

36. OTDK Biológia Szekció

Az alternatív linker hiszton foszforilációjának szerepe *Drosophilában*

Pék Ramóna

Biológia BSc, III. évfolyam

Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar

ELKH Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Genetikai Intézet

Témavezető: Dr. Henn László Dániel

Belső konzulens: Dr. Boros Imre Miklós

Szeged, 2022

Tartalomjegyzék

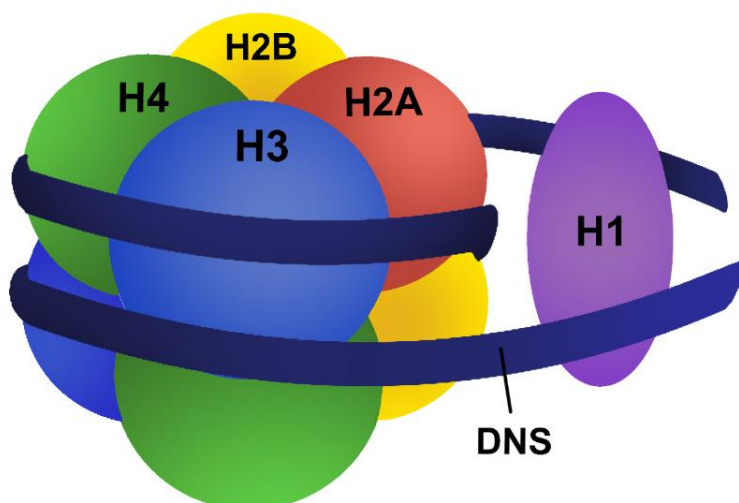
1. Irodalmi áttekintés.....	3
1.1. A kromatin szerveződése	3
1.2. A hisztonfehérjék általános jellemzői	4
1.3. A H1 linker hiszton és variánsai	5
1.4. A korai embrionális fejlődés <i>Drosophilában</i>	6
1.5. A BigH1 alternatív linker hiszton	7
1.6. Linker hisztonok poszttranszlációs módosításai	8
2. Célkitűzések	10
3. Anyagok és módszerek.....	11
3.1. Embriók életképességének mérése	11
3.2. <i>Drosophila</i> embriók fixálása.....	11
3.3. <i>Drosophila</i> embriók immunfestése	11
3.4. Mikroszkópos képek készítése és kiértékelése	12
3.5. NPS fertilitás teszt.....	12
3.6. Mutagén PCR protokoll.....	13
3.7. A PCR termékek emésztése DpnI-el és tisztítás	14
3.8. Szekvencia és Ligálás Független Klónozás (SLIC)	14
3.9. pUC18 3Flag BigH1 dsRed vad típusú és NPS plazmidok emésztése BstXI-el és fragmentumok visszaizolálása agaróz gélből	15
3.10. Ligálás	15
3.11. Transzformálás	15
3.12. Kolónia PCR.....	15
3.13. A PCR termékek és a kombinált pUC18 plazmidok szekvenciáinak ellenőrzése restrikciós endonukleáz emésztéssel	16
3.14. Klónozás pTZ plazmidba és előkészítés injektálásra	16
3.15. Felhasznált <i>Drosophila</i> vonalak	17
4. Eredmények és kiértékelésük.....	18
4.1. Az NPS mutáns embriók csökkent életképességet mutatnak	18
4.2. Az NPS mutánsban korai magosztódási hibák figyelhetők meg	19
4.3. Az NPS mutáns homozigóta hímek sterilek	20
4.4. A BigH1 foszforiláltsága befolyásolja az expressziós mintázatot	21
4.5. BigH1 mutánsok tervezése a foszforilációs helyek jelentőségének vizsgálatához	23
4.6. Egyedi foszforilációs helyek elrontása PCR-ral	25
4.7. Foszforilációs mutáns <i>BigH1</i> szekvenciák előállítása pUC18- vad típusú és NPS plazmidok klónozásával	27

4.8. Klónozás pTZ vektorba	28
5. Összefoglalás	30
6. Köszönetnyilvánítás	31
7. Irodalomjegyzék.....	32
8. Függelék.....	36
9. Tételes Szerzői Hozzájárulás	38

