

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

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

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

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 az érintett régiók működésének szabályozásában. Ezzel szemben a replikációfüggetlen expressziójú hiszton variánsok a génexpresszió szabályozásában specifikus funkciókkal rendelkeznek, és mutathatnak sejttypusspecifikus expressziót.

A *Drosophila melanogaster* kanonikus hiszton génjei egy klaszterben helyezkednek magas kópiaszámban. Ezzel szemben a hiszton variánsok a hiszton klaszteren kívül helyezkednek el a genomban, egy példányban, szerkezetükben általában kissé eltérnek kanonikus megfelelőiktől, specifikus szabályozásuk pedig lehetővé teszi specifikus szöveti vagy differenciálódási funkciók ellátását.

A többi alternatív hisztontól eltérően a H4 variáns fehérje (H4r) aminosavsorrendje megegyezik a kanonikus H4-ével. Annak érdekében, hogy a H4r-t megkülönböztethessük a kanonikus H4-től és információt nyerhessünk a szerepéről, epitóp-jelöltük a H4r-t, tanulmányoztuk annak térbeli és időbeli kifejeződését, és feltártuk a kromatinban való lokalizációját nukleosomális szinten. 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 sejttypusok között, a H4r az agyi sejtek egy kisebb populációjában felhalmozódást mutat, mely nem korlátozódik sejttypusra vagy differenciációs stádiumra. ChIP-seq kísérletekkel kimutattuk, 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-nek van a kanonikus H4-től eltérő, specifikus variáns hiszton funkciója, amellyel hozzájárulhat a nem osztódó sejtek transzkripciós memóriájának kialakításához.

Felhasznált módszerek

Mintagyűjtés:

- különböző korú embriók gyűjtése és dekonionizálása
- L3 stádiumú lárvák és 1 napos felnőtt szervek boncolása immunfestéshez
- 0-5 napos felnőtt állatok gyűjtése, kezelése (hősokk ill. hősokk és regeneráció), fagyasztása, fejek elválasztása a test többi részétől DNS-, RNS- és fehérjepreparáláshoz

Molekuláris biológiai és genetikai módszerek:

- a *H4r* gént célzó guide-RNS-eket kódoló plazmid létrehozása ligálás független klónozással (SLIC)
- 3xFlag epitóp-jelölt H4r-t és dsRed markert hordozó plazmid létrehozása klasszikus klónozással
- epitóp-jelölt H4r-t, valamint az epitóp-jelölt H4r mellett sejttípus-specifikusan kifejeződő Lamin B-GFP-t termelő transzgenikus *Drosophila* vonalak létrehozása plazmid injektálással és keresztezésekkel, epitóp-jelölt H3.3-at termelő transzgenikus vonal előállítás keresztezéssel
- immunhisztokémiai vizsgálatok és mikroszkópia
- kromatin-, RNS- és fehérjepreparátumok készítése
- hagyományos végpont PCR, reverz transzkripció, qPCR
- Tricin-SDS-PAGE és Western blot
- kromatin-immunprecipitáció, könyvtárkészítés és szekvenálás

Bioinformatikai módszerek:

- online adatbázisok használata
- plazmid konstrukciók és primerek tervezése (SnapGene)
- mikroszkópos képek analízise (ImageJ és Leica LAS AF)
- szekvenálási adatok elemzése (<https://usegalaxy.eu/>)
- statisztikai elemzések (Excel és GraphPad Prism)

Eredmények és megvitatásuk

1. A H4r expressziójának nyomon követését és mennyiségi analizését lehetővé tevő *Drosophila* vonalak előállítása

Mivel a H4r aminosavsorrendje a kanonikus H4-ével teljesen megegyezik, és a két fehérje csupán az expressziójukban tér el egymástól, a H4r funkcionális vizsgálatához szükséges volt az, hogy a két H4 fehérjét egymástól meg tudjuk különböztetni. Ehhez olyan plazmidokat hoztunk létre, mely a *H4r* gént a kiterjesztett genomi régiójával együtt tartalmazza, és ezen a plazmidon a gént a 3xFlag epitóp taget kódoló szekvenciával fuzionáltuk. A Flag-tagget H4r-t termelő állatok könnyű azonosítása érdekében két loxP rekombinációs hely által határolt *dsRed* marker gént inszertáltunk a *H4r* géntől downstream. A loxP rekombinációs helyek segítségével Cre-mediált rekombinációval később eltávolítottuk a *dsRed* gént, egy újabb *Drosophila* vonalat létrehozva, melyet kettős immunfestésekhez tudunk felhasználni. A dsRed piros fluoreszcens színe így nem befolyásolta az immunhisztokémiai vizsgálatok eredményeit. Az így létrehozott törzset olyan keresztezésekhez használtuk fel, melyek eredményeként a 3xFlag-H4r-t termelő állatok sejttípus-specifikusan termeltek GFP-jelölt Lamin B-t. Ezen transzgenikus állatokat azért hoztuk létre, hogy a H4r sejt-specifikus kifejeződését nyomon követhessük.

