

A Histone H4 replacement (H4r) gén funkciójának vizsgálata *Drosophila melanogaster*ben

Doktori (Ph.D.) értekezés

Ábrahám Andrea

Témavezetők:

Prof. Dr. Boros Imre Miklós

egyetemi tanár

Dr. Henn László Dániel

tudományos munkatárs

Biológia Doktori Iskola

Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék

Szegedi Tudományegyetem

ELKH Szegedi Biológiai Kutatóközpont



Szeged

2022

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	4
Bevezetés.....	7
1. Irodalmi áttekintés.....	9
1.1. Az eukarióta kromatin szerveződése	9
1.1.1. A mitotikus kromoszómák szerveződése	9
1.1.2. A nem osztódó sejtek kromatinstruktúrája	10
1.1.2.1. Eukromatin és heterokromatin.....	10
1.1.2.2. A génexpresszió szabályozása és a genomintegritás fenntartása funkcionális kromatin domének kialakításával.....	11
1.2. Az indukálható gének aktivációja	12
1.3. A transzkripció memória és a környezeti stimulus kapcsolata	14
1.4. Az alternatív hisztonok általános jellemzői.....	16
1.4.1. Hiszton H4 variánsok.....	17
1.4.1.1. A <i>Drosophila melanogaster</i> Histone H4 replacement (<i>H4r</i>) génje	19
2. Célkitűzések	20
3. Anyagok és módszerek	21
3.1. A <i>H4r</i> promóterén megtalálható transzkripció faktor kötőhelyek azonosítása	21
3.2. Transzgenikus <i>Drosophila</i> vonalak előállítása.....	21
3.2.1. Guide-RNS (gRNS) célszekvenciák meghatározása.....	21
3.2.2. Guide-RNS-ek beépítése a pCFD4 plazmidba	22
3.2.3. Guide-RNS-eket expresszáló <i>Drosophila</i> vonalak előállítása.....	24
3.2.4. A guide-RNS párok tesztelése	25
3.2.5. A <i>H4r</i> epitóp-jelöléséhez szükséges plazmidok megtervezése	25
3.2.6. A vad típusú <i>H4r</i> gén és kiterjesztett genomi környezetének pBluescript KS (+) plazmidba klónozása	26
3.2.7. PAM-szekvenciák mutációja.....	28
3.2.8. <i>dsRed</i> marker gén inszerciója a transzgenikus állatok azonosításához	29

3.2.9.	Injektálás és transzgenikus <i>Drosophila</i> törzsek alapítása	32
3.3.	Immunhisztokémia és mikroszkópia	34
3.4.	Immunprecipitáció és western blot.....	34
3.5.	RNS-izolálás és RT-qPCR	37
3.6.	Kromatin-immunprecipitáció és szekvenálás.....	38
3.6.1.	Kromatin izolálás adult fejből.....	39
3.6.2.	Kromatin-immunprecipitáció	40
3.6.3.	ChIP-seq könyvtárkészítés és szekvenálás	43
3.6.4.	Bioinformatika és statisztika.....	43
4.	Eredmények	45
4.1.	Epitóp-jelölt H4r-t termelő transzgenikus <i>Drosophila</i> vonal létrehozása	45
4.2.	A H4r expressziójának jellemzői	47
4.2.1.	A H4r kifejeződési mintázata embriogenezis során	47
4.2.2.	A H4r kifejeződési mintázata ivarvonalon	50
4.2.3.	A H4r kifejeződési mintázatának változása a neuronális differenciáció során	51
4.2.4.	Szövetspecifikus transzkripció faktor kötőhelyek a <i>H4r</i> gén promóterén	58
4.2.5.	A <i>H4r</i> expressziója nem változik szignifikánsan hő sokk és regeneráció hatására	58
4.3.	A H4r lokalizációjának vizsgálata ChIP-seq-vel.....	59
4.3.1.	A H4r preferenciálisan kötődik specifikus kromatinrégiókhoz	59
4.3.2.	A H4r és H3.3 mennyisége különböző módon változik transzkripció aktiváció és represszió hatására	63
5.	Eredmények megvitatása	65
6.	Köszönetnyilvánítás	69
7.	Irodalomjegyzék.....	70
8.	Összefoglalás	77
9.	Summary	79
10.	Publikációs lista	81
11.	Nyilatkozat.....	82
12.	Függelék	83

Rövidítések jegyzéke

cDNS : complementary DNA

CENP-A : Centromere protein A

CFLAG . C-terminálisán 3xFlag-epitóp taggelt H4r

ChIP-seq : kromatin-immunprecipitációt követő szekvenálás

CIAP : Calf Intestinal Alkaline Phosphatase

Cid : Centromere identifier protein

CpBV-H4 : *C. plutellae* által termelt H4 variáns

CTCF : CCCT-Binding Factor

CTD : C-terminális domén

CDK : ciklin-dependens kináz

Cse4 : Chromosome segregation protein 4

Gad1 : Glutamic acid decarboxylase 1

ECL : enhanced chemiluminescence

gRNS/gRNA : guide-RNS

H3K9me_{2/3} : H3 9. pozícióban lévő lizin di- ill. tri-metilációja

H3K27me₃ : H3 27. pozícióban lévő lizin tri-metilációja

H3.3 NK : H3.3-3xFlag-t expresszáló 1-5 napos adultok kezeletlen mintái

H3.3 HS : H3.3-3xFlag-t expresszáló 1-5 napos adultok hősokkolt mintái

H3.3 HS+3h : H3.3-3xFlag-t expresszáló 1-5 napos adultok hősokkot követően regenerált mintái

H4r NK : 3xFlag-H4r-t expresszáló 1-5 napos adultok kezeletlen mintái

H4r HS : 3xFlag-H4r-t expresszáló 1-5 napos adultok hősokkolt mintái

H4r HS+3h : 3xFlag-H4r-t expresszáló 1-5 napos adultok hősokkot követően regenerált mintái

H4K5ac : H4 5. pozícióban lévő lizin acetilációja

H4K5acIP : H4K5ac specifikus ellenanyaggal végzett immunprecipitáció

H4r : Histone H4 replacement

H4-v.1. : H4 transzkript-variáns

Hox : homeotikus gén

Hsp : heat shock protein

HP1 : heterokromatin protein 1

IND : intermediate neuroblasts defective

LAD(s) : laminával asszociált domén(ek)

LamB : LaminB

LOF : loss-off-function

MNáz : Micrococcal nuclease

NFLAG : N-terminálisán 3xFlag-epitóp taggelt H4r

PAM : protospacer adjacent motif

PAR(íláció) : poli-ADP riboziláció

PcG : Polycomb group

PRE : Polycomb response element

PTM : poszt-transzlációs módosítás

RT-qPCR : reverz transzkripciót követő kvantitatív PCR

SAM : Dynabeads Sheep-Anti Mouse IgG

SAR : Dynabeads Sheep-Anti Rabbit IgG

Ser2 : az RNS polimeráz II C-terminális doménjének 2. pozíciójában lévő szerin aminosava

Ser5 : az RNS polimeráz II C-terminális doménjének 5. pozíciójában lévő szerin aminosava

SLIC : sequence – and ligation independent cloning

SWI/SNF : SWItch/Sucrose Non-Fermentable

TAD(s) : topológiaiilag assziciált domén(ek)

TFII : transzkripció faktor II

TRE : Trithorax response element

trxG : Trithorax group

UTR : untranslated region

VNC : ventral nerve chord

XPB : xeroderma pigmentosum type B

Bevezetés

Eukarióta sejtekben a DNS sejtmagba történő becsomagolását a hiszton fehérjék végzik. A hisztonok és DNS komplexeként létrejövő kromatin kondenzációján keresztül ezek a fehérjék a genom stabilitásáért és a génműködés szabályozásáért felelősek. A DNS replikációjához kötötten kifejeződő kanonikus hisztonok minden sejtben megtalálhatók és poszt-transzlációs módosításaiktól függő módon vesznek részt azon régiók működésének szabályozásában, amelyekhez kötődnek. Ezzel szemben a replikációfüggetlen expressziójú hiszton variánsok a génexpresszió szabályozásában specifikus funkciókkal rendelkeznek, és mutathatnak sejt típus-specifikus expressziót is.

A *Drosophila melanogaster* ideális modellorganizmus ezen fehérjék funkcióinak vizsgálatára: kanonikus hiszton génjei egy nagy klaszterben helyezkednek el a 2. kromoszómán több, mint száz génegységet tartalmazva, melyek mindegyikében megtalálható az öt kanonikus hiszton génje egy-egy kópiában. A hiszton variánsok a kanonikus hiszton klaszteren kívül helyezkednek el a genomban, egy-két kópiában.

A hiszton variánsok szerkezetükben általában kissé eltérnek kanonikus szomatikus megfelelőiktől, és egyedi gének által kódoltak, amelyek specifikus szabályozása teszi lehetővé a hiszton variánsok szöveti vagy differenciálódási funkcióinak ellátását. A H4 variáns (*His4r* vagy *H4r*) génje, amely a kanonikus hiszton génklaszteren kívül helyezkedik el, és amelyről replikációtól független expressziója révén poliadenilált mRNS képződik, evolúciósan konzerválódott a *Drosophila* fajokban annak ellenére, hogy fehérjetermékének aminosavsorrendje azonos a kanonikus H4-ével. Annak érdekében, hogy információt nyerjünk ennek az alternatív H4 hisztonnak a lehetséges szerepéről, epitóp-jelöltük a H4r-t, tanulmányoztuk annak térbeli és időbeli kifejeződését, és feltártuk a kromatinban való lokalizációját nukleoszomális szinten. RNS- és immunhisztokémiai vizsgálatok alapján a H4r általánosan kifejeződik az embrionális és lárvális fejlődési állapotokban, de a fejlődő idegrendszerben, a H4r expressziója tekintetében enyhe eltérések figyelhetők meg az egyes sejt típusok között, a fehérje legnagyobb mértékben a kolinerg neuronokban marad fenn. A ChIP-seq kísérletek azt mutatták ki, hogy a H4r lokalizációja preferenciális összefüggést mutat a szabályozó régiókkal, különösen a sejtek stresszre adott válaszaiban részt vevő gének esetén. Mindent összevetve a kísérleti adatok azt jelzik, hogy a H4r rendelkezik a kanonikus H4-től

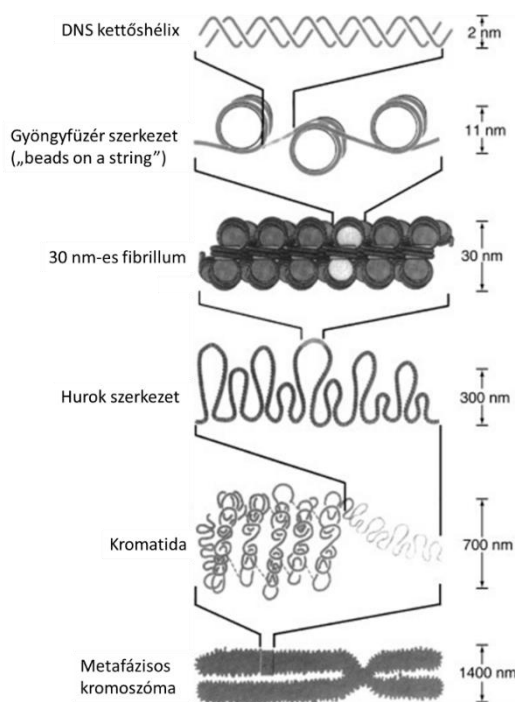
eltérő, alternatív hiszton funkcióval, amely hozzájárulhat a nem osztódó sejtek transzkripció memóriájának kialakításához.

1. Irodalmi áttekintés

1.1. Az eukarióta kromatin szerveződése

1.1.1. A mitotikus kromoszómák szerveződése

Az eukarióta sejtek genomja lineáris kettősszálú DNS, mely ún. hiszton fehérjék segítségével feltekeredve csomagolódik a sejtmagba. A DNS és a hozzá kötődő fehérjék által alkotott makromolekuláris komplex a kromatin. A kromatin csomagolódás – folding – hierarchikus szerveződésének repetitív alapegysége a nukleoszóma, melyet 8 hiszton fehérje oktamerje alkot. A négy nukleoszómalis hiszton fehérje – H2A, H2B, H3 és H4 két-két molekulája komplexet alkot, melyre a DNS 147 bp hosszúságú szakasza 1,67 fordulattal tekeredik (1). A nukleoszóma szerkezetét a H1 linker hiszton stabilizálja, mely a nukleoszóma belépő ill. kilépő DNS-t kötve szabályozza a nukleoszóma pozícióját. A nukleoszóma által létrehozott gyöngyfűzészerű szerkezet – az angol szakirodalomban „beads on a string” – átmérője ~11 nm (2). A nukleoszóma közötti – internukleoszómalis – kölcsönhatások kialakításával jön létre az ún. 30 nm-es fibrillum, mely többszörös hurkolódásával alakul ki a metafázisos kromoszóma egyik karja, a kromatida, ahogyan az az 1. ábrán látható:



1. ábra: A metafázisos kromoszóma szerveződésének szintjei (Forrás: <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/chromatin>)

A sejtosztódás ezen fázisában, a metafázisban nincs transzkripció, a genom maximálisan tömörödött. A nem osztódó sejtek működéséhez szükséges génexpressziót az adott gének kicsomagolásával biztosítja a sejt, amely egy másfajta tömörítési hierarchiát eredményez, a sejtben kialakul a transzkripcionálisan aktívabb eukromatin és a génkifejeződést gátló heterokromatin.

1.1.2. A nem osztódó sejtek kromatinstruktúrája

1.1.2.1. Eukromatin és heterokromatin

Az átírandó gének aktivációját első lépésben a gén körüli kromatinrégió kondenzáltságának csökkentése teszi lehetővé. Ehhez csökken az adott régióban a nukleoszómák és így az internukleoszómális kölcsönhatások száma, nő a nukleoszómák közötti linker DNS hossza, hozzáférhetővé téve így az átírandó gének promótereit, enhanszereit, egyéb szabályozó régióit, valamint magán a géntesten is csökken a nukleoszómák mennyisége. Az így létrejövő dekondenzált kromatin az eukromatin. A konstitutívan vagy fakultatívan represszálandó (heterokromatin) kromatinrégiók kondenzálása Drosophilában a heterokromatin protein 1 (HP1) ill. a Polycomb group (PcG) / Trithorax group (trxG) fehérjék segítségével történik, melyek toborzása a heterokromatinizálandó régiókhoz az ott megjelenő epigenetikai jelekkel történik. A HP1 esetében pl. a H3K9 di- vagy trimetilációját (H3K9me_{2/3}), a PcG/trxG fehérjék esetén a Polycomb/Trithorax response elemeken (PRE/TRE) kívül, melyek specifikus Pc/Trx-kötő motívumok (3), a H3K27 trimetilációját (H3K27me₃) írták le, mint hiszton poszt-transzlációs módosításokat, melyek részt vesznek az említett fehérjék toborzásában (4,5). A PcG és trxG fehérjéket egymás antagonistáiként írták le, és bár azóta ez a kép némileg árnyaltabb lett, az egyedfejlődést irányító homeotikus (Hox) géneken valóban egymással ellentétes hatást fejtenek ki. A PcG fehérjék a Hox gének transzkripciójának csendesítésében, míg a trxG fehérjék azok aktivációjában játszanak szerepet. Az egyes testtájokban lévő sejtekben a Hox gének expressziós mintázata még a korai embrióban kialakul, és ez a mintázat a sejtosztódások során tovább öröklődik (6).

A hiszton poszt-transzlációs módosítások (PTM-ek) funkcióinak feltérképezése jelenleg is erősen kutatott terület. Az eddig azonosított PTM-ek és ismert funkcióik alapján általánosságban elmondható, hogy a PTM helyzete, minősége és a PTM-ek kölcsönhatásai egyaránt befolyásolja a funkcióikat (7). A lizin acetilációk általában lazítják az elektrosztatikus kölcsönhatást az erősen pozitív nettó töltésű hisztonok és a negatív töltésű DNS között, ami a

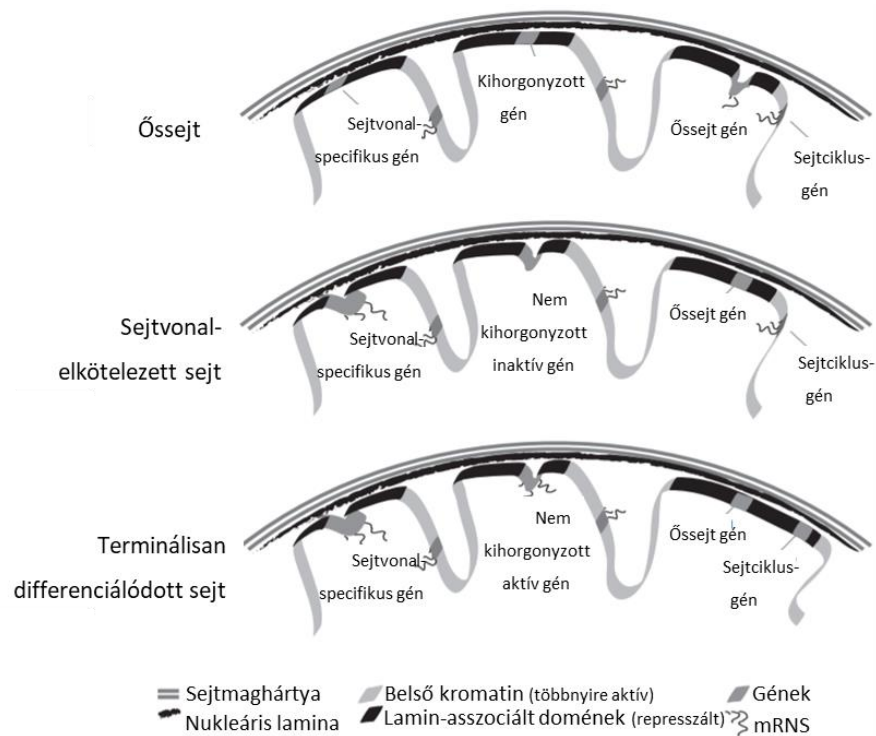
nukleoszómák elcsúsztatását vagy eltávolítását teszi lehetővé a kromatin remodeller fehérjék (SWI/SNF) számára (8–10). A hiszton metilációk, foszforilációk, ubikvitinációk stb. funkciói azonban függenek a módosítás pozíciójától, a környezetében lévő egyéb módosításoktól, sőt, még a kovalens módosítások számától is (ti. különböző funkcióval bírhat egy hiszton lizin mono-, di- ill. trimetilációja).

A klasszikus aktív eukromatin – inaktív heterokromatin felosztás nem teljesen áll összhangban a meglévő expressziós adatokkal. Habár nagy általánosságban igaz, hogy az aktív gének nagy része eukromatinban található, heterokromatinban is találhatók aktív gének, mi több, bizonyos gének kizárólag heterokromatikus környezetben aktiválódnak (11,12).

1.1.2.2. A génexpresszió szabályozása és a genomintegritás fenntartása funkcionális kromatin domének kialakításával

A kromatin tömörítése fizikai akadályt nyújt a transzkripcióval szemben, így a megfelelő génexpressziós mintázat megőrzése érdekében fontos, hogy a különböző tömörödöttségű és epigenetikai jelekkel ellátott kromatinrégiók elhatárolódjanak egymástól. A közös szabályozás alatt álló gének ún. topológiai asszociált doménekbe (TADs) rendeződnek, melyeket inzulátorok (pl. CTCF) választanak el egymástól (13). Az aktív géneket tömörítő TAD-okban alakulnak ki a promóter-enhanszer kölcsönhatások, a szövetspecifikus expressziót mutató gének promóterei és enhanszeri külön TAD-okban találhatók azon sejtekben, amelyekben az adott gének transzkripcionálisan inaktívak (14). A határok megszűnése vagy eltolódása nem csak a génexpressziót érintheti, hanem a teljes genom integritását is: a heterokromatin funkciói közé tartozik a transzkripció represszióján túl a repetitív elemek közti rekombináció gátlása illetve a mobilis genetikai elemek, a transzpozonok csendesítése is (4).

A TAD-ok stabilizációjában a sejtmaghártya belső rétegével asszociált nukleáris lamina is részt vesz. A laminával asszociált domének (LADs) többnyire erősen kondenzált, transzkripcionálisan inaktív kromatinrégiókat jelentenek (15). Mindazonáltal, az egyes genomi régiók laminával való interakciói a differenciáció során dinamikusan változnak, így vonva be a sejtmaghártyát a differenciáció folyamatába (16):



2. ábra: A sejtmaghártya szerepe a differenciálódás során bekövetkező génexpresszió-változásokban (Peric-Hupkes D és mtsai, 2010 nyomán). A sejtmaghártya belső felszínével asszociált lamina képes gátolni a génexpressziót, így a differenciáció során a laminához történő kihorgonyzódás is szerepet játszik a differenciáció során végbemenő génrepresszióban, ahogyan az a sejtciklus-specifikus gének esetén megfigyelhető. Ezzel összhangban a differenciációban szerepet játszó gének aktiválódhatnak azáltal, hogy a laminától elválnak és a transzkripció faktorok, valamint az RNS polimeráz számára hozzáférhetővé válnak.

1.2. Az indukálható gének aktivációja

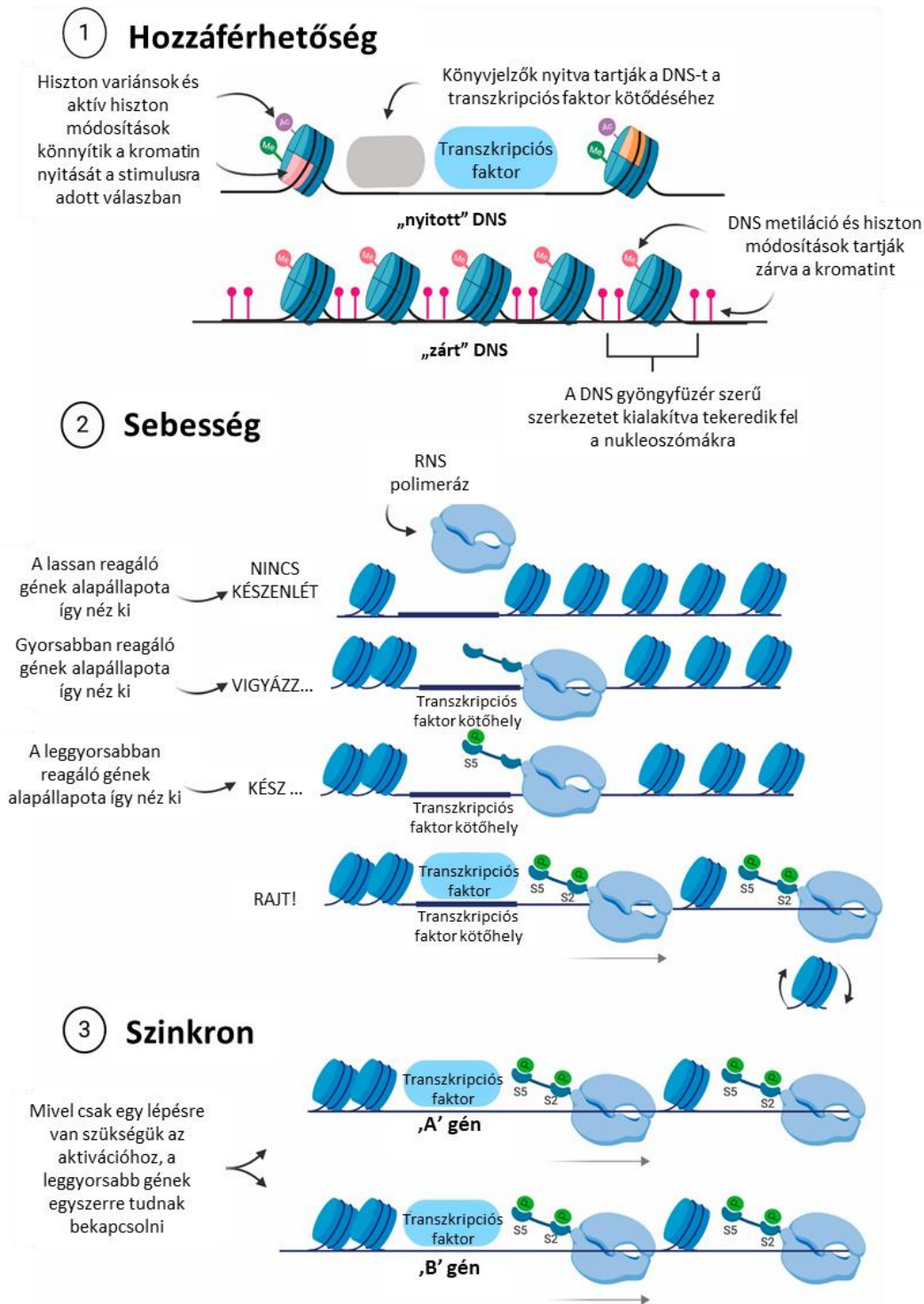
A háztartási génektől eltérően, melyek konstitutívan fejeződnek ki, az indukálható gének csak meghatározott stimulusok hatására aktiválódhatnak. Ez rugalmasan változó kromatinszerkezetet követel meg, amely stimulus hiányában az érintett gének kifejeződését represszálja, de a stimulus megjelenésére gyors és csak átmeneti transzkripciót tesz lehetővé (14). Az egyes gének promótereinek hozzáférhetősége a sejtosztódások során tovább öröklődik, melyeket ún. mitotikus könyvjelzők tesznek lehetővé. Könyvjelzőként működnek olyan epigenetikai jelek, mint pl. hiszton poszt-transzlációs módosítások, illetve egyes promóterekhez a sejtosztódás során végig kötődnek transzkripció faktorok, melyek az osztódás végén gyors aktivációt tesznek lehetővé. Ezeket pionír transzkripció faktoroknak nevezik (14). A mitotikus könyvjelzők sejtosztódás után az indukálható gének gyors aktivációján túl a sejttípusra jellemző transzkripció mintázat kialakításában is részt vesznek.

Stimulus hatására aktivátorok kötődnek az indukálendő gének promótereikhez, melyek kötőhelyet biztosítanak koaktivátorok, valamint a kromatin remodellerek számára. Utóbbiak eltávolítják a nukleoszómákat a promóterról, ami lehetővé teszi az RNS polimeráz és az általános transzkripciós faktorok (TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIIE, TFIIIF, TFIIH) számára a preiniciációs komplex felépítését. Ezt követően a CDK7 kináz foszforilálja az RNS polimerázt a C-terminális doménjén (CTD) a Ser5 pozícióban. A TFIIH helikáz aktivitású alegysége, az XPB (*Drosophilában* hay) szétnyitja a DNS két szálát, és lehetővé teszi az RNS polimeráz számára, hogy 20-40 nukleotid hosszúságban átírja az aktív (sense) szálát (promoter clearance). Az RNS polimeráz ezután megakad, a transzkripció elongáció csak akkor folytatódik, amikor a CDK9 foszforilálja a CTD-t a Ser2 pozícióban. A remodelling komplexek a polimerázhoz kötődve segítik a nukleoszómák eltávolítását a transzkripció közben (17).

Nem osztódó sejtekben a kanonikus hisztonok nem fejeződnek ki, ezért ezekben a sejtekben a hiszton variánsok könnyebben mozgósíthatók az indukció hatására történő kromatin-átrendeződések során (18). A lehetséges környezeti stimulusok közül a hőstressz hatásait jellemezték már a lehető legtöbb szempont alapján: *Drosophilában* jól ismertek a hőstressz génexpressziós mintázatra gyakorolt hatásai, a stimulust követő globális kromatin-átrendeződések, és több hiszton variánsnak a folyamatban betöltött szerepe is (18,19). Hősokk hatására a genom nagy része transzkripcionálisan represszálódik, és csak a hősokk válaszban szerepet játszó gének aktiválódnak. A hőstresszre indukálódó génekre beépült nukleoszómák hisztonjai stimulus hatására gyors PARiláción mennek keresztül, amelyet a nukleoszómák egy részének eltávolítása követ, a megmaradt nukleoszómákba pedig H3.3 épül be nagy mennyiségben. A nukleoszómák számának csökkenése a kromatin lokális fellazulásához vezet, amely politén kromoszóma preparátumokon fénymikroszkóppal is megfigyelhetők, ezekre az angol szakirodalom „heat-shock puff”-ként hivatkozik. A fellazult kromatin gyors és erős transzkripciót tesz lehetővé. Hősokk hatására jelentősen megemelkedik a transzkripció aktivációban szerepet játszó H3.3 hiszton variáns expressziója is, mely nagyrészt beépül a kromatin aktív régióiba. A stimulus megszűnését követően a regeneráció során azonban szükségtelenné válik a hősokkválasz-gének aktivációja, ennek megfelelően a H3.3 néhány óra alatt kanonikus H3-ra cserélődik, ezzel egyidőben a hősokk hatására represszált gének csendesítése is megszűnik (19).

1.3. A transzkripció memória és a környezeti stimulus kapcsolata

A környezeti ingerekre adott válaszokban szerepet játszó gének gyors aktivációja stimulus hatására elengedhetetlen a változó környezetben való életben maradáshoz. Ehhez az indukálható gének promótereinek könnyedén hozzáférhetőnek kell lennie az RNS polimeráz számára. Ebben a fent említett, könyvjelzőként működő epigenetikai markerek, melyeken a preiniciációs komplex fel tud épülni, kulcsszerepet játszanak: a lazább kromatinszerkezet kialakításában hiszton poszt-transzlációs módosítások, és zömmel variánsokat tartalmazó, instabil nukleoszómák vesznek részt (20). Amennyiben egy adott környezeti stimulusra aktiválódó gén az egyed élete során még nem aktiválódott, a gén promóterén a preiniciációs komplexnek össze kell szerelődnie, az RNS polimeráz először a C-terminális domén (CTD) Ser5 pozíciójában foszforilálódik (preiniciált RNS polimeráz), majd a Ser2 pozícióban történő foszforilációval megkezdődik az elongáció. Amennyiben a gén újra meg újra aktiválódik (prekondicionálás), a preiniciációs komplex a következő stimulus megjelenése előtt összeszerelődik, az RNS polimeráz CTD Ser5 aminosaván foszforiláltan kötődik a promóterhez, és a következő stimulus hatására már csak a Ser2 foszforilációra van szükség a transzkripcióhoz. Ez egy sokkal gyorsabb és erősebb transzkripciót tesz lehetővé, mint amekkora az első stimulus hatására ment végbe, valamint lehetővé teszi, hogy az adott stimulusra aktiválódó összes gén egyszerre aktiválódjon (14). A folyamatot az 5. ábra szemlélteti:



5. ábra: Az indukálható gének kromatin jellegzetességei. (Weinhouse, 2021 nyomán) Me: hisztón metiláció; Ac: hisztón acetiláció; S2: RNS polimeráz C-terminális domén Ser2; S5: RNS polimeráz C-terminális domén Ser5; P: foszforiláció.

Humán embrionális sejtvonalban leírták, hogy olyan környezeti stimulusok hatására, mint pl. a hő sokk, a TAD-ok átalakulnak, és stressz-indukálta TAD-ok alakulnak ki. Az új TAD-ok felbontják az adott sejtre normál körülmények között jellemző enhanszer-promóter

kontaktokat, ami az aktív gének egy részének repressziójához vezet (21). *Drosophila* sejtekben ezzel szemben a sejt típusra jellemző TAD formációk megmaradnak, hőshatására csupán a TAD-ok közti határok alakulnak át a CTCF inzulátor fehérje és a kohezin relokalizációjával. A TAD-határok elmosódása lehetővé teszi a relokalizált kohezin és a represszív PcG komplexek interakcióját, ami a humán sejtekhez hasonlóan bizonyos gének hőshatására bekövetkező represszióját eredményezi (14).

