

B3543

EGY ÚJ KROMOSZÓMA SPECIFIKUS CENTROMER  
SZEKVENCIA AZONOSÍTÁSA ÉS MOLEKULÁRIS  
JELLEMZÉSE

FÁTYOL KÁROLY



SZEGEDI BIOLÓGIAI KÖZPONT

1997

Az alacsonyabbrendű eukarióták centromerikus DNS szakaszainak azonosításában és funkcionális jellemzésében elért jelentős sikerek ellenére az emlős centromer azonosítása még mindig várat magára. Nagyban hozzájárul ehhez a sikertelenséghez a pericentrikus kromoszómaregiók különleges DNS összetétele. Magasabbrendű eukariótákban a centromerikus kromoszómaszakaszok túlnyomórészt tandem szerveződő, sokszor faj vagy kromoszómaspecifikus repetitív DNS elemekből ún. szatellitkből épülnek fel. A szatellitek pericentrikus koncentrálódása több szempontból is megnehezíti a funkcionális emlős centromer definiálását. A rövid repetitív egységekből álló szatellit szekvenciák általában nagy mértékű instabilitást mutatnak konvencionális vektorokba klónozva. Emiatt a hagyományos génbankokban a centromerikus kromoszómaszakaszok DNS elemei alulreprezentáltak. Ez a tény valamint az emlős centromerikus DNS konzervativitásának látszólagos hiánya felveti annak az igényét, hogy megkíséreljük centromerikus kromatinfrakciók izolálását, majd ezek felhasználásával centromer specifikus DNS bankok létrehozását.

Centromerikus kromatinfrakciók izolálására kidolgozott módszerekről több riport is beszámol. Az eljárások többségükben a kromoszómakarok nukleáz kezelés révén történő szelektív eltávolítására épülnek. Ennek az a megfigyelés szolgál alapjául miszerint az emlős kromoszómák pericentrikus régiói kompakt, nukleázokkal szemben viszonylag ellenálló kromatin struktúrát vesznek fel. Egy másik beszámolóban a kromoszómák ultrahangos fragmentálását követően, centromer fehérjéket felismerő ellenanyagokkal végrehajtott immunoprecipitáció révén kísérelték meg centromerikus kromatin izolálását. Habár az ismert módszerek eredményezhetik a centromerikus kromatinfrakció szelektív dúsulását, mindkét megközelítésnek lehetnek hátrányai. A nukleázokat alkalmazó eljárások arra az alapfeltevésre épülnek, hogy a centromerikus kromatin nagy mértékben védett DN-áz emésztéssel szemben. Ez a feltételezés azokra a citológiai megfigyelésekre alapul amelyek a centromerikus kromoszómaregiók intakt megőrződését mutatják limitált DN-áz kezeléssel szemben.

során. Nincsenek viszont adatok arra nézve, hogy a centromer teljes DNS tartalma megőrződik-e ilyen viszonyok mellett. Lehetséges, hogy a nukleáz kezeléssel előállított kromatinfrakciók nem reprezentálják a centromer teljes DNS tartalmát. Az ultrahang illetve egyéb mechanikai behatások alkalmazása ugyancsak aggályos lehet. Az ilyen módszerekkel végrehajtott kromoszóma fragmentáció nehezen szabályozható. Elégtelen mértékű fragmentáció nem vezethet a centromerikus kromatin megfelelő fokú dúsulásához, ugyanakkor túlzott mechanikai behatások a centromer-kinetokor komplex sérüléséhez vezethetnek, ami viszont újra csak bizonyos centromerikus DNS frakciók elvesztését eredményezheti.

