Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

DNS folytonossághiányok vizsgálata *Saccharomyces cerevisiae* sejtekben

Hegedüs Éva

Témavezető: Prof. Dr. Szabó Gábor

DEBRECENI EGYETEM
Molekuláris Sejt- és Immunbiológiai Doktori Iskola

Debrecen, 2010.

Munkámat korábban a Membránbiofizikai Doktori Iskolában kezdtem és a Molekuláris Sejt- és Immunbiológiai Doktori Iskolában folytattam, annak megalakulása óta.

Témavezető:

Prof. Dr. Szabó Gábor, az MTA doktora

A szigorlati bizottság elnöke:

Prof. Dr. Fésüs László, akadémikus

A szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Harcska László, Ph.D.

Dr. Balajthy Zoltán, Ph.D.

A védési bizottság elnöke:

Prof. Dr. Fésüs László, akadémikus

Opponensek:

Prof. Dr. Miseta Attila, az MTA doktora

Dr. Bíró Sándor, Ph.D.

A védési bizottság tagjai:

Dr. Harcska László, Ph.D.

Dr. Balajthy Zoltán, Ph.D.

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 sajátságait 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. Mivel mind az egészséges sejtek kromatinja által mutatott, mind az apoptotikus DNS hurok-méretű fragmentációja esetén a töréspontok között egyes patológiás génátrendeződésekben szerepet játszó szekvenciák túlreprezentáltak, felmerült az a lehetőség is, hogy ezek a régiók transzlokációk preferált szubsztrátjai lehetnek.

1. 1. Célkitűzések

A. Munkám során alapvető kérdéseket igyekeztem megválaszolni a hurok-méretű kromatin fragmentáció mechanizmusával és biológiai jelentőségével kapcsolatban - az élesztősejtek kísérleti rendszere kínálta lehetőségeket kihasználva. Célom volt:
   - a két DNS szálon protein-denaturációval feltárt folytonossághiányok viszonyának meghatározása
   - a hurok-méretű kromatinfragmentáció sejtciklus-függésének vizsgálata
   - az egyes kromoszómák fragmentációs mintázata összehasonlítása
   - kromatinfragmentáció a hurkokban lévő DNS szuperhelicitástól való függésének meghatározása
   - a *Schizosaccharomyces pombe* kromatinfragmentációs mintázatának vizsgálata
   - a fragmentáció méreteloszlásának jellemzése
   - a riboszómális DNS klaszter (rDNS lókusz) viselkedésének vizsgálata
   - az rDNS kópiákon belül a nick-ek és RNS/DNS-hibridek térképezése

B. Célom volt továbbá, transzlokációk predilekciós helyeinek gondolt folytonossághiányok vizsgálatára alkalmas módszertani repertoár bővítése, fejlesztése.

2. Irodalmi áttekintés

2. 1. Az eukarióta kromatin szerkezete

Az eukarióta kromatin szuperhelikális hurokba szerveződik, melyek a feltételeztett nukleáris mátrix/ scaffoldhoz periódikusan csatlakoznak átlagosan 70 – 220 kb-ként, a 600 – 3000 bp hosszúságú *S/MAR (Matrix/ Scaffold Attachment Region)* szekvenciákon keresztül. Nem rendelkeznek tiszta konszenzus szekvenciákkal, de előszeretettel alakítanak ki alternatív másodlagos struktúrákat, többek között bázis-párosítatlan régiókat, melyek egyszálúvá válhatnak szuperhelikális stressz alatt. A hurkok elrendeződése meglehetősen dinamikus. A sejt valószínűleg nem használja egyszerre az összes potenciális horgonyzó helyét. A szuperhelicitást mutató, S/MAR-ok által definiált és a genom transzkripciós és replikációs egységeinek megfelelő méretű hurkok szerepe a gén-szabályozásban ill. DNS replikációban lényegében ismeretlen. Specifikus, poszttranszlációs hiszton módosítások kombinációja hozza létre a kromatin reguláció komplex, funkcionális hierarchiáját. Jelentős különbségek vannak emlős és élesztő sejtek epigenetikus szabályozása között, és e tekintetben a vizsgált két élesztő faj között is.