1.4. Az alternatív hisztonok általános jellemzői

Az alternatív hisztonok (más néven hiszton variánsok, replikációfüggetlen hisztonok) a sejt ciklus S-fázisában expresszálandó és kromatinba beépülő, kanonikus hisztonjait helyettesítik, a variánsra jellemző sejtekben, géneken. A kanonikus hisztonok génjei magasabbrendű eukariótákban jellemzően sok, akár több, mint száz kópiában találhatók a genomban, és egy vagy több génklaszterbe tömörülhetnek. *Drosophila melanogaster*-ben a kanonikus hisztonok több, mint száz kópiában, egy kanonikus génklaszterbe csoportosulva helyezkednek el a genomban, míg a variánsok egy-két gén által kódoltak, melyek a kanonikus hiszton klaszteren kívül helyezkednek el a genomban. További különbség a kanonikus megfelelőiktől, hogy a variánsok mRNS-ei sejt ciklustól függetlenül expresszálandók, poliadeniláltak és tartalmazhatnak intront. Az ezekről az mRNS-ekről transzlálódó fehérjék általában kis mértékben eltérő, de a kanonikus megfelelőjükhöz még mindig nagyon hasonló aminosavsorrenddel rendelkeznek (22). Ez alól a H4 hiszton kivétel, mely rendelkezik variánsokra jellemző, egykópiás, intront tartalmazó, poliadenilált mRNS-sel, amely azonban a kanonikus H4-gyel megegyező aminosavsorrendű fehérjét kódol (lásd 1.4.1. fejezet).

Hiszton variánsok általánosan jelen vannak az egysejtűektől a magasabbrendű eukariótákig a legtöbb organizmusban. Egyes hiszton variánsok, mint pl. a centromerspecifikus H3 variáns (élesztőben Cse4, *Drosophila*-ban Cid, emlősökben CENP-A) szinte kivétel nélkül minden eukariótában megtalálhatók és ugyanazt a funkciót töltik be közeli és távoli rokon fajokban egyaránt, míg más variánsok csak egy kládban jelentek meg az evolúció során, mint pl. a dóziskompensáció emlősökre jellemző módjában, az X kromoszóma inaktivációjában részt vevő macroH2A (23).

A hiszton variánsok betölthetnek szövetspecifikus (pl. a *Drosophila* ivarvonal-specifikus BigH1 linker hiszton variánsa (24)), környezeti hatás specifikus (pl. H2A.X/H2Av, mely a kettősszalú DNS-törések javításában vesz részt (25)), vagy általánosabb, kromatinstabilitáshoz

és génexpresszióhoz kötött funkciókat (pl. a centromer-specifikus CENP-A/Cid vagy a transzkripció aktivátor H3.3 (26)). A legjobban tanulmányozott modellorganizmusok hiszton variánsait az 1. táblázat mutatja be:

	Variáns			Funkció
	Élesztő	Drosophila	Emlős	
H1	-	-	H1t (27,28)	testis-specifikus linker hiszton (27,28)
	-	dBigH1 (24)	H1oo (27,28)	petesejt-specifikus linker hiszton (27,28)
	-	-	H1a-e (27,28)	szomatikus linker hiszton (27,28)
H2A	Htz1 (23)	H2Av / H2A.Z (25)	H2A.Z (23)	konstitutív heterokromatin stabilizáció, génexpresszió szabályozás (23)
	-		H2A.X (29)	DNS károsodás hibajavítás (29)
	-	-	macroH2A (29)	dóziskompensáció: X kromoszóma inaktiváció (29)
H3	H3.3 (30)			transzkripció aktiváció, konstitutív heterokromatin stabilizáció, transzkripciós memória, spermatogenezis (<i>Drosophila</i>) (30)
	Cse4 (23)	Cid (23)	CENP-A (23)	centromer-specifikus H3 variáns (23)
H4	-	-	H4t (patkány, zsákállatok) (31,32)	testis-specifikus H4 variáns (31,32)
		H4r (33)		nem ismert
	-	-	H4G (főemlősök) (34)	nukleolusz-specifikus H4 variáns (34)

1. táblázat: Hiszton variánsok előfordulása egysejtű, soksejtű és emlős modell rendszerekben.

1.4.1. Hiszton H4 variánsok

Evolúcióbíológiai szempontból a H4 hiszton a legérdekesebb, ugyanis csak kevés, egymástól filogenetikailag távol álló csoportban azonosítottak eddig H4 variáns, ami jelzi, hogy az igény egy sejtciklus-független expressziójú H4 jelenlétére az evolúció során többször is megjelent. A variánsok egy része csak replikációfüggetlen mRNS expresszióját tekintve

különbözik kanonikus megfelelőjétől, ezeket mRNS-variánsoknak nevezzük. Az mRNS variánsok a kanonikus H4 génjéről íródnak át, de egyedi szabályozással, ilyen pl. a szarvasmarha vagy a patkány *H4-v.1*. mRNS-variánsai (35,36). Ezen variánsok poliadenilált mRNS-sel, meghatározott szövetekben expresszálódnak, a funkcióik még ismeretlenek. A szarvasmarha *H4-v.1*. variánsa a mellékvese velőállományában fejeződik ki (36), míg a patkány H4 transzkript-variáns a májban, csecsemőmirigyben, csontvelőben, mellékvesében és az alveoláris makrofágokban. Utóbbi expressziós mintázat immun-folyamatokban való részvételt enged feltételezni, de a pontos működésmechanizmus még ismeretlen (35).

Az H4-homológ fehérjék egyik legkülönlegesebb példája a *Cotesia plutellae* bracovírus által termelt CpBV-H4 fehérje (37). A vírus az általa támadott gazdaszervezet, a káposztamoly (*Plutella xylostella*) H4 hiszton fehérjével 82,5%-ban homológ fehérjét termel, mely képes beépülni a gazdaszövetek kromatinjába, és megváltoztatni annak génexpressziós mintázatát, melynek eredményeként az immunválaszban szerepet játszó gének csendesítődnek (37).

A kanonikustól eltérő aminosavszekvenciával rendelkező, hiszton variánsokra jellemző karakterisztikájú alternatív H4 hiszton eddig csak három taxonban írtak le: az ostoros egysejtű *Trypanosoma brucei*-ben (38), az előgerinchúrosok közé tartozó *Oikopleura dioica*-ban (32), és főemlősökben (34). Ahogy a variánssal rendelkező taxonok filogenetikailag távol állnak egymástól, úgy a bennük leírt H4 variánsok funkciói is. A *Trypanosoma brucei*-ben leírt H4V egyike az ebben a fajban leírt négy hiszton variánsnak. A H2AZ és H2BV a transzkripció starthelyeket jelölik ki az RNS polimeráz számára, a H3V és H4V pedig a transzkripció terminációs helyeket. A H4V 85%-os homológiát mutat kanonikus megfelelőjével, a 15%-nyi különbség a fehérje mindhárom doménjét érinti. A variánst tartalmazó nukleoszómák kevésbé stabilak, mint a csak kanonikus hisztonokat tartalmazók, melynek fontos szerepe lehet a transzkripció-szabályozásban (38). Az *Oikopleura dioica* által termelt testis-specifikus H4t 3 aminosavcserében különbözik kanonikus megfelelőjétől, melyek poszt-transzlációs módosítóhelyeket érintenek, de a pontos szerepük még ismeretlen (32). A főemlősökben leírt H4G variáns a kanonikus H4-él rövidebb C-terminális doménnel rendelkezik, a teljes fehérje 85%-os homológiát mutat kanonikus megfelelőjével. A nukleoluszban lokalizálódik, és szerepet játszik az rDNS transzkripciójában. Bizonyos ráktípusokban, főleg mellrák esetén, kimutatták a *H4g* gén túltermelődését (34,39).

1.4.1.1. A *Drosophila melanogaster* Histone H4 replacement (*H4r*) génje

A *Histone H4 replacement* (*H4r*) gén a variáns és kanonikus hisztonok tulajdonságait ötvözi: a kanonikus hiszton klaszteren kívül, egy gén által kódolt *H4r* tipikus eukarióta génszerkezettel rendelkezik, tartalmaz intront, és a róla átíródó mRNS poliadenilált. Northern-blot eredmények alapján a gén a szomatikus sejtekben expresszálódik, az ivarvonalban azonban nem (33). Az expressziós mintázata alapján feltételezhető, hogy szerepe a kanonikus H4 helyettesítése a H3.3 replikációfüggetlen hiszton partnereként a poszt-mitotikus sejtekben, melyekben a kanonikus H4 már nem expresszálódik (33). Ezt erősíti az a tény, hogy a *H4r* funkcióvesztéses allélt hordozó (loss-of-function, röviden LOF) mutáns állatok fertilisek és életképesek, de csökkent életképességűek (40). Figyelembe véve a *H4r*-nek a kanonikustól eltérő kodonhasználatát, lehetséges, hogy a H4r a kanonikus H4-től eltérő dinamikával transzlálódik (41), ami eltérő ko-transzlációs módosításokat tesz lehetővé. A ko-transzlációs módosítások vagy az interakciós partnerek transzláció során történő kötődése a sejtek környezeti stimulusok hatására bekövetkező gyors válaszát teszi lehetővé (42). A H4r-nek a környezeti stresszhatásokra adott válaszokban betöltött lehetséges szerepére utal az a szakirodalmi adat is, mely szerint a *H4r* mRNS expressziója szignifikánsan megemelkedik etanolos kezelés hatására (43). A *H4r* LOF-mutáns állatok hőstresszel szemben ellenállóbbnak bizonyultak, MNáz-esszé alapján a Hsp-gének lazább kromatinszerkezettel rendelkeznek, mint a vad típusú állatok (40). Ez azt engedi feltételezni, hogy a H4r-nek az indukálható gének kromatinjának szabályozásában lehet szerepe.

2. Célkitűzések

A hisztonok nélkülözhetetlen szerepet játszanak a genom stabilitás, a kontrollált sejtosztódás és differenciáció, valamint a homeosztázis fenntartásában. Bármilyen mutáció, amely ezen fehérjék mennyiségét vagy szerkezetét érinti, súlyos károkat okozhat az említett folyamatokban, degenerációs vagy tumoros folyamatokat indítva be. Bár kritikus szerepet töltenek be az eukarióta egyedek életképességének és szaporodóképességének fenntartásában, működésüket illetően még mindig rengeteg a nyitott kérdés.

Kutatócsoportunk érdeklődésének egyik központjában az egyik legkevésbé jellemzett hiszton, a H4 funkciói álltak. Mivel a *Drosophila melanogaster* genomjában a több, mint száz H4 kópián kívül még egy gén található, amely replikációfüggetlen expresszióval termelődik, felmerült a kérdés, hogy a szabad H4 hiszton készlet hogyan járul hozzá a sejt homeosztázisának fenntartásához. A rendelkezésre álló, jelenleg kevés szakirodalmi adat arra a feltételezésre vezetett, mely szerint lehetséges, hogy a replikációfüggetlen H4r-nek szerepe lehet a differenciálódott sejtekben a transzkripciós memória kialakításában. Az én feladatom a replikációfüggetlen alternatív H4 funkciójának vizsgálata volt, az alábbi kérdések megválaszolásával:

1. Hogyan expresszálódik a *H4r*? Mutat-e a *H4r* expressziója vagy akkumulációja sejtípus- vagy fejlődési stádium specificitást?
2. Megváltozik-e az expressziója vagy kromatinba épült mennyisége környezeti stimulus (hőstressz) hatására?
3. A genomi eloszlása kanonikus vagy variáns hisztonokra jellemző-e? Milyen funkciók köthetők azokhoz a genomi régiókhoz, amelyeken a H4r lokalizálódik?
4. Hogyan változik a H4r lokalizációja transzkripció aktiváció és csendesítés hatására? Tükrözi-e a H4r mennyisége az érintett géneken a múltbéli transzkripciós eseményeket, ami a H4r transzkripciós memóriában betöltött szerepére utalhat?

3. Anyagok és módszerek

3.1. A *H4r* promóterén megtalálható transzkripció faktor kötőhelyek azonosítása

A *H4r* gén promóteréhez potenciálisan kötődő transzkripció faktorokat a MEME-Suit programmal (<http://meme-suite.org/tools/fimo>) azonosítottuk. A transzkripció faktor kötőhelyeket a gén első exonjától upstream 545 bp hosszúságú szekvencián azonosítottuk, melyhez egy, a JASPAR szoftver segítségével meghatározott 153 motívumot tartalmazó listát (http://jaspar.genereg.net/search?page_size=250&q=&tax_group=insects&collection=CORE) használtunk fel. A szoftver a $\leq 0,0001$ p-értékkel rendelkező találatokat listázta.

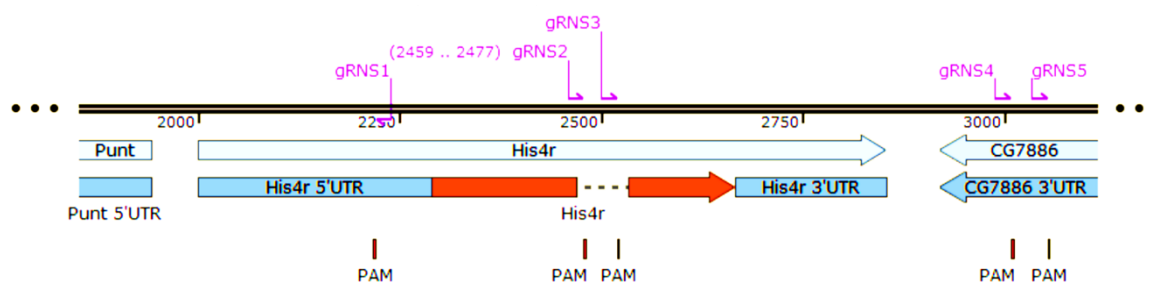
3.2. Transzgenikus *Drosophila* vonalak előállítása

3.2.1. Guide-RNS (gRNS) célszekvenciák meghatározása

Annak érdekében, hogy a kísérletek során a *H4r*-t és a kanonikus *H4*-et megkülönböztethessük egymástól, a *H4r* gént a CRISPR/Cas9 rendszer segítségével egy olyan génre cseréltük ki, amely 3xFlag-tagget *H4r*-t kódol. Az ehhez szükséges guide-RNS-ek célszekvenciáit a CRISPR Optimal Target Finder programmal (44) határoztuk meg az alábbi beállításokkal:

- guide-RNS-ek hossza: 20 nukleotid
- keresés *Drosophila melanogaster* fajban (r_6)
- az összes lehetséges targetszekvencia figyelembe vételével (egyaránt figyelembe véve a NAG és NGG PAM-szekvenciákat)
- magas stringencia

A szoftver által jelzett potenciális off-target hatású guide-RNS szekvenciák közül a maximum 4 potenciális off-target hatással rendelkező guide-RNS jelöltek közül választottunk ki összesen ötöt kísérletes tesztelésre, melyek a 6. ábrán látható helyeket célozták (a szoftver potenciális off-targetként azonosította a genom azon szakaszait, melyek az adott guide-RNS utolsó 12 nukleotid szekvenciájától maximum 1 nukleotiddal tértek el (45)). Azt, hogy a targetszekvenciák milyen genomi régiókat érintenek, a FlyBase adatbázis BLAST programjának segítségével ellenőriztük (<http://flybase.org/blast/>).



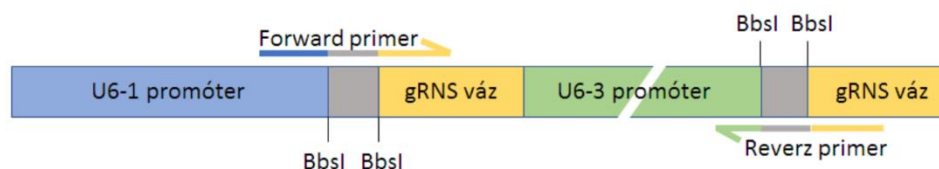
6. ábra: A *H4r* gént célzó guide-RNS-ek target pozíciói. A kiválasztott öt guide-RNS-t a gRNS1-5 jelölik, alul a guide-RNS-eket követő PAM (protospacer adjacent motif) szekvenciákkal jelölt Cas9 hasítási helyek. A szaggatott vonal a *H4r* gén intronját jelöli.

A kiválasztott guide-RNS (gRNS) szekvenciák:

- gRNS1: CTGTAAAGCGACGCCATGTT
- gRNS2: GTGTGCTAAAGGTACGTTC
- gRNS3: TGAAAAACTGATTAATTTCT
- gRNS4: GCCATCTGCGAATTCAAGCTC
- gRNS5: GGCAGTAGCAGTAGAAAAGGC

3.2.2. Guide-RNS-ek beépítése a pCFD4 plazmidba

A pCFD4 két guide-RNS együttes kifejezésére alkalmas, ezért a genomi DNS-ben két darab kettősszálú DNS törés idézhető elő segítségével, ami növelheti a kettősszálú DNS-törés indukálta hibajavítás (nem-homológ végek ligálása vagy homológ rekombináció) valószínűségét (45,46). A *H4r* gén manipulációjához olyan primereket terveztünk, melyek tartalmazzák a protospacer- illetve ezek reverz komplementer szekvenciáit (lásd 6. ábra). Forward primerekbe terveztük a *H4r* 5'UTR régióját célzó gRNS1-et, valamint az intront célzó gRNS2-t és gRNS3-at, melyek a Cas9 fehérje irányításával az upstream DNS hasítást teszik lehetővé. A downstream hasításhoz szükséges gRNS4-et és gRNS5-öt reverz primerekbe terveztük, az alábbi séma szerint:



Forward primer: 5' - TATATAGGAAAGATATCCGGGTGAACTTC G-N19/20- GTTTTAGAGCTAGAAATACGAAG

Reverz primer: 5' - ATTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAAC -N19/20revcompC GACGTTAAATTGAAAATAGGTC

7. ábra: A guide-RNS-ek pCFD4 plazidba történő klónozásához szükséges primerek tervezésének alapjai.

Olyan plazmidokat terveztünk, amelyek segítségével a *H4r* génben ill. közelében két ponton hasíthatók a Cas9 fehérjén keresztül. Ehhez az upstream DNS hasításhoz szükséges guide-RNS-eket (gRNS1-3) a forward primerekbe, a downstream hasításhoz szükségeseket (gRNS4-5) pedig a reverz primerekbe terveztük. A primerpárokkal létrehozott PCR termék a pCFD4 plazmidba klónozható.

Az így kapott primerek szekvenciáit a Függelék 1. táblázata tartalmazza.

A guide-RNS szekvenciákat tartalmazó forward és reverz primerekkel polimeráz láncreakciót (PCR) végeztünk pCFD4 plazmid templáton. A három különböző forward és két különböző reverz primerrel ez összesen 6 különböző reakciót jelentett. A PCR-t Q5 polimerázzal végeztük (NEB), a gyártói protokollt követve.

A PCR során amplifikált fragmenteket agaróz gélen (1 v/g% agaróz; 500 ng/ml etídium-bromid; TEB [8,9 mM Tris, 2,0 mM EDTA pH 8,0, 89 mM bórsav] pufferben) futtattuk meg, majd a megfelelő méretű fragmenteket borotvapengével körbevágtuk UV fényben. Az izolált géldarabokból Gel Extraction Kit (Geneaid) segítségével tisztítottuk ki a DNS-t a gyártó által javasolt protokoll alapján.

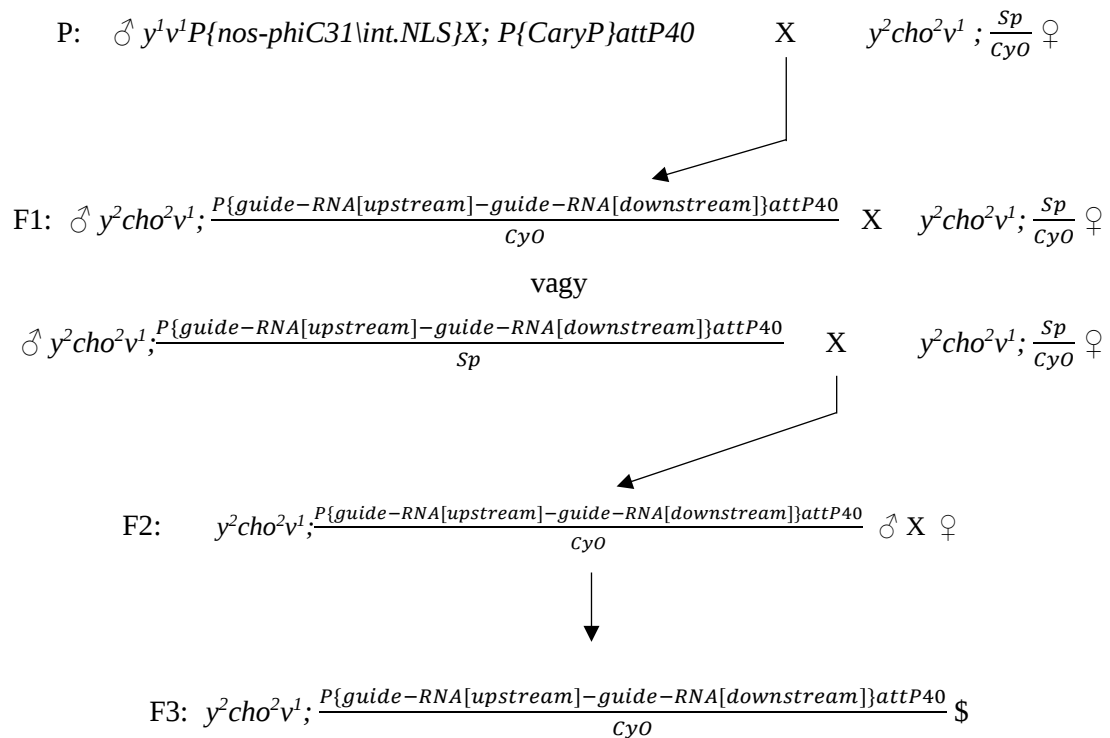
A pCFD4 plazmidot (47) BbsI (BpiI) restrikciós endonukleázzal emésztettük meg, majd a BbsI hasított plazmidot agaróz gélen megfuttattuk, UV fényben gélből kivágtuk, és a kivágott gélkockából a DNS-t Gel Extraction Kit (Geneaid) segítségével izoláltuk.

A guide-RNS szekvenciákat tartalmazó PCR termékeket ligálás-független (SLIC) klónozással (48) építettük a BbsI emésztett pCFD4 plazmidba. A reakcióelegyet (2 ng/μl pCFD4 fragment; 10 V/V% 10x Fermentas Green puffer; 0,075 U/μl T4 polimeráz; 2,5 nM guide-RNS-tartalmú PCR termék) 2,5 percig szobahőmérsékleten, majd 10 percig jégen inkubáltuk. A SLIC reakció 5 μl-nyi végtermékével 200 μl, előzetesen 0,85 μl merkaptotetanollal előkészített 2T1 *E. coli* sejteket transzformáltunk. A kompetens sejteket 30 percig inkubáltuk jégen, 42°C-os vízfürdőben 45 másodpercig hősokkoltuk, majd 2 percig

hűtöttük jégen. 500 µl YTB tápoldat és 3,5 µl 40 %-os glükóz oldat hozzáadása után a sejteket egy órán át 37°C-os a vízfürdőben inkubáltuk folyamatos kevertetés mellett. A sejtszuszpenzió 100 µl-ét ampicillin tartalmú YTB (5 g/l élesztő kivonat; 5 g/l NaCl; 10 g/l Trypton; 1,75 v/g% agaróz) táptalajon szélesztettük (mivel a pCFD4 plazmid ampicillin szelekciós markert tartalmaz) és a lemezeket egy éjszakán át 37°C-on inkubáltuk. A másnapra felnőtt telepek közül néhányat folyékony YTB táptalajba oltottunk át, majd High Speed Plasmid Mini Kit (Geneaid) segítségével tisztítottuk ki, egy éjszakán át 37°C-on inkubált baktériumszuszpenzióból. A tisztított plazmidok szekvenciáit Sanger-szekvenálással ellenőriztük. A megfelelő szekvenciájú plazmidokat újabb átoltást követően folyékony baktériumszuszpenzióból QIAGEN Plasmid Mini Kit segítségével tisztítottuk ki a gyártói protokoll alapján, és a tisztított plazmidokat 30 µl injektáló pufferben (NaH₂PO₄ pH 6,8 1 mM, KCl 50 mM) oldottuk fel.

3.2.3. Guide-RNS-eket expresszáló *Drosophila* vonalak előállítása

A fent leírt módon előállított plazmidokkal $y^1v^1P\{nos-phiC31\int int.NLS\}X; P\{CaryP\}attP40$ (Bloomington *Drosophila* Stock Center #25709) embriókat injektáltunk, majd az injektált állatok közül a hímeket kereszteztük tovább, az alábbi séma szerint:



A keresztezési sémában feltüntetett *guide-RNA[upstream]-guide-RNA[downstream]* megjelölés a 6 különböző primerpárosítás eredményeként *gRNS1-gRNS4*, *gRNS1-gRNS5*, *gRNS2-gRNS4*, *gRNS2-gRNS5*, *gRNS3-gRNS4* és *gRNS3-gRNS5* guide-RNS párosításokat takar.

3.2.4. A guide-RNS párok tesztelése

A 3.2.3. fejezetben leírtak szerint létrehozott, guide-RNS-párokat expresszáló *Drosophila* vonalak hímeit *y¹M{Act5C-Cas9.P}ZH-2A w** (Bloomington Drosophila Stock Center #54590) genotípusú, Cas9 fehérjét expresszáló szüzekkel kereszteztük, majd néhány véletlenszerűen kiválasztott utódból DNS-t preparáltunk, és PCR-rel vizsgáltuk meg a guide-RNS-ek és a Cas9 által létrehozott deléció jelenlétét a *H4r* génben. Ehhez az adult utódokat lefagyasztottuk, majd Squish pufferben (10 µM Tris pH 8,0; 1 mM EDTA; 25 mM NaCl) homogenizáltuk, majd Proteináz K-val (200 µg/ml) 30 percig emésztettük a minták fehérjéit. Az enzimet 98°C-on 2 perc alatt inaktiváltuk, majd az így létrehozott minták 1 µl-ét templátként használtuk fel a PCR során. A deléciót a *H4r* géntől upstream hibridizáló H4rDel Fw és a géntől downstream hibridizáló H4rDel Rev primerekkel mutattuk ki, HotFire polimeráz (Solis BioDyne) használatával, a gyártói utasításokat követve. A primerek szekvenciáit a Függelék 1. táblázata tartalmazza. A primerekkel a PCR során a negatív kontrollként használt (guide-RNS-eket és így deléciót nem hordozó) *y¹M{Act5C-Cas9.P}ZH-2A w** állat genomjából 2 kb hosszúságú szakasz amplifikálódik fel, míg a keresztezésből származó állatok genomjából ennél 500-800 bp-rel rövidebb termék képződik.

3.2.5. A H4r epitóp-jelöléséhez szükséges plazmidok megtervezése

A H4r expressziójának nyomonkövetéséhez olyan donor plazmidokra volt szükség, melyeken a 3xFlag epitóp tag a H4r 5'UTR és az első exon közé (N-terminális tag) illetve a második exon és a 3'UTR közé (C-terminális tag) esik, megőrizve így a *H4r* gén szabályozó régióit és eredeti expressziós mintázatát. A transzgenikus állatok könnyű azonosítása érdekében *dsRed* marker gént is klónoztunk a *H4r*-től downstream. Ehhez olyan plazmidot használtunk fel, melyen a *dsRed* gén két loxP rekombinációs szekvencia között helyezkedik el, így az a transzgenikus legyekből szükség esetén – amennyiben a dsRed túl erős hátteret adna az immunfestések során - Cre-mediált rekombinációval eltávolítható (lásd [3.2.93.2.8.](#) fejezet).

3.2.6. A vad típusú *H4r* gén és kiterjesztett genomi környezetének pBluescript KS (+) plazmidba klónozása

A vad típusú *H4r* gént vad típusú (OregonR) egyedből amplifikáltuk, melyhez a templátul szolgáló DNS-t Proteináz K-val történő emésztéssel preparáltuk. A PCR-t Q5 polimerázzal és a *H4r* genomi Forward és Reverz primerekkel (lásd Függelék 1. táblázat) végeztük, a PCR-termékeket agaróz gélből izolálva tisztítottuk ki Gel Extraction Kit (Geneaid) segítségével.

A primereket úgy terveztük meg, hogy az amplikon mindkét végén tartalmazzon *NheI* restrikciós enzim hasítóhelyet, mely enzim ragadós végeket hoz létre. A pBluescript KS (+) plazmid multiklónozó helye tartalmaz *XbaI* restrikciós enzim hasítóhelyet, mely enzim az *NheI* endonukleázzal kompatibilis ragadós végeket hoz létre. Így az amplikont *NheI*-el, a vektort *XbaI* endonukleázzal emésztettük, majd a termékeket PCR Extraction Kit (Geneaid) segítségével tisztítottuk.

A vektort ezt követően FastAP foszfatáz enzimmal defoszforiláltuk, a gyártói protokoll alapján.

A defoszforilált vektort és az inszertet ligáltuk (75 ng inszert, 25 ng vektor DNS, T4 ligáz 0,25 U/μl, 10 V/V% 10x T4 puffer 10 μl végtérfogatban). Az elegyet szobahőmérsékleten inkubáltuk 30 percen át, majd 70 °C-on 5 percen át melegítettük a ligáz enzim hőinaktivációjához. Ezt követően jégen hűtöttük transzformációhoz. A ligátum 5 μl-ével DH5α *E.coli* sejteket transzformáltunk a 3.2.2. pontban leírtaknak megfelelően.

Azt a szűk genomi szakaszt, melyet fuzionáltatni kívántunk a 3xFlag epitóp taggel, egy újabb PCR segítségével amplifikáltunk fel. Mivel ez a régió nem tartalmazott az egyik szükséges helyen restrikciós enzim hasítóhelyet, olyan primert terveztünk, melynek 5'-végén megtalálható volt az enzim felismerési és hasítási szekvenciája (*KpnI*). A PCR-t Q5 polimerázzal és a *H4r* Del Forward és *H4r* *KpnI* Reverz primerekkel végeztük (lásd Függelék 1. táblázat). A PCR termékhez 1,15 M végkoncentrációjú ammónium-acetátot és 50 V/V% izopropanolt adtunk, majd 5 perces szobahőmérsékleten történt inkubációt követően 10 percen át centrifugáltuk 13000 rpm-en. A felülúszó eltávolítása után 70%-os etanollal mostuk, majd újabb 5 perces, 13000 rpm-en történt centrifugálás és a felülúszó eltávolítása után a csapadékot beszárítottuk, és 50 μl desztillált vízben oldottuk fel.

A módosított pBluescript KS (+) plazmid a multiklónozó helyben található BglII hasítóhely meglétében különbözik az eredeti plazmidtól. Ezen módosításra azért volt szükség, mert így az ampikon egyik végén BglII, másik végén KpnI hasítóhellyel rendelkezett, ezért kettős emésztést követően inszertálható a módosított plazmidba. Az említett enzimekkel megemésztettük az ampikont, a 762 bp hosszúságú terméket agaróz gélből (1 v/g% agaróz, 500 ng/ml etídium-bromid, TEB pufferben) izoláltuk Gel Extraction Kit (Geneaid) segítségével. Hasonlóan jártunk el a módosított plazmid emésztése során is. A vektor DNS-t emésztés után CIAP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase) foszfatázzal (0,1 U/μl végkoncentráció, 50°C-on 5 perces inkubáció) defoszforiláltuk, majd 65°C-on 15 percen át tartó hőinaktiváció után gélből tisztítottuk a fentebb leírtaknak megfelelően. Az emésztett ampikont T4 ligáz segítségével klónoztuk a vektorba, majd transzformációig jégen hűtöttük a terméket, melynek 5 μl-ével DH5α sejteket transzformáltunk a 3.2.2. pontban leírtaknak megfelelően. A másnapra felnőtt telepek közül néhányat folyékony YTB táptalajba oltottunk át, majd egy éjszakás inkubációt követően High Speed Plasmid Mini Kit (Geneaid) segítségével izoláltunk belőlük plazmidot, és BglII/KpnI kettős tesztémésztéssel ellenőriztük őket.

