Epigenetikai faktorok hatásának vizsgálata a Huntington-kór patomechanizmusában *Drosophila* modellben

Doktori (Ph.D.) értekezés

Varga Júlia

Témavezető: Dr. Bodai László
tanszékvezető egyetemi docens

Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi és Informatikai Kar,
Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék

Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi és Informatikai Kar,
Biológia Doktori Iskola

Szeged

2020

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	2
I. Elméleti bevezetés	4
I.1. Az eukarióta kromatin szerkezete	4
I.2. Hisztonok és hiszton variánsok.....	4
I.3. A kromatin szerkezet módosításai szabályozó szereppel bírnak	6
I.4. A hiszton fehérjék útja a sejtmagba	9
I.5. A Hat1 hiszton acetiltranszferáz	11
I.6. Epigenetikai változások a neurodegeneratív betegségekből	14
I.7. A Huntington-kór.....	15
I.8. <i>Drosophila</i> , mint Huntington-kór modell	18
II. Célkitűzések.....	21
II.1. A <i>Drosophila</i> Hat1 általános jellemzése és hatásának vizsgálata a Huntington-kór patogenezisében	21
II.2. His4r variáns hiszton fehérjék acetilációs módosításainak hatása a Huntington-kór patomechanizmusára	22
III. Anyagok és módszerek.....	23
III.1. <i>Drosophila</i> fenntartás, keresztezések és fenotípus vizsgálatok	23
III.1.1. Felhasznált törzsek	23
III.1.2. Hat1 delécia létrehozása transzpozon remobilizálással	23
III.1.3 Hat1 mutánsok életképességének, élettartamának és fekunditásának vizsgálata..	23
III.1.4. Szem pigment koncentrációjának meghatározása spektrofotometriával.....	24
III.1.5. Cirkadián ritmus és napi aktivitás vizsgálata	24
III.1.6. Hőstressz érzékenység vizsgálata.....	24
III.1.7. His4r transzgenikus állatok törzsbe állítása	25
III.1.8. Idegsejtekben expresszált His4r konstrukciók életképességre gyakorolt hatásának vizsgálata	25
III.1.9. Életképesség és élettartam vizsgálatok mHtt-t expresszáló egyedekben	25
III.1.10. Neurodegeneráció vizsgálata pseudopupil assay-el	26
III.2. Molekuláris biológiai módszerek	26
III.2.1. Hat1 mutációk azonosítása PCR-al.....	26
III.2.2. Pontmutáns His4r transzgenek és transzgenikus törzsek létrehozása	27
III.2.3. Az integrált pontmutáns His4r transzgenek szekvencia ellenőrzése.....	28

III.2.4. mRNS szint vizsgálata RT-qPCR-ral	29
III.2.5. RNS szekvenálás	29
III.2.6. Western blot analízis	30
III.2.7. Lárvális nyálmirigyek immunfestése	31
IV. Eredmények	33
IV.1. A <i>Drosophila Hat1</i> általános jellemzése és funkciójának vizsgálata a Huntington-kór patogenezisében	33
IV.1.1. Hat1 deléciós mutáns előállítása.....	33
IV.1.2. A Hat1 H4K5 és K12 specifikus acetiltranszferáz aktivitással rendelkezik ..	34
IV.1.3. K5 és K12 acetiláció hiányának hatása a His4r sejtmagi lokalizációjára.....	38
IV.1.4. A Hat1 deléción csökkent életképességet és élettartamot eredményez	39
IV.1.5. A Hat1 nem szükséges a fertilitáshoz, de a túltermelése nőstényekben megnöveli a lerakott peték számát	42
IV.1.6. A Hat1 gén neuronális kifejeződésének vizsgálata az öregedés során	43
IV.1.7. A Hat1 gén deléciójának hatása a napi aktivitásra és cirkadián ritmusra.....	43
IV.1.8. Kromatin szerveződésre gyakorolt hatás vizsgálata PEV analízissel.....	45
IV.1.9. A Hat1 deléción transzkriptomikai hatásának vizsgálata	47
IV.1.10. A Hat1 deléción nem befolyásolja a hőstressz érzékenységet	50
IV.1.11. Csökkent Hat1 dózis hatásának vizsgálata Huntington-kór modellben	51
IV.2. His4r hiszton fehérjék acetilációs módosításainak hatása a Huntington-kór patomechanizmusára	56
IV.2.1. His4r pontmutáns konstrukciók és transzgenikus <i>Drosophila</i> vonalak előállítása	56
IV.2.2. A His4r transzgének kifejeződésének vizsgálata.....	56
IV.2.3. A His4r pontmutánsok életképességre gyakorolt hatásának vizsgálata	60
IV.2.4. A pontmutáns His4r transzgének expressziója nem idéz elő fotoreceptor neuron degenerációt	61
IV.2.5. A His4r pontmutációk hatása a mutáns Htt kiváltotta patológias folyamatokra	62
V. Diskusszió.....	68
VI. Köszönetnyilvánítás	74
VII. Irodalomjegyzék	75
VIII. Összefoglalás.....	92
IX. Summary	96
X. Publikációs lista.....	99

I. Elméleti bevezetés

I.1. Az eukarióta kromatin szerkezete

A génjeink viszonylag változatlan formában történő átörökléséért felelős DNS-nek, mely a humán genom esetében mintegy $6,6 \cdot 10^9$ bázispárnyi és körülbelül 2 méter hosszúságú, nagy mérete miatt tömörödnie kell, hogy beleférjen a közelítőleg 10 μm átmérőjű sejtmagba. Ahhoz, hogy a sejtmagban rendezett és funkcióit ellátni képes módon elférjen, a DNS egy kromatinnak nevezett nukleoprotein komplexet alkot főként hiszton fehérjékkel, és emellett más fehérje és RNS alkotókkal együtt. A komplex legkisebb alapegységei a nukleoszóma, melyeket 4 hiszton fehérje típus és a hozzájuk kötődő negatív töltésű DNS alkot. Ezek a „core” hiszton fehérjék a H2A, H2B, H3 és a H4. Két H2A-H2B és két H3-H4 dimer hozza létre a hiszton oktamer, amelyre 147 bázispárnyi DNS tekeredik rá. A hiszton oktamer és DNS által létrehozott struktúrára kívülről a H1 linker hiszton fehérje kapcsolódik, stabilizálva a köztük lévő kapcsolatot. A nukleoszóma gyöngyszerűen helyezkednek el a DNS láncon, ezt a „gyöngyfüzér” szerkezetet nevezik átmérője után 10 nm-es rostnak. A H1 hiszton kapcsolódása a „gyöngyfüzér” felcsavarodásához vezet. Egy „csavarulatot” 6 nukleoszóma alkot és átmérője megközelítőleg 30 nm, az így felépülő struktúrát nevezik szolenoid szerkezetnek. Ezek a 30 nm-es kromatin fonalak hurkokat alkotnak és a DNS így további tömörödést, kondenzációt ér el.¹ A kromatin által felvett struktúra függ a kapcsolódó linker hiszton típusoktól is.² A magasabb rendű kromatin struktúra kialakításában részt vesznek más fehérjék is, mint amilyen a lamin, a topoizomeráz II, az SMC (Structural Maintenance of Chromosomes) fehérjék, valamint a centromer és telomer kialakításában részt vevő fehérjék.³

I.2. Hisztonok és hiszton variánsok

A hiszton fehérjék méretüket tekintve kicsi, 11-16 kDa méretű bázikus fehérjék, melyek evolúciósan nagymértékű konzerváltságot mutatnak. Azonban nem minden organizmus alkalmaz hiszton fehérjéket a DNS „csomagoláshoz”. A prokariótákban számos különböző, filogenetikailag egymással kapcsolatot nem mutató fehérje tölti be ezt a funkciót, az Archaeákban találhatóokról úgy vélik, hogy az eukarióta hisztonok evolúciós ősei lehetnek.⁴ Az eukarióták országán belül található dinoflagelláták szintén nem rendelkeznek hiszton fehérjékkel, hanem azoktól független eredetű kisméretű bázikus fehérjéket használnak DNS-ük tömörítésére.^{3,5} Az emlősök spermatozoái pedig úgynevezett protamin fehérjéket alkalmaznak erre a célra.⁶

Az eukarióták többségében 4 típusú hiszton fehérje alkotja a nukleoszóma magját alkotó oktamer komplexet (nukleoszóma core partikulum), ezek a H2A, H2B, H3 és H4 hiszton fehérjék, melyeket kanonikus vagy „core” hisztonoknak is nevezünk.⁷ A kanonikus hisztonok a genomban úgynevezett gén klaszterekben helyezkednek el, ezekben a klaszterekben a hiszton fehérje géneknek számos kópiája található meg.⁸ A hiszton gének egyedi 5'- és 3'-UTR régiókkal, valamint promóterekkel rendelkeznek. A kanonikus hiszton fehérjék speciális RNS-ről íródnak, melyek poly A farok nélküliek.^{9 10} Ezek a hiszton fehérjék kétféle strukturális doménnel rendelkeznek. Az úgynevezett „histone fold domain” pozitív töltése

révén képes kölcsönhatásba lépni a negatív töltésű DNS-el, illetve a hiszton-hiszton kapcsolatok kialakulása is ezen keresztül jön létre.^{11 12} A másik doménjük pedig egy flexibilis, nukleoszómából farki rész szerű módon kinyúló struktúra, amely magas lizin aminosav tartalma révén számos poszt-transzlációs módosítás helyéül szolgál.^{13 14} Ilyen farki struktúrával a hiszton fehérjék az N- és a C-terminális részükön is rendelkezhetnek.^{11 15} A hiszton fehérjék magas affinitással kötődnek a DNS-hez, annak kis árok részét ismerik fel és nem szekvencia-specifikus módon kötődnek hozzá. Azonban egyes DNS szekvencia részek nagyobb preferenciával kötnek nukleoszómákat, így pl. az AT dinukleotidok 10 bp-nyi periodicitású ismétlődései.^{16 12 17 18}

A H1 linker hiszton kívülről kötődik hozzá a DNS-hez és a core hiszton fehérjékhez. Egy központi globuláris doménből és az ezt határoló N- és C-terminális doménekéből épül fel.¹⁹ Két fő helyen kapcsolódik a kromatin struktúrához, az egyik a nukleoszómális felszínen található, a másik pedig két nukleoszóma közötti régióban a DNS kis árok részén.²⁰ Ehhez a kötődéshez szükséges mind a C-terminális rész, mind a globuláris domén.²¹ A H1 hiszton gén szintén a hiszton klaszterekben található több kópiában.⁸

A kanonikus hisztonok helyettesíthetőek hiszton variánsokkal, melyek a hiszton gén klasztereken kívül kódoltak, és kanonikus megfelelőjükhöz képest szekvencia eltéréseket hordoznak. Beépülésükre replikációkor vagy replikációtól függetlenül is sor kerülhet. A hiszton variánsok egyedi kölcsönhatásokat képesek létrehozni a kromatin-asszociált fehérjékkel - mint amilyenek a kromatin átrendező fehérjék -, vagy megváltoztathatják a kromatin szerkezetét.²²

A H2A hiszton fehérjének mára többféle variánsát sikerült azonosítani különféle többsejtű élőlényekben, ilyenek a H2A.X, a H2A.Z, a H2A.B és a macro-H2A. Az egyik legismertebb közülük a macro-H2A, amely a legnagyobb hiszton variáns, mérete a kanonikus H2A majdnem háromszorosa. Emlősökben az inaktív X-kromoszómához kötődik, valamint szerepet játszik a DNS hibajavításban és a rekombinációban is.^{23 24}

A H3-as hiszton fehérjének is több variánsa ismert, emlősökben ilyen a H3.1, H3.2, H3.3 és CENP-A, melyek fehérje szekvenciája nagyon hasonló. A H3.3 kromatinba épülése egy nyitottabb konformációt eredményez elősegítve ezzel a transzkripciót.²⁵ A CENP-A fehérje a kanonikus H3-at főként a centromerikus régiókban cseréli le replikáció független módon.²⁶ A centromer pozíciója a kromoszómán nem DNS szekvencia által meghatározott, hanem a legtöbb eukarióta organizmusban a CENP-A jelenléte jelöli ki, amely a centromer és kinetochor kialakításában és fenntartásában nélkülözhetetlen.^{27 28 29}

A *Drosophila* His4r H4 hiszton „variáns” aminosav szekvenciájában nem tér el a kanonikus hiszton fehérjétől, csak szabályozásában.³⁰ A humán H4 génváltozatok változatos szerveződésű proximális promótereik révén és a génklaszterek általános kromatinizációjának eltérései miatt szabályozásukban eltérnek egymástól.³¹ Egy nemrégiben felfedezett humán H4 hiszton változat a H4G, amelynek hiányzik a C-terminális farki része és a kanonikus H4 fennmaradó részével is csak 85%-os hasonlóságot mutat. A H4 hiszton változatokra jellemző, hogy különböző rákos szövetekben eltérő expressziót mutatnak.³²

A H1 linker hiszton fehérjének is számos változatos szekvenciájú variánsa létezik a többsejtű élőlényekben. A H1 altípusok közül a H1.0, a H1.X, a H1T2, a H1LS1 és a H1oo tekinthető valóban hiszton variánsnak, ugyanis ezek expressziója folyamatos a sejtciklus során és kromatinba épülésük replikáció független módon történik.^{33 34}

I.3. A kromatin szerkezet módosításai szabályozó szereppel bírnak

Az epigenetikai szabályozás olyan öröklődő változásokat hoz létre, amelyek nem a DNS szekvenciában kódoltak. A hiszton fehérjék kovalens módosításai, mint amilyen például az acetiláció, a foszforiláció, a metiláció és az ubikvitináció az N-terminális hiszton végeken, hipotetikusán egy úgynevezett hiszton-kódot képeznek, amely szabályozó hatással bír a génexpressziós folyamatokra.^{35 36} A hiszton végek kovalens módosításai interakciós felületekként szolgálhatnak a nukleoszóma összerendeződés során kromatin átrendező fehérjék és transzkripció regulátor fehérjék toborzásához (1. ábra). Néhány hiszton módosítás rövid életű és génexpresszió aktiválást vagy gátlást vált ki, míg mások a sejtosztódások során öröklődhetnek.³⁷

1. ábra. Hiszton fehérjékre jellemző poszt-transzlációs módosítások. A H2A, H2B, H3 és H4 hiszton fehérjéket eltérő N- és C-terminális módosítások jellemzik, melyek eltérő funkciót töltenek be a kromatin struktúrájának szabályozása során.

A kromatin struktúrája szabályozza az esszenciális sejtmagi folyamatokat, mint amilyen a transzkripció, DNS replikáció és a DNS hibajavítás. Egy gén transzkripciós aktivitásának szabályozásában fontos szerepet tölt be a lokális kromatin szerkezet. Amikor a DNS a nukleoszóma köré tekeredik, hozzáférhetetlenné válik más DNS-kötő fehérjék számára, így pl. a transzkripciós faktorok sem tudnak kapcsolatot létesíteni vele.¹⁶ A konformációs eltérések a nukleuszban lokálisan jelentkeznek, és a transzkripciót szabályozzák. A kompaktabb kromatin szerkezet akadályozza a transzkripciós folyamatokat, míg a nyitottabb struktúra transzkripciós faktorok számára elérhetővé teszi az adott DNS szakaszt.³⁸ Vannak erősen kondenzált kromatin szakaszok, melyek a sejtosztódás késői S-fázisában replikálódnak és a meiotikus rekombinációban sem vesznek részt. Ezeken a szakaszokon jellemzően alacsony a transzkripciós aktivitás, vagy egyáltalán nincsen. Az ilyen kromatin típust heterokromatinnak, míg az aktívan átíródó genomi régiókat eukromatinnak nevezik.^{3 37}

A 2000-es évek elején *Drosophilában* kétféle heterokromatin típust sikerült azonosítani különböző felépítésű fehérjékkel és eltérő szabályozó funkciókkal. A felfedezett két heterokromatin és egy eukromatin típuson kívül Filion és munkatársai 2010-ben közölt cikkükben további két kromatin típus azonosítását és jellemzését írták le, amely alapján öt kromatin típust különítettek el. Kutatásaik alapján a muslica genom specifikus kombinációjú fehérjékkel határolt nagy régiókra osztható és az öt kromatin típus egyedi fehérje kombinációkat tartalmaz.³⁹

A Filion és munkatársai által azonosított „kék” és a „zöld” kromatin nagyon hasonlóak a korábban azonosított kromatin típusokkal. A „zöld” kromatin megegyezik a klasszikus heterokromatinnal, amelyet a SU(VAR)3-9, HP1, LHR, HP6, HP1, RPD3 kölcsönható fehérjék és H3K9me2 dúsulás jelöl.^{40 41} A „kék” kromatin a korábban is azonosított Polycomb-csoport (PcG) által represszált kromatinnak felel meg és PC, E(Z), PCL, SCE, RPD3, EFF fehérjék kötése, valamint H3K27me3-ös kromatin jel magas szintje jellemzi.^{42 43} A „fekete” kromatin egy csendes típusa a kromatinnak, amely a genom nagy részére kiterjed és feltételezhetően aktív szerepet játszik a transzkripcionális csendesítésben. Jellemző kölcsönható partnerei a H1 hiszton, D1, IAL, SUUR, SU(HW), LAM, és EFF.³⁹ Szövetexpressziós adatok alapján, vannak gének a „fekete” kromatinban, amelyek képesek aktívvá válni. Gazdag a magas szinten konzervált nem-kódoló elemekben (HCNEs), melyek feltételezhetően a génszabályozásban vesznek részt és valószínűsíthetően szerepet játszanak az egyedfejlődésben.^{45 39} A „piros” és „sárga” kromatin a transzkripcionálisan aktív eukromatinra jellemző jegyeket hordoz. Ezekben a kromatin típusokban magas szintű az mRNS képződés, magas szinten van jelen az RNS polimeráz, magas a H3K4me2-ös és H3K79me3-ös aktív jelek szintje, és kevés a H3K9me2-ös és a H3K27me3-ös represszív jelek mennyisége.³⁹ A „piros” és „sárga” kromatinra jellemző fehérjék az RPD3, SIR2, SIN3A, DF31, ASH2, MAX. Csak a „piros” kromatinra jellemző a BRM, SU(VAR)2-10, MED31, az 55 kDa-os CAF1 alegység, valamint az olyan DNS kötő faktorok, mint az ECR, GAF, JRA. Az MRG15 chromodomént tartalmazó fehérje és az aktív H3K36me3-ös jel, pedig csak a „sárga” kromatinban mutat dúsulást.^{46 47 48 49} A „piros” kromatint erős origó felismerő komplex (ORC) dúsulás is jellemzi⁵⁰, ami arra utal, hogy a DNS replikáció gyakran a „piros” kromatinban kezdődik. A DNS kötő faktorok az egyes kromatin típusok által meghatározott

módon kötődnek a felismerési szekvenciájukhoz. Minden kromatin típus specifikus DNS kötő faktorok DNS kötését segíti elő és specifikus régiókhoz irányítják azokat a genomon.³⁹

A hiszton módosítások közül a lizin ϵ -aminocsoportjának acetilációja az elsőként felismert hiszton módosítások közé tartozik.⁵¹ A hisztonok acetilációja a gén aktivációval mutat korrelációt. A lizin acetiláció az egyik leggyakoribb fehérje poszttranszlációs módosítás, amely szabályozza a fehérjék affinitását más fehérjékhez.⁵² Ezeket a jelöléseket bromodomént tartalmazó kromatin-asszociált fehérjék ismerik fel.^{53 54 55 56} Az acetilációt hiszton acetiltranszferáz (HAT) enzimek hozzák létre és hiszton deacetilázok képesek (HDAC) eltávolítani (2. ábra).⁵⁷ Ez egy nagyon dinamikus folyamat, amely fontos szerepet tölt be a kromatin átrendeződés és a transzkripció irányításában.^{58 59 60 61}

2. ábra. Hiszton fehérjék acetilációja. Az acetiláció egy dinamikus folyamat a sejtekben, amely specifikus lizin aminosavakon jön létre. Kialakítását HAT, eltávolítását HDAC enzimek végzik.

A hiszton acetiltranszferázok acetil-CoA-ról acetil csoportot helyeznek a hiszton fehérjék specifikus lizin aminosavaira. Az acetilcsoport thioészterről aminra helyezése viszonylag alacsony kémiai „költséggel” jár, az olyan kémiai reakciókhoz képest, mint például a foszforiláció.⁶² A hiszton peptid szubsztrátok az enzimek központi core régiója által kialakított árokhoz és a szomszédos részekben található amino- és karboxi-terminális részekhez kötődnek, itt jön létre a kölcsönhatások többsége.⁶² Azonban a hiszton acetiltranszferázok a hisztonok mellett számos nem-hiszton fehérje szubsztrát acetilálására is képesek (pl. AML1, AML1-ETO, p53, c-MYC, NF- κ B, Cohesin, Tubulin).^{63 64 65 66 67 68 69} A hiszton fehérjék acetilációja nyitottabb kromatin szerkezetet eredményez, ami lehetővé teszi a transzkripció faktorok számára a hozzáférést a DNS-hez. Celluláris lokalizációjuk alapján a HAT enzimeket A és B típusra osztják. Az A típusú hiszton acetiltranszferázok nukleáris lokalizációt mutatnak és transzkripcióhoz kapcsolódó folyamatokat szabályoznak.⁷⁰ Ez a típus további öt alosztályra osztható homológiájuk és acetilációs mechanizmusuk alapján.⁶¹ A

GNAT család tagjai közé tartozik a PCAF, a Gcn5 és az ALP3. A CBP és p300 alkotja a CBP/p300 családot.⁷¹ A Tip60, MOZ, MORF, HBO1 és HMOF a MYST család tagjai.⁷² A transzkripció faktorokkal kapcsolatban álló HAT családba tartozik a TAF1 és a TIFIIIC90. Továbbá számos szteroid receptor koaktivátor is tartozik a HAT enzimek közé, ilyenek a p600, SRC1, CLOCK és AIB1/ACTR/SCR3.^{73 74 61} A B típusú hiszton acetiltranszferázok citoplazmatikus lokalizációt mutatnak és az újonnan szintetizálódó hiszton fehérjéket acetilálják. Ilyen enzim a Hat1, amely részt vesz a DNS hibajavításban és a hiszton depozícióban is.⁷⁵

A hiszton acetiltranszferázok aktivitását szabályozhatják szabályozó fehérje alegységek vagy autoacetiláció. Számos hiszton acetiltranszferáz multiprotein komplexekkel működik együtt azok katalitikus aktivitását vagy szubsztrát specifikusát szabályozva.^{76 77} Továbbá számos HAT katalitikus aktivitásához szükséges valamilyen kofaktor kötése.⁶²

A bromodomén családja egy olyan fehérje domén család, amely képes felismerni az acetilált lizineket. A lizin acetiláció reverzibilis természetének köszönhetően az acetil-lizin és bromodomén kölcsönhatás dinamikus és tranziens a sejtekben.⁵⁶ A konzervált strukturális felépítés ellenére a bromodomén család teljes szekvencia hasonlósága nem magas. A bromodomének magukba foglalnak egy konzervált, négy hélixből felépülő balmenetes köteget (α_Z , α_A , α_B , α_C), egy inter-helikális ZA és BC hurokkal, melynek hossza és szekvenciája variálható.⁷⁸ Az acetil-lizin felismerése a ZA és BC hurok közötti hidrofób zsebbel történik.⁷⁹ A BC hurok kezdeti részén egy magasan konzervált aszparagin aminosav alakítja ki hidrogén kötést az acetil-lizin karboxil oxigénjével oldalláncának amid nitrogénjén keresztül.⁶²

Kísérletesen az acetiláció hatásai olyan pontmutációkkal vizsgálhatóak, ahol a lizin (K) aminosav glutaminra (Q) cserélése acetilációt mimikál, míg a lizin-arginin (K-R) csere acetilálatlan (vagy módosítatlan) lizint mimikáló szubsztitúció.^{80 81}

I.4. A hiszton fehérjék útja a sejtmagba

Az újonnan szintetizált kanonikus és variáns hisztonok, valamint a reciklizált hisztonok áthelyezésre kerülhetnek a DNS-re replikációt, transzkripciót, DNS hibajavítást vagy más nukleáris folyamatot követően. A hiszton depozícióban a hiszton chaperon fehérjék játszanak szerepet. Funkcióik közé tartozik a hiszton folding elősegítése^{82 83}, a hiszton-enzim kölcsönhatás kialakulásának elősegítése^{83 84 85 86}, a szolubilis hiszton pool fenntartása^{87 88}, hisztonoknak a DNS-re helyezése⁸⁹, hiszton kicserélés elősegítése^{90 91 92}.

A hiszton chaperonok savas felületekkel tudnak a hisztonokhoz kötődni és gyakran tartalmaznak helyettes vagy kiegészítő fehérje doméneket a hisztonokkal való kölcsönhatáshoz. Ilyenek például a TPR (tetratricopeptide repeats) motívumok a NASP (nuclear autoantigenic sperm protein) fehérjében⁹³, az RbAp46/48 fehérje WD40 doménje^{94 95} és az ASF1 (antisilencing factor 1) IgG-szerű régiója^{96 97}.

Az újonnan szintetizált hisztonok különféle módosításokon esnek át a megfelelő nukleáris transzportozhoz.⁹⁸ A misfolding és aggregáció elkerülése érdekében számos fehérje chaperon gyűlekezik a riboszómális polipeptid exit helyek mellett. A Heat Shock Protein 70 fehérje

család tagjai ezekhez a helyekhez toborzódnak, hogy ATP-t felhasználva kialakítsák a fehérjékben a hidrofób szegmenseket.⁹⁸ A H3 és H4 külön hősokk fehérjékkel létesít kapcsolatot, a Hsc70-el (Complex Ia) és a Hsp70/90 (Complex Ib) komplexszel. Ezt követően a tNASP hiszton chaperon és a Hsp90 (Complex II) közreműködésével a H3 és H4 egy heterodimert hoz létre. Az elsőként detektálható poszt-transzlációs módosítás már a transzláció során megjelenik, mikor a H3 még a riboszómához kapcsolódik. Ez a H3K9 metiláció, amelyet humán sejtekben a SetDB1 (SET domain, Bifurcated 1) enzim hoz létre.⁹⁹ Az újonnan szintetizált hiperacetilálódott hisztonok kevésbé stabilak és hibás kapcsolatot alakítanak ki a Hsp chaperonokkal, ami a sejtciklus folyamatára is hatással van. Ezért az INHAT (inhibitor of acetyltransferases) fehérje komplex szabályozza az újonnan szintetizált H4 hisztonok megfelelő acetiláltsági állapotát.¹⁰⁰ A humán sejtekben a H3-H4 dimeren megjelenik a H3K14 és K18 acetiláció^{101 102}, majd H3-H4 dimer kapcsolódik az ASF1 (anti-silencing function 1) és sNASP (somatic nuclear autoantigenic sperm protein) hiszton chaperonokhoz, valamint a Hat1 (histone acetyltransferase 1) enzimhez (Complex III). A Complex III-ban a H4 már nincsen kölcsönhatásban az INHAT alegységekkel, helyettük a Hat1 enzimmel kerül kapcsolatba, amely acetilálja a H4K5 és K12 pozíciókat.¹⁰⁰ Végül a H3-H4 hisztonok kölcsönhatnak az Importin-4-el és az ASF1-el (Complex IV), így jutnak be a sejtmagba a kromatinba rendeződéshez.^{82 83}

A 40 kDa-nál nagyobb méretű makromolekulák nem tudnak egyszerű diffúzióval átjutni a nukleáris pórus komplexen, ezért aktív transzporterek segítségére van szükségük, melyeket karyopherinnek (Kap) vagy importinnak (Imp) neveznek¹⁰³. A karyopherin fehérje család NLS (nuclear localisation signal) szekvenciát vagy nukleáris export szignált ismer fel a cargo fehérjék importjához vagy exportjához^{104 105 106}. Az NLS szekvencia egy strukturálisan rendezetlen régió, ami főként pozitív töltésű aminosavakból áll limitált szekvencia homológiával.¹⁰⁷ Az NLS szekvenciák közötti konzerváltság hiánya kicsiny számú Kap fehérje számára teszi lehetővé nagy számú nukleáris fehérje transzlokációját a nukleuszba, vagyis egy egyszerű Kap fehérje számos szubsztrátot képes transzlokálni¹⁰⁸.

Az ASF1-H3-H4 komplexhez kötődő számos karyopherin fehérje közül az Importin 4/Kap123 (humán/élesztő) a legáltalánosabb (Complex IV), amely arra enged következtetni, hogy ez az elsődleges nukleáris importere.^{82 83 101 109} A karyopherinek közvetlenül kötődnek a hiszton farki részekhez azok NLS-szerű szekvenciáján keresztül¹¹⁰, de az Importin-4 a teljes ASF1-H3-H4 protein komplexet ismeri fel.¹¹¹ A Kap123 két lizin-kötő zsebet használ a H3₁₋₂₈-NLS felismerésére és megkötésére. A H3K14 és K23 a kulcs aminosavak a Kap123 kötődésben és az acetiláció zavarja ezt a kölcsönhatást. A H4₁₋₃₂-NLS-t a Kap123 valószínűleg a második lizin-kötő zseben keresztül köti meg és a felismerés a H4K16-on keresztül történik meg. A H4K16 acetiláció valamint a Hat1 által létrehozott H4K5K12 diacetiláció szintén csökkenti az importin kötést. A H4K5K12 diacetiláció támogatja a H3-Kap123 kötődést, így az ASF1-H3-H4 nukleáris import a H3 NLS szekvencián keresztül valósul meg.¹¹² Az ASF1 destabilizálja az Importin-4-hiszton kölcsönhatást, azt sugallva, hogy közreműködik a hiszton-felszabadításban a nukleuszban. A karyopherinek egy magi RAN GTPáz használ a teljes disszociációhoz az ASF1-H3-H4-ról a nukleuszban.^{113 114}

A H2A/H2B dimeren nem figyelhető meg poszt-transzlációs módosítás a nukleáris import előtt. A H2A/H2B dimer hiszton chaperone-okkal lép kölcsönhatásba a citoplazmában, pl. a

Nap-1-gyel, amely elősegíti a nukleuszba jutását, a H3/H4 tetramerekkel történő kölcsönhatását és a nukleoszóma kialakítását.^{115 116}

Replikáció során az eredeti templát DNS szárlól származó nukleoszómaakat alkotó parentális hiszton fehérjék közvetlenül a replikálódó DNS-re helyeződnek és újra összerendeződnek nukleoszómaikká.¹¹⁷ A szolubilis hiszton fehérjék, melyek az osztódó sejt S fázisa során szintetizálódtak szintén nukleoszómaiba rendeződnek az új DNS szálra. Ezt a folyamatot kromatin összerendező faktorok segítik elő.¹¹⁸

A CAF-1 (Chromatin assembly factor 1) egy kromatin összerendező faktor, amely részt vesz az újonnan szintetizálódott hisztonok depozíciójában.^{119 120} Ez a fehérje komplex a p150, p60 és az RbAp48 (vagy élesztőben a Cac1, Cac2 és Cac3) alegységekből áll^{120 121}, és a replikációs villák mögött van jelen, ugyanis kölcsönhat a PCNA (proliferating cell nuclear antigen) processzálo gyűrűvel¹²². Az RbAp48 CAF-1 fehérje alegység kölcsönhat a H4 hisztonnal^{94 95} és hiánya a nukleoszóma összerendeződés hibáihoz vezet *in vitro*.¹²³ Egyes tanulmányok egy olyan modellt sugallnak, ahol két CAF-1-H3-H4 komplex egy (H3-H4)₂ tetramerré rendeződik a DNS-en.^{124 125} A nukleoszómalis hisztonok feltételezhetően a DNS replikáció során bekövetkező DNS looping során helyeződnek át.^{126 127} Míg a DNS looping talán a hisztonok szegregációjában játszik szerepet a replikációs villáknál, az eukarióta replikatív helikáz képes kapcsolatba lépni a hisztonokkal^{128 129 130 131} és ez elkülöníti a szülői hisztonokat, közel tartva azokat az eukarióta replikációs gépezethez^{132 133}.

A H2A/H2B dimerek kölcsönhatását a H3/H4 tetramerrel elősegíti egy konzervált acetilációs módosítás is a H4K91 pozícióban, amelyet a Hat4 enzim hoz létre, szabályozva a hiszton oktamer összerendeződést és a tetramer-dimer kölcsönhatás stabilitását.^{134 135 136 137}

1.5. A Hat1 hiszton acetiltranszferáz

A Hat1 egy B típusú hiszton acetiltranszferáz. A B típusú hiszton acetiltranszferázok az újonnan szintetizálódott hiszton fehérjéket acetilálják kromatinba épülésük előtt.^{138 139 140 141} Ez a fajta acetilációs tevékenység többnyire a H3 és H4 hiszton fehérjéken érvényesül közvetlenül a szintézisüket követően.^{142 143 144 145} A hiszton fehérjék nukleoszómaiba épülését követően a kromatin érés folyamata során ezek a módosítások eltávolításra kerülnek.^{146 147 148} A H4 hiszton acetiláltsági mintázata nagymértékű konzerváltságot mutat az eukarióta élőlényekben. A H4 potenciálisan acetilálható lizin (K) aminosavai az N-terminális farki részen található 5-ös, 8-as, 12-es és 16-os pozíciók. Ezek közül az újonnan szintetizált hisztonokon a K5 és K12 acetiláltsága megfigyelhető volt a legtöbb vizsgált eukariótában, a K8 és K16 pedig nem.^{148 149} Az újonnan szintetizálódott H3 hiszton fehérjék acetilációs mintázata ennél jóval nagyobb variációt mutat a különböző organizmusokban.^{150 151 152}

A Hat1, mint azt neve is sejteti, az elsőként felfedezett hiszton acetiltranszferáz enzim.¹⁵³ Főként a citoplazmában található meg, azonban a nukleuszban is jelen van.⁸⁵ A *Hat1* gén felfedezése két különböző úton történt. Az első ilyen kísérletben hőérzékeny élesztő mutánsok vizsgálatát végezték, hogy azonosítsanak egy olyan törzset, amely H4 hiszton acetiláció defektust mutat. Az alacsonyabb hiszton acetiltranszferáz szintet a XVI. kromoszóma jobb karjának centromer közeli régiójában található *Hat1* mutáció okozta.¹⁵⁴ A második ilyen

kísérlet is élesztőben történt, ahol a citoplazmatikus H4 acetilációért felelős hiszton acetiltranszferázt akarták izolálni. A tisztítást követően a katalitikus alegység fehérje szekvencia adatai lehetővé tették a hozzá tartozó gén azonosítását. Az élesztő extraktumból a Hat1 együtt tisztult egy másik polipeptiddel, a Hat2-vel, amely növelte a Hat1 katalitikus aktivitását.⁸⁵

Számos más organizmusból tisztítottak azóta H4 specifikus B típusú hiszton acetiltranszferázt. Ezek nagymértékű evolúciós konzerváltságot mutattak és gyakran együtt voltak tisztíthatóak egy Hat2-höz hasonló WD-40 domént tartalmazó fehérje alegységgel, pl. *X. laevis* (Rbap48), csirke és humán (Rbap46) minták, valamint kukorica esetén is.^{156 157 86 158}

^{159 160 161} Az RbAp46 fehérje WD-40 doménje a H4 hiszton első alpha hélixéhez kötődik és megváltoztatja a hiszton fold domén térszerkezetét.^{162 95} Ez a konformációs változás a Hat1 katalitikus alegységét a hiszton farki rész közelébe helyezi⁸⁵, így az RbAp46 H4 hisztonhoz kötődése nagymértékben megemeli a Hat1 katalitikus aktivitását.^{85 95 86}

Számos eukarióta sejt lízise során a Hat1 enzim a szolubilis citoplazmatikus frakcióban volt megtalálható és a szabad H4 fehérjéken mutatott aktivitást, így sokáig azt feltételezték, hogy nagyrészt vagy teljes mértékben a citoplazmára korlátozódik acetilációs tevékenysége.⁸⁵ Azonban sikerült a nukleuszban is kimutatni a jelenlétét.¹⁶³ A Hat1 citoplazmatikus aktivitására élesztőben, *X. laevis*ben és emberben a H4 hiszton K5 és K12 acetilálása jellemző, azonban emberben mutat némi H2A K5 acetilációs aktivitást is.^{85 155}

Szintetikus peptidekkel végzett kísérletekkel kimutatták, hogy a 8-as és 16-os lizinek acetiláltsága esetén a Hat1 nem képes módosítást végezni a fehérjén. A 8-as és 16-os lizin argininre (acetilálatlan állapotot mimikáló módosítás) cserélése esetén azonban a Hat1 képes funkcióját betölteni, vagyis ezen pozíciók pozitív töltése a fontos.¹⁶⁴ Több proteomikai tanulmány alapján a Hat1/Rbap46 komplex elsődleges kölcsönható partnerei a szolubilis H3/H4 komplexeknek.^{83 82 165 166 167 168 169 109 170 113} Érdekes módon különböző modell rendszerekben, a gombáktól egészen az emlős sejtekig, a *Hat1* mutációk különféle fenotípusokban nyilvánultak meg.