2. A H4r anyai hatású fehérjeként kerül az embrióba, beépül a pronucleusok kromatinjába, és általánosan kifejeződik minden sejtben az embriogenezis során.

Immunhisztokémiai vizsgálatok során megállapítottuk, hogy a H4r a petefészkek és herék szomatikus sejtjeiben fejeződik ki nagyobb mértékben, azonban az ivarvonal sejtjeiben mutatott enyhébb expressziója révén anyai hatású fehérjeterméként kerül az embrióba, és az anyai és apai pronucleusokba egyaránt beépül. A pronucleusok egyesülése után a sejtmag-osztódások során beépül a kromatinba, melyhez a sejt a citoplazmában jelen lévő, nagy mennyiségű anyai H4r készletet használja fel. A H4r a zigótikus genomaktivációt követően minden sejtben általánosan kifejeződik az embriogenezis során.

3. A H4r a sejtek egy kisebb populációjában felhalmozódást mutat a lárvakori neuronális differenciáció során.

Az agy bizonyos sejtjei a környező sejtekhez képest nagymértékű H4r felhalmozódást mutattak. 3xFlag-H4r-t és sejtípus-specifikus Lamin B-GFP-t együttesen termelő állatokon végzett immunfestések alapján megállapítottuk, hogy a H4r-t nagy mennyiségben termelő sejtek többsége kolinerg neuron, de megtalálhatók közöttük GABAerg és glutaminerg neuronok is, valamint neuroblasztok, így a H4r felhalmozódása nem köthető sem sejtípushoz, sem differenciációs stádiumhoz.

4. A H4r expressziója nem változik szignifikánsan hősök és regeneráció hatására.

Mivel a szakirodalmi adatok alapján feltételezhető, hogy a H4r-nek a hősök gének körüli kromatin szabályozásában szerepe lehet, megvizsgáltuk, hogy hogyan változik a *H4r* gén expressziója mRNS- és fehérjeszinten, valamint a kromatinba beépülő H4r mennyisége hősök ill. azt követő regeneráció hatására. qPCR és western blot analízisek eredményei alapján sem az mRNS, sem a fehérje termelődése nem változik szignifikánsan a vizsgált környezeti hatásokra, és a kromatinba beépülő H4r mennyisége is állandó marad. Ezek alapján a H4r alacsony szintű, de folyamatos expressziója elegendő H4 fehérjét biztosíthat a környezeti stimulusok hatására bekövetkező kromatin átrendeződésekhez.

5. A H4r preferenciálisan kötődik specifikus kromatinrégiókhoz

Mivel az agyban a H4r bizonyos sejtekben akkumulációt mutat, mely nem jár a H4r-t felhalmozó sejtek kromatinjának fokozottabb tömörítésével, valamint a H4r expressziója a nem-osztódó sejtekben erőteljesebb, mint az osztódó sejtekben, a főként differenciálódott sejteket tartalmazó agyban vizsgáltuk a H4r lokalizációját. Annak megállapításához, hogy a kanonikus H4-gyel megegyező aminosav-szekvenciájának megfelelően a kanonikus hisztonokhoz hasonló eloszlást mutat-e a genomon, vagy a hiszton variánsokra jellemző expressziójának köszönhetően variánsokra jellemző sajátosságokat mutat-e az eloszlása, a H4r lokalizációját a kanonikus hiszton H3-mal ill. a variáns H3.3-mal hasonlítottuk össze. Ehhez olyan

állatokat használtunk fel, melyek 3xFlag epitóp-jelölt H3.3-at termelnek az agyban. Így Flag és H3 specifikus ellenanyagokkal végzett ChIP-seq adatok alapján megállapítottuk, hogy a H4r eloszlása a H3.3-mal nagyfokú hasonlóságot mutat, és élesen eltér a kanonikus H3-tól. Míg a kanonikus H3 a disztális intergenikus régiókban volt abundáns, a H4r és a H3.3 zömmel gének promóterein lokalizálódott. Ez felvetette annak lehetőségét, hogy a H4r-nek specifikus szerepe lehet a transzkripció aktiváció ill. represszió szabályozásában. Megvizsgálva a H4r és H3.3 nukleoszómák számához viszonyított átlagos mennyiségét az egyes géneken megállapítottuk, hogy ez a két hiszton variáns szignifikánsan nagyobb mennyiségben fordul elő az aktív és indukálható géneken, mint az inaktív géneken. Ezzel az eredményekkel tovább erősítik azt a feltételezést, hogy a H4r-nek szerepe lehet a transzkripció aktivációban.