1. Irodalmi áttekintés

1.1. A kromatin szerveződése

Az eukarióta szervezetek örökítőanyaga fehérjékkel komplex szerkezetet alkotva úgynevezett kromatinként van jelen a sejtmagokban. A kromatinszerkezet alapegysége a nukleoszóma, melyet négyféle core hiszton fehérje (H2A, H2B, H3 és H4), valamint az általuk képzett oktamer köré tekeredő 145-147 bázispárnyi DNS alkot (Luger et al., 1997). A nukleoszómaéhoz egy további fehérje, a H1 linker hiszton kapcsolódik, ezzel lehetővé téve a magasabb rendű kromatin szerveződési szintek kialakulását. Az így keletkezett struktúrák a kromatoszóma, melyek nagyban meghatározzák a DNS-hez való hozzáférhetőséget (1. ábra) (Allan et al., 1986; Luger et al., 1997).

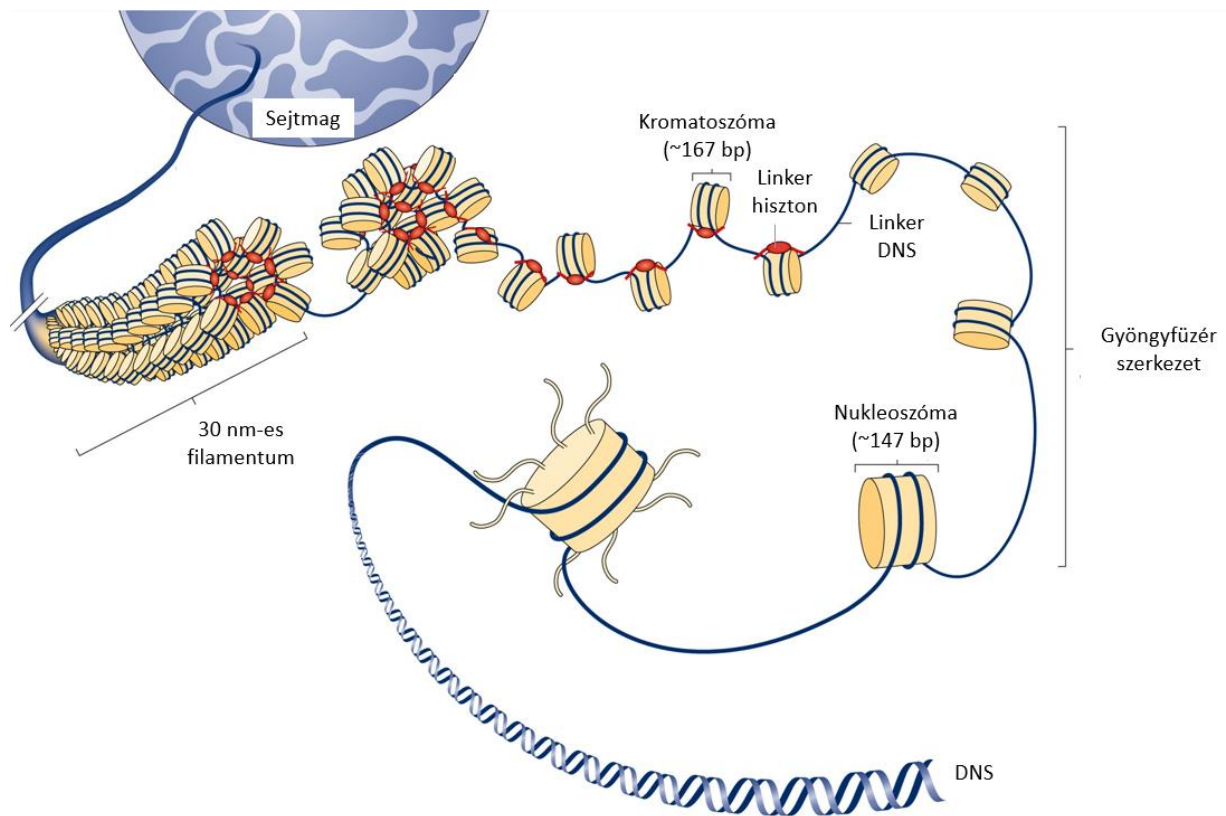


1. ábra: A kromatoszóma. A kromatoszóma 2-2 db H2A, H2B, H3 és H4 core hiszton fehérjéből, a köréjük tekeredő DNS szálból, valamint a H1 linker hisztonból épül fel.