A *H4r*-t tartalmazó plazmid oldatát kettéválasztva kétféle PCR-t mértünk össze, melyben az egyik esetben a *H4r* 1. exon 5' -, másik esetben a 2. exon 3'-végéhez inszertáltuk ugyanazon Flag epitóp taget kódoló DNS-t. Az inszercióhoz Q5 polimerázzal végeztünk PCR-t, melyhez olyan primereket terveztünk, melyek tartalmazták a 3xFlag taget kódoló szekvenciát (N-terminális jelöléshez: *H4r* NFLAG Forward és Reverz, C-terminális jelöléshez: *H4r* CFLAG Forward és Reverz, lásd Függelék). A PCR-t az alábbi beállításokkal indítottuk el:

- | | | | |
|---------------------------|------|--------------|-------|
| 1. Iniciális denaturáció: | 98°C | 2 perc | |
| 2. Denaturáció: | 98°C | 30 másodperc | } 5x |
| 3. Annealing: | 62°C | 30 másodperc | |
| 4. Elongáció: | 72°C | 3,75 perc | |
| 6. Denaturáció: | 98°C | 30 másodperc | } 30x |
| 7. Annealing: | 71°C | 30 másodperc | |
| 8. Elongáció: | 72°C | 3,75 perc | |
| 10. Terminális elongáció: | 72°C | 5 perc | |
| 11. Hűtés, tárolás: | 4°C | | |

Az PCR-termékekhez 2,5-szeres mennyiségű 96%-os etanolt és 0,1-szeres térfogatnyi 3M pH 5,2 Na-acetát oldatot mértünk, majd vortexszel való keverés után folyékony nitrogénben fagyasztottuk le. Kiolvasztás után 5 percen át 13000 rpm-en centrifugáltuk, majd a felülúszó eltávolítása után 70%-os etanolt adtunk a csapadékhoz, a PCR-termék eredeti térfogatának 3-szoros mennyiségében. Újabb 5 perces, 13000 rpm-en történt centrifugálást követően a felülúszót eltávolítottuk, a csapadékot beszárítottuk, és 50 µl desztillált vízben oldottuk fel.

A tisztított amplikonokat ClaI endonukleázzal emésztettük, majd a termékeket PCR Extraction Kit (Geneaid) segítségével tisztítottuk ki, és a ClaI által létrehozott ragadós végeiket ligálva újabb cirkuláris plazmidokat hoztunk belőlük létre. A plazmidokkal DH5α sejteket transzformáltunk, a transzformáció minden tekintetben megegyezett a 3.2.2. fejezetben leírtakkal. A másnapra felnőtt telepek közül néhányat folyékony YTB táptalajba oltottunk át, majd egy éjszakás inkubációt követően High Speed Plasmid Mini Kit (Geneaid) segítségével izoláltunk belőlük plazmidot.

A Sanger-szekvenálás alapján megfelelő szekvenciával rendelkező plazmidokat és a vektorként szolgáló kiterjesztett genomi régiót tartalmazó plazmidot HpaI és BglII enzimekkel emésztettük meg, majd agaróz gélen futtattuk meg. A jelölt *H4r* génjét tartalmazó plazmidok esetében a kisebb méretű (763 bp), a vektorként szolgáló plazmid esetében a nagyobb (6108 bp) fragmentet izoláltuk a gélből Gel Extraction Kit (Geneaid) segítségével. A vektor DNS-t ezután CIAP foszfatáz segítségével defoszforiláltuk, ezt követően a vektor és inszert DNS-ek ligálását végeztük T4 ligáz segítségével. A ligátumok 5-5 µl-ével DH5α sejteket transzformáltunk a 3.2.2. pontban leírtaknak megfelelően. A másnapra felnőtt telepek közül néhányat folyékony YTB táptalajba oltottunk át, majd egy éjszakás inkubációt követően High Speed Plasmid Mini Kit (Geneaid) segítségével izoláltunk belőlük plazmidot, és HpaI/BglII kettő tesztéméssel ellenőriztük őket.

3.2.7. PAM-szekvenciák mutációja

Annak érdekében, hogy a Cas9 fehérje a homológ DNS-t tartalmazó plazmidot ne hasítsa el, csak a targetált genomi DNS-t, a guide-RNS-eket követő Protospacer adjacent motif (PAM) szekvenciákban pontmutációkat kellett létrehoznunk. Mivel ezt a klónozási lépést azt követően végeztük el, hogy a guide-RNS-eket expresszáló transzgenikus vonalakat létrehoztuk, és a guide-RNS párok hatékonyságát teszteltük (lásd 3.2.4. fejezet), csak a gRNS1-hez és gRNS5-

höz tartozó PAM-szekvenciákban hoztunk létre mutációkat a taggelt H4r-t kódoló gént hordozó plazmidokon.

A 3xFlag-taggel fuzionált *H4r*-t hordozó plazmidok segítségével két új szubklón plazmidot állítottunk elő a módosított H4r gén és a tőle upstream 265 bp és downstream 430 bp közötti szekvenciák klónozásával, melyet a SacII és PstI enzimekkel hajtottunk végre. Ehhez a taggelt H4r-t hordozó plazmidokat és pBluescript KS (+) plazmidot emésztettük meg a fent említett enzimek segítségével, majd a 1617 bp hosszúságú, Flag-taggelt H4r-t tartalmazó fragmenteket és a 2917 bp hosszúságú vektor DNS-t agaróz gélből izolálással tisztítottuk Favorgen FavorPrep GEL/PCR Extraction or Purification DNA fragments Mini Kit felhasználásával. A kétféle inszert és a vektor ligálását T4 ligázzal végeztük, majd a ligátumok 5-5 µl-ével 2T1 sejteket transzformáltunk. A másnapra felnőtt telepek közül néhányat folyékony YTB táptalajba oltottunk át, majd egy éjszakás inkubációt követően High Speed Plasmid Mini Kit (Geneaid) segítségével izoláltunk belőlük plazmidot.

A kapott szubklónokon a PAM szekvenciákat szekvencia- és ligálásfüggetlen klónozással (SLIC) (48) mutáltattuk, melyhez a mutáns PAM szekvenciákkal körülvett *H4r* gén amplifikációját a PAM1gen Forward és a PAM2gen Reverz primerekkel (lásd Függelék 1. táblázat), Q5 polimeráz felhasználásával végeztük.

A mutáns PAM-szekvenciák által határolt plazmidszekvenciákat a PAM1plasmid Forward és a PAM2plasmid Reverz primerekkel (lásd Függelék 1. táblázat) amplifikáltuk.

Az inszertek és vektoraik SLIC reakcióval történő összekapcsolásához T4 DNS polimerázt használtunk, az így kapott plazmidokkal 2T1 sejteket transzformáltunk. A másnapra felnőtt telepek közül néhányat folyékony YTB táptalajba oltottunk át, majd egy éjszakás inkubációt követően High Speed Plasmid Mini Kit (Geneaid) segítségével izoláltunk belőlük plazmidot. A SacII/PstI kettős tesztémésztés alapján megfelelőnek bizonyult plazmidokat használtuk fel *dsRed* marker gén inszerciójához.

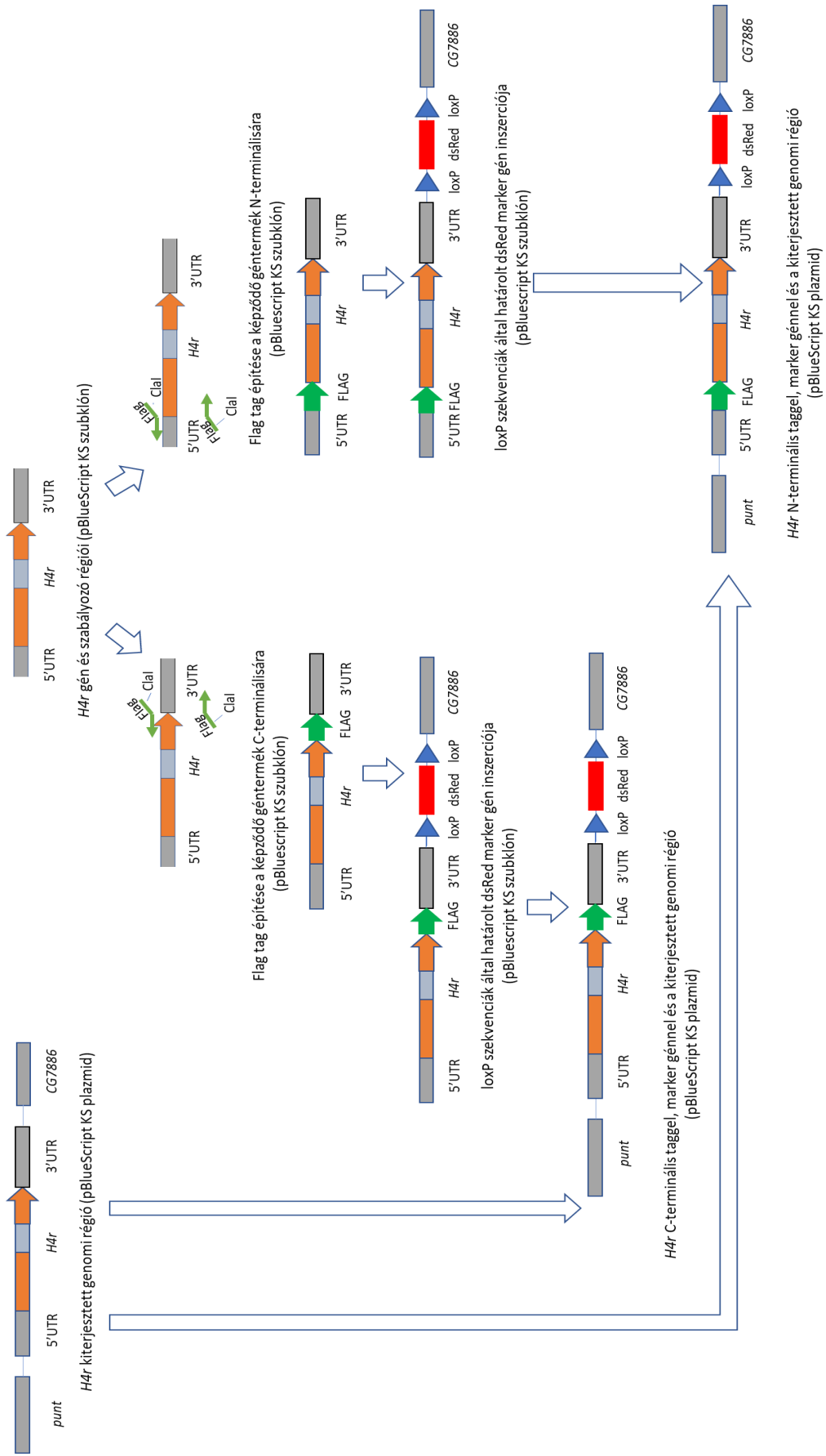
3.2.8. *dsRed* marker gén inszerciója a transzgenikus állatok azonosításához

A (pHD-dsRed plazmidból származó) loxP-dsRed-loxP szekvenciát a végek T4 polimerázzal való feltöltése után a plazmidok NdeI felismerő szekvenciájához klónoztuk. A módosított *H4r* gént és a loxP szekvenciákkal körülvett dsRed marker gént SacI és PstI enzimek

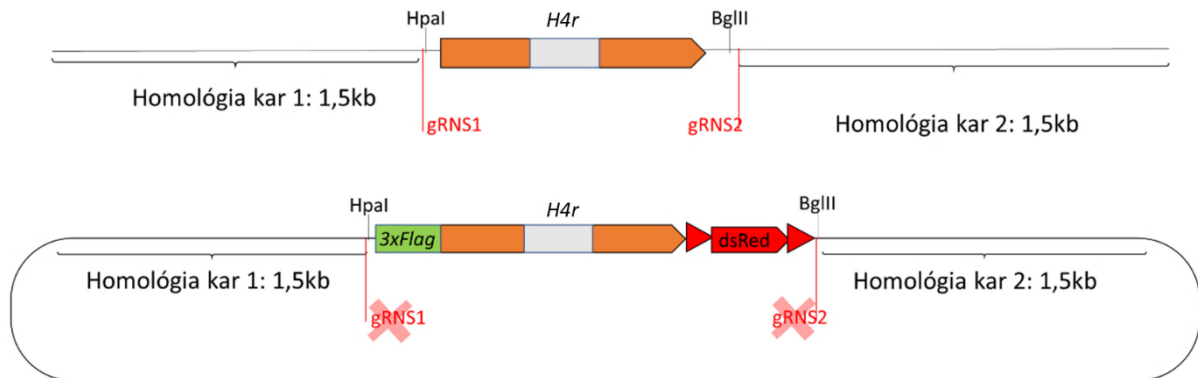
segítségével klónoztuk vissza a donor plazmidokba. Injektálás előtt a taggelt H4r-t hordozó plazmidok szekvenciáját Sanger-szekvenálással is leellenőriztük.

A klónozási sémát a 6. ábra mutatja be:

A



B

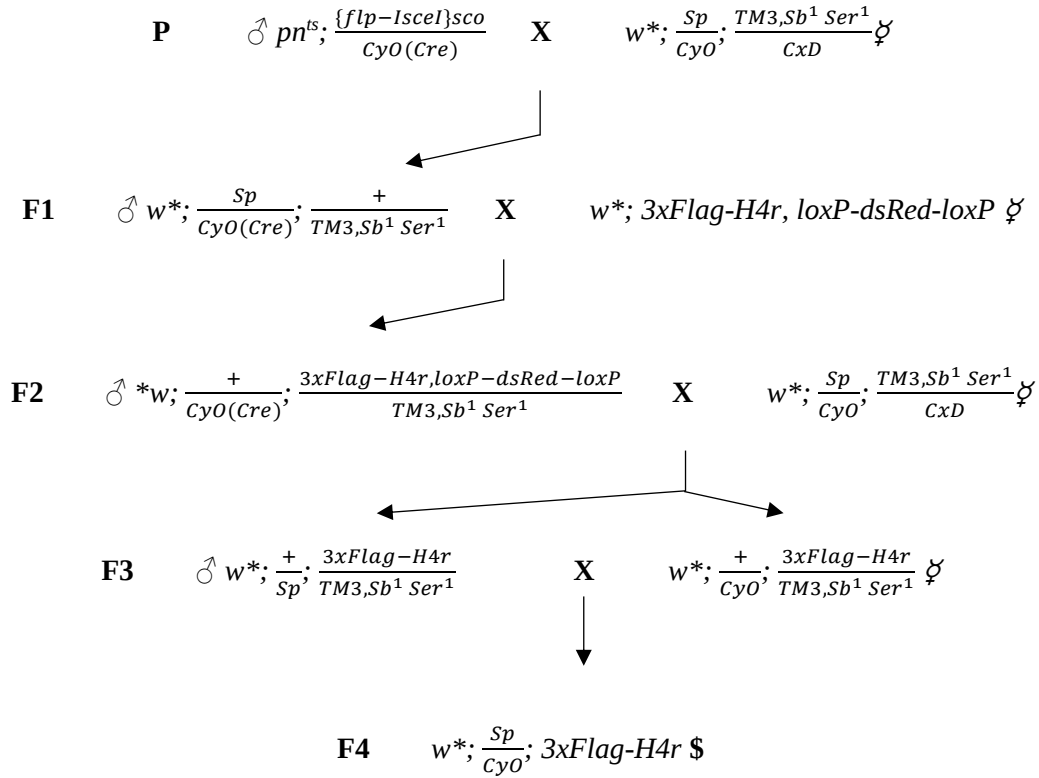


8. ábra. A 3xFlag-H4r-t expresszáló transzgenikus *Drosophila* vonal létrehozásának lépései. A: A 3xFlag-H4r gént és dsRed marker gént kódoló szekvenciák pBluescript KS (+) plazmidba klónozásának lépései (az ábrán csak a plazmidba klónozott inszertek vannak feltüntetve). A kiterjesztett genomi régió (mely tartalmazza az upstream és downstream 1,5 kb hosszúságú homológia karokat) plazmidba klónozása után csak a H4r gént tartalmazó kisebb plazmidot (szubklónt) hoztuk létre, melyet olyan primerek segítségével amplifikálhattunk föl PCR-rel, melyek tartalmazták a 3xFlag taget kódoló szekvenciát. Mivel mindkét primer tartalmazott ClaI hasítóhelyet, a PCR terméket cirkularizálni lehetett ezzel az enzimmel történő emésztéssel és a két vég ligálásával. Az így létrehozott plazmidba a taggelt H4r géntől downstream inszertáltuk a loxP rekombinációs helyekkel határolt dsRed markergént, mely a plazmid segítségével létrehozott transzgenikus állatok azonosítását tette lehetővé. A 3xFlag-H4r, loxP-dsRed-loxP ill. H4r-3xFlag, loxP-dsRed-loxP szekvenciát végül visszaklónoztuk a kiterjesztett genomi régiót tartalmazó plazmidba. B: Az endogén H4r gén epitóp-taggelése és a marker gén inszerciója CRISPR/Cas9 rendszer segítségével. A taggelt H4r-t kódoló gént, a dsRed marker gént és a homológia karokat hordozó plazmidokat PAM-szekvenciák elrontása után olyan embriókba injektáltattuk, melyekben a H4r génnél CRISPR/Cas9 rendszer segítségével kettősszállú DNS törések jöttek létre. A beinjektált donor plazmid szolgált a DNS-törés homológ rekombinációval történő helyreállítása során templátként. Az ábra csak az N-terminális epitóp taggelést mutatja be, de a C-terminális taggelés is ugyanígy zajlott, C-terminálison taggelt H4r-t kódoló gént tartalmazó plazmid felhasználásával.

3.2.9. Injektálás és transzgenikus *Drosophila* törzsek alapítása

A 3xFlag-jelölt H4r-t és dsRed markert expresszáló transzgenikus vonal létrehozásához a donor plazmidokat QIAGEN Plasmid Midi Kit segítségével tisztítottuk a gyártói protokollt követve, majd a plazmidokat tartalmazó csapadékot injektáló pufferben oldottuk fel. Az 500 ng/μl koncentrációra beállított plazmid DNS-t az SZBK *Drosophila* Injektáló laborjában a $\sigma^1 y^2 cho^2 v^1 / Y; \frac{P\{guide-RNA1-guide-RNA5\} attP40}{CyO}$ X $y^1 M\{Act5C-Cas9.P\} ZH-2A$ w σ^1 (Bloomington *Drosophila* Stock Center #54590) keresztezésből származó embriókba injektálták. A transzgenikus állatokat dsRed expresszió alapján azonosítottuk az injektált legyek w; TM3 Sb/TM6 Hu, Tb egyedekkel történő keresztezésből származó utódaiban, a géncserét Sanger-szekvenálással is megerősítettük.

A H4r funkcionális vizsgálatát célzó kísérletekhez az N-terminálison jelölt H4r-t expresszáló transzgenikus vonalat alkalmaztuk, ugyanis a C-terminálison jelölt H4r-t expresszáló vonal ismertlen okból csak balanszer kromoszómával heterozigóta formában volt életképes, homozigóta formában nem. Az N-terminálison taggelt H4r-t kifejező állatok nem mutattak semmilyen eltérést a vad típusú állatokhoz képest. A *dsRed* gént, amelynek terméke jelentős háttérrel adott a számár anti-patkány Alexa Fluor 555 (Ab150074) másodlagos ellenanyaggal festett mintákban, a loxP helyek közti Cre-mediált rekombinációval üttük ki a lárva agyak háttérmentes immunfestésének megvalósíthatóságához, az alábbi keresztezési séma szerint:



Annak megállapításához, hogy a H4r expressziója köthető-e specifikus sejtekhez a lárva agyban, a $w^*; \frac{Sp}{CyO}; 3xFlag-H4r$ legyeket tovább kereszteztük. Olyan utódok létrehozása volt a cél, melyekben a különböző neurontípusok sejtmagjai GFP expresszió alapján azonosíthatók, a H4r expressziójával így kolokalizáció vizsgálható. Ehhez a Függelékben leírt keresztezési séma keresztezéseit hajtottuk végre.

3.3. Immunhisztokémia és mikroszkópia

A lárva és a felnőtt agyakat, valamint a petefészkeket és heréket Ringer-oldatban boncoltuk ki, majd 4% formaldehidet tartalmazó PBS-ben (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄) fixáltuk 20 percig forgatva szobahőmérsékleten. A fixáló oldat eltávolítása után a mintákat háromszor 5 percig szobahőmérsékleten mostuk PBT-ben (0,1% Triton-X-100 PBS-ben oldva), majd PBT-N-ben (0,1% Triton-X-100, 1% BSA és 5% FBS PBS-ben oldva) blokkoltuk szobahőmérsékleten 1 órán keresztül. A mintákat egy éjszakán át elsődleges antitesteket tartalmazó PBTN-ben inkubáltuk, majd háromszor mostam PBT-ben szobahőmérsékleten 10 percig, majd másodlagos antitesteket és DAPI-t tartalmazó PBTN-ben inkubáltuk 1 órán át szobahőmérsékleten. További három 10 perces PBT-vel történő mosás után a mintákat mikroszkóp tárgylemezre helyeztük, és Fluoromount-G-ben (Invitrogen) fedtük le.

Immunfestéshez használt antitestek: egér monoklonális α -Flag (Sigma M2) 1 μ g/ml koncentrációban; nyúl poliklonális α -H4 (Ab10158) 5 μ g/ml koncentrációban; patkány α -vasa (DSHB) 2 μ g/ml koncentrációban; nyúl poliklonális α -GFP (A-6455) 1:500 hígításban; kecske poliklonális anti-egér Alexa Fluor 488 (Ab150113) 3,33 μ g/ml koncentrációban; szamár poliklonális anti-nyúl Alexa Fluor 555 (Ab150074) 3,33 μ g/ml koncentrációban; szamár poliklonális anti-patkány Alexa Fluor 555 (A-48270) 3,33 μ g/ml koncentrációban; DAPI 2 μ g/ml koncentrációban.

A csak α -Flag antitesttel és DAPI-val festett lárva és felnőtt agyat, valamint a petefészket és heréket Spinning disc konfokális mikroszkóppal (Visitron spinning disk konfokális mikroszkóp Yokogawa CSU-W1 egységgel és Andor Zyla 4.2 PLUS sCMOS kamerával) vizualizáltuk 20x nagyításban száraz objektív használatával (NA:0,45), a különböző csatornákkal készített képekből összetett képeket ImageJ szoftverrel készítettük el. Az α -Flag-gel, α -GFP antitestekkel és DAPI-val festett embriókat és lárva agyakat Leica SP5 AOBS konfokális lézeres pásztázó mikroszkóppal, 20x száraz (NA:0,7) objektívvel vettük fel, a kompozit képek létrehozását és kolokalizációs arány számlálást az ImageJ szoftverrel végeztük.

3.4. Immunprecipitáció és western blot

Annak ellenőrzését, hogy az N-terminális tag nem gátolja-e a H4r N-terminális poszt-transzlációs módosításainak végbemenetelét, H4K5ac (ab51997) ellenanyaggal ellenőriztük. Mivel különböző stádiumú állatok és szervek esetén mindig azt tapasztaltuk, hogy a kanonikus

H4 jele a western blot során elnyomja az epitóp tag miatt 2 kDa-nal nagyobb H4r jelét, immunprecipitációt végeztünk Flag-tagget H4r-t expresszáló lárva agyak mintáin H4K5ac-specifikus ellenanyaggal, majd α -Flag ellenanyaggal mutattuk ki a minták H4rK5ac-tartalmát. A 3xFlag-H4r-t expresszáló állatokból illetve a negatív kontrollként szolgáló OregonR állatokból 15-15 lárva agyat 30 μ l Dounce bufferben (50 mM HEPES pH 7.5; 150 mM NaCl; 10% glicerín; 1 mM EDTA; 1,5 mM $MgCl_2$; 1% Triton X-100; 1 mM DTT; 1mM PMSF; 1x PIC (Roche)) homogenizáltunk, majd 4°C-ra előhűtött centrifugában maximális fordulatszámon üleptítettük a mintákat 2 percig. A felülúszót tiszta Eppendorf-csőbe vittük át, majd a koncentráció-különbségeket Bradford reagenssel történő mérést követően Dounce-bufferrel egyenlítettük ki. Ezt követően 10 μ l mintát félretettünk totál extrakt kontrollnak, 10 μ l 2x SDS loading puffer hozzáadása után 98°C-on 10 percig forraltuk. Dynabeads Sheep-Anti Rabbit IgG (SAR) mintánként 30 μ l-ét tiszta Eppendorf-csőbe mértük ki, mágneses állvánnyal leüleptítettük a gyöngyöket, eltávolítottuk róluk a saját pufferüket, majd 350 μ l IP-pufferrel (50 mM HEPES pH 7.5; 150 mM NaCl; 10% glicerín; 1 mM EDTA; 1,5 mM $MgCl_2$; 1x PIC (Roche)) mostuk őket, majd a mintákat adtuk hozzájuk (pre-cleaning). 2 órás, 4°C-on, forgatással történő inkubáció után a gyöngyöket mágneses állvány segítségével kiüleptítettük, a felülúszót tiszta Eppendorf-csövekbe vittük át, majd hozzáadtunk 1-1 μ g H4K5ac-specifikus ellenanyagot. 4°C-on egész éjszakán át forgatva inkubáltuk, majd másnap minden mintához 30 μ l SAR-gyöngyöt adtunk, melyekkel 2 órán át inkubáltuk 4°C-on forgatva. Az inkubációs idő letelte után a gyöngyöket mágneses állvánnyal üleptítettük, a felülúszókat eltávolítottuk, a gyöngyöket pedig négyszer 10 percig mostuk 200 μ l IP-pufferrel. Az utolsó mosás után a gyöngyöket 40 μ l 2x SDS loading pufferben forraltuk 98°C-on 10 percig.

Annak megállapításához, hogy a zigótikus genomaktiváció előtt álló, korai embriók milyen mennyiségű anyai eredetű H4r-t tartalmaznak, a *w*; *3xFlag-H4r* állatokat *w*; *3xFlag-BigH1* genotípusú állatokkal (24) kereszteztük, az így kapott *w*; $\frac{3xFlag-H4r,BigH1[wt]}{H4r[wt],3xFlag-BigH1}$ heterozigóta nőtény utódok *w*¹¹¹⁸ hímekkel való tovább keresztezésével kapott embriókból pedig az alábbi protokoll (49) szerint izoláltunk fehérjét:

10 mg 0-1 órás embriót A/1 pufferben (0,23 M szacharóz; 15 mM Tris-HCl pH 7.5; 60 mM KCl; 15 mM NaCl; 0,15 mM spermin; 0,5 mM spermidin; 0,2 mM PMSF; 14 mM merkaptotanol; 0,25 mM $MgCl_2$) homogenizáltuk, majd a mintákat 4 °C-ra előhűtött centrifugában 3300 g gyorsulással centrifugáltuk 15 percig. A felülúszót, mely a szolubilis fehérjéket tartalmazta, tiszta Eppendorf csőbe vittük át. A csapadékot, mely a kromatinkötött

fehérjéket tartalmazta, egyszer mostuk A/1 pufferrel, majd egyszer A/2 pufferrel (15 mM Tris-HCl pH 7.5; 60 mM KCl; 15 mM NaCl; 0,15 mM spermin; 0,5 mM spermidin; 0,2 mM PMSF; 14 mM merkaptotanol; 0,25 mM MgCl₂). Mosás után a csapadékot A/2 pufferben oldottuk vissza, majd 10 percig forraltuk azonos térfogatú 2x SDS minta puffer hozzáadása után.

Adult fejből teljes fehérjekivonatok elkészítéséhez 15 felnőtt fejet homogenizáltunk RIPA pufferben (150 mM NaCl; 0,1% SDS; 0,5% Na-DOC; 0,01% Triton-X-100; 1x PIC; 25 mM Tris-HCl pH 7,5) (4 µl/fej), majd jégen inkubáltuk 30 percig. Az inkubációs idő végén a mintákat 10 percig 13000 rpm fordulatszámmal centrifugáltuk, és a felülúszókat tiszta Eppendorf-csövekbe vittük át. A csapadékokat újra felfuszpendáltuk a felülúszók mennyiségével megegyező mennyiségű tiszta RIPA pufferben, és az oldható fehérjéket tartalmazó felülúszókat, valamint a kromatinhoz kötött fehérjéket tartalmazó reszuszpéndált csapadékokat 10 percig forraltuk 98°C-on SDS loading-pufferrel.

A fehérjék szeparációját Tricin-SDS-PAGE segítségével végeztük (50). Blottolás előtt a membránokat 15 másodpercig metanolban, majd 2 percig desztillált vízben, végül minimum 3 percig transzfer pufferben (20 mM Tris-HCl pH 8,0; 150 mM glicin; 20% metanol) mostuk. Blottolás után a membránokat 5% zsírmentes tejpórt tartalmazó TBST-ben (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 150 mM NaCl; 0,05% Tween-20) blokkoltuk 1 órán át szobahőmérsékleten, majd a membránokat 0,02% BSA-t és az elsődleges antitesteket megfelelő hígításban tartalmazó TBST-ben inkubáltuk 4°C -on egy éjszakán át. Miután a BSA és elsődleges ellenanyag-tartalmú TBST-t eltávolítottuk, a membránokat négyszer mostuk TBST-ben 10 percig, majd 0,02% BSA-t és a másodlagos antitesteket megfelelő hígításban tartalmazó TBST-ben inkubáltuk 1 órán át szobahőmérsékleten. Négyszeri 10 perces mosással TBST-ben történő mosást követően a membránokat tízszeresére hígított ECL reagensben (Millipore) inkubáltuk szobahőmérsékleten 5 percig, majd Li-Cor C-DiGit szkennelvel hívtuk elő, a jelek intenzitását ImageJ szoftverrel számszerűsítettük. A statisztikai elemzést a GraphPad Prism 8.0.1 segítségével végeztük, egyirányú ANOVÁ-t követő páros többszörös összehasonlítás Tukey-teszttel.

Western blothoz a következő ellenanyagokat használtam: egér monoklonális α -Flag (Sigma M2) 0,2 µg/ml koncentrációban; nyúl poliklonális α -H4 (ab10158) 1 µg/ml koncentrációban; nyúl monoklonális α -H4K5ac (ab51997) 1 µg/ml koncentrációban; nyúl poliklonális anti-egér/HRP (Dako, P0260) 1:10000 hígításban, kecske poliklonális anti-nyúl/HRP (Dako, P0448) 1:10000 hígításban.

3.5. RNS-izolálás és RT-qPCR

RNS-t adult fejből NE pufferben (15 mM HEPES pH 7,6; 10 mM KCl; 5 mM MgCl₂; 0,1 mM EDTA; 0,5 mM EGTA; 350 mM szacharóz; 0,1 % Tween 20; 1 mM DTT; 1x PIC (Proteináz Inhibítor koktél, Roche), 2,8 µl/fej) történő homogenizálás után vontunk ki. Az extrakciót TRIzol Reagent (Thermo) alkalmazásával végeztük, az alábbi protokoll szerint:

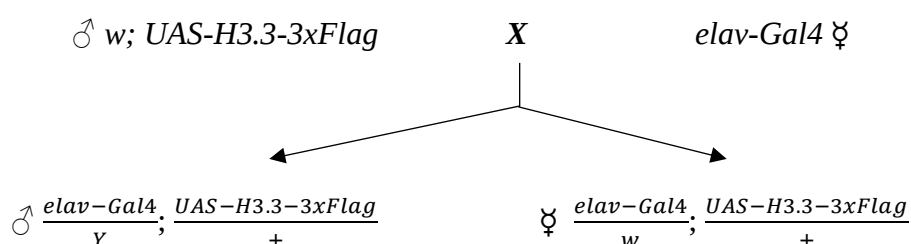
50 µl mintához 10x térfogatnyi TRIzol adtunk, majd vortexelést követően szobahőmérsékleten inkubáltuk 5 percig. Az inkubációs idő letelte után 12000 g gyorsulással centrifugáltuk 4°C-ra előhűtött centrifugában 10 percig, majd a felülúszót tiszta Eppendorf-csőbe vittük át, és újabb 5 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten. 100 µl kloroform hozzáadása után 15 másodpercig vortexeltük magas fokozaton, majd 3 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten. Ezután 12000 g gyorsulással centrifugáltuk 4°C-on 15 percig, a felülúszó 400 µl-ét tiszta Eppendorf-csőbe helyeztük, 2 µg glikogént és 250 µl izopropanolt adtunk hozzá, majd az RNS-t 10 percig tartó szobahőmérsékleten való inkubálással csaptuk ki. Ezután 12000 g gyorsulással centrifugáltuk 4°C-ra előhűtött centrifugában 10 percig, majd eltávolítottuk a felülúszót, a csapadékot pedig 750 µl 75% etanollal mostuk, majd 7500 g gyorsulással centrifugáltuk 4°C-on 5 percig, a végén a felülúszót eltávolítottuk. Az etanolos mosást megismételtük, majd a csapadékot beszárítottuk, és 20 µl nukleázmentes desztillált vízben oldottuk vissza. Az oldódást 55°C-on 10 percig történő inkubációval segítettük elő. Az RNS minták koncentrációját és tisztaságát Nanodroppal ellenőriztük, majd mintánként 500 ng RNS-ből készítettünk cDNS-t.