Gombákban kimutatták, hogy szerepe van a H4 hiszton nukleáris importjában. *Candida albicans*ban a Hat1 a H4 hisztonhoz kapcsolódik és acetilálja azt a nukleáris transzlokációt megelőzően, továbbá a nukleáris importban részt vevő NuB4 komplex tagjaként is jelen van.¹⁷¹ *Physarium polycephalumban* a H4 K5 és K12 acetilációt gátló mutációk a nukleáris import hibáihoz vezettek.¹⁷¹

Gombában és emlős sejtekben azt a felfedezést tették, hogy a Hat1 részt vesz a kromatin összerendeződésben is. *Physarium polycephalumban* részt vesz az újonnan szintetizálódott H3/H4 replikációs helyhez való szállításában és a H4 hiszton fehérje replikáció kapcsolt acetilációja szükséges a hatékony kromatin összerendeződéshez.¹⁷¹ Egér embrionális fibroblaszt (MEF) sejtekben kimutatták, hogy a Hat1 szükséges a H4 K5 és K12 acetilációjához a replikáció kapcsolt kromatin összerendeződés és a megfelelő kromatin konformáció fenntartása során. A Hat1 hiánya a bromodóment tartalmazó fehérjék – Brg1, Baz1a, Brd3 – csökkenéséhez, valamint a Topoizomeráz 2 és a DNS helikázok szintjének növekedéséhez vezet MEF sejtekben.¹⁷² A MEF sejtekben Hat1 hiánya esetén a transzláció regulációért, mRNS splicingért és DNS hibajavításért felelős fehérjék dúsulása is

megfigyelhető volt a naszcens kromatinon, míg a DNS replikációban részt vevő faktorok nagyrészt változatlan mennyiségben fordultak elő. *Hat1* delécio hatására számos ATP-függő kromatin átrendező komplex (Brg1, NuRD, ACF) is csökkent szintet mutatott a naszcens kromatinon, ami megváltozott struktúrára utal. Mindemellett a core hisztonok és hiszton chaperonok (FACT komplex, ATRX, NMP3) száma is megemelkedett *Hat1* hiányában. A *Hat1* úgy tűnik, hogy a kromatin érés idején disszociál a naszcens kromatinról, amely után bekövetkezik a H4K5K12 deacetiláció.¹⁷²

A *Hat1* egy további különleges szabályozó szerepére lettek figyelmesek *Xenopus*, *Drosophila*, csirke és humán sejtekben egyaránt, ami nem más, mint a CENP-A centromerikus H3 hiszton variáns fehérje megfelelő kromatinba építése. *Xenopus* pete extraktumban az RbAp46/48 – *Hat1* komplex specifikusan köt a CENP-A N-terminális részéhez, míg a H3.1 N-terminálishoz nem.^{158 85 155 173 164 174} *Drosophila melanogaster* S2 sejtekben a *Hat1* stabil komplexet hoz létre a CENP-A-val a nukleuszban és a citoplazmában is. A *Hat1* nem módosítja a CENP-A aminosavait, hanem kölcsönhatásba lép a CENP-A – H4 dimerrel és a H4-es hisztont acetilálja a K5-ös és K12-es pozícióban. A kölcsönhatás fennmarad a kromatinba épülésig, ami egy chaperon-szerű funkciót sejtet és talán a H4 hiszton acetilált állapotát hivatott fenntartani. A *Hat1* komplex megtalálható citoplazmatikusan, nukleárisan és kromatinhoz kötött állapotban is a sejtben. *Hat1* hiányában csökkent CENP-A centromerikus kromatinba épülés volt megfigyelhető.¹⁷⁵ Az acetilálatlan H4 a CENP-A-val nem épült be a centromerikus régióba *Xenopus*-ban és csirke DT40 sejtekben sem.^{176 177 178} DT40 csirke és humán HeLa sejtekben a H4K5 és H4K12 acetilációs jelek dúsulását figyelték meg a centromer régiókon. RbAp48 deficiens és mutáns (Y32H) DT40 sejtekben a prenukleoszómális CENP-A-H4 komplexekben a H4K5ac és H4K12ac szint, valamint a centromerek CENP-A szintje kevesebb, mint felére csökkent.¹⁷⁸ Acetilálatlan lizineket mimikáló H4-K5RK12R fehérje expressziójának hatására a CENP-A nem centromerikus régiókba történő hibás beépülése az RbAp48 mutáns sejtekéhez volt hasonló. A H4-K5RK12R expresszió következtében kialakuló hibás CENP-A beépülés arra utal, hogy az RbAp48-*Hat1* komplex általi acetiláció szükséges a H4 – CENP-A komplex centromerbe épüléséhez. Acetilált lizineket mimikáló H4-K5QK12Q expresszió hatására a centromerikus CENP-A szint növekedett az RbAp48 deficiens sejtekben, vagyis az acetilációt mimikáló H4 menekítette a hibás CENP-A beépülést.¹⁷⁸

Élesztőben, továbbá csirke és egér sejtekben felfedezték, hogy a *Hat1* hiánya DNS repair hibákat és megnövekedett érzékenységet okoz a DNS károsító ágensekkel szemben. *Schizosaccharomyces pombe*-ban a *Hat1* delécioja érzékenyebbé teszi az élesztőt az MMS DNS károsító szerre.¹⁷³ *Candida albicans*-ban a DNS különböző hibáinak javítása sérül és a DNS sérülések száma is gyakoribb. Emellett a delécios mutánsok lassabb növekedési fenotípust is mutattak.¹⁷¹ Csirke DT40 sejtekkel végzett kísérletekben a *Hat1* hiánya szintén lassabb növekedést és megemelkedett érzékenységet eredményezett MMS és camptotechin kezelés hatására.¹⁶⁵ Egerekben a *Hat1* delécioja neonatális letalitást okozott és a *Hat1* null mutáns egerekből származó egér embrionális fibroblaszt sejtekben növekedési defektusok, genom instabilitás, valamint megemelkedett érzékenység volt megfigyelhető a DNS károsító anyagokkal szemben. Ezek a sejtek emelkedett szenzitivitást mutattak mind az egyes szálú, mind a kettős szálú DNS törést okozó anyagok hatására.¹⁷⁹ *Saccharomyces cerevisiae*-ben

csak akkor voltak megfigyelhetőek ezek a DNS hibajavítási zavarok, ha a mutációt kombinálták lizin-arginin cserékkel a H3-as hiszton N-terminális részén.^{180 181}

Élesztőben felfedezték azt is, hogy a Hat1 szerepet játszik a telomerikus csendesítésben. *Saccharomyces cerevisiae*-ben, mikor a Hat1 mutációt kombinálták lizin-arginin cserékkel a H3-as hiszton N-terminális részén, az telomerikus csendesítési hibákhoz is vezetett.^{180 181} Ha a H3 N-terminális módosításokat kombinálták H4 N-terminálison található lizinek argininre cserélésével, azt kapták, hogy egyedül a H4K12-es pozíció esetén (a K5, K8, K16-nál nem) tapasztaltak hasonló telomerikus csendesítési hibákat, tehát a Hat1 hatása a 12-es pozíción keresztül érvényesülhet.¹⁸⁰

I.6. Epigenetikai változások a neurodegeneratív betegségekben

A neuronok olyan dinamikus sejtek, amelyek hosszú posztmitotikus életük során válaszolnak, reagálnak az őket érő ingerekre. Strukturális és funkcionális plaszticitásuk megfelelő transzkripció regulációt igényel, ugyanis ennek nem megfelelő működése a fejlődő és adult agyban egyaránt a kognitív funkciók meghibásodásához vezet.¹⁸²

A leggyakoribb neurodegeneratív betegségek esetében a legjelentősebb kockázati tényezőt az öregedés jelenti, amely összefüggésben áll a kognitív kapacitás csökkenésével is. Ezek a betegségek a neuronok progresszív degenerációját, sejtpusztulást okoznak, és többségükre nem ismerünk gyógymódot. A legismertebb neurodegeneratív betegségek közé tartozik az Alzheimer-kór, a Parkinson-kór, az amiotrófikus laterálszklerózis, a frontotemporális demencia és a spinocerebelláris ataxiák.^{183 184 185 186} Ezek a betegségek különböznek pathofiziológiájukban, némely közülük a memóriát érinti és kognitív zavarokat okoz (pl. Alzheimer-kór), mások a mozgást érintik (pl. ataxiák) és vannak, melyek mindkettőt (pl. Parkinson-kór).¹⁸⁷

Ismertek olyan neurodegeneratív megbetegedések, amelyeket egyetlen gén mutációja vált ki. Azokat a megbetegedéseket, ahol egy fehérjében meghosszabbodott glutamin szakasz jelenik meg CAG trinukleotid ismétlődések átíródása következtében, poliglutamin betegségeknek nevezik. Attól függően, hogy milyen génben keletkezik a hiba és milyen sejteket érint, különböző kórképeket okozhat. Ilyen megbetegedés a Huntington-kór (HD), a spinális bulbáris izomatrófia (SBMA), a dentatorubral-pallidolusian atrofia (DRPLA) és a spinocerebelláris ataxia (SCA) hat formája. Ezen betegségek pathomechanizmusának közös vonása, hogy a képződött fehérje poliglutamin szakasza miatt megváltozik a kódolt fehérjék térbeli szerkezete és aggregációra hajlamossá válnak.¹⁸⁸ Úgynevezett fehérje aggregátumok keletkeznek, melyek struktúráisan károsítják a sejteket, továbbá toxikus fehérje fragmentumok hasadnak le belőlük, amelyek a sejtmagba vándorolva a DNS expresszióját megváltoztatják és más proteinekhez kötődve megváltoznak a fehérje-fehérje kölcsönhatások is a sejten belül. Ez elsősorban a neuronális sejteket érinti. A repeat instabilitás kialakulásának pontos okát nem ismerjük. A DNS replikációja során keletkező szál-törések javításakor a DNS polimeráz enzim „elcsúszása” az ismétlődő szekvenciáknál eredményezhet expansziót és a hiba kijavításában résztvevő mismatch repair rendszer funkciózavara is hozzájárulhat a mutáció létrejöttéhez.^{188 189 190 191 192 193}

Számos tanulmány világított már rá, hogy milyen kritikus funkciót tölt be a kromatin és az epigenetikai szabályozás az agy öregedése, illetve a neurodegeneráció során. Neurodegeneratív betegségeknél megfigyelhetőek epigenetikai szabályozásbeli eltérések az egészséges öregedő agyhoz képest.^{194 195} Egyes hiszton acetilációs és metilációs szint változások korhoz köthetőek. Állatmodellekben az öregedés során a represszív jelek – H3K9me2, H3K9me3 és H3K27me3 – szintjében csökkenés következik be, illetve az aktiváló hatású jelek – H3K36me3 és H3K27ac – mennyisége megemelkedik a cerebrális kortextben és a hippokampusban.¹⁹⁶ A különböző kromatin-asszociált faktorokban bekövetkező mutációk olyan neurológiai betegségekhez vezetnek, mint például az autizmus spektrum betegségek (pl. MECP2)^{197 198}, a mentális retardáció (pl. FMRP)¹⁹⁹ és a skizofrénia (pl. CHD2)²⁰⁰.

Előzetes vizsgálatok azonosítottak közös DNS metilációs változásokat különböző neurodegeneratív betegségeknél, ami közös szabályozási programot feltételez.²⁰¹ Az olyan neurodegeneratív betegségek, mint az Alzheimer-kór, Huntington-kór és az amiotrófiás laterálszklerózis, nagymértékű transzkripciós profil változással hozhatóak kapcsolatba, ami a kromatin szabályozás érintettségére utal.^{202 203 204} Mindez rávilágít arra, hogy milyen fontos szerepet tölt be az epigenetikai szabályozás az idegsejtek működésében és az idegrendszeri funkciókban.

I.7. A Huntington-kór

A Huntington-kórt (Huntington's disease, HD) 1872-ben George Huntington írta le először, mint önálló betegséget. A betegség kialakulásáért felelős génhibát 1993-ban fedezte fel a Huntington's Disease Collaboration Research Group.²⁰⁵ A *Huntingtin* gén 210 kb hosszúságú, 67 exont tartalmaz. Az első exonban az open reading frame-en belül van egy instabil, polimorf CAG trinukleotid ismétlődés, melynek expanziója úgynevezett funkcionyeréses (gain of function) mutációhoz vezet. Egészséges személyeknél a CAG ismétlődések száma 9-36 között váltakozik. Mutáció következtében a CAG ismétlődések száma 36-121 érték közé emelkedik, ami megváltoztatja a kódolt fehérje funkcióját. Minél hosszabb az ismétlődések száma, annál gyorsabb és súlyosabb lefolyású a betegség.^{206 207} A nagy méretű Huntingtin (Htt) fehérje főként a citoplazmában található meg, a mutáns formáknál azonban hibás proteolitikus hasítások következtében olyan N-terminális fragmentumok keletkeznek, melyek bejutnak a sejtmagba.^{207 208}

A betegség egy autoszómális domináns módon öröklődő progresszív neurodegeneratív kór. Tünetei általában 40-45 éves kor között jelentkeznek és 10-15 éven belül halálhoz vezetnek. Három fő tünetcsoport jellemzi: motoros tünetek, pszichopathológiai zavarok és kognitív hanyatlás. Jellemző motoros tünet a chorea, amely spontán jelentkező irreguláris mozgás. Súlyosan károsítja a beteg mozgását, járása lassú, merev, bizonytalan. A betegség végstádiumában a korábbi hiperkinézist bradikinézia, rigiditás és disztónia váltja fel. A kognitív hanyatlás már a betegség korai szakaszában észlelhető. Ennek a frontális típusú demenciának a fő tünetei a memóriazavar, lelassult információfeldolgozás és kognitív inflexibilitás. Jellemző továbbá a személyiségváltozás: gyanakvó, paranoid, impulzív viselkedés kialakulása figyelhető meg a betegeknél. Csökken az önkontroll, dühkitörések, agresszivitás jelentkezhet. Gyakori a depresszió, alkoholizmus, öngyilkosság. A klinikai

tünetek neuropathológiai alapja a nucleus caudatus és az agykéreg sorvadása. A striatális degeneráció foka korrelál a motoros és pszichés tünetek súlyosságával. A striátum sejtjei közül főként a közepes méretű tüskés neuronok érintettek, melyek efferenseket küldenek a globus pallidusba és a substantia nigrába.^{209 210 211 212 213 214}

A vad típusú Huntingtin fehérje egy scaffold-szerű funkciót betöltve számos fehérje komplexszel lép kölcsönhatásba, melyek különböző celluláris folyamatokban vesznek részt.^{215 216 217 218 219} A Htt fehérje kölcsönhat számos olyan transzkripciós faktorról is, amelyek a neuronális túlélést szabályozó gének expressziós aktivitásában játszanak szerepet.^{220 221 222 207} Funkciója van továbbá az endo-exocitózis szabályozásában, az endo-exocitotikus és recycling rendszer elemeivel való kölcsönhatás révén.^{223 224} Így mintegy anti-apoptotikus faktorként, részt vesz a szinaptikus transzmisszió és az agyi homeosztázis regulációjában, valamint a sejtérés és differenciáció folyamatának szabályozásában is.^{216 218 225 226} A Htt kölcsönhatásba lép a dinein és a kinezin molekuláris motor komplexekkel is.^{227 228} A Huntingtin fehérje mennyiségének csökkenése a dinein/dinaktin komplex nem megfelelő működését okozza, ami az axonális transzport csökkenéséhez vezet és hatással van az osztódási orsó helyzetére a neuronális progenitor sejtekben.^{229 230 227 225} A megfelelő orsó orientációra a neuroepitheliális őssejtek osztódása során kritikus szükség van.²³¹ A Htt mennyiségének csökkenése a ciliogenezisben is csökkenést okoz.²²⁶ Tanulmányok tesznek említést arról is, hogy a vad típusú Huntingtin fehérje a szelektív autofágia folyamatában is részt vehet.^{232 233} *Drosophilában* a Htt hiánya csökkent autofagoszóma kialakulást és emelkedett ubikvitinált fehérje mennyiséget eredményez.²³⁴

A *Huntingtin* mutáció következményeként fellépő neuronális sejthalált hosszú neuronális diszfunkció előzi meg, melyhez számos celluláris folyamat járulhat hozzá. Ilyen sejten belüli folyamatok a mutáns Huntingtin (mHtt) fehérje hasításon és aggregáción túl a hibás fehérje-fehérje kölcsönhatások, a funkcióképtelen kalcium szignalizáció, az abnormális axonális transzport, a károsodott metabolizmus, a neuronális aktivitás diszregulációja és a megváltozott transzkripciós aktivitás.^{207 218 235 236} A transzkripcionális diszreguláció központi szerepet játszik a Huntington-kór pathogenezisében.²³⁷ A fő transzkripcionális változások az agyban detektálhatóak a betegség hatására.²⁰²

Egér modellen kimutatták, hogy a *Htt* gén hibája esetén számos gén mutat megváltozott expressziót az egészséges egyedekhez képest. A downregulált gének között megtalálhatóak olyan gének, amelyek a striatális neuron identitásért és funkciókért felelősek, úgymint a *Darpp32*, az *Rgs9*, a *Drd1* és a *Drd2*.^{202 238 239 240 241} Kevesebb olyan gén mutatott downregulációt, amely a kortex neuronális jelátvitelében és szöveti identitásának kialakításában vesz részt.^{239 241} HD mutáns sejtekben *REST*, *SP1*, *TAF130*, *p53* transzkripciós faktorok deregulációja is megfigyelhető az abnormális fehérje interakciók miatt.^{242 243 244 218}^{245 241} A neuronális aktivitásban, plaszticitásban és ingerelhetőségben kulcsfontosságú szerepet játszó IEG (Immediate Early Gene) faktorok, mint pl. a *Fos*, *Egr1*, *Arc*, dinamikus expresszióját szabályozó szignalizációs útvonalak (cAMP, CREB/CBP, Ras/MAPK/MSK1) HD-s striátumban szintén hibásnak tűnnek.^{246 247 248} Huntington-kóros páciensek poszt-mortem prefrontális agykérgi mintáin végzett kísérletek azt mutatták, hogy a Hox gének és más homeobox gének reaktiválódtak a páciensek agyában és az egyedfejlődés során még éretlen neuronsejtekhez hasonló expressziót mutattak. Ezáltal a neuronális identitásért felelős

transzkripció program a HD-s páciensek agyában zavart szenved. A striátum és kortex upregulált génjei közé tartoznak a gyulladás (inflammációs) folyamatokban részt vevő gének is.^{249 202}

A mHtt fehérje az olyan kromatin szabályozó faktorok aktivitását is érintette, mint a Polycomb repressive complex 2 (PRC2). A Htt hozzákötődik a PRC2-höz a sejtmagban, ami a PRC2 aktiválásához vezet, míg a mHtt tovább serkenti a PRC2 aktivitást sejt modellekben.²⁵⁰ A PRC2 inaktiváció a striatális neuronokban a neuronális differenciációban szerepet játszó transzkripció faktorok reaktiválódását és a striatális identitásért felelős gének downregulációját eredményezi. A PRC2 csökkent aktivitása adult neuronokban a HD-s egerekre emlékeztető molekuláris, elektrofiziológiai és viselkedési fenotípusokhoz vezet, a PRC2 inaktivációból és a mHtt expresszióból származó transzkripcionális jelek a striátumban mutatnak hasonlóságokat.²⁵¹

A Huntington-kórra jellemző, hogy a különböző hiszton módosítások is zavart szenvednek. A HD során megfigyelhető hiszton acetilációs zavarokat részben a CREB-binding protein (CBP) és a Pcaf hiszton acetiltranszferáz aktivitású fehérjék kötődése, mHtt aggregátumokba történő csapódása okozza.^{242 252} *Drosophila* és egér modellen kimutatták, hogy a hiszton deacetilázok (HDAC) gátlása jótékony hatást fejt ki a HD fenotípusra.^{252 253 254} Preklinikai tanulmányok is bizonyítják a jótékony hatását az olyan széles spektrumú HDAC inhibitoroknak, mint a SAHA (suberoylanilide hydroxamic acid), TSA (Trichostatin A), fenilbutirát, nátrium-butirát.^{255 256 257 258 259} A HDAC inhibitorok HD-s egerekben javítottak a neuropathológián és a motoros funkción. A HDAC4 inaktiválása egy transzkripció független mechanizmuson keresztül, a mHtt aggregáció folyamatára hatva javít a HD-s egerek neurodegenerációján. Ez azt sugallja, hogy a nem-hiszton fehérjék acetilációján keresztül is hathatnak a deacetiláz gátlószerek.²⁶⁰ A mHtt overexpresszió hatására egerekben nagymértékű változás következik be a hiszton acetilációban.²⁶¹ Azonban általánosan a H2B, H3 és H4 globális acetilációs szintben nem található különbség a HD-s R6/2 egerek agyszöve és a kontroll egereké között.^{256 258} A HD-s egerek striátumában speciális génlokuszokon figyeltek meg H3 acetiláció csökkenést. Ilyen downregulált génpromóter volt a *Drd2*, a *Penk1*, az *Actb* és a *Grin1*.²⁵⁸ Megfigyeltek H3K9, H3K14 és H4K12 acetilációs változásokat is a striátumban, azonban ezek a változások csak néhány lokuszra korlátozódtak és gyenge korrelációt mutattak.^{262 263} A H3K27 acetilációnak szintén szelektíven lecsökkent a szintje. Erős korrelációt fedeztek fel továbbá a csökkent H3K27ac, a csökkent RNS polimeráz II (RNAPII) és a gének downregulációja között. Az úgynevezett szuperenhanszerek, amelyek a sejttípus specifikus identitást és funkciót definiálják, szintén csökkent H3K27ac-ot mutattak ezekben az egerekben. Ezek a változások főként olyan géneket érintettek, amelyek a neuronális aktivitást, neuronális plaszticitást és transzmissziót szabályozzák.²⁴⁰

A hisztonok metilációs szintjét szabályozó enzimek szintén deregulációt mutatnak HD modellekben. Ilyen az ESET/SETB1 H3K9 metiltranszferáz, melynek szintje megnövekedett az R6/2 HD-s egerek striátumában és kortexében az SP1/SP3–mediálta transzkripció aktivációnak köszönhetően, melynek hatására megnövekedett a hisztonok H3K9 metilációja.²⁶⁴ A H3K4me3 szintjében csökkenést fedeztek fel R6/2 egerekben a demetilálásában részt vevő KDM5C/JARID1C enzim upreguláltságának következtében, neuronális gén downregulációt okozva a HD-s egerek striátumában és kortexében.^{239 240 265} Különböző

hosszúságú CAG ismétlődést hordozó mHtt-t expresszáló embrionális őssejteken (ESC) és neuronális progenitor sejteken (NPC) végzett kísérletek során korrelációt fedeztek fel a CAG-ismétlődés-függő génexpressziós változások és a H3K4me3 szintje között. Ez a neuronális őssejtek (NSC) esetén kifejezettebb volt, ami azt sugallja, hogy a mHtt befolyásolja az epigenetikai szabályozást a korai neuronális differenciációs állapotok során. A *Htt* null mutáció esetében ESC sejtekkel végzett kísérletekben egy általános H3K27me3 csökkenést is kimutattak, míg NPC sejtekkel végzett kísérletek során az ellenkezője történt ennek, azt sugallva, hogy a Htt részt vehet a H3K27me3 eltüntetésében sejt differenciációs állapot függő módon.²⁶⁶ HD-s páciensek prefrontális kortexén végzett kísérletek során is kimutattak H3K4me3 szint növekedést olyan gének promóterein, amelyek neuronális aktivitás és gyulladásos folyamatok szignalizációs útvonalaiiban vesznek részt.²⁶⁷ A H3K9me2 heterokromatitinizációval összefüggő kromatin jel megemelkedett szintjét is kimutatták mind HD-s páciensek, mind R6/2 egerek striátumában.²⁶⁴

Emelkedett H2A ubikvitinációs szintet is megfigyeltek R6/2 egerekben.²⁶⁸ A striatális H2A ubikvitinációs változások arra utalnak, hogy a hiszton változások nem csak a diszregulált géneket érintik.²⁶⁹

Teljes genom metilációs analízist is végeztek HD sejt modelleken. Az eredmények szerint a mHtt fehérjék hatására DNS metilációs változások jelentek meg mind a proximális, mind a disztális promóter szabályozási régiókon.²⁶⁵ HD-s páciensekből származó poszt-mortem agykéreg és máj mintán végzett DNS metilációs analízis eredményeként azt találták, hogy a *Htt* promótere szövetspecifikus metilációt mutatott, ami szövetspecifikus promóter aktivitáshoz vezetett.²⁷⁰ Az 5-hidroximetilcitozin (5-hmC) és a 7-metilguanin (7-mG) szintje HD-s egerekben globálisan lecsökkent az agyban.^{271 272}

I.8. *Drosophila*, mint Huntington-kór modell

A *Drosophila melanogaster*, más néven ecetmuslica, az egyik legelterjedtebben használt kísérleti organizmus, mivel egyszerű és kiválóan jellemzett genommal rendelkezik, genetikai módosításához fejlett eszköztár áll a kutatók rendelkezésére, és emellett kiváló modell számos humán betegség tanulmányozására. A *D. melanogaster* 4 pár kromoszómával rendelkezik, melyek közül az első a nem meghatározásban vesz részt, a többi 3 pedig autoszómális, a 4. nagyon kis méretű.²⁷³ A *D. melanogaster* genom projekt 2000-ben került befejezésre. Genommérete megközelítőleg 180 Mb, melynek a 2/3-a eukromatikus, 1/3 pedig heterokromatikus régió. Genomja megközelítőleg 18.000 gént foglal magába.^{274 275} Bár a fehérjék teljes aminosav szekvencia hasonlósága a *Drosophila* és az emlősök között megközelítőleg 40%, a fehérjék konzervált funkcionális doménjei több, mint 80%-os egyezést mutatnak.²⁷⁶ A *Drosophila* genom projekt eredményeit összevetve a humán genommal kiderült, hogy az emberi betegség gének közel 75%-ának van funkcionális orthológia muslicában.²⁷⁷

A *Drosophilát* már több, mint 100 éve alkalmazzák genetikai analízisek során. Elsőként William E. Castle tanulmányozta az 1900-as évek elején²⁷⁸, majd 1909-ben Thomas Hunt Morgan kezdte el genetikai kísérletekre használni. Az ezt követő 30 évben klasszikus

genetikai kísérletekkel sikerült a gének, kromoszómák és az öröklődő genetikai információ fő törvényszerűségeit megállapítani. Eleinte a mutagenézis technikák a besugárzásos és vegyszeres kezeléseken alapultak, majd az 1970-es évektől számos molekuláris biológiai eljárás indult fejlődésnek. Ilyenek a gén klónozás, a hibridizációs technikák, vagy a P-elemen alapuló transzformációs módszer.²⁷⁶

A *Drosophila* kísérletes szempontból előnyös tulajdonságai közé tartozik, hogy rövid idő alatt több utódgenerációban nagyszámú utódot (generációs ideje 25 °C-on 10 nap, akár több száz utód szülőpáronként) képes létrehozni. A különböző stádiumú egyedeken (embrió, lárvá, báb, adult) a vizsgálat céljának megfelelően eltérő jellegű kísérletes módszerek kivitelezhetők. Az adult állatok szervei funkcionálisan hasonlóak az emlős szervekhez (agy, bél, keringési-, kiválasztó- és reprodukció rendszer). A muslica agy több mint 100.000 neuront tartalmazó egyedi hálózat, amely komplex viselkedési mintázatok kialakítására és feldolgozására képes (cirkadián ritmus, tanulás és memória kialakítás, udvarlás és agresszió). Mindemellett apró méretű, könnyen fenntartható és manipulálható laboratóriumi körülmények között. Számos mutáns és transzgenikus törzs beszerezhető törzsközpontokból, mint amilyen a Bloomington *Drosophila* Stock Center, a Kyoto Stock Center vagy a Vienna *Drosophila* Resource Center. Ezen kívül bárki számára elérhető online adatbázisok és kísérleti eszközök széles köre áll rendelkezésre.²⁷⁶

A kísérletes munkához rendelkezésre állnak olyan speciális kromoszómák, amelyek lehetővé teszik a vizsgált jellegzetesség nyomonkövetését anélkül, hogy az átkevereződhetne és „elveszhetne” a következő generációkban. Ezeket balanszer kromoszómáknak nevezzük, melyek a kívánt funkció betöltéséhez inverziókat tartalmaznak a kromoszóma teljes hosszán, valamilyen fenotípusban megnyilvánuló, egyszerűen nyomon követhető úgynevezett „marker gén”-t, továbbá egy recesszív letális mutációt is.²⁷⁹

Egy általánosan elterjedt módszer *Drosophilában* a gének expressziós szintjének megemelésére vagy csökkentésére, azok funkciójának vizsgálatához, a GAL4-UAS expressziós rendszer.²⁸⁰ A GAL4 (galactose-responsive transcription factor GAL4) egy élesztő transzkripció faktor, amely az UAS (upstream-activating sequence) szekvenciához kötődve elindítja annak a génnek az expresszióját, amely promótere előtt található. Ha a GAL4 megtalálható az egyik muslica törzsben, míg az UAS szekvencia a vizsgálni kívánt transzgen előtt egy másik törzsben, akkor ezeket keresztezve olyan utódokat hozhatunk létre, amelyekben a transzgen expressziója a GAL4 driver által meghatározott fejlődés- és szövetspecifikus módon valósul meg. A génexpresszió csökkentése, vagy „csendesítése” pedig RNS interferenciával valósítható meg.²⁷⁶ Tehát a Perrimon és kollégái által kifejlesztett GAL4-UAS rendszer használata térben és időben kontrollálható expressziót biztosít a kifejeztetni vagy csendesíteni kívánt gén számára.²⁸¹

A *Drosophila* széles körben alkalmazott modell a neurodegeneratív betegségek tanulmányozására is. Ezek közé tartozik a Huntington-kór, mely esetén a betegség modellben neuronálisan expresszáltatható a teljes hosszúságú humán *Huntingtin* gén meghosszabbodott poliglutamin domént kódoló szakasszal, vagy a humán *Htt* gén N-terminális fragmentjei meghosszabbodott poliglutamin kódoló szakasszal. A meghosszabbodott poliglutamin domént hordozó Huntingtin fragmentumok overexpressziója hatékonyan indukálja a jellemző

fenotípusokat muslicákban. Ezek az állatok olyan neuronális diszfunkciókat mutatnak, mint amilyen a szinaptikus transzmisszió és axonális transzport hibái, a neuronális degeneráció, a mozgás problémák és a rövidebb élettartam.^{252 282 283 284 285}

A *Drosophila* egy hatékony modell, amelynek egyszerűbb a kezelése az emlős modell rendszereknél és jóval magasabb komplexitásúak az élesztő sejteknél. Alkalmas gén funkció és fehérje kölcsönhatások vizsgálatára, molekuláris mechanizmusok, celluláris folyamatok felderítésére, humán betegségekben új biomarkerek és terápiás targetek keresésére, azonban az elsődleges felfedezések utáni részletesebb mechanizmusok vizsgálatára az emlős modellek alkalmasabbak.²⁷⁶

II. Célkitűzések

Tekintve, hogy a Huntington-kór jelenleg gyógyíthatatlan és csak tüneti kezelésére van lehetőség, célunk volt különböző genetikai és molekuláris biológiai vizsgálatokkal a kór pathogenezisét befolyásoló epigenetikai targetek keresése és jellemzése. Ismert az, hogy a hisztonok acetilációs állapota befolyásolja a betegség lefolyását, e folyamatban érintett konkrét acetilációs pozíciók azonban csak részlegesen azonosítottak, kevésbé jellemzettek. Ezért a következő kísérleti lépéseket és az alábbi kérdések megválaszolását tűztük ki célul:

II.1. A *Drosophila* *Hat1* általános jellemzése és hatásának vizsgálata a Huntington-kór patogenezisében

1. *Hat1* deléciós mutáns *Drosophila melanogaster* törzset állítunk elő:

Erre a génre korábban nem állítottak elő null mutáns vonalat, ezért P-elem transzpozon remobilizációval tervezünk deléciós mutánst létrehozni funkcionális vizsgálatainkhoz.

2. Meghatározzuk a *Hat1* enzim hiszton acetilációs targetjeit.

A létrehozott *Drosophila melanogaster* *Hat1* deléciós mutáns vonalat használva western blot kísérletekben vizsgáljuk a H4 hiszton acetiláltságát.

3. Megállapítjuk, szükségesek-e a *Hat1* által létrehozott hiszton poszt-transzlációs módosítások a H4 hiszton nukleáris transzportjához.

Létrehozunk olyan kanonikus H4 hisztonéval megegyező aminosav szekvenciájú FLAG-tag-gel jelölt *His4r* transzgén expresszálo törzseket, melyekben lehetetlenné tesszük a H4K5 és K12 acetilációt. Ezekben az egyedekben lárvális nyálmirigy immunfestéssel megvizsgáljuk a variáns hisztonok sejten belüli lokalizációját.

4. Megállapítjuk a *Hat1* hiszton acetiltranszferáz génexpresszióra gyakorolt hatását.

A létrehozott deléciós mutánsban teszteljük, hogy van-e az enzimnek hatása a kromatin szerveződésre és génexpresszióra. Ehhez pozíció effektus variegációs tesztet és transzkriptomikai analízist végzünk.

5. Meghatározzuk a *Hat1* hiányának hatását az egyedek egyes fenotípusaira.

Jellemezzük a *Hat1* deléciós mutáns vonalnak az életképességre, élettartamra és fertilitásra gyakorolt hatását.

6. Megvizsgáljuk a *Hat1* teljes vagy részleges hiányának hatását egyes stressz körülmények között.

Megvizsgáljuk a Hat1 hiányának a hőstressz és proteopáthiás stressz válaszra gyakorolt hatását. Ez utóbbi során a Huntington-kór *Drosophila* modelljében kívánjuk tesztelni a Hat1 csökkent szintjének a hatását életképesség, élettartam és a retinális neurodegeneráció vizsgálatával.

II.2. His4r variáns hiszton fehérjék acetilációs módosításainak hatása a Huntington-kór patomechanizmusára

1. Különböző pozíciókban acetilációt mimikáló His4r variáns hisztont hordozó vektorkonstrukciókat hozunk létre.

Site Directed Mutagenézissel olyan konstrukciókat hozunk létre, amelyekben a *His4r* gén 5-ös, 8-as, 12-es vagy 16-os pozíciójú lizinjét glutaminra (acetilációt mimikál) vagy arginira (acetilálatlan/módosítatlan állapotot mimikál) cseréljük. Továbbá létrehozunk kontrollként egy módosítatlan *His4r* gént hordozó konstrukciót is. A transzgéneket a követhetőség érdekében egy C-terminális FLAG-tag jelöléssel látjuk el.

2. Különböző pozíciókban acetilációt mimikáló His4r variáns hiszton fehérjét expresszáló transzgenikus *Drosophila* törzseket hozunk létre és azokat többrétűen validáljuk.

