

DNS REPARÁCIÓ VIZSGÁLATOK EMLŐSSEJT TENYÉSZETEKEN ÉS ALZHEIMER-KÓROS BETEGEK LIMFOCITÁIN

Mórocz Mónika

Ph.D. értekezés

Témavezető: **Dr. Raskó István**

Az értekezés a Szegedi Tudományegyetem **Molekuláris és sejtbiológia Ph.D.
programjának** keretében készült, a MTA Szegedi Biológiai Központ Genetikai
Intézetének Humán Molekuláris Genetikai csoportjában

2003

Szeged

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton hálásan köszönöm az eddigi munkámhoz és a dolgozat megírásához nyújtott segítséget:

szüleimnek, akik tanítottak és minden tanulmányi és szakmai döntésemben támogattak, gimnáziumi osztályfőnökömnek s egyben biológia tanárnőmnek **Dütsch Zsoltnénak**, aki erre a pályára irányított,

Dr. Cserpán Imrének, aki az egyetemi évek alatt témavezetőm volt és akitől a molekuláris biológia alapjait elsajátítottam és akihez azóta is minden problémával bátran fordulhatok,

Dr. Raskó Istvánnak, munkacsoportunk és intézetünk vezetőjének, aki ehhez a munkához a szellemi irányítást és az anyagi támogatást nyújtotta, valamint kutatói pályafutásomat lehetővé tette, amikor csoportjába fogadott egy majdnem pályamódosító kitérő után,

Prof. C. Stephen Downes-nak, hogy a University of Ulster, School of Medical Sciences, Cancer and Aging munkacsoportjában dolgozhattam az Észak Írország-i Coleraine-ban, volt és jelenlegi kollégáimnak **Csiszár Ágnesnek**, **Dr. Bachrati Csanádnak**, **Dr. Kalmár Tibornak**, **Czibula Ágnesnek**, **Sinkó Ildikónak**, **Szabó Erikának**, **Tömöry Gyöngyvérnek**, **Csányi Bernadettnek**, **Tóth Editnek**, **Dr. Kálmán Jánosnak**, **Juhász Annának**, **Dr. Jayne Devlin-nek**, **Dr. Angela P. McGlynn-nek**, **Dr. Gillian R. Wasson-nak** a számos szakmai és egyéb segítséget valamint a jó munkahelyi légkört,

Lehőcz Istvánné és Radóné Dudás Mária asszisztenseknek áldozatos és precíz munkáját, férjemnek, **Ungi Sándornak**, kisfiamnak, **Kristófnak** és **férjem családjának**, hogy a munkámmal járó nehézségeket, a külföldi távolléteket elviselték és minden nehéz helyzetben mellettem álltak és támogattak.

1.TARTALOMJEGYZÉK

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	2
1. TARTALOMJEGYZÉK	3
2. A RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	5
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	5
3.1. Előszó.....	6
3.2. Az UV fény által indukált DNS károsodások.....	6
3.2.1. Az UV által indukált DNS károsodások képződésének mechanizmusa.....	8
3.2.2. Az UV fény és a DNS kölcsönhatása.....	8
3.2.3. A ciklobután pirimidin dimer.....	9
3.2.4. A 6-4 fototermék.....	10
3.2.5. Ritkábban előforduló UV fototermékek.....	10
3.3. Az UV fény által okozott károsodások javításának mechanizmusa.....	11
3.3.1. A fotoreaktiváció.....	11
3.3.2. Nukleotid Excíziós Reparációs rendszer (NER).....	12
3.3.2.1. Az emberi nukleotid excíziós reparációs rendszer működése.....	13
3.3.2.2. A NER heterogenitása.....	16
3.3.2.2.1. A DNS reparáció heterogenitása a genom különböző szakaszain.....	16
3.3.2.2.2. A NER heterogenitása a gének ill. specifikus szekvenciák szintjén.....	17
3.3.2.2.3. A NER szubsztrát-specifikus heterogenitása.....	17
3.4. A NER mutációi következtében kialakuló emberi betegségek.....	18
3.4.1. A Xeroderma Pigmentosum.....	18
3.4.2. A Cockayne-szindróma (CS).....	20
3.4.3. A Trichothiodisztrófia (TTD).....	21
3.4.4. A NER-hez kapcsolódó betegségek és a TFIIH.....	22
3.5. A DNS károsodások szerepe a tumorigenezisben.....	23
3.5.1. A p53 szerepe a DNS reparációban.....	23
3.6. A fototermékek analizésére használatos DNS reparáció vizsgálati módszerek.....	26
3.6.1. DNS száltöréseken alapuló módszerek.....	26
3.6.2. Tömespektrometriás módszerek.....	26
3.6.3. Reparációs DNS szintézis vizsgálat (Unscheduled DNA synthesis assay(UDS)).....	27
3.6.4. Immunoassay (IA).....	27
3.6.5. Gazdasejt Reaktivációs módszer (Host cell reactivation assay, HCR).....	27
3.6.6. DNS szintézis gátláson alapuló PCR módszere.....	23
3.7. Oxidatív DNS károsodások.....	28
3.8. A Bázis Excíziós Reparációs Rendszer (BER).....	30
3.9. Az oxidatív stressz és szerepe az emberi betegségekben.....	33
3.10. Az Alzheimer-kór.....	33
4. CÉLKITŰZÉSEK.....	37
5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	38
5.1. Az UV fény által okozott DNS károsodások vizsgálata.....	38
5.1.1. Enzimek és oldatok.....	38
5.1.2. Sejtvonalak.....	38
5.1.3. A sejtek UV kezelése.....	39
5.1.4. Genomiális DNS izolálás.....	39
5.1.5. Kvantitatív PCR módszer.....	40
5.1.5.1. Az amplifikált szekvencia és a primerek.....	40
5.1.5.2. A kvantitatív PCR reakció körülményei.....	41

5.1.5.3. A PCR termékek kvantitatív analízise.....	41
5.1.5.4. UV túlélési teszt.....	41
5.1.5.5. DNS szintézis gátlás.....	41
5.1.5.6. In vitro kromatin modifikáció nátrium-butiráttal.....	42
5.1.5.7. A teljes genom UV reparációs aktivitásának mérése hidroxipatit kromatográfiával.....	42
5.2. Az oxidatív DNS károsodások vizsgálata.....	42
5.2.1. Anyagok és oldatok.....	43
5.2.2. A vizsgált személyek.....	43
5.2.3. A vérminták és a limfociták kezelése	43
5.2.4. A Comet assay	44
5.2.4.1. A sejtek beágyazása és lízise.....	47
5.2.4.2. Enzimes kezelések	48
5.2.4.3. Elektroforézis.....	48
5.2.4.4. Mikroszkópos analízis.....	48
5.2.4.5. Statisztikai analízis.....	48
6. EREDMÉNYEK.....	50
6.1. AZ UV FOTOTERMÉKEK SZEKVENCIASPECIFIKUS REPARÁCIÓJÁNAK VIZSGÁLATA A HETEROKROMATIKUS RÉGIÓBAN KVANTITATÍV PCR-REL.....	50
6.1.1. A kvantitatív PCR célszekvenciájának kiválasztása és jellemzése.....	50
6.1.2. A chAB4 alapú PCR reakció, mint kvantitatív DNS reparáció vizsgálati módszer.....	52
6.1.2.1. A módszer in vitro UV érzékenységeinek tesztelése.....	52
6.1.2.2. A kvantitatív PCR in vivo UV érzékenységeinek vizsgálata.....	54
6.1.3. A QPCR alkalmazása emberi és humán/rágcsáló hibrid sejtvonalak reparáció ... kinetikájának vizsgálatára.....	58
6.1.4. A Na-butirát kezeléssel kiváltott kromatin dekonzenzáció hatása a HeLa sejtek reparációjára.....	65
6.2. AZ OXIDATÍV DNS KÁROSODÁSOK MENNYISÉGÉNEK ÉS REPARÁCIÓJÁNAK VIZSGÁLATA ALZHEIMER-KÓROS BETEGEK LIMFOCITÁIBAN.....	68
7. AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA	73
7.1 Az UV által indukált fototermékek reparációjának vizsgálata a heterokromatikus régióban humán sejtvonalakban.....	73
7.2. Az oxidatív DNS károsodások és reparációjuk vizsgálata Alzheimer kóros limfocitákban.....	79
8. ÖSSZEFOGLALÁS.....	84
9. AZ PHD ÉRTEKEZÉS ÖSSZEFOGLALÓJA.....	86
10. SUMMARY OF THESIS (Angol nyelvű összefoglaló).....	92
11. IRODALOMJEGYZÉK	98
12. KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE.....	108

2. A RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

A β ₄₂	Amyloid- β ₄₂ -peptid
AD	Alzheimer's disease/dementia (Alzheimer-kór)
AP endonukleáz	Apurin/apirimidin endonukleáz
APE1	Apurin/apirimidin endonukleáz1
AraC	Citozin- β -D arabinofuranozid
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated protein
ATR	Ataxia Telangiectasia Related protein
BER	Bázis Excíziós Reparációs rendszer
CS	Cockayne syndrome
CPD	Ciklobután pirimidin dimer
DDB	Damaged DNA binding-károsodott DNS-t kötő fehérje
EndoIII	Endonukleáz III
ERCC1	Excision repair cross complementing1 protein
Fapy-Ade	4,6-diamino-5-formamidopirimidin
Fapy-Gua	2,6-diamino-4-hidroxy-5-formamidopirimidin
FEN1	Flap-endonuclease1
Fpg	Formamido-pirimidin-DNS-glikoziláz
HPLC	Nagynyomású folyadék kromatográfia
Hprt	Human phosphoribosyl transferase
HR23B	Humán Rad23 homológ fehérje
Hu	Hidroxiurea
H ₂ O ₂	Hidrogén-peroxid
NER	Nukleotid Excíziós Reparációs rendszer
8OHdG, 8oxo-dG	8-hidroxi-2'-deoxiguanin (8-oxoguanin)
8OHdA, 8-oxo-dA	8-hidroxi-dezoxiadenin
SEM	Standard error of mean (az átlagok standard hibája)
RPA	Replication protein A
PARP	poly-ADP-ribose polymerase
PBS	Phosphate-buffered saline
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PNK	polinukleotid-kináz
Pol β	DNS polimeráz β
QPCR	quantitative polimerase chain reaction (kvantitatív PCR)
RFC	Replication factor C
TFIIH	Transzkripció faktor II H
TTDA	Trichothiodystrophy A protein
UDS	Unscheduled DNA synthesis assay (Reparációval kapcsolt DNS szintézis vizsgálat)
XRCC1	X-ray cross complementing1
XPA-G	Xeroderma pigmentosum A-G (7 komplementációs csoport)
XPV	Xeroderma pigmentosum Variant

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. Előszó

Minden élő szervezet genomja állandó fizikai és kémiai behatásoknak van kitéve, melyek egy része a sejten belülről, más része a környezetből érkezik. A DNS molekula kémiailag nem inert, hanem környezetével állandóan kölcsönhatásban áll és más molekulákkal reakcióba lép, kémiai módosulásai azonban a genetikai információ elvesztését, megváltozását eredményezhetik. Ez az organizmus szempontjából kétféle következménnyel jár: egyrészt a kialakuló mutációk a metabolikus folyamatok megváltozását, a sejt pusztulását, felgyorsult öregedést vagy rákot okozhatnak, másrészt hosszútávon, generációkon keresztül az ilyen változások résztvesznek az evolúcióban. A legegyszerűbb egysejtűektől a magasabbrendű fajokig az élő szervezetek mindegyike kifejlesztett olyan mechanizmusokat, melyekkel a DNS hibáit kijavíthatja. A primitív egysejtűekben is létezik néhány olyan fehérje, amely a DNS károsodások javítását végzi és ezek az egyszerű reparációs mechanizmusok az evolúció során nagyfokú konzervatívizmust mutatnak (Friedberg 1995). Magasabbrendűekben ezek a fehérjék bonyolult működési rendszert alkotnak, melyet DNS reparációs rendszernek nevezünk. Ez a rendszer igen heterogén, több alrendszerből állva nagyon kifinomult és bonyolult hálózatot képezve illeszkedik a sejt működési folyamataiba és összehangoltan működik olyan sejtfunkciókkal, mint a sejtciklus ellenőrzés, transzkripció szabályozás, kromatinszerveződés vagy programozott sejthalál.

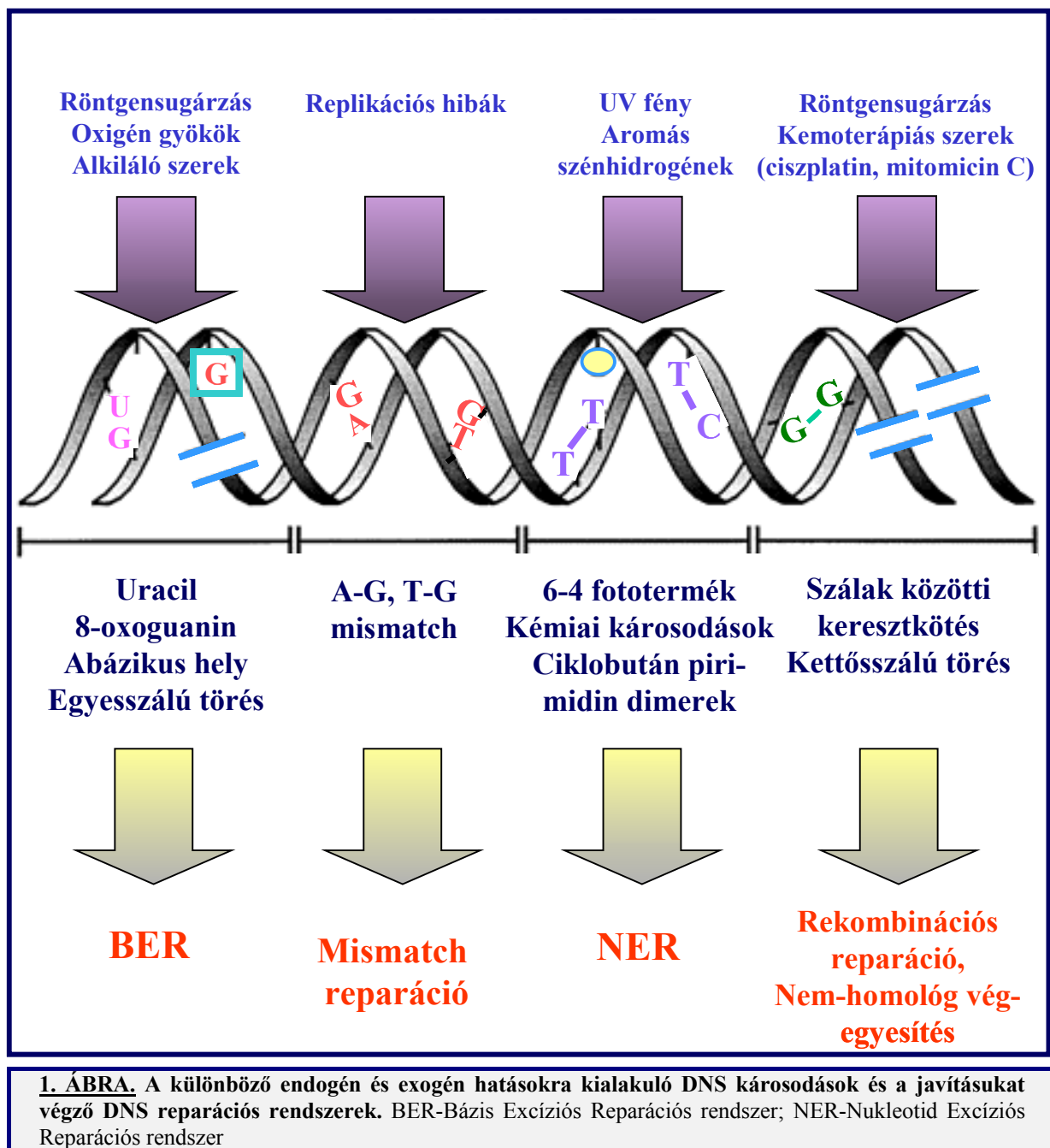
A DNS reparációs rendszer több, a károsodások különböző típusaira specializálódott alrendszere közös funkciókat és ebből következően közös fehérje faktorokat is tartalmaz (1. ÁBRA).

Disszertációm témája a DNS reparáció két rendszerét érinti:

1. a nukleotid excíziós rendszert, mely többek között az UV fény hatására képződő fototermékek reparációját végzi és a
2. a bázis excíziós rendszert, amely az oxidatív károsodások és egyes szálú törések eltávolításában vesz részt.

Munkánk során emberi sejtenyészeteken az UV sugárzás hatására kialakuló DNS károsodások eltávolításának nyomonkövetésére kifejlesztettünk egy kvantitatív polimeráz láncreakción alapuló vizsgálati módszert. A módszer segítségével tanulmányoztuk különböző emberi sejtvonalak reparációs kinetikáját. Ezen munka ismertetése képezi dolgozatom egyik részét.

Dolgozatom másik része egy újszerű mikroelektroforézis technika alkalmazásáról számol be, melynek segítségével a sejtekben keletkező oxidatív DNS károsodások mértéke és reparációja nyomonkövethető. A DNS oxidatív károsodásai következtében kialakuló kóros folyamatok számos emberi betegség kialakulásában és súlyosbodásában játszanak szerepet. Ezek közé tartozik az Alzheimer-kór is. Alzheimer-kóros betegek és életkorban illesztett egészséges kortársaik limfocitáiban vizsgáltuk a DNS oxidáció mértékét és az oxidált bázisok reparációját.



3.2. Az UV fény által indukált DNS károsodások

3.2.1. Az UV által indukált DNS károsodások képződésének mechanizmusa

A napsugárzás számos kedvező és káros hatással van az emberi szervezetre, és az ezek közötti jótékony egyensúly fenntartása fontos hatással van az egészségre. A napsugárzás ultraibolya fény tartománya azon előnyös hatásán túl, hogy hozzájárul a D-vitamin képződéshez gyorsítja a bőr öregedését, helyi és szisztémás immunszuppressziót okoz és extrém esetben tumorképződést indukálhat (Studzinski 1995).

A statisztikusan kimutatható ózonréteg csökkenés (Jankowski 1997) következtében növekszik a föld felszínét érő ultraibolya sugárzás, ami egyik magyarázata lehet a bőrrák világszerte növekvő előfordulásának. Közel 1 millió új bőrrákos esetet regisztrálnak évente csak az Egyesült Államokban (Pfeifer 1997a), ami kiemeli az UV károsodások vizsgálatának jelentőségét.

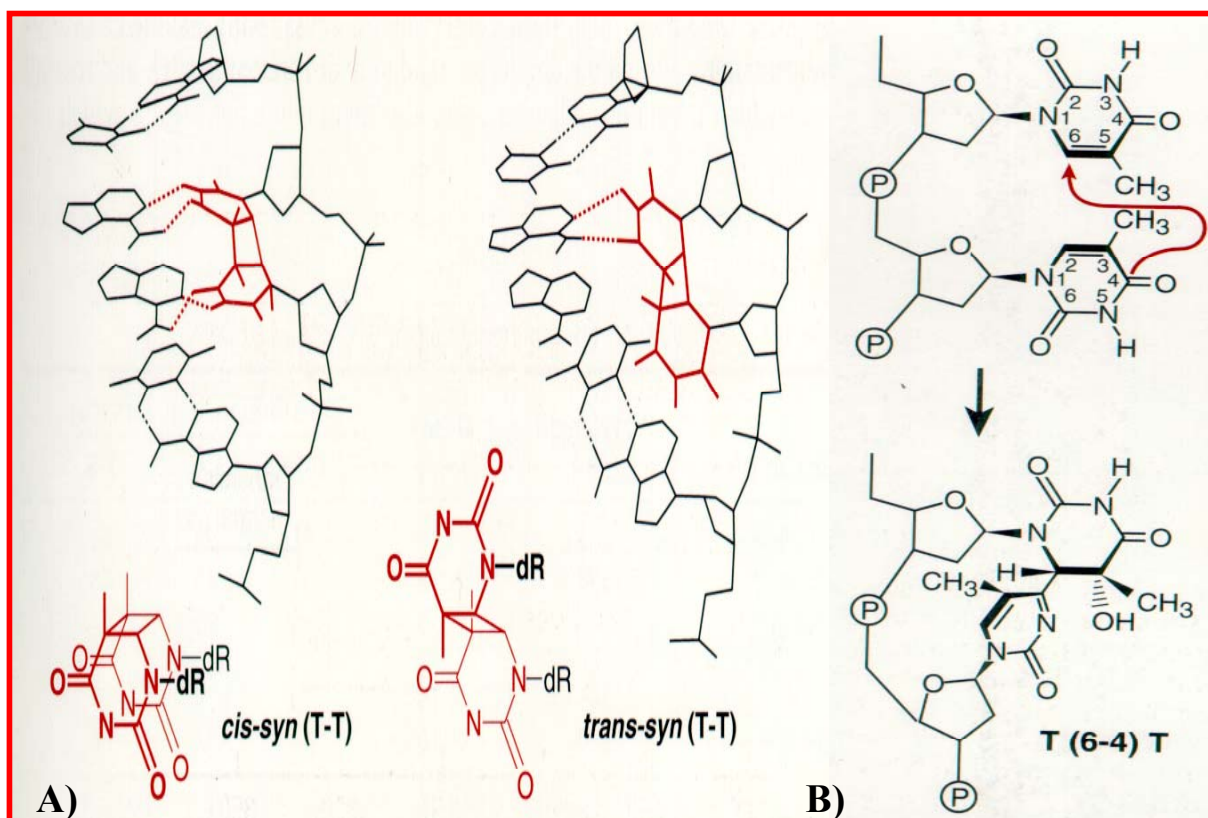
Az UV károsodások reparációs folyamatai más ágensek által kiváltott olyan DNS károsodások javítását is végzik, melyek különféle tumoros elváltozások forrásai. Az UV fény hatására a DNS szálon képződő fototermékek ezért egyfajta, könnyen kiváltható modell károsodások a nukleotid excíziós reparációs rendszer (NER) indukciójának és működésének tanulmányozására.

3.2.2. Az UV fény és a DNS kölcsönhatása

Az ultraibolya sugárzás spektrumát három részre szokták felosztani: UVC (100-280 nm) UVB (280-315 nm) és UVA (315-400 nm) (IARC 1992). A DNS molekula fő elnyelési hullámhossza 265 nm, a 320 nm-nél hosszabb hullámhosszú fényt nem képes elnyelni. Azonban a hosszabb hullámhosszú UV fény is képes DNS károsodásokat kiváltani azáltal, hogy különböző kromofór molekulák a sejtben abszorbeálják ezt a fény típust, majd az energiájukat triplet-triplet energia átadással átadják a DNS-nek. Ez a folyamat a fotoszenzitizáció. Ezzel a mechanizmussal acetone, acetophenone és néhány psoralen közvetítésével sikerült ciklobután pirimidin dimerek képződését kiváltani *in vitro* (Guillo 1995, Lamola 1970). Habár nincs direkt bizonyíték arra, hogy biológiai kromofórok közvetítenék ezt a folyamatot a DNS felé, a fotoszenzitizáció létezését *in vivo* nem lehet kizárni.

3.2.3. Ciklobután pirimidin dimerek (CPD-k)

A két szomszédos timin bázis között ciklobután gyűrűvel összekapcsolt dimereket 1960-as években fedezték fel a DNS molekulán UVC sugárzás hatására és pirimidin dimereknek vagy két timin között timidin dimereknek nevezték el (**2A. ÁBRA**) (Beukers 1960).



2. ÁBRA. A fototermékek képződése és torziós hatása a DNS kettős hélixre. A) A ciklobután pirimidin dimer sztereoizomerek. A *cis-syn* CPD a leggyakoribb forma. B) (6-4) pirimidin-pirimidon fototermék kialakulása. Mindkét termék blokkolja a DNS polimerázok működését. (Friedberg, 1995.)

A ciklobután pirimidin dimerek a leggyakoribb UVC és UVB sugárzás által kiváltott DNS károsodások, melyek elvileg bármely két szomszédos pirimidin között kialakulhatnak (Cadet 1983; IARC 1992). Nem szomszédos pirimidinek dimerizációja nagyon ritkán, de előfordul (Kim 1995a; Love 1992). Emberi DNS-ben a timidin dimerek (TT) előfordulása a leggyakoribb; az összes dimer 68%-át képviselik, míg a TC dimerek átlagosan 16%-ban, a CT dimerek 13%-ban, CC dimerek 3%-ban fordulnak elő a humán genomban (Mitchell 1992).

A két szomszédos pirimidin bázis 5. és 6. szénatomja között kialakuló kovalens kötés jelentős száltorzulást okoz a B-DNS konformációban. A dimerek környezetében a DNS kb.

15%-al fellazul és meghajlik: a cisz-szin ciklobután dimereknél $\sim 7^\circ$ -os szögben, a transz-szin dimereknél 22° -os szögben (Kim 1995b; Pfeifer 1997b; Wang 1993).

A dimerképződés létrejöttéhez a pirimidinek jelentős térbeli kitekeredése szükséges, ami a cukor-foszfát gerinc merevségétől is függ, ezért a DNS hajlíthatósága egy adott szekvencián meghatározza a dimerek kialakulásának esélyét. A letekeredett állapotú és hajlékony (nagy A+T) tartalmú szekvenciákon nagyobb a pirimidin dimerek képződési esélye (Pfeifer 1997b). Ezzel szemben a merev DNS szakaszokon gátolt a fotodimerizáció, mert a két kovalens kötés kialakításához szükséges optimális térbeli elrendeződés nem tud kialakulni (Becker 1989). A három szálú DNS valószínűleg ezért kevésbé érzékeny a fotodimerizációra (Lyamichev 1990; Malkov 1992; Tang 1991).

3.2.4. A 6-4 fototermék

Az 1960-as évek végén leírtak egy másik, az UV fény által kiváltott DNS károsodást is, amely kémiai tulajdonságaiban eltér a pirimidin dimerektől (Johns 1964). A későbbiekben a 6-4 pirimidin-pirimidonnak, vagy rövidebben 6-4 fototerméknek elnevezett károsodásokat eltérő fotokémiai tulajdonságaik miatt a fototermékek új osztályaként sorolták be. A 6-4 fototermékek egy négytagú átmeneti molekulán keresztül képződnek az 5' pirimidin 5. és 6. szénatomja között, valamint a 3' pirimidin 4. szénatomja és az oxigén atom között (Mitchell 1989). Modell kísérletek alapján a 6-4 fototermék kialakulásához szintén szükséges a DNS letekeredése és a bázisok elfordulása (Pfeifer 1997b). A 6-4 fototermék még nagyobb torzulásokat okoz a kettős szálban, mint a timidin dimer, mivel az összekapcsolódó pirimidinek síkja majdnem derékszöget zár be egymással és 44° -os meghajlást eredményez a DNS gerincében (Kim 1995a) **(2B. ÁBRA)**.

A 6-4 fototermékek az összes UV károsodás 10-20%-át teszik ki. Képződésük gyakorisága azonban nagymértékben függ az adott DNS szakasz (A+T)/(G+C) arányától, kromatin struktúrájától (Mitchell 1989), valamint az UV fény hullámhosszától (Yamada 1992).

3.2.5. Ritkábban előforduló UV fototermékek

A **Dewar izomer** a 6-4 fototermék izomerizációjával keletkezik egy újabb foton befogásával az UVB sugárzás során (Taylor 1988).

A **citozin-hidrát** képződését oligonukleotidok UV besugárzásakor észlelték. Ezek a károsodások azonban instabilak, féléletidejük 37°C-on 25 óra. Bomlásuk után eredeti komponenseiké alakulnak vissza, ami megkérdőjelezheti biológiai fontosságukat. Bórrákos sejtekben azonban gyakran mutathatók ki mutációk egyedülálló citozinon, vagy CC tartalmú szekvenciákon, ami felveti esetleges szerepüket a mutációk kialakulásában (Boorstein 1990).

A purinok a pirimidinekhez képest sokkal stabilabbak UV behatással szemben. UVC hatására szomszédos adeninek (Gasparro 1986), timinek és adeninek között kialakulhatnak dimerek (Bose 1983), keletkezésük gyakorisága azonban mintegy két nagyságrenddel alacsonyabb a ciklobután dimerekénél és biológiai szerepük mindeddig nem ismert.

Nukleinsavak és fehérjék közötti fotokémiai reakciókat is leírtak (Alexander 1962), valamint megfigyelték timin és egyes aminosavak (cisztein, lizin és arginin) közötti keresztkötések kialakulását is (Kornhauser 1976). Bizonyítékok vannak a DNS-fehérje keresztkötések kialakulására UVB és UVC fény hatására (Peak 1985), de mindeddig nem bizonyított ezeknek a termékeknek bármiféle szerepe a mutagenézisben.

3.3. Az UV fény által okozott károsodások javításának mechanizmusa

3.3.1. A fotoreaktiváció

A ciklobután pirimidin dimerek (Hearst 1995) és valószínűleg a 6-4 fototermékek (Kim 1994) javítása legegyszerűbben egy fotoreaktivációnak nevezett speciális mechanizmussal történhet. Ezt a folyamatot eddig baktériumokban írták le. A fotoreaktiváció kulcselemei speciális enzimek, a fotoliázok, melyek képesek megkötni a látható fény kvantumjait és átadni annak energiáját a sérült helynek. A fotoliázok 50-60 kDa-os monomer fehérjék, melyek két kromofórból állnak. A két kromofór együttesen működik és lehet mindkettő flavin, vagy egy flavin és egy folát, illetőleg egy flavin és egy deazaflavin. Működésük során először egy fénytől független folyamatban az enzim specifikusan kötődik a DNS-en lévő ciklobután dimerhez. Az első kromofór szolgál fénygyűjtő antennaként és megköt egy 350-450 nm hullámhosszú fotont, majd az abszorbeált energiát átadja egy FADH^- kofaktornak, amely lead egy elektront a ciklobután dimernek (Kim 1993). Ez a ciklobután dimer kihasításához vezet, amit egy elektron leadás kísér a flavin kofaktor felé és ezáltal helyreáll a normális DNS szekvencia és az enzim natív formája.

Habár a CPD-k fotoreaktivációja szinte minden organizmusban megtalálható, emlősekben a létezése nem kellőképpen igazolt, egerekben a velük szerkezeti hasonlóságot mutató fehérjéknek a cirkadián biológiai ritmus szabályozásában van fontos szerepük (van der Horst 1999). Néhány vizsgálat beszámol emberben is fotoreaktivációs aktivitásról (D'Ambrosio 1981; Ogut 1989; Sutherland 1985), a fehérjét azonban mindeddig nem izolálták.

3.3.2. A Nukleotid Excíziós Reparációs Rendszer (NER)

Az ultraibolya fény által indukált timidin dimereknek a DNS szálból való kivágásáról és az ezt követő reparációs replikációról az első kísérleti eredmények 1964-ből származnak (Shuster 1964). Ezek az eredmények a timidin dimereket tartalmazó DNS szakasz kivágódásáról, újraszintetizálásáról és a szál összeillesztéséről számolnak be.

A nukleotid excíziós folyamatok felfedezése után a tudományos közvélemény még jónéhány évig azon állásponton volt, hogy ez a rendszer csak olyan rendkívüli esetekben segíti egy organizmus túlélését, ha az a napsugárzástól súlyos UV károsodást szenved (Hanawalt 2001). Úgy gondolták, hogy a sötétben tartott sejtekben a NER teljesen lényegtelen, elhanyagolható funkció. Mára már nyilvánvaló, hogy a nukleotid excíziós rendszer a DNS reparáció egyik fő útvonala, mely számos organizmusban jelen van. Érdekes azonban, hogy a növényekben hiányzik, bennük a fotoreaktiváció végzi az UV fototermékek eltávolítását.

A NER sokoldalúságát tükrözi, hogy rengeteg, struktúráisan eltérő károsodás javításában részt vesz. Fő szubsztrátjai a fototermékek, de olyan nagyméretű kémiai ágensek, mint a DNS keresztkötést okozó kemoterápiás szer, mint a ciszplatin, illetve a gomba alkaloid az illudin, vagy a dohányzás során a szervezetbe kerülő policiklusos aromás szénhidrogének által indukált DNS károsodásokat szintén a NER javítja. Bizonyos alkiláló és oxidáló hatású kémiai anyagok által kiváltott bázis károsodások szintén a hatáskörébe tartoznak, bár ezek eltávolítását főként a bázis excíziós reparáció végzi, a nukleotid excíziós rendszer ilyen esetekben mint tartalék védelmi mechanizmus szerepel (Tornaletti 1996, de Laat 1999;).

Annak ellenére, hogy NER-nek az UV károsodások eltávolításában játszott szerepe a legtöbbet tanulmányozott, egyre több vizsgálat erősíti meg, hogy fehérjéi a sejt egyéb életfunkcióiban is szerepet játszanak. Részei egyrészt más reparációs utaknak, illetve a NER szorosan együttműködik a sejtciklus szabályozással, a transzkripcióval, a DNS replikációval

és nélkülözhetetlen a rákos folyamatok megelőzésében (Tornaletti 1994, Berg 2000; Hanawalt 2001).

3.3.2.1. Az emberi nukleotid excíziós reparációs rendszer működése

A NER főbb folyamatai és az adott funkcióknak megfelelő fehérjék az eukariótákban az élesztőtől az emberig nagyfokú homológiát mutatnak. Az emberi NER-ben résztvevő faktorok működése csupasz DNS-en végzett, sejtextraktumokból rekonstruált faktorokkal végzett vizsgálatok nyomán viszonylag jól ismert, és ezek alapján két fő alrendszerből áll. Egyik alrendszere végzi a transzkripcionálisan aktív gének átíródó szálának reparációját, ezt az útvonalat transzkripcióval kapcsolt vagy transzkripcionális reparációnak nevezzük (TCR) (Bohr 1985, 1987, 1988, Mellon 1986, 1987, Tu 1996) A genom nagyobb, transzkripcionálisan inaktív részének reparációját az ún. globál genom reparáció végzi (GGR) (Madhani 1986). A két alrendszer a jelenlegi ismeretek szerint csak az első néhány lépésben, a DNS károsodás felismerésében és azonosításában különbözik (Hanawalt 2002).

A nukleotid excíziós reparációs rendszer mintegy 30 féle fehérjéből áll (Lehmann 1995), melyeket a Xeroderma pigmentosum (XP) nevű, igen ritka autoszómális recesszív öröklődésű betegségben szenvedőkből izolált sejtvonalakból és emlős mutáns sejtekből azonosítottak. A NER kulcsenzimeit a Xeroderma pigmentosum egyes komplementációs csoportjaiban mutáns fehérjéről nevezték el (XPA-XPG, XPV).

Az emlős NER elemeit tisztított fehérjékből álló *in vitro* rendszerben sikerült rekonstruálni (Aboussekhra 1995) és a komponensek részletes biokémiai analízisét is elvégezték (Sancar 1996; de Laat 1999; Wood 1999).

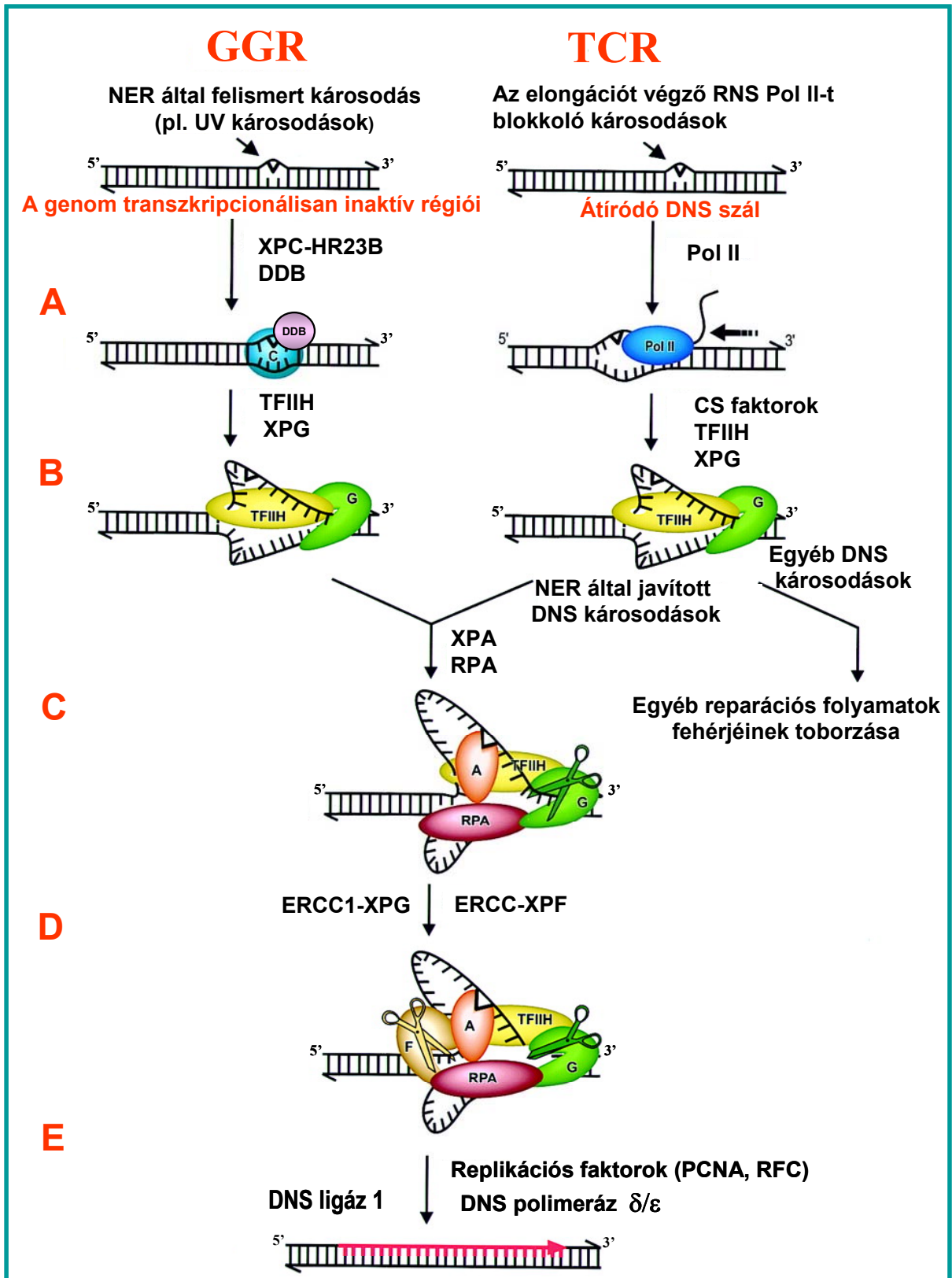
A humán NER működését bemutató modell szerint az első lépés a károsodás felismerése (**3A. ÁBRA**; de Laat 1999 nyomán). Ezután a károsodás meglétét megerősítő enzimek a reparáció helyéhez toborozzák a javításhoz szükséges fehérjéket (**3B. ÁBRA**). Ebben a két lépésben résztvevő enzimek eltérőek a NER két alrendszerében. Mivel a NER számos struktúráisan különböző DNS károsodás eltávolítását végzi, a globál genom reparációban működő, elsőként aktiválódó felismerő enzimek nem a károsodás típusát, hanem annak környezetében a DNS helikális szerkezetének torzulását érzékelik. A hélix torzulásának fontosságát szintetikusán előállított DNS károsodásokkal sejtmentes rendszereken bizonyították (Hess 1998, Buschta-Hedayat 1999; de Laat 1999;). A 6-4 fototermékek és a pirimidin dimerek eltérő száltorziós hatása miatt az XPC-HR23B önmagában valószínűleg

nem képes a CPD-ket felismerni, csak a 6-4 fototermékeket. A CPD-k azonosításához a károsodott DNS-t kötő fehérjére (DDB; damaged DNA binding) is szükség van (Wakasugi 2001).

Transzkripcióval kapcsolt reparációban az elongációt végző RNS Polimeráz II-nek a DNS szálon való megakadása jelenti a károsodás elsődleges érzékelését. A globál genom reparációban a károsodások felismerésében résztvevő enzimek köre még nem teljesen tisztázott. Bizonyosnak látszik, hogy az első felismerési lépést végző XPC-HR23B és a DDB faktor (a GGR-ben szükséges a pirimidin dimerek felismeréséhez, (Tang 2000)) és a TFIIH (transzkripció faktor II H, TCR esetén) enzimkomplexeken kívül egy második lépésben szükség van a károsodás meglétét megerősítő további fehérjékre is (Sugasawa 2001). Ezek az enzimek, az egyszerű buborék struktúrához tévesen is odakötődni képes XPC-HR23B-vel együtt már képesek a károsodás meglétét megerősíteni és odairányítani az excíziót elvégző többi komponenst is. Ebben a feladatban valószínűleg az XPA és RPA (replikációs protein A) fehérjék is résztvesznek, mivel kimutatták, hogy specifikus kötődési affinitásuk van a károsodott DNS szárhoz (Jones 1993, Asahina 1994; He 1995;) **(3C. ÁBRA)**. A károsodás megerősítése pontosabb azonosítást jelent az egyszerű szerkezeti torzió felismerésénél, amiben a TFIIH-nak és az XPG-nek is szerepe van mind a TCR, mind a GGR esetében.

A transzkripciót végző RNS polimeráz II léziót felismerő képességét több reparációs útvonal is kihasználja. A transzkripcióval kapcsolt reparáció során, bázis excíziós reparációval (BER) javítódnak olyan károsodások, mint a 8-oxoguanin és a timin-glikol. A BER-ban szintén résztvesz a TFIIH komplex és az XPG is, amelyek a károsodás pontos azonosítása révén képesek különbséget tenni abban, hogy melyik reparációs rendszer elemeit (NER vagy BER) toborozzák a helyszínre (Sugasawa 2001).

A NER további folyamatában a TFIIH (mely 9 alegységből álló komplex) alkotórészei közül az XPB és XPD, mint ellenkező polaritással rendelkező helikázok, kitekerik a DNS-t a károsodás környezetében. Az így létrejött fellazult DNS struktúra, az ún nyitott komplex hozzáférhetővé válik az ERCC1-XPG és XPF struktúraspecifikus endonukleázok számára **(3D. ÁBRA)**.



3. ÁBRA. A nukleotid excíziós reparációs rendszer (NER) két alrendszerének működése. A globál genom reparáció (GGR) és a transzkripcióval kapcsolt reparáció (TCR) folyamatai kezdeti eltérés után azonos mechanizmussal fejeződnek be. A folyamatba egymás után belépő fehérjékből kialakult enzimmolekulák egy "kivág-újraépít" reakciósorban 24-32 nukleotid újraszintetizálásával javítja ki a hibás DNS szakaszt.

A hibás szakasz kivágása a károsodás pozíciójához képest asszimetrikusan történik, először az XPG a károsodástól 2-8 nukleotidra hasít 3' irányban, majd az ERCC1-XPF 15-24 bázisnyira 5' irányban (Huang 1992; Moggs 1996; Mu 1996, Evans 1997;). A kivágott 24-32 nukleotidot a DNS polimeráz δ/ϵ kapcsolódva a proliferáló-sejt nukleáris antigénnel (PCNA) és a replikációs faktor C-vel (RFC) újra szintetizálja (**3E. ÁBRA**). A szintézis lépése előtt valószínűleg az összes NER fehérje elhagyja a DNS szálát, kivéve az RPA-t, ami a nukleázok ellen védi a DNS-t és segíti a DNS replikációt.

