen fókuszál. Így az 50 kb-os fragmentáció kifejezés alatt a FIGE gélelektroforézissel 50 kb körül fókuszálódó fragmentumok halmazát értem, ami valójában egy hozzávetőlegesen 30-200 kb-os fragmentumokat felölelő intervallumot fed le, amint ezt a mintegy 400 kb-ig feloldást biztosító CHEF program használatával megállapíthattam (9.A ábra 4. minta és 9.C ábra).

Az agarózba ágyazott élesztő kromatint *Sfi* I restrikciós enzimmel, valamint S1 nukleázzal emésztettem, majd CHEF segítségével a keletkezett fragmentumokat elválasztottam egymástól. A futtatást követően a gélt nylon membránra blottoltuk át és

Southern szondával hibridizáltuk⁹. Az *Sfi* I az I. kromoszómát 4 helyen hasítja, 5 különböző hosszúságú fragmentumot eredményezve.



9. ábra: *S. cerevisiae* I. kromoszómájának Southern blot vizsgálata. Az agarózba ágyazott WDHY199 DNS-t ritkán hasító restrikciós endonukleázokkal (*Sfi* I, *Not* I), ill. S1 nukleázzal történő emésztésüket követően az I. kromoszómára specifikus szondával vizsgáljuk Southern blot során. A szonda elhelyezkedése a **D.** ábrán látható. Az **A** képen a CHEF-futtatást követően EBr-festett agaróz gél látható, a **B** kép pedig a Southern blot eredményét mutatja. **1.** *Sfi* I emésztett blokk; **2.** *Sfi* I emésztett blokk S1 nukleáz emésztése; **3.** S1 nukleáz emésztett blokk *Sfi* I emésztése; **4.** S1 nukleáz emésztett blokk; **5.** *Not* I emésztett blokk; **6.** *Not* I emésztett blokk S1 nukleáz emésztése; **7.** S1 nukleáz emésztett blokk *Not* I emésztése; **8.** emésztetlen blokk; **M1.** Midrange marker; **M2.** λ DNS és λ DNS *Hind* III fragmentjeinek keveréke; **M3.** Pulse marker (50 – 1000 kb). Kék nyilak: megjelent fragmentumok. **C.** Az S1 nukleáz-emésztett DNS (A ábra 4. minta) eloszlási hisztogramja. **D.** *S. cerevisiae* I. kromoszómájának szerkezete. A fragmentumok hossza alapján számított nick-ek és az ARS-ok kolokalizációját bekarikázás jelöli az ábrán. (A Southern szonda elhelyezkedése miatt a DNS fragmentumokat kijelölő nick-ek helye nem minden esetben egyértelmű – a lehetséges elrendezéseket *a, b, c, d, e, f, g* jelzik.)

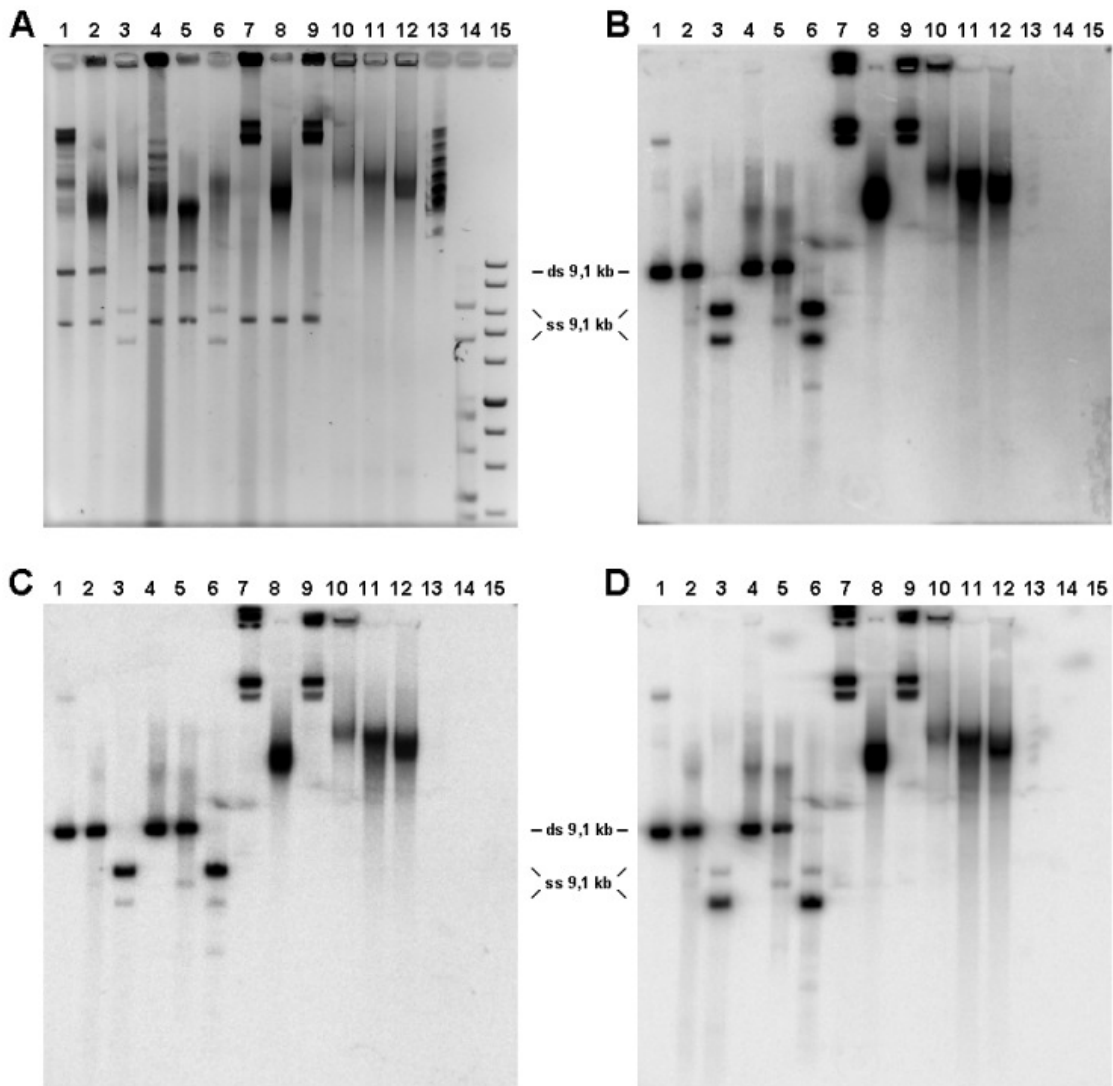
⁹ Ezekben a kísérletekben a (pre)hibridizációs-mosásos-autoradiográfiai lépéseket kollaborációs partnerünk, dr. Kókai Endre végezte (Orvosi Vegytani Intézet).

A hibridizáláshoz használt Southern szondát a 60 kb-os *Sfi* I fragmentumra terveztem (9.D. ábra). Ezen a szakaszon belül átlagosan egy nick előfordulása volt várható, mely S1 nukleáz emésztéssel ds töréssé alakítható. A nick-ek előfordulásában valamilyen szabályosság látszik tükröződni (9. ábra), hiszen a 60 kb alatti tartományban jól látható sávozódás volt észlelhető. A minták *Not* I restriktív enzim és S1 nukleáz kezelése is a nick-ek csoportosulását mutatta. A restriktív endonukleázok működése során azonban előfordulhat, hogy azok a specifikus ds hasításon felül, ss bemetszéseket is ejtenek a dsDNS-ben (Dr. Kiss Antal, SzBK, szóbeli közlés). Az ilyen ss bemetszések hagyományos gélelektroforézissel rejtve maradnak, S1 nukleáz kezelést követően azonban láthatóvá válnak. Ezért fontos megjegyezni, hogy a hibridizáció hasonló mintázatot mutatott, amikor a restriktív endonukleáz és az S1 nukleáz emésztés sorrendjét felcseréltem (9. ábra 2-3., ill. 6-7. minta). Ebben az esetben ugyanis, mivel az megelőzi a restriktív emésztést, az S1 nukleáz nem képes kimutatni a restriktív enzimek által okozott ss bemetszéseket. Megállapítható volt, hogy az *Sfi* I és a *Not* I nem, vagy csak csekély mennyiségű aspecifikus ss bemetszéseket hozott létre a dsDNS-ben.

A fragmentumok mérete alapján következtethetünk a nick-ek helyzetére az I. kromoszómán belül. Ahogy a 9.D. ábrán látható, a nick-ek elhelyezkedése átfedést mutat az ARS szekvenciákkal. Ez arra utalhat, hogy a nick-eknek a replikációval kapcsolatos funkcionális jelentőségük lehet.

4. 1. 7. *S. cerevisiae* rDNS fragmentációjának vizsgálata

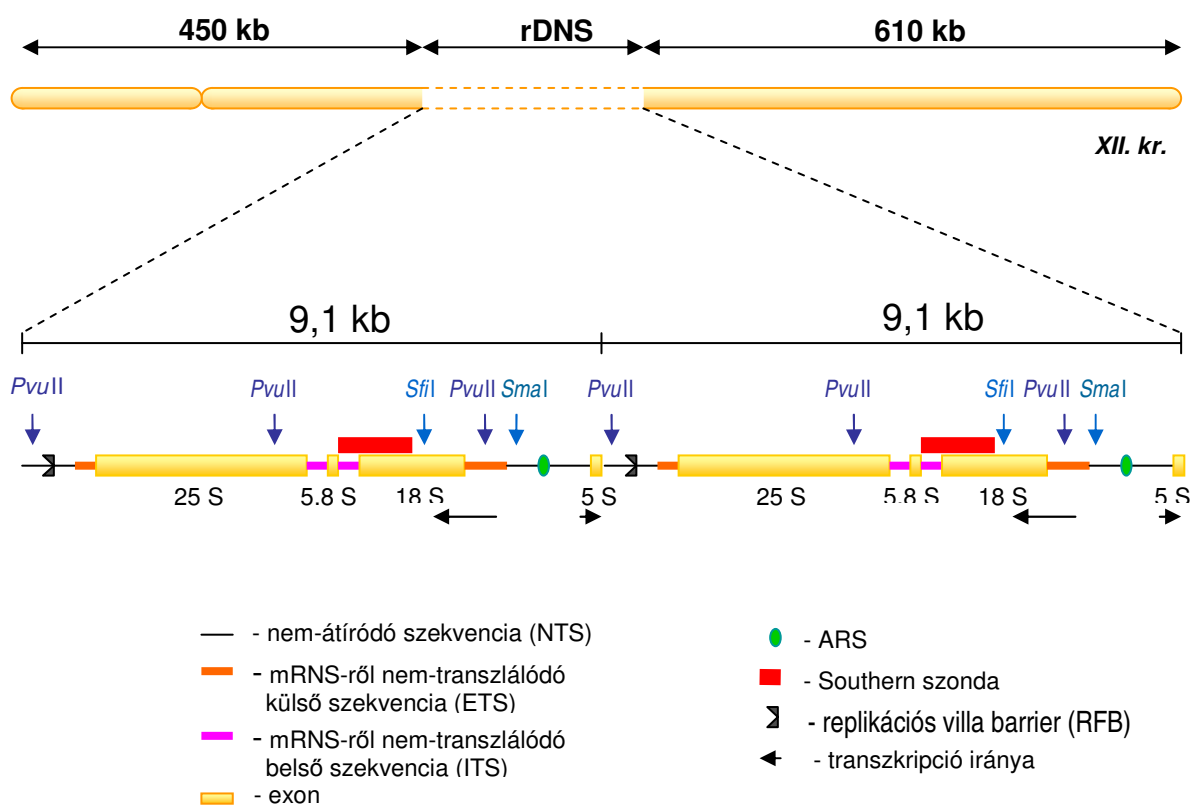
Mint fentebb láttuk, az élesztő genomi DNS különböző körülmények között kapott fragmentumainak mérete átlagosan 20 – 200 kb közé esik. Ez alól nem jelent kivételt a *S. cerevisiae* riboszómális DNS (rDNS) klaszter régiója sem, mely meglepő, hiszen a 100 – 200 tandem elrendezésű, azonos szekvenciájú, egyenként 9,1 kb-os egységekből felépülő régió sajátosságai miatt feltételezhetnénk az össz-DNS-től eltérő fragmentációs mintázat megjelenését. Southern blottos vizsgálatok során azonban azt láttam, hogy a mintegy 1,5 Mb-nyi rDNS az össz-DNS-sel azonos módon viselkedik S1 nukleáz kezelés és urea/hő-denaturálás hatására egyaránt, azaz mintegy 20 – 200 kb-ként fragmentálódik (10. ábra 8-12. minta, 12. ábra 3. minta). (Az rDNS klasztert hordozó XII. kromoszóma az általam használt WDHY 199 törzs második legnagyobb kromoszómája (8.A ábra).)



10. ábra: *S. cerevisiae* rDNS-ének vizsgálata Southern blottal. **A.** EBr-festett agaróz gél **1.** *Sfi* I emésztett WDHY199 blokk; **2.** *Sfi* I és *S1* nukleáz emésztett WDHY199 blokk; **3.** *Sfi* I emésztett WDHY199 blokk urea/hő-denaturálása; **4.** *Sma* I emésztett WDHY199 blokk; **5.** *Sma* I és *S1* nukleáz emésztett WDHY199 blokk; **6.** *Sma* I emésztett WDHY199 blokk urea/hő-denaturálása; **7.** kezeletlen kontroll; **8.** *S1* nukleáz emésztett WDHY199 blokk; **9.** 8M urea-TE-ben inkubált WDHY199 blokk; **10.** urea/hő-denaturált WDHY199 blokk; **11.** *S1* emésztett WDHY199 blokk urea/hő-denaturálása; **12.** *S1* emésztett WDHY199 blokk 8M urea-TE-ben inkubálása; **B.** Southern blot ds rDNS szondával; **C.** Southern blot szensz szál specifikus ss rDNS szondával; **D.** Southern blot antiszensz szál specifikus ss rDNS szondával.

Az 20-200 kb-kénti DNS fragmentáció az rDNS esetében minden 2-20. rDNS egységen belül (átlagosan: 11 egységenként) történő fragmentációs eseményt jelent. Munkám további részében arra voltam kíváncsi, hogy ezen fragmentációs események egy kópián belül egy adott szekvenciához/szakaszhoz köthetők-e, vagy pedig random elrendeződést mutatnak.