A módosított *His4r* génszekvenciákat pTWF-attB vektorba klónozva *Drosophila* embriókba injektáltatjuk, melyekből transzgenikus vonalakat állítunk elő. Ellenőrizzük a szubsztitúciók jelenlétét a transzgének visszaizolálásával és szekvenáltatásával. A transzgének RNS és fehérje expresszióját ellenőrizzük qPCR-al és western blot-tal. A transzgének sejten belüli lokalizációját lárvális nyálmirigy immunfestéssel határozzuk meg.

3. Megállapítjuk, hogy a His4r variáns hiszton fehérje különböző acetilációs állapotait mimikáló transzgének expressziója hatással van-e az életképességre és a neuronális pusztulásra.

Megvizsgáljuk a transzgének *elav-GAL4* driver indukálta neuronális expressziójának hatását az egyedek fenotípusára. Ezt az állatok kikelésének és retinális neurodegenerációjának tesztelésével tervezzük vizsgálni.

4. Megvizsgáljuk, hogy a His4r variáns hiszton fehérje különböző acetilációs állapotait mimikáló transzgének expressziója milyen hatással van a Huntington-kór *Drosophila* modelljében.

Vizsgálni kívánjuk a mutáns Huntingtint expresszáló muslicák életképességét, élettartamát, retinális neuron pusztulásuk mértékét és motoros képességeiket.

III. Anyagok és módszerek

III.1. *Drosophila* fenntartás, keresztezések és fenotípus vizsgálatok

III.1.1. Felhasznált törzsek

A kísérleteink során használt törzsek közül a bloomingtoni törzsközpontból (Bloomington Drosophila Stock Center, Bloomington, IN, USA) származnak a következők: $y^1 w^{67c23}; P\{EPgy2\}Hat1^{EY21697}$, w ; $Dr \Delta 2-3/TM3 \Delta 2-3$, w^{1118} , w^{m4h} , w ; $da-GAL4$, $w P\{GawB\}elavC155$, w ; $TM6 Sb/TM3 Ubx$. A w ; $UAS-Httex1p-Q120$ transzgenikus törzs J. Lawrence Marsh (University of California, Irvine, CA, USA), a $y w M\{eGFP.vas-int.Dm\}ZH-2A$; +; $M\{RFP.attP\}ZH-86Fb$; + (röviden: $\Phi X86Fb$) transzgén dokkoló helyet tartalmazó törzs Konrad Basler (University of Zurich, Svájc) laboratóriumából származik.

A törzsek fenntartásához és a keresztezésekhez standard *Drosophila* táptalajt használtunk (3% száraz élesztő, 4% kukoricadara, 2% búzaliszt, 9% glükóz, 0,7% agar és 0,15% Tegosept). A petéztetéshez használt kísérletek során málnaszörppel kiegészített agar táplemezeket használtunk (5 g agar 150 ml H₂O-ban feloldva, kiegészítve 50 ml málnaszörppel és aktív szénnel).

III.1.2. *Hat1* deléció létrehozása transzpozon remobilizálással

A deléció létrehozásához a P-elemet hordozó $y^1 w^{67c23}; P\{EPgy2\}Hat1^{EY21697}$ hímeket kereszteztük w ; $Dr \Delta 2-3/TM3 \Delta 2-3$ nőstényekkel, melyek utódai közül a w ; $P\{EPgy2\}Hat1^{EY21697}/TM3 Sb \Delta 2-3$ genotípusú, úgynevezett jump-starter hímeket w ; +; $TM6 Sb/TM3 Ubx$ genotípusú nőstényekhez kereszteztük. Az utódok közül a transzpozonon található *mini-white* markergént elvesztő, fehér szemű w ; $Hat1^{rev}/TM6 Sb$ revertáns hím egyedeket w ; +; $TM6 Sb/TM3 Ubx$ nőstényekhez kereszteztük vissza egyedenként. A jelölt egyedeket PCR reakcióval teszteltük tovább (részletesen kifejtve a molekuláris módszereknél). A PCR eredmények alapján a w ; $Hat1^{\Delta 57}$ deléciós és w ; $Hat1^{REV16}$ precíz revertáns vonalat választottuk ki, melyek esetében a *Hat1* gén szekvenciáját kapilláris szekvenálással (Delta Bio 2000 Kft) is ellenőriztük.

III.1.3 *Hat1* mutánsok életképességének, élettartamának és fekunditásának vizsgálata

Az életképesség vizsgálatához a $Hat1^{\Delta 57}$ deléciós és $Hat1^{REV16}$ precíz revertáns egyedeket $\Phi X86Fb$ törzshöz kereszteztük, a heterozigóta hím utódokat visszakereszteltük a homozigóta *Hat1* deléciós vagy revertáns nőstényekhez. Mindkét genotípus esetén minimum 10 db keresztezésből kikelő homo- illetve heterozigóta utódok genotípusonkénti számát jegyeztük fel szemszínük alapján 5 napon keresztül. Az utódok összes egyedszáma mindkét keresztezés típus esetén meghaladta az 1400-at.

Az élethossz vizsgálatokhoz a *Hat1^{Δ57}* és a *Hat1^{REV16}* homoizógóta egyedeket használtunk. 20 db állatot helyeztünk egy-egy fiolába és 25 °C-on tartva heti 2-3 alkalommal friss fiolákba ráztuk őket. Az elpusztult egyedek számát naponta feljegyeztük. Mindkét genotípus esetén a nőstényeket és a hímeket is vizsgáltuk. Mind a *Hat1^{Δ57}*, mind a *Hat1^{REV16}* törzs esetén, nőstényekből és hímekből egyaránt 200-200 egyedet vizsgáltunk.

Nőstények fekunditásának vizsgálatához *da-GAL4 > Hat1^{EY21697}* túltermelő nőstényeket, valamint a *Hat1^{REV16}* precíz revertáns és *Hat1^{Δ57}* deléciós mutáns szűz nőstényeket kereszteztünk *w¹¹¹⁸* genotípusú (fehér szemű, *Hat1*-re nézve vad típusú) hímekhez. 3 napos egyedeket kereszteztünk oly módon, hogy 5 nőstény és 3 hím került egy fiolába, melyeket 5 napig naponta átráztunk és a 24 óra során lerakott petéket számoltuk. Minden genotípusú keresztezésből 10 párhuzamos került indításra, vagyis 50 db nőstény fekunditását vizsgáltuk genotípusonként.

III.1.4. Szem pigment koncentrációjának meghatározása spektrofotometriával

3-4 napon keresztül gyűjtött és 25 °C-on tartott *w^{m4h}* genotípusú szűz nőstényeket kereszteztünk frissen kelt *Hat1^{REV16}* precíz revertáns, illetve *Hat1^{Δ57}* deléciós mutáns hímekkel. Az utódokat 5 napon keresztül ugyanabban az időpontban gyűjtöttük, majd 1 hét elteltével folyékony nitrogénben fagyasztottuk. Az állatokat -80 °C-on tároltuk a kellő mennyiség összegyűjtéséig és egyszerre készítettünk belőlük mintát a fotometriás méréshez. 20 db muslica fejet homogenizáltunk 600 µl 0,1%-os ammóniaoldat és 600 µl kloroform elegyében. Ezt az elegyet centrifugáltuk 4 percig 13.000 rpm-en majd a felülúszót fotometráltuk 485 nm-es hullámhosszon. Ezt követően a mért abszorbancia értékeket hasonlítottuk össze. Minden genotípusból 10 párhuzamos mintát készítettünk, vagyis az egyes genotípusokból 200 db egyedet vizsgáltunk.

III.1.5. Cirkadián ritmus és napi aktivitás vizsgálata

A *Hat1^{REV16}* precíz revertáns és *Hat1^{Δ57}* deléciós mutáns egyedeket a vizsgálatot megelőzően és annak során is 25 °C-on 12 órás fény/sötét megvilágításban tartottuk. 7 napos hím egyedeket használtunk a vizsgálat során és genotípusonként 38 egyeden végeztük el a mérést. Az egyedeket egyesével 5 mm átmérőjű üveg fiolákba helyeztük, majd a fiolákat DAM2 *Drosophila* Activity Monitor (TriKinetics Inc) mérőeszközbe helyeztük, amelyben mozgási aktivitásukat 5 napon keresztül nyomon követtük. Ha egy állat a mérőműszerben megszakítja az infravörös sugárnyalábot, azt a DAM2 berendezés érzékeli az adatokat gyűjtő DAMSystem3 szoftver pedig egy szöveg fájlba írja. Az adatok elemzését DAMFileScan (TriKinetics Inc) és pySolo programmal végeztük ²⁸⁶.

III.1.6. Hőstressz érzékenység vizsgálata

A kísérlet során frissen kikelt *Hat1^{Δ57}* deléciós mutáns és *Hat1^{REV16}* precíz revertáns egyedeket 7 napon keresztül 25 °C-on tartottunk, majd hőstressznek tettük ki őket és a

hősokkot követő 18-20 órás 25 °C-on történő inkubáció (recovery) elteltével feljegyeztük az életben maradt egyedek számát. A 37 °C-os hőstressz vizsgálatot légtermosztátban, a 40 °C-os kísérletet vizes inkubátorban végeztük. A 37 °C-os kísérletnél a fiolák 0,5-1 cm vastagságú táptalajt és 25 egyedet tartalmaztak, a 40 °C-os tesztelésnél üres fiolákba 10-15 állatot helyeztünk. A 37 °C-os hősokk vizsgálatot 7 órán keresztül végeztük, ahol a vizsgálati időpontok az első 3 órában óránként, az azt követő 4 órában pedig fél óránként voltak, és genotípusonként 100 egyedet teszteltünk időtartamonként. A 40 °C-on végzett kísérlet 25, 30 és 35 perces időtartamokig zajlott, genotípusonként minimum 120 egyeddel időtartamonként. A fiolákat egyszerre helyeztük a légtermosztátba vagy vizes inkubátorba, és a vizsgálati időpontoknál a kellő egyedszámot tartalmazó mennyiségű fiolát vettük ki.

III.1.7. His4r transzgenikus állatok törzsbe állítása

A kodon szubsztitúciókat tartalmazó *His4r* transzgéneket hordozó vektor konstrukciókat attP-zh86Fb ϕ C31 specifikus dokkoló helyet hordozó izogenizált embriókba injektáltattuk (MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Genetikai Intézet). A kikelt adult állatokat egyedenként w^{1118} állatokhoz kereszteztük. A kikelő transzformáns utódokat a transzgénen található *mini-white* markergénre szelektáltuk. A transzformáns egyedeket $w; +; TM6 Sb/TM2 Ubx$ állatokkal kereszteztük, majd az utódokat a hordozott balanszer szerint szétválogattuk és homozigóta törzseket hoztunk létre.

III.1.8. Idegsejtekben expresszált His4r konstrukciók életképességre gyakorolt hatásának vizsgálata

A *His4r* transzgének életképességre gyakorolt hatásának teszteléséhez heterozigóta transzgenikus pontmutáns *His4r* hímeket ($w; +; His4r/TM6 Sb$) *elav-GAL4* drivert hordozó szűz nőstényekhez kereszteztünk, a kikelő utódok genotípusonkénti számát 5 napon keresztül feljegyeztük. A kikelt transzgént expresszáló utódok számát a nem expresszáló, *elav-GAL4* drivert és balanszer kromoszómát hordozó testvéreik számához hasonlítottuk. Az életképesség adatok minimum 3 db keresztezést tartalmazó fiolából származó eredmények módosításonként (minden szubsztitúció esetén), a kikelt összes egyedszám pedig minimum 200 db *His4r* transzgénenként.

III.1.9. Életképesség és élettartam vizsgálatok mHtt-t expresszáló egyedekben

A *Hat1* kísérletek során a *Hat1*^{Δ57} deléciós és a *Hat1*^{REV16} precíz revertáns hímeket *elav-GAL4/w; +; Sb/TM6 Ubx* szűz nőstényekhez kereszteztük. A *His4r* pontmutánsokkal végzett kísérletek során a *His4r* transzgenikus törzsekből származó hímeket kereszteztünk *elav-GAL4/w; +; Sb/TM6 Ubx* genotípusú szűz nőstényekhez. A *Sb* markert hordozó hím utódokat ezt követően $w; UAS-Httex1p-Q120$ szűz nőstényekhez kereszteztük. Az utódkategóriák közül a hímek nem expresszáló (*elav-GAL4* neuronális driver nélküli, „egészséges”) kontrollok, a nőstények fele expresszálja a mutáns Huntingtin fehérjét, de nem

hordozza a vizsgált genetikai elemeket („beteg” kontroll egyedek), míg a másik fele expresszálja a mutáns Huntingtin fehérjét és hordozza vagy a *Hat1*^{Δ57}, vagy a *Hat1*^{REV16} allélt, vagy a megfelelő *His4r* transzgént.

Az egyedek életképességének teszteléséhez a kikelő utódok genotípusonkénti számát 5 napon keresztül jegyeztük fel. A *Hat1* kísérletek során összesen minimum 38 db keresztezést tartalmazó fiola volt vizsgálva allélenként (*Hat1*^{Δ57} és *Hat1*^{REV16}), ahol a 4 utódkategória összes egyedszáma minimum 1300 db volt. A *His4r* transzgenikus törzsekkel végzett kísérletek esetén az életképesség adatok minimum 12 db keresztezést tartalmazó fiolából származó eredmények módosításonként (minden szubsztitúció esetén), a kikelt összes egyedszám pedig minimum 430 db transzgenenként.

Az élethossz vizsgálatokhoz 10-35 állatot helyeztünk egy-egy fiolába és 25 °C-on tartva heti 2-3 alkalommal friss fiolákba ráztuk őket. Az elpusztult egyedek számát naponta feljegyeztük. A *Hat1*^{Δ57} esetén az élethossz vizsgálatához használt összes egyedszám meghaladta az 1000 egyedet (mHtt expresszáló kategóriák esetén minimum 110 egyed), a *Hat1*^{REV16} allél esetén pedig meghaladta a 400 egyedet (mHtt expresszáló kategóriák esetén minimum 30). A *His4r* élettartam vizsgálatok során az életképes kategóriák esetén az összes egyedszám minimum 490 egyed volt szubsztitúciónként (mHtt expresszáló kategóriák esetén minimum 20 db, kivétel K5R – 2db, K8R – 10 db).

III.1.10. Neurodegeneráció vizsgálata pseudopupil assay-el

A neurodegeneráció mértékének vizsgálatára úgynevezett pseudopupil módszert alkalmaztunk. Frissen dekapitált állatok fejét átlátszó körömlakk segítségével tárgylemezre rögzítettük, majd immerziós olajjal lefedtük, és az összetett szemeket Nikon Eclipse 80i mikroszkóppal 50X nagyítású immerziós lencsével vizsgáltuk. Az összetett szemet felépítő ommatídiumokban megfigyelhető rhombdomerek ommatídiumonkénti számát jegyeztük fel a vizsgálat során. A kísérletet genotípusonként minimum 10 egyeden hajtottuk végre és egyedenként minimum 20 ommatídiumot vizsgáltunk (kivétel: az *elav-GAL4/w; HttQ120/+; His4r/+* genotípusú egyedek esetén a 2 napos vizsgálat során 4 db K8R, a 4 napos vizsgálat során 7 db K8R muslicát teszteltünk).

III.2. Molekuláris biológiai módszerek

III.2.1. Hat1 mutációk azonosítása PCR-rel

Azokhoz a PCR reakciókhoz, amelyeket a *Hat1* deléciók gélelektroforézissel történő tesztelése céljából készítettünk, egyedi muslicákból preparáltunk DNS-t Greg Gloor és William Engels (Dept. of Genetics, Univ. of Wisconsin, Madison, USA) protokollja alapján a következő módon: egy egyedet homogenizáltunk 50 µl úgynevezett „Squashing Buffer”-ben (10 mM Tris-HCl pH 8,2, 1 mM EDTA, 25 mM NaCl, 200 µg/ml Proteináz K) és 37 °C-on hőkezeltük egy órán keresztül, majd 85 °C-on inkubáltuk további 15 percig a proteináz

inaktiválásához. A kapilláris szekvenáláshoz készített PCR reakciókhoz a genomi DNS kivonását E. Jay Rehm (Berkeley Drosophila Genome Project) protokollja (Quick Fly Genomic DNA Prep.) szerint végeztük a következőképpen: 15 egyedet homogenizálunk 200 µl „Buffer A”-ben (100 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0,5% SDS) és hőkezeltük 65 °C-on 30 percig. Ezt követően 400 µl „LiCl/KAc Solution”-t (5 M KAc : 6 M LiCl 1:2,5 rész arányban) adtunk hozzá és jégen inkubáltuk 10 percig. Centrifugáltuk 15 percig és 500 µl felülúszóhoz 600 µl izopropanolt mértünk, majd újra centrifugáltuk az elegyet 15 percig. A felülúszó eltávolítása után a csapadékot mostuk 70%-os etanollal, majd száradás után 75 µl TE pufferben oldottuk vissza. A PCR reakciókat olyan primerekkel végeztük, amelyek alkalmasak azon deléciók detektálására, amelyek nem érintik a szomszédos géneket. A primerek szekvenciái a következők voltak: Hat1.F: ACCAGAGCGAGATGTGTAC, Hat1.R: AGAACCTACGAGGCCCTCAA. A PCR-t genomi DNS templáton Dream Taq DNS polimeráz (Thermo Fisher Scientific, TFS) felhasználásával a gyártó utasításai szerint végeztük. A PCR program a következő lépésekből állt: 1. 95 °C 3 perc; 2. 95 °C 30 mp; 3. 60 °C 30 mp; 4. 72 °C 2 perc 30 mp; 5. 72 °C 7 perc; 6. 4 °C, a 2 – 4 lépések 35 ciklusban voltak ismételve.

III.2.2. Pontmutáns His4r transzgének és transzgenikus törzsek létrehozása

A pontmutáns transzgének létrehozásához templátként egy *His4r* génszakaszt intronjaival együtt hordozó pENTR3C vektorkonstrukciót - pENTR3C-*His4r*-GB – használtunk. Ezt a konstrukciót előzőleg úgy hoztuk létre, hogy a *His4r* gént vad típusú *w¹¹¹⁸* genotípusú egyedek genomi DNS-én elvégzett PCR reakcióval amplifikáltuk *His4r.gF* (GGTACCGCACACACACATGGATTAAG) és *His4r.gR* (GGTACCGGGAGAGCTAAATTTGCAG) primerekkel Q5 High-Fidelity DNS polimerázt (New England Biolabs, NEB) használva a gyártó protokollja szerint. Ezt követően a génszakaszt pJET1.2 vektorba klónoztuk CloneJET PCR cloning kit (TFS) alkalmazásával a gyártó javaslata szerint. A *His4r* gén start kodontól a stop kodon előtti kodonig terjedő szakaszát PCR reakcióval amplifikáltuk a pJET1.2-*His4r* vektorról *His4r.E3C.F* (GGTACCAAAATGACTGGTCGTGGAA) és *His4r.E3C.R* (GAATTCGCACCGCCAAATCCGTA) primerekkel Q5 DNS polimeráz használatával. A szekvenciát pJET1.2 vektorba inszertáltuk vissza CloneJET PCR cloning kit-tel. Ezt a konstrukciót FastDigest KpnI és EcoRI (TFS) restrikciós enzimekkel emésztettük, majd a *His4r* fragmentet ugyan ezen enzimekkel felnyitott pENTR3C Gateway Entry vektorba ligáltuk, így előállítva a pENTR3C-*His4r*-GB konstrukciót.

A NEB Q5 irányított mutagenézishez a PCR reakciókat a gyártó javaslata szerint mértük össze, templátként a pENTR3C-*His4r*-GB konstrukciót használtuk. Az általunk használt PCR program: 1. 98 °C 30 mp; 2. 98 °C 10 mp; 3. 58 °C – K5, 60 °C – K8, 63 °C – K12, 65 °C – K16 30 mp; 4. 72 °C 2 perc; 5. 72 °C 7 perc; 6. 4 °C, a 2-4. lépés 25 ciklusban ismételve. Az alkalmazott szubsztitúciót hordozó primerek szekvenciái a következők voltak (a kis betűvel jelölt szekvencia részletek az érintett kodon tripletek, az aláhúzott szakaszok pedig reakcióban módosított nukleotidok):

<u>K5R Forward primer:</u>	TGGTCGTGGA cgc GGAGGCAAAGG
<u>K5Q Forward primer:</u>	TGGTCGTGGA cag GGAGGCAAAGG
<u>K5 Reverse primer:</u>	GTCATTTTGGTACCGGATC
<u>K8R Forward primer:</u>	AAAGGGAGGC cgc GGATTGGGAAAG
<u>K8Q Forward primer:</u>	AAAGGGAGGC cag GGATTGGGAAAG
<u>K8 Reverse primer:</u>	CCACGACCAGTCATTTTG
<u>K12R Forward primer:</u>	AGGATTGGGA cgc GGGGGCGCCAAG
<u>K12Q Forward primer:</u>	AGGATTGGGA caa GGGGGCGCCAAG
<u>K12 Reverse primer:</u>	TTGCCTCCCTTTCCACGA
<u>K16R Forward primer:</u>	GGGGCGCC cgc CGTCATCGTA
<u>K16Q Forward primer:</u>	GGGGCGCC cag CGTCATCGTA
<u>K16 Reverse primer:</u>	CCTTTCCCAATCCTTTGCC

A K5RK12R kettős szubsztitúció létrehozása úgy történt, hogy a His4r-K12R módosított pENTR plazmidon végeztünk később egy további inverz PCR reakciót a K5R primerpárral.

A PCR termékeket Agencourt AMPure XP gyöngyökkel (Beckman Coulter) tisztítottuk, majd Kináz-Ligáz-DpnI kezelésnek vetettük alá T4 polinukleotid kináz (TFS), T4 DNS ligáz (TFS) és DpnI (TFS) felhasználásával a gyártó javaslatai szerint. A Kináz-Ligáz-DpnI kezelt tisztított PCR mintákat *E. coli* DH5 α kompetens sejtekbe transzformáltuk, majd a tisztított plazmidokat EcoRI-KpnI restrikciós endonukleáz kezeléssel teszteltük és Sanger szekvenálással (DeltaGene, Szeged) ellenőriztük. A megfelelő klónokat pENTR3C vektorból Gateway LR Clonase II Enzyme Mixel (TFS) pTWF-attB vektorba klónoztuk (módosított pTWF Gateway destination vektor, amely tartalmazza a ϕ C31 attB régiót az NsiI restrikciós helyre klónozva). A konstrukciókat DH5 α sejtekbe transzformáltuk, majd a kolóniákból izolált plazmidokból EcoRI-KpnI restrikciós endonukleázzal végzett tesztelés alapján megfelelőnek bizonyultakból NucleoBond Xtra Midi kittel (Macherey-Nagel) embrió injektáláshoz megfelelő tisztaságú preparátumot készítettünk. A plazmidokat attP-zh86Fb III. kromoszómás inszerció dokkoló helyet hordozó embriókba injektáltattuk (MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Genetikai Intézet).

III.2.3. Az integrált pontmutáns His4r transzgének szekvencia ellenőrzése

A transzgenikus törzsekből genomi DNS-t izoláltunk E. Jay Rehm (Berkeley Drosophila Genome Project) protokollja (Quick Fly Genomic DNA Prep.) szerint, majd a mintákon PCR reakciót végeztünk Dream Taq polimerázzal (TFS) a gyártó javaslata szerint a következő primerekkel: pTWF-SeqF (GCAACTACTGAAATCTGCCAAGAAG), pTWF-SeqR (AAGGTTTCCTTCACAAAGATCCTCT). Az általunk használt PCR program: 1. 95 °C 3 perc; 2. 95 °C 30 mp; 3. 66 °C 30 mp; 4. 72 °C 75 mp; 5. 72 °C 5 perc, 6. 4 °C, a 2-4. lépés

35 ciklusban ismételve. A PCR mintákat ellenőrző agaróz gélelektroforézist követően Sanger szekvenálással (DeltaGene, Szeged) ellenőriztük. Mindegyik szekvencia hordozta az általunk készített szubsztitúciókat.

III.2.4. mRNS szint vizsgálata RT-qPCR-rel

RNS expressziós szint vizsgálatot végeztünk 3 napos *elav-GAL4* neuronális driverrel indukált *His4r* transzgént hordozó egyedeken, valamint *Hat1* expressziós vizsgálatot végeztünk 1 napos, 3 napos, 1 hetes, 2 hetes és 6 hetes w^{1118} vad típusú egyedeken. Az RNS izoláláshoz mintánként 20 db adult muslica fejet homogenizáltunk 100 µl Trizol reagensben (Invitrogen), az RNS-t a gyártó protokollja szerint tisztítottuk, majd 20 µl DEPC kezelt vízben oldottuk fel. Ezt követően 500 ng RNS mintát DNaseI enzimmel (TFS) kezeltünk a gyártói javaslat szerint. A 11 µl végtérfogató DNaseI kezelt RNS mintákból 9,6 µl-t felhasználva TaqMan Reverse Transcription Reagents (TFS) és random hexamer primerek alkalmazásával a gyártói protokollt követve egyesszálú cDNS-t állítottunk elő. A cDNS mintákat kvantitatív real-time PCR (qPCR) reakciókban vizsgáltuk PikoReal RT-PCR berendezésben SensiFAST SYBR® No-ROX Kit (Bioline) alkalmazásával a gyártói protokoll szerint. A cDNS templátokból a mérés során 5x, 25x, 125x és 625x hígítású mintákat használtunk kalibrációként. Az alkalmazott PCR program a következő volt: 1. polimeráz aktiváció: 95 °C 7 perc; 2. denaturáció: 95 °C 15 mp; 3. annealing – elongáció 60 °C 60 mp; a 2-3 lépés 40 ciklusban ismétlődött. Az értékelés során tubulin génexpresszióra normalizáltuk a kapott értékeket.

Alkalmazott expressziós primerek:

Hat1 qF: GTGGTGTTACTTCTTGAGCTACG

Hat1 qR: GGAGCCAAGCCGAGTTTCT

His4r qF: TCGCGGTGTGCTAAAGGTATTC

pTWF-attB-qR: AAGGTTTCCTTCACAAAGATCCTCT

tubulin qF: TGTCGCGTGTGAAACACTTC

tubulin qR: AGCAGGCGTTTCCAATCTG

III.2.5. RNS szekvenálás

RNS izolálás: Szinkronizált 6-12 órás w^{1118} és $w^{1118}; + Hat1^{457}$ embriókból totál RNS mintát készítettünk Qiagen RNeasy Plus Mini kit-tel. A minták tisztaságát NanoDrop ND-1000 spektrofotométerrel, koncentrációját Qubit RNA HS Assay Kit (TFS) alkalmazásával, integritását pedig kapilláris gélelektroforézis segítségével vizsgáltuk Agilent RNA 6000 nano kitet használva Bioanalyzer 2100 (Agilent) berendezéssel.

Szekvenáló könyvtár készítés és szekvenálás: A polyA szelektált RNS szekvenáló könyvtárat 1 µg totál RNS-ből TruSeq RNA sample prep kit v2 (Illumina) kittel, a gyártó által biztosított „low sample protocol” alkalmazásával készítettük. A szekvenáló könyvtár

validálását és átlagos fragmenthosszúságának ellenőrzését kapilláris gélelektroforézissel, Bioanalyzer 2100 berendezéssel és Agilent High Sensitivity DNA kit használatával végeztük. Az átlagos fragment hosszúságot és kvantitatív PCR-on alapuló koncentráció mérést (NEBNext Library Quant Kit for Illumina, NEB) használtuk fel a könyvtár koncentrációk kiszámításához. A denaturált könyvtárak 15 pM-os koncentrációra hígítása után a szekvenálást Illumina MiSeq szekvenátorral, MiSeq Reagent Kit V3-150 használatával, 2x75 bp paired-end szekvencia leolvasások meghatározásával végeztük.

A kapott eredmények értékelése: Az elsődleges adatelemzést MiSeq Control Software v2.6 / Real-Time Analysis software v1.18.54 alkalmazásával hajtottuk végre. A Fastq fájlok minőségi vágását Trimmomatic v0.33 szoftverrel paired-end módban végeztük, majd a szekvenciákat TopHat2²⁸⁷ programmal a dmr6.13 *Drosophila melanogaster* referencia genomhoz illesztettük. Az illesztési fájlok indexelését, rendezését és deduplikálását SAMtools szoftverrel tettük meg, majd az génexpressziós analízist Cufflinks programmal²⁸⁷ végeztük a FlyBase dmr6.13.gtf transzkript annotációját felhasználva. A génontológiai dúsulás elemzést PANTHER Overrepresentation Test segítségével hajtottuk végre (teszt típus: Fisher egzakt teszt FDR korrekcióval), GO génontológiai adatbázis felhasználásával a teljes *Drosophila* génkészletet használtuk referencia listaként.

III.2.6. Western blot analízis

Fehérjeminták készítése embriókból a Hat1-el kapcsolatos kísérletek során: A legyűjtött embriókat szonikációs pufferben (50 mM Tris-HCl pH7,9, 2 mM EDTA, 50 mM NaCl, 0,5 mM DTT, 1x PIC, 10 mM Na-butirát) homogenizáltuk, 1 mg embrióhoz 7,88 µl puffert használtunk. A mintákat szonikáltuk 4 cikluson át (30 mp szonikálás, 30 mp szünet) magas fokozaton Diagenode Bioruptor szonikátorral. Ezt követően a mintákhoz azonos térfogatnyi 2x SDS-loading puffert adtunk és 95 °C-on 10 percig hőkezeltük őket.

Fehérjeminták készítése adult fejekből a His4r-el kapcsolatos kísérletek során: A gyűjtött állatokat lefagyasztottuk folyékony nitrogénben és vortexeltük. A fejeket összegyűjtöttük és homogenizáltuk szonikációs pufferben, 20 fejhez 25 µl puffert használtunk. A mintákhoz azonos térfogatnyi 2x SDS-loading puffert adtunk és 95 °C-on 5 percig hőkezeltük őket, majd centrifugáltuk 13.000 rpm-en 10 percig.

Tricin-SDS-PAGE: 10%-os akrilamid gélét készítettünk, melynek összetétele a következő: szeparáló gél: 7 ml 3x gél puffer, 7 ml 29:1 akrilamid:bis-akrilamid, 7 ml H₂O, 100 µl 10% APS, 50 µl TEMED; stacking gél: 2 ml 3x gél puffer, 1 ml 29:1 akrilamid:bis-akrilamid, 3 ml H₂O, 40 µl 10% APS, 20 µl TEMED. Az általunk használt pufferek: 3x gél puffer (3 M Tris, 1 M HCl, 0,3% SDS, pH8,45 beállítása 0,33 M HCl-el), 10x anód puffer (1 M Tris, 0,225 M HCl), 10x katód puffer (1 M Tris, 1 M Tricin, 1% SDS). Az elektroforézis során 15-30 µg fehérje mintát vittük fel átlagosan.

A blottolást nitrocellulóz membránra (GE Healthcare Life Sciences) végeztük 40 V-os feszültség alkalmazásával 2 órán keresztül 4 °C-on. A blottoláshoz használt transzfer puffer összetétele a következő: 25 mM Tris, 192 mM glicin, 0,01% SDS, 850 ml H₂O, 15% metanol. A blottolást követően a membránokat 5%-os tejporban (tejpor 1x TBST-ben feloldva – 5 mM

Tris, 15 mM NaCl, 7,4 pH, 0,05% Tween-20) blokkoltuk 4 °C-on éjszakán át vagy szobahőn minimum 1 órán keresztül.

A membránokat 1%-os tejport tartalmazó 1x TBST-ben hígított ellenanyagokkal inkubáltuk. Az elsődleges ellenanyagok a következők voltak: anti-FLAG (M2 Cell Signaling Tech, 2368, 1:5000), anti-H3 (Abcam, ab1791, 1:4000), anti-H4K5ac (Abcam, ab61236, 1:500), anti-H4K8ac (Abcam, ab15823, 1:1000), anti-H4K12ac (Abcam, ab61238, 1:1000), anti-H3K18ac (Abcam, ab1191, 1:500), anti-H3K23ac (Abcam, ab47813, 1:1000). Ezeket 1-2 órán keresztül szobahőn vagy 4 °C-on éjszakán át alkalmaztuk. Az elsődleges ellenanyaggal történő inkubáció után 1x TBST-ben mostuk a membránt 4-szer 10 percig, majd ráhelyeztük a másodlagos ellenanyagot. Ezek a következők voltak: GAR-HRP (Dako) 1:4000-10000, RAM-HRP (Dako) 1:5000. A másodlagos ellenanyaggal 1-1,5 órát inkubáltuk a membránt szobahőn, majd ismét mostuk 4-szer 10 percig 1x TBST-ben.

Az előhívást MILLIPORE ImmobilonTM Western HRP szubsztrát használatával végeztük a gyártó utasítása szerint. A híváshoz C-DiGit Blot Scanner-t használtunk és a jelintenzitás értékeit a C-DiGit programmal határoztuk meg.

A jelintenzitás értékek összesítése során először a technikai replikátumoknak vettük az átlagát, majd az egyes biológiai replikátumokat átlagoltuk. A diagramokon ezek szórása látható feltüntetve. A H4K5ac vizsgálata során minimum 4 biológiai replikátumot vizsgáltunk genotípusonként, az estek többségében 2 technikai ismétléssel (1-3 technikai replikátum). A H4K12ac esetén genotípusonként 3 biológiai replikátumot vizsgáltunk átlagosan 2 technikai ismétléssel (1-3 technikai replikátum). A H4K8ac vizsgálatának eredményei 4 biológiai replikátum egy kísérleti értékeiből származnak. A H3K18 és H3K23ac mérése genotípusonként 3 biológiai replikátumon történt 4 technikai ismétléssel. Az egyes western blot kísérletek során használt embriók mennyisége 0,6-0,9 mg volt mintánként. A His4r fehérje expressziós vizsgálatok során 3 biológiai replikátumot vizsgáltunk genotípusonként 2 technikai ismétléssel. A western blot kísérletekben egyszerre felvitt minta mennyisége 4 adult muslica fejnek felel meg.

III.2.7. Lárvális nyálmirigyek immunfestése

Vándorló L3-as stádiumú lárvák nyálmirigjét boncoltuk ki fixáló oldatban (4% formaldehid PBS-ben). A kiboncolt szöveteket áthelyeztük több lyukú plate-be és további 20 percig fixáltuk. A mintákat 3-szor 10 percig mostuk 400 µl PBS-ben, majd 1 órán át permeabilizáltuk 400 µl 0,5% Triton X-100-at tartalmazó PBS-ben. 45 percig blokkoltunk 400 µl 5% BSA-t tartalmazó PBST-ben (0,1% TWEEN-20 PBS-ben), majd 300 µl 1% BSA-t tartalmazó PBST-ben 1:750 arányban hígított α-FLAG M2 (F3165, Sigma) elsődleges ellenanyagot mértünk a mintákra és éjszakán át inkubáltuk őket 4 °C-on himbán. Ezt követően 6-szor 10 percig mostuk a szöveteket 600 µl PBST-ben, majd ráértünk 300 µl 1% BSA-t tartalmazó PBST-ben 1:1500 arányban hígított GAM-Alexa Fluor488 másodlagos ellenanyagot (R37120, TFS), amellyel 1,5 órán át inkubáltuk szobahőn himbán (letakarva). Ezt követően ismét mostuk 4-szer 10 percig 600 µl PBST-ben, majd DAPI festéshez ráértünk 600 µl, 2500x hígítású PBST-ben oldott DAPI-t 10 percre, amit 10 perc mosás

követett 600 µl PBST-ben. 1 órát inkubáltuk a mintákat himbán szobahőn 600 µl 30% glicerint tartalmazó PBS-ben, majd 87%-os glicerinen preparáltuk őket. Fluoromontban helyeztük tárgylemezre a szöveteket, melyekről a fotókat Olympus BX51 és Olympus FV10i Confocal Laser Scanning mikroszkóppal készítettük.