Embriókból ugyanezen protokoll alapján tisztítottunk RNS-t, az alábbi változtatásokkal: 10 mg embriót 150 µl TRIzolban homogenizáltunk, majd 40 µl nukleázmentes vízzel hígítottuk, és vortexeltük. Ezt követően a mintákat a fent leírt módon preparáltuk.

cDNS-készítéshez a tisztított RNS-minták DNS-szennyeződését DNaseI-gyel (Thermo) távolítottuk el, majd reverz transzkripciót végeztünk TaqMan Reverse Transcription Reagents (Invitrogen) segítségével. A qPCR-t Promega GoTaq qPCR Master Mix (Thermo) használatával végeztük. A qPCR-hez használt primereket a Függelék 1. táblázata tartalmazza. A statisztikai elemzést a GraphPad Prism 8.0.1 segítségével végeztük, egyirányú ANOVÁ-t követő páros többszörös összehasonlítás Sidak-teszttel.

3.6. Kromatin-immunprecipitáció és szekvenálás

Annak vizsgálatához, hogy a H4r lokalizációja a genomon kanonikus vagy alternatív hiszton jellegzetességeket mutat-e, valamint milyen mértékű a kolokalizációja a H3-variáns H3.3-mal, standard körülmények között nevelt 1-5 napos kifejlett állatok fejein végeztünk kromatin-immunprecipitációt és szekvenálást (ChIP-seq). A H4r által kötött DNS precipitációjához α -Flag (Sigma M2), az összes nukleoszómális DNS precipitációjához α -H3 (Ab1791) ellenanyagot használtunk. A H3.3 lokalizációjához egy másik *Drosophila* vonalat használtunk, amely H3.3-3xFlag-et expresszált neuronokban, az *elav*-Gal4-driver irányítása alatt. Ezen állatok az alábbi keresztezésből származtak:



A H3.3 lokalizációját ezen minták esetén is a kanonikus H3 kontrollhoz viszonyítottuk, ehhez ezeken a mintákon is α -Flag és α -H3 ellenanyagokkal végeztünk immunprecipitációt. Ezután megvizsgáltuk, hogy a H4r és H3.3 lokalizációja hogyan változik transzkripció aktiváció ill. represszió hatására, ezért olyan állatokon ismételtük meg a kísérletet, amelyeket 20 percig 37°C-os hőstressznek tettünk ki, valamint olyanokon is, amelyeket a 20 perces, 37°C-os hőstresszt követően 3 órán át szobahőmérsékleten hagytunk regenerálódni. Az így kapott minták jelöléseit az 2. táblázat foglalja össze:

		genotípus	
		w; 3xFlag-H4r ^{dsRed}	♀ $\frac{elav-Gal4}{w}; \frac{UAS-H3.3-3xFlag}{+}$ ♂ $\frac{elav-Gal4}{Y}; \frac{UAS-H3.3-3xFlag}{+}$
kezelés	kezeletlen (kontroll)	H4r NK	H3.3 NK
	37°C 20 perc	H4r HS	H3.3 HS
	37°C 20 perc, majd 3 óra szobahőmérsékleten	H4r HS+3h	H3.3 HS+3h

2. táblázat: A ChIP-seq kísérlethez felhasznált minták rövidítései

A kísérletet Schauer és munkatársai 2013-as cikkében (51) leírtak szerint végeztük, néhány módosítással:

3.6.1. Kromatin izolálás adult fejből

Mintánként 2500 db egyedet gyűjtöttünk össze, a kezeletlen kontrollokat gyűjtés után azonnal lefagyasztottuk folyékony nitrogénben. A többi állatot 37 °C-os, 20 percig tartó hőstressznek vetettük alá, majd a HS jelölésű mintául szolgáló egyedeket a hőstressz után azonnal lefagyasztottuk folyékony nitrogénben, a többi egyed fagyasztás előtt hagytuk szobahőmérsékleten regenerálódni 3 órán át. A minták felhasználásig -80°C-on voltak tárolva.

A fejeket folyékony nitrogénbe történő újrafagyasztással majd azt követő vortexeléssel választottuk le a testekről, a testrészeket háromrészes szitán szeparáltuk el egymástól, melyen a szárnyak és torok a legfelső részben maradtak, a lábak a legalsó részbe kerültek, a fejek pedig a középsőben gyűltek össze. Az összegyűjtött fejeket folyékony nitrogénben morzsoltuk finomszemcséjű porrá mozsárban, majd a port folyamatosan kevertük 5 percig jégen 7 ml NE pufferben. Ezután a mintákat Wheaton-homogenizátorban homogenizáltuk, végig jégen tartva, majd 100 µl-t lefagyasztottunk és -80°C-on tároltuk RNS-izoláláshoz. A minták többi részét 50 ml-es centrifuga csövekbe mértük át, és 1% végkoncentrációjú frissen készített formaldehiddel fixáltuk 10 percig szobahőmérsékleten forgatva. A fixálást 109 mM végkoncentrációjú glicinnel állítottuk le 5 percig forgatva szobahőmérsékleten. A mintákat

ezután két réteg steril Miracloth szűrőn filtráltuk át, majd a tisztított oldatot 3500 rpm fordulatszámmal centrifugáltuk 4°C-ra előhűtött centrifugában 5 percig. Ezután a Falcon-csővek aljában összegyűlt sejtmagokról eltávolítottuk a felülúszót, és reszuszpendáltuk őket 1 ml RIPA pufferben. Ezután a mintákat ismét 3500 rpm fordulatszámmal centrifugáltuk 4°C-ra előhűtött centrifugában 5 percig, majd eltávolítottam a felülúszót. Ezt megismételtük még kétszer, majd a csapadékot 400 µl sejtmag lízis pufferben (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM EDTA; 1% SDS; 1x PIC) szuszpendáltuk fel, majd 400 µl Dilution bufferrel (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,5 mM EGTA pH 8,0; 140 mM NaCl; 1x PIC) hígítottuk a kétszeresére, közvetlenül szonikálás előtt. A szonikálást Bioruptorral végeztük, a legerősebb fokozatra állítva, 8x 30 másodperc ON/30 másodperc OFF ciklussal. 80 µl mintával ellenőriztük a minták fragmenteloszlását agaróz gélen, a többi mintát ezalatt -80°C-on tároltuk.

Az izolált kromatin fragmenteloszlásának ellenőrzéséhez a szennyeződésként jelen lévő RNS eltávolításához a mintákat 20 µg RNáz A-val (Thermo) inkubáltuk 37°C-on 30 percig, 550 rpm fordulatszámmal rázatva, majd a keresztkötéseket 65°C-on egy éjszakán át inkubálva bontottuk fel. Másnap 0,5 mg/ml végkoncentrációjú Proteináz K és 0,5% végkoncentrációjú SDS-t hozzáadásával bontottuk el a minták fehérjetartalmát 50°C-on inkubálva 3 órán át 550 rpm fordulatszámmal rázatva, majd a DNS-t fenol-kloroform-izoamilalkoholos extrakcióval tisztítottuk ki a Pacific Biosciences Shared Protocol – Extracting DNA Using Phenol-Chloroform protokollját követve (52). A tisztított DNS-t 20 µl TE pufferben (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA) vettük fel, és 0,8%-os agaróz gélen futtattuk meg, melynek eredményét a Függelék 2. ábrája mutatja be.

Bár a mintákban a legtöbb fragment a kívánt ≤ 500 bp alá esik, még két ciklussal szonikáltuk őket immunprecipitáció előtt, hogy lehetőség szerint 1-2 nukleoszómányi fragmentekből készíthessünk könyvtárat szekvenáláshoz.

3.6.2. Kromatin-immunprecipitáció

A szonikált, tisztított kromatin koncentrációját Qubit dsDNA BR Assay Kittel mértük meg a gyártó utasításait követve. A minták koncentrációit és az alapján a felhasznált mennyiséget a Függelék 2. táblázata mutatja be.

A mintákat sejtmag lízis puffer és Dilution buffer 1:1 arányú keverékével azonos térfogatra hígítottuk, majd csak Dilution bufferből az így kapott térfogat 1,5-szörösét, „RIPA for IP” pufferből (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA; 0,5 mM EGTA; 1% Triton X-100; 0,1% Na-DOC; 0,1% SDS; 140 mM NaCl; 1x PIC) a sejtmag lízis puffer és Dilution buffer 1:1

arányú keverékével hígított térfogat 2,5-szeresét adtuk hozzá. Dynabeads Sheep-Anti Mouse IgG (SAM) és Dynabeads M-280 Sheep Anti-Rabbit IgG (SAR) (Thermo) mágneses gyöngyök 50 µl-ét annak saját pufferének eltávolítása után a mintákhoz adtuk, majd 4°C-on forgattuk 2 órán át. Ezután 2000 rpm fordulatszámmal centrifugáltuk 4°C-ra előhűtött centrifugában 5 percig, majd a felülúszókat háromfelé osztottuk:

1. ellenanyagmentes kontroll
2. α -Flag ChIP
3. α -H3 ChIP

A másodlagos ellenanyaggal bevont gyöngyök kromatinhoz való hozzáadása még az elsődleges ellenanyagok hozzáadása előtt lehetővé tette, hogy eltávolítsuk azokat a fragmenteket, melyek a másodlagos ellenanyagok aspecifikus kötődése révén a szekvenálásra szánt mintákba kerülnének. A centrifugálás során a gyöngyök az Eppendorf-csövek aljára kerültek, így a felülúszók tiszta Eppendorf-csövekbe való átvitele után az elsődleges ellenanyagok már csak a targetjeikhez kötődhettek: az α -Flag az egyik mintasorozatban a H4r-hez, a másikban a H3.3-hoz, az α -H3 a kanonikus és variáns H3-hoz egyaránt. Miután az 1-1 µg elsődleges ellenanyagot a szétosztott mintákhoz adtuk, 4°C-on forgattam egy éjszakán át. Másnap 4°C-ra előhűtött centrifugában centrifugáltuk a mintákat 13300 rpm fordulatszámon 15 percig, ezalatt újabb, mintánként 50-50 µl mágneses gyöngyöt mostunk 100-100 µl „RIPA for IP” pufferben. A centrifugálás után a gyöngyöket a megfelelő mintákban reszuszpendáltuk (SAM Dynabeads – Flag ellenanyagot (Sigma M2); SAR Dynabeads – H3 ellenanyagot (Ab1791) tartalmazó mintákban). Az ellenanyagmentes kontrollokhoz 25 µl SAM és 25 µl SAR Dynabead-et is adtunk, majd a mintákat 4°C-on forgattuk 4 órán át. Az inkubációs idő lejártá után a mintákat mágneshez állítottuk, az ellenanyagmentes kontrollok felülúszóit félretettük total input kontrollnak. A kitapadt gyöngyöket ötször 5 percig mostuk 600 µl „RIPA for IP” pufferben forgatva, majd egyszer 5 percig 600 µl LiCl pufferben (0,25 M LiCl; 0,5% NP-40; 0,5% Na-D0C; 1 mM EDTA; 10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1x PIC), majd egyszer 5 percig 600 µl, 1x PIC-et tartalmazó 10 mM Tris-HCl pH 8,0 pufferben. Végül a gyöngyöket 100 µl 1x PIC-et tartalmazó 10 mM Tris-HCl pH 8,0 pufferben reszuszpendáltuk, majd a total input kontrollok, ellenanyagmentes kontrollok és ChIP-minták RNS-tartalmát is elbontottuk 2 µg RNase A-val (Thermo) 37°C-on 1 óra alatt, majd a keresztkötéseket felbontottuk 65°C-on egy éjszakán át 550 rpm fordulatszámon történő rázatással. Ezután az ellenanyagokat és a minták

fehérjéit Proteináz K-val bontottuk le (lásd 3.6.1. fejezet), majd a precipitált kromatint fenol-kloroform-izoamilalkoholos extrakcióval tisztítottuk ki:

A mintákat egységesen 200 μ l végtérfogatra hígítottuk TE puffer hozzáadásával, majd 100 μ l fenolt és 100 μ l kloroform:izoamilalkoholt (24:1) adtunk hozzájuk. Ezt 2 perc vortexelés követte Biosan Multispinen az alábbi beállításokkal: vortexelés magas fokozaton 2000 rpm-en 20 másodpercig, majd centrifugálás 2 másodpercig, összesen 5 ciklusban. A mintákat ezután 13300 rpm fordulatszámmal centrifugáltuk szobahőmérsékleten 10 percig, majd a felülúszóból 2x80 μ l-t új Eppendorf-csőbe vittük át. Az alsó fázist 160 μ l TE pufferrel hígítottuk, Biosan Multispinen összekevertük a fent leírt beállításokkal, majd újra centrifugáltuk 13300 rpm fordulatszámmal 10 percig. A felülúszó 2x80 μ l-ét az előző centrifugálás után félretett 160 μ l felülúszóhoz adtuk, majd 160 μ l fenol és 160 μ l kloroform:izoamilalkohol (24:1) hozzáadása után megismételtük az extrakciót. A kétszeresen tisztított felülúszó 300 μ l-ét új Eppendorf-csőbe helyeztük, és 300 μ l kloroform:izoamilalkohollal (24:1) is újra tisztítottuk a fent leírtak szerint. Az utolsó centrifugálás után maradt felülúszóból 230 μ l-t vittünk át új Eppendorf-csőbe, és 23 μ l 3 M Na-Ac pH 5,2 és 1,5 μ l 20 mg/ml glikogén (G1767) hozzáadása után 1 ml 100% etanollal csaptuk ki a DNS-t -20°C-on inkubálva egy éjszakán át. Másnap 13300 rpm fordulatszámmal centrifugáltuk 4°C-ra előhűtött centrifugában 15 percig, a felülúszót eltávolítottuk, a csapadékot 70% etanollal mostuk, majd centrifugáltuk 13300 rpm fordulatszámmal 4°C-on 10 percig. A felülúszó eltávolítása után a csapadékot beszárítottuk, majd 30 μ l 10 mM Tris-HCl pH 8,0 pufferben oldottuk vissza.

A α -Flag ellenanyag megbízhatóságának ellenőrzéséhez w^{1118} állatok fejeiből izolált kromatinon is immunprecipitációt végeztünk, majd a Flag-taggelt H4r-t ill. H3.3-at expresszáló állatokból származó mintákkal (beleértve az ellenanyagmentes kontrollokat is) ChIP-qPCR segítségével hasonítottuk össze, melyekhez a Függelék 1. táblázatában feltüntetett *Hsp*-génekre, valamint *Gad1*, *IND* géneken illetve F20 és F22 heterokromatikus régiókra specifikus primereket használtunk. Az α -Flag használata nem eredményezett számottevő immunprecipitált DNS-t a w^{1118} állatok esetén, valamint az ellenanyagmentes kontrollok sem tartalmaztak számottevő immunprecipitált DNS-t, így az α -Flag (és az ellenanyagmentes kontrollok alapján az α -H3) ellenanyag kellően megbízhatónak bizonyult a ChIP-seq kísérletekhez.

3.6.3. ChIP-seq könyvtárkészítés és szekvenálás

A könyvtárkészítést NEBNext Ultra™ II DNA Library Prep Kit for Illumina kittel valósítottuk meg, a gyártói utasításokat követve. Ehhez Qubit dsDNA BR Assay Kittel megmértük a minták koncentrációit, melyet a Függelék 2. táblázata mutat be a felhasznált mennyiségekkel együtt. A szekvenálás MiSeq Reagent Kit v3 használatával történt, szintén a gyártói protokollt követve.

3.6.4. Bioinformatika és statisztika

A leolvasások rossz minőségű végeit Trim Galore szoftverrel távolítottuk el (0.6.6.) (53) és a jó minőségű readeket a *Drosophila melanogaster* (dm6) genomjához illesztettük Bowtie2 (2.4.2) szoftverrel (54). A feketelistás szekvenciákat – melyek az újgenerációs szekvenálás jellegéből adódóan adnak magas jelet, nem pedig a minták valódi tartalmát tükrözik (55) - a BAM Filter Galaxy version 0.5.9 szoftverrel (56) távolítottuk el. A mintákat összehasonlító korrelációs mátrixok a multiBamSummary Galaxy Version 3.3.2.0..0 szoftver segítségével készültek (57), a diagramok és Spearman-korreláció számítás a plotCorrelation Galaxy 3.3.2.0.0 verziójával valósultak meg (57). A peak-callingot a megszűrt BAM fájlokra hajtottuk végre a MACS2 callpeak Galaxy 2.1.1.20160309.6 verziójának segítségével (58,59), a csúcsok annotációja a ChIPseeker Galaxy 1.18.0+galaxy1 szoftverrel történt (60). A különböző minták közötti különbségeket a MACS2 bdgdiff Galaxy 2.1.1.20160309.1 verziójával számszerűsítettük (58,59). Mivel a totál input kontrollok nem lettek megszekvenálva, a variáns hisztonok csúcsait és leolvasásait azok H3-ra normalizált értékeivel hasonlítottuk össze. A leolvasások és csúcsok génekhez és FlyBase azonosítókhoz rendelése a *Drosophila melanogaster* BDGP6.28.101 genomannotáció felhasználásával történt. Az egyes genomi régiókra eső leolvasások számát a BedCov Galaxy 2.0.2 verziójával (61) határoztuk meg, és azokat a következő képlet szerint normalizáltuk: az adott régióban lévő leolvasások száma egy adott mintában / adott minta összes leolvasásának száma. Az egyes génekre eső leolvasások számának meghatározásához felhasznált annotációs fájlt FlyMine-ről (<https://www.flymine.org/flymine/regions>) töltöttük le. Gének funkcionális annotációjához a PANTHER GO-Slim (<http://pantherdb.org/>) szoftverét használtuk, Fisher's Exact tesztípust és FDR korrekciót alkalmazva. A erősen, indukálhatóan vagy gyengén/nem expresszált gének expressziós adatai a FlyBase expressziós profilból származnak ([http://flybase.org/rnaseq/profile search](http://flybase.org/rnaseq/profile_search)), az oldal alapbeállításait használva: az erősen expresszált géneket olyan génekként határozták meg, amelyek expressziója legalább „nagyon

magas” besorolást kapott az 1-5 napos korú adult fejekben, és az expressziós csúcs besorolása legalább „mérsékelten magas”. A gyengén vagy nem expresszált géneket olyan génekként határozták meg, amelyek expressziója legfeljebb „alacsony” besorolást kapott az 1-5 napos korú adult fejekben, és az expressziós csúcs besorolása legfeljebb „nem/rendkívül alacsony”. Az indukálhatóan expresszáladó géneket olyan génekként határozták meg, amelyek expressziója legalább „nagyon magas” besorolást kapott az 1-5 napos korú adult fejekben, és az expressziós csúcs besorolása legalább „mérsékelten magas” minden olyan kezelés esetén, amelyről rendelkezésre áll expressziós adat. Az adatsorokon statisztikai elemzést a GraphPad Prism 8.0.1 segítségével végeztük, egyirányú ANOVÁ-t követő páros többszörös összehasonlítás Sidak-tesztel.

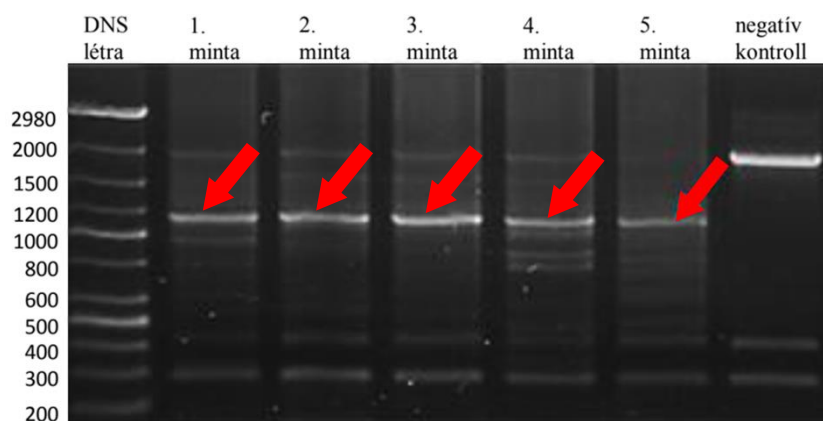
4. Eredmények

4.1. Epitóp-jelölt H4r-t termelő transzgenikus *Drosophila* vonal létrehozása

Mivel a H4r és a kanonikus H4 aminosav-szekvenciája teljesen megegyezik, ahhoz, hogy a H4r-t vizsgálni tudjuk, először megkülönböztethetővé kellett tennünk a kísérletek során a kanonikus H4-től. Ehhez a CRISPR/Cas9 rendszer segítségével 3xFlag-epitóp taget kódoló szekvenciát fuzionáltuk az endogén H4r-t kódoló szakaszhoz, így megőriztük a H4r eredeti expressziós mintázatát, és a kanonikus H4-től is meg tudtuk különböztetni.

A *H4r* gén *3xFlag-H4r* ill. *H4r-3xFlag* génre történő kicseréléséhez több különböző guide-RNS-t (lásd 6. ábra) is kipróbáltunk különböző párosításokban, az általuk irányított Cas9 fehérje által létrehozott kettősszalú DNS-törések homológ DNS-szakasz hiányában ligálással kerültek javításra, ami működő guide-RNS-ek és Cas9 esetén a vad típushoz képest 500-800 bp delécióhoz vezetett. Azt a guide-RNS párt használtuk fel a gén epitóp-jelölt H4r-t kódoló génre történő kicseréléséhez, amely a várt méretű deléciót eredményezte. Ennek tesztelésére a guide-RNS-eket expresszáló $y^2cho^2v^1$; $\frac{P\{guide-RNA[upstream]-guide-RNA[downstream]\}attP40}{CyO}$ hímeket $y^1M\{Act5C-Cas9.P\}ZH-2A w^*$ (Bloomington *Drosophila* Stock Center #54590) genotípusú, Cas9 fehérjét expresszáló szüzekkel kereszteztük, majd a véletlenszerűen kiválasztott, adult korú utódaikból preparált DNS mintákon PCR-rel vizsgáltuk meg a deléció jelenlétét. Kontrollnak Cas9 fehérjét kifejező, de guide-RNS-eket nem expresszáló $y^1M\{Act5C-Cas9.P\}ZH-2A w^*$ állatot használtunk.

Csak egy (gRNS1-gRNS5) guide-RNS párosítás eredményezett deléciót a guide-RNS-eket expresszáló hímek és a Cas9 fehérjét expresszáló szüzek keresztezéséből származó utódokban:

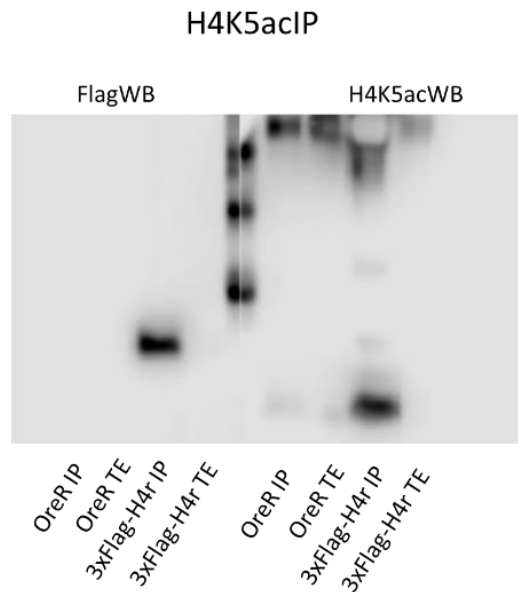


9. ábra: A gRNS1 és guide-RNS5 együttes expressziója deléciót eredményezett a *H4r* génben.

Ezek alapján az eredmények alapján a gRNS1 és gRNS5 guide-RNS-ek együttes expressziója valóban a DNS hasításához vezetett a *H4r* génben és a géntől downstream, a kettősszájú DNS-törés pedig a nem-homológ végek ligálásával javítva 800 bp-os deléciót eredményezett. Ha a hibajavításkor homológ DNS-szakasz is rendelkezésre áll, a kettősszájú DNS-törés homológ rekombinációval javítható, ami felhasználható arra, hogy a *H4r* gént olyan génre cseréljük ki, amely epitóppal jelölt H4r-t kódol.

A géncseréhez két olyan plazmidot hoztunk létre, melyek 1,5-1,5 kb hosszúságú homológ szakaszok között tartalmazzák az epitóp taget kódoló szekvenciával fuzionált *H4r* gént. Az egyik esetben az epitóp tag a H4r fehérje N-terminális végéhez lett fuzionáltatva, a másik esetben a C-terminális végéhez. Mindkét plazmidot a $\sigma y^2cho^2v^1; \frac{P\{guide-RNA[upstream]-guide-RNA[downstream]\}attP40}{CyO} \times y^lM\{Act5C-Cas9.P\}ZH-2A w^* \varnothing$ keresztezésből származó embriókba injektáltattuk, majd a 3.2.9. fejezetben leírtaknak megfelelően 3xFlag-tagget H4r-t expresszáló transzgenikus vonalakat hoztunk létre.

Ismeretlen okból a $w; \frac{H4r-3xFlag, loxP-dsRed-loxP}{TM3}$ törzs csak heterozigóta formában volt életképes, homozigóta formában nem, ezért a H4r funkcionális vizsgálatához a $w; 3xFlag-H4r, loxP-dsRed-loxP$ állatokat használtuk fel. Az N-terminálison tagget H4r-t kifejező állatok semmilyen eltérést nem mutattak a vad típusúakhoz képest. Ez alapján feltételezhető, hogy az N-terminális tag nem befolyásolta a H4r működését. Ezt a H4r egyik poszt-transzlációs módosításának vizsgálatával erősítettük meg, melynek során H4K5ac-specifikus ellenanyaggal végzett immunprecipitáció és Flag-ellenanyaggal végzett western blot segítségével ki tudtuk mutatni ezt a kovalens módosítást a H4r N-terminális doménjén (lásd 10. ábra). Bár nem állt rendelkezésünkre ellenanyag minden lehetséges H4 poszt-transzlációs módosítás vizsgálatára, ez az eredmény arra enged következtetni, hogy az N-terminális Flag-tag nem gátolja az N-terminális módosítások végbemenetelét.

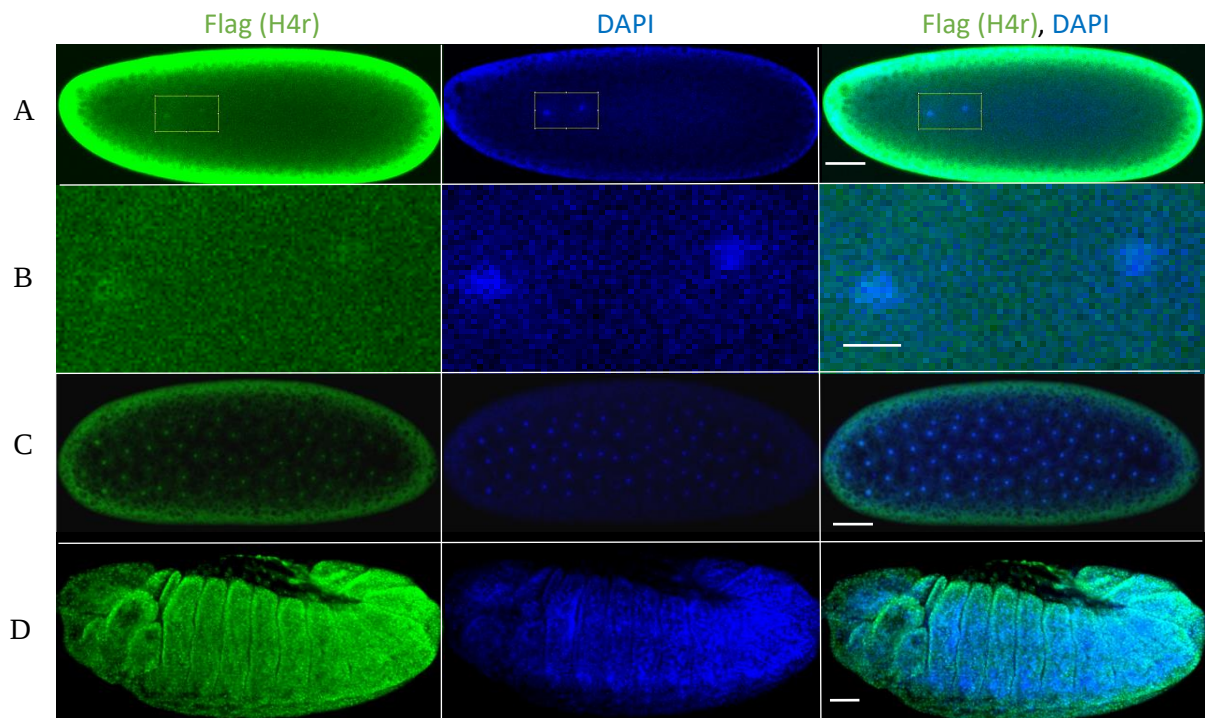


10. ábra: Az N-terminálisán taggelt H4r K5ac poszt-transzlációs módosításának vizsgálata. A H4K5ac-specifikus ellenanyaggal (ab51997) végzett immunprecipitációt (H4K5acIP) követően western blottal ki tudtuk mutatni, hogy a H4r rendelkezik ezzel a kovalens módosítással. Az immunprecipitációra a minta H4rK5ac-tartalmának feldúsítása miatt volt szükség, enélkül ugyanis a kanonikus H4 jele elnyomta a Flag-tag miatt 2 kDa-nal nagyobb H4r jelét. OreR: OregonR; IP: immunprecipitált minták; TE: totál extrakt.

4.2. A H4r expressziójának jellemzői

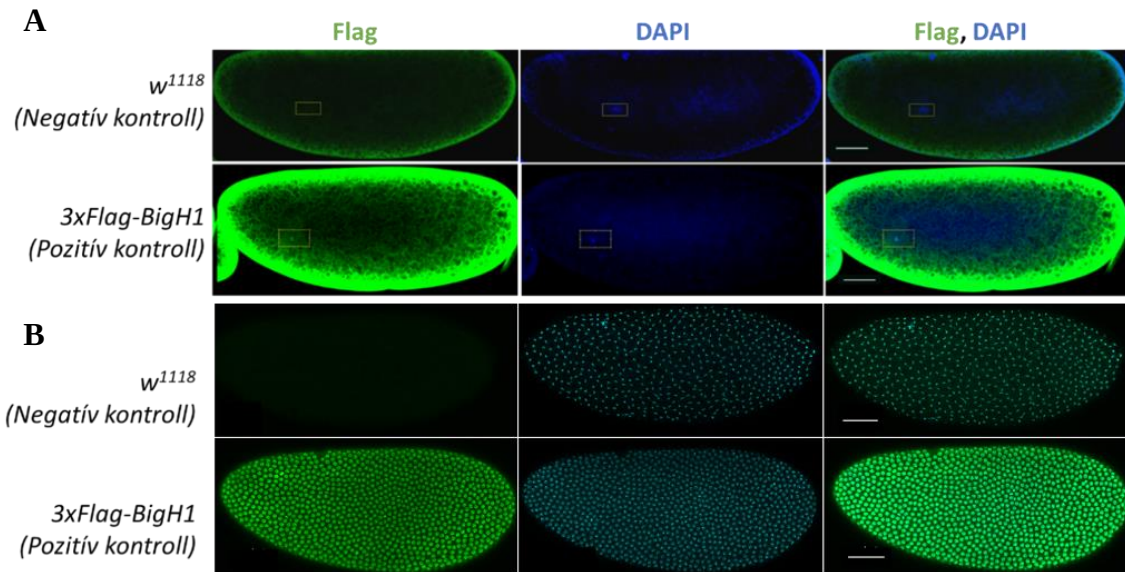
4.2.1. A H4r kifejeződési mintázata embriogenezis során

A H4r expresszióját az embrionális fejlődés során Flag-specifikus ellenanyaggal történő immunfestéssel követtük nyomon. A fehérje már a megtermékenyített embrió pronucleusaiban is kimutatható volt (lásd 11A-B. ábra), ami alapján feltételezhető, hogy a H4r anyai hatással kerül az embrióba, és részt vesz az apai pronucleusban végbemenő protamin-hisztin kicserélődésben. A H4r az embriogenezis során minden sejtmagban jelen volt (lásd 11C-D. ábra). Ez a kifejeződési mintázat a kanonikus hisztinokéval megegyezik, így semmilyen jel nem utalt arra, hogy a H4r-nek lenne bármilyen, a kanonikus H4-től eltérő, specifikus funkciója.



