

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

**Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei**

**Varga Júlia**

**Témavezető: Dr. Bodai László  
tanszékvezető egyetemi docens**

**Szegedi Tudományegyetem  
Természettudományi és Informatikai Kar  
Biológia Doktori Iskola**



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

**2020**

**Szeged**

## Bevezetés

A Huntington-kór (HD) egy dominánsan öröklődő, késői megjelenésű, progresszív neurodegeneratív betegség, amely minden esetben halálos kimenetelű, és a mai napig nem létezik rá hatásos gyógymód. A betegségben érintett *Huntingtin* gén 210 kb hosszúságú, 67 exont tartalmaz. Az első exon kódoló szekvenciájában található egy instabil, polimorf CAG trinukleotid ismétlődés, melynek expanziója funkcionyeréses mutációhoz vezet. Egészséges személyeknél a CAG ismétlődések száma 9-36 között váltakozik. Mutáció következtében a CAG ismétlődések száma 36-121 érték közé emelkedhet, ami megváltoztatja a gén funkcióját. Minél hosszabb az ismétlődések száma, annál gyorsabb és súlyosabb lefolyású a betegség. A nagyméretű Huntingtin (Htt) fehérje főként a citoplazmában található meg, azonban hibás proteolitikus hasítások következtében olyan N-terminális fragmentumok keletkeznek, melyek bejutnak a sejtmagba.

A Huntington-kórra jellemző összetett patomechanizmus egyik eleme a génkifejeződés hibás szabályozása, amely részben annak tulajdonítható, hogy egyes hiszton módosítások zavart szenvednek. A HD során megfigyelhető hiszton acetilációs zavarokat részben a CREB-binding protein (CBP) és a Pcaf hiszton acetiltranszferáz aktivitású fehérjék kötődése, mutáns Huntingtin (mHtt) aggregátumokba történő csapdázódása okozza. *Drosophila* és egér modellen kimutatták, hogy a hiszton deacetilázok (HDAC) gátlása jótékony hatást fejt ki a HD tüneteire. 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 hiszton acetiláció szerepét normál körülmények között és a mutáns Huntingtin fehérje okozta proteopátiás 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. A H4 kanonikus hiszton és His4r variáns hiszton fehérje aminosav szinten megegyezik egymással, csak expressziós szabályozásukban lehet eltérés. Feltételezhető, hogy a H3 hiszton és annak H3.3 variánsaihoz hasonló módon 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 fragmentumok hasonló módon aggregátumokat képeznek az egyedek agyában neurodegenerációt okozva, és ezzel hasonló mozgási és cirkadián ritmus zavarokhoz, valamint élettartam csökkenéshez vezetve, mint ami a humán pácienseknél megfigyelhető.

## Célkitűzések

A *Drosophila* Hat1 általános jellemzése és hatásának vizsgálata a Huntington-kór patogenezisében résztémában a következő célkitűzéseink voltak:

- *Hat1* deléciós mutáns *Drosophila melanogaster* törzset állítunk elő és meghatározzuk a Hat1 enzim hiszton acetilációs targetjeit.
- Megállapítjuk, szükségesek-e a Hat1 által létrehozott hiszton posztranszlációs módosítások a H4 hiszton nukleáris transzportjához.
- Meghatározzuk a Hat1 hiszton acetiltranszferáz génexpresszióra gyakorolt hatását.
- Meghatározzuk a Hat1 hiányának fenotípusos hatását és megvizsgáljuk a Hat1 részleges hiányának a Huntington-kór patogenezisére gyakorolt hatását.

A His4r variáns hiszton fehérjék acetilációs módosításainak hatása a Huntington-kór patomechanizmusára kutatási téma részben a következőket tűztük ki célul:

- Különböző aminosav pozíciókban acetilációt vagy acetilálatlan állapotot mimikáló His4r variáns hiszton fehérjét expresszáló transzgenikus *Drosophila* törzseket hozunk létre és azokat többértően validáljuk.
- Megállapítjuk, hogy a His4r variáns hiszton fehérje különböző acetilációs állapotait mimikáló transz gének expressziója hatással van-e az életképességre és a neuronális pusztulásra.

- Megvizsgáljuk, hogy a His4r variáns hiszton fehérje különböző acetilációs állapotait mimikáló transzgenek expressziója milyen hatással bír a Huntington-kór *Drosophila* modelljében.
- Megvizsgáljuk milyen összefüggésben áll egymással a Hat1 hiányának hatása és a His4r módosítások hatása a Huntington-kór patomechanizmusára.

