

A BigH1 alternatív linker hiszton szerepe a *Drosophila* korai fejlődésben

Doktori értekezés (Ph.D) tézisei

Szabó Anikó

Témavezető:

Prof. Dr. Boros Imre Miklós

egyetemi tanár

Dr. Henn László Dániel

tudományos munkatárs

Biológia Doktori Iskola

Biokémia és Molekuláris biológia Tanszék

Szegedi Tudományegyetem

ELKH Szegedi Biológiai Kutatóközpont



Szeged

2020

BEVEZETÉS

Az embrionális fejlődés kezdete minden élőlény életében kritikus időszak, mely során kialakulnak a felnőtt egyed morfológiai alapjait képező struktúrák. Ezt a folyamatot kezdetben az anyától kapott RNS, fehérje és egyéb molekulák határozzák meg, beleértve a kromatin szerveződéséhez nélkülözhetetlen hiszton fehérjéket. Az állatvilágban jellemzően az embrionális kromatinállomány megfelelő szerveződését egy alternatív linker hiszton H1 fehérje biztosítja, melyet embrió- és/vagy petesejt-specifikus linker hisztonnak nevezünk. A linker hisztonok közötti funkcionális különbségek vizsgálatát megnehezíti, hogy a legtöbb állat számos variánssal rendelkezik, melyek funkcionálisan redundánsak lehetnek.

A *Drosophila melanogaster* ideális modellszervezet a korai embriogenezis során jelen lévő H1 fehérje vizsgálatára, mivel a kanonikus szomatikus H1 mellett csupán egy linker hiszton variánssal rendelkezik, a BigH1 fehérjével. A BigH1-et 2013-ban írták le, mint a korai embriogenezisre jellemző linker hiszton, mely a cellularizációt megelőzően mRNS és fehérje szinten is nagy mennyiségben van jelen a fejlődő embrióban, majd a cellularizációt követően a szintje lecsökken, és átveszi a helyét a szomatikus H1 fehérje. A BigH1 csupán az embrió primordiális ivarvonal őssejtjeiben marad fenn, melyekből a későbbiekben az ivarszervek fejlődnek ki. A BigH1 kimutatható a nőstény állatok petefészkeiben a petesejtben és a vele szomszédos dajkasejtekben, illetve a hímivarvonal őssejtjeiben és a differenciálódott spermaticitákban.

A BigH1 linker hiszton embrionális fejlődésben betöltött pontos szerepe mindeddig ismeretlen volt. Munkám során azt vizsgáltam, hogy a BigH1 fehérje mely tulajdonságokban különbözik a szomatikus H1 fehérjétől, és ezen tulajdonságok miként teszik a H1-nél alkalmasabbá a korai embrionális kromatin szervezésében való részvételre. Munkám elsősorban a BigH1 és H1 fehérjék által kialakított kromatinszerkezet különbségeire irányult, melynek

vizsgálatához célul tűztük ki a kromatin hozzáférhetőségének, a nukleoszómak és kromatoszómak stabilitásának, illetve a génexpressziós program változásainak összehasonlítását BigH1 és H1 linker hisztonok jelenlétében.

FELHASZNÁLT MÓDSZEREK

Mintagyűjtés:

- *Drosophila* embriók gyűjtése és előkészítése feldolgozásra (dekorionizálás és fagyasztás)

Molekuláris biológiai módszerek:

- BigH1 mutáns allélt hordozó plazmid konstrukciók létrehozása klasszikus klónozással és SLIC reakció segítségével
- plazmidok izolálása kittel és hagyományos alkalikus lízissel
- baktériumok kémiai transzformációja
- fehérje és kromatin preparátumok készítése embriókból
- Tricin-SDS-PAGE és Western blot
- MNáz esszé embrionális kromatinon
- RNS izolálás és DNáz kezelés
- hagyományos végpont PCR, RT-PCR és Qpcr
- QINESIn esszé nukleoszóma stabilitás teszt

Bioinformatikai módszerek:

- online adatbázisok és eszközök használata
- plazmid konstrukciók tervezése (SnapGene)
- primerek tervezése (SnapGene)
- képszerkesztő programok használata (Adobe Illustrator)
- képek analízise (ImageJ)
- statisztikai analízis (GraphPad)
- qPCR adatok elemzése (Microsoft Excel)
- többszörös szekvencia illesztés (UGENE)

EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

1. **A BigH1 korai embriógenézis során betöltött szerepének vizsgálatára alkalmas *Drosophila* vonalak létrehozása**

A csoportunkban olyan plazmidokat és segítségével *Drosophila* vonalakat hoztunk létre, amelyekben az endogén *BigH1* gén kódoló szakaszát részlegesen (BigH1-H1 kimérák) vagy teljesen (*HHH*) a szomatikus *H1* gén kódoló régiója helyettesíti, ami lehetővé teszi a BigH1 és H1 fehérjék funkcionális összehasonlítását, valamint a BigH1 domének szerepének feltárását.

