

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**Egyszál folytonossághiányok szerepe a kromatin hurkok kialakításában és
patológiás génátrendeződésekben**

Székvölgyi Lóránt

Témavezető: Prof. Dr. Szabó Gábor



DEBRECENI EGYETEM
ORVOS ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
BIOFIZIKAI ÉS SEJTBOLÓGIAI INTÉZET
DEBRECEN, 2006

1. BEVEZETÉS

A genom szerveződésében van egy általános alapelv: az örökítőanyag egy limitált térfogatot foglal el, s hossza sokszorosán felülmúlná az őt tartalmazó kompartment dimenzióit, ha nem szerveződne ún. magasabbrendű struktúrákba. Mai tudásunk szerint a magasabbrendű kromatin szerkezet alapja a DNS molekula hurkos-doménekbe történő szerveződése, amely a magstruktúra enigmatikus „nukleáris mátrix” koncepciójával hozható összefüggésbe. A 30-150 kbp méretű DNS régiókat formáló hurkok a kromatin szerkezeti hierarchiájának azon szintjét alkotják, melynek fontos, ám teljességgel feltáratlan funkcionális relevanciája lehet. A hurkok kihorgonyzási pontjai (angolul *scaffold/matrix attachment regions, S/MARs*) gyakran promoterek, replikációs origók, rekombinációs forró pontok közelében találhatóak, s egyre valószínűbb, hogy alapvető szerepet játszanak különféle patológiás gén-átrendeződésekhez / kromoszóma aberrációkhoz vezető folyamatokban. A S/MAR szekvenciák meglepő sajátága a nagyfokú heterogenitásuk és a konszenzus szekvenciák hiánya; egyedüli kivétel a topoizomeráz II enzim konszenzus szekvenciája, amely az eddig megszekvenált S/MAR-ok 85%-ában jelen van.

A kromatin hurkok közvetlenül megfigyelhetők az ún. halo-kísérletek során, és kromatin fragmentációs jelenségek kapcsán. Előbbi esetben sejteket nagy ionerősségű sóoldattal extrahálva ún. halo-preparátumot nyerhetünk, amelyben a sejtmag mátrixhoz rögzülő, illetve abból kibomló kromatin hurkok tömegét figyelhetjük meg. A kromatin hurok-méretű darabokra történő fragmentálódása (hurok-méretű DNS fragmentáció) megfigyelhető mind apoptotikus sejtek, mind normál sejtek esetében - intenzív proteolitikus körülmények között: az ionos detergens és proteáz, valamint kelátor jelenlétében izolált DNS ~50 kbp-os átlagos méretű, szemben az agaróz-blokkban lizált sejtekből származó DNS megabázisos méretével, amely feltehetően a hurkok rögzítési pontjainál történő törés/hasadás eredménye.

Az akut és poszt-terápiás leukémiák nagy részében a Mixed Lineage Leukemia (MLL) gén mintegy 40 partnergén valamelyikével transzlokálódik. Az MLL töréspont klaszter régiója (breakpoint cluster régiója, bcr) az 5. és 11. exonok közötti 8.3 kb-os szakaszt öleli fel. De novo leukémiákban az MLL BCR az 5.exon és a 8.intron első harmada közötti területen törik leggyakrabban, míg poszt-terápiás leukémiákban a 8. intron második harmada és a 11.exon közötti szakaszon, ezen belül leggyakrabban egy topoizomeráz II konszenzus szekvencia környezetében, a 9. exonban. A bcr a mi szempontunkból az 50 kbp-os fragmentáció töréspontjainak egy reprezentánsa, mely azért is érdekes, mert a leukemogenezis egy sajátos, kísérleti stratégiánk szempontjából lényeges modellje épül arra a tényre, hogy az MLL bcr apoptózisban is tapasztalt preferenciális hasadását olyan kimérikus transzkriptumok megjelenése is követte, melyek kromoszóma transzlokáció bekövetkezésére utaltak.

Munkánk során a teljes kromatin állományon illetve az MLL bcr-en, mint modell rendszeren azt az izgalmas hipotézist vizsgáltuk, amely szerint a hurok-méretű kromatin fragmentációban érintett fragilis helyek egyben a kromoszóma rendellenességek, transzlokációk predilekciós helyei.