IV. Eredmények

IV.1. A *Drosophila* *Hat1* általános jellemzése és funkciójának vizsgálata a Huntington-kór patogenezisében

*Drosophila melanogaster*ben a *CG2051*, vagy *Hat1*, egy citoplazmatikus hiszton acetiltranszferázt kódoló génként ismert. A harmadik kromoszómán a 83C4 citológiai pozícióban található, mérete 2048 bp. Humán ortológja a *Hat1*. Muslicában ez az egyetlen eddig azonosított H4 specifikus katalitikus aktivitással rendelkező citoplazmatikus hiszton acetiltranszferáz enzim.

IV.1.1. *Hat1* deléciós mutáns előállítása

A *Hat1* gén funkciójának vizsgálatához a *P{EPgy2}Hat1^{EY21697}* transzpozon inszerciós *Drosophila* törzsből kiindulva P-elem remobilizálással *Hat1* deléciós mutánt állítottunk elő. A *P{EPgy2}Hat1^{EY21697}* inszerció a *Hat1* első intronjában, a 3R:5.789.135 genomi pozícióban lokalizálódik. A P-elem inszerciós törzs törzs mini-white (*w⁺mC*) és mini-yellow (*y⁺mDint2*) látható markereket hordoz, továbbá tartalmaz egy Scer/UAS kötőhelyet Scer/GAL4 transzkripciós regulátor általi indukálható expressziót biztosítva. A törzs életképes és fertilis. A P-elem remobilizálást $\Delta 2-3$ transzpozáz forrással végeztük és a transzpozon által hordozott domináns *mini-white* marker elvesztésére szelektáltunk a revertáns vonalak azonosításához. A revertáns vonalakat ezt követően PCR-rel teszteltük. A *Hat1*-et érintő deléciók azonosításához olyan primereket terveztünk, amelyek közrefogják a *Hat1* kódoló szekvenciáját, de a *Hat1*-et határoló géneket nem érintik (a primerek az Anyagok és módszerek fejezetben találhatóak). 226 revertáns vonalat teszteltünk, melyek közül 5 hordozott deléciót. Ezek közül az 57-es számú (*Hat1^{Δ57}*) bizonyult a legnagyobb méretűnek (3. ábra).

A *Hat1^{Δ57}* törzs szekvenálása során kiderült, hogy a deléció a kódoló régió mintegy 80%-át érinti, benne a katalitikus aktivitásért felelős acetiltranszferáz domént is. A 2048 bp-os génből 1409 bp deletálódott, ez a 3R:5.787.709 – 5.789.127 genomi régiót jelenti. A kísérleteink kontrolljaként kiválasztottunk egy precíz revertáns törzset is (amelyben a P-elem kiugrása nem idézett elő deléciót), melynek szekvenciáját kapilláris szekvenálással szintén ellenőriztük. A *Hat1^{REV16}* revertánsban a P-elem kivágódása során nem távolított el génszakaszt a *Hat1* génből, azonban mintegy 20 bázispár hátra maradt a transzpozonból, ami feltehetőleg nem okoz zavart a gén expressziójában és funkciójában. (A deléciós mutáns esetén nem találtunk hátra hagyott P-elem darabot.)

3. ábra. Delécio létrehozása a *Hat1* génben P-elem remobilizációval. (A). w^{1118} (*Hat1*-re nézve vad-típusú) törzsből, egy a P-elem remobilizációból származó precíz revertánsból (*Hat1*^{REV174}), *Hat1*^{Δ57} deléciós mutánsból, valamint a *Hat1*^{EY21697} inszerciót hordozó törzsből izolált genomi DNS mintán végzett *Hat1* specifikus PCR reakciók termékei láthatóak. A *P{EPgy2}Hat1*^{EY21697} elemet hordozó törzsön végzett PCR során nem keletkezett termék a transzpozon túl nagy mérete miatt, míg a *Hat1*^{Δ57} deléciós mutánson végzett PCR terméke jól láthatóan mintegy 1500 bp-al rövidebb a w^{1118} vad típusú, illetve a *Hat1*^{REV174} precíz revertáns egyedeken végzett PCR reakciók termékeinél. (B) A *Hat1*^{Δ57} delécio genomi kiterjedését (szürke kiemelés) mutató sematikus ábra.

IV.1.2. A *Hat1* H4K5 és K12 specifikus acetiltranszferáz aktivitással rendelkezik

Annak megállapítására, hogy a *Drosophila* Hat1 humán ortológjához hasonló funkciót tölt-e be a hiszton fehérjék acetilálásában, western blot kísérleteket végeztünk. A kísérlethez *da-GAL4 > Hat1*^{EY21697} – Hat1 túltermelő, *Hat1*^{Δ57} homozigóta, valamint kontrollként w^{1118} 0-6 órás embriókból készítettünk fehérjemintát, ugyanis génexpressziós adatok alapján az egyedfejlődés során ekkor a legerősebb a *Hat1* gén expressziója²⁸⁸.

A western blot kísérletekhez anti-H4K5ac és anti-H4K12ac elsődleges ellenanyagot használtunk, mivel ezek az acetilációs módosítások köthetőek elsődlegesen a Hat1 hiszton acetiltranszferáz ortológokhoz. Bemérési kontrollként anti-H3 ellenanyagot használtunk. A western blot kísérletek jelintenzitásainak értékeit kvatifikáltuk és normalizáltuk a H3 loading kontroll szintjére. A kísérlet során H4K5ac és H4K12ac jel volt detektálható a vad típusú

w^{1118} és az *Hat1* túltermelő mintákban, viszont a *Hat1*^{Δ57} mutásban nem, vagy csak nagyon kis mértékben. A deléciós mutánsban mért értékek mindkét esetben szignifikánsan kevesebbnek bizonyultak a w^{1118} kontrollban jelen lévőnél (H4K5ac t-próba: $P=2,88 \times 10^{-5}$, H4K12ac t-próba: $P=7,265 \times 10^{-3}$) (4-5. ábra).

4. ábra. A *Hat1* H4K5 és H4K12 acetilációs aktivitással rendelkezik. Reprezentatív western blot képek w^{1118} , *Hat1*^{Δ57} és *Hat1* túltermelő (overexpressziós - OE) 0-6 órás embrió mintákról. A *Hat1* deléció hatására a H4 K5 és K12 acetiláció csaknem eltűnik a *Drosophila* embriókból.

5. ábra. A *Hat1* felelős az embrionális H4K5 és H4K12 acetiláció döntő részéért. Western blot kísérlet w^{1118} , *Hat1*^{Δ57} és *Hat1* túltermelő (overexpressziós - OE) 0-6 órás embrió mintákon. H4K5ac (A) és H4K12ac (B) jelintenzitás értékek összesítésének ábrázolása látható H3 értékre normalizálva. A diagramokon hibasávként szórás látható feltüntetve. A statisztikai értékelés Student t-próbával történt, ahol a **: P-érték < 0,01,

***: P-érték < 0,001. A western blot kísérletek eredményeinek összesítése alapján a *Hat1* deléció hatására az embrionálisan jelen lévő H4K5 és H4K12 acetiláció szignifikánsan kevebb a vad típusban található nál, a *Hat1* túltermelése viszont nem eredményez megemelkedett acetilációs szintet.

Annak megállapítására, hogy a *Hat1* ortológokra jellemző H4 acetilációs aktivitáson kívül a *Hat1* más pozícióban is acetilálja-e a H4-es hiszton fehérjét, megvizsgáltuk a H4K8 acetilációs szintet is *Hat1*^{Δ57} és *w*¹¹¹⁸ vad típusú egyedeken. A western blot kísérlet a várakozásainknak megfelelő eredményt adott, a H4K8 acetiláció mértékét a *Hat1* deléció nem befolyásolja, vagyis ilyen katalitikus aktivitással nem rendelkezik (6. ábra).

6. ábra. A *Hat1* mutánsban nem változik a H4K8 acetiláció mértéke. (A) Reprezentatív western blot kép *w*¹¹¹⁸ és *Hat1*^{Δ57} 0-6 órás embrió mintákról. (B) A western blot H4K8ac jelintenzitás értékek összesítésének ábrázolása. A diagramon hibasávként szórás látható feltüntetve. A *Hat1* deléció hatására a H4K8ac szint nem változott szignifikáns mértékben a korai embriókban, tehát a *Hat1* katalitikus aktivitása specifikusnak tűnik a H4K5 és H4K12 pozíciókra.

Az eredmények alapján elmondható, hogy a *Hat1* felelős a H4K5 és H4K12 acetiláció döntő részéért *Drosophila* embrióban. Katalitikus aktivitása specifikusnak tűnik erre a két pozícióra, ugyanis a H4K8 acetiláció szintjében a *Hat1*^{Δ57} embriókban nem történt változás a vad típusú embriókhoz képest.

Megvizsgáltuk a *Hat1* deléció hatását a H3 hisztonon megjelenő acetilációra is, ugyanis irodalmi adatok¹⁷⁹ alapján egér embrionális fibroblaszt sejtekben a *Hat1* hiánya befolyásolta

a H3 hiszton acetiláltsági állapotát is. Kísérletünk során a H3K18 és H3K23 pozíciók acetilációját teszteltük (7-8. ábra).

7. ábra. A *Hat1* deléción csökken a H3K18 acetilációhoz vezet. Reprezentatív western blot képek *w¹¹¹⁸* és *Hat1^{Δ57}* 0-6 órás embrió mintákról. A *Hat1* deléciós embriók csökkent H3K18ac szintet mutatnak a *w¹¹¹⁸* vad típusú embriókhoz képest, míg a H3K23ac szint változatlan marad.

8. ábra. A *Hat1* deléción hatással van a H3 hisztonon megjelenő acetilációra. Western blot kísérlet *w¹¹¹⁸* és *Hat1^{Δ57}* 0-6 órás embrió mintákon. A H3K18ac (A) és H3K23ac (B) jelintenzitás értékek összesítésének ábrázolása látható H3 értékre normalizálva. A diagramokon hibasávként szórás látható feltüntetve. A statisztikai értékelés Student t-próbával történt, ahol a *: P-érték < 0,05. A H3K18ac szignifikánsan lecsökken a *Hat1* deléciós embriókban a vad típusú *w¹¹¹⁸* kontrollhoz képest, míg a H3K23ac szintben nem található eltérés.

A H3K23 acetilációs szintben nem volt szignifikáns különbség, azonban a H3K18 acetiláció szintje szignifikáns csökkenést mutatott deléciós mutáns embriókban a vad típushoz képest (t-próba: $P=1,61 \times 10^{-2}$).

IV.1.3. K5 és K12 acetiláció hiányának hatása a His4r sejtmagi lokalizációjára

Az újonnan szintetizálódott H4 hiszton fehérjék a citoplazmában acetilálódnak az N-terminális 5-ös és 12-es lizinükön, amely módosítások feltételezhetően a sejtmagi transzportban is szerepet játszhatnak. Tekintve, hogy a *Hat1* delécia hatására szinte eltűnik a H4 K5 és K12 acetiláció a korai embriókból, viszont mégsem letális, valószínűsíthető, hogy a H4-es hiszton ezen módosítások hiányában is képes bejutni a sejtmagba.

Ennek igazolására létrehoztunk egy olyan transzgenikus törzset, amely egy indukálható FLAG-tag-gel jelölt *His4r* konstrukciót hordoz (mivel a *His4r* aminosav szekvenciája azonos a kanonikus H4 hisztonéval, ezért megkülönböztetésük a peptid tag hozzáadásával lehetséges), amely így nyomon követhető *Hat1* homozigóta deléciós háttéren. Továbbá létrehoztunk egy szintén indukálható K5R és K12R dupla módosítást hordozó *His4r* gént tartalmazó konstrukcióval ellátott transzgenikus törzset is, ahol lizin-arginin cserével lehetetlenné tettük az acetilációt ezekben az pozíciókban, tehát módosítatlan lizineket mimikáltunk a *Hat1* targetjeinek számító 5-ös és 12-es pozíciókban.

Ezt követően FLAG specifikus ellenanyaggal végzett lárvális nyálmirigy immunfestéssel vizsgáltuk az acetilálatlan *His4r* fehérjék lokalizációját egyrészt vad típusú *His4r*-t *Hat1* deléciós háttéren expresszáló (*His4r-GB Hat1^{Δ57}*), másrészt acetilálhatatlan *His4r*-t (*His4r-K5RK12R*) expresszáló lárvális nyálmirigy sejtekben, amelyeket kontrollként vad típusú *His4r*-t vad típusú háttéren expresszáló (*His4r-GB*) nyálmirigy sejtekhez hasonlítottunk. A vad típusú kontroll és a két mutáns kategória esetén egyaránt sejtmagi lokalizációt mutat a *His4r* fehérje. Tehát a H4 K5 és K12 acetilációs módosítások nem nélkülözhetetlenek a nukleáris transzporthoz (9. ábra).

9. ábra. A H4-K5K12 acetiláció nem szükséges a nukleáris importhoz. Konfokális mikroszkóppal készített fotók vad típusú *His4r* transzgént expresszáló (*hs-GAL4/+; UAS-His4r-GB/+*), homozigóta *Hat1^{Δ57}* háttéren vad típusú *His4r* transzgént kifejező (*hs-GAL4/+; UAS-His4r-GB / Hat1^{Δ57}*), valamint *His4r-K5RK12R* transzgént expresszáló (*hs-GAL4/+; UAS-His4r-K5RK12R/+*) L3-as lárvák nyálmirigyéről anti-FLAG antitest festéssel (zöld). DAPI festéssel (kék) láthatók a sejtmagok. A DAPI és FLAG festés teljesen átfed egymással, vagyis a *His4r* transzgenikus fehérjék minden genotípusban sejtmagi lokalizációt mutatnak.

IV.1.4. A *Hat1* deléció csökkent életképességet és élettartamot eredményez

A *Hat1* deléciót hordozó állatokból sikerült homozigóta törzset létrehozni, tehát a deléció homozigóta formában életképes és fertilis. Azonban tesztelni kívántuk, hogy a gén hiánya nem okoz-e csökkent életképességet.

A kérdés megválaszolásához homozigóta *Hat1^{Δ57}* állatokat kereszteztünk *φX86Fb* (a harmadik kromoszómán markerelt, a *Hat1* génre nézve vad típusú) muslicákhoz és a heterozigóta hím utódokat visszakeresztettük homozigóta deléciós nőstényekhez. A keresztezésből származó *Hat1^{Δ57}* homozigóta és heterozigóta utódok kikelési arányát hasonlítottuk össze szemszínük alapján. A kísérlet kontrolljaként ugyanezt a keresztezési

sémát elvégeztük a *Hat1^{REV16}* precíz revertáns vonallal is. A kikelési arányok százalékos megoszlását vizsgáltuk külön nőstények és hímek esetén (10. ábra).

10. ábra. A *Hat1* deléció csökkenti az életképességet. Homozigóta és heterozigóta *Hat1^{Δ57}* deléciós (A) és *Hat1^{REV16}* revertáns (B) állatok kikelési aránya. A diagramokon hibásávként szórás látható feltüntetve. A statisztikai értékelés Student t-próbával történt, ahol a ***: P-érték < 10⁻⁴. A *Hat1^{Δ57}* delécióra heterozigóta és homozigóta egyedeknél egyaránt nagyobb arányban keltek nőstény utódok, mint hímek, azonban a delécióra homozigóta utódok kikelési aránya szignifikánsan kevesebbnek bizonyult a heterozigótáknál, mind a hímek, mind a nőstények esetén. A *Hat1^{REV16}* precíz revertáns esetén a kikelési arányokban nem volt eltérés.

A kísérletekből egyértelműen kiderül, hogy a *Hat1* deléció ront az egyedek életképességén. A *Hat1^{Δ57}* delécióra homozigóta utódok kikelési aránya mind nőstények (t-próba: P = 1,593×10⁻⁶), mind hímek (t-próba: P = 1,186×10⁻⁵) esetén szignifikánsan lecsökkent a delécióra heterozigótákhoz képest, míg a *Hat1^{REV16}* precíz revertáns esetén nincs szignifikáns különbség a kikelési arányokban.

A *Hat1* deléció okozta életképességben bekövetkezett csökkenés hatására kíváncsiak voltunk, vajon az élettartamban is tapasztalható-e változás a precíz revertánshoz képest. Az élettartam vizsgálatot *Hat1^{Δ57}* és *Hat1^{REV16}* homozigóta egyedeken végeztük. Az élettartam görbék eltérései a nőstények esetén a 25, 50, 75 és 90%-os mortalitási értéknél egyaránt (P-érték: 25% - 0,0001, 50% - 0,000022, 75% - 0,0002, 90% - 0,0008), hímeknél pedig a 90%-os érték kivételével (P-érték: 25% - 5,7×10⁻⁹, 50% - 4,8×10⁻⁷, 75% - 0,0001, 90% - 0,1198)

szignifikánsnak bizonyultak (11. ábra és 1. táblázat). Eredményeink alapján tehát a *Hat1* delécio nem csak az életképességre, hanem az élettartamra is szignifikánsan negatív hatással van.

11. ábra. A *Hat1* delécio csökkent élettartamot okoz. *Hat1^{Δ57}* és *Hat1^{REV16}* egyedek élettartam görbéi százalékos értékeket feltüntetve, nőstényeket és hímeket külön-külön ábrázolva láthatóak. Az élettartam görbék lefutásában szignifikáns különbségek láthatóak a deléciós mutánsok és a revertáns kontroll között a nőstényeknél és a hímeknél egyaránt Log-Rank Teszt alapján a különbség szignifikancia értéke nőstények esetén $P = 1,5 \times 10^{-5}$, hímek esetén $P = 1,9 \times 10^{-7}$.

Összehasonlított genotípusok	P-érték 25%-os mortalitásnál	P-érték 50%-os mortalitásnál	P-érték 75%-os mortalitásnál	P-érték 90%-os mortalitásnál
<i>Hat1^{Δ57}</i> v.s. <i>Hat1^{REV16}</i> nőstény	0,0001	0,000022	0,0002	0,0008
<i>Hat1^{Δ57}</i> v.s. <i>Hat1^{REV16}</i> hím	$5,7 \times 10^{-9}$	$4,8 \times 10^{-7}$	0,0001	0,1198

1. táblázat. A *Hat1^{Δ57}* és *Hat1^{REV16}* egyedek meghatározott mortalitási arányaihoz tartozó szignifikancia értékek. A hímek és nőstények adatai külön-külön kerültek értékelésre. Piros színnel kiemelve láthatóak a szignifikáns eltérések. Az értékelés Mann Whitney U Teszttel történt.

A hímeknél a 90%-os mortalitási értéknél nem volt szignifikáns az eltérés a *Hat1*^{REV16} kontroll és a *Hat1*^{Δ57} deléciós egyedek között, azonban a többi mortalitási értéknél nagyobb mértékű és szignifikánsabb különbségeket figyelhetünk meg, mint a nőstények esetén.

IV.1.5. A *Hat1* nem szükséges a fertilitáshoz, de a túltermelése nőstényekben megnöveli a lerakott peték számát

A gén a reprodukív szervekben mutatja a legmagasabb expressziós szintet a modeENCODE szövetexpressziós adatok szerint ²⁸⁹, ezért fekunditás tesztet végeztünk az állatok termékenységeinek vizsgálatára. A kísérlet során *Hat1*^{Δ57} mutáns és *da-GAL4* > *Hat1*^{EY21697} – *Hat1* túltermelő állatokat, kontrollként pedig *Hat1*^{REV16} precíz revertáns törzset használtunk. Mind a három kategóriából szűz nőstényeket *w*¹¹¹⁸ vad típusú hímekkel kereszteztünk, majd meghatároztuk a 24 óra alatt lerakott peték számát. A 24 órás petézések eredményét átlagoltuk egy nőstényre (12. ábra). Az eredményekből az a következtetés vonható le, hogy a *Hat1* hiánya nincs hatással a fekunditásra, viszont túltermelése esetén szignifikánsan (t-próba: $P = 8,92 \times 10^{-9}$) megemelkedik a lerakott peték száma.

12. ábra. A *Hat1* túltermelése esetén megemelkedik a nőstények által rakott peték mennyisége. Fekunditás teszt a *Hat1*^{REV16}, a *Hat1*^{Δ57} és *Hat1* túltermelő (overexpresszáló - OE) nőstényeken. Az eredmények 5 nap összevont átlagából származnak a három vizsgált kategóriára és az egy nőstény által egy nap alatt lerakott peték számát ábrázolja. A diagramokon hibásávként szórás látható feltüntetve. A statisztikai értékelés Student t-próbával történt, ahol a ***: P-érték < 10⁻⁸. Míg a *Hat1* deléciónak szemmel láthatóan nem volt különösebb hatással a nőstények fekunditására, addig a túltermelése szignifikánsan növelte a lerakott peték számát.

IV.1.6. A *Hat1* gén neuronális kifejeződésének vizsgálata az öregedés során

Mivel egyes hiszton acetiltranszferázok aktivitásáról bizonyított, hogy szerepet játszanak az öregedés és a neurodegeneráció folyamatában^{290 195 52}, kíváncsiak voltunk, hogy az öregedés során változik-e a *Hat1* transzkripció aktivitása az idegsejtekben. A vizsgálathoz a *Hat1*-re nézve vad típusú *w¹¹¹⁸* muslica öregedési soron (1 napos, 3 napos, 1 hetes, 2 hetes és 6 hetes), fejből izolált RNS-ből készítettünk cDNS mintát, majd ezeken expressziós mérést végeztünk qPCR-al *Hat1* specifikus primerekkel. Az eredmények alapján elmondható, hogy közvetlenül a kikelést követően a *Hat1* transzkriptum mennyisége jelentősen megemelkedik, nagyjából a kétszeresére, majd ebben a transzkriptum mennyiségben ezt követően az öregedés első 6 hete során nem következik be szignifikáns változás (13. ábra).

13. ábra. A *Hat1* mRNS neuronális szintje egyenletes az öregedés során. *Hat1* neuronális expresszió vizsgálata RT-qPCR-al *w¹¹¹⁸* vad típusú muslica öregedési soron tubulin szintre normalizálva. A diagramokon hibasávként szórás látható feltüntetve. A *Hat1* expressziós szintje az 1. nap után megemelkedik, de ezt követően egy viszonylag állandó értéket mutat az öregedés első 6 hete során.

IV.1.7. A *Hat1* gén deléciójának hatása a napi aktivitásra és cirkadián ritmusra

A hiszton acetitranzferázok nem megfelelő működése esetén fellépő neurodegeneratív folyamatok egyik tünete a cirkadián ritmus zavarok megjelenése.^{291 52} Kíváncsiak voltunk, vajon a főként citoplazmatikus *Hat1* enzim befolyásolja-e a cirkadián ritmust és napi motoros aktivitást. Ennek megválaszolására egy hetes hím *Hat1^{Δ57}* egyedeken végeztünk vizsgálatot, kontrollként *Hat1^{REV16}* precíz revertáns törzset használtunk. A vizsgálatokat DAM-2 *Drosophila* aktivitás monitorral (TriKinetics Inc, Waltham, MA USA) végeztük, amely

infravörös sugár segítségével érzékeli a detektor előtt elhaladó állatokat. Az eredmények azt mutatják, hogy a *Hat1*^{Δ57} deléciós mutáns egyedek cirkadián ritmusában nem következik be lényeges változás, azonban kis (statisztikailag nem szignifikáns) mértékben csökkent aktivitást és emelkedett alvás mennyiséget mutatnak a *Hat1*^{REV16} revertáns kontroll egyedekhez képest (14-15. ábra).

14. ábra. A *Hat1* deléció nincs hatással az egyedek cirkadián ritmusára. Az ábrán öt napon keresztül látható a vizsgált egyedek aktivitása. A mérés 12-12 órás fény-sötét megvilágításban történt, ahol reggel 8 órától este 8 óráig tartott a megvilágítás. Feketével ábrázolva látható a *Hat1*^{REV16} precíz revertáns kontroll muslicák aktivitási görbéje, míg kézzel jelölve a *Hat1*^{Δ57} deléciós mutánsoké. Az ábrán az alvással töltött idő mennyiségek láthatóak 30 perces periódusokban ábrázolva. Mikor reggel 8 órakor felkapcsol a világítás az állatok egy időre felébrednek, illetve előtte és utána is viszonylag éberebbek. Este 8 óránál, mikor a lámpák lekapcsolnak szintén ez figyelhető meg. Az alvással és ébren töltött időszakok lefutása a *Hat1* deléciós egyedek esetén nem mutat jelentős eltérést a revertáns kontrollhoz képest.

15. ábra. A *Hat1* hiányának a napi aktivitásra és alvásra gyakorolt hatása. (A) A *Hat1*^{Δ57} és *Hat1*^{REV16} egyedek percenkénti aktivitása látható összesítve, amelyből látható, hogy a deléciós mutánsok valamelyest kevésbé aktívak. (B) A *Hat1*^{Δ57} és *Hat1*^{REV16} egyedek naponta alvással töltött ideje látható percben összesítve, amely alapján a deléciós mutánsok átlagosan több időt töltenek alvással. (C) A *Hat1*^{Δ57} és *Hat1*^{REV16} egyedek alvási epizódumait ábrázolja egy napra átlagolva, amelyből kiderül, hogy a deléciós mutánsok nem csak több időt töltenek alvással, de az alvási epizódumaik száma is több naponta a revertáns kontroll egyedekhez képest. A diagramokon a box a 25. és 75. percentilis értéket, valamint a medián értéket jelöli, a hibasávok a 10. és 90. percentilis értékeket mutatják, továbbá pontokként láthatóak az ezen kívül eső adatpontok.

IV.1.8. Kromatin szerveződésre gyakorolt hatás vizsgálata PEV analízissel

Mivel a hiszton acetiltranszferázok elsősorban a hiszton fehérjék poszttranszlációs módosításában vesznek részt, ezért azok kromatinba épülésére is hatással lehetnek, vagyis kromatin szervező funkciójuk lehet. Ennek vizsgálatára a pozíció effektus variegáció (PEV) jelenségét használtuk fel. Ehhez egy olyan törzset (*w*^{m4h}) használtunk, amelyben a *w* szemszín gén heterokromatikus környezet közelébe van helyezve. Ha a heterokromatin ráterjed a *w* génre, az állatok mozaikos szemében fehér foltok jelennek meg, míg ha a *w* eukromatikus környezetben marad, akkor a szemben a piros szín dominál. A *Hat1*^{Δ57} törzsből hím egyedeket kereszteztünk *w*^{m4h} szűz nőstényekhez és az utódok szemszínén vizsgáltuk a változásokat a szem pigment tartalmának fotometráálásával. Kontrollként *Hat1*^{REV16} precíz revertánst használtunk szintén *w*^{m4h} szűz nőstényekhez keresztezve.

A *Hat1*^{Δ57} deléciót hordozó nőstény utódok szemszíne szignifikánsan sötétebb lett, mint a *Hat1*^{REV16} allét hordozó kontrollé, míg a deléciós hímek szemszíne megegyezik a kontrolléval (t-próba: nőstények estén $P = 1,62 \times 10^{-4}$; hímeknél $P = 0,694$). Az alábbi eredmények alapján

a gén deléciójának hatása a nőstény egyedekben variegáció szuppresszió volt, a heterokromatin visszahúzódott, vagyis a gén részt vehet a zárt kromatin szerkezet kialakításában és/vagy fenntartásában (16-17. ábra).

16. ábra. A *Hat1* hatással van a kromatin nyitottságra. A PEV szemszínre gyakorolt hatását szemléltető fotó, a képen $w^{m4h}/w; +; Hat1^{REV16}/+$ (felül) és $w^{m4h}/w; +; Hat1^{\Delta57}/+$ (alul) genotípusú egyedek mozaikos szeme látható. *Hat1* deléció hatására az egyedek szeme sötétebb színű a kontrollnál.

17. ábra. A *Hat1* PEV szupresszor hatású nőstényekben. PEV vizsgálat $w^{m4h}/w; +; Hat1^{\Delta57}/+$, $w^{m4h}/Y; +; Hat1^{\Delta57}/+$, valamint $w^{m4h}/w; +; Hat1^{REV16}/+$, $w^{m4h}/Y; +; Hat1^{REV16}/+$ genotípusú egyedeken szem pigment fotometriás méréssel 485 nm-es hullámhosszon, a nőstényeket (A) és hímeket (B) külön-külön összehasonlítva. A diagramokon hibásávként szórás látható feltüntetve. A statisztikai értékelés Student t-próbával történt, ahol a ***: $P < 0,001$. A hímek esetén nem látható eltérés, azonban a nőstények szemszíne sötétebb volt a *Hat1* deléciót hordozó egyedek esetén a revertáns allélt hordozó kontrollnál. Vagyis a deléció hatására a kromatin nyitottabbá vált.

IV.1.9. A Hat1 deléció transzkriptomikai hatásának vizsgálata

Tekintve, hogy a PEV teszt során azt az eredményt kaptuk, hogy a Hat1 szerepet játszhat a kromatin szerveződésben, kíváncsiak voltunk, hogy milyen hatásással van a génkifejeződésre és milyen típusú gének expresszióját befolyásolja. Ennek megállapítására polyA-RNS szekvenálást végeztünk *Hat1*^{Δ57} és *w*¹¹¹⁸ vad típusú 6-12 órás embrió mintákon. Az eredményekből megállapítottuk, hogy 2137 gén expressziós mintázata változott meg szignifikánsan *Hat1* deléció hatására. Ezen expressziós változások 2/3-a génexpresszió növekedést (upregulációt), 1/3-a pedig génexpresszió csökkenést (downregulációt) mutatott.

További elemzés alá vetve a változást mutató géneket, összehasonlítottuk azokat a modENCODE fejlődési RNS expressziós adatokkal.^{292 289} Ennek során azt találtuk, hogy a deléciós mutánsban emelkedett expressziót mutató (upregulálódott) gének döntő része vad típusú embriókban egy a vizsgált 6-12 órás fejlődési periódusnál korábbi embrionális stádiumban mutat magasabb expressziót, míg a vad típusúhoz képest alacsonyabb expressziót mutató (downregulálódott) gének jelentős többsége korábbi embrionális stádium során alacsonyabb szinten expresszálódik. Ebből arra következtetünk, hogy *Hat1* deléció hatására egy fejlődési késés következik be az embriókban (18. ábra).

18. ábra. A *Hat1* deléció fejlődési késést okoz embriókban. A 6-12 órás *Hat1*^{Δ57} és *w*¹¹¹⁸ vad típusú embriók RNS szekvenálás eredményeinek összesítése összevetve a modENCODE RNS-seq adatokkal.^{292 289} A boxplot az adott géncsoportnak vad típusú állatokban mért mediánját valamint első és harmadik kvartilisét mutatja az embrionális fejlődés során. A *Hat1* mutánsban emelkedett expressziót (upregulációt) mutató gének (A) esetén láthatjuk, hogy a vad típusú embriókban a vizsgátnál korábbi embrionális stádiumban mutatnak magasabb expressziós szintet, míg a deléciós mutánsban csökkent expressziót mutató (downregulálódott) gének (B) korábbi embrionális stádium során expresszálódnak alacsonyabb szinten. Ez alapján a *Hat1*^{Δ57} embriók a valós koruknál fiatalabbnak tűnnek, ami egy fejlődésbeli csúszással magyarázható.

A génexpressziós változások 83%-a az embrionális transzkripció program késésére vezethető vissza. Azonban sikerült azonosítanunk 370 gént, melyek expressziós változása nem magyarázható ezzel a fejlődésbeli csúszással. Ezen gének molekuláris funkciójukat tekintve jelentős részben nukleinsav kötésben, illetve transzkripció faktor aktivitásban játszanak szerepet (19. ábra).

19. ábra. A fejlődésbeli késéssel nem magyarázható gének molekuláris funkciójának GO analízise. A P-érték minden esetben 10^{-5} alatti érték. A funkciók között leginkább a transzkripció faktor aktivitás és nukleinsav kötés figyelhető meg.

Az 1397 emlekedett expressziót mutató (upregulált) gén közül 154, a 740 csökkent expressziót mutató (downregulált) gén közül 216 expressziós változása nem magyarázható a fejlődésbeli csúszással. Biológiai folyamatokban való részvételük szerint a *Hat1* deléciónak hatására megemelkedett expressziójú gének főként fejlődési és transzlációs szabályozók, a csökkent expressziót mutató gének pedig alap metabolizmusban részt vevő faktorok (20. ábra).

20. ábra. A fejlődésbeli késéssel nem magyarázható gének biológiai folyamatokban betöltött szerepe. A fejlődési csúszással nem magyarázható gének csoportosítása biológiai folyamatokban való részvételük szerint külön a *Hat1* deléciós mutáns embriókban emelkedett expressziót mutató (upregulált - A) és a csökkent expressziót mutató (downregulált - B) kategóriákra nézve. Az Y tengelyen a dúsulás mértéke, az X tengelyen pedig a szignifikancia értéke látható az egyes kategóriáknak. A vad típusú embriókhoz képest megemelkedett expressziójú gének között többnyire transzlációs szabályozók, míg a csökkent expressziót mutató gének között elsősorban metabolizmusban részt vevő faktorok találhatók.

IV.1.10. A *Hat1* deléció nem befolyásolja a hőstressz érzékenységet

Következő kísérleteinkben azt vizsgáltuk, hogy a *Hat1* hiánya hatással van-e stressz körülményekre való érzékenységre. Először környezeti stresszorként hőstresszt alkalmaztunk. A kísérletet 37 °C-os és 40 °C-os hőmérséklet alkalmazásával végeztük el. 25 - 35 perces 40 °C-os kezelés, illetve 1 - 7 órás 37 °C-os kezelés hatását vizsgáltuk 7 napos *Hat1*^{Δ57} és *Hat1*^{REV16} homozigóta nőstény és hím egyedek túlélésére nézve. A hősokk idejének növelésével arányosan a túlélők száma fokozatosan csökkent mindkét genotípus esetén, azonban a *Hat1*^{Δ57} egyedek túlélési százaléka egyik vizsgált esetben sem tért el szignifikánsan a revertáns kontrollétól. A hőstressz kísérletünkben a hímek bizonyultak érzékenyebbeknek, így rajtuk mutatjuk be a túlélési arányokat a deléciós mutáns és a precíz revertáns kategóriák esetén (21. ábra).

21. ábra. A *Hat1* deléciónak nincs hatása az egyedek hőstressz tűrésére. Túlélési görbék 37 °C-os (A) és 40 °C-os (B) hőstressz alkalmazása után homozigóta *Hat1^{Δ57}* és *Hat1^{REV16}* hím egyedeken. A 37 °C-os hőstressz 7 órán keresztül, míg a 40 °C-os 35 percig zajlott. Mindkét körülmény hasonló lefutású túlélési görbét eredményezett a *Hat1^{Δ57}* és *Hat1^{REV16}* kategóriák esetén, vagyis erre a stressz kondícióra nincs hatása a *Hat1* deléciónak.

IV.1.11. Csökkent *Hat1* dózis hatásának vizsgálata Huntington-kór modellben

A másik stressz körülmény, amit vizsgálni kívántunk, a protheopátiás stressz. A Huntington-kór megjelenését okozó mutáns Huntingtin fehérje intracelluláris aggregátumokat képez és abnormális interakciókat is létrehoz más fehérjékkel, akadályozva ezzel egyes esszenciális celluláris folyamatok fiziológias működését. Az egyik olyan fehérje típus, mellyel aggregátum formában kapcsolatba lép, a hiszton acetiltranszferáz enzimek.^{252 242 293} A hiszton acetiltranszferázok nem megfelelő működése az acetiláltág zavarához és transzkripcionális diszregulációhoz vezet, melyek jellemzőek is a Huntington-kóros páciensekre.²⁵⁹

Kíváncsiak voltunk, hogy a *Hat1* citoplazmatikus hiszton acetiltranszferáz hatással lehet-e a Huntington-kór patomechanizmusára. Ennek vizsgálatára olyan transzgenikus *Drosophila melanogaster* törzset használtunk, amely hordozza a humán *Huntingtin* gén 1-es exonját egy

120 glutaminból álló patológiás hosszúságú poliglutamin szakaszt kódoló CAG ismétlődéssel (*UAS-Httex1Q120* vagy *mHtt*). Ennek a transzgénnek az expresszióját a neuronális *elav-GAL4* driverrel indukáltuk.