Humán és élesztő genomok összehasonlítása:

	Genom méret (Mb)	**Kr (1n) szám**	**Kr. méret**	**Gén szám**	**Ismétlődő szekvencia (%)**	**Átlagos transzkriptum / gén méret (kb)**	**GC tartalom**
H. sapiens	3300	23	50-263 Mb	30000	46	25	41,5 %
S. cerevisiae	12 +rDNS	16	220-2200 Kb	5700	2,4	2	38,3 %
S. pombe	13,8	3	3,5-5,7 Mb	4900	0,35	1,4	36 %

A genomban a legjelentősebb ismétlődést a riboszómális DNS (rDNS) mutatja.

	rDNS kópia száma	**rDNS kópia hossza (kb)**	**rDNS lokalizációja**
S. cerevisiae	100 -200	9,1	XII. kr.
S. pombe	100 -200	10,4	III.kr.

2. 2. A szerkezeti hierarchia tükröződése DNS fragmentációs jelenségekben

Az apoptózis kapcsán a DNS nukleoszómális vagy 50−300 kb-nyi darabokra való feldarabolódása a folyamat közismert tünetei. Élesztő sejtek esetében szintén leírták az apoptotikus jelek megjelenését.

A DNS 50 kb körüli duplaszál-töréseket involváló fragmentációja figyelhető meg, amikor normál, nem apoptotikus humán vagy egér sejtvonalakból izolált kromatint, sejtmagokat vagy akár az élő sejteket magukat ionos detergenssel és proteázokkal kezelünk kelátor jelenlétében.

A mechanikai nyírás kivédése érdekében agarózba ágyazott, deproteinizált sejtek kromatinjának S_1 nukleáz emésztése is jellegzetes DNS fragmentációt idéz elő emlős és élesztő sejtek esetében egyaránt. Az S_1 nukleázzal való emészthetőség helyileg denaturált régiókat vagy egyszálú folytonossághiányokat jelezhet a DNS-ben. A kromatinban előforduló egyszálú folytonossághiányok tanulmányozását a DNS urea-elektroforézise tette lehetővé: ennek során az agarózba ágyazott emlős vagy élesztő sejtek (protoplasztok) deproteinizált preparátumait urea jelenlétében hővel denaturálva a genom zöme nagyjából 50 kb-os egyszálú fragmentekre esik szét, sejtek lúggal történő direkt kezelése eredményéhez hasonlóan.

Térinverziós egy-sejt gélelektroforézis technikával munkacsoportunk korábban kimutatta, hogy alkalikus körülmények között a nem apoptotikus humán sejtek és sarjadó élesztő szferoplasztok kromatinja granulumokra esik szét, melyek ~50 kb-os átlagos DNS méretnek felelnek meg.

A DNS polimeráz általi *in situ* nukleotid inkorporáció RNáz H szenzitivitása és a magok jellegzetes anti-RNS/DNS hibrid-specifikus monoklonális antitest jelölődése azt valószínűsíti, hogy a nick-eknél RNS/DNS hibridek fordulnak elő.

A fragmentumok végeit klónozva és szekvencia analízisnek alávetve munkacsoportunk azt találta, hogy repetitív elemek, valamint konszenzus szekvenciák gyakran vannak jelen a töréspont-szekvenciákban, amelyek szintén megtalálhatók az MLL (Mixed Lineage Leukemia) gén bcr régiójában (breakpoint cluster region), amiről ismert, hogy gyermekkori leukemiák hátterében álló kromoszóma transzlokációk leggyakoribb partnere és preferenciálisan hasad a hurok-méretű apoptotikus DNS fragmentáció során is.

2. 3. Tranziens folytonossághiányok előfordulása a genomi DNS-ben fiziológiás 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: pl. a replikációkor és transzkripciókor kialakuló torziós stressz feloldását a topoizomeráz enzimek végzik a DNS egyik vagy mindkét szálának bemetszésével. Élesztőben a párosodási típus váltása kapcsán, a mitokondriális DNS replikáció során ill. az immunoglobulin gének átrendeződéi folyamatiban is előfordulnak tranziens vagy perzisztáló nick-ek. Transzkripciós iniciáció kapcsán is leírtak tranziens nickek képződését.