A kromatoszóma „beads-on-a-string” (gyöngyfűzér) szerveződést mutatnak, ami tovább tömörödik 30 nm-es filamentumokká ezzel másodlagos kromatin szerveződési szintet felvéve. Ezen rostok pontos szerkezeti felépítését és szerveződését illetően már többféle modellt is felállítottak, azonban a mai napig a legelfogadottabb a szolenoid szerkezet modellje (Bian & Belmont, 2012). A 30 nm-es filamentumok további tömörödésével jönnek létre a magasabb rendű kromatin struktúrák, végső soron a kromoszóma karok (2. ábra).

A magasabbrendű kromatin, az örökítőanyag tömörödöttségi szintje és a transzkripció aktivitás alapján megkülönböztetünk eu- és heterokromatint. Az eukromatikus régiók jelentik

a transzkripciósan aktív részeket, ahol a nukleoszómák lazább elhelyezkedése megengedi, hogy a DNS hozzáférhető legyen a transzkripciós faktorok számára. Heterokromatin esetén azonban a kromatin olyan tömör struktúrát vesz fel, hogy itt nem jellemző a génátírás (Woodcock & Ghosh, 2010).



2. ábra: A kromatin szerveződése (Fyodorov et al., 2018).

1.2. A hisztonfehérjék általános jellemzői

A hiszton fehérjékről általánosságban elmondható, hogy tripartit szerkezet jellemző rájuk, ami egy rendezett globuláris doménből, valamint két rendezetlen szerkezetű terminális doménből, egy N-terminális és egy C-terminális régióból áll (Zhou et al., 2013).

A kanonikus hiszton fehérjét kódoló gének magas kópiaszámban vannak jelen a genomban replikáció-függő módon kifejeződő génklaszterekben rendeződve. Erre azért van szükség, hogy a sejtciklus S-fázisában, amikor az új DNS szálak szintézise megtörténik, elegendő mennyiségű hiszton fehérje álljon rendelkezésre (Marzluff et al., 2008). Eukarióta élőlények esetén azonban különböző hiszton variánsok is jelen vannak a sejtekben, de az ezeket kódoló gének kevesebb kópiában, a kanonikus hisztonokat kódoló klasztereken kívül

helyezkednek el. Ezen variánsok expressziója nagyrészt fejlődési stádium- vagy szövetspecifikus és nem korlátozódik a sejtciklus S-fázisára (Millar, 2013).

1.3. A H1 linker hiszton és variánsai

Amíg a core hisztonok a nukleoszóma egységét képezik, a H1 linker hiszton globuláris doménje az ebből ki- és belépő DNS szálakhoz kapcsolódik, ezzel stabilizálva a DNS-hiszton komplexet. A lizin-gazdag C-terminális domén szintén hozzájárul a DNS kötéshez (Vyas & Brown, 2012), az N-terminális rész pedig feltehetően a DNS-hez való kötődés erősségében játszik szerepet (Zhou et al., 2013).

Vannak olyan eukarióta élőlények melyek genomja csak egyféle linker hisztont kódol, ilyen például a *Saccharomyces cerevisiae* élesztőgomba, azonban a legtöbb szövetes állat örökítőanyagában többféle H1 variáns génje is jelen van (Patterton et al., 1998). Emberben és egérben például eddig 11 féle H1 változatot azonosítottak (Izzo et al., 2008). Ezek elsősorban a DNS-kötési affinitásukban különböznek egymástól, ami a C-terminális régióik hosszával hozható összefüggésbe (Th'ng et al., 2005), továbbá az eu- illetve heterokromatinhoz való preferenciájuk is változhat, valamint különbség lehet a kifejeződési mintázatukban is (Millán-ariño et al., 2016; Th'ng et al., 2005).

