

XXXI. OTDK Biológia Szekció

Az 5'hidroximetil-citozin kvantitatív vizsgálata a genomiális DNS-ben

szerző: Vető Borbála

témavezető: Arányi Tamás, MD, PhD
MTA TTK Enzimológiai Intézet



Eötvös Loránd Tudományegyetem
Természettudományi Kar
Biológa MSc II.évf.

Budapest, 2013.január 9.

Tartalomjegyzék

Összefoglaló	3
Abstract.....	4
Bevezető	5
Anyagok és módszerek.....	9
Sejtkultúra	9
Kezelések	10
DNS izolálás	10
Immunofluoreszcencia	11
Áramlási citometria.....	11
Tömegspektrometria.....	11
Eredmények és megvitatásuk.....	12
Immunofluoreszcencia	12
Áramlási citometria.....	15
Tömegspektrometria.....	19
Szerzői hozzájárulás	24
Irodalomjegyzék.....	26

Összefoglaló

Az eukarióta sejtek kromatinszerkezete alapvető változásokon megy keresztül a sejt differenciáció és az egyedfejlődés során, valamint lokálisan meghatározza az egyes gének kifejeződését. A kromatinszerkezet kialakításában fontos szerepet játszanak a hisztonok, valamint a DNS kovalens módosításai. Az 5'-hidroximetil-citozin (5hmC) egy olyan citozin-módosítás, amit a TET-enzimek 5'-metil-citozinból alakítanak át oxidációval. Korábbi kutatások igazolták, hogy az 5hmC az aktív demetiláció fontos állomása, de valószínűleg önálló szabályozó szerepe is van. Kísérleteimet DT-40 csirke limfocitákon, HepG2 hepatocarcinoma sejteken és HapMap emberi limfoblastokon végeztem. Megfigyeltem, hogy a sejtekben - az irodalmi adatoknak megfelelően - egy metiltranszferáz-inhibitor, az 5-aza-2'-deoxicitidin hatására a globális metiláció szintje lecsökken, viszont az 5hmC szintje megnő. Eredményeimet áramlási citometria (FACS), immunfluoreszcencia epifluoreszcens mikroszkóppal és tömegspektrometria (LC-MS/MS) segítségével vizsgáltam. Így kvantitatív módszerekkel is sikerült meghatároznom a sejtek teljes 5mC és 5hmC-szintjét.

Abstract

The chromatin structure of the eukaryotic cells undergoes significant changes during cell differentiation and development. In addition, it locally determines the expression of the genes. Histones and covalent modifications to the DNA play important roles in forming the chromatin structure. 5-hydroxymethylcytosine (5hmC) is a cytosine modification which is generated from 5'-methylcytosine with the help of TET enzymes. Recent studies have proved that 5hmC is an essential stage of active demethylation. However, it might also take part in independent regulation. I conducted research on DT-40 chicken lymphocytes, HepG2 hepatocarcinoma cells and HapMap human lymphoblasts. In accordance with published data, I found that upon the methyltransferase inhibitor treatment, the global methylation level decreases, whereas the level of 5hmC increases. My research methods were flow cytometry, immunofluorescence with epifluorescent microscopy and mass spectrometry (LC-MS/MS). Thus, I could quantitatively determine the total genomic level of 5mC and 5hmC.

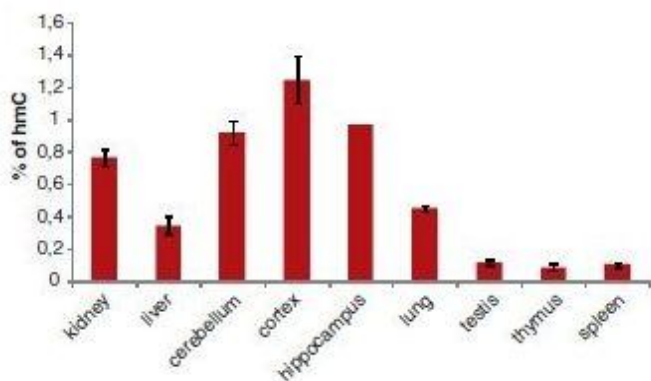
Bevezető

Az eukarióta sejtek kromatinszerkezete alapvetően befolyásol fontos élettani folyamatokat, mint például a gének kifejeződését. A kromatin szerkezetének fő meghatározói az úgynevezett epigenetikai faktorok, melyek a hisztonok, illetve a DNS kovalens módosításai. A DNS esetében ezek a fő faktorok a citozinok metilációja és hidroximetilációja. A DNS-metiláció emlőszövetekben főleg CpG dinukleotidokban jelentős (ahol a régies „p” jelölés a foszfodiészter kötést mutatja). A DNS metilációjában a DNMT enzimek játszanak elsődleges szerepet, hiszen ezek katalizálják a metil-citozinok (5mC) szintézisét (Bestor, TH., 2000). Emlőszövetekben háromféle DNS-metiltranszferáz (DNMT) enzim van: DNMT3A, DNMT3B és DNMT1. Az első kettő *de novo* metil-transzferáz, melyek még nem metilált CpG-ket céloznak meg. A DNMT1 enzim ezzel szemben olyan kettősszálú DNS-t metilál, ahol az egyik szál metilált, míg a vele komplementer pozíció nem (*maintenance methyl-transferase*).

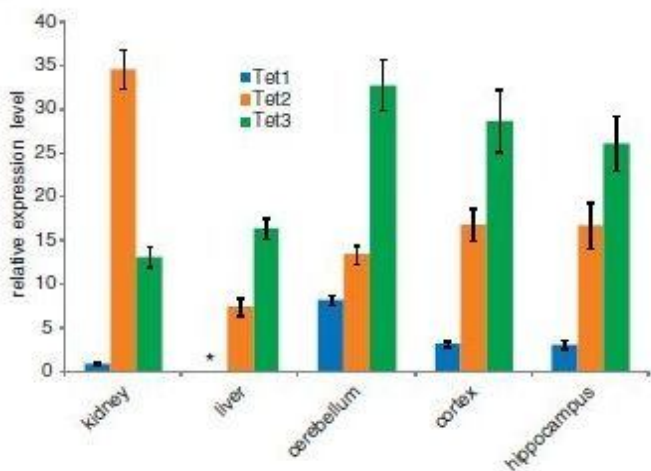
A CpG dinukleotidok egyenetlenül helyezkednek el a genomban. A genom nagy része a véletlenszerű eloszlásnál szignifikánsan kevesebb CpG dinukleotidot tartalmaz, míg helyenként a CpG dinukleotidok eloszlása szigetszerűen összesűrűsödik. Ezeket a szekvenciákat nevezzük CpG szigeteknek. Akkor beszélhetünk CpG-szigetéről, ha egy legalább 300 bp hosszú régióban a C+G nukleotidok aránya eléri a 60%-ot és a CpG/GpC arány nagyobb 0,6-nál (ez az arány a genom többi részében 0,1 körül szokott lenni). A CpG szigetek sokszor transzkripció starthelyek közelében találhatók, és a promóterek 60-70%-ában van CpG-sziget. A promóterek CpG-szigeteinek metilációja transzkripció csendesítést eredményez (Boyes, J. és Bird, A., 1992). A repetitív elemek és a mobilis szekvenciák metilációja a genomi instabilitás és a vírusok elleni védelem szempontjából fontos. Továbbá, a DNS metilációnak szerepe van az X kromoszóma-inaktivációban és az imprintingben is (Jones, PA. és Takai, D., 2001). A metilációs mintázat a megfelelő sejtes homeosztázis fenntartásához elengedhetetlen, hiszen a mintázat felborulása sok betegséghez, többek között rosszindulatú daganatok kialakulásához is vezethet (Rao, PM. és mtsai, 1989).

Az újonnan felfedezett TET (ten-eleven-translocase) családba tartozó enzimek a TET1, a TET2 és a TET3. Ezek 2-oxoglutarát (α -ketoglutarát) és Fe(II)-függő dioxigenázok, melyek *in vivo* és *in vitro* is képesek az 5mC-t 5'-hidroximetilcitozinná (5hmC) alakítani oxidációval, ami demetilációt jelent. Egy konzervált fémionkötő katalitikus doménnel és egy CXXC doménnel rendelkeznek. A DNS-kötő domén egy CpG-kötő motívum (Ito, S., 2011).