A transzkripció-indukálta negatív-szuperhelikális állapot elősegíti az R-hurkok (RNS/DNS hibridek) kialakulását, ami a keletkező RNS szál DNS templáthoz történő visszakapcsolódása révén alakul ki. A topoizomeráz I enzim közvetve gátolja az R-hurok kialakulását, mert amellett, hogy relaxálja a negatív szupertekercset, az ASF/SF2-hez (alternative splicing factor / splicing factor 2) közvetlenül kötődve és aktiválva azt, elősegíti az mRNS-érést. ASF/SF2 hiánya (közvetlenül vagy valamilyen, még feltáratlan folyamat során) ds töréseket okoz, mely végül nagymolekula-súlyú DNS fragmentumok (~50 kb) megjelenését eredményezi.

3. Anyagok és módszerek

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

A *S. cerevisiae* sejteket (WDHY 199 törzs; MATa, leu 2-3 112 trp1-289ura3-52 his7-2 lys1-1) YPD tápoldatban (1% yeast extract, 2 % bactopepton, 2 % glükóz, pH 5) növesztettem 30°C-on logaritmikus kultúra esetén OD_{600} = 1-ig (~2×10^7 sejt/ml), stacioner kultúra esetén OD_{600} = 3,5-ig (~4×10^9 sejt/ml). A sejteket kétszer mostam 50 mM EDTA-ban (pH 8), majd reszuszpendáltam szferoplasztáló oldatban (2 mg/ml Lyticase, 0,9 M szorbit, 0,125 M EDTA, 100 mM DTT) és összekevertem azonos térfogatú 1,5 %-os LMP agarózzal. 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 ~3×10^8 sejtet tartalmazott.

A *S. pombe* sejteket (L972 h^- törzs; vad típus) YEL tápoldatban (0,5 % yeast extract, 3 % glükóz, pH 5) növesztettem 30°C-on logaritmikus kultúra esetén OD_{600} = 0,75-ig, (~5×10^6 sejt/ml), stacioner kultúra estén OD_{600} = 3,5-ig, (~2×10^8 sejt/ml). A sejteket kétszer mostam 50 mM EDTA-ban (pH 8), majd reszuszpendáltam 15 mg/ml Lysing enzimet tartalmazó CPES oldatban (25 mM citromsav, 0,12 M Na_2HPO_4, 20 mM EDTA, 1,2 M szorbitol). A sejtszuszpenziót összekevertem azonos térfogatú 1,5 %-os LMP agarózzal. 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 ~$1,5\times10^7$ sejtet tartalmazott.

Az agaróz blokkokat 54°C-on 2 napig emésztettem lízis oldatban (0,5 mg/ml proteináz K, 0,5 M EDTA (pH 8), 10 mM Tris-HCl és 1 % SDS), majd háromszor mostam TE-vel (10 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, pH8) és TE-ben tároltam 4°C-on.

3. 1. 2. S. cerevisiae sejtek szinkronizálása a sejtciklus különböző fázisaiban

A sejteket OD = 1-ig növesztettem, majd végkoncentrációban 20 µg/ml α-faktort (Sigma) (G1 fázis), 200 mM hidroxiureát (Sigma) (S fázis), ill. 20 µg/ml nokodazolt (Sigma) (G_2/M fázis) adtam a tápoldathoz 1,5 órán keresztül inkubáltam.

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

A sejteket 100 – 100 sejt / Petri-csésze koncentrációban szélesztettem ki YPDA táptalajra (YPD tápoldat, 2% agar) logaritmikus, ill. stacioner növekedési fázisban lévő kultúrákból, majd 3 napig inkubáltam 30°C-on. Az életképes kolóniák számát öt párhuzamos kísérlet átlaga alapján számítottam.