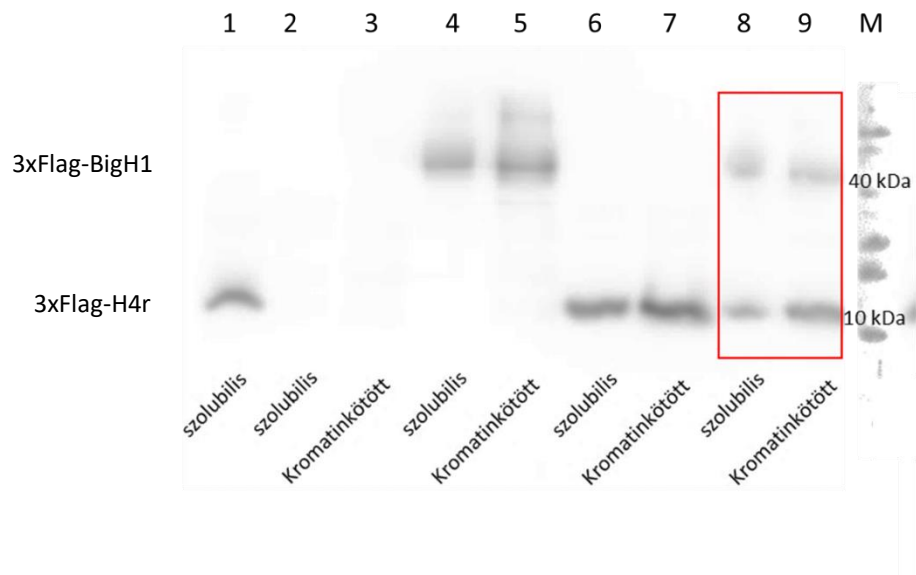
11. ábra: A H4r általános expressziót mutat az embriogenezis során. **A:** Megtermékenyített embrió, bekeretezve a pronucleusok; **B:** Pronucleusok; **C:** Zigótikus genomaktiváció előtt álló (korai) embrió (7. sejtmag-osztódási ciklus); **D:** Gasztrulálódó embrió. A lépték 50 μm -t jelez az A,C, D ábrákon, 10 μm -t a B ábrán.

Az immunfestések kontrolljaival való összehasonlítás alapján a korai, zigótikus genomaktiváció előtt álló embriókban megfigyelt erős citoplazmás festődés nagy mennyiségű szolubilis H4r jelenlétét jelzi, ugyanis a negatív kontrollban a Flag-ellenanyag nem adott erős háttérrel, ellenben a pozitív kontrollként használt 3xFlag-BigH1-et expresszáló törzsből származó embriók, melyek bizonyítottan nagy mennyiségű anyai eredetű BigH1 fehérjét tartalmaznak, hasonló mintázatot mutattak:



12. ábra: Az embriókon végzett immunhisztokémiai vizsgálatok kontrolljai. A: megtermékenyített embriók negatív és pozitív kontrollja. **B:** Zigótikus genomaktiváció kezdetén álló embriók kontrolljai (11. sejtmag-osztódási ciklus)

Annak megerősítésére, hogy a pronucleusokat tartalmazó embriókon megfigyelhető erős citoplazmás festődés nagy mennyiségű anyai eredetű fehérje jelenlétére utal, western blot segítségével összevetettük a H4r mennyiségét 0-1 órás embriókban a BigH1 linker hiszton variánshoz képest. A BigH1 szakirodalmi adatok alapján a korai embrió domináns linker hisztonja, és bizonyítottan nagy mennyiségű anyai eredetű fehérjeként van jelen a zigótikus genomaktiváció előtt álló embriókban (24), ezért jó viszonyítási alap. *w*; *3xFlag-H4r* és *w*; *3xFlag-BigH1* vonalak keresztezéséből létrejött *w*; $\frac{3xFlag-H4r,BigH1[wt]}{H4r[wt],3xFlag-BigH1}$ genotípusú nőtények által lerakott embriókban vizsgáltuk meg az anyai eredetű H4r és BigH1 fehérjék mennyiségét. Ehhez ezeket a *H4r* és *BigH1* génekre heterozigóta szüzeket *w¹¹¹⁸* hímekkel kereszteztük, majd az 1 óra alatt összegyűjtött petéikből származó mintákon végeztünk western blotot Flag-ellenanyaggal. Így egyetlen ellenanyag segítségével tudtuk összevetni a H4r-t és a BigH1-et. A kísérlet eredményét a 13. ábra mutatja be:

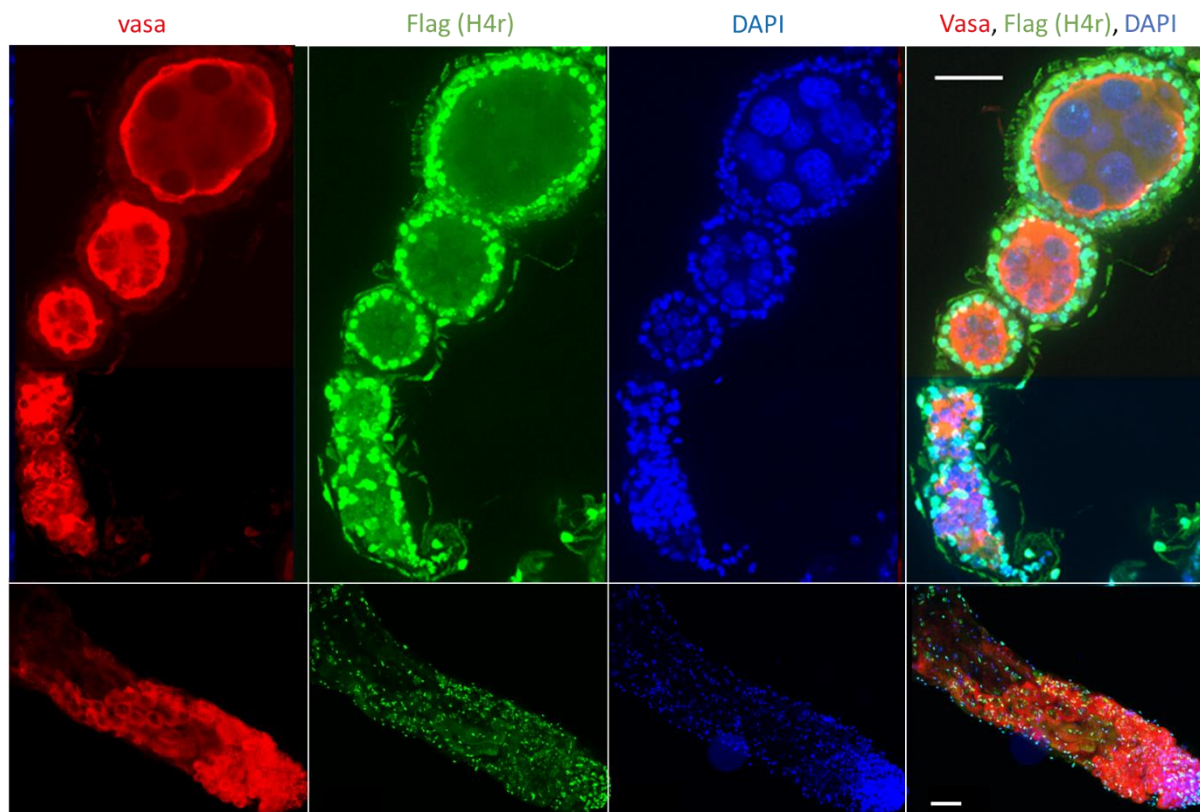


13. ábra: A H4r és a BigH1 szolubilis és kromatinkötött mennyisége 0-1 órás embriókban. A minták: 1: w; *3xFlag-H4r* adult fej (pozitív kontroll 1); 2-3: *w¹¹¹⁸* embriók (negatív kontroll); 4-5: w; *3xFlag-BigH1* embriók (pozitív kontroll 2); 6-7: w; *3xFlag-H4r* embriók; 8-9: w; $\frac{3xFlag-H4r, BigH1[w^t]}{H4r[w^t], 3xFlag-BigH1}$ heterozigóta anyák utódai (embriók).

A western blot tanúsága szerint a szolubilis és kromatinkötött H4r mennyisége a BigH1-ével összevethető a korai embriókban. Mivel a 0-1 órás embriókban a zigótikus genomaktiváció még nem történt meg, ezek a fehérjék kizárólag anyai hatással kerülhettek az embriókba. Ez ellentmond annak a szakirodalmi adatnak, mely szerint a *H4r* az ivarvonalon nem vagy csak gyengén expresszálódik (33).

4.2.2. A H4r kifejeződési mintázata ivarvonalon

A *H4r* gént elsőként leíró, 1996-os cikkben (33) Northern-blot kísérletekkel megállapították, hogy petefészkekben és embriókban a H4-ekvivalens fehérjét kódoló mRNS-ek döntően a kanonikus H4 génekről származnak, míg a differenciált testi sejtekben nagyobb mennyiségű H4r van jelen. A *H4r* mRNS expresszióját vizsgáló RT-qPCR kísérleteink megerősítették, hogy adult fejekben, ahol döntően poszt-mitotikus sejtek vannak jelen (62), a *H4r* mRNS expressziója többszáz-szorosa az osztódó sejtekben mérhető expresszióknak (lásd Függelék 1. ábra). Az immunhisztokémiai és western-blot eredményeink alapján azonban a H4r fehérje nagy mennyiségben van jelen a korai embriókban, ami anyai eredetre utal. Az ellentmondás tisztázásához immunfestések segítségével megvizsgáltuk a H4r fehérje kifejeződési mintázatát petecsövekben és herékben, melynek eredményét a 14. ábra mutatja be:

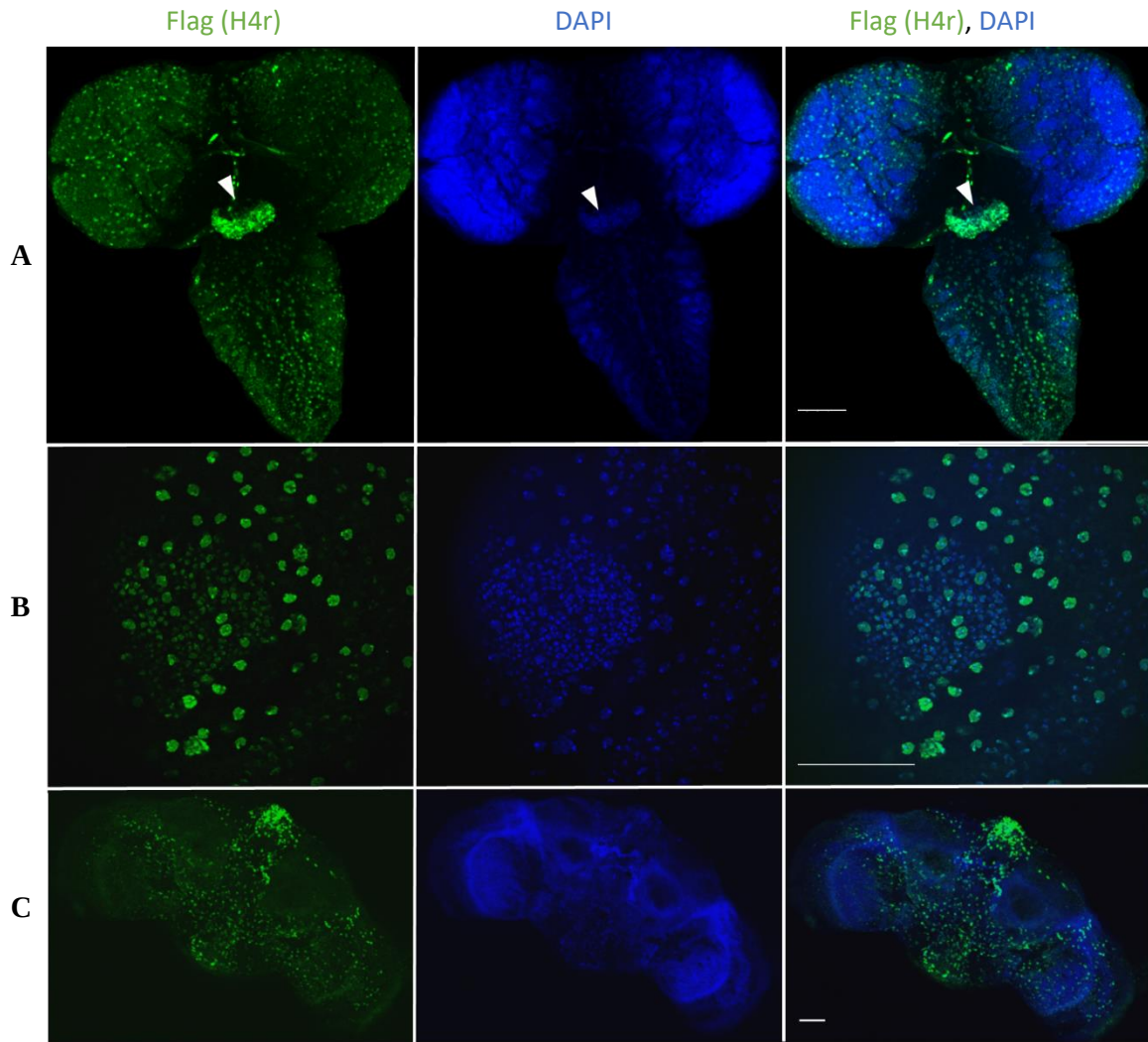


14. ábra: A H4r expressziója petecsőben (fölül) és herében (alul). A vasa az ivarvonalhoz tartozó sejtek citoplazmáját jelöli. A lépték 20 μ m-t jelez.

A H4r mindkét vizsgált szervben a szomatikus sejtekben volt legerősebben kimutatható, a dajkasejtek citoplazmájában megfigyelhető gyenge Flag-festődés a negatív kontrollban megfigyelténél nem erősebb. Az immunhisztokémiai vizsgálataink és a szakirodalmi adatok alapján a H4r expressziója szignifikánsan magasabb a nem-osztódó sejtekben, de az embriókon végzett vizsgálataink alapján az ivarvonalban lévő gyenge H4r expresszió nagy mennyiségű H4r felhalmozódását eredményezi az embriókban.

4.2.3. A H4r kifejeződési mintázatának változása a neuronális differenciáció során

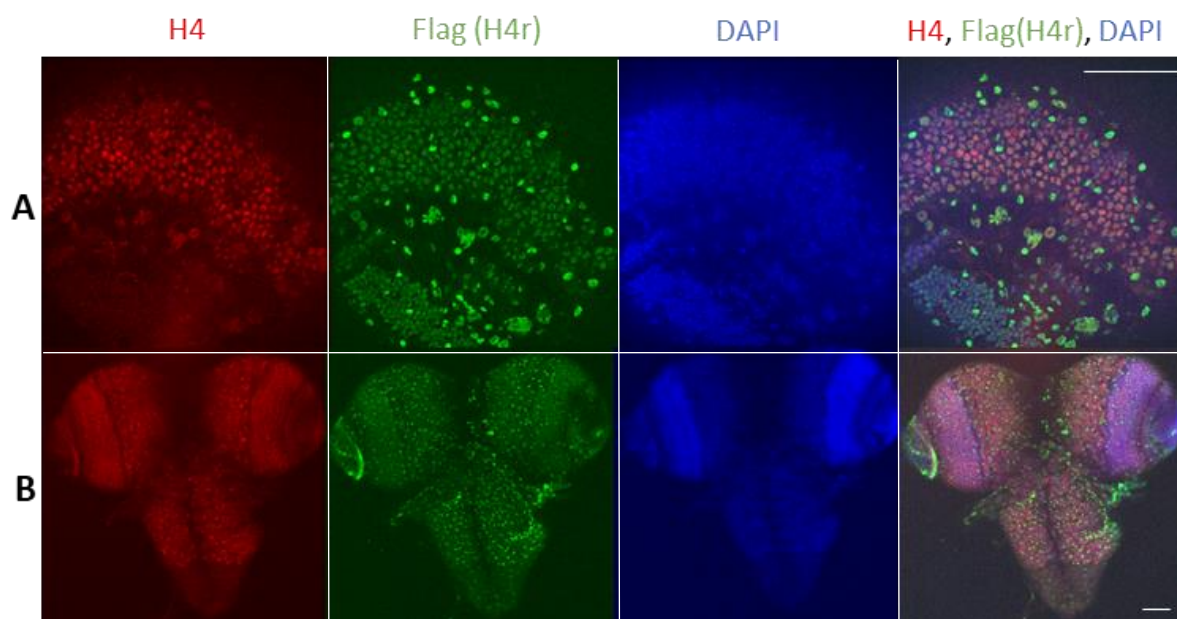
Az embriogenezis során megfigyelt általános H4r expresszió a legtöbb vizsgált lárvális szövetben (imaginális diszkuszkok, nyálmirigy) is kimutatható volt, azonban a lárva agyat vizsgálta azt találtuk, hogy a H4r az agyi sejteknek egy kisebb populációjában felhalmozódást mutat (lásd 15A-B. ábra). Ez a kifejeződési mintázat a kifejlett állatok agyában is megfigyelhető volt (lásd 15C. ábra).



15. ábra: A H4r kifejeződési mintázata és bizonyos sejtekre jellemző akkumulációja. A: Lárva agy (szemdiszkuszok és ventrális idegkötég (VNC – ventral nerve chord), nyílheggyel a subesophagiális ganglion jelezve; **B:** Szemdiszkusz; **C:** Adult agy. A léptékek az A és C ábra esetén 50 μm -t, a B esetén 10 μm -t jeleznek. A kép ventrális nézetben készült.

Annak megállapítására, hogy a H4r-t akkumuláló sejtekben nagyobb mennyiségű H4 hiszton fejeződik-e ki, mint a H4r-t gyengébben vagy nem expresszáló sejtekben, összevetettük a H4r és a kanonikus H4 mintázatát lárva agyakban (lásd 16. ábra). Az aminosav-szekvencia egyezősége miatt a H4 ellenanyag (Ab10158) kimutatta a kanonikus és a variáns H4 fehérjét is, a variáns kimutatására a Flag (Sigma M2) ellenanyag volt alkalmas. A H4 ellenanyaggal való festődés a DAPI-val való festődéshez hasonló mintázatot adott, ami arra engedett következtetni, hogy a H4r-t akkumuláló sejtekben is hozzávetőlegesen ugyanannyi H4 hiszton van jelen, mint a többi sejtben, de ezekben a sejtekben a H4r aránya jóval magasabb. Ezek alapján a H4r mennyisége nem az adott sejtek kromatin kondenzáltságával hozható

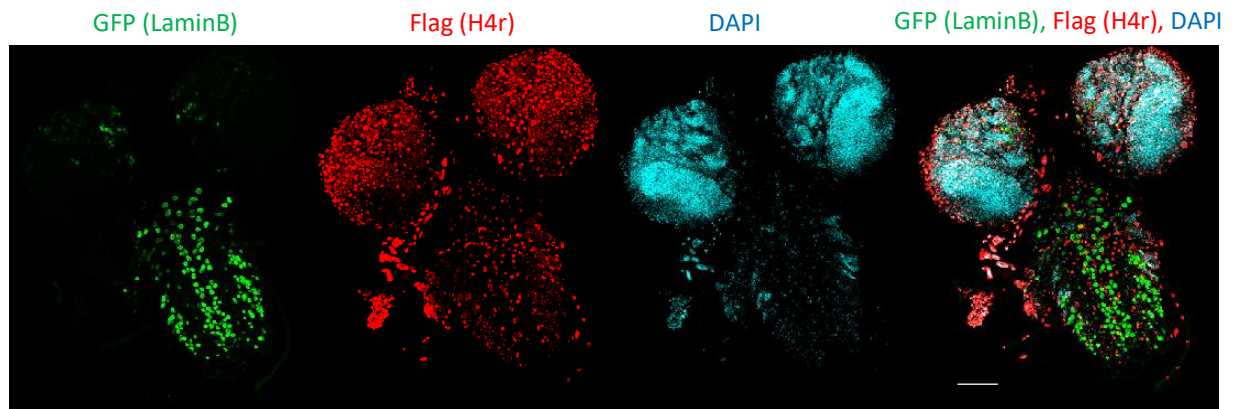
összefüggésbe, ami felvetette annak lehetőségét, hogy a H4r specifikus szerepet tölthet be azokban a sejtekben, melyekben nagyobb mennyiségben fejeződik ki.



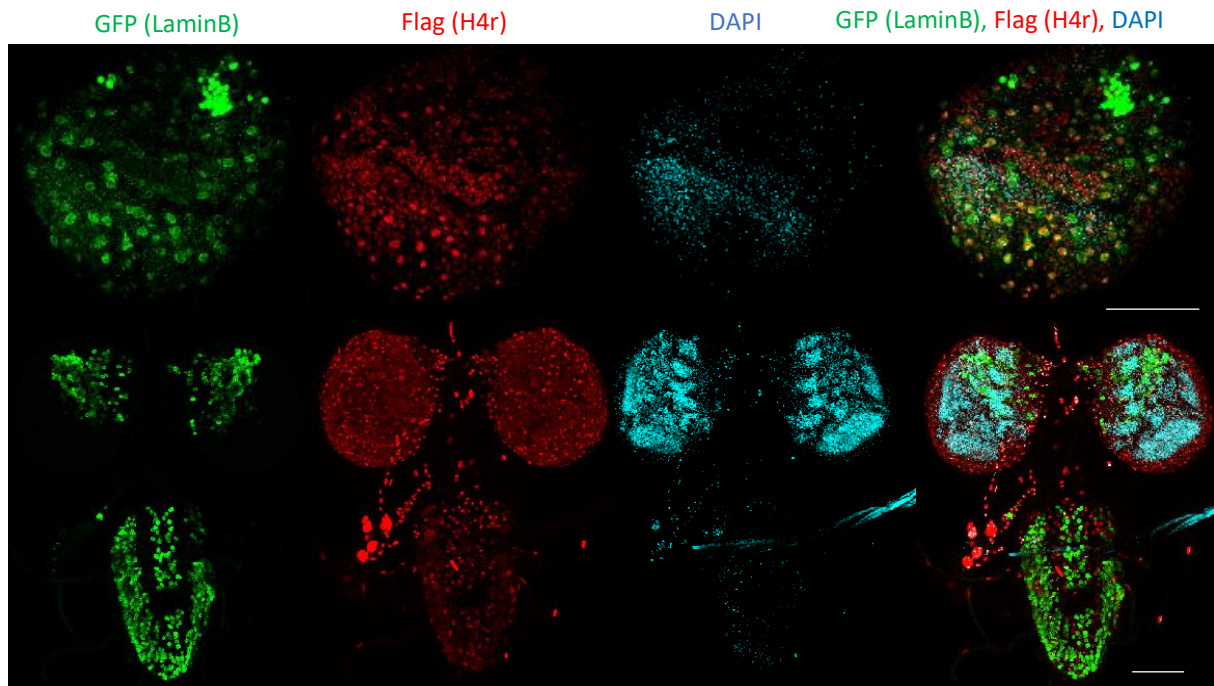
16. ábra: A kanonikus és a variáns H4 fehérjék kifejeződésének összehasonlítása immunhisztokémia segítségével. A: Szemdiszkusz; B: Teljes lárva agy. A lépték az A ábra esetén 10 μm -t, a B ábra esetén 50 μm -t jeleznek. A kép dorzális nézetben készült.

Hogy közelebb juthassunk a H4r specifikus szerepének megértéséhez, olyan kísérleteket végeztünk, melyek segítségével azonosíthatók azon sejtípusok, amelyekre jellemző a H4r nagyobb mértékű expressziója vagy akkumulációja. Ehhez olyan transzgenikus állatokat hoztunk létre, melyek egyszerre expresszálnak LaminB-GFP-t egy-egy sejtípusra jellemző gén Gal4-driverének irányítása alatt, valamint 3xFlag-taggelt H4r-t. A LaminB sejtmaghártyában lokalizálódik, így kijelöli az adott sejtípus sejtmagjait. α -GFP és α -Flag kettős immunfestéssel az adott típusú sejtek és a H4r-t felhalmozó sejtek közti kolokalizáció mértéke meghatározható:

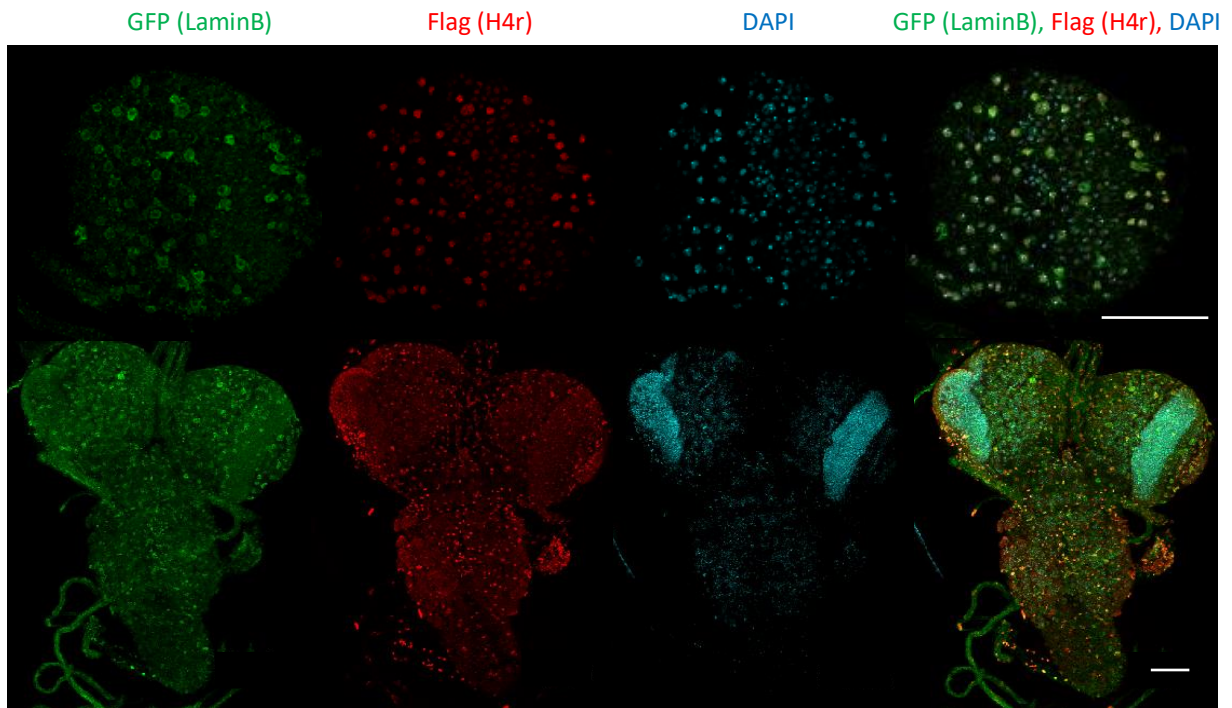
A: *w; OK371-Gal4/UAS-Lam-GFP; 3xFlag-H4r*



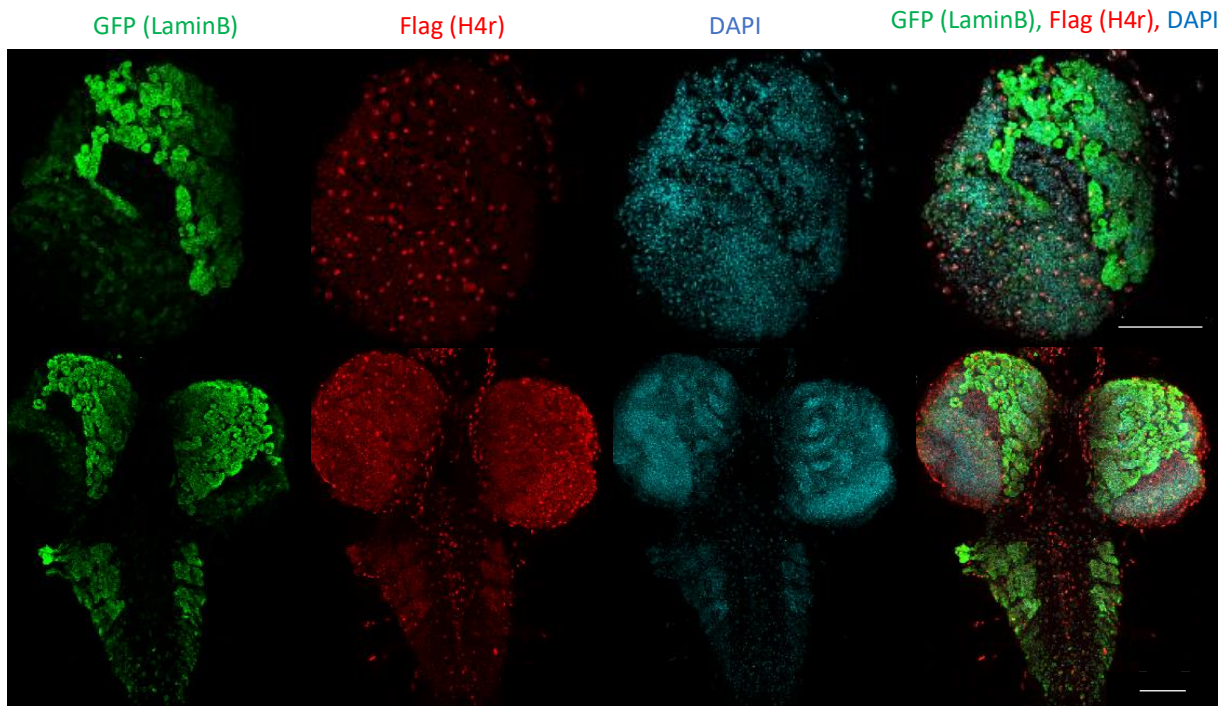
B: *w; Gad1-Gal4/UAS-Lam-GFP; 3xFlag-H4r*



C: *w; ChAT-Gal4/UAS-Lam-GFP; 3xFlag-H4r*

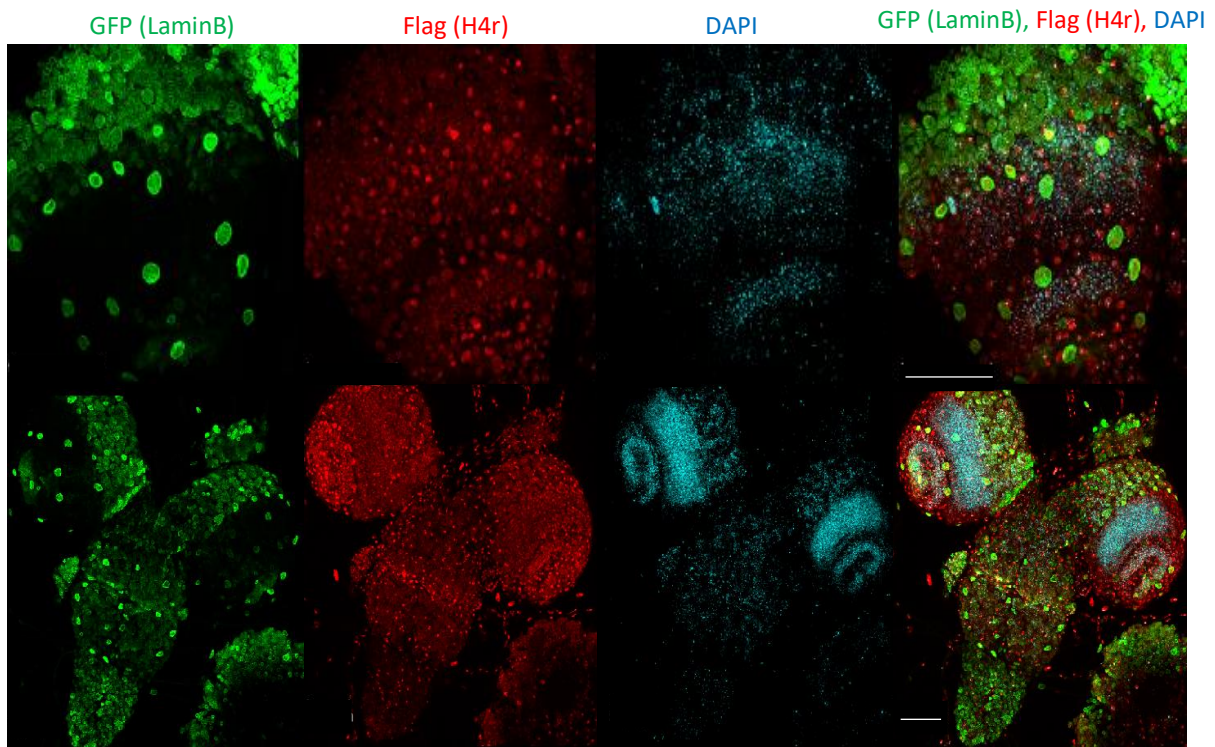


D: *w; Insc-Gal4/UAS-Lam-GFP; 3xFlag-H4r*



E: *elav-Gal4/w; UAS-Lam-GFP/+; 3xFlag-H4r/+*

elav-Gal4/Y; UAS-Lam-GFP/+; 3xFlag-H4r/+



17. ábra: LaminB-GFP és 3xFlag-H4r kettős immunfestések a H4r-t expresszáló sejtek típusának meghatározásához. Kolokalizáció mérése A: kolinerg neuronokkal; B: érett neuronokkal; C: GABAerg neuronokkal; D: glutaminerg neuronokkal; E: neuroblasztokkal. A léptékek a felső ábrákon 10 μm -t, az alsó ábrákon 50 μm -t jeleznek. A B és D ábrák ventrális, az A, C és E ábrák dorzális nézetben készültek.