A fentebb részletezett problémákra jelenthet megoldást az általunk alkalmazott *in vivo* kromoszóma fragmentáció módszere. Korábbi megfigyelések bizonyítják, hogy a hidroxürea-koffein kezeléssel indukált korai kromatin kondenzáció (*premature chromatin condensation: PCC*) során a kromatin többségétől elváló centromer-kinetokor komplex mind struktúráját mind funkcióját megőrzi. Ezeknek a centromerikus kromoszóma daraboknak az immunoprecipitációja jó eséllyel szolgáltathat olyan kromatin frakciót amelyben a teljes, funkcionális centromer-kinetokor komplex DNS tartalma reprezentálva van. Az itt ismertetett kísérletek során kínai hörcsög sejtekben *in vivo* kromoszóma fragmentációt indukáltunk. Ezt követően anti-centromer ellenanyagokat tartalmazó humán autoimmun szérum felhasználásával immunoprecipitáltuk a centromerikus kromoszóma darabokat. Az ily módon kapott kromatinfrakcióból DNS-t tisztítottunk és azt plazmid vektorba klónoztuk. Nyolc plazmid klónt véletlenszerűen kiválasztottunk és a klónozott DNS fragmentek kromoszómális lokalizációját *in situ* hibridizációval vizsgáltuk metafázisos hörcsög kromoszómákon. Az egyik 536 bp hosszú DNS fragment (HUCAFF170) erős hibridizációs jelet mutatott a 2. kínai hörcsög kromoszóma pericentrikus régiójában. Az általunk itt alkalmazott módszerhez hasonló eljárást mások is sikeresen használtak. Ouspenski és munkatársa az 1. kínai hörcsög kromoszóma centromerikus régiójából izoláltak egy 6 kb



méretű, egy példányban előforduló DNS szakaszt. Ők három, véletlenszerűen kiválasztott klón vizsgálata során azonosították az új centromerikus szekvenciát. Összesen tehát 11 klón analízise két új centromerikus DNS elem izolálásához vezetett. Ez az adat az itt részletezett módszer potenciális alkalmazhatóságát mutatja. Az analizált alacsony klón szám azonban még nem teszi lehetővé, hogy megbízhatóan megítéljük a centromerikus kromatin dúsulásának mértékét. Ennek egyértelmű eldöntése további vizsgálatokat igényel.

A továbbiakban megvizsgáltuk az azonosított új centromer szekvencia genomikus szerveződését. A HUCAFF170 klón próbaként való használatával izolált 13.3 kb méretű lambda fág klón (HC90) szerkezetének elemzése kimutatta, hogy az eredetileg azonosított 536 bp-os DNS fragment homológiát mutat, egy tandem szerveződő repetitív DNS elem 2.8 kb méretű ismétlődő egységeivel. Genomikus *Southern* hibridizációk megerősítették, hogy az új szatellit-szerű DNS szekvencia a 2. kínai hörcsög kromoszóma pericentrikus régiójának egyik fő alkotóeleme (HC2 szatellit).

A 2.8 kb méretű *SacI* egységek két rövid szakaszon homológiát mutatnak a homeotikus gének DNS-t kötő homeobox régióival. Ezekről a szakaszokról eltekintve a repetitív egységek nem mutatnak homológiát más ismert DNS elemmel. Az analizált *SacI* egységek határán azonosítható 1062 bp hosszú nyílt leolvasási keret egy olyan 353 aminosavból álló potenciális polipeptidet kódolhat amely két, a homeoboxsal magasszintű homológiát mutató peptidrészt tartalmaz. Habár a nyílt leolvasási keret előtt promóterek konszenzus szekvenciával homológiát mutató szakaszok nem azonosíthatók nem zárhatjuk ki, hogy néhány, a repetitív egységbe ágyazott ORF-el rokon DNS szakasz esetenként expresszáldhat. Ezt a feltételezt megerősíteni látszik az RT-PCR kísérletek eredménye is. Az általunk azonosított DNS elemhez hasonló, homeoboxsal rokon repetitív szekvenciákat főemlősből is leírtak. A humán 4. kromoszómán elhelyezkedő 3.3 kb-os repetitív egységgel rendelkező D4Z4 elemet egy domináns öröklés menetet mutató betegség (FSHD) kapcsán írták le. A kiterjedt kutatások ellenére még ma sem tisztázott a D4Z4 repetitív

egységeinek deléciója és az FSHD manifesztációja közötti kapcsolat, habár a D4Z4 elemek heterokromatikus lokalizációja pozíció effektus variegációra utalhat. A legújabb vizsgálatok kimutatták, hogy a D4Z4 elemmel rokon szekvenciák főmélősökben is megtalálhatók. Ez a megfigyelés valamint az általunk hórscögben azonosított új repetitív DNS elem felveti annak a lehetőségét, hogy a homeoboxal rokon repetitív DNS elemeknek valamilyen ma még nem ismert evolúciósan konzervált szerepe lehet.

