

——— Tudományos Diákköri Dolgozat ———

Batki Júlia

Vegyész MSc I. évfolyam

Az uracil-tartalmú DNS sorsa ecetmuslicában

Témavezetők:

Prof. Vértessy G. Beáta, MTA doktora, egyetemi tanár

Horváth András, tudományos segédmunkatárs

Magyar Tudományos Akadémia Természettudományi Kutatóközpont

Enzimológia Intézet

Genom metabolizmus és javítás csoport



——— Eötvös Loránd Tudományegyetem ———

——— Természettudományi Kar ——

— Budapest, 2012 —

Tartalomjegyzék

1. Köszönetnyilvánítás	4
2. Rövidítések	5
3. Irodalmi áttekintés	6
3.1 A DNS	6
3.2 Uracil a DNS-ben	7
3.3 Az uracil kizárása a DNS-ből	10
3.4 Az uracil eltávolítása a DNS-ből	11
3.4.1 Báziskivágásos javítómechanizmus	12
3.4.2 Uracil-DNS glikozilázok	12
3.5 DNS károsodás	14
3.6 <i>Drosophila melanogaster</i> , avagy az ecetmuslica	14
3.6.1 A modellszervezet	14
3.6.2 Enzimfunkció vizsgálata modellszervezetekben	15
3.6.3 Az uracil-DNS szerepe az ecetmuslicában	17
4. Célkitűzések	18
5. Anyagok és módszerek	19
5.1 Sejtkultúrák fenntartása és kezelésük drogokkal	19
5.2 Felhasznált <i>Drosophila melanogaster</i> törzsek	20
5.2.1 Életképesség vizsgálat	21
5.3 Immuncitokémia és immunhisztokémia	21
5.3.1 Sejtek immunfluoreszcens jelölése	23
5.3.2 Szövetek immunfluoreszcens jelölése	23
5.4 TUNEL próba	25
5.5 Mikroszkópia	26
5.6 DNS és RNS izolálása szövetből	27
5.7 Nukleinsav koncentrációmérés	27
5.8 cDNS készítés	28
5.9 DNS emésztés	29
5.10 DNS fragmentumok elválasztása gélelektroforézissel	29

5.11	DNS izolálása gélből	30
5.12	PCR reakció	30
5.12.1	mRNS kifejeződés kvantitatív meghatározása	31
5.12.2	Uracil mérés DNS-ben	33
6.	Eredmények összefoglalása	36
6.1	A dUTPáz hiányában tapasztalt letalitás molekuláris mechanizmusának vizsgálata	36
6.1.1	Genomi integritás csökkenés	36
6.1.2	Mi felelős az uracil-DNS integritásának csökkenéséért?	40
6.2	A Thd1 hiányának hatása a DNS nukleotid összetételére	41
6.2.1	A Thd1 expresszió csökkenése	41
6.2.2	A genomi uracil tartalom vizsgálata	42
6.3	A dUTPáz túltermelés hatása	43
7.	Eredmények értékelése és következtetések	45
8.	Összefoglalás	48
9.	Hivatkozásjegyzék	49

1. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani **Prof. Vértessy G. Beátának**, csoportvezetőmnek, mert lehetőséget biztosított számomra a csoportban való munkára és hasznos tanácsaival segítette kutatásomat.

Köszönöm **Prof. Buday Lászlónak**, az MTA TTK Enzimológiai Intézet igazgatójának, hogy lehetővé tette számomra a kutatómunkát az intézetben.

Kiemelt köszönettel és hálával tartozom **Horváth Andrásnak**, témavezetőmnek, aki megismertette velem a kutatómunka és a terület szépségeit, felmerülő kérdéseimre mindig készséggel válaszolt, nagy türelemmel segítette és irányította munkámat, és tanácsaival hozzájárult ezen dolgozat elkészüléséhez.

Köszönet illeti **Róna Gergelyt** a mikroszkópos felvételek elkészítésért és hasznos, építő jellegű tanácsaiért.

Szeretném megköszönni **Erdélyi Miklósnak** és **Vilmos Péternek**, a Szegedi Biológiai Kutatóközpont Genetikai Intézet munkatársainak, hogy rendelkezésemre bocsájtották a kísérleteimben használt *Drosophila melanogaster* törzseket.

Köszönöm a **Genom metabolizmus és hibajavítás csoport minden tagjának** a biztatást és az ösztönző légkört, melyet teremtettek számomra.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni **családomnak** és **barátaimnak**, hogy mindig mellettem állnak és támogatnak, nélkülük a dolgozat nem jöhetett volna létre.

2. Rövidítések

A	adenin	HU	hidroxi-urea
AID	activation-induced deaminase aktiválás indukált dezamináz	MBD4	methyl-CpG-binding domain protein 4
AP hely	apurin/apirimidin hely (bázismentes hely)	mRNS	messenger RNS - hírvivő RNS
APE	AP endonukleáz	NLS	nukleáris lokalizációs szignál
ATM	Ataxia-telangiectasia mutated	ON	overnight - egész éjszaka
ATR	ATM and Rad3 related	PBS	phosphate buffered saline – izotóniás foszfát puffer
BER	base excision repair-báziskivágásos javítómechanizmus	PCR	polimerase chain reaction - polimeráz láncreakció
BSA	bovine serum albumin - szarvasmarha szérum albumin	PFA	paraformaldehid
C	citozin	pH2AX	foszfo-H2AX
cDNS	copy DNS	PIPES	piperazine-N,N'-bis(2- etánszulfonsav)
CSR	class switch recombination- osztályváltó rekombináció	qPCR	kvantitatív real time PCR
dATP	dezoxiadenozin-trifoszfát	RNR	ribonukleotid reduktáz
dCTP	dezoxicitidin-trifoszfát	RNS	ribonukleinsav
dGTP	dezoxiguanozin-trifoszfát	RNSi	RNS interferencia
DNS	dezoxiribonukleinsav	RPA	replication protein A
dNTP	dezoxiribonukleozid-trifoszfát	RT	reverz transzkriptáz
dTTP	dezoitimidin-trifoszfát	siRNS	Small interfering RNS
dUMP	dezoitiridin-monofoszfát	SMUG1	Single-strand selective monofunctional uracil DNA glycosylase
dUTP	dezoitiridin-trifoszfát	T	timin
dUTPáz	(dezoitiridin-trifoszfát)-nukleotid pirofoszfátáz	Thd1	TDG muslica homológja
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav	TDG	timin/uracil-mismatch-DNS- glikoziláz
EG	Eva Green	TdT	terminal deoxynucleotidyl transferase
EGTA	etilén-glikol-tetraecetsav	TRIS	trisz-(hidroximetil)-aminometán
FBS	fetal bovine serum - magzati szarvasmarha szérum	TS	timidilát szintáz
FdUMP	5-fluoro-2'-dezoitiridin-5'-monofoszfát	TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
FdUR	fluoro-dezoitiridin	U	uracil
G	guanin	UDG	uracil-DNS glikoziláz
GS	goat serum - kecske szérum	UNG	U-DNS N-glikoziláz

3. Irodalmi áttekintés

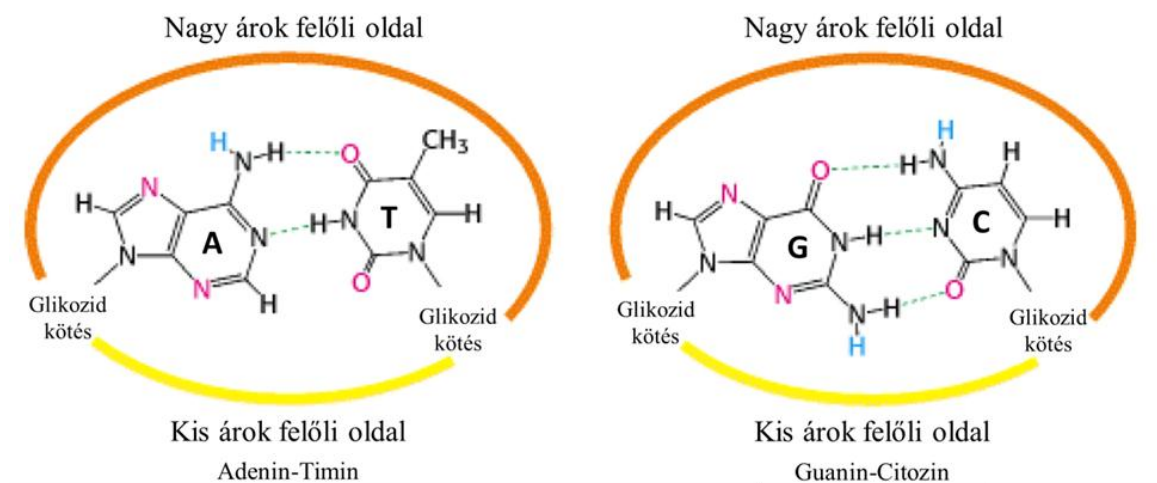
3.1 A DNS

Minden élőlény számára az egyik legfontosabb feladat a genetikai információ változatlan állapotban történő átadása egyik generációról a másikra. Az élővilágban néhány vírus kivételével a DNS molekulák látják el ezt a szerepet. A DNS egy biopolimer molekula, melyet nukleotidok építenek fel, amik négyféle bázist tartalmazhatnak: kétféle purin bázist (adenin, guanin), és kétféle pirimidin bázist (timin, citozin). A bázisok β -N-glikozidos kötással kapcsolódnak a cukor komponenshez, ami jelen esetben a 2-dezoxi-D-ribóz. A cukormolekula ötödik szénatomján lévő hidroxilcsoporttal képez észterkötést a foszforsav. A polinukleotidban a monomerek 3',5'-foszfodiészter kötással kapcsolódnak össze és két ilyen szál antiparalell lefutással egy kettős hélix szerkezetet alkot. A hélixet a komplementer bázisok közötti hidrogén-kötések és a szomszédos bázisok közötti hidrofób kölcsönhatások tartják össze. A Chargaff szabálynak megfelelően az adenin mindig a timinnel, a guanin mindig a citozinnal képez párt. Előbbinél két hidrogén-kötés alakul ki, utóbbi esetén három. Abból eredően, hogy a bázisok glikozidos kötése nem teljesen egymással szemben találhatók, a bázispárok kiterjedtebb oldalára nyílik a nagy árok, míg a másik oldalon, kisebb felületet adva a kis árok.

A biológiai információt a bázisok változatos sorrendjükben, szekvenciájukban hordozzák. A szekvencia specifikus felismerését az enzimek számára az teszi lehetővé, hogy a DNS kis és nagy árkában az egyes bázisok más-más csoportjai találhatók, ezáltal eltérő hidrogénkötési mintázat alakul ki, ami csak egy adott bázisra lesz jellemző. A kis árok felől hozzáférhető a guanin 2-amino és a citozin 2-oxo csoportja által kialakított hidrogénkötés, ezáltal megkülönböztethető az A-T bázispártól. A nagy árok felől különböztethetőek meg a guanin 6-oxo - citozin 4-amino valamint az adenin 6-amino - timin 4-oxo csoportok által kialakított hidrogénkötések. Szintén a nagy árokban érhető el a timin 5-metil-csoportja (1. ábra).

Az információ áramlásának iránya: DNS→RNS→fehérje. DNS-ről RNS a transzkripciónak nevezett folyamat során keletkezik, az RNS-ről fehérje pedig a transzláció során. A DNS-ben tárolt helyes információ szükséges a sejt megfelelő működéséhez, és ezt kell utódsejtjeibe is juttatnia. Külső és belső hatásokra azonban a bázisok és maga a DNS is könnyen károsodhatnak.

Azt az eseményt, amikor a DNS szekvenciájában történő módosulás megváltoztatja a kódolt információt, mutációnak nevezzük.



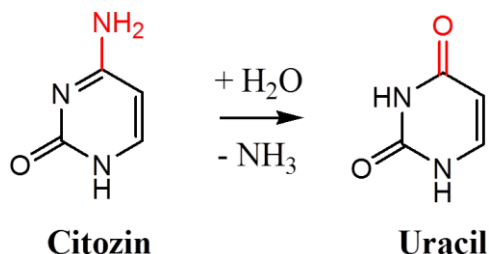
1. ábra: A DNS [1]

A DNS-ben az adenin timinnel, a guanin pedig citozinnal képez párt. A bázisok glikozidos kötése nem egymással szemben találhatók, ezért megkülönböztethető a nagy árok és a kis árok. Az enzimek számára a bázisok specifikus felismerését a DNS árkokban található különböző csoportok és az eltérő hidrogénkötési mintázat teszi lehetővé.

3.2 Uracil a DNS-ben

A DNS-mutáció leggyakoribb forrásai a bázisok kémiai átalakulása, illetve a nem megfelelő Watson-Crick bázispárosodás. Ha ezek a DNS szintézis előtt, illetve a szintézis alatt nem javítódnak ki, akkor a két új szál egyikében megjelenhet a mutáció.

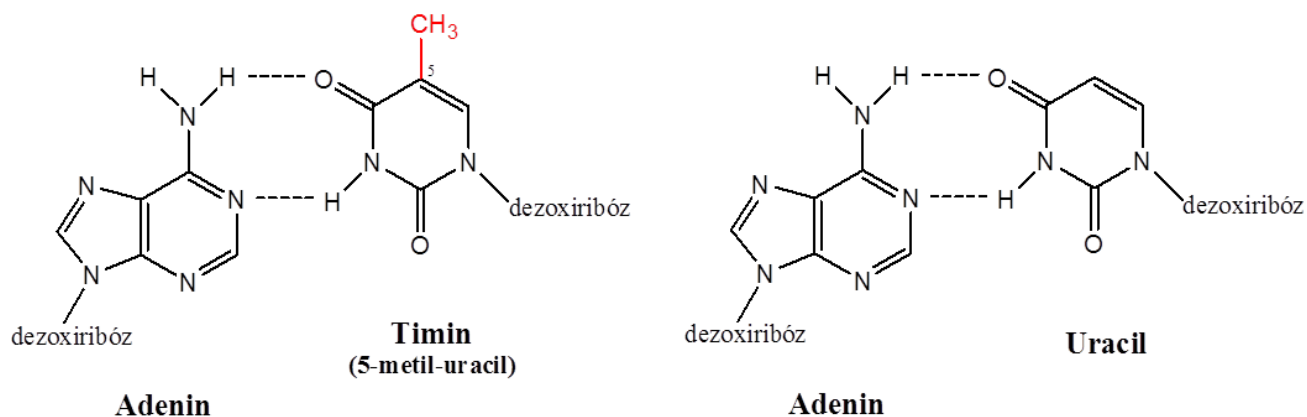
A DNS bázisainak módosulása bekövetkezhet külső hatásokra és fiziológiás körülmények között spontán is. Előbbire jó példa a bázisok metilálódása például nitrozaminok [2], vagy oxidációja reaktív oxigén komponensek (ROS) hatására [3]. Utóbbira példa az aromás gyűrűhöz kapcsolódó aminocsoport vizes hidrolízise, melynek során a megfelelő hidroxil-vegyület és ammónia keletkezik. Ezt a folyamatot dezaminációnak nevezzük. Különböző molekulák, például a nitrogén-monoxid és a salétromossav, illetve reaktív gyökök, mint a hidroxilgyök, a reakciót elősegítik. Az így keletkező módosult bázisok mind eltérő bázispárpépzési hajlammal rendelkeznek, tehát mutagének [4]. A leggyakoribb dezaminálódási termék a citozinból keletkező uracil, mely természetes esetben nem tartozik a DNS-t felépítő bázisok közé (2. ábra).



2. ábra: A citozin dezaminációja

A citozin dezaminációja spontán körülmények között is végbemenő folyamat, melynek során uracil keletkezik. A nitrogén-monoxid és a salétromosav, illetve reaktív gyökök a reakciót elősegítik.

Az uracil és a timin csak az 5. szénatomon egy metil-csoportban különböznek és ekvivalensek mind információátviteli képességüket tekintve, mind a bázispárosodás során a hidrogénkötési mintázatukat tekintve (3. ábra). A bázispárban résztvevő uracil csak a DNS nagy árka felől különböztethető meg a timintől, a metil-csoport hiányának köszönhetően.