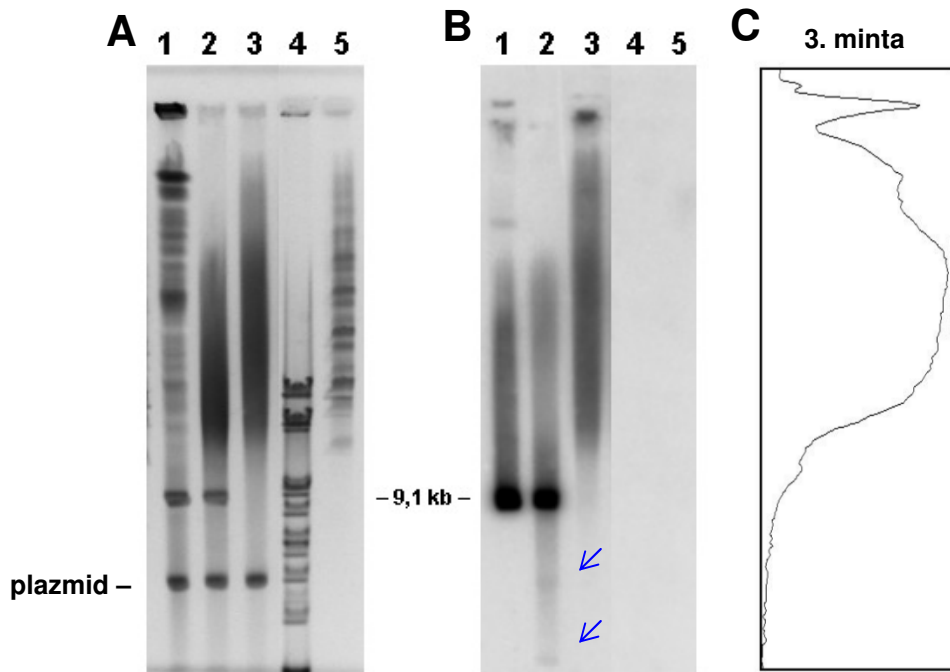
Az agarózba ágyazott pékélesztő genomi DNS-t olyan különböző, általában ritkán hasító, restriktív enzimekkel emésztettem, amely egy rDNS kópián belül csupán egyszer hasít, a genom többi részét viszont nagymolekula-súlyú fragmentumokra hasítja, mely fragmentumok konvencionális gélelektroforézis során a kompressziós zónába tömörülnek. A hasítás eredményeként az rDNS régió egységeire bontható. Ezen egységek agaróz gélelektroforézis során egy 9,1 kb-os, a genomi DNS többi részétől jól elkülönülő sávba csoportosulnak. A töréspontok detektálásához Southern blot analízist végeztünk, melyhez ^{32}P -vel jelölt szondát terveztem a 11. ábrán látható módon.



11. ábra: *S. cerevisiae* rDNS-ének szerkezete.

Ahhoz, hogy a kópián belüli egyszálú folytonossághiányokat detektálhatóvá tegyem, a genomi DNS-t tartalmazó, restriktív enzimmel emésztett agaróz blokkokat további S1 nukleáz kezelésnek vettem alá. A kezelés hatására az egyszálú folytonossághiányok duplaszálú töréssé alakíthatók, az így keletkezett, az rDNS egységhez képest kisebb fragmentumok az agaróz gélen gyorsabban migrálnak és Southern szonda segítségével egyértelműen azonosíthatóak. Random megoszlás esetében a minták elkenődését várnám, hiszen ebben az

esetben a törések bárhol előfordulhatnak az rDNS egység mentén, amely változatos fragmentméretet eredményezne; míg abban az esetben, ha a folytonossághiányok egy adott szakaszhoz köthetők, Southern hibridizációt követően diszkrét csíkok megjelenését várnám a 9,1 kb alatti tartományban. A 12. ábrán látható, hogy az S1 nukleáz emésztést követően diszkrét sávok jelentek meg ebben a tartományban, mely a nick-ek szabályos helyeken történő előfordulását támasztja alá (2. minta).

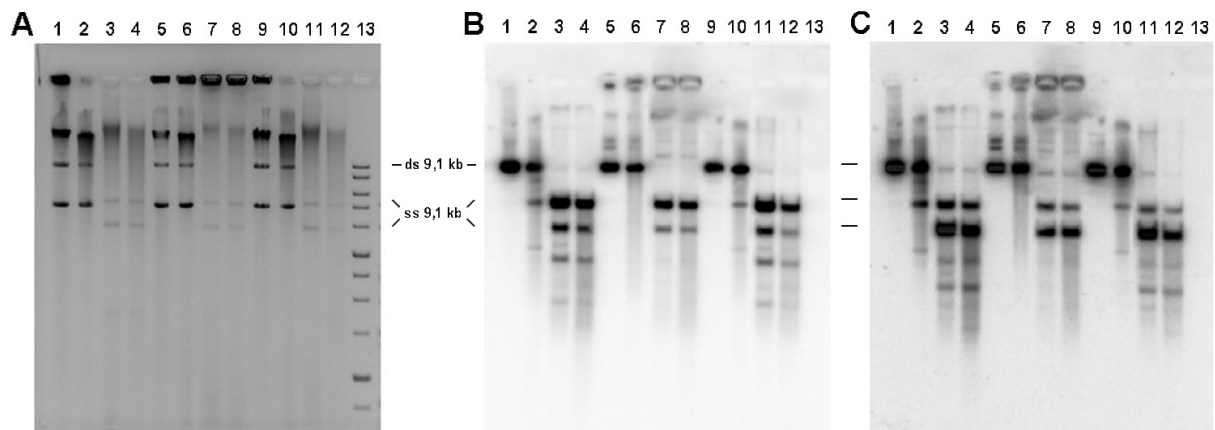


12. ábra: *S. cerevisiae* rDNS-ének Southern blot vizsgálata. **A.** Az EBr-festett WDHY 199 DNS CHEF-fel történő feloldása az rDNS egységén belül egyszer hasító restrikciós endonukleáz, ill. S1 nukleáz emésztést követően. **B.** rDNS-re specifikus szondával végzett Southern blot eredménye. **1.** *Sfi* I emésztett blokk; **2.** *Sfi* I emésztett blokk S1 nukleáz emésztése; **3.** S1 nukleáz emésztett agaróz blokk; **4.** λ DNS és λ DNS *Hind* III fragmenteinek keveréke; **5.** Midrange maker. Kék nyilak: megjelenő fragmentumok. **C.** Southern szondával kimutatott S1nukleáz-emésztett rDNS klaszter (B ábra 3. minta) eloszlási hisztogramja.

Problémát jelentett azonban, hogy nem tudom megállapítani, hogy a kimutatni kívánt folytonossághiány az rDNS melyik szálán helyezkedik el. A probléma megoldására az urea-agaróz gélelektroforézis kínált megoldást, amely során a denaturált rDNS szálak gyorsabban futnak a gélen, mint a ds DNS. Ez meglepő, hiszen a nagymolekula-súlyú DNS esetében épp az ellenkezőjét láttam, azaz ott a ds DNS mutatott nagyobb migrációs sebességet. Ugyanakkor a két (teljesen azonos hosszúságú) komplementer szál egymáshoz viszonyított migrációs

sebessége is eltérő volt. (A módszer leírását és részletesebb vizsgálatát a 4. 2.1. fejezet tartalmazza.)

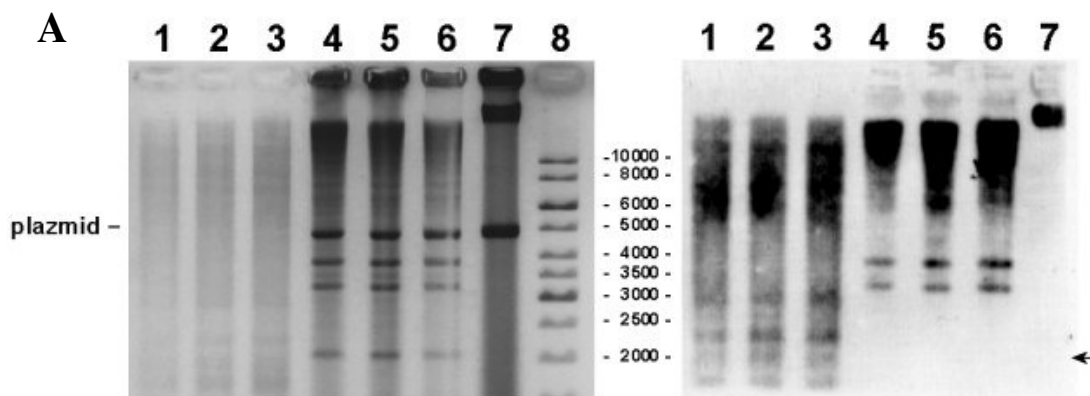
Az rDNS két szálát szeparáltan futtatva, majd a mintákat nylon membránra blottolva, egyszál-specifikus Southern szondát használva a szeparált két szálon külön-külön térképezhető a folytonosságihiányok elhelyezkedése. A 13. ábra 3. mintáján látható, hogy a denaturálódás következtében manifesztálódó nick-ek szintén a keletkező fragmentumok diszkrét sávokba történő tömörülését okozták, mely a nick-ek adott szakaszokon történő előfordulását támasztják alá, a random elhelyezkedés lehetőségével szemben.



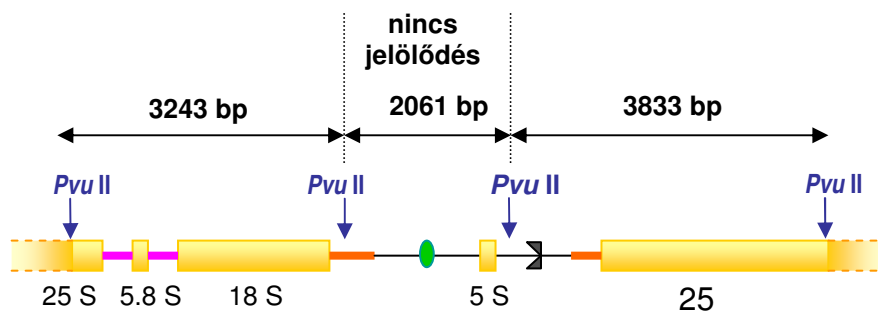
13. ábra: Szinkronizált WDHY 199 sejtek rDNS-ének Southern blot vizsgálata. Logaritmikus növekedési fázisú, ill. G1, G2/M sejtciklus fázisú sejtek rDNS-ét *Sma* I restrikciós endonukleázzal egységeire hasítottuk, majd S1 nukleáz, ill. urea/hő-denaturálás következtében megfigyelhető fragmentációját vizsgáltuk Southern blot segítségével egyszál-specifikus szondát alkalmazva. **A.** Ebr-festett agaróz gél. **1.** *Sma* I emésztett blokk logaritmikus sejtekből; **2.** *Sma* I és S1 nukleáz emésztett blokk logaritmikus sejtekből; **3.** logaritmikus sejtekből készült *Sma* I emésztett blokk urea/hő-denaturálása; **4.** logaritmikus sejtekből készült *Sma* I és S1 nukleáz emésztett blokk urea/hő-denaturálása; **5.** *Sma* I emésztett blokk G1 fázisú sejtekből; **6.** *Sma* I és S1 nukleáz emésztett blokk G1 fázisú sejtekből; **7.** G1 fázisú sejtekből készült *Sma* I emésztett sejtek blokk urea/hő-denaturálása; **8.** G1 fázisú sejtekből készült *Sma* I és S1 nukleáz emésztett blokk urea/hő-denaturálása; **9.** *Sma* I emésztett blokk G2 fázisú sejtekből; **10.** *Sma* I és S1 nukleáz emésztett blokk G2 fázisú sejtekből; **11.** G2 fázisú sejtekből készült *Sma* I emésztett blokk urea/hő-denaturálása; **12.** G2 fázisú sejtekből készült *Sma* I és S1 nukleáz emésztett blokk urea/hő-denaturálása; **13.** 1 kb-os marker. **B.** Southern blot szensz szál-specifikus, ss rDNS szondával. **C.** Southern blot antiszensz szál-specifikus, ss rDNS szondával. (A futtatást 1,2 %-os urea-agarózgélben, urea-TAE pufferben, 2 V/cm-es erőterben, hidegszobában végeztük 13 órán át. A gélt EBr-dal festettük a futtatást követően.)

Az rDNS Southern hibridizációs vizsgálatát G1 és G2/M sejtciklus fázisban szinkronizált sejtekből kiindulva is elvégeztem. Ahogy a 13. ábrán látható, a két fázisból származó rDNS-ek eltérő hibridizációs mintázatot mutattak. A G2 sejtek esetében erősebb

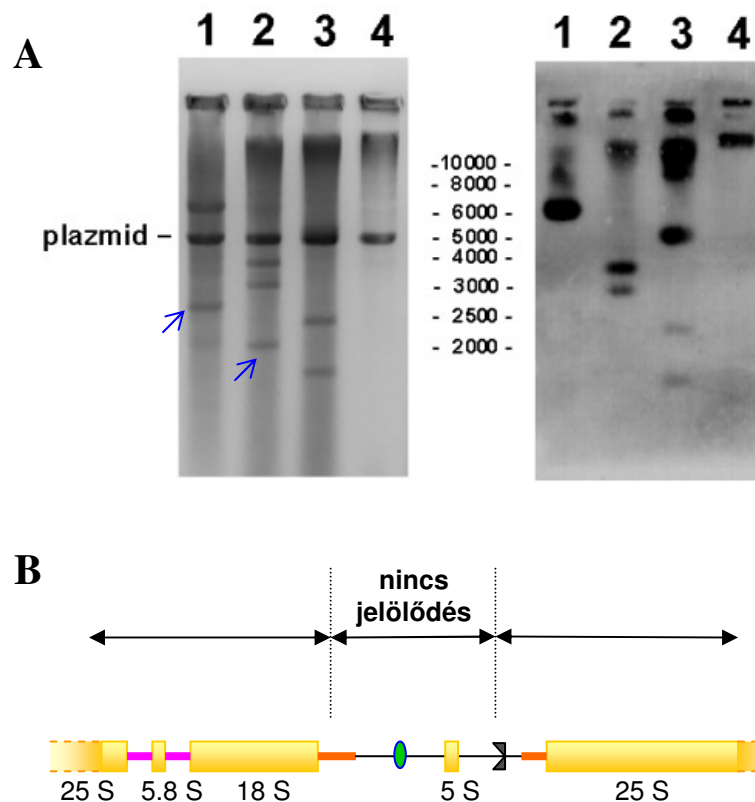
transzlációval, és a reakciót dideoxi-nukleotidokkal termináltam. A biotinnal megjelölt DNS-t *Pvu II* restrikciós enzimmal emésztettem. A *Pvu II* az rDNS egységen belül háromszor hasít, mely 3833, 3243, 2061 bp-os fragmentumok megjelenését eredményezte. A urea/hő-denaturált minták és denaturálatlan minták gélelektroforézisét követően a mintákat nylon membránra blottoltuk, majd a biotin beépülést anti-biotin antitest segítségével mutattam ki. (Ez az eljárás az irodalomban - tudtommal - előzmények nélküli.) A 15. ábrán látható, hogy a legkisebb *Pvu II* fragmentumon (2061 bp) belül nem volt detektálható biotin-dUTP beépülés, bár ez a fragmentum tartalmazza az rDNS ARS szekvenciáját. Ez az adat nem mond ellent azonban nick-ek replikációs barrier régióbeli lokalizációjának (15. ábra), hiszen a 3833 bp-os *Pvu II* fragmentum esetében detektáltam jelet.