A kísérlet során olyan keresztezéseket állítottunk össze, melyekben a hímek nem expresszálják a *mHtt* transzgént, tehát egészségesnek tekinthetők. A nőstények expresszálják a *mHtt*-t, és a nőstények egyik fele a *Hat1* vad allélját hordozza, a másik felében pedig a *Hat1*^{Δ57} mutáció heterozigóta formában jelen van. További kontrollként olyan keresztezést is végeztünk, amelyben a *Hat1*^{REV16} precíz revertánst használtuk. Az utódkategóriák a következők voltak: *elav-GAL4/w; UAS-HttQ120/+*, *TM6 Sb/+* (expresszálja a mutáns *Htt* transzgént, „beteg” kontroll), *elav-GAL4/w; UAS-HttQ120/+; Hat1*^{Δ57} vagy *Hat1*^{REV16}/*+* (amelyben expresszálódik a mutáns *Htt* és mellette *Hat1* deléciós vagy revertáns allélt hordoz), *w/Y; UAS-HttQ120/+; TM6 Sb/+* (nincs *mHtt* expresszió és nem hordoz *Hat1* deléciós vagy revertáns allélt), *w/Y; UAS-HttQ120/+; Hat1*^{Δ57} vagy *Hat1*^{REV16}/*+* (nincs *mHtt* expresszió, de *Hat1* deléciós vagy revertáns allélt hordoz).

IV.1.11.a. A Hat1 részleges hiányának hatása a mHtt expresszáló állatok életképességére

Elsőként az imént felsorolt egyedek életképességét teszteltük az adultok kikelési arányának vizsgálatával. A kísérleti eredményekből jól látszik, hogy bár a *Hat1* mutáció jelenlétében a *mHtt*-t expresszáló egyedek kikelési aránya a duplájára nőtt, a *Hat1* precíz revertánssal végzett keresztezések utódainál ugyanez az eredmény látható (22. ábra). Az eredmény mindkét esetben szignifikáns változás volt, *Hat1*^{Δ57} esetén t-próba: $2,23165 \times 10^{-6}$, *Hat1*^{REV16} esetén t-próba: $9,9927 \times 10^{-6}$. Így elképzelhető, hogy valamilyen háttér mutáció okozza a fenotípusbeli javulást.

22. ábra. A *Hat1*^{Δ57} és *Hat1*^{REV16} allél azonos hatást fejt ki az életképességre *Drosophila* Huntington-kór modellben. (A) A *Hat1* deléció hatása az mHtt-t expresszáló muslicák kikelésére. (B) Azonos kísérlet a *Hat1*^{REV16} precíz revertánssal végrehajtva kontrollként. A kísérletben találhatóak mHtt-t expresszáló és nem expresszáló, *Hat1*^{Δ57} vagy *Hat1*^{REV16} allélt hordozó és nem hordozó kategóriák egyaránt. A diagramokon hibásávként szórás látható feltüntetve. A statisztikai értékelés Student t-próbával történt, ahol a ***: P-érték < 10⁻⁵. A *Hat1*^{Δ57} deléciót hordozó mHtt-t expresszáló egyedek közül szignifikánsan több kelt ki a „beteg” mHtt-t expresszáló kontroll kategóriához képest, azonban ugyanez az eredmény látható a *Hat1*^{REV16} revertáns allélt hordozó egyedek esetén is.

IV.1.11.b. A *Hat1* részleges hiányának hatása mHtt expresszáló állatok élettartamára

A Huntington-kórra és a Huntington-kór *Drosophila* modelljére egyaránt jellemző a rövidebb élettartam. Ezért vizsgáltuk az életképesség teszt során alkalmazott egyedek élethosszát is. A mHtt-t expresszáló, *Hat1*^{Δ57}/+ illetve *Hat1*^{REV16}/+ heterozigóta egyedek élettartam görbéje hasonló lefutású, azonban a *Hat1*^{Δ57} allélt hordozó egyedek 25%-os (P = 0,0067) és 50%-os (P = 0,0117) mortalitási értékei szignifikánsan jobbak a csak mHtt-t expresszáló kategóriánál, míg a *Hat1*^{REV16} allélt hordozók esetén ez a javulás nem figyelhető meg (23. ábra, 2. táblázat).

23. ábra. A *Hat1* deléció kismértékű javulást fejt ki az élettartamra Huntington-kór modellben. A *Hat1*^{Δ57} és *Hat1*^{REV16} heterozigóta allél hatása a mHtt-t expresszáló muslicák élethosszára. A deléciót hordozó egyedek 25%-os és 50%-os mortalitási értéke szignifikánsan jobbnak bizonyult a mHtt-t expresszáló „beteg” kontrollhoz képest.

Összehasonlított genotípusok	P-érték 25%-os mortalitásnál	P-érték 50%-os mortalitásnál	P-érték 75%-os mortalitásnál	P-érték 90%-os mortalitásnál
<i>elav-GAL4/w;HttQ120/+;Sb/+</i> v.s. <i>elav-GAL4/w;HttQ120/+;Hat1^{REV16}/+</i>	0,6479	0,4654	0,4077	0,2588
<i>elav-GAL4/w;HttQ120/+;Sb/+</i> v.s. <i>elav-GAL4/w;HttQ120/+;Hat1^{Δ57}/+</i>	0,0067	0,0117	0,449	0,307
<i>elav-GAL4/w;HttQ120/+;Hat1^{REV16}/+</i> v.s. <i>elav-GAL4/w;HttQ120/+;Hat1^{Δ57}/+</i>	0,102	0,4109	0,8437	0,3392

2. táblázat. A mHtt-t expresszáló, *Hat1*^{Δ57} és *Hat1*^{REV16} allélt hordozó egyedek meghatározott mortalitási arányaihoz tartozó szignifikancia értékek. A mHtt-t expresszáló „beteg” kontroll egyedekkel való összehasonlításból származó adatok. A szignifikáns eltérések piros színnel kiemelve láthatóak. A különbségek közötti szignifikancia értékelése Mann-Whitney U Teszttel történt.

IV.1.11.c. A *Hat1* részleges hiánya enyhíti a mHtt expresszáló állatokban megfigyelhető neurodegenerációt

Megvizsgáltuk az imént bemutatott genotípusú állatok neuronpusztulásának mértékét is. Muslicákban a neuronpusztulás jól detektálható az összetett szemük átvilágításával. Ommatídiumonként 8 rhabdomer található, melyből 7 látható (1 takarásban van).

Neurodegeneráció hatására a rhabdomerek száma csökken és ezt a különbséget vizsgáltuk kísérletünkben úgynevezett pseudopupil assay alkalmazásával.

Annak ellenére, hogy a *Hat1*^{Δ57} és *Hat1*^{REV16} allél hatása a mHtt-t expresszáló muslicák életképességére azonos volt és az élettartamon is csak kis mértékben javított a deléciós allél, a neurodegenerációs vizsgálat során sokkal kisebb mértékű retinális neuronpusztulást mutatott a *Hat1* deléciós allélt hordozó és mHtt-t expresszáló kategória a mHtt-t expresszáló „beteg” belső kontrolljához és a revertáns allélt hordozó kontroll egyedekhez képest is. A különbség a deléciós és revertáns kategória között szignifikáns, t-próba: $P = 7,88 \times 10^{-14}$ (24. ábra).

24. ábra. A *Hat1* részleges hiánya csökkenti a neurodegeneráció mértékét Huntington-kór modellben. *Hat1*^{Δ57} vagy *Hat1*^{REV16} allélt hordozó, mHtt-t expresszáló egyedek és saját belső mHtt-t expresszáló „beteg” kontrolljuk neurodegenerációjának vizsgálata. Eredményként az ommatídiumonkénti rhabdomer szám átlaga látható ábrázolva. A diagramokon hibasávként a szórás látható feltüntetve. A statisztikai értékelés Student t-próbával történt, ahol a ***: $P < 10^{-13}$. A *Hat1* deléciót hordozó egyedek neuronpusztulása szignifikánsan kisebb mértékű a kontroll kategóriáknál.

Tehát összességében elmondható, hogy a *Drosophila* *Hat1* részleges hiánya csökkenti a Huntington-kór kiváltotta neurodegeneráció mértékét.

IV.2. His4r hiszton fehérjék acetilációs módosításainak hatása a Huntington-kór patomechanizmusára

Annak vizsgálatára, hogy a hiszton deacetilázok gátlása esetén, illetve saját kísérleteinkben a Hat1 hiánya esetén, a mHtt fehérje kiváltotta tünetek enyhülésében mely hiszton pozícióra gyakorolt hatás játszat szerepet, a His4r hiszton fehérje egyes acetilálható pozícióinak jelentőségét vizsgáltuk. A His4r fehérje a H4-es hisztonnal fehérje szekvenciájában megegyezik, azonban kifejeződésük eltérő.³⁰ Feltételezhető, hogy a His4r a H4-et a transzkripcionálisan aktív helyeken lecseréli, hasonlóan, mint ahogy az a H3 és a H3.3 variánsok esetén megfigyelhető²⁹⁴. A H4 és His4r hiszton N-terminális részén acetilálható aminosavak az 5-ös, 8-as, 12-es és 16-os pozíciójú lizinek. Ezek vizsgálatára olyan szubsztitúciókat hordozó transzgenikus konstrukciókat hoztunk létre, amelyekről az átíródó His4r hiszton fehérjék ezekben a pozíciókban (K5, K8, K12, K16) acetiláltságot, vagy acetilálatlan állapotot mimikálnak.

IV.2.1. His4r pontmutáns konstrukciók és transzgenikus Drosophila vonalak előállítása

Létrehoztunk egy pENTR3C-His4r-GB vektorkonstrukciót, mely tartalmazza a vad típusú *His4r* gént a start kodontól a translációs stop előtti kodonig, annak intronjaival együtt (GB: gene body). Ebben terveztünk létrehozni acetilált lizint (lizin > glutamin csere, K>Q) illetve módosítatlan lizint (lizin > arginin csere, K>R) mimikáló pontmutációkat az 5-ös, 8-as, 12-es és 16-os lizinek kodonjaiban (K5R, K5Q, K8R, K8Q, K12R, K12Q, K16R, K16Q). Ehhez megfelelő módosításokat tartalmazó primereket terveztünk (lásd az Anyagok és módszerek fejezetben), majd ezeket a primereket alkalmazva inverz PCR-on alapuló NEB Q5 irányított mutagenézis módszerrel pontmutáns konstrukciókat hoztunk létre. A szubsztitúciót hordozó szekvenciákat pTWF-attB vektorba klónoztuk, ami egy a transzgén GAL4 függő aktivációját és C-terminális FLAG-tag jelölést lehetővé tevő, ϕ C31 integráz mediálta helyspecifikus transzgén inszercióra alkalmas vektor. A konstrukciókat *attP-zh86Fb* transzgén dokkoló helyet hordozó embriókba injektáltattuk. A kikelt állatokat egyedi keresztezésekbe vittük w^{1118} törzssel, majd a transzgenikus (*mini-white* szemszín markert hordozó) utódok közül kiválasztottunk négy-négy vonalat minden pozícióra nézve, melyekből homozigóta törzseket állítottunk elő.

A létrehozott transzgenikus törzsek validálásához a törzsekből izolált *Drosophila* genomi DNS templáton a pTWF-attB vektor beépülő részére tervezett közös primerpárral végeztünk PCR reakciókat, melyek termékeit kapilláris szekvenálással ellenőriztük. Megállapítottuk, hogy a vizsgált transzformáns vonalak hordozzák az általunk tervezett szubsztitúciókat.

IV.2.2. A His4r transzgének kifejeződésének vizsgálata

IV.2.2.a. A transzgenek transzkripció szintjének vizsgálata

A különböző pontmutációkat hordozó *His4r* transzgeneket azonos genomi pozícióba, ugyanarra a dokkoló helyre integráltuk azért, hogy kifejeződésük ne függjön a genomi környezettől. Hogy meggyőződjünk a transzgenek azonos kifejeződéséről, a szövetspecifikus neuronálisan kifejeződő *elav-GAL4* driverrel indukált expressziójú *UAS-His4r* transzgenek transzkripció szintjét RT-qPCR analízissel vizsgáltuk. Ehhez a vizsgálni kívánt egyedek fejeiből készítettünk cDNS mintát és az *UAS-His4r* génre (*His4r-qF*), valamint a pTWF-attB vektor beépülő részére specifikus (pTWF-attB-qR) expressziós primereket használtunk. Méréseink alapján RNS expressziós szintben nincs számottevő különbség a különböző módosításokat hordozó transzgenek között. (25. ábra).

25. ábra. A transzgenikus *His4r* RNS expresszió nem mutat szignifikáns eltéréseket. *elav-GAL4* neuronális driverrel indukált expressziójú transzgenikus *UAS-His4r* szubsztitúciókat hordozó (K5R, K5Q, K8R, K8Q, K12R, K12Q, K16R, K16Q) és vad típusú *UAS-His4r* transzgént expresszáló (GB) törzseken végzett *His4r* transzgen RNS expresszió mérés qPCR-al tubulin háztartási génre normalizálva. Az egyedek a transzgénre és a driverre nézve heterozigóták voltak. A diagramokon hibásávként szórás látható feltüntetve. Az egyes transzgenek módosítástól függetlenül egyenletes expressziót mutatnak.

IV.2.2.b. A *His4r* transzgenek fehérje expressziós szintjének vizsgálata

Vizsgáltuk a különböző *His4r* transzgeneket expresszáló muslicákban a transzgénről származó *His4r* fehérje szintjét is. A transzformáns vonalakat neuronális *elav-GAL4* driver törzshöz kereszteztük a pontmutációt hordozó *UAS-His4r* gének expresszáltatásához, majd az

utódokon anti-FLAG specifikus ellenanyagot használva western blot kísérletet végeztünk a FLAG-taggel jelölt UAS-His4r változatok fehérje szintjének ellenőrzésére. Bemérési kontrollként H3 elleni ellenanyagot alkalmaztunk. A szekvenálással ellenőrzött vonalak mindegyike expresszálja a transzgént, azokról fehérje képződik. A His4r fehérje szintje azonban nem azonos mennyiségű az egyes vonalakban. Az eredmények azt mutatják, hogy a Q (acetilációt mimikáló glutamin) módosítás minden pozíció esetén alacsonyabb fehérje expressziót eredményezett az R (módosítatlan lizint mimikáló arginin) módosításnál, különösen alacsony His4r fehérje szintet mutattunk ki a His4r-K5Q és a His4r-K16Q pontmutációt hordozó fehérjét expresszáló állatokban (26. ábra). Szignifikáns a különbség a GB expresszióhoz képest a K5Q ($P = 0,0119$), a K12R ($P = 0,0035$), a K16R ($P = 0,0308$) és a K16Q ($P = 0,000401$) módosítások esetén. Mivel a transzgének transzkripcionális aktivitásában nem találtunk számottevő különbséget, így feltételezhető, hogy valamilyen fehérje expresszió vagy lebontásbeli különbség okozza az acetilált lizint mimikáló módosítások esetén a csökkent fehérje szintet.

A

B

26. ábra. A *His4r* transzgénekről termelődő fehérje szintje eltéréseket mutat a szubsztitúciók hatására. (A) Reprezentatív western blot kép az *elav-GAL4* neuronális driverrel indukált expressziójú transzgenikus *UAS-His4r* szubsztitúciókat hordozó (K5R, K5Q, K8R, K8Q, K12R, K12Q, K16R, K16Q) és vad típusú *UAS-His4r* transzgént expresszáló (GB) törzseken. Az egyedek a transzgénre és a driverre nézve heterozigóták voltak. Fehérje szinten az egyes módosítások eltéréseket mutatnak, különösen a K16Q és K5Q esetén, ahol a kontrollnál (GB) lényegesen alacsonyabb a fehérje szint. (B) A western blot kísérletek jelintenzitás értékeinek kvantifikálása, normalizálva a H3 loading kontroll értékekre (genotípusonként három biológiai és két technikai replikátum). A diagramokon hibasávként szórás látható feltüntetve. A statisztikai értékelés Student t-próbával történt, ahol az egyes módosítások a GB jelintenzitás értékeihez lettek hasonlítva és a *: $P < 0,05$, **: $P < 0,01$, ***: $P < 0,001$ értéket jelöl. Az R változatok magasabb, míg a Q változatok alacsonyabb fehérje szintet mutatnak.

IV.2.2.c. A transzgenikus *His4r* fehérjék sejten belüli lokalizációjának vizsgálata

Azt feltételeztük, hogy a FLAG-tag nem fogja zavarni a fehérje foldingot és transzportot, és az *UAS-His4r* transzgenikus fehérjék módosítástól függetlenül bejutnak a sejtmagba. Ennek ellenőrzéséhez a western blot kísérletnél is alkalmazott *elav-GAL4* driver törzshöz kereszteztük a transzgenikus vonalakat és L3 stádiumú lárvák nyálmirigyein végeztünk immunfestést FLAG-tag elleni ellenanyaggal, a sejtmagokat pedig DAPI sejtmag festékkel jelöltük. A várakozásainkkal megegyező eredményt kaptunk, a transzgenikus fehérjék sejtmagi lokalizációt mutatnak, képesek bejutni a sejtmagba (27. ábra).

27. ábra. A *His4r* transzgének sejtmagi lokalizációt mutatnak. L3-as lárvális nyálmirigyekről készített reprezentatív fluoreszcens mikroszkópos képek az *elav-GAL4* driverrel indukált expressziójú transzgenikus *UAS-His4r* szubsztitúciókat hordozó (K5R, K5Q, K8R, K8Q, K12R, K12Q, K16R, K16Q) és vad típusú *UAS-His4r* transzgént expresszáló (GB) törzseken, valamint kontrollként vad típusú, transzgént nem expresszáló *w¹¹¹⁸* törzsön. A transzgént expresszáló egyedek a transzgénre és a driverre nézve heterozigóták voltak. A transzgenikus fehérjék lokalizációja FLAG antitest festéssel zöld színben látható, a sejtmagok DAPI festéssel kék színnel jelennek meg. A *w¹¹¹⁸* vad típusú, transzgenikus fehérjét nem expresszáló kontroll, így FLAG festődést nem mutat. A FLAG és DAPI festés minden transzgenikus egyedben azonos mintázatot mutat, vagyis a *His4r* transzgenikus fehérjék sejtmagi lokalizációja figyelhető meg.

IV.2.3. A *His4r* pontmutánsok életképességre gyakorolt hatásának vizsgálata

A pontmutáns *UAS-His4r* transzgének expresszióját *elav-GAL4* driverrel indukáltuk, életképességüket *UAS-His4r* transzgént nem expresszáló, csak *elav-GAL4* drivert és balanszer kromoszómát hordozó testvéreikhez hasonlítottuk a nőstények és hímek esetén egyaránt. A neuronális expresszió egyik vizsgált esetben sem tapasztaltuk negatív hatását az életképességre nézve, a kikelési százalék minden esetben meghaladja a százat, vagyis a balanszer kromoszómát hordozó kontroll egyedek életképessége rosszabb volt az *UAS-His4r* transzgéneket expresszáló egyedekénél (28. ábra).

28. ábra. A *His4r* transzgénnek neuronális expressziója nincs negatív hatással az életképességre. Az *elav-GAL4* neuronális driverrel indukált expressziójú, szubsztitúciókat hordozó (K5R, K5Q, K8R, K8Q, K12R, K12Q, K16R, K16Q) *UAS-His4r* transzgén, illetve vad típusú *UAS-His4r* transzgén expresszáló (GB) törzsek életképesség adatai. A transzgén expresszáló egyedek kikelési száma az *UAS-His4r* transzgén nem, csak *elav-GAL4* drivert és balanszer kromoszómát (*TM6 Sb*) hordozó testvéreik számához lett viszonyítva, melynek arányát mutatja a diagram. A balanszer kromoszómák életképességre kifejtett negatív hatása lehet az oka a transzgén expresszáló egyedek 100% föléti életképesség értékeinek. Az adatok alapján azonban egyik módosításnak sincs negatív hatása az életképességre sem a hímek, sem a nőstények esetén.

IV.2.4. A pontmutáns *His4r* transzgénnek expressziója nem idéz elő fotoreceptor neuron degenerációt

A már korábban bemutatott pseudopupil assay alkalmazásával teszteltük, van-e a pontmutáns *UAS-His4r* transzgénnek *elav-GAL4* indukálta neuronális expressziójának hatása az érintett neuronok túlélésére. A vizsgálat 4 napos nőstény egyedeken történt. Az eredményeink azt mutatták, hogy a transzgénnek neuronális expressziója nem okozott fotoreceptor neuron pusztulást az egyedekben (29. ábra).

29. ábra. A *His4r* transzgének neuronális expressziójának nincsen hatása a fotoreceptor neuronokra. Az *elav-GAL4* neuronális driverrel indukált expressziójú, szubsztitúciókat hordozó (K5R, K5Q, K8R, K8Q, K12R, K12Q, K16R, K16Q) *UAS-His4r* transzgént, illetve vad típusú *UAS-His4r* transzgént expresszáló (GB) törzseken végzett neurodegeneráció vizsgálat. A kísérlet során a rhabdomerek ommatídiumonkénti átlagos száma került meghatározásra. Ez az érték minden vizsgált kategóriában 7-nek adódott, tehát nem volt egyik módosítás hatására sem megfigyelhető neuronális pusztulás.

A *His4r* expressziós kísérletek alapján összességében kijelenthető, hogy a transzgének neuronális expressziójának önmagában nincs negatív hatása, így a Huntington-kór modellben végzett kísérletek során bármilyen irányban történő változás a mutáns Huntingtin kiváltotta patológiás folyamatra specifikusnak mondható.

IV.2.5. A *His4r* pontmutációk hatása a mutáns *Htt* kiváltotta patológiás folyamatokra

Kíváncsiak voltunk, hogy a *His4r* különböző acetilációs állapotait mimikáló módosítások milyen hatást fejtenek ki a Huntington-kór *Drosophila* modelljében, illetve, hogy a változások összevethetőek-e a *Hat1* deléziós teszteknel kapott eredményeinkkel.

A kísérletekhez olyan keresztezéseket állítottunk össze, melyeknek eredményeképpen négyféle utódkategória megjelenését vártuk: *elav-GAL4/w; UAS-HttQ120/+*, *TM6 Sb/+* (amelyben a mutáns *Htt* expresszálódik, azonban egyik *His4r* transzgént sem hordozza), *elav-*

GAL4/w; UAS-HttQ120/+; UAS-His4r/+ (amelyben mind a mutáns *Htt*, mind valamelyik *His4r* transzgén kifejeződik), *w/Y; UAS-HttQ120/+; TM6 Sb/+* (amelyben jelen van a *mHtt* transzgén, de driver hiányában nem expresszálódik), *w/Y; UAS-HttQ120/+; UAS-His4r/+* (amelyben jelen van a *mHtt* és a *His4r* transzgén, de driver hiányában nem expresszálódik). Így mindkét hím kategória „egészséges” kontrolljaként szolgál a kísérleteknek, a csak *mHtt*-t expresszáló nőstény egyedek pedig az *UAS-His4r* transzgének valamelyikét expresszáló állatokhoz hasonlítható „beteg” kontroll egyedek.

IV.2.5.a. *His4r* pontmutációk hatása a mutáns *Htt* kiváltotta csökkent életképességre

Életképességük vizsgálatához a kikelt utódkategóriák egyedeinek számát viszonyítottuk egymáshoz. A vad típusú *UAS-His4r* gént (*His4r-GB*) expresszáló egyedek életképessége is nagymértékben lecsökkent a csak *mHtt*-t expresszáló „beteg” kontrollhoz képest. Egyik *UAS-His4r* transzgént expresszáló kategória kikelt egyedszáma sem érte el a pusztán *mHtt*-t expresszáló kategóriáét, viszont a *His4r-GB*-t expresszáló egyedeknél a K8Q és a K16Q módosítást hordozók életképessége jobbnak bizonyult. Ezek közül a K16Q kikelési aránya szignifikánsan nagyobb, mint a *His4r-GB* kontrollé (t-próba: $P = 0,0102$). A többi kategória csökkent életképességet mutatott a módosítatlan *His4r-GB* transzgént hordozókhoz képest. A K5Q módosítást hordozó állatok kis mértékben mutattak rosszabb kikelési arányt, K12R és K12Q módosításokat hordozó egyedek pedig egyáltalán nem keltek ki. A K5R, K8R, K12R és K12Q módosítások esetén az életképesség csökkenés szignifikáns (t-próba: K5R – $P = 0,0025$, K8R – $P = 0,0289$, K12R – $P = 0,0013$, K12Q – $P = 0,0013$). A lizin-arginin (K-R, vagyis módosítatlan lizint mimikáló) módosítás minden esetben gyengébb életképességet eredményezett a többi kategóriánál (30. ábra).

30. ábra. A *His4r* transzsgének neuronális expressziójának hatása az életképességre *Drosophila* Huntington-kór modellben. A *mHtt*-t (*UAS-HttQ120*) és transzgenikus *UAS-His4r* szubsztitúciókat hordozó (K5R, K5Q, K8R, K8Q, K12R, K12Q, K16R, K16Q), és vad típusú *UAS-His4r* transzsgént expresszáló (GB) törzsek életképesség adatai. A módosított *UAS-His4r*-t *mHtt* háttéren *elav-GAL4* driverrel neuronálisan expresszáló állatok kikelési aránya látható saját *UAS-His4r* transzsgént nem, csak *mHtt*-t expresszáló belső „beteg” kontrolljaikhoz viszonyítva (a nem expresszáló „egészséges” kontrollok nincsenek ábrázolva). A statisztikai értékelés Student t-próbával történt, ahol a *: $P < 0,05$, **: $P < 0,01$. A vad típusú *His4r-GB* expresszió is kb. 60%-os életképesség csökkenéshez vezetett. Ennél kisebb mértékű életképesség csökkenést okozott a K8Q és K16Q módosítás, melyek közül a K16Q szignifikáns javulás.

IV.2.5.b. *His4r* pontmutációk hatása a mutáns *Htt* kiváltotta csökkent élettartamra

Az életképes, *mHtt*-t és *UAS-His4r* transzsgént együtt expresszáló utódkategóriákon élettartam vizsgálatot is végeztünk (a K12-es módosításokat hordozó utódkategóriák nem bizonyultak életképesnek). Az *UAS-His4r* transzsgént nem, csak *mHtt*-t expresszáló egyedek élettartamát egyik *His4r* szubsztitúciót hordozó kategória sem haladta meg. Viszont az elmondható, hogy a *His4r-GB*-t (módosítatlan transzsgént) expresszáló egyedeknél a K8Q és K16Q módosítást hordozók hosszabb élettartamot mutattak (31. ábra). A *His4r-K8Q*-t expresszáló egyedek szignifikáns élettartam javulást mutatnak a *His4r-GB*-t expresszálóakhoz képest minden vizsgált mortalitási értéknél, valamint a *His4r-K8R*-t expresszáló kategóriánál

is a 25%-os mortalitási értéknél. A *His4r-K16Q*-t expresszáló egyedek pedig a *His4r-GB*-t expresszáló kategóriához képest nem, azonban a *His4r-K16R*-hez képest szignifikáns javulást mutat élettartamát tekintve a 25, 50 és 75%-os mortalitási értéknél (3. táblázat).

31. ábra. A *His4r* transzgénnek neuronális expressziójának hatása az élettartamra *Drosophila* Huntington-kór modellben. A *mHtt*-t (*UAS-HttQ120*) és transzgenikus *UAS-His4r* szubsztitúciókat hordozó (K5R, K5Q (A), K8R, K8Q (B), K12R, K12Q (C), K16R, K16Q (D)), és vad típusú *His4r* transzgént expresszáló (GB) törzsek élettartam görbéi. A módosított *UAS-His4r*-t *mHtt* háttéren *elav-GAL4* driverrel neuronálisan expresszáló állatok élettartama látható csak *mHtt*-t expresszáló belső kontrolljaikhoz (+) és *mHtt* mellett *His4r-GB*-t expresszáló (GB) kontrollhoz viszonyítva külön minden vizsgált pozícióra. A vad típusú *His4r-GB* expresszió is jelentős élettartam csökkenéshez vezetett, melyet enyhít a K8Q és K16Q módosítás.

	Összehasonlított genotípusok	P-érték 25%-os mortalitás- nál	P-érték 50%-os mortalitás- nál	P-érték 75%- os mortalitás- nál	P-érték 90%-os mortalitás- nál
K5	<i>elav-GAL4/w; UAS-HttQ120/+; Sb/+ v.s. elav-GAL4/w; UAS-HttQ120/+; UAS-His4r-GB/+</i>	0,5457	0,9966	0,9248	0,7504
	<i>elav-GAL4/w; UAS-HttQ120/+; Sb/+ v.s. elav-GAL4/w; UAS-HttQ120/+; UAS-His4r-K5R/+</i>	0,271	0,4133	0,5164	0,7026
	<i>elav-GAL4/w; UAS-HttQ120/+; Sb/+ v.s. elav-GAL4/w; UAS-HttQ120/+; UAS-His4r-K5Q/+</i>	0,0093	0,0081	0,0141	0,1007
	<i>elav-GAL4/w; UAS-HttQ120/+; UAS-His4r-GB/+ v.s. elav-GAL4/w; UAS-HttQ120/+; UAS-His4r-K5R/+</i>	0,3655	0,2513	0,5511	0,791
	<i>elav-GAL4/w; UAS-HttQ120/+; UAS-His4r-GB/+ v.s. elav-GAL4/w; UAS-HttQ120/+; UAS-His4r-K5Q/+</i>	0,1531	0,0696	0,0231	0,1671
	<i>elav-GAL4/w; UAS-HttQ120/+; UAS-His4r-K5R/+ v.s. elav-GAL4/w; UAS-HttQ120/+; UAS-His4r-K5Q/+</i>	0,5971	0,4196	0,7878	0,7878
K8	<i>elav-GAL4/w; UAS-HttQ120/+; Sb/+ v.s. elav-GAL4/w; UAS-HttQ120/+; UAS-His4r-GB/+</i>	0,000041	0,0001	0,0015	0,0605
	<i>elav-GAL4/w; UAS-HttQ120/+; Sb/+ v.s. elav-GAL4/w; UAS-HttQ120/+; UAS-His4r-K8R/+</i>	0,0067	0,0364	0,1199	0,3164
	<i>elav-GAL4/w; UAS-HttQ120/+; Sb/+ v.s. elav-GAL4/w; UAS-HttQ120/+; UAS-His4r-K8Q/+</i>	0,4392	0,3544	0,163	0,0537
	<i>elav-GAL4/w; UAS-HttQ120/+; UAS-His4r-GB/+ v.s. elav-GAL4/w; UAS-HttQ120/+; UAS-His4r-K8R/+</i>	0,7291	0,7291	0,9182	0,4676
	<i>elav-GAL4/w; UAS-HttQ120/+; UAS-His4r-GB/+ v.s. elav-GAL4/w; UAS-HttQ120/+; UAS-His4r-K8Q/+</i>	0,0029	0,0017	0,0139	0,0484
	<i>elav-GAL4/w; UAS-HttQ120/+; UAS-His4r-K8R/+ v.s. elav-GAL4/w; UAS-HttQ120/+; UAS-His4r-K8Q/+</i>	0,0285	0,052	0,0715	0,2944
K16	<i>elav-GAL4/w; UAS-HttQ120/+; Sb/+ v.s. elav-GAL4/w; UAS-HttQ120/+; UAS-His4r-GB/+</i>	0,0022	0,0128	0,0293	0,4734
	<i>elav-GAL4/w; UAS-HttQ120/+; Sb/+ v.s. elav-GAL4/w; UAS-HttQ120/+; UAS-His4r-K16R/+</i>	0,0005	0,0006	0,0163	0,4257
	<i>elav-GAL4/w; UAS-HttQ120/+; Sb/+ v.s. elav-GAL4/w; UAS-HttQ120/+; UAS-His4r-K16Q/+</i>	0,0334	0,0258	0,1877	0,2109
	<i>elav-GAL4/w; UAS-HttQ120/+; UAS-His4r-GB/+ v.s. elav-GAL4/w; UAS-HttQ120/+; UAS-His4r-K16R/+</i>	0,6874	0,9865	0,2399	0,914
	<i>elav-GAL4/w; UAS-HttQ120/+; UAS-His4r-GB/+ v.s. elav-GAL4/w; UAS-HttQ120/+; UAS-His4r-K16Q/+</i>	0,0775	0,0775	0,3221	0,1101
	<i>elav-GAL4/w; UAS-HttQ120/+; UAS-His4r-K16R/+ v.s. elav-GAL4/w; UAS-HttQ120/+; UAS-His4r-K16Q/+</i>	0,0434	0,0434	0,0329	0,0776

3. táblázat. *mHtt*-t és pontmutáns *His4r* transzgéneket expresszáló *Drosophilák* esetében meghatározott mortalitási arányokhoz tartozó szignifikancia értékek. Zöld színnel kiemelve láthatóak azok az adatok, ahol az *UAS-His4r* transzgént expresszáló utódok élettartama szignifikánsan rosszabbnak bizonyult a csak *mHtt*-t (*UAS-HttQ120*) expresszáló kategóriához képest, pirosan az olyan szignifikáns javulás látható, ahol valamelyik *UAS-His4r* expresszió jobbnak bizonyult egy másiknál. A különbségek statisztikai értékelése Mann-Whitney U teszttel történt.

IV.2.5.c. *His4r* pontmutációk hatása a mutáns *Htt* kiváltotta neurodegenerációra

A már korábban ismertetett pseudopupil assay alkalmazásával teszteltük van-e a különböző *UAS-His4r* transzgének neuronális expressziójának hatása a Huntington-kór okozta idegsejt degenerációra. A vizsgálatot azokkal a pontmutáns transzgénekekkel (*UAS-His4r-GB*, *K5Q*, *K8R*, *K8Q*, *K16R*, *K16Q*) tudtam elvégezni, amelyek a *mHtt*-el együtt kifejeztetve nem okozták az állatok pusztulását. A kísérletet 2 és 4 napos állatokon végeztem. A 2 napos egyedek esetén a *His4r* transzgént expresszáló kategóriáknál az ommatidumonkénti rhabdomerek számának átlag értékei szinte egyik esetben sem mutattak jelentős eltérést a csak *mHtt*-t expresszáló belső kontrolljukhoz képest, kivéve a *K5Q* módosítást hordozók, ahol kismértékű, ám szignifikáns javulás látható a neurodegenerációban (t-próba: $P = 0,01226$) (30. ábra (A)). A 4 napos egyedeken végzett kísérlet valamelyest eltérő eredményt ad a 2 naposokon végzethez képest. A *His4r-K5Q* mellett a *His4r-K16R* és *His4r-K16Q* transzgen

expressziója is szignifikáns változást mutat a csak *mHtt*-t expresszáló belső kontrolljához képest (t-próba K5Q: $P = 0,04337$, K16R: $P = 0,003$, K16Q: $P = 0,03393$) (32. ábra (B)).

32. ábra A *His4r* transzgének neuronális expressziójának hatása a fotoreceptor neuronok degenerációjára Huntington-kór modellben. A *mHtt*-t (*UAS-HttQ120*) és transzgenikus *UAS-His4r* szubsztitúciókat hordozó (K5Q, K8R, K8Q, K16R, K16Q), illetve *mHtt*-t és vad típusú *UAS-His4r* transzgént expresszáló (GB) törzsek neurodegenerációs vizsgálata. A diagramokon az *UAS-His4r* transzgént és *mHtt*-t együttesen expresszáló egyedek ommatídiumonkénti rhabdomer számának aránya látható csak *mHtt*-t expresszáló belső kontrolljaikhoz viszonyítva. Az A panelen 2 napos, a B panelen 4 napos egyedek adatai kerültek ábrázolásra. Az ommatídiumonkénti rhabdomer szám a vad típusú *His4r-GB* expresszió esetén nem tér el szignifikánsan a „beteg” kontrollétól. Ennél kisebb mértékű rhabdomer szám csökkenést okozott a K5Q, a K16R és K16Q módosítás expressziója.