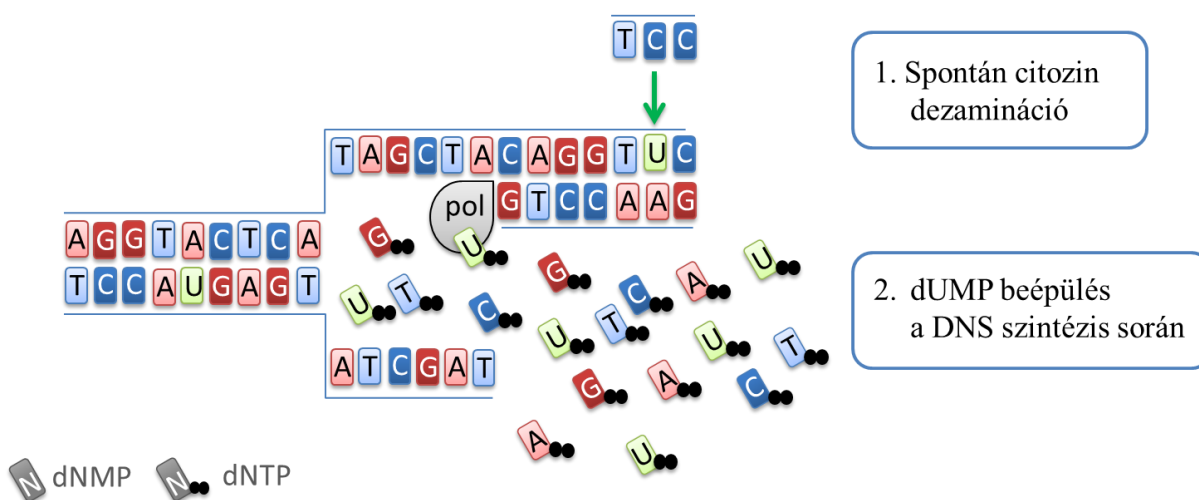
3. ábra: Adenin párban timinnel és uracillal

A timin az ötödik pozícióban lévő metil-csoportban különbözik az uraciltól. Az uracil bázispárképzési hajlamát tekintve timin analóg, ezért adeninnel képez párt.

A feltételezések szerint az evolúció során a DNS alapú élet csak később jelent meg, tehát a timin, szintén később képződhetett, mint az uracil. Erre utalhat az is, hogy a timin tartalmú dezoxiribonukleozid-trifoszfát (dTTP) *de novo* bioszintézise dezoxiuridin-monofoszfáton (dUMP) keresztül történik [5]. Ez a szintézis egy igen energiaigényes folyamat, tehát jogosan merül fel a kérdés, hogy az evolúció során miért volt szükség az uracil lecserélésére. Az általánosan elfogadott elmélet a fentebb tárgyalt citozin dezaminálódásával ad magyarázatot. A

nukleinsavbázisok közül a citozin a legkevésbé stabil a spontán dezaminálódás szempontjából (naponta átlagosan 50-500 citozin dezamináció történik sejtenként [6]). A reakcióban uracil keletkezik, ami azonban nem guaninnal, hanem adeninnel fog párt képezni, így a DNS megkettőződésekor a két új szál már nem lesz egyforma: egy $C:G \rightarrow T(U):A$ mutáció jön létre. Ha a DNS-ben az uracil az alapvető négy bázis közé tartozna, akkor nem lehetne megkülönböztetni a helyesen beépült uracilt a dezaminálódás során keletkezettől. A timin megjelenése azért jó megoldás, mert az így létrejött, metilcímkevel ellátott uracil lesz az adenin párja, és az uracil, mint dezaminálódási termék már észlelhető hibaként, és azt különböző javító mechanizmusok segítségével a sejt el tudja távolítani a DNS-ből.

Uracil nemcsak a citozin dezaminálódása során kerülhet be a DNS-be. A másik lehetséges út, ha a DNS szintézis alatt hibásan timin helyett épül be (4. ábra). A sejtben ugyanis jelen van dezoxiuridin-trifoszfát (dUTP) is, mert ez egy köztes terméke a *de novo* dTTP szintézisnek [7]. A szerkezetileg nagyon hasonló dTTP és dUTP között a legtöbb DNS polimeráz (kivétel archeák DNS polimerázai) nem tud különbséget tenni, így a replikáció során dUTP is beépülhet. Ezt a sejt úgy tudja kiküszöbölni, hogy alacsonyan tartja a dUTP/dTTP arányt, ezáltal csökkentve az uracil bekerülésének a valószínűségét [8].



4. ábra: Uracil a DNS-ben

A DNS-ben gyakori hiba az uracil megjelenése. Ennek egyik módja a dUMP helytelen beépülése a DNS szintézis során, ugyanis a legtöbb DNS polimeráz nem tud különbséget tenni a dUTP és dTTP prekursorok között. A másik út a citozin spontán dezaminációja.

A DNS-beli uracilt a javító mechanizmusok hibaként értelmezik és előfordulását a sejtek igyekeznek minimalizálni. Találtak azonban olyan fiziológiás folyamatokat, melyekben az uracil megjelenése a DNS-ben elengedhetetlen szerepet játszik. Ilyen a szomatikus hipermutáció (SHM) és az osztályváltó (class switch) rekombináció (CSR), melyek a szervezetbe kerülő idegen anyagokra adott immunválasz kialakításában elengedhetetlenek [9]. Az egyik legfontosabb immunsejtünk a B-limfocita, mely specifikus receptorokkal rendelkezik és az idegen anyagokra specifikus antitesteket termel. Ahhoz, hogy ezek minél többféle idegen anyagot felismerjenek, a sejtek régió specifikusan mutációkat hoznak létre. Ebben szerepet játszó enzim az aktiválás indukált dezamináz (AID - activation induced deaminase), mely a citozin dezaminációját katalizálja uracillá. Az átmenetileg megjelenő uracil részlegesen tud csak javítódni a nem megfelelő pontosságú DNS polimerázoknak köszönhetően, ezáltal jön létre a mutáció. Ezt a folyamatot nevezzük SHM-nek [10]. A CSR folyamatának első lépései hasonlóak, azonban az uracil kivágása során megjelenő egyes, majd kettős száltörések itt homológ rekombinációval javítódnak ki [9].

3.3 Az uracil kizárása a DNS-ből

A DNS szintézis során felhasznált építőelemek a dezoxiribonukleozid-trifoszfátok (dNTP). Ezek az alábbi négy bázist tartalmazzák: citozin (dCTP), timin (dTTP), guanin (dGTP), adenin (dATP). A dTTP bioszintézis egyik közti terméke az uracil-tartalmú dNTP, a dUTP. Ha ez nagy mennyiségben van jelen a sejtben, akkor a DNS polimerázok beépíthetik a dTTP helyett, hisz mint fentebb már említettem, a legtöbb DNS polimeráz nem tud különbséget tenni e két dNTP között. Ennek elkerülésében fontos szerepet játszó enzim, a dTTP bioszintézis útvonalában is létfontosságú enzim a (dezoxiuridin-trifoszfát)-nukleotid pirofoszfátáz (dUTPáz), mely a dUTP hidrolízisét katalizálja dUMP-vé és szervesetlen pirofoszfáttá. Ezzel a reakcióval a sejt minimalizálni tudja a dUTP/dTTP arányt. Az arány fenntartásához az enzim közvetve is hozzájárul azáltal, hogy a termékként képződő dUMP-ből további lépésekkel a sejt dTTP-t állít elő.

A dUTPáz a legtöbb szervezetben homotrimer felépítésű, és minden alegysége 5 konzervált szekvencia motívumot tartalmaz. Az alegységek β redői az úgynevezett "lekváros tekercs" (jelly roll) módon tekerednek fel. Az enzimben 3 aktív centrum található, minden centrum

felépítésében mind a 3 alegység részt vesz. Ez úgy jöhet létre, hogy az első egység adja az 1., 2., 4. motívumokat, a második a 3. motívumot és a harmadik egység pedig az 5. motívumot. Annak érdekében, hogy az igen magas energiatartalmú dNTP-k feleslegesen ne hidrolizálódjanak el, elengedhetetlen a dUTPáz szigorú szubsztrátspecifitása. Ezt két mechanizmus is segíti: az egyik a purinok, a ribóz és a timin szterikus kizárása, a másik pedig, hogy a hidrogénkötési mintázat uracilra specifikus. Az aktív centrumban egy vízmolekula található egy aszpartát oldallánc által koordinálva, mely a nukleofil támadásért felelős a dUTP α -foszfor atomján. A reakció S_N2 mechanizmussal játszódik le. Az enzim működését segíti a magnézium-ion [8].

Mivel a dUTPáz funkciója a DNS szintézishez kapcsolható, eukarióta élőlényekben az enzim a sejtmagban lokalizálódik. Emberben egy 22 kDa-os fehérjeként található meg ott, mely az N-terminálisán hordozza a magba jutáshoz szükséges nukleáris lokalizációs szignált (NLS). Ezen kívül létezik egy mitokondriális izoforma (23 kDa) is, mely csak N-terminális régiójában tér el a sejtmagi formától. Ebben a régióban található a 60 aminosavból álló szignál szekvencia, mely a lokalizációért felelős. Az izoformákat ugyanaz a gén kódolja, és a két enzim alternatív promoter használatával alakul ki. A magi forma expressziója sejtciklus függő, a mitokondriális izoforma pedig konstitutív expressziót mutat [11]. *Drosophila melanogaster*-ben szintén megtalálható a magi izoforma (23 kDa), mely hordozza az NLS-t az N-terminálison. A *Drosophila*-ban is jelen van egy másik izoforma (21 kDa), mely nem hordoz transzport szignált, így a citoplazmában lokalizálódik. Itt a két izoforma alternatív splicing-gal alakul ki. A humán dUTPáztól eltérően, a *Drosophila* homológ tartalmaz egy 28 aminosavból álló fajspecifikus szakaszt a C terminálison, melynek funkciója egyelőre ismeretlen [12].

A rosszindulatú elváltozások kezelése, a rákterápia kiemelt fontosságú terület napjainkban. A timidilát metabolizmus régóta fontos célpontja kemoterápiás kezeléseknek. A gyakorlatban ma is használt kemoterápiás szer az 5-fluoro-dezoxiuridin, mely a timidilát-szintáz gátolja, ami a dUMP átalakítását katalizálja dTMP-vé. A dUTPáz – a dUTP/dTTP arány szabályozója, a *de novo* timidilát bioszintézis másik fontos enzime - szintén lehetséges terápiás célpont [11].

3.4 Az uracil eltávolítása a DNS-ből

A sejtnak több védelmi vonallal kell rendelkezni ahhoz, hogy DNS-e változatlan állapotban maradjon és így kerüljön az utódsejtekbe. A hibát megelőző funkciónak tekinthető a dNTP

készletet szabályozó enzimek működése - ahová a dUTPáz enzim is tartozik - hiszen ezek felelősek azért, hogy ne kerüljön módosult bázis a DNS-be. Ha ez mégis előfordul, a sejt ezt is többféle mechanizmussal tudja kijavítani, hogy elkerülje a mutációt.

3.4.1 Báziskivágásos javítómechanizmus

A sejt az úgynevezett báziskivágásos javítómechanizmussal (Base Excision Repair - BER) végzi a kémiai módon módosult bázisok eltávolítását a DNS-ből. Az első lépést a DNS glikozilázok katalizálják, melyek hidrolizálják az N-glikozidos kötést a DNS bázis és a dezoxiribóz között, bázismentes (apurin/apirimidin-AP) helyet hagyva maguk után. A sokféle módosult bázisra különböző specifikus DNS glikozilázok alakultak ki [13]. Ezt követően a javítómechanizmus részeként a bázismentes helyeken az AP endonukleázok (APE) elhasítják 5' irányban a foszfodiészter kötést, aminek következtében szabad 3'-OH vég, ill. bázismentes 5'-dezoxiribóz-foszfát keletkezik. A bifunkciós DNS glikozilázok egyszerre rendelkeznek glikoziláz és AP liáz aktivitással is, így a második lépést is katalizálják. A következő reakció az 5'-dezoxiribóz-foszfát lehasítása, majd a megfelelő bázis beépítése, amit a DNS polimeráz β katalizál. Utolsó lépésként pedig a DNS ligáz újra kialakítja a foszfodiészter kötést.

3.4.2 Uracil-DNS glikozilázok

A DNS glikozilázok rengeteg fajtája ismert a különböző módosult bázisokra. Ezen enzimsorozat elsőként felfedezett tagja az uracil-DNS glikoziláz (UDG) volt [14]. Az UDG-nek több családja is ismert, melyek eltérő szubsztrátspecifitással és katalitikus hatékonysággal rendelkeznek, de közös bennük, hogy a DNS-ben levő uracil felismerésében és kivágásában van szerepük. Az UDG családon belül az U-DNS N-glikoziláz (UNG) fedezték fel először. Az UNG egyes és kettős szálú DNS-en is aktív, és itt az alábbi preferenciát mutatja az uracil kivágásában: egyes szálú DNS-ben levő U (ssU) > U:G pár kettős szálú DNS-ben (dsU/G) > U:A pár kettős szálú DNS-ben (dsU/A). Ezen felül rendelkezik aktivitással olyan uracil származékok eltávolításában is, amelyek módosítást tartalmaznak az 5. pozícióban (pl.: 5-fluorouracil-5FU). Az UDG családba tartozó további enzim a SMUG1 (Single-strand selective Monofunctional Uracil-DNA Glycosylase). Mint neve is mutatja, elsőként azt feltételezték róla, hogy kizárólag egyes szálú DNS-en hatékony, azonban már kimutatták, hogy kettős szálú DNS-en is aktív. Az uracil kivágásában hasonló preferenciát mutat, mint az UNG, azonban aktivitása általánosan

kisebb, kivéve az 5-hidroximetil-uracil (5-hmU) esetében, mert azt igen nagy hatékonysággal távolítja el [15]. A harmadik uracil-DNS glikoziláz a timin/uracil-mismatch-DNS-glikoziláz (TDG). A TDG csak kettős szálú DNS-en aktív és a guaninnal hibáspárban lévő uracil és timin eltávolításáért felelős [16]. E két szubsztrát a citozin és a metil-citozin dezaminációja során jöhet létre, és mindkét termék mutagén. Hasonlóan nagy aktivitással képes eltávolítani a TDG az 5. pozícióban módosult uracil származékot, az 5-fluorouracilt is. A TDG-hez hasonlóan a metil-CpG-binding-domén4 (MBD4) enzim is csak kettős szálú DNS-en aktív és szintén a dezaminálódás során létrejött uracilt és timint távolítja el [17]. Az MBD4 azonban egy DNS kötő fehérje, mely a bázisok eltávolítását a genom egy speciális részén végzi (CpG szigetek). Ezekben a régiókban sok citozin és metil-citozin található közvetlenül egymás mellett, ezért nagyobb a dezamináció valószínűsége. Ezeken a DNS szakaszokon szintén fontos szerepet játszik a javításban a TDG enzim.

Nem minden fajban található meg az összes emlős enzim homológja. *Drosophila melanogaster*-ből hiányzik a fő uracil-DNS glikoziláz, az UNG és az MBD4. Ebben az élőlényben az uracil-DNS glikoziláz aktivitás csak a SMUG1, illetve a Thd1 (a TDG homológja) enzimekre korlátozható [17, 18]. Az uracil-DNS glikozilázokról az 1. Táblázat-ban található összefoglaló.

Uracil-DNS glikozilázok emlősökben	Szubsztrát specificitás	<i>Drosophila melanogaster</i> homológok
UNG	ssU, dsU:G, dsU:A, 5FU	✗
SMUG	ssU, dsU:G, dsU:A, 5FU, hmU	SMUG1
TDG	dsU:G, dsT:G	Thd1
MBD4	dsU:G, dsT:G (CpG szigetek)	✗

1. Táblázat: Az uracil-DNS glikozilázok

A táblázatban összefoglalva láthatók az emlősökben megtalálható uracil-DNS glikozilázok és szubsztrátjaik. A harmadik oszlopban vannak feltüntetve a *Drosophila melanogaster* homológok.

(Jelölések: ss - single strand - egyes szálú DNS, ds – double strand – kettős szálú DNS)

3.5 DNS károsodás

A legdrasztikusabb DNS károsodás a DNS száltörés, mely lehet egyes és kettős száltörés is. Száltörések létrejöhetnek külső hatásra, mint például ionizáló sugárzás vagy drogok hatása, valamint belső forrásból származóan, melyre példa a javítóenzimek túlműködése. A javítási folyamatok - mint a báziskivágásos javítómechanizmus is - intermediér terméke a száltörést tartalmazó DNS, azonban ez normális esetben javítódik. Ha nem teljes a javítás (pl. hiperaktív javítási ciklusok miatt) és a száltörések hosszabb ideig megmaradnak, a replikáció vagy a transzkripció elakad (összeomlik a replikációs villa vagy a transzkripciós buborék), így a genomi információ értelmezése nem történhet meg.