## Alkalmazott módszerek

- Hat1 deléción létrehozása transzpozon remobilizációval.
- Hat1 mutációk azonosítása PCR-ral.
- Hat1 mutánsok életképességének, élettartamának és fekunditásának vizsgálata.
- Szem pigment koncentrációjának meghatározása spektrofotometriával.
- Cirkadián ritmus és napi aktivitás vizsgálata.
- Hőstressz érzékenység vizsgálata.
- *His4r* *in vitro* mutagenezise.
- *His4r* pontmutáns transzgenikus *Drosophila* törzsek létrehozása.
- Az integrált pontmutáns *His4r* transzgének szekvencia ellenőrzése.
- Idegsejtekben expresszált *His4r* konstrukciók életképességre gyakorolt hatásának vizsgálata.
- Életképesség és élettartam vizsgálatok mutáns Huntingtint expresszáló egyedekben.
- Neurodegeneráció vizsgálata pseudopupil assay-el.
- mRNS szint vizsgálata RT-qPCR-ral.
- Transzkriptomikai vizsgálat RNS szekvenálással.
- Western blot analízis.
- Lárvális nyálmirigyek immunfestése.

## Eredmények összefoglalása

1. 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, melyek a *His4r* hiszton variáns olyan indukálható változatait hordozzák, amelyek C-terminális részükön egy FLAG peptid tag-gel jelöltek, az N-terminális részen található acetilálható lizin aminosavak (K5, K8, K12, K16) pontmutációi pedig folytonos acetilált állapotot (lizin (K) – glutamin (Q) csere) vagy módosíthatlan állapotot (lizin (K) – arginin (R) csere) mimikálnak. A kísérleteink kontrolljaként előállítottunk egy olyan transzgenikus törzset is, amely a *His4r* gént módosíthatlan formában hordozza. Létrehoztunk egy olyan *His4r* szubsztitúciós törzset is, melyben mind az 5-ös, mint a 12-es lizint kódoló tripletet kicseréltük arginint kifejezőre, amely olyan körülményt utánoz, ahol a *Hat1* hiszton acetiltranszferáz nem acetilálja a *His4r* hiszton.
2. Kimutattuk, hogy mind a *Hat1* deléciós mutáns, mind az *UAS-His4r* transzgént idegsejtekben expresszáló muslicák életképesek és fertilisek, a *Hat1* deléció kismértékű szemi-letális fenotípushoz vezetett.
3. Kimutattuk, hogy a neuronokban indukált pontmutáns *His4r* transzgénekről átírt mRNA szintjében nincs jelentős eltérés a

különböző transzgenek között, azonban a fehérjék mennyisége az adott módosítás függvényében változik. Az acetilációt mimikáló K→Q módosítás minden pozíció esetén alacsonyabb fehérje szintet eredményezett a módosítatlan lizint mimikáló K→R módosításnál.

4. A transzgenikus, pontmutáns His4r fehérjék sejten belüli lokalizációját fluoreszcens mikroszkópiával vizsgálva megállapítottuk, hogy mindegyik módosított fehérje változat sejtmagi lokalizációt mutatott, a létrehozott pontmutációk nem akadályozták meg a His4r importját a sejtmagba.
5. Kimutattuk, hogy a His4r transzgen pontmutáns változatainak neuronális expressziója nem okozott életképesség csökkenést vagy neurodegenerációt.
6. A *Hat1* deléciós mutáns vizsgálatával megállapítottuk, hogy a Hat1 szükséges a H4 hiszton K5-ös és K12-es lizinjeinek acetilálásához korai embriókban, míg a K8 acetilációjára nincs hatással. Továbbá megállapítottuk, hogy a Hat1 hiánya a H3 hiszton K18-as lizinjének acetilációs állapotát is befolyásolja, ami irodalmi adatok alapján indirekt hatás eredménye lehet.
7. Megállapítottuk, hogy az eukariótákban általános citoplazmatikus H4-K5K12 diacetiláció nem szükséges a H4 hiszton sejtmagba jutásához. Konfokális mikroszkópiával kimutattuk, hogy mind a vad típusú His4r transzgenikus fehérje a Hat1 hiánya esetén, mind az acetilálhatatlan His4r-K5RK12R transzgenikus fehérje vad típusú háttéren sejtmagi lokalizációt mutat.
8. Megállapítottuk, hogy a *Hat1* hiányának nincs számottevő hatása sem az állatok hőstressz tűrésére, sem a cirkadián aktivitásukra.