2. CÉLKITŰZÉSEK

- A magasabbrendű, hurok-szintű kromatinszerkezet kialakításának nem ismerjük a mechanizmusát. Ebben jelentős előrelépést tehetünk, ha sikerül azonosítani azokat a szekvencia motívumokat / karakterisztikus fehérjéket, melyek az általunk régóta vizsgált kromatin fragmentációs jelenség hurok-méretű periodicitását megmagyarázzák.
- A korai apoptotikus fázisban talált MLL transzlokációkat illegitim repair folyamatokkal magyarázzák, melyek a kurrens értelmezés szerint megmentenék a sejtet a pusztulástól, daganatos transzformáció árán („abortív” apoptózis modell). A töréspontok és a topoizomeráz II kötőhelyek MLL régióon belüli finom eloszlásának vizsgálata során azt reméljük megtudni, hogy létezik-e a fragmentációs pontoknak egy jól meghatározott halmaza a kromatinon, melyek az átrendeződések predilekciós helyeiként fungálnak.
- Különböző típusú rákos megbetegedéseknél számos gén epigenetikus szabályozásában specifikus diszreguláció figyelhető meg. Az MLL hiszton-modifikációinak vizsgálata különösen indokolt azokban az esetekben, amikor a citosztatikus kezelést követően, főleg topoizomeráz II gátlószerek alkalmazása esetén a betegek jelentős százalékában várható második daganatos vagy leukémiás betegség kialakulása. Ezért célul tűztük ki egy új, CHIP-minták kiértékelésére alkalmas áramlási citometriás platform kifejlesztését („*CHIP-on-beads*”), amely a rutin diagnosztikai laboratóriumok számára a real time QPCR egy olcsóbb alternatíváját kínálja a különféle betegségek aetiológiájában szerepet játszó epigenetikai markerek szűrésére és monitorozására.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Több sejtvonalban (Jurkat, ML-1, HL-60, DC3F, Hela, NIH3T3) és emberi perifériás limfocitákban (PBL) egy új eljárással (field inversion single-cell gelelectrophoresis, **FI-SSGE**) egyedi sejtek szintjén detektáltuk a kromatin hurkok mag-mátrixról történő lecsatolódását illetve a hurok-méretű fragmentációt. Az eredményeket konfokális lézerpásztázó mikroszkópiával (**CLSM**) vizualizáltuk, illetve lézerpásztázó citometriával (**LSC**) kvantifikáltuk.

A hurok-lehorgonyzási pontokra jellemző DNS-végeket *in situ nick transzlációval* karakterizáltuk.

A töréspontok sejtmagon belüli topográfiáját a **halo-FISH** kísérletekkel lokalizáltuk. **Primer extenzióval** térképeztük a kromoszóma átrendeződéseket bevezető DNS-hasításokat, illetve sejtmag extraktumokkal végzett in vitro assay-kben teszteltük az MLL bcr fragilitását okozó faktorokat.

A töréspont klaszterre jellemző hiszton-kódot és az egyik legjellegzetesebb S/MAR-fehérje, a topoizomeráz II enzim szerepét kromatin immunoprecipitációval (**ChIP**), a bcr-en belüli heterogén kromatin szerkezet különféle genotoxikus ágensekre adott válaszát real-time pcr-al (**QPCR**) vizsgáltuk.

Az MLL és a szöveti transzglutamináz 2 (TGM2) gén epigenetikus markereit egy új, áramlási citometria és PCR kombinációján alapuló kvantitatív módszerrel („**ChIP-on-beads**”) vizsgáltuk. Kísérleteinktől azt reméljük, hogy a flow citometriás diagnosztikai laboratóriumok a ChIP-on-beads technikával a daganatos betegségek kezelésére használt kemoterápiás protokollok hatását érzékenyebb, finomabb módon tesztelhetik a jövőben.

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉSÜK

I.