A DNS kettős száltörés (illetve az egyes szálú DNS) megjelenésekor aktiválódó sejtválasz az ATM-ATR (**A**taxia-**t**elangiectasia **m**utated - **ATM** and **R**ad3 related) útvonal. Mind az ATM, mind az ATR is kináz enzimek, melyek kizárólag fehérjéket foszforileznek és ezek a fehérje szubsztrátok elengedhetetlenek a jelátvitelben. Ezek közé tartozik a H2AX, mely egy hiszton variáns (a DNS kompakt szerkezetének kialakításában részt vevő fehérje) és a kettős száltörés közvetlen környezetében foszforileződik. Ekkor képződik a foszfo-H2AX (pH2AX), mely a kettős száltörések megjelenését jelzi a sejt számára. Az ATM-ATR útvonal feladata a sejtciklus leállítása, hogy a javítóenzimeknek legyen ideje kijavítani a hibákat. Amennyiben a hibák kijavítása sikertelen, aktiválják a programozott sejthalált kiváltó faktorokat [19].

3.6 *Drosophila melanogaster*, avagy az ecetmuslica

3.6.1 A modellszervezet

Biokémiai folyamatok vizsgálatához és megértéséhez, betegségek okainak, illetve lehetséges gyógymódjainak megtalálásához régóta alkalmaznak különböző modellszervezeteket. Erre azért van szükség, mert más fajokban, például az emberben, a folyamatok tanulmányozása nehéz vagy kivitelezhetetlen. Az elfogadott elmélet szerint az élőlények leszármazása közös és az evolúció során a legtöbb alapvető folyamat megőrződött, így a modellorganizmussal végzett kísérletek eredményei jó alapot képeznek más fajok működésének megértéséhez. A mai kutatásokban leggyakrabban alkalmazott modellszervezetek az *Escherichia coli*, a *Saccharomyces cerevisiae* (köznapi nevén sörélesztő), az *Arabidopsis thaliana* (köznapi nevén

lúdfű), a *Caenorhabditis elegans* (fonálféreg), a *Danio rerio* (köznapi nevén zebrahal), a *Drosophila melanogaster* (köznapi nevén ecetmuslica) és a *Mus musculus* (köznapi nevén házi egér).

A *Drosophila melanogaster* - ismertebb nevén az ecetmuslica - teljes átalakulással fejlődő rovar, mely az egyik legrégebben, és a mai napig leggyakrabban alkalmazott modellszervezet a biokémiai és genetikai kutatásokban. Genomja négy pár kromoszómából áll: egy X/Y ivari kromoszómapárból és három pár autoszómából, melyek teljes szekvenciája ismert. Fejlődése négy különböző állapotra különíthető el: az embrionális, a lárva (három stádium), a báb és a kifejlett állapot [20]. Lárva stádiumban kétféle szövettípus található: az imaginális primordium szövet, melyből a kifejlett állat szövetei alakulnak ki, és a differenciált szövet, mely a metamorfózisnak nevezett folyamat során programozott úton lebomlik, és nem lesz jelen a kifejlett állatban. Előbbi szövettípus folyamatos osztódásban van, majd a metamorfózis alatt differenciálódik. Ide tartoznak az imaginális diszkuszkok, például a szárny diszkusz, melyből a kifejlett állat szárnya fejlődik ki, és az imaginális gyűrűk, melyekből mirigyek alakulnak ki. A lárvális szövet másik típusa nem osztódó szövet, de az endoreplikációnak köszönhetően mérete növekszik. Erre példa a nyálmirigy. Az egyedfejlődésben legfontosabb szerepet játszó hormon a 20-hidroxi-ekdizon (ekdizon), mely koncentrációjának pulzusszerű növekedése szükséges az embrió első stádiumú lárva állapotba alakulásához, valamint az első és a második lárva stádium végén bekövetkező vedlésekhez is. A lárva állapot harmadik stádiumának végén jelentős koncentrációemelkedés vezet a bebábozódáshoz. Bábállapotban lejátszódó folyamat a metamorfózis, mely során kialakul a kifejlett állat. A metamorfózis kezdetén az ekdizon molekula hozzáköt a sejtmagban található ekdizon receptorhoz, mely sok más gén aktivációjáért felelős transzkripciós faktor. Az aktivált gének közé tartoznak kaspáz enzimek (az apoptózis fontos enzimei, melyek emlősökben is megtalálhatóak) és a sejthalál útvonalak muslica specifikus enzimei is (reaper, hid, grim). Ennek az aktivációnak köszönhetően programozott úton lebomlanak a differenciált lárvális szövetek [21, 22].

3.6.2 Enzimfunkció vizsgálata modellszervezetekben

Modellszervezetekre hatékony módszereket fejlesztettek ki, hogy vizsgálják az enzimek szerepét, funkcióját. Az enzimet kódoló gén irányított úton történő módosításával elérhető

csökkenés, illetve növekedés az enzim mennyiségében. Ennek hatására bekövetkező esetleges változások segítségével szerezhető több információ a génben kódolt enzimről.

Gyakran alkalmazott technika a génkiütés, mely során a gént elrontó mutáció miatt (pontmutáció, inszerció, delécio) egyáltalán nem képződik enzim, vagy csak olyan, melynek aktivitása csökkent. Ezzel a módszerrel vizsgálható az enzim teljes hiányának következménye is.

Az elmúlt évtizedben felfedezett módszer az RNS interferencia, más néven géncsendesítés [23]. Az RNS interferencia (RNSi) az mRNS szintjén csökkenti le az enzim termelődését. Alapja egy természetesen is előforduló folyamat, melyben rövid kettősszálú RNS-ek (siRNS) keletkeznek. Az siRNS egyik szála egy komplex (RISC) segítségével képes hibridizálni a lebontandó mRNS-hez, melyet a komplex ezt követően feldarabol. A géncsendesítés során mesterségesen bejuttatnak egy olyan a DNS szakaszt, melyről a lebontandó mRNS-hez hibridizálni képes kettős szálú RNS íródik át. A jelenség felfedezése után több módszert is kialakítottak az RNS interferencia használatára ecetmuslicában (például az UAS/Gal rendszer) [24].

Az enzimfunkció vizsgálatának másik megközelítése, ha az enzim jóval nagyobb mennyiségben van jelen, mint természetesen. Ebben az esetben mesterségesen bejuttatják az enzimet kódoló gént még egy kópiában, de nem a természetes promotérével, hanem egy olyan, amely jóval több mRNS átíródását, ezáltal több fehérje képződését teszi lehetővé. Így az enzim túltermelés következményei vizsgálhatók.

A transzpozonok („ugráló gének”) olyan genetikai elemek, melyek relatív pozíciója változhat a genomban. Az általuk kódolt enzim a transzpozáz, mely képes felismerni a transzpozonban megtalálható ismétlődő szekvenciákat, kivágni azt a genomból és új helyre beilleszteni. Az ecetmuslica genomjában történő módosításokra alkalmazott technika a P elem inszerció. A P elem egy transzpozon, mely a P transzpozázt kódolja. A muslica genomba egy mutáns P transzpozáz segítségével mesterségesen beilleszthető az általa felismert ismétlődő szekvenciák között lévő DNS szakasz. Ez a módszer felhasználható gének kiütésre, csendesítő RNS-eket kódoló DNS szekvenciák és túltermelő gének bevitelére.

3.6.3 Az uracil-DNS szerepe az ecetmuslicában

Az ecetmuslicából hiányzik az UNG, mely a fő uracil-DNS glikoziláz, azonban jelen van a Thd1 és a SMUG. Az uracil-DNS metabolizmusában másik nagyon fontos enzim, a dUTPáz megtalálható, de expressziója egyedfejlődéshez kötött és szövet specifikus [12]. Az állat fejlődése során embrió állapotban jelentős mennyiségű enzim mutatható ki, míg lárvá stádiumban drasztikus csökkenés figyelhető meg. Az utóbbi állapotban jelenlévő kétféle szövettípus dUTPáz expressziója eltér: az imaginális primordium szövetekben detektálható a dUTPáz, míg a bábállapotban lebomló differenciált szövetekben nem mutatható ki. Ezzel összhangban áll az, hogy az imaginális szövetek genomja uracil mentes, de a metamorfózis során programozottan lebomló szövetek DNS-ében nagy mennyiségű uracil halmozódik fel (~1500 uracil / millió bázis) [25]. Ez az első olyan ismert példa, ahol komplex eukarióta élőlényben természetesen előfordul uracilt tartalmazó DNS. Bábállapotban ismét megemelkedik a dUTPáz expresszió szintje, mivel a differenciált szövetek degradálódnak és egyre nagyobb arányban lesz jelen a kifejlett állatra jellemző dUTPázt expresszáló szövet. A felnőtt állatban a dUTPáz jelenléte a nőstények ováriumára korlátozódik. Kollégáim, Békési Angéla és Muha Villő megvizsgálták, milyen hatással van az élőlényre a dUTPáz teljes hiánya. Ebben a kísérletben RNS interferencia segítségével csökkentették kimutatási határ alá a dUTPáz mennyiségét, ami bábállapotban letalitáshoz vezetett. Azt is sikeresen kimutatták, hogy az enzim jelenléte nélkül az imaginális primordium szövetek DNS-ében az uracil nagymértékben felhalmozódik (~1100 uracil / millió bázis, ami egy nagyságrendbe esik a differenciált szövetek uracil tartalmával). Ez azzal magyarázható, hogy dUTPáz hiányában a sejt dTTP-hez viszonyított dUTP aránya magas lesz, lehetővé téve annak beépülését a DNS-be. Hasonlóan a muslicához, más modellszervezetben is megnő a genomi uracil-tartalom dUTPáz hiányában (*Escherichia coli* [26]).

4. Célkitűzések

1. A dUTPáz enzim ecetmuslicában esszenciálisnak bizonyult [25]. Feltételezésünk szerint a dUTPáz hiányában a genom integritása csökken, és ez okozhatja a letalitást. Munkám során szerettem volna megvizsgálni azt, hogy a dUTPáz enzim hiánya, illetve az uracil felhalmozódása milyen módon befolyásolja a DNS épségét az imaginális szövetekben. Ehhez két módszer alkalmazását terveztem: az egyik a DNS-beli száltörések közvetlen kimutatására alkalmas, míg a másik egy közvetett módszer, mellyel a száltörés hatására aktiválódó sejtválasz marker molekulája detektálható.

2. Fő célom volt tanulmányozni a dUTPáz enzim hiányában bekövetkezett letalitás molekuláris mechanizmusát, azaz meghatározni azt, hogy a folyamatban milyen enzimek játszanak még fontos szerepet. Feltételezhető, hogy az uracil felhalmozódás következtében a báziskivágásos javítómechanizmus (BER) enzimek is részt vesznek a genom integritásának esetleges csökkenésében, ami végül az egyedszintű letalitáshoz vezethet. Ezért kísérleteimben a dUTPáz enzim és bizonyos BER enzimek (Thd1, SMUG, APE1) együttes hiányát szerettem volna megvizsgálni: milyen következménnyel jár az egyed szintjén és a DNS szintjén.

3. További célom volt az előző bekezdésben leírt BER enzimek különálló vizsgálata is. Ehhez olyan egyedek felhasználását terveztem, melyekben az enzimek expressziója RNS interferencia segítségével volt csökkentve. Ezzel vizsgálni kívántam, hogy önmagukban ezen enzimek hiánya milyen módon befolyásolja a DNS nukleotid összetételét.

4. A dUTPáz enzim hiányának egyes következményei ismertek, valamint munkám első részében ennek további jellemzését végeztem. Célul tűztem ki, hogy tanulmányozzam a dUTPáz túltermeltetésének hatását is mind az életképesség tekintetében, mind molekuláris szinten a genomi uracil-tartalom meghatározásával. Ennek segítségével még több információt kaphatunk a dUTPáz genomvédő szerepéről, illetve arról, hogy van-e élettani jelentősége a dUTPáz hiányának és a magas DNS-beli uracil-tartalomnak a differenciált szövetekben. Ehhez olyan egyedekből izolált szöveteket szerettem volna felhasználni, melyekben a dUTPáz kifejeződése mesterségesen indukálható volt.

5. Anyagok és módszerek

Az alábbiakban szeretném áttekinteni a kutatómunkám során alkalmazott anyagokat és az általam elvégzett kísérleteket.

5.1 Sejtkultúrák fenntartása és kezelésük drogokkal

A HeLa sejtvonal egy korlátlanul osztódó sejtvonal, mely a legrégebb és leggyakrabban használt emberi sejtvonal a kutatásokban.

A HeLa sejteket DMEM-F12 médiumban (Sigma) 37°C-on, 5%-os CO₂ tartalom mellett termosztálva tartottuk. A médium tartalmazott még 10 % FBS-t (Fetal Bovine Serum), 50 µg/ml penicillin és 50 µg/ml streptomycin antibiotikumokat.

A Schneider 2 (S2) sejtek *Drosophila melanogaster* embrió eredetű szuszpenziós, azaz nem letapadó sejtek.

Az S2 sejteket 26 °C-on Schneider rovar tápoldatban (Sigma) tartottuk és a tápoldat szintén 10 % FBS-t tartalmazott és a HeLa sejteknél alkalmazott antibiotikumokat, azzal megegyező koncentrációban.

Mindkét sejtípust négyféle vegyülettel kezeltük, melyekkel történő kezelések közvetve, illetve közvetlenül kettős száltörések megjelenéséhez vezetnek [27-30]. Ezekről a vegyületekről más sejtípusban kimutatták, hogy képesek kiváltani az általunk is kimutatni kívánt ATM-ATR útvonal aktiválódását [31-33].

A kezelés előtt 1 napig növesztettük a sejteket a fent leírt médiumokban. A kezelés 37 fokon, 5 % CO₂ tartalom mellett történt. Az alkalmazott vegyületek és a kezelések körülményei az alábbi táblázatban találhatók:

Használt vegyület	Hidroxi-urea	5-fluoro-dezoxiuridin	Etoposide	Bleomycin
Alkalmazott koncentráció	20 mM	100 µM	10 µM	15 µg/ml
Kezelés időtartama	1 óra	ON*	ON	ON

*ON: egész éjszakán át (overnight)

5.2 Felhasznált *Drosophila melanogaster* törzsek

Az alábbi táblázatban található összefoglalva a munkánk során alkalmazott muslica törzsek, genotípusuk és eredetük:

Törzs neve	Genotípus	Eredet
W1118	Vad típus	Szegedi <i>Drosophila</i> Törzsközpont
Act-Gal4	W; Act-Gal4/CyO, GFP; W; W	
21883	W; P{GD11362}v21883; W; W	
DmDut20	W; SM6b/Sp; DmDut20/TM3(Sb); W	VDRC
Thd1 in	W; W; W; Mi{MIC}Thd1MI02311	
Thd1 RNAi	W; CG1981.110439/SM6b; TM3/CXD; W	Erdélyi Miklós, SZBK, Genetikai Intézet
Thd1Dut.1	W; CG1981R2/SM6b; CG4584R2/TM3; W	
Thd1Dut.2	W; CG1981.110439/SM6b; CG4584R2/TM3; W	
Thd1Dut.3	W; CG4584.105285KK/SM6b; CG1981R1/TM3; W	
Thd1Dut.4	W; CG4584.21883/SM6b; CG1981R1/TM3; W	
Thd1Dut.5	W; CG1981.13657/SM6b; CG4584R2/TM3; W	
Thd1Dut.6	W; CG4584.21884/SM6b; CG1981R1/TM3; W	
Thd1Dut.7	W; CG4584R3/SM6b; CG1981R1/TM3; W	
APEDut.1	W; CG3178.108661/SM6b; CG4584R2/TM3; W	
APEDut.2	W; CG3178.19819/SM6b; CG4584R2/TM3; W	
APEDut.3	W; CG4584.21883/SM6b; CG3178R3/TM3; W	
APEDut.4	W; CG4584.105285KK/SM6b; CG3178R2/TM3; W	
APEDut.5	W; CG4584.21884/SM6b; CG3178R3/TM3; W	
APEDut.6	W; CG4584R3/SM6b; CG3178R3/TM3; W	
APEDut.7	W; CG4584.105285KK/SM6b; CG3178R3/TM3; W	
APEDut.8	W; CG4584R3/SM6b; CG3178R2/TM3; W	
APEDut.9	W; CG4584.21884/SM6b; CG3178R2/TM3; W	
SMUGDut	W; CG5285.103742/SM6b; CG4584R2/TM3; W	

A kísérletek során kontrolként a W1118 vad típusú muslicákat, illetve azok szöveteit használtuk. A dUTPáz csendesített egyedeket az Act-Gal4 és a 21883 törzsek keresztezésével

kaptuk, míg a dUTPáz overexpresszáló muslicákat az Act-Gal4 és a DmDut20 törzsek keresztezésével. A kettős csendesített törzsek előállítása során szintén az Act-Gal4 törzzsel kereszteztük a választott törzseket (Thd1Dut.1-7, APEdDut.1-9, SMUGDut).