A TET-enzimekre szövetspecifikus expresszió jellemző, a TET1 expressziója elsősorban ES sejtekben (embrionális őssejt) jelentős (Tahiliani, M. és mtsai, 2009). Ennek megfelelően az 5hmC szintje is változik szövettípusonként. A legtöbb 5hmC a központi idegrendszerben és ES sejtekben található (Globisch, D. és mtsai, 2010). Pontosabban: a legtöbb 5hmC az agykéregben, a hippocampusban és a kisagyi Purkinje sejtekben található (**1. ábra**), így a hidroximetiláció feltételezhetően fontos szerepet játszik az idegi fejlődésben és érésben (Münzel, M. és mtsai, 2011). Közepes az 5hmC szintje a vesében, a tüdőben és a májban. A legalacsonyabb 5hmC-szint a tímuszban, a lépben és a herében figyelhető meg. Az egyes szervekben vizsgált TET-enzimek expressziós szintjeit a **2. ábra** mutatja be. Itt árnyaltabb, differenciáltabb képet kaphatunk. Míg a TET1 és TET2 enzimek a pluripotencia fenntartásához szükségesek, addig a TET3 inkább a differenciációs folyamatokban vesz részt (Münzel, M. és mtsai, 2011).



1. ábra: 5hmC-szint a különböző szervekben (Szwagierczak, A. és mtsai, 2010).



2. ábra: A TET-enzimek expressziója különböző szervekben (Szwagierczak, A. és mtsai, 2010).

A TET1 enzim genomi elhelyezkedését vizsgálva egér ES sejteken kiderült, hogy az enzim főleg génben gazdag régiókhoz köt, leggyakrabban transzkripciót indító helyekhez (*Transcription Start Site*) (Williams, K. és mtsai, 2011). A TET1 enzim csaknem kizárólag CpG-szigeteket preferál, amit kromatin immunoprecipitációt követő nagy áteresztőképességű szekvenálással (ChIP-Seq) igazoltak (Wu, H. és mtsai, 2011). A TET1 enzim felelős a promóterbeli CpG-szigetek hipometilált vagy metiláció-mentes állapotának fenntartásáért. Ezt úgy bizonyították, hogy a TET1 kiütése az 5mC-szint növekedéséhez vezetett a TET1-kötőhelyeken (Wu, H. és mtsai, 2011).

A TET gének mutációit ugyancsak kapcsolatba hozták rosszindulatú megbetegedések kialakulásával. A TET2 mutáció például haematopoetikus tumorokhoz vezethet. Továbbá, a TET2 enzim gyakran mutált egyéb haematológiai betegségekben (Delhommeau, F. és mtsai, 2009). Akut mieloid leukémia (AML) esetében hipermetiláció és mieloid proliferáció jelenik meg. A betegeknél esetenként megfigyelhető az IDH1 vagy IDH2 (izocitrát dehidrogenáz) mutációja, ami az 5hmC szintézisben szerepet játszó α -ketoglutarát szintéziséért felelős (Figueroa, ME. és mtsai, 2010). Ekkor alacsonyabb az 5hmC-szint és magasabb az 5mC-szint. Fontos megjegyezni, hogy az izocitrát és az α -ketoglutarát is a citromsavciklus nélkülözhetetlen elemei.

A TET-enzimek fő feladata tehát az 5mC 5hmC-intermedieren keresztüli demetilációja (**3. ábra**). A citozinok 5' hydroximetilációjának elvesztése valószínűleg több útvonalon keresztül történik. A passzív DNS-demetiláció különösen fontos a gyorsan osztódó sejtek, pl. ESC-k esetében, amikor a sejtek osztódását követően az új citozinok már nem lesznek módosítva. Továbbá, az 5hmC részese lehet az aktív demetilációs útvonalnak is, melynek végén szintén citozin keletkezik. Ebben DNS-javító mechanizmusok játszanak szerepet. Az AID/APOBEC család citidin-deaminázai a hmC-t hidroximetil-uridinné (hmU) alakítják, ami T:G mismatchet eredményez. Ezt a lépést bázis-kivágó kijavítás (BER) vagy 5hmC-glikoziláció és BER követi (Guo és mtsai, 2011). A formilcitozin (fC) és a karboxilcitozin (caC) szerepe még nem teljesen tisztázott az aktív demetilációs útvonalban. Az már ismert, hogy ezt a két citozinmódosítást a TET-enzimek végzik 5hmC-ből további oxidációval. A TET-enzimek azonban nem képesek a caC-t citozinná alakítani, amit helyettük feltételezhetően egy timin DNS-glikoziláz (TDG) végez (Hashimoto, H. és mtsai, 2012). A TDG enzim mellett a SMUG1 (egyszálú DNS-re szelektív, monofunkcionális uracil-DNS glikoziláz) DNS-glikoziláz is szerepet játszhat a folyamatban (Auclair, G. és Weber, M., 2012).

Ha az 5mC és az 5hmC genomi eloszlását vizsgáljuk, láthatjuk, hogy az 5mC nagyrészt heterokromatikus régiókban és szatellitákban található meg, míg az 5hmC promóter régiókban és TSS-ek helyén, valamint ritka heterokromatikus régiókban és repetitív elemekben (Pastor, WA. és mtsai, 2011). Viszont eukromatikus régiókban, LINE elemek 5' végénél, pluripotenciáért felelős transzkripció faktorok kötőhelyénél gyakran fordul elő, és gyakoribb az exonokban, mint az intronokban (Ficz, G. és mtsai, 2011).

A két citozinszármazék meghatározása DNS-immunoprecipitációt követő nagy áteresztőképességű szekvenálással (MeDIP-Seq, és hMeDIP-Seq) történhet például, 5mC és 5hmC-specifikus antitestek segítségével (Ficz, G. és mtsai, 2011; Williams, K. és mtsai, 2011; Wu, H. és mtsai, 2011; Xu, Y. és mtsai, 2011). Azonban a módszer nem használható abszolút mennyiségi különbségek megállapítására.

Az 5-aza-2'-deoxicitidin egy citidin analóg, ami képes beépülni a DNS-be (Glover, AB. és Leyland-Jones, B., 1987). A *decitabine* néven is ismert molekula az Amerikai Élelmiszer-, és Gyógyszer Ellenőrző Hatóságnál bejegyzett, ma már klinikai alkalmazásban van, mint mielodiszplázias betegségek esetén használt gyógyszer (Kuendgen, A. és mtsai, 2008), továbbá akut mieloid leukémia esetén is alkalmazzák. Az 5-aza-2'-deoxicitidin egy DNS-metiltranszferáz inhibitor, a DNMT-et gátolja, úgy, hogy a metilálendő akceptor szénatom helyére egy nitrogén épül be, és a DNMT-t kovalensen köti. Az 5-aza-2'-deoxicitidin csak a DNS-be beépülve képes gátolni a DNMT enzimeket. Hatására globális genomiális demetiláció következik be.

Laboratóriumunkban, az MTA TTK Enzimológiai Intézetben célul tűztük ki a sejtek teljes genomiális 5mC- és 5hmC-szint meghatározását. Kísérleteinkben tömegspektrometriával (LC/MS) pontos (Yamagata, Y. és mtsai, 2012) kvantitatív eredményeket kaptunk.

Anyagok és módszerek

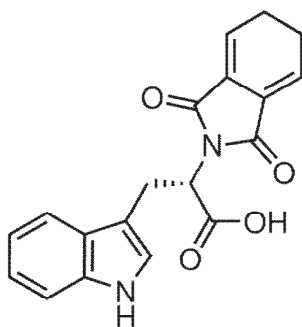
Sejtkultúra

HepG2 hepatocarcinoma, DT-40 csirke vad típusú, DT-40 Xpa-, HapMap 18592, HapMap 18552 és HapMap 18633 humán limfoblaszt sejtvonalakat tartottam fenn, és végeztem rajtuk a kísérleteket. A HepG2 sejtvonalat az ATCC-től, a HapMap sejteket a

HapMaptól vásároltuk, a DT-40 sejteket pedig dr. Szűts Dávidtól (Enzimológiai Intézet) kaptuk. A DT-40 sejtek limfoid sejtek, melyek AVL (*avian leukosis virus*)-indukálta limfómákból erednek, melyeket *in vivo* szingénikus csirkékben termeltettek, majd a sejteket kinyerték (Baba, TW. és mtsai, 1985). A DT-40 Xpa- mutáns sejtvonalat Szűts Dávid állította elő az alábbi cikkben leírtak szerint (Szűts, D. és mtsai, 2008). Az Xpa gén a Z ivari kromoszómán helyezkedik el madaraknál, és az Xpa fehérje a DNS-javító mechanizmusok egyik fontos résztvevője. A HepG2 hepatocarcinoma sejtvonalat Advanced MEM (Gibco) médiumban tartottam, amit kiegészítettem a következőkkel: 10% FBS, 2mM glutamin, 100 U/ml penicillin és 100 µg/l streptomycin. A HepG2 sejteket 70-80%-os konfluencia elérésekor passzáltam, tripszinnel emésztettem a letapadó sejteket. A DT-40 sejtek médiuma RPMI (Lonza), amit a következőkkel egészítettem ki: 3% csirke szérum, 7% FBS, 2mM glutamin, 100 U/ml penicillin, 100 µg/l streptomycin és 50µM β-merkaptotanol. A HapMap-sejteket szintén RPMI médiumban tartottam, amit 15% FBS-sel egészítettem ki.