Sokáig vitatott kérdés volt, hogy a NER elemei egymást követően lépnek-e be a reparációs folyamatba, vagy előzetesen ún. reparozómába összekapcsolódva együttesen kerülnek kapcsolatba a DNS károsodással. Volker és mtsai vizsgálatai (Volker 2001) azt igazolják, hogy a fehérjék egyenként kapcsolódnak be a reparációba.

3.3.2.2. A nukleotid excíziós rendszer heterogenitása

3.3.2.2.1. A DNS reparáció heterogenitása a genom különböző szakaszain

A genom különböző szakaszai eltérő kinetikával javítódnak, ami függ az adott régió transzkripcionális aktivitásától és kromatinszerkezetétől. A transzkripcionálisan aktív szakaszok az emberi genomnak kevesebb, mint 5%-át képviselik és ebből csak mintegy 1,5%-ot tesznek ki az exonok (Lander 2001; Venter 2001). A globál genom reparációs alrendszer végzi tehát a genom túlnyomó többségének reparációját. A GGR jóval kevésbé ismert folyamat, mint a transzkripcióval kapcsolt reparáció. Nem tisztázott, hogyan megy végbe *in vivo* a nukleoszómákba szerveződött genom reparációja, hogyan történik a károsodások érzékelése a nukleoszómális szerkezet szét- és összeszerelése közben. Nem ismerjük továbbá, hogy hogyan válik hozzáférhetővé a heterokromatikus szakaszokon a károsodott nukleotid. A reparáció idejére a nukleoszómális struktúrának részben vagy egészben fel kell bomlania ahhoz, hogy a reparációs enzimek hozzáférjenek a károsodásokhoz és a nukleoszómák pozíciója is változik a reparáció során (Smerdon 1991). A folyamatban résztvevő kromatin fehérjék közül még csak néhány ismert (Green 2002).

A genom legszorosabban csomagolt, konstitutív heterokromatikus régióinak reparációjáról található a legkevesebb adat az irodalomban. A centromer, a telomer és a pericentrikus heterokromatin (mely utóbbi átmeneti zónát képez a szorosan csomagolódott centromerikus és a géneket hordozó kromoszóma régiók között), igen fontos struktúrális részét képezi a kromoszómáknak. A bennük lévő repetitív szekvenciák miatt, illetve "gén-

szegény” természetük következtében ezek a szakaszok képviselik a humán genom szekvencia adatbázis fehér foltjait. Az itt található szekvenciák szerepe nem tisztázott, az elmúlt néhány év kutatásai alapján azonban úgy tűnik, hogy a genom integritásának megőrzésében jelentős szerepük van. A pericentrikus heterokromatinban található ismétlődő szekvencia blokkok ugyanis gyakran színhelyei interkromoszómális átrendeződéseknek (Horvath 2001). A pericentrikus repetitív szekvenciák bizonyítottan szerepet játszanak a mikrodeléció vagy mikroduplikációs szindrómáknak nevezett betegségek kialakulásában (Chen 1997; Reiter 1997; Amos-Landgraf 1999; Shaikh 2001). Transzlokációs töréspontok tanulmányozása során azt találták, hogy a tumoros sejtvonalak 60%-ában a pericentrikus és centromerikus régióban történt az átrendeződés (Padilla-Nash 2001). Habár a heterokromatinban történő reparációs folyamatokról igen kevés információnk van, Surrallés és mtsai (1998) vizsgálata is megerősíti, hogy a genomon belüli DNS reparációs és kromatinszerkezeti heterogenitás felelős lehet az egyes kromoszómákra, kromoszómális régiókra (különösen a heterokromatinra) jellemző fokozott fragilitásért.

3.3.2.2.2. A NER heterogenitása a gének és specifikus szekvenciák szintjén

A két NER alrendszer működési specificitásából adódik egy génen belül a két DNS szál reparációjának eltérése. A transzkripcionálisan aktív gének átíró szálát ugyanis a TCR javítja, míg a másik szálát GGR, így az utóbbi reparációja általában lassabb.

Tornaletti vizsgálatai szerint a reparáció eltérő sebességgel megy végbe egy adott gén egyes pozíciói között is. A p53 génben a pirimidin dimerek 70-90%-a reparálódik 24 órán belül. Bizonyos pozíciókban azonban a reparáció késlekedik, vagy hiányzik és ott még 48 óra múlva is kimutathatóak a CPD-k. Ezek a lassan reparálódó nukleotidok bőrrákban azonosított mutációs forrópontoknak feleltethetők meg (Tornaletti 1994).

A génen belüli reparációs heterogenitást igazolja az a közlemény, amelyben Tu (1996) és munkatársai reparáció-gradiens kialakulásáról számolnak be az emberi *Jun* génben. Adataik szerint a gén promótere reparálódott leghalassabban, a leggyorsabban a transzkripció iniciációs hely, valamint a génben 3' irányba mutató lassú, gradiens jellegű reparáció csökkenést detektáltak.

3.3.2.2.3. A NER szubsztrát-specifikus heterogenitása

A 6-4 fototermékek reparációja átlagosan 5-ször gyorsabb, mint a pirimidin dimerek reparációja (Mitchell 1989). Ennek oka az általuk kiváltott nagyfokú hélix torzió, amit a

felismerő enzimek gyorsan azonosítanak. Ez a szubsztrátspecifikus heterogenitás abban nyilvánul meg, hogy a ciklobután pirimidin dimerek viszonylag hatékonyan reparálódnak a transzkripcióval kapcsolt reparációs rendszerben (TCR), viszont a GGR-ben sokkal lassabban és kevésbé hatékonyan (Friedberg 1995; Pfeifer 1997b).

3.4. A NER mutációi következtében kialakuló emberi betegségek

A reparációs rendszerek kiemelkedően fontos szerepe miatt a résztvevő gének bizonyos mutációi az étellel összeegyeztethetetlenek az emberben, ezért fordul elő viszonylag kevés DNS reparációs betegség. A NER gének mutációi három ritka, autoszómális recesszív öröklődésű fényérzékenységi szindróma kialakulásához vezetnek:

1. Xeroderma pigmentosum (XP)
2. Cockayne szindróma (CS)
3. Trichothiodisztrófia (TTD)

Sejtfúziós kísérletekkel 7 komplementációs csoportot azonosítottak az XP esetében (XPA-XPG-t), illetve később egy 8. külön csoportot alkotó XPV-t (Xeroderma pigmentosum variáns). Két komplementációs csoportot találtak a CS esetében (CSA és CSB), valamint egy kombinált XP és CS csoportot. Három komplementációs csoport különíthető el a Trichothiodisztrófiás betegek körében (XPB, XPD és TTDA). Figyelemre érdemes, hogy az XPB, XPD és XPG gének különböző mutációi speciális klinikai megjelenést mutatnak, vagy Xeroderma pigmentosum-os fenotípust vagy kevert XP/CS fenotípust, vagy TTD-t. A Xeroderma pigmentosum-os betegekre fokozott rákhajlam jellemző (ami ezerszerese a normál populációs átlagnak (Kraemer 1997), míg a CS és a TTD esetében fokozott tumorképződési hajlam nem mutatható ki. A klinikai tünetek is nagyon különböznek a három betegségben, ami jelenleg nehezen értelmezhető csupán a NER mutációi következményeként (de Boer 2000). A betegekben legtöbbször pontmutációkat mutattak ki az adott génben.

3.4.1. A Xeroderma Pigmentosum

A XP-os betegekre kitüremkedésekkel teli, durva pergamenszerű bőr (xeroderma) kialakulása, valamint rengeteg szeplő (pigmentosum) megjelenése jellemző a napnak kitett bőrfelületeken (**4. ÁBRA**). Bár születéskor még semmilyen eltérés nem figyelhető meg, féléves kortól a napérzékenység egyre fokozódik és degeneratív elváltozásokhoz vezet főként a bőrön, a szemén és a nyakon (Kraemer 1997).

Xeroderma pigmentosum-os betegekben leggyakrabban kialakuló ráktípusok a bazálsejtes karcinóma, a pikkelysejtes karcinóma és ritkábban a melanóma. Az első tumor megjelenésének ideje átlagosan a 8. életévre tehető, ami 50 évvel korábbi a populációs átlagnál. Várható élettartamuk 30 évvel alacsonyabb az átlagosnál. A belszervi daganatok kialakulása is 10-20-szor gyakoribb 20 éves kor alatt, mint az átlag populációban (Kraemer 1984).



4. ÁBRA. Xeroderma pigmentosum-os beteg

A Xeroderma pigmentosum-os betegek egy részére (kb. 20%) az életkorral folyamatosan súlyosbodó neurológiai elváltozások jellemzőek, melyek oka az idegsejtek degenerálódása és pusztulása (főleg XPA típusú betegekben). A részleges NER defektust mutató betegeknél esetleg csak késői életkorban, vagy egyáltalán nem alakulnak ki neurológiai tünetek. A lehetséges magyarázat erre az, hogy az oxidatív károsodások reparációjának híján elpusztulnak az ezen károsodásra fokozottan érzékeny idegsejtek (Reardon 1997). Az XP-os betegeknél heterogenitás figyelhető meg a betegség súlyosságában, mely főleg a napérzékenységben, a neurológiai tünetek súlyosságában valamint a reparációs képességben észlelhető. Az XPC típusú betegek az XPA és XPD típusoknál kevésbé érzékenyek a napfényre. A legtöbb XPA, XPB, XPD és XPG csoportba tartozó beteg súlyos NER hiányosságokat mutat (Bootsma 1993). Az XPD típusú betegek egy részénél azonban akár 50%-os reparációs aktivitás is megmaradhat. Mivel az XPC fehérje csak a globál genom reparációban játszik szerepet, az XPC típusú betegekben a

transzkripcióval kapcsolt reparáció normális működése következtében 15-30%-os reparációs aktivitás is fennmaradhat.

Az egyedüli kandidáns gént, amelynek hibája az XPE komplementációs csoport elváltozásait magyarázza még nem sikerült klónozni. Az XPE komplementációs csoportba sorolt betegeknél csökken legkevésbé a NER aktivitás és az XPE-t nélkülözhetőnek tartják az *in vitro* NER folyamatokban. Néhány, de nem minden XPE betegeknél a DDB faktor hiányát detektálták, amely két alegységből áll (p127 és p48) és főleg, de nem kizárólag a kisebb p48 alegységben találtak mutációkat. A DDB faktor a kromatinba szerveződött DNS-en főként a CPD-k azonosításában vesz részt és elősegíti azok felismerését, amire az XPC-HR23B nem képes önállóan a CPD-knek a 6-4 fototermékhez viszonyítva kisebb száltorziós hatása miatt (Tang 2000).

A Xeroderma pigmentosum variáns (XPV) sejteben a NER folyamatai megfelelően végbemennek, csak az UV hatására keletkező DNS károsodások javítása szenved zavart. Az XPV sejtekben mutációkat azonosítottak a DNS Polimeráz η -nak nevezett fehérje génjében. Ez a polimeráz képes a DNS szintézist folytatni a pirimidin dimerek "átugrásával" (ún. "trans-lesion" DNS szintézist végez) (Masutani 1999).

3.4.2. A Cockayne-szindróma (CS)

A Cockayne szindrómás betegekre korai öregedés, fokozott fényérzékenység miatti bőrelváltozások, szürkehályog kialakulása, látásproblémák jellemzőek. Ezenkívül csontozatbeli elváltozások, mint az alacsony termet, esetleg törpeség, testtartási problémák, csonttritkulás, púposág, fogszúvasodás, valamint a zsírszövet elvesztése és neurológiai eltérések kialakulása, visszamaradott szexuális fejlődés is előfordul a betegeknél (Nance 1992) (**5. ÁBRA**). Meglepő, hogy a CS betegeknél nem jelentkezik a fokozott rákhajlam. Az átlagos halálozási életkor 12,5 év, a fő halálok tüdőgyulladás és légúti fertőzések.

A Cockayne szindrómás betegeknél a globál genom reparáció megfelelően működik, de a transzkripcióval kapcsolt reparációjuk hibás. Ennek oka CSA vagy CSB gének által hordozott mutáció (Hanawalt 1998). Ez a két fehérje valószínűleg a transzkripcióban feltartóztatott RNS polimeráz elmozdításában játszik szerepet. A CS klinikai tüneteit nehéz pusztán NER defektussal értelmezni, hiszen a teljesen NER-hiányos XPA betegek klinikai tüneteitől nagyon eltérnek. Egyes vizsgálatok a Cockayne szindrómát általános transzkripciós betegséggént tartják számon, amit a DNS károsodások indukálnak (Bootsma 1993, Balajee

1997). A CS sejttényészetek érzékenyebbek az oxidatív károsodásokra, mint a vad típusúak (Leadon 1993). Valószínűleg a betegekben az endogén oxidatív károsodások hozzájárulnak a fejlődési rendellenességek kialakulásához.



5. ÁBRA.
Cockayne-szindrómás
beteg.
(Lehmann (1995) Trends
Biochem. Sci. 20, 402-405)

Ritkán XPG és CS együttesen is előfordul. Az XPG/CS betegekből izolált sejtvonalakban is az oxidatív károsodások eltávolításában találtak eltéréseket, ami önmagában az XPG sejtekre nem jellemző. Az XPG a NER-ben betöltött endonukleáz funkció mellett rendelkezik az oxidatív károsodások transzkripcionális reparációjában fontos egyéb funkcióval, aminek defektusa a Cockayne szindrómára jellemző fenotípus kialakítását eredményezi és így tovább erősíti a NER oxidatív károsodások eltávolításában betöltött szerepét (Cooper 1997; Nospikel 1997).

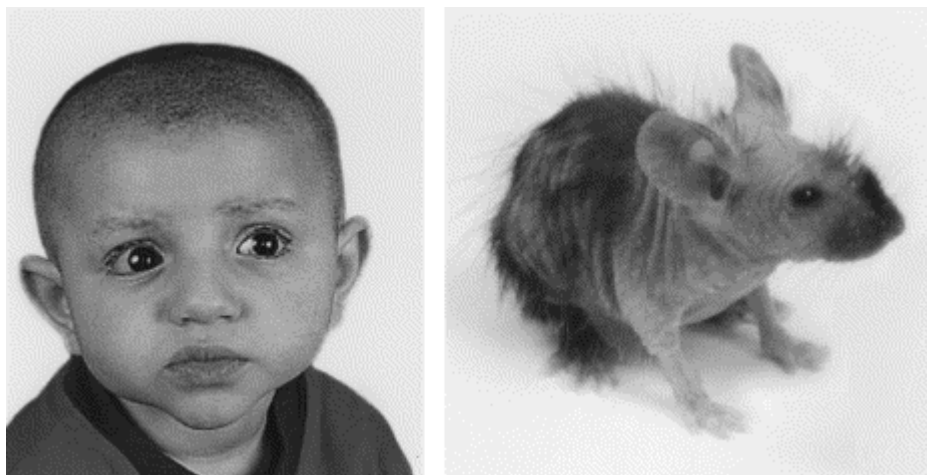
3.4.3. A Trichothiodisztrófia (TTD)

A Trichothiodisztrófia nagyon heterogén klinikai tüneteket mutató NER betegség. Nevét a betegek jellegzetes, kén hiányosságuk miatt törékeny hajszálairól kapta. Jellemző rájuk az UV fényre való érzékenységek, melyben az XPD, XPG és a még nem klónozott gén, a TTDA játszik szerepet. (Stefanini 1986; Stefanini 1993; Vermeulen 1993). Habár a TTDA fehérjéről még nem igazolták, hogy része lenne a TFIIH komplexnek, mindhárom fent

említett komplementációs csoport hibája helyreállítható volt beinjektált, tisztított TFIIH komplexszel (van Vuuren 1994). Annak ellenére, hogy az UV érzékeny TTD betegek bizonyítottan NER hiányosak, nem jellemző rájuk a bőrrák kialakulása és a napnak kitett bőrfelületek elváltozásai is nagyon enyhék a xerodermás betegekhez képest (Itin 1994; van Vuuren 1994, Botta 1998)

A TTD-s betegekre jellemző a halpikkelyszerű bőrelváltozások kialakulása. A törékeny haj a cisztein-gazdag fehérjék szintézisének zavarára vezethető vissza (Itin 1994; Lehmann 1995). A TTD-s betegek IQ-ja az átlagosnál alacsonyabb és gyakran szellemi fogyatékoság jellemző rájuk, hasonlóan a CS betegekhez. Csökkent termékenység is jellemzi őket (Itin 1990), valamint növekedéssel kapcsolatos zavarok, amelyek enyhe növekedési visszamaradottságtól a törpeségig terjedhetnek. A csontozatbeli és egyéb elváltozások sok átfedést mutatnak a CS betegekkal (Sarasin 1992; McCuaig 1993).

A NER szindrómák megértését nagy mértékben elősegítették a homológ mutációkat hordozó egér törzsek, melyek fenotípusukban, reparációs eltéréseikben nagy hasonlóságot mutatnak az emberi betegségekhez (Hoeijmakers 2001a) (**6.ÁBRA**).



6. ÁBRA. Trichothiodiszfóriás beteg és TTD mutáns egér.

(Hoeijmakers, Mutat.Res. 2001 nyomán)

3.4.4. A NER-hez kapcsolódó betegségek és a TFIIH

A transzkripcióval kapcsolt reparációs rendszer fehérjéinek mutációi következtében kialakult betegségek fenotípusos eltéréseire nincs még elfogadott ok-okozati összefüggés. Három NER-rel kapcsolt szindróma alakul ki egyetlen hibás folyamat vagy egyetlen hibás gén következtében (pl. az XPB és XPD esetében). A TFIIH két helikáz alegységének

funkciójára alapozva Bootsma és Hoeijmakers a **7. ÁBRÁN** látható magyarázatot állította fel a NER, a transzkripció, a TFIIH komplex stabilitása és a mutációk okozta betegség kialakulása között (Bootsma 1993; Hoeijmakers 2001a). Xeroderma pigmentosum alakul ki ha a mutáció a nukleotid excíziós reparációhoz szükséges TFIIH funkciót károsítja. Ha ehhez a transzkripciót érintő funkciókat is kiiktató mutáció társul átfedő XP/CS fenotípusok jönnek létre. A TFIIH belső stabilitását érintő mutációk okozhatják a TTD esetében a törékeny haj kialakulását, mivel ilyenkor a TFIIH széteseik mielőtt a haj végső differenciálódási lépései befejeződnenek. A TTD UV érzékeny típusaiban ezen kívül a NER funkció is hibás.

TFIIH funkció			Klinikai fenotípus
NER	Transzkripció	Stabilitás	XP
NER	Transzkripció	Stabilitás	XP/CS
NER	Transzkripció	Stabilitás	TTD (UV szenzitív)
NER	Transzkripció	Stabilitás	TTD (nem UV szenzitív)

7. ÁBRA. A Transzkripciós Faktor IIH (TFIIH) komplex különböző funkciójú fehérjéinek hibája következtében kialakuló nukleotid excíziós reparációs szindrómák

3.5. A DNS károsodások szerepe a tumorgenezisben

Ma már általánosan elfogadott nézet, hogy az onkogének és a tumorszupresszorok mellett a DNS reparáció génjei alkotják a tumorgenezisben fő szerepet játszó harmadik géncsaládot. Klinikai bizonyítékok támasztják elő, hogy a rákos elváltozásokat mutató sejtekben kimutatható a csökkent reparációs aktivitás. A DNS reparáció génjeinek mutációi mellett kulcsszerep jut ebben a folyamatban a p53 tumorszupresszornak

3.5.1. A p53 szerepe a DNS reparációban

Az emberi daganatok több, mint 50%-ánál a p53 génben mutattak ki mutációt (Levine 1997), a pikkelysejtes karcinóma elnevezésű bőrrák esetében 90%-ban ez a gén hordoz mutációt (Decraene 2001). A bőrrákos sejtekben a p53 gén mutációi nem Xeroderma pigmentosum-os betegekben 92%-ban, míg Xeroderma pigmentosum-osok esetében 98%-ban

a szomszédos pirimidineken jelentkeztek. Ezeket a CC→TT tandem mutációkat az UV fény ujjenyomatának nevezik (Daya-Grosjean 1995).

A p53 tumorszupresszor gén terméke a p53 fehérje transzkripciós faktor, mely mintegy 100 gén transz-aktiválásában vesz rész (Tokino 1994).

A Li-Fraumeni szindróma nevű emberi betegségben szenvedő betegek csírvonalukban p53 mutációkat hordoznak és a normál populációnál sokkal hajlamosabbak a rák kialakulására (Srivastava 1990). Bizonyos onkogén vírusok (adenovírus, SV40, HPV) tumorképző tulajdonsága részben abban rejlik, hogy bizonyos vírusfehérjék kölcsönhatásba lépnek és gátolják a p53 fehérjét (Bowman 2000; Sanchez-Prieto 1996). A humán papilomavírus E6 fehérjéje pl. funkcionálisan inaktiválja a p53 fehérjét azáltal, hogy hozzákötődve felgyorsítja annak proteoszómális degradációját (Kessis 1993, Ford 1998;).

DNS károsodások hatására a sejtben a p53 fehérje szintje megemelkedik és féléletideje mintegy ötszörösére meghosszabbodik (Maltzman 1984; Price 1993, Maki 1997) **(8. ÁBRA)**.

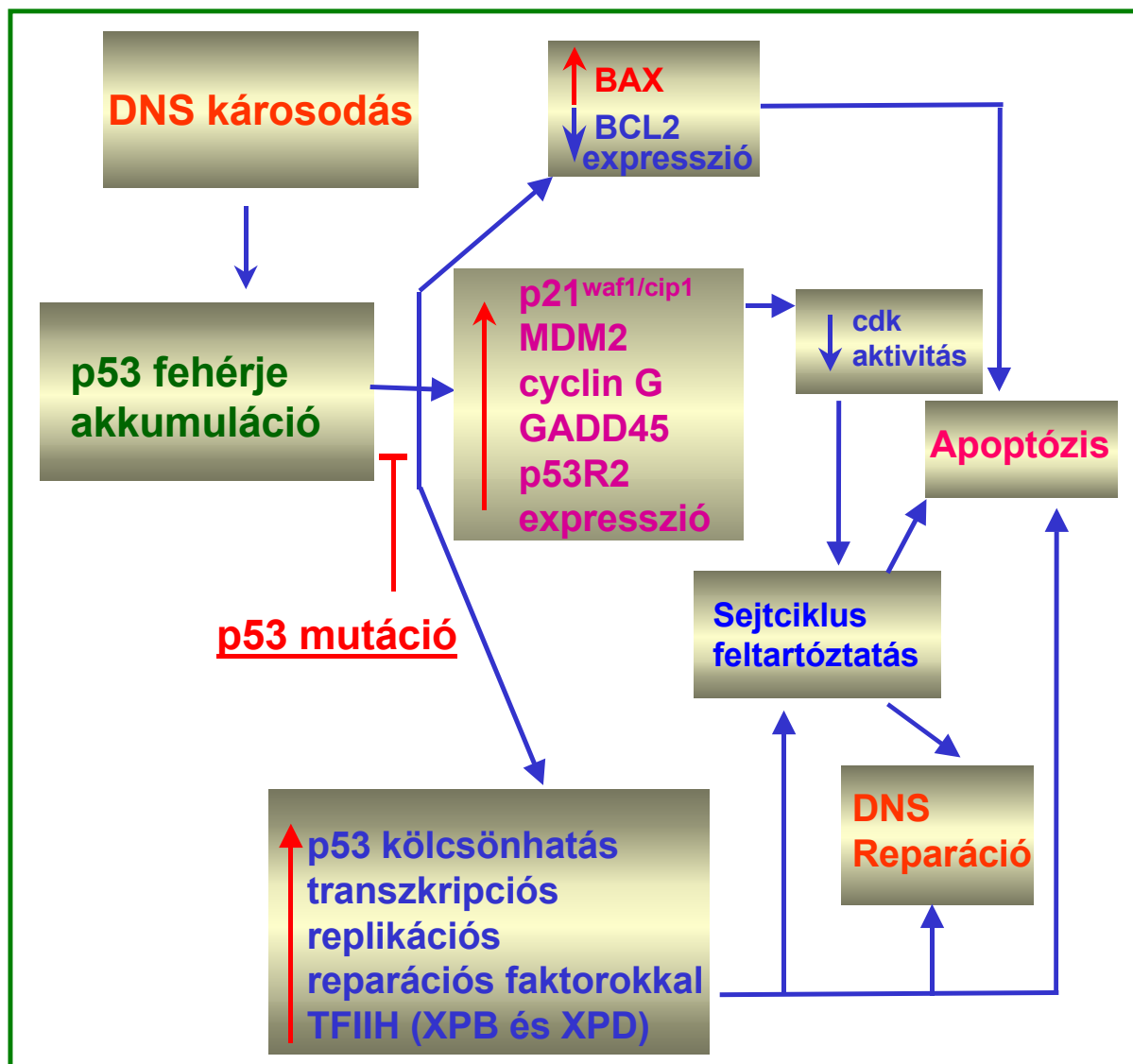
A p53 fehérje szintjének emelkedését váltja ki az UV károsodás (valószínűleg a rövid excíziós átmeneti oligonukleotidok révén), DNS keresztkötések kialakulása (ciszplatin), γ -sugárzás, DNS száltörések, hipoxia, hősokk, oxidatív stressz, az rNTP raktár kiürülése és különböző kémiai ágens (Graeber 1994; Nelson 1994; Renzing 1996, Lakin 1999;). A DNS károsodások hatására számos szenzor fehérje (pl különböző kinázok, Mdm2, ATM, ATR fehérje, hiszton acetil-transzferázok) képes kapcsolatba lépni a p53 fehérjével és a szignált átadni, ami a főként a p53 poszttranszlációs modifikációját jelenti (Lakin 1999).

A p53 fehérje védelmező szerepét a sejt további sorsa szempontjából három fő útvonalon fejti ki (Smith 1995; 1997, Ford 1997; Levine 1997; McKay 1999; Smith 2000a, Decraene 2001) **(8. ÁBRA)**:

1. Közvetlenül részt vesz a nukleotid excíziós reparációban azáltal, hogy direkt fehérje-fehérje kölcsönhatásba lép a reparációs fehérjékkel (XPB és XPD, RPA), illetve más reparációs fehérjék transzkripcionális szabályozását irányítja.
2. A sejtciklus G1/S ellenőrzőpontjának transzkripcionális szabályozása révén időt biztosít a reparációs folyamatok számára a súlyosan károsodott sejtekben (főként a p21^{WAF1/CIP1}, Gadd45, p53R2, cyclin G gének transzkripcionális aktiválásán/gátlásán keresztül) .
3. Azon esetekben, ahol a reparáció nem lehetséges, beindítja a programozott sejthalált (Bax és Bcl gén szabályozása) és eliminálja a károsodott sejtet, ezáltal megvédve az egyedet a mutációk rögzülésétől (Prives 1999).

A p53 fehérje inaktivációja kulcsszerepet játszik a tumorgenezisben, ezért méltán nevezik a genom őrének. Az, hogy egy bizonyos DNS károsodásra melyik p53 által szabályozott útvonal indul be, függ a sejt típusától, onkogén összetételétől, az extracelluláris stimulusoktól, a stressz körülmény intenzitásától valamint a p53 és különböző fehérjék kölcsönhatásától (Levine 1997, Decraene 2001;).

A DNS károsodásokra adott sejtválasz szabályozásában más tumorszupresszor gének is szerepet játszanak. A közelmúltban mutatták ki a p33^{ING1} (Cheung, Jr. 2001), az 53BP1 (Rappold 2001) és a pRb (Therrien 1999) szabályozó szerepét.



8. ÁBRA. A p53 fehérje központi szerepe a DNS károsodást követő sejt folyamatokban. A p53 fehérje a DNS reparáció, a programozott sejthalál és a sejtciklus szabályozás révén irányítja a DNS károsodásokra adott sejt választ.

3.6. A fototermékek analízisére használatos DNS reparáció vizsgálati módszerek

3.6.1. DNS száltöréseken alapuló módszerek

Ezek a módszerek bizonyos bakteriális és fág enzimek azon képességén alapulnak, hogy azok a fototermékek közelében száltöréseket indukálnak. A kivágódott DNS fragment analízise ezután történhet alkalikus cukor gradienssel, céziuim-klorid gradienssel, alkalikus gélelektroforézissel (esetleg “egy-sejt gélelektroforézissel” (Comet assay (Singh 1988)), vagy kromatográfiásan (Seawell 1980, Mitchell 1994, Kasten 1995) etidium-bromiddal festve, esetleg bromodezoxi-uridin (BrdU) jelenlétében (Friedberg 1995, Mu 1997). A módszerek hátránya, ami bizonyos szempontból előny is lehet, hogy specifikus enzimek szükségesek hozzá. A ciklobután pirimidin dimerek felismerésére képes a T4 endonukleáz V (Seawell 1980), a citozin-hidrátokat az *E. coli* Endonukleáz III ismeri fel (Weiss 1993). A 6-4 fototermékek, a Dewar-izomer és más UV károsodások azonban nem detektálhatók ezekkel a módszerekkel.

A DNS reparációs enzimek használatán alapuló továbbfejlesztett módszer a ligáláson alapuló PCR (LM-PCR), (Gao 1994; Pfeifer 1997a). A módszer speciális PCR technikát alkalmaz, amely képes a T4 endonukleáz kezelés hatásra keletkező egyszálú töréseket detektálni a DNS-en. A vizsgálandó, ismert szekvencián indukált fototermékek helyén enzimatiskeus kezeléssel ligálható 5' foszforilált véget alakítanak ki. Ezután egy specifikus primer segítségével primer extenziót végeznek a fototermék helye és a primer horgonyzási helye között. Az így kapott DNS szakasz 3' végére (a fototermék helyére) oligonukleotid linkert kapcsolnak, amihez egy újabb, ún. “nested” primer horgonyozható. A vizsgálandó DNS szakaszon képződő minden egyes fototerméknél így kialakított, azonos végi szekvenciákról a két primerrel exponenciális amplifikáció végezhető. Bár a módszerrel nukleotid szintű felbontással lehet detektálni a DNS károsodásokat, a többszörös enzimatiskeus kezelés miatt nagy mintaszámnál, pl. reparáció kinetikai vizsgálatoknál nagyon körülményes az alkalmazása.

3.6.2. Tömegspektrometriás módszerek

A tömegspektrometria (MS) a vizsgálandó molekula ionizálásán és fragmentálásán alapszik. Az ionokat elektromos térben gyorsítják és eltérő sebességük alapján detektálják.

(Deforce 1996). A gázkromatográfiás-tömegspektroszkópiát (GC-MS) alkalmazták CPD-k detektálására is (Podmore 1996).

3.6.3. Reparációs DNS szintézis vizsgálat (Unscheduled DNA synthesis assay (UDS))

Az UDS a DNS reparáció során történő DNS szintézis detektálásán alapuló módszer. Az UV fénnyel besugárzott sejteket [³H]-jelölt timidin tartalmú tápfolyadékban növesztik és a beépült radioaktív jelet autoradiográfiával detektálják. Míg az UV sugárzást nem szenvedett, kontrollként használt sejtek csak az S fázisban építenek [³H]-jelölt timidint a DNS-ükbe, addig a besugárzott sejtekben a reparációs DNS szintézis (ún “unscheduled” DNS szintézis) során radioaktív jel beépülése detektálható. Ezzel a vizsgálattal az S fázisos DNS szintézis és a reparációs DNS szintézis elkülöníthető (Mu 1997). Bár a módszer nem specifikus, széleskörben elterjedt, mivel olcsó és egyszerű.

3.6.4. Immunoassay (IA)

Első alkalmazása a 60-as évekre tehető (Levine 1966). Specifikus monoklonális ellenanyagokat fejlesztettek ki a ciklobután pirimidin dimerek (Mizuno 1991), a 6-4 fototermékek (Matsunaga 1990) és a Dewar izomerek ellen is (Matsunaga 1993).

A fototermékek detektálásban a leggyakrabban használt technikák radioimmunassay (RIA) és az ún. Enzim-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) technikák. Az IA technikák nagy előnye az érzékenységük.

3.6.5. Gazdasejt Reaktivációs módszer (Host cell reactivation assay, HCR)

A HCR módszer transzfekciós technikán alapszik. Egy UV sugárzásnak kitett riporter gént (legtöbbször kloramfenikol-acetil-transzferázt) hordozó vektort vagy UV-vel inaktivált vírust juttatnak be a vizsgálni kívánt gazdasejbe. A riporter gén az UV károsodások miatt nem képes kifejeződni, aktivitása csak a gazdasejt reparációs rendszerének működése által indul be. A módszert sikeresen alkalmazták emberi vizsgálatokra (Wei 1993). A technika nem specifikus a DNS károsodások típusára nézve, ami esetenként előnyt jelenthet. A módszer hátránya, hogy a vizsgálat eredménye nagymértékben függ az alkalmazott transzfekciós technikától, a használt vektor tulajdonságaitól, ráadásul a vektoron detektált DNS reparáció

nem tükrözi tökéletesen a gazdasejt transzkripcióval kapcsolt reparációs folyamatait, ezért a kapott eredmények értelmezése nehéz.

3.6.6. DNS szintézis gátláson alapuló PCR módszerek

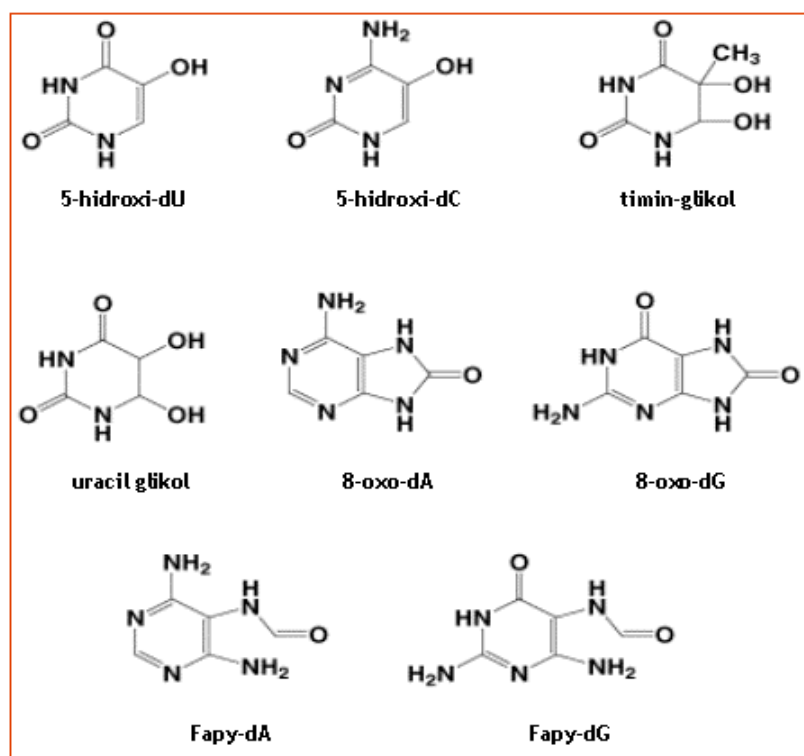
A fototermékek polimeráz enzimeket feltartóztató képességét használják ki a különböző PCR alapú módszerek. Az amplifikáció során a CPD-k és a 6-4 fototermékek is megállítják a Taq Polimerázt és így az adott szál szintézise terminálódik (Ponti 1991, Kalinowski 1992; Murray 1992). Az intakt, fototermékeket nem tartalmazó DNS mintához képest egy UV károsodásnak kitett sejt DNS-éről csökkent mennyiségű PCR termék keletkezik a kvantitatív PCR reakció jól definiált körülményei között. Az UV fénnel besugárzott sejtenyészetekből különböző reparációs idő elteltével izolált DNS amplifikációja a reparációs folyamatok nyomonkövetését teszi lehetővé.

A kvantitatív PCR módszerek előnye, hogy kevés sejtől izolált, kis mennyiségű DNS szükséges hozzájuk. A keletkező fototermékek együtt vizsgálhatók, ami lehet előny és hátrány is, hiszen így nem választható el pl. a CPD-k és a 6-4 fototermékek reparációja. A módszerek beállítása nagy pontosságot igényel, azonban definiált amplifikációs körülmények alkalmazásával nagyszámú minta egyidejű vizsgálatát teszik lehetővé gyorsan, megbízhatóan, kevés költséggel (Kalinowski 1992, Englander 1997, Ayala-Torres 2000 Van Houten 2000).

3.7. Oxidatív DNS károsodások

Az oxigén gyökök számos intra- és extracelluláris forrásból származhatnak (Clayson 1994), hiszen az oxigén molekula a begyűjtője azoknak az elektronoknak amelyek a különböző redox folyamatokban és az aerob metabolizmus során képződnek. Sejten belül főként a mitokondriumokban lezajló sejtlégzés során keletkező oxigén gyökök szivárgása révén indukálódnak oxidatív károsodások. Oxigén gyökök külső forrása lehet az ionizáló sugárzás, hő, különböző kémiai anyagok és az UVA fény (Friedberg 1995). A keletkező gyökök (singlet oxigén gyök (1O), peroxid-gyök (O_2), hidroxil gyök (OH) és hidrogén-peroxid (H_2O_2)) más makromolekuláktól újabb elektronokat képesek befogni és ezáltal szabadgyök-képző láncreakciókat indukálni, amelyek a gyökképződés helyétől távol is képesek károsodásokat okozni. Egyéb oxidatív gyök képző reakciók még a peroxisómális folyamatok, a nitrogén-oxid szintézis és a fagocitáló leukociták metabolizmusa.

A H_2O_2 fémionok (Fe^{2+} és Cu^{2+}) által katalizált reakciókban (Fenton-reakció) igen reaktív $\cdot\text{OH}$ gyökökké alakul. A réz fontos szerepet játszik a DNS nukleáris mátrixhoz való rögzítésében, ami a DNS molekula környezetében lezajló szabadgyök képződést fokozza (Friedberg 1995; Lewis 1982, Collins 1999). A szabadgyökök a sejt számos makromolekulájának oxidatív károsodását válthatják ki; a DNS oxidációjában főként a $\cdot\text{OH}$ gyökök játszanak fő szerepet (Imlay 1988). A DNS purinbázisainak fő oxidatív módosulásai a 8-hidroxiguanin (8-oxo dG), 8-hidroxiadenin (8-oxo-dA), az imidazolgyűrű felnyílásával keletkező 2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidin (Fapy-dG) és 4,6-diamino-5-formamidopirimidin (Fapy-dA) (**9. ÁBRA**). A pirimidinek főbb oxidált formái a timin-glikol, az urea, az 5,6-dihidro-timin, a metiltartronil-urea és az 5-hidroxi-metilhidantoin (Asahara 1989; Dizdaroglu 1992). Vizsgálataink során az emberi DNS glikozilázoknál szélesebb felismerési spektrumú, glikoziláz és AP endonukleáz hatással is rendelkező, *E. coli*-ból izolált két enzimet, a Formamido-pirimidin DNS glikozilázt (**Fpg**, az oxidált purin bázisok eltávolításáért felelős) és az Endonukleáz III-at (**Endo III**, az oxidált pirimidinek kihalásáért felelős) alkalmaztuk.



9. ÁBRA. Néhány gyakran előforduló oxidált DNS bázis szerkezete.

3.8. A Bázis Excíziós Reparációs Rendszer (BER)

A sejt metabolizmusa során keletkező oxidatív gyökök, metiláló ágensek, deamináció és hidroxiláció által kiváltott DNS károsodásokat a bázis excíziós reparációs rendszer javítja. Kb. 10000-re tehető naponta az egészséges sejtekben a szabad gyökök által kiváltott DNS bázis károsodások száma (Christen 2000).

A BER fő enzimei a DNS-glikozilázok, melyek szűk, részlegesen átfedő felismerési spektrummal rendelkeznek, és a károsodások azonosításán kívül a bázisokat a cukor-foszfát gerinchez kapcsoló N-glikozidos kötés hidrolitikus hasításával távolítják el. Kis mólsúlyú, alegységeket nem tartalmazó és általában kofaktorokat sem igénylő fehérjék (Friedberg 1995). Az eddig azonosított emberi DNS glikozilázokat mutatja be az **1. TÁBLÁZAT** (Lindahl 1999).

A DNS-glikozilázok a DNS molekula kis árkában facilitált diffúzióval mozognak mindaddig, míg károsodott nukleotidot nem találnak. Ekkor meghajlítják a DNS szálát a károsodott bázis körüli régió összenyomásával, hogy az eltávolítandó bázis jól beilleszkedjék a fehérje belső ürgébe, majd elhasítják a glikozidos kötést (**10/I-II. ÁBRA**) (Lindahl 1999).