B



15. ábra: *S. cerevisiae* DNS-ben előforduló nick-ek és az rDNS ARS szekvencia kapcsolatának vizsgálata „Ab-Southern”-nel. **A.** A bal oldali panel az EBr-festett agarózgél mutatja. Az agarózba ágyazott WDHY 199 DNS-be biotin-dUTP-t építettem nick-transzlációval, majd *Pvu II* restrikciós endonukleázzal emésztettem. **1-3.** biotinnal jelölt, *Pvu II* hasított urea/hő-denaturált minták. **4-6.** biotinnal jelölt, *Pvu II* hasított denaturálatlan minták. A nick transzláció terminálását ddGTP-vel (**1, 4**), ddCTP-vel (**2, 5**), ill. ddATP-vel (**3, 6**) végeztük; **7.** emésztetlen kontroll; **8.** 1 kb-os marker. A jobb oldali panelen látható a biotinnal jelölt fragmentumok anti-biotin antitesttel és tormaperoxidázzal konjugált másodlagos antitesttel történő detektálása a gél nylon membránra történő blottolását követően. Nyíl: a biotin-beépülést nem mutató fragmentum helye. **B.** A biotin-beépülést nem mutató fragmentum helye az rDNS kópián belül.



16. ábra: RNS/DNS hibridek kimutatása *S. cerevisiae* rDNS-ében „Ab-Southern” módszerrel. **A.** A bal oldali panel az EBr-festett agarózgél mutatja. Az agarózba ágyazott WDHY 199 DNS-t restriktív endonukleázokkal emésztettem. **1.** *Hind* III emésztés; **2.** *Pvu* II emésztés; **3.** *Stu* I emésztés; **4.** *Bam*HI emésztés. A jobb oldali panelen látható RNS/DNS hibrideket hordozó fragmentumok S9.6 antitesttel és tormaperoxidázzal konjugált másodlagos antitesttel történő detektálása a gél nylon membránra történő blottolását követően. Kék nyilak: az Ab-Southern során nem jelölődött fragmentumok. **B.** RNS/DNS hibrideket nem mutató fragmentumok helye az rDNS kópián belül. (A jelölések megegyeznek a 14. ábra jeleivel.)

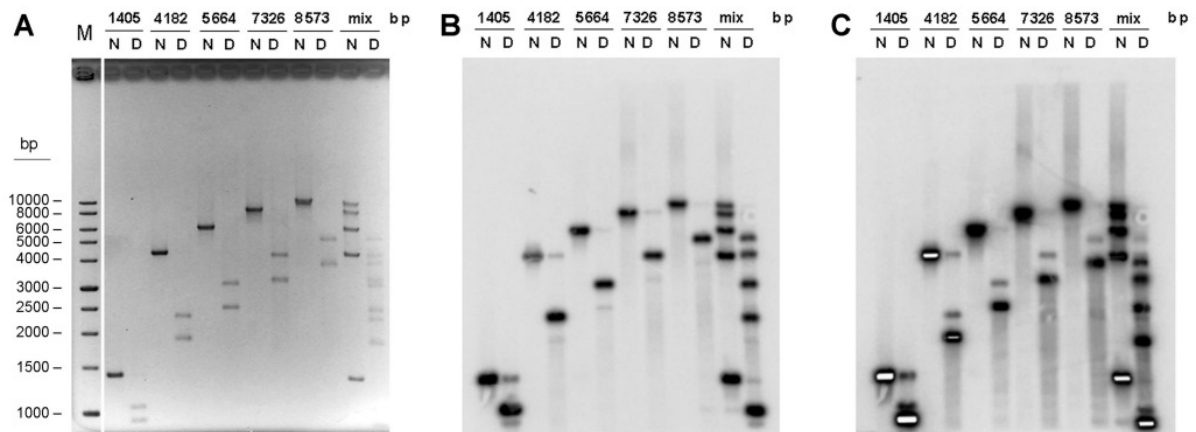
Az „Ab-Southern” módszer alkalmasnak bizonyult továbbá a genomi DNS-ben előforduló RNS/DNS hibridek vizsgálatára is. Munkám során olyan restriktív enzimekkel hasítottam az agarózba ágyazott *S. cerevisiae* DNS-t, amelyek az rDNS kópiákon belül többször is vágnak (*Hind* III, *Pvu* II, *Stu* I). Kivételt jelentett a *Bam*HI, ami az rDNS klaszterbe nem hasít bele. Agaróz gélelektroforézist követően a mintákat nitrocellulóz membránra blottoltam, és az RNS/DNS hibrid kimutatását S9.6 antitesttel végeztem. A monoklonális S.9.6 antitest szekvenciától függetlenül specifikusan ismeri fel az RNS/DNS hibrideket. Az antitest epitóp-felismerő képessége erőteljesen függ a hibridek hosszától: microarray adatok szerint a 25 nukleotidnyi hibrid jelintenzitása az 1/10-e az 50 nukleotid hosszúságúnak, a legkisebb, még kimutatható hibrid hossza 15 nukleotid volt (100). Ezzel a

módszerrel kimutattam, hogy az ARS szekvenciát hordozó rDNS régió nem tartalmaz RNS/DNS hibrideket, míg az RFB-t hordozó rDNS fragmentumok esetében azok kimutathatóak voltak (16. ábra).

4. 2. Génátrendeződések és folytonossághiányok detektálására alkalmas módszerek fejlesztése

4. 2. 1. Folytonossághiány vizsgálatára alkalmas gélelektroforetikus módszer fejlesztése

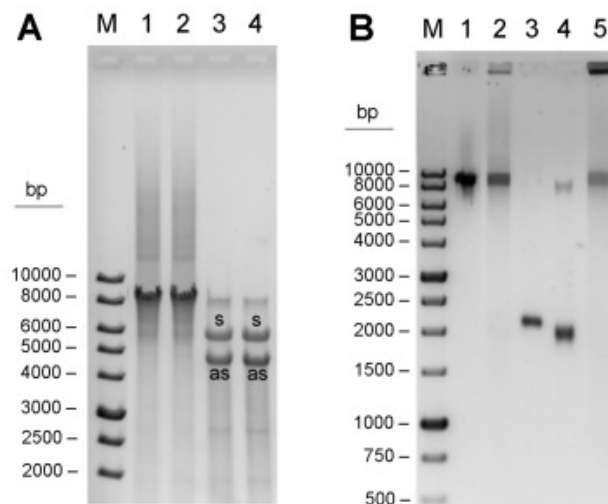
Urea/hő-denaturációt követően az 1-20 kb-os ss fragmentumok szeparáltak, két külön sávban és gyorsabban futottak agaróz gélen, mint a ds DNS fragmentumok. A vizsgálathoz az *S. cerevisiae* rDNS-ről készített különböző hosszúságú PCR termékeket (17. ábra), valamint a λ DNS *Hind*III fragmentumait használtam (nem bemutatott adatok). Egyszál-specifikus Southern szondával igazoltam, hogy a denaturált mintákban megjelenő két sáv valóban a ds fragmentumok két komplementer szálának felelnek meg.



17. ábra: Különböző hosszúságú ds és denaturált, ss fragmentek urea-agaróz gélelektroforézise. A ds fragmentek PCR-rel készültek, templákként *S. cerevisiae* rDNS-t használtuk, az Anyagok és módszerekben feltüntetett primerekkel. Az 1405, 4182, 5664, 7326, 8573 bp hosszúságú PCR termékek a 3'-végüknél egymással átfedőek, melyet a közös reverz primer determinál. **A.** EBr-festett urea-agarózzél. **N** és **D** jelöli a nem-denaturált, ill. denaturált mintákat a növekvő hosszúságú termékek esetén (a számok a fragmentumok hosszát jelölik); **mix:** a PCR termékek keveréke. **M:** denaturálatlan 1 kb marker. **B.** Szensz szál-specifikus szondával végzett Southern blot. **C.** Antiszensz szál-specifikus szondával végzett Southern blot.

Az agaróz koncentráció csökkentésével a ds fragmentumok retardációja fokozódott az ss molekulákhoz képest. Abban az esetben, ha TAE puffer helyett TBE puffert használtam a denaturált fragmentek lassabban futottak a 1- 1,6 %-os gélen, mint a dsDNS.

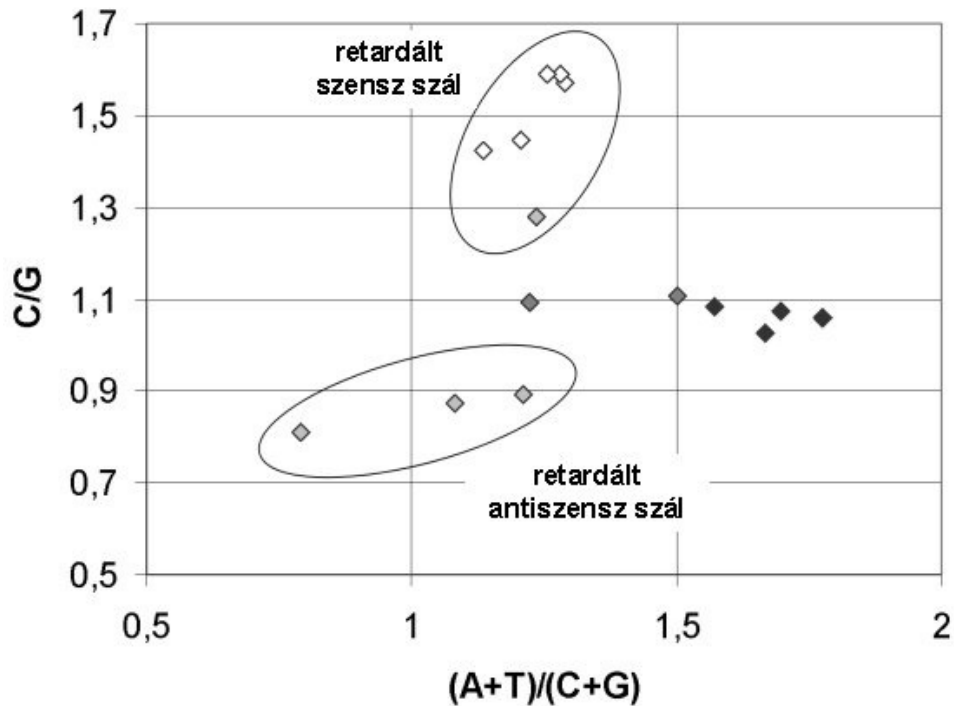
Amikor a gélből kivágott komplementer szálakat hibridizáltam egymással, visszakaptam az eredeti ds fragmentumot (18.B ábra 5. minta). A két szál azután is fenntartotta különböző migrációs tulajdonságát, amikor külön-külön újraképeztem őket urea-mentes agarózban (18.B ábra 3-4. minta). Az urea jelenléte valószínűleg szükséges a hődenaturáció alatt, de az urea folyamatos jelenléte a gélben valószínűleg nem feltétele a két szál eltérő elektroforetikus migrációjának.



18. ábra: Komplementer szálak reasszociációja. **A.** 8573 bp PCR termék urea-agaróz gélelektroforézise. **1-2.** denaturálatlan (ds) PCR termék (duplikált minta); **3-4.** urea/hő-denaturált PCR termék szensz (s) és antiszensz (as) szálai (duplikált minta); **M.** 1 kb-os marker. A ds PCR erméket és a komplementer szálakat külön-külön kivágtam és hagyományos agarózgélen újraképeztem. **B.** Nem-denaturáló gélelektroforézis vizsgálat. **1.** ds PCR termék újraképezése („A” gél 1. minta); **2.** ds PCR terméket hődenaturáltam urea jelenléte nélkül, majd engedtem reasszociálódni („A” gél 2. minta), **3-4.** szensz (3) és antiszensz (4) szálak újra képezése („A” gél 3. minta); **5.** a kivágott szensz (s) és antiszensz (as) szálakat együtt hő-denaturáltam és reannéláltam („A” gél 4. minta).