Kezelések

A kezeléseket elsősorban 5-aza-2'-deoxicitidinnel végeztem (4. ábra), 1 µg/ml-es koncentrációban, 48 órán keresztül 24 óránkénti médiumcserével. Az 5-aza-2'-deoxicitidint DMSO-ban oldottam fel, és -20 °C-on tároltam 0,5 mg/ml-es koncentrációban (*stock solution*). A kontroll dimetil-szulfoxid (DMSO) volt.



4.ábra: 5-aza-2'-deoxicitidin

DNS izolálás

Alapvetően a Qiagen Puregene protokollját használtam, saját kezűleg készített oldatokkal. A mintákból a DNS-t úgy nyertem ki, hogy lizáltam a sejteket, majd RNázal

kezeltém a mintákat. Ezután a fehérjéket precipitáltam, majd centrifugálással eltávolítottam. Ezt követően izopropanol, majd 70%-os etanol segítségével kinyertem a DNS-t.

Immunofluoreszcencia

A sejtek tripszinizálása és mosása után óvatosan hipotóniás oldatot (0,075M KCl) adtam a sejtuszpenzióhoz. Ezt követően etanol és ecetsav 3:1 keverékével fixáltam a sejteket, miközben vortexeltem a csöveket, és 1-2 cseppet cseppentettem a tárgylemezre. A fixált sejteket 30 percig 2M-os HCl/Triton-X-100-oldatban inkubáltam, majd neutralizáltam a mintákat, és BSA-s blokkoló oldatot használtam. Az elsődleges antitestek anti-5mC patkány monoklonális antitest és anti-5hmC egér monoklonális antitest (Diagenode) voltak, mindkettő 1:100-es hígításban. 4 °C-on inkubáltam a tárgylemezeket egy éjszakán át. A következő napon mosás után a másodlagos antitesteket vittem fel a mintákra. Ezek Alexa 488 (zöld) anti-egér antitest és Alexa 546 (piros) anti-patkány antitest voltak, melyeket kecskében termeltettek. Majd újra mosás következett. Végül Vectashield médiumot és DAPI sejtmagfestéket vittem fel a mintákra. Ezek után epifluoreszcens mikroszkóppal analizáltam a mintáimat.

Áramlási citometria (FACS)

A kísérletek egy részét áramlási citométerrel végeztem, FACSCaliburral. Ehhez a sejteket PBS-sel megmostam, majd 70% etanollal fixáltam. Lassan csepegtettem az etanolt a mintákra, majd pedig 1 napig inkubáltam 4 °C-on a sejteket. Ezután az immunofluoreszcencia fejezetnél leírtak szerint folytattam a kísérletet a fixálás utáni résztől kezdve.

Tömegspektrometria

A tömegspektrometriás mérésekhez dr. Szabó Pál (MTA Kémiai Kutatóközpont) segítségét kértem, aki hangyasavval hidrolizálta a mintákat, majd a nukleotid bázisokat detektálta tömegspektrometriával. 100%-os hangyasavat adott a mintákhoz, ami után 90 perc 130 °C-os inkubáció következett. A nitrogénes evaporáció után 10 mM-os ammónium-formiátot adott a mintákhoz. Grádiens-elúciót alkalmazott a szeparáláshoz: ammónium-fomiátot és acetonitrilt használt. Úgy biztosította a tömegspektrometriás módszer pontosságát

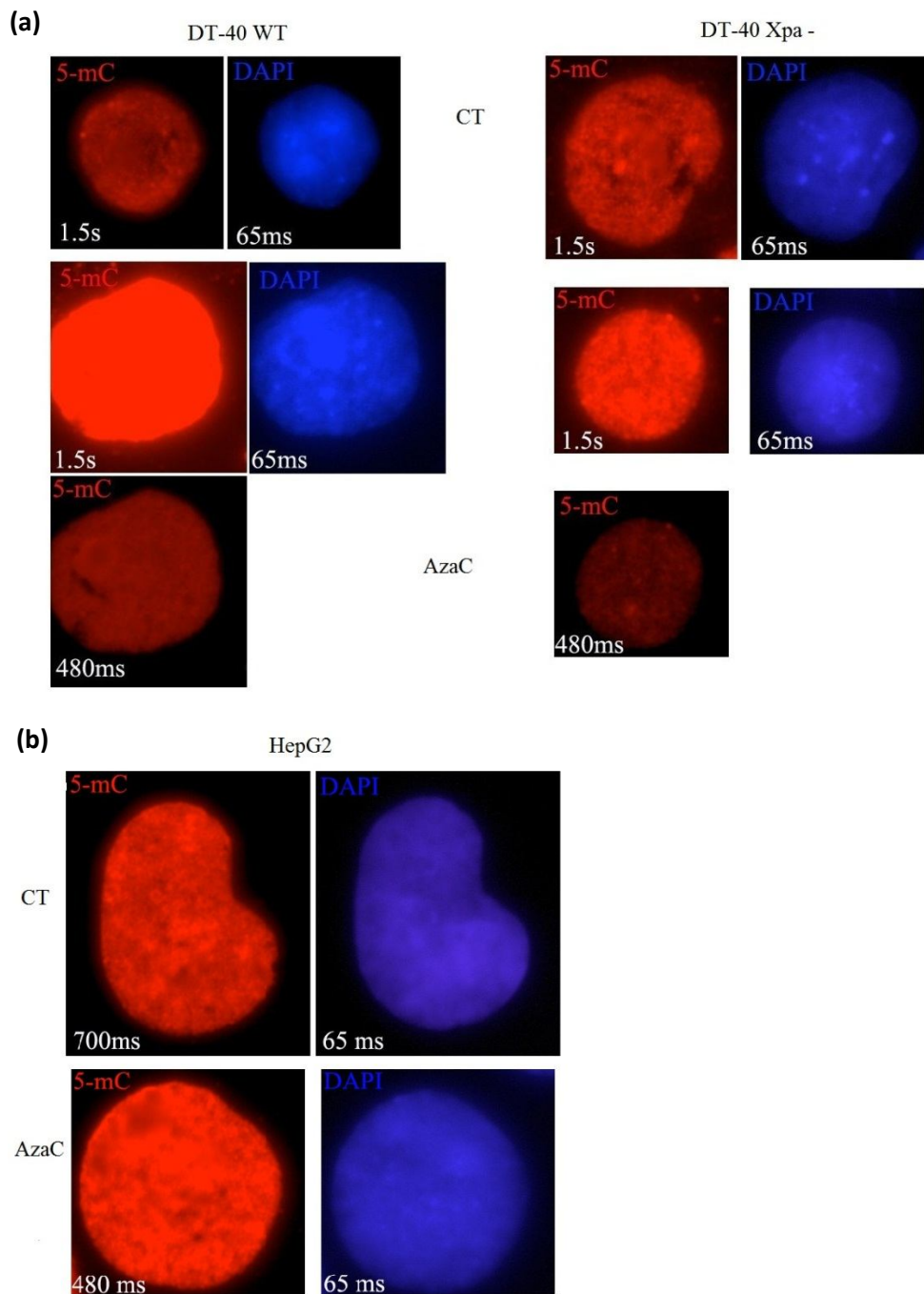
és reprodukálhatóságát, hogy 3 független DNS mintát vizsgált és mindegyiket háromszor lemérte. A 3200 QTrap LC/MS/MS rendszer segítségével végezte a méréseket, és 5hmC/citozin, valamint 5mC/C bázisarányokat határozott meg minden mintából (Yamagata, Y. és mtsai, 2012).

Eredmények és megvitatásuk

Kísérleteim során a genomiális 5mC- és 5hmC-szintet akartam meghatározni különböző sejtek esetében. Háromféle módszert alkalmaztam a kétféle citozinszármazék kimutatására és számszerűsítésére a genomban: immuno fluoreszcencia, áramlási citometria és tömegspektrometria. Továbbá, az 5-aza-2'-deoxicitidines kezelés hatását szerettem volna minél jobban megvizsgálni, és bebizonyítani, hogy a metiltranszferáz-inhibitor molekula lecsökkenti az 5mC szintjét. Végül kíváncsi voltam, hogy ez a változás hogyan befolyásolja az 5hmC-szintet.