Enzim	Méret (aminosav)	A gén lokalizációja	A felismert bázis
UNG	313	12q23-q24	U és 5-hidroxiuracil
TDG	410	12q24.1	U vagy T G-nal szemben, ethenocytosin
hSMUG1	270	12q13.1-q14	U főleg egyszálú DNS-ben
MBD4	580	3q21	U vagy T G-nal szemben CpG szekvenciában
hOGG1	345	3p25	8-oxoG C-nal szemben, Fapy-A, Fapy-G
MYH	521	1p32.1-p34.3	A 8-oxoG-nal szemben
hNTH1	312	16p13.2-p13.3	timin-glikol, citozin-glikol, dihidrouracil, Fapy-A, Fapy-G
MPG	293	16p (a telomernél)	3-MeA, ethenoadenin, hypoxantin

1. TÁBLÁZAT. Az emberi DNS-glikozilázok és az általuk felismert és eltávolított bázisok

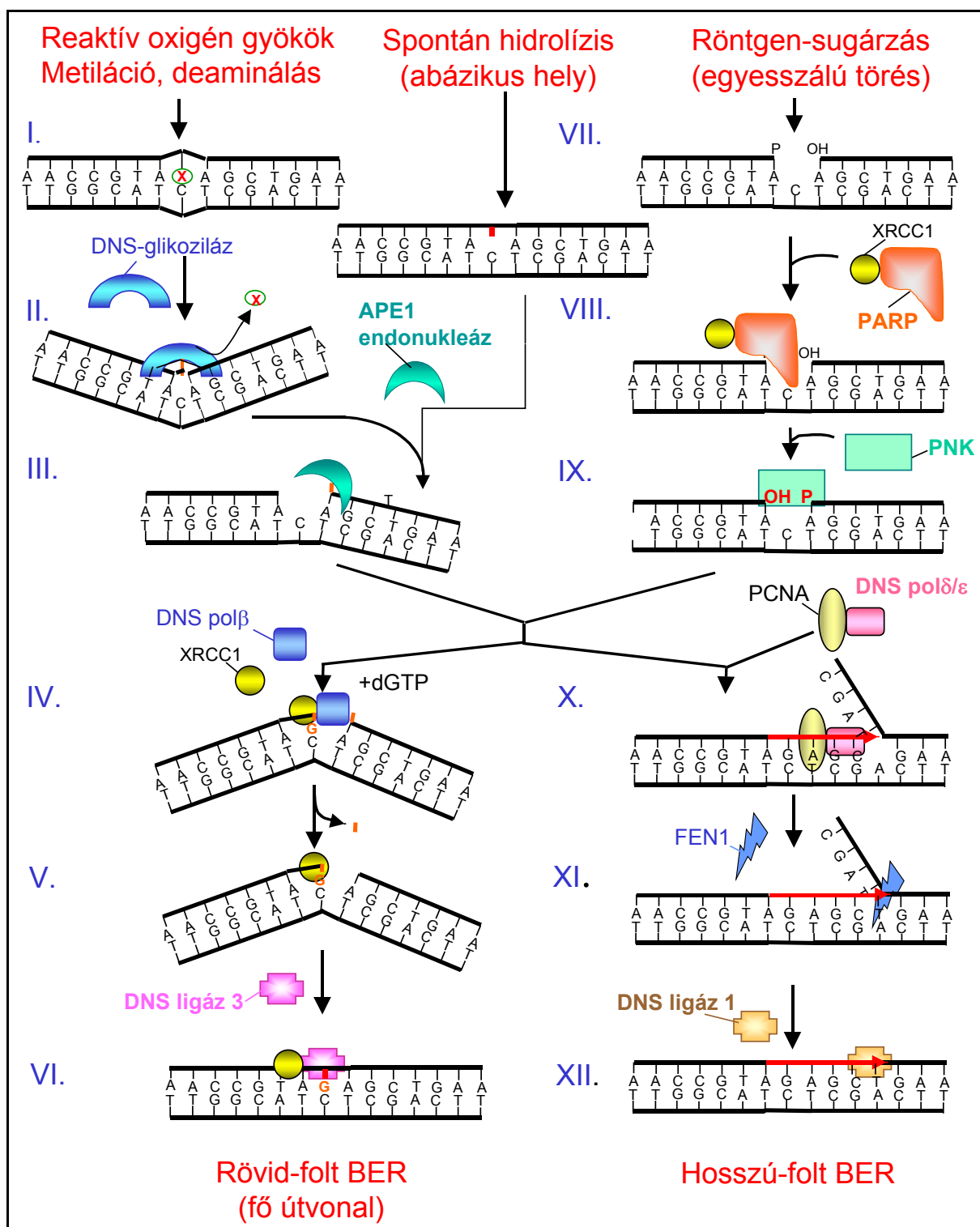
(Wyatt 1999, Hoeijmakers 2001b). Így keletkezik egy abázikus hely, mely spontán hidrolízissel szintén kialakulhat a DNS-en (**10/III. ÁBRA**). A BER következő enzime, az APE1 endonukleáz 5' irányban elhasítja a cukor-foszfát gerincet és a helyszínre toborozza a DNS Pol β -t (**10/III-IV. ÁBRA**). A Pol β N-terminális doménje AP-liáz aktivitással rendelkezik, lehasítja a bázisból visszamaradó 5'-dezoxiribóz-foszfátot, a másik domén polimeráz aktivitása révén pedig beilleszti a hiányzó nukleotidot, valamint kölcsönhatásba lép más BER enzimekkel: helyszínre irányítja az XRCC1-t és a DNS ligáz 3-at (**10/IV-VI. ÁBRA**). Az XRCC1 fehérje stabilizáló szerepet játszik, és vázként tartja össze a folyamatban

egymást követő Pol β és DNS-ligáz 3 enzimeket. A folyamat befejezéseként a DNS-ligáz 3 egyesíti az új nukleotidot és a régi szálát. A emlősökben a bázis excíziós reparáció domináns útvonala az ún. rövid-folt BER, ami egyetlen nukleotid kicserélésével jár.

A szabadgyökök vagy röntgensugárzás hatására indukálódó egyesszálú törések reparációjában a Poli-(ADP-ribóz)-polimeráz1 (PARP1) enzim aktiválódik elsőként **(10/VII-VIII. ÁBRA)**.

Szerepe a reaktív egyes szálú végek átmeneti védelme és mintegy “anti-rekombinogén” faktorként szerepel. A polinukleotid kináz (PNK) szintén védi és “polírozza” a szálvégeket **(10/IX. ÁBRA)** A száltörések esetén a Pol δ/ϵ -polimeráz végzi az új szál szintézisét **(10/X. ÁBRA)**. A FEN1 struktúraspecifikus nukleáz távolítja el a DNS gerincből kihajlított néhány nukleotidot, a PCNA fehérje stimulálja ezt a reakciót és stabilizálja a komplexet **(10/XI. ÁBRA)**.

A FEN1 fehérje fontos feladata, hogy megakadályozza a hajtűhurok kialakulását és a polimeráz esetleges megcsúszását a DNS szintézis során, ami repetitív szekvenciák létrejöttéhez vezethet. Az egyesszálú törések reparációjában a szálegyesítést a DNS-ligáz1 végzi **(10/XII. ÁBRA)**.



10. ÁBRA. A humán bázis excíziós reparáció (BER) működése. A “rövid-folt” BER esetén a Polβ egyetlen új nukleotidot épít be a hibás bázis helyére. Az egyesszálú törések reparációjakor (“hosszú-folt” BER) 2-8 nukleotid szintetizálódik újra a Polδ/ε révén.

3.9. Az oxidatív stressz és szerepe az emberi betegségekben

Az oxidatív szabadgyökök túlsúlya és az antioxidáns védelmi mechanizmusok kimerülése az emberi szervezetben oxidatív stresszt eredményez. Mindez hozzájárul bizonyos allergiák (asztma, gyógyszer-, ételérzékenységek), rákos megbetegedések (húgyhólyag, tüdő, bőr, nyelőcső stb. rák), neurodegeneratív betegségek (Alzheimer-kór, Parkinson kór, amiotrófiás lateral sclerosis), metabolikus betegségek, látási problémák (szürke-, zöldhályog) kialakításához, illetve súlyosbításához (Mates 1999). A sejtek öregedési folyamataiban szintén kulcsszerepet játszik az oxidatív stressz, ezért az időskori megbetegedésekben kulcsfontosságú patológiás faktor; kivédése és a sejten belüli védelmi rendszerek erősítése terápiás szempontból nagyon jelentős, ezért az utóbbi években kutatási és gyógyszerfejlesztési szempontból is kiemelt szerepet kap.

3.10. Az Alzheimer-kór (AD)

Az Alzheimer-kórt, mint a legáltalánosabban ismert időskori emlékezetvesztéssel járó neurodegeneratív betegséget először 1907-ben diagnosztizálta Alois Alzheimer német orvos. A betegségnek familiáris és sporadikus formája is ismert és főleg idős korban fordul elő. Gyakorisága a 65-75 éves korosztályban kb. 3%, 75-85 év között 18-20%, a 75-85 év közötti korosztályban 50% (Evans 1989). A fejlett nyugati országokban az idős lakosság arányának növekedésével ez a betegség egyre súlyosabb terhet jelent a társadalom számára. Az Amerikai Egyesült Államokban jelenleg 4 millió fölött van a regisztrált Alzheimer-kórban szenvedők száma és a 4.-5. fő halálozási okként tartják számon.

A betegség megértésének fő hátráltatója az, hogy a szelektív idegsejt elhalás etiológiája és pathogenezeze mind a mai napig nem tisztázott. Az elhunytaknál a boncolás során az agyban szenilis plakkok (senile plaques, fő alkotórészük β -amiloid) és neurofibrilláris hálózatok (neurofibrillary tangles, fő alkotórészük foszforilált tau-fehérje) azonosíthatók szövettani vizsgálattal.

Az Alzheimer-kóros betegeknek másodlagosan multi-neurotranszmitter hiány is kialakul. A legjellemzőbb az agykérgi kolin-acetiltranszferáz és az acetilkolinészteráz hiány (Bartus 1982). Az elmúlt évtizedben az Alzheimer-kórral kapcsolatban számos fontos molekuláris genetikai felismerés született. Azonosították a familiáris AD-ban mutációt hordozó APP (amyloid precursor protein) gént a 21-es, a presenilin1 gént a 14-es és a presenilin2 gént az 1-es kromoszómán. A korai manifesztációjú familiáris forma a

megbetegedések mindössze néhány %-át teszi ki a gyakoribb sporadikus Alzheimer-kórral szemben (Swartz 1999).

Kimutatták, hogy az apolipoprotein E-4 (APO E-4) allél fontos kockázati faktor mind a korai manifesztációjú familiáris, mind a sporadikus Alzheimer-kór kialakulásában. Az APO E-4 allélra homozigóta személyek 90%-ánál 80-éves korukra kialakul az AD (Corder 1993, Christen 2000).

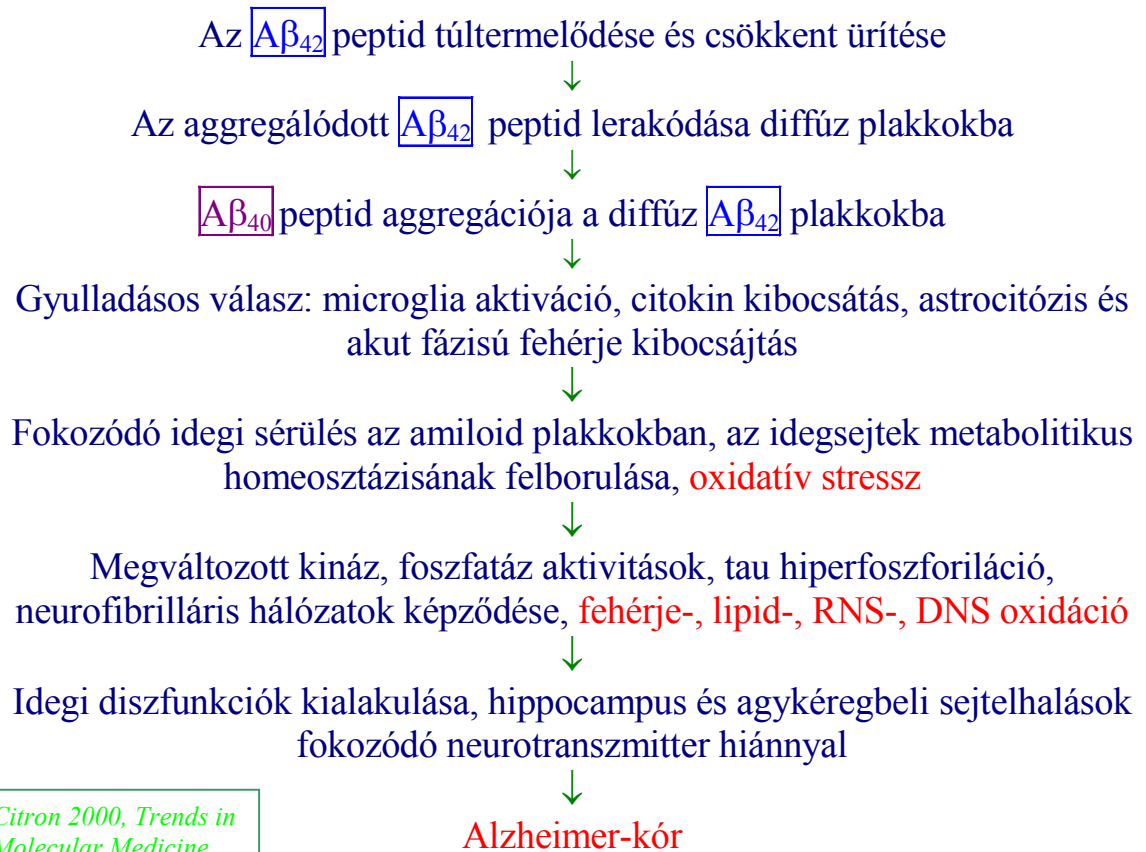
Az Alzheimer-kór kialakulására jelenleg több hipotézis létezik. Ezek közül az egyik az ún. amiloid-kaskád hipotézis, mely szerint az agyban lerakódó amiloid peptid aggregálódása és az általa indukált kóros folyamatok felelősek a szelektív neuron elhalásért **(11. ÁBRA)** (Citron 2000).

Ezen folyamatok súlyosbodásában fontos szerepet játszik azonban az Alzheimer-kórban sokak által detektált fokozott szabadgyök képződés, mely oxidatív stresszt vált ki a szervezetben. Mivel az idegsejtek extrém módon érzékenyek a szabadgyökökkel szemben, az oxidatív stressznek és a védelmi faktoroknak kiemelt szerepe van a betegség megelőzésében és esetleges gyógyításában.

Az Alzheimer-kóros betegekben detektált oxidatív stressz számos vizsgálat szerint főként a mitokondriumok defektusára vezethető vissza. Az Alzheimer-kór kialakulását, súlyosbodását a mitokondriális elváltozások egyrészt az oxidációt előidéző fokozott szabadgyök termelése révén, másrészt az energiaforrások csökkenése révén idézhetik elő. Alzheimer-kóros betegekben detektálták a mitokondriális légzési lánc citokróm-c oxidáz enzimrendszerének defektusát (Mutisya 1994) valamint, hogy a citokróm-c oxidáz gén mutációja együtt szegregál a késői manifesztációjú Alzheimer-kórral (Davis1997). A mitokondriális defektusok az oxidatív szabadgyökök kiszabadulása, illetve a csökkent energia ellátás révén drámai hatással vannak az agy működésére (Curti 1997, Blass 2000;). Az egész szervezetben jelenlévő oxidatív stresszhatáson kívül az agyban a szenilis plakkokban lerakódott β -amiloid további szabadgyök képződést vált ki, ami fokozza az oxidatív stresszt, további mitokondriális defektusokat idéz elő, a neuronok pedig az oxidatív stresszre fokozottan érzékenyek (Behl 1992; Behl 1994; Schubert 1995) **(12 ÁBRA)** (Butterfield 2001).

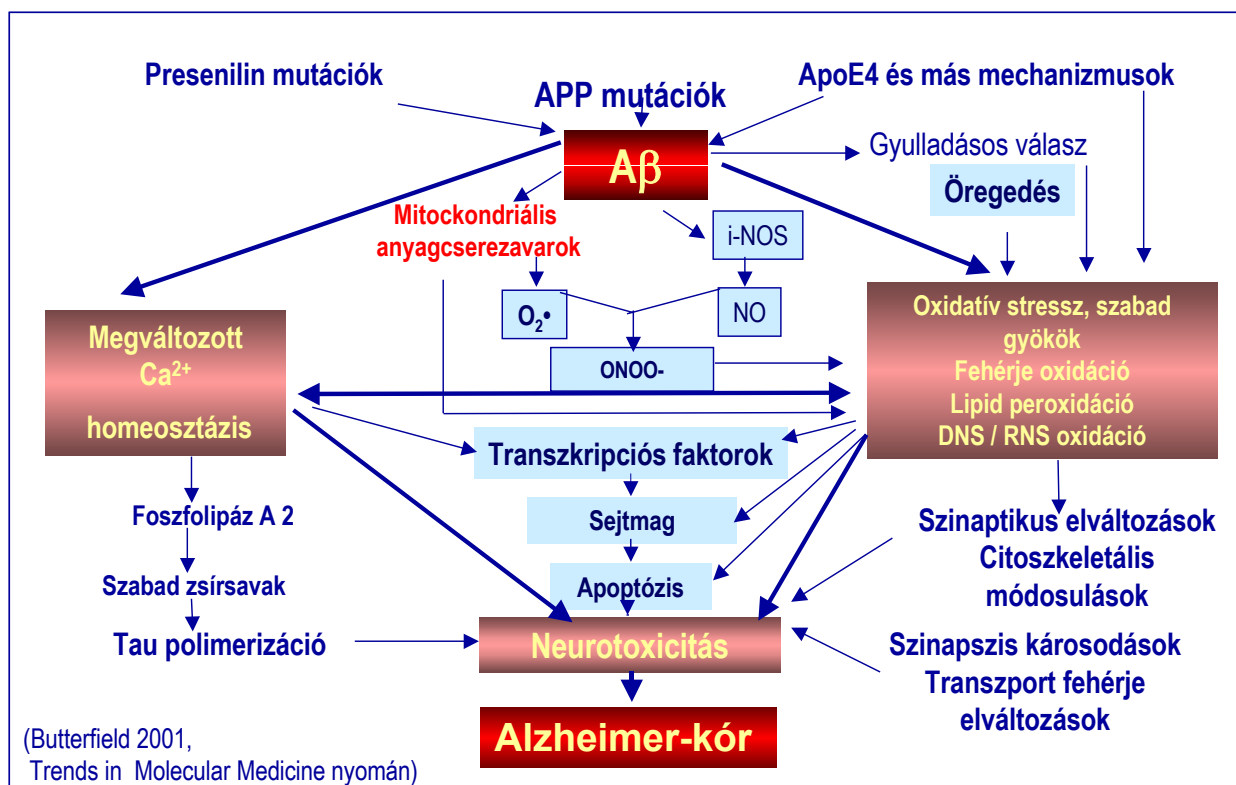
Számos egyéb, a patogenezisben szerepet játszó faktort is kimutattak (pl. nyomelemek (réz, cink, alumínium),neurotoxicitása, glutamát toxicitás stb), melyek hozzájárulhatnak a neurológiai elváltozások kialakulásához (Markesbery 1997).

Az amiloid-kaszád hipotézis az Alzheimer-kór kialakulására



*Citron 2000, Trends in
Molecular Medicine
nyomán*

11. ÁBRA. Az Alzheimer-kór kialakulásának főbb faktorait összefoglaló ún. amiloid-kaszád hipotézis. A hipotetikus kaszkád folyamat egyes lépéseinek ok-okozati összefüggései a betegséggel ill. egymással még nem kellően tisztázottak.



12. ÁBRA. Az amiloid β -peptid ($A\beta$) szerepe az Alzheimer-kóros betegek idegsejtjeiben kialakuló oxidatív stresszben. Az amiloid β -peptid túlermelődése (az amiloid prekursor protein (APP) vagy a presenilin mutációja vagy az APOE4 allél jelenléte ill. más faktorok pl. oxidatív stressz következtében) $A\beta$ -mediált, szabadgyök kibocsátással járó oxidatív stresszhez vezet. Az oxidatív stressz reaktív oxigén fajok képződésével, lipid peroxidációval, azt követő fehérje módosulásokkal stb. jár együtt. Az $A\beta$ -mediált oxidatív stressz egyéb következménye a szabad zsírsavak kibocsátása (ami a tau fehérje polimerizációjához vezethet, fehérje oxidációt okozhat), a Ca^{2+} homeosztázis felborulása (ami további mitokondriális anyagcserezavarokat okoz, így peroxinitrit képződést eredményez, foszfolipáz A2 aktiválódást okozhat és apoptózist indukálhat) gyulladásos válasz, mitokondriális defektusok és apoptózis, ami az idegsejt pusztulásához vezet. Az antioxidánsok képesek a feltüntetett folyamatok szinte mindegyikére hatást gyakorolni, hatásmechanizmusuk tanulmányozása ezért kiemelt szerepet kap az Alzheimer-kórral kapcsolatos gyógyszerfejlesztési kutatásokban.

4. CÉLKITŰZÉSEK

I. A NER heterogén rendszer mind a károsodások felismerésében, mind javítási kinetikájában. A TCR és GGR fő komponenseinek jellemzése megtörtént, azonban igen keveset tudunk a struktúrálisan fontos heterokromatikus szakaszok reparációjáról. Miután a csoportunkban eddig elvégzett DNS reparációs kísérletekben elsősorban a sok sejtet/DNS-t igénylő és ezért drága és bonyolult régi technikák alkalmazásával a reparáció más aspektusait vizsgáltuk, célul tűztük ki

- olyan kvantitatív PCR alapú módszer kidolgozását, mellyel emberi sejtek heterokromatikus régióinak reparációs kinetikája vizsgálható, és
- a kidolgozott PCR módszer alkalmazásával emberi, valamint humán/rágcsáló hibrid sejtvonalak reparációs kinetikájának vizsgálatát.

II. Az oxidatív károsodások jelentőségét az Alzheimer-kór pathomechanizmusában számos közlemény igazolja (Markesbery 1999, Christen 2000; Smith 2000b). Az idegsejtekben DNS és RNS oxidáció kialakulását is kimutatták. Néhány, az elmúlt években megjelent közlemény alátámasztja, hogy az oxidatív stressz által okozott elváltozások nemcsak az agyban, hanem a perifériás szervekben is jelen vannak (Matsushima 1995, Parker, Jr. 1995, Mecocci 1998).

Ezek alapján vizsgálatainkhoz az ilyen típusú analízishez eddig mások által még nem használt alkalikus Comet-assay-t alkalmazva, élő, Alzheimer-kóros betegekben és életkorban hozzájuk illő kontrollokban az oxidatív DNS károsodások szintjét kívántuk megvizsgálni:

- a perifériás vérből izolált limfocitákon kezelés nélkül,
- a perifériás vérből izolált limfocitákon *in vitro* alkalmazott oxidatív stresszt követő rövid reparációs idő elteltével.

5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

5.1. Az UV fény által okozott DNS károsodások vizsgálata

5.1.1. Enzimek és oldatok

PBS: 136 mM NaCl, 2.6 mM KCl, 5 mM NaH₂PO₄, 1.7 mM NaH₂PO₄, pH: 7.2,

RN-áz A (Merck), **ProteinázK** (Merck), **EcoRI enzim és puffer** (Fermentas)

TE puffer: 10 mM EDTA, 1 mM Tris*HCL, pH: 8.0

10x TBE puffer: 900 mM Tris-Borát, 20 mM EDTA, pH: 8.0)

szekvenáló festék: 95 % formamid, 10 mM EDTA pH: 8.0, 0.09% xilén-cianol, 0.09% brómfenol-kék)

5 %-os denaturáló akrilamid géloldat: (1 l-hez: 420 g urea, 465 ml 3-szor desztillált, ioncserélt víz, 125 ml 40 %-os akrilamid:bisakrilamid (38:2) törzsoldat (100 g akrilamid + 5 g bisakrilamid 250 ml vízben oldva), 100 ml 10xTBE, 400 µl Ammónium- perszulfát, 25µl TEMED (N,N,N',N'-tetrametil-etiléndiamin)

gélfixáló oldat: 10 % etanol, 10 % ecetsav

5.1.2. Sejtvonalak

Tíz emberi és két humán/rágcsáló hibrid sejtvonalban vizsgáltuk a heterokromatikus reparációt. A normál diploid humán fibroblaszt a SZTE Bőrgyógyászati Klinikájáról, plasztikai sebészeti műtétből származik. A HeLa méhnyak karcinóma, az A375, RVH421 melanóma sejtvonalakat, az EJ30 húgyhólyag karcinóma, valamint a GM01630 (XPA), GM02994 (XPA), GM02096 (XPC), Xeroderma pigmentosum-ban szenvedő betegekből izolált sejtvonalakat Robert T. Johnsontól (Coriell Institute, USA) kaptuk. A HT1080 fibroszarkóma az American Tissue Culture Collection-ből (USA), a TPC1 thyroid papilláris karcinóma Prof. Toshikazu Ushijama-tól származik. Az A9+15 egér (+humán 15-ös kromoszómát hordozó), a 15A kínai hörcsög (+humán 15-ös kromoszómát hordozó) hibrid sejtvonalak a Coriell Institute-ből származnak.

Az RVH421, A375 és A9+15 sejtek MEM (Sigma) tápoldatban nőttek, kiegészítve nem eszenciális aminosavakkal, 1 mM nátrium-piruváttal, 200 mM glutaminnal és 10% újszülött borjúsérummal (SIGMA). A GM02994, GM01630 és GM02096 sejtvonalak MEM tápoldatban nőttek, kiegészítve 20% újszülött borjúsérummal. A HT1080, a HeLa, a TPC1 és

a humán fibroblaszt sejteket DMEM (GIBCO) tápoldatban növesztettük 10% (illetve humán fibroblaszt esetében 20%) újszülött borjúsérummal kiegészítve. A 15A és az EJ30 sejtvonalakat 10% újszülött borjúsérummal kiegészített F12 tápoldatban tenyésztettük.

5.1.3. A sejtek UV kezelése

A sejteket kb. 80%-os sűrűségűre növesztettük 100 mm-es Petri csészékben. A kiindulási sejtszám 8×10^5 - 10^9 között változott, sejtvonaltól függően. A tápfolyadékot eltávolítottuk és a sejteket kétszer alaposan mostuk PBS-sel. Ezután 2 ml PBS-ben 254 nm-es germicid fénycső alatt UV fénnel kezeltük őket $0.4 \text{ J/m}^2/\text{sec}$ intenzitással. Az UV fénycsövet radiométerrel (Cole Palmer Instrument Comp, Franciaország) kalibráltuk. A besugárzást (0 - 500 J/m^2 tartományban) követően a sejtekből vagy azonnal DNS-t izoláltunk, vagy különböző reparációs időket hagyva (3, 6, 12 és 24 óra) tápfolyadékban tovább növesztettük őket. A sejtvonalak kvantitatív PCR analízise során a 3 J/m^2 UV dózist alkalmaztuk. Ez az emberi sejtek számára olyan fiziológiás dózis, amely által kiváltott UV károsodások mennyisége nagyjából azonos az USA déli államaiban egy nyári napon a déli órákban kb. 15-20 perces napozás által "begyűjthető" UV károsodás mennyiségével (Friedberg 1995; Van Houten 2000). A napsugárzás UV tartalma szélességi foktól, ózonréteg vastagságtól, napszaktól, felhősödéstől és más faktoroktól függő, azaz nem fejezhető ki egy adott számértékkel. A napsugárzásból ráadásul csak az UVA és B tartományba sorolt UV fény éri el a föld felszínét, a 320 nm alatti tartományú UV fény (így az általunk használt UVC (254nm)) nem. (Az UVC fényt a kísérleti rendszerekben azért alkalmazzák, mivel ezen a hullámhosszon a legnagyobb a DNS UV-elnyelése és a kis dózisok is jelentős fototermék képződést indukálnak. Az említett összehasonlítás a különböző hullámhosszú UV fény tartományok fototermék-képző hatásának átszámítása után kapott tájékoztató jellegű irodalmi adat.)

5.1.4. Genomiális DNS izolálás

A sejtekből a hagyományos fenol-kloroformos extrakciós módszer (Short Protocols in molecular biology 1992) kis módosításával genomiális DNS-t izoláltunk. A fehérjementesítést 56°C -on 0.25 mg/ml Proteináz K-ban végeztük egy éjszakán át, majd enyhe kézi forgatás közben fenollal és kloroformmal extraháltuk a mintákat. A DNS-t etanollal szobahőn kicsaptuk, 70%-os alkohollal mostuk és üvegbottal kitekertük. Enyhe szárítás után TE pufferben oldottuk, majd Ribonukleáz A-val RNS mentesítettük. A DNS-eket 0.6 %-os

agaróz gélen (Sigma) elektroforetizáltuk. A DNS mintákat az oldhatóság elősegítése és koncentrációmérés könnyítése érdekében EcoRI restrikciós enzimmal emésztettük. A DNS koncentráció meghatározását spektrofotométerrel (WPA) végeztük.

5.1.5. Kvantitatív PCR módszer

5.1.5.1. Az amplifikált szekvencia és a primerek

A heterokromatin reparációjának vizsgálatára kidolgoztunk egy multiplex (két primer párt alkalmazó) kvantitatív PCR módszert. A módszer részletes leírása az Eredmények című fejezet részét képezi, itt csak az alkalmazott primer szekvenciák bemutatása következik.

Az első primer párral egy 1964 bp hosszúságú A/T gazdag szekvenciát amplifikáltunk (A/T tartalom 67.71%) a **chAB4** alacsony kópiaszámú repetitív szekvencia 1353-3316 nucleotidjai között (**GeneBank Acc. No.: X57630**): ezt a PCR terméket **“nagy fragment”**-nek neveztük. Ez a szekvencia 1007 lehetséges pirimidin dimer helyet tartalmaz (**3. TÁBLÁZAT**). Az amplifikált nagy fragment kvantitálására egy belső kontroll szekvenciát alkalmaztunk. A másik primer párral amplifikált **cSac10** egy 103 bp-os G+C gazdag szakasz (**“kis fragment”**; 67% G/C tartalom) a **GeneBank Acc. No AF401203** szekvencia 83826-83928 bp között, amely szintén része a chAB4-et is tartalmazó repetitív palindromnak. Ezen a szekvencián belül nem fordul elő két szomszédos timin nukleotid, ezért a leggyakoribb timidin dimerek képződése nem lehetséges. A kvantitatív PCR módszerhez alkalmazott primer párok a következők voltak:

Nagy fragment (chAB4):

chAB4F2M: 5`-TTTTGCTCTTATCTTCTATTTGTTCCA-3`;

pozíció:1353-1379

chAB4RM: 5` TGTGGTAGTAGCTCAGGTCT-3`;

pozíció: 3316-3296

Kis fragment (cSac10):

BK1: 5`-TGGGCGGGCGATGCACTTGACC-3`;

pozíció: 83928-83907

BK2: 5`CTGCCGGTGCACCACGTCTAGA-3`;

pozíció: 83826-83847

5.1.5.2. A kvantitatív PCR reakció körülményei

Az amplifikációt MJ Research PTC-100 PCR készülékben végeztük. A reakcióelegy összetétele a következő volt: 50 ng EcoRI emésztett genomiális DNS, 2.5 U Dupla-A-TaqTM polimeráz (Zenon Biotechnology RT, Szeged), 160 μ M mind a négy dNTP-ből, (Boehringer Mannheim), 1 μ Ci α^{32} P-dCTP, 300 μ M mindkét chAB4 primerből, 200 μ M mindkét cSac10 primerből, 1xPCR puffer (50 mM KCl, 10 mM Tris*HCL pH: 9.0 25°C-on (Zenon Biotech.)), 4.5 mM MgCl₂. A reakciót 50 μ l végtérfogatban végeztük. A reakcióelegyet 93°C-on 3 percig denaturáltuk, majd 28 ciklusban amplifikáltuk a következők szerint: denaturálás 92°C-on 1 percig, primer kapcsolódás (annealing) 62°C-on 1 percig, átírás 68°C 3 percig, végezetül szál lezárás 5 percig 72°C-on és hűtés 4°C-ra.

5.1.5.3. A PCR termékek kvantitatív analízise

A PCR termékből 10 μ l-t analizáltunk 17 cm hosszú, 1 mm vastag 5 %-os denaturáló poliakrilamid gélen 1xTBE-ben 300 V-on 90 perces után. A futtatás előtt 25 μ l szekvenáló festéket adtunk az 50 μ l PCR reakcióhoz és 80°C-on denaturáltuk 2 percig. A gél 500 ml fixáló oldatban fixáltuk 2x20 percig, gélzáritón száritottuk és a PCR termékek radioaktivitását PhosphorImagerTM 445 SI készülékben ImageQuant (Molecular Dynamics, Inc.) szoftverrel határoztuk meg ún Volume értéként (a PhosphorImager által detektált, a cpm-mel arányos származtatott mértékegység). A kvantitatív analízis során az UV fénnel be nem sugárzott kontroll sejt DNS-éről amplifikált kis fragment mennyiségét tekintettük 1-nek, majd az UV fénnel besugárzott sejtek DNS-éről amplifikált kis fragment mennyiségét a kontrolléhoz viszonyítottuk. A kapott viszonyszám alapján a nagy fragment mennyiségét normáltuk és a kontroll nagy fragment %-ában ábrázoltuk

5.1.5.4. UV túlélési teszt

A sejtvonalak UV érzékenységét a standard módszer szerint teszteltük (Waldren 1978). A sejtet szuszpenzióban UV fénnel besugároztunk 0.4 J/m²/sec intenzitással. Különböző expozíciós idő elteltével (0-40 J/m² UVC dózis) 1000 ill. 5000 (Bürker kamrában számolt) sejtet Petri csészékbe tettünk és a besugárzást követő 14. napon a túlélő 50 sejtnél nagyobb kolóniákat megszámoltuk. A dózis-válasz görbéket a **24. ÁBRA** mutatja (64.oldal).

5.1.5.5. DNS szintézis gátlás

A módszer alapját az képezi, hogy az UV fény által indukált károsodásoknál a sejt saját reparációs endonukleázai bevágásokat végeznek a DNS-en, kihalítják a károsodott nukleotidot, de a replikáció gátlása miatt a DNS reparáció nem mehet teljesen végbe. A PCR reakció során a bevágásoknál a Taq polimeráz leáll.

HT1080 sejtekből két sorozatot növesztettünk 100 mm-es Petri csészékben kb. 80 %-os sűrűségig. 30 perccel az UV sugárzást megelőzően DNS szintézis inhibitorokat (hidroxiureát (Hu) és citozin- β -D arabinofuranozidot (AraC) 10^{-2} ill. 10^{-4} M koncentrációban) adtunk az egyik sorozat sejtekhez, a másik sorozat kezeletlen maradt. Ezután a sejteket egy sejt rétegben UV fénnel besugároztuk 2 ml PBS-ben. Ezt követően a sejteket vagy azonnal (kontroll és 0 órás minták), vagy bizonyos reparációs idők elteltével (3, 6 órás minták) begyűjtöttük, DNS-t izoláltunk belőlük, ezt EcoRI-el emésztettük és kvantitatív PCR reakcióban amplifikáltuk.

5.1.5.6. In vitro kromatin modifikáció nátrium-butiráttal

A Na-butirát által kiváltott kromatin dekonzenzáció hatását a heterokromatikus reparációra HeLa sejteken vizsgáltuk. Két sorozat (kontroll, 0, 3, 6 órás minták) sejtet kb. 50%-os sűrűségűre növesztettük 100 mm-es Petri-csészékben. A sejteket PBS-sel kétszer mostuk, majd az egyik sorozat sejtet friss, 5 mM Na-butiráttal kiegészített tápoldatban növesztettük 48 óráig, míg a másik sorozat normál tápoldatot kapott. 48 óra után a sejteket UV fénnel besugároztuk 3 J/m^2 dózissal 2 ml PBS-ben és vagy azonnal begyűjtöttük, vagy a fent említett reparációs időkhöz inkubáltuk. Az inkubáció után a sejteket feltártuk és genomiális DNS-t izoláltunk, majd azt a kvantitatív PCR módszerrel amplifikáltuk.

5.1.5.7. A teljes genom UV reparációs aktivitásának mérése hidroxipatit kromatográfiával

A HeLa sejteket 30 mm-es Petri csészékben 5×10^4 sejt/csésze sűrűségben [metil- ^3H]-timidin (1.78 GBq/mmol 7.4 kBq/ml) tartalmú tápoldatban növesztettük 24 óráig a DNS előjelölése érdekében. Harminc perccel az UV besugárzás előtt a sejteket 2xPBS-ben mostuk és jelöletlen tápoldatot adtunk, melybe 10 mM hidroxiurea és 100 μM AraC-t adtunk a reparációs DNS szintézis megakadályozása és ezáltal száltörések akkumulálása érdekében. A

PBS-ben történő UV besugárzás után a sejteket 20-120 percig inkubáltuk az előző tápoldatban azért, hogy reparációs endonukleázok kifejthessék hatásukat, majd kétszer PBS-ben mostuk és jégre helyeztük. A DNS száltöréseit Ahnström és Edvardson (Ahnstrom 1974) alkalikus lízis módszerével mértük. 20 percig lizáltuk a sejteket 0.15 M NaOH, 0.3 M NaCl, 0.01 M Na₂EDTA, 5% szaharóz oldatban és a DNS-t hidroxipatit oszlopokon analizáltuk a károsodások környékén kitekeredő egyesszálú DNS-t a kettősszálútól elválasztva. A száltörések gyakoriságát Röntgen-sugárzás indukált törésekre kalibráltuk Collins módszere (1977) szerint.

5.2. Az oxidatív DNS károsodások vizsgálata

5.2.1. Anyagok és oldatok

A külön nem jelzett eredetű vegyszerek a Reanal Vegyszergyártól származnak.

Histopaque 1077 (Sigma), **H₂O₂**, **RPMI tápoldat** (GIBCO), **Üveg fedőlemez 24x33 mm** (Menzel Glaser)

Normál olvadáspontú agaróz (Sigma, Cat. No. P9539)

Alacsony olvadáspontú agaróz (Sigma, Cat. No. P9414)

Durvára csiszolt felszínű, matt mikroszkóp tárgylemez (Richardson Supply Co., Cat.No 267-096)

Comet Lízis puffer: 2.5 M NaCl, 100 mM Na₂ EDTA, 10 mM Tris, pH:10, és 1 % frissen adott TritonX-100 (MERCK).

1xEndonukleáz puffer: 40 mM HEPES-KOH, 0.1 M KCl, 0.5 mM EDTA, 0.2 g/ml bovine serum albumin (BSA), pH: 8.0

Alkalikus Elektroforézis puffer: 0.3 M NaOH, 1 mM EDTA, pH: 13

Neutralizáló puffer: 0.4 M Tris-HCl, pH: 7.5

Formamido-pirimidin-DNS glikoziláz és Endonukleáz III enzimek: *E. coli* sejt extraktum Andrew Collins laboratóriumából (Rowett Research Institute, UK)

5.2.2. A vizsgált személyek

27 késői manifesztációjú sporadikus Alzheimer-kóros beteget és 12 életkorban illesztett egészséges személyt vizsgáltunk a SZTE Pszichiátria Klinikájának járóbetegei közül. Az Alzheimer-kór klinikai diagnózisa a DSM-III-R and NINCDS-ADRDA kritériumainak

megfelelően történt (American 1987; McKhann 1984), és mivel élő betegeket vizsgáltunk, szövettani adatok nem álltak rendelkezésre a diagnózis megerősítésében (a tesztek alapján a diagnózist 90%-ban veszik megalapozottnak). Az Alzheimer-kóros betegek mérsékelt szellemi leépülést mutattak a Mini-Mental State Examination (MMSE) teszt szerint. Mindegyik beteget késői manifesztációjú AD típusúnak tekintettük, (mivel a betegség kezdete 65 éves kor utánra tehető), s mivel egyik beteg családjában sem fordult elő Alzheimer-kór, sporadikusnak tekintettük. A betegek adatait a **2. TÁBLÁZAT** tartalmazza.

	Alzheimer-kórosok (AD) ± SD (n=27)	Kontroll személyek ± SD (n=12)
Életkor (év)	72.00±6.74	72.33±9.41
A betegség kezdete (év)	69±4.2	-----
MMSE Pontérték*	18.62±4.32	27.50±1.08
Nem (Férfi/Nő)	10/17	5/7

2. TÁBLÁZAT. A vizsgált személyek adatai (*p<0.05 Az Alzheimer-kórosok a kontroll személyekkel összevetve)

Az egészséges kontroll személyeket a betegek házastársai közül választottuk, ahol a korbeli illesztés ezt megengedte (ez a hasonló életkörülmények és táplálkozási szokások miatt is fontos szempont). Az MMSE pontérték a kontrolloknál magasabb volt, mint 26 és egyikükönél sem fordult elő emlékezési zavarokkal járó megbetegedés, belszervi vagy ideggyógyászati probléma (ez a diagnózis fizikai, neurológiai valamint neurofiziológiai laboratóriumi teszteken alapult, amely minden esetben megfelelt a normál értéknek). A vizsgált személyek nem dohányoztak, nem szedtek antioxidánsokat (mint az E-vitamin, selegiline) vagy más olyan szert, ami befolyásolhatná a szervezet redox állapotát, illetve oxidatív DNS károsodásokat okozna (mint pl. egyes antipszichotikus szerek vagy rákellenes gyógyszerek).

5.2.3. A vérminták és a limfociták kezelése

A limfocitákat 500-1000 µl (4 illetőleg 8 lemez/beteg készítéséhez) 5% EDTA véralvadástgátlóval kevert vérből nyertük. A szeparálás és a limfociták vizsgálata a minta gyűjtést követően frissen megtörtént, a mintákat nem fagyasztottuk, ill. tároltuk, hogy

elkerüljük az oxidatív műtermékek képződését. A különböző mintavételi napokon történő mintagyűjtés jól meghatározott, reprodukálható körülmények között történt (azonos időben történő mintavétel, pontos minta kezelési idők, azonos törzs oldatok). Az illesztett kontrollok analízise mindig a beteg mintákkal együtt történt. A betegek állapotára és idős korára való tekintettel nem volt lehetőség a mintavételek ismétlésére, de minden analízist duplikátumban végeztünk. A módszer normál vérmintákon történő optimalizálása, valamint a duplikátumok vizsgálata során a módszer igen jól reprodukálhatónak bizonyult.

A szeparáláshoz a teljes vért azonos mennyiségű Histopaque 1077 reagensre rétegeztük. A sejteket 200 g-vel 15 percig szobahőn centrifugáltuk. A sejteket a gyűrűszerű interfázisból összegyűjtöttük és kétszer mostuk PBS-sel, közben 200 g-vel centrifugáltuk. A limfociták felét kezeletlenül hagytuk, és az alapállapotban meglévő károsodások tanulmányozására használtuk. A sejtek másik felét 5 perces 4°C-on történő 150 μ M (PBS-ben hígított) H_2O_2 -dal kiváltott oxidatív stressznek tettük ki. A limfocitákat a H_2O_2 eltávolítása érdekében kétszer mostuk PBS-sel majd 1 ml RPMI tápoldatban felfuszpendáltuk és a reparációs folyamatok lezajlása érdekében 1 óráig inkubáltuk 37°C-on 5% CO_2 jelenlétében.