A HC90 fág klónban azonosított 2.8 kb-os SacI egységek szekvenciáinak összehasonlítása az ismétlődő egységek különböző szakaszainak eltérő konzervativitását mutatták ki. Míg az "a" és "b" típusú SacI egységek végei majdnem azonosak addig a középső 1.5 kb-nyi szakaszukon csak 88.5% homológiát mutatnak egymással. A genomikus *Southern* hibridizációk ugyancsak a repetitív egységek középső szakaszainak nagyfokú heterogenitására utáltak. Érdemes megjegyezni, hogy a repetitív egységek nagy mértékben konzervált szakaszai egybeesnek a kettős homeoboxot tartalmazó ORF elhelyezkedésével. Ez felveti annak a lehetőségét, hogy ezen szakaszok relatív konzervativitása valamilyen funkcióval kapcsolatos szelekciós nyomásra vezethető vissza. Nem zárhatjuk ki azonban annak a lehetőségét sem, hogy a középső szakaszon koncentrálóó különleges szekvencaelemek ("egyszerű" szekvenciák, hosszú A-T szakaszok) okozzák ennek a régióának a fokozott instabilitását.

A *pulsed field* gélelektroforézissel kombinált *Southern* hibridizáció a HC2 szatellit nagyméretű homogén blokkjait mutatta ki, míg az egy primerrel végrehajtott PCR kísérletek fordított ismétlődések létét bizonyították. Összevetve ezeket az adatokat felvázolhatjuk a HC2 szatellit kialakulásához vezető legvalószínűbb evolúciós útvonalat. A szatellit őseül feltételezhetően egy homeotikus génekkel homológiát mutató DNS szakasz szolgálhatott. Ebben a pszeudogénszerű szekvenciában először a homeoboxot meghatározó szekvencareszlet duplikációja játszódhatott le. A DNS elem nagyobbfokú amplifikációjának valószínűleg feltétele volt egy rekombinációs "hot spot"-ként működő (CA)<sub>n</sub> szakasznak a



pszeudogén közelébe történő beépülése. Az elsődleges amplifikációt további, lokális szaltatórikus amplifikációk követhették, amelyek a kiterjedt homogén blokkok kialakulását eredményezték. A szatellit amplifikációja különféle mechanizmusok révén történhetett. A testvér kromatidák között lejátszódó egyenlőtlen *crossing over* mellett egyéb, fordított ismétlődéseket kialakító amplifikációs folyamatok is lejátszódtak. A lokális amplifikációk egy vagy néhány repetitív egységet magukba foglaló "rolling circle" struktúrák révén történhettek. Ugyanakkor a már kialakult nagyméretű homogén blokkok egy lépésben lejátszódó duplikációja is bekövetkezhetett. A HC2 szatellit repetitív egységeinek szintjén lejátszódó amplifikációs események mellett a repetitív egységen belüli "egyszerű" szekvenciák párhuzamos evolúciójának is szemtanúi lehetünk. A szatellit ismétlődő egységének őseül szolgáló DNS elem tartalmazhatott egy kitüntetett helyzetű tetranukleotid szakaszt, amely a 2.8 kb-os egységek amplifikációját követően, az egyes repetitív egységekben egymástól függetlenül vezethetett a tetranukleotid elemekből felépülő "egyszerű" szekvenciák kialakulásához. Összefoglalva tehát a HC2 szatellit mai formáját hierarchikusan egymásra épülő szinteken lejátszódó, különböző mechanizmusokat használó amplifikációs folyamatok alakították ki.