E kísérleti rendszer bővítéséhez létrehoztam egy olyan plazmidot (*NULL*), amelyet megfelelő *Drosophila* petékbe injektálva BigH1 fehérjét nem expresszáló *Drosophila* vonalat hoztunk létre, melynek segítségével vizsgálható a BigH1 linker hiszton hiányának fenotípusa.

Készítettem továbbá egy olyan plazmidot is (*P0*), melynek felhasználásával létrehoztunk olyan *Drosophila* vonalat, amelyben a BigH1 fehérje nem képes foszforilációra az S287, S288, S299 és S331 aminosavakon. Ez lehetővé teszi a jövőben, hogy a BigH1 foszforilációjának szerepét vizsgáljuk a korai embrionális fejlődés során.

A BigH1 mutáns *Drosophila* vonalak létrehozásával megteremtettünk egy olyan kísérleti rendszert melyben *in vivo* vizsgálható az alternatív linker hiszton szerepe.

2. **Normál laboratóriumi körülmények mellett a kanonikus linker hiszton képes az alternatív linker hiszton embrionális fejlődésben betöltött szerepének helyettesítésére**

Laborunkban végzett kísérletek alapján kimutattuk, hogy a létrehozott BigH1 mutáns törzsek 25 °C-on életképesek.

Western blot módszert alkalmazva kimutattam, hogy a kiméra mutáns törzsekben a BigH1-H1 kimérák vagy a szomatikus H1 a vad típusú BigH1 fehérjéhez hasonlóan a korai embriógenézis során fejeződnek ki, valamint a fehérjék mérete az elvártnak megfelelő. Bizonyítottam tehát, hogy mind a H1, mind a BigH1-H1 kimérák 25°C-on alkalmasak a BigH1 alternatív hiszton helyettesítésére az embrionális fejlődés során.

3. A BigH1 N-terminális doménje szerepet játszik a fehérje megfelelő expressziójában

A BigH1 mutáns embriókon végzett Western blot kísérletekkel kimutattam azt is, hogy azokról a kiméra allélokról, melyek esetén a BigH1 N-terminális régiója a H1 azonos doménjével helyettesített (H1-NTD), a képződő kiméra fehérje mennyisége alacsonyabb. Megállapítottam, hogy azokban a mutáns embriókban, melyekben a BigH1-et teljes mértékben H1 helyettesíti (*HHH*), az alacsonyabb fehérje szint hátterében a vad típusúhoz mérten alacsonyabb RNS-szintű kifejeződés áll.

4. A linker hiszton típusa befolyással van a transzkripció programra

Megvizsgáltam, hogy a BigH1-nek, mint ivarvonal- és embrióspecifikus linker hisztonnak van-e szerepe a transzpozonokkal szembeni védelemben. Kimutattam, hogy a vad típusú BigH1 H1-re történő cseréje következtében tizennégy vizsgált transzpozabilis elem közül nyolcnak szignifikánsan megváltozik az RNS szintű kifejeződése. Megállapítottam, hogy a *HHH* mutánsban a változás a transzpozonok szövetspecifitásától (szomatikus, ivarvonal-specifikus vagy intermedier) független módon növekvő vagy csökkenő a vad típusú embriókhoz képest. Ebből arra következtetek, a BigH1 és H1 jelenlétében eltéréseket mutat a génextpressziós program.

5. A nukleoszóma szintű kromatin szerkezet hasonló BigH1 és H1 jelenlétében

Csoportunkban megfigyeltük, hogy azokban az embriókban, melyekben a BigH1-et szomatikus H1 helyettesíti, jelentősen megnő a magok mérete a korai embrionális stádiumban. Feltételeztük, hogy ennek hátterében a kromatinszerkezet megváltozása állhat.

Ennek vizsgálatára MNáz esszét alkalmaztam, melynek eredménye alapján megállapítottam, hogy a BigH1-et tartalmazó nukleoszómákban a nukleoszómális DNS átlagosan 5 bázispárral hosszabb. Ebből arra következtetek, hogy a BigH1 nagyobb méretéből adódóan nagyobb felületen védi a nukleoszómális DNS-t az MNáz emésztéssel szemben.

Azonban a linker DNS H1 és BigH1 jelenlétében is hasonló méretű, így a nukleoszómák sűrűsége is hasonló.

A mono- és multinukleoszómális DNS aránya megegyezik BigH1 és H1 jelenlétében, tehát a kromatin általános nyitottsága a linker hiszton típusától független, és nem az ebben bekövetkező változás áll a H1 jelenlétében tapasztalt nagyobb magméret hátterében.

6. BigH1 jelenlétében stabilabbak a nukleoszómák

A nukleoszómák stabilitásának vizsgálatához *Drosophila* embrióra optimalizáltam a QINESIn esszét és egy Western blot alapú módszert, melynek alapja a hisztonok sókezeléssel történő elúciója a kromatinról. Ezek segítségével meghatároztam, hogy a H2Av, H3 és H4 core hisztonok mennyire stabilan kapcsolódnak a kromatinhoz.