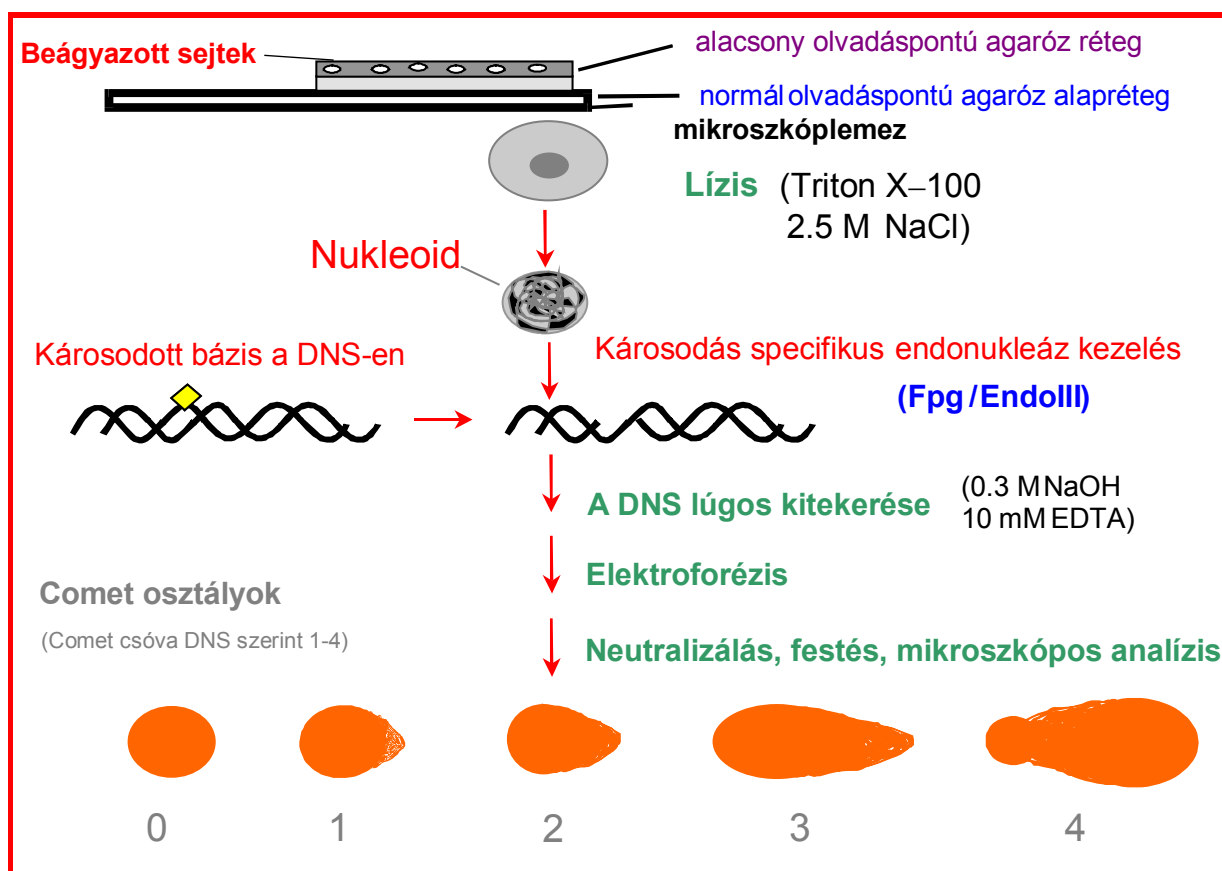
5.2.4. A Comet assay

Az alkalmazott módszer az Ostling és Johanson (Ostling 1984) által kidolgozott “egy sejt gélelektroforézis” technika továbbfejlesztett változata. A módszer elvi alapjait a **13. ÁBRA** mutatja be. A Comet assay alapvetően a DNS száltöréseinek kimutatására alkalmas a sejtmagok egyenkénti fluorescens mikroszkópos analízisével. Neutrális körülmények között a kettősszalú törések (Olive 1992), alkalikus körülmények között az egyesszalú törések és ún. lúg-labilis helyek detektálhatók (Gedik 1992).

Azok a DNS károsodások, amelyek felismerésére specifikus endonukleázok léteznek (Fpg az oxidált purinok, Endonukleáz III (EndoIII) az oxidált pirimidinek felismerésére, kihasítására képes), ezen enzimek alkalmazásával száltörésekké alakíthatók, így a Comet assay-vel szintén kimutathatók (Collins 1993; 1995; 1997). A vizsgálat során a tesztelni kívánt DNS károsító ágenssel kezelt, illetőleg valamely ágens feltételezett hatása alatt álló (pl. beteg szervezetből vett) sejtmintát használnak (**13. ÁBRA**).

A mintának egyedi sejtekből álló szuszpenzióknak kell lennie, ezért szövetminta esetén a sejteket a lehető legkevesebb preparatív károsodást okozva szét kell választani. A sejtek analízise (feltárása, enzimátikus kezelése, elektroforézise majd festése és mikroszkópos

vizsgálata) a tárgylemez felszínére rétegzett vékony agaróz gélben történik, amelybe a sejtek még élő állapotukban kerülnek beágyazásra.

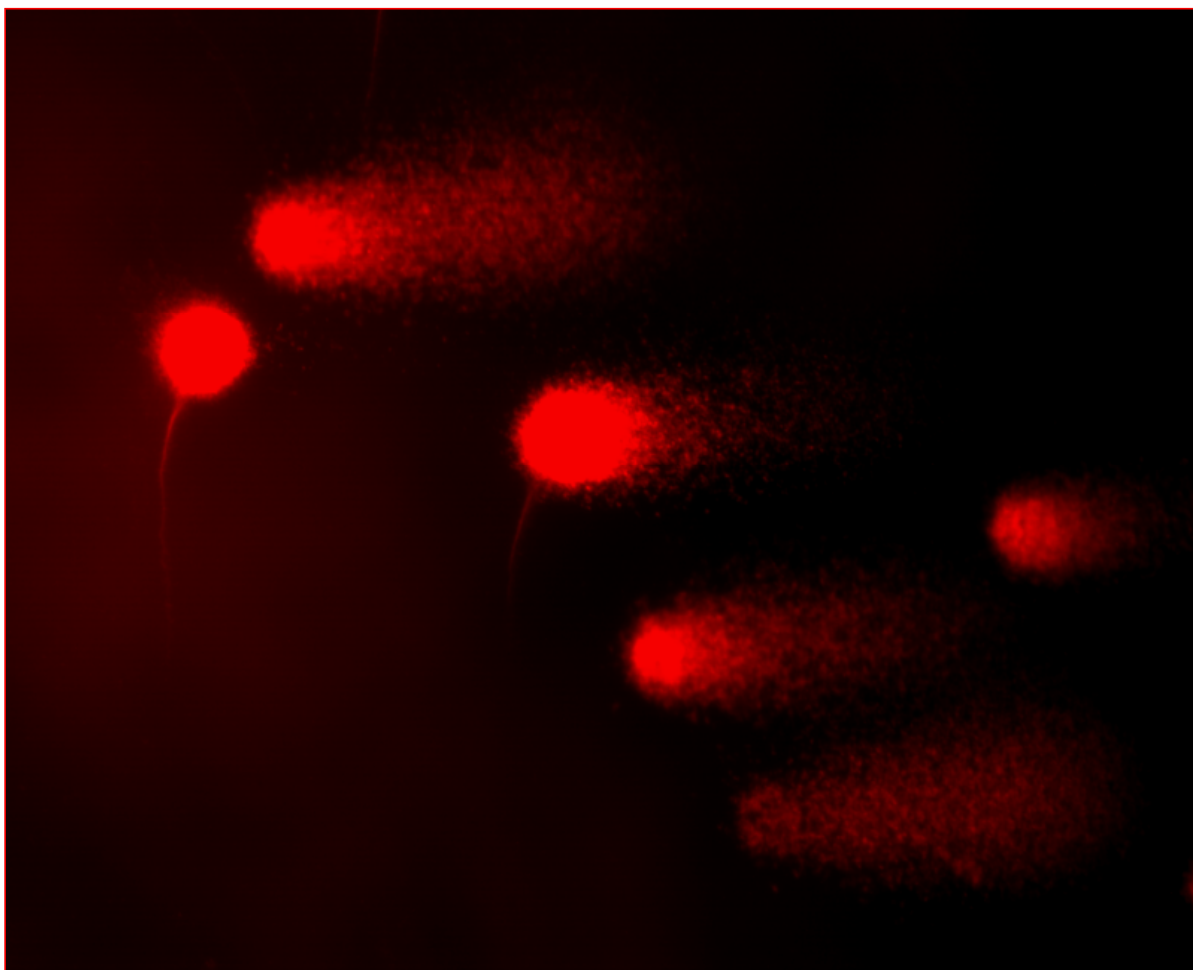


13. ÁBRA. A Comet assay. A vizsgálandó sejteket agarózba ágyazzuk és tárgylemezre rétegezzük, majd lízáljuk. Az oxidatív DNS károsodásokat specifikus endonukleázokkal (Fpg, EndoIII) száltöréssé alakítjuk, majd a fellazult szálak lúgos kitekerése után a nukleoidokat elektroforetizáljuk. Az anód irányába a károsodás mértékével arányosan kiáramló DNS üstökös alakot képez. A csóvába kiáramló DNS mennyisége fluorescens mikroszkópban kvantitatívan analizálható.

A DNS károsodások hatására keletkező (vagy enzimes kezeléssel a károsodás helyén indukált) száltörések következtében az elektroforézis során a sejtmagból egy üstökösszerű képződmény alakul ki. Az agarózban elmozdulni képtelen, nagymólsúlyú DNS-t tartalmazó fejből az elektromos térben az anód irányába kihurkolódó csóva alakul ki, melyben a DNS tartalom egyenesen arányos a száltörésekkel (Olive 1990) és mind vizuális értékeléssel (0-tól 4-ig terjedő skálán való osztályozással), mind számítógéppel, speciális szoftverek alkalmazásával kvantitatívan értékelhető. A fluorescens *in situ* hibridizációval kiegészített Comet analízis nagyobb kromoszóma régiók vagy egyedi szekvenciák vizsgálatát is lehetővé teszi (McKelvey-Martin 1998).

Vizsgálatunkban Alzheimer-kóros betegek véréből frissen, Histopaque gradiens centrifugálással izolált limfocitákban Comet assay-vel detektáltuk a DNS egyes szálú töréseit

ill. az oxidált bázisokat, melyeket enzimatikusan alakítottuk át a módszerrel detektálható száltörésekké. Az elektroforézis hatására a sejtmagokból kialakuló üstökös-szerű fehérjementesített nukleoidok képét mutatja be a **14. ÁBRA.**



14. ÁBRA. Alzheimer kóros beteg hidrogén-peroxiddal kezelt limfocitáinak képe a Comet assay elvégzése után (fluorescens mikroszkópos felvétel, 400x-os nagyítás, etidium-bromidos festés)

5.2.4.1. A sejtek beágyazása és lízise

Az általunk használt protokoll a Singh és Collins által (Collins 1996; Singh 1988) kidolgozott alkalikus elektroforézist alkalmazó módszer, kisebb módosításokkal.

70 µl 0.5%-os PBS-ben oldott normál olvadáspontú agarózt rétegeztünk a durvára csiszolt felszínű mikroszkóp lemezekre, lefedtük fedőlemezzel és 4°C-on hagytuk megszilárdulni. A leülepített limfocitákat az utolsó csepp PBS-ben óvatosan felráztuk és 70 µl 0.5%-os (PBS-ben oldott) alacsony olvadáspontú agarózt adtunk hozzájuk, majd a fedőlemez eltávolítása után a már megszilárdult első agaróz rétegre terítettük. Új fedőlemezzel lefedve a sejtes agaróz réteget is hagytuk megszilárdulni 5 percig 4°C-on. Ezután a fedőlemezt

eltávolítottuk és lízis puffert rétegeztünk a vízszintesen tartott lemezekre, majd 1 óráig inkubáltuk 4°C-os hűtőszekrényben. A lízissel a fehérjéket távolítjuk el a sejtmagból és a visszamaradó, gélbe ágyazott ún. nukleoid hozzáférhetővé válik az enzimatis kezelések számára.

5.2.4.2. *Enzimes kezelések*

A lízist követően a lemezeket 3-szor 5 percig mostuk 1xEndonukleáz pufferrel. A puffert papírtörölközőre csorgattuk le a lemezek óvatos oldalra billentésével. Az utolsó mosást követően 50 µl 1xEndonukleáz pufferben 3000x hígított Fpg (Formamido-pirimidin-DNS-glikoziláz, amely az oxidált purinok DNS-ből történő kivágását végzi) illetőleg 1000x hígított EndoIII (Endonukleáz III, amely az oxidált pirimidinek kihalásáért felelős) enzimet adtunk hozzá. (Az enzimeket túltermelő *E. coli* törzsekből A. Collins és mtsai. (Rowett Research Institute, UK) izolálták és bocsájtották rendelkezésünkre). Az alkalmazott enzim koncentrációkat az adott preparátumból készített hígítási sorozat aktivitásának tesztelése nyomán választottuk. Az enzimatis kezelés Fpg enzim esetén 30, EndoIII esetén 45 percig tartott 37°C-on nedves kamrában.

5.2.4.3. *Elektroforézis*

Az enzimatis emésztést követően a tárgylemezeket horizontális elektroforézis tankba helyeztük frissen készített, 4°C-ra hűtött alkalikus elektroforézis pufferbe. A lemezeket 20 percig inkubáltuk a pufferben, hogy a törött DNS szálak denaturálódjanak az elektroforézis megkezdése előtt. Az elektroforézis 20 percig 25 V-on 300 mA áramerősséggel folyt, jégbe állított horizontális tankban. Az elektroforézis után a tankból kivett lemezeket vízszintes tálcára helyezve 3x 5 percig 1 ml 4°C-os neutrálizáló puffer rárétegzésével, majd lecsorgatásával mostuk, majd 50 µl 500 µg/ml (PBS-ben) etidium-bromid rácsöppentésével a lemezeket 5 percig festettük, fedőlemezzel lefedtük és fluorescens mikroszkóppal analizáltuk.

5.2.4.4. *Mikroszkópos analízis*

A lemezeket 400x-os nagyításban vizsgáltuk (Nikon 40x Fluor lencse) fluorescens mikroszkóppal (Nikon Eclipse E400 mikroszkóp, Hamamatsu Digitális kamerával,

Microcolor Model RGB-MS-C board (CRI, INC, Boston NA). Az analízist a Komet4 szoftver segítségével (Kinetic Imaging Ltd., Liverpool UK) Észak-Írországból, a University of Ulster, School of Biomedical Sciences, Cancer and Aging Group laboratóriumában végeztük.

5.2.4.5. Statisztikai analízis

A statisztikai analízist Komet4 szoftver által szolgáltatott ún. (az üstökös fejében és csóvájában mért fluoreszcencia intenzitások arányából számított) “% Comet csóva DNS” adatok alapján kétmintás Student t-teszt alkalmazásával végeztük. Mintánként 50 sejt mért “% Comet csóva DNS” értékét összegeztük, majd a kontroll és Alzheimer-kóros csoportban átlagoltuk. A $p < 0.05$ értékeket vettük statisztikusan szignifikánsnak.

6. EREDMÉNYEK

6.1. Az UV fototermékek szekvenciaspecifikus reparációjának vizsgálata a pericentrikus régióban kvantitatív PCR-rel

6.1.1. A kvantitatív PCR célszekvenciájának kiválasztása és jellemzése

A pericentrikus heterokromatin reparációjának vizsgálatára egy olyan célszekvenciát választottunk, amely az UV károsodások vizsgálatára A+T gazdag régiója és a humán kromoszómákon való szétszórtsága révén jó célpontnak tűnt.

A chAB4 szekvencia család alacsony kópiaszámú, a haploid emberi genomban kb. 50 kópiás repetitív elem, amely 10 kromoszómán található meg (1,3,4,9,13,14,15,21,22 és azY kromoszómán).

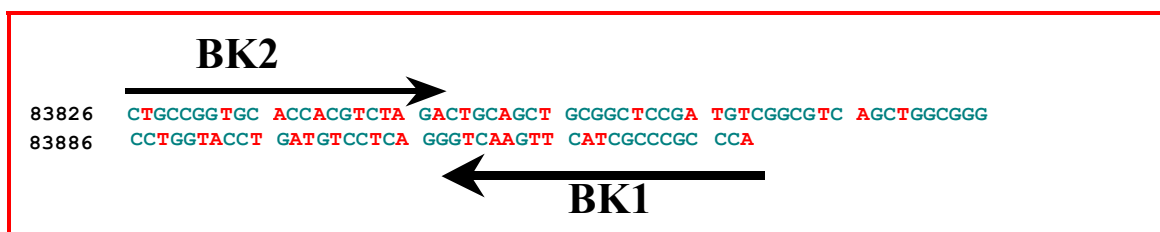
A chAB4 egységek, melyeknek az általunk amplifikált célszekvencia egy kb. 2 kb-os részlete (**15. ÁBRA**), hatalmas hajtűhurokként (kb. 240-260 kb) fordulnak elő a genomban.

Az általunk kidolgozott módszer alapja az UV fototermékek DNS amplifikációt gátló hatásán alapul. A PCR reakcióban az UV károsodásoknál a Taq polimeráz leáll, nem írja végig a DNS szálát. Így a PCR termék mennyisége egy azonos mennyiségű, de intakt templátot tartalmazó reakcióból képződő össztermékhez képest a léziók számával arányosan csökken (Ponti 1991, Kalinowski 1992; Murray 1992). A chAB4 célszekvencián, már igen kis UV dózisoknál is kellően nagyszámú DNS károsodás képződik, ezért a róla képződő PCR termék mennyiségét az UV dózis ill. a DNS reparáció befolyásolja.

A PCR reakcióba bemért templát DNS mennyiségének nyomonkövetésére szükséges volt egy olyan belső kontrollt alkalmazni, amely nem változik az UV besugárzás függvényében, azaz a róla képződő termék mennyisége csak az amplifikáció körülményeitől függ. Ezért a chAB4 repetitív elemben kiválasztottunk egy olyan rövid, 103 bp-os szakaszt (cSac10), amely mintegy 15 kb-ra helyezkedik el a célszekvenciától és amelyen a szakasz rövide és bázisösszetétele miatt igen kis valószínűséggel képződnek UV fototermékek (**16. ÁBRA**). Ez a szakasz igen GC gazdag, a bázisarányok itt fordítottak a nagy fragmenthez képest.



15. ÁBRA. A chAB4 repetitív elem UV-célszekvenciaként alkalmazott részlete, az ún. “nagy termék” az amplifikációhoz használt primerekkel.



16. ÁBRA. A “kis” PCR termék (cSac10) szekvenciája és az amplifikáló primerek.

A lehetséges fototermékek mennyisége a szekvenciában előforduló szomszédos pirimidinek mennyiségéből számítható (3. TÁBLÁZAT). Az egyes dimerek előfordulási

gyakorisága a két termék hosszaránya (~1:20) és a szekvenciából prediktálható fototermékek mennyisége alapján kiszámítható. Kb. 1:25 az összes dimer aránya a két szakaszon, de átlagosan a TT dimerek képződése 4x gyakoribb, tehát kb. 2000-szer (20x25x4) kisebb valószínűséggel fordul elő pirimidin dimer képződés a kis PCR fragmenten, mint a nagyon, ezért amplifikációja alacsony UV dózissal a besugárzástól függetlennek tekinthető.

	CT	TC	CC	TT	összesen
NAGY PCR fragment	223	202	80	502	1007
KIS PCR fragment	13	11	18	0	42

3. TÁBLÁZAT. A lehetséges fototermékek (CT, TC, CC, TT-pirimidin dimerek ill. 6-4 fototermékek) mennyisége a PCR kis és nagy fragmentjén

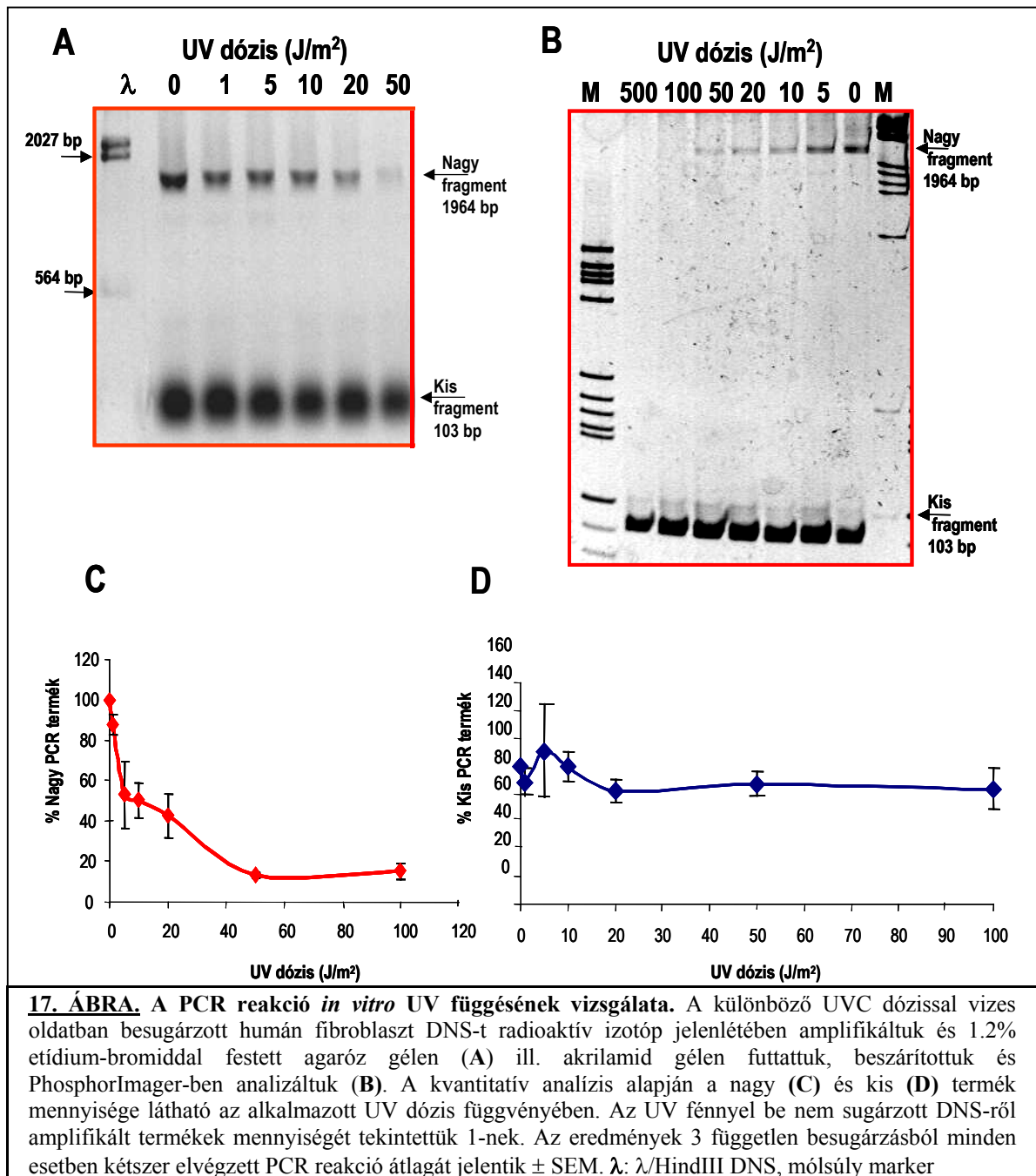
A PCR reakcióban tehát 4 primer alkalmazásával két fragmentet amplifikáltunk: egy **nagy terméket**, ami adott mennyiségű templát DNS-ről az UV behatás ill. a reparáció függvényében változó mennyiségű, ill a **kis terméket**, aminek mennyisége az említett faktoroktól független. A kvantitatív PCR módszer UV fototermékek vizsgálatára való alkalmasságának demonstrálására számos kontroll kísérletet végeztünk el.

6.1.2. A chAB4 alapú PCR reakció, mint kvantitatív DNS reparáció vizsgálati módszer

6.1.2.1. A módszer *in vitro* UV érzékenységeinek tesztelése

A PCR módszer UV érzékenységeinek vizsgálatát izolált humán fibroblaszt DNS-en végeztük. 50 ng DNS-t desztillált vízben oldva 20 µl-es csöpp formájában sugároztunk be 254 nm-es UV fénnel különböző ideig, majd a 4 primer (chAB4F2M, chAB4RM, BK1, BK2) jelenlétében amplifikáltuk. A PCR reakciót radioaktív izotóp hozzáadása mellett végeztük. A PCR termékeket etidium bromiddal festett agaróz gélen megfuttatuk. Az elektroforézis fotóján a nagy termék (chAB4, 1964 bp) jól láthatóan csökken az UV dózis függvényében, míg a kis fragment mennyisége széles UV dózis tartományban nem változik (**17A. és B. ÁBRA**). Akrilamid gélen futtatott, fixált és vacuum szárított gél analízisével a PCR termékeket kvantitatívan értékeltük (**17B.,C. és D. ÁBRA**). A kvantitatív analízis alapján a módszer alacsony UV dózis (akár 1 J/m²) hatására képződő károsodások kimutatására is alkalmas és ez alapján kimondható, hogy vizsgálatunkban a detektált nagy

PCR termék mennyisége fordítottan arányos az UV dózissal, míg a kis fragment mennyisége független az UV besugárzástól. A kalibrálás során az UV fénnyel be nem sugárzott kontroll DNS mintáról amplifikált kis fragment mennyiségét tekintettük 1-nek, majd az UV fénnyel besugárzott mintához viszonyítottuk és a kapott viszonzszám alapján a nagy fragment mennyiségét normáltuk. A **17B.** és **C. ÁBRÁN** az UV dózis függvényében az ehhez viszonyított PCR terméket tüntettük fel %os értékben.



6.1.2.2. A kvantitatív PCR *in vivo* UV érzékenysége vizsgálat

A módszer UV érzékenységét a sejtben lévő, kromatinba ágyazott DNS-en is vizsgáltuk, mivel különböző sejtvonalak reparációjának nyomonkövetésére kívántuk alkalmazni. Diploid humán fibroblaszt sejttényeszeteket különböző dózisú UVC fénnel sugároztunk be, majd azonnal DNS-t izoláltunk belőlük és a DNS-eken elvégeztük a PCR reakciót radioaktív izotóp jelenlétében (**18. ÁBRA**).

A módszerrel már igen alacsony dózissal, 1 J/m^2 -nél mintegy 20-30 %-os csökkenést detektáltunk a célszekvencia (nagy fragment) amplifikációjában (**18. ÁBRA**). Az emberi sejtek számára már jórészt letális 30 J/m^2 -ig növelve az alkalmazott dózist, a besugárzás ellenére a DNS-nek mintegy fele marad amplifikálható. A sejtes formában besugárzott DNS amplifikációjánál 10 J/m^2 fölött a PCR termék nem csökken lineárisan az UV dózissal, az amplifikáció telítést mutat, ami valószínűleg az utóbbiban lévő kromatin szerveződés következménye. A csupasz DNS amplifikációja csak kb. 50 J/m^2 értéknél mutat telítést (**18. és 18. ÁBRA** valamint **4. TÁBLÁZAT**).

A célszekvencia jelentős TT tartalma miatt (502 lehetséges timidin dimer/1964 bp) extrém módon érzékeny az UV fényre. Az *in vivo* UV érzékenységi görbe alapján (**18A. ÁBRA**) látható, hogy a módszer kellően érzékeny és jól alkalmazható alacsony, "fiziológias" UV dózisok által kiváltott DNS károsodások vizsgálatára. A módszer további alkalmazása során a sejteket 3 J/m^2 dózissal sugároztuk be.

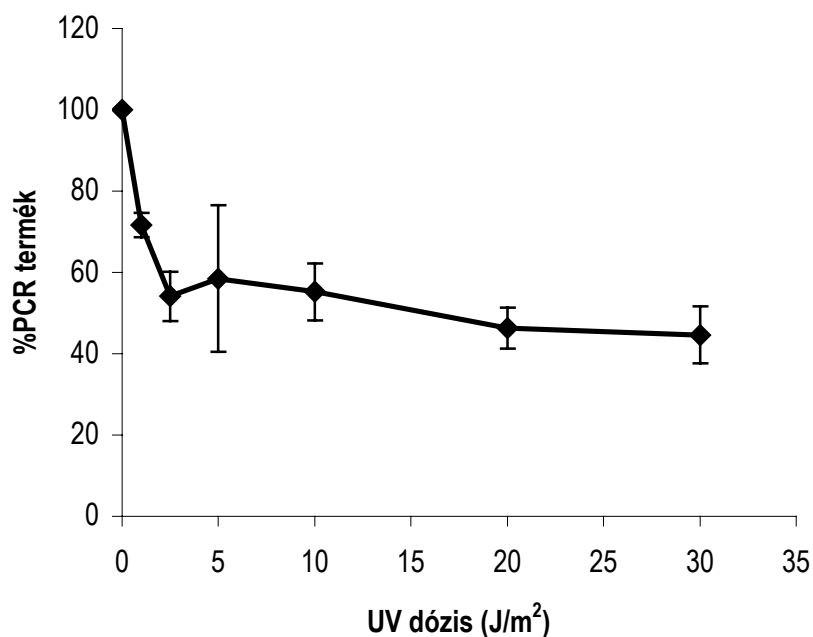
Egy adekvát kvantitatív PCR módszer (QPCR) esetén a DNS károsodások detektálásához elengedhetetlen feltétel, hogy az amplifikáció terméke arányos legyen a kiindulási DNS templát mennyiségével. Ennek eléréséhez a PCR reakciót exponenciális fázisban kell tartani (Kalinowski 1992; Van Houten 2000). A PCR termékek mennyiségének a kiindulási templát DNS-től való függése a **19A és B. ÁBRÁN** látható. 50-100 ng templát DNS koncentráció tartományban a bemért DNS mennyiségének kétszerezése esetén mindkét keletkező PCR termék a kiindulási templát DNS mennyiség kétszerese. Ebben a tartományban érvényesül az exponenciális amplifikáció követelménye, tehát a további vizsgálatoknál a reakcióba bemért templát DNS mennyiségét 50-60 ng-nak választottuk.

A két termék eltérő nukleotid összetétele miatt $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP izotópos jelölést alkalmaztunk, ami jobban megfelel GC gazdag kis fragment jelölésére. A templát függés tesztelésénél az eltérő izotópos jelölődés miatt kaptunk a két fragmentnél eltérő mennyiségű radioaktív jelet azonos mennyiségű templátról. A radioaktív jel erőssége vizsgálatainkban a PhosphorImager-

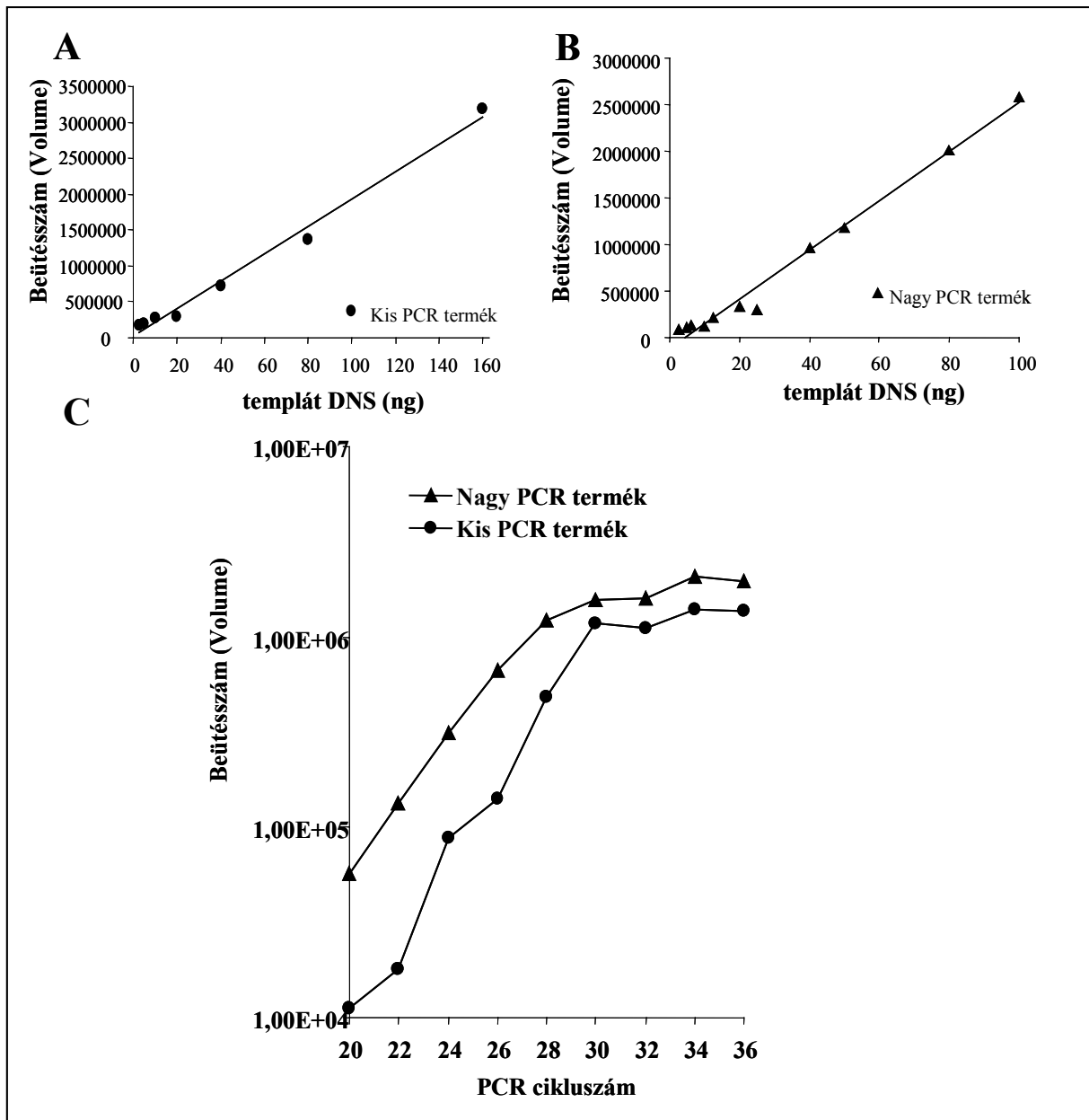
es kvantitálást nem zavarta, ugyanis az így detektált jel sokkal szélesebb tartományban emelkedik lineárisan a radioaktivitással, mint a Röntgen-filmen detektált jel. Az általunk használt beütésszám (Volume) nem érte el a telítési tartományt.

A					B		
UV dózis(J/m ²)	% Kis PCR termék	SEM Kis termék	% Nagy PCR termék	SEM nagy termék	UV dózis(J/m ²)	% Nagy PCR termék	SEM
0	100%	0%	100%	0%	0	100	0
1	88%	10%	88%	5%	1	71,69	3
5	111%	34%	53%	16%	2,5	54,1	6
10	99%	10%	50%	9%	5	58,47	18
20	82%	9%	43%	11%	10	55,21	7
50	87%	9%	13%	1%	20	46,28	5
100	84%	15%	15%	4%	30	44,61	7

4.TÁBLÁZAT. A *in vivo* és *in vitro* UV besugárzás hatásának vizsgálata kis és nagy PCR termék amplifikációjára. A feltüntetett *in vitro* (A) és az *in vivo* (B) UV dózisok alkalmazása után detektált % PCR termék mennyisége (17. és 18. ÁBRA nyomán)



18. ÁBRA. A PCR reakció UV érzékenységének tesztelése *in vivo* UV besugárzással. Diploid humán fibroblaszt sejtkultúrát különböző dózisú UV fénnyel kezeltünk, a sejtekből DNS-t izoláltunk és radioaktív izotóp jelenlétében elvégeztük a PCR reakciót, a termékek mennyiségét PhosphorImagerben kvantitáltuk. Az UV dózis függvényében az amplifikálódó nagy PCR termék mennyiségét ábrázoltuk. Az UV fénnyel nem kezelt, ún. kontroll sejtekről amplifikált nagy fragment mennyiségét tekintettük 100%-nak. Az eredmények három független besugárzásból származó DNS-en minden esetben kétszer megismételt, duplikátumban megfuttatott PCR reakció termékeinek átlagát $\pm$ SEM jelölik.



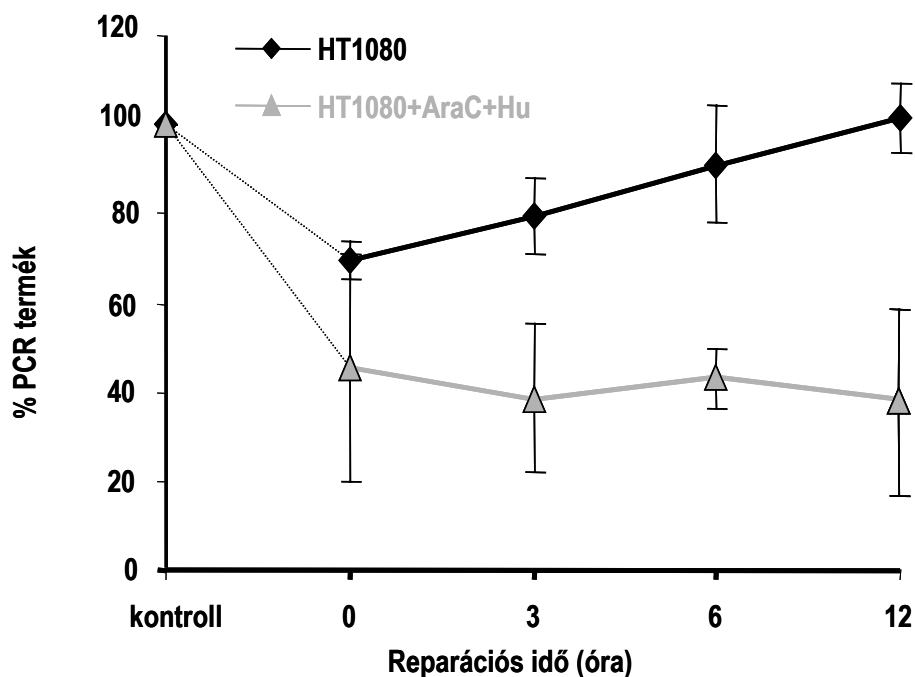
19. ÁBRA. A PCR reakció templát és ciklusszám függése. A templát DNS mennyiségének függvényében (A és B) és a PCR ciklusszámok emelésével (C) a növekvő PCR termék mennyiségeket a radioaktív jel beütésszámaként (ún Volume, a PhosphorImager által detektált, a cpm-mel arányos származtatott mértékegység) detektáltuk.

Ellenőriztük a reakció ciklusszám-függését, azt a tartományt keresve ahol az amplifikált DNS mennyisége a ciklusszámok növelésével még arányosan emelkedik, nem ér a telítési szakaszba. A **19C. ÁBRÁN** látható, hogy a 28-30 ciklusig a reakció még az exponenciális fázisban van. A két termék amplifikációs görbéje nagyjából párhuzamos lefutású, a két primerpár nem gátolja egymás működését. A 30. ciklus után a telítési fázis következik, ezért a QPCR módszer alkalmazásánál a továbbiakban a 28 ciklussal történő

amplifikációt alkalmaztuk. A két termék eltérő nukleotid összetétele miatt $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP izotópos jelölést alkalmaztunk, ami jobban megfelel GC gazdag kis fragment jelölésére. A templátfüggés tesztelésénél az eltérő izotópos jelölődés miatt kaptunk a két fragmentnél eltérő mennyiségű radioaktív jelet azonos mennyiségű templátról. A radioaktív jel erőssége vizsgálatainkban a PhosphorImager-rel történő kvantitálást nem zavarta, ugyanis az így detektált jel sokkal szélesebb tartományban emelkedik lineárisan a radioaktivitással, mint a Röntgen-filmen detektált jel. Az általunk használt beütésszám nem érte el a telítést.

Tesztelni kívántuk, hogy a QPCR alkalmas-e sejtvonalak DNS reparáció kinetikájának vizsgálatára. A fototermék detektálására alkalmas QPCR módszer esetén azonos mennyiségű DNS-ből kiindulva a relatív PCR termék (a változó mennyiségű nagy termék kalibrálva az állandó mennyiségű kis termékre) az UV besugárzás következtében csökken. Ha a vizsgálandó, UV kezelt sejteknek különböző reparációs időket hagyunk, az idő előrehaladtával a PCR termék mennyisége a reparációs folyamatok által eltávolított polimeráz gátló léziók csökkenése miatt emelkedni fog. Teljes reparáció esetén a PCR termék eléri az UV fénnel nem kezelt, kontroll sejt DNS-éből amplifikált relatív PCR termék mennyiségét (ezt tekintjük 1-nek). A HT1080 emberi fibroszarkóma sejtvonalon elvégeztük a reparáció kinetikai vizsgálatot. A **20. ÁBRÁN** látható, hogy a DNS szintézis inhibitorokkal nem kezelt sejtvonalon hatékony reparációval 12 óra alatt eltávolítja az összes PCR-t gátló fototerméket és a PCR termék eléri a kontroll sejtvonallal amplifikált termék mennyiségét.

Ha a sejt kultúrát DNS szintézis gátlókkal kezeljük (AraC+Hu), akkor a reparáció kezdeti, károsodást felismerő, kivágó folyamatai végbemennek (**3A-D. ÁBRA**), a lézió helyének újraszintetizálása viszont nem (**3E. ÁBRA**). Ilyenkor száltörések maradnak a templáton és a Taq polimeráz nem képes amplifikálni a hibás szálakat. Ilyen sejt kultúrából amplifikált DNS-ben a PCR termék az idő függvényében nem emelkedik, mivel nem megy végbe a reparáció. A **20. ÁBRÁN** látható, hogy az y-tengelyen feltüntetett, UV sugárzást nem kapott kontroll DNS-ről amplifikált, 100 %-nak tekintett PCR termékhez viszonyítva az UV besugárzást kapott sejtek DNS-éről amplifikált % PCR termék először csökken (órás minta), majd a reparációs idő előrehaladtával emelkedik, végül eléri a kontroll szintjét. Ezzel szemben az AraC+Hu kezelt sejt nem reparál, a PCR termék mennyisége a reparáció során nem emelkedik. Ez a vizsgálat megerősíti, hogy az általunk kifejlesztett kvantitatív PCR módszer alkalmas az UV fototermékek reparáció kinetikai vizsgálatára.



20. ÁBRA. HT1080 sejtvonal reparáció kinetikájának vizsgálata DNS szintézis inhibitorok jelenlétében és nélkülük. HT1080 sejteket duplikátumban növesztettünk, 3 J/m² dózisú UVC fénnyel kezeltünk. Egy sorozat sejthez DNS szintézis inhibitorokat (AraC+Hu) adtunk (▲), a másik sorozatot (◆) kezeletlenül hagytuk és azonnal, vagy a feltüntetett reparációs idők után a sejtekből DNS-t izoláltunk majd elvégeztük a QPCR reakciót. A kis termékre kalibrált nagy PCR termék (ún. relatív PCR termék) időbeli változását ábrázoltuk két PCR reakció két-két példányban való futtatásának átlagaként ± SEM.

6.1.3. A QPCR alkalmazása emberi és humán/rágcsáló hibrid sejtvonalak reparáció kinetikájának vizsgálatára

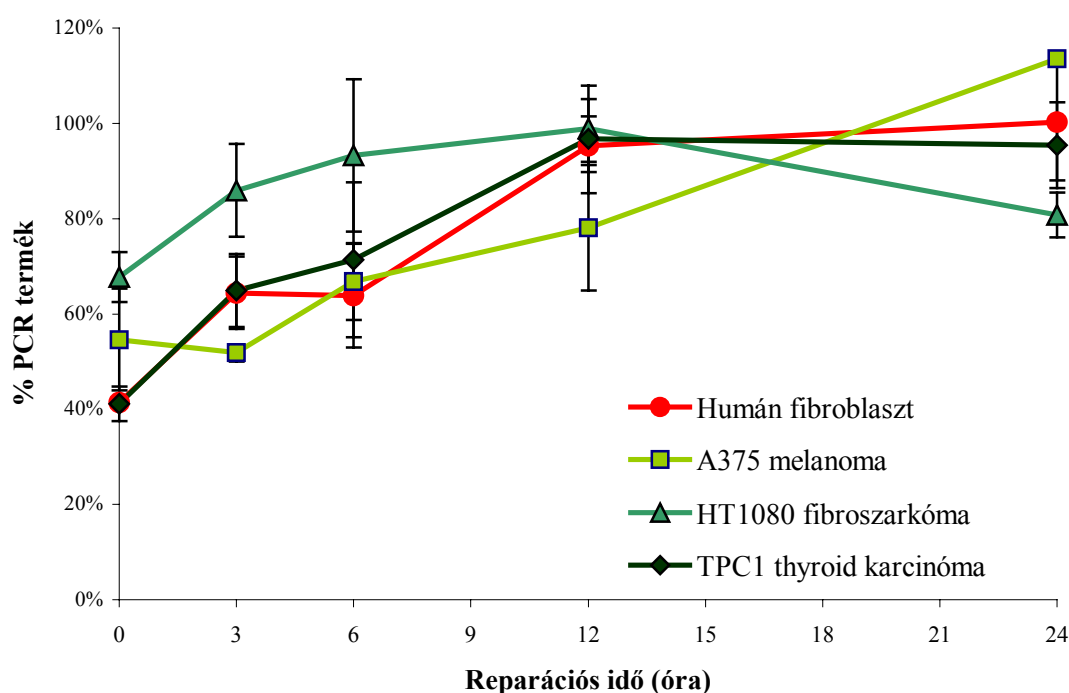
A fentiekben részletezett, optimalizált PCR körülményeket alkalmazva vizsgáltuk emberi és rágcsáló/humán hibrid sejtvonalak reparációs kinetikáját a heterokromatinban. A vizsgált sejtvonalak megnevezése **5. TÁBLÁZAT**-ban látható.