A komplementer szálak nukleotid-összetételét összehasonlítva azt találtam, hogy a C/G és (A+T)/(C+G) arány együttesen befolyásolta a két szál egymástól történő szeparációjának mértékét (19. ábra). Magas (A+T)/(C+G) arány esetében a két szál nem különült el egymástól, alacsonyabb (A+T)/(C+G) arány esetében a két szál szeparáltan futott és a szeparáció mértéke a C/G aránytól függött. Ha a C – G arány kiegyenlített volt a szálon

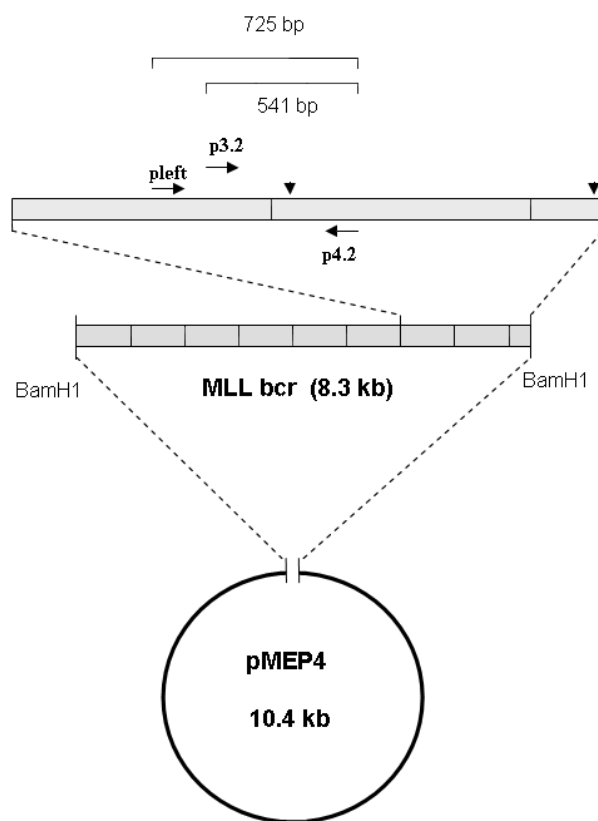
belül, a szeparáció mértéke kicsi volt, ha azonban eltérést mutatott, az eltérés mértékének növekedésével együtt nőtt a gélen történő szeparációjuk mértéke is. Tapasztalataim alapján az elektroforézis során a G-gazdag szál gyorsabban haladt a gélen, a C-gazdag szál pedig a retardált szál volt. Az rDNS esetében a szensz szál haladt lassabban a gélen, az antiszensz szál pedig gyorsabban. (A szensz és antiszensz szál kifejezéseket a 25S, 5,8S és 18S rRNS-ek átíródásához viszonyítva használom.)



19. ábra: DNS fragmentek bázisösszetételének vizsgálata. A különböző fragmenteket reprezentáló pontok helyét a $(A+T)/(G+C)$ és C/G arányuk határozza meg. Az ábra a szensz szálak értékeit mutatja. A pontok szürke árnyalatai a két komplementer szál elektroforetikus szeparációjának mértékét jelölik. A legnagyobb mértékű szeparációt a fehér szín, a szeparáció hiányát a fekete szín jelöli. Fehér: rDNS-ről készült 9,1 kb-os, 8,5 kb-os, 7,3 kb-os, 5,6 kb-os, ill. 4,1 kb-os PCR termék; világos szürke: rDNS-ről készült 1,4 kb-os PCR termék; 23 kb-os, 6,6 kb-os, 4,3 kb-os λ Hind III fragment; sötét szürke: 9,4 kb-os λ Hind III fragment; MLL bcr-ről készült 8 kb-os PCR termék; fekete: 2,3 kb-os, ill. 2 kb-os λ Hind III fragment; MLL bcr-ről készült 6 kb-os, ill. 3 kb-os PCR termék.

4. 2 .2. Folytonossághiány vizsgálatára alkalmas áramlási citometriás módszerek fejlesztése¹⁰

Egészséges és apoptotikus sejtek hurok-méretű fragmentációjában szereplő töréspontok között a véletlenszerű előfordulásnál gyakrabban találunk pathológiás génátrendeződésekben résztvevő szekvenciákat. Munkacsoportunk korábban egészséges emberi sejtek hurok-méretű fragmentumainak végeit klónozva és szekvencia analízisnek alávetve a konszenzus motívumok között találta a gyermekkori akut leukémiában és poszterápiás leukémiában gyakran szereplő MLL gén bcr régiójának erős topoizomeráz II kötőhely szekvenciáját.



20. ábra: Primerek és restrikciós helyek pozíciója az MLL bcr-t hordozó pMEP4 plazmidon.

Nyílhegy: *Xba* I restrikciós hely.

¹⁰ Munkám ezen része csoportunk abba a kutatási vonulatába illeszkedik, melynek keretében a mikrogöngy analízissel párosított áramlási citometriás analízis genetikai vizsgálatok céljára történő alkalmazásainak új lehetőségeit keressük.

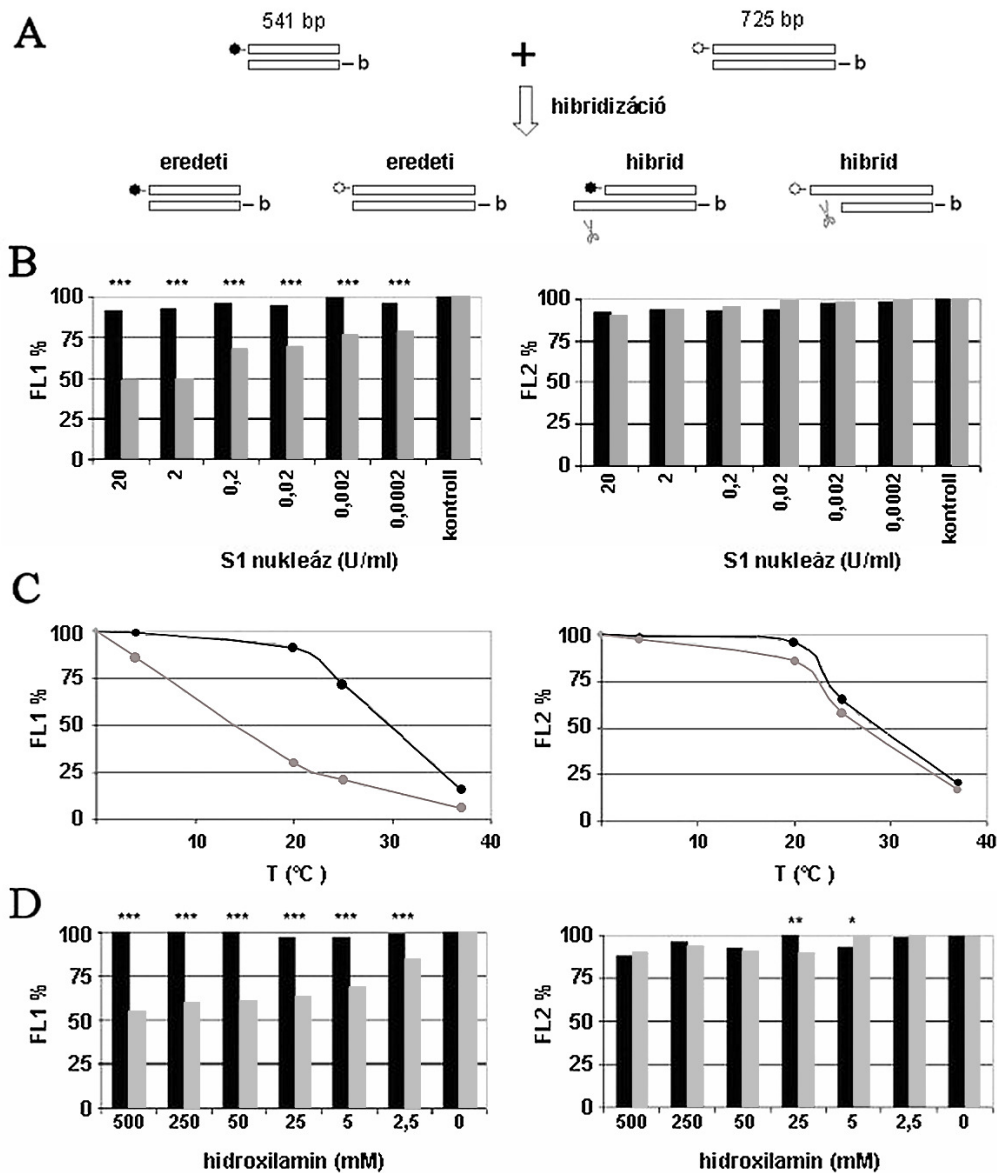
Az MLL bcr ezen régióját használva modell rendszerként, HTP módszereket dolgoztam ki gyakori genetikai rendellenességek, mint deléció, inszerció, ss léziók, nick-ek, gap-ek ill. egyes génátrendeződések kimutatására. Nagyobb deléciók, inszerciók könnyedén kimutathatók az adott régiót felölelő PCR termékek hossza alapján. Kisebb eltérések felismerésénél azonban hasznos módszernek ígérkezett az általunk¹¹ kidolgozott módszer. A stratégia lényege, hogy 6FAM/biotin-jelölt 725 bp-os és Cy3/biotin-jelölt 541 bp-os, egymással átfedő PCR terméket készítettem az MLL bcr régiót tartalmazó plazmidról, azonos antiszensz primert használva (20. ábra).

A kétféle denaturált molekula renaturálását követően a 21.A ábrán látható kombinációk keletkeztek, melyek között két hibrid is szerepel. Ezeket a molekulákat az egyszálú régióknál hasítottuk S1 nukleázzal, vagy hidroxilamin/piperidin kezeléssel.

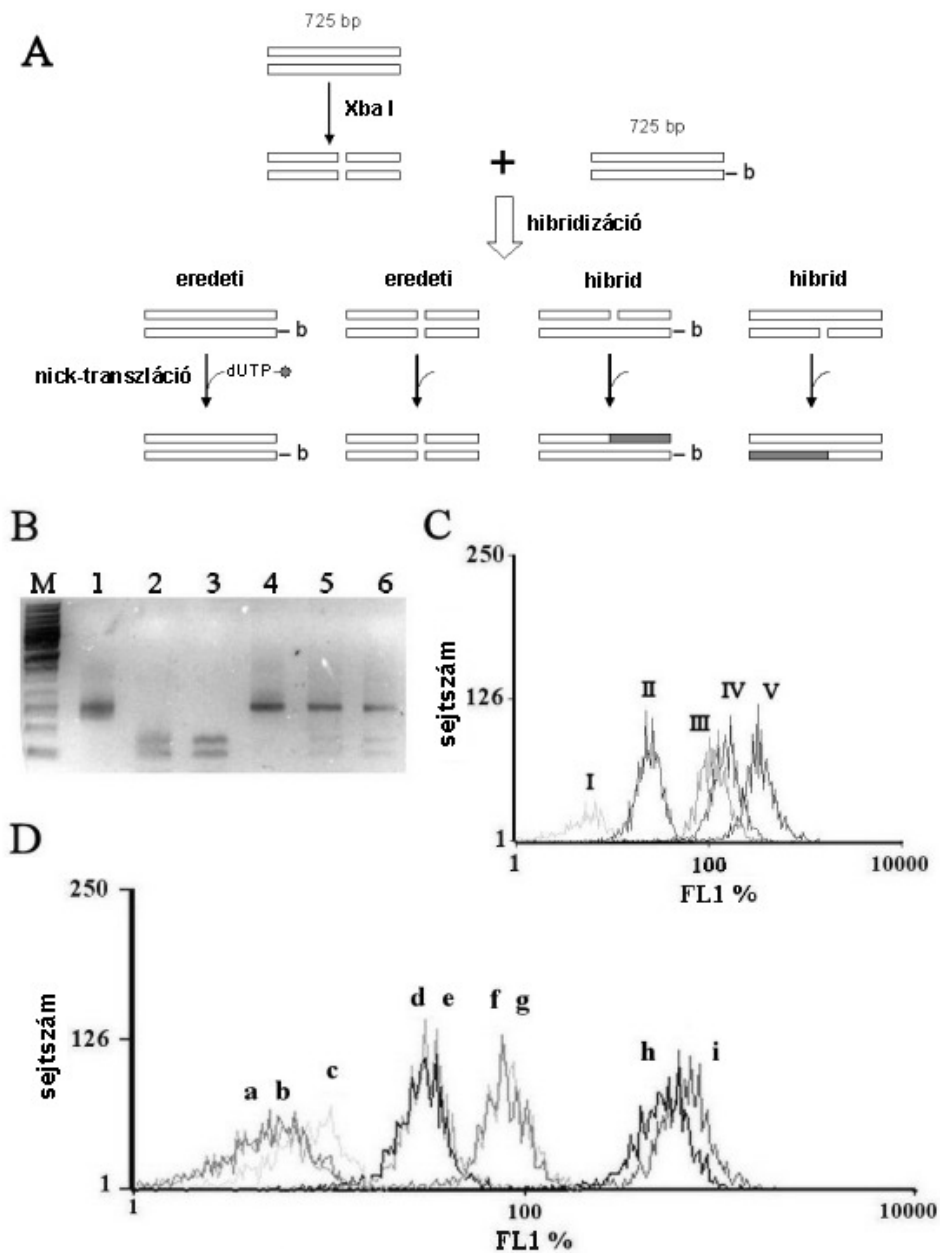
A hidroxilamin/piperidin kezelés a párosítatlan vagy mismatch-ben található citozinnál hasított. Ezután streptavidinnel bevont mikrogöngyhöz kötöttük a molekulákat, majd áramlási citométeren mértük a fluoreszcencia változást. A túlnyúló végekkel rendelkező hibrid molekulák sokkal érzékenyebbek a kezelésekre, mint a homoduplexek (21.B és D ábra).

Egy olyan kísérleti stratégia lehetőségét is teszteltem, mely ss folytonossághiányok HTP detektálását teheti lehetővé. Egy 725 bp-os jelöletlen PCR terméket *Xba* I restrikciós enzimmal hasítottam, mely egyszer hasít az adott szekvencián belül. A hasított DNS-t biotinnal jelölt, azonos hosszúságú, de hasítatlan PCR termékkel hibridizáltam 1:1 arányban. A hibridizálást követően az eredeti termékeken kívül olyan hibrideket is kaptam, melyek molekulánként egy nick-et hordoztak, ahogy az a 22.A ábrán, ill. 22.B gélelektroforetikus képén látható. Ezek a nick-ek *E. coli* DNS polimeráz I holoenzimével nick-transzlálhatóak voltak. Az újonnan szintetizált száalba fluorescein-12-dUTP nukleotidokat építettem be. A biotin-jelölt hibridet streptavidinnel bevont mikrogöngyre kötöttem és áramlási citométeren mértük a fluoreszcencia növekedést (22.C ábra).

¹¹ A kísérletek egy részét Pataki Judit Ph.D. hallgatóval közösen végeztem.