A létrehozott vonalak genotípusait és a jelölt sejtek típusát, valamint a GFP-vel kijelölt sejtek és a H4r-t nagy mértékben expresszáló sejtek közti kolokalizáció mértékét az 5. táblázat mutatja be:

Létrehozott transzgenikus állatok genotípusai	LamB-GFP-t expresszáló sejtek típusai	H4r-t felhalmozó sejtek aránya az adott típusú sejtek között	Adott típusú sejtek %-os megoszlása a H4r-t felhalmozó sejtek között	Neurontípusok %-os megoszlása lárva agyban
$w; \frac{OK371-Gal4}{UAS-LamB-GFP}; 3xFlag-H4r$	glutaminerg neuronok (63,64)	3,05%	1,07%	3,15%
$w; \frac{Gad1-Gal4}{UAS-LamB-GFP}; 3xFlag-H4r$	GABAerg neuronok (64)	8,3%	8,87%	9,6%
$w; \frac{ChAT-Gal4}{UAS-LamB-GFP}; 3xFlag-H4r$	kolinerg neuronok (64,65)	21,48%	24,75%	26,8%
$w; \frac{Insc-Gal4}{UAS-LamB-GFP}; 3xFlag-H4r$	neuroblasztok (66)	10,48%	18,58%	24,65%
$\text{♀ } \frac{elav-Gal4}{w}; \frac{UAS-LamB-GFP}{+}; \frac{3xFlag-H4r}{+}$ $\text{♂ } \frac{elav-Gal4}{Y}; \frac{UAS-LamB-GFP}{+}; \frac{3xFlag-H4r}{+}$	érett neuronok (67)	9,2%	29,9%	25,5%

5. táblázat: A H4r-t felhalmozó sejtek típusainak meghatározására létrehozott transzgenikus állatok genotípusai és a vizsgált sejtípusokkal való kolokalizáció mértéke. A neurontípusok %-os megoszlását a DAPI-val mért kolokalizáció alapján határoztuk meg. (Az érett neuronok vizsgálata minden transzgenre nézve heterozigóta állatokkal történt, mert ismeretlen okból a homozigóta forma letalitást mutatott.)

ImageJ szoftver segítségével meghatároztuk, hogy az összes H4r-t akkumuláló sejtnél hány százaléka ad jelet GFP-ellenanyaggal, valamint azt is, hogy a GFP-jel alapján azonosított, adott típusú sejtek hány százaléka fed át a H4r-t felhalmozó sejtekkel. Ennek segítségével kiderült, hogy a H4r akkumulációja nem köthető egy meghatározott sejtsoporthoz, az összes vizsgált sejtípus előfordul ezen sejtek között. Habár a H4r akkumulációja többféle sejtípusban is előfordul, az is kiderült, hogy a H4r-t nagymértékben kifejező sejtek legnagyobb része kolinerg neuron. Teljes lárva agyat vizsgálva a H4r-t akkumuláló sejtek 21,48%-a volt kolinerg neuron, a kolinerg neuronoknak pedig 24,75%-ára volt jellemző a H4r felhalmozódása. Szemdiszkuszokban a H4r-t akkumuláló sejtek nagyobb hányada, 43,7%-a bizonyult kolinerg neuronnak, azonban a kolinerg neuronoknak a H4r-t akkumuláló hányada a szemdiszkuszban 21,25%-nak bizonyult, ami közel azonos a teljes agyban mért gyakorisággal (21,48%). A vizsgált típusú sejtek kolokalizációjának mértéke ahhoz hasonló volt, amilyen arányban ezen neuronok a lárva agyban lévő összes sejt között előfordulnak. Ezen eredmények alapján a H4r akkumulációja véletlenszerűen fordul elő ezen típusú neuronok között. Mivel a H4r felhalmozódása kimutatható volt neuroblasztokban és érett neuronokban egyaránt, azt is megállapíthattuk, hogy a H4r akkumulációja nem függ a sejtek differenciációs stádiumától.

4.2.4. Szövetspecifikus transzkripció faktor kötőhelyek a *H4r* gén promóterén

Miután immunhisztokémiai vizsgálatok segítségével megállapítottuk, hogy a *H4r* milyen típusú sejtekben fejeződik ki, megvizsgáltuk, milyen ingerek hatására aktiválódhat a transzkripciója. Ehhez először a promóterén jelen lévő potenciális transzkripció faktor kötőhelyeket azonosítottuk.

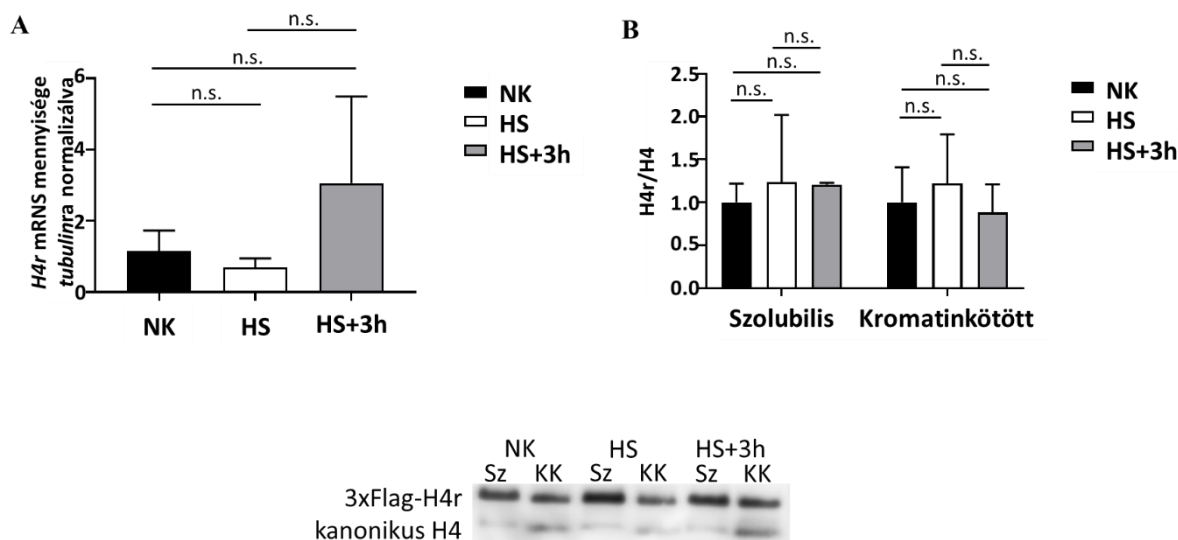
A *H4r* promóteranalízise során több potenciális szövetspecifikus transzkripció faktor kötőhelyet azonosítottunk. Az immunhisztokémiai eredményekkel összhangban az azonosított transzkripció faktorok nagyrészt az embrionális ill. neuronális differenciációhoz, valamint a follikuláris sejtek differenciációjához köthetők, ezeken felül megtalálhatók rajta Polycomb-mediált represszióban szerepet játszó fehérjék és a hősokkal indukálható expresszióra utaló Hsf kötőhelyek is. A *H4r* promóterén azonosított kötőhellyel rendelkező transzkripció faktorokat és azok funkcióinak rövid leírását a Függelék 3. táblázata tartalmazza.

4.2.5. A *H4r* expressziója nem változik szignifikánsan hősokk és regeneráció hatására

Mivel a *H4r* promóterén megtalálható Hsf kötőhely hősokkal való indukálhatóságot enged feltételezni, valamint a szakirodalmi adatok alapján a *H4r*-nek a hősokk gének promótereinél szerepe lehet a kromatinfunkciók szabályozásában (40), megvizsgáltuk, hogy hogyan változik a *H4r* expressziója hősokk ill. azt követő regeneráció hatására. Ehhez kezeletlen kontroll, 20 percig 37°C-on hősokkolt és 20 percig 37°C-on hősokkolt majd 3 órán át szobahőmérsékleten regenerálódott állatok izoláltunk RNS-t, kromatint és fehérjét, és megvizsgáltuk a *H4r* expresszióját mRNS és fehérjeszinten, valamint a kromatinban való lokalizációját is. Mivel a *H4r* a nem osztódó sejtekben szignifikánsan nagyobb mennyiségben fejeződik ki, mint az osztódó sejtekben (lásd Függelék 1. ábra), 1-5 napos kifejlett állatok fejeiből preparáltunk mintát, ahol a sejtek túlnyomó többsége terminálisan differenciálódott (62).

Sem mRNS, sem fehérjeszinten nem tapasztalunk szignifikáns változást a *H4r* expressziójában (az mRNS mennyiségét *tubulin*-ra normalizáltunk, a statisztikai elemzést két biológiai párhuzamos mintán végeztük: egyirányú ANOVÁ-t követő Sidak-teszt, $p \geq 0,1357$; a *H4r* és kanonikus H4 arányának változását kétirányú ANOVÁ-t követő Tukey-tesztel elemeztük, ugyanazon két biológiai mintából származó eredményeken: $p \geq 0,8675$), a kromatinkötött fehérje mennyisége sem változott számottevően hősokk ill. regeneráció hatására (a *H4r*/kanonikus H4 arány változását kétirányú ANOVÁ-t követő Tukey-tesztel elemeztük, ugyanazon két biológiai mintából származó eredményeken: $p \geq 0,7529$)(lásd 18. ábra). Ez

azonban még nem zárja ki annak lehetőségét, hogy a kromatinban való lokalizációja megváltozik transzkripció aktiváció ill. represszió hatására, ezért az izolált kromatinon immunprecipitációt végeztünk, amelyet szekvenálás követett (ChIP-seq) (lásd [4.3.4.2.](#) fejezet).



18. ábra: A *H4r* expressziójában bekövetkező változások hő sokk és regeneráció hatására. A: Változások az *H4r* mRNS expressziójában hő sokk és regeneráció után. ($n=2$; $p \geq 0.1357$; egyirányú ANOVA); **B:** Változások a szolubilis és a kromatin-kötött *H4r* mennyiségében a hő sokk és regeneráció hatására. NK: negatív kontroll; HS: hő sokkolt; HS+3h: hő sokkolt és szobahőmérsékleten három óra alatt regenerálódott. Sz: oldható, KK: kromatin-kötött ($n=2$; $p \geq 0.8675$ ill. $p \geq 0.7529$, kétirányú ANOVA).

4.3. A *H4r* lokalizációjának vizsgálata ChIP-seq-kel

4.3.1. A *H4r* preferenciálisan kötődik specifikus kromatinrégiókhoz

Mivel a *H4r* ötvözi a kanonikus és a variáns hiszton jellegeket - szerkezetében megegyezik kanonikus megfelelőjével, de a hiszton variánsokra jellemző génszerkezet, kópiaszám és szabályozás jellemzi – felmerül a kérdés, hogy a *H4r* genomi eloszlása kanonikus, vagy variáns jellegeket tükröz-e, ami a kanonikus H4-től esetlegesen eltérő szerepére utalhat? Ennek a kérdésnek a megválaszolásához ChIP-seq kísérletek segítségével vizsgáltuk meg a *H4r* kromatinon való eloszlását, és összevetettük egy kanonikus és egy variáns hisztonéval.

Mivel a kanonikus H4-től való esetleges eltérés kimutatása volt a célunk, kézenfekvő lett volna H4-specifikus ellenanyagot használnunk, azonban a különböző rendelkezésre álló kanonikus hiszton-specifikus ellenanyagok közül a H3-specifikus ellenanyag mutatott a Flag-ellenanyaggal összevethető affinitást immunprecipitációs kísérletekben. Mivel a H3- ill. H4-specifikus ellenanyagok egyaránt képesek kötni a kanonikus targetjeiket és azok variánsait is,

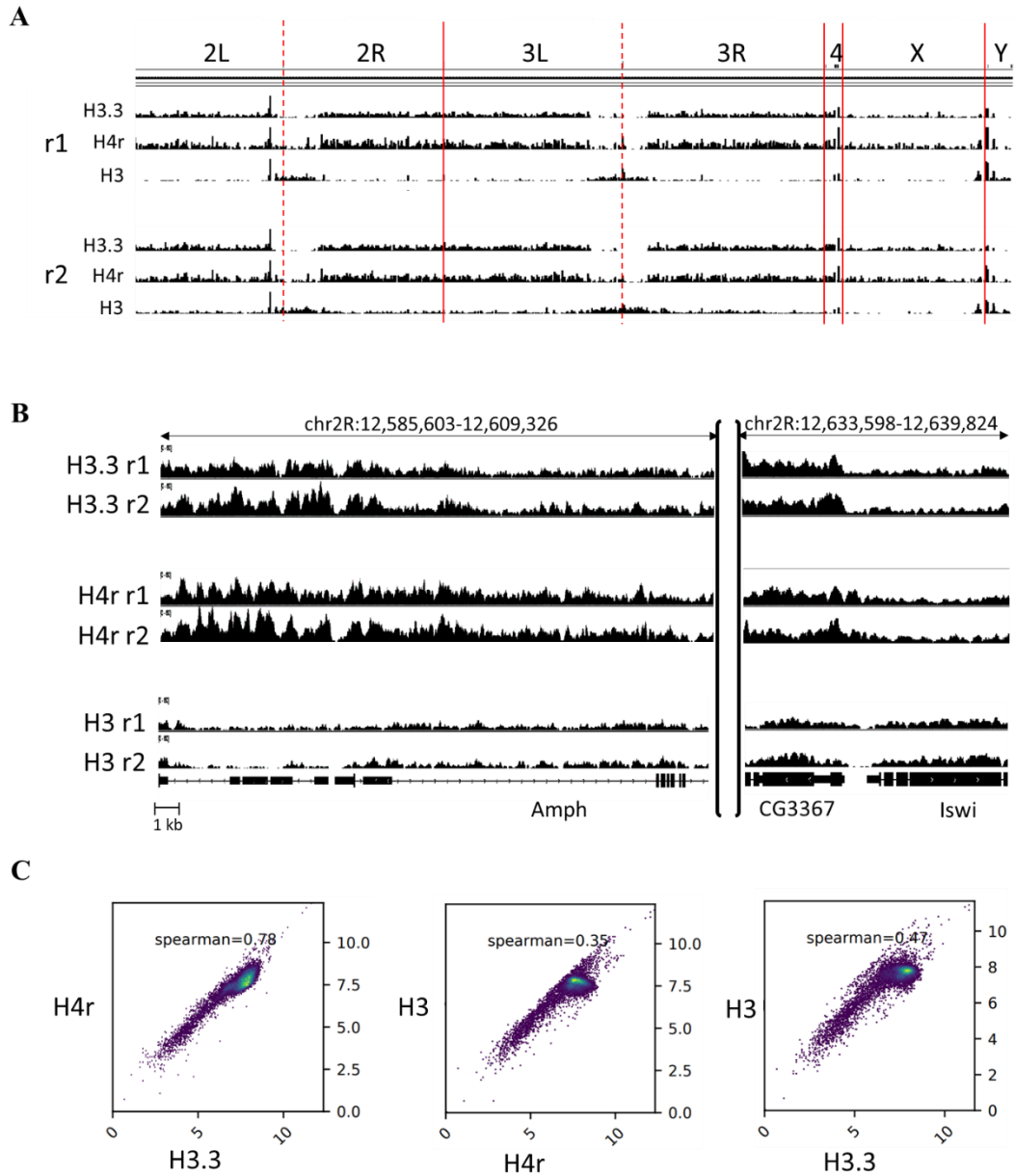
mindkettő használata esetén a kapható szekvenálási leolvasások az összes nukleoszómát jelölik, függetlenül attól, hogy azok kanonikus vagy variáns hisztont tartalmaznak-e. Ezért választottuk a nagyobb affinitású ellenanyagot, amely a H3-t ismerte fel.

A H4r variáns jellegének vizsgálatára a genomi eloszlását egy másik hiszton variánsával, a H3.3-éval hasonlítottuk össze. Ehhez egy olyan *Drosophila* vonalat használtunk, amely Flag-tagget H3.3-at expresszál az UAS-Gal4 rendszer irányítása alatt. Így mindkét hiszton variáns lokalizációját Flag-specifikus ellenanyag használatával tudtuk kimutatni a ChIP-seq kísérletek során. Mind a 3xFlag-H4r-t kifejező állatokból, mind pedig a H3.3-3xFlag-t termelőkből származó mintákon végeztük ChIP-seq kísérletet H3-ellenanyag felhasználásával, így mindkét hiszton genomi eloszlását a nukleoszómák eloszlásával tudtuk összevetni. Mivel a szakirodalmi adatok és az immunhisztokémiai eredményeink alapján a H4r-nek a nem-osztódó, differenciálódott sejtekben lehet specifikus szerepe, kísérleteinket 1-5 napos, kifejtett állatok fejeiből származó mintákon végeztük el.

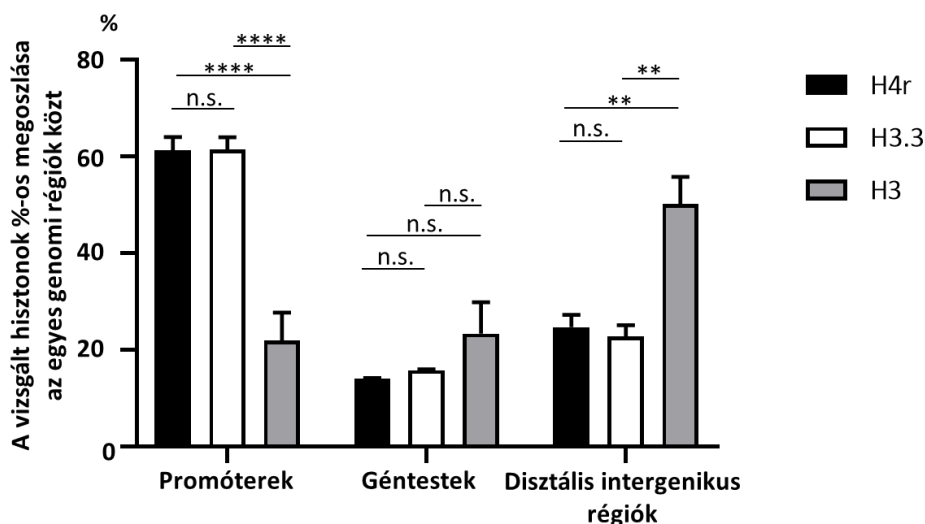
Több különböző Gal4-drivert kipróbálva a legtöbb esetben jelentős letalitást tapasztaltunk a H3.3-3xFlag túltermeltetése esetén, az elav-Gal4 driver használatával azonban a Flag-jelölt H3.3-at túltermelő állatok a vad típusú állatokéval megegyező életképességet mutattak. Mivel így a H3.3-3xFlag expressziós mintázata nem felel meg az endogén H3.3 kifejeződési mintázatának (hiszen a H3.3 minden sejtben, nem csak a neuronokban expresszálódik), a Flag-ellenanyaggal kapott ChIP-seq eredményeinket ellenőrzésképp összevetettük az elérhető szakirodalmi adatokkal. A mi eredményeink összhangban állnak a H3.3 és kanonikus H3 genomi lokalizációját érintő elérhető szakirodalmi adatokkal (68).

A két független kísérlet eredményét a 19. ábra mutatja be. A bemutatott eredmények alapján a H4r eloszlásáról kapott eredmények reprodukálhatók, az eloszlása a genomon nem véletlenszerű és nem homogén, valamint nagymértékű hasonlóságot mutat H3.3 variáns hiszton eloszlásával ($p = 0,78$, lásd a 19C. ábra). A két alternatív hiszton lokalizációi közötti átfedés azonban messze nem tökéletes, ami a két variáns funkcionális különbségeire utal.

A H4r eloszlása jelentősen eltér a kanonikus hiszton H3-tól ($p = 0,35$, lásd 19C ábra). A H4r eloszlása jelentősen eltér a kanonikus hiszton H3-étől ($p = 0,35$, lásd 19C. ábra). Míg a H4r és a H3.3 variánsok legnagyobb része (~60%) gének promóterein lokalizálódott, a kanonikus H3 az intergenikus régiókban domináns (~50%) (lásd 20. ábra).



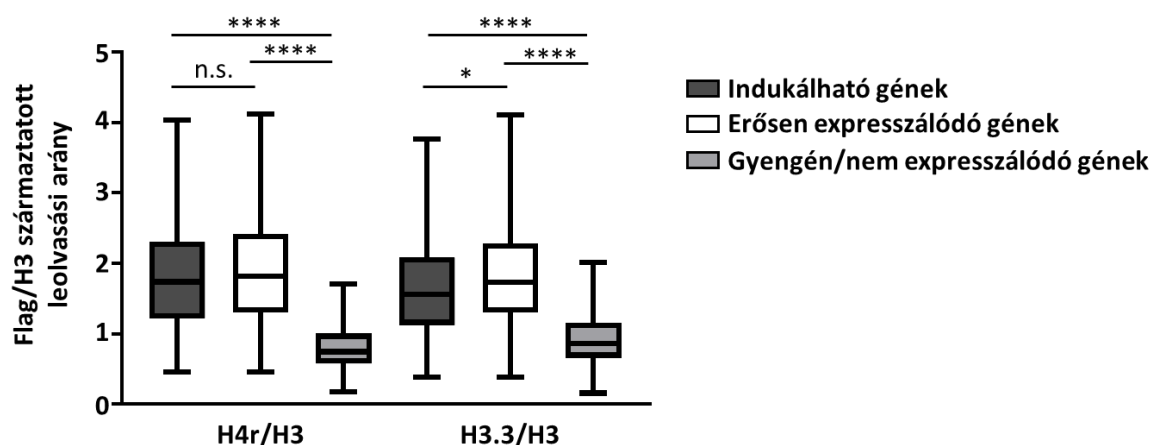
19. ábra: **A:** A H3.3, a H4r és a H3 eloszlása genomszerte a ChIP-seq kísérletek eredményei alapján. Legfelül az egyes kromoszómák jelezve, a grafikonok a baloldalon jelzett fehérjék lokalizációjának észlelt gyakoriságát jelzik. Megjegyzendő, hogy a H3.3-at és a H4r-t egyaránt Flag-specifikus antitest detektálta, míg a H3-at egy H3-specifikus antitestet, amely egyaránt felismeri a H3.3-at. **B:** H3.3, H4r és kanonikus H3 lokalizáció meghatározott, reprezentatívnak tekinthető genomi régiókban. Az A és B ábrán bemutatott csúcsok mérete azzal arányos, hogy az adott mintából származó összes leolvasás számához képest mennyi esik az adott pozíciókra. **C:** **H4r, H3.3 és H3 eloszlások összevetése és Spearman-korrelációi.** r1: 1. biológiai replikátum; r2: 2. biológiai replikátum.



20. ábra: A H4r, H3.3 és kanonikus H3 mennyiségi eloszlása különböző genomi régiókban. n.s. : nem szignifikáns; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

Ezután meghatároztuk, milyen funkciókhoz köthetők azok a gének, amelyeken a H4r ill. a H3.3 lokalizálódik. A PANTHER GO-Slim Biological Process elemzése szerint ezek a gének a differenciálódás során aktiválódó illetve a sejtek normál működéséhez szükséges gének – ide értve a különböző ingerek által indukálható géneket is. A sejtciklushoz és a sejtosztódáshoz kapcsolódó géneken csak véletlenszerű H4r és H3.3 előfordulás figyelhető meg (lásd Függelék 4. ábra).

A FlyBase RNS expressziós adataival összevetve a vizsgált hiszton variánsok mennyisége szignifikánsan magasabb azokon a géneken, amelyek indukálhatók vagy erősen expresszálódnak a felnőtt agyban, mint azokon a géneken, amelyek gyengén vagy nem expresszálódnak (lásd 21. ábra). A statisztikai analízishez génenként a vizsgált variánsokból származó ChIP-seq leolvasások számát a H3-ból származó leolvasások számára normalizáltuk. A H3-ból származó leolvasások a nukleoszómák mennyiségéről adtak információt, míg a Flag-ellenanyagból származók csak a variánsokról. A kettő aránya megmutatta, hogy az adott gént érintő összes nukleoszómák között mennyire gyakoriak a vizsgált hiszton variánsok.



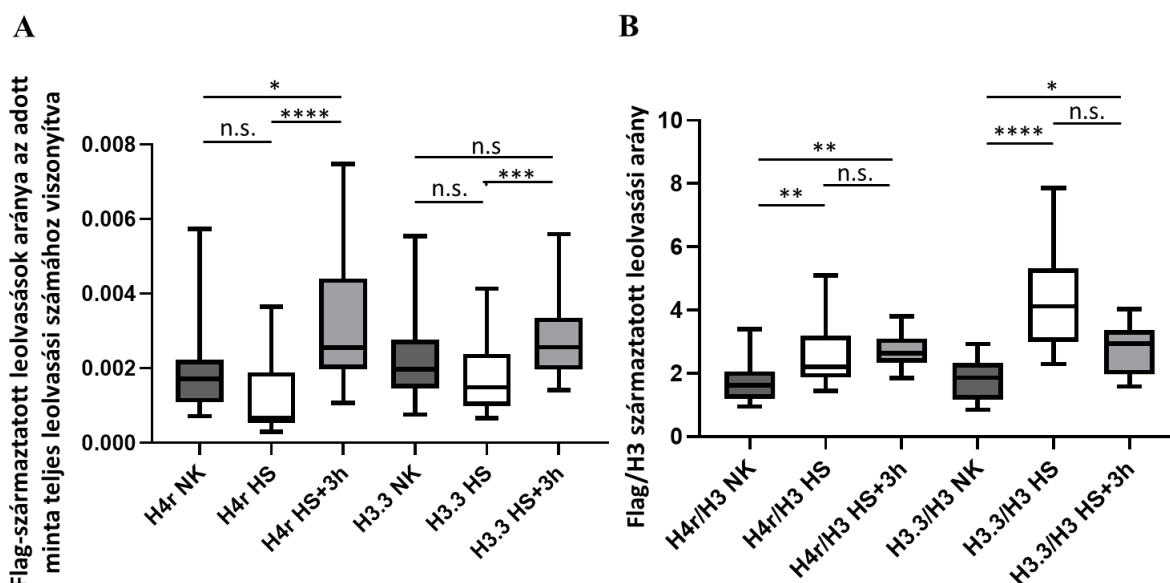
21. ábra: Az alternatív hisztonok mennyisége a kanonikus H3-hoz viszonyítva adult fejben indukálható (n=972), erősen (n=323) vagy gyengén/nem (n=2846) expresszálódó géneken (az expressziós adatok FlyBase-ről származnak). Az alkalmazott statisztikai elemzési módszer: Kruskal-Wallis-teszt. n.s. : nem szignifikáns; *: p < 0,05; **: p < 0,01; ***: p < 0,001; ****: p < 0,0001

4.3.2. A H4r és H3.3 mennyisége különböző módon változik transzkripció aktiváció és represszió hatására

A rendelkezésre álló szakirodalmi adatok arra a feltételezésre vezettek, hogy a H4r-nek szerepe lehet a transzkripció memória kialakításában a poszt-mitotikus, terminálisan differenciálódott sejtekben. Ebben az esetben a H4r mennyisége az egyes géneken visszatükrözheti a múltbéli transzkripció eseményeket, esetleg részt vehet azok ismétlődő aktivációjának szabályozásában. Mivel a *H4r* deléciós mutáns állatok megnövekedett hőstressz-rezisztenciája (40) alapján a H4r-nek a hősokk-gének működésének szabályozásában szerepe lehet, hősokkolt ill. azt követően regenerált állatokból származó mintákon ismételtük meg a ChIP-seq kísérleteinket, és megvizsgáltuk a H4r és a H3.3 mennyiségének változását hőstressz és regeneráció hatására a hősokk-géneken. Ehhez a kísérleti állatokat (1-5 napos kifejtett állatok) 20 percig 37°C-os hőstressznek tettük ki, az állatok felét a hőstresszt követően szobahőmérsékleten hagytuk 3 órán át regenerálódni, majd a fagyasztást követően a fejeikből izolált kromatinon ChIP-seq kísérletet végeztünk α -Flag és α -H3 ellenanyagok felhasználásával.

A szekvenálási eredmények azt mutatták, hogy a H4r és a H3.3 mennyisége nem változik szignifikánsan a *Hsp*-géneken hősokk hatására, de nő regeneráció után (lásd 22A. ábra). A H4r kanonikus H3-hoz viszonyított aránya látványosan megnő hősokk hatására, a hősokk során beépült nukleoszómánkénti relatív mennyisége nem változik szignifikánsan a regeneráció

során. A H3.3 kanonikus H3-hoz viszonyított aránya nő a hő sokk hatására, de a H4r-rel ellentétben a regeneráció után enyhe, de nem szignifikáns csökkenést mutat (lásd 22B. ábra).



22. ábra: A H4r és H3.3 mennyiségének változása a *Drosophila* 13 Hsp-génjén hő sokk ill. regeneráció hatására. A: A Hsp gének leolvasási arányának változása az adott minta összes olvasási számához viszonyítva. Alkalmazott statisztikai elemzési módszer: Friedman-teszt B: Az alternatív/kanonikus hisztonarány változásai. Az alkalmazott statisztikai elemzési módszer: Friedman-teszt. n.s. : nem szignifikáns; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$. NK: kezeletlen (nem hő sokkolt) kontroll (Flag-tagget hisztont expresszáló állatok); HS: 20 percig 37°C-on hő sokkolt állatokból származó minták; HS+3h: 20 percig 37°C-on hő sokkolt majd 3 órán át szobahőmérsékleten regenerálódott állatokból származó minták.