3. 1. 4. Agaróz blokkok enzim kezelése

A reziduális proteáz aktivitás inaktiválása érdekében az agaróz blokkokat izopropanolban feloldott 0,75 mM PMSF-fel (phenyl-methyl-sulfanyl-fluoride) kezeltem, majd háromszor mostam TE-vel.

S_1 nukleáz emésztés: A blokkokat 3×20 percig mostam S_1 pufferben (0,2 M NaCl, 50 mM Na-acetát, 1 mM $ZnSO_4$, 0,5 % glicerol) és 1,5 óráig emésztettem 500 U/ml S_1 nukleázzal (Promega Biosciences Inc.) S_1 pufferben 37°C-on.

DNS polimeráz I kezelés: A blokkokat mostam 1×polimeráz pufferben (50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT) 3×20 percig, majd 1,5 óráig kezeltem 150 U/ml DNS polimeráz I enzimmel (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 $MgCl_2$, 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. 5. Pulzáltatott-mezejű gélelektroforézis: FIGE, CHEF

A FIGE futtatáshoz az MJ Research PPI 200 invertert alkalmaztam. Az 5-ös program az 50 – 400 kb mérettartományban 9-es program 2000 kb-ig biztosít megfelelő feloldást. A futtatás minden esetben hidegszobában, általában 5 V/cm erőtérben zajlott.

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

Urea/hő denaturáló FIGE: Az agaróz blokkokat 8M urea/TE pufferben áztattam 1 órát szobahőmérsékleten, majd a blokkokat további kezelés nélkül, ill. 80°C-on 5 percig történő hő-denaturálás után vittem fel a gélre. A futtatásokat 1 % agarózgél/1×TAE-ben végeztem, amely 1 M ureát tartalmazott. Elektroforetikus pufferként 1 M urea /1×TAE puffert használtam. A géleket 0,5 µg/ml EBr-dal festettem meg.

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

3. 1. 6. 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. 7. Southern-blot

Hagyományos és urea-agaróz géleket BIO-RAD vacuum blotter segítségével Hybond-N^+ nylon membránra (Amersham Pharmacia Biotech) blottoltuk át, 30 percig 80°C-on szárítottuk, UV-keresztkötöttük ($1{,}2\times10^5$ μJ/cm^2), majd prehibridizáltuk 3 órán át 55°C-on 30 ml prehibridizációs oldatban (1 % BSA, 0.5 M Na_2HPO_4, 7 % SDS, 1 mM EDTA, 10 μg/ml hering sperma DNS), és 15 órán át hibridizáltuk az rDNS gén klaszterre specifikus próbákkal. Az 1405 bp-os ds PCR terméket használtuk templátként a további próbák preparálásához. A ^{32}P jelölést vagy random primer jelöléssel (ds próba; RediPrime Kit, Amersham) vagy egyszál-specifikus próba preparálásához lineáris amplifikációval" (egy primert használva) végeztük: A p1F primert alkalmaztuk a szensz szál-specifikus és p1R primert az antiszensz szál-specifikus próba preparálásához. A PCR reakciókat 2.5 U Taq polimeráz enzimmel, 1×reakció pufferben (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 0.08 % N P-40, pH 8.8) hajtottuk végre, kiegészítve 3 mM $MgCl_2$-dal, 50 ng templát DNS-sel, 20 pmol primerrel, 5 μM dATP / dTTP / dGTP-vel, valamint 5μl [α^{32}P]-dCTP (6000 Ci/mmol, 10 mCi/ml; Institute of Isotopes LTD, Hungary). Alkalmazott PCR program: 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 próbák tisztítását Sephadex G-25 oszlopon végeztük (Amersham). A hibridizáció után a membránokat háromszor mostuk 60 ºC-on mosó folyadékkal (40 mM Na_2HPO_4, 1 % SDS, 1 mM EDTA). A jelet BIO-RAD Phospho-Imager segítségével detektáltuk.

3. 1. 8. „Ab-Southern"

A *S. cerevisiae* kromatint tartalmazó blokkokba nick transzlációval 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 higításban, hibridizációs oldatban, 16 órán át 4°C-on. A membránt 5×5 percig mostam 0,2 % Tween-20 / PBS-ben, majd torma-peroxidázzal

konjugált kecske anti-egér IgG poliklonális antitesttel jelöltem, 1:2000 higításban, 1,5 órát szobahőmérsékleten. A detektálást kemiluminescens filmmel végeztem.