21. ábra: Deléció és inszerció áramlási citometriás vizsgálata ssDNS enzimatis és kémiai hasításával. **A.** A módszer elve. Rövid és hosszú PCR termékét készítettünk különböző, Cy3, ill. 6FAM-jelölt szensz és azonos, biotin-jelölt antiszensz primerekkel. A keletkezett PCR termékeket összekevertük, denaturáltuk, majd reanneáltuk. A kapott homo- és heteroduplexeket S1 nukleáz, ill. hidroxilamin/piperidin kezelésnek tettük ki, majd streptavidin bevonatú mikrogyöngyhöz kötöttük és áramlási citométerrel mértük. Fehér csillag: 6FAM; fekete csillag: Cy3, b: biotin. **B.** Heteroduplex (szürke oszlop) és homoduplex (fekete oszlop) FL1 és FL2 intenzitás változása S1 nukleáz emésztést követően. **C.** Heteroduplex (szürke vonal) és homoduplex (fekete vonal) FL1 és FL2 intenzitás változása S1 nukleáz emésztést követően, különböző hőmérsékleten. **D.** Heteroduplex (szürke oszlop) és homoduplex (fekete oszlop) FL1 és FL2 intenzitás változása hidroxilamin/piperidin emésztést követően.



22. ábra: Ss folytonossághiányok áramlási citometriás detektálása nick-transzlációt követően. **A.** A módszer elve. *Xba* I emésztett és emésztetlen, biotinált PCR termékeket összekevertünk, denaturáltunk és rehibridizáltunk. Ennek eredményeként kétfajta hibridet kaptunk. DNS polimeráz I enzimmel fluorescein-konjugált nukleotidot építettünk be nick-transzláció során. **B.** A különböző PCR termékek gélelektroforetikus képe. 1. FITC- (szensz) és biotin-jelölt (antiszensz) PCR termék; 2. *Xba* I emésztett, FITC jelölt PCR termék; 3. jelületlen primerekkel készült, *Xba* I emésztett PCR termék; 4. FITC-jelölt és biotin-jelölt PCR termékek hibridje; 5. *Xba* I emésztett, FITC-jelölt és biotinnal jelölt, emésztetlen PCR termékek hibridje; 6. *Xba* I emésztett, jelületlen és biotinnal jelölt, emésztetlen PCR termékek hibridje; M. 1 kb DNA marker (GeneRuler). (A 4. és 5. minta azonos a 23. D ábra 'f', ill. 'd' csúcsával.) **C.** Mikrogyöngyök fluoreszcencia intenzitásának eloszlási histogramja. A mikrogyöngyökhöz kötött hibridekbe nick-transzláció segítségével fluorescein-dUTP-t építettünk. I. üres streptavidinált mikrogyöngy; II. *Xba* I emésztett, jelületlen és biotinált PCR termék hibridje;

III. *Xba* I emésztett, jelöletlen és biotinált PCR termék hibridje 10 perces fluorescein-dUTP beépítés után; IV. *Xba* I emésztett, jelöletlen és biotinált PCR termék hibridje 45 perces fluorescein-dUTP beépítés után; V. *Xba* I emésztett, jelöletlen és biotinált PCR termék hibridje 1,5 órás fluorescein-dUTP beépítés után. **D.** Mikrogyöngyök fluoreszcencia intenzitásának eloszlási hisztogramja. A mikrogyöngyökhöz kötött hibridekbe nick-transzláció segítségével fluorescein-dUTP-t építettünk, hasonlóan a C. ponthoz, de a PCR termékek előállításához FITC-jelölt szensz primert használtunk. 'a-c': háttér fluoreszcencia: a mikrogyöngyöket FITC-jelölt (a) vagy biotinált (b) PCR termékkel inkubáltuk, ill. üres mikrogyöngyöket analizáltuk; 'd-e': *Xba* I emésztett (d) vagy emésztetlen (e) FITC-jelölt és biotinált PCR termék hibridje; f: FITC- és biotin-jelölt PCR termék; g: biotin jelölt PCR termék nick-transzlációt követően; h: *Xba* I emésztett, jelöletlen és biotinált PCR termék hibridje nick-transzlációt követően; i: *Xba* I emésztett, FITC-jelölt és biotinált PCR termék hibridje nick-transzlációt követően.

5. Megbeszélés¹²

5. 1. Hurok-méretű kromatin fragmentáció vizsgálata élesztő sejtekben

Normál eukarióta sejtekből hagyományos – pl. lizált sejtek proteolitikus emésztését követő fenol-kloroform extrakcióján és etanol precipitációján vagy szilikát adszorpción alapuló – eljárásokkal izolált kromatin ~50 kb-os DNS fragmentációt mutat. Ez az átlagos fragmentumméret a DNS pakolódás magasabb szintjét képviselő kromatin hurkok mérettartományába esik. Ugyanakkor a lízist megelőzően a sejteket agarózba ágyazva a fragmentáció elkerülhető. A fenti megfigyeléseket *S. cerevisiae*-ből és *S. pombe*-ből oldatban ill. agarózba ágyazást követően izolált DNS esetében reprodukáltam, továbbvizsgáltam és a jelenségek olyan szabályszerűségeit figyeltem meg, melyek nem magyarázhatók pusztán random folyamatokkal.

A munkacsoportunk által korábban megfigyelt egészséges, nem apoptotikus humán sejtekben megfigyelt fragmentációs mintázat nagyfokú hasonlóságot mutat a korai apoptotikus sejtekben megjelenő fragmentációhoz, amelyet általában az ~50 kb-os hurkok alapjánál működő nukleázoknak tulajdonítanak (20,101). Mivel a multicelluláris szervezetek esetében jellemző apoptotikus jegyek megjelenését – többek között a DNS fragmentációját – élesztő sejtekben is leírták, fontos hangsúlyozni, hogy kolónia képzési teszt segítségével igazoltam az általam használt élesztősejtek normális, ~100%-os életképességű, nem apoptotikus állapotát mind logaritmikus, mind stacioner fázisban.

Az *Aspergillus oryzae*-ből származó S₁ nukleáz magas szelektivitást mutat az egyszálú nukleinsavak iránt. Működése mono- és oligonukleotidokat eredményez, amelyek 5'-foszforil és 3'-hidroxil csoportban végződnek. Az S₁ nukleáz hidrolizálja a szimpla-szálú régiókat a duplex DNS-ben és ez által felfedi a lokálisan átalakult struktúrákat. A szimplaszál-specifikus S₁ nukleáz preferálja a nick-ekkel szemben lévő DNS-t, a mung bean nukleázhoz hasonlóan (102). Mivel a deproteinizált kromatint tartalmazó agaróz blokkokat S₁ nukleáz emésztését követően hurok-méretű fragmentumok megjelenését figyeltem meg, ez a genomi DNS-ben előforduló egyszálú DNS szakaszok jelenlétét igazolja. Ezek az egyszálú DNS szakaszok valószínűleg a genomi DNS-ben előforduló ss folytonossághiányok eredménye, hiszen hurok-méretű fragmentációt figyeltem meg deproteinizált kromatint tartalmazó agaróz blokkok urea

¹²A jelenségkör elfogulatlan újragondolása érdekében a diszkusszió következtetéseire a munkám keretében nyert, itt leírt adatok alapján jutottam, csoportunk már publikált és publikálatlan eredményeire csak annyira támaszkodtam, amennyire az elkerülhetetlen volt.

jelenlétében történő denaturációja, ill. alkalikus denaturációja esetében is, márpedig a denaturáló eljárások a másodlagos struktúrák jelenlétére érzékenyek. Az urea/hő denaturáció módszere az urea DNS destabilizáló hatásán alapul. A módszert elsőként Materna és mts. írták le kisebb méretű PCR termékek esetén (98), azonban a módszer nagymolekula-súlyú DNS esetén is alkalmazható és segítségével ss és dsDNS ugyanazon gélen futtatható (68). Az urea jelenlététől azt várhatjuk, hogy teljesen deproteinizálja a kromatint az agaróz blokkokon belül (103). Az is ismert, hogy az urea bázis összetételtől függetlenül csökkenti a T_m hőmérsékletet mólónként ~ 3 K-nel (104). Az alkalikus gélelektroforézis során a magas pH következtében a timidin és guanin elveszít egy protont, így megakadályozva a H-híd kialakulását/fenntartását az adenin, ill. citozin partnerükkel (105). Az S1-kezelt és kezeletlen kromatinból urea/hő denaturációval nyert minták méretének összehasonlításából arra következtettünk, hogy az egyszálú bemetszések a szemben lévő két DNS szálon egymás közelében helyezkedhetnek el.

Az agarózba ágyazott kromatin egymáshoz közeli, de nem pontosan szemben lévő nick-ei mentén a deproteinizálás kapcsán kialakuló torziós stressz nem tudja széttekerni és eztáltal dezintegrálni a DNS-t, míg DNS izolálás során ezt nincs mi megakadályozza. Az ilyenkor lezajló ~ 50 kb-os fragmentációban szerepet játszhatnak mechanikai nyíróerők, amennyiben a kromatinban már korábban jelen lévő egyszálú folytonossághiányokkal szemben lévő DNS-t érintik (az egyszálú DNS ugyanis sokkal érzékenyebb a DNS-t károsító hatásokra, mint a kettős szálú DNS). Ezzel magyarázható lenne a DNS izolálás és az S1 nukleáz emésztés eredményének hasonlósága is. Az is elképzelhető azonban, hogy a másik szálon már szintén jelenlévő nick mentén egyszerűen széttekerődik a DNS, ds fragmenteket létrehozva. Ugyanez beágyazott sejteken csak az urea/hő (vagy az alkalikus) denaturáció kapcsán lenne megfigyelhető.

A nick-ek, azaz ss törések vagy a lízis során generálódnak, vagy eleve jelen lehetnek *in vivo*. Az első esetben arra következtethetünk, hogy a hurok-méretű régiókat kijelölő nukleáz hiperszenzitív helyek az egész élesztő kromatinban jelen lehetnek, hasonlóan az emlős kromatinhoz (106), és ezen szakaszok azonnal hasítódhatnak a sejtlízis során, mely magyarázatul szolgálna mind az urea/hő-denaturáció, mind az S1 nukleáz kezelés után kapott fragmentációra. Egy alacsony szintű, ss-specifikus nukleáz emésztés révén nick-ek akumulálódhatnak a nukleoszóma-mentes régiókban. A nukleáz tartalom talán magasabb lehet az életképes stacioner kultúrákban, mely magyarázná a kezelésekre adott komplettebb válaszokat *S. cerevisiae* sejtek esetében (5. ábra), a jelenséget azonban nem vizsgáltam tovább, mivel *S. pombe* esetében nem mutattam ki hasonló különbséget a logaritmusos és

stationer növekedési fázisok között. A másik lehetőség, hogy a nick-ek már eleve, a feltárást megelőzően is jelen vannak a genomi DNS-ben, és fenntarásukban, maszkírozásukban fehérjéknek, RNS molekuláknak is szerepe lehet (1).

Megvizsgáltuk, hogy a hurok-méretű fragmentációt befolyásolja-e és ha igen hogyan, a DNS másodlagos tekeredése. Interkalálódó festék hozzáadásával elérhető (1), hogy az élesztő sejtek DNS-e alultekert állapotból kitekeredjen és a festék koncentrációjának növelésével akár túltekert állapot is előidézhető. Interkalálódó festékként az EBr-t használtuk, melyről kimutattuk, hogy képes belépni az élő protoplasztokba és ott a DNS-hez kötődni (itt nem dokumentált adat, összhangban az irodalommal (107,108). Azt tapasztaltuk, hogy sem az S1 kezelés, sem az urea/hő-denaturáció során keletkező fragmentumok mérete nem változott az EBr koncentráció függvényében. Mivel a szuperhelicitás nem befolyásolta a kezelésekor keletkező fragmentumok méretét, valószínűtlennek tűnik egy olyan interpretáció, mely a hurkonként átlagosan egy nick keletkezését azzal magyarázná, hogy az első (random, vagy a BUR-oknál, de aspecifikus nukleáz hatásra generálódó) nick létrejötte nyomán relaxálódó – így teljes terjedelmükben renaturálódott – kromatin hurkok már további sérülésekre kevésbé érzékenyek lennének.

A humán kromoszómák nagy méretűeknek (átlagosan 145 Mb) (109) köszönhetően intakt állapotban nem képesek belépni az agaróz mátrixba, így szeparációjuk sem lehetséges gélelektroforézis segítségével. Ezzel szemben mind a pékélesztő (220-2200 kb), mind a sörélesztő (3,5-5,7 Mb) kisméretű, intakt kromoszómái elválaszthatóak nagyobb molekulású DNS elválasztására alkalmas gélelektroforetikus módszerek (CHEF, FIGE) segítségével, lehetőséget teremtve az egyes élesztő kromoszómák fragmentációjának összehasonlítására. Az egyes kromoszómák meglehetősen hasonló gén-sűrűséggel, szekvencia összetétellel, valamint epigenetikus sajátosságokkal rendelkeznek, beleértve a DNS pakolódás mértékét is *S. cerevisiae*-ben, valamint *S. pombe*-ban. Így nem meglepő, hogy a DNS törések előfordulásában nem találtunk különbségeket a különböző kromoszómák között – ami arra utalt, hogy a folytonossághiányok jellemzése (térképezése) bármelyik kromoszómán globális, a teljes genomra vonatkozó szabályszerűségek felderítésére adhat alkalmat. Ezekben a kísérletekben a deproteinizált kromatin minták első elektroforetikus futtatása során az egyes kromoszómák (változó mértékben) megszabadulnak a lizátumban meglévő molekuláris környezetüktől, így az S1 emésztés vagy urea/hő denaturálás már ilyen tisztább mintákon történik. Az így nyert fragmentációs eloszlás nem különbözött attól, amit egy lépésben kaptunk, ami arra utal, hogy a lizátum egyéb komponensei (pl. nukleázok) nem játszanak meghatározó szerepet a jelenség előidézésében.

A hurok-méretű fragmentáció mérettartománya egybeesik a kromatin funkcionális (transzkripciós és replikációs) egységeinek becsült méretével (20,109). Ezért felmerül a kérdés, hogy a nick-ek jelenléte ezen folyamatok valamelyikéhez kapcsolható-e, pl. jelenlétük a DNS tranzienst vagy stabil kapcsolatát tükrözheti a topoizomeráz enzimekkel a transzkripciós strathelyek és/vagy a replikációs origók körül (110).