A sejtvonalak reparációs kinetikáját a **21-23. ÁBRA** mutatja. A kvantitatív analízis során az UV fénnyel be nem sugárzott kontroll sejt DNS-éről amplifikált kis fragment mennyiségét tekintettük 1-nek, majd az UV fénnyel besugárzott sejtek DNS-éről amplifikált kis fragment mennyiségét a kontrolléhoz viszonyítottuk. A kapott viszonyszám alapján a nagy fragment mennyiségét normáltuk és a kontroll nagy fragment %-ában ábrázoltuk.

1.	Normál diploid humán fibroblaszt
2.	HeLa méhnyak karcinóma
3.	A375 melanóma
4.	RVH421 melanóma
5.	HT1080 fibroszarkóma
6.	TPC1 thyroid papilláris karcinóma
7.	EJ30 húgyhólyag karcinóma
8.	GM01630 XPA
9.	GM02994 XPA
10.	GM02096 XPC
11.	A9+15 egér A9+humán 15-ös kromoszóma
12.	15A kínai hörcsög, CHO sejt +humán 15-ös kromoszóma
5. TÁBLÁZAT. A QPCR módszerrel vizsgált sejtvonalak	

A különböző sejtvonalak reparációs kinetikai adatai heterogén képet mutatnak. A normál reparációjú, kontrollként alkalmazott diploid humán fibroblaszt gyorsan reparálja a heterokromatikus chAB4 szekvenciát, 12 óra alatt az összes fototerméket eltávolítja (**21. ÁBRA és 6. TÁBLÁZAT**). Bizonyos sejtvonalak (HT1080, TPC1) hasonlóan gyors reparációt mutatnak. Ez a reparációs hatékonyság megfelel a transzkripcionálisan aktív szakaszok reparációs rátájának (Bohr 1988). Az A375 sejtvonala 12 óráig lassabb, a globál genom reparációs rátájának megfelelő kinetikával reparál (~35 % reparáció 8 óra alatt (Bohr 1988)).

Reparációs idő (óra)	Hum. fibr	HT1080	TPC1	A375
0	0 ± 8	0 ± 5	0 ± 4	0 ± 11
3	39 ± 11	57 ± 10	47 ± 8	-6 ± 2
6	38 ± 10	80 ± 16	59 ± 16	27 ± 8
12	91 ± 12	97 ± 9	109 ± 5	52 ± 13
24	100 ± 16	41 ± 5	106 ± 9	131 ± 1
6. TÁBLÁZAT. A jól reparáló sejtvonalak reparációs % értékei. Az UV fénnel nem kezelt DNS-ről amplifikált PCR termék mennyiségét tekintettük 100% reparációnak, míg a besugárzás utáni, 0 órás minta DNS-éről amplifikált PCR terméket 0% reparációnak. A táblázat értékei 3 független kísérlet átlagát jelölik ± SEM.				



21. ÁBRA. A chAB4 régióban hatékony reparációt mutató sejtvonalak PCR analízise. Az UV fénnyel nem kezelt sejt DNS-éből amplifikált nagy PCR termék mennyiségét tekintettük 100%-nak. A grafikonok 3 független kísérlet átlagát jelölik $\pm$ SEM. Minden DNS-t kétszer analizáltunk PCR-rel és duplikátumban futtattunk meg akrilamid gélen.

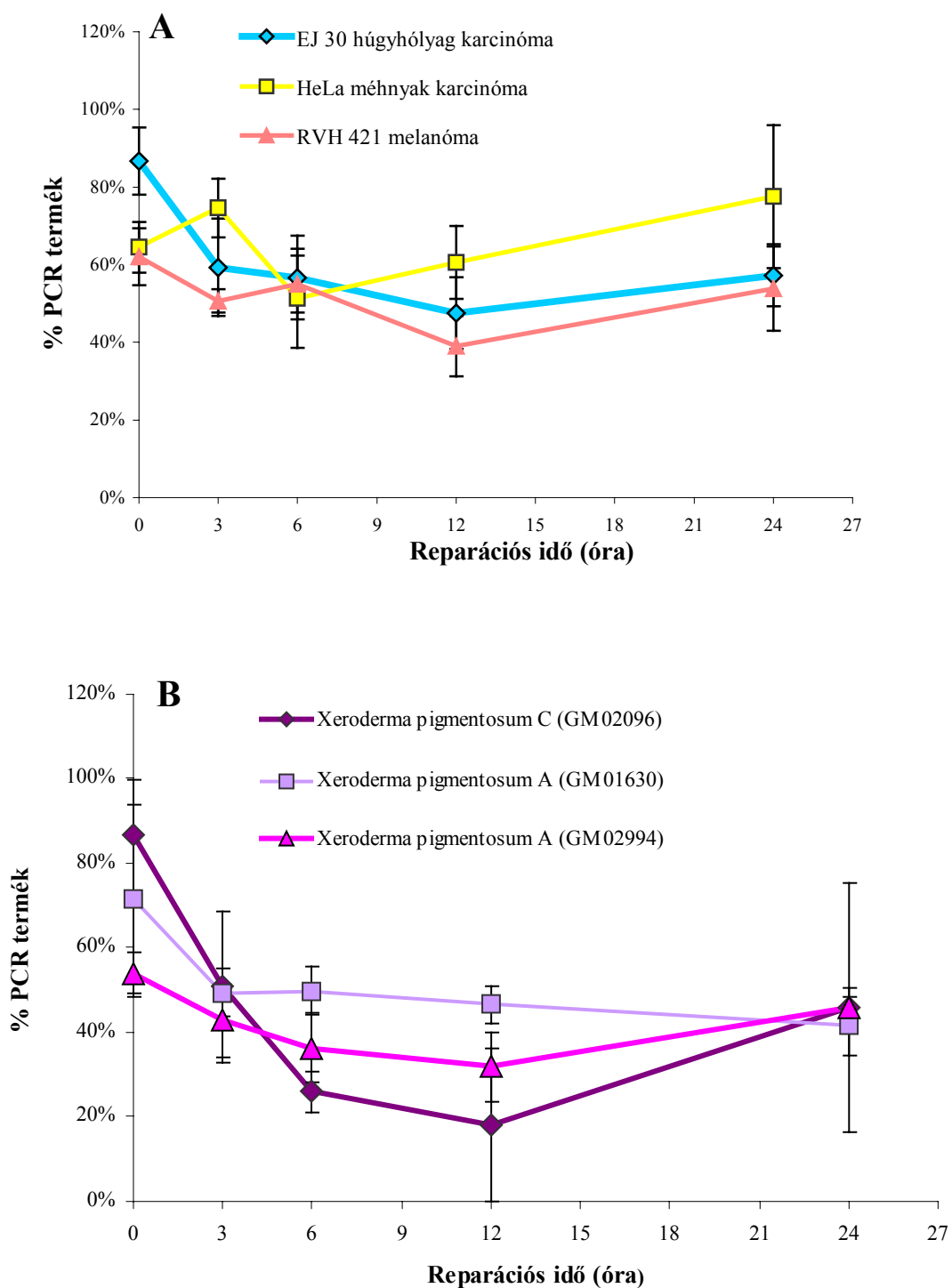
Bizonyos tumoros sejtvonalak (RVH421, EJ30, HeLa) és a reparációs szindrómában, a Xeroderma pigmentosumban szenvedő betegekből származó sejtek (XPC és a két XPA sejtvonal) szinte egyáltalán nem reparálják a heterokromatinnak ezt a régióját (22.A és B. ÁBRA).

Ezen sejtek esetében a relatív PCR termék az idő függvényében nem emelkedik, hanem stagnál vagy csökken. A Xeroderma pigmentosum C sejtek esetében a reparáció hiánya nem meglepő, hiszen kizárólag a globál genom reparációs útvonal károsodásokat felismerő enzime, az XPC fehérje hiányzik. Bár a transzkripcionális reparáció ezekben a sejtekben megmaradhat, és kb. 30% reparációs aktivitás az átíródó génekben működik, a heterokromatin, és így a chAB4 szekvencia reparációja minden bizonnyal teljesen hiányzik. Az XPA sejtvonalakban a mutáns XPA fehérje hiánya, (ami jelenlegi tudásunk szerint a károsodás pontosabb azonosításában és a többi reparációs enzim toborzásában játszik szerepet mind a TCR, mind a GGR alrendszerben) szintén teljes reparációs defektushoz vezet. A Xeroderma pigmentosumban szenvedők fokozott UV érzékenységet mutatnak, ami *in vitro* jól

tükröződik az XP sejtvonalak UV túlélési görbéinek vizsgálatakor (**24. ÁBRA**). Ezen sejtvonalak számára már a fizológiásnak nevezhető 3J/m^2 UVC dózis is letális.

Az egyes sejtvonalak esetében a 0 reparációs időpontban tapasztalt PCR termék mennyiségi különbségek minden bizonnyal nem az eltérő UV érzékenységet tükrözik. A kapott különbségek nem szignifikánsak, mégis eltérő mennyiségű pirimidin dimér képződést sugallnak. Ez talán a sejttypusonként eltérő reparációs aktivitással magyarázható. A Xeroderma pigmentosum-os sejtvonalak reparáció deficiensek. A heterokromatin reparációjához a kompakt kromatinszerkezet fellazítása szükséges, aminek során a kromatin fehérjék és a reparációs fehérjék közötti szignál átadásnak valamilyen faktorokon át meg kell történnie. Elképzelhető, hogy ezekben a kromatin modifikációs folyamatokban a hibás NER fehérjék nem képesek résztvenni és az alap reparációs aktivitások hiányában (ami a kromatint némiképp fellazítaná) ezért a reparáció defektust mutató sejtekben a reparáció híján kompaktabb a kromatin állomány, míg a hatékony reparációjú sejtekben folyik a heterokromatinban a reparáció és ott ezért némileg nyitottabb. Ezért keletkezhet a hatékony reparációjú sejtekben több dimer azonos UV dózistra.

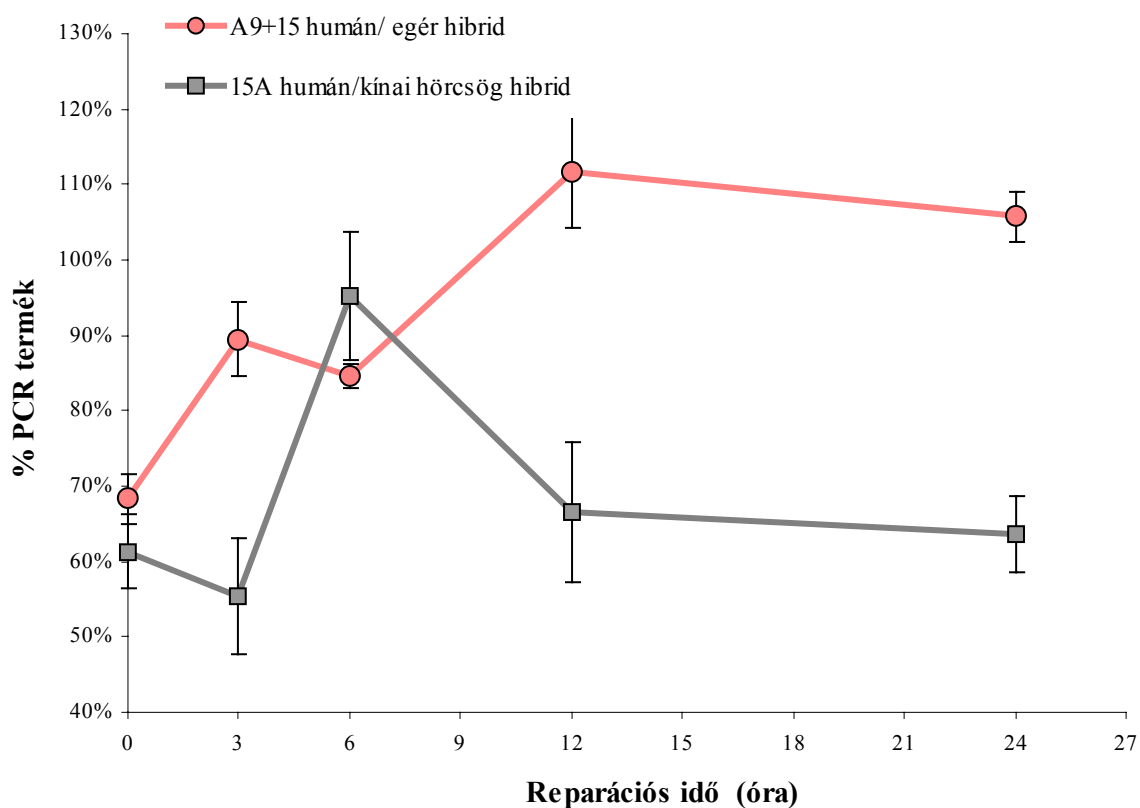
A tumoros sejtvonalak (RVH421, EJ30, HeLa) esetében kapott teljes reparációs defektus igen érdekes, de nem teljesen váratlan jelenség. A rágcsáló/humán hibrid sejtvonalak reparációs kinetikája viszont meglepő. A rágcsáló sejtekben chAB4 szekvencia nem fordul elő. A 15A és A9+15 hibrid sejtvonalak így csak a számfölötti 15-ös emberi kromoszómán hordozzák ezt a szekvenciát.



22. ÁBRA. A heterokromatikus chAB4 régióban reparáció defektust mutató tumoros (A) és Xeroderma pigmentosumos (B) sejtvonalak PCR analízise. Az UV fénnel nem kezelt sejt DNS-éből amplifikált nagy PCR termék mennyiségét tekintettük 100%-nak. A grafikonok 3 független kísérlet átlagát jelölik $\pm$ SEM. Minden DNS-t kétszer analizáltunk PCR-rel és duplikátumban futtattunk meg akrilamid gélen.

Míg a rágcsáló sejtekre igen lassú globál genom reparáció jellemző (CHO sejtek a teljes genom mindössze 15%-át reparálják 24 óra alatt (Bohr 1988), addig a vizsgált humán/rágcsáló hibrid sejtvonalak ezt az emberi szekvenciát gyorsan reparálják (**23. ÁBRA**). A hörcsög/humán hibrid 15A sejtvonala 6 óra alatt a károsodások 80%-át eltávolítja. Az A9+15 sejtek reparációja kissé lassabb; 6 óra alatt az UV fototermékek 50%-át, 12 óra alatt viszont 100%-át kijavítják, ami transzkripcióval kapcsolt reparáció hatékonyságának felel meg.

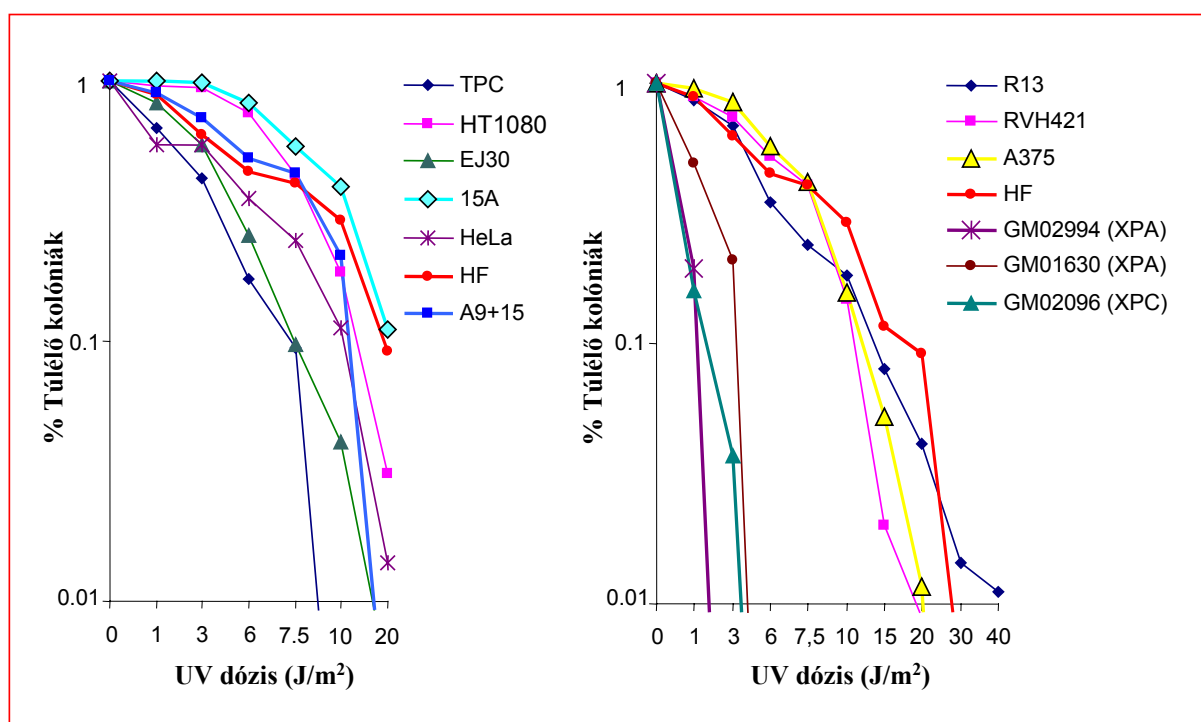
A 15A sejtvonala DNS-ének amplifikációjakor az UV kezelést követő 12 óra múlva következetesen a PCR termék csökkenését detektáltuk. Úgy tűnt, mintha a teljes reparáció ellenére a hörcsög sejtben apoptózis következtében a DNS fragmentálódása indult volna el. A 15A sejtvonala UV túlélési görbéje azonban nem utal apoptózisra (**24. ÁBRA**), a sejtek 10%-ának túlélését eredményező UV dózis megegyezik a diploid humán fibroblaszt sejtekével ($20 \pm 0.7 \text{ J/m}^2$) (**7. TÁBLÁZAT**).



23. ÁBRA. A humán/rágcsáló hibrid sejtvonalak reparáció vizsgálata Az UV fénnyel nem kezelt sejt DNS-éből amplifikált nagy PCR termék mennyiségét tekintettük 100%-nak. A grafikonok 3 független kísérlet átlagát jelölik $\pm$ SEM. Minden DNS-t kétszer analizáltunk PCR-rel és duplikátumban futtattunk meg akrilamid gélen

Másik lehetséges magyarázat erre a jelenségre az, hogy az UV besugárzás hatására valamiképpen a 15-ös humán kromoszóma eliminációja indul be. Ez a folyamat a DNS feldarabolódásához vezet, aminek eredményeképpen a nagy fragment mennyisége intakt templát híján hamarabb csökken, mint a kis PCR terméké. Így a relatív PCR termék csökkenését detektáljuk. Ezt a hipotézist erősítik az alkalikus Comet assay-vel kapott eredmények. UV fénnel kezeltük a chAB4 szekvenciát nem reparáló HeLa sejteket, a jól reparáló humán fibroblaszt sejteket és a vizsgálandó 15A sejteket. Alkalikus Comet assay-vel követtük nyomon a teljes genom reparációját 0, 6 és 12 órás mintavétellel. A DNS száltörések mennyiségét (ami a DNS károsodások helyén történő incíziós aktivitást tükrözi) a Comet csóva DNS intenzitásának növekedéseként detektáltuk. A diploid humán fibroblaszt sejt (**25C. ÁBRA**) esetén a Comet csóva DNS kezdeti emelkedés után a kontroll szintjére esik vissza, ami 12 óra alatt végbemenő 100%-os reparációt jelent.

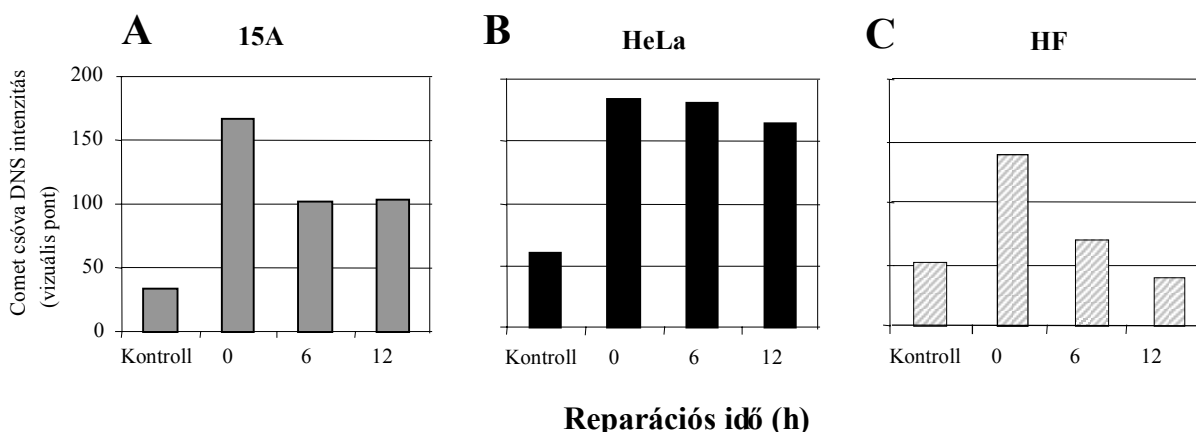
A HeLa sejtekben a száltörések mennyisége az idő előrehaladtával csak igen lassan csökken, 12 óra múlva a kezdeti száltöréseknek csak 10%-a távolítódik el (**25B. ÁBRA**). A 15A sejtekben a reparáció 6 óráig gyorsabb, mint a HeLa sejtekben, de lassabb, mint a humán fibroblasztban. A Come csóva DNS intenzitása a 15A sejtben 12 órával a besugárzás után nemhogy csökken, hanem 1-2%-al emelkedik, ami újabb száltörések megjelenésére utal (**25A. ÁBRA**).



24. ÁBRA. A vizsgált sejtvonalak UV túlélési görbéi. A sejtenyészeteket a feltüntetett dózisú UV fénnel kezeltük, majd 2 hét elteltével az 50 sejtés vagy nagyobb kolóniákat kristályibolya festés után megszámoltuk.

Sejtvonalak	Túlélési paraméterek (D_{10}^*) (J/m ²)
Hum. fibrobl.	20 ± 0.70
A375	18 ± 0.70
RVH421	17 ± 0.70
R13	17 ± 0.70
TPC1	7.5 ± 0.14
A9+15	17 ± 1.41
15A	20 ± 0.7
HT1080	15 ± 1.41
EJ30	8.5 ± 0.35
HELA	11 ± 1.41
GM02994	1.95 ± 0.63
GM02096	1.75 ± 1.06
GM01630	4.5 ± 0.21

7. TÁBLÁZAT. A vizsgált sejtvonalak túlélési görbájéből számolt D_{10} értékek (a sejtek 10%-ának túlélését eredményező UV dózis)



25. ÁBRA. Az UV fény hatására bekövetkező szál törések teljes genomon történő (ún. overall) reparációjának vizsgálata Comet assay-vel. (A) 15A, (B) HeLa, (C) humán fibroblaszt sejteket (HF) 3 J/m² UVC fénnel kezeltünk és azonnal (K és 0 h) vagy a feltüntetett reparációs idők után agaróz gélbe ágyaztuk és tárgylemezre rétegeztük. Alkalikus lízis, elektroforézis és etidium-bromidos festés után a sejtmagokból kiáramló DNS (Comet csóva) intenzitását fluorescens mikroszkópban vizuális pontozással értékeltük.

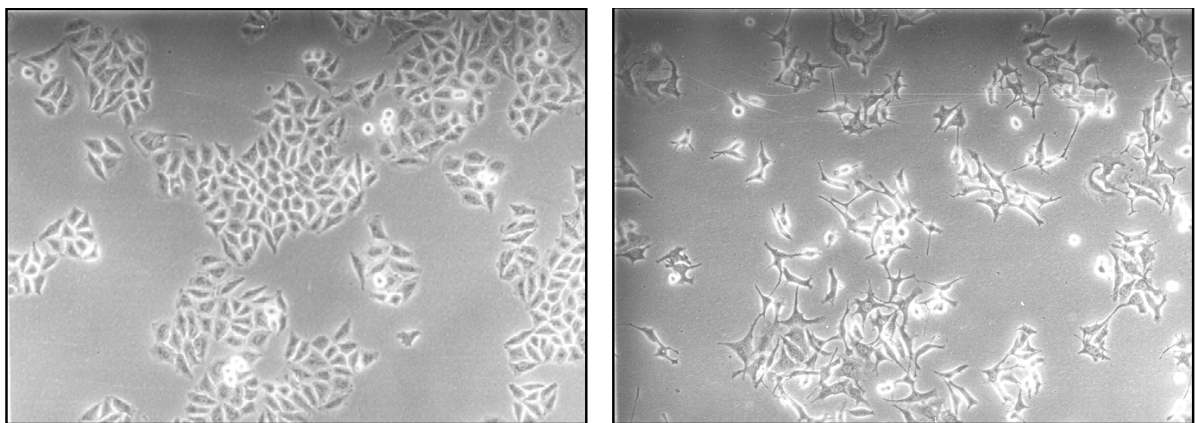
6.1.4. A Na-butirát kezeléssel kiváltott kromatin dekondenzáció hatása a HeLa sejtek reparációjára

Általánosan elfogadott tény, hogy a kromatin szerveződés hatással van a DNS reparáció intenzitására. A nukleoszómális szerveződés miatt a DNS károsodások a genom egyes régióiban nem egyformán hozzáférhetőek a reparációs enzimek számára. A hisztonok

fontos szerkezeti elemei a nukleoszómáknak, és szerkezeti módosulásaik jelentősen befolyásolják a kromatin kondenzáltsági állapotát. A transzkripcionálisan aktív kromatin régiók hiperacetilált hisztonokat tartalmaznak (Reeves 1984). Az ilyen régiók könnyebb hozzáférhetősége a hisztonok acetilációjával a lizinek pozitív töltéseinek neutralizálása révén valósul meg, aminek hatására a nukleoszómális szolenoid struktúra felbomlik és a kromatin “felnyílik”. A hiszton acetiláció a kromatin relaxáció általános mechanizmusának tekinthető (Perry 1982). A hisztonok hiperacetiláltsági állapota a sejtek *in vitro* nátrium-butiráttal való kezelésével érhető el, mivel a nátrium-butirát meggátolja a hiszton-deacetilázok működését és ezáltal a kromatin ideiglenes fellazulását eredményezi. Ez a hatás azonban csak átmeneti, 12 órával a kezelés után megszűnik (Ramanathan 1989).

A nátrium-butirát egyes sejtekben a hiszton hiperacetilációján kívül más, összetettebb hatással is bír, a sejtnövekedést és a DNS replikációt is gátolja, bizonyos sejtvonalakban differenciálódást indukál (Fishman 1974).

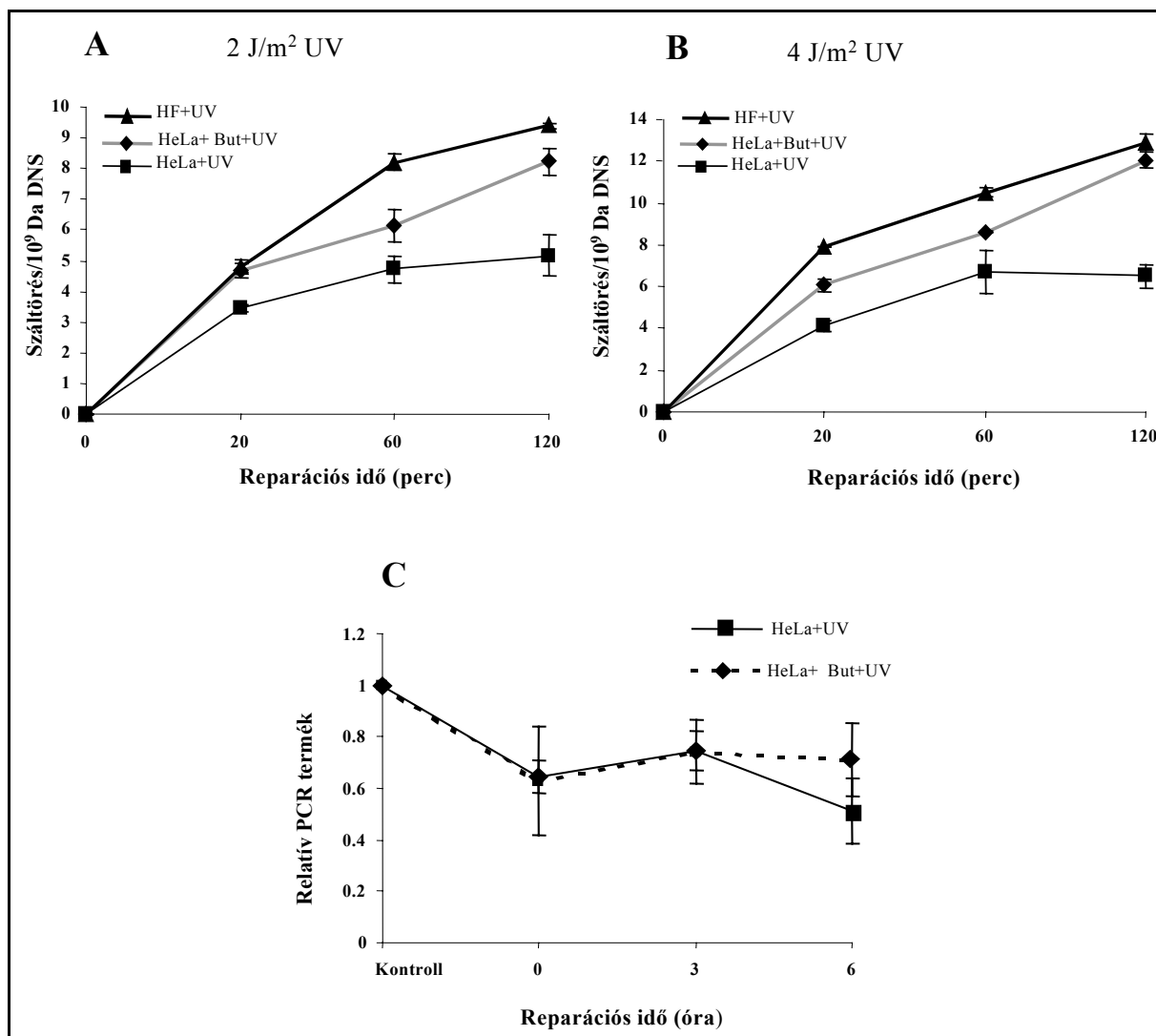
A nátrium-butirát esetleges hatását a heterokromatikus reparációra a chAB4 régióban reparáció defektust mutató HeLa sejteken kívántuk megvizsgálni. A sejtek egy részét 48 órán keresztül 5 mM nátrium-butiráttal kiegészített tápoldatban növesztettük, másik részét nem kezeltük, majd UV fénnel besugároztuk a sejteket, különböző reparációs idők múltán DNS-t izoláltunk belőlük és elvégeztük a QPCR reakciót. A nátrium-butirát kezelés látványos morfológiai változást okozott a HeLa sejteken. A normál állapotukban apró, zömök sejtek az idegi irányba történő differenciációhoz hasonlóan kiterülő, nyúlványos sejtekké változtak (**26. ÁBRA**).



26. ÁBRA. A nátrium butirát kezelés hatása a HeLa sejtek morfológiájára. (A) HeLa sejtek a nátrium-butirát kezelés előtt és (B) 48 órával a kezelés után. (Fáziskontraszt mikroszkópos felvétel, 10x objektív)

A teljes genom reparációjának vizsgálatához a sejtekhez radioaktív izotóp jelenlétében DNS-szintézis inhibitorokat adtunk (Ara C és hidroxürea), hogy a reparációs DNS szintézist

megakadályozzuk. Ezután a sejteket UV fénnyel (2 és 4 J/m²) besugároztuk PBS-ben, majd újra visszaadtuk a DNS szintézis inhibitorokat tartalmazó tápoldatot. A DNS károsodások helyén a reparációs enzimek által generált száltöréseket detektáltuk hidroxipatit kromatográfiával. Kontroll sejtvonalként a jól reparáló humán fibroblaszt sejteket használtuk (27A. és B. ÁBRA).



27. ÁBRA. A nátrium-butirát által indukált kromatin dekondenzáció hatása a HeLa sejtek DNS reparációjára. A 2 J/m² (A) és 4 J/m² (B) UV dózis hatására keletkező fototermékek a teljes genomból való eltávolításának vizsgálatát hidroxipatit kromatográfiával végeztük. DNS inhibitorok adása mellett a száltörések mennyisége a reparációs aktivitást tükrözi. (C) A nátrium-butirát hatása a HeLa sejtek heterokromatikus reparációjára

Míg a teljes genom reparációs aktivitását a nátrium-butirát hozzáadása mindkét vizsgált UV dózis esetén megemelte (27A. és B. ÁBRA), ez az aktivitás még így is alacsonyabb, mint normál humán fibroblaszt sejtekben butirát kezelés nélkül. A heterokromatikus célszekvencia reparációjára HeLa sejtekben a nátrium-butirát kezelés nem volt hatással (27C. ÁBRA).

6.2. Az oxidatív DNS károsodások mennyiségének és reparációjának vizsgálata Alzheimer-kóros betegek limfocitáin

Vizsgálatunkban 27 Alzheimer-kóros beteg és a 12 egészséges idős kontroll személy limfocitáin végeztük el a Comet assay-t. Az összehasonlítás során az AD betegekben magasabbnak találtuk az egyes szálú törések mennyiségét, mint a kontrollokban, bár a különbség nem volt szignifikáns (**28A. ÁBRA**). A limfocitákat az oxidált purinok mennyiségét detektáló Fpg enzimmel is kezeltük (**28B. ÁBRA**). Az enzim által kiváltott száltörések a vizsgálatban az alapállapotban meglévő egyes szálú törésekhez hozzáadódnak. A betegeknél szignifikánsan emelkedett ($p < 0.05$) oxidált purin szintet mutattunk ki (**28B. ÁBRA**).

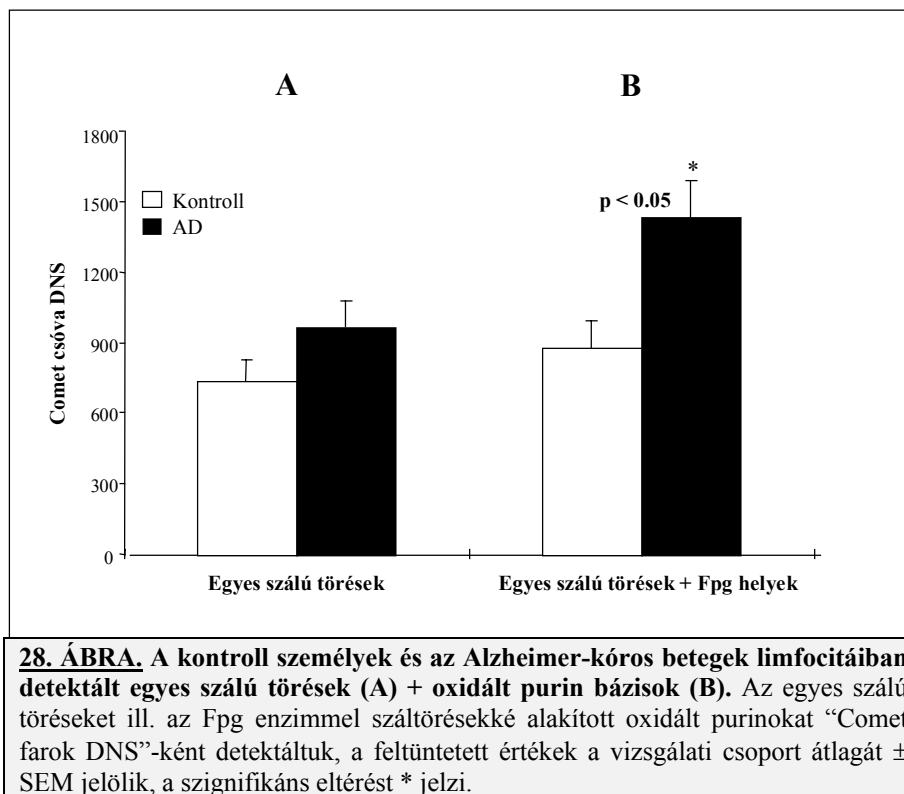
Megvizsgáltuk az oxidált pirimidinek mennyiségét is a két csoportban. Ehhez az Endonukleáz III enzimet használtuk. A vizsgálatba a továbbiakban bevont személyek (11 beteg és 6 kontroll) esetében mindkét enzimmel (Fpg és EndoIII) külön-külön ill. együtt alkalmazva (Fpg+EndoIII) is elvégeztük a száltörések és az oxidált bázisok szintjének meghatározását (**29. ÁBRA**).

Az oxidált pirimidinek mennyisége a betegektől vett limfocitákban magasabb volt, mint a kontrollokban, de az eltérés nem volt szignifikáns (**29B. ÁBRA**). A két enzim együttes alkalmazásával (nyilvánvalóan az oxidált purinok miatt) ismét szignifikáns különbséget találtunk a két vizsgálati csoport között (**29C. ÁBRA**).

Mecocci és munkatársai eredményei szerint az Alzheimer-kóros betegek limfocitáiban és a vizsgált kontroll személyek limfocitáiban oxidatív stressz hatására nem volt különbség a keletkező 8-oxo-guanin mennyiségében (Mecocci 1998). Ez alapján feltételezhető, hogy a felhalmozódó oxidatív károsodások hátterében nem az eltérő stresszérzékenység, hanem valamilyen reparációs mechanizmus zavara áll, aminek igazolására teszteltük a két csoportból izolált limfociták DNS reparációs képességét H_2O_2 -vel indukált oxidatív stressz után.

Irodalmi adatok alapján nem tűnt célszerűnek hosszú reparációs idők után vizsgálni a végbemenő javítási folyamatokat. Az egyes szálú törések féléletideje mintegy fél óra, az oxidatív károsodások javítása ennél hosszabb időt igényel, emberi sejtvonalak esetében néhány óra (Collins 1996). Az izolált limfociták DNS reparációja nem túl hatékony alacsony dNTP-pool-juk miatt és ezen a dNTP-kel kiegészített médium sem javít jelentősen. Ezenkívül az inkubációs periódus alatt a limfociták a légköri oxigén jelenlétében további oxidatív

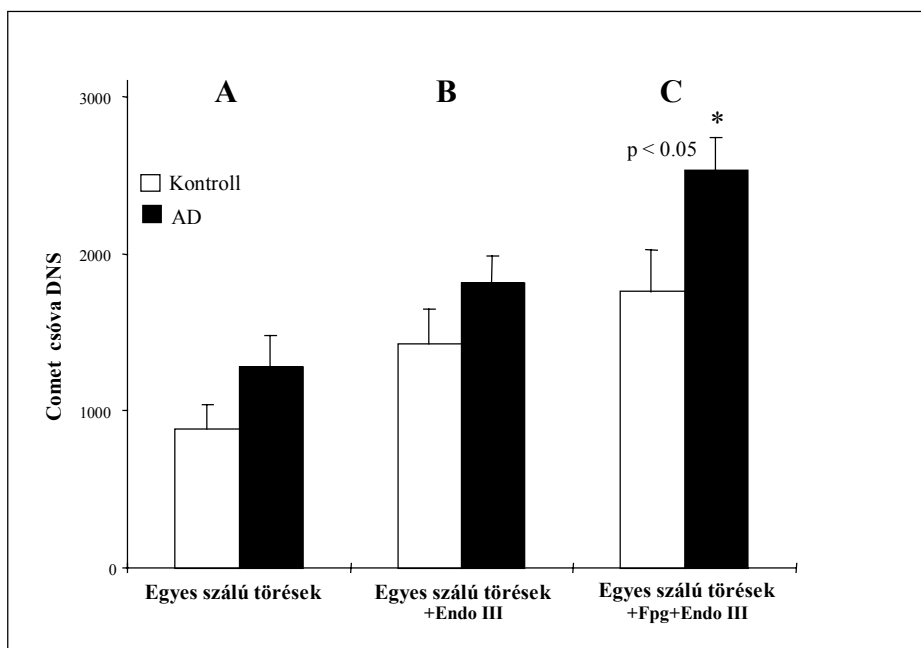
károsodásokat szenvedhetnek, ami kísérleti műtermékek detektálásához vezethet (Collins 1999; Collins 2001) Mindezen okok miatt egyetlen reparációs időt alkalmaztunk és egy órával a H₂O₂ kezelés után vizsgáltuk a megmaradó és az Fpg-vel indukálható száltörések mennyiségét.



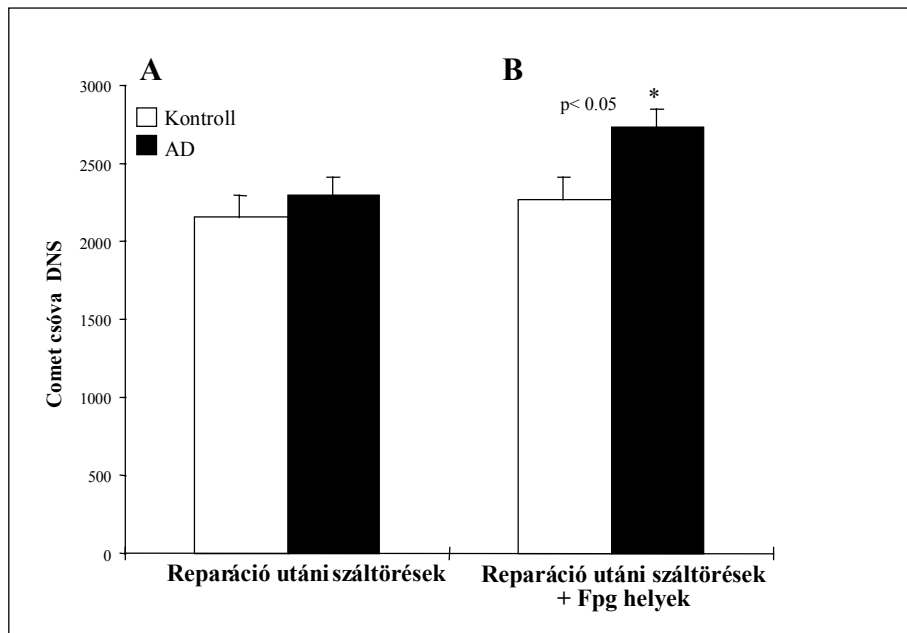
Az erőteljes oxidatív stressz által kiváltott egyes szálú törések és oxidált bázisok reparációja nem ment teljesen végbe, ezért a száltörések mennyisége az alapállapothoz képest magasabb volt a rövid reparációs periódus után (**30B. és 31B. ÁBRA**). A reparációs idő után a javítatlanul megmaradó egyesszálú törések+Fpg helyek mennyisége szignifikánsan nagyobb volt az Alzheimer-kóros betegekben (**30B. ÁBRA**), míg önmagukban az egyes szálú törések mennyisége nem tér el szignifikánsan a két vizsgálati csoportban (**30A. ÁBRA**).