Immunofluoreszcencia

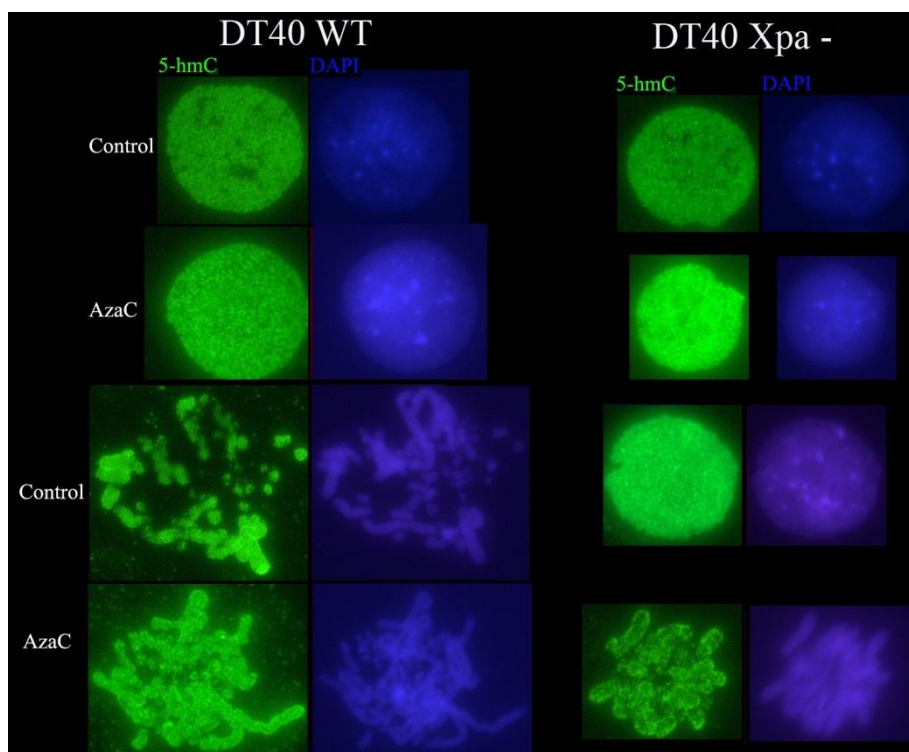
Az immunofluoreszcencia során piros színű anti-5mC és zöld színű anti-5hmC antitesteket használtam a citozinszármazékok kimutatására a fixált DT-40 és HepG2 sejtmagokban. A sejtmagokat DAPI-val festettem kék színűre, és a tárgylemezekre felvitt mintákat epifluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltam. Az **5. ábrán** látható a genomiális 5mC-szint kontroll sejtek és 5-aza-2'-deoxicitidines kezelés hatására. Az ábrán nem látjuk egyértelműen a várt változást, mert nem látszik, hogy csökkenne a festés fényintenzitása vagy a festett kromoszómarészletek száma. Belátható, hogy ezzel a módszerrel nem tudjuk pontosan számszerűsíteni a változást a kontrollhoz képest.



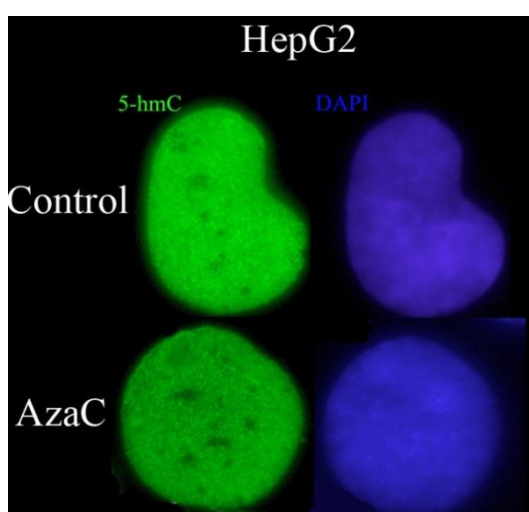
5. ábra. (a): DT-40 vad típusú, DT-40 Xpa– és **(b):** HepG2 sejtek 5mC-szintje a sejtmagban. Kontroll és 5-aza-2'-deoxicitidin hatására.

Az **6. ábrán** látható a genomiális 5hmC-szint kontroll sejtek és 5-aza-2'-deoxicitidines kezelés hatására. Ebben az esetben sem látunk változást a kezelés hatására a kontrollhoz képest.

(a)



(b)

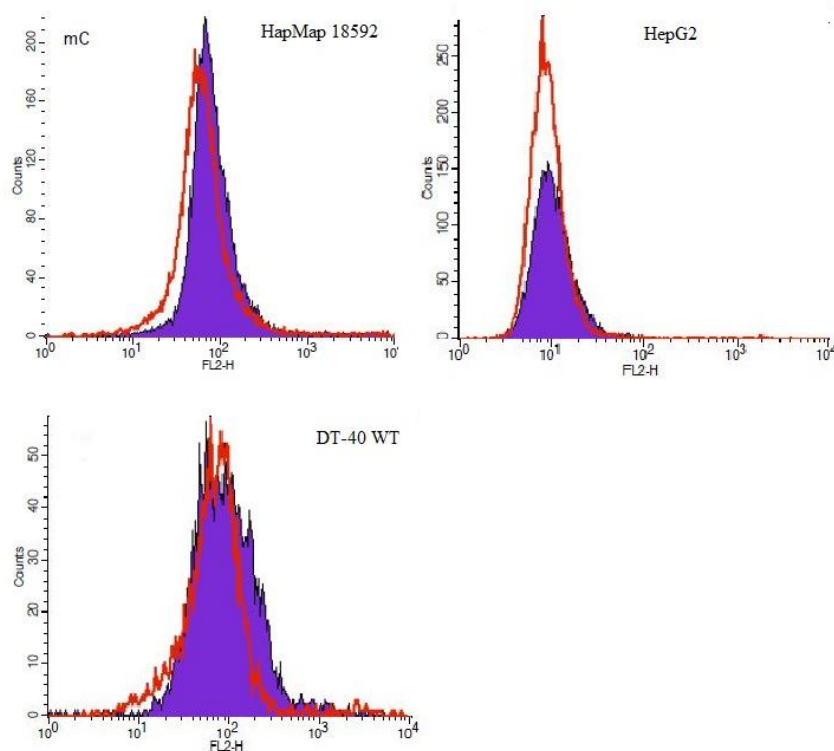


6. ábra. (a): DT-40 vad típusú, DT-40 Xpa- és (b): HepG2 sejtek 5hmC-szintje a sejtmagban. Kontroll és 5-aza-2'-deoxicitidin hatására.

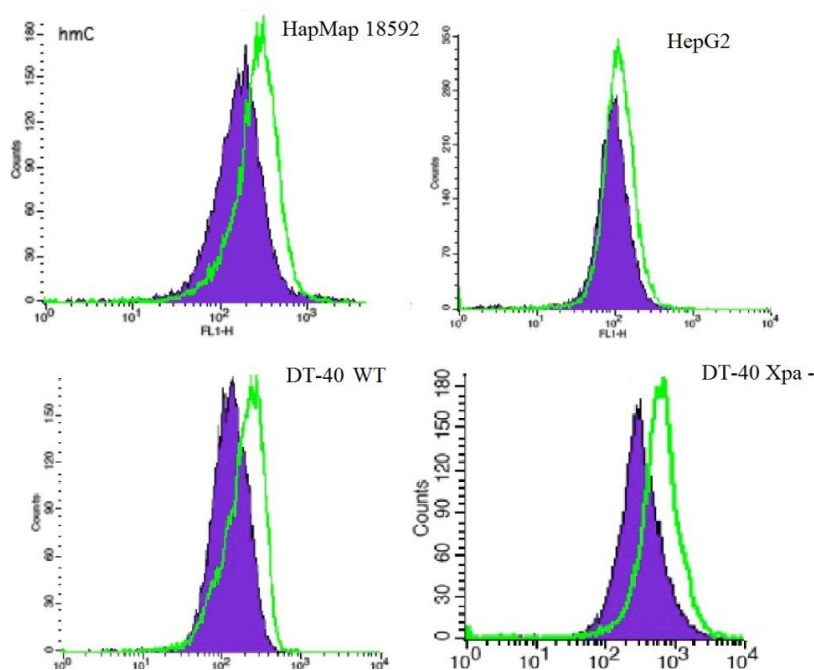
A mikroszkópos ábrák láthatóan nem tudták egyértelműen bizonyítani a feltevésünket, miszerint 5-aza-2'-deoxicitidin hatására az 5mC-szint csökken és hogy ez összefügghet az 5hmC-szinttel. Az immunfluoreszcencia ebben az esetben tehát nem ad kvantitatív eredményt, kvalitatívan azonban mégis jelzi a citozinszármazékok eloszlását a sejtmagban.