5.2.1 Életképesség vizsgálat

A kettős csendesített törzsek létrehozásához szükséges keresztezés során négy különböző utód keletkezett: kettős csendesített, csak dUTPáz, illetve BER enzim csendesített és csendesítést nem tartalmazó egyed. Az így létrejött törzsek életképességének vizsgálata úgy történt, hogy a kifejlett, kettős csendesített egyedek számát összehasonlítottuk a csak dUTPáz csendesített egyedek számával. Menekítésnek tekintettük, ha több kifejlett muslica kelt ki előbbi esetén a csak dUTPáz csendesített muslicákhoz képest. A vizsgált egyedek száma 24 és 102 között változott. Az életképességi vizsgálatokat 25 °C és 18 °C inkubációs hőmérsékleten is elvégeztük. A Thd1-dUTPáz csendesítő allél kombinációból hét, a SMUG-dUTPáz csendesítő allél kombinációból egy és az APE1-dUTPáz csendesítő allél kombinációból kilenc törzset vizsgáltunk.

5.3 Immuncitokémia és immunhisztokémia

Az immuncitokémia és az immunhisztokémia olyan módszerek, mellyel specifikus fehérjéket lehet detektálni sejtekben, illetve szövetekben. Ez antitestek segítségével lehetséges, melyek az immunrendszer által termelt fehérjék. Az antitestek a célmolekuláknak (más néven antigének) egy specifikus részét (epitóp) ismerik fel. Az epitóp a felismert makromolekula valamely jellemző térszerkezete, vagy kémiai mintázata. Specifikus antitesteket úgy állítanak elő, hogy az antigént emlősökbe (jellemzően nyúl, egér, vagy kecske) injektálják. Immunválaszként a B-limfociták (az immunrendszer egyik fontos sejt típusa) az antigénre nagy specifitású és affinitású immunoglobulinokat fejlesztenek és termelnek. Az antitestek egy konstans és egy változékony régióból állnak. Az antitest érés során a fehérjék változékony régiója az antigén valamely epitópjának felismerésére adaptálódik. Az antitesteket vagy a véráramból (poliklonális), vagy az izolált és immortalizált B-limfocitákból (monoklonális) nyerik. Míg a poliklonális antitestek számos B-limfocitából származnak, ennek megfelelően sokfélék, ugyanannak az antigénnek számos epitópját felismerik, addig a monoklonális antitestek csak egy B-limfocitából származnak, ezért csupán egy epitópra specifikusak. Bizonyos diagnosztikumban jelentős antigének ellen termelt antitestek kereskedelmi forgalomban kaphatók.

Az immuncitokémiai és az immunhisztokémiai vizsgálatok során elsőként elsődleges antitestet használunk, ami a detektálni kívánt fehérjére specifikus. Az ezt követően használt másodlagos antitest az elsődleges antitest konstans régiójára specifikus és egy fluoreszcens jelölő anyagot hordoz. Ezt a jelölő molekulát detektáljuk mikroszkóp segítségével.

A kísérletek során három különböző fehérjét szerettünk volna kimutatni. Az alábbi táblázat tartalmazza a kimutatni kívánt fehérjéket, azt hogy az elsődleges antitest milyen állatból és melyik cégtől származott, valamint azt, hogy az egyes kísérletekben milyen töménységben használtuk:

Kimutatott fehérje	Állat	Antitest típusa	Cég	Alkalmazott hígítás		
				HeLa	S2	Szövet
Fosfo-H2AX	egér	monoklonális	Millipore	1:500	1:250	1:250
dUTPáz	nyúl	poliklonális	Saját*	-	-	1:10000
FLAG-tag	egér	monoklonális	Sigma	-	-	1:10000

*ELTE Biológia Intézet Immunológia Tanszék – Erdei Anna

Az alábbi táblázat a felhasznált másodlagos antitesteket mutatja be, mely tartalmazza a kimutatott fehérjéket, azt hogy milyen állatból és melyik cégtől származtak, valamint az alkalmazott hígításokat és a konjugált fluoreszcens csoportokat:

Kimutatott fehérje	Állat	Cég	Alkalmazott hígítás	Fluorofór
Egér antitest	kecske	Invitrogen	1:1000	Alexa546
Nyúl antitest	kecske			Alexa488

Ahhoz, hogy a sejteket, szöveteket vizsgálni tudjuk, az ott zajló folyamatokat meg kell állítani. A fixálás egy olyan folyamat, melyben a makromolekulák között keresztkötéseket hozunk létre és rögzítjük a sejtbeli struktúrákat, de eközben a fehérjék az antitestek számára felismerhetőek maradnak.

A sejtbe juttatni kívánt antitest molekulák túl nagyok ahhoz, hogy a sejtmembránon átjussanak, ezért azt átjárhatóvá kell tenni. Ezt detergenssel (például Tween 20 vagy Triton X-100) történő kezeléssel lehet elérni a permeabilizálásnak nevezett folyamat során.

A sejtekben számos különböző fehérje található, melyek aspecifikus kötőhelyeket tartalmaznak. Ezekhez az antitestek hozzá tudnak kötődni, ezáltal nem megfelelő eredményt adva. A blokkolásnak során ez kiküszöbölhető olyan oldattal, amely nagy mennyiségben sokféle fehérjét tartalmaz, melyek le tudják foglalni a nem specifikus kötőhelyeket. Erre alkalos elemektől mentes állati vérszérumot szokás alkalmazni (pl.: BSA - bovine serum albumin – szarvasmarha szérum albumin; FBS - fetal bovine serum - magzati szarvasmarha szérum; GS – goat szérum – kecske szérum).

5.3.1 Sejtek immunfluoreszcens jelölése

A sejtekkel nagyon vékony, kisméretű óráüvegre kitapadva dolgoztunk. A HeLa sejtek képesek önmaguktól felülethez kötődni, azonban az S2 sejtek nem. Ezért ezeknél az óráüvegeket polilizinnel kezeltük, ami elősegíti az S2 sejtek kitapadását. A fixálást 4% PFA-ban 15 percig, a permeabilizálást 0.1 % Triton-X 100-ban 10 percig végeztük. Mindkét lépés után a mintákat PBS-ben mostuk. Másfél óra blokkolás után az elsődleges ellenanyagban két órán át inkubáltuk a sejteket szobahőmérsékleten. Ezt követően olyan blokkolóban mostuk a sejteket háromszor 20 percig, ami 0,05 % Triton-X 100-at tartalmazott. A másodlagos antitestet tartalmazó blokkolóban tartottuk a mintákat egy óráig, sötétben. Ismét mostuk a mintákat PBS-el, illetve kétszer 15 percig 0,05 % Triton-X 100-at tartalmazó blokkolóval. Végül 5 percen keresztül olyan PBS-ben tartottuk a sejteket, ami 10000-szeres hígításban (1 µg/ml koncentrációban) tartalmazott DAPI-festéket (a DNS-t kötni képes fluoreszcens DNS festék).

<i>Blokkoló:</i> 2,5 % FBS	<i>PBS:</i> 0,13 M NaCl
2,5 % GS	7 mM Na ₂ HPO ₄
1 % BSA	3 mM NaH ₂ PO ₄
0,002 % NaN ₃	pH=7,2
PBS-ben	

5.3.2 Szövetek immunfluoreszcens jelölése

Drosophila melanogaster lárvából kiboncolt imaginális szárny diszkusz és nyálmirigy szöveteket festettünk. A fixáló elegy 50 % n-heptánt és 50 % PEM-et tartalmazott, amiben 1 órán keresztül rázódtak a szövetek szobahőmérsékleten, majd a mintákat inaktiváló oldattal mostuk háromszor 10 percig.

PEM: 4 % PFA

25 % Tween-20

100 mM PIPES

1 mM MgCl_2

1 mM EGTA

pH=6,9

Inaktiváló oldat: 50 mM TRIS

150 mM NaCl

0,5 % Tween-20

pH=7,4

A pH2AX elleni festés esetén a permeabilizálás és a blokkolás 1 órán keresztül, szobahőmérsékleten, Blokkoló-1 oldatban történt. Ezt követően a szöveteket 16 órán keresztül 4 °C-on inkubáltuk az elsődleges ellenanyagot tartalmazó Blokkoló-2-ben. A mintákat négyszer egy órán keresztül mostuk Blokkoló-1-ben. A másodlagos antitestet Blokkoló-2-ben alkalmaztuk, amiben a szövetek 2 órán keresztül rázódtak szobahőmérsékleten sötétben. A következő lépésekben háromszor 30 percig mostuk a mintákat Blokkoló-1-el.

Blokkoló-1: 5% GS

1,5 % BSA

0,1 % Tween-20

1 % Triton-X 100

0,001 % NaN_3

PBS-ben

pH=7,4

Blokkoló-2: 5% GS

1% BSA

0,01 % Tween-20

0,1 % Triton-X 100

0,001 % NaN_3

PBS-ben

pH=7,4

A dUTPáz és FLAG-tag elleni festés esetén a permeabilizálás és a blokkolás 2 órán keresztül Blokkoló-A-ban, majd ismét két órán keresztül 5 % GS-t tartalmazó Blokkoló-A-ban történt szobahőmérsékleten. Ezt követően a szöveteket ON 4 °C-on inkubáltuk az elsődleges ellenanyagot tartalmazó Blokkoló-B-vel. A mintákat a következő nap háromszor mostuk Blokkoló-C-ben és ON 4 °C-on Blokkoló B-vel. A másodlagos antitestet Blokkoló-B-ben alkalmaztuk, amiben a szövetek 2 órán keresztül rázódtak szobahőmérsékleten sötétben. A következő lépésekben háromszor 30 percig mostuk a mintákat Blokkoló-C-vel.

Blokkoló-A: 1,5 % BSA

0,1 % Tween-20

1 % Triton-X 100

0,001 % NaN_3

250 mM NaCl

PBS-ben

pH=7,4

Blokkoló-B: 5% GS

1% BSA

0,01 % Tween-20

0,1 % Triton-X 100

0,001 % NaN_3

PBS-ben

pH=7,4

Blokkoló-C: 1,5 % BSA
 0,05 % Tween-20
 0,5 % Triton-X 100
 0,001 % NaN₃
 250 mM NaCl
 PBS-ben
 pH=7,4

A szöveti festések esetén a sejtmagokat DAPI-val, illetve Hoechst-festékekkel (a DNS-t kötni képes fluoreszcens DNS festék) tettük láthatóvá. Mindkét festéket 10 percig 10000-szeres hígításban (1 µg/ml koncentrációban) alkalmaztuk. Utolsó lépésként a szöveteket kétszer 10 percig mostuk PBS-ben.

5.4 TUNEL próba

A TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) próba egy olyan módszer, mellyel a DNS száltoérései detektálhatók. A DNS szintézisét végző enzimek a DNS polimerázok, melyek többségének szüksége van mintaszálra (templát) ahhoz, hogy a szintézis végbemenjen. Ebben a kísérletben azonban egy olyan DNS polimerázt alkalmazunk (TdT - terminal deoxynucleotidyl transferase), amely nem igényel templátot, tehát a beépülő nukleotidok azok lesznek, amelyek az enzim közvetlen környezetében találhatók. A módszer során nagy mennyiségű fluoreszcensen jelölt dUTP-t (Cy5-dUTP) juttatunk a sejtbe, így az enzim nagy valószínűséggel ezt fogja a szabad szálvéghez szintetizálni, feljelölve a száltoérést. A fluoreszcens jel a sejtben mikroszkópiás módszerrel vizsgálható.

Drosophila melanogaster lárvából kiboncolt imaginális szárny diszkusz szöveteket festettünk. A szöveteket 30 percen keresztül fixáltuk szobahőmérsékleten, majd mostuk őket háromszor 10 percen keresztül PBS-sel. A mintákat ezután egy 50% PBT5X-et és 50 % n-heptánt tartalmazó eleggyel kezeltük, mely a szövetekben levő zsír eltávolításáért felelős. Ismét a szövetek mosása következett, háromszor 10 percig PBT-vel, majd kétszer 10 percig PBT5X-el. A permeabilizálást 30 percen keresztül 65 °C-on végeztük, majd eltávolítottuk a citrátot a megfelelő mosó oldattal. Ezután a mintákat kétszer 10 percig PBT5X-el, majd ismét kétszer 10 percig PBT-vel mostuk. Az enzimes kezelés előtt a szöveteket 30 percig a jelölő oldatban inkubáltuk. Ezt követően a mintákhoz hozzáadtuk a TdT-t (NEB) 0,2 unit/µl koncentrációban és a Cy5-dUTP-t

(GE Healthcare) 5 μ M koncentrációban. Az egy órás reakciót (37 °C) PBT5X-el állítottuk le, és mostuk a mintákat háromszor 10 percig PBT-vel. Itt a második mosó pufferbe 10000-szeres hígításban tettünk Hoechst DNS festéket.

Fixáló: 0,1 M PIPES
1 mM EDTA
1 % Triton X-100
2mM MgSO₄
1 % formaldehid
pH=6,9

PBT: 0,1 % Triton-X 100
PBS-ben

PBT5X: 0,5 % Triton-X 100
PBS-ben

Permeabilizáló oldat: 0,1 M nátrium-citrát
PBT-ben

Citrát eltávolító oldat: 10 % TRIS
20 % FBS
30 mg/ml BSA
PBS-ben

Jelölő oldat: 30 mM Tris-HCl
140 mM nátrium-kakodilát
1 mM CoCl₂
pH=7,2

5.5 Mikroszkópia

A biokémiai vizsgálatok során szükség lehet a sejt alkotóinak (sejtmembrán, sejtmag, sejthártya) vagy a sejtben lévő, egy adott molekulának a detektálására, lokalizációjának meghatározására. Ennek vizsgálatára elterjedt módszer a fluoreszcens mikroszkópia. Ilyenkor vagy a célmolekulát felismerő és kötő vegyület maga rendelkezik fluoreszcenciával, vagy ehhez a molekulához kémiai kötésekkel konjugálnak egy fluorofórt. Ha a jelölt sejtet megvilágítjuk a fluorofórt gerjesztő hullámhosszúságú fénnel, akkor az emittált fényt megfelelő hullámhosszúságon detektálhatjuk. Egy minta egyszerre többféle fluoreszcens molekulával is meg lehet jelölve, ha azok gerjesztéséhez szükséges fény hullámhossza és az emittált fény hullámhossza eltérőek. Az általunk használt konfokális mikroszkópia azért előnyösebb, mint a hagyományos fluoreszcens mikroszkópia, mert képes a vizsgált sejtről, szövetről egyetlen síkban képet alkotni anélkül, hogy a szomszédos síkokból származó jelet detektálnánk. Vizsgálataink során Zeiss 710-es lézeres szkennelő mikroszkópot (LSCM) használtuk. A felvételek elkészítését kollégám, Róna Gergely végezte.

Az alábbi táblázat tartalmazza az általunk használt fluoreszcens festékeket, valamint a gerjesztési és a detektálási hullámhosszúságukat, illetve azt, hogy ezekkel milyen molekulát szerettünk volna kimutatni:

Fluoreszcens festék	Gerjesztési hullámhossz	Detektálás hullámhossztartománya	Cél molekula
DAPI/Hoescht	405 nm	410-450 nm	DNS
Alexa 488	488 nm	580-610 nm	dUTPáz
Alexa 546	546 nm	550-700 nm	pH2AX, FLAG-tag
Cy5	633 nm	640-700 nm	Száltörés (TUNEL)

A sejteket/szöveteket a mikroszkópos vizsgálat előtt be kell ágyazni. Ekkor mintáinkat desztillált vizes mosás után (hogy eltávolítsunk minden oldott sót és fehérjét) egy üveglapra (tárgylemez) helyeztük. A sejtekre/szövetekre FluorSave beágyazót tettünk, mely megvédi a sejteket a kiszáradástól, a fluoreszcens festéket óvja a fotobleaching-től (a fluorofór fotokémiai bomlása), de nem zavarja a mikroszkópos vizsgálatot, ugyanis fénytörése megegyező az üvegével. Végül nagyon vékony üveglappal lefedtük a sejteket/szöveteket.