A reparáció után javítatlanul megmaradó oxidált pirimidinek mennyisége sem tért el szignifikánsan a kontroll személyek és az AD betegek között (**31B. ÁBRA**).

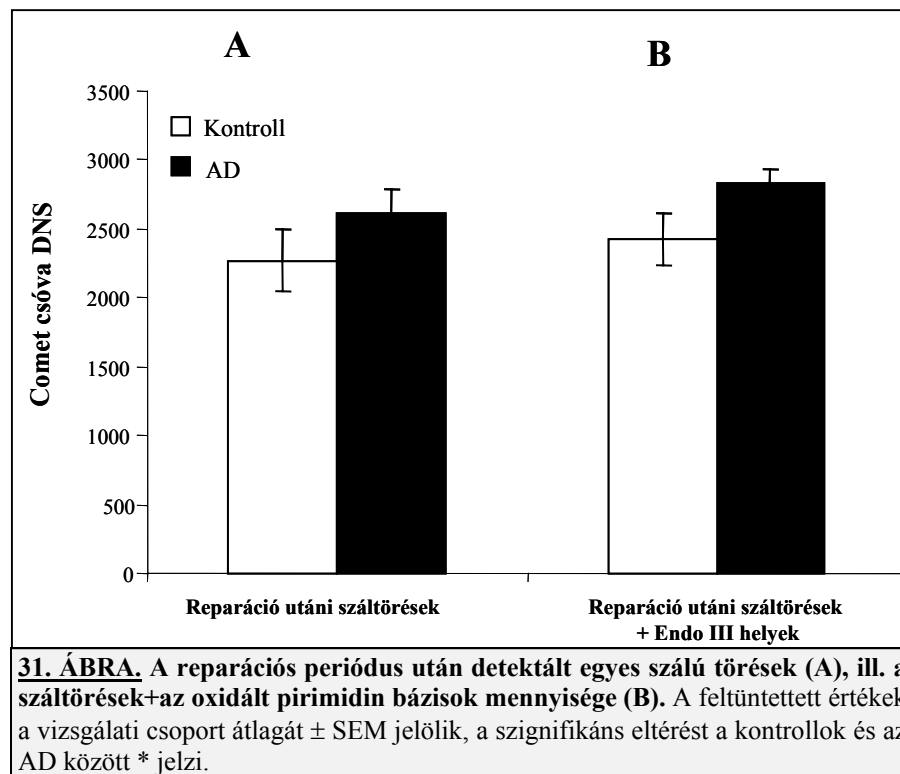
A oxidatív stresszt követő reparációs vizsgálat során a kiindulási állapothoz (azaz a frissen izolált limfocitákban detektálthoz) képest az egyes szálú törések és az oxidatív károsodások mennyiségében is csökkenést detektáltunk (**32. ÁBRA**) mind az AD betegek, mind a kontroll személyek esetében. Ez a reparációs folyamatok működését tükrözi, ill. azt is igazolja, hogy a légköri oxigéntől nem szenvedtek oxidatív károsodást a minták.



29. ÁBRA. A kontroll személyek és az Alzheimer-kóros betegek limfocitáiban detektált egyes szálú törések (A), oxidált pirimidin bázisok (B) ill. oxidált purin+pirimidin bázisok (C) mennyisége. Az Fpg enzimmel az oxidált purinokat, az EndoIII-mal az oxidált pirimidineket száltörésekké alakítva, ill. az egyes szálú töréseket “comet farok DNS”-ként detektáltuk. A feltüntetett értékek a vizsgálati csoport átlagát $\pm$ SEM jelölik, a szignifikáns eltérést a kontrollok és az AD betegek között * jelzi.



30. ÁBRA. A reparációs periódus után detektált egyes szálú törések (A), ill. a száltörések+az oxidált purinok mennyisége. (B). A feltüntetett értékek a vizsgálati csoport átlagát $\pm$ SEM jelölik, a szignifikáns eltérést a kontrollok és az AD betegek között * jelzi.

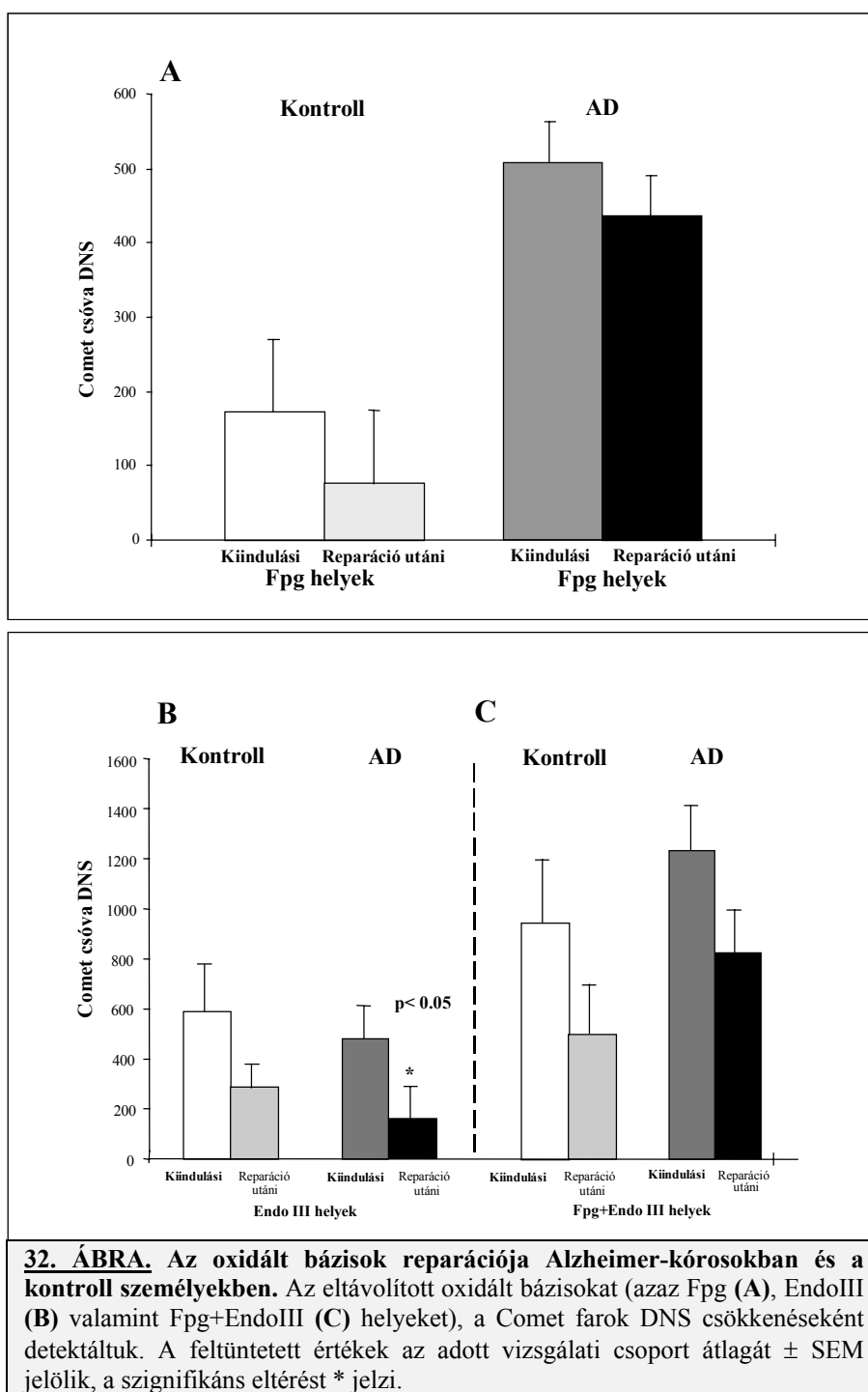


A **32. ÁBRÁ**-n feltüntetett kiindulási Fpg helyek számát a **28A.** és **B. ÁBRA** értékeinek különbségeként kaptuk (a mért értékek személyenkénti különbségét képezve, majd a csoporton belül átlagolva), mind a kontrollok és mind az AD betegek esetében. A reparáció utáni Fpg helyek számát a **30A.** és **B. ÁBRÁN** feltüntetett értékek alapján hasonlóan számítottuk.

A reparáció által eltávolított pirimidin bázisok, valamint az összes eltávolított oxidált bázis mennyiségét (Fpg+EndoIII hely) szintén a kezeletlen mintákon detektált enzimfelismerő helyeknek és a reparáció utáni enzimfelismerő helyeknek a különbségéből számítottuk.

Az az eredmény, hogy az oxidatív stressz utáni reparációt követően még a stressz előtti, alapállapotnál is kevesebb oxidált bázist detektáltunk, stressz által indukált reparációs folyamatok beindulását tükrözi. Ez a folyamat a kontroll csoportban kissé hatékonyabb volt, bár nem volt szignifikáns, mint az Alzheimer-kóros csoportban, főként az oxidált purinok esetében (**32A. ÁBRA**). Az oxidált pirimidinek eltávolítása megfelelően megy végbe az Alzheimer-kórosokban is, itt szignifikáns különbség volt detektálható a kiindulási és a reparáció után megmaradó oxidált pirimidinek mennyiségében (**32B. ÁBRA**). A kettős enzim kezeléssel detektált ún. összes oxidált bázis eltávolítása a kontroll csoportban volt némileg

hatékonyabb, az előbbieik alapján nyilvánvalóan az oxidált purinok eltávolításának zavara miatt (**32C. ÁBRA**).



7. AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

7.1. Az UV által indukált fototermékek reparációjának vizsgálata a heterokromatikus régióban humán sejtvonalakban

Az általunk kifejlesztett kvantitatív PCR vizsgálati módszer alkalmas eszköznek bizonyult az UV fototermékek vizsgálatára a heterokromatinban.

Az UV sugárzás célpontjául kiválasztott chAB4 alacsony kópiaszámú ismétlődő szekvencia a főemlősök genomjában a különböző kromoszómákon összesen mintegy 100 kópiás gyakoriságával kellően reprezentálja a heterokromatikus régiót. A szekvenciacsaládot 1989-ben azonosították Assum és munkatársai (Assum 1991; Assum 1998) egy emberi angiofibroma (rostos érdaganat) sejtvonal kis polidiszperz cirkuláris DNS frakciójából (spcDNS). Ez az extrakromoszómális DNS frakció főként repetitív elemeket (Alu, alfoid-szatellit DNS, L1 szekvencia elem stb.) tartalmazott. Ezen szekvenciák közös jellemzője, hogy mobilis genetikai elemekhez hasonlítanak molekuláris struktúrájuk és a genomban való szétszórtságuk alapján. A polidiszperz cirkuláris DNS frakció szerepe jelenleg nem tisztázott. Az egyedfejlődés során a kromoszómális átrendeződések átmeneti vagy melléktermékeként képződő spcDNS megjelenése jellemzője az angiofibroma sejtvonalaknak, melyekre citogenetikailag feltűnően változatos transzlokációs mozaikosság jellemző (Neidlinger 1988).

Az általunk vizsgált szekvencia egy óriási hajtűhurkot (~240-260 kb) képező ismétlődő blokk ~2 kb-os részlete. A palindromban két 90 kb-os fordítottan ismétlődő chAB4 szekvencia fog közre egy 60 kb-os nem ismétlődő elemet. A chAB4 család az emberen kívül előfordul a főemlősök közül a csimpánz, gorilla az orangután és a gibbon genomjában is. A szekvencia nagyon konzervált, emberben két alcsalád létezik. Az egyes kópiák között kb. 95%-os a homológia. Cserpán és mtsai nemrégiben kimutatták, hogy ez a szekvenciacsalád szorosan kapcsolódik egy másik nagy kiterjedésű ismétlődő szekvencia elemmel, a Ψ NF1-el. A chAB4- Ψ NF1 szegment minden bizonnyal a 17-es emberi kromoszóma evolúciós elődjén megjelenő ősi kópia duplikációjával kapcsolatosan szóródott szét a különböző humán kromoszómákon (Cserpán 2002).

A hosszú ismétlődési egységű repetitív szekvenciák, mint a chAB4, általában szálak közötti rekombinációval vagy egyenlőtlen crossing overrel duplikálódhatnak, ami közeli rokon fajok közötti kópiaszámbeli eltéréseket eredményezhet. Ez jellemző a chAB4

szekvenciára is, hiszen az ember és a csimpánz haploid genomjában kb. 50 kópiában található meg, míg a közeli rokon fajokban a gorillában, az orángutanban, és a gibbonban csak néhány példányban fordul elő, a Rhesus majomból pedig hiányzik (Assum 1998). Az eddigi ismeretek alapján tehát a chAB4 evolúciós szempontból rendkívül instabil elemnek tekinthető (Assum 1994).

A módszerünkben alkalmazott egyedi megközelítés, azaz a nagy A+T tartalma miatt speciálisan UV érzékeny szekvencia használata a fototermékek vizsgálatára, megoldja a fototermékek detektálhatóságának problémáját. Alacsony, de az emberi sejtek által még jól tolerálható UV dózis hatására ugyanis olyan kevés fototermék képződik a genomban (átlagosan egy károsodás/10 kb detektálásához $\sim 10 \text{ J/m}^2$ UV dózis szükséges, (Ayala-Torres 2000)), hogy csak meglehetősen hosszú, 10-20 kb-os DNS szakaszok vizsgálata esetén mutatható ki néhány DNS károsodás. Ez a jelenleg használatos, jobb Taq polimerázok által már amplifikálható lánchosszúság, de a “teljesítőképességük” határait súrolja, ezért az ilyen lánchosszúságok nem mindig reprodukálhatóak. Magasabb UV dózisok alkalmazásánál ugyan több a detektált károsodás, viszont a vizsgálatok a sejtek apoptózis közeli állapotát tükrözik és nem a normál reparációs folyamatokat.

A chAB4 szekvencia vizsgált szakaszán a humán Hprt gén azonos hosszúságú szakaszához képest a lehetséges szomszédos timinek alapján 1,65-ször magasabb a timidin-dimer képződésének az esélye. A Poisson eloszlás alapján a termékcsökkenés mértékéből általunk számított károsodás gyakoriság 3 J/m^2 -es UV dózissal viszont kb. 10x akkora, mint van Houten és munkatársai által a Hprt génen detektált károsodás gyakoriság, annak ellenére, hogy a chAB4 szekvencia a heterokromatinban található (Van Houten 2000).

A chAB4 szekvencia tehát egy extrém módon UV érzékeny részletet tartalmaz, ami akár UV szenzorként is működhet a genomban. Mivel ez a régió evolúciós szempontból is igen instabilnak tekinthető, ezenkívül az UV károsodások szempontjából mutációs forrópontként viselkedhet, a normál sejtekben ezért valószínűleg hatékony a reparációja, mint ahogy vizsgálataink során a diploid, normál humán fibroblaszt és néhány egyéb sejtvonal esetében detektáltuk (A375, TPC1 és a rágszáló/humás hibridek). Ez a felismerés némiképp megváltoztathatja a heterokromatinban zajló (és általában lassúnak tartott) reparációról alkotott képet. Az irodalomban igen kevés és meglehetősen régi adat található a fototermékek heterokromatikus reparációjáról. A ciklobután pirimidin dimerek eltávolítását vizsgálva emberi 6A3 sejten (Mellon 1986) és Afrikai zöld majom vesesejteken (Zolan 1982, Mellon 1986) azt találták, hogy a CPD-k reparációja a teljes genom reparációjától nem különbözött

(20-30 % dimer eltávolítás 4 óra alatt) viszont lényegesen elmaradt a transzkripcionálisan aktív szakaszok reparációjától (79% CPD eltávolítás 4 óra alatt). Más, szintén a NER által eltávolított károsodás (pl. aflatoxin) eltávolításának hatékonysága csak 25%-a volt a CPD eltávolítási hatékonyságának és UV besugárzás hatására az egyéb kémiai károsodások reparációja némileg meggyorsult (Zolan 1982, Mellon 1986; Smith 1987).

A rövid, kb 2 kb-os chAB4 szakaszon kialakuló nagyszámú pirimidin dimer elképzelésünk szerint olyan mértékű száltorziót vált ki a DNS-en, hogy ez normál reparációs kapacitású sejtekben hatékonyan indukálja a reparációs rendszert. Ehhez az indukcióhoz hozzájárulhat néhány egyéb faktor is. A DNS reparáció kromatin szinten való működésére a “hozzáférés-reparálás-visszarendezés” modelljét alkották meg, miután világossá vált hogy a sejtextraktummal ill. tisztított NER enzimekkel végzett reparációs szintézis hatékonysága jóval alacsonyabb volt a kromatinba ágyazott, mint a csupasz DNS-en (Wang 1991, Hara 2000). E modell szerint első lépésként a kromatinszerkezet szétszerelése megy végbe a DNS reparáció folyamatában, hogy a reparációs enzimek megfelelően hozzáférhessenek a javítandó nukleotidhoz. Folyamatosan bővül azon fehérjéknek köre, melyekről kiderül, hogy a reparációhoz szükséges kromatin módosításban ill. a reparáció utáni kromatin összeszerelődésben szerepük van (Green 2002). Ezzel összefüggésben számos emberi betegségről derül ki, hogy háttérben ezeknek a kromatin fehérjéknek a mutációi állnak. Három különböző emberi betegség (az α -talasszémia/mentális retardáció, a Juberg-Marsidi szindróma és a Sutherland-Haan szindróma kialakulásáért ugyanannak az ATRX nevű kromatin fehérjének mutációi felelősek, mely épp az általunk vizsgált régióban, az rDNS (a riboszómális DNS) régióban horgonyzódik a heterokromatinon (McDowell 1999). Az ATRX egy II-típusú ATP-függő helikáz, melynek pontos funkciója nem ismert, feltételezhetően kromatin átrendező faktor, mutációi azonban ismeretlen módon néhány repetitív szekvencia metilációs mintázatának megváltozását is eredményezi (Gibbons 2000).

Hasonló pericentromerikus heterokromatinban lokalizálódó, a kromatin szerkezet módosítását eredményező fehérje pl. a *S.cerevisiae*-ben a **CP1** (centromer promóter faktor, amely számos promóter kromatinszerkezetét befolyásolja és a centromernél kinetochor fehérjék kötődését irányítja), *Drosophila*-ban a **GAGA faktor** (amely a kromoszóma kondenzációban és szegregációban játszik szerepet) emlősökben az **Ikaros**, (transzkripciós szabályozó faktor, amely represszorként működik ha a Mi-2-vel (ATP függő nukleosóma átrendező komplex) és a HDAC-vel (Hisztón-deacetiláz) a heterokromatinban lokalizálódik

viszont aktivátor ha az SWI/SNF-el (az első azonosított kromatin átrendező komplex) az eukromatinban (McDowell 1999).

A pericentrikus heterokromatin struktúrális szempontból is igen fontos, hiszen elválasztja a centromert a géneket hordozó kromoszóma szakaszoktól. Az itt horgonyzó szabályozó és kromatinsztruktúrát módosító fehérjék által ez a genomi régió funkcionálisan is hatással van a sejtfolymatokra. A pericentrikus heterokromatinban található (esetleg hiányos reparációjuk miatt) genomiálisan instabil repetitív szekvenciák számos tumoros elváltozásért felelősek (Mazzarella 1997, Brewer 1999; Ji 2000; Padilla-Nash 2001).

A nukleotid excíziós reparációs rendszer transzkripcióval kapcsolt alrendszere a sejtek azonnali túléléséért felelős, igyekszik megakadályozni hibás, vagy megrövidült fehérjék szintézisét. Ezzel szemben a vizsgált chAB4 szekvencia javítását is végző globál genom reparáció a hosszabb távú integritás megőrzéséért felelős. Feladata, hogy megakadályozza a mutációk felhalmozódását a genomban, ezzel védve az egyedet a későbbi sejtosztódások során aktiválódó tumoros elváltozásoktól. Ezt alátámasztja saját vizsgálatunk is, hiszen a heterokromatikus chAB4 szekvencián reparáció deficienciát mutató sejtvonalak tumor eredetűek, ill. reparációs szindrómás betegekből származnak.

A reparáció hiányára ezekben a sejtvonalakban az egyik lehetséges magyarázat lehetne a p53 gén mutációja, hiszen ez a "genom őrének" is nevezett p53 fehérje központi szerepet tölt be a DNS reparációban (lásd 3.5.1 fejezet). A reparáció deficiens RVH421 melanoma sejtvonal azonban vad típusú p53 fehérjét tartalmaz, míg a HeLa sejtekben a p53 fehérje deficiens. A rágszáló sejtekben pedig hatékony reparációt detektáltunk, viszont a rágszáló sejtekre a p53 indukálta reparációs útvonal kevésbé jellemző. Bár a vizsgált sejtvonalak némelyikének nem ismert a p53 státusza, az ismertek esetében a reparációs hatékonyság nem mutatott korrelációt az aktív p53 jelenlétével. Ezért azt feltételezzük, hogy a heterokromatin reparációjában valószínűleg más tumor szupresszorok, illetve eddig nem azonosított szenzor, szignál és effektor fehérjék is közreműködnek, elsősorban a károsodások érzékelése és a hozzáférhetősége szintjén (Rappold 2001). Bizonyos vizsgálatok a retinoblasztóma fehérje, a Gadd45 stressz fehérje szerepét sugallják (Cheung, Jr. 2001, Therrien 1999)

A rágszáló sejtek globál genom reparációs aktivitása az irodalmi adatok szerint még az emlős sejtekénél is kevésbé hatékony (Bohr 1988). A idegen DNS-nek rágszáló (egér és kínai hörcsög) reparációs rendszerrel történő vizsgálatára egyedi lehetőséget nyújt az általuk hordozott 15-ös emberi kromoszóma, hiszen a vizsgált repetitív szekvenciát csak főemlősök

hordozzák, ezért csak a humán kromoszómán folyó reparációt detektáljuk. Az emberi chAB4 szekvencia gyors reparációja azt az elképzelést erősíti, hogy a pericentromerikus régióban ezen a rövid DNS szakaszon keletkező nagy számú károsodás erőteljes száltorziót, nagyfokú kromatin átrendeződést esetleg genomiális instabilitást válthat ki, ezért hatékony reparációt indukál. A kínai hörcsög sejt viszont erre a szokatlanul intenzív reparációra esetleg a saját reparációs kapacitásának kimerítése miatt a 15-ös humán kromoszóma eliminációjával válaszol. A 15-ös kromoszóma eliminációját vizsgáló Comet assay kísérletünk és a kvantitatív PCR eredménye (azaz a szál törések mértékében kapott különbség) a kétféle megközelítés miatt eltérő. A Comet assay-vel a teljes genom reparációját vizsgáltuk. Az UV besugárzás után a reparációs aktivitás tapasztunk, hiszen a szál törések a 6 órás mintavételnél csökkentek. Ezt követően a 12 órás mintavételnél bekövetkezett egy minimális (1-2%-os) emelkedés, vagy helyesebben stagnálás a szál törések mennyiségében. A kínai hörcsög genom reparációja valószínűleg ezután sem áll meg hirtelen, sokkal valószínűbb, hogy a stagnálás az egyetlen humán kromoszóma eliminációja során újratermelődő szál törések miatt következik be. Egyetlen 15-ös humán kromoszóma eliminációja a teljes kínai hörcsög genommal összevetve valószínűleg nem tud ennél erőteljesebb szál törés képződést indukálni, mivel vele szemben hat a jóval nagyobb kínai hörcsög genomon folyó reparáció, ami eltávolítja a töréseket a többi kromoszómán. A Comet assay-vel csak relatív értéket, % töredezett DNS-t tudunk kimutatni. A kvantitatív PCR ezzel szemben speciálisan a heterokromatikus szakasz reparációját detektálja, ezért jóval nagyobb mértékű az ott kapott szál törésre utaló PCR termék csökkenés. A vizsgálat eredménye azonban nem igazolja biztosan a 15-ös kromoszóma eliminációját, ahhoz FISH analízis elvégzésére lenne szükség.

A HeLa sejtek esetében a károsodások hozzáférhetőségének fokozása a hiszton deacetiláció gátlásával nem segítette elő a reparációs folyamatok működését a heterokromatinban, míg a teljes genom reparációjára pozitív hatással volt. Lehetséges, hogy a szorosan csomagolt kromatin fellazításához a nátrium-butilát kezelés nem volt elégséges, illetve hogy a pericentrikus heterokromatinban a hozzáférést a hiszton fehérjéken kívül más faktorok, eddig ismertelen kromatin átrendező fehérjék irányítják. Valószínűsíthető, hogy a hisztonfehérjék egyéb poszttranszlációs modifikációi (metiláció, foszforiláció) ill. az ezek kombinációjából kialakuló ún. "hiszton kód" irányítja a nukleoszómák pozicionálását, a kromatin felnyílását és kondenzálását a heterokromatin reparációja során. Az ezekben a folyamatokban résztvevő fehérjéknek a felderítése áll jelenleg a kutatások középpontjában (Morales 2001; Jones 2002; Robertson 2002).

A vizsgálatainkban a tumoros vonalakkal kapott eredmények felvetik a heterokromatikus reparáció fontosságát a tumorigenezisben. A nem működő reparációs rendszer felismerése tumoros sejtekben mindössze az első lépés abban az irányban, hogy az ok-okozati összefüggéseket kiderítsük. Az általunk vizsgált repetitív elem segítségével felvetődött, hogy a pericentrikus heterokromatinban lévő bizonyos szekvenciák esetleges *in vivo* szenzorokként szerepelhetnek egyes genotoxikus ágensekkel szemben, valamint elképzelhető, hogy DNS károsodások következtében jelentősen torzult struktúrájuk miatt genomiális instabilitást válthatnak ki, amennyiben nem reparálódnak.

A sejtvonalak javítási készségében kapott eltérések okát sajnos vizsgálati módszerünkkel nem tudjuk kideríteni. A heterokromatikus régiók reparációjának vizsgálatára egyáltalán nincsenek újszerű technikákkal kivitelezett vizsgálatok, amelyek erre vonatkozó ismereteket nyújtanának. Mindössze a különböző reparációs utakban szerepet játszó gének polimorfizmusát vizsgáló közlemények foglalkoznak azzal, hogy a reparációs gének polimorfizmusai egyéni reparációs képességbeli eltérésekhez vezethetnek, és ezek az eltérések korrelációban állhatnak a tumorképződési hajlammal (de boer 2002, Hu 2002, Hou 2003, Kumar 2003). Az egyéni reparációs kapacitás változásaival kapcsolatban kutatások tárgyát képezi, hogy ezeket az élettartam során bekövetkező változásokat befolyásolhatják-e az életkörülmények, táplálkozási szokások stb. (Andrew Collins, szóbeli közlés).

Eredményeink rámutatnak arra is, hogy a heterokromatinban zajló nukleotid excíziós reparáció olyan komplex, eddig ismeretlen faktoroktól függő mechanizmus, amely lényegesen bonyolultabb folyamatok összehangolása révén valósul meg, mint amit sejtmentes rendszerekben alapvető működésként reprodukáltak. A kromatin szinten működő reparációs folyamatok megértéséhez még számos kulcsfontosságú fehérjét és szignál útvonalat kell azonosítani és ezeknek a faktoroknak minden bizonnyal a reparáción kívül igen fontos szerepe van számos egyéb szabályozó folyamatban is (heterokromatinizáció, "gén csendesítés" (gene silencing) stb.).

7.2. Az oxidatív DNS károsodások és reparációjuk vizsgálata Alzheimer-kóros limfocitákban

Számos irodalmi adat támasztja alá az oxidatív stressz jelenlétét és hatását az Alzheimer-kórban, hiszen az oxidatív stressz számos markerét kimutatták a betegekben (Mutisya 1994; Simonian 1996; Lyras 1997; Koppal 1999; Lovell 1999; Markesbery 1999; Christen 2000; Smith 2000b).

Mivel az AD elsősorban gondolkodási és emlékezési funkciók elvesztését okozza, a legtöbb vizsgálat szinte kizárólag a központi idegrendszeri elváltozásokra korlátozódik. Az oxidatív stressz jeleként kimutattak fokozott lipid peroxidációt (Lovell 1997)), és fehérje oxidációt (Hensley 1995), megnövekedett mitokondriális DNS oxidációt (Mecocci 1994), csökkent telítetlen zsírsav szintet (Svennerholm 1994; Prasad 1998), emelkedett neuronális magi DNS (Gabbita 1998; Lovell 1999) és RNS oxidációt (Nunomura 1999).

Az elmúlt években megjelent néhány közlemény, ami felveti, hogy az Alzheimer kór nem csupán a központi idegrendszer betegsége, hanem az egész szervezetre kiterjedő kór, amelyben a legtöbb patológiás elváltozás az agyat érinti (Parker, Jr. 1995, Matsushima 1995; Mecocci 1998). Célunk az volt, hogy élő, Alzheimer kóros betegek perifériás limfocitáiban megvizsgáljuk az oxidatív DNS károsodások mennyiségét, összehasonlítva korban illesztett egészséges emberekével, illetve vizsgálni kívántuk az *in vitro* alkalmazott oxidatív stresszt követő DNS reparációt e két csoportban.

Mecocci és munkatársai HPLC-vel emelkedett szintű 8-OHdG-t detektáltak Alzheimer-kóros limfocitákban, egészséges kontroll személyekhez viszonyítva. Vizsgálatukban a kontroll személyekben az öregedési folyamatok során az életkorral progresszíven emelkedő mennyiségű 8-OHdG-t mutattak ki, míg az AD betegeknél az oxidatív marker szintje nem volt összefüggésben az életkorral (Mecocci 1998). A detektált oxidatív károsodások mennyisége vizsgálatunkban nem mutatott korrelációt a vizsgált személyek életkorával. Az oxidatív károsodások mennyisége valószínűleg inkább a betegség előrehaladottságával van összefüggésben, bár vizsgálatunkban a gondolkodási, emlékezési funkciókat tükröző MiniMental Pont sem mutatott összefüggést az oxidált bázisok mennyiségével (az adatok az értekezésben nem szerepelnek).

Az oxidatív károsodások detektálására használt módszerek, mint a HPLC és a gázkromatográfia/tömegspektroszkópia (GC/MS), a minta előkészítés során oxidatív károsodásokat generáló eljárásokat tartalmaznak. Az emberi szervezet háttér oxidatív

károsodásainak standardizálására irányuló vizsgálatban a 8-OHdG/10⁶ guanin értékben a HPLC több, mint 10-szeres, a GC/MS kb. 75-szörös túlbecslést eredményezett a Comet-assay-vel szemben (Collins 2001). Mivel a pirimidin dimerek detektálása esetében a károsodásspecifikus enzimeket alkalmazó Comet assay más módszerekkel (HPLC, GC/MS) történt meghatározásokkal megegyező eredményt adott, ebből arra következtethetünk, hogy az így detektált háttér oxidatív károsodások mértéke minden bizonnyal pontosabban tükrözi az alapállapotú oxidatív károsodások szintjét, mint a HPLC-vel és GC/MS-vel végzett analízisek (Gedik 1998; Collins 2001).

A Comet assay alkalmas az oxidált purinok és pirimidinek együttes és külön-külön történő detektálására. Előnye a kémiai analitikai módszerekkel szemben tehát az, hogy kísérleti oxidatív melléktermékek indukciója nélkül képes detektálni az oxidatív DNS károsodásokat, gyors, kivitelezése egyszerű és jól reprodukálható. Ezért alkalmaztuk az Alzheimer-kór oxidatív elváltozásainak detektálására.

A vizsgálataink során Alzheimer-kóros betegek limfocitáiban szignifikánsan emelkedett ($p < 0.05$) oxidált purin bázis szintet detektáltunk, mind alapállapotban, mind pedig H₂O₂ stressz után beiktatott reparációs periódus után vizsgálva egészséges idős személyekkel összehasonlítva. Az oxidált pirimidinek és az egyesszálú DNS törések mennyisége alapállapotban kissé, de nem szignifikánsan magasabb volt az Alzheimer-kóros betegekben. A jelentősen emelkedett oxidált purin szint egyik oka lehet, hogy az Alzheimer-kóros limfociták fogékonyabbak a szabadgyök képződés által kiváltott károsodásokkal szemben. Ezt azonban cáfolta Mecocci és mtsai-nak vizsgálata, akik az AD és kontroll csoportban oxidatív stresszre azonos mennyiségű 8-OHdG képződését detektálták széles H₂O₂ koncentráció tartományban (Mecocci 1998).

A másik kiváltó ok, amit többek között a mi vizsgálatunk is alátámaszt, az oxidatív stressz jelenléte. Az oxidatív stressz állapotában a fokozottan jelenlévő szabadgyök támadással szembeni védekező mechanizmusok kimerülnek a fennálló defektusuk miatt, vagy a túlzott oxidáló ágens jelenléte miatt.

A védelmi mechanizmusok defektusát Alzheimer-kórban számos irodalmi adat támasztja alá. A nem enzimatisz védelmi mechanizmusok erősítése, mint pl. az antioxidánsok (C vitamin, E vitamin, melatonin, flavonoidok, karotinoidok, Selegiline, *Ginkgo biloba* extract (EGb 761)) táplálékkiegészítőként való adagolása pozitív terápiás hatással voltak az Alzheimer-kórra. Az E vitamin és a Selegiline a betegség progresszióját

lassította, míg a EGb 761 a gondolkodási funkciók javulását is előidézte (Kanowski 1996; Oken 1998).

Az enzimatisz védelmi mechanizmusok hiányos működése (Marcus 1998; Ramassamy 2000), illetve az oxidatív stressz hatását jelző stresszfehérjék, mint a PARP (Love 1999), Bcl-2 (Deng 1999), a superoxid-dizmutáz (Pappolla 1998), a hem-oxigenáz-1 agyi emelkedett szintű kifejeződése szintén jellemző az Alzheimer-kórban (Takeda 2000).

A harmadik védelmi vonal, a genetikai állomány intaktságát megőrizni hivatott DNS reparációs rendszer.

Az egy óras reparációs periódus után végzett vizsgálatunkban detektált, még az oxidatív stressz előttinél is alacsonyabb szintű oxidatív károsodás egyfajta stressz által indukált reparációs aktivitást tükröz. Feltételezhetően az Alzheimer-kóros betegek szervezetében eleve oxidatív stressz állapotban lévő limfocitákban az *in vitro* stressz hatására tovább emelkedett bizonyos indukálható reparációs enzimek aktivitása. Valószínűleg ez magyarázza az Alzheimer-kóros betegekben az oxidált pirimidineknek a kontroll személyekben detektálnál is hatékonyabb eltávolítását, valamint jelzi, hogy ez az útvonal az Alzheimer-kóros betegekben is megfelelően működik. Ez az indukált reparációs aktivitás az Alzheimer-kórban a fennálló állandó oxidatív stressz folyamán valószínűleg hamar kimerül, másrészt a limfocitákra jellemző alacsony tartalék dNTP raktár miatt sincs kapacitás a teljes reparációra. Az AD betegeknel tapasztalt szignifikáns csökkenés a reparáció előtti oxidált pirimidin mennyiséghez képest nem jelenti azt, hogy Alzheimer-kóros betegekben fokozott az oxidált pirimidinek eltávolítását végző bázis excíziós aktivitás. Ezt erősíti az alap állapotban az AD betegekben detektált oxidált pirimidin szint (EndoIII felismerő hely) emelkedés is, habár nem volt szignifikáns.

Az egyes szálú törések eltávolításában sem volt szignifikáns eltérés a két csoport között az egy óras reparációs periódus alatt, ezért feltételezhetően az egyes szálú törések javítása is megfelelően működik az Alzheimer-kóros limfocitákban.

Az oxidált purin bázisok eltávolításának esetleges defektusa hosszú távon a károsodott purinok felhalmozódásához vezethet, amit kísérletünkben detektáltunk az alapállapotban vizsgált limfocitáknál. Ennek háttérében valamilyen reparációs mechanizmus kimerülése vagy reparációs enzim hibája állhat, amit megerősít, hogy az AD betegekben a kontrollokhoz képest kissé, de nem szignifikánsan kevesebb volt a reparációval eltávolított purinbázis.

Ezt a megállapításunkat alátámasztja, hogy Lovell és mtsai Alzheimer-kóros betegek agyában szignifikánsan csökkent 8-oxoguanin-DNS-glikoziláz (az oxidált guaninok

felismerésért, kihatásáért felelős enzim) aktivitást detektáltak (Lovell 2000). Mivel a guaninok a legsérülékenyebb bázisok, valamint reparációjuk lassabb, mint a pirimidineké egészséges sejtekben is, ezért a reparációs rendszerek hibája, főként a 8-OHdG felhalmozódásához vezetett emberi limfoblasztoid sejt kultúrában (Jaruga 1996).

Vizsgálataink során tehát, az irodalmi adatokkal összhangban megerősítettük az oxidatív stressz jelenlétét és detektáltuk hatását Alzheimer-kóros limfocitákban. Az a tény, hogy az oxidatív elváltozások nemcsak az agyban, hanem a perifériás limfocitákban is kimutathatók, megerősíti, hogy kiváltó okuk valószínűleg azonos és az Alzheimer-kórban kialakult oxidatív stressz az egész szervezetben jelen van. A számos makromolekulát, köztük a DNS-t érintő oxidatív elváltozások mindenképpen hozzájárulnak a károsodott idegsejtek pusztulásához és így az Alzheimer-kór súlyosbodásához.

Számos vizsgálat kísérelte meg felfedni az oxidatív stressz eredetét. Alzheimer-kóros betegekben kimutatták a mitokondriális légzési lánc citokró-m-c oxidáz enzimrendszerének defektusát (Mutisya 1994) valamint, hogy a citokró-m-c oxidáz gén mutációja együtt szegregál a késői manifesztációjú Alzheimer-kórral (Davis 1997). A mitokondriális defektusok az oxidatív szabadgyökök kiszabadulása, illetve a csökkent energia ellátás révén drámai hatással vannak az agy működésére (Curti 1997; Blass 2000). Az egész szervezetben jelenlévő oxidatív stressz hatásán kívül az agyban a szenilis plakkokban lerakódott β -amiloid további szabadgyökök képződést vált ki, a neuronok pedig az oxidatív stresszre fokozottan érzékenyek (Behl 1992; Behl 1994; Schubert 1995).

Az Apolipoprotein E4 (APO E4) allélja által kódolt koleszterin carrier molekula a többi APO E allél által kódolt fehérjénél érzékenyebb az oxidatív stresszre, ezenkívül korreláció van e fehérjék peroxidációja és az Alzheimer-kór között (Ramassamy 1999). Az oxidatív stressz hatására bekövetkező egyéb elváltozások (lipid peroxidáció, antioxidáns enzimek túltermelődése, valamint az antioxidánsok protektív hatása) összefüggésben vannak az APO E genotípussal (Ramassamy 1999).

A fentiekből következően az oxidatív stressz markereinek detektálása, illetve ezeken keresztül a terápiás céllal adott antioxidánsok hatásának mérése igen fontos a betegség progressziójának vizsgálatában és esetleges gyógyításában. Az általunk detektált emelkedett oxidált purin bázis szint önmagában diagnosztikus markerként nem alkalmazható, mivel a két vizsgálati csoportban tapasztalt markáns különbség ellenére a kontroll személyek és az Alzheimer-kórosok között a detektált értékekben egyéni különbségek és ezért egyes esetekben átfedések voltak kimutathatók. A Comet assay alkalmazásával, adott személyek vizsgálatánál

azonban ismételt mintvételekkel a betegség progressziója során bekövetkező oxidatív DNS elváltozások egyszerűen nyomon követhetők. Az általunk alkalmazott vizsgálati eljárással az Alzheimer-kór terápiájában alkalmazott táplálékkiegészítők, antioxidánsok és gyógyszerek DNS-károsító ill. protektív hatása is detektálható és elkezdjük az ilyen irányú vizsgálatokat az 1/40 OM00570/2001 NKFP pályázat keretében.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

Az UV fototermékek szekvenciaspecifikus reparációjának vizsgálata során:

- Kidolgoztunk egy repetitív szekvencián detektált, UV fototermék képződés és reparáció vizsgálatára alkalmas kvantitatív PCR vizsgálati módszert
- A módszer felhasználásával elvégeztük 10 humán és két rágcsló/humán sejtvonál reparáció kinetikájának vizsgálatát a chAB4 régióban
- A kvantitatív PCR módszerrel igen hatékony UV fototermék reparációt (12 ill. 24 órán belül a teljes reparáció) detektáltunk a diploid humán fibroblaszt, a HT1080, az A375, az A9+15 és a TPC1 sejtvonalakban, ami a heterokromatinban szokatlan jelenség
- A 15A hörcsög/humán hibrid sejtben egy UV hatásra a teljes reparáció után bekövetkező száltörés indukciót detektáltunk 12 órával a besugárzás után (a mechanizmus tisztázása további vizsgálatokat igényel)
- Egyes tumor sejtvonalakban (RVH421, HeLa, EJ30) és a reparáció deficiens Xeroderma pigmentosum-os (XPA, XPC) sejtvonalakban a reparáció hiányát detektáltuk a kvantitatív PCR-rel
- Kimutattuk, hogy a kromatinszerkezet fellazítása nátrium-butiráttal önmagában nem eredményezett javulást a heterokromatin reparációjában HeLa sejtekben, ami arra utal, hogy a reparáció hiánya ebben a régióban más, ezidáig azonosítatlan faktorok által is befolyásolt
- Vizsgálataink rámutatnak a pericentrikus heterokromatin reparációjának komplexitására és felvetik annak a lehetőségét, hogy a reparáció hiánya ezekben a struktúráisan fontos, de kevésbé tanulmányozott régiókban szerepet játszhat a tumoros elváltozások kialakulásában

Az Alzheimer-kóros limfociták vizsgálata során:

- A Comet assay-t sikeresen alkalmaztuk Alzheimer-kóros betegek limfocitáin oxidatív DNS károsodások kimutatására

- Szignifikánsan több oxidált purin bázis jelenlétét mutattuk ki Alzheimer-kóros betegek limfocitáinak DNS-ében egészséges, korban illesztett kontroll személyekhez viszonyítva
- Detektáltuk egy oxidatív stressz indukálta reparációs folyamat jelenlétét és csökkent működésű Alzheimer-kóros betegek limfocitáiban, amely az oxidált purinok felhalmozódásához és ezáltal a kórkép súlyosbodásához vezethet
- Eredményeink alátámasztják azt az elképzelést, hogy az Alzheimer-kórban kialakuló oxidatív stressz nemcsak az agyat érinti, hanem a perifériás szervekben is kimutatható, kiváltó oka ezért valószínűleg az egész szervezetben azonos

9. A PH.D. ÉRTEKEZÉS ÖSSZEFOGLALÓJA

Bevezető

Az emlős sejtek nagyméretű genomja számos külső és belső DNS károsító ágens hatásának van kitéve. Az emlős genomban a kijavíthatatlanul maradó DNS károsodások a replikáció során mutációkat indukálnak. Ezek a mutációk a sejtek túlélési esélyeit befolyásolhatják, illetve ha a sejtek növekedésének szabályozását irányító génekben keletkeznek, daganatos elváltozások kialakulását indíthatják el. Ezen hatások kivédésére a sejtek különböző DNS reparációs rendszereket fejlesztettek ki. Ezek közül a nukleotid excíziós reparációs rendszer (NER) az egyik leghatékonyabb védelmi rendszer, amely sokféle, struktúrálisan különböző, a kettős hélix torzulását okozó károsodás eltávolítására képes. Ezeknek a károsodásoknak a javítása egy többlépéses reakciófolyamatban valósul meg, amely a károsodás felismeréséből, behatárolásából, kétoldali (5' és 3' irányú) asszimetrikus bevágásból, a mintegy 30 nukleotid kihasításából, újraszintetizálásából, majd a régi és új szál egyesítéséből áll (de Laat 1999).