3. 2. 1. Egyszálú DNS régiók és nick-ek detektálása áramlási citometriával

Enzimatikus hasítás S_1 nukleázzal: 100 ng biotin/6FAM labeled PCR terméket emésztettem 0.00001 – 1 U S_1 nukleázzal 50 µl 1×S_1 pufferben 20ºC-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 -20ºC-on tartottam 2 óráig. Centrifugálás után (15000rpm, 10 perc, 4ºC) a DNS-t 50 µl PBS-ben (pH 7,4) oldottam fel.

Kémiai hasítás hidroxilamin / piperidin kezeléssel: 2 µl TE-ben feloldott 100 ng biotin/6FAM-jelölt 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 dH_2O-ban vettem fel és azonos térfogatú 1%-os piperidinnel összekeverve 90º-on 30 percig inkubáltam, sötétben. Végül a DNS-t precipitáltam és 50 µl PBS-ben vettem fel.

Biotin/6FAM-jelölt PCR terméket készítettem és 10 U *E. coli* DNS polimeráz I-gyel kezeltem 25 µl 1×polimeráz pufferben, amely végkoncentrációban 40 µM dATP/CTP/GTP-t, valamint 2 µM dTTP-t és 40 µM fluoreszcein – 12 – dUTP-t tartalmazott, 16ºC-on 2 óráig.

10000 streptavidinált polimer mikrogyöngyöt (Polyscience Inc.; átmérő: 6 µm) adtam 50 µl biotin/6FAM-jelölt PCR termékhez 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 mikrogyöngyöket Bekton-Dickinson FACSan áramlási citométeren mértem. Az összegyűjtött adatokat BDIS Cell Quest 3.3 szoftverrel elemeztem.

4. Eredmények

4. 1. Hurok-méretű fragmentáció vizsgálata élesztő sejtekben

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

Kolónia-képzési teszttel ellenőriztem logaritmikus és stacioner növekedési fázisból származó élesztő sejtek életképességét. Mindkét esetben a sejtek közel 100 %-a egészséges telepet hoztak létre, azaz valóban nem apoptotikus sejtekkel végeztem a kísérleteimet.

Agaróz blokkokba ágyazott, deproteinizált *S. cerevisiae* és *S. pombe* kromatin S_1 nukleáz emésztésnek kitéve vagy denaturáció során ~50 kb-os fragmentumokat eredményezett, egyszálú (ss) folytonossághiányok (nick) jelenlétét valószínűsítve mindkét törzsben.

Az S1 kezelt és nem kezelt mintákat urea/hő-denaturálásukat követően összehasonlítva hasonló fragmentációs mintázatot eredményeztek urea-agaróz gélen. Megállapítottam, hogy ezen folytonossághiányok a DNS két szálán egymás közelében – nem véletlenszerűen - helyezkedhetnek el.

4. 1. 2. Hurok-méretű fragmentáció növekedési fázis- és sejtciklus-függése

A *S. cerevisiae* sejteket G1-, S-, ill. G2/M-fázisban szinkronizáltam. A különböző sejtciklus fázisú sejtekből készített agaróz blokkok S1 nukleáz-kezelésének, ill. urea/hő-denaturálásnak eredménye minden esetben egységesen hasonló fragmentációs mintázat volt. Tehát kimutattam, hogy a hurok-méretű fragmentációnak nincs sejtciklus függése.

Logaritmikus és stacioner fázisú *S. pombe* sejtekből készített agaróz blokkok hasonló mintázatot eredményeztek S1 nukleáz kezelést vagy urea/hő-denaturációt követően.