Áramlási citometria (FACS)

További kísérleteket végeztem tehát a genomiális 5mC és 5hmC kvantitatív meghatározására. Áramlási citométerrel végeztem vizsgálatokat. Ahogyan a **7. ábrán** látszik, kezelés hatására lecsökken az 5mC-szint, de - érdekes módon - megnő az 5hmC-szint (**8.ábra**). Tehát létezik valamiféle összefüggés a genomiális 5mC és 5hmC-szint között. Azonban fontos megjegyezni, hogy nem minden esetben kaptam ennyire meggyőző eredményt.

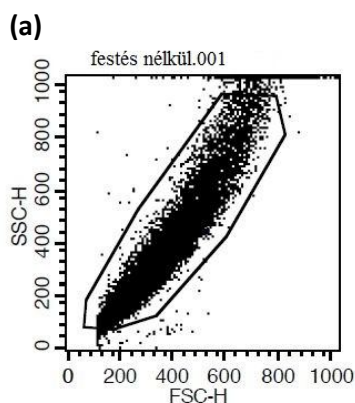


7. ábra: FACS eredmények HapMap 18592, HepG2 és DT-40 vad típusú sejtek esetében. 5-aza-2'-deoxicitidin hatására 5mC-szint csökkenés tapasztalható (piros szín).

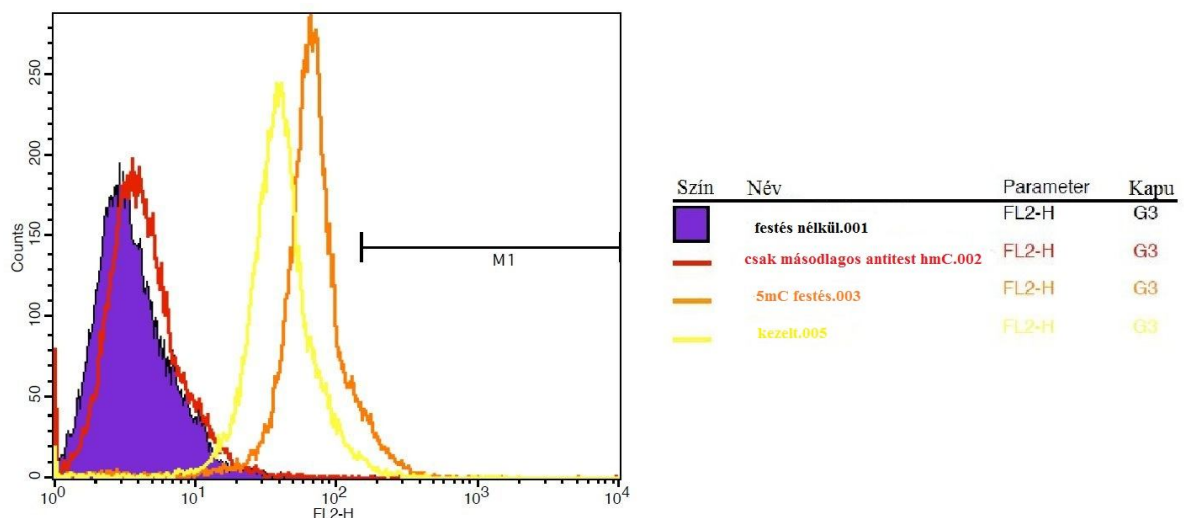


8. ábra: FACS eredmények HapMap 18592, HepG2, DT-40 vad típusú és DT-40 Xpa- sejtek esetében. 5-aza-2'-deoxicitidin hatására 5hmC-szint növekedés tapasztalható (zöld szín).

A következőkben egy-egy kiragadott példán láthatók az áramlási citometriás vizsgálat során kapott eredmények, valamint azok statisztikai kiértékelése. A **9.ábra (a)** részén megfigyelhető egy dot plot ábra és a kapuzás használata, a **(b)** részen a festetlen (lila), a csak másodlagos antitesttel festett (piros), a kezeletlen, de teljesen festett 5mC-os (narancssárga) és a kezelt és festett 5mC-os (citromsárga) minták görbéinek hisztogramos elhelyezkedése logaritmikus vízszintes tengelyen. Továbbá, a **(c)** részlet a statisztikai elemzést mutatja be, amikor összehasonlítottam a kezeletlen és 5-aza-2'-deoxicitidinnel kezelt minták 5mC-os festődését. Azt sikerült megállapítanom, hogy a kezelés hatására kb. 4,79%-kal csökken az 5mC-szintje. A kép mellett látható a fontosabb eredmények összegzése kiemelve.



(b)



(c)

File: untreated mC.003		Log Data Units: Linear Values							
Acquisition Date: 05-Jun-12		Gate: G3							
Gated Events: 23191		Total Events: 24415							
X Parameter: FL2-H (Log)									
Marker	Events	% Gated	Mean	Geo Mean	SD	CV	Median	Peak	Ch
All	23191	100.00	74.76	65.11	55.59	74.36	64.36	62	
M1	1353	5.83	211.03	199.22	152.04	72.05	186.01	151	

File: aza mC.005		Log Data Units: Linear Values							
Acquisition Date: 05-Jun-12		Gate: G3							
Gated Events: 23198		Total Events: 24449							
X Parameter: FL2-H (Log)									
Marker	Events	% Gated	Mean	Geo Mean	SD	CV	Median	Peak	Ch
All	23198	100.00	44.57	38.44	37.36	83.82	37.86	36	
M1	241	1.04	241.90	206.14	225.78	93.34	176.24	149	

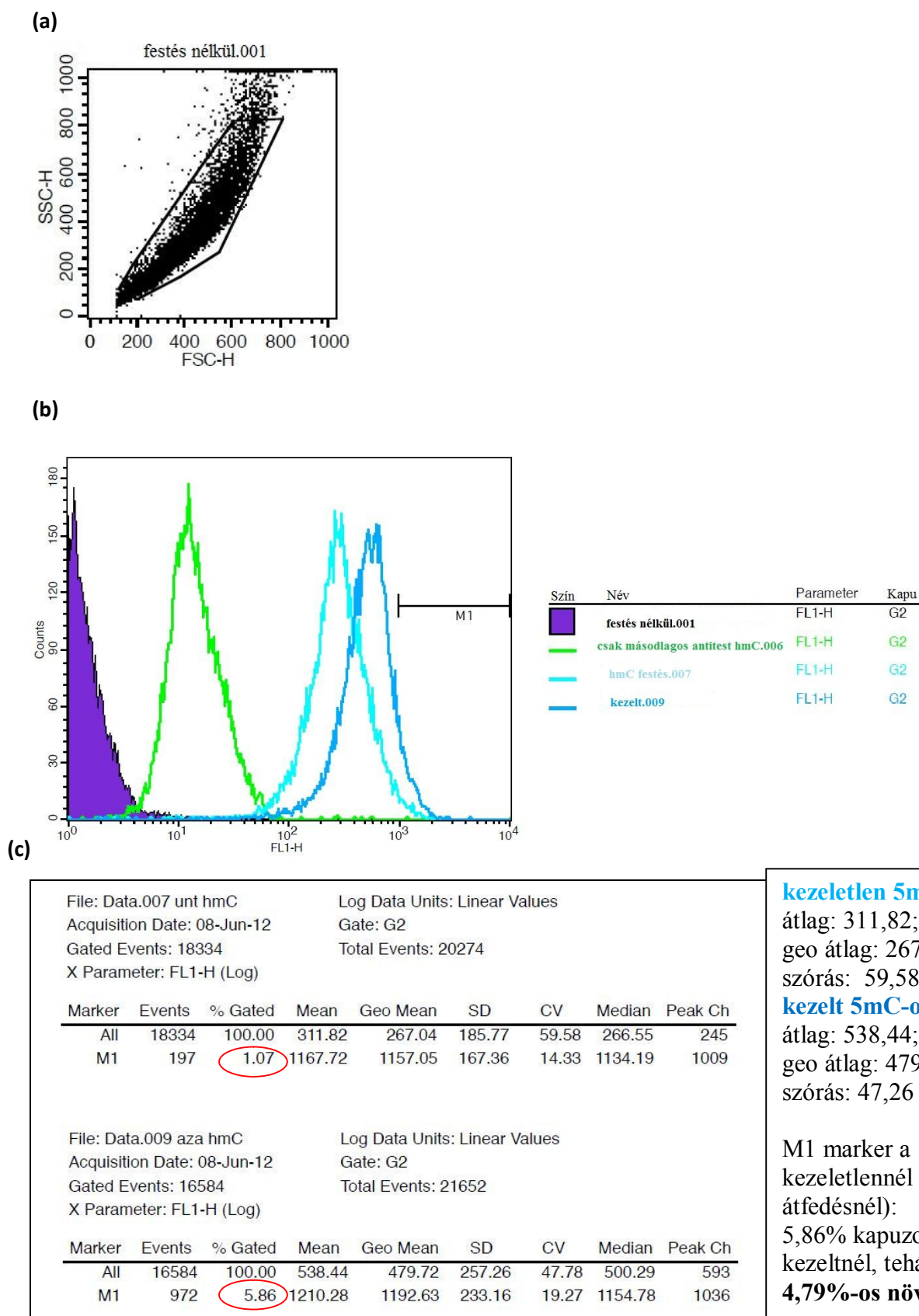
kezeletlen 5mC-os festés:
átlag: 74,76;
geo átlag: 65,11;
szórás: 55,59

kezelt 5mC-os festés:
átlag: 44,57;
geo átlag: 38,44;
szórás: 37,44

M1 marker a kezeltnél
(1%-os átfedésnél):
5,83% kapuzott a
kezeletlennél, tehát kb.
4,79%-os csökkenés