Mivel az ss töréspontok Southern blot térképezéssel az I. kromoszómán ARS szekvenciák tágabb környezetében helyezkedtek el, ezért felvetődött a nick-ek kapcsolata a DNS replikációval. Bár a hurokméretű fragmentáció jelensége nem korlátozódott csupán az S-fázisra, az a sejtciklus minden fázisában egyaránt megfigyelhető volt, a DNS replikáció ORC-inek (origin recognition complex) egyes elemei a sejtciklus során végig a DNS-hez kötött állapotban vannak, így ezekkel összefüggésben lehetnének jelen az észlelt nick-ek.

Ugyanakkor a nagy molekulású DNS molekulák gélelektroforetikus feloldása nem biztosított kellő ponosságot annak eldöntésére, hogy a nick-ek és az ARS szekvenciák között valódi kolokalizáció van-e. Ezért az alábbiakban tárgyalt, rDNS lókuszon finomabb feloldásban végzett térképezésem részletesebben analizált adataiból adódó következtetésemet erősebb állításnak tartom.

A tipikus *S. cerevisiae* kromoszómákra jellemző, hogy a telomerikus régiókat leszámítva főleg egyedi, nem repetitív DNS-t tartalmaznak. A többi kromoszómától eltérően, a XII. kromoszóma több, mint felét azonban tandem ismétlődő szekvencia, az rDNS alkotja. Az ismétlődő természetéből fakadóan sajátos felépítésű rDNS klaszter esetében előfordulhatna, hogy a hurok-méretű fragmentáció eltérő mintázatot mutat, összevetve a fennmaradó, főleg egyedi szekvenciákat hordozó kromoszómák fragmentációs mintázatával. Kísérleteim alapján azonban a XII. kromoszóma és azon belül az rDNS klaszter ugyanazt az ~50 kb-os fragmentációt mutatja S1 kezelést követően és denaturáló körülmények között, mint amit a többi kromoszóma esetében is tapasztaltunk. Ez a fragmentációs gyakoriság azt jelenti, hogy átlagosan 11 egységenként egyszálú töréseknek kellene előfordulniuk. Mivel az egyes egységek szekvenciájuk tekintetében azonos felépítésűek, ezért a fragmentáció hátterében valamilyen epigenetikus mechanizmus állhat.

Az RDN1 lókuszbán helyet foglaló minden egyes kópia egy 35S és 5S transzkripciós egységet tartalmaz, melyeket egymástól két intergénikus szekvencia (IGS1 és IGS2), vagy más néven nem átíródó szekvencia (NTS1 és NTS2) választ el. Az RNS polimeráz I által átírt 35S prekursor rRNS-ből a közös promoterről átíródó 18S, 5,8S és 25S rRNS-ek keletkeznek. A 5S átírását az RNS polimeráz III végzi (111). A replikációs origókat kijelölő ARS szekvenciák az RDN1 lókuszból NTS2 régiójában helyezkednek el. Az NTS1 régiójában belül

pedig a replikációs villa barriert (RFB) találjuk, melyhez a Fob1 protein kötődve biztosítja az ARS szekvencia aktivációját követően kialakult replikációs villa elakadását az egyik irányban, míg poláris működésének köszönhetően, a másik irányba az szabadon haladhat, átlagosan 5 kópiát írva át. Ez a mód biztosítja az rDNS replikációjának unidirekcionális voltát, ill. ennek köszönhető, hogy a 35S egység replikációjának iránya túlnyomórészt megegyezik a transzkripciójának irányával (111).

A restriktív enzimekkel az rDNS klaszter 9,1 kb-os egységeire bontását követően a nick-ek szabályos előfordulását (manifesztációját) figyeltem meg a minták S1 nukleáz kezelését, ill. urea/hő denaturációja nyomán. A Southern blottal a két szálon egymással nagyjából szemben kimutatott egy-egy valódi nick azonban, az I. kromoszómán megfigyeltekkel ellentétben, nem az ARS szekvenciák közelében lokalizálódott, hanem konzekvens módon az RFB területére esett. (Annak gyakoriságáról, hogy a két szálon talált nick-ek együtt, egy egységen belül egyszerre forduljanak elő, nem nyertem adatokat.)

Egy saját fejlesztésű metodikával, az „Ab-Southern” módszerrel kimutattam, hogy a nick-ek nem az ARS szekvenciák környezetében helyezkednek el az rDNS kópiákon belül. Ugyanakkor az RFB-nél lévő nick-ek jelenlétét az eredmények alátámasztani látszanak. Ezzel a technikával azt is valószínűsítettem, hogy az RFB-nél észlelt nick a restriktív enzim kezelés előtt már jelen volt a DNS-ben, vagyis nem artefaktuális eredetű.

Az „Ab-Southern” módszerrel azt is kimutattam, hogy az rDNS klaszter RNS/DNS hibrideket tartalmaz, melyek eloszlása egy kópián belül színén nem random: a nick-ek elhelyezkedéséhez hasonlóan, az ARS szekvenciák környezetében nem mutathatóak ki RNS/DNS hibridek, míg a RFB-t hordozó fragmentumok jól jelölődtek. Ez alátámasztja munkacsoportunk azon hipotézisét, mely szerint a hurok-mértű fragmentációt kijelölő nick-ek környezetében RNS/DNS hibridek fordulnak elő (1).

Az RFB-n belül három kisebb helyet különböztethetünk meg: RFB1, RFB2, RFB3. A replikációtól és Fob1-től függő DNS törést detektáltak az RFB1 és RFB2 helyeken, amelyek azonban a lókuszt összes DNS-ének csak kis frakcióját teszik ki. Az RFB2 és RFB3 esetében pedig a replikációtól független DNS töréseket találtak, amely törések valószínűleg a topoizomeráz I enzim működésének köszönhetőek. Ez utóbbi törések bár függetlenek a replikációtól, az RNS polimeráz I általi transzkripciótól és a kromatin struktúrától, úgy tűnik a topoizomeráz I hasításhoz a Fob1 jelenléte szükséges. Elképzelhető, hogy a Fob1 kötődése úgy torzítja DNS-t, hogy az kedvező a topoizomeráz I működésének (112). Az általunk észlelt folytonossági hiányok ebbe a képbe illeszkednek, további vizsgálatukat ebben az összefüggésben tervezzük, azt feltételezve, hogy az RFB területén észlelt nick-ek molekuláris

mechanizmusa hasznos analógiát jelent a kromatin más területein bekövetkező hurokméretű fragmentáció vonatkozásában is.

5. 2. 1. Folytonossághiányok detektálására alkalmas gélelektroforetikus módszer fejlesztése

Az urea/hő-denaturálás következtében egyszálúvá vált DNS fragmentumok az 1-20 kb-ig terjedő mérettartományban szeparáltan futtattak agarózgélben. Míg a ds DNS fragmentumok migrációját elsősorban azok mérete határozza meg és a nukleotid szekvenciájuk kevésbé befolyásolja azt, az ss DNS fragmentumok esetében mindkét paraméternek szerepe van a futási tulajdonságok meghatározásában.

Ha a két DNS szál bázisösszetétele eltér egymástól, az a szálak különböző konformációs állapotának kialakulását eredményezheti, a kisméretű DNS fragmentekre kidolgozott SSCP (single strand conformation polymorphism) módszerek (113) tapasztalatainak megfelelően. Másrészt, a bázisok és a denaturáló ágens között dinamikus interakció valósulhat meg, ami befolyásolhatja a két szál konformációjának különbségét. A bázisösszetételbeli különbségek különböző 3D struktúra kialakulásához vezethetnek, mely a két szál migrációs sebességében is tükröződik a gélelektroforézis során.

Munkámban az urea-gélelektroforézis ezen új alkalmazását DNS folytonossághiányok rDNS egységeken belüli szál-specifikus elhelyezkedésének vizsgálatára használtam. Ugyanakkor pl. ss szondák készítésére vagy CpG metiláció szál-specifikus vizsgálatára felhasználható lehet. Ez a módszer a sejtbiológia számos területén szintén hasznos lehet, többek között DNS szintézis során a vezető és késlekedő szál vizsgálatára, akár az „immortal strand” hipotézis vizsgálatára, vagy repair folyamatok szál-specifikus analízisére. Alkalmas lehet továbbá élesztőben párosodási típus váltás vizsgálatára, ahol a késlekedő szálon lévő specifikus nick eddig ismeretlen módon generálódik, a topoizomeráz I-mediálta hasítások analízisére, vagy az immunglobulin nehéz lánc régióinál a „class switch” rekombináció mechanizmusának vizsgálatára.

5. 2. 2. Génátrendeződésre és folytonosságghiányok detektálására alkalmas áramlási citometriás módszerek fejlesztése

Általános benyomás szerint a daganatos betegségek hátterében álló többféle genetikai elváltozás forrópontjai nem-random megoszlást mutatnak, sokkal inkább egy vagy néhány viszonylag rövidebb régióba (bcr) csoportosulnak. Pl. az MLL gén átrendeződése a 8,3 kb-os bcr régióon belül reciprok transzlokációval bármely potenciális partnergénnel gyermekkori és posztterápiás leukémiák kialakulásához vezethet. Az MLL bcr szintén preferált lokusz a DNS hasítására és átrendeződésére a topoizomeráz inhibitorok vagy FAS ligand által indukált apoptózis során. Nagyon izgalmas kérdés az általunk detektált folytonosságghiányok / hiperszenzitív pontok és ezen forrópontok egyes csoportjainak esetleges korrelációja. A DNS folytonosságghiányok vizsgálatában szerzett tapasztalataimra építve, genotoxikus hatások szűrésére alkalmas módszerek kidolgozásában is részt vettem. Mikrogyöngyökön immobilizált PCR termékek áramlási citometriás analízisével módszereket dolgoztam ki gyakori genetikai elváltozások kimutatására - a kidolgozott módszerek tesztelése egyelőre csak modell rendszereken történt meg, a mérési elv verifikálása szintjén.

A deléciók és inszerciók gyakori genetikai módosulások, melyeknek szerepe lehet genetikai betegségekben és rákos elváltozásokban, ahogy az általánosan ismert és szintén hozzájárulnak a normál mutációs rátához. Mozgékony genetikai elemek, vírusok, javítatlan 1 nukleotid csúszás a replikáció során, triplet expanzio a leggyakoribb deléció/inszerciót kiváltó okok között szerepelnek. Ezek egyben az általunk bemutatott, áramlási citometrián alapuló heteroduplex analízissel vizsgálható jelenségek is. Egy másik potenciális alkalmazási terület az alternatív splicing, amikor cDNS szolgálhatna az amplifikáció teszt-templátjaként.

A nem folytonos DNS fragmentumok a vele komplementer, de folytonos DNS molekulákkal hibridizálva könnyen detektálhatók nick transzlációval fluoreszcens nukleotid analógok használatával. Ezt a stratégiát alkalmazva, a sejtekben megjelenő ss vagy (tranzien) ds diszkontinuitások jelenlétének monitorozása, többek között az apoptotikus stimulusokra érzékenyen reagáló MLL bcr esetén, reményeink szerint lehetségessé válik. A módszer alkalmazható lehet a hely-specifikus nick-ek analízisére, amelyeket többek között aktív promotereknél, replikációs origók mellett, VDJ átrendeződés kapcsán, vagy élesztő párosodási típus váltás során figyeltek meg. Egy ilyen vizsgálat kivitelezéséhez szükség lesz egy genomi DNS mintára, amelyből a megfelelő restriktív enzimmel a minket érdeklő régiót kivágjuk és

egy biotin jelölt, plazmidról származó szondával hibridizáljuk. A hibridek nick-transzlálhatóak, ha genomi minta DNS-ben diszkontinuitások vannak, míg annak hiányában nem várunk beépülést.

A tesztelt stratégiák bemutatják az áramlási citometriás mikrogyöngyös vizsgálatok sokszínűségét és kiterjesztik a lehetőségek határait. A modell rendszert használó vizsgálatok közvetlenül alkalmazhatóak HTP szűrési eljárásokra specifikus genetikai kondícióknál, valamint áramlási citometriás eszköztárat adnak a molekuláris biológiai DNS analízishez (110).

6. Összefoglalás

Kolónia-képzési teszttel igazoltam, hogy a kromatin fragmentációs jelenséget nem-apoptotikus, 100 %-os életképességű élesztő sejtek mutatják.

Logaritmikus és stacioner fázisú *S. cerevisiae* és *S. pombe* sejtekből származó, agarózba ágyazott deproteinizált kromatin 20-200 kb-os fragmentációját figyeltem meg S1 nukleáz emésztésüket, urea/hő-denaturációjukat, ill. alkalikus denaturálásukat követően egyaránt. Megállapítottam, hogy mindkét genomban hurok-méretű szakaszokat határoló egyszál folytonosságihiányok találhatóak.

S. cerevisiae sejteket G1-, S- és G2 sejtciklus fázisban szinkronizálva sem találtam számottevő eltérést a teljes genom fragmentációs mintázatában.

Megállapítottam, hogy a hurok-méretű kromatin fragmentáció minden kromoszómára kiterjed S1 nukleáz, ill. urea/hő-denaturálást követően.

S. cerevisiae I. kromoszómáján a hurok-méretű fragmentumokat kijelölő nick-ek és ARS szekvenciák egymás tágabb környezetében helyezkednek el.

S. cerevisiae esetében kimutattam, hogy a 100-200 tandem ismétlődő, azonos szekvenciájú 9,1 kb-os egységekből felépülő mintegy 1,5 Mb-nyi rDNS klaszter hurok-méretű fragmentációt mutat, az össz-DNS-hez hasonlóan, S1 nukleáz és urea/hő-denaturálás hatására. Ez azt jelenti, hogy átlagosan minden 11. egységen belül fordulnak elő nick-ek – vagyis ezek előfordulását epigenetikai tényezők határozzák meg.

rDNS specifikus Southern szonda segítségével térképeztem az rDNS szakaszokon belül a hurok-méretű fragmentációt kijelölő nick-ek helyét. Behatároltam annak a régióknak a helyét az rDNS egységeken belül, ahol a nick-ek előfordulása szabályosságot mutat: ez a RFB-ével esett egybe.

Folytonosságihiányok és RNS/DNS hibridek kimutatására alkalmas „Ab-Southern” módszert dolgoztam ki.

Új elektroforetikus és mikrogöngy alapú áramlási citometriás módszereket dolgoztam ki.

Summary

By the colony-forming test, I confirmed that the chromatin fragmentation phenomena observed reflect features of ~ 100 % viable cells.