5.6 DNS és RNS izolálása szövetből

A szövetekből történő genomi DNS izolálásához és tisztításához az Epicentre Biotechnologies cég Master Pure DNA Purification Kit-jét használtuk és a megfelelő protokollt követtük. A szövetekből RNS izolálását a Qiagen RNeasy Plus Mini Kit alkalmazásával végeztük és itt is minden lépést a gyártó utasításai szerint hajtottunk végre.

5.7 Nukleinsav koncentrációmérés

A nukleinsavak koncentrációjának meghatározásához a Thermo Scientific cég Nanodrop ND-1000 spektrofotométerét használtuk. A műszer előnye, hogy nagyon kis mennyiségek (1-2 μ l) koncentrációja is meghatározható. A mérés a nukleinsav bázisok 260 nm-en mérhető fényelnyelésén alapszik. A mért abszorbanciából a Lambert-Beer törvény segítségével számítható ki a koncentráció.

5.8 cDNS készítés

A reverz transzkriptáz (RT), más néven RNS-függő DNS polimeráz retrovírusokban (melyekben az információhordozó molekula RNS) található enzim, mely képes RNS-ről DNS átíratot képezni. Első lépésként az RT elkészíti az RNS molekulával komplementer DNS molekulát, majd elbontja az RNS-t. Az így keletkezett DNS molekulát nevezzük cDNS-nek (copy DNS).

Munkánk során ismert koncentrációjú RNS-t tartalmazó oldatból akkora térfogatot vettünk ki, mely 1 µg RNS-t tartalmazott. Ehhez 1 µl Random Hexamer (Fermentas) véletlen összetételű DNS oligonukleotid primert adtunk és 20 µl végtérfogatra egészítettük ki desztillált vízzel. Az így kapott mintát 1 percen keresztül 65 °C-on tartottuk, majd 1 percre jégre. Ekkor az RNS molekulák elvesztették feltekert másodlagos szerkezetüket, alkalmassá válva a primerek hibridizálásához. A 20 µl mintánkat két részre osztottuk. Az egyik részhez 10 µl olyan oldatot (RT mix) adtunk, mely tartalmazta a reverz transzkriptáz enzimet (Monsterscript), míg a másik részlethez pedig olyat, ami az enzim helyett desztillált vizet tartalmazott (nRT mix). Utóbbinál így a reakció végén nem keletkezik cDNS. Erre azért van szükség, hogy megállapítsuk maradt-e a mintánkban genomi DNS szennyezés. A két oldat ezen felül tartalmazott dNTP-t és az enzim megfelelő működéséhez szükséges puffert. A szintézist PCR készülékben végeztük és az alkalmazott hőmérsékleteket és ezek időtartamát az alábbi táblázat foglalja össze:

Hőmérséklet	Időtartam
37 °C	5 perc
42 °C	5 perc
60 °C	40 perc
90 °C	5 perc
0 °C	1 perc

RT mix: 1 µl RT enzim
0,4 µl dNTP
4 µl Puffer
4,6 µl desztillált víz

nRT mix: 0,4 µl dNTP
4 µl Puffer
5,6 µl desztillált víz

5.9 DNS emésztés

A DNS feldarabolását restrikciós endonukleázzal végeztük. Ez egy olyan enzim, mely képes specifikus szekvenciát felismerni a DNS-ben és ott mindkét szálon hidrolizálni a foszfodiészter kötést. Ekkor kétféle vég keletkezhet: tompa vég vagy ragadós vég. Ezek az enzimek baktériumban találhatóak, tehát nagyon sokféle van belőlük a természetben is, de egyre több specifikusabb enzimet állítanak elő mesterségesen is.

Az általunk használt enzim az NheI, ami az alábbi szekvenciát ismeri fel és ragadós véget eredményez:

Felismerőhelye és hasítása: 5'--- G,CTAGC --- 3'
3'--- CGATC,G --- 5'

Az általunk PCR reakcióban felszorzozni kívánt szakasz egy 963 bázispár hosszú szekvencia a dUTPáz gén közelében. Ezt két NheI hasító hely fogja közre, melyek 4400 bázispár távolságra találhatók egymástól.

Az előzetes DNS koncentráció mérés alapján minden DNS oldatból annyit vettünk ki, hogy a DNS tartalom 2 µg legyen. Ezekhez 1 µl enzimet adtunk, 5 µl NheI puffert és 0,5 µl BSA-t. Végül mindegyik minta térfogatát 50 µl-re egészítettük ki desztillált vízzel. Az emésztést 37 °C-on egy éjszakán át végeztük.

5.10 DNS fragmentumok elválasztása gélelektroforézissel

Az agaróz gélelektroforézis a DNS fragmensek elválasztására, azonosítására alkalmas módszer. A DNS molekulában a nukleotidok foszfodiészter kötésekkel kapcsolódnak össze. A foszforsav harmadik hidroxil-csoportja disszociált állapotban van lúgos közegben (pH=8), ezért a DNS molekula negatív töltésű. Ennek következtében az elektroforézis során a DNS fragmensek az elektromos térben a pozitív pólus felé mozognak, melynek hatására töltésük, méretük és alakjuk szerint szeparálódnak. A DNS elektroforetikus mozgási sebességét befolyásolja a DNS mérete és szerkezete, az agaróz koncentrációja és az alkalmazott áramerősség.

Az általunk használt agaróz gél 1%-os volt. Ehhez 1,1 g agarózt oldottunk fel 110 ml TAE pufferben melegítés közben. Miután az agaróz teljesen feloldódott, az oldathoz GelRed (Biotium) DNS festéket adtunk 10000-szeres hígításban. Ez a festék a DNS szálai közé interkalálódik és

UV fény hatására fényt bocsájt ki. A mintákhoz hatszoros hígításban hozzáadtuk a töltő puffert (Loading Dye - Fermentas). A puffer tartalmazott glicerint, mely nagy sűrűségénél fogva a minták lesüllyedését segíti a zsebek aljára, és festékanyagokat (brómfenolkék és xilén-cianol), melyekkel ellenőrizhető a gélen történő szeparálódás. Miután a gél megszilárdult, felvittük rá a töltő pufferrel hígított DNS mintákat és egy molekulásúly markert. A marker ismert méretű DNS szakaszokból áll, így meghatározható a mintákban levő ismeretlen DNS darabok mérete. Az elektroforézist 100 V-on végeztük.

A számunkra szükséges DNS szakasz 4400 bázispár hosszú volt. A molekulásúly marker segítségével UV fénynél megkerestük a 4000 és 5000 bázispár méretű szakaszok helyzetét a gélen, majd ezeket a darabokat a gélből kivágtuk és tömegüket lemértük.

<i>Loading Dye:</i>	10 mM TRIS-HCl	<i>TAE puffer:</i>	40 mM Tris-acetát
	0,03V/V% brómfenolkék		0,001 M EDTA
	0,03V/V% xilol-cianol		pH=8,0
	60V/V% glicerín		
	60 mM EDTA		
	pH=7,6		

5.11 DNS izolálása gélből

Agaróz gélelektroforézissel nemcsak a minták minőségét ellenőrizhetjük, hanem használhatjuk a minta különböző méretű komponenseinek elválasztására úgy, hogy utána a számunkra megfelelő méretű komponenssel tovább dolgozunk.

A DNS-t az agaróz gélből a Macherey-Nagel cégtől származó Nucleospin Gel and PCR clean up Kit-el nyertük ki és a kísérlet során a gyártó útmutatását követtük.

5.12 PCR reakció

A PCR (Polimerase Chain Reaction - polimeráz láncreakció) gyakran alkalmazott technika DNS molekulák felsokszorozására. Ehhez szükség van egy templát DNS-re (akár egyetlen molekula is elég, melyet szeretnénk felsokszorozítani); két primerre, melyek rövid (18-25 bázispár) mesterséges oligonukleotidok és pontosan kijelölik a sokszorozítani kívánt szakaszt;

olyan DNS polimerázra, mely hőstabil; dNTP-re és megfelelő pufferre, amelyben az enzim hatékonyan tud működni. A PCR reakció olyan egymás utáni ciklusokból áll, melyben szabályos időközönként változik a hőmérséklet. Ekkor az alábbi három lépés történik: elsőként a DNS két szála elválik egymástól (denaturáció), majd a primerek hibridizálnak a DNS-hez (anelláció), végül megtörténik az új szál szintézise (extenzió). A PCR egyik változata a qPCR (quantitative real time polymerase chain reaction), melyben a DNS felszorzásának valós időben detektálható. Ez fluoreszcens DNS festék alkalmazásával történik, mely minden ciklus utolsó lépésében a kettős szálú DNS molekulába interkalálódik és az ekkor kialakuló fluoreszcenciáját detektáljuk. Az általunk alkalmazott DNS festék az Eva Green (EG) (Biotium). Ez egy 488 nm-en gerjeszthető fluoreszcens festék, és az emittált fényt 520-540 nm tartományban detektáljuk. A mérés végén felvehető az olvadási görbe. A felfűtés adott hőmérsékletről kezdődik egy gradiens szerint. Ekkor a DNS kettősszálú formája fokozatosan megszűnik, a fluoreszcens festék már nem tud interkalálódni és emiatt egyre kisebb lesz a detektálható fluoreszcens jel. Az olvadási görbe negatív első deriváltjából kapható meg az olvadáspont (az a hőmérséklet, ahol a kettős szál disszociációja 50 %-os), ami a görbe maximumához tartozó hőmérséklet. Az olvadási görbe felvételével tudjuk ellenőrizni az aspecifikus termékek keletkezését, mivel ezek a termékek más lefutású görbét adnak, mint az általunk felszorzani kívánt termék. Ha jelen van aspecifikus termék is, a derivált görbe több csúcsot fog tartalmazni.

5.12.1 mRNS kifejeződés kvantitatív meghatározása

A sejtbeli mRNS relatív mennyisége meghatározható PCR segítségével. Ehhez elsőként az RNS-ből reverz transzkriptáz segítségével cDNS-t kell készíteni, ami már felszorzozható a hőstabil Taq polimerázzal (Bioline). Ahhoz, hogy kimutassuk, hogy a génmutációt követően valóban lecsökkent az mRNS koncentráció a normál sejtekhez képest, szükség van belső kontrollra. Erre állandóan kifejeződő, konstitutív géneket szokás választani (housekeeping - háztartási gének), melyek olyan fehérjéket kódolnak, amelyekre a sejtnak állandóan szüksége van. Az erről a génről átíródó mRNS mennyiségét állandónak tekintjük mind a normál, mind a mutáns élőlényekben. Ehhez viszonyítva megmondható az általunk vizsgált enzimek mRNS koncentrációjának változása. A kontrol mintákból kétszeres, 5 lépcsős hígítási sort készítünk. A hígítási sor mintáinak felszaporításakor kapott jeleknél, egy megállapított fluoreszcencia értéknél (küszöb érték - threshold) leolvassuk a hozzájuk tartozó ciklus számokat (Ct érték). Ennek

segítségével megállapítható a PCR hatékonysága (E). Elméletileg a PCR reakció minden ciklusában a DNS molekulák mennyisége megkétszereződik. A gyakorlati méréseknél azonban az enzimek nem képesek 100 százalékban felsokszorozni az összes templátot. A DNS polimeráz által felsokszorozott molekulák számának és az elméletileg maximálisan kapható molekulák számának a hányadosa adja a PCR reakció hatékonyságát. Ennek segítségével a mérendő minták cDNS tartalma meghatározható a kontrolhoz képest.

Kísérleteink során a Thd1 enzim mennyiségének csökkenésére szerettünk volna következtetni annak mRNS koncentrációjából, olyan *Drosophila melanogaster*-ben, ahol a Thd1 génben mutáció volt. Belső kontrolként az Rp49 (Riboszomális protein 49) enzimet használtuk.

A felsokszorozni kívánt szakaszhoz illeszkedő primerek szekvenciái az alábbiak:

Thd1:

3' – GATACTCCCGAATGTCTAAGCA – 5'

5' – CAGCAGACACCTTTTGTGATC – 3'

Rp49:

3' – ATACAGGCCCAAGATCGTGAAG – 5'

5' – GCACCAGGAAGTTCTTGAATCC – 3'

Összeállítottuk a reakció pufferét, mely az alábbiakat tartalmazta:

81,9 µl RNáz mentes víz

13 µl Eva Green

130 µl Immomix (Puffer, ami tartalmazza a Taq polimerázt és a dNTP-ket.)

9,1 µl Primer keverék

A reakció pufferből 9 µl-t mérünk össze 1 µl cDNS mintával.

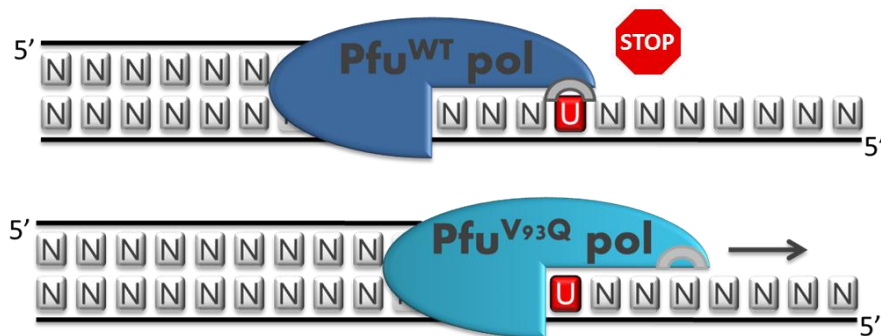
A reakció programozása táblázatosan összefoglalva:

Folyamat	Hőmérséklet	Idő	Ismétlés szám
Felfűtés	95 °C	10 perc	1
Denaturáció	95 °C	8 másodperc	30
Anelláció	56 °C	10 másodperc	
Átírás	72 °C	20 másodperc	
Olvasási görbe felvétele	95 °C	1 perc	1
	55 °C	30 másodperc	1
	95 °C	30 másodperc	1

5.12.2 Uracil mérés DNS-ben

A genomi uracil mérését egy qPCR alapú módszer segítségével végeztük, melyet témavezető, Horvát András fejlesztett ki. A dolgozat a módszert röviden foglalja össze, részletes leírás a [34] cikkben található.

A kísérlet során két qPCR reakciót állítunk össze. Az egyikben a DNS polimeráz a Taq polimeráz (Bioline) volt, mely a normál PCR reakciók esetén gyakran használt enzim és referenciaként használható, mert uracilra nem érzékeny. A másikban az archea *Pyrococcus furiosus* (Pfu) (Agilent) DNS polimerázát használtuk, mely az uracil-tartalmú DNS-t nem tudja felsokszorozni (5. ábra).



5. ábra: A *Pyrococcus furiosus* DNS polimeráz

A vad típusú polimeráz az uracilt tartalmazó DNS elongációja során, attól 4 bázis távolságra elakad. Az uracil-felismerő zsebben egy mutáció segítségével ez a szelektivitás megszüntethető és a mutáns enzim használható akár referenciaként is.

Elsőként a DNS mintákból 10 lépcsős kétszeres hígítási sort készítettünk, hogy a PCR hatékonyságát (E) (lásd 5.12.1) kiszámítsuk mindkét enzim esetén. A mérés során azt feltételezzük, hogy a DNS-ben jelenlevő uracil egyenletesen oszlik el. Adott szakaszra nézve az uracil mennyiségét a következő képlet alapján számoljuk ki:

$$\frac{[\text{U mentes DNS}]}{[\text{összes DNS}]} = (1 - U)^S$$

ahol 1-U annak a valószínűsége, hogy az S bázis hosszúságú szakasz nem tartalmaz uracilt. A Taq polimerázzal kapott eredményeket kontrolként használjuk és erre normáljuk a Pfu-val kapott

eredményeket. A számítások során felhasználjuk a két enzim hatékonyságát is. Az [uracil mentes DNS]/[összes DNS] arány a következő képlettel számítható:

$$\frac{[\text{U mentes DNS}]}{[\text{összes DNS}]} = \frac{(E_{\text{Pfu}} + 1)^{\text{CtPfuminta} - \text{CtPfukontrol}}}{(E_{\text{Taq}} + 1)^{\text{CtTaqminta} - \text{CtTaqkontrol}}}$$

Ahol az E_{Pfu} és E_{Taq} a Pfu és Taq polimerázokkal végzett reakciók hatékonysága, a CtPfuminta, a CtPfukontrol, a CtTaqminta és a CtTaqkontrol a Ct értékeket jelentik a vizsgált minta és a kontrol esetében, mindkét enzimmel végezve a reakciót.