9.ábra: FACS eredmények kiértékelése HapMap 18552 sejteken, 5mC festése esetén. **(a):** dot plot: a festetlen sejtek szóródása (FSC és SSC) és kapuzás (G3). **(b):** hisztogram: 5-aza-2'-deoxicitidin hatására 5mC-szint csökkenés tapasztalható. **(c):** statisztikai elemzés.

A **10.ábra (a)** részén megfigyelhető egy dot plot ábra és a kapuzás használata, a **(b)** részén a festetlen (lila), a csak másodlagos antitesttel festett (zöld), a kezeletlen, de teljesen festett 5hmC-os (világoskék) és a kezelt és festett 5hmC-os (sötétkék) minták görbéinek hisztogramos elhelyezkedése logaritmikus vízszintes tengelyen. Továbbá, a **(c)** részlet a hozzá tartozó statisztikai elemzést mutatja be, amikor összehasonlítottam a kezeletlen és 5-aza-2'-deoxicitidinnel kezelt minták 5hmC-os festődését. Azt sikerült megállapítanom, hogy a kezelés hatására kb. 4,79%-kal nő az 5hmC-szintje. A kép mellett látható a fontosabb eredmények összegzése kiemelve.



10.ábra: FACS eredmények kiértékelése DT-40 Xpa- sejteken, 5hmC festése esetén. (a): dot plot: festetlen sejtek szóródása (FSC és SSC) és kapuzás (G2). (b): hisztogram: 5-aza-2'-deoxicitidin hatására 5hmC-szint növekedés tapasztalható. (c): statisztikai elemzés.

Összességében elmondható, hogy valóban tapasztalható csökkenés 5-aza-2'-deoxicitidines kezelés hatására az 5mC-szintben, és az 5hmC-szint csökken. A statisztikai elemzés során látható, hogy többféle számérték is összehasonlítható. Fontos megjegyezni, hogy – bár a csökkenés és a növekedés véletlenül azonos számérték –, a kettő nem összehasonlítható, mert más sejtekről, más mintákról, más immunfestésről van szó, és jól látszik, hogy a festődés is különböző mértékű. A szórás nagysága miatt azonban sem biztos, hogy megbízható a kiértékelés. Szignifikancia-tesztet nem végeztem, mert a mérésenként körülbelül 20.000 esemény értékeit nem tudnám bevinni egy statisztikai programba.

Véleményem szerint sem az immunfluoreszcencia, sem az áramlási citométerrel történő vizsgálat sem tudja pontosan, egyértelműen és teljesen kvantitatívan megmutatni a genomiális 5hmC- és 5mC-szintet, ezért tömegspektrometriát alkalmaztunk.

Tömegspektrometria

Az **1. és 2. táblázat** mutatja a tömegspektrometriás eredményeinket, továbbá a **11. és a 12. ábrán** láthatók az ebből készített diagramok. Látható, hogy itt sikerült a legpontosabban meghatározni genomiális citozinszármazékok mennyiségi eloszlását. Azt figyeltük meg, hogy a DT-40 vad típusú sejtek esetében körülbelül 3.5-szörös csökkenés tapasztalható az 5mC-szintben a citozinhoz képest 5-aza-2'-deoxicitidin hatására. DT-40 Xpa- sejtek esetében ez a csökkenés kb. 2.7-szeres. Ezzel szemben – meglepetésünkre - az 5hmC-szint növekedése DT-40 vad típusnál majdnem kétszeres, és a DT-40 Xpa- sejtípus esetében majdnem hasonló.

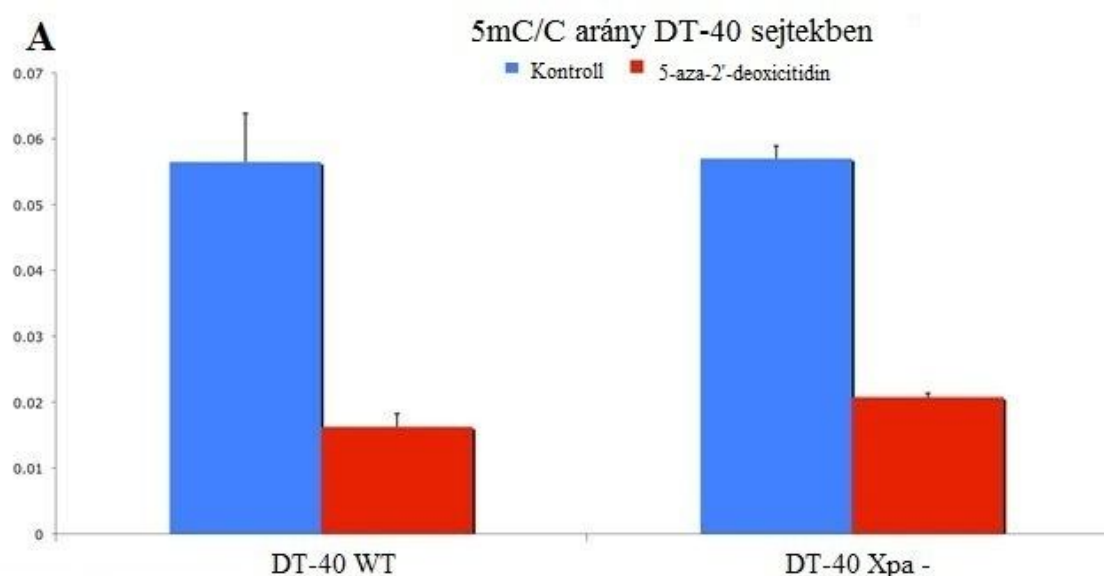
név	5mC/C	átlag	szórás	5hmC/C	átlag	szórás			
VT01	0,05158			0,00025					
VT01	0,04927			0,00027					
VT01	0,04868	0,049843	0,001533	0,00028	0,000267	0,000015			
VT02	0,06164			0,0003			VT kezeletlen	átlag	szórás
VT02	0,06342			0,00027			5mC/C	0,05647	0,007371366
VT02	0,06423	0,063097	0,001325	0,00028	0,000283	0,000015	5hmC/C	0,000275	0,0000164
VTA1	0,01396			0,00055					
VTA1	0,0152			0,00056					
VTA1	0,01442	0,014527	0,000627	0,00053	0,000547	0,000015			
VTA2	0,01794			0,00054			VT kezelt	átlag	szórás
VTA2	0,01704			0,00053			5mC/C	0,01624	0,002004595
VTA2	0,01888	0,017953	0,000920	0,00057	0,000547	0,000021	5hmC/C	0,000547	0,0000163

1. táblázat: Tömegspektrometriás eredmények DT-40 vad típusú genotípusú sejteken. Az 5mC/C és 5hmC/C arány látható kontroll és 5-aza-2'-deoxicitidin hatására.