20-200 kb fragmentation of agarose embedded deproteinized *S. cerevisiae* and *S. pombe* chromatin derived from logarithmic or stationary cultures were observed after S1 nuclease digestions and urea/heat- or alkaline denaturation, establishing that there are ss discontinuities marking loop-sized fragments in the genome of both yeast strains.

I have not determined differences in the DNA fragmentation patterns of cells synchronized in G1-, S- or G2 phases.

I have established that the loop-sized fragmentation can be detected in all of chromosomes of *S. cerevisiae* or *S. pombe* after S1 nuclease digestions and urea/heat-denaturations.

Nicks and ARS sites exhibited an overall colocalization on chromosome I of *S. cerevisiae*.

The ~1.5 Mb rDNA cluster containing 100 – 200 units of 9.1 kb showed loop-sized fragmentations similar to total DNA, i.e. nicks occur in every 11. unit on the average.

The nicks in the rDNA units were mapped by Southern blotting using rDNA specific probes. One of the nicks coincides with a region of RFB.

I have developed a new method called “Ab-Southern” to detect discontinuities and RNA/DNA hybrids in DNA molecules.

New gelelectrophoretic and flow-cytometric microbead assays have been established as part of my Ph.D. work.

7. Közlemények

Az értekezésben felhasznált közlemények

1. Szekvolgyi L, Rakosy Z, Balint BL, Kokai E, Imre L, Vereb G, Bacso Z, Goda K, Varga S, Balazs M and others. Ribonucleoprotein-masked nicks at 50-kbp intervals in the eukaryotic genomic DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(38):14964-9.
2. Kornberg RD, Lorch Y. Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell* 1999;98(3):285-94.
3. Felsenfeld G, Groudine M. Controlling the double helix. *Nature* 2003;421(6921):448-53.
4. Dorigo B, Schalch T, Kulangara A, Duda S, Schroeder RR, Richmond TJ. Nucleosome arrays reveal the two-start organization of the chromatin fiber. *Science* 2004;306(5701):1571-3.
5. Kasinsky HE, Lewis JD, Dacks JB, Ausio J. Origin of H1 linker histones. *Faseb J* 2001;15(1):34-42.
6. Swedlow JR, Hirano T. The making of the mitotic chromosome: modern insights into classical questions. *Mol Cell* 2003;11(3):557-69.
7. Schalch T, Duda S, Sargent DF, Richmond TJ. X-ray structure of a tetranucleosome and its implications for the chromatin fibre. *Nature* 2005;436(7047):138-41.
8. Woodcock CL, Woodcock H, Horowitz RA. Ultrastructure of chromatin. I. Negative staining of isolated fibers. *J Cell Sci* 1991;99 (Pt 1):99-106.
9. Robinson PJ, Fairall L, Huynh VA, Rhodes D. EM measurements define the dimensions of the "30-nm" chromatin fiber: evidence for a compact, interdigitated structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(17):6506-11.
10. Kireeva N, Lakonishok M, Kireev I, Hirano T, Belmont AS. Visualization of early chromosome condensation: a hierarchical folding, axial glue model of chromosome structure. *J Cell Biol* 2004;166(6):775-85.
11. Trojer P, Reinberg D. Facultative heterochromatin: is there a distinctive molecular signature? *Mol Cell* 2007;28(1):1-13.
12. Oberdoerffer P, Sinclair DA. The role of nuclear architecture in genomic instability and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8(9):692-702.
13. Hall IM, Shankaranarayana GD, Noma K, Ayoub N, Cohen A, Grewal SI. Establishment and maintenance of a heterochromatin domain. *Science* 2002;297(5590):2232-7.
14. Gartenberg M. Heterochromatin and the cohesion of sister chromatids. *Chromosome Res* 2009;17(2):229-38.
15. Shukla A, Chaurasia P, Bhaumik SR. Histone methylation and ubiquitination with their cross-talk and roles in gene expression and stability. *Cell Mol Life Sci* 2009;66(8):1419-33.
16. Ringrose L, Ehret H, Paro R. Distinct contributions of histone H3 lysine 9 and 27 methylation to locus-specific stability of polycomb complexes. *Mol Cell* 2004;16(4):641-53.
17. Gasser SM. Visualizing chromatin dynamics in interphase nuclei. *Science* 2002;296(5572):1412-6.
18. Nickerson J. Experimental observations of a nuclear matrix. *J Cell Sci* 2001;114(Pt 3):463-74.
19. Yanagida M. Higher-order chromosome structure in yeast. *J Cell Sci* 1990;96 (Pt 1):1-3.

20. Bode J, Benham C, Ernst E, Knopp A, Marschalek R, Strick R, Strissel P. Fatal connections: when DNA ends meet on the nuclear matrix. *J Cell Biochem Suppl* 2000;Suppl 35:3-22.
21. Heng HH, Goetze S, Ye CJ, Liu G, Stevens JB, Bremer SW, Wykes SM, Bode J, Krawetz SA. Chromatin loops are selectively anchored using scaffold/matrix-attachment regions. *J Cell Sci* 2004;117(Pt 7):999-1008.
22. Kipp M, Gohring F, Ostendorp T, van Drunen CM, van Driel R, Przybylski M, Fackelmayer FO. SAF-Box, a conserved protein domain that specifically recognizes scaffold attachment region DNA. *Mol Cell Biol* 2000;20(20):7480-9.
23. Ottaviani D, Lever E, Takousis P, Sheer D. Anchoring the genome. *Genome Biol* 2008;9(1):201.
24. Heng HH, Chamberlain JW, Shi XM, Spyropoulos B, Tsui LC, Moens PB. Regulation of meiotic chromatin loop size by chromosomal position. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(7):2795-800.
25. Courbet S, Gay S, Arnoult N, Wronka G, Anglana M, Brison O, Debatisse M. Replication fork movement sets chromatin loop size and origin choice in mammalian cells. *Nature* 2008;455(7212):557-60.
26. Adachi Y, Kas E, Laemmli UK. Preferential, cooperative binding of DNA topoisomerase II to scaffold-associated regions. *Embo J* 1989;8(13):3997-4006.
27. Luderus ME, den Blaauwen JL, de Smit OJ, Compton DA, van Driel R. Binding of matrix attachment regions to lamin polymers involves single-stranded regions and the minor groove. *Mol Cell Biol* 1994;14(9):6297-305.
28. Liebich I, Bode J, Reuter I, Wingender E. Evaluation of sequence motifs found in scaffold/matrix-attached regions (S/MARs). *Nucleic Acids Res* 2002;30(15):3433-42.
29. Boyle AP, Davis S, Shulha HP, Meltzer P, Margulies EH, Weng Z, Furey TS, Crawford GE. High-resolution mapping and characterization of open chromatin across the genome. *Cell* 2008;132(2):311-22.
30. Mucha M, Lisowska K, Goc A, Filipinski J. Nuclease-hypersensitive chromatin formed by a CpG island in human DNA cloned as an artificial chromosome in yeast. *J Biol Chem* 2000;275(2):1275-8.
31. Svetlova E, Avril-Fournout N, Ira G, Deschavanne P, Filipinski J. DNase-hypersensitive sites in yeast artificial chromosomes containing human DNA. *Mol Gen Genet* 1998;257(3):292-8.
32. Wood V, Gwilliam R, Rajandream MA, Lyne M, Lyne R, Stewart A, Sgouros J, Peat N, Hayles J, Baker S and others. The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* 2002;415(6874):871-80.
33. Sipiczki M. Where does fission yeast sit on the tree of life? *Genome Biol* 2000;1(2):REVIEWS1011.
34. Levin DE. Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 2005;69(2):262-91.
35. Sherman F. Getting started with yeast. *Methods Enzymol* 2002;350:3-41.
36. Bitterman KJ, Medvedik O, Sinclair DA. Longevity regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: linking metabolism, genome stability, and heterochromatin. *Microbiol Mol Biol Rev* 2003;67(3):376-99, table of contents.
37. White CL, Suto RK, Luger K. Structure of the yeast nucleosome core particle reveals fundamental changes in internucleosome interactions. *Embo J* 2001;20(18):5207-18.
38. Eichler EE, Sankoff D. Structural dynamics of eukaryotic chromosome evolution. *Science* 2003;301(5634):793-7.
39. Link AJ, Olson MV. Physical map of the *Saccharomyces cerevisiae* genome at 110-kilobase resolution. *Genetics* 1991;127(4):681-98.

40. Philippsen P, Stotz A, Scherf C. DNA of *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol* 1991;194:169-82.
41. Richard GF, Fairhead C, Dujon B. Complete transcriptional map of yeast chromosome XI in different life conditions. *J Mol Biol* 1997;268(2):303-21.
42. Bendich AJ. Structural analysis of mitochondrial DNA molecules from fungi and plants using moving pictures and pulsed-field gel electrophoresis. *J Mol Biol* 1996;255(4):564-88.
43. Khuu P, Sandor M, DeYoung J, Ho PS. Phylogenomic analysis of the emergence of GC-rich transcription elements. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(42):16528-33.
44. Potter T, Kohnlein W. Pulsed-field gel electrophoresis of chromosomal DNA of *Saccharomyces pastorianus* after exposure to x-rays (30-50 keV) and neutrons (14 MeV). *Radiat Environ Biophys* 2001;40(1):39-45.
45. Kobori T, Yoshino T, Sugiyama S, Ohtani T. Hierarchical chromatin structure of *Schizosaccharomyces pombe* revealed by atomic force microscopy. *Curr Microbiol* 2003;47(5):404-7.
46. Gottschling DE, Berg BL. Chromosome dynamics: yeast pulls it apart. *Curr Biol* 1998;8(3):R76-9.
47. Ludovico P, Sousa MJ, Silva MT, Leao C, Corte-Real M. *Saccharomyces cerevisiae* commits to a programmed cell death process in response to acetic acid. *Microbiology* 2001;147(Pt 9):2409-15.
48. Madeo F, Frohlich E, Frohlich KU. A yeast mutant showing diagnostic markers of early and late apoptosis. *J Cell Biol* 1997;139(3):729-34.
49. Tomei LD, Shapiro JP, Cope FO. Apoptosis in C3H/10T1/2 mouse embryonic cells: evidence for internucleosomal DNA modification in the absence of double-strand cleavage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(3):853-7.
50. Ploski JE, Aplan PD. Characterization of DNA fragmentation events caused by genotoxic and non-genotoxic agents. *Mutat Res* 2001;473(2):169-80.
51. Parrish JZ, Xue D. Cuts can kill: the roles of apoptotic nucleases in cell death and animal development. *Chromosoma* 2006;115(2):89-97.
52. Widlak P, Garrard WT. Roles of the major apoptotic nuclease-DNA fragmentation factor-in biology and disease. *Cell Mol Life Sci* 2009;66(2):263-74.
53. Ohsato T, Ishihara N, Muta T, Umeda S, Ikeda S, Mihara K, Hamasaki N, Kang D. Mammalian mitochondrial endonuclease G. Digestion of R-loops and localization in intermembrane space. *Eur J Biochem* 2002;269(23):5765-70.
54. Counis MF, Torriglia A. Acid DNases and their interest among apoptotic endonucleases. *Biochimie* 2006;88(12):1851-8.
55. Severin FF, Hyman AA. Pheromone induces programmed cell death in *S. cerevisiae*. *Curr Biol* 2002;12(7):R233-5.
56. Madeo F, Frohlich E, Ligr M, Grey M, Sigrist SJ, Wolf DH, Frohlich KU. Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast. *J Cell Biol* 1999;145(4):757-67.
57. Herker E, Jungwirth H, Lehmann KA, Maldener C, Frohlich KU, Wissing S, Buttner S, Fehr M, Sigrist S, Madeo F. Chronological aging leads to apoptosis in yeast. *J Cell Biol* 2004;164(4):501-7.
58. Laun P, Pichova A, Madeo F, Fuchs J, Ellinger A, Kohlwein S, Dawes I, Frohlich KU, Breitenbach M. Aged mother cells of *Saccharomyces cerevisiae* show markers of oxidative stress and apoptosis. *Mol Microbiol* 2001;39(5):1166-73.
59. Madeo F, Herker E, Wissing S, Jungwirth H, Eisenberg T, Frohlich KU. Apoptosis in yeast. *Curr Opin Microbiol* 2004;7(6):655-60.

60. Madeo F, Engelhardt S, Herker E, Lehmann N, Maldener C, Proksch A, Wissing S, Frohlich KU. Apoptosis in yeast: a new model system with applications in cell biology and medicine. *Curr Genet* 2002;41(4):208-16.
61. Buttner S, Eisenberg T, Carmona-Gutierrez D, Ruli D, Knauer H, Ruckenstuhl C, Sigrist C, Wissing S, Kollroser M, Frohlich KU and others. Endonuclease G regulates budding yeast life and death. *Mol Cell* 2007;25(2):233-46.
62. Burhans WC, Weinberger M. Yeast endonuclease G: complex matters of death, and of life. *Mol Cell* 2007;25(3):323-5.
63. Szabo G, Jr., Boldog F, Wikonkal N. Disassembly of chromatin into approximately equal to 50 kb units by detergent. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;169(2):706-12.
64. Szabo G, Jr. 50-kb chromatin fragmentation in the absence of apoptosis. *Exp Cell Res* 1995;221(2):320-5.
65. Szilagyí I, Varga T, Szekvolgyi L, Hegedus E, Goda K, Kaczur V, Bacso Z, Nakayama Y, Posafi J, Pongor S and others. Non-random features of loop-size chromatin fragmentation. *J Cell Biochem* 2003;89(6):1193-205.
66. Gal I, Varga T, Szilagyí I, Balazs M, Schlamadinger J, Szabo G, Jr. Protease-elicited TUNEL positivity of non-apoptotic fixed cells. *J Histochem Cytochem* 2000;48(7):963-70.
67. Szabo G, Jr., Bacso Z. Chromatin isolated from viable human PBLs contains DNA fragmented to ≥ 50 kb. *Cell Death Differ* 1996;3(2):237-41.
68. Varga T, Szilagyí I, Szabo G, Jr. Single-strand breaks in agarose-embedded chromatin of nonapoptotic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;264(2):388-94.
69. Tuteja R, Tuteja N. Ku autoantigen: a multifunctional DNA-binding protein. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2000;35(1):1-33.
70. Nieduszynski CA, Knox Y, Donaldson AD. Genome-wide identification of replication origins in yeast by comparative genomics. *Genes Dev* 2006;20(14):1874-9.
71. Heichinger C, Penkett CJ, Bahler J, Nurse P. Genome-wide characterization of fission yeast DNA replication origins. *Embo J* 2006;25(21):5171-9.
72. Pasero P, Bensimon A, Schwob E. Single-molecule analysis reveals clustering and epigenetic regulation of replication origins at the yeast rDNA locus. *Genes Dev* 2002;16(19):2479-84.
73. Kuzminov A. Single-strand interruptions in replicating chromosomes cause double-strand breaks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(15):8241-6.
74. Nitiss JL. DNA topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions. *Nat Rev Cancer* 2009;9(5):327-37.
75. Jin YH, Ayyagari R, Resnick MA, Gordenin DA, Burgers PM. Okazaki fragment maturation in yeast. II. Cooperation between the polymerase and 3'-5'-exonuclease activities of Pol delta in the creation of a ligatable nick. *J Biol Chem* 2003;278(3):1626-33.
76. Garg P, Burgers PM. How the cell deals with DNA nicks. *Cell Cycle* 2005;4(2):221-4.
77. Ayyagari R, Gomes XV, Gordenin DA, Burgers PM. Okazaki fragment maturation in yeast. I. Distribution of functions between FEN1 AND DNA2. *J Biol Chem* 2003;278(3):1618-25.
78. Misteli T. Beyond the sequence: cellular organization of genome function. *Cell* 2007;128(4):787-800.
79. Drolet M. Growth inhibition mediated by excess negative supercoiling: the interplay between transcription elongation, R-loop formation and DNA topology. *Mol Microbiol* 2006;59(3):723-30.