V. Diszkusszió

Huntington-kór esetében a mutáns Huntingtin fehérje első exonjában lévő instabil, polimorf CAG trinukleotid ismétlődés expanziója funkcionyeréses mutációhoz vezet, a fehérje N-terminális rész közel egy patológiás hosszúságú poliglutamin ismétlődés jön létre. A nagyméretű Huntingtin fehérje főként a citoplazmában található meg, azonban mutáns formájából hibás proteolitikus hasítások következtében olyan N-terminális fragmentek keletkeznek, melyek bejutnak a sejtmagba. A mHtt képes kölcsönhatásokat kialakítani más fehérjékkel, melyek csapódhatnak az aggregátumokba és így nem képesek funkciójuk betöltésére. Ilyen ismert fehérjék a CBP/p300 és Pcaf hiszton acetiltranszferázok, melyek nem megfelelő működése acetilációs zavart okoz.^{295 296 236}

Tekintve, hogy a betegség jelenleg gyógyíthatatlan és csak a tüneti kezelésre van lehetőség célunk volt a kór patogenezisére potenciálisan jótékony hatású epigenetikai targetek keresése. Kísérleteinkhez olyan *Drosophila melanogaster* törzseket használtunk, amelyek a humán Huntingtin fehérje 1-es exonját hordozzák 120 glutamint tartalmazó poliglutamin szakasszal. A transzgén expresszióját neuronális *elav-GAL4* driverrel indukáltuk. A hosszú glutamin szekvenciát hordozó fehérjék aggregátumokat képeznek az agyban és ennek hatására az egyedek mutatják a Huntington-kór jellegzetes tüneteit, úgymint mozgási és aktivitásbeli defektusok, cirkadián-ritmus eltérések, neuronális pusztulás, rövid élettartam.^{297 298}

A *Drosophila* Hat1 általános jellemzése és funkciójának vizsgálata a Huntington-kór patogenezisében

A Hat1 *Drosophilában* egy még kevésbé jellemzett aktivitású hiszton acetiltranszferáz enzim. Funkcionális elemzéséhez létrehoztunk egy funkció veszteséges mutáns vonalat. Bár a létrehozott delécia nem terjed ki a teljes génre, a kódoló szekvencia megközelítőleg 80%-a - beleértve a katalitikus aktivitásért felelős domént - elveszett.

A Hat1 targetjeinek azonosításához western blot analízist végeztünk, melynek során megállapítottuk, hogy ortológjaihoz hasonló módon H4K5 és H4K12 acetilációs aktivitással rendelkezik. *Drosophilában* nem csak ez az egyetlen hiszton acetiltranszferáz enzim mutat ilyen szubsztrát specifitást, L3 lárvában hasonló aktivitást mutattak ki korábban a GCN5 acetiltranszferázt tartalmazó ATAC komplex esetén is.²⁹⁹ Adataink alapján azonban a H4K5 és H4K12 acetilációt embriókban egyedül a Hat1 tartja fenn, ugyanis a Hat1 deléciós embriókban kevesebb, mint 4%-ra csökkent a H4K5 és H4K12 acetiláció szintje a vad típusú embriókhoz képest. Ez az acetilációs tevékenység az érintett lizinekre nézve specifikusnak tűnik, ugyanis a *Hat1* delécia a H4K8 acetilációra nem volt hatással.

A H3 hiszton acetilációját is vizsgálat alá vettük, ugyanis egy korábban megjelent értekezés szerint egér embrionális fibroblaszt sejtekben a Hat1 mutáció hatással volt a H3 hisztonon megjelenő acetilációra is és H3K9, H3K18, H3K27 acetilációs szintbeli változást okozott. Jelentős csökkenést mutatott az állandó H3K18 acetilációs szint és a replikáció során beépített hisztonokon lévő H3K18 acetiláció is, míg például a H3K23 acetiláció nem volt érzékeny a Hat1 hiányára.¹⁷⁹ Az általunk kapott eredmények alátámasztják ezeket az

adatokat, ugyanis a *Hat1* deléciós mutáns *Drosophila* embriókban szignifikánsan csökkent a H3K18 acetilációs szint, míg a H3K23 acetilációban nem történt változás a vad típusú embriókhoz képest. Ezért annak ellenére, hogy a *Hat1* nem rendelkezik H3 specifikus katalitikus aktivitással^{85 175}, úgy tűnik, hogy indirekt módon a *Hat1* befolyásolja a H3 hiszton acetilációs szintjét is.

A H4 hiszton K5 és K12 diacetilációjának olyan funkciót tulajdonítanak, hogy a hisztonok nukleáris importjában és a kromatin összerendeződésben tölthet be szerepet. A H3 és H4 hisztonok karyopherin fehérjék közvetítésével jutnak a sejtmagba, és a H3, H4 N-terminális részek redundánsnak tűnnek a nukleáris transzport folyamat során.¹¹² *Saccharomyces cerevisiae*-ben a H4 K5 és K12, illetve a H4 K5, K8 és K12 pozíciók szimultán mutációja glutaminra azt eredményezte, hogy a H4 citoplazmatikus miszlokalizációt mutatott, míg arginire mutáltatásuk esetén nem volt ez a hatás megfigyelhető.³⁰⁰ Ezen adatok alapján a H4 N-terminális részének pozitív töltése elősegíti az NLS funkciót és annak acetilációs állapota hatással van a H4 nukleáris transzportjára, azonban ezek a poszttranszlációs módosítások nem esszenciálisak az import folyamat során. *Hat1* null mutáns egér embrionális fibroblaszt sejtekben nem volt kimutatható eltérés sem a citoszolikus, sem a nukleáris H4 hiszton szintben, ami alátámasztja azt a feltevést, hogy a *Hat1* által létrehozott acetilációs jelek nem szükségesek a nukleáris importhoz.¹⁷² Az általunk kivitelezett kísérlet alátámasztja ezt, ugyanis a His4r variáns hiszton fehérje (amely aminosav szekvencia szinten megegyezik a H4 hisztonnal) *Hat1* hiányában is sejtmagi lokalizációt mutatott. Továbbá azon His4r fehérjék, melyeknek a K5 és K12 pozíciói argininre voltak cserélve, szintén bejutottak a sejtmagba. Egyes eredmények szerint a H4 K5 és K12 acetiláció inkább gátolja, mintsem elősegíti a nukleáris importot.^{300 112} Így elképzelhető, hogy a *Hat1* általi acetiláció a H4 hiszton karyopherin kötéséből való felszabaduláshoz kellhet a sejtmagba jutást követően vagy a kromatin összerendező faktorokhoz történő kötődéshez, és ezáltal a kromatinba épülés elősegítésében játszhat szerepet.

Drosophilában a *Hat1* részt vesz a CENP-A (centromere protein A) centromerikus H3 hiszton fehérje variáns kromatinba helyezésében, ahol a *Hat1* komplexet alkot CENP-A, H4 és Caf1-p55 (*Hat2* homológ) fehérjékkel. Bár a *Hat1* nem acetilálja a CENP-A-t, annak RNSi általi csendesítése mégis a kromatinba épített CENP-A szignifikáns csökkenéséhez vezetett S2 sejtekben.¹⁷⁵ Saját adataink azt látszanak alátámasztani, hogy bár a H4K5 és K12 diacetiláció hozzájárulhat a nukleáris transzporthoz vagy az általános kromatin összerendeződéshez, nem játszik nélkülözhetetlen szerepet ezekben a folyamatokban. Annak ellenére, hogy *Drosophila* embriókban egyedül a *Hat1* felelős a H4K5 és H4K12 acetilációért, a fehérje nem esszenciális. A *Hat1* delécia nem okoz fertilitási zavarokat és csak kis mértékben csökkenti az életképességet. Előfordulhat redundancia funkcióit tekintve, feltehetően ezért nem letális a hiánya.

A H4 K5 és K12 diacetiláció részt vesz a DNS kettős szál törés utáni Asf1 (anti-silencing factor 1)-függő kromatin újra-rendeződésben³⁰¹, azonban úgy tűnik, hogy a kromatin összerendeződésben nem játszik nélkülözhetetlen szerepet.^{302 303} Humán MCF7 (adenokarcinóma mellrák sejtvonal) sejtekben felfedezték azonban, hogy a *Hat1* által létrehozott acetilációnak szerepe van a megfelelő replikációban, ugyanis az ATAD2 (ATPase chromatin AAA domain-containing protein 2) - amely szükségesnek tűnik a PCNA

(Proliferating cell nuclear antigen) megfelelő lokalizációjához a kromatinon és ezzel a hatékony replikációhoz - köti a K5 és K12 diacetilált H4-et, és a naszcens kromatinhoz toborozza.³⁰⁴ *Hat1* null mutáns egér embrionális fibroblaszt sejtekben számos bromodóment tartalmazó fehérje depletált, míg a Topoizomeráz 2 α és 2 β szintje megemelkedik.¹⁷² A topoizomerázok és a PCNA megváltozott jelenléte utalhat kromatin szerveződésbeli hibára a *Hat1* hiánya esetén, melyet saját kísérleteink is alátámasztani látszanak. Pozíció effektus variegációs teszttel kimutattuk, hogy a *Hat1* részt vehet a zárt kromatin szerkezet kialakításában és fenntartásában. Ezért a *Hat1* deléció génexpresszióban megnyilvánuló hatásait is vizsgáltuk *Drosophila* embriókban. Érdekes módon azt tapasztaltuk, hogy több, mint 2000 gén expressziós szintje mutatott szignifikáns változást vad típusú embriókhoz képest. Ezen eltérések kétharmada megemelkedett génexpressziót (upregulációt), egyharmada pedig csökkent génexpressziót (downregulációt) mutatott. Ezeket az adatokat összehasonlítva a modENCODE fejlődési RNS szekvencia adataival^{288 292} azt találtuk, hogy a *Hat1* mutánsokban emelkedett expressziót mutató gének nagy része korai embriókban mutat magasabb expressziót, míg a csökkent expressziót mutató gének többsége későbbi embrionális stádiumokban rendelkezik magasabb expressziós szinttel. Ez alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a változások nagy része egy fejlődési késés következménye lehet, feltételezhetően egy replikációra és/vagy kromatin érésre kifejtett negatív hatás eredményeként. Azok közül a gének közül, amelyeknek expressziós változása nem magyarázható ezzel a fejlődési csúszással (a változást mutató gének kb. 17%-a), a *Hat1* deléciós mutáns embriókban megemelkedett génexpressziót mutatók többnyire egyedfejlődési folyamatokban, míg a csökkent génexpressziót mutatók metabolikus folyamatokban résztvevő faktorok.

Kísérletsorozatunkban vizsgáltuk azt is, hogy a *Hat1* hiszton acetiltrenszeráz enzimnek van-e valamilyen hatása a mutáns Huntingtin fehérje kiváltotta neurodegenerációra a Huntington-kór *Drosophila* modelljében, mivel bár a hiszton acetilációnak a betegségben játszott szerepét régóta vizsgálják, a *Hat1* szerepére vonatkozó kísérleti adatok nem álltak rendelkezésre. A *Hat1* delécióval kapcsolatos eredményeink alapján elképzelhető, hogy mint az más tanulmányokban is szerepelt és amint saját kromatin szerveződési vizsgálatunk - mely szerint a *Hat1* PEV szuppresszor hatású - is alátámasztani látszik, a *Hat1* egy zártabb kromatin szerkezet kialakításában vagy fenntartásában vehet részt. Ez lehet az oka annak, hogy a *Hat1* részleges hiánya csökkentette a Huntington-kór kiváltotta neurodegeneráció mértékét. Ez a neuronális túlélésre kifejtett hatás ellentétes irányú a nukleáris hiszton acetiltransferázoknak (*dCBP/nejire* és *Pcaf/gcn5*) a Huntington-kór modellekben megfigyelt hatásával.^{293 296} Feltételezésünk szerint a *Hat1* deléció következtében jelenlévő csökkent H4K5 és K12 acetiláció olyan módon lehet pozitív hatással a neurodegenerációra Huntington-kór modellben, hogy mint azt a His4r kísérleteinkben tapasztaltuk, a nem acetilált hiszton fehérjék magasabb szinten vannak jelen a sejtekben és az acetiláció hiányában előfordulhat, hogy ezeknek a hiszton fehérjéknek a kromatinba épülése lassul, vagy gátolt, ami magyarázhatja az általunk vizsgált *Hat1* deléciós embriók fejlődési csúszását is, illetve a pozíció effektus variegációs tesztjeink során tapasztalt nyitottabb kromatin szerkezetet is. Elképzelhető, hogy ebben főként a K12 acetilációnak lehet szerepe és ezért volt a

feltételezhetően aktív transzkripciós helyeken szerepet játszó His4r fehérje K12 módosításainknak letális hatása *muslica* HD modellben.

His4r variáns hiszton fehérjék acetilációs módosításainak hatása Huntington-kór modellben

Egyes hiszton deacetiláz enzimek gátlása enyhítő hatással van a Huntington-kór modellekben megfigyelhető fenotípusokra^{259 260 256 255 252 254}, feltehetően legalább részben a hiszton fehérjék acetilációs szintjének módosítása által. Az azonban nem feltárt, hogy mely hisztonok melyik aminosavainak módosításai bírnak jelentőséggel ebben a folyamatban. Ezért célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk a H4 hisztonnal megegyező aminosav sorrendű His4r hiszton különböző acetilációs állapotainak hatását a Huntington-kór *muslica* modelljében.

Annak vizsgálatára, hogy a hiszton deacetilázok gátlása esetén, és saját kísérleteinkben a Hat1 hiánya esetén, a mutáns Htt okozta tünetek enyhülésében mely hiszton pozícióra gyakorolt hatás játszhat szerepet, olyan kísérletet terveztünk, melynek során a His4r hiszton fehérje egyes acetilálható lizinjeinek szerepét vizsgáltuk pontmutációk segítségével. Glutamin cserével acetilált, arginin cserével pedig módosítatlan lizineket mimikáltunk az 5-ös, 8-as, 12-es és 16-os pozíciókban. Választásunk azért esett a His4r fehérje vizsgálatára, mert aminosav szekvenciája megegyezik a kanonikus H4 hiszontéval, azonban a kanonikus génklaszteren kívül, csak egy kópiában található meg a genomban és a hiszton gén klaszterben található hisztonoktól eltérően kifejeződése nem kapcsolódik a replikációval. Az általunk vizsgálni kívánt módosításokat hordozó *His4r* pontmutáns vektor konstrukciókat úgy terveztük meg, hogy tartalmazzák az intronikus régiókat, hogy a His4r-nek a kanonikus H4 hiszton fehérjétől esetlegesen eltérő, splicing szintjén megvalósuló expressziós szabályozása megmaradjon. A H3.3 hiszton variánsok esetén megfigyelhető, hogy a kanonikus H3 hiszton a transzkripciósan aktív génszakaszokon cserélődik le²⁹⁴. Feltételezzük, hogy ez a H4 - His4r fehérjékre is igaz lehet, azaz, hogy a His4r lecserélheti a H4 hiszton posztreplicatív sejtekben az aktív géneken. Azt feltételeztük, hogy ezen tényezők következtében az életképességet kevésbé befolyásoló, elsősorban az aktív génekre korlátozott hatású, jól vizsgálható modell rendszert hozunk létre.

Az UAS-His4r pontmutáns transzgéneket hordozó *Drosophila* törzseket validáltuk a beépült transzgen szekvenálásával, az RNS és fehérje expressziójuk szintjének tesztelésével és az expresszált fehérjék sejten belüli lokalizációjának vizsgálatával. A szekvenciák minden esetben hordozták a megfelelő szubsztitúciót. Az RNS expresszió a transzgénekről megfelelő volt és nem mutatott egymáshoz képest számottevő eltérést. Azonban a fehérje expressziós szint vizsgálata során azt az érdekes eredményt kaptuk, hogy az acetilációt mimikáló módosítások minden esetben alacsonyabb fehérje szintet mutattak a módosítatlan lizint mimikáló argininnel helyettesített változatuknál. Ennek oka valószínűleg valamilyen fehérje stabilitási eltérés, a módosítás következtében megváltozhatott a fehérjék expressziója vagy féléletideje. Ennek ellenére a fehérje lokalizációs vizsgálat minden esetben azt mutatta, hogy a His4r transzgenikus fehérjék bejutnak a sejtmagba.

A H4 N-terminális része szerepet játszik a nukleáris transzport folyamatban. A H3 és H4 kompetál a Kap123 / IPO4 importinhoz kötődésben. A H4 K16 a második lizin-kötő zsebhez

képes kapcsolódni és ennek a pozíciónak a glutaminra változtatása, vagyis a pozitív töltés semlegesítése, csökkenti a H4 affinitását az inportinhoz. A H4 K5 és K12 hasonló mutációja még jobban lecsökkenti a H4 affinitását a Kap123 / IPO4 -hez, tehát ezek a pozíciók szintén szerepet játszanak a karyopherin felismerésben.¹¹² Egyes eredmények szerint a H4 K5 és K12 acetiláció inkább gátolja, mintsem elősegíti a nukleáris importot.^{300 112} Amennyiben a H4 N-terminális lizinjeinek acetilált állapota akadályozza a nukleáris transzport folyamatot, az magyarázatul szolgálhat arra, hogy az acetilációt mimikáló módosítások miért vannak alacsonyabb mennyiségben jelen a sejtekben western blot eredményeink szerint. Elképzelhető, hogy ezeknek a fehérjéknek gyorsabb a lebontása, hogy ne akadályozzák a H3:H4 komplexek sejtmagba jutását.

A validálást követő első kísérleteink a transzgénnek fenotípusra gyakorolt hatásának tesztelésére irányultak. Az *UAS-His4r* transzgénnek neuronális expressziójának nem volt hatása az egyedek életképességére és önmagukban nem okoztak retinális neuronpusztulást. Tehát a Huntington-kór *Drosophila* modelljében való tesztelés során tapasztalható fenotípusbeli eltérések a betegségre kifejtett specifikus hatásnak tulajdoníthatóak.

A mutáns *Huntingtin* (*mHtt* – *UAS-HttQ120*) és *UAS-His4r* transzgént együttesen expresszáló egyedeken életképesség, élettartam és neurodegenerációs vizsgálatot hajtottunk végre. A *mHtt* és az *UAS-His4r* együttes expressziójának hatására romlott az egyedek életképessége, a csak *mHtt*-t expresszáló „beteg” kontroll állatokhoz képest. Azonban a vad típusú *UAS-His4r* és *mHtt* transzgént expresszáló kategóriánál jobb életképességet és hosszabb élettartamot mutattak a K8Q és K16Q módosításokat hordozó *UAS-His4r* transzgént expresszáló egyedek. A neurodegenerációs vizsgálat során a K5Q, K16Q és K16R módosítások mutattak pozitív hatást.

Eredményeink azt mutatják, hogy a K5R módosítás szignifikánsan rontotta az életképességet *Drosophila* HD modellben, a K5Q módosítás pedig szignifikánsan jótékony hatással volt a neurodegenerációra (a K5R módosítás hatásának vizsgálatát a neurodegenerációra nem tudtuk elvégezni az egyedek nagymértékű életképesség és élettartam csökkenése miatt). A H4K5 acetilációról egérben leírták, hogy szerepet játszik a memória folyamatokban és a H4K5ac korrelál a hippocampusban a génexpresszióval.³⁰⁵ Ami magyarázatul szolgálhat arra, hogy a His4r-K5Q acetilációt mimikáló módosítás neuronális expressziója pozitív hatással volt a Huntington-kór okozta acetiláció csökkenésre.

A K8R módosítás HD modellben az egyedek szignifikáns életképesség csökkenését okozta, míg a K8Q módosítás javított az egyedek életképességén és élettartamán is. A H4K8 acetilációról leírták, hogy szükséges a kromatin dekompacktálódáshoz a replikáció során, ugyanis *S. pombe*-ban a H4 K8R hiszton expresszió részlegesen akadályozta a kromatin dekondenzációt.³⁰⁶ Ez magyarázhatja a His4r-K8Q acetilációt mimikáló módosítás pozitív hatását, ami lehetséges, hogy Huntington-kór kiváltotta transzkripcionális diszreguláció mérséklésén keresztül valósul meg.

A H4K12 acetilációról szintén leírták, hogy szükséges a kromatin dekompacktálódáshoz a replikáció során, ugyanis *S. pombe*-ban a H4 K12R hiszton expresszió (a H4 K8R módosításhoz hasonlóan) részlegesen akadályozta a kromatin dekondenzációt.³⁰⁶ A H4K12 acetilációs jelet összefüggésbe hozták a kor-függő memória károsodással is.³⁰⁷ Továbbá HD

egér modellben általános H4K12ac csökkenés volt jellemző a hippocampális agyi régiókon, ezért a neuronális H4K12 deacetiláció egy biomarkere lehet a hippocampális degenerációval összefüggésben álló epigenetikai diszregulációnak.²⁶³ Ezért elképzelhető, hogy a H4K12 dinamikus acetilációs szabályozása olyan fontos szerepet játszik a megfelelő neuronális működésben, hogy az általunk létrehozott His4r-K12R és K12Q módosítások expressziója ezért nem életképes HD modellben.

A H4K16 pozícióról felfedezték, hogy részt vesz a magasabb szerveződésű kromatin struktúra kialakulásában és acetilációja gátolja többek között a 30 nm-es rost formálódást *in vitro*. A H4K16ac valószínűsíthetően csökkenti az ISWI kromatin átrendező faktor és a nukleosóma közötti kölcsönhatást is.³⁰⁸ Ezért lehetséges, hogy az általunk vizsgált His4r-K16Q módosítás pozitív hatása csak az alacsony fehérje szintnek köszönhető, azonban a His4r-K16R acetilálatlan állapotot mimikáló módosítás expressziójának neurodegenerációt szignifikánsan enyhítő hatása ezen a kromatin szerveződésben betöltött szerepen keresztül hathat.

A CBP/p300 specifikusan acetilálja a H2A és H2B minden acetilálható pozícióját, a H3 K14, K18 (és kisebb mértékben a K23 pozíciót is), valamint a H4 K5, K8 pozíciókat (és kisebb mértékben a K12 és K16 pozíciót is). A Pcaf elsősorban H3K14 acetilációt végez, de H4K8 acetilációs aktivitása is van.³⁰⁹ Ezekről az enzimekről már bizonyítást nyert, hogy szerepet játszanak a Huntington-kór pathogenezisében. A deacetiláz gátlók, amelyek a Sir2 vagy Rpd3 hiszton deacetilázokon keresztül hatva csökkentik a CBP/p300 és Pcaf csapódását és az acetiláció csökkenése révén kialakuló neurodegeneráció mértékét, elképzelhető, hogy összefüggésbe hozhatóak az általunk vizsgált acetilációt mimikáló His4r transzgenek pozitív hatásával, elsősorban a His4r-K8Q módosítással. Így lehetséges, hogy a dCBP és Pcaf által kialakított H4K8 acetiláció fenntartásán keresztül fejtik ki jótékony hatásukat a hiszton deacetiláz gátlók, ami magyarázatul szolgálna a His4r-K8Q expresszió pozitív és a His4r-K8R módosítás életképességet és élettartamot negatívan befolyásoló hatására *Drosophila* HD modellben.

A Huntington-kór okozta hiszton acetilációs változások csökkentésére széles spektrumú hiszton deacetiláz gátlókat (fenilbutirát, valproinsav, SAHA) alkalmaznak a klinikumban. Ha a betegség patomechanizmusában szerepet játszó hiszton pozíciókat célzottan lehetne kezelni, az hatékonyabb terápiás lehetőséget nyújthatna kevesebb szükségtelen mellékhatással. A H4 / His4r K8 pozíció lehet egy ilyen potenciális target a jövőben. Továbbá a Hat1 gátlásával feltehetően a kromatin szerkezet nyitottabbá válásán keresztül megvalósuló Huntington-kórra kifejtett neurodegenerációt enyhítő hatás szintén egy hatásos lehetőségnek tűnhet.

VI. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Bodai Lászlónak, hogy irányította munkámat és lehetőséget adott arra, hogy kutatócsoportjában dolgozzak.

Köszönöm Dr. Zsindely Nórának a hasznos szakmai tanácsait, melyekkel segítette kísérleteimet.

Köszönet illeti a kutatócsoport minden jelenlegi és volt tagját, aki segítséget nyújtott munkám során. Közülük is szeretném kiemelni Neller Alexandrát és Korbai Szabinát, akik kísérletesen is hozzájárultak a disszertációm eredményeihez.

Köszönöm továbbá korábbi munkatársaimnak és csoporttársaimnak – Nagy Ágotának, Jipa Andrásnak, Németh Brigittának és Váradi Orsolyának, hogy hasznos ötleteikkel és támogatásukkal segítettek e hosszú út megtétele során.

Mindemellett köszönöm családomnak - Gschwindt Attilának, Varga Dánielnek, Vargáné Koplányi Tündének és Varga Tibornak - a biztatást és támogatást.

A disszertáció alapját képező kutatás a GINOP-2.3.2-15-2016-00032, a GINOP-2.3.2-15-2016-00034 és az OTKA K-112294 pályázatok támogatásával készült.

VII. Irodalomjegyzék

1. Fazary, A. E., Ju, Y.-H. & Abd-Rabboh, H. S. M. How does chromatin package DNA within nucleus and regulate gene expression? *Int. J. Biol. Macromol.* **101**, 862–881 (2017).
2. Fyodorov, D. V., Zhou, B.-R., Skoultchi, A. I. & Bai, Y. Emerging roles of linker histones in regulating chromatin structure and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **19**, 192–206 (2018).
3. Alan Wolffe. *Chromatin: Structure and Function*. (Elsevier, 2000). doi:10.1016/B978-0-12-761914-9.X5000-4.
4. Sandman, K., Pereira, S. L. & Reeve, J. N. Diversity of prokaryotic chromosomal proteins and the origin of the nucleosome. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **54**, 1350–1364 (1998).
5. Vernet, G., Sala-Rovira, M., Maeder, M., Jacques, F. & Herzog, M. Basic nuclear proteins of the histone-less eukaryote *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa): two-dimensional electrophoresis and DNA-binding properties. *Biochim. Biophys. Acta* **1048**, 281–289 (1990).
6. Balhorn, R. The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biol.* **8**, 227 (2007).
7. van Holde, K. & Zlatanova, J. The nucleosome core particle: does it have structural and physiologic relevance? *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* **21**, 776–780 (1999).
8. Marzluff, W. F. & Duronio, R. J. Histone mRNA expression: multiple levels of cell cycle regulation and important developmental consequences. *Curr. Opin. Cell Biol.* **14**, 692–699 (2002).
9. Dominski, Z. & Marzluff, W. F. Formation of the 3' end of histone mRNA. *Gene* **239**, 1–14 (1999).
10. Borun, T. W., Gabrielli, F., Ajiro, K., Zweidler, A. & Baglioni, C. Further evidence of transcriptional and translational control of histone messenger RNA during the HeLa S3 cycle. *Cell* **4**, 59–67 (1975).
11. Arents, G., Burlingame, R. W., Wang, B. C., Love, W. E. & Moudrianakis, E. N. The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 10148–10152 (1991).
12. Luger, K., Mäder, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F. & Richmond, T. J. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389**, 251–260 (1997).
13. Schroth, G. P., Yau, P., Imai, B. S., Gatewood, J. M. & Bradbury, E. M. A NMR study of mobility in the histone octamer. *FEBS Lett.* **268**, 117–120 (1990).
14. Fletcher, T. M. & Hansen, J. C. The nucleosomal array: structure/function relationships. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **6**, 149–188 (1996).
15. Arents, G. & Moudrianakis, E. N. The histone fold: a ubiquitous architectural motif utilized in DNA compaction and protein dimerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 11170–11174 (1995).

16. Burton, D. R. *et al.* The interaction of core histones with DNA: equilibrium binding studies. *Nucleic Acids Res.* **5**, 3643–3663 (1978).
17. Prunell, A. Nucleosome reconstitution on plasmid-inserted poly(dA) . poly(dT). *EMBO J.* **1**, 173–179 (1982).
18. Widlund, H. R. *et al.* Identification and characterization of genomic nucleosome-positioning sequences. *J. Mol. Biol.* **267**, 807–817 (1997).
19. Aviles, F. J., Chapman, G. E., Kneale, G. G., Crane- Robinson, C. & Bradbury, E. M. The Conformation of Histone H5. *Eur. J. Biochem.* **88**, 363–371 (1978).
20. Brown, D. T., Izard, T. & Misteli, T. Mapping the interaction surface of linker histone H1(0) with the nucleosome of native chromatin in vivo. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**, 250–255 (2006).
21. Thoma, F. & Koller, T. Influence of histone H1 on chromatin structure. *Cell* **12**, 101–107 (1977).
22. Maze, I., Noh, K.-M., Soshnev, A. A. & Allis, C. D. Every amino acid matters: essential contributions of histone variants to mammalian development and disease. *Nat. Rev. Genet.* **15**, 259–271 (2014).
23. Costanzi, C. & Pehrson, J. R. Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female mammals. *Nature* **393**, 599–601 (1998).
24. Malik, H. S. & Henikoff, S. Phylogenomics of the nucleosome. *Nat. Struct. Biol.* **10**, 882–891 (2003).
25. Chen, P. *et al.* H3.3 actively marks enhancers and primes gene transcription via opening higher-ordered chromatin. *Genes Dev.* **27**, 2109–2124 (2013).
26. Shelby, R. D., Monier, K. & Sullivan, K. F. Chromatin assembly at kinetochores is uncoupled from DNA replication. *J. Cell Biol.* **151**, 1113–1118 (2000).
27. Yoda, K. *et al.* Human centromere protein A (CENP-A) can replace histone H3 in nucleosome reconstitution in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 7266–7271 (2000).
28. Black, B. E. *et al.* Centromere identity maintained by nucleosomes assembled with histone H3 containing the CENP-A targeting domain. *Mol. Cell* **25**, 309–322 (2007).
29. Allshire, R. C. & Karpen, G. H. Epigenetic regulation of centromeric chromatin: old dogs, new tricks? *Nat. Rev. Genet.* **9**, 923–937 (2008).
30. Akhmanova, A., Miedema, K. & Hennig, W. Identification and characterization of the *Drosophila* histone H4 replacement gene. *FEBS Lett.* **388**, 219–222 (1996).
31. Holmes, W. F. *et al.* Coordinate control and selective expression of the full complement of replication-dependent histone H4 genes in normal and cancer cells. *J. Biol. Chem.* **280**, 37400–37407 (2005).
32. Long, M. *et al.* A novel histone H4 variant H4G regulates rDNA transcription in breast cancer. *Nucleic Acids Res.* **47**, 8399–8409 (2019).
33. Terme, J.-M. *et al.* Histone H1 variants are differentially expressed and incorporated into chromatin during differentiation and reprogramming to pluripotency. *J. Biol. Chem.* **286**, 35347–35357 (2011).
34. Hergeth, S. P. & Schneider, R. The H1 linker histones: multifunctional proteins beyond the nucleosomal core particle. *EMBO Rep.* **16**, 1439–1453 (2015).
35. Strahl, B. D. & Allis, C. D. The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**, 41–45 (2000).

36. Turner, B. M. Cellular memory and the histone code. *Cell* **111**, 285–291 (2002).
37. Carlberg, C. & Molnár, F. The Histone Code. in *Human Epigenomics* (eds. Carlberg, C. & Molnár, F.) 75–88 (Springer, 2018). doi:10.1007/978-981-10-7614-5_5.
38. Finch, J. T. & Klug, A. Solenoidal model for superstructure in chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **73**, 1897–1901 (1976).
39. Fillion, G. J. *et al.* Systematic protein location mapping reveals five principal chromatin types in Drosophila cells. *Cell* **143**, 212–224 (2010).
40. Ebert, A., Lein, S., Schotta, G. & Reuter, G. Histone modification and the control of heterochromatic gene silencing in Drosophila. *Chromosome Res. Int. J. Mol. Supramol. Evol. Asp. Chromosome Biol.* **14**, 377–392 (2006).
41. Greil, F., de Wit, E., Bussemaker, H. J. & van Steensel, B. HP1 controls genomic targeting of four novel heterochromatin proteins in Drosophila. *EMBO J.* **26**, 741–751 (2007).
42. Czermin, B. *et al.* Physical and functional association of SU(VAR)3-9 and HDAC1 in Drosophila. *EMBO Rep.* **2**, 915–919 (2001).
43. Tie, F., Prasad-Sinha, J., Birve, A., Rasmuson-Lestander, Å. & Harte, P. J. A 1-Megadalton ESC/E(Z) Complex from Drosophila That Contains Polycomblike and RPD3. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 3352–3362 (2003).
44. Fauvarque, M. O. *et al.* Dominant modifiers of the polyhomeotic extra-sex-combs phenotype induced by marked P element insertional mutagenesis in Drosophila. *Genet. Res.* **78**, 137–148 (2001).
45. Chintapalli, V. R., Wang, J. & Dow, J. A. T. Using FlyAtlas to identify better Drosophila melanogaster models of human disease. *Nat. Genet.* **39**, 715–720 (2007).
46. Wang, Z. *et al.* Genome-wide mapping of HATs and HDACs reveals distinct functions in active and inactive genes. *Cell* **138**, 1019–1031 (2009).
47. Zhang, P. *et al.* Structure of human MRG15 chromo domain and its binding to Lys36-methylated histone H3. *Nucleic Acids Res.* **34**, 6621–6628 (2006).
48. Martínez-Balbás, M. A., Tsukiyama, T., Gdula, D. & Wu, C. Drosophila NURF-55, a WD repeat protein involved in histone metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 132–137 (1998).
49. Tie, F., Furuyama, T., Prasad-Sinha, J., Jane, E. & Harte, P. J. The Drosophila Polycomb Group proteins ESC and E(Z) are present in a complex containing the histone-binding protein p55 and the histone deacetylase RPD3. *Dev. Camb. Engl.* **128**, 275–286 (2001).
50. MacAlpine, H. K., Gordân, R., Powell, S. K., Hartemink, A. J. & MacAlpine, D. M. Drosophila ORC localizes to open chromatin and marks sites of cohesin complex loading. *Genome Res.* **20**, 201–211 (2010).
51. Allfrey, V. G., Faulkner, R. & Mirsky, A. E. ACETYLATION AND METHYLATION OF HISTONES AND THEIR POSSIBLE ROLE IN THE REGULATION OF RNA SYNTHESIS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **51**, 786–794 (1964).
52. Lu, X., Wang, L., Yu, C., Yu, D. & Yu, G. Histone Acetylation Modifiers in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Front. Cell. Neurosci.* **9**, (2015).
53. Dhalluin, C. *et al.* Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature* **399**, 491–496 (1999).

54. Jacobson, R. H., Ladurner, A. G., King, D. S. & Tjian, R. Structure and function of a human TAFII250 double bromodomain module. *Science* **288**, 1422–1425 (2000).
55. Owen, D. J. *et al.* The structural basis for the recognition of acetylated histone H4 by the bromodomain of histone acetyltransferase gcn5p. *EMBO J.* **19**, 6141–6149 (2000).
56. Fujisawa, T. & Filippakopoulos, P. Functions of bromodomain-containing proteins and their roles in homeostasis and cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18**, 246–262 (2017).
57. Verdin, E. & Ott, M. 50 years of protein acetylation: from gene regulation to epigenetics, metabolism and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **16**, 258–264 (2015).
58. Turner, B. M. Histone acetylation as an epigenetic determinant of long-term transcriptional competence. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **54**, 21–31 (1998).
59. Berger, S. L. Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **12**, 142–148 (2002).
60. Neely, K. E. & Workman, J. L. Histone acetylation and chromatin remodeling: which comes first? *Mol. Genet. Metab.* **76**, 1–5 (2002).
61. Sun, X.-J., Man, N., Tan, Y., Nimer, S. D. & Wang, L. The Role of Histone Acetyltransferases in Normal and Malignant Hematopoiesis. *Front. Oncol.* **5**, (2015).
62. Marmorstein, R. & Zhou, M.-M. Writers and readers of histone acetylation: structure, mechanism, and inhibition. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **6**, a018762 (2014).
63. Yamaguchi, Y. *et al.* AML1 is functionally regulated through p300-mediated acetylation on specific lysine residues. *J. Biol. Chem.* **279**, 15630–15638 (2004).
64. Wang, L. *et al.* The leukemogenicity of AML1-ETO is dependent on site-specific lysine acetylation. *Science* **333**, 765–769 (2011).
65. Gu, W. & Roeder, R. G. Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* **90**, 595–606 (1997).
66. Vervoorts, J. *et al.* Stimulation of c-MYC transcriptional activity and acetylation by recruitment of the cofactor CBP. *EMBO Rep.* **4**, 484–490 (2003).
67. Santander, V. S. *et al.* Tubulin must be acetylated in order to form a complex with membrane Na(+),K (+)-ATPase and to inhibit its enzyme activity. *Mol. Cell. Biochem.* **291**, 167–174 (2006).
68. Ivanov, D. *et al.* Eco1 is a novel acetyltransferase that can acetylate proteins involved in cohesion. *Curr. Biol. CB* **12**, 323–328 (2002).
69. Buerki, C. *et al.* Functional relevance of novel p300-mediated lysine 314 and 315 acetylation of RelA/p65. *Nucleic Acids Res.* **36**, 1665–1680 (2008).
70. Roth, S. Y., Denu, J. M. & Allis, C. D. Histone acetyltransferases. *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 81–120 (2001).
71. Bowers, E. M. *et al.* Virtual ligand screening of the p300/CBP histone acetyltransferase: identification of a selective small molecule inhibitor. *Chem. Biol.* **17**, 471–482 (2010).
72. Voss, A. K. & Thomas, T. MYST family histone acetyltransferases take center stage in stem cells and development. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* **31**, 1050–1061 (2009).
73. Chen, H. *et al.* Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300. *Cell* **90**, 569–580 (1997).