4. 1. 3. Hurok-méretű fragmentáció szuperhelicitás függése

Hurkonként átlagosan egy folytonossághiány létrejöhetne aspecifikus módon, pl nukleázok hatására úgy is, ha feltételezzük, hogy ezek hatása szuperhelicitás-függő. Ebben az esetben a hurokban megjelenő első nick megszüntetné a szupehelicitást, így egy második nick megjelenése valószínűtlen ugyanabban a hurokban. Ennek a korábban nem vizsgált altertnatívának a vizsgálatára a szferoplasztokat tartalmazó blokkokat különböző

koncentrációjú EBr-dal kiegészített izotóniás oldatban inkubáltam a feltárás előtt. Az interkalálódó EBr növekvő koncentrációjánál a negatív szuperhelikális állapotú DNS először kitekerődik, majd túltekert állapotba kerül. Az agaróz blokkokat ezután S1 nukleáz kezelésnek vetettem alá, ill. urea/hő-denaturálással hasonlítottam össze a mintákat. A különböző EBr koncentrációk jelenléte, azaz a DNS különböző szuperhelikális állapota a sejtek feltárásának pillanatában, nem befolyásolta a hurok-méretű fragmentumok kialakulását. Ez az eredmény cáfolja az átlagosan hurokméretű fragmentek létrejöttének fent említett alternatív magyarázatát.

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

2D-gélelektroforézis mindegyik kromoszóma 50 kb körül fókuszálódó DNS fragmentációját eredményezte FIGE gélen mindkét élesztő esetében. Ez a tény a kromoszómák ill. a két élesztőfaj közötti genetikai és epigenetikai különbségek ismeretében számos tényezőt kizár a fragmentáció létrejöttét meghatározó fő faktorok köréből.

1. 5. Töréspontok vizsgálata S. cerevisiae I. kromoszómáján

CHEF segítségével meghatároztam a FIGE-vel 50 kb körül fókuszálódó fragmentumok pontosabb méreteloszlását. Az, összhangban a kromatin hurkok méretével, egy hozzávetőlegesen 20-200 kb-os fragmentumokat felölelő intervallumot fed le, amint ezt a mintegy 400 kb-ig feloldást biztosító CHEF program használatával megállapítottam.

Az S. cerevisiae I. kromoszómáján vizsgáltam a nick-ek elhelyezkedését Southern blottal. Az S1-szenzitív helyek bizonyos régióknál fókuszálódtak. Ezek a régiók egyaránt megjelentek abban az esetben, amikor az S1 emésztés megelőzte vagy követte az (Sfi I vagy Not I) restrikciós enzim emésztést. Az I. kromoszómán végzett S1 szenzitív helyek térképezésénél kapott feloldásnál és érzékenységnél, a fragmentáció részben stochasztikus, részben pedig szekvencia/hely specifikus megoszlást mutat. A nick-ek az ARS szekvenciák közelében helyezkedtek el, a CHEF által megszabott feloldásban. Ez arra utalhat, hogy a nick-eknek a replikációval kapcsolatos funkcionális jelentőségük lehet.

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

Southern blottos vizsgálatok alapján 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, ez minden 2-20. rDNS egységen belül (átlagosan: 11 egységenként) történő fragmentációs eseményt jelent. Mivel azonos szekvenciájú egységekről van szó, a nick-ek létrejöttében epigenetikai faktoroknak tulajdoníthatunk jelentőséget.

Az rDNS kópián belül egyszer hasító restrikciós enzimekkel az rDNS régiót egységeire bontottam. Southern hibridizációt követően S1 nukleáz emésztést követően diszkrét sávok jelentek meg, mely tény a nick-ek szabályos helyeken történő előfordulására utal.

Ezen helyek térképezéséhez az rDNS egységeket külön migráló komplementer szálakra szeparáltam urea/hő-denaturáció és agaróz gélelektroforézis során. Az egyszálú DNS szálak külön és gyorsabban futnak a gélen, mint a ds DNS. A szemközti szálak szekvencia öszzetételének összehasonlítása alapján a szeparációt C/G és (A+T)/(C+G) arány befolyásolja.

Egyszál-specifikus Southern próbát használva a szeparált két szálon külön-külön térképezhető a folytonossághiányok elhelyezkedése. A denaturálódás következtében manifesztálódó nick-ek szintén adott szakaszokra fókuszálódtak.