Két NER alrendszer különíthető el, a transzkripcióval kapcsolt reparáció (TCR), amely a transzkripcionálisan aktív szakaszok átíródo szálát javítja és a globál genom reparációs rendszer (GGR), amely az inaktív genom régiók reparációját végzi.

Annak ellenére, hogy a NER fehérjék összehangolt működését *in vitro* rendszerben reprodukálni tudták UV fénnel besugárzott plazmid DNS-en tisztított fehérjék felhasználásával (Aboussekhra 1995), keveset tudunk arról, hogyan működik a NER az élő sejtben, a kromatinba ágyazott DNS-en. A heterokromatikus (különösen a pericentrikus, centromerikus, telomerikus) szakaszokon végbemenő javítási folyamatok alig ismertek, bár valószínűleg közvetlen összefüggés van a kromatin szerkezet, a DNS reparáció és a kromoszóma törések között (Surrallés 1998).

Az UV okozta DNS károsodások reparációja heterogén folyamat. A CPD-k keletkezése és reparációja nagyon eltérő a humán genom egyes régiói között és eltérő lehet a reparáció sebessége akár szomszédos szekvenciákon is. Az UV fototermékek gyorsabban javítódnak a transzkripcionálisan aktív DNS-en, mint a genom egyéb szakaszain, ezen belül is az aktív gének átíródo szálai élveznek előnyt az inaktív szállal szemben (Bohr 1987; Mellon 1987; Hanawalt 1991; Gao 1994; Tornaletti 1994; Tommasi 2000). Mindazonáltal az egyes emberi sejtvonalak és sejttípusok reparációs aktivitásának eltéréseiről igen keveset tudunk.

A normál sejtműködés számos termékéről igazolták, illetve feltételezik, hogy DNS károsító hatással rendelkezik. A károsodott bázisok gyakran spontán keletkeznek vagy oxidáció, alkilálás, illetőleg hibás bázispárosodás eredményei, melyek többségét a bázis excíziós reparációs rendszer (BER) javítja (bár néhány bázis károsodás javítására a NER is képes), ezért a BER-t gyakran a belső eredetű károsodások védelmi rendszerének tekintik (Memisoglu 2000). A makromolekulák (lipidek, fehérjék, RNS és DNS) szabadgyökök hatására bekövetkező oxidációja gyakran okoz patológiás elváltozásokat és betegségeket. Az oxidáló hatású szabadgyökök és a védelmi mechanizmusok (enzimatis és nem enzimatis antioxidánsok, reparációs rendszerek) egyensúlyának felborulása oxidatív stresszt eredményez, amely bizonyos életfolyamatok megzavarása következtében kóros elváltozásokhoz vezet.

Egyik alapvető különbség a NER és a BER között, hogy míg a NER néhány fehérje felhasználásával képes számos kémiai és szerkezetileg különböző károsodást felismerni, addig a BER több specifikus, korlátozott számú károsodás felismerésére képes fehérjét alkalmaz. A BER első lépésében a károsodott bázist egy specifikus DNS-glikoziláz kihalítja. Ezután az abázikus helyet egy apurin/apirimidin (AP) endonukleáz ismeri fel, amely 5' irányban elhalítja a foszfodiészter kötést és egy 5' abázikus véggel rendelkező száltörést hagy maga után. Az abázikus helyre a megfelelő nukleotidot a DNS polimeráz β (bizonyos helyzetekben a FEN1 endonukleáz) illeszti be endonukleáz és polimeráz aktivitása által, majd a szál ligálása következik.

E két reparációs rendszer (BER és a NER) fontos szerepet játszik a magasabbrendű eukarióták testi sejtjeiben a citotoxikus, mutagén és karcinogén hatások kivédésében. A csírasejtek mutációi átközlnek az utódoknak és fejlődési rendellenességeket valamint genetikai elváltozásokat okozhatnak.

Célkitűzések

I. A NER heterogén rendszer mind a károsodások felismerésében, mind javítási kinetikájában. A TCR és GGR fő komponenseinek jellemzése megtörtént, azonban igen keveset tudunk a struktúráisan fontos heterokromatikus szakaszok reparációjáról. Miután a csoportunkban eddig elvégzett DNS reparációs kísérletekben elsősorban a sok sejtet/DNS-t igénylő és ezért drága és bonyolult régi technikák alkalmazásával a reparáció más aspektusait vizsgáltuk, célul tűztük ki:

- olyan kvantitatív PCR alapú módszer kidolgozását, mellyel emberi sejtek heterokromatikus régióinak reparációs kinetikája vizsgálható kevés sejt felhasználásával,
- a kidolgozott PCR módszer alkalmazásával emberi, valamint humán/rágcsáló hibrid sejtvonalak reparációs kinetikájának vizsgálatát.

II. Az oxidatív károsodások jelentőségét az Alzheimer-kór pathomechanizmusában számos közlemény igazolja (Markesbery 1999; Christen 2000; Smith 2000b). Az idegsejtekben DNS és RNS oxidáció kialakulását is kimutatták. Az elmúlt években néhány közlemény alátámasztja, hogy az oxidatív stressz által okozott elváltozások nemcsak az agyban, hanem a perifériás szervekben is kimutathatók (Matsushima 1995; Parker, Jr. 1995; Mecocci 1998;). Ezek alapján vizsgálatainkhoz az ilyen típusú analízishez eddig mások által még nem használt alkalikus Comet-assay-t alkalmazva, élő, Alzheimer-kóros betegekben és életkorban hozzájuk illesztett egészséges idős emberekben az oxidatív DNS károsodások szintjének vizsgálatát kívántuk elvégezni:

- a perifériás vérből izolált limfocitákon kezelés nélkül,
- a perifériás vérből izolált limfocitákon *in vitro* alkalmazott oxidatív stresszt követő rövid reparációs idő elteltével.

Eredmények és következtetések

Disszertációm két DNS reparációs útvonal, a NER és a BER által javított DNS károsodások indukcióját és eltávolítását vizsgálja.

I. Az emberi sejtekben végbemenő UV fototermék-reparáció vizsgálatára egy A+T gazdag részletet tartalmazó pericentromerikus régiót célszekvenciaként alkalmazó kvantitatív PCR reakciót dolgoztunk ki. A módszer az UV károsodások azon tulajdonságán alapul, hogy azok száltorziós hatásuk révén gátolják a Taq polimeráz által végrehajtott replikációt (Ponti 1991; Kalinowski 1992; Murray 1992;).

A célszekvenciául választott chAB4 ismétlődő elemet eredetileg egy angiofibroma sejtvonalon polidiszperz DNS frakciójában fedezték fel. Ez egy alacsony kópiaszámú repetitív szekvencia család, amely kb. 100 kópiában található meg az emberi genomban, (szétszórtan a különböző kromoszómák pericentrikus heterokromatinjában) és evolúciós szempontból igen instabilnak tekinthető (Assum 1989; Assum 1991). A chAB4 elem igen érzékeny

célszekvencia az UV fény DNS károsító hatásának vizsgálatára, mivel nagyszámú, dimer képződésére alkalmas szomszédos pirimidin alkotja.

Kísérleteink során kidolgoztuk a chAB4 szekvencia kvantitatív amplifikációjának pontos körülményeit, melyek lehetővé teszik a fototermékek kimutatását nanogramnyi genomiális DNS-ből, fiziológiás UV dózisok alkalmazása mellett. Az optimális QPCR körülményeket alkalmazva (melyek lehetővé teszik, hogy az amplifikáció exponenciális fázisban maradjon) 10 emberi és két humán/rágcsáló hibrid sejtvonal reparációs kinetikáját vizsgáltuk.

A QPCR módszerrel hatékony reparációt detektáltunk (100% reparáció 12 ill. 24 óra alatt) a diploid humán fibroblaszt, a HT1080, az A375, az A9+15 és a TPC1 sejtvonalakban, ami meglepő jelenség az emberi heterokromatinban és meglehetősen váratlan az egér/humán hibrid (A9+15) sejtekben.

UV indukált száltörés akkumulációt detektáltunk QPCR-rel a látszólag már reparált DNS-ben 12 órával az UV kezelés után a 15A kínai (hőrcsög/humán hibrid) sejtvonalban. A száltörések mennyiségének emelkedését Comet assay-vel is megerősítettük, a jelenség magyarázata azonban további vizsgálatokat igényel.

A pericentromerikus heterokromatinban az UV károsodások eltávolításának defektusát, ill. hiányát mutattuk ki néhány tumoros sejtvonalban (RVH421, HeLa, EJ30) és a NER szindrómás Xeroderma pigmentosum nevű betegségben szenvedő személyekből izolált (XPA és XPC) sejtvonalakban.

Kísérleteink azt is igazolták, hogy a kromatinszerkezet fellazítása nátrium-butíráttal kezeléssel nem befolyásolta a heterokromatin reparációs kinetikáját, viszont a teljes genom reparációját meggyorsította. Ez a vizsgálat azt igazolja, hogy a pericentrikus heterokromatin reparációjában (főként a károsodások hozzáférhetőségének elősegítésében) eddig még nem azonosított faktorok is fontos szerepet játszhatnak.

A nagyszámú pirimidin dimer képződése a viszonylag rövid (~2 kb)-os chAB4 szekvencia részletesen jelentős torzulást válthat ki a DNS gerincben, amely a régió kromatin szerkezetének megzavarásához és struktúrális instabilitáshoz vezethet. Ez összhangban van azzal, hogy a heterokromatikus régió forró pontként szerepel számos duplikációs, mikrodeléciós és mikroduplikációs színromában (Chen 1997; Reiter 1997; Amos-Landgraf 1999; Horvath 2001; Padilla-Nash 2001; Shaikh 2001). A pericentrikus károsodások javítása védelmi mechanizmusként fontos a potenciálisan onkogén genomi átrendeződések

megelőzésében, illetve a reparációs hibák az instabil pericentrikus heterokromatinban elősegíthetik tumoros elváltozások kialakulását.

A sejtvonalak közötti reparációs képességbeli eltérések azt igazolják, hogy a chAB4 pericentromerikus repetitív szekvencia reparációja számos faktortól függhet, hiszen a GGR-ben a károsodások felismerése többlépéses és összetett folyamat, aminek működését, eltéréseit a jelenlegi ismereteink alapján nem tudjuk megmagyarázni. Az alkalmazott QPCR technika azonban alkalmas módszer a reparációs folyamatok nyomonkövetésére és jellemzésére a vizsgált sejtekben. A QPCR technikával lehetőség nyílik a heterokromatikus reparációt befolyásoló faktorok vizsgálatára és különböző sejttypusok esetén kapott adatok összegzésével jobban megérthetjük ezeket a komplex folyamatokat.

II. Az Alzheimer kóros betegekben a DNS oxidáció markereinek vizsgálatára az oxidatív DNS károsodásokra specifikus endonukleázokkal kiegészített, alkalikus Comet assay-t használtuk (az Fpg az oxidált purinokat, az EndoIII az oxidált pirimidineket ismeri fel). A módszer pontos és reprodukálható körülményeket biztosít az oxidatív bázismódosulások vizsgálatára, kísérleti oxidatív melléktermékek képzése nélkül.

A Comet assay-vel az Alzheimer-kóros betegek perifériás limfocitáiban szignifikáns emelkedést detektáltunk az oxidált purinbázisok mennyiségében. Ez az eredmény jó összhangban van Mecocci és mtsai eredményeivel, akik HPLC-vel szignifikánsan magasabb 8OHdG szintet detektáltak AD limfocitákban (Mecocci 1998).

Vizsgálatainkban az egyesszálú törések és az oxidált pirimidinek mennyisége enyhén, de nem szignifikánsan magasabb volt Alzheimer-kóros betegekben, mint az összehasonlításához használt, korban illesztett egészséges idős személyekben.

Összehasonlítottuk a kontrollok és az Alzheimer-kóros betegek limfocitáinak reparációs képességét. Az oxidatív stresszt követően az egy órás reparációs idő után detektált, javítatlanul maradó egyes szálú törések mennyisége (amelyet Comet csóva DNS-ként mértünk) nem különbözött szignifikánsan a két csoport között, hasonló reparációs aktivitást tükrözve. A reparáció után megmaradó egyesszálú törések+Fpg felismerő helyek mennyisége szignifikánsan magasabb volt az AD betegekben, mint a kontroll személyekben. A reparáció előtti és utáni Fpg helyek összehasonlítása alapján az oxidált purinok reparációja kissé hatékonyabb volt a kontrollokban, mint az Alzheimer-kóros betegekben.

Az oxidált pirimidinek eltávolítása (az Endonukleáz III felismerő helyek csökkenése) hatékonyabb volt, mint a purinoké, sőt az Alzheimer-kórosokban szignifikáns csökkenést detektáltunk a reparáció során, ami hatékony oxidált pirimidin reparációt jelez.

Ezek az eredmények az oxidált purinok és pirimidinek reparációs kinetikájának eltérését mutatják. Míg az egyesszálú törések és az oxidált pirimidinek reparációja között nincs szignifikáns különbség a kontroll csoport és az AD betegek között, (vagyis valószínűleg a BER ezen károsodások reparációjáért felelős enzimeit megfelelően működnek a két csoportban) addig az oxidált purinok vizsgálata révén kapott eredmények azt tükrözik, hogy az AD-s limfocitákban nem megfelelően megy végbe ezek javítása.

Az AD-s limfociták minden bizonnyal oxidatív stressznek vannak kitéve, aminek hatását purin reparációs zavarok súlyosbíthatják. Ezt támasztja alá, hogy Lovell és munkatársai (2000) szignifikánsan csökkent 8-oxoguanin glikoziláz (a 8OHdG kihasításáért felelős BER enzim) és megnövekedett DNS helikáz aktivitást detektáltak Alzheimer-kórosok agyából izolált sejtmagi fehérje mintákban. Jaruga és Dizdaroglu (1996) vizsgálatai szerint a purinok az oxidatív stresszel szemben legfogékonyabb bázisok és emberi limfoblasztoid sejtkultúrákban reparáció defektusuk a 8OHdG felhalmozódásához vezet. Gabbita és mtsai (1998) az agyi oxidatív stressz szempontjából szintén a guanint találták a legsérülékenyebb bázisnak, aminek nagyfokú oxidációja az Alzheimer-kóros agy funkcionális elváltozásaihoz vezethet.

Összegzésül megállapíthatjuk, hogy vizsgálataink szerint az Alzheimer-kór a perifériás limfocitákban emelkedett szintű oxidatív DNS (főként purin) károsodással párosul, ezenkívül defektus figyelhető meg az oxidált purinok reparációjában. Megállapíthatjuk, hogy a Comet assay az oxidatív DNS károsodásokra specifikus endonukleázok használatával egy egyszerű, pontos módszernek bizonyult az Alzheimer-kórban indukálódó szabadgyökök DNS károsító hatásának tanulmányozására. Alkalmazásával igazoltuk, hogy az oxidatív stressz nemcsak az idegrendszerben, hanem a perifériás szervekben is kialakul.

10. SUMMARY OF PH.D THESIS

Introduction

The large genomes of mammalian cells are vulnerable to an array of DNA-damaging agents, of both endogenous and environmental origin. Unrepaired DNA damage in the mammalian genome results in the induction of mutations during replication. These mutations may interfere with cellular viability or, when present in genes involved in cellular growth control, predispose the cell to develop into malignant cancer. To counteract these threats cells have evolved various DNA repair pathways. Among these, nucleotide excision repair (NER) is the most versatile, capable of removing a wide range of helix distorting lesions. The removal of these DNA lesions by NER occurs via a reaction mechanism that includes DNA damage recognition, lesion demarcation, dual asymmetrical incisions at the 5' and 3' sites flanking the lesion, excision of 30 nucleotide from the single-stranded loop, containing the lesion, and gap-filling by DNA synthesis and ligation (de Laat 1999).

Two NER sub-pathways, the transcription-coupled repair (TCR) and the global genome repair (GGR) have been identified as acting on the transcribed strand of active genes and on transcriptionally inactive DNA, respectively. TCR is believed to underlie the recovery of RNA polymerase II dependent RNA synthesis that is inhibited following exposure to genotoxic agents.

In spite of the fact that the concerted action of NER proteins has been reproduced *in vitro* using UV irradiated plasmid DNA and purified protein components (Aboussekhara 1995) little is known about NER mechanisms in chromatin environment. Information concerning the repair of heterochromatic (especially pericentric, centromeric and telomeric) sequences is scarce, however there is probably a direct link between chromatin structure, DNA repair and chromosome fragility (Surrallès 1998).

It is well known that multiple levels of heterogeneity exist in the DNA repair of photoproducts. Induction and repair of CPDs can vary significantly along human genome and different repair rates are often described even between neighbouring sequences. UV damage is repaired more rapidly in transcriptionally active DNA than in the whole genome, largely due to faster repair in the transcribed strand than in the non transcribed strand of genes (Bohr 1987; Mellon 1987; Hanawalt 1991; Gao 1994; Tornaletti 1994; Tommasi 2000).

Nevertheless little is known about cell type specific differences in the repair capacity of different human cell lines.

Several endogenous products of normal metabolisms have been demonstrated to or suspected of damaging DNA. These include a variety of damaged bases, such as spontaneously formed, oxidised, alkylated or mismatched bases that are normally repaired by base excision repair (BER) although many of these lesions are also substrates for NER (Memisoglu 2000). BER is generally believed to constitute the primary defence against lesions formed by endogenous DNA damaging agents. Free radical mediated oxidation of macromolecules (lipids, proteins, RNA and DNA) often contributes to pathological alterations and diseases. The imbalance between oxidative free radicals and defence mechanisms (enzymatic and nonenzymatic antioxidants, repair systems) leads to oxidative stress, which can affect processes leading to clinical manifestation.

The fundamental difference between NER and BER is that NER uses a limited number of proteins to recognise many different types of damage, whereas BER uses a number of damage-recognition proteins, each specific for a limited number of lesions. In the first phase of BER, the damaged base is removed by a DNA glycosylase. The abasic site is then recognised by an apurinic/apyrimidic (AP) endonuclease, which cleaves the phosphodiester bond that is 5' to the lesion, and leaves behind a strand break with a normal 5'-abasic terminus. Replacement of the abasic residue with the correct nucleotide relies on both the endonuclease and polymerisation activities of DNA polymerase β (and in certain situations the flap endonuclease FEN1), and is followed by ligation of the break.

These two DNA repair pathways (BER and NER) play an important role in protecting the somatic cells of higher eukaryotes against cytotoxic, mutagenic and carcinogenic effects of a wide variety of DNA damaging agents. In contrast to somatic cells, mutations occurring in germ cells are transferred to the progeny and may lead to malformations and genetic defects in the offspring.

Aims

I. As described in the introduction NER is a heterogenous system. The function and concerted action of core proteins of TCR and GGR is well understood, but our understanding of repair process in heterochromatin is poor. Methods used previously for examining different aspects of DNA repair are not sufficiently specific, do not give accurate information, often

require a large amount of cell/DNA and therefore are expensive. PCR based DNA repair methods are fast and accurate, and produce reproducible results from small amounts of DNA. Using PCR-based methods, specific genomic regions (which are not accessible by other techniques) can be examined.

The aim of our research were as follows:

- to develop a highly sensitive and specific quantitative PCR (QPCR) method for the study of DNA repair in human pericentric heterochromatin
- to obtain further knowledge of repair kinetics of UV induced DNA damage in different human cell lines using the QPCR method

II. There is increasing evidence that free radical damage is involved in neuron death in neurodegenerative disorders (Markesbery, 1997, 1999; Christen 2000; Smith 2000b). Recent publications support this and suggest that oxidative stress is also present in peripheral tissues (Matsushima 1995; Parker, Jr. 1995; Mecocci 1998;).

Therefore we decided to examine this link in peripheral lymphocytes of patients with Alzheimer's disease.

The aim of our experiments were using the alkaline Comet assay:

- to measure the level of oxidative DNA damage in peripheral lymphocytes (from patients with Alzheimer's disease versus healthy, age matched controls) **without any treatment**
- to measure the level of oxidative DNA damage in peripheral lymphocytes (from patients with Alzheimer's disease versus healthy, age matched controls) **after a short repair period following *in vitro* oxidative stress**

Results and conclusions

This Ph.D thesis focuses on the induction and removal of DNA damage repaired by two DNA repair pathways NER and BER.

I. In order to examine the repair characteristics of UV photoproduct repair in human cell lines a quantitative PCR method employing a particularly A+T rich pericentromeric region as a probe, was developed. The method is based on the inhibitory effect of UV photoproducts on replication by Taq polymerase (Ponti 1991; Kalinowski 1992; Murray 1992;).

The target sequence was chAB4, a sequence element originally discovered in the polydisperse DNA of an angiofibroma cell lines. It is a low copy number repetitive element, occurring about 100 times in the human genome, and in evolutionary sense it represents an unusually unstable sequence family (Assum 1994; Assum 1998). An advantage of studying the chAB4 sequence is that it contains long arrays of potential pyrimidine dimers, and thus serves as a sensitive target for ultraviolet light.

We developed precise conditions for the quantitative amplification of the chAB4 target sequence from nanogram quantities of genomic DNA and for the detection of UV-induced photoproducts at biologically relevant doses. The optimal PCR conditions (which ensure that amplification remains in exponential phase) were used to examine the repair kinetics of 10 human and 2 human/rodent hybrid cell lines.

Using QPCR method we detected efficient repair (100% repair in 12 or in 24 hour) in diploid human fibroblast, in HT1080, in A375, A9+15 and in TPC1 cell lines, which is not usual in human heterochromatin and a quite unexpected phenomena in rodent/human hybrid as A9+15.

12 hours after UV irradiation an unexpected UV induced strand breakage accumulation in the human chromosome 15 was detected by QPCR after seemingly complete repair in 15A hamster/human hybrid cells. Elevation of the level of DNA strand breaks was confirmed by Comet assay, however, explanation of this process needs further investigation.

Deficient repair was detected in some tumour cell lines (RVH421, HeLa, EJ30) and in cell lines derived from NER deficient Xeroderma pigmentosum patients (XPA and XPC).

This work shows that making chromatin accessible via sodium-butyrate treatment does not improve the repair of heterochromatin but improves overall repair in HeLa cells. This suggests that the lack of UV damage repair (accessibility of lesions) in pericentric heterochromatin maybe under the control of yet unidentified repair factors.

High yields of pyrimidine dimers produced in the relatively short chAB4 sequence could cause considerable torsion of DNA, which could in turn lead to perturbation of chromatin organisation and structural instability. This may be relevant to pericentric heterochromatic regions, these being hot spots for duplication, microdeletion and microduplication syndromes ((Chen 1997; Reiter 1997; Amos-Landgraf 1999; Horvath 2001; Padilla-Nash 2001; Shaikh 2001). The correct repair of pericentric lesions would, therefore, be important as a defence against gross, potentially oncogenic genomic rearrangements. Thus

deficiency in repair in this unstable pericentric heterochromatin region may promote oncogenic changes.

Given this cellular diversity of response to chAB4 damage, we can conclude that repair of this pericentromeric heterochromatin sequence is governed by factors which are too complex to be understood at present; in accordance with the current understanding that the damage recognition mechanism for global genomic nucleotide excision repair is significantly complex process. The QPCR-based technique gives a unique opportunity to characterise and measure the repair of heterochromatic regions in human cells, even after very low UV doses. Results obtained by this straightforward technique can be used to determine factors contributing to the efficiency of the global excision repair subpathway on defined sequences.

II. In order to examine DNA oxidation markers in Alzheimer's disease we used an alkaline Comet assay with lesion specific endonucleases (Fpg recognises the oxidised purines, EndoIII recognises oxidised pyrimidines). This method allows precise and reproducible conditions for detecting oxidative base modifications without causing formation of oxidative artifacts.

The Comet assay showed significant elevations of oxidised purines in the basal state of peripheral lymphocytes in Alzheimer' patients (AD). This result follows the findings of Mecocci (1994) who, using HPLC, detected significantly higher levels of 8OhdG in lymphocytes of AD patients than in controls.

The level of single strand breaks and oxidised pyrimidines were found slightly, but non-significantly elevated in AD patients compared to healthy, age matched control patients.

We compared the DNA repair capacity of oxidative damage in AD lymphocytes and controls. After one hour repair period, the amount of remaining single stand breaks and alkali-labile sites of lymphocyte DNA did not differ significantly between AD patients and controls, reflecting similar effectiveness of repair. The increase of Comet tail DNA showed significantly higher levels of oxidised purines remaining after repair period in AD patients, indicating a difference between the repair kinetics of Fpg sites in the two groups. The amount of oxidised purines removed during a repair period was higher in controls than in AD patients. Removal of oxidised pyrimidines was more efficient than that of purines and interestingly it was significantly more effective in AD. This significant decrease of Endonuclease III sites indicates effective repair of pyrimidins in AD patients.

These findings showed a difference between the repair kinetics of oxidised purines and pyrimidines in AD patients. While there is no significant difference between single strand break repair kinetics of AD lymphocytes and controls, and probably no defect in the essential components of this repair pathway, our results not only support the concept that AD lymphocytes are subject to increased intracellular oxidative stress, but also suggests that AD cells may have deficiencies in oxidation-specific DNA repair mechanisms leading to accumulation of oxidised purines.

In accordance with our results a statistically significant decrease of the activity of 8-oxoguanine glycosylase (responsible for the excision of 8OdHG) and increased DNA helicase activity has been found in nuclear protein samples from AD brain tissue (Lovell 2000). Jaruga and Dizdaroglu (1996) have shown that purines are the most susceptible bases for oxidative damage and the deficiency in cultured human lymphoblastoid cells of their repair system leads to an accumulation of 8OHdG. Guanine was also found to be the most vulnerable base in oxidative stress in brain tissue, and Gabbita et al. (1998) suggested that damage to this base could cause functional changes in AD brains.

In conclusion, our study demonstrates that Alzheimer's disease is associated with elevated levels of oxidative DNA damage in peripheral lymphocytes, as well as the previously-reported neuronal damage, and showed that removal of oxidised purines in AD lymphocytes is impaired. We also demonstrated that the Comet assay with oxidative lesion specific endonucleases offers a simple alternative methodology for detection of increased free radical damage in nuclear DNA in Alzheimer's disease and can verify that oxidative stress in AD is present not only in neuronal tissues but also in peripheral lymphocytes.

10. IRODALOMJEGYZÉK

1. Aboussekhra A, Biggerstaff M, Shivji MK, Vilpo JA, Moncollin V, Podust VN, Protic M, Hubscher U, Egly JM, and Wood RD (1995) Mammalian DNA nucleotide excision repair reconstituted with purified protein components. *Cell* 80 (6):859-868.
2. Ahnstrom G and Edvardsson KA (1974) Letter: Radiation-induced single-strand breaks in DNA determined by rate of alkaline strand separation and hydroxylapatite chromatography: an alternative to velocity sedimentation. *Int.J.Radiat.Biol.Relat Stud.Phys.Chem.Med.* 26 (5):493-497.
3. Alexander, P. Cross-linking of deoxyribonucleic acid to protein following ultra-violet irradiation of different cells. Moroson, H. *Nature* 194, 882-883. 1962.
4. American, Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders. 3rd ed., Revised. 1987. American Psychiatric Association. 1987.
5. Amos-Landgraf JM, Ji Y, Gottlieb W, Depinet T, Wandstrat AE, Cassidy SB, Driscoll DJ, Rogan PK, Schwartz S, and Nicholls RD (1999) Chromosome breakage in the Prader-Willi and Angelman syndromes involves recombination between large, transcribed repeats at proximal and distal breakpoints. *Am.J.Hum.Genet.* 65 (2):370-386.
6. Asahara H, Wistort PM, Bank JF, Bakerian RH, and Cunningham RP (1989) Purification and characterization of *Escherichia coli* endonuclease III from the cloned *nth* gene. *Biochemistry* 28 (10):4444-4449.
7. Asahina H, Kuraoka I, Shirakawa M, Morita EH, Miura N, Miyamoto I, Ohtsuka E, Okada Y, and Tanaka K (1994) The XPA protein is a zinc metalloprotein with an ability to recognize various kinds of DNA damage. *Mutat.Res.* 315 (3):229-237.
8. Assum G, Bockle B, Fink T, Dmochewitz U, and Krone W (1989) Restriction analysis of chromosomal sequences homologous to single-copy fragments cloned from small polydisperse circular DNA (spcDNA). *Hum.Genet.* 82 (3):249-254.
9. Assum G, Fink T, Klett C, Lengl B, Schanbacher M, Uhl S, and Wohr G (1991) A new multisequence family in human. *Genomics* 11 (2):397-409.
10. Assum G, Gartmann C, Schempp W, and Wohr G (1994) Evolution of the chAB4 multisequence family in primates. *Genomics* 21 (1):34-41.
11. Assum G, Pasantes J, Glaser B, Schempp W, and Wohr G (1998) Concerted evolution of members of the multisequence family chAB4 located on various nonhomologous chromosomes. *Mamm.Genome* 9.(1):58-63.
12. Ayala-Torres S, Chen Y, Svoboda T, Rosenblatt J, and Van Houten B (2000) Analysis of gene-specific DNA damage and repair using quantitative polymerase chain reaction. *Methods* 22 (2):135-147.
13. Balajee AS, May A, Dianov GL, Friedberg EC, and Bohr VA (1997) Reduced RNA polymerase II transcription in intact and permeabilized Cockayne syndrome group B cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94 (9):4306-4311.
14. Bartus RT, Dean RL, III, Beer B, and Lippa AS (1982) The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* 217 (4558):408-414.
15. Becker MM and Wang Z (1989) Origin of ultraviolet damage in DNA. *J.Mol.Biol.* 210 (3):429-438.
16. Behl C, Davis J, Cole GM, and Schubert D (1992) Vitamin E protects nerve cells from amyloid beta protein toxicity. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 186 (2):944-950.
17. Behl C, Davis JB, Lesley R, and Schubert D (1994) Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity. *Cell* 77 (6):817-827.
18. Berg RJ, Rebel H, van der Horst GT, van Kranen HJ, Mullenders LH, van Vloten WA, and de Gruijl FR (2000) Impact of global genome repair versus transcription-coupled repair on ultraviolet carcinogenesis in hairless mice. *Cancer Res.* 60 (11):2858-2863.
19. Beukers, R. Isolation and identification of the irradiation product of thymine. Berends, W. *Biochim.Biophys.Acta* 41, 550-551. 1960.
20. Blass JP, Sheu RK, and Gibson GE (2000) Inherent abnormalities in energy metabolism in Alzheimer disease. Interaction with cerebrovascular compromise. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 903:204-221.
21. Bohr VA, Smith CA, Okumoto DS, Hanawalt PC. (1985) DNA repair in an active gene: removal of pyrimidine dimers from the DHFR gene of CHO cells is much more efficient than in the genome overall. *Cell.* 40(2):359-69.
22. Bohr VA (1988) DNA repair and transcriptional activity in genes. *J.Cell Sci.* 91 (Pt 2):175-178.
23. Bohr VA, Phillips DH, and Hanawalt PC (1987) Heterogeneous DNA damage and repair in the mammalian genome. *Cancer Res.* 47 (24 Pt 1):6426-6436.

24. Boorstein RJ, Hilbert TP, Cunningham RP, and Teebor GW (1990) Formation and stability of repairable pyrimidine photohydrates in DNA. *Biochemistry* 29 (46):10455-10460.
25. Bootsma D and Hoeijmakers JH (1993) DNA repair. Engagement with transcription. *Nature* 363 (6425):114-115.
26. Bose SN, Davies RJ, Sethi SK, and McCloskey JA (1983) Formation of an adenine-thymine photoadduct in the deoxydinucleoside monophosphate d(TpA) and in DNA. *Science* 220 (4598):723-725.
27. Botta E, Nardo T, Broughton BC, Marinoni S, Lehmann AR, and Stefanini M (1998) Analysis of mutations in the XPD gene in Italian patients with trichothiodystrophy: site of mutation correlates with repair deficiency, but gene dosage appears to determine clinical severity. *Am.J.Hum.Genet.* 63 (4):1036-1048.
28. Bowman KK, Sicard DM, Ford JM, and Hanawalt PC (2000) Reduced global genomic repair of ultraviolet light-induced cyclobutane pyrimidine dimers in simian virus 40-transformed human cells. *Mol.Carcinog.* 29 (1):17-24.
29. Butterfield DA, Drake J, Pocernich C, Castegna (2001) Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role for amyloid beta-peptide *Trends Mol Med.* (12):548-54.
30. Brewer C, Holloway S, Zawalnyski P, Schinzel A, and FitzPatrick D (1999) A chromosomal duplication map of malformations: regions of suspected h. *Am.J.Hum.Genet.* 64 (6):1702-1708.
31. Buschta-Hedayat N, Buterin T, Hess MT, Missura M, and Naegeli H (1999) Recognition of nonhybridizing base pairs during nucleotide excision repair of DNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96 (11):6090-6095.
32. Cadet J, Gentner NE, Rozga B, and Paterson MC (1983) Rapid quantitation of ultraviolet-induced thymine-containing dimers in human cell DNA by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J.Chromatogr.* 280 (1):99-108.
33. Citron M.(2000) Secretases as targets for the treatment of Alzheimer's disease. *Mol Med Today* (10):392-7.
34. Chen KS, Manian P, Koeuth T, Potocki L, Zhao Q, Chinault AC, Lee CC, and Lupski JR (1997) Homologous recombination of a flanking repeat gene cluster is a mechanism for a common contiguous gene deletion syndrome. *Nat.Genet.* 17 (2):154-163.
35. Cheung KJ, Jr., Mitchell D, Lin P, and Li G (2001) The tumor suppressor candidate p33(ING1) mediates repair of UV-damaged DNA. *Cancer Res.* 61 (13):4974-4977.
36. Christen Y (2000) Oxidative stress and Alzheimer disease. *Am.J.Clin.Nutr.* 71 (2):621S-629S.
37. Clayson DB, Mehta R, and Iverson F (1994) International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens. Oxidative DNA damage--the effects of certain genotoxic and operationally non-genotoxic carcinogens. *Mutat.Res.* 317 (1):25-42.
38. Collins AR (1977) DNA damage in ultraviolet-irradiated HeLa and CHO-K1 cells examined by alkaline lysis and hydroxyapatite chromatography. *Biochim.Biophys.Acta* 478 (4):461-473.
39. Collins AR (1999) Oxidative DNA damage, antioxidants, and cancer. *Bioessays* 21 (3):238-246.
40. Collins AR, Dobson VL, Dusinska M, Kennedy G, and Stetina R (1997) The comet assay: what can it really tell us? *Mutat.Res.* 375 (2):183-193.
41. Collins AR, Dusinska M, Gedik CM, and Stetina R (1996) Oxidative damage to DNA: do we have a reliable biomarker? *Environ.Health Perspect.* 104 Suppl 3:465-469.
42. Collins AR, Duthie SJ, and Dobson VL (1993) Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. *Carcinogenesis* 14 (9):1733-1735.
43. Collins AR and Horvathova E (2001) Oxidative DNA damage, antioxidants and DNA repair: applications of the comet assay. *Biochem.Soc.Trans.* 29 (Pt 2):337-341.
44. Collins AR, Ma AG, and Duthie SJ (1995) The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. *Mutat.Res.* 336 (1):69-77.
45. Cooper PK, Nospikel T, Clarkson SG, and Leadon SA (1997) Defective transcription-coupled repair of oxidative base damage in Cockayne syndrome patients from XP group G. *Science* 275 (5302):990-993.
46. Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, and Pericak-Vance MA (1993) Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261 (5123):921-923.
47. Cserpan I, Katona R, Praznovszky T, Novak E, Rozsavolgyi M, Csonka E, Morocz M, Fodor K, and Hadlaczky G (2002) The chAB4 and NF1-related long-range multisequence DNA families are contiguous in the centromeric heterochromatin of several human chromosomes. *Nucleic Acids Res.* 30 (13):2899-2905.
48. Curti D, Rognoni F, Gasparini L, Cattaneo A, Paolillo M, Racchi M, Zani L, Bianchetti A, Trabucchi M, Bergamaschi S, and Govoni S (1997) Oxidative metabolism in cultured fibroblasts derived from sporadic Alzheimer's disease (AD) patients. *Neurosci.Lett.* 236 (1):13-16.
49. D'Ambrosio SM, Whetstone JW, Slazinski L, and Lowney E (1981) Photorepair of pyrimidine dimers in human skin in vivo. *Photochem.Photobiol.* 34 (4):461-464.

50. Davis RE, Miller S, Herrnsstadt C, Ghosh SS, Fahy E, Shinobu LA, Galasko D, Thal LJ, Beal MF, Howell N, Parker WD Jr. (1997) Mutations in mitochondrial cytochrome c oxidase genes segregate with late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94(9):4526-31.
51. Daya-Grosjean L, Dumaz N, and Sarasin A (1995) The specificity of p53 mutation spectra in sunlight induced human cancers. *J.Photochem.Photobiol.B* 28 (2):115-124.
52. de Boer J and Hoeijmakers JH (2000) Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis* 21 (3):453-460.
53. de Boer JG. (2002), Polymorphisms in DNA repair and environmental interactions. *Mutat Res.* 509(1-2):201-10.
54. de Laat WL, Jaspers NG, and Hoeijmakers JH (1999) Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes Dev.* 13 (7):768-785.
55. Decraene D, Agostinis P, Pupe A, de Haes P, and Garmyn M (2001) Acute response of human skin to solar radiation: regulation and function of the p53 protein. *J.Photochem.Photobiol.B* 63 (1-3):78-83.
56. Deforce DL, Ryniers FP, van den Eeckhout EG, Lemiere F, and Esmans EL (1996) Analysis of DNA adducts in DNA hydrolysates by capillary zone electrophoresis and capillary zone electrophoresis-electrospray mass spectrometry. *Anal.Chem.* 68 (20):3575-3584.
57. Deng G, Su JH, Ivins KJ, Van Houten B, and Cotman CW (1999) Bcl-2 facilitates recovery from DNA damage after oxidative stress. *Exp.Neurol.* 159 (1):309-318.
58. Dizdaroglu M (1992) Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin. *Mutat.Res.* 275 (3-6):331-342.
59. Englander EW and Howard BH (1997) Alu-mediated detection of DNA damage in the human genome. *Mutat.Res.* 385 (1):31-39.
60. Evans DA, Funkenstein HH, Albert MS, Scherr PA, Cook NR, Chown MJ, Hebert LE, Hennekens CH, and Taylor JO (1989) Prevalence of Alzheimer's disease in a community population of older persons. Higher than previously reported. *JAMA* 262 (18):2551-2556.
61. Evans E, Fellows J, Coffey A, and Wood RD (1997) Open complex formation around a lesion during nucleotide excision repair provides a structure for cleavage by human XPG protein. *EMBO J.* 16 (3):625-638.
62. Fishman PH, Simmons JL, Brady RO, and Freese E (1974) Induction of glycolipid biosynthesis by sodium butyrate in HeLa cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 59 (1):292-299.
63. Ford JM, Baron EL, and Hanawalt PC (1998) Human fibroblasts expressing the human papillomavirus E6 gene are deficient in global genomic nucleotide excision repair and sensitive to ultraviolet irradiation 2. *Cancer Res.* 58 (4):599-603.
64. Ford JM and Hanawalt PC (1997) Expression of wild-type p53 is required for efficient global genomic nucleotide excision repair in UV-irradiated human fibroblasts. *J.Biol.Chem.* 272 (44):28073-28080.
65. Friedberg E. 1995. DNA repair. New York, NY: Freeman.
66. Gabbita SP, Lovell MA, and Markesbery WR (1998) Increased nuclear DNA oxidation in the brain in Alzheimer's disease. *J.Neurochem.* 71 (5):2034-2040.
67. Gao S, Drouin R, and Holmquist GP (1994) DNA repair rates mapped along the human PGK1 gene at nucleotide resolution. *Science* 263 (5152):1438-1440.
68. Gasparro FP and Fresco JR (1986) Ultraviolet-induced 8,8-adenine dehydromers in o. *Nucleic Acids Res.* 14 (10):4239-4251.
69. Gedik CM, Ewen SW, and Collins AR (1992) Single-cell gel electrophoresis applied to the analysis of UV-C damage and its repair in human cells. *Int.J.Radiat.Biol.* 62 (3):313-320.
70. Gedik CM, Wood SG, and Collins AR (1998) Measuring oxidative damage to DNA; HPLC and the comet assay compared. *Free Radic.Res.* 29 (6):609-615.
71. Gibbons RJ, McDowell TL, Raman S, O'Rourke DM, Garrick D, Ayyub H, and Higgs DR (2000) Mutations in ATRX, encoding a SWI/SNF-like protein, cause diverse changes in the pattern of DNA methylation 1. *Nat.Genet.* 24 (4):368-371.
72. Graeber TG, Peterson JF, Tsai M, Monica K, Fornace AJ, Jr., and Giaccia AJ (1994) Hypoxia induces accumulation of p53 protein, but activation of a G1- phase checkpoint by low-oxygen conditions is independent of p53 status. *Mol.Cell Biol.* 14 (9):6264-6277.
73. Green CM and Almouzni G (2002) When repair meets chromatin: First in series on chromatin dynamics. *EMBO Rep.* 3 (1):28-33.
74. Guillo LA, Blais J, Vigny P, and Spassky A (1995) Selective DNA thymine dimerization during UVA irradiation in the presence of a saturated pyridopsoralen. *Photochem.Photobiol.* 61 (4):331-335.
75. Hanawalt PC (1991) Heterogeneity of DNA repair at the gene level. *Mutat.Res.* 247 (2):203-211.
76. Hanawalt PC (1998) Genomic instability: environmental invasion and the enemies within. *Mutat.Res.* 400 (1-2):117-125.
77. Hanawalt PC (2001) Controlling the efficiency of excision repair. *Mutat.Res.* 485 (1):3-13.