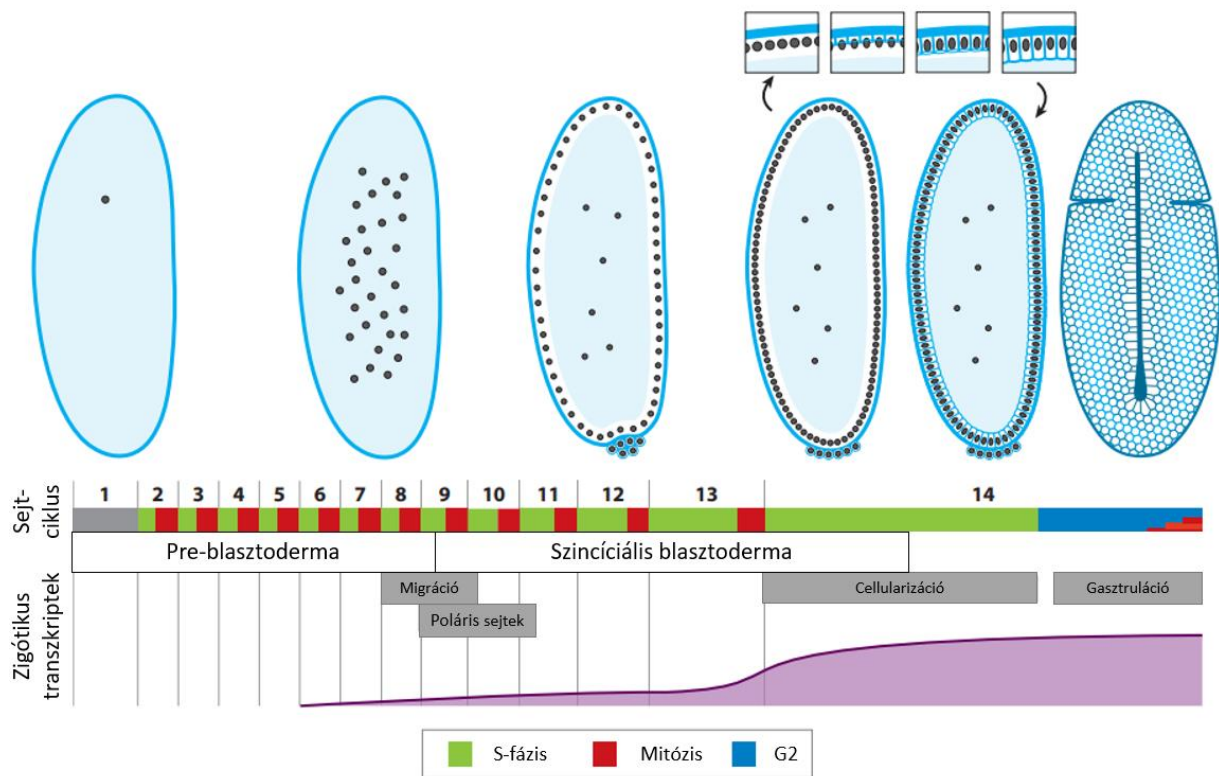
A testi sejtekben kifejeződő variánsok mellett vannak olyan alternatív H1 linker hisztonok is, melyek expressziója kifejezetten egy bizonyos életszakaszra, szövetre vagy szervre korlátozódik. Szövetes állatokban rendszerint jelen van egy olyan hiszton variáns, ami petesejt- és korai embrió specifikus (Happel & Doenecke, 2009). A tengerisünökben (*Echinoidea*) például minden kanonikus hisztonnak van egy ilyen változata, melyeket osztódási stádium (CS, cleavage stage) hisztonoknak nevezünk. Itt a CS H1 felel meg a linker hiszton variáns génjének. (Brandt et al., 1997). A dél-afrikai karmosbékánál (*Xenopus laevis*) szintén egy alternatív H1 protein, a B4 tölti be a korai embrió-specifikus linker hiszton szerepet egészen a gasztruláció kezdetéig (Cho & Wolffe, 1994). A zebradániónál (*Danio rerio*) a H1M gén kódolja az ennek megfelelő fehérjét (Wibbrand & Olsen, 2002), emberben és egérben pedig a H1foo és hH1foo gének felelősek ezért (Funaya et al., 2018; Mizusawa et al., 2010).