9. Pozíció effektus variegáció vizsgálatával kimutattuk, hogy a *Hat1* a zártabb kromatin szerkezet kialakításában vagy fenntartásában vesz részt.
10. RNS-szekvenáláson alapuló transzkriptomikai vizsgálattal kimutattuk, hogy több mint 2000 gén expressziós mintázata változott meg szignifikánsan a *Hat1* enzim hiányában 6-12 órás embriókban. A transzkripció változást mutató gének 2/3-a esetében emelkedett, 1/3-a esetében pedig csökkent a génkifejeződés mértéke. Megállapítottuk, hogy a transzkripció változások jelentős része egy fejlődési késésnek tulajdonítható, azonban a megemelkedett génextpressziós változások kb. 10%-a, a csökkent génextpressziós változásoknak pedig kb. a 30%-a nem magyarázható ezzel a jelenséggel. Ezek közül a gének közül a biológiai folyamatokban való részvételük szerint az *Hat1* deléziós mutáns embriókban megemelkedett expressziójú gének főként fejlődési és translációs szabályozók, a lecsökkent expressziójú gének pedig alap metabolizmusban részt vevő faktorokat kódolnak.
11. A *Hat1*-nek a mutáns Huntingtin kiváltotta proteopátiás stresszre gyakorolt hatását a betegség transzgenikus modelljében vizsgálva megállapítottuk, hogy a főként citoplazmatikus *Hat1* részleges hiánya - eltérően az eddig vizsgált nukleáris acetiltranszferáz enzimektől - csökkentette a neurodegeneráció mértékét. Mivel korábbi megállapításaink szerint a *Hat1* részt vehet a zárt kromatin szerkezet kialakításában, ezért feltételezhető, hogy a részleges hiánya esetén kialakuló nyitottabb kromatin szerkezet az oka a tünetek enyhülésének.

12. A *His4r* neuronális túltermelése hatásainak vizsgálatával megállapítottuk, hogy az *UAS-His4r* transzgént vad típusú formában kifejező egyedek életképessége jelentősen csökkent a csak mHtt-t expresszáló „beteg” kontroll egyedekhez képest. A mHtt mellett a vizsgált *His4r* szubsztitúciós változatokat kifejező transzgenikus állatok közül egyik változat életképessége sem érte el a csak mHtt fehérjét expresszáló egyedekét. A K12-es pozícióban módosítást hordozó egyedek nem voltak életképesek; az életképes kategóriák esetén a módosítatlan lizint mimikáló változat (K→R) minden esetben gyengébb életképességet mutatott a vad típusú *His4r* és az acetilált lizint mimikáló (K→Q) változatoknál. A *His4r* gént vad típusú formában expresszáló egyedeknél az acetilációt mimikáló K8Q és K16Q módosítást hordozók jobb életképességűnek és hosszabb élettartamúnak bizonyultak. Megállapítottuk, hogy a HD modellben megfigyelhető neurodegeneráció mértékét a *His4r* K5Q, K16Q és K16R módosításai is enyhítették.
13. Immunoblot analízissel kimutattuk, hogy a K5Q és K16Q acetilációt mimikáló módosítások fehérje expressziós szintje alacsonyabb más módosított változatokénál, ezért a fenotípus javulásoka ezekben az esetekben feltehetően az alacsonyabb fehérje szint lehet. A neurodegenerációs vizsgálatok és a fehérje expressziós adatok egybevetése alapján a *His4r*-K8 pozíció és a *His4r*-K16 pozíció acetilációs állapota jelentőséggel bírhat a Huntington-kór patomechanizmusában.

## **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.

Hálával tartozom házi védési opponenseimnek, Dr. Sinka Ritának és Dr. Honti Viktornak, a gyors és alapos bírálatért, és hogy hasznos javaslataikkal hozzájárultak, hogy egy színvonalasabb PhD értekezést tudjak bemutatni.

Mindemellett köszönöm családomnak, Gschwindt Attilának, Varga Dánielnek, Vargané 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.

## **Publikációs lista**

*MTMT azonosító: 10053004*

### **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)

**Referált folyóiratban megjelent közlemények** [Impakt faktorok összege: 7,961]

*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]

*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]