A detektált egyszál-törések közül a *replikációs villa barrier*nél (RFB) előforduló nick-et tekintem az rDNS gén klaszter hurok-méretű fragmentációját kijelölő nick-nek. A további három nick azonban, PCR termékeken végzett kontroll kísérletek alapján, valószínűleg a restrikciós endonukleáz emésztés következménye.

4. 1. 8. Egyszálú törések és ARS szekvenciák kapcsolatának vizsgálata S. cerevisiae rDNS-ben

„Ab-Southern”-nel (általam kifejlesztett metodika, ld. Módszerek) kimutattam, hogy az ARS szekvenciáját hordozó Pvu II fragmentumon belül nem volt detektálható biotin-dUTP beépülés. Tehát nick-ek nincsennek jelen az rDNS ARS szekvenciájának szűkebb (2 kb-os) környezetében. Másrészről nickek voltak detektálhatóak az RFB-t hordozó fragmentumon.

4. 2. Génátrendeződések és folytonossághiányok detektálására alkalmas módszerek fejlesztése

Nagyobb deléciók, inszerciók könnyedén kimutathatók az adott régiót felölelő PCR termékek hossza alapján. Kisebb eltérések felismerésénél azonban hasznos módszernek ígérkezett az általunk 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.

A kétféle denaturált molekula renaturálását követően keletkező kombinációk 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 hasít. Ezután streptavidinnel bevont mikrogyöngyhöz kötöttük a molekulákat, majd áramlási citométeren mértük a fluoreszcencia változást. A túlnyúló végekkel rendelkező hibrid molekulák sokkal érzékenyebbek a kezelésekre, mint a homoduplexek.

Egy 725 bp-os jelöletlen PCR terméket Xba I restrikciós enzimmel hasítottuk, mely egyszer hasít az adott szekvencián belül. A hasított DNS-t biotinnal jelölt, azonos hosszúságú, de hasítatlan PCR termékkel hibridizáltuk 1:1 arányban. A hibridizálást követően az eredeti termékeken kívül olyan hibrideket is kaptunk, melyek molekulánként egy nick-et hordoztak. Nick-transzlációval fluorescein-12-dUTP nukleotidokat építettem be. A biotin-jelölt hibridet streptavidinnel bevont mikrogyöngyre kötöttem és áramlási citométeren mértük a fluorescencia növekedést.

Kidolgoztam egy urea-agaróz gélelektroforetikus módszer alapú technikát az urea/hő-denaturált DNS két szeparált szálának analíziséhez, ami különféle vizsgálatokhoz alkalmazható, többek között szál-specifikus nick-ek detektálásához.

5. Megbeszélés

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

A ~100%-os életképességű, agarózba ágyazott *S. cerevisiae*-ből és S. *pombe* DNS-ben S1 nukleázzal, vagy urea/hő denaturációval kimutatott egyszálú folytonossághiányok vagy a lízis során generálódnak, vagy valószínűbb, hogy eleve, a feltárást megelőzően is jelen vannak a genomi DNS-ben, feltehetően maszkírozódva.

Az interkalálódó EBr-dal változtatott szuperhelicitás nem befolyásolta a kezelésekor keletkező fragmentumok méretét. Ez valószinűtlenné tesz egy olyan interpretációt, mely a hurkonként átlagosan egy nick keletkezését azzal magyarázná, hogy az nick létrejötte nyomán relaxálódó – így teljes terjedelmükben renaturálódott – kromatin hurkok már további sérülésekre rezisztensebbek lehetnek, így kialakítva a hurkonkénti átlag egy nick-et.

A *S. cerevisiae* és *S. pombe* kromoszómák közül, a többi kromoszómától eltérően, a XII.-estöbb, mint felét tandem ismétlődő szekvencia, az rDNS alkotja – ez a kromoszóma sem viselkedett a többitől eltérően. Érdekes, hogy egy, minden kb. 11. transzkripciós egységen belül megfigyelhető nick konzekvens módon az RFB területére esett, azt sugallva, hogy ezeket a folytonossághiányokat meghatározó tényezők epigenetikus természetűek, hiszen miden egység azonos szekvenciát hordoz.