A H4r abszolút és relatív mennyisége is jelentősen magasabb a Hsp-géneken hő sokkot követő regeneráció után, mint amennyi hő sokk előtt jelen volt ezeken a géneken. Ezzel szemben a H3.3 abszolút mennyisége nem haladja meg regeneráció során a kezelés előtt a Hsp-géneken mért mennyiségét. Ez az eredmény azt sugallja, hogy a két vizsgált alternatív hiszton hasonló szerepet tölt be a Hsp gének transzkripció aktiválásában, de különböző szerepet játszanak a transzkripció repressziójában. Represszió során a H3.3 részben kanonikus H3-ra cserélődik, de a H4r a Hsp géneken marad a hő sokk-kezelés előtti állapothoz képest megnövekedett mennyiségben. Ez alapján a H4r mennyisége a kezdeti feltételezésünkkel egybevágóan visszatükrözi a múltbéli transzkripció eseményeket, ami a transzkripció memóriában betöltött esetleges szerepére utal.

5. Eredmények megvitatása

Doktori munkám során létrehoztunk egy olyan kísérleti rendszert, melyben a kanonikus H4 és a vele megegyező aminosavszekvenciával rendelkező, de eltérő módon expresszáldó H4r a 3xFlag epitóp tag segítségével megkülönböztethetők egymástól. Az epitóp jel nyomon követésével kimutattuk, hogy a H4r anyai hatású fehérjeterméként kerül az embrióba, és már az anyai és apai pronucleusokban is jelen van. A szakirodalomból ismert, hogy az apai pronucleusban a protamin hisztonokra cserélődésre során a kanonikus H3 helyett H3.3 épül be a kromatinba (69), ami a H4r apai pronucleusokon történt kimutatásával együtt támogatja azt a hipotézist, mely szerint a H4r egyik funkciója, hogy interakciós partnerként szolgáljon a H3.3-nak, amikor az a H4 hisztonnal dimer formájában beépül a kromatinba a HIRA chaperon segítségével. Mivel azonban az anyai pronucleusba kanonikus H3 épül be, és a H3.3 nem mutatható ki (70), de a H4r igen, ez bizonyítékul szolgál arra, hogy a H4r-nek van a H3.3-tól független funkciója is.

Szakirodalmi adatok alapján a *H4r* mRNS mennyisége a poszt-mitotikus sejtekben szignifikánsan nagyobb, mint a csíravonalban, ami arra enged következtetni, hogy a H4r feladata a kanonikus H4 helyettesítése a poszt-mitotikus sejtekben, ahol a kanonikus H4 már nem expresszáldik (33). A mi kísérleti eredményeink alapján azonban a H4r fehérje már az embrionális stádiumtól kezdődően nagy mennyiségben jelen van, és éppen a neuronális differenciáció során csendesítődik bizonyos sejtekben, melyek közt megtalálhatók neuroblasztok, kolinerg, GABAerg és glutaminerg neuronok is. Azon sejtek között, melyekben a H4r expressziója a differenciáció után is fennmarad, legnagyobb arányban kolinerg neuronokat találtunk, ez azonban a mérések eredmények alapján abból eredhet, hogy a lárva agyban lévő sejtek legnagyobb része kolinerg neuron. A kolokalizációs mérések eredményei alapján a H4r felhalmozódása véletlenszerűen fordul elő az egyes agyi sejtek között, differenciálódási stádiumtól vagy funkciótól függetlenül.

Ahhoz, hogy megérthessük a H4r funkcióját, meg kellett vizsgálni, milyen genomi régiókhoz kötődik preferenciálisan. A H4r lokalizációját a genomon adult fejből származó kromatinon vizsgáltuk meg kromatin-immunprecipitációt követő szekvenálással. Kontrollnak a minden nukleoszómában jelen lévő H3-at használtuk. Összehasonlításként egy olyan vonalon is elvégeztük a kísérletet, amely 3xFlag-jelölt H3.3-at expresszált. A H4r és H3.3 lokalizációja nagyfokú hasonlóságot mutatott, és élesen eltért a kanonikus H3-étól. A replikációfüggetlen

hisztonok és a kanonikus H3 lokalizációjában szembetűnő különbségeket találtunk, a kromatinkötött H4r és H3.3 legnagyobb része promótereken volt kimutatható, míg a kanonikus H3 az intergenikus régiókban volt domináns. Ez az eredmény arra engedett következtetni, hogy a H4r a kanonikus H4-gyel azonos aminosav-sorrend ellenére hiszton variáns funkcióval rendelkezhet.

A H4r és H3.3 lokalizációja nagyrészt átfedő volt, és az adult fejben erősen expresszáldó ill. indukálható géneken voltak abundánsak. Ez a H4r-nek a transzkripció-aktivációban betöltött szerepére engedett következtetni, amit támogatott a lokalizációjának H3.3-mal mutatott nagyfokú átfedése, a H3.3 transzkripció aktivációban betöltött szerepe ugyanis már bizonyított (19). A H4r transzkripció-szabályozásban betöltött szerepének pontosabb megértéséhez megvizsgáltuk a H4r és a H3.3 lokalizációjának változását transzkripció aktiváció és represszió hatására. Ehhez a hősokkot illetve az azt követő regenerációt alkalmaztunk, mert ezen környezeti változások génexpresszióra gyakorolt hatásai *Drosophiában* már jól ismertek, valamint a H4r hősokk gének aktivitásának szabályozásában betöltött szerepe a szakirodalmi adatok alapján valószínűsíthető (40).

A ChIP-seq kísérleti eredményeink alapján a H4r és a H3.3 hasonló módon megnövekedett mennyiségben épül be azokba a nukleoszómákba, amelyek hősokkra történő aktiváció során is a hősokk-géneken maradnak, így részt vesznek a transzkripció aktivációjában. Regeneráció során azonban, amikor a transzkripció csendesítésével párhuzamosan megnő a hősokk géneken a nukleoszómák száma, az újonnan beépülő nukleoszómák nagyjából H4r-t tartalmaznak kanonikus H4 helyett, azonban a H4r-nél kevesebb H3.3-at tartalmaznak. 3 órás regenerációs időt követően a H3.3 mennyisége visszatér a hősokk-kezelés előtti szintre, míg a H4r regeneráció után mért mennyisége a *Hsp*-géneken jelentősen meghaladja a kezelés előtti mennyiségét. Ez összhangban áll a kezdeti felvetésünkkel, mely szerint a H4r mennyisége az egyes géneken visszatükrözi a korábbi transzkripciós eseményeket.

A transzkripciós memória feladata a sejt identitásának és homeosztázisának fenntartása a sejt működéséhez szükséges gének aktiválásával és a szükségtelen gének repressziójával, ezen kívül a gyakori környezeti ingerekre történő egyre gyorsabb és erősebb transzkripciós válaszok kialakítása. A H4r-nek a vizsgált szövetben aktív és indukálható géneken kimutatott lokalizációja, valamint az indukciót követő regeneráció során kimutatható megnövekedett mennyisége alapján feltehetően szerepe lehet a sejtek identitásának megfelelő génexpressziós mintázat létrehozásában és fenntartásában, valamint változó környezetben az indukálható

gének transzkripciójának aktivációjában betöltött szerepével járulhat hozzá a sejtek homeosztázisának fenntartásához.

Érdekes felfedezés volt, hogy a *H4r* expressziója nem változik szignifikánsan hő sokk és regeneráció hatására sem mRNS, sem fehérje szinten. A kromatinkötött H4r mennyisége sem változik szignifikánsan, de a ChIP-seq adatok tanulsága alapján genomszerte jelentős H4r-átrendeződés történik transzkripció aktiváció és represszió hatására. Ez alapján a H4r alacsony szintű, de folyamatos expressziója elegendő fehérjét biztosít a sejtnak a transzkripciós változások hatására történő kromatin-átrendeződéshez.

Bár a H4r aminosav-szekvenciája teljesen megegyezik a kanonikus H4-ével, működése sokkal több hasonlóságot mutat a H3.3 hiszton variánssal, mint a vizsgált kanonikus hiszton H3-mal. Mivel az egyetlen különbség a H4r és a kanonikus H4 között a két fehérje expressziójában rejlik, a két fehérje funkciójában mutatkozó különbségek is erre vezethetők vissza. Mivel a kanonikus H4 kizárólag a sejtciklus S-fázisában expresszálódik, feltételezhető, hogy a H4r-nek valóban az egyik feladata a kanonikus H4 helyettesítése a nem osztódó sejtekben, amelyekben a kanonikus H4 nem fejeződik ki (33). Ez megmagyarázza azt a nagymértékű átfedést a H4r és a H3.3 lokalizációjában is: mivel a H3.3 csak egy H4 hisztonnal dimert alkotva épülhet be a nukleoszómába, a nem osztódó sejtekben az ott nagyobb mennyiségben jelen levő H4r szolgálhat számára dimerizációs partnerként. Ez azonban nem magyarázza meg, miként tölt be a H4r önállóan funkciót azon géneken, amelyek csak H4r lokalizációt mutattak, de H3.3 lokalizációt nem, és az osztódó sejtekben, embrionális és lárvális szövetekben kimutatott H4r jelenléte is nyitott kérdés marad.

A kanonikus *H4* és a variáns *H4r* gének nem csak expressziós mintázatukban, hanem génszerkezetükben és kodonhasználatukban is eltérnek egymástól. Ismert jelenség az eukarióta transzláció szabályozásban az, hogy bizonyos mRNS-ek meghatározott pozíciókban ritka kodonokat tartalmaznak. A ritka kodonokat tartalmazó tRNS-ekből a többi tRNS-nél jóval kevesebb van jelen az adott sejtben, ezért ezen kodonok jelenléte lelassítja a transzlációt, ezzel lehetővé téve ko-transzlációs események végbemenetelét (42). Ilyen ko-transzlációs esemény lehet egy naszcens fehérje N-terminális doménjének ko-transzlációs módosítása, vagy fehérjekomplexek transzlációval összekapcsolt felépítése (42). Mivel a H4 hiszton N-terminális rendetleg pozícióban tartalmazhat poszt-transzlációs módosításokat, lehetséges, hogy a kanonikus és a variáns H4 ezen módosításaikban térnek el egymástól, és így töltenek be különböző funkciókat (41). Bár az embrionális sejtekben kifejeződik a kanonikus H4 is,

környezeti stimulus esetén segítheti a választ az, ha rendelkezésre áll egy olyan dinamikával transzlálódó H4 fehérje, amelyen a környezeti hatásra adott válaszhoz szükséges kovalens módosítások már a transzláció során végbemennek.

Doktori munkám során bizonyítékokat gyűjtöttünk a H4r funkciójára vonatkozóan, melyekkel bebizonyítottuk, hogy a H4r a kanonikus H4-gyel megegyező aminosav-sorrend ellenére rendelkezik hiszton variáns funkcióval. A rendelkezésre álló eredmények alapján a H4r szerepét illető elméletek részben megerősítést nyertek: a ChIP-seq eredmények bebizonyították, hogy a H4r valóban nagyrészt a H3.3-mal közösen tölti be funkcióját, de kiderült, hogy attól függetlenül is lát el feladatokat. Az immunhisztokémiai kísérletek segítségével kimutattuk, hogy a *H4r* gént leíró 1996-os cikkben (33) bemutatott RNS-expresszió élesen eltér a fehérje expressziójától, és a fehérje termelődése nem korlátozódik a poszt-mitotikus sejtekre. Bár a kanonikus és a variáns H4 fehérjék funkcióiban mutatkozó különbségeket magyarázhatja a kodonhasználatukban mutatkozó különbség és abból esetlegesen eredő különbségek a kovalens módosításokban, annak vizsgálata, hogy ez valóban így van-e, további kísérleteket igényel.

6. Köszönetnyilvánítás

Hálásan köszönöm témavezetőimnek, **Prof. Dr. Boros Imrének** és **Dr. Henn Lászlónak**, hogy részt vehettem a kutatócsoport munkájában és támogatásukkal, javaslataikkal és iránymutatásukkal segítettek a dolgozatban bemutatott kísérletek elvégzését. Köszönöm továbbá **Ökrösné Katalinnak**, **Dr. Szabó Anikónak** és **Dr. Vedelek Balázsnak**, hogy szakmai tapasztalataikat megosztották velem és rengeteg, a molekuláris laboratóriumi munkához szükséges tudással láttak el. Köszönet illeti **Dr. Villányi Zoltánt** és **Dr. Szabó Áront** is, az első kísérleti eredményeimtől kezdve nyújtott rengeteg technikai tanácsért és új ötletekért. A ChIP-seq kísérletek során nyújtott nélkülözhetetlen segítségükért külön köszönet illeti **Dr. Zsindely Nórát**, **Dr. Bodai Lászlót**, **Dr. Villányi Zoltánt** és **Nagy Gábort**. Köszönöm továbbá a **családomnak**, **barátaimnak**, és **páromnak**, hogy támogattak a munkám során.

Ez a munka az **OTKA-116372** és a **GINOP-2.3.2-15-2016-00032** pályázatok támogatásával valósult meg.

7. Irodalomjegyzék

1. Heslop-Harrison JS, Schwarzach T. Nucleosomes and centromeric DNA packaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013 Dec 10;110(50):19974–5.
2. Bednar J, Horowitz RA, Grigoryev SA, Carruthers LM, Hansen JC, Koster AJ, et al. Nucleosomes, linker DNA, and linker histone form a unique structural motif that directs the higher-order folding and compaction of chromatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998 Nov 24;95(24):14173–8.
3. Reinig J, Ruge F, Howard M, Ringrose L. A theoretical model of Polycomb/Trithorax action unites stable epigenetic memory and dynamic regulation. *Nat Commun*. 2020 Dec;11(1):4782.
4. Liu J, Ali M, Zhou Q. Establishment and evolution of heterochromatin. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2020;1476(1):59–77.
5. Sales-Gil R, Vagnarelli P. How HP1 Post-Translational Modifications Regulate Heterochromatin Formation and Maintenance. *Cells*. 2020 Jun;9(6):1460.
6. Kingston RE, Tamkun JW. Transcriptional Regulation by Trithorax-Group Proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2014 Oct 1;6(10):a019349–a019349.
7. Turner BM. Cellular Memory and the Histone Code. *Cell*. 2002 Nov 1;111(3):285–91.
8. Choudhary C, Weinert BT, Nishida Y, Verdin E, Mann M. The growing landscape of lysine acetylation links metabolism and cell signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014 Aug;15(8):536–50.
9. Längst G, Becker PB. ISWI Induces Nucleosome Sliding on Nicked DNA. *Molecular Cell*. 2001 Nov 21;8(5):1085–92.
10. Längst G, Becker PB. Nucleosome mobilization and positioning by ISWI-containing chromatin-remodeling factors. *J Cell Sci*. 2001 Jul;114(Pt 14):2561–8.
11. Dimitri PP, Corradini N, Rossi F, Verni F. The paradox of functional heterochromatin. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 2005 Feb 1;27:29–41.

12. Yasuhara JC, Wakimoto BT. Oxymoron no more: the expanding world of heterochromatic genes. *Trends in Genetics*. 2006 Jun 1;22(6):330–8.
13. Luppino JM, Joyce EF. Single Cell Analysis Pushes the Boundaries of TAD Formation and Function. *Curr Opin Genet Dev*. 2020 Apr;61:25–31.
14. Weinhouse C. The roles of inducible chromatin and transcriptional memory in cellular defense system responses to redox-active pollutants. *Free Radical Biology and Medicine*. 2021 Jul 1;170:85–108.
15. Ulianov SV, Doronin SA, Khrameeva EE, Kos PI, Luzhin AV, Starikov SS, et al. Nuclear lamina integrity is required for proper spatial organization of chromatin in *Drosophila*. *Nat Commun*. 2019 Dec;10(1):1176.
16. Peric-Hupkes D, van Steensel B. Role of the Nuclear Lamina in Genome Organization and Gene Expression. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 2010 Jan 1;75(0):517–24.
17. Weake VM, Workman JL. Inducible gene expression: diverse regulatory mechanisms. *Nat Rev Genet*. 2010 Jun;11(6):426–37.
18. Talbert PB, Henikoff S. Environmental responses mediated by histone variants. *Trends Cell Biol*. 2014;24(11):642–50.
19. Schwartz BE, Ahmad K. Transcriptional activation triggers deposition and removal of the histone variant H3.3. *Genes Dev*. 2005 Apr 1;19(7):804–14.
20. Soboleva TA, Nekrasov M, Ryan DP, Tremethick DJ. Histone variants at the transcription start-site. *Trends in Genetics*. 2014 May 1;30(5):199–209.
21. Lyu X, Rowley MJ, Corces VG. Architectural Proteins and Pluripotency Factors Cooperate to Orchestrate the Transcriptional Response of hESCs to Temperature Stress. *Mol Cell*. 2018 Sep 20;71(6):940-955.e7.
22. Martire S, Banaszynski LA. The roles of histone variants in fine-tuning chromatin organization and function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020 Sep;21(9):522–41.

23. Pusarla RH, Bhargava P. Histones in functional diversification. *The FEBS Journal*. 2005;272(20):5149–68.
24. Henn L, Szabó A, Imre L, Román Á, Ábrahám A, Vedelek B, et al. Alternative linker histone permits fast paced nuclear divisions in early *Drosophila* embryo. *Nucleic Acids Research*. 2020 Sep 18;48(16):9007–18.
25. Fillingham J, Keogh MC, Krogan N. GammaH2AX and its role in DNA double-strand break repair. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*. 2006 Sep 1;84:568–77.
26. Ahmad K, Henikoff S. Histone H3 variants specify modes of chromatin assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002 Dec 10;99(Supplement 4):16477–84.
27. Ye X, Feng C, Gao T, Mu G, Zhu W, Yang Y. Linker Histone in Diseases. *International Journal of Biological Sciences*. 2017 Jul 18;13:1008–18.
28. Parseghian MH, Hamkalo BA. A compendium of the histone H1 family of somatic subtypes: An elusive cast of characters and their characteristics. *Biochem Cell Biol*. 2001 Jun 1;79(3):289–304.
29. Sarma K, Reinberg D. Histone variants meet their match. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005 Feb;6(2):139–49.
30. Vardabasso C, Hasson D, Ratnakumar K, Chung CY, Duarte LF, Bernstein E. Histone variants: emerging players in cancer biology. *Cell Mol Life Sci*. 2014 Feb;71(3):379–404.
31. Wolfe SA, Anderson JV, Grimes SR, Stein GS, Stein JS. Comparison of the structural organization and expression of germinal and somatic rat histone H4 genes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*. 1989 Mar;1007(2):140–50.
32. Moosmann A, Campsteijn C, Jansen PW, Nasrallah C, Raasholm M, Stunnenberg HG, et al. Histone variant innovation in a rapidly evolving chordate lineage. *BMC Evol Biol*. 2011 Dec;11(1):208.
33. Akhmanova A, Miedema K, Hennig W. Identification and characterization of the *Drosophila* histone H4 replacement gene. *FEBS Letters*. 1996 Jun 17;388(2):219–22.

34. Long M, Sun X, Shi W, Yanru A, Leung STC, Ding D, et al. A novel histone H4 variant H4G regulates rDNA transcription in breast cancer. *Nucleic Acids Res.* 2019 Sep 19;47(16):8399–409.
35. Poirier R, Lemaire I, Lemaire S. Characterization, localization and possible anti-inflammatory function of rat histone H4 mRNA variants. *The FEBS Journal.* 2006;273(18):4360–73.
36. Gendron N, Dumont M, Gagné MF, Lemaire S. Poly A-containing histone H4 mRNA variant (H4-v. 1): isolation and sequence determination from bovine adrenal medulla. *Biochim Biophys Acta.* 1998 Mar 4;1396(1):32–8.
37. Hepat R, Song JJ, Lee D, Kim Y. A viral histone h4 joins to eukaryotic nucleosomes and alters host gene expression. *J Virol.* 2013 Oct;87(20):11223–30.
38. Siegel TN, Hekstra DR, Kemp LE, Figueiredo LM, Lowell JE, Fenyo D, et al. Four histone variants mark the boundaries of polycistronic transcription units in *Trypanosoma brucei*. *Genes Dev.* 2009 May 1;23(9):1063–76.
39. Pang MYH, Sun X, Ausió J, Ishibashi T. Histone H4 variant, H4G, drives ribosomal RNA transcription and breast cancer cell proliferation by loosening nucleolar chromatin structure. *Journal of Cellular Physiology.* 2020;235(12):9601–8.
40. Faragó A, Ürmösi A, Farkas A, Bodai L. The histone replacement gene *His4r* is involved in heat stress induced chromatin rearrangement. *Sci Rep.* 2021 Dec;11(1):4878.
41. Yamamoto Y, Watanabe T, Matsuo Y. Epigenetics Evolution and Replacement Histones: Evolutionary Changes at *Drosophila* H4r. *Journal of Phylogenetics & Evolutionary Biology.* 2016 Aug 1;4.
42. Collart MA, Weiss B. Ribosome pausing, a dangerous necessity for co-translational events. *Nucleic Acids Research.* 2020 Feb 20;48(3):1043–55.
43. Morozova TV, Mackay TFC, Anholt RRH. Transcriptional networks for alcohol sensitivity in *Drosophila melanogaster*. *Genetics.* 2011 Apr;187(4):1193–205.

44. Gratz SJ, Ukken FP, Rubinstein CD, Thiede G, Donohue LK, Cummings AM, et al. Highly specific and efficient CRISPR/Cas9-catalyzed homology-directed repair in *Drosophila*. *Genetics*. 2014 Apr;196(4):961–71.
45. Gratz SJ, Rubinstein CD, Harrison MM, Wildonger J, O'Connor-Giles KM. CRISPR-Cas9 genome editing in *Drosophila*. *Curr Protoc Mol Biol*. 2015 Jul 1;111:31.2.1-31.2.20.
46. Ge DT, Tipping C, Brodsky MH, Zamore PD. Rapid Screening for CRISPR-Directed Editing of the *Drosophila* Genome Using *white* Coconversion. *G3 Genes|Genomes|Genetics*. 2016 Oct 1;6(10):3197–206.
47. Port F, Chen HM, Lee T, Bullock SL. Optimized CRISPR/Cas tools for efficient germline and somatic genome engineering in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014 Jul 22;111(29):E2967–76.
48. Jeong JY, Yim HS, Ryu JY, Lee HS, Lee JH, Seen DS, et al. One-step sequence- and ligation-independent cloning as a rapid and versatile cloning method for functional genomics studies. *Appl Environ Microbiol*. 2012 Aug;78(15):5440–3.
49. Pérez-Montero S, Carbonell A, Morán T, Vaquero A, Azorín F. The embryonic linker histone H1 variant of *Drosophila*, dBigH1, regulates zygotic genome activation. *Dev Cell*. 2013 Sep 30;26(6):578–90.
50. Schagger H. Tricine-SDS-PAGE. *Nat Protoc*. 2006;1(1):16–22.
51. Schauer T, Schwalie PC, Handley A, Margulies CE, Flicek P, Ladurner AG. CAST-ChIP maps cell-type-specific chromatin states in the *Drosophila* central nervous system. *Cell Rep*. 2013 Oct 17;5(1):271–82.
52. SharedProtocol-Extracting-DNA-usinig-Phenol-Chloroform.pdf [Internet]. [cited 2021 Sep 3]. Available from: <https://www.pacb.com/wp-content/uploads/2015/09/SharedProtocol-Extracting-DNA-usinig-Phenol-Chloroform.pdf>
53. GitHub - FelixKrueger/TrimGalore: A wrapper around Cutadapt and FastQC to consistently apply adapter and quality trimming to FastQ files, with extra functionality for RRBS data [Internet]. [cited 2021 Sep 6]. Available from: <https://github.com/FelixKrueger/TrimGalore>

54. Langmead B, Wilks C, Antonescu V, Charles R. Scaling read aligners to hundreds of threads on general-purpose processors. Hancock J, editor. *Bioinformatics*. 2019 Feb 1;35(3):421–32.
55. Amemiya HM, Kundaje A, Boyle AP. The ENCODE Blacklist: Identification of Problematic Regions of the Genome. *Sci Rep*. 2019 Jun 27;9(1):9354.
56. Mendoza-Parra MA, Saleem MAM, Blum M, Cholley PE, Gronemeyer H. NGS-QC Generator: A Quality Control System for ChIP-Seq and Related Deep Sequencing-Generated Datasets. *Methods Mol Biol*. 2016;1418:243–65.
57. Ramírez F, Ryan DP, Grüning B, Bhardwaj V, Kilpert F, Richter AS, et al. deepTools2: a next generation web server for deep-sequencing data analysis. *Nucleic Acids Res*. 2016 Jul 8;44(W1):W160-165.
58. Zhang Y, Liu T, Meyer CA, Eeckhoute J, Johnson DS, Bernstein BE, et al. Model-based Analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biology*. 2008 Sep 17;9(9):R137.
59. Feng J, Liu T, Qin B, Zhang Y, Liu XS. Identifying ChIP-seq enrichment using MACS. *Nat Protoc*. 2012 Sep;7(9):1728–40.
60. Yu G, Wang LG, He QY. ChIPseeker: an R/Bioconductor package for ChIP peak annotation, comparison and visualization. *Bioinformatics*. 2015 Jul 15;31(14):2382–3.
61. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 2009 Aug 15;25(16):2078–9.
62. Truman JW, Bate M. Spatial and temporal patterns of neurogenesis in the central nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol*. 1988;125(1):145–57.
63. Mahr A, Aberle H. The expression pattern of the *Drosophila* vesicular glutamate transporter: a marker protein for motoneurons and glutamatergic centers in the brain. *Gene Expr Patterns*. 2006 Mar;6(3):299–309.
64. Nässel DR, Enell LE, Santos JG, Wegener C, Johard HA. A large population of diverse neurons in the *Drosophila* central nervous system expresses short neuropeptide F, suggesting multiple distributed peptide functions. *BMC Neurosci*. 2008 Dec;9(1):90.

65. Yasuyama K, Meinertzhagen IA, Schürmann FW. Synaptic organization of the mushroom body calyx in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Comparative Neurology*. 2002;445(3):211–26.
66. Kraut R, Campos-Ortega JA. *inscuteable*, A Neural Precursor Gene of *Drosophila*, Encodes a Candidate for a Cytoskeleton Adaptor Protein. *Developmental Biology*. 1996 Feb;174(1):65–81.
67. Robinow S, White K. Characterization and spatial distribution of the ELAV protein during *Drosophila melanogaster* development. *Journal of Neurobiology*. 1991;22(5):443–61.
68. Martire S, Gogate AA, Whitmill A, Tafessu A, Nguyen J, Teng YC, et al. Phosphorylation of histone H3.3 at serine 31 promotes p300 activity and enhancer acetylation. *Nat Genet*. 2019 Jun;51(6):941–6.
69. Loppin B, Dubruille R, Horard B. The intimate genetics of *Drosophila* fertilization. *Open Biol*. 2015 Aug;5(8):150076.
70. Konev AY, Tribus M, Park SY, Podhraski V, Lim CY, Emelyanov AV, et al. CHD1 Motor Protein Is Required for Deposition of Histone Variant H3.3 into Chromatin in Vivo. *Science*. 2007 Aug 24;317(5841):1087–90.

8. Összefoglalás

A hisztonoknak esszenciális szerepe van a sejtosztódás és a génexpresszió szabályozásában, a genom integritásának fenntartásában, és a poszt-mitotikus sejtek differenciációjában is. Magasabbrendű állatokban a legtöbb kanonikus hisztonnak van egy vagy több replikációfüggetlen expressziójú variánsa is, melyek mutathatnak szövetspecifitást. A nukleoszómális alternatív hisztonok kritikus szerepet töltenek be a poszt-mitotikus sejtek homeosztázisában és a transzkripció memória kialakításában.

A H4 a legkonzerváltabb aminosav-szekvenciájú hiszton, és a legtöbb organizmus nem rendelkezik replikációfüggetlen variánssal. Az eddig leírt néhány variáns funkciója még többnyire tisztázatlan. A hiszton variánsok között egyedülálló módon a leírt replikációfüggetlen H4 variánsok egy része a kanonikus H4-gyel teljesen megegyező aminosavsorrenddel rendelkezik. Ez felveti azt a kérdést, hogy ezek az alternatív H4 fehérjék valóban rendelkeznek-e a kanonikus megfelelőjüktől eltérő funkcióval, vagy sem. Erre a kérdésre a *Drosophila melanogaster Histone H4 replacement (H4r)* génjének funkcionális vizsgálatával kerestük választ.

Immunhisztokémiai vizsgálatok sorozatával kimutattuk, hogy a H4r anyai hatású fehérjeterméként kerül az embrióba, és minden sejtben megtalálható egészen a differenciáció kezdetéig, amikortól kezdve H4r akkumuláció mutatható ki, amely a sejtek egy kisebb populációjára korlátozódik. A H4r-t felhalmozó sejtek többsége kolinerg neuron, de találhatók köztük glutaminerg és GABAerg neuronok is, sőt, neuroblasztok is, melyek sejtvonal-elkötelezett, de nem terminálisan differenciálódott sejtek.

A H4r expressziójának vizsgálata során megállapítottuk, hogy a H4r a H3.3-mal nagy mértékben átfedő lokalizációt mutat genomszerte, azonban a H3.3-tól független funkciója is van, illetve transzkripció csendesítéskor a H3.3-tól eltérő módon nem cserélődik ki kanonikus megfelelőjére, hanem a korábban aktív gén promóterén marad a represszió során is. Ez felveti annak lehetőségét, hogy a H4r-nek a transzkripció memória kialakításában lehet szerepe.

A H4r lokalizációjának vizsgálata során kiderült, hogy az erősen expresszáldó ill. indukálható gének promóterein jóval nagyobb mennyiségben van jelen, mint az inaktív géneken, így feltételezhetően részt vesz a génexpresszió aktivációjában.

Bár a szakirodalmi adatok és az itt bemutatásra került eredmények is arra engednek következtetni, hogy a H4r szerepet játszik a hősokk gének aktivitásának szabályozásában, a *H4r* gén expressziója mégsem változik hősokk és regeneráció hatására. Ez alapján a gén elsődleges szerepe az lehet, hogy a folyamatos expressziója révén fenntartsa egy elérhető H4 fehérje készletet, amely a kromatin átrendeződések során azonnal felhasználható.

9. Summary

Histones play essential role in regulating cell division and gene expression, maintaining genome integrity, and differentiating post-mitotic cells. In higher order animals, most canonical histones have one or more replication-independent variants that may show tissue specific expression. Nucleosomal alternative histones play a critical role in the homeostasis of post-mitotic cells and the development of transcriptional memory.

H4 is the most conserved histone in its amino acid sequence, and most organisms do not have a replication-independent H4 variant. The function of the variants described so far is still largely unclear. Uniquely among histone variants, some of the replication-independent H4 variants have the same amino acid sequence as canonical H4. This raises the question of whether or not these alternative H4 proteins actually have a function that is different from their canonical counterpart. We sought an answer to this question by the functional analysis of the *Drosophila melanogaster* Histone H4 replacement (*H4r*) gene.

We have shown by a series of immunohistochemical experiments that H4r is transferred to the embryo maternally and is found in all cells until the onset of differentiation, when H4r accumulation can be observed in a small population of the brain cells. The majority of H4r-accumulating cells are cholinergic neurons, but glutaminergic and GABAergic neurons, and even neuroblasts, which are cell line-engaged but not terminally differentiated cells, were also found among them.

Examining the expression of H4r, we found that H4r has a highly overlapping localization with H3.3 throughout the genome, but it also has a function independent of H3.3, as it is not exchanged with its canonical counterpart during transcriptional silencing but remains at the promoter of the previously active gene during repression. This raises the possibility that H4r may play a role in the development of transcriptional memory.

Examination of the localization of H4r revealed that it is more abundant on the promoters of highly or inducibly expressed genes than on promoters of inactive genes, thus presumably involved in the activation of gene expression.

