

*Székvölgyi Lóránt*

## **Ha török, ha szakad: DNS és genomszerkezet-kutatás a Debreceni Egyetemen\***

### **Bevezetés**

A természet máig megoldatlan talánya, hogy vajon hogyan fér el egy közel két méter hosszúságú makromolekula, az emberi örökítőanyag (a dezoxiribonukleinsav, DNS), egy körülbelül 5 mikrométer átmérőjű sejtmag piciny térfogatában? A folyamat bonyolultságát illusztrálendő, körülbelül olyan ez, mintha egy tevét akarnánk átszuszakolni a tű fokán: „*Nem fér bele csak a fele, nem fér több más' belefele!*” (Republic együttes: „A teve a tű fokán” című szerzeménye).

A természettudományokban kevésbé jártas, vagy abban idegenül mozgó kedves Olvasóim számára a fejezet végén található táblázat egyfajta tömör és humoros megoldását kínálhatja a fenti talány megfejtésének. Kérem Öket, hogy nyugodtan ugorják át a következő részeket és lapozzanak közvetlenül az I. táblázathoz. Azon Olvasókat viszont, akik úgy döntenek, hogy végigolvassák e cikket, arra invitálom, hogy ismerjék meg a közelmúltban megalakult MTA–DE Lendület kutatócsoport munkáját, amely a fenti dilemmára kíván tudományos igényű választ adni.

### **Török, szakad**

A DNS egy hosszú polimer lánc, amely mechanikai tulajdonságait tekintve rigid testként modellezhető. Perzisztenciahossza, amely a polimerek hajlékonyságára jellemző fizikai paraméter, 50 nm (~150 bp); vagyis az emberi genom hosszának ismeretében ( $3 \times 10^9$  bp) megbecsülhetjük, hogy a DNS hányféle térbeli konformációt képes spontán módon felvenni. Ez a szám egészen pontosan  $3 \times 10^9 / 150 = 2 \times 10^7$ . A lehetséges térbeli szerkezetek kiugróan magas száma nyilvánvalóan nincs összhangban a kromatinszerkezeti kutatások több alapvető megfigyelésével: például, azzal, hogy a sejtek örökítőanyaga, a kromoszómák, nem csupán DNS-ből, hanem DNS+hiszton+nem-hiszton fehérjék komplexeiből állnak, amelyek nyitottabb (vagyis rugalmasabb) és zártabb (merevebb) kromatin régiókat alakítanak ki minden egyes sejtmagban. Ezen kívül a kromatin szerkezeti alap-

---

\* MTA-DE Lendület, Genomszerkezet és Rekombináció kutatócsoport; Molekuláris Medicina Kutatóközpont (DE Általános Orvostudományi Kar); Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet (DE ÁOK).

egysége, a nukleoszóma, nagyszámú és kémiaiag rendkívül változatos poszt-transzlációs módosításain keresztül<sup>1</sup> a különféle sejtes funkcióknak megfelelően finomhangolja a nyitottabb és zártabb kromatin régiók térszerkezetét. Egy másik alapvető megfigyelés, hogy a kromoszómák egy sor diszkrét topológiai állapotot vesznek fel a sejtosztódási ciklus során, s e térbeli állapotok egyrészt nagyságrendekkel kisebb számúak az elméletileg várható értéknél, másrészt tökéletesen reprodukálhatóak minden egyes interfázis és mitózis/meiózis során. A DNS e duális viselkedését (stabilitás és flexibilitás) az evolúció időskáláján szemlélve igen logikusnak tűnik, hogy ez a kettősség elengedhetetlenül szükséges az alapvető sejtes funkciók és a funkciókat működtető szerkezeti elemek megőrzéséhez (pl. számtartó/számfelező osztódás, DNS replikáció, transzkripció) és azok lezármazási úton történő továbbadásához.