A felsokszorozni kívánt szakaszhoz illeszkedő primerek szekvenciái az alábbiak:

3' - TCGGGATGACTTTTGGGTTCTG - 5'
5' - CGCGGTTTAACACAGCGTCGG - 3'

1. Reakció uracilra érzékeny enzimmel:

Összeállítottuk a reakcióhoz szükséges oldatot, mely az alábbiakat tartalmazta:

166,4 µl RNáz mentes víz	9,1 µl Primer keverék
13 µl Eva Green	5,2 µl dNTP
26 µl Pfu puffer	5,2 µl Pfu enzim

A reakció pufferből 9 µl-t mérünk össze 1 µl DNS mintával.

A reakció programozása táblázatosan összefoglalva:

Folyamat	Hőmérséklet	Idő	Ismétlés szám
Felfűtés	95 °C	2 perc	1
Denaturáció	95 °C	15 másodperc	40
Anelláció	57 °C	10 másodperc	
Átírás	72 °C	1 perc 10 másodperc	
Olvasási görbe felvétele	95 °C	1 perc	1
	55 °C	30 másodperc	1
	95 °C	30 másodperc	1

2. Reakció uracilra nem érzékeny enzimmel:

Összeállítottuk a reakcióhoz szükséges oldatot, mely az alábbiakat tartalmazta:

81,9 µl RNáz mentes víz
13 µl Eva Green
130 µl Immomix (Puffer, ami tartalmazza a Taq polimerázt és a dNTP-ket.)
9,1 µl Primer keverék

A reakció pufferből 9 µl-t mérünk össze 1 µl DNS mintával.

A reakció programozása táblázatosan összefoglalva:

Folyamat	Hőmérséklet	Idő	Ismétlés szám
Felfűtés	95 °C	10 perc	1
Denaturáció	95 °C	15 másodperc	40
Anelláció	57 °C	10 másodperc	
Átírás	72 °C	1 perc 10 másodperc	
Oladási görbe felvétele	95 °C	1 perc	1
	55 °C	30 másodperc	1
	95 °C	30 másodperc	1

6. Eredmények összefoglalása

6.1 A dUTPáz hiányában tapasztalt letalitás molekuláris mechanizmusának vizsgálata

A dUTPáz enzim ecetmuslicában esszenciálisnak bizonyult [25]. Fő célom volt megvizsgálni az enzim hiányában tapasztalt letalitás mechanizmusát és meghatározni azt, hogy a folyamatban milyen enzimek játszanak még fontos szerepet.

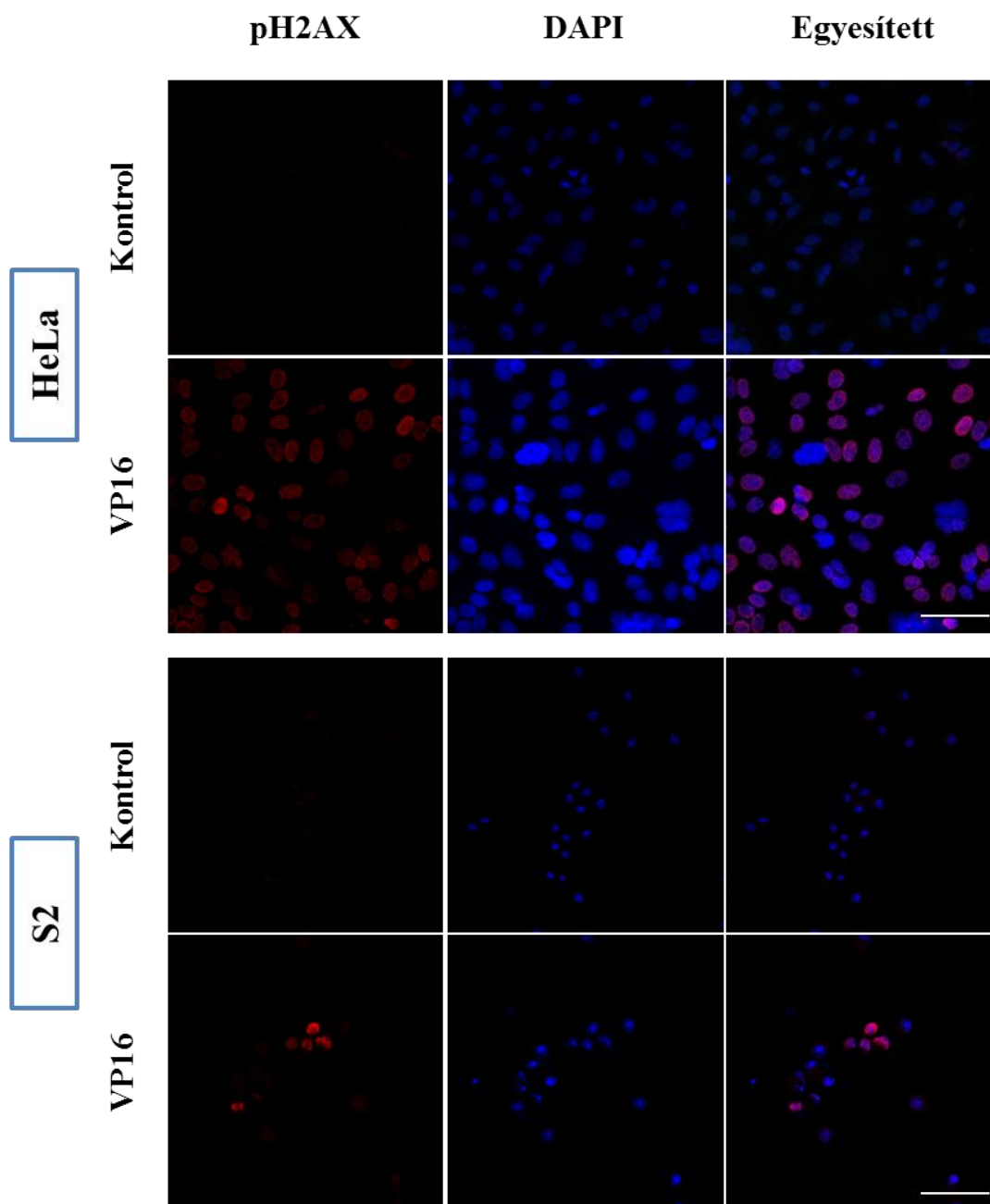
6.1.1 Genomi integritás csökkenés

Kísérleteimben szerettem volna megvizsgálni azt, hogy milyen módon hat a dUTPáz hiánya, illetve a nagy mennyiségű uracil megjelenése a DNS integritására. Elsőként a DNS kettős száltörések hatására aktiválódó specifikus sejtválasz (ATM-ATR útvonal) megjelenését kívántam tanulmányozni, mely segítségével közvetett módon kaphatunk képet a DNS-ben esetlegesen megjelenő száltörésekről. Az útvonalban fontos szerepet játszó, a kettős száltörések közvetlen környezetében foszforileződő H2AX (pH2AX) marker molekulát immunhisztokémia segítségével detektáltam.

A módszert sejteken optimalizáltam, hogy teszteljem az elsődleges antitest működését. Kísérleteimben HeLa és S2 sejteket kezeltem hidroxü-ureával (HU), 5-fluoro-dezoxiuridinnel (5-FdUR), bleomycinnel és etoposiddal (VP-16). Irodalmi adatok alapján ismert ezekről a vegyületekről, hogy képesek kiváltani az általam is kimutatni kívánt ATM-ATR útvonal aktiválódását más sejttípusokban [31-33]. Az immuncitokémiai vizsgálat során a pH2AX molekulákat specifikus antitesttel tudtam detektálni. A sejtmagot fluoreszcens DAPI festéssel tettem láthatóvá, mely képes a DNS-hez kötni. Kontrollként olyan sejteket használtam, melyeket nem kezeltem a vegyületekkel, de az immuncitokémiai vizsgálat összes lépését elvégeztem ezekkel is, megegyezően a kezelt sejtekkel. A felvételek konfokális mikroszkóppal készültek.

A kezeletlen kontrol sejtekben nem látható festődés, tehát ott nem foszforileződött a H2AX, míg a négyféle vegyülettel kezelt sejtek esetén mind HeLa, mind S2 sejtekben kaptam festődést, tehát a sejtek ezekben az esetekben tartalmaztak pH2AX-et. Ezzel sikeresen igazoltam, hogy a használni kívánt antitest mind humán, mind ecetmuslica eredetű sejtekben működik és nincs aspecifikus kölcsönhatás egyik esetben sem. Az immuncitokémiai kísérleteim eredményei

közül a jelen dolgozatban a VP16-tal kezelt HeLa és S2 sejtek, valamint a hozzájuk tartozó kontrol sejtek láthatók (6. ábra).

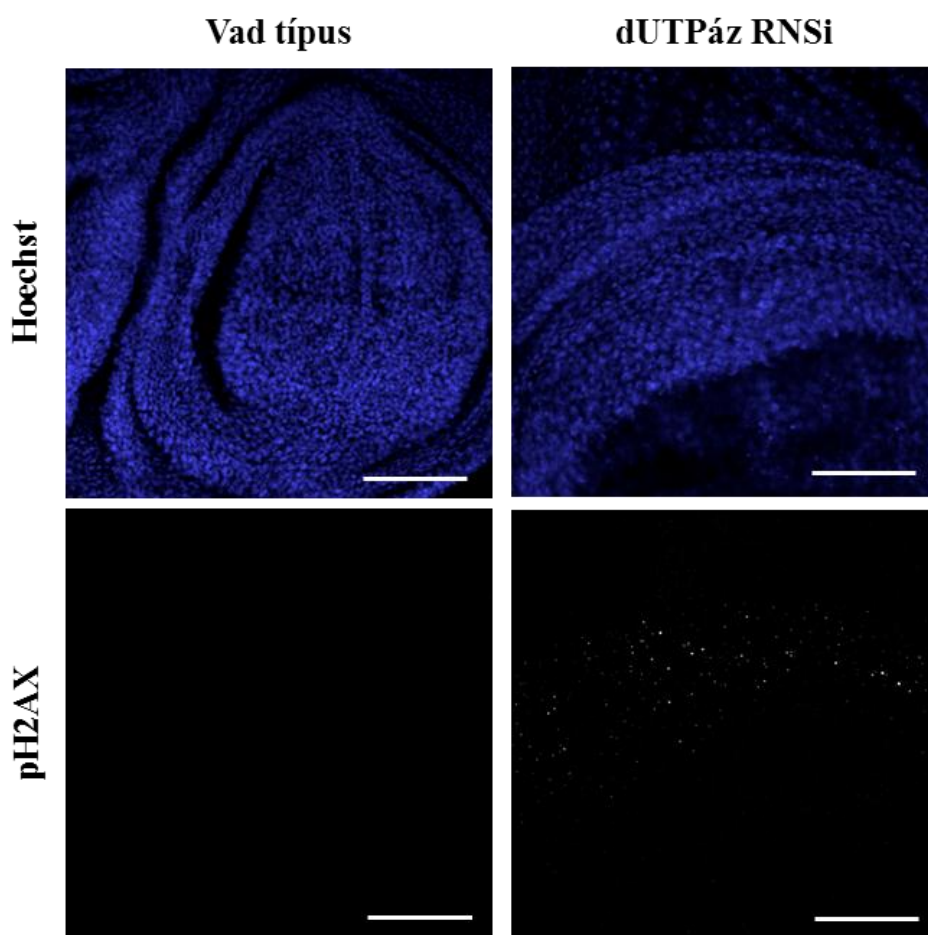


6. ábra: pH2AX kimutatása HeLa és S2 sejtekben

Az ábrán kontrol sejtek és VP16-tal (etoposide) kezelt sejtek láthatóak. Immuncitokémia segítségével detektált molekula a pH2AX, mely piros színnel jelölve látható a felvételen. A DNS-t fluoreszcens DAPI festéssel tettem láthatóvá, melyet kék szín jelöl. Az utolsó oszlopban a festések egyesített képe látható. A skála 50 μ m.

A sikeres optimalizációt követően elvégeztem a sejtválasz kimutatási vizsgálatot *Drosophila melanogaster* imaginális szárny diszkusz szöveteken is, melyek dUTPáz csendesítést tartalmaztak. Kontrollként vad típusú élőlényekből származó szöveteket használtam, melyekben a dUTPáz mennyisége normális volt. A szövetekről konfokális mikroszkóppal készítettük a felvételeket.

Az immunhisztokémiai vizsgálat felvételein a vad típusú élőlények szöveteiben nem kaptam jelet, míg a dUTPáz csendesített élőlényekből származó szövetekben kimutattam a H2AX foszforileződését, ami az ATM-ATR útvonal aktiválódására utal. A felvételeken fehér pontokként láthatók a pH2AX pozitív sejtek (7. ábra).



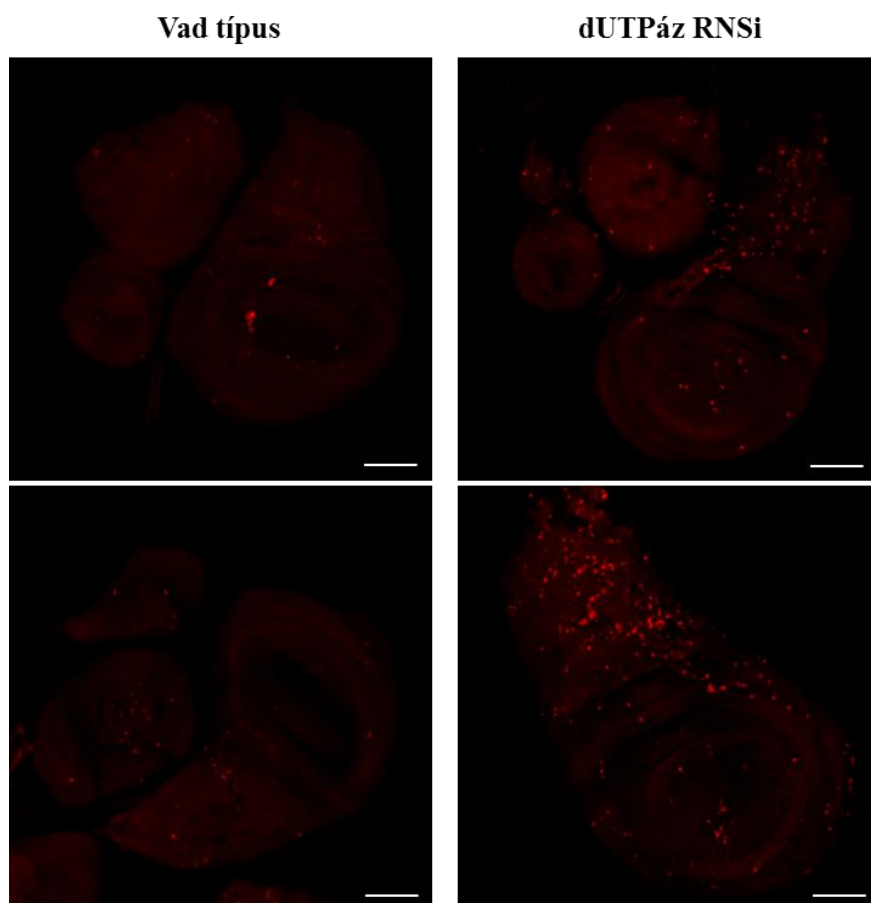
7. ábra: pH2AX elleni immunhisztokémia *Drosophila melanogaster* szövetekben

Az ábrán láthatóak vad típusú és dUTPáz csendesített állatból származó imaginális szárny diszkusz szövetek. A DNS-t Hoechst festékkel tettem láthatóvá, amit kék szín jelöl. A pH2AX pozitív sejtek fehér pontokként láthatóak. A skála 50 μ m.

A dUTPáz hiányában uracilt felhalmozó DNS integritását megvizsgáltam egy másik módszerrel is, mely a száltöréseket közvetlenül képes kimutatni. A TUNEL próba a DNS 3'-OH szálvégeit mutatja ki, ami akkor jelenik meg egy sejtben, ha annak genomjában száltörés található.

A kísérletet dUTPáz csendesített állatokból származó szárny diszkusz szövetekkel végeztem el. Kontrollként - hasonlóan az immunhisztokémiához - vad típusú élőlényből származó szárny diszkuszokat használtam. A szövetekről konfokális mikroszkóppal készítettünk képeket.