80. Tuduri S, Crabbe L, Conti C, Tourriere H, Holtgreve-Grez H, Jauch A, Pantesco V, De Vos J, Thomas A, Theillet C and others. Topoisomerase I suppresses genomic instability by preventing interference between replication and transcription. *Nat Cell Biol* 2009;11(11):1315-24.
81. Li X, Manley JL. Inactivation of the SR protein splicing factor ASF/SF2 results in genomic instability. *Cell* 2005;122(3):365-78.
82. Budzowska M, Kanaar R. Mechanisms of dealing with DNA damage-induced replication problems. *Cell Biochem Biophys* 2009;53(1):17-31.
83. Shim EY, Ma JL, Oum JH, Yanez Y, Lee SE. The yeast chromatin remodeler RSC complex facilitates end joining repair of DNA double-strand breaks. *Mol Cell Biol* 2005;25(10):3934-44.
84. Weaver DT, Alt FW. V(D)J recombination. From RAGs to stitches. *Nature* 1997;388(6641):428-9.
85. Delker RK, Fugmann SD, Papavasiliou FN. A coming-of-age story: activation-induced cytidine deaminase turns 10. *Nat Immunol* 2009;10(11):1147-53.
86. Cummings J, Smyth JF. DNA topoisomerase I and II as targets for rational design of new anticancer drugs. *Ann Oncol* 1993;4(7):533-43.
87. Morris SK, Lindsley JE. Yeast topoisomerase II is inhibited by etoposide after hydrolyzing the first ATP and before releasing the second ADP. *J Biol Chem* 1999;274(43):30690-6.
88. Jensen S, Redwood CS, Jenkins JR, Andersen AH, Hickson ID. Human DNA topoisomerases II alpha and II beta can functionally substitute for yeast TOP2 in chromosome segregation and recombination. *Mol Gen Genet* 1996;252(1-2):79-86.
89. Baker NM, Rajan R, Mondragon A. Structural studies of type I topoisomerases. *Nucleic Acids Res* 2009;37(3):693-701.
90. Baranello L, Bertozzi D, Fogli MV, Pommier Y, Capranico G. DNA topoisomerase I inhibition by camptothecin induces escape of RNA polymerase II from promoter-proximal pause site, antisense transcription and histone acetylation at the human HIF-1alpha gene locus. *Nucleic Acids Res*;38(1):159-71.
91. Rowley JD. Backtracking leukemia to birth. *Nat Med* 1998;4(2):150-1.
92. So CW, Cleary ML. Dimerization: a versatile switch for oncogenesis. *Blood* 2004;104(4):919-22.
93. Broecker PL, Super HG, Thirman MJ, Pomykala H, Yonebayashi Y, Tanabe S, Zeleznik-Le N, Rowley JD. Distribution of 11q23 breakpoints within the MLL breakpoint cluster region in de novo acute leukemia and in treatment-related acute myeloid leukemia: correlation with scaffold attachment regions and topoisomerase II consensus binding sites. *Blood* 1996;87(5):1912-22.
94. Strout MP, Marcucci G, Bloomfield CD, Caligiuri MA. The partial tandem duplication of ALL1 (MLL) is consistently generated by Alu-mediated homologous recombination in acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(5):2390-5.
95. Blanco JG, Edick MJ, Relling MV. Etoposide induces chimeric Mll gene fusions. *Faseb J* 2004;18(1):173-5.
96. Betti CJ, Villalobos MJ, Diaz MO, Vaughan AT. Apoptotic stimuli initiate MLL-AF9 translocations that are transcribed in cells capable of division. *Cancer Res* 2003;63(6):1377-81.
97. Sim SP, Liu LF. Nucleolytic cleavage of the mixed lineage leukemia breakpoint cluster region during apoptosis. *J Biol Chem* 2001;276(34):31590-5.

98. Materna T, Weber S, Kofler-Mongold V, Phares W. Electrophoretic separation of both single- and double-stranded nucleic acids in the same urea-containing agarose gel. *Anal Biochem* 1998;255(1):161-3.
99. Vogelstein B, Pardoll DM, Coffey DS. Supercoiled loops and eucaryotic DNA replicaton. *Cell* 1980;22(1 Pt 1):79-85.
100. Hu Z, Zhang A, Storz G, Gottesman S, Leppla SH. An antibody-based microarray assay for small RNA detection. *Nucleic Acids Res* 2006;34(7):e52.
101. Rusnak JM, Calmels TP, Hoyt DG, Kondo Y, Yalowich JC, Lazo JS. Genesis of discrete higher order DNA fragments in apoptotic human prostatic carcinoma cells. *Mol Pharmacol* 1996;49(2):244-52.
102. Desai NA, Shankar V. Single-strand-specific nucleases. *FEMS Microbiol Rev* 2003;26(5):457-91.
103. Lopez-Canovas L, Higginson D, Orozco E, Riveron AM. Rapid Non-Enzymatic DNA Deproteinization in Agarose Miniplugs. *Analytical Letters* 1996;29(12):2079 - 2084.
104. Hong J, Capp MW, Anderson CF, Saecker RM, Felitsky DJ, Anderson MW, Record MT, Jr. Preferential interactions of glycine betaine and of urea with DNA: implications for DNA hydration and for effects of these solutes on DNA stability. *Biochemistry* 2004;43(46):14744-58.
105. Sambrook J, Russell DW, editors. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. third edition ed. New York: Cold Spring Harbor; 2001.
106. Filipski J, Leblanc J, Youdale T, Sikorska M, Walker PR. Periodicity of DNA folding in higher order chromatin structures. *Embo J* 1990;9(4):1319-27.
107. Coppey-Moisan M, Brunet AC, Morais R, Coppey J. Dynamical change of mitochondrial DNA induced in the living cell by perturbing the electrochemical gradient. *Biophys J* 1996;71(5):2319-28.
108. Shimokawa N, Miura M. Detection of living cells that express AP1 using a fluorolabeled DNA probe. *FEBS Lett* 1996;388(1):16-20.
109. Jackson DA, Pombo A. Replicon clusters are stable units of chromosome structure: evidence that nuclear organization contributes to the efficient activation and propagation of S phase in human cells. *J Cell Biol* 1998;140(6):1285-95.
110. Abdurashidova G, Radulescu S, Sandoval O, Zahariev S, Danailov MB, Demidovich A, Santamaria L, Biamonti G, Riva S, Falaschi A. Functional interactions of DNA topoisomerases with a human replication origin. *Embo J* 2007;26(4):998-1009.
111. Tsang E, Carr AM. Replication fork arrest, recombination and the maintenance of ribosomal DNA stability. *DNA Repair (Amst)* 2008;7(10):1613-23.
112. Burkhalter MD, Sogo JM. rDNA enhancer affects replication initiation and mitotic recombination: Fob1 mediates nucleolytic processing independently of replication. *Mol Cell* 2004;15(3):409-21.
113. Konstantinos KV, Panagiotis P, Antonios VT, Agelos P, Argiris NV. PCR-SSCP: a method for the molecular analysis of genetic diseases. *Mol Biotechnol* 2008;38(2):155-63.

Értekezés alapjául szolgáló közlemények

Hegedus, E., Kokai, E., Kotlyar, A., Dombradi, V., and Szabo, G., Separation of 1-23-kb complementary DNA strands by urea-agarose gel electrophoresis, *Nucleic Acids Res*, 37, e112 (2009). **IF: 6,878**

Hegedus, E., Imre, L., Pataki, J., Lizanecz, E., Szekvolgyi, L., Fazakas, F., Bacso, Z., Toth, A., Szabo, M., Seres, Z., and Szabo, G., Heteroduplex analysis using flow cytometric microbead assays to detect deletions, insertions, and single-strand lesions, *Cytometry A*, 73, 238 (2008). **IF: 3,259**

Szekvolgyi, L., Hegedus, E., Molnar, M., Bacso, Z., Szarka, K., Beck, Z., Dombradi, V., Austin, C., and Szabo, G., Nick-forming sequences may be involved in the organization of eukaryotic chromatin into approximately 50 kbp loops, *Histochem Cell Biol*, 125, 63 (2006). **IF: 3,220**

Hegedus, E., Szekvolgyi, L., Kokai, E., Vereb, G., Bacso, Z., Dombradi, V., and Szabo, G., Loop-size chromatin domains resolved at the individual chromosome level. (*előkészületben*)

Egyéb közlemények

Szekvolgyi, L., Imre, L., Minh, D. X., Hegedus, E., Bacso, Z., and Szabo, G., Flow cytometric and laser scanning microscopic approaches in epigenetics research, *Methods Mol Biol*, 567, 99 (2009).

Pataki, J., Szabo, M., Lantos, E., Szekvolgyi, L., Molnar, M., Hegedus, E., Bacso, Z., Kappelmayer, J., Lustyik, G., and Szabo, G., Biological microbeads for flow-cytometric immunoassays, enzyme titrations, and quantitative PCR, *Cytometry A*, 68, 45 (2005). **IF: 2,115**

Szilagyi, I., Varga, T., Szekvolgyi, L., Hegedus, E., Goda, K., Kaczur, V., Bacso, Z., Nakayama, Y., Posafi, J., Pongor, S., and Szabo, G., Jr., Non-random features of loop-size chromatin fragmentation, *J Cell Biochem*, 89, 1193 (2003). **IF: 2,664**

Poszterek

Hegedus, E., Kokai, E., Vereb, G., Bacso, Z., Szekvolgyi, L., Dombradi, V., and Szabo, G.: Mapping the arrangement of nicks marking loop-size domains in yeast chromatin; Edinburgh, Higher Order Chromatin Architecture Conference (2009)

Hegedüs, É., Kókai, E., Székvölgyi, L., Roszik, J., Dombrádi, V. és Szabó, G.: Hurok-méretű doméneket kijelölő nick-ek térképezése az élesztő kromatinban; Nyíregyháza, Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok (2009)

Hegedüs, É., Kókai, E., Székvölgyi, L., Dombrádi, V. és Szabó, G.: Hurok-méretű doméneket kijelölő DNS bevágások nem véletlenszerű elrendeződése az élesztő kromatinban; Szeged, Biokémiai konferencia (2008)

Hegedüs, É., Molnár, M. és Szabó, G.: Magasabbrendű kromatinszerkezet vizsgálata *Saccharomyces cerevisiae* és *Schizosaccharomyces pombe* sejtekben; Balatonfüred, Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok (2007)

Pataki, J., Székvölgyi, L., Hegedüs, É., Szabó, M., Lantos, E., Lustyik, G. és Szabó, G.: Mikrogyöngyök áramlási citometriás analízisén alapuló diagnosztikai módszerek; Budapest, Sejtanalitikai konferencia (2004)

8. Tárgyszavak

kromatin, hurok, nick, fragmentáció, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, rDNS, replikáció, gélelektroforézis

Keywords

chromatin, loop, nick, fragmentation, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, rDNA, replication, gel electrophoresis

9. Köszönetnyilvánítás

Elsősorban témavezetőmnek, Prof. Dr. Szabó Gábornak szeretnék köszönetet mondani iránymutatásáért, értékes tanácsaiért és támogatásáért.

Köszönöm Dr. Molnár Mónikának az élesztősejtek kezelésével, szinkronizálásával kapcsolatos segítségét.

Köszönöm továbbá Dr. Kókai Endrének a Southern-blottos vizsgálatokban nyújtott segítségét, valamint Prof. Dr. Dombrádi Viktornak, hogy lehetővé tette ezen vizsgálatok laboratóriumában történő elvégzését.

Szeretném köszönetemet kifejezni Pataki Jutkának az áramlási citometriás módszerek fejlesztésében nyújtott segítségét.

Szeretném megköszönni Dajka Gyöngyinek és Szabóné Jenei Anitának a laboratóriumi munkában nyújtott mindennapi segítségüket, valamint Munkacsoportunk minden tagjának kisebb-nagyobb segítségét, konzultációját és hogy jelenlétükkel kellemes légkört teremtettek a munkavégzéshez: Dr. Bacsó Zsolt, Bársony Orsolya, Dr. Fenyőfalvi György, Dr. Goda Katalin, Gutayné Tóth Zsuzsanna, Imre László, Dr. Székvölgyi Lóránt, Vezendiné Nagy Adél.

Köszönöm továbbá Prof. Dr. Sipiczki Mátyásnak és Dr. Kónya Józsefnek, hogy CHEF műszerüket laboratóriumukban rendelkezésemre bocsátották.

Szeretnék köszönetet mondani Intézetünk jelenlegi és korábbi vezetőjének, Prof. Dr. Szöllősi Jánosnak és Prof. Dr. Gáspár Rezsőnek, hogy lehetővé tették, hogy Ph.D.munkámat Intézetükben végezzem.

10. Függetlenség