Munkánk során biofizikai és molekuláris sejtbioológiai módszereket alkalmazva elsőként vizualizáltuk és kvantifikáltuk egészséges, nem-apoptotikus sejtekben a teljes kromatin állományt érintő hurok-méretű fragmentációt. Kimutattuk, hogy a kromatin-hurkokat lehorgonyzó sejtmag mátrix preformált nick-klasztereket tartalmaz. Ezen fókuszok (1) intenzíven jelölhetőek DNS polimeráz I enzimmel, amely egyöntetű 3'OH-végek jelenlétére utal, (2) egyáltalán nem jelölhetőek Klenow enzimmel vagy terminális transzferázzal (TdT), amely kizárja a dupla-szál törések és hosszabb egyszál-folytonossághiányok (gap-ek) jelenlétét, azonban (3) szignifikáns jelölődést kapunk mind Klenow enzimmel illetve TdT-vel, ha a halo preparátumokat előzetesen ribonukleolítikus kezelésnek tesszük ki (RNase A, lúg, Exo III). Az RNáz-kezelés hatására megjelenő Klenow / TdT pozitivitás specifikus RNáz inhibitorral kivédhető. Ezen adatok arra utalnak, hogy a sejtmag mátrix fibrogranuláris RNS/ribonukleoprotein hálózata kapcsolatban van a kromatin hurkok lehorgonyzási pontjaival, stabilizálva az ott jelen lévő egyszál-folytonosság hiányokat. Feltevésünk szerint a nick-RNS/RNP kontaktus létfontosságú ezen nick-ek fenntartásában, mivel így a repair rendszer nem ismeri fel az RNS/RNP-vel maszkírozott DNS-végeket. A nick-fókuszok, strukturális szerepük mellett, kiindulási pontjai lehetnek a különféle fiziológiás folyamatok (pl. apoptózis, rekombináció) és nem fiziológiás stressz-hatások (pl. xenobiotikumok, kemoterápiás szerek) során megfigyelhető – és agaróz-blokkba ágyazott sejtek S1-nukleáz emésztésével is reprodukálható hurok-méretű DNS fragmentációnak.

A Jurkat ill. az ML-1 emberi sejtvonalak közötti egyik lényeges különbség az MLL gén transzlokált volta az utóbbiban. Halo-FISH kísérleteink azt mutatták, hogy Jurkat sejtekben illetve PBL-ben a normál (germline) MLL bcr jellegzetes, diszkrét módon

fragmentálódik a halo képződés során. A fragmentáció ~50 kbp-onként manifesztálódik a kromatin hurkok kihorgonyzási pontjain perzisztáló nick-ek mentén. Az MLL gént átrendeződött konfigurációban (tMLL) tartalmazó ML-1 sejtek esetében, ill. centromérikus szonda esetén jelentősen eltérő fragmentációs mintázatot (hurok-struktúrát) kaptunk. A kromatin hurok-méretű fragilitása nem a sejtproliferáció (S-fázis) következménye, viszont szoros korrelációt mutatott a vizsgált régiók (1) transzkripció aktivitásával, (2) DNáz szenzitivitásával, illetve (3) egyes hiszton-módosításokkal. Kimutattuk, hogy az MLL bcr-en - S/MAR-fehérje kötő kapacitása miatt - speciális DNS-fehérje interakciók alakulhatnak ki. ChIP kísérleteink szerint (1) a topoizomeráz II enzim preferenciálisan (aszimmetrikusan) kötődik a mind a germline és transzlokált MLL-bcr telomerikus szakaszához, (2) az etoposide-kezelés egy fellazult kromatin-szerkezet kialakítása révén (magnövekedett H3K4 metiláció / H3Kcetiláció illetve DNáz szenzitivitás) közvetetten megnöveli a bcr-hez kötődő topo II mennyiségét. Ez az adatsor, és az a tény, hogy az ~50 kbp fragmentum végek konszenzus szekvenciája az MLL breakpoint cluster régió egyik hot-spotja, egy erős topoizomeráz II kötőhely szekvenciájával jelentős egyezést mutat, alátámasztják azt a lehetőséget, hogy az enzim egyes izoformái, szubpopulációi valamilyen, a hurokszerű periodicitással korreláló kötődést mutathat a kromatin mentén.

Kísérletei eredményei alapján feltételezzük, hogy RNS-sel maszkírozott egyszál folytonossághiányok, nick-ek határolják a kromatin hurkos-doméneit, és ezen, mindkét szálon a hurkok határánál halmozódó nick-ek mentén ds fragmentáció következik be, amint megszűnik a kromatinba szervezett állapot. Az MLL bcr esetében a topoizomeráz II enzim-nukleáz és ligáz aktivitásai révén-, pozícionálhatja és hozhatja létre a nick-eket.

II.

Metodikai fejlesztésünk, az általunk „ChIP-on-beads”-nek nevezett áramlási citometriás ChIP kiértékelő módszer - a QPCR technológiához hasonlóan - megbízható képet ad a vizsgált gének epigenetikai állapotáról. Az általunk kidolgozott új módszer segítségével a H4 hiszton acetilációjának, illetve a H3 hiszton metilációjának magas szintjét mutattuk ki az MLL és TGM2 gének promóter régióiban. Ezek a modifikációk szignifikánsan lecsökkentek apoptózis során, ami együtt járt a TGM2 és MLL mRNS-ek kifejeződésének csökkenésével. A ChIP-on-beads-ek technika megfelelő készülékkel (pl: Becton Dickinson FACSarray) nagyszámú minta egyidejű vizsgálatára alkalmas, amely reményeink szerint lehetővé teszi a különféle daganatok progressziójára karakterisztikus epigenetikus markerek vizsgálatát a klinikai rutin diagnosztikában.