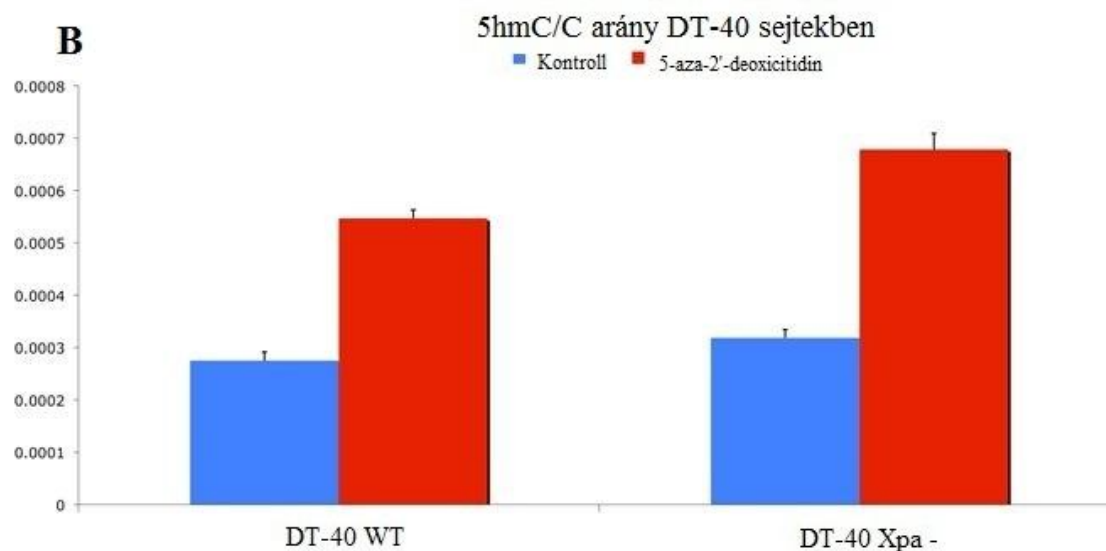
név	5mC/C	átlag	szórás	5hmC/C	átlag	szórás			
XPa01	0,05323			0,00031					
XPa01	0,05798			0,00033					
XPa01	0,05751	0,05624	0,002617	0,00033	0,000323	0,000012			
XPa02	0,05763			0,00029			Xpa- kezeletlen	átlag	szórás
XPa02	0,05861			0,00033			5mC/C	0,056985	0,00191956
XPa02	0,05695	0,05773	0,000835	0,00032	0,000313	0,000021	5hmC/C	0,000318	0,0000160
XPaA1	0,02046			0,00064					
XPaA1	0,02002			0,00069					
XPaA1	0,02018	0,02022	0,000223	0,00067	0,000667	0,000025			
XPaA2	0,02109			0,00073			Xpa- kezelt	átlag	szórás
XPaA2	0,02114			0,00068			5mC/C	0,020745	0,000616174
XPaA2	0,02158	0,02127	0,000270	0,00066	0,000690	0,000036	5hmC/C	0,000678	0,0000306

2. táblázat: Tömegspektrometriás eredmények DT-40 Xpa- genotípusú sejteken. Az 5mC /C és 5hmC/C arány látható kontroll és 5-aza-2'-deoxicitidin hatására.

Az adatsorok közötti szignifikanciát páratlan t-próbával végeztem. Azt az eredményt kaptam, hogy az eltérések a kezelt és kezeletlen adatsorok között minden esetben nagyon szignifikánsak.



11. ábra: Tömegspektrometriás eredmények DT-40 vad típusú és Xpa- genotípusú sejteken. Az 5mC és C arány látható kontroll és 5-aza-2'-deoxicitidin hatására.

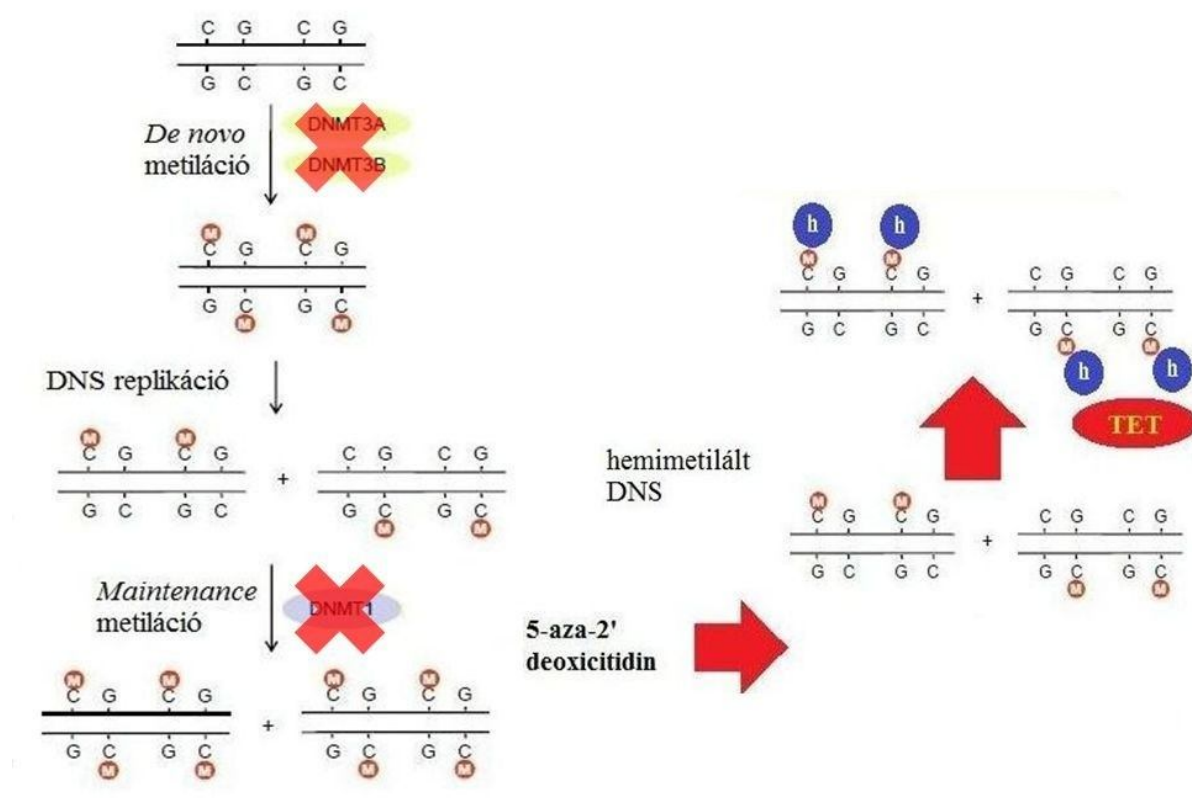


12. ábra: Tömegspektrometriás eredmények DT-40 vad típusú és Xpa- genotípusú sejteken. Az 5hmC és C arány látható kontroll és 5-aza-2'-deoxicitidin hatására.

Szeretnénk elvégezni még tömegspektrometriai méréseket más sejtvonalakon is pl. kezeletlen és kezelt HepG2 sejteken és HapMap limfocitákon is. Le, T. és munkatársai (2011) kifejlesztettek egy új, nagyon érzékeny, gyors, robusztus és pontos tömegspektrometriai módszert, mellyel egyszerre számszerűsíthető az 5mC- és az 5hmC-szint a DNS-ben. Ez az LC-ESI-MS/MS-MRM (*liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry with multiple reaction monitoring*). Néhány mintát elküldtünk a Zymo Research-nek az USA-ba, ők ezzel a módszerrel detektálják az 5mC-t és 5hmC-t a genomban. Az eredményekre még várunk.

Összességében elmondható, hogy váratlan megfigyelésünk volt az, hogy az 5-aza-2'-deoxicitidines kezelés hatására a genomiális 5hmC-szint megnőtt. Azt már korábbi kutatások bebizonyították sejtvonalakon, hogy az 5mC-szint lecsökken a DNMT gátlásával. A TET-enzimek „egyszerű” oxidáló szerepét a jelen kísérletek esetében azért nem feltételezhetjük, mert kevesebb 5mC esetén kevesebb 5hmC keletkezne, azonban jelen esetben nem ez valósul meg. Így a tapasztalt jelenségre valamilyen más magyarázatot kell találnunk, ami a **13. ábrán** jól látható. A metilálatlan DNS-szálak metilálását a DNMT 3A és 3B metiltranszferáz enzimek végzik. Azt tudjuk, hogy a DNS-replikáció szemi-konzervatív. Emiatt akár metilált, akár metilálatlan az eredeti szál, az újonnan keletkező kétszálú DNS metilálatlan vagy hemimetilált lesz: a templát szála az eredeti állapotban marad, az új szála pedig metilálatlan lesz. Azért választottuk a 48 órás kezelést, mert ez idő alatt több sejtosztódás is lezajlik, így egyre több hemimetilált szál keletkezik. A DNMT1 enzim feladata a metiláltsági szint

fenntartása, ezért a hemimetilált szálakhoz köt, és metilálttá teszi azokat. Így lehetséges az, hogy a genomi imprinting segítségével továbbadódhat az epigenetikai információ anyasejtről utódsejtre. Mivel az 5-aza-2'-deoxicitidin (citidin analóg metiltranszferáz-inhibitor) képes beépülni a DNS-be a sejtosztódás során, és gátolja a DNMT-ket, így nem tud újra metilálódni a DNS a DNMT1 segítségével. Így felborul az epigenetikai mintázat. Elképzelésünk szerint a TET enzim nagyobb affinitással kötődik a hemimetilált szálakhoz, mint a mindkét szálon metiláltakhoz, ellenkező esetben elméletileg minden metilált citozinból hidroximetilált lenne. Az is lehetséges, hogy alapállapotban a DNMT1 kiszorítja a TET enzimeket, azaz a DNMT1 már azelőtt átmásolja a metilációs mintázatot a komplementer szálra, mielőtt a metilált citozinokat a TET tovább tudná oxidálni 5hmC-ná. Kezelés hatására viszont megszűnik a „kompetíció”, és a TET be tud kötni a metilcitozinokhoz. Fontos azonban megjegyezni, hogy a tömegspektrometriás mérésekből látszik, hogy az 5mC-szint csökkenése nagyobb mértékű, mint az 5hmC-szint növekedése, tehát nem lesz minden 5mC-ből 5hmC. Valószínűleg nem olyan stabilak a hmC-ok, ezért a TET enzimek segítségével továbbalakulhatnak az aktív demetilációs útvonalon szintén instabil formil- vagy carboxilcitozinná, és végül akár citozinná. Az 5hmC-szint növekedését még nem tudjuk pontosan megmagyarázni, de a jövőben kísérleteket tervezünk ennek az érdekes epigenetikai módosításnak a feltérképezésére és a pontos mechanizmus megismerésére.