Kísérleti adatok szerint emlősökben a különböző linker hiszton fehérjék képesek kompenzálni egymás hiányát, ezért egy-egy linker hiszton gén delécioja rendszerint nem okoz fenotípusos elváltozást. (Fan et al., 2005; Sirotkin et al., 1995). Emiatt a funkcionális redundancia miatt gerinces állatokban a linker hisztonok kutatása nehézségekbe ütközik. Ezzel szemben ecetmuslicában (*Drosophila melanogaster*) a linker hiszton fehérjék komplexitása

alacsonyabb szintű, mert a genom csak kétféle linker hisztont kódol: a testi sejtekben kifejeződő, (szomatikus) H1-et valamint a BigH1 alternatív linker hisztont ami egy ivarvonal- és korai embrió-specifikus fehérjeváltózat (Pérez-Montero et al., 2013).

1.4. A korai embrionális fejlődés *Drosophilában*

A megtermékenyítést 13 szinkronizált magi osztódás követi a korai embriókban (Foe & Alberts, 1983). A korai osztódási ciklusok (1-8.) az embrió belsejében mennek végbe, majd az osztódó magok az embrió felszínére vándorolnak és ott folytatják az osztódást (9-13. ciklus). A ciklusok során a DNS replikációja és a mitotikus fázisok egymás után következnek, ezáltal ez a folyamat sokkal gyorsabb, mint egy átlagos szomatikus sejt sejtciklusa (Farrell & Farrell, 2014). Mivel ezeket a korai, nagyon gyors osztódási ciklusokat nem jellemzik a sejtciklus G1 és G2 fázisai, így az ismert DNS hibajavítási ellenőrzési pontok kimaradnak a DNS szintézis és a mitózis előtt. Ennek az a várható következménye, hogy egy átlagos sejtciklushoz viszonyítva több DNS hiba halmozódik fel, melyek vagy a DNS szintézis szakaszában, vagy a nem megfelelően osztódó kromoszómák miatt keletkeznek mitózis során. A szinciciális blasztoderma embrió ahelyett, hogy kijavítaná a felhalmozott hibákat, eliminálja a nem megfelelőnek bizonyult sejtmagokat úgy hogy ezek az embrió belsejébe süllyednek („nuclear fallout” fenotípus) (Sullivan et al., 1993). A 10. ciklus elejére az embrió poszterior végén elkülönülnek a poláris sejtek, melyekből később az ivarvonal őssejtek fejlődnek ki. A többi sejtmag körül csak a 14. ciklus elején alakul ki plazmamembrán, létrehozva ezzel a szomatikus sejteket. Ezt a folyamatot cellularizációnak nevezzük. A cellularizációval egyidőben játszódik le a zigótikus genom aktiváció (ZGA), melynek során az anyai eredetű géntermékek helyét átveszik az újonnan képződő (zigótikus) géntermékek (Farrell & Farrell, 2014). Az embrió ezt követően a gasztruláció stádiumába lép és megkezdődik a csíralemezek kialakulása (3. ábra) (Foe & Alberts, 1983).



3. ábra: A korai embrionális fejlődés *Drosophila melanogaster*-ben. A felső ábrákon az embriogenezis stádiumai láthatók a megtermékenyítéstől kezdve a gasztrulációig. A felső kis képeken a cellularizáció folyamata van kiemelve (Farrell & Farrell, 2014).