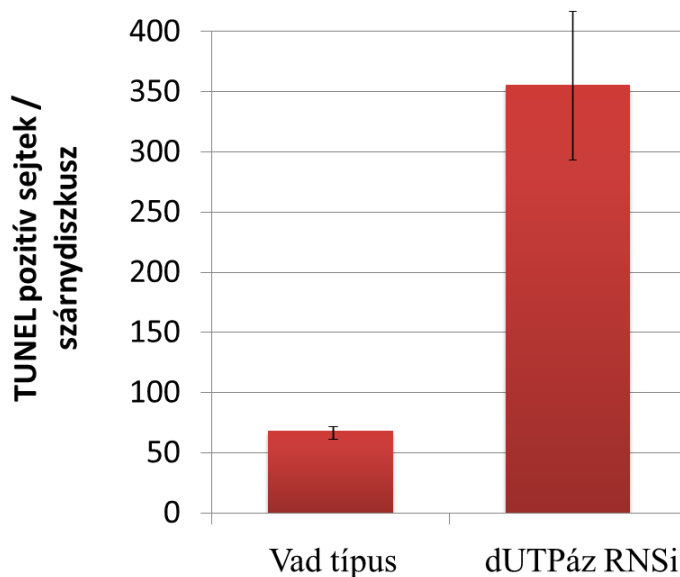
A festésnek köszönhetően a DNS száltöréseket felhalmozó sejtek elkülönülő pontokként detektálhatók a szövetben. Látható, hogy a dUTPáz hiányos szövetekben jelentősen megemelkedett a TUNEL pozitív sejtek száma a kontrolhoz képest (8. ábra).



8. ábra: TUNEL próba *Drosophila melanogaster* szövetekben

Az ábrán láthatóak vad típusú és dUTPáz csendesített állatból származó imaginális szárny diszkusz szövetek. A TUNEL pozitív sejtek elkülönülő piros pontokként láthatóak. A skála 50 μ m.

Imaginális diszkusz szövetre vetítve megszámláltam a TUNEL pozitív sejteket a kontrol és a dUTPáz csendesített szövetekben. Eredményként azt kaptam, hogy a kontrol szövetek átlagosan $68,2 \pm 11,2$, míg a dUTPáz hiányos szövetek átlagosan $355,6 \pm 78,5$ TUNEL pozitív sejtet tartalmaznak (9. ábra).



9. ábra: A TUNEL próba kvantitatív eredménye

A diagramon vad típusú és dUTPáz csendesített állatból származó imaginális szárny diszkuszokban a TUNEL pozitív sejtek száma / diszkusz látható.

A TUNEL próba eredménye alapján elmondható, hogy a dUTPáz csendesített egyedek imaginális diszkusz szöveiben nagymértékű DNS fragmentálódás történt.

6.1.2 Mi felelős az uracil-DNS integritásának csökkenéséért?

A dUTPáz hiánya szál törések megjelenéséhez vezet, ami végső soron okozhatja az egyed pusztulását. Szerettem volna megvizsgálni, milyen más enzimek játszanak még szerepet ebben a folyamatban. Feltételezésünk szerint a báziskivágásos javítómechanizmus aktiválódása is közrejátszhat. A mechanizmus feltárásához és feltevésünk igazolásához olyan törzseket vizsgáltam meg, melyekben a dUTPáz mellett bizonyos BER enzimek is csendesítve voltak.

A dUTPázal egyidejűleg a Thd1, a SMUG és az APE1 enzimeket csendesítettem és tanulmányoztam, hogy a különböző csendesítő allélokkal készült törzsek esetén tapasztalható-e változás az egyedek életképességében a dUTPáz csendesített egyedekhez viszonyítva. A

kísérleteket két hőmérsékleten végeztem (18 °C és 25 °C), mert az irodalomban található arra példa, hogy a hőmérséklettől függ a csendesítés mértéke, ezáltal a tapasztalt fenotípus [35].

Mindhárom enzim esetén azt tapasztaltam, hogy a dUTPáz hiányában kapott letalitást a BER enzimek egyidejű hiánya képes menekíteni, mivel több kifejlett állatot kaptam. Az eredményeket az alábbi táblázatban foglalom össze, mely tartalmazza, hogy a vizsgált törzsek közül mennyi esetén volt tapasztalható az életképesség növekedése (piros színnel jelölve):

	25 °C	18 °C
SMUG	0/1	1/1
Thd1	3/7	6/7
APE1	2/9	4/9

A táblázatban látható, hogy alacsonyabb hőmérsékleten mindhárom esetben menekített a vizsgált BER enzim.

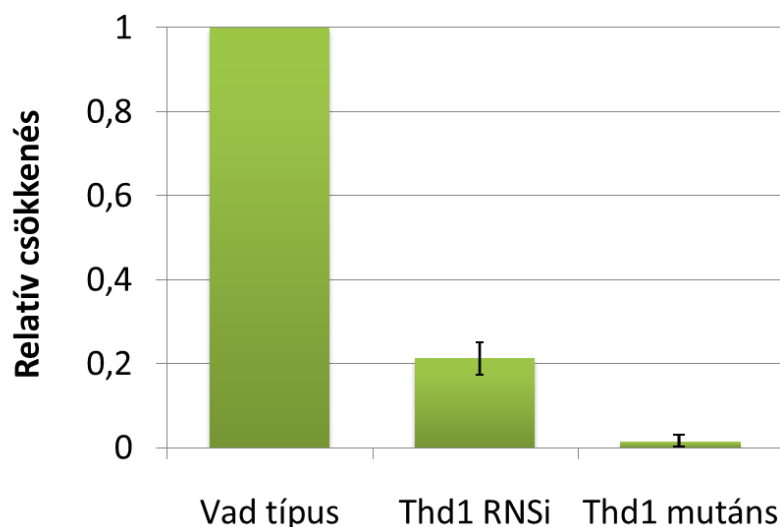
6.2 A Thd1 hiányának hatása a DNS nukleotid összetételére

Céлом volt az előző kísérletben szereplő BER fehérjék funkciójának tanulmányozása is. Szerettem volna megvizsgálni, hogy az enzimek hiánya okoz-e változást a DNS nukleotid összetételében. Az előző kísérlet során a Thd1 enzim esetén állt rendelkezésünkre nagyobb számú törzs, és itt kaptuk a legnagyobb menekítési arányt, ezért elsőként ezen enzim vizsgálatát végeztem el. Két törzset használtam kísérleteimben, melyekben két különböző megközelítéssel lett csökkentve a Thd1 expresszió: RNS interferenciával és a gént elrontó mutációval.

6.2.1 A Thd1 expresszió csökkenése

Ahhoz, hogy értékelni tudjuk a Thd1 hiányának hatását, ellenőrizni kellett a fehérje expresszió csökkenésének mértéket. Az enzim mennyiségére következtethetünk mRNS-ének koncentrációjából is. A géncsendesített törzsben az mRNS koncentráció mérését kollégám, Békési Angéla végezte. Eredményként azt kapta, hogy az mRNS koncentrációja $0,214 \pm 0,057$ -szeresére csökkent le a vad típushoz képest (nem publikált adat). A Thd1 mutációt hordozó élőlények Thd1 mRNS mennyiségének változását én határoztam meg. Ehhez embrió állapotú élőlényekből kinyertem az RNS-t, tisztítottam, majd cDNS-t állítottam elő belőle. Ennek mennyiségét kvantitatív PCR segítségével határoztam meg. Kontrolként vad típusú muslicákat

használtam. Sikeresen meghatároztam, hogy a Thd1 enzim mennyisége $0,014 \pm 0,007$ -szeres csökkenést mutatott a Thd1 génben mutációt tartalmazó élőlényekben a kontrolhoz képest (10. ábra).



10. ábra: Thd1 expresszió csökkenésének meghatározása *Drosophila melanogaster* szövetekben

A diagramon a Thd1 mRNA mennyiségének csökkenése látható a Thd1 csendesített és a Thd1 génben mutációt hordozó szövetekben, a vad típusú kontrol szövetekhez képest.

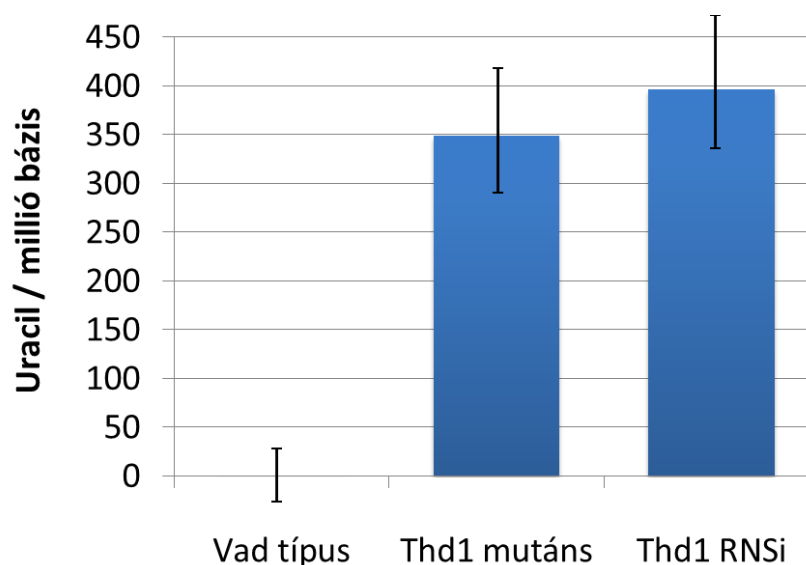
6.2.2 A genomi uracil tartalom vizsgálata

A Thd1 javítóenzimként szerepet játszik a DNS-ben megjelenő uracil bázisok eltávolításában. Annak érdekében, hogy meghatározzam, az enzim milyen mértékben járul hozzá a DNS uracil-mentes állapotához, megmértem a genomi uracil mennyiségét a Thd1 csendesített és mutációt tartalmazó egyedek szövetében. Kontrolként normál Thd1 expressziót mutató állatokat használtam.

Az imaginális szárny diszkuszokból kinyert genomi DNS-t restriktációs emésztésnek vettem alá. A kapott fragmenseket elválasztottam agaróz gélelektroforézissel, majd a gélből izoláltam azt a DNS frakciót, amelyben a vizsgálni kívánt fragmentum feldúsult. Egy kvantitatív PCR alapú módszer segítségével megmértem a DNS uracil tartalmát.

Eredményként azt kaptam, hogy mindkét csökkent Thd1 expressziót mutató szövetben jelentős mértékben megnőtt az uracil mennyisége a genomban. A mutációt tartalmazó esetben ez

az érték $349,09 \pm 128,37$ uracil / 1 millió bázis, az RNS interferenciánál $396,71 \pm 135,75$ uracil / 1 millió bázis, míg a kontrol uracil tartalma $0,005 \pm 57,041$ uracil / 1 millió bázis (11. ábra).



11. ábra: Genomi uracil tartalom meghatározása Thd1 hiányában

A diagramon a genomi uracil mérésének eredménye látható. A mérést Thd1 mutáns és Thd1 csendesített élőlényekből származó szövetekkel végeztem. Kontrollként vad típusú élőlények imaginális diszkusztát használtam. Az eredmény uracil mennyisége / 1 millió bázis értékben van megadva.

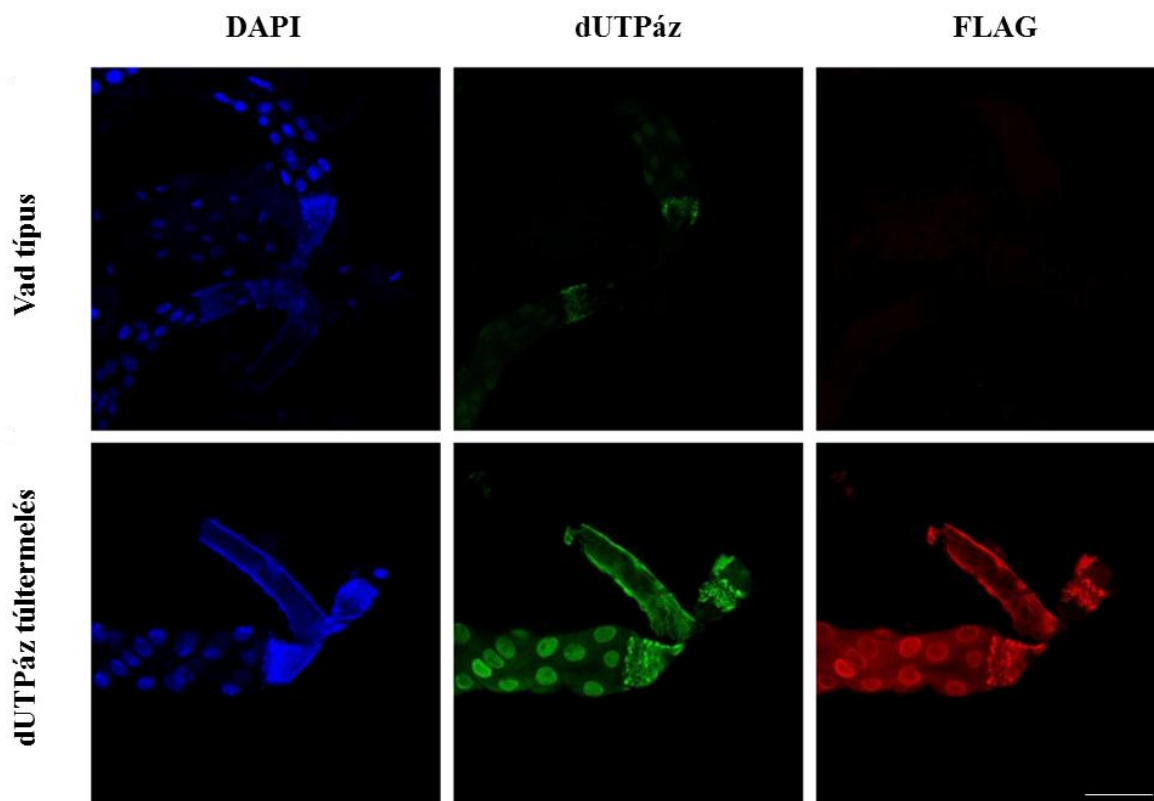
6.3 A dUTPáz túltermelés hatása

Az előző fejezetekben bemutattam a dUTPáz enzim hiányának következményeit. Munkám során szerettem volna megvizsgálni a dUTPáz túltermelésének hatását is az életképesség és a genomi uracil tartalom tekintetében. Ehhez a kísérlethez olyan élőlényekből származó lárvális nyálmirigy szöveteket használtam, melyekben mesterségesen volt túltermeltetve az ecetmuslica dUTPáza. A túltermeltetett fehérje tartalmazott egy ún. FLAG epitóp taget is, melyre azért volt szükség, hogy a dUTPáz expresszió ellenőrzésére használt immunhisztokémiai vizsgálat során megkülönböztethető legyen a mesterségesen bevitt dUTPáz a sejtekben endogén módon termelődőtől.

A dUTPáz termelődését immunhisztokémiai vizsgálattal igazoltam, melyben dUTPáz specifikus és FLAG-tag specifikus antitesteket használtam. A DNS-t DAPI festéssel tettem láthatóvá. Kontrollként vad típusú élőlényekből származó nyálmirigyeket használtam, melyek az

imaginális gyűrűt leszámítva, nem expresszálnak dUTPázt. A szövetekről konfokális mikroszkóppal készítettünk felvételeket (12. ábra).

Eredményként azt kaptam, hogy a vad típusú élőlényből származó mintában az imaginális gyűrűre korlátozódik a festődés, mely csak a dUTPáz elleni antitesttel mutatható ki, hiszen az endogén dUTPáz nem tartalmazza a FLAG-taget. A dUTPáz túltermelést tartalmazó egyedekből származó szövetekben mind az imaginális gyűrű, mind a differenciálódott szövet esetén tapasztaltam festődést. Ezt azt jelenti, hogy a túltermelés hatására megjelent a dUTPáz mindkét típusú lárvális szövetben, és ez kimutatható a dUTPáz elleni és a FLAG-tag elleni antitesttel is. Ezzel igazoltam, hogy a dUTPáz túltermelés sikeres volt.



12. ábra: A dUTPáz túltermelés kimutatása *Drosophila melanogaster* differenciált lárvális szövetében

Az ábrán láthatóak vad típusú állatból és a dUTPázt túltermelő állatból származó lárvális nyálmirigy szövetek. A DNS-t DAPI festékkel tettem láthatóvá, melyet kék szín jelöl. A kétféle fehérje kimutatásának pozitív eredménye zöld (dUTPáz elleni antitest), illetve piros (FLAG-tag elleni antitest) színnel látható. A skála 100 μm .

A kísérlet megmutatta, hogy a dUTPáz megjelenése a differenciált szövetekben nem okoz perturbációt az egyedfejlődésben és más, a vad típustól eltérő fenotípust.