13. ábra: Összegzés: elképzelésünk az 5-aza-2'-deoxicitidin szabályozási mechanizmusáról.

Továbbá érdekes lenne megvizsgálni a TET- vagy DNMT-enzimek kiütése vagy csendesítése során tapasztalható változásokat. Nemcsak genomi, de lokális szinten is érdekes lenne további kísérleteket végezni a hidroximetilációval kapcsolatban. Fontos lenne CpG-szigeteket közelebbről megvizsgálni, továbbá olyan géneket vizsgálni, amelyek promóterében magas 5hmC-szintet feltételezünk. Kíváncsiak vagyunk még az 5hmC exoni és introni elhelyezkedésére is.

Szerzői hozzájárulás

1. Én végeztem a sejtek tenyésztését, kezelését és a DNS izolálását.
2. Én végeztem az immunofluoreszcenciás vizsgálatokat.
3. Én végeztem az áramlási citometriás méréseket, ahol kiderült, hogy kezelés hatására csökkent az 5mC-szint, míg nőtt az 5hmC-szint.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni témavezetőmnek, dr. Arányi Tamásnak (MTA TTK Enzimológiai Intézet) a dolgozatom megírásában nyújtott segítségét és tanácsait. Továbbá köszönöm dr. Szabó Pálnak (MTA TTK Kémiai Kutatóközpont) a tömegspektrometriás méréseket, dr. Caroline Bacquet-nak (MTA TTK Enzimológiai Intézet) a sejtenyésztéshez és az immunofluoreszcenciához, dr. Szűts Dávidnak (MTA TTK Enzimológiai Intézet) a DNS izolálásához, Kiss Juditnak (MTA TTK Enzimológiai Intézet) pedig az áramlási citometriához szükséges ismeretek átadását.

Engedélyek a Bevezetőben felhasznált ábrákhoz

OXFORD UNIVERSITY PRESS LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Oct 22, 2012

This is a License Agreement between Borbala Veto ("You") and Oxford University Press ("Oxford University Press") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Oxford University Press, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

License Number	3012400797109
License date	Oct 19, 2012
Licensed content publisher	Oxford University Press
Licensed content publication	Nucleic Acids Research
Licensed content title	Sensitive enzymatic quantification of 5-hydroxymethylcytosine in genomic DNA:
Licensed content author	Aleksandra Swagierczak, Sebastian Bultmann, Christine S. Schmidt, Fabio Spada, Heinrich Leonhardt
Licensed content date	10/01/2010
Type of Use	Thesis/Dissertation

NATURE PUBLISHING GROUP LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Oct 22, 2012

This is a License Agreement between Borbala Veto ("You") and Nature Publishing Group ("Nature Publishing Group") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Nature Publishing Group, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

License Number	3012400596353
License date	Oct 19, 2012
Licensed content publisher	Nature Publishing Group
Licensed content publication	EMBO reports
Licensed content title	DNA methylation: TET proteins[mdash]guardians of CpG islands?
Licensed content author	Kristine Williams , Jesper Christensen and Kristian Helin
Licensed content date	Jan 1, 2012
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Requestor type	academic/educational
Format	print and electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables /illustrations	1
High-res required	no
Figures	Figure 1/B
Author of this NPG article	no

Irodalomjegyzék

Auclair, G. és Weber, M. Mechanisms of DNA methylation and demethylation in mammals. *Biochimie* **94**, 2202-2211 (2012).

Baba, TW. Cell lines derived from avian lymphomas exhibit two distinct phenotypes. *Virology* **144**, 139-151 (1985).

Bestor, TH. The DNA methyltransferases of mammals. *Human Molecular Genetics* **9**, 2395-2402 (2000).

Boyes, J. és Bird, A. Repression of genes by DNA methylation depends on CpG density and promoter strength: evidence for involvement of a methyl-CpG binding protein. *The EMBO Journal* **11**, 327-332 (1992).

Delhommeau, F. és mtsai. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *The New England Journal of Medicine* **360**, 2289-2301 (2009).

Ficz, G. és mtsai. Dynamic regulation of 5-hydroxymethylcytosine in mouse ES cells and during differentiation. *Nature* **473**, 398-402 (2011).

Figuerola, ME. és mtsai. Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell* **18**, 553-567 (2010).

Globisch, D. és mtsai. Tissue distribution of 5-hydroxymethylcytosine and search for active demethylation intermediates. *PLoS ONE* **5** e15367 (2010).

Glover, AB. és Leyland-Jones, B. Biochemistry of azacytidine: a review. *Cancer Treatment Reports* **71**, 959-964 (1987).

Hashimoto, H. és mtsai. Excision of 5-hydroxymethyluracil and 5-carboxylcytosine by the thymine DNA glycosylase domain: its structural basis and implications for active DNA demethylation. *Nucleic Acids Research* 1-13 (2012).

Ito, S. és mtsai. Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylmethylcytosine and 5-carboxymethylcytosine. *Science* **333**, 1300-1303 (2011).

Jones, PA. és Takai, D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science* **293**, 1068–1070 (2001).

Kuendgen, A. és mtsai. Current status of epigenetic treatment in myelodysplastic syndromes. *Annals of Hematology* **87**, 601–611 (2008).

Laird, PW. és Jaenisch, R. The role of DNA methylation in cancer genetic and epigenetics. *Annual Review of Genetics* **30**, 441-464 (1996).

Le, T. és mtsai. A sensitive mass-spectrometry method for simultaneous quantification of DNA methylation and hydroxymethylation levels in biological samples. *Analytical Biochemistry* **412**, 203-309 (2011).

Münzel, M. és mtsai. 5-hydroxymethylcytosine, the sixth base of the genome. *Angewandte Chemie International Edition* **50**, 6460-6468 (2011).

Pastor, W.A. és mtsai. Genome-wide mapping of 5-hydroxymethylcytosine in embryonic stem cells. *Nature* **473**, 394-397 (2011).

Rao, P.M. és mtsai. Studies on hypomethylation of liver DNA during early stages of chemical carcinogenesis in rat liver. *Carcinogenesis* **10**, 933-937 (1989).

Szwagierczak, A. és mtsai. Sensitive enzymatic quantification of 5-hydroxymethylcytosine in genomic DNA. *Nucleic Acids Research* **38** e181 (2010).

Szűts, D. és mtsai. REV1 restrains DNA polymerase ζ to ensure frame fidelity during translesion synthesis of UV photoproducts in vivo. *Nucleic Acids Research* **36**, 6767-6780 (2008).

Tahiliani, M. és mtsai. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner. TET1 *Science* **324**, 930-935 (2009).

Williams, K. és mtsai. TET1 and hydroxymethylcytosine in transcription and DNA methylation fidelity. *Nature* **473**, 343-348 (2011).

Williams, K. és mtsai. DNA methylation: TET proteins – guardians of CpG islands? *EMBO Reports* **13**, 28-35 (2012).

Wu, H. és mtsai. Dual functions of Tet1 in transcriptional regulation in mouse embryonic stem cells. *Nature* **473**, 389-394 (2011).

Xu, Y. és mtsai. Genome-wide regulation of 5hmC, 5mC, and gene expression by Tet1 hydroxylase in mouse embryonic stem cells. *Molecular Cell* **42**, 452-464 (2011).

Yamagata, Y. és mtsai. Rapid turnover of DNA methylation in human cells. *Epigenetics* **7:2**, 141-145 (2012).

Yu, M. és mtsai. Base-resolution analysis of 5-hydroxymethylcytosine in the mammalian genome. *Cell* **149**, 1-13 (2012)