1.5. A BigH1 alternatív linker hiszton

A *Drosophilában* kimutatott korai embrió- és ivarvonal specifikus alternatív linker hiszton szerkezetét tekintve elmondható, hogy a gén 1373 bázispárból áll. Két exont tartalmaz, melyek egyenként 837, illetve 442 bp-ból állnak a nem transzlálódó régiókkal (UTR) együtt. Az ebből keletkező fehérje összesen 353 aminosav és 38,7 kDa nagyságú (http1). A H1 hisztonhoz hasonlítva ennek a fehérjének az N-terminális doménje nagyobb (amiből a neve is adódik) és több savas kémhatású aminosav található meg benne. A globuláris szerkezetű centrális domén, ami a legkonzerváltabb régióknak mondható, is csak 57% egyezést mutat a kanonikus linker hiszton fehérjével (Pérez-Montero et al., 2013). A BigH1 sokkal mobilisabbnak bizonyul és kevésbé erősen köti a nukleoszómákat a kanonikus hisztonnal szemben, viszont ennek ellenére az így kialakult kromatoszómák mégis stabilabbak. A megfelelő funkciók ellátásában bizonyítottan szerepet játszik a fehérje középső globuláris, valamint a C-terminális doménje. (Henn et al., 2020).

A BigH1 anyai öröklődést mutat és a megtermékenyítést követő 13 gyors, szinkronizált magi osztódás során nagy mennyiségben jelen van a szinciciális blasztoderma embrióban. A

BigH1 a szomatikus sejmagokban a cellularizáció után fokozatosan H1-re cserélődik és a gasztrulációt követően már csak az ivarvonal őssejtekben marad fenn. Ez a váltás egybeesik a ZGA-val, amikor is intenzíven beindul a transzkripció a saját genomról. Kísérletes eredmények alapján feltételezték, hogy a BigH1 képes meggátolni a túl korai ZGA bekövetkeztét, ezzel megfelelő fejlődési ritmust biztosítva az embrióknak (Pérez-Montero et al., 2013). Később azonban bebizonyosodott, hogy a BigH1 hiányában is életképesek a *Drosophila* embriók, mert a korai embrionális fejlődés során a BigH1 fehérje hiányát a H1 bizonyos mértékig képes kompenzálni (Carbonell et al., 2020; Li et al., 2019). Az is kiderült már, hogy a H1 géncsökkentés hatását viszont a BigH1 túltermelése képes helyreállítani (Xu et al., 2016). Eddigi ismereteink szerint a *BigH1* kifejeződési mintázatának szabályozásában a keletkezett mRNS nem transzlálódó régiója (UTR) és a hozzá kapcsolódó Brat fehérje vesz részt mind a nőstény ivarvonalban, mind pedig a korai embriogenezis során (Climent-Cantó et al., 2021), azonban a hímivarszervekben ettől eltérő mechanizmus is szerepet játszik (Carbonell et al., 2017).

1.6. Linker hisztonok poszttranszlációs módosításai

A hiszton fehérjék egy további fontos jellemzője, hogy szabályozásukban lényeges szerepet játszanak a poszttranszlációs módosítások (PTM). Ezek az additív funkciók csoportok leggyakrabban a két terminális doménen fordulnak elő és nagyban befolyásolják a kromatin szerveződését, valamint a különböző fehérjék kromatinhoz való kapcsolódását (Bannister & Kouzarides, 2011). A legjelentősebb PTM-ek többek között az acetiláció, metiláció és foszforiláció. Az első kettő nagyrészt a kromatin kompaktságát szabályozza: az acetiláció lazább kromatin struktúrát hoz létre, ezzel lehetővé téve az aktív transzkripciót, a metiláció pedig tömörebb kromatinszerkezet kialakításával epigenetikus géncsökkentésért és heterokromatikus régiók létrehozásáért felel (Rice & Allis, 2001). A foszforiláció ezzel szemben inkább a DNS hibajavító folyamatok és a sejtciklus megfelelő működésében játszik fontos szerepet (Rossetto et al., 2012).