7. Eredmények értékelése és következtetések

Csoportunk korábbi eredménye, hogy a dUTPáz esszenciális enzim ecetmuslicában és hiányában a muslica szöveteinek genomjában megnő az uracil mennyisége. Munkám során szerettem volna tisztázni a tapasztalt fenotípusok molekuláris mechanizmusát. Kísérleteimben foszfo-H2AX elleni immunhisztokémiai vizsgálat segítségével kimutattam az imaginális szövetekben olyan sejteket, melyekben aktiválódott az ATM-ATR út vonal. A sejtválasz aktiválódásából DNS kettős száltörések jelenlétére következtethetünk. Ez összhangban áll az általam használt másik módszer, a TUNEL próba eredményével, ami segítségével sikeresen kimutattam nagy mennyiségű szabad DNS szálvéget tartalmazó sejteket. Kísérleteim alapján összevettem a kétféle módszerrel kapott eredményeket: a szöveteken belül a TUNEL pozitív sejtek száma jóval több volt, mint a foszfo-H2AX-et tartalmazó sejteké. Erre magyarázatként szolgálhat az, hogy nem sikerült kijavítani az uracil beépülése okozta hibákat, aminek hatására beindult a programozott sejthalál és a kaszpáz aktivált DNáz-ok fragmentálták a DNS-t, mely a TUNEL próbával detektálható. Azt, hogy az uracil DNS-beli megjelenésének hatására, illetve az uracil megjelenésekor keletkező száltörések hatására beindulhat-e a programozott sejthalál, későbbi munkám során kívánom tisztázni. Más modellszervezetekben is megvizsgálták TUNEL próba segítségével, hogy dUTPáz hiányában hogyan változik a DNS integritása. Az eredmények egyeznek az általam kapottal, hiszen ezekben az esetekben is megnőtt a TUNEL pozitív sejtek száma [36],[37]. A pH2AX elleni festést azonban még nem használták a dUTPáz enzim hiányának vizsgálatára.

Tudományos diákköri munkám ezen fejezete részét képezi csoportunk 2012. júniusában megjelent publikációjának a PLoS Genetics nevű folyóiratban [25].

Munkám következő részében megvizsgáltam milyen enzimek játszhatnak még fontos szerepet a letalitás kialakulásában. Feltételezéseink szerint részt vehet a folyamatban olyan javítóenzim, mely az uracil eltávolításáért felelős. *Saccharomyces cerevisiae*-ben [38], *Escherichia coli*-ban [39] és *Caenorhabditis elegans*-ban [40] modellszervezetekben kimutatták, hogy dUTPáz hiányában az életképesség csökkenésért a fő uracil-DNS glikoziláz, az UNG felelős. Az életképesség csökkenésének egyik oka a DNS fragmentálódása lehet. Mivel a *Drosophila melanogaster*-ből hiányzik az UNG, ezt a szerepet más BER enzim veheti át. Erre ad igazolást az a kapott eredmény, mely szerint a Thd1, a SMUG és az APE1 fehérjék párhuzamos

csendesítése életképesség-növekedést okoz. A Thd1 enzim hibáspárban lévő uracil (guaninnal szemben) eltávolításáért felelős. Ez alapján elképzelhető, hogy a folyamatban egy másik javítómechanizmus, a hibáspár javítás (mismatch repair) enzime is részt vehetnek. Érdekes lenne megvizsgálni, hogy ezen enzimek párhuzamos csendesítése esetén tapasztalnánk-e változást az életképességben.

Céлом volt a menekítő BER enzimek különálló vizsgálata is. A meglévő kettős csendesítést tartalmazó törzsek közül a Thd1 enzim esetén tapasztaltuk a legnagyobb menekítési arányt, ezért elsőként ezt szerettem volna részletesebben is tanulmányozni. Kísérleteimben a Thd1 génben mutációt hordozó és Thd1 RNS interferenciát tartalmazó egyedeket használtam. A mutációt hordozó törzsben számszerűen megmértem a Thd1 mRNS mennyiségének csökkenését. Mindkét vizsgált típus igazolta, hogy a Thd1 valóban fontos szerepet játszik az uracil eltávolításában, hiszen hiányában a genomi uracil tartalom megnőtt. Ahhoz, hogy a dUTPáz és a Thd1 kapcsolatát, illetve ezek szerepét az uracil és a száltörések megjelenésében mélyrehatóan megvizsgáljam, további kísérletek elvégzésére van szükség. Jövőbeli terveim között szerepel olyan egyedek vizsgálata, melyek egyszerre tartalmaznak dUTPáz RNS interferenciát és a Thd1 génben mutációt. Ezekből származó szövetekben szeretném megnézni, hogy a két enzim együttes hiánya milyen módon befolyásolja a DNS uracil tartalmát és integritását.

További célkitűzésem volt megvizsgálni azt, hogy okoz-e változást a dUTPáz túltermelése az egyedfejlődésben, illetve a genom uracil-szubsztituált állapotában. Ezt azért is érdekes vizsgálni, mert ezzel választ kaphatunk arra a kérdésre, hogy van-e valamilyen élettani szerepe a muslicában annak, hogy a dUTPáz enzim nincs jelen a differenciált lárvális szövetekben, illetve hogy ott magas a genom uracil tartalma. A muslicában található az első olyan példa, ahol időszakosan tolerált a DNS-ben megjelenő nagy mennyiségű uracil egy magasabb rendű összetett eukarióta élőlényben, ezért elképzelhető, hogy az uracil-tartalmú DNS-nek szerepe van fiziológiás folyamatokban, például a metamorfózis során degradálódó sejtek megjelölésében. Ennek felderítésére vizsgáltam meg olyan egyedeket, melyekben mesterségesen túltermeltettük a dUTPázt. Azt, hogy az enzim valóban megjelent a differenciált szövetekben, immunhisztokémiai vizsgálattal ellenőriztem. Az egyedfejlődés során nem történt zavar és nem látható fenotípusos eltérés a vad típusú élőlényekhez képest. Ez alapján megállapítható, hogy a dUTPáz hiánya nem szükséges a lárvális differenciált szövetek degradációjához a metamorfózis során. Korábbi

tapasztalataink szerint a dUTPáz kifejeződése a szövetekben alacsonyan tartja a genom uracil tartalmát [25]. Ennek következtében valószínűsíthető, hogy a vizsgált szövetekben a dUTPáz túltermelése lecsökkentette a DNS-beli uracil mennyiségét. Ennek igazolásához és a dUTPáz túltermelés további, molekuláris szintű jellemzéséhez a genomi uracil tartalom mérését tervezem elvégezni.

8. Összefoglalás

A DNS-ben igen gyakori hiba az uracil megjelenése. Az uracil-tartalmú DNS metabolizmusában szerepet játszó legfontosabb enzimek a dUTPáz és az uracil-DNS glikozilázok (UDG). Az *ecetmuslica* modellszervezetben a dUTPáz esszenciális, és hiányában megnő a genomi uracil-tartalom az imaginális szövetekben. A metamorfózis során degradálódó szövetekben - ahol normálisan hiányzik a dUTPáz – természetes esetben is magas a DNS uracil tartalma.

Munkám során célul tűztem ki a letalitás molekuláris mechanizmusának felderítését. Feltételezéseink szerint a genomi integritás csökkenése lehet az oka az egyedszintű letalitásnak, ezért kísérleteimben a DNS integritását vizsgáló módszereket alkalmaztam. Fosfo-H2AX elleni immunhisztokémiai vizsgálattal és TUNEL próba segítségével DNS száltöréseket tartalmazó sejteket detektáltam a dUTPáz hiányos imaginális szövetekben. Valószínűsíthető, hogy a száltörések megjelenéséért a báziskivágásos javítómechanizmus (BER) enzimei felelősek. Ennek tisztázásához olyan egyedekkel végeztem kísérleteket, melyekben egyszerre volt csendesítve a dUTPáz és a vizsgálni kívánt három BER enzim egyike (Thd1, SMUG, APE1). Mindhárom esetben különböző mértékű életképesség-növekedés volt tapasztalható.

A három BER enzim funkcióját különállóan is szerettem volna tanulmányozni. Eddigi munkám során Thd1 csendesített és Thd1 mutációt hordozó egyedek szöveteit vizsgáltam. Számszerűen meghatároztam az expresszió csökkenésének mértékét, majd ezt követően egy qPCR alapú módszer segítségével megmértem, hogy a szövetek genomjában az uracil-tartalom megemelkedik.

További célkitűzésem volt, hogy tanulmányozzam a dUTPáz túltermeltetésének hatását is mind az életképesség tekintetében, mind molekuláris szinten a genomi uracil-tartalom meghatározásával. Ennek segítségével több információt kaphatunk a dUTPáz genomvédő szerepéről, illetve arról, hogy van-e élettani jelentősége a magas DNS-beli uracil-tartalomnak a differenciált szövetekben. Ehhez olyan egyedeket vizsgáltam meg, melyekben mesterségesen indukálható volt a dUTPáz túltermelése. A túltermeltetés sikerességét immunhisztokémiával ellenőriztem. Az enzim megjelenése nem okozott zavart az egyedfejlődésben. Jövőbeli tervem a DNS-beli uracil-tartalom mérése a túltermelés molekuláris szintű jellemzésének céljából.

9. Hivatkozásjegyzék

1. Stryer, L.B., Jeremy M.; Tymoczko, John L., *Biochemistry*. 5. ed. 2001: W. H. Freeman and Company.
2. Sedgwick, B., et al., *Repair of alkylated DNA: Recent advances*. DNA Repair, 2007. **6**(4): p. 429-442.
3. Kamiya, H., *Mutagenicity of oxidized DNA precursors in living cells: Roles of nucleotide pool sanitization and DNA repair enzymes, and translesion synthesis DNA polymerases*. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2010. **703**(1): p. 32-36.
4. Kow, Y.W., *Repair of deaminated bases in DNA*. Free Radic Biol Med, 2002. **33**(7): p. 886-93.
5. Niida, H., et al., *Mechanisms of dNTP supply that play an essential role in maintaining genome integrity in eukaryotic cells*. Cancer Sci, 2010. **101**(12): p. 2505-9.
6. Preston, B.D., T.M. Albertson, and A.J. Herr, *DNA replication fidelity and cancer*. Seminars in Cancer Biology, 2010. **20**(5): p. 281-293.
7. Mathews, C.K., *DNA precursor metabolism and genomic stability*. The FASEB Journal, 2006. **20**(9): p. 1300-1314.
8. Vértessy, B.t.G. and J. Tóth, *Keeping Uracil Out of DNA: Physiological Role, Structure and Catalytic Mechanism of dUTPases*. Accounts of Chemical Research, 2009. **42**(1): p. 97-106.
9. Schrader, C.E., et al., *The roles of APE1, APE2, DNA polymerase beta and mismatch repair in creating S region DNA breaks during antibody class switch*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2009. **364**(1517): p. 645-52.
10. Maul, R.W. and P.J. Gearhart, *AID and somatic hypermutation*. Adv Immunol, 2010. **105**: p. 159-91.
11. Ladner, R.D. and S.J. Caradonna, *The human dUTPase gene encodes both nuclear and mitochondrial isoforms. Differential expression of the isoforms and characterization of a cDNA encoding the mitochondrial species*. J Biol Chem, 1997. **272**(30): p. 19072-80.
12. Bekesi, A., et al., *Developmental regulation of dUTPase in Drosophila melanogaster*. J Biol Chem, 2004. **279**(21): p. 22362-70.
13. Robertson, A.B., et al., *DNA repair in mammalian cells: Base excision repair: the long and short of it*. Cell Mol Life Sci, 2009. **66**(6): p. 981-93.
14. Krokan, H.E., R. Standal, and G. Slupphaug, *DNA glycosylases in the base excision repair of DNA*. Biochem J, 1997. **325** (Pt 1): p. 1-16.
15. Kavli, B., *hUNG2 Is the Major Repair Enzyme for Removal of Uracil from U:A Matches, U:G Mismatches, and U in Single-stranded DNA, with hSMUG1 as a Broad Specificity Backup*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(42): p. 39926-39936.
16. Cortazar, D., et al., *The enigmatic thymine DNA glycosylase*. DNA Repair, 2007. **6**(4): p. 489-504.
17. Krokan, H.E., et al., *Uracil in DNA and its processing by different DNA glycosylases*. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 2009. **364**(1517): p. 563-568.
18. Adams, M.D., et al., *The genome sequence of Drosophila melanogaster*. Science, 2000. **287**(5461): p. 2185-95.

19. Smith, J., et al., *The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer*. Adv Cancer Res, 2010. **108**: p. 73-112.
20. Cranna, N. and L. Quinn, *Impact of steroid hormone signals on Drosophila cell cycle during development*. Cell Div, 2009. **4**: p. 3.
21. Baehrecke, E.H., *Steroid regulation of programmed cell death during Drosophila development*. Cell Death Differ, 2000. **7**(11): p. 1057-62.
22. Baehrecke, E.H., *Autophagic programmed cell death in Drosophila*. Cell Death Differ, 2003. **10**(9): p. 940-5.
23. Sharp, P.A., *RNAi and double-strand RNA*. Genes Dev, 1999. **13**(2): p. 139-41.
24. Perrimon, N., J.Q. Ni, and L. Perkins, *In vivo RNAi: today and tomorrow*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(8): p. a003640.
25. Muha, V., et al., *Uracil-containing DNA in Drosophila: stability, stage-specific accumulation, and developmental involvement*. PLoS Genet, 2012. **8**(6): p. e1002738.
26. Lari, S.-U., et al., *Quantitative determination of uracil residues in Escherichia coli DNA: Contribution of ung, dug, and dut genes to uracil avoidance*. DNA Repair, 2006. **5**(12): p. 1407-1420.
27. Shao, J., et al., *Ribonucleotide reductase inhibitors and future drug design*. Curr Cancer Drug Targets, 2006. **6**(5): p. 409-31.
28. Van Triest, B., et al., *Downstream molecular determinants of response to 5-fluorouracil and antifolate thymidylate synthase inhibitors*. Ann Oncol, 2000. **11**(4): p. 385-91.
29. Quennet, V., et al., *CtIP and MRN promote non-homologous end-joining of etoposide-induced DNA double-strand breaks in G1*. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(6): p. 2144-52.
30. Mladenov, E., P. Kalev, and B. Anachkova, *The complexity of double-strand break ends is a factor in the repair pathway choice*. Radiat Res, 2009. **171**(4): p. 397-404.
31. Koike, M., et al., *Dynamics of Ku80 in living hamster cells with DNA double-strand breaks induced by chemotherapeutic drugs*. J Vet Med Sci, 2010. **72**(11): p. 1405-12.
32. Kurose, A., et al., *Effects of hydroxyurea and aphidicolin on phosphorylation of ataxia telangiectasia mutated on Ser 1981 and histone H2AX on Ser 139 in relation to cell cycle phase and induction of apoptosis*. Cytometry A, 2006. **69**(4): p. 212-21.
33. Kumari, D., et al., *The role of DNA damage response pathways in chromosome fragility in Fragile X syndrome*. Nucleic Acids Res, 2009. **37**(13): p. 4385-92.
34. Horvath, A. and B.G. Vertessy, *A one-step method for quantitative determination of uracil in DNA by real-time PCR*. Nucleic Acids Res, 2010. **38**(21): p. e196.
35. Malzer, E., et al., *Impaired tissue growth is mediated by checkpoint kinase 1 (CHK1) in the integrated stress response*. J Cell Sci, 2010. **123**(Pt 17): p. 2892-900.
36. Castillo-Acosta, V.M., et al., *Depletion of dimeric all-alpha dUTPase induces DNA strand breaks and impairs cell cycle progression in Trypanosoma brucei*. Int J Biochem Cell Biol, 2008. **40**(12): p. 2901-13.
37. Dubois, E., et al., *Homologous recombination is stimulated by a decrease in dUTPase in Arabidopsis*. PLoS One, 2011. **6**(4): p. e18658.
38. Gadsden, M.H., et al., *dUTP pyrophosphatase is an essential enzyme in Saccharomyces cerevisiae*. EMBO J, 1993. **12**(11): p. 4425-31.
39. el-Hajj, H.H., L. Wang, and B. Weiss, *Multiple mutant of Escherichia coli synthesizing virtually thymineless DNA during limited growth*. J Bacteriol, 1992. **174**(13): p. 4450-6.
40. Dengg, M., et al., *Abrogation of the CLK-2 checkpoint leads to tolerance to base-excision repair intermediates*. EMBO reports, 2006. **7**(10): p. 1046-1051.