A szatellit sokszor faj sőt extrém esetekben kromoszómaspecifikusak is lehetnek. Az általunk azonosított HC2 szatellit sem mutat szekvencia homológiát más fajok szatellit elemeivel. *In situ* hibridizáció ugyanakkor azt is kimutatta, hogy az új szatellit a kínai hörcsög kromoszómák közül is csak a 2. kromoszómán található meg. Ezt megelőzően kínai hörcsögből csak az emlősök telomerikus DNS szakaszaival homológ, (TTAGG)<sub>n</sub> összetételű repetitív elem volt ismert. Ez a kromoszómák Robertsoni fúziójának maradványaként tekinthető szekvencia elem az 1. és 2. kromoszómák kivételével az összes hörcsög kromoszóma pericentrikus régiójában megtalálható. A telomerrel homológ pericentrikus DNS elemek hiánya a két nagy szubmetacentrikus kromoszómának a többi

kromoszómától eltérő evolúciós eredetére utal. Az általunk azonosított 2. kromoszóma specifikus szatellit ezt a feltételezést megerősíti.

A szatellitek funkciója még ma sem egyértelműen eldöntött kérdés. A jelenleg rendelkezésünkre álló adatok a pericentrikus szatelliteknek a testvér kromatidák összetartásában betöltött szerepével vannak leginkább összhangban. Specifikus funkciók és a szatellitek közötti kapcsolat megállapítását nagy mértékben megnehezíti a szekvencia konzervativitás látszólagos hiánya. Ezt az ellentmondást oldhatja az a feltételezés, hogy a pericentrikus heterokromatin sajátságainak kialakulásában a szatellitek ismétlődő egységeinek szekvenciája csak másodlagos szerepet tölt be és a centromer funkciójához esszenciális kromatin konformációt lényegileg bármilyen, szabályos periodicitást mutató DNS elem képes kialakítani. Ezt a feltételezést erősítik meg azok az újabb vizsgálatok amelyek tandem ismétlődő transzgenek heterokromatinszerű sajátságait mutatták ki *Drosophilában* és növényekben. Nem zárhatjuk ki azonban annak a lehetőségét sem, hogy a pericentrikus szatellitekben általánosan előfordulnak rövid konzervált, potenciális fehérjékötő helyként szolgáló szekvenciaelemek. A szatellitek ismétlődő egységeinek többségét kitevő "töltelék" DNS szakaszok funkciója ez esetben az lehet, hogy a konzervált elemeket megfelelő elrendezésben és távolságban tartsa. Az ilyen jellegű térkitöltő funkció csak kismértékű szelekciós nyomást fejthet ki ezen DNS szakaszok szekvenciájának megőrzésére.

Egyes feltételezések szerint a szatellit szekvenciák az interfázisos sejtmag szerveződésében is fontos funkciót tölthetnek be. Könnyen beláthatjuk, hogy az általunk azonosított szatellithez hasonló, változatos, esetenként kromoszóma specifikus szatellitek részt vehetnek a sejtmagi rend kialakításában elősegítve például azt, hogy egyfajta "cimkeként" szolgálva a homológ kromoszómák interfázisban is felismerjék egymást. A kromoszómák ilyen fajta megjelölése fontos lehet abban, hogy adott kromoszómák az általuk hordozott gének megfelelő expresszióját biztosító sejtmagi kompartmenteket foglalják el.

**Publikációk:**

1., Praznovszky T, Kereső J, Tubak V, Cserpán I, **Fátyol K**, Hadlaczky G

*Proc Natl Acad Sci U S A* 1991, 88(24):11042-11046

2., **Fátyol K**, Cserpán I, Praznovszky T, Kereső J, Hadlaczky G

*Nucleic Acids Res* 1994, 22(18):3728-3736

3., Kereső J, Praznovszky T, Cserpán I, Fodor K, Katona R, Csonka E, **Fátyol K**, Holló G,  
Szeles A, Ross AR, Sumner AT, Szalay AA, Hadlaczky G

*Chromosome Res* 1996, 4(3):226-239

4., Holló G, Kereső J, Praznovszky T, Cserpán I, Fodor K, Katona R, Csonka E, **Fátyol K**,  
Szeles A, Szalay AA, Hadlaczky G

*Chromosome Res* 1996, 4(3):240-247