A foszforilált H1-et elsősorban a kromatin kompaktságának megváltozásával hozták összefüggésbe, mivel ez a forma a sejtciklus mitotikus és S-fázisainál, illetve a transzkripcionálisan aktív és inaktív kromatin átmeneteinél figyelhető meg (Lu et al., 1994, 1995). *Drosophilában* a H1 N-terminális domén foszforilációja jellemző, mégpedig leginkább az S10-es aminosavon. Ez korai embriókban detektálható, amikor is a H1 megjelenik a kromatinon a 10. ciklus körül. Az embrió kora előrehaladtával azonban egyre kevésbé jellemző

ez a tulajdonság, ami szintén arra ad következtetést, hogy ez a PTM a mitózis által szabályozott. (Villar-Garea & Imhof, 2008). Korai embriogenezis során a BigH1 foszforilációját is kimutatták, azonban ennek jelentősége idáig ismeretlen volt (Pérez-Montero et al., 2013).

Prof. Boros Imre kutatócsoportja korai embriókon végzett tömegspektrometriai kísérletsorozatban, a BigH1 fehérje 15 lehetséges foszforilációs helyét azonosították és előállítottak egy olyan gént, ahol ezeket a foszforilációs helyeket elmutáltatták, létrehozva egy foszforilációra képtelen fehérjét expresszáló gént, amit *BigH1^{NPS}* –nek nevezték el (No Phosphorylation Sites, a továbbiakban *NPS*) (publikálatlan eredmények). Ennek a mutánsnak a részletes fenotípuselemzése eddig nem történt meg.

2. Célkitűzések

Kutatásunk célja a BigH1 fehérje foszforilációjának jelentőségének megismerése volt egy olyan mutáns genotípusú törzsön keresztül, melyben a *BigH1* gén ki van cserélve egy olyan génváltozatra, amiről foszforilációra képtelen fehérje keletkezik.

Elsősorban arra voltunk kíváncsiak, hogy a foszforiláció illetve ennek hiánya hogyan befolyásolja a fenotípusos jellegeket, többek között az életképességet és a fehérje kifejeződési mintázatát. Továbbá célunk kideríteni, hogy a fehérje megfelelő működéséhez egy általános hiperfoszforilált állapot szükséges, vagy a BigH1 részleges módosításokkal is képes maradéktalanul ellátni a funkcióját. Ezen kérdés megválaszolására molekuláris klónozással új foszforilációs mutáns *BigH1* géneket állítunk elő, hogy CRISPR/Cas9 génszerkesztést alkalmazva új típusú mutáns törzseket hozzunk létre.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Embriók életképességének mérése

Az állatokat 25°C-on petéztettük petéztető táptalajon (4 g/l agar-agar; 1,2 g/l glükóz; 0,6 g/l aktív szén; 1,2 V/V% almaecet; 1,2 V/V% nipagin 1:5 arányban etanolban hígítva). A 0-30 perces embriókat legyűjtöttük és 25, illetve 15°C-on tároltuk, majd 36 óra után megszámoltuk a kikelt és az elpusztult embriókat. A statisztikai adatokat Microsoft Excel táblázattal és GraphPad Prism 9 szoftverrel készítettük el. Az értékeléshez t-próbát használtunk (Two-tailed, unpaired).

3.2. *Drosophila* embriók fixálása

Az embriókat 1-2 percig háztartási hypoban (4 V/V% NaOCl₂) dechorionáltuk, majd 1:1 arányban heptán:PBS-t (1xPBS: 137 mM NaCl; 2,681 mM KCl; 0,01 M Na₂HPO₄; 1,764 mM KH₂PO₄) és 4% formaldehidet tartalmazó oldatban 20 percig fixáltuk orbitális rázón kevertetve, 160 RPM-en. Ezt követően heptánt és metanolt 1:1 arányban tartalmazó oldatban devitellináltuk, metanollal mostuk, majd az immunfestésig metanolban, -20°C-on tároltuk a mintákat.