74. Spencer, T. E. *et al.* Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature* **389**, 194–198 (1997).
75. Blanco-García, N., Asensio-Juan, E., de la Cruz, X. & Martínez-Balbás, M. A. Autoacetylation regulates P/CAF nuclear localization. *J. Biol. Chem.* **284**, 1343–1352 (2009).
76. Carrozza, M. J., Utley, R. T., Workman, J. L. & Côté, J. The diverse functions of histone acetyltransferase complexes. *Trends Genet. TIG* **19**, 321–329 (2003).
77. Lee, K. K. & Workman, J. L. Histone acetyltransferase complexes: one size doesn't fit all. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 284–295 (2007).
78. Jeanmougin, F., Wurtz, J. M., Le Douarin, B., Chambon, P. & Losson, R. The bromodomain revisited. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 151–153 (1997).
79. Mujtaba, S., Zeng, L. & Zhou, M.-M. Structure and acetyl-lysine recognition of the bromodomain. *Oncogene* **26**, 5521–5527 (2007).
80. Wang, X. & Hayes, J. J. Acetylation Mimics within Individual Core Histone Tail Domains Indicate Distinct Roles in Regulating the Stability of Higher-Order Chromatin Structure. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 227–236 (2008).
81. Fujimoto, H. *et al.* A possible overestimation of the effect of acetylation on lysine residues in KQ mutant analysis. *J. Comput. Chem.* **33**, 239–246 (2012).
82. Alvarez, F. *et al.* Sequential establishment of marks on soluble histones H3 and H4. *J. Biol. Chem.* **286**, 17714–17721 (2011).
83. Campos, E. I. *et al.* The program for processing newly synthesized histones H3.1 and H4. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 1343–1351 (2010).
84. Han, J., Zhou, H., Li, Z., Xu, R.-M. & Zhang, Z. Acetylation of lysine 56 of histone H3 catalyzed by RTT109 and regulated by ASF1 is required for replisome integrity. *J. Biol. Chem.* **282**, 28587–28596 (2007).
85. Parthun, M. R., Widom, J. & Gottschling, D. E. The major cytoplasmic histone acetyltransferase in yeast: links to chromatin replication and histone metabolism. *Cell* **87**, 85–94 (1996).
86. Verreault, A., Kaufman, P. D., Kobayashi, R. & Stillman, B. Nucleosomal DNA regulates the core-histone-binding subunit of the human Hat1 acetyltransferase. *Curr. Biol. CB* **8**, 96–108 (1998).
87. Cook, A. J. L., Gurard-Levin, Z. A., Vassias, I. & Almouzni, G. A specific function for the histone chaperone NASP to fine-tune a reservoir of soluble H3-H4 in the histone supply chain. *Mol. Cell* **44**, 918–927 (2011).
88. Groth, A. *et al.* Regulation of replication fork progression through histone supply and demand. *Science* **318**, 1928–1931 (2007).
89. Laskey, R. A., Honda, B. M., Mills, A. D. & Finch, J. T. Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. *Nature* **275**, 416–420 (1978).
90. Adkins, M. W., Howar, S. R. & Tyler, J. K. Chromatin disassembly mediated by the histone chaperone Asf1 is essential for transcriptional activation of the yeast PHO5 and PHO8 genes. *Mol. Cell* **14**, 657–666 (2004).
91. Belotserkovskaya, R. *et al.* FACT facilitates transcription-dependent nucleosome alteration. *Science* **301**, 1090–1093 (2003).

92. Park, Y.-J. & Luger, K. Histone chaperones in nucleosome eviction and histone exchange. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **18**, 282–289 (2008).
93. Bowman, A. *et al.* sNASP and ASF1A function through both competitive and compatible modes of histone binding. *Nucleic Acids Res.* **45**, 643–656 (2017).
94. Murzina, N. V. *et al.* Structural basis for the recognition of histone H4 by the histone-chaperone RbAp46. *Struct. Lond. Engl.* **1993** **16**, 1077–1085 (2008).
95. Song, J.-J., Garlick, J. D. & Kingston, R. E. Structural basis of histone H4 recognition by p55. *Genes Dev.* **22**, 1313–1318 (2008).
96. English, C. M., Adkins, M. W., Carson, J. J., Churchill, M. E. A. & Tyler, J. K. Structural basis for the histone chaperone activity of Asf1. *Cell* **127**, 495–508 (2006).
97. Natsume, R. *et al.* Structure and function of the histone chaperone CIA/ASF1 complexed with histones H3 and H4. *Nature* **446**, 338–341 (2007).
98. Hartl, F. U. & Hayer-Hartl, M. Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 574–581 (2009).
99. Rivera, C. *et al.* Methylation of histone H3 lysine 9 occurs during translation. *Nucleic Acids Res.* **43**, 9097–9106 (2015).
100. Saavedra, F. *et al.* PP32 and SET/TAF-I β proteins regulate the acetylation of newly synthesized histone H4. *Nucleic Acids Res.* **45**, 11700–11710 (2017).
101. Jasencakova, Z. *et al.* Replication stress interferes with histone recycling and predeposition marking of new histones. *Mol. Cell* **37**, 736–743 (2010).
102. Loyola, A., Bonaldi, T., Roche, D., Imhof, A. & Almouzni, G. PTMs on H3 variants before chromatin assembly potentiate their final epigenetic state. *Mol. Cell* **24**, 309–316 (2006).
103. Stewart, M. Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 195–208 (2007).
104. Baake, M., Bäuerle, M., Doenecke, D. & Albig, W. Core histones and linker histones are imported into the nucleus by different pathways. *Eur. J. Cell Biol.* **80**, 669–677 (2001).
105. Mühlhäusser, P., Müller, E.-C., Otto, A. & Kutay, U. Multiple pathways contribute to nuclear import of core histones. *EMBO Rep.* **2**, 690–696 (2001).
106. Xu, D., Farmer, A. & Chook, Y. M. Recognition of nuclear targeting signals by Karyopherin- β proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **20**, 782–790 (2010).
107. Lee, B. J. *et al.* Rules for nuclear localization sequence recognition by karyopherin beta 2. *Cell* **126**, 543–558 (2006).
108. Chook, Y. M. & Süel, K. E. Nuclear import by karyopherin- β s: recognition and inhibition. *Biochim. Biophys. Acta* **1813**, 1593–1606 (2011).
109. Mosammaparast, N., Guo, Y., Shabanowitz, J., Hunt, D. F. & Pemberton, L. F. Pathways mediating the nuclear import of histones H3 and H4 in yeast. *J. Biol. Chem.* **277**, 862–868 (2002).
110. Soniat, M., Cağatay, T. & Chook, Y. M. Recognition Elements in the Histone H3 and H4 Tails for Seven Different Importins. *J. Biol. Chem.* **291**, 21171–21183 (2016).
111. Yoon, J. *et al.* Integrative Structural Investigation on the Architecture of Human Importin4_Histone H3/H4_Asf1a Complex and Its Histone H3 Tail Binding. *J. Mol. Biol.* **430**, 822–841 (2018).

112. An, S., Yoon, J., Kim, H., Song, J.-J. & Cho, U.-S. Structure-based nuclear import mechanism of histones H3 and H4 mediated by Kap123. *eLife* **6**, (2017).
113. Campos, E. I. *et al.* Analysis of the Histone H3.1 Interactome: A Suitable Chaperone for the Right Event. *Mol. Cell* **60**, 697–709 (2015).
114. Greiner, M., Caesar, S. & Schlenstedt, G. The histones H2A/H2B and H3/H4 are imported into the yeast nucleus by different mechanisms. *Eur. J. Cell Biol.* **83**, 511–520 (2004).
115. Mosammaparast, N., Ewart, C. S. & Pemberton, L. F. A role for nucleosome assembly protein 1 in the nuclear transport of histones H2A and H2B. *EMBO J.* **21**, 6527–6538 (2002).
116. Mosammaparast, N. *et al.* Nuclear import of histone H2A and H2B is mediated by a network of karyopherins. *J. Cell Biol.* **153**, 251–262 (2001).
117. Krude, T. Chromatin: Nucleosome assembly during DNA replication. *Curr. Biol.* **5**, 1232–1234 (1995).
118. Kaufman, P. D. & Botchan, M. R. Assembly of nucleosomes: do multiple assembly factors mean multiple mechanisms? *Curr. Opin. Genet. Dev.* **4**, 229–235 (1994).
119. Smith, S. & Stillman, B. Purification and characterization of CAF-I, a human cell factor required for chromatin assembly during DNA replication in vitro. *Cell* **58**, 15–25 (1989).
120. Kaufman, P. D., Kobayashi, R., Kessler, N. & Stillman, B. The p150 and p60 subunits of chromatin assembly factor I: a molecular link between newly synthesized histones and DNA replication. *Cell* **81**, 1105–1114 (1995).
121. Tyler, J. K., Bulger, M., Kamakaka, R. T., Kobayashi, R. & Kadonaga, J. T. The p55 subunit of Drosophila chromatin assembly factor 1 is homologous to a histone deacetylase-associated protein. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 6149–6159 (1996).
122. Shibahara, K. & Stillman, B. Replication-dependent marking of DNA by PCNA facilitates CAF-1-coupled inheritance of chromatin. *Cell* **96**, 575–585 (1999).
123. Kadyrova, L. Y., Rodrigues Blanco, E. & Kadyrov, F. A. Human CAF-1-dependent nucleosome assembly in a defined system. *Cell Cycle* **12**, 3286–3297 (2013).
124. Mattioli, F. *et al.* DNA-mediated association of two histone-bound complexes of yeast Chromatin Assembly Factor-1 (CAF-1) drives tetrasome assembly in the wake of DNA replication. *eLife* **6**, (2017).
125. Sauer, P. V. *et al.* Insights into the molecular architecture and histone H3-H4 deposition mechanism of yeast Chromatin assembly factor 1. *eLife* **6**, (2017).
126. Brennan, L. D., Forties, R. A., Patel, S. S. & Wang, M. D. DNA looping mediates nucleosome transfer. *Nat. Commun.* **7**, 13337 (2016).
127. Chang, H.-W., Pandey, M., Kulaeva, O. I., Patel, S. S. & Studitsky, V. M. Overcoming a nucleosomal barrier to replication. *Sci. Adv.* **2**, e1601865 (2016).
128. Foltman, M. *et al.* Eukaryotic replisome components cooperate to process histones during chromosome replication. *Cell Rep.* **3**, 892–904 (2013).
129. Huang, H. *et al.* A unique binding mode enables MCM2 to chaperone histones H3-H4 at replication forks. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **22**, 618–626 (2015).
130. Ishimi, Y., Komamura-Kohno, Y., Arai, K. & Masai, H. Biochemical Activities Associated with Mouse Mcm2 Protein. *J. Biol. Chem.* **276**, 42744–42752 (2001).

131. Richet, N. *et al.* Structural insight into how the human helicase subunit MCM2 may act as a histone chaperone together with ASF1 at the replication fork. *Nucleic Acids Res.* **43**, 1905–1917 (2015).
132. Annunziato, A. T. Split decision: what happens to nucleosomes during DNA replication? *J. Biol. Chem.* **280**, 12065–12068 (2005).
133. Madamba, E. V., Berthet, E. B. & Francis, N. J. Inheritance of Histones H3 and H4 during DNA Replication In Vitro. *Cell Rep.* **21**, 1361–1374 (2017).
134. Cosgrove, M. S., Boeke, J. D. & Wolberger, C. Regulated nucleosome mobility and the histone code. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 1037–1043 (2004).
135. Mersfelder, E. L. & Parthun, M. R. The tale beyond the tail: histone core domain modifications and the regulation of chromatin structure. *Nucleic Acids Res.* **34**, 2653–2662 (2006).
136. Yan, Q. *et al.* BBAP monoubiquitylates histone H4 at lysine 91 and selectively modulates the DNA damage response. *Mol. Cell* **36**, 110–120 (2009).
137. Zhang, L., Eugeni, E. E., Parthun, M. R. & Freitas, M. A. Identification of novel histone post-translational modifications by peptide mass fingerprinting. *Chromosoma* **112**, 77–86 (2003).
138. Garcea, R. L. & Alberts, B. M. Comparative studies of histone acetylation in nucleosomes, nuclei, and intact cells. Evidence for special factors which modify acetylase action. *J. Biol. Chem.* **255**, 11454–11463 (1980).
139. Sures, I. & Gallwitz, D. Histone-specific acetyltransferases from calf thymus. Isolation, properties, and substrate specificity of three different enzymes. *Biochemistry* **19**, 943–951 (1980).
140. Wiegand, R. C. & Brutlag, D. L. Histone acetylase from *Drosophila melanogaster* specific for H4. *J. Biol. Chem.* **256**, 4578–4583 (1981).
141. Richman, R., Chicoine, L. G., Collini, M. P., Cook, R. G. & Allis, C. D. Micronuclei and the cytoplasm of growing *Tetrahymena* contain a histone acetylase activity which is highly specific for free histone H4. *J. Cell Biol.* **106**, 1017–1026 (1988).
142. López-Rodas, G., Georgieva, E. I., Sendra, R. & Loidl, P. Histone acetylation in *Zea mays*. I. Activities of histone acetyltransferases and histone deacetylases. *J. Biol. Chem.* **266**, 18745–18750 (1991).
143. López-Rodas, G., Tordera, V., Sánchez del Pino, M. M. & Franco, L. Subcellular localization and nucleosome specificity of yeast histone acetyltransferases. *Biochemistry* **30**, 3728–3732 (1991).
144. Mingarro, I., Sendra, R., Salvador, M. L. & Franco, L. Site specificity of pea histone acetyltransferase B in vitro. *J. Biol. Chem.* **268**, 13248–13252 (1993).
145. Brownell, J. E. & Allis, C. D. Special HATs for special occasions: linking histone acetylation to chromatin assembly and gene activation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **6**, 176–184 (1996).
146. Louie, A. J., Candido, E. P. & Dixon, G. H. Enzymatic modifications and their possible roles in regulating the binding of basic proteins to DNA and in controlling chromosomal structure. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **38**, 803–819 (1974).
147. Ruiz-Carrillo, A., Wangh, L. J. & Allfrey, V. G. Processing of newly synthesized histone molecules. *Science* **190**, 117–128 (1975).

148. Jackson, V., Shires, A., Tanphaichitr, N. & Chalkley, R. Modifications to histones immediately after synthesis. *J. Mol. Biol.* **104**, 471–483 (1976).
149. Annunziato, A. T. & Seale, R. L. Histone deacetylation is required for the maturation of newly replicated chromatin. *J. Biol. Chem.* **258**, 12675–12684 (1983).
150. Chicoine, L. G., Schulman, I. G., Richman, R., Cook, R. G. & Allis, C. D. Nonrandom utilization of acetylation sites in histones isolated from *Tetrahymena*. Evidence for functionally distinct H4 acetylation sites. *J. Biol. Chem.* **261**, 1071–1076 (1986).
151. Sobel, R. E., Cook, R. G., Perry, C. A., Annunziato, A. T. & Allis, C. D. Conservation of deposition-related acetylation sites in newly synthesized histones H3 and H4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 1237–1241 (1995).
152. Parthun, M. R. Hat1: the emerging cellular roles of a type B histone acetyltransferase. *Oncogene* **26**, 5319–5328 (2007).
153. Kuo, M. H. *et al.* Transcription-linked acetylation by Gcn5p of histones H3 and H4 at specific lysines. *Nature* **383**, 269–272 (1996).
154. Benson, L. J. *et al.* Modifications of H3 and H4 during chromatin replication, nucleosome assembly, and histone exchange. *J. Biol. Chem.* **281**, 9287–9296 (2006).
155. Kleff, S., Andrulis, E. D., Anderson, C. W. & Sternglanz, R. Identification of a gene encoding a yeast histone H4 acetyltransferase. *J. Biol. Chem.* **270**, 24674–24677 (1995).
156. Eberharter, A., Lechner, T., Goralik-Schramel, M. & Loidl, P. Purification and characterization of the cytoplasmic histone acetyltransferase B of maize embryos. *FEBS Lett.* **386**, 75–81 (1996).
157. Chang, L. *et al.* Histones in transit: cytosolic histone complexes and diacetylation of H4 during nucleosome assembly in human cells. *Biochemistry* **36**, 469–480 (1997).
158. Imhof, A. & Wolffe, A. P. Purification and properties of the *Xenopus* Hat1 acetyltransferase: association with the 14-3-3 proteins in the oocyte nucleus. *Biochemistry* **38**, 13085–13093 (1999).
159. Lusser, A. *et al.* Analysis of the histone acetyltransferase B complex of maize embryos. *Nucleic Acids Res.* **27**, 4427–4435 (1999).
160. Ahmad, A., Takami, Y. & Nakayama, T. Distinct regions of the chicken p46 polypeptide are required for its in vitro interaction with histones H2B and H4 and histone acetyltransferase-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **279**, 95–102 (2000).
161. Ahmad, A., Nagamatsu, N., Kouriki, H., Takami, Y. & Nakayama, T. Leucine zipper motif of chicken histone acetyltransferase-1 is essential for in vivo and in vitro interactions with the p48 subunit of chicken chromatin assembly factor-1. *Nucleic Acids Res.* **29**, 629–637 (2001).
162. Banumathy, G. *et al.* Human UBN1 is an ortholog of yeast Hpc2p and has an essential role in the HIRA/ASF1a chromatin-remodeling pathway in senescent cells. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 758–770 (2009).
163. Poveda, A. *et al.* Hif1 is a component of yeast histone acetyltransferase B, a complex mainly localized in the nucleus. *J. Biol. Chem.* **279**, 16033–16043 (2004).
164. Makowski, A. M., Dutnall, R. N. & Annunziato, A. T. Effects of acetylation of histone H4 at lysines 8 and 16 on activity of the Hat1 histone acetyltransferase. *J. Biol. Chem.* **276**, 43499–43502 (2001).

165. Barman, H. K. *et al.* Histone acetyltransferase-1 regulates integrity of cytosolic histone H3-H4 containing complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **373**, 624–630 (2008).
166. Ai, X. & Parthun, M. R. The nuclear Hat1p/Hat2p complex: a molecular link between type B histone acetyltransferases and chromatin assembly. *Mol. Cell* **14**, 195–205 (2004).
167. Tagami, H., Ray-Gallet, D., Almouzni, G. & Nakatani, Y. Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis. *Cell* **116**, 51–61 (2004).
168. Saade, E. *et al.* Analysis of interaction partners of H4 histone by a new proteomics approach. *Proteomics* **9**, 4934–4943 (2009).
169. Ejlassi-Lassalette, A., Mocquard, E., Arnaud, M.-C. & Thiriet, C. H4 replication-dependent diacetylation and Hat1 promote S-phase chromatin assembly in vivo. *Mol. Biol. Cell* **22**, 245–255 (2011).
170. Drané, P., Ouararhni, K., Depaux, A., Shuaib, M. & Hamiche, A. The death-associated protein DAXX is a novel histone chaperone involved in the replication-independent deposition of H3.3. *Genes Dev.* **24**, 1253–1265 (2010).
171. Tscherner, M., Stappler, E., Hnisz, D. & Kuchler, K. The histone acetyltransferase Hat1 facilitates DNA damage repair and morphogenesis in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* **86**, 1197–1214 (2012).
172. Agudelo Garcia, P. A. *et al.* Identification of multiple roles for histone acetyltransferase 1 in replication-coupled chromatin assembly. *Nucleic Acids Res.* **45**, 9319–9335 (2017).
173. Benson, L. J. *et al.* Properties of the type B histone acetyltransferase Hat1: H4 tail interaction, site preference, and involvement in DNA repair. *J. Biol. Chem.* **282**, 836–842 (2007).
174. Wu, H. *et al.* Structural basis for substrate specificity and catalysis of human histone acetyltransferase 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 8925–8930 (2012).
175. Boltengagen, M. *et al.* A novel role for the histone acetyltransferase Hat1 in the CENP-A/CID assembly pathway in *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Res.* **44**, 2145–2159 (2016).
176. Westhorpe, F. G. & Straight, A. F. Functions of the centromere and kinetochore in chromosome segregation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **25**, 334–340 (2013).
177. Westhorpe, F. G., Fuller, C. J. & Straight, A. F. A cell-free CENP-A assembly system defines the chromatin requirements for centromere maintenance. *J. Cell Biol.* **209**, 789–801 (2015).
178. Shang, W.-H. *et al.* Acetylation of histone H4 lysine 5 and 12 is required for CENP-A deposition into centromeres. *Nat. Commun.* **7**, 1–13 (2016).
179. Nagarajan, P. *et al.* Histone acetyl transferase 1 is essential for mammalian development, genome stability, and the processing of newly synthesized histones H3 and H4. *PLoS Genet.* **9**, e1003518 (2013).
180. Kelly, T. J., Qin, S., Gottschling, D. E. & Parthun, M. R. Type B histone acetyltransferase Hat1p participates in telomeric silencing. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 7051–7058 (2000).
181. Qin, S. & Parthun, M. R. Histone H3 and the Histone Acetyltransferase Hat1p Contribute to DNA Double-Strand Break Repair. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 8353–8365 (2002).

182. Chen, L.-F., Zhou, A. S. & West, A. E. Transcribing the connectome: roles for transcription factors and chromatin regulators in activity-dependent synapse development. *J. Neurophysiol.* **118**, 755–770 (2017).
183. Canter, R. G., Penney, J. & Tsai, L.-H. The road to restoring neural circuits for the treatment of Alzheimer's disease. *Nature* **539**, 187–196 (2016).
184. Abeliovich, A. & Gitler, A. D. Defects in trafficking bridge Parkinson's disease pathology and genetics. *Nature* **539**, 207–216 (2016).
185. Taylor, J. P., Brown, R. H. & Cleveland, D. W. Decoding ALS: from genes to mechanism. *Nature* **539**, 197–206 (2016).
186. Wyss-Coray, T. Ageing, neurodegeneration and brain rejuvenation. *Nature* **539**, 180–186 (2016).
187. Gitler, A. D., Dhillon, P. & Shorter, J. Neurodegenerative disease: models, mechanisms, and a new hope. *Dis. Model. Mech.* **10**, 499–502 (2017).
188. Zoghbi, H. Y. & Orr, H. T. Glutamine repeats and neurodegeneration. *Annu. Rev. Neurosci.* **23**, 217–247 (2000).
189. Cleary, J. D. & Ranum, L. P. W. Repeat associated non-ATG (RAN) translation: new starts in microsatellite expansion disorders. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **26**, 6–15 (2014).
190. Knowles, T. P. J., Vendruscolo, M. & Dobson, C. M. The amyloid state and its association with protein misfolding diseases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 384–396 (2014).
191. Pearl, L. H., Schierz, A. C., Ward, S. E., Al-Lazikani, B. & Pearl, F. M. G. Therapeutic opportunities within the DNA damage response. *Nat. Rev. Cancer* **15**, 166–180 (2015).
192. Paull, T. T. Mechanisms of ATM Activation. *Annu. Rev. Biochem.* **84**, 711–738 (2015).
193. McKinnon, P. J. DNA repair deficiency and neurological disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **10**, 100–112 (2009).
194. Bourgeron, T. From the genetic architecture to synaptic plasticity in autism spectrum disorder. *Nat. Rev. Neurosci.* **16**, 551–563 (2015).
195. Lardenoije, R. *et al.* The epigenetics of aging and neurodegeneration. *Prog. Neurobiol.* **131**, 21–64 (2015).
196. Akbarian, S., Beeri, M. S. & Haroutunian, V. Epigenetic determinants of healthy and diseased brain aging and cognition. *JAMA Neurol.* **70**, 711–718 (2013).
197. Amir, R. E. *et al.* Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat. Genet.* **23**, 185–188 (1999).
198. Ramocki, M. B. *et al.* Autism and other neuropsychiatric symptoms are prevalent in individuals with MeCP2 duplication syndrome. *Ann. Neurol.* **66**, 771–782 (2009).
199. Alpatov, R. *et al.* A chromatin-dependent role of the fragile X mental retardation protein FMRP in the DNA damage response. *Cell* **157**, 869–881 (2014).
200. Poisson, A. *et al.* Chromatin remodeling dysfunction extends the etiological spectrum of schizophrenia: a case report. *BMC Med. Genet.* **21**, 10 (2020).
201. Sanchez-Mut, J. V. *et al.* Human DNA methylomes of neurodegenerative diseases show common epigenomic patterns. *Transl. Psychiatry* **6**, e718 (2016).
202. Hodges, A. *et al.* Regional and cellular gene expression changes in human Huntington's disease brain. *Hum. Mol. Genet.* **15**, 965–977 (2006).

203. Narayanan, M. *et al.* Common dysregulation network in the human prefrontal cortex underlies two neurodegenerative diseases. *Mol. Syst. Biol.* **10**, 743 (2014).
204. Prudencio, M. *et al.* Distinct brain transcriptome profiles in C9orf72-associated and sporadic ALS. *Nat. Neurosci.* **18**, 1175–1182 (2015).
205. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. *Cell* **72**, 971–983 (1993).
206. Telenius, H. *et al.* Somatic and gonadal mosaicism of the Huntington disease gene CAG repeat in brain and sperm. *Nat. Genet.* **6**, 409–414 (1994).
207. Landles, C. & Bates, G. P. Huntingtin and the molecular pathogenesis of Huntington's disease. Fourth in molecular medicine review series. *EMBO Rep.* **5**, 958–963 (2004).
208. Wexler, A., Wild, E. J. & Tabrizi, S. J. George Huntington: a legacy of inquiry, empathy and hope. *Brain J. Neurol.* **139**, 2326–2333 (2016).
209. Craufurd, D., Thompson, J. C. & Snowden, J. S. Behavioral changes in Huntington Disease. *Neuropsychiatry. Neuropsychol. Behav. Neurol.* **14**, 219–226 (2001).
210. Rosenblatt, A. *et al.* The association of CAG repeat length with clinical progression in Huntington disease. *Neurology* **66**, 1016–1020 (2006).
211. Rosas, H. D. *et al.* Cerebral cortex and the clinical expression of Huntington's disease: complexity and heterogeneity. *Brain J. Neurol.* **131**, 1057–1068 (2008).
212. Roos, R. A. C. Huntington's disease: a clinical review. *Orphanet J. Rare Dis.* **5**, 40 (2010).
213. Dorsey, E. R. *et al.* Natural history of Huntington disease. *JAMA Neurol.* **70**, 1520–1530 (2013).
214. Papoutsis, M., Labuschagne, I., Tabrizi, S. J. & Stout, J. C. The cognitive burden in Huntington's disease: pathology, phenotype, and mechanisms of compensation. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* **29**, 673–683 (2014).
215. Kaltenbach, L. S. *et al.* Huntingtin interacting proteins are genetic modifiers of neurodegeneration. *PLoS Genet.* **3**, e82 (2007).
216. Borrell-Pagès, M., Zala, D., Humbert, S. & Saudou, F. Huntington's disease: from huntingtin function and dysfunction to therapeutic strategies. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **63**, 2642–2660 (2006).
217. Schulte, J. & Littleton, J. T. The biological function of the Huntingtin protein and its relevance to Huntington's Disease pathology. *Curr. Trends Neurol.* **5**, 65–78 (2011).
218. Zuccato, C., Valenza, M. & Cattaneo, E. Molecular mechanisms and potential therapeutic targets in Huntington's disease. *Physiol. Rev.* **90**, 905–981 (2010).
219. Goehler, H. *et al.* A protein interaction network links GIT1, an enhancer of huntingtin aggregation, to Huntington's disease. *Mol. Cell* **15**, 853–865 (2004).
220. Cui, L. *et al.* Transcriptional repression of PGC-1 α by mutant huntingtin leads to mitochondrial dysfunction and neurodegeneration. *Cell* **127**, 59–69 (2006).
221. Dunah, A. W. *et al.* Sp1 and TAFII130 transcriptional activity disrupted in early Huntington's disease. *Science* **296**, 2238–2243 (2002).
222. Li, S.-H. *et al.* Interaction of Huntington disease protein with transcriptional activator Sp1. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 1277–1287 (2002).

223. Gervais, F. G. *et al.* Recruitment and activation of caspase-8 by the Huntingtin-interacting protein Hip-1 and a novel partner Hippi. *Nat. Cell Biol.* **4**, 95–105 (2002).
224. Vecchi, M. & Di Fiore, P. P. It's HIP to be a hub. *J. Cell Biol.* **170**, 169–171 (2005).
225. Godin, J. D. *et al.* Huntingtin is required for mitotic spindle orientation and mammalian neurogenesis. *Neuron* **67**, 392–406 (2010).
226. Keryer, G. *et al.* Ciliogenesis is regulated by a huntingtin-HAP1-PCM1 pathway and is altered in Huntington disease. *J. Clin. Invest.* **121**, 4372–4382 (2011).
227. Colin, E. *et al.* Huntingtin phosphorylation acts as a molecular switch for anterograde/retrograde transport in neurons. *EMBO J.* **27**, 2124–2134 (2008).
228. Caviston, J. P. & Holzbaur, E. L. F. Huntingtin as an essential integrator of intracellular vesicular trafficking. *Trends Cell Biol.* **19**, 147–155 (2009).
229. Gauthier, L. R. *et al.* Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules. *Cell* **118**, 127–138 (2004).
230. Caviston, J. P., Ross, J. L., Antony, S. M., Tokito, M. & Holzbaur, E. L. F. Huntingtin facilitates dynein/dynactin-mediated vesicle transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 10045–10050 (2007).
231. Yingling, J. *et al.* Neuroepithelial stem cell proliferation requires LIS1 for precise spindle orientation and symmetric division. *Cell* **132**, 474–486 (2008).
232. Ochaba, J. *et al.* Potential function for the Huntingtin protein as a scaffold for selective autophagy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 16889–16894 (2014).
233. Rui, Y.-N. *et al.* Huntingtin functions as a scaffold for selective macroautophagy. *Nat. Cell Biol.* **17**, 262–275 (2015).
234. Kim, M. *et al.* Drosophila Fip200 is an essential regulator of autophagy that attenuates both growth and aging. *Autophagy* **9**, 1201–1213 (2013).
235. Labbadia, J. & Morimoto, R. I. Huntington's disease: underlying molecular mechanisms and emerging concepts. *Trends Biochem. Sci.* **38**, 378–385 (2013).
236. Saudou, F. & Humbert, S. The Biology of Huntingtin. *Neuron* **89**, 910–926 (2016).
237. Seredenina, T. & Luthi-Carter, R. What have we learned from gene expression profiles in Huntington's disease? *Neurobiol. Dis.* **45**, 83–98 (2012).
238. Kuhn, A. *et al.* Mutant huntingtin's effects on striatal gene expression in mice recapitulate changes observed in human Huntington's disease brain and do not differ with mutant huntingtin length or wild-type huntingtin dosage. *Hum. Mol. Genet.* **16**, 1845–1861 (2007).
239. Vashishtha, M. *et al.* Targeting H3K4 trimethylation in Huntington disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, E3027–3036 (2013).
240. Achour, M. *et al.* Neuronal identity genes regulated by super-enhancers are preferentially down-regulated in the striatum of Huntington's disease mice. *Hum. Mol. Genet.* **24**, 3481–3496 (2015).
241. Langfelder, P. *et al.* Integrated genomics and proteomics define huntingtin CAG length-dependent networks in mice. *Nat. Neurosci.* **19**, 623–633 (2016).
242. Nucifora, F. C. *et al.* Interference by huntingtin and atrophin-1 with cbp-mediated transcription leading to cellular toxicity. *Science* **291**, 2423–2428 (2001).
243. Bae, B.-I. *et al.* p53 mediates cellular dysfunction and behavioral abnormalities in Huntington's disease. *Neuron* **47**, 29–41 (2005).

244. Ravache, M., Weber, C., Mérienne, K. & Trottier, Y. Transcriptional activation of REST by Sp1 in Huntington's disease models. *PloS One* **5**, e14311 (2010).
245. Moumné, L., Betuing, S. & Caboche, J. Multiple Aspects of Gene Dysregulation in Huntington's Disease. *Front. Neurol.* **4**, 127 (2013).
246. Besnard, A., Galan-Rodriguez, B., Vanhoutte, P. & Caboche, J. Elk-1 a transcription factor with multiple facets in the brain. *Front. Neurosci.* **5**, 35 (2011).
247. West, A. E. & Greenberg, M. E. Neuronal activity-regulated gene transcription in synapse development and cognitive function. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, (2011).
248. Lopez-Atalaya, J. P. & Barco, A. Can changes in histone acetylation contribute to memory formation? *Trends Genet. TIG* **30**, 529–539 (2014).
249. Labadorf, A. *et al.* RNA Sequence Analysis of Human Huntington Disease Brain Reveals an Extensive Increase in Inflammatory and Developmental Gene Expression. *PloS One* **10**, e0143563 (2015).
250. Seong, I. S. *et al.* Huntingtin facilitates polycomb repressive complex 2. *Hum. Mol. Genet.* **19**, 573–583 (2010).
251. von Schimmelfmann, M. *et al.* Polycomb repressive complex 2 (PRC2) silences genes responsible for neurodegeneration. *Nat. Neurosci.* **19**, 1321–1330 (2016).
252. Steffan, J. S. *et al.* Histone deacetylase inhibitors arrest polyglutamine-dependent neurodegeneration in Drosophila. *Nature* **413**, 739–743 (2001).
253. Kazantsev, A. *et al.* A bivalent Huntingtin binding peptide suppresses polyglutamine aggregation and pathogenesis in Drosophila. *Nat. Genet.* **30**, 367–376 (2002).
254. Pallos, J. *et al.* Inhibition of specific HDACs and sirtuins suppresses pathogenesis in a Drosophila model of Huntington's disease. *Hum. Mol. Genet.* **17**, 3767–3775 (2008).
255. Ferrante, R. J. *et al.* Histone deacetylase inhibition by sodium butyrate chemotherapy ameliorates the neurodegenerative phenotype in Huntington's disease mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **23**, 9418–9427 (2003).
256. Hockly, E. *et al.* Suberoylanilide hydroxamic acid, a histone deacetylase inhibitor, ameliorates motor deficits in a mouse model of Huntington's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 2041–2046 (2003).
257. Gardian, G. *et al.* Neuroprotective Effects of Phenylbutyrate in the N171-82Q Transgenic Mouse Model of Huntington's Disease. *J. Biol. Chem.* **280**, 556–563 (2005).
258. Sadri-Vakili, G. *et al.* Histones associated with downregulated genes are hypo-acetylated in Huntington's disease models. *Hum. Mol. Genet.* **16**, 1293–1306 (2007).
259. Sharma, S. & Taliyan, R. Transcriptional dysregulation in Huntington's disease: The role of histone deacetylases. *Pharmacol. Res.* **100**, 157–169 (2015).
260. Mielcarek, M. *et al.* SAHA decreases HDAC 2 and 4 levels in vivo and improves molecular phenotypes in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *PloS One* **6**, e27746 (2011).
261. Igarashi, S. *et al.* Inducible PC12 cell model of Huntington's disease shows toxicity and decreased histone acetylation. *Neuroreport* **14**, 565–568 (2003).
262. McFarland, K. N. *et al.* Genome-wide histone acetylation is altered in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *PloS One* **7**, e41423 (2012).