Megállapítottam, hogy a vizsgált hisztonok nehezebben távolíthatók el a vad típusú kromatinról, melyben BigH1 a linker hiszton, mint a H1 jelenlétében kialakuló kromatin esetén.

Ez alapján elmondható, hogy a BigH1 jelenlétében nagyobb stabilitást mutatnak a nukleoszómák, mint a H1-et tartalmazók.

7. A BigH1 a szomatikus H1-nél mobilisebb linker hiszton

Megvizsgáltam, hogy a BigH1 és szomatikus H1 fehérjék mennyire stabilan kapcsolódnak a kromatinhoz, és megállapítottam, hogy annak ellenére, hogy a BigH1 jelenlétében stabilabbak a nukleosómák, maga a BigH1 könnyebben eltávolítható a kromatinról, mint a szomatikus H1.

Ezek alapján a BigH1 kapcsolata a nukleosómákkal gyengébb, így egy mobilisebb linker hiszton, mint a szomatikus H1.

További kísérletek alátámasztották, hogy a BigH1 gyengébb nukleosóma kötő képességében szerepet játszik egy DNS kötő hurok megrövidülése, és azt is bizonyították, hogy a BigH1 nagyfokú mobilitása a DNS replikáció során biztosítja a dinamikus nukleosóma kicserélődést.

8. A BigH1 fehérje a szomatikus H1-nél kevésbé konzervált linker hiszton

Tizenkét *Drosophila* fajból származó szekvencia adatokat vizsgálva megállapítottam, hogy a BigH1 fehérje ortológjai ezekben megtalálhatók. Nyolc rokon faj fehérje szekvenciáit vizsgálva megállapítottam, hogy a BigH1 fehérje legkonzerváltabb doménje a centrális globuláris domén, azonban nagymértékű hasonlóságot csak a közeli rokon fajok között fedeztem fel. Ezzel szemben a szomatikus H1 fehérje *Drosophila* fajok között rendkívül konzervált. A BigH1 és H1 szekvenciák összehasonlításával kimutattam, hogy a két fehérje közötti hasonlóság kevesebb, mint 30 %.

ÖSSZEFOGLALÁS

A dolgozatban bemutatott kísérleti eredmények a munkacsoportunkban végzett kutatás szerves részét képezik. Eredményeink bizonyították, hogy a BigH1 egy mobilis linker hiszton, melynek kapcsolata a nukleosómákkal gyengébb a

szomatikus H1-hez képest. Így biztosítja a dinamikus nukleoszóma kicserélődést és DNS replikációt, ezáltal a gyors magosztódási ciklusokat a *Drosophila* korai embriogenezis során, amikor a zigótikus genomról még nem történik átírás.

PUBLIKÁCIÓS LISTA

MTMT azonosító: 10062451

A dolgozat alapját képező közlemény:

Henn, László* ; **Szabó, Anikó*** ; Imre, László ; Román, Ádám ; Ábrahám, Andrea ; Vedelek, Balázs ; Nánási, Péter ; Boros, Imre M. Alternative linker histone permits fast paced nuclear divisions in early *Drosophila* embryo. NUCLEIC ACIDS RESEARCH 48 : 16 pp. 9007-9018. (2020) **IF:** 11,501

*megosztott első szerzők

További közlemények:

Huliák, Ildikó ; Bodai, László ; Czepán, Mátyás ; Kovács, Dávid ; **Szabó, Anikó** ; Tiszlavicz, László ; Lázár, György ; Rakonczay, Zoltán ; Hegyi, Péter ; Boros, Imre Miklós et al. Genetic, epigenetic and transcriptional comparison of esophagus tumor-associated and adjacent normal myofibroblasts. ONCOLOGY REPORTS 41 : 2 pp. 839-852. , 14 p. (2019) **IF:** 3,417

Carbonell A, Henn L, Pérez-Roldán J, Tamirisa S, **Szabó A**, Boros IM, et al. In response to Li et al.: Linker histones function in *Drosophila* embryogenesis. BioRxiv: 2020.03.21.001529. DOI: 10.1101/2020.03.21.001529

TÉMAVEZETŐI NYILATKOZAT

Alulírott **Prof. Dr Boros Imre Miklós, Dr. Henn László Dániel** a jelölt (Szabó Anikó) témavezetőjeként kijelentem, hogy a disszertáció a jelölt saját munkája, melyet a témavezetésem mellett önállóan készített el. Kijelentem, hogy a disszertáció megfelel az SZTE TTIK Biológia Doktori Iskola formai és tartalmi követelményeinek.

Szeged, 2021. január 6.

.....
Prof. Dr. Boros Imre Miklós

egyetemi tanár

Szegedi Tudományegyetem

.....
Dr. Henn László Dániel

tudományos munkatárs

ELKH Szegedi Biológiai Kutatóközpont