A flexibilitást növelő fontos tényező lehet a DNS molekula egyik vagy mindkét szálát megszakító folytonossághiányok jelenléte. Spontán, indukált vagy genetikailag programozott DNS törések gyakorlatilag folyamatosan keletkeznek a sejtekben a különféle sejtélettani és/vagy patológiás folyamatok révén, ám azokat hatékony repair rendszerek javítják ki. Megjegyzendő, hogy a kromoszómatörésekre általában, mint valamilyen patológiás állapotra gondolunk (részben jogosan, hiszen azok növelik a genom instabilitását, amely pl. a rosszindulatú sejtek jellemzője), viszont az utóbbi évek kutatásai számos olyan fiziológiás folyamatot tártak fel<sup>2</sup>, amelyek programozott DNS törések létrejötte nélkül nem játszódhatnának le. Kutatócsoportom érdeklődésének a fókuszában az utóbbi, vagyis a fiziológiás állapotokra jellemző DNS léziók (törések, R-hurkok) és azok háromdimenziós kromatinszerkezetbe történő beágyazottsága áll. Hipotézisünk szerint e speciális struktúráknak fontos szerepe lehet a genom térbeli szerveződésének a kialakításában.

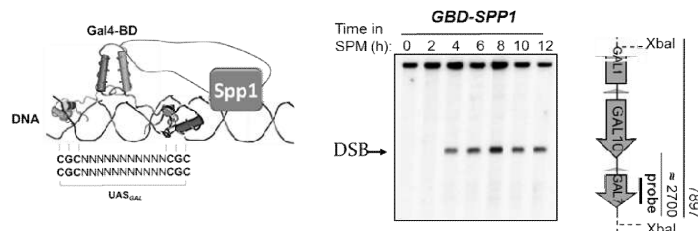
### Kísérleti megközelítések

Kísérleteinkben arra a kérdésre keressük a választ, hogy a kromoszómák milyen térbeli interakciós mintázatok szerint működtetnek bizonyos alapvető sejtes folyamatokat? Például a homológ rekombináció folyamatát, amelynek alapvető szerepe van a biológiai sokféleség kialakulásában az evolúció során, vagy az immunológiai védekezésben, az ivarsejtek kialakulásában, vagy a DNS molekula károsodásainak a kijavításában.

Pékélesztő (*Saccharomyces cerevisiae*) sejtekben a meiotikus homológ rekombináció elindulásához sejtenként 150–200 DNS duplaszál törés szükséges. Ezek a törések nem véletlenszerűen, hanem genetikailag programozott módon alakulnak ki a Spo11 enzim hatására. A Spo11 nem önmagában, hanem egy ún. rekombinoszóma enzim komplex részeként működik, amelyek a kromatin hurkok kihorgonyzási pontjainál dúsulnak, viszont maguk a DNS törések nem ezekre a pontokra, hanem a kromoszómák hurok doménjeire esnek. Ezt a szerkezeti

paradoxont az ún. tethered loop-axis complex (TLAC) modell bevezetése oldotta fel, amely szerint a DNS hurkok (ahol a törések vannak) és a kromoszómák tengelye (ahol a töréseket okozó enzimek vannak) fizikai kölcsönhatásba kell lépjenek egymással. Francia és ausztrál kollaborációs partnerekkel elvégzett kísérleteinkben a TLAC komplex molekuláris komponenseit karakterizáltuk. A résztvevő hiszton modifikációk szerepét tisztázandó kiemelt figyelmet fordítottunk a COMPASS nevű hiszton metiláz komplex<sup>3</sup> és az általa katalizált hiszton módosítások vizsgálatára. A kromoszómák előre meghatározott pontjain (célzottan) helyeztünk el hiszton H3K4me módosításokat, majd ugyanitt detektáltuk a DNS töréseket. Ezzel a megközelítéssel azt kívántuk bizonyítani, hogy amikor elhelyezzük a kromoszómán a hiszton-jelet, akkor valóban a várt helyen törik el a DNS és nem máshol – ok-okozati kapcsolatot igazolva a két változó között a korábbi statisztikai összefüggés helyett. Ehhez egy olyan géntechnológiai eszközt fejlesztettünk ki, amely egyrészt felelős a vizsgált hiszton módosítás kialakulásáért, másrészt szelektíven odairányítható a DNS molekula előre megadott szakaszaihoz – egy Gal4 DNS kötő domént (Gal4BD) tartalmazó „célzó” egység segítségével<sup>4-5</sup>. A Gal4BD-COMPASS fúziós fehérjék – a kromoszómákhoz odairányítva – törést és rekombinációt váltottak ki, így bizonyítva az ok-okozati összefüggést a hiszton jel és a rekombináció iniciációja és között.