6. A H4r és a H3.3 mennyisége megnő a hősokk-géneken, azonban a regeneráció folyamán bekövetkező transzkripciós represszió során csak a H4r marad az érintett gének promóterein.

A hősokk géneken hősokk hatására a H4r és H3.3 nukleoszómák számához viszonyított előfordulási gyakorisága megnő, igazolva a két alternatív hiszton transzkripció aktivációban betöltött szerepét. Regeneráció során azonban a hősokk gének csendesítődnek, ami a nukleoszómák számának növekedésével jár, ezzel összhangban a két fehérje abszolút mennyisége is jelentősen megnő, a H4r-é jobban, mint a H3.3-é. Bár a nukleoszómák számához viszonyított relatív változás egyik variáns esetében sem szignifikáns, a H4r-é kismértékben növekszik, a H3.3-é viszont lecsökken, vagyis a regeneráció során visszaépülő nukleoszómák nagyobb részt H4r-t tartalmaznak kanonikus H4 helyett, és inkább kanonikus H3-at tartalmaznak H3.3 helyett. Ez ahhoz a feltételezéshez vezet, hogy bár a két variáns lokalizációja nagymértékben átfed és mindkettő részt vesznek a transzkripció aktivációban, a H4r-nek lehet a H3.3-tól független funkciója is, a represszált géneken maradván szerepet játszhat a transzkripciós memória kialakításában, lehetővé téve az egyre gyorsabb és erősebb transzkripciós választ a stimulus ismétlődése esetén.

Összefoglalás

A dolgozatban bemutatott eredmények a csoportunkban végzett epigenetikai kutatások szerves részét képezik. Kísérleti eredményeinkkel bebizonyítottuk, hogy a H4r-nek a kanonikus H4-gyel megegyező aminosav-szekvenciája ellenére variáns funkciói vannak: eloszlása a genomon hiszton variáns jelleget mutat, részt vesz a paternális pronucleusban a protamin hisztonokra történő kicserélődésében, a transzkripció aktivációjában, az indukálható gének expressziójának szabályozásában, és lehetséges szerepet tölthet be a transzkripciós memória kialakításában is.

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

TÉMAVEZETŐI NYILATKOZAT

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

Szeged, 2022. március 21.

.....

Prof. Dr. Boros Imre Miklós

egyetemi tanár

Szegedi Tudományegyetem

.....

Dr. Henn László Dániel

tudományos munkatárs

ELKH Szegedi Biológiai Kutatóközpont

TÁRSSZERZŐI NYILATKOZAT

Alulírott Prof. Dr. Boros Imre, Dr. Henn László, Dr. Villányi Zoltán, Dr. Zsindely Nóra, Dr. Bodai László, Dr. Szabó Áron és Nagy Gábor nyilatkozom arról, hogy a „Despite its sequence identity with canonical H4, Drosophila H4r product is enriched at specific chromatin regions” (Scientific Reports, 2022) című közleményünkben illetve a „A Histone H4 replacement (H4r) gén funkciójának vizsgálata Drosophila melanogasterben” című doktori értekezésben közölt eredményekben a jelölt, Ábrahám Andrea szerepe meghatározó. Hozzájárulok, a közleményünkben foglalt eredményeket a jelölt felhasználja a Szegedi Tudományegyetem TTIK Biológia Doktori Iskola keretében a doktori fokozat eléréseért benyújtott dolgozatában, és egyúttal kijelentem, hogy ezeket az eredményeket nem használtam fel tudományos fokozat megszerzésekor, és ezt a jövőben sem teszem.

.....

Prof. Dr. Boros Imre

.....

Dr. Bodai László

.....

Dr. Henn László

.....

Dr. Szabó Áron

.....

Dr. Villányi Zoltán

.....

Nagy Gábor

.....

Dr. Zsindely Nóra