Although the literature data and the results presented here suggest that H4r plays a role in regulating the activity of heat shock genes, the expression of the H4r gene does not change upon heat shock and regeneration. It suggests that the primary role of the gene may be to maintain

an available pool of H4 protein by its continuous expression that can be used immediately during chromatin rearrangements.

10. Publikációs lista

MTMT azonosító: 10064691

A dolgozat alapját képező közlemény:

Ábrahám A., Villányi Z., Zsindely N. et al. Despite its sequence identity with canonical H4, *Drosophila H4r* product is enriched at specific chromatin regions. *Sci Rep* **12**, 5007 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-09026-x>

IF: 4,379

További közlemények:

Henn L, Szabó A, Imre L, Román Á, **Ábrahám A**, Vedelek B, et al. Alternative linker histone permits fast paced nuclear divisions in early *Drosophila* embryo. *Nucleic Acids Research*. 2020 Sep 18;48(16):9007–18. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa624>

IF: 11,501

11. Nyilatkozat

A dolgozatban bemutatott kísérleteket az Anyagok és módszerekben leírtak szerint én végeztem el, melyek a következők:

- promóteranalízis
- transzgenikus *Drosophila* vonalak előállításához szükséges plazmidok megtervezése és előállítása (guide-RNS-eket kódoló plazmidok, 3xFlag epitóp-jelölt H4r-t és dsRed markert kódoló plazmid)
- transzgenikus *Drosophila* vonalak előállítása (embriók injektálása, keresztezések)
- immunfestések és mikroszkópos vizsgálatok
- RNS és fehérje expressziós vizsgálatok (mintagyűjtés, mintapreparálás, qPCR és western blot) és a mérési adatok kiértékelése
- kromatin-immunprecipitáció, könyvtárkészítés és szekvenálás
- szekvenálási adatok kiértékelése
- ko-immunprecipitáció

A *w*; *3xFlag-H4r* genotípusú állatok első biológiai párhuzamos mintasorozatának, valamint a *w*¹¹¹⁸ kontroll kromatin-immunprecipitációját, qPCR-rel történő ellenőrzését és szekvenálását Dr. Zsindely Nóra és Dr. Villányi Zoltán végezték.

Dr. Zsindely Nóra és Dr. Villányi Zoltán segítséget nyújtott a kromatin-immunprecipitáció és szekvenálás során.

Dr. Bodai László segítséget nyújtott a szekvenálásban.

Dr. Zsindely Nóra segítséget nyújtott a Bioanalyzer Expert szoftver használatában.

Nagy Gábor segítséget nyújtott a szekvenálási eredmények bioinformatikai és statisztikai elemzésében.

Dr. Henn László és Dr. Szabó Áron segítséget nyújtott az immunfestések és mikroszkópos vizsgálatok során.

A transzgenikus vonalak létrehozásához szükséges klónozási lépések Ökrösné Katalin közreműködésével valósultak meg.

12. Fűggelék

gRNS1 Forward: TATATAGGAAAGATATCCGGGTGAACTTCGCTGTAAAGCGACGCCATGTT
GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG

gRNS2 Forward: TATATAGGAAAGATATCCGGGTGAACTTCGGTGTGCTAAAGGTACGTTTCG
TTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG

gRNS3 Forward: TATATAGGAAAGATATCCGGGTGAACTTCGTGAAAACTGATTAATTTCT
GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG

gRNS4 Reverz: ATTTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAACGCCATCTGCGAATTCAAGCTC
GACGTTAAATTGAAAATAGGTC

gRNS5 Reverz: ATTTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAACGGCAGTAGCAGTAGAAAAGG
CGACGTTAAATTGAAAATAGGTC

H4r genomi Forward: AGATACGCTAGCAGGCACATTATGCACACAGAAAGGGATG

H4r genomi Reverz: ATGGTTCAAGAGAAGGCCATGGAGGGAGG

H4rDel Forward: GCAAACCTTGTTTACAGCACTCGTTGCG

H4rDel Reverz: AGGCGACGGACTCCACGTTACTTAG

H4r KpnI Reverz: TCGTTTCGGTACCGTTTGCGTTGAATACTACTGATTAAG

H4r CFLAG Forward: CATGACATCGATTACAAGGATGACGATGACAAGTAAGCACGCCCTCTAACC
TCCACATAATAAATAACC

H4r CFLAG Reverz: CTTGTAATCGATGTCATGATCTTTATAATCACCGTCATGGTCTTTGTAGTC
CATACCGCCAAATCCGTAAAGGGTGCG

H4r NFLAG Forward: CATGACATCGATTACAAGGATGACGATGACAAGATGACTGGTCGTGGAAA
GGGAGGCAAAGG

H4r NFLAG Reverz: CTTGTAATCGATGTCATGATCTTTATAATCACCGTCATGGTCTTTGTAGTC
CATTTCTCAGTTGCTTCGTAAAGTTGGCTG

PAM1gen Forward: TTACCTTTCATCAAACATGGCGTCG

PAM2gen Reverz: AATTTGCAGTCATACTCACGGGC

PAM1plasmid Forward: CTGCCCCGTGAGTATGACTGC

PAM2plasmid Reverz: CGACGCCATGTTTGATGAAAGG

qH4r Forward: TTATAAAGATCATGACATCGATTACAAGGATGACGA

qH4r Reverz: CGAGTTTCCTCGTAAATCAAGCCAGAG

qH4 Forward: ACTCATATACGAGGAAACGCGTGG

qH4 Reverz: TTTTAAACCGCCAAATCCGTAGAGGG

Alpha-tubulin at 84B Forward: TGTCGCGTGTGAAACACTTC

Alpha-tubulin at 84B Reverz: AGCAGGCGTTTCCAATCTG

Aktin Forward AAGTTGCTGCTCTGGTTGTCG

Aktin Reverz GCCACACGCAGCTCATTGTAG

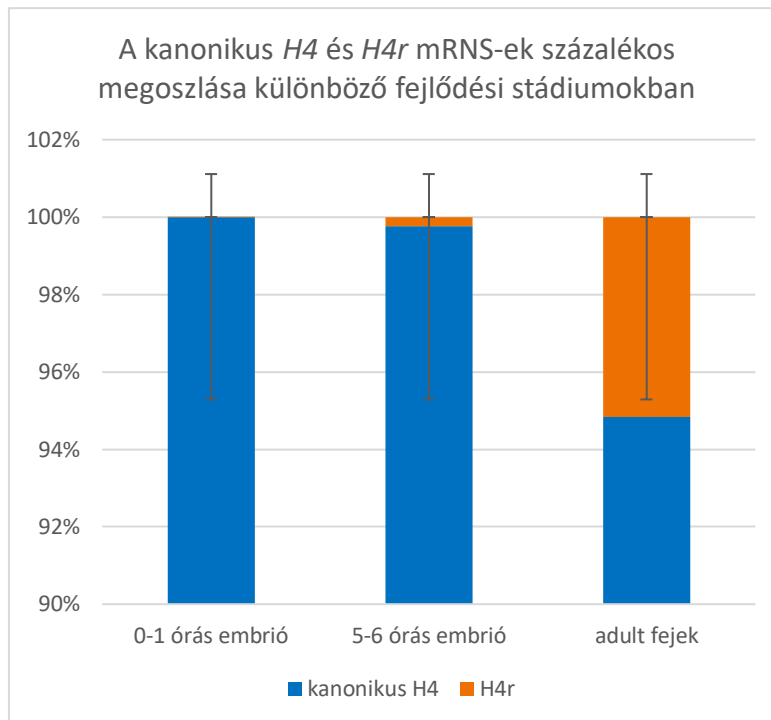
Hsp27-HSE Forward: ACTCCCCAGAAAAGAAATGTCAAGA

Hsp27-HSE Reverz: CTCTCGCATCTTCTGGCTCTTT

Hsp60A Forward: TTTGCCAGTTTCGCTTGCTC

Hsp60A Reverz:	CCCCACGACTGCTCAATGAT
Hsp68 Forward:	AAGTGTTTGAGGGCGAGAGG
Hsp68 Reverz:	TCAGGATACCGTTTGCGTCC
Hsp83 Forward:	AGGTGATCCGCAAGAACCTG
Hsp83 Reverz:	GAGGTGTGGAAGCGAAGGAA
IND Forward:	CCAGAAGAAGGAGAACTGGGATCG
IND Reverz:	TTGTTGCTGCTGCTGCTGG
Gad1 Forward:	ATCTCATGCCCACAACAGTGAC
Gad1 Reverz:	GAACCTTCTCGTTCCGGTCG
rp49 Forward:	CCGCTTCAAGGGACAGTATCTG
rp49 Reverz:	ATCTCGCCGCAGTAAACGC
F20 Forward:	TCAAGCCGAACCCTCTAAAAT
F20 Reverz:	AACGCCAACAACAGAAAATG
F22 Forward	CAGTTGATGGGATGAATTTGG
F22 Reverz:	TGCCTGTGGTTCTATCCAAAC

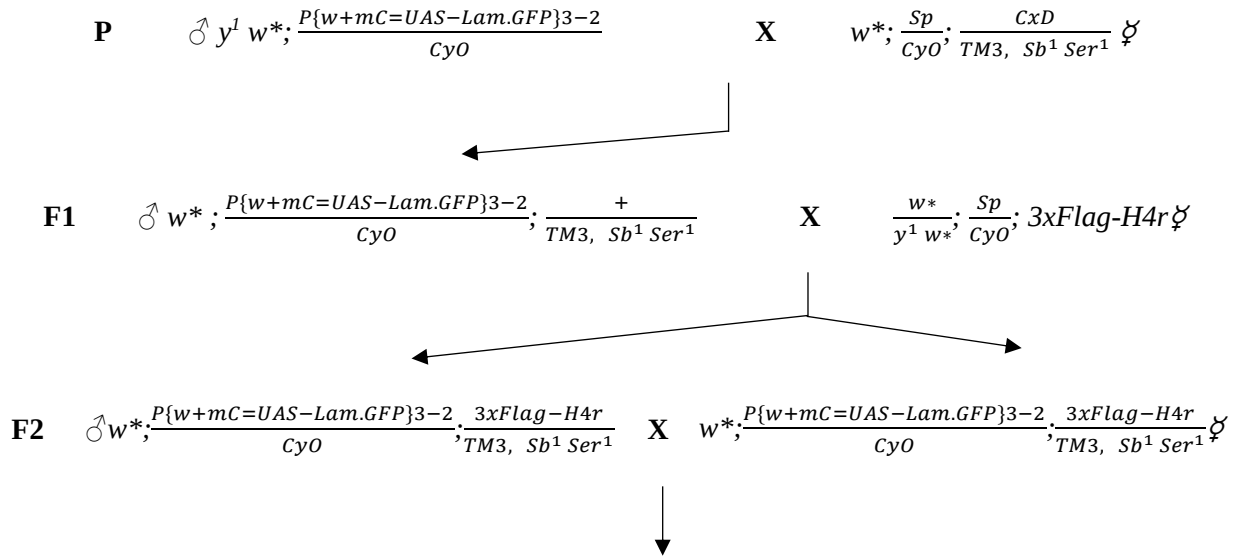
1. táblázat: Felhasznált primerek.



1. ábra: A kanonikus *H4* és *H4r* mRNS-ek százalékos megoszlása különböző fejlődési stádiumokban. A 0-1 órás embriókban a zigótikus genomaktiváció előtti, anyai eredetű *H4* és *H4r* mRNS arányokat vizsgáltuk, az 5-6 órás embriókban a zigótikus genomaktiváció utáni, de még differenciálatlan sejtekben kimutatható arányokat vizsgáltuk, míg az adult fejek a terminálisan differenciálódott sejtek kanonikus és variáns *H4* arányokat reprezentálják. A qPCR-t a qH4 Forward és qH4 Reverz, valamint a qH4r Forward és qH4r Reverz primerekkel végeztük, a normalizálást aktinra végeztük.

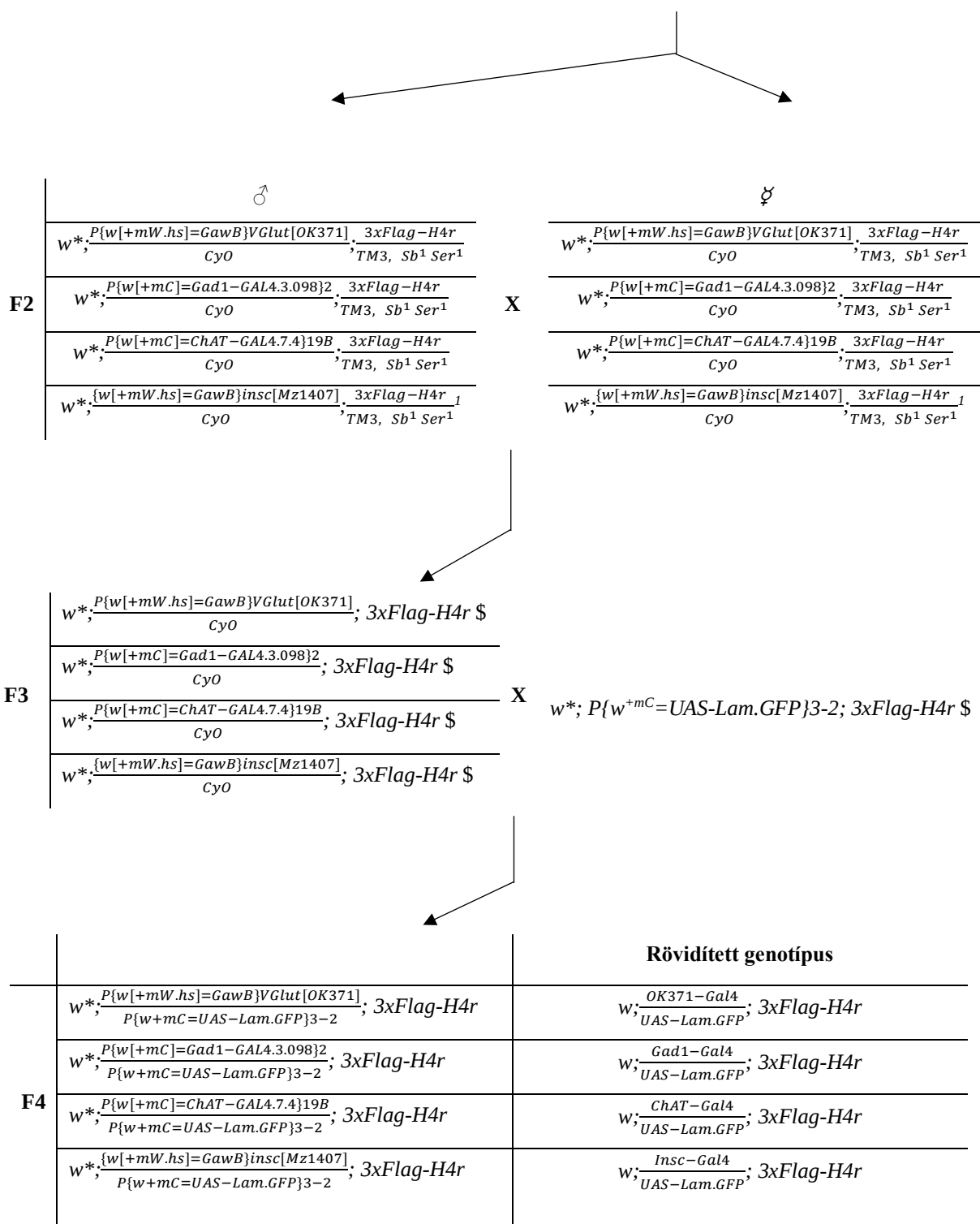
első biológiai replikátumok	c (ng/μl)	ChIP input DNS mennyiség (μg)
H4r NK	24,7	2,63
H4r HS	17,6	
H4r HS+3h	16,2	
H3.3 NK	11,8	2,86
H3.3 HS	6,66	
H3.3 HS+3h	13,6	
második biológiai replikátumok	c (ng/μl)	ChIP input DNS mennyiség (μg)
H4r NK	13,4	2,39
H4r HS	11,2	
H4r HS+3h	17,7	
H3.3 NK	12,1	2,575
H3.3 HS	10,3	
H3.3 HS+3h	14,3	

2. táblázat: A ChIP-hez használt kromatin minták koncentrációi és felhasznált mennyiségeik. Az egyes ellenanyagokkal ezen minták harmada lett precipitálva (háromfelé osztás: ellenanyagmentes kontrol – input kontrol; α-Flag ChIP, α-H3 ChIP)

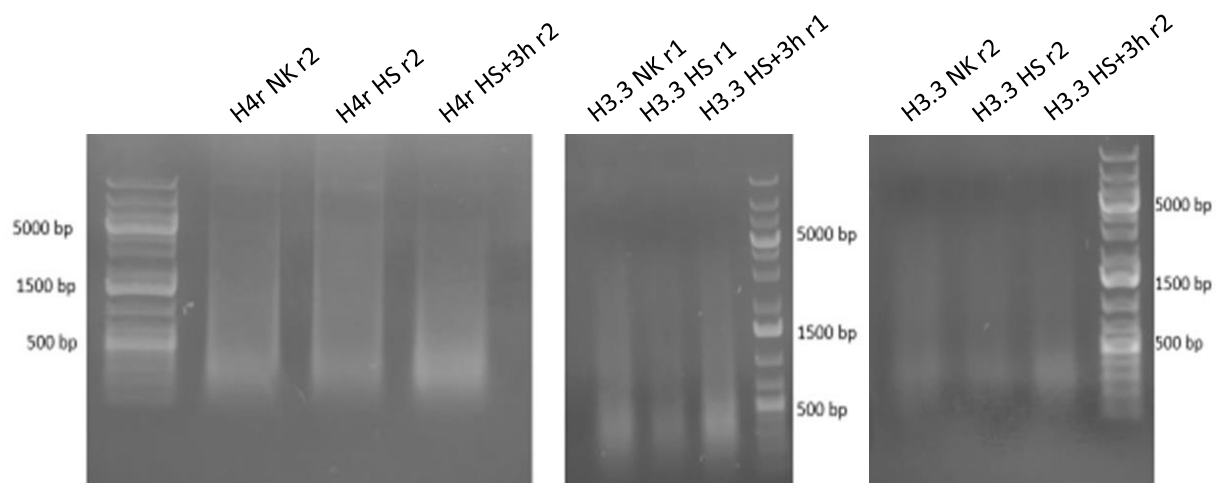


		Bloomington Drosophila Stock Center ID
	♂	
	♀	
		$w[1118]; P\{w[+mW.hs]=GawB\}VGlut[OK371]$
		$P\{w[+mC]=Gad1-GAL4.3.098\}2/CyO$
P	$w^*; \frac{Sp}{CyO}; \frac{CxD}{TM3, Sb^1 Ser^1}$	X
		$w^*; \frac{P\{w[+mC]=ChAT-GAL4.7.4\}19B}{CyO, P\{ry[+t7.2]=sevRas1.V12\}FK1}$
		$w^*; P\{w[+mW.hs]=GawB\}insc[Mz1407]$
		#26160
		#51630
		#6798
		#8751

	♂	♀
	$w^*; \frac{P\{w[+mW.hs]=GawB\}VGlut[OK371]}{CyO}; \frac{+}{TM3, Sb^1 Ser^1}$	
	$w^*; \frac{P\{w[+mC]=Gad1-GAL4.3.098\}2}{CyO}; \frac{+}{TM3, Sb^1 Ser^1}$	X
F1	$w^*; \frac{P\{w[+mC]=ChAT-GAL4.7.4\}19B}{CyO}; \frac{+}{TM3, Sb^1 Ser^1}$	$w^*; \frac{Sp}{CyO}; 3xFlag-H4r$
	$w^*; \frac{P\{w[+mW.hs]=GawB\}insc[Mz1407]}{CyO}; \frac{+}{TM3, Sb^1 Ser^1}$	

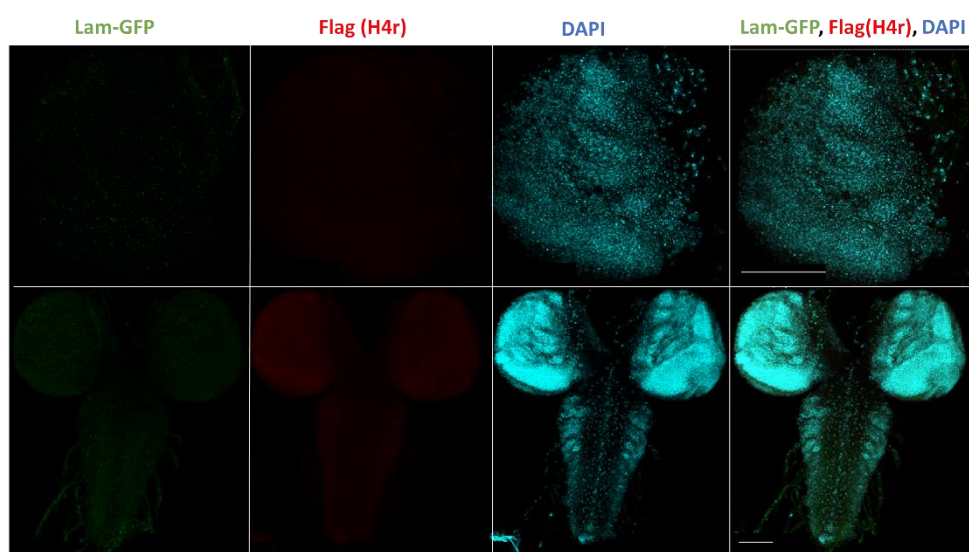


A LaminB-GFP-t és 3xFlag-H4r-t egyszerre expresszáló transzgenikus állatok létrehozását célzó keresztezési séma.

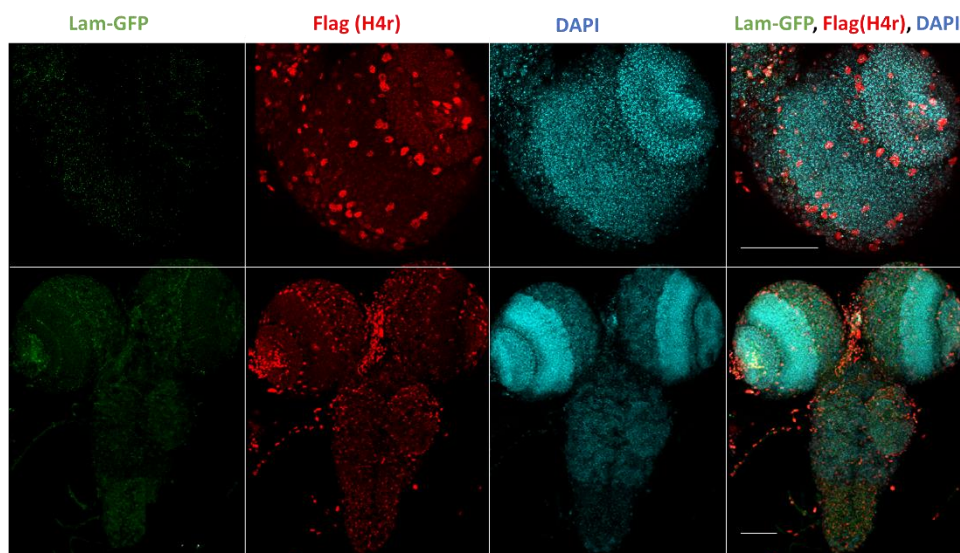


2. ábra: Szonikált kromatin minták, melyek a ChIP-seq kísérletek templátjául szolgáltak. (A H4r-en végzett ChIP-seq minták első biológiai replikátumának preparálását Zsindely Nóra és Villányi Zoltán végezték)

A *w¹¹¹⁸* (negatív kontroll)



B *w; Act5C-Gal4/+; UAS-H4r-3xFlag/+* (pozitív kontroll)

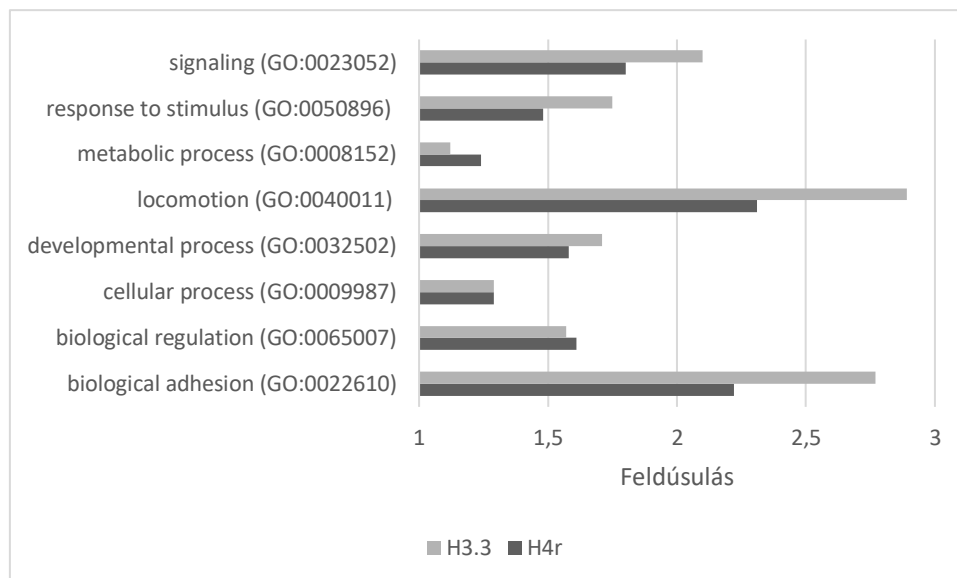


3. ábra: A lárva agyakon végzett immunhisztokémiai kísérletek kontrolljai. A: negatív kontroll lárva agy; B: pozitív kontroll lárva agy. A lépték a felső ábrákon (szemdiszkuszok) 10 μm -t, az alsókon (teljes lárva agyak) 50 μm -t jeleznek.

	TF	p-érték	q-érték	FlyBase összefoglaló
1.	<i>opa</i>	7,69E-06	0,00822	az <i>odd paired (opa)</i> gén egy transzkripciós faktort kódol, amely pair-rule génként működik a korai embriogenezis során, valamint részt vesz a középbel morfogenezisében. Az embriogenezis után hozzájárul az adult fej morfogeneziséhez, az idegi őssejtek fejlődéséhez és a cirkadián ritmushoz.
2.	<i>hb</i>	9,62E-06	0,00956	DNS-kötő transzkripciós faktor aktivitást, RNS polimeráz II-specifikus és RNS polimeráz II cisz-szabályozó régió szekvencia-specifikus DNS-kötő aktivitást mutat. Részt vesz a neuronok létrehozásában; a neurális prekursor sejtek proliferációjának szabályozásában; és a transzkripció szabályozásában az RNS polimeráz II segítségével. A sejtmagban lokalizálódik. Számos struktúrában fejeződik ki, beleértve az ektodermális eredetű embrionális szerveket; embrionális/lárva idegrendszerben; az embrionális szelvényekben; a csírvonalban; és szomatikus prekursor sejtekben. Az emberi IKZF5 (IKAROS family Zinc-finger 5) ortológja.
3.	<i>pho</i>	1,15E-05	0,0123	A <i>pleiohomeotic (pho)</i> gén cinkujjfehérjét kódol, amely a Polycomb válaszelemekhez kötődik, és szükséges a Polycomb-group fehérjekomplexeinek kromatinhoz történő toborzásához. Elsősorban transzkripciós represszor.
4.	<i>fkh</i>	2,73E-05	0,0276	A <i>fork head (fkh)</i> gén egy winged-helix nukleáris transzkripciós faktort kódol, amely leginkább a nyálmirigy-képződésben játszott szerepe miatt tanulmányozott, ahol szükséges a nyálmirigyek életképességéhez, invaginációjához és más korai expressziójú nyálmirigy-transzkripciós faktorok expressziójának fenntartásához. A <i>sage</i> termékével együttműködve aktiválja a nyálmirigy -specifikus géntermékek, például a szekretált fehérjék és azok módosító enzimjeinek expresszióját.
5.	<i>sna</i>	2,88E-05	0,0306	A <i>snail (sna)</i> gén egy transzkripciós faktort kódol, amely hozzájárul az embrionális mezoderma fejlődéséhez, a három-mesenchymális átmenethez és az aszimmetrikus sejtosztódáshoz.
6.	<i>M1BP</i>	3,88E-05	0,041	Az <i>Motif 1 Binding Protein (M1BP)</i> gén egy transzkripciós pausing faktort kódol. Az abd-A és Ubx által kódolt Hox fehérjékkel való kölcsönhatás révén szabályozza a transzkripciót. Hozzájárul a petefészek follikuláris sejtjeinek fejlődéséhez.
7.	<i>Hsf</i>	6,13E-05	0,0462	hősokk transzkripciós faktor
8.	<i>slp1</i>	6,33E-05	0,0639	<i>sloppy paired 1 (slp1)</i> a fork-head család egy transzkripciós faktorát kódolja, amely kölcsönhatásba lép a <i>gro</i> által kódolt korepresszorral. Az <i>slp1</i> terméke a fejlődési folyamatok széles

				skáláját szabályozza, beleértve az embrionális szegmentációt, a ventrális retina sejtek specifikációját és a medulla neuronokat termelő neuroblasztok osztódását.
9.	<i>exd</i>	7,93E-05	0,0826	Az <i>extradenticle (exd)</i> gén egy homeodomain transzkripciós faktort kódol, amelyet a <i>hth</i> termékének megkötésekor importálódik a nukleuszba. A <i>hth-exd</i> fehérjekomplex tagjai Hox kofaktorok, de további Hox-független funkciókkal is rendelkeznek, mint például az antennák fejlesztésében, a proximális függelékek kialakításában és a szem differenciálatlan sejjei osztódásának elősegítésében.
10.	<i>Dr</i>	7,93E-05	0,0795	A <i>Drop (Dr)</i> egy homeodomain transzkripciós faktort kódol, amely részt vesz a neuroektoderma és a szárnydiszkusz kialakításában, a myoblasztok és neuroblasztok specifikációjában, az izom-, ideg- és gliasejtek megfelelő fejlődésében, a hím nemi szervek diszkuszaiban és a glükózanyagcsere szabályozásában.
11.	<i>cad</i>	9,66E-05	0,0912	A <i>caudal (cad)</i> olyan transzkripciós faktort kódol, amely olyan folyamatokban vesz részt, mint az anterior/posterior mintázat kialakulása, a szervek morfogenezeise és a veleszületett immun homeosztázis.
12.	<i>CG4328-RA</i>	9,66E-05	0,0904	Prediktált DNS-kötő transzkripciós faktor aktivitással, RNS polimeráz II-specifikus és RNS polimeráz II transzkripciós szabályozó régió szekvencia-specifikus DNS-kötő aktivitással rendelkezik. Prediktáltan részt vesz a neuronok differenciálódásában és az RNS polimeráz II általi transzkripció pozitív szabályozásában. Prediktáltan magra lokalizálódik. Több struktúrában fejeződik ki, beleértve az embrionális agyat; embrionális szelvényeket; az embrió hasi középvonala; és hasi idegköteg. Ennek a génnek az humán ortológjai az autoszomális domináns nem szindrómás sükettségben és köröm-térdkalács szindrómában játszanak szerepet. Humán ortológjai az LMX1A (LIM homeobox transcription factor 1 alfa) és LMX1B (LIM homeobox transcription factor 1 beta).
13.	<i>Cf2</i>	9,83E-05	0,104	A Chorion faktor 2 (<i>Cf2</i>) egy cink-ujj DNS-kötő transzkripciós faktort kódol, amely részt vesz a tüszősejtek sorsának meghatározásában és a myogén génexpresszió szabályozásában.

3. táblázat: A *H4r* promóterén azonosított kötőhellyel rendelkező transzkripciós faktorok és funkcióik



4. ábra: A H4r ill. H3.3 lokalizációt mutató gének fő funkcionális kategóriái. X-tengelyen a véletlenszerű előforduláshoz képest hányszoros az adott kategóriába eső találatok száma. Az x-tengelyen feltüntetett feldúsulás mértéke azt jelzi, hogy az y-tengelyen ábrázolt kategóriákba eső gének száma hányszorosa a véletlenszerűen kapható gének számával.