78. Hanawalt PC. Subpathways of nucleotide excision repair and their regulation. *Oncogene*. 2002 21(58):8949-56.
79. Hara R, Mo J, and Sancar A (2000) DNA damage in the nucleosome core is refractory to repair by human excision nuclease. *Mol.Cell Biol.* 20 (24):9173-9181.
80. He Z, Henricksen LA, Wold MS, and Ingles CJ (1995) RPA involvement in the damage-recognition and incision steps of nucleotide excision repair. *Nature* 374 (6522):566-569.
81. Hearst JE (1995) The structure of photolyase: using photon energy for DNA repair. *Science* 268 (5219):1858-1859.
82. Hensley K, Hall N, Subramaniam R, Cole P, Harris M, Aksenov M, Aksenova M, Gabbita SP, Wu JF, Carney JM, and . (1995) Brain regional correspondence between Alzheimer's disease histopathology and biomarkers of protein oxidation. *J.Neurochem.* 65 (5):2146-2156.
83. Hess MT, Naegeli H, and Capobianco M (1998) Stereoselectivity of human nucleotide excision repair promoted by defective hybridization. *J.Biol.Chem.* 273 (43):27867-27872.
84. Hoeijmakers JH (2001a) From xeroderma pigmentosum to the biological clock contributions of Dirk Bootsma to human genetics. *Mutat.Res.* 485 (1):43-59.
85. Hoeijmakers JH (2001b) Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411 (6835):366-374.
86. Horvath JE, Bailey JA, Locke DP, and Eichler EE (2001) Lessons from the human genome: transitions between euchromatin and heterochromatin. *Hum.Mol.Genet.* 10 (20):2215-2223.
87. Hou SM, Ryk C, Kannio A, Angelini S, Falt S, Nyberg F, Husgafvel-Pursiainen K. (2003) Influence of common XPD and XRCC1 variant alleles on p53 mutations in lung tumors. *Environ Mol Mutagen.* 41(1):37-42
88. Huang JC, Svoboda DL, Reardon JT, and Sancar A (1992) Human nucleotide excision nuclease removes thymine dimers from DNA by incising the 22nd phosphodiester bond 5' and the 6th phosphodiester bond 3' to the photodimer. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89 (8):3664-3668.
89. Hu JJ, Mohrenweiser HW, Bell DA, Leadon SA, Miller MS. (2002) Symposium overview: genetic polymorphisms in DNA repair and cancer risk. *Toxicol Appl Pharmacol*;185(1):64-73.
90. IARC. Solar and ultraviolet radiation. IARC Scientific Publication, Lyon, France, 1992. 55. 1992. 1992.
91. Imlay JA and Linn S (1988) DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science* 240 (4857):1302-1309.
92. Itin PH, Bircher AJ, Lautenschlager S, Zuberbuhler E, and Guggenheim R (1994) A new clinical disorder of twisted and rolled body hairs with multiple, large knots. *J.Am.Acad.Dermatol.* 30 (1):31-35.
93. Itin PH and Pittelkow MR (1990) Trichothiodystrophy: review of sulfur-deficient brittle hair syndromes and association with the ectodermal dysplasias. *J.Am.Acad.Dermatol.* 22 (5 Pt 1):705-717.
94. Jankowski J and Cader AB (1997) The effect of depletion of the earth ozone layer on the human health condition. *Int.J.Occup.Med.Environ.Health* 10 (4):349-364.
95. Jaruga P and Dizdaroglu M (1996) Repair of products of oxidative DNA base damage in human cells. *Nucleic Acids Res.* 24 (8):1389-1394.
96. Ji Y, Eichler EE, Schwartz S, and Nicholls RD (2000) Structure of chromosomal duplicons and their role in mediating human genomic disorders. *Genome Res.* 10 (5):597-610.
97. Johns, H. E. The ultraviolet photochemistry of thymidyl(3'-5')-thymidine. Pearson, M. L. *J.Mol.Biol.* 9, 503-524. 1964. 1964.
98. Jones CJ and Wood RD (1993) Preferential binding of the xeroderma pigmentosum group A complementing protein to damaged DNA. *Biochemistry* 32 (45):12096-12104.
99. Jones PA and Baylin SB (2002) The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat.Rev.Genet.* 3 (6):415-428.
100. Kalinowski DP, Illenye S, and Van Houten B (1992) Analysis of DNA damage and repair in murine leukemia L1210 cells using a quantitative polymerase chain reaction assay. *Nucleic Acids Res.* 20 (13):3485-3494.
101. Kanowski S, Herrmann WM, Stephan K, Wierich W, and Horr R (1996) Proof of efficacy of the ginkgo biloba special extract EGb 761 in outpatients suffering from mild to moderate primary degenerative dementia of the Alzheimer type or multi-infarct dementia. *Pharmacopsychiatry* 29 (2):47-56.
102. Kasten U, Beyersmann D, Dahm-Daphi J, and Hartwig A (1995) Sensitive nonradioactive detection of UV-induced cyclobutane pyrimidine dimers in intact mammalian cells. *Mutat.Res.* 336 (2):143-152.
103. Kessis TD, Slebos RJ, Nelson WG, Kastan MB, Plunkett BS, Han SM, Lorincz AT, Hedrick L, and Cho KR (1993) Human papillomavirus 16 E6 expression disrupts the p53-mediated cellular response to DNA damage. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 90 (9):3988-3992.
104. Kim JK, Patel D, and Choi BS (1995b) Contrasting structural impacts induced by cis-syn cyclobutane dimer and (6-4) adduct in DNA duplex decamers: implication in mutagenesis and repair activity. *Photochem.Photobiol.* 62 (1):44-50.

105. Kim ST, Malhotra K, Smith CA, Taylor JS, and Sancar A (1994) Characterization of (6-4) photoproduct DNA photolyase. *J.Biol.Chem.* 269 (11):8535-8540.
106. Kim ST and Sancar A (1993) Photochemistry, photophysics, and mechanism of pyrimidine dimer repair by DNA photolyase. *Photochem.Photobiol.* 57 (5):895-904.
107. Kim ST and Sancar A (1995a) Photorepair of nonadjacent pyrimidine dimers by DNA photolyase. *Photochem.Photobiol.* 61 (2):171-174.
108. Koppal T, Drake J, Yatin S, Jordan B, Varadarajan S, Bettenhausen L, and Butterfield DA (1999) Peroxynitrite-induced alterations in synaptosomal membrane proteins: insight into oxidative stress in Alzheimer's disease. *J.Neurochem.* 72 (1):310-317.
109. Kornhauser A (1976) UV induced DNA-protein cross-links in vitro and in vivo. *Photochem.Photobiol.* 23 (6):457-460.
110. Kraemer KH (1997) Sunlight and skin cancer: another link revealed. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94 (1):11-14.
111. Kraemer KH, Lee MM, and Scotto J (1984) DNA repair protects against cutaneous and internal neoplasia: evidence from xeroderma pigmentosum. *Carcinogenesis* 5 (4):511-514.
112. Kumar R, Hoglund L, Zhao C, Forsti A, Snellman E, Hemminki K. (2003) Single nucleotide polymorphisms in the XPG gene: Determination of role in DNA repair and breast cancer risk. *Int J Cancer.*;103(5):671-5
113. Lakin ND and Jackson SP (1999) Regulation of p53 in response to DNA damage. *Oncogene* 18 (53):7644-7655.
114. Lamola, A. A. Triplet photosensitization and the photobiology of thymine dimers in DNA. *Pure.appl.Chem.* 24, 599-610. 1970. 1970.
115. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, and Zody MC (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409 (6822):860-921.
116. Leadon SA and Cooper PK (1993) Preferential repair of ionizing radiation-induced damage in the transcribed strand of an active human gene is defective in Cockayne syndrome. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 90 (22):10499-10503.
117. Lehmann AR (1995) Nucleotide excision repair and the link with transcription. *Trends Biochem.Sci.* 20 (10):402-405.
118. Levine AJ (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88 (3):323-331.
119. Levine L, Seaman E, Hammerschlag E, and Van Vunakis H (1966) Antibodies to photoproducts of deoxyribonucleic acids irradiated with ultraviolet light. *Science* 153 (744):1666-1667.
120. Lewis CD and Laemmli UK (1982) Higher order metaphase chromosome structure: evidence for metalloprotein interactions. *Cell* 29 (1):171-181.
121. Lindahl T and Wood RD (1999) Quality control by DNA repair. *Science* 286 (5446):1897-1905.
122. Love JD and Minton KW (1992) Ultraviolet-induced dimerization of non-adjacent pyrimidines in poly[d(A-T)]. *J.Biol.Chem.* 267 (35):24953-24959.
123. Love S, Barber R, and Wilcock GK (1999) Increased poly(ADP-ribosyl)ation of nuclear proteins in Alzheimer's disease. *Brain* 122 (Pt 2):247-253.
124. Lovell MA, Ehmann WD, Mattson MP, and Markesbery WR (1997) Elevated 4-hydroxynonenal in ventricular fluid in Alzheimer's disease. *Neurobiol.Aging* 18 (5):457-461.
125. Lovell MA, Gabbita SP, and Markesbery WR (1999) Increased DNA oxidation and decreased levels of repair products in Alzheimer's disease ventricular CSF. *J.Neurochem.* 72 (2):771-776.
126. Lovell MA, Xie C, and Markesbery WR (2000) Decreased base excision repair and increased helicase activity in Alzheimer's disease brain. *Brain Res.* 855 (1):116-123.
127. Lyamichev VI, Frank-Kamenetskii MD, and Soyfer VN (1990) Protection against UV-induced pyrimidine dimerization in DNA by triplex formation. *Nature* 344 (6266):568-570.
128. Lyras L, Cairns NJ, Jenner A, Jenner P, and Halliwell B (1997) An assessment of oxidative damage to proteins, lipids, and DNA in brain from patients with Alzheimer's disease. *J.Neurochem.* 68 (5):2061-2069.
129. Madhani HD, Bohr VA, Hanawalt PC. (1986) Differential DNA repair in transcriptionally active and inactive proto-oncogenes: c-abl and c-mos. *Cell.*45 (3):417-23.
130. Maki CG and Howley PM (1997) Ubiquitination of p53 and p21 is differentially affected by ionizing and UV radiation. *Mol.Cell Biol.* 17 (1):355-363.
131. Malkov VA, Soyfer VN, and Frank-Kamenetskii MD (1992) Effect of intermolecular triplex formation on the yield of cyclobutane photodimers in DNA. *Nucleic Acids Res.* 20 (18):4889-4895.
132. Maltzman W and Czyzyk L (1984) UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells. *Mol.Cell Biol.* 4 (9):1689-1694.

133. Marcus DL, Thomas C, Rodriguez C, Simberkoff K, Tsai JS, Strafaci JA, and Freedman ML (1998) Increased peroxidation and reduced antioxidant enzyme activity in Alzheimer's disease. *Exp.Neurol.* 150 (1):40-44.
134. Markesbery WR (1997) Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radic.Biol.Med.* 23 (1):134-147.
135. Markesbery WR and Carney JM (1999) Oxidative alterations in Alzheimer's disease. *Brain Pathol.* 9 (1):133-146.
136. Masutani C, Kusumoto R, Yamada A, Dohmae N, Yokoi M, Yuasa M, Araki M, Iwai S, Takio K, Hanaoka F. (1999) The XPV (xeroderma pigmentosum variant) gene encodes human DNA polymerase eta. *Nature* 399 (6737):700-4.
137. Mates JM, Perez-Gomez C, and Nunez dC, I (1999) Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin.Biochem.* 32 (8):595-603.
138. Matsunaga T, Hatakeyama Y, Ohta M, Mori T, and Nikaido O (1993) Establishment and characterization of a monoclonal antibody recognizing the Dewar isomers of (6-4)photoproducts. *Photochem.Photobiol.* 57 (6):934-940.
139. Matsunaga T, Mori T, and Nikaido O (1990) Base sequence specificity of a monoclonal antibody binding to (6- 4)photoproducts. *Mutat.Res.* 235 (3):187-194.
140. Matsushima H, Shimohama S, Fujimoto S, Takenawa T, and Kimura J (1995) Reduction of platelet phospholipase C activity in patients with Alzheimer disease. *Alzheimer Dis.Assoc.Disord.* 9 (4):213-217.
141. Mazzarella R and Schlessinger D (1997) Duplication and distribution of repetitive elements and non-unique regions in the human genome. *Gene* 205 (1-2):29-38.
142. McCuaig C, Marcoux D, Rasmussen JE, Werner MM, and Gentner NE (1993) Trichothiodystrophy associated with photosensitivity, gonadal failure, and striking osteosclerosis. *J.Am.Acad.Dermatol.* 28 (5 Pt 2):820-826.
143. McDowell TL, Gibbons RJ, Sutherland H, O'Rourke DM, Bickmore WA, Pombo A, Turley H, Gatter K, Picketts DJ, Buckle VJ, Chapman L, Rhodes D, and Higgs DR (1999) Localization of a putative transcriptional regulator (ATR-X) at pericentromeric heterochromatin and the short arms of acrocentric chromosomes 1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96 (24):13983-13988.
144. McKay BC, Ljungman M, and Rainbow AJ (1999) Potential roles for p53 in nucleotide excision repair. *Carcinogenesis* 20 (8):1389-1396.
145. McKelvey-Martin VJ, Ho ET, McKeown SR, Johnston SR, McCarthy PJ, Rajab NF, and Downes CS (1998) Emerging applications of the single cell gel electrophoresis (Comet) assay. I. Management of invasive transitional cell human bladder carcinoma. II. Fluorescent in situ hybridization Comets for the identification of damaged and repaired DNA sequences in individual cells. *Mutagenesis* 13 (1):1-8.
146. McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, and Stadlan EM (1984) Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 34 (7):939-944.
147. Mecocci P, MacGarvey U, and Beal MF (1994) Oxidative damage to mitochondrial DNA is increased in Alzheimer's disease. *Ann.Neurol.* 36 (5):747-751.
148. Mecocci P, Polidori MC, Ingegni T, Cherubini A, Chionne F, Cecchetti R, and Senin U (1998) Oxidative damage to DNA in lymphocytes from AD patients. *Neurology* 51 (4):1014-1017.
149. Mellon I, Bohr VA, Smith CA, and Hanawalt PC (1986) Preferential DNA repair of an active gene in human cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 83 (23):8878-8882.
150. Mellon I, Spivak G, and Hanawalt PC (1987) Selective removal of transcription-blocking DNA damage from the transcribed strand of the mammalian DHFR gene. *Cell* 51 (2):241-249.
151. Memisoglu A and Samson L (2000) Base excision repair in yeast and mammals. *Mutat.Res.* 451 (1-2):39-51.
152. Mitchell DL, Cleaver JE, and Lutze LH (1994) Excision of cyclobutane dimers in genomic and episomal DNA in human cells. *Photochem.Photobiol.* 60 (3):221-224.
153. Mitchell DL, Jen J, and Cleaver JE (1992) Sequence specificity of cyclobutane pyrimidine dimers in DNA treated with solar (ultraviolet B) radiation. *Nucleic Acids Res.* 20 (2):225-229.
154. Mitchell DL and Nairn RS (1989) The biology of the (6-4) photoproduct. *Photochem.Photobiol.* 49 (6):805-819.
155. Mizuno T, Matsunaga T, Ihara M, and Nikaido O (1991) Establishment of a monoclonal antibody recognizing cyclobutane-type thymine dimers in DNA: a comparative study with 64M-1 antibody specific for (6-4)photoproducts. *Mutat.Res.* 254 (2):175-184.
156. Moggs JG, Yarema KJ, Essigmann JM, and Wood RD (1996) Analysis of incision sites produced by human cell extracts and purified proteins during nucleotide excision repair of a 1,3-intrastrand d(GpTpG)-cisplatin adduct. *J.Biol.Chem.* 271 (12):7177-7186.

157. Morales V, Giamarchi C, Chailleux C, Moro F, Marsaud V, Le Ricousse S, and Richard-Foy H (2001) Chromatin structure and dynamics: functional implications. *Biochimie* 83 (11-12):1029-1039.
158. Mu D, Hsu DS, and Sancar A (1996) Reaction mechanism of human DNA repair excision nuclease. *J.Biol.Chem.* 271 (14):8285-8294.
159. Mu D and Sancar A (1997) DNA excision repair assays. *Prog.Nucleic Acid Res.Mol.Biol.* 56:63-81.
160. Murray V, Motyka H, England PR, Wickham G, Lee HH, Denny WA, and McFadyen WD (1992) The use of Taq DNA polymerase to determine the sequence specificity of DNA damage caused by cis-diamminedichloroplatinum(II), acridine- tethered platinum(II) diammine complexes or two analogues. *J.Biol.Chem.* 267 (26):18805-18809.
161. Mutisya EM, Bowling AC, and Beal MF (1994) Cortical cytochrome oxidase activity is reduced in Alzheimer's disease. *J.Neurochem.* 63 (6):2179-2184.
162. Nance MA and Berry SA (1992) Cockayne syndrome: review of 140 cases. *Am.J.Med.Genet.* 42 (1):68-84.
163. Neidlinger C, Assum G, Krone W, Dietrich C, Hochsattel R, and Klotz G (1988) Increased amounts of small polydisperse circular DNA (spcDNA) in angiofibroma-derived cell cultures from patients with tuberous sclerosis (TS). *Hum.Genet.* 79 (3):286-288.
164. Nelson WG and Kastan MB (1994) DNA strand breaks: the DNA template alterations that trigger p53-dependent DNA damage response pathways. *Mol.Cell Biol.* 14 (3):1815-1823.
165. Nunomura A, Perry G, Pappolla MA, Wade R, Hirai K, Chiba S, and Smith MA (1999) RNA oxidation is a prominent feature of vulnerable neurons in Alzheimer's disease. *J.Neurosci.* 19 (6):1959-1964.
166. Nospikel T, Lalle P, Leadon SA, Cooper PK, Clarkson SG. (1997) A common mutational pattern in Cockayne syndrome patients from xeroderma pigmentosum group G: implications for a second XPG function. *Proc Natl Acad Sci U S A.*:94(7):3116-21.
167. Ogut SE, D'Ambrosio SM, Samuel M, and Sutherland BM (1989) DNA photoreactivating enzyme from human tissues. *J.Photochem.Photobiol.B* 4 (1):47-56.
168. Oken BS, Storzbach DM, and Kaye JA (1998) The efficacy of Ginkgo biloba on cognitive function in Alzheimer disease. *Arch.Neurol.* 55 (11):1409-1415.
169. Olive PL, Banath JP, and Durand RE (1990) Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. *Radiat.Res.* 122 (1):86-94.
170. Olive PL, Wlodek D, Durand RE, and Banath JP (1992) Factors influencing DNA migration from individual cells subjected to gel electrophoresis. *Exp.Cell Res.* 198 (2):259-267.
171. Ostling O and Johanson KJ (1984) Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 123 (1):291-298.
172. Padilla-Nash HM, Heselmeyer-Haddad K, Wangsa D, Zhang H, Ghadimi BM, Macville M, Augustus M, Schrock E, Hilgenfeld E, and Ried T (2001) Jumping translocations are common in solid tumor cell lines and result in recurrent fusions of whole chromosome arms. *Genes Chromosomes.Cancer* 30 (4):349-363.
173. Pappolla MA, Chyan YJ, Omar RA, Hsiao K, Perry G, Smith MA, and Bozner P (1998) Evidence of oxidative stress and in vivo neurotoxicity of beta-amyloid in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease: a chronic oxidative paradigm for testing antioxidant therapies in vivo. *Am.J.Pathol.* 152 (4):871-877.
174. Parker WD, Jr. and Parks JK (1995) Cytochrome c oxidase in Alzheimer's disease brain: purification and characterization. *Neurology* 45 (3 Pt 1):482-486.
175. Peak JG, Peak MJ, Sikorski RS, and Jones CA (1985) Induction of DNA-protein crosslinks in human cells by ultraviolet and visible radiations: action spectrum. *Photochem.Photobiol.* 41 (3):295-302.
176. Perry M and Chalkley R (1982) Histone acetylation increases the solubility of chromatin and occurs sequentially over most of the chromatin. A novel model for the biological role of histone acetylation. *J.Biol.Chem.* 257 (13):7336-7347.
177. Pfeifer GP (1997b) Formation and processing of UV photoproducts: effects of DNA sequence and chromatin environment. *Photochem.Photobiol.* 65 (2):270-283.
178. Pfeifer GP and Tornaletti S (1997a) Footprinting with UV irradiation and LMPCR. *Methods* 11 (2):189-196.
179. Podmore ID, Cooke MS, Herbert KE, and Lunec J (1996) Quantitative determination of cyclobutane thymine dimers in DNA by stable isotope-dilution mass spectrometry. *Photochem.Photobiol.* 64 (2):310-315.
180. Ponti M, Forrow SM, Souhami RL, D'Incalci M, and Hartley JA (1991) Measurement of the sequence specificity of covalent DNA modification by antineoplastic agents using Taq DNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* 19 (11):2929-2933.
181. Prasad MR, Lovell MA, Yatin M, Dhillon H, and Markesbery WR (1998) Regional membrane phospholipid alterations in Alzheimer's disease. *Neurochem.Res.* 23 (1):81-88.
182. Price BD and Calderwood SK (1993) Increased sequence-specific p53-DNA binding activity after DNA damage is attenuated by phorbol esters. *Oncogene* 8 (11):3055-3062.

- 183.Prives C and Hall PA (1999) The p53 pathway. *J.Pathol.* 187 (1):112-126.
- 184.Ramanathan B and Smerdon MJ (1989) Enhanced DNA repair synthesis in hyperacetylated nucleosomes. *J.Biol.Chem.* 264 (19):11026-11034.
- 185.Ramassamy C, Averill D, Beffert U, Bastianetto S, Theroux L, Lussier-Cacan S, Cohn JS, Christen Y, Davignon J, Quirion R, and Poirier J (1999) Oxidative damage and protection by antioxidants in the frontal cortex of Alzheimer's disease is related to the apolipoprotein E genotype. *Free Radic.Biol.Med.* 27 (5-6):544-553.
- 186.Ramassamy C, Averill D, Beffert U, Theroux L, Lussier-Cacan S, Cohn JS, Christen Y, Schoofs A, Davignon J, and Poirier J (2000) Oxidative insults are associated with apolipoprotein E genotype in Alzheimer's disease brain. *Neurobiol.Dis.* 7 (1):23-37.
- 187.Rappold I, Iwabuchi K, Date T, and Chen J (2001) Tumor suppressor p53 binding protein 1 (53BP1) is involved in DNA damage-signaling pathways. *J.Cell Biol.* 153 (3):613-620.
- 188.Reardon JT, Bessho T, Kung HC, Bolton PH, and Sancar A (1997) In vitro repair of oxidative DNA damage by human nucleotide excision repair system: possible explanation for neurodegeneration in xeroderma pigmentosum patients. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94 (17):9463-9468.
- 189.Reeves R (1984) Transcriptionally active chromatin. *Biochim.Biophys.Acta* 782 (4):343-393.
- 190.Reiter LT, Murakami T, Koeuth T, Gibbs RA, and Lupski JR (1997) The human COX10 gene is disrupted during homologous recombination between the 24 kb proximal and distal CMT1A-REPs. *Hum.Mol.Genet.* 6 (9):1595-1603.
- 191.Renzing J, Hansen S, and Lane DP (1996) Oxidative stress is involved in the UV activation of p53. *J.Cell Sci.* 109 (5):1105-1112.
- 192.Robertson KD (2002) DNA methylation and chroma. *Oncogene* 21 (35):5361-5379.
- 193.Sancar A (1996) DNA excision repair. *Annu.Rev.Biochem.* 65:43-81.
- 194.Sanchez-Prieto R, Quintanilla M, Cano A, Leonart ML, Martin P, Anaya A, and Cajal S (1996) Carcinoma cell lines become sensitive to DNA-damaging agents by the expression of the adenovirus E1A gene. *Oncogene* 13 (5):1083-1092.
- 195.Sarasin A, Blanchet-Bardon C, Renault G, Lehmann A, Arlett C, and Dumez Y (1992) Prenatal diagnosis in a subset of trichothiodystrophy patients defective in DNA repair. *Br.J.Dermatol.* 127 (5):485-491.
- 196.Schubert D, Behl C, Lesley R, Brack A, Dargusch R, Sagara Y, and Kimura H (1995) Amyloid peptides are toxic via a common oxidative mechanism. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92 (6):1989-1993.
- 197.Schwartz M, Yoles E, Levin LA (1999) 'Axogenic' and 'somagenic' neurodegenerative diseases: definitions and therapeutic implications. *Mol Med Today.* (11):470-3.
- 198.Seawell PC, Simon TJ, and Ganesan AK (1980) Binding of T4 endonuclease V to deoxyribonucleic acid irradiated with ultraviolet light. *Biochemistry* 19 (8):1685-1691.
- 199.Shaikh TH, Kurahashi H, and Emanuel BS (2001) Evolutionarily conserved low copy repeats (LCRs) in 22q11 mediate deletions, duplications, translocations, and genomic instability: an update and literature review. *Genet.Med.* 3 (1):6-13.
- 200.Short Protocols in molecular biology. 1992. Short Protocols in Molecular Biology. Second Edition ed. Ausubel FM et al (eds).Green Publishing Associates and John Wiley&Sons.
- 201.Shuster, R. C. The excision of thymine dimer from the DNA of UV-irradiated E. coli 15 T-A-U during thymine deprivation. Boyce, R. P. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 16, 489-496. 1964. 1964.
- 202.Simonian NA and Coyle JT (1996) Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 36:83-106.
- 203.Singh NP, McCoy MT, Tice RR, and Schneider EL (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp.Cell Res.* 175 (1):184-191.
- 204.Smerdon MJ (1991) DNA repair and the role of chromatin structure. *Curr.Opin.Cell Biol.* 3 (3):422-428.
- 205.Smith CA (1987) DNA repair in specific sequences in mammalian cells. *J.Cell Sci.Suppl* 6:225-241.
- 206.Smith MA, Rottkamp CA, Nunomura A, Raina AK, and Perry G (2000b) Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biochim.Biophys.Acta* 1502 (1):139-144.
- 207.Smith ML, Chen IT, Zhan Q, O'Connor PM, and Fornace AJ, Jr. (1995) Involvement of the p53 tumor suppressor in repair of u.v.-type DNA damage. *Oncogene* 10 (6):1053-1059.
- 208.Smith ML, Ford JM, Hollander MC, Bortnick RA, Amundson SA, Seo YR, Deng CX, Hanawalt PC, and Fornace AJ, Jr. (2000a) p53-mediated DNA repair responses to UV radiation: studies of mouse cells lacking p53, p21, and/or gadd45 genes 8. *Mol.Cell Biol.* 20 (10):3705-3714.
- 209.Smith ML and Fornace AJ, Jr. (1997) p53-mediated protective responses to UV irradiation 8. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94 (23):12255-12257.
- 210.Srivastava S, Zou ZQ, Pirollo K, Blattner W, and Chang EH (1990) Germ-line transmission of a mutated p53 gene in a cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome. *Nature* 348 (6303):747-749.

211. Stefanini M, Lagomarsini P, Arlett CF, Marinoni S, Borrone C, Crovato F, Trevisan G, Cordone G, and Nuzzo F (1986) Xeroderma pigmentosum (complementation group D) mutation is present in patients affected by trichothiodystrophy with photosensitivity. *Hum.Genet.* 74 (2):107-112.
212. Stefanini M, Lagomarsini P, Giliani S, Nardo T, Botta E, Peserico A, Kleijer WJ, Lehmann AR, and Sarasin A (1993) Genetic heterogeneity of the excision repair defect associated with trichothiodystrophy. *Carcinogenesis* 14 (6):1101-1105.
213. Studzinski GP and Moore DC (1995) Sunlight--can it prevent as well as cause cancer? *Cancer Res.* 55 (18):4014-4022.
214. Sugawara K, Okamoto T, Shimizu Y, Masutani C, Iwai S, and Hanaoka F (2001) A multistep damage recognition mechanism for global genomic nucleotide excision repair. *Genes Dev.* 15 (5):507-521.
215. Surrallés J, Puerto S, Ramirez MJ, Creus A, Marcos R, Mullenders LH, and Natarajan AT (1998) Links between chromatin structure, DNA repair and chromosome fragility. *Mutat.Res.* 404 (1-2):39-44.
216. Sutherland BM, Bennett PV, Freeman AG, Moore SP, and Strickland PT (1985) Transformation of human cells by DNAs ineffective in transformation of NIH 3T3 cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 82 (8):2399-2403.
217. Svennerholm L and Gottfries CG (1994) Membrane lipids, selectively diminished in Alzheimer brains, suggest synapse loss as a primary event in early-onset form (type I) and demyelination in late-onset form (type II). *J.Neurochem.* 62 (3):1039-1047.
218. Takeda A, Perry G, Abraham NG, Dwyer BE, Kutty RK, Laitinen JT, Petersen RB, and Smith MA (2000) Overexpression of heme oxygenase in neuronal cells, the possible interaction with Tau. *J.Biol.Chem.* 275 (8):5395-5399.
219. Tang MS, Htun H, Cheng Y, and Dahlberg JE (1991) Suppression of cyclobutane and mean value of 6-4 dipyrimidines formation in triple-stranded H-DNA. *Biochemistry* 30 (28):7021-7026.
220. Tang JY, Hwang BJ, Ford JM, Hanawalt PC, Chu G (2000) Xeroderma pigmentosum p48 gene enhances global genomic repair and suppresses UV-induced mutagenesis. *Mol Cell.* (4):737-44.
221. Taylor JS, Garrett DS, and Cohrs MP (1988) Solution-state structure of the Dewar pyrimidinone photoproduct of thymidyl(3'---5')-thymidine. *Biochemistry* 27 (19):7206-7215.
222. Therrien JP, Drouin R, Baril C, and Drobetsky EA (1999) Human cells compromised for p53 function exhibit defective global and transcription-coupled nucleotide excision repair, whereas cells compromised for pRb function are defective only in global repair 1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96 (26):15038-15043.
223. Tokino T, Thiagalingam S, el Deiry WS, Waldman T, Kinzler KW, and Vogelstein B (1994) p53 tagged sites from human genomic DNA. *Hum.Mol.Genet.* 3 (9):1537-1542.
224. Tommasi S, Oxyzoglou AB, and Pfeifer GP (2000) Cell cycle-independent removal of UV-induced pyrimidine dimers from the promoter and the transcription initiation domain of the human CDC2 gene. *Nucleic Acids Res.* 28 (20):3991-3998.
225. Tornaletti S and Pfeifer GP (1994) Slow repair of pyrimidine dimers at p53 mutation hotspots in skin cancer. *Science* 263 (5152):1436-1438.
226. Tornaletti S and Pfeifer GP (1996) UV damage and repair mechanisms in mammalian cells. *Bioessays* 18 (3):221-228.
227. Tu Y, Tornaletti S, and Pfeifer GP (1996) DNA repair domains within a human gene: selective repair of sequences near the transcription initiation site. *EMBO J.* 15 (3):675-683.
228. van der Horst GT, Muijtjens M, Kobayashi K, Takano R, Kanno S, Takao M, de Wit J, Verkerk A, Eker AP, van Leenen D, Buijs R, Bootsma D, Hoeijmakers JH, and Yasui A (1999) Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature* 398 (6728):627-630.
229. Van Houten B, Cheng S, and Chen Y (2000) Measuring gene-specific nucleotide excision repair in human cells using quantitative amplification of long targets from nanogram quantities of DNA. *Mutat.Res.* 460 (2):81-94.
230. van Vuuren AJ, Vermeulen W, Ma L, Weeda G, Appeldoorn E, Jaspers NG, van der Eb AJ, Bootsma D, Hoeijmakers JH, Humbert S, and . (1994) Correction of xeroderma pigmentosum repair defect by basal transcription factor BTF2 (TFIIH). *EMBO J.* 13 (7):1645-1653.
231. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, and Carver A (2001) The sequence of the human genome. *Science* 291 (5507):1304-1351.
232. Vermeulen W, Jaeken J, Jaspers NG, Bootsma D, and Hoeijmakers JH (1993) Xeroderma pigmentosum complementation group G associated with Cockayne syndrome. *Am.J.Hum.Genet.* 53 (1):185-192.
233. Volker M, Mone MJ, Karmakar P, van Hoffen A, Schul W, Vermeulen W, Hoeijmakers JH, van Driel R, van Zeeland AA, and Mullenders LH (2001) Sequential assembly of the nucleotide excision repair factors in vivo 1. *Mol.Cell* 8 (1):213-224.

234. Wakasugi M, Shimizu M, Morioka H, Linn S, Nikaido O, and Matsunaga T (2001) Damaged DNA-binding protein DDB stimulates the excision of cyclobutane pyrimidine dimers in vitro in concert with XPA and replication protein A. *J.Biol.Chem.* 276 (18):15434-15440.
235. Waldren CA and Rasko I (1978) Caffeine enhancement of X-ray killing in cultured human and rodent cells. *Radiat.Res.* 73 (1):95-110.
236. Wang CI and Taylor JS (1993) The trans-syn-I thymine dimer bends DNA by approximately 22 degrees and unwinds DNA by approximately 15 degrees. *Chem.Res.Toxicol.* 6 (4):519-523.
237. Wang EH and Prives C (1991) DNA helicase and duplex DNA fragment unwinding activities of polyoma and simian virus 40 large T antigen display similarities and differences. *J.Biol.Chem.* 266 (19):12668-12675.
238. Wei Q, Matanoski GM, Farmer ER, Hedayati MA, and Grossman L (1993) DNA repair and aging in basal cell carcinoma: a molecular epidemiology study. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 90 (4):1614-1618.
239. Weiss RB and Gallagher PE (1993) In vivo repair of cytosine hydrates in DNA of cultured human lymphoblasts. *Photochem.Photobiol.* 58 (2):219-225.
240. Wood RD (1999) DNA damage recognition during nucleotide excision repair in mammalian cells. *Biochimie* 81 (1-2):39-44.
241. Wyatt MD, Allan JM, Lau AY, Ellenberger TE, and Samson LD (1999) 3-methyladenine DNA glycosylases: structure, function, and biological importance. *Bioessays* 21 (8):668-676.
242. Yamada H and Hieda K (1992) Wavelength dependence (150-290 nm) of the formation of the cyclobutane dimer and the (6-4) photoproduct of thymine. *Photochem.Photobiol.* 55 (4):541-548.
243. Zolan ME, Cortopassi GA, Smith CA, and Hanawalt PC (1982) Deficient repair of chemical adducts in alpha DNA of monkey cells. *Cell* 28 (3):613-619.

12. KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

Az értekezés témakörébe tartozó közlemények

1. **Mónika Mórocz**, János Kálmán, Anna Juhász, Ildikó Sinkó, Stephen Downes, Zoltán Janka, István Raskó; Elevated Levels of Oxidative DNA Damage in Lymphocytes from Alzheimer's Patients; *Neurobiol Aging*. 2002 Jan-Feb;23(1):47-53. (IF₂₀₀₀:4.15)
2. **Mónika Mórocz**, Ágnes Csiszár, Robert T. Johnson, C. Stephen Downes, Imre Cserpán, István Raskó; Variation in sequence-specific repair of UV damage in human pericentromeric heterochromatin of different cell lines, *Cancer Letters* 2003 közlésre elfogadva. (IF₂₀₀₀:1.51)
3. **Mórocz Mónika**, Kálmán János, Juhász Anna, Sinkó Ildikó, Stephen Downes, Janka Zoltán, Raskó István; Emelkedett szintű sejtmagi oxidatív DNS károsodás kimutatása Alzheimer kóros betegek limfocitáiban Comet assay alkalmazásával; *Clinical Neuroscience* 2000. 53(1) 26-27.(poszter absztrakt)

Egyéb közlemények

4. Imre Cserpán, Róbert Katona, Tünde Praznovszky, Edit Novák, Márta Rózsavölgyi, Erika Csonka, **Mónika Mórocz**, Katalin Fodor and Gyula Hadlaczky; The chAB4 and NF1-related long-range multisequence DNA families are contiguous in the centromeric heterochromatin of several human chromosomes *Nucleic Acid Research*, 2002. 30(13):2899-905. (IF₂₀₀₁:6.37).
5. I Sinkó, **M. Mórocz**, J. Zádori, M. Krizsán, K. Kokavszky, I. Raskó (2000): Comet Assay for Testing Reproductive Toxicity; *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, Vol. 17, Number 8, 2000. (Abstract from the Second World Congress of APART)
6. A. Czibula, **M. Morocz**, A. Csiszar, C. Bachrati, E. Olah, F. Szeszak, E. Morava, L. Szappanos, I. Rasko (2002) A putative molecular genetic susceptibility allele for idiopathic scoliosis; *Eur. J. Hum. Genet.* 10, Supplement 1, 76 (Abstract from European Human Genetics Conference, Strasbourg, France, 2002.)

Előadások:

1. Csiszár Ágnes, **Mórocz Mónika**, Kalmár Tibor, Robert T. Johnson, Raskó István; UV sugárzás okozta DNS károsodások reparációjának vizsgálata emlősejteken; **Magyar Genetikai Kongresszus, Siófok, (1999. ápr. 11-14).**

2. A. Csiszar, **M. Morocz**, T. Kalmar, R.T Johnson, I. Rasko; Repair capacity of UV lesions in human melanoma cell lines; **Victor Rotschild Memorial Symposia, Hebrew University, Jerusalem, Israel, (02-07. May, 1999).**
3. **M. Morocz**, A. Csiszar, T. Kalmar, I. Cserpan, I. Rasko; A multiplex, low copy number repetitive sequence based quantitative PCR Method to detect UV photoproduct; **Victor Rotschild Memorial Symposia, Hebrew University, Jerusalem, Israel, (02-07. May, 1999).**
4. **Mónika Mórocz**, János Kálmán, Anna Juhász, Ildikó Sinkó, Stephen Downes, Zoltán Janka, István Raskó; Elevated Levels of Oxidative DNA Damage in Lymphocytes from Alzheimer's Patients Detected by Comet Assay; **DNA Repair Meeting, Smolenice, Slovakia (9-12. Okt, 2000).**
5. **Mórocz Mónika**, Kálmán János, Juhász Anna, Sinkó Ildikó, Stephen Downes, Janka Zoltán, Raskó István; A Comet assay és alkalmazása humángenetikai vizsgálatokra; **Straub Napok MTA Szegedi Biológiai Központ, (Szeged, 2000. nov. 30).**
6. **Mórocz Mónika**, Kálmán János, Juhász Anna, Sinkó Ildikó, Angela P. McGlynn, Stephen Downes, Janka Zoltán, Raskó István; A Comet Assay és alkalmazása molekuláris diagnosztikai vizsgálatokra; **Magyar Biokémiai Egyesület VI. Konferenciája, Sárospatak. (2001. máj. 17-19).**
7. **Mórocz Mónika**, Kálmán János, Juhász Anna, Sinkó Ildikó, Janka Zoltán, Stephen Downes, Raskó István; Emelkedett szintű oxidatív DNS károsodás kimutatása Alzheimer-kóros betegek lymphocitáiban Comet assay alkalmazásával; **Magyar Humángenetikusok Országos Konferenciája, (Debrecen, 2001. Jún. 8-9).**
8. Czibula Ágnes, **Mórocz Mónika**, Bachrati Csanád, Szappanos László, Morava Éva, Raskó István; A scoliosis pathogenezisében résztvevő gén jellemzése; **MTA Akadémiai napok, MTA SZAB Székház, Szeged (2001. november 27).**
9. **Mórocz Mónika**, Kálmán János, Juhász Anna, Sinkó Ildikó, Janka Zoltán, Stephen Downes, Raskó István. DNS-károsodás és repair Alzheimer-kórban, **V. Neuropszichofarmakológiai Kongresszus, Pszichiátriai kezelések és a molekuláris biológia, Tihany, (2002. szeptember 26- 28.)**

Poszterek

1. Cserpán I, Praznovszky T, Fátyol K, Rózsavölgyi M, Novák E, Peterffy M, **Mórocz M**, Hadlaczký Gy. Boundary Regions of Pericentromeric Satellite Sequences; 3th Conference of Hungarian Genetical Society, Debrecen, p51.,(8-12. Dec. 1994).
2. **Mórocz M**, Czibula A, Bachrati Cs, Raskó I, Rapid, Simple Method for Study Gene Specific Repair in Cell Culture; 3th Conference of Hungarian Genetical Society Debrecen, p105. (8-12. Dec, 1994).
3. Csiszár Ágnes, **Mórocz Mónika**, Kalmár Tibor, Cserpán Imre, Robert T. Johnson, Raskó István; DNS reparáció molekuláris vizsgálata humán sejteken; **Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztálya 5. Munkaértekezlete Sopron, (2000. máj. 8-11).**
4. A. Csiszar, **M. Morocz**, T. Kalmar, R.T Johnson, I. Rasko; Repair capacity of UV lesions in human melanoma cell lines; **Victor Rotschild Memorial Symposia, Hebrew University, Jerusalem, Israel, (02-07. May, 1999).**
5. **M. Morocz**, A. Csiszar, T. Kalmar, I.Cserpan, I. Rasko; A multiplex, low copy number repetitive sequence based quantitative PCR Method to detect UV photoproduct; **Victor Rotschild Memorial Symposia, Hebrew University, Jerusalem, Israel, (02-07. May, 1999).**
6. **M. Morocz**, A. Csiszar, T. Kalmar, C.Z. Bachrati. I.Cserpan, R.T. Johnson, I. Rasko; Detection of UV photoproduct repair of euchromatic and heterochromatic genome sequences in human cultured cell lines; **30th Annual Meeting of European Environmental Mutagen Society, Budapest, (2000. aug. 22-26).**
7. I Sinkó, **M. Mórocz**, J. Zádori, M. Krizsán, K. Kokavszky, I. Raskó; Comet Assay for Testing Reproductive Toxicity; **Second World Congress of APART. Budapest (14-17 Sept. 2000).**
8. **Mórocz Mónika**, Kálmán János, Juhász Anna, Sinkó Ildikó Stephen Downes, Janka Zoltán, Raskó István; Emelkedett szintű sejtmagi oxidatív DNS károsodás kimutatása Alzheimer kóros betegek limfocitáiban Comet assay alkalmazásával; **5.th Conference of Alzheimer's Disease and Related Disorders. Pécs, (2000. okt. 26-28) (A Magyar Alzheimer-kór társaság díját elnyert poszter)**

9. A Czibula, **M. Morocz**, A. Csiszar, C. Bachrati, E. Olah, F. Szeszak, E. Morava, L. Szappanos, I. Rasko A putative molecular genetic susceptibility allele for idiopathic scoliosis; **European Human Genetics Conference, Strasbourg, France (2002. május. 25-28).**

10. **Mónika Mórocz**, Ágnes Csiszár, Robert T. Johnson , C. Stephen Downes, Imre Cserpán, István Raskó Sequence-specific repair of UV damage in human pericentromeric heterochromatin **32nd Annual Meeting of European Environmental Mutagen Society, Warsaw, Poland (2002, szeptember 3-7).**