5. KÖZLEMÉNYEK

Az értekezésben felhasznált közlemények:

(1) **Szekvolgyi L**, Hegedus E, Molnar M, Szarka K, Beck Z, Dombradi V, Austin CA and Szabo G. Nick-forming sequences may be involved in the organization of eukaryotic chromatin into approximately 50 kbp loops. *Histochem. Cell Biol.* (2006) **125**: (1-2): 63-73, **IF: 2.594**

(2) **Szekvolgyi L**, Balint LB, Imre L, Goda K, Szabo M, Nagy L and Szabo G. ChIP-on-beads: flow-cytometric evaluation of chromatin immunoprecipitation. Accepted for publication in *Cytometry Part A*, **IF: 2.698**

(3) **Szekvolgyi L**, Rakosy Zs, Balint LB, Bacso Zs, Goda K, Vereb Gy, Varga S, Balazs M, Nagy L and Szabo G. Preformed nicks mark the boundaries of interphase chromatin loops. (*közlésre elküldve*)

Egyéb közlemények:

(4) Pataki J, Szabo M, Lantos E, **Szekvolgyi L**, Molnar M, Hegedus E, Bacso Zs, Kappelmayer J, Lustyik Gy and Szabo G. Biological microbeads for flow-cytometric immunoassays, enzyme titrations and quantitative PCR. *Cytometry Part A* (2005) **68A**: 45-52, **IF: 2.698**

(5) Szilagyi I, Varga T, **Szekvolgyi L**, Hegedus E, Goda K, Kaczur V, Bacso Zs, Nakayama J, Posfai J, Pongor S and Szabo G. Non-random features of loop-size chromatin fragmentation *J Cell Biochem.* (2003) **89**:1193-1200, **IF: 2.664**

Poszterek, konferenciák:

1. Regularly spaced nicks delimit chromatin loops

Lóránt Székvolgyi, Zsuzsa Rákosy, Bálint L Bálint, Zsolt Bacsó, Katalin Goda, Margit Balázs, László Nagy and Gábor Szabó. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, conference on Dynamic Organization of Nuclear Function (2006)

2. ChIP-on-beads: kromatin immunprecipitáció áramlási citometriás kiértékelése
Székvölgyi Lóránt, Imre László, Bálint L Bálint, Goda Katalin, Szabó Miklós, Nagy László és Szabó Gábor. Budapest, Sejtanalitikai konferencia (2006)
3. DNS-fehérje interakciók az MLL gén töréspont klaszter régiójában
Székvölgyi Lóránt, Bálint L Bálint, Dombrádi Viktor és Szabó Gábor
Eger, Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok (2005)
4. Mikrogyöngyök áramlási citometriás analízisén alapuló diagnosztikai módszerek
Pataki Judit, **Székvölgyi Lóránt**, Hegedűs Éva, Szabó Miklós, Lantos Erika, Lustyik György és Szabó Gábor. Budapest, Sejtanalitikai konferencia (2004)
5. Fixed cells as microbeads for various applications
Szabo G, Lustyik G, Pataki J, Szabo M, **Szekvolgyi L**, Hegedus E, Fazekas F
Cytometry Part A 59A (1): 154-154 May 2004. IDS Number: 819MV; ISSN: 0196-4763
6. Heteroduplex analysis by flow-cytometry
Pataki Judit, **Székvölgyi Lóránt**, Lantos Erika, Szabó Gábor
Predeal, Biophysical Congress (2003)
7. Hurok méretű DNS fragmentáció normál és apoptotikus sejtekben
Székvölgyi Lóránt, Hegedűs Éva, Kaczur Viktória, Erdődi Ferenc és Szabó Gábor
Siófok, Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok (2002)

LECTURES:

1. 11q23 MLL bcr: hurok méretű kromatin fragmentáció vizsgálata egy rekombinogén lókuszon
Székvölgyi Lóránt, Szarka Krisztina, Beck Zoltán és Szabó Gábor
Pécs, Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok (2004)
2. 11q23 MLL bcr: studying loop-size chromatin fragmentation at a recombinogenic locus
Székvölgyi Lóránt and Szabó Gábor. Trieste, Theoretical course on genome dynamics and evolution (2004).