263. Valor, L. M., Guiretti, D., Lopez-Atalaya, J. P. & Barco, A. Genomic Landscape of Transcriptional and Epigenetic Dysregulation in Early Onset Polyglutamine Disease. *J. Neurosci.* **33**, 10471–10482 (2013).
264. Ryu, H. *et al.* ESET/SETDB1 gene expression and histone H3 (K9) trimethylation in Huntington's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 19176–19181 (2006).
265. Ng, C. W. *et al.* Extensive changes in DNA methylation are associated with expression of mutant huntingtin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 2354–2359 (2013).
266. Biagioli, M. *et al.* Htt CAG repeat expansion confers pleiotropic gains of mutant huntingtin function in chromatin regulation. *Hum. Mol. Genet.* **24**, 2442–2457 (2015).
267. Dong, X. *et al.* The Role of H3K4me3 in Transcriptional Regulation Is Altered in Huntington's Disease. *PloS One* **10**, e0144398 (2015).
268. Kim, M.-O. *et al.* Altered histone monoubiquitylation mediated by mutant huntingtin induces transcriptional dysregulation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **28**, 3947–3957 (2008).
269. McFarland, K. N. *et al.* Genome-wide histone acetylation is altered in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *PloS One* **7**, e41423 (2012).
270. De Souza, R. A. G. *et al.* DNA methylation profiling in human Huntington's disease brain. *Hum. Mol. Genet.* **25**, 2013–2030 (2016).
271. Thomas, B. *et al.* A novel method for detecting 7-methyl guanine reveals aberrant methylation levels in Huntington disease. *Anal. Biochem.* **436**, 112–120 (2013).
272. Wang, F. *et al.* Genome-wide loss of 5-hmC is a novel epigenetic feature of Huntington's disease. *Hum. Mol. Genet.* **22**, 3641–3653 (2013).
273. Deng, Q., Zeng, Q., Qian, Y., Li, C. & Yang, Y. Research on the karyotype and evolution of *Drosophila melanogaster* species group. *J. Genet. Genomics Yi Chuan Xue Bao* **34**, 196–213 (2007).
274. Adams, M. D. *et al.* The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* **287**, 2185–2195 (2000).
275. Myers, E. W. *et al.* A Whole-Genome Assembly of *Drosophila*. *Science* **287**, 2196–2204 (2000).
276. Yamaguchi, M. & Yoshida, H. *Drosophila* as a Model Organism. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1076**, 1–10 (2018).
277. Pandey, U. B. & Nichols, C. D. Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. *Pharmacol. Rev.* **63**, 411–436 (2011).
278. Castle, W. E. Inbreeding, Cross-Breeding and Sterility in *Drosophila*. *Science* **23**, 153–153 (1906).
279. Kaufman, T. C. A Short History and Description of *Drosophila melanogaster* Classical Genetics: Chromosome Aberrations, Forward Genetic Screens, and the Nature of Mutations. *Genetics* **206**, 665–689 (2017).
280. Brand, A. H. & Perrimon, N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Dev. Camb. Engl.* **118**, 401–415 (1993).
281. Duffy, J. B. GAL4 system in *drosophila*: A fly geneticist's swiss army knife. *genesis* **34**, 1–15 (2002).
282. Jackson, G. R. *et al.* Polyglutamine-expanded human huntingtin transgenes induce degeneration of *Drosophila* photoreceptor neurons. *Neuron* **21**, 633–642 (1998).

283. Romero, E. *et al.* Suppression of neurodegeneration and increased neurotransmission caused by expanded full-length huntingtin accumulating in the cytoplasm. *Neuron* **57**, 27–40 (2008).
284. Lee, W.-C. M., Yoshihara, M. & Littleton, J. T. Cytoplasmic aggregates trap polyglutamine-containing proteins and block axonal transport in a *Drosophila* model of Huntington's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 3224–3229 (2004).
285. Marsh, J. L., Pallos, J. & Thompson, L. M. Fly models of Huntington's disease. *Hum. Mol. Genet.* **12 Spec No 2**, R187–193 (2003).
286. Gilestro, G. F. & Cirelli, C. pySolo: a complete suite for sleep analysis in *Drosophila*. *Bioinformatics* **25**, 1466–1467 (2009).
287. Trapnell, C. *et al.* Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nat. Protoc.* **7**, 562–578 (2012).
288. Graveley, B. R. *et al.* The developmental transcriptome of *Drosophila melanogaster*. *Nature* **471**, 473–479 (2011).
289. Graveley, B. R. *et al.* The Developmental Transcriptome of *Drosophila melanogaster*. *Nature* **471**, 473–479 (2011).
290. Peixoto, L. & Abel, T. The role of histone acetylation in memory formation and cognitive impairments. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* **38**, 62–76 (2013).
291. Lim, C. *et al.* Functional Role of CREB-Binding Protein in the Circadian Clock System of *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 4876–4890 (2007).
292. Sandler, J. E. & Stathopoulos, A. Quantitative Single-Embryo Profile of *Drosophila* Genome Activation and the Dorsal-Ventral Patterning Network. *Genetics* **202**, 1575–1584 (2016).
293. Taylor, J. P. *et al.* Aberrant histone acetylation, altered transcription, and retinal degeneration in a *Drosophila* model of polyglutamine disease are rescued by CREB-binding protein. *Genes Dev.* **17**, 1463–1468 (2003).
294. Ahmad, K. & Henikoff, S. The histone variant H3.3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly. *Mol. Cell* **9**, 1191–1200 (2002).
295. Chatterjee, S. *et al.* A novel activator of CBP/p300 acetyltransferases promotes neurogenesis and extends memory duration in adult mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **33**, 10698–10712 (2013).
296. Bodai, L., Pallos, J., Thompson, L. M. & Marsh, J. L. Pcaf modulates polyglutamine pathology in a *Drosophila* model of Huntington's disease. *Neurodegener. Dis.* **9**, 104–106 (2012).
297. Barbaro, B. A. *et al.* Comparative study of naturally occurring huntingtin fragments in *Drosophila* points to exon 1 as the most pathogenic species in Huntington's disease. *Hum. Mol. Genet.* **24**, 913–925 (2015).
298. Faragó, A., Zsindely, N. & Bodai, L. Mutant huntingtin disturbs circadian clock gene expression and sleep patterns in *Drosophila*. *Sci. Rep.* **9**, 7174 (2019).
299. Ciurciu, A., Komonyi, O., Pankotai, T. & Boros, I. M. The *Drosophila* histone acetyltransferase Gcn5 and transcriptional adaptor Ada2a are involved in nucleosomal histone H4 acetylation. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 9413–9423 (2006).

300. Blackwell, J. S., Wilkinson, S. T., Mosammaparast, N. & Pemberton, L. F. Mutational analysis of H3 and H4 N termini reveals distinct roles in nuclear import. *J. Biol. Chem.* **282**, 20142–20150 (2007).
301. Ge, Z. *et al.* Sites of Acetylation on Newly Synthesized Histone H4 Are Required for Chromatin Assembly and DNA Damage Response Signaling. *Mol. Cell. Biol.* **33**, 3286–3298 (2013).
302. Ma, X.-J., Wu, J., Altheim, B. A., Schultz, M. C. & Grunstein, M. Deposition-related sites K5/K12 in histone H4 are not required for nucleosome deposition in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 6693–6698 (1998).
303. Shibahara, K., Verreault, A. & Stillman, B. The N-terminal domains of histones H3 and H4 are not necessary for chromatin assembly factor-1- mediated nucleosome assembly onto replicated DNA in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 7766–7771 (2000).
304. Koo, S. J. *et al.* ATAD2 is an epigenetic reader of newly synthesized histone marks during DNA replication. *Oncotarget* **7**, 70323–70335 (2016).
305. Park, C. S., Rehrauer, H. & Mansuy, I. M. Genome-wide analysis of H4K5 acetylation associated with fear memory in mice. *BMC Genomics* **14**, 539 (2013).
306. Ruan, K. *et al.* Histone H4 acetylation required for chromatin decompaction during DNA replication. *Sci. Rep.* **5**, 1–10 (2015).
307. Peleg, S. *et al.* Altered histone acetylation is associated with age-dependent memory impairment in mice. *Science* **328**, 753–756 (2010).
308. Shogren-Knaak, M. *et al.* Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. *Science* **311**, 844–847 (2006).
309. Schiltz, R. L. *et al.* Overlapping but distinct patterns of histone acetylation by the human coactivators p300 and PCAF within nucleosomal substrates. *J. Biol. Chem.* **274**, 1189–1192 (1999).

VIII. Összefoglalás

A Huntington-kór egy olyan dominánsan öröklődő, késői megjelenésű, progresszív neurodegeneratív betegség, amely minden esetben halálos kimenetelű, és a mai napig nem létezik rá hatásos gyógymód. A *Huntingtin* gén 210 kb hosszúságú, 67 exont tartalmaz. Az első exonban az open reading frame-en belül van egy instabil, polimorf CAG trinukleotid ismétlődés, melynek expansziója funkcionyeréses (gain of function) mutációhoz vezet. Egészséges személyeknél a CAG ismétlődések száma 9-36 között váltakozik. Mutáció következtében a CAG ismétlődések száma 36-121 érték közé emelkedik, ami megváltoztatja a gén funkcióját. Minél hosszabb az ismétlődések száma, annál gyorsabb és súlyosabb lefolyású a betegség.^{206 207} A nagyméretű Huntingtin (Htt) fehérje főként a citoplazmában található meg, azonban hibás proteolitikus hasítások következtében olyan N-terminális fragmentumok keletkeznek, melyek bejutnak a sejtmagba.^{207 208}

A Huntington-kórra jellemző összetett patomechanizmus egyik eleme a génkifejeződés hibás szabályozása, amely részben annak tulajdonítható, hogy a különböző hiszton módosítások is zavart szenvednek. A HD során megfigyelhető hiszton acetilációs zavarokat részben a CREB-binding protein (CBP) és a Pcaf hiszton acetiltranszferáz aktivitású fehérjék kötődése, mHtt aggregátumokba történő csapdázódása okozza.^{242 252} *Drosophila* és egér modellen kimutatták, hogy a hiszton deacetilázok (HDAC) gátlása jótékony hatást fejt ki a HD fenotípusra.^{252 253 254} Azonban jelenleg nem ismert, hogy mely hisztonok milyen aminosavain keresztül érvényesül a széles spektrumú HDAC-k gátlásával megvalósuló tüneteket enyhítő hatás.

A disszertációmban bemutatott kísérletsorozattal azt a célt tűztük ki, hogy megvizsgáljuk a *Drosophila* Hat1 H4 hiszton specifikus hiszton acetiltranszferáz, valamint a H4/His4r acetiláció szerepét normál körülmények között és a mutáns Huntingtin fehérje okozta proteopáthiás stressz esetén is. A Hat1 hiszton acetiltranszferáz funkcióját még nem vizsgálták korábban a Huntington-kórral összefüggésben. Ez az enzim főként a citoplazmában van jelen és a H4 hiszton 5-ös és 12-es lizinjeinek acetilálását végzi, ami egy univerzálisan előforduló diacetilációs jel az eukarióta organizmusokban.¹⁵² A H4 kanonikus hiszton és His4r variáns hiszton fehérje aminosav szinten megegyezik egymással, csak expressziós szabályozásukban lehet eltérés.³⁰ Feltételezhető, hogy a H3 hiszton és annak H3.3 variánsaihoz hasonló módon²⁹⁴, az aktívan átíródó gén régiókban a His4r lecseréli a kanonikus H4 hiszton fehérjét. Ezért a His4r fehérje potenciálisan acetilálható pozícióit terveztük megvizsgálni a Huntington-kór patomechanizmusában szerepet játszó lehetséges epigenetikai targetek keresése céljából.

Kísérleteinkhez a Huntington-kór *Drosophila* modelljét alkalmaztuk, amely bizonyítottan alkalmas a betegség tanulmányozására, ugyanis a meghosszabbodott poliglutamin domént hordozó mutáns Huntingtin fehérje ugyanúgy aggregátumokat képez az egyedek agyában neurodegenerációt okozva, és ezzel hasonló mozgási és cirkadián ritmus zavarokhoz, valamint élettartam csökkenéshez vezetve, mint ami a humán pácienseknél megfigyelhető²⁹⁷

Kísérleteinkhez *Hat1* mutáns valamint *His4r* transzgenikus *Drosophila melanogaster* törzseket hoztunk létre. A *Hat1* funkcionális vizsgálatához P-elem remobilizációval előállítottunk egy *Hat1* deléciós törzset, amelyből a gén kódoló régiója szinte teljesen hiányzik, eltávolítva a HAT domént is, és ennek kísérleti kontrolljaként egy olyan precíz revertáns vonalat, ahol a gén helyreállt a transzpozon kiugrása után. Továbbá létrehoztunk olyan transzgenikus *Drosophila* törzseket, melyekben a *His4r* hiszton variáns fehérje olyan indukálható változatai találhatók, amelyek C-terminális részükön egy FLAG-tag-et hordoznak, az N-terminálisán található acetilálható lizin aminosavak (K5, K8, K12, K16) pontmutációi pedig folytonos acetilált állapotot (lizin (K) – glutamin (Q) csere) vagy módosítatlan állapotot (lizin (K) – arginin (R) csere) mimikálnak. A kísérleteink kontrolljaként előállítottunk egy olyan transzgenikus törzset is, amely a *His4r* gént módosítatlan formában hordozza. Mivel a *Hat1* a vizsgált eukarióta organizmusokban a H4 hiszton 5-ös és 12-es lizinjeinek acetilálását végzi, ezért létrehoztunk egy olyan *His4r* szubsztitúciós törzset is, melyben mind az 5-ös, mint a 12-es lizint kódoló tripletet kicseréltük arginint kifejezőre, (amely módosítatlan állapotot mimikál mindkét pozícióban,) vagyis egy olyan körülményt utánoz, ahol a *Hat1* hiszton acetiltranszferáz nem acetilálja a *His4r* hiszton.

Mind a *Hat1* deléciós mutáns, mind a neuronálisan *UAS-His4r* transzgént expresszáló vonalak életképesnek és fertilisnek bizonyultak. A *Hat1* deléción azonban kismértékű szemileletális fenotípushoz vezetett.

A *His4r* transzgenikus törzsek validálása során a transzgének kifejeződésével kapcsolatban azt állapítottuk meg, hogy míg mRNS szinten nincs jelentős eltérés a kifejeződésük mértékében (ahogy azt a helyspecifikus transzgén integráció esetén vártuk), addig a fehérjék neuronális mennyisége az adott módosítás függvényében változik. Az acetilációt mimikáló glutamin módosítás minden pozíció esetén alacsonyabb fehérje expressziót eredményezett a módosítatlan lizint mimikáló arginin módosításnál. Feltételezhetően valamilyen fehérje expresszió vagy lebontásbeli különbség okozza az acetilált lizint mimikáló módosítások esetén a csökkent fehérje szintet. Ennek ellenére fenotípusbeli különbséget neuronális expresszió esetén nem tapasztaltunk a törzsek között, életképesség csökkenés és neurodegeneráció nem volt megfigyelhető. A transzgenikus, pontmutáns *His4r* fehérjék sejtben belüli lokalizációját fluoreszcens mikroszkópiával vizsgálva megállapítottuk, hogy mindegyik módosított fehérje változat bejutott a sejtmembránba, lokalizációjukban nem volt különbség.

A *Hat1* deléciós mutáns funkcionális vizsgálatának első lépéseként az enzim targetjeinek meghatározására fókuszáltunk. Eredményeink a korábbi megállapításokkal egybecsengenek, a H4 hiszton 5-ös és 12-es lizinjeinek acetilálását végzi, amely aktivitás specifikusnak tűnik erre a két pozícióra (a 8-as pozíció acetilációs állapotában nem történt változás). Meglepő módon 0-6 órás deléciós mutáns embriókban ez az aktivitás csaknem teljesen eltűnik. Továbbá a *Hat1* hiánya a H3 hiszton 18-as lizinjének acetilációs állapotát is befolyásolja, ami viszont egy indirekt hatás eredménye lehet, ugyanis korábbi irodalmi adatok alapján a *Hat1*-nek nincsen H3 specifikus katalitikus aktivitása^{85 175}.

A korábbi elképzelések szerint a H4 K5 és K12 diacetiláció, amely az eukarióta organizmusokban egy univerzális citoplazmatikus hiszton módosítás, szükséges a H4 hiszton sejtmembránba jutásához. Ezért módosítatlan 5-ös és 12-es lizineket mimikáló (lizin - arginin

csere) *His4r* konstrukciót, illetve *Hat1* deléció háttéren vad típusú *His4r* konstrukciót hordozó transzgenikus állatokon teszteltük ezt a hipotézist. Konfokális mikroszkópiával sikerült megállapítanunk, hogy mind a vad típusú *His4r* transzgenikus fehérje a *Hat1* hiánya esetén, mind az acetilálhatatlan *His4r* transzgenikus fehérje vad típusú háttéren sejtmagi lokalizációt mutat. Tehát a K5K12 diacetilációs módosítás nem nélkülözhetetlen a H4 / *His4r* hiszton sejtmagba jutásához.

A *Hat1* deléció hatására jelentkező jelentősebb molekuláris változások ellenére nincs kifejezett hatása sem az állatok hőstressz tűrésére, sem a cirkadián aktivitásukra. Pozíció effektus variegációs tesztünk alapján részt vehet egy zártabb kromatin szerkezet kialakításában vagy fenntartásában. Ezért transzkriptomikai analízist is végeztünk a *Hat1* által befolyásolt génexpressziós változások vizsgálatára. Az RNS expressziós vizsgálat alapján több, mint 2000 gén expressziós mintázata változott meg szignifikánsan az enzim hiányában 6-12 órás embriókban. Ezen génexpressziós változások 2/3-a emelkedett expressziót (upregulációt), 1/3-a pedig csökkent expressziót (downregulációt) mutatott. A változások jelentős része egy fejlődési késésnek tulajdonítható, ami lehet egy megváltozott kromatin szerveződés eredménye, azonban a megemelkedett génexpressziós változások kb. 10%-a, a csökkent génexpressziós változásoknak pedig kb. a 30%-a nem magyarázható ezzel a jelenséggel. Ezek közül a gének közül a biológiai folyamatokban való részvételük szerint a *Hat1* deléció mutáns embriókban megemelkedett expressziójú gének főként fejlődési és transzlációs szabályozók, a lecsökkent expressziójú gének pedig alap metabolizmusban részt vevő faktorokat kódolnak.

A *Hat1*-nek a mutáns Huntingtin kiváltotta proteopátiás stresszre gyakorolt hatását a betegség transzgenikus modelljében tesztelve azt tapasztaltuk, hogy a főként citoplazmatikus *Hat1* részleges hiánya - eltérően az eddig vizsgált nukleáris acetiltranszferáz enzimektől^{252 295} – csökkentette a neurodegeneráció mértékét. Mivel korábbi megállapításaink szerint a *Hat1* részt vehet a zárt kromatin szerkezet kialakításában, ezért elképzelhető, hogy a részleges hiánya esetén kialakuló nyitottabb kromatin szerkezet az oka a tünetek enyhülésének.

A *His4r* szubsztitúciók esetén változatos eredményeket kaptunk. Az *UAS-His4r* transzgént vad típusú formában expresszáló egyedek életképessége is jelentősen csökkent a csak mHtt-t expresszáló „beteg” kontroll egyedekhez képest. Egyik módosított *His4r* transzgént hordozó kategória életképessége sem érte el a csak mHtt fehérjét expresszáló egyedekét, a *His4r* gént vad típusú formában expresszáló egyedeknél azonban a 8-as és a 16-os pozícióban acetilációt mimikáló (lizin - glutamin csere) módosítást hordozók jobb életképességűnek bizonyultak. Az 5-ös pozícióban acetilációt mimikáló módosítást hordozó állatok kis mértékben mutattak rosszabb kikelési arányt a módosítatlan *His4r* gént hordozókhoz képest. A 12-es pozícióban módosítást hordozó egyedek pedig egyáltalán nem keltek ki. Azonban az életképes kategóriák esetén a módosítatlan lizint mimikáló (lizin – arginin csere) módosítás minden esetben gyengébb életképességet mutatott a többi kategóriánál. Az élethossz vizsgálatok alapján szintén a 8-as és 16-os pozíciók változásai tűntek pozitív irányba befolyásoló hatásúnak. A neurodegenerációs vizsgálat során a 16-os pozíció szintén pozitív találat volt, azonban az 5-ös pozíció acetilációt mimikáló módosítása is jótékony hatásúnak bizonyult.

A fenotípusbeli javulások alapján az *UAS-His4r* transzgének közül az 5-ös és a 8-as pozíció acetilációját mimikáló módosítások, valamint a 16-os pozíció tűnnek potenciálisan pozitív hatásúnak a Huntington-kór patogenezisére. Azonban ezek közül az K5Q és K16Q acetilációt mimikáló módosítások fehérje expressziós szintje valamilyen processzingbeli eltérésnek köszönhetően sokkal alacsonyabb más módosított változatokénál. Ezért a fenotípus javulások oka ezekben az esetekben lehet az alacsonyabb mennyiségű fehérje szint. A neurodegenerációs vizsgálatok és a fehérje expressziós adatok alapján úgy tűnik, hogy a His4r-K8 pozíció acetilált állapota és His4r-K16 pozíció acetilálatlan állapota jelentőséggel bírhat a Huntington-kór patomechanizmusában.

IX. Summary

Huntington's disease (HD) is a fatal, dominantly inherited, late-onset, progressive neurodegenerative disorder, for which there is no available cure or effective treatment. The human *Huntingtin* (*HTT*) gene is 210 kb long and consists of 67 exons. In the first exon of *HTT* there is an unstable polymorphic CAG trinucleotide (encoding for glutamine, Q) repeat, which, if expands over a certain repeat length causes gain of function mutation. In healthy individuals the number of CAG repeats are between 9 and 36. If the number of CAG repeats exceeds 36 repeat units, the resulting elongated polyglutamine domain changes the properties of the Huntingtin protein and induce the complex pathogenesis of HD. Longer repeats cause earlier disease onset and more severe symptoms.^{206 207}

The large Huntingtin (Htt) protein is mainly localized to the cytoplasm, but incorrect proteolytic cleavage of mutant Htt (mHtt) results in short N-terminal fragments that can be imported to the nucleus.^{207 208} A main part of the multifaceted pathomechanism of HD is the dysregulation of gene expression, which partially caused by disturbed modification of histones. CREB-binding protein (CBP) and PCAF histone acetyltransferases, among others, bind to mHtt proteins, which leads to incorrect histone acetylation in the HD.^{242 252} In *Drosophila* and mouse HD models some inhibitors of histone deacetylases (HDACs) were shown to ameliorate the HD symptoms previously.^{252 253 254} However, it is still not elucidated that the acetylation state of which lysine residues of which histone proteins might play a crucial role in the alleviating effect of broad spectrum HDAC inhibitors.

In the experiments that form the basis of my Ph.D. thesis our aims were to study the functions of the histone H4 specific *Drosophila* Hat1 histone acetyltransferase and to examine the potential involvement of Hat1 and specific H4/His4r acetylation states in protheopathic stress conditions caused by mutant Huntingtin. The function of Hat1 has not yet been characterized in connection with the Huntington's disease. This enzyme is mainly localized in the cytoplasm and acetylates the 5th and 12th lysines (K) of nascent histone H4. This H4-K5K12 diacetylation is a universal mark in eukaryotic organisms.¹⁵² Canonical H4 and the His4r variant histone proteins have identical amino acid sequences but the regulation of their expression is different.³⁰ We hypothesized, that similarly to the case of histone H3 and its variant H3.3²⁹⁴, canonical H4 histone is replaced by His4r at sites of active gene expression. Based on this assumption we decided to study those lysines of His4r, which can be acetylated to find epigenetic marks that are involved in the pathomechanism of Huntington's disease.

For our experiments I used a *Drosophila* model of HD that was proven to be appropriate to study the cellular aspects of HD pathogenesis. In this model expression of an N-terminal fragment of mHtt leads to effects similar to those characteristic for the human disease: mutant Huntingtin protein forms intracellular aggregates in the brain of flies, cause neurodegeneration, movement and circadian rhythm defects, and reduced lifespan.^{297 298}

We generated *Hat1* mutant and *UAS-His4r* transgenic *Drosophila melanogaster* strains. The *Hat1*^{Δ57} amorphic mutant was generated by P-element remobilization that resulted in the deletion of almost the whole coding sequence of the gene including the HAT domain. For experimental control we chose a precise revertant line in which the gene was restored after

remobilization of the transposon. We also generated transgenic *Drosophila* strains that carry inducible *His4r* histone transgenes that are labeled with a C-terminal FLAG-tag and contain substitutions in their N-terminal tail regions that mimic the acetylated (lysine (K) to glutamine (Q) change) or unacetylated/unmodified forms (lysine to arginine (R) change) of specific lysine residues (K5, K8, K12, K16). For experimental control we made a transgenic line that carries a wild-type (not modified) *His4r* gene. We also made a transgenic line with K5 and K12 double substitutions to arginine (K5R-K12R) to imitate a condition in which the target lysine residues of the Hat1 histone acetyltransferase cannot be acetylated. The *Hat1* mutant and the neuronally expressed *His4r* transgenes were viable and fertile, although loss of *Hat1* caused mild sub-lethality.

During the validation of the *His4r* transgenic strains we found that the expression of the transgenes did not differ at the mRNA level (as we expected because of the site specific integration), but their protein levels if expressed in neurons depended on the specific substitution. The K to Q substitutions that mimic the acetylated state showed lower protein levels in every position than K to R substitutions that mimic unacetylated/unmodified state. Presumably, lower protein levels in the case of acetylation mimetic *His4r* proteins is caused by differences in the protein expression, processing or turnover. However, based on fluorescence microscopy analysis the cellular localization of the various modified *His4r* proteins was alike, all variants showed nuclear localization. To ascertain that the *His4r* point mutant transgenes are not neurotoxic we analyzed the phenotypes of the strains and found that neuronal expression of the various *His4r* mutants did not cause neurodegeneration or reduced viability.

Our first step in the functional analysis of *Hat1* mutant was the identification of the targets of the enzyme. Our results, similar to previous observations in other species, indicate that Hat1 acetylates the K5 and K12 lysine residues of histone H4 and this activity seems to be specific for these positions as the acetylation state of H4K8 did not change. Interestingly, in 0-6 hours old *Hat1* mutant embryos these H4K5 and K12 acetylations almost completely disappeared. Furthermore, lack of Hat1 influenced the acetylation state of the H3K18 residue, that presumably, is an indirect effect because according to previous studies *Drosophila* Hat1 does not have H3 specific catalytic activity^{85 175}.

As cytoplasmic diacetylation of K5 and K12 residues of nascent histone H4 is a universal post-translational histone modification in eukaryotic organisms it was hypothesized that it might be necessary for the nuclear transport of H4. To test this hypothesis we generated a transgenic strain carrying a *His4r-K5RK12R* transgene mimicking unacetylated/unmodified lysine residues at these positions (with lysine to arginine change) and a strain that carries a wild-type *His4r* construct in *Hat1* null background. Using immunofluorescence confocal microscopy we found that both transgenic wild-type *His4r* in *Hat1* null background and transgenic *His4r-K5RK12R* proteins in wild-type background showed correct nuclear localization. Consequently, the K5K12 diacetylation mark is not necessary for the nuclear import of H4 / *His4r* histones.

Despite of the significant molecular changes in *Hat1* mutants, it has no remarkable effects on the heat stress resistance or the circadian rhythm of the flies. Using position effect

variegation analysis we found that Hat1 may play a role in the formation or maintenance of closed chromatin. Therefore, we performed RNA-seq transcriptome analysis to identify and analyze gene expression changes caused by the lack of Hat1. Our data shows that the expression of more than 2000 genes changed significantly in 6-12 hours old *Hat1* null embryos. 2/3 of the genes showing altered expression levels were upregulated, while 1/3 were downregulated. The majority of the observed transcriptional alterations were presumably the consequence of a developmental delay, which could be explained by altered formation and structure of chromatin. However, dysregulated transcription in 10% of the upregulated genes and 30% of the downregulated genes could not be explained by phenomena. Most of the upregulated genes in this group play roles in developmental and translational regulation while the majority of the downregulated genes encode factors that participate in metabolism.

While examining the effects that the mainly cytoplasmic Hat1 exert on mutant Huntingtin induced phenotypes in the transgenic model of the disease we found that, contrary to the previously examined nuclear histone acetyltransferase enzymes^{252 295}, its reduced levels ameliorated neurodegeneration. As we previously found that Hat1 may play a role in the formation of closed chromatin, it is conceivable that a more relaxed chromatin structure caused by reduced levels of Hat1 is the reason for the reduced symptoms.

In the analysis of UAS-His4r epigenetic mark mimetic substitutions we have got diverse results. The co-expression of wild-type His4r transgene along with mHtt reduced lifespan compared to the lifespan of control flies expressing mHtt only. We found that none of the mHtt – His4r^{mimic} co-expressing categories had improved viability compared to mHtt expressing control flies, but flies co-expressing mHtt and acetylated lysine mimicking (lysine to glutamine change) K8Q or K16Q mutated His4r transgenes had better viability than flies co-expressing mHtt and wild-type His4r. The acetylation mimetic K5Q substitution had a modest worsening effect on viability compared to the wild-type His4r transgene expressing flies in the HD model. Both His4r K12Q and K12R modified transgenes were lethal if co-expressed with mHtt. In general, in the case of each tested His4r lysine residue (except for K12 modifications that gave no viable offspring) unacetylated lysine mimetic His4r transgenes had lower viability if co-expressed with mHtt than acetylation mimetic His4r transgenes. Furthermore, His4r K8Q and K16Q acetylation mimetic modifications had also positive effect on lifespan. In neurodegeneration tests we found that besides the K16Q substitution the K5Q modification had a positive effect on the survival of photoreceptor neurons.

Among the post-translational modification mimetic UAS-His4r transgenes the acetylation mimetic K5Q, K8Q and both of the K16 modifications had positive, relieving effect on some of the phenotypes of the HD model flies. However, the His4r K5Q and K16Q proteins showed lower protein levels feasibly due to different protein processing and turnover. Therefore, the reason for the observed positive effects on HD phenotypes in these cases is most likely the lower level of His4r protein. Based on protein expression data and results of the neurodegeneration assays acetylation mimetic His4r-K8Q and the unacetylated mimetic His4r-K16R transgenes had a significant, protein level independent positive effect on the pathomechanisms induced by mutant Htt.

X. Publikációs lista

X.1. A doktori eljárás alapját képező 2 db közlemény

1. Varga, Júlia; Korbai, Szabina; Neller, Alexandra; Zsindely, Nóra; Bodai, László.
Hat1 acetylates histone H4 and modulates the transcriptional program in *Drosophila* embryogenesis.
Scientific Reports 9(1): 17973 (2019)
2. Varga, Júlia; Dér, Nikolett Petra; Zsindely, Nóra; Bodai, László.
Green tea infusion alleviates neurodegeneration induced by mutant Huntingtin in *Drosophila*.
Nutritional Neuroscience, 23(3):183-189. (2020)

X.2. Referált folyóiratban megjelent közlemények [Impakt faktorok összege: 7,961]

X.2.1. A disszertáció témájához kapcsolódó közlemények

Varga, Júlia; Korbai, Szabina; Neller, Alexandra; Zsindely, Nóra; Bodai, László

Hat1 acetylates histone H4 and modulates the transcriptional program in *Drosophila* embryogenesis.
Scientific Reports 9(1): 17973 (2019) [Impakt faktor: 4,011]

X.2.2. Egyéb közlemények

Varga, Júlia; Dér Nikolett Petra; Zsindely, Nóra; Bodai, László.

Green tea infusion alleviates neurodegeneration induced by mutant Huntingtin in *Drosophila*.
Nutritional Neuroscience, 23(3):183-189. (2020) [Impakt faktor: 3,950]

X.3. Egyéb szakmai anyagok

X.3.1. Konferencia előadások (előadóként)

1. Varga, Júlia. Egy feltételezett ubikvitin receptor jellemzése. XXXII. Országos Tudományos Diákköri Konferencia, Biológia Szekció. Pécs, 2015.04.08-10.
2. Varga, Júlia; Deák, Péter; Pál, Margit; Kovács, Levente. Egy feltételezett ubikvitin receptor jellemzése. 16. Kolozsvári Biológus Napok. Kolozsvár, Románia, 2015.04.16-18.
3. Varga, Júlia. Examination of potential epigenetical targets of Huntington's disease in *Drosophila melanogaster*. PhD Conference, SZTE TTIK Biológia Doktori Iskola. (Szeged, 2018. 05.28-30.) In: "Dissertation Summaries", Acta Biologica Szegediensis, 62(1), pp. 83-105. (2018)
4. Varga, Júlia; Korbai, Szabina; Neller, Alexandra; Zsindely, Nóra; Bodai, László. A *Drosophila* Hat1 acetilálja a H4 hisztont és hozzájárul a megfelelő transzkripció profil

kialakulásához az embriogenezis során. XVIII. Genetikai Műhelyek Magyarországon minikonferencia. Szeged, 2019. 09. 12.

Konferencia előadások (társszerzőként)

1. Ürmösi, Adél; Varga, Júlia; Bodai, László. His4r deléció mutáns létrehozása P-elem ugratás segítségével Drosophila melanogasterben. In: Fenesi, A; László, Z; Markó, B (szerk.) 17. Kolozsvári Biológus Napok. Kolozsvár, Románia: Babes-Bolyai Tudományegyetem, (2016) pp. 89-89.

X.3.2. Konferencia poszterek

1. Varga, Júlia; Zsindely, Nóra; Bodai, László. Generation and analysis of mutations of the Drosophila Hat1 gene. Annual Meeting of the Hungarian Biochemical Society. (Szeged, Magyarország: 2016.08.28 -2016.08.31.) In: BIOKÉMIA: A MAGYAR BIOKÉMIAI EGYESÜLET FOLYÓIRATA 15: 3 pp. 66-66. Paper: P65 , 1 p. (2016)

2. Zsindely, Nóra; Varga, Júlia; Bodai, László. Probing the epigenetic background of Huntington's disease using histone PTM mimics. Annual Meeting of the Hungarian Biochemical Society. (Szeged, Magyarország: 2016.08.28 -2016.08.31.) In: BIOKÉMIA: A MAGYAR BIOKÉMIAI EGYESÜLET FOLYÓIRATA 15: 3 pp. 40-40. Paper: P4 , 1 p. (2016)

3. Zsindely, Nóra; Varga, Júlia; Faragó, Anikó; Bodai, László. Exploring the role of histone modifications in Huntington's disease. 2nd Danube Conference on Epigenetics. (Budapest, Magyarország, 2016.10.05-2016.10.08.) In: Tamás, Arányi; Bálint, L Bálint; Petra, Hajkova; Ana, Pombo; Laszlo, Tora (szerk.) 2nd Danube Conference on Epigenetics (2016) p. 57 Paper: P-05

4. Varga, Júlia; Faragó, Anikó; Zsindely, Nóra; Bodai, László. dHat1 acetyltransferase acetylates Histone H4 and modulates gene expression in Drosophila embryos. Hungarian Molecular Life Sciences 2017. (Eger, Magyarország, 2017.03.31-2017.04.02.) In: Zsuzsanna, Heiszler; Róbert, Hohol; Nóra, Éles-Etele (szerk.) Hungarian Molecular Life Sciences 2017 : Programme and Book of abstracts. Budapest, Magyarország : Diamond Congress Ltd., (2017) pp. 208-209.