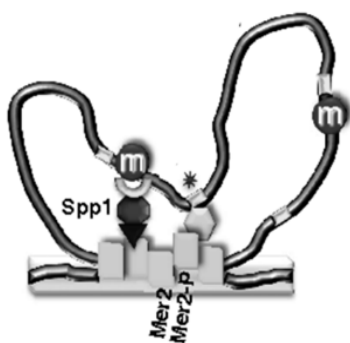
A Gal4BD-targeting kísérleteink egy váratlan és elsőre megmagyarázhatatlan eredménye volt, hogy a legerősebb DNS törés indukáló hatást nem a COMPASS katalitikus alegysége (Set1) fejtette ki, hanem a 40 KDa-os Spp1 nevű egység, amely sokszorosan felülmúlta a Set1 hatását<sup>5</sup> (1. ábra).



**1. ábra:** A GAL4BD-Spp1 kiméra fehérjét rekombinációsán „hideg” kromatin területekre irányítva az rendkívül erős DNS törés-indukáló hatást fejt ki.

Adódott a kérdés, hogy vajon az Spp1 fizikai kölcsönhatásba lép az egyik rekombinoszóma fehérjével (pl. a Spo11-gyel)? A teljes (~6000) élesztő fehérje kódoló génekre vonatkozóan elvégeztünk egy élesztő két-hibrid szűrést, amelyben csaliként az Spp1 fehérjét használtuk. A kísérlet eredményeként a Mer2 rekombinoszóma fehérjét azonosítottuk az Spp1 interakciós partnereként. (A Mer2 a Spo11 közvetlen partnere és aktivátora, amely a kromoszóma tengelyre lokalizálódik.) A két fehérje fizikai kölcsönhatását megerősítettük *in vivo* kísérletekben.

Kísérleteink végeredménye egy olyan rekombinációs modell megalkotása volt, amely egyrészt kiterjesztette a régebbi TLAC modellt, másrészt molekuláris szinten megmagyarázta a meiotikus DNS dupla-szál törések beágyazottságát a magasabb rendű kromatin szerkezetbe<sup>4</sup> (2. ábra).



**2. ábra:** A meiotikus rekombináció iniciációjának munkamodellje.

Az Spp1 fehérje a PHD ujj doménjén keresztül a nukleoszóma-mentes szakaszokat szegélyező H3K4me3 jelhez kötődik, majd a Mer2-kötő doménjén keresztül a kromoszóma szkaffold-on található rekombinószóma komplexszel lép fizikai kölcsönhatásba (a Mer2 fehérjén keresztül). Ezáltal a kromatin hurkokon található rekombinációs forrópont „oda-

irányítódik” a kromoszóma tengelyen lokalizálódó Spo11 enzimhez, amely DNS kettősszál törést indukál.

### Perspektíva

További kísérleteinkben kitüntetett figyelmet szentelünk annak a kérdésnek a megválaszolására, hogy vajon a TLAC komplexhez hasonló (vagy attól eltérő) térbeli DNS interakciós mintázatok átörökökíthetőek-e az utódgenerációkra, illetve ha igen, akkor milyen genetikai vagy epigenetikai mechanizmus szerint? Ezt a kutatási területet a szakzsargonon „vadiúj” genetikának hívja, amely a klasszikus genetikai és molekuláris biológiai megközelítések mellett magába foglalja a genomika, a polimerfizika, matematika és bioinformatika eszköztárát is. Bízom abban, hogy e korántsem triviális kísérletek sikeres megvalósítása a *genomszerkezet és transzgenerációs epigenetika* tudományterületének egy új, nemzetközileg is elismert vezető műhelyének megalakulását eredményezheti hazánkban.

### Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom korábbi és jelenlegi munkatársaimnak és kollaborációs partnereimnek, különösen az MTA–DE Lendület kutatócsoport tagjainak: Fürtös Ibolya, Nagy Éva, Mosolygó–Lukács Ágnes, Petrucz Anita, Sipos Éva, Gyapjas Boglárka, Qiuzhen Li, Hetey Szabolcs, Halász László és Karányi Zsolt. Köszönettel tartozom Szabó Gábor professzornak (DE ÁOK, Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet), hiszen kutatási programom az általa sok éve vizsgált kromatin-szerkezettel kapcsolatos kutatásokról nőtte ki magát. Végül, de nem utolsósorban, nagy-nagy köszönettel tartozom családomnak.

### Hivatkozások

1. Kouzarides, T. Chromatin modifications and their function. *Cell* **128**, 693–705 (2007).
2. Szekvolgyi L, Nicolas A From meiosis to postmeiotic events: Homologous recombination is obligatory but flexible FEBS JOURNAL 277:(3) pp. 571–589. (2010).
3. Dehé, P.-M. *et al.* Protein interactions within the Set1 complex and their roles in the regulation of histone 3 lysine 4 methylation. *J. Biol. Chem.* **281**, 35404–12 (2006).
4. Szekvolgyi L\*, Ohta K, Nicolas A\* Initiation of meiotic homologous recombination: flexibility, impact of histone modifications and chromatin remodelling. CSH PERSPECT BIOL (2015) – \*megosztott utolsó-szerzők.
5. Acquaviva L\*, Szekvolgyi L\*, Dichtl B, Dichtl BS, Saint Andre CD, Nicolas A, Géli V. The COMPASS Subunit Spp1 Links Histone Methylation to Initiation of Meiotic Recombination. *SCIENCE* 339:(6116) pp. 215–218. (2013) \*megosztott első-szerzők.

1. táblázat: A világ nagy talányának (humoros) megfejtése:  
hogyan fér át a teve a tú fokán?

1	Felhevítem a tút úgy, hogy képlékeny legyen, majd kinyújtom akkorára, hogy átférjen rajta a teve.
2	Elégetem a tevét, majd a hamut átszórom egy piciny tölcser segítségével. Túl nagy szemcséjű hamu esetén használunk jobban égő tevét.
3	A tevét feloldom erős savban, és az oldatot áttöltöm a tölcser segítségével. (Ez a kedvencem!)
4	Sokszor átmegyek úthengerrel a tevéen, vagy beteszem a húsdarálóba stb.; a lényeg, olyan masszát képezek a tevéből, ami már átmegy. Vegyük figyelembe, hogy a teve gyorsabb, mint az úthenger.
5	Éles késsel akkora darabokra vágom a tevét, hogy azok átférjenek.
6	Feltalálom a teleportgépet, és a tevét vivő energianyalábot átvezetem a tú fokán.
7	Veszek egy fekete lyukat, beleteszem a tevét, ami hihetetlenül nagy tömegvonzás hatására gyakorlatilag nulla térfogatúvá tömörül, így már simán átfér.
8	Veszek egy erős szívó hatású valamit, és azzal átszívom.
9	Feltalálom az időgépet, és előremegyek vele az időben addig, amíg az emberiség vagy az azt követő civilizációk valamelyike ki nem talál végtelenfajta megoldást. Ezután visszajövök, és a saját nevemben publikálom.

forrás: [http://issuu.com/feszec/docs/jubileum\\_k\\_sz](http://issuu.com/feszec/docs/jubileum_k_sz)