Egy saját fejlesztésű metodikával, az„Ab-Southern" módszerrel kimutattam, hogy nincs kapcsolat a nick-ek és ARS szekvenciák között az rDNS kópiákban. Ezzel a technikával azt is igazoltam, hogy az RFB-nél észlelt nick a restrikciós enzim kezelés előtt már jelen volt a DNS-ben, vagyis nem artefaktuális eredetű. Az NTS1 régión belül találjuk a replikációs villa barriert (RFB), melyhez a Fob1 protein kötődve biztosítja az ARS szekvencia aktivációját követően kialakult replikációs villa elakadását az egyik irányban. Fob1 és replikáció, valamint topoizomeráz I-függő DNS töréseket valóban detektáltak ezekben a szekvenciákban.

5. 2. Génátrendeződésre és folytonossághiányok detektálására alkalmas módszerek fejlesztése

Kidolgoztam egy új módszert, melynek segítségével egyazon 1-20 kb méretű DNS molekula komplementer szálai szeparáltan vizsgálhatók. A módszer jól reprodukálható és egyszálú folytonossághiányokat térképezésekor számos vizsgálatra alkalmazható.

Mikrogyöngyökön immobilizált PCR termékek áramlási citometriás analízisével módszereket dolgoztam ki gyakori genetikai elváltozások kimutatására. A deléciók és inszerciók gyakori genetikai módosulások, melyeknek szerepe lehet genetikai betekségekben és rákos elváltozásokban. Mozgékony genetikai elemek, vírusok, javítatlan 1 nukleotid csúszás a replikáció során, triplet expanzió a leggyakoribb deléciót/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 szolgálhat az amplifikáció teszt-templátjaként. 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 egy áramlási citometriás eszköztárat adnak a molekuláris biológiai DNS analízishez.

6. Összefoglalás

Kolónia-képzési teszttel igazoltam, hogy a kromatin fragmentációs jelenséget ~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 folytonossághiányok 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.

rDNS specifikus Southern próba segítségével térképeztük az rDNS szakaszokon belül a hurok-méretű fragmentációt kijelölő nick-ek helyét. Behatároltuk annak a régiónak a helyét az rDNS egységeken belül, ahol a nick-ek előfordulása szabályosságot mutat: ez a RFB-ével esett egybe.

Új elektroforetikus és mikrogyöngy alapú áramlási citometriás módszereket dolgoztam ki.

7. Közlemények

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**

Összesített impakt faktor: 18,136

Poszterek:

Éva Hegedüs, Endre Kókai, György Vereb, Zsolt Bacsó, Lóránt Székvölgyi, Viktor Dombrádi and Gábor Szabó: Mapping the arrangement of nicks marking loop-size domains in yeast chromatin; Edinborough, Higher Order Chromatin Architecture Conference (2009)

Hegedüs Éva, Kókai Endre, Székvölgyi Lóránt, Roszik János, Dombrádi Viktor és Szabó Gábor: Hurok-méretű doméneket kijelölő nick-ek térképezése az élesztő kromatinban; Nyíregyháza, Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok (2009)

Hegedüs Éva, Kókai Endre, Székvölgyi Lóránt, Dombrádi Viktor és Szabó Gábor: Hurok-méretű doméneket kijelölő DNS bevágások nem véletlenszerű elrendeződése az élesztő kromatinban; Szeged, Biokémiai konfereccia (2008)

Hegedüs Éva, Molnár Mónika, Szabó Gábor: Magasabbrendű kromatinszerkezet vizsgálata Saccharomyces cerevisiae és Schizosaccharomyces pombe sejtekben; Balatonfüred, Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok (2007)

Pataki Judit, Székvölgyi Lóránt, Hegedüs Éva, Szabó Miklós, Lantos Erika, Lustyik György és Szabó Gábor: Mikrogyöngyök áramlási citometriás analízisén alapuló diagnosztikai módszerek; Budapest, Sejtanalitikai konferencia (2004)