3.3. *Drosophila* embriók immunfestése

A metanolban tárolt embriókat fokozatosan rehidratáltuk 1:2, 1:1 majd 2:1 arányú PBT:metanol-os (PBT: PBS + 0,1V/V% Triton X-100) mosással, ami egyenként 5 percig tartott. Ezt követően tiszta PBT-ben mostam még 3x5 percig. A mintákat PBT-N-ben (PBT-N: 0,1 V/V% Triton X-100; 1 V/V% BSA; 5 V/V% FCS) blokkoltuk legalább 1 órán keresztül szobahőmérsékleten. Az elsődleges ellenanyagokat PBT-N-ben hígítottuk (1. táblázat), ebben inkubáltuk a mintákat egy éjszakán át 4°C-on. Másnap 3x10 percig mostuk PBT-ben, majd hozzáadtuk a másodlagos ellenanyagokat és a DAPI-t (1. táblázat), melyekkel 1 óráig mostuk a megfelelő hígításban PBT-N-nel, sötétben. 3x10 perc PBT-ben való mosás után a mintákat 50 µl Fluoromount G-be ágyazva tárgylemezre helyeztük és fedőlemezrel fedtük le.

Ellenanyagok és DAPI	Gyártó	Hígítási arány
α -Flag (F3165, egér)	Sigma	1:1000
α -vasa (patkány)	DSHB	1:300
α - γ -H ₂ Av (UNC93, egér)	DSHB	1:500
α -Dcp1 (#9578, nyúl)	Cell Signaling	1:100
Alexa-488 konjugált α -egér (A11001)	Invitrogen	1:600
Alexa-555 konjugált α -nyúl (A21428)	Invitrogen	1:600
Alexa-647 konjugált α -egér (A21235)	Invitrogen	1:600
Alexa-647 konjugált α -patkány (A21247)	Invitrogen	1:600
DAPI (1mg/ml törzsoldat)	Sigma	1:1000

1. táblázat: Az ellenanyagok és a DAPI hígítási arányai immunfestéshez.

3.4. Mikroszkópos képek készítése és kiértékelése

Az immunfestés eredményeit Leica TCS SP5 AOBS konfokális scanning lézermikroszkóppal 20X-os (NA: 0,7) objektíven vizsgáltuk.

2 mikron vastagságú középvonali optikai szeletekről készítettünk képeket az embriókról. Ezeken a lesüllyedő sejtmagokat manuálisan számoltuk meg a statisztikához mind a dorzális, a ventrális és a laterális oldalakon.

Az összetett képekhez ImageJ szoftvert, a statisztikák elkészítéséhez Microsoft Excel táblázatot és GraphPad Prism 9 szoftvert alkalmaztunk. A statisztikai értékeléshez t-próbát használtunk (Two-tailed, unpaired).

3.5. NPS fertilitás teszt

Négyféle keresztezést raktunk össze ehhez a kísérlethez és minden változatot 28 külön fiolában vizsgáltunk. A hímek fertilitási tesztjében homozigóta *NPS* hímeket kereszteztünk w^* szűzekkel és kontrollként heterozigóta *NPS* hímeket kereszteztünk w^* szűzekkel. Ezeknél a keresztezéseknél 3-4 szüzet raktunk egy-egy hímhez. A nőstények fertilitási tesztjében 2-2 homozigóta *NPS* szüzet kereszteztünk 2-2 w^* hímmel, kontrollként pedig heterozigóta *NPS* szűzeket kereszteztünk w^* hímekkel.

3.6. Mutagén PCR protokoll

A mutagén PCR reakciók mindegyikéhez Q5 DNS-polimerázt használtunk az alacsony hibaráta miatt. A felhasznált primerek olvadáspontja különböző, így gradiens PCR-t alkalmaztunk (2. táblázat, 1. függelék). A PCR-hoz használt reakcióelegy: 20 V/V% 5x Puffer; 0,2 mM dNTP; 0,5 µM Forward primer; 0,5 µM Reverse primer; 2 V/V% templát DNS; 0,05 U/µl Q5 polimeráz (NEB).

Forward primer	S265 Fw	ori Fw	S339; T340 Fw	ori Fw	T327 Fw	ori Fw
Reverse primer	ori Rev	S265 Rev	ori Rev	S339; T340 Rev	ori Rev	T327 Rev
A felamplifikált DNS mérete (bp)	3170	2393	2163	3395	2198	3361
Elődenaturáció	95°C 30 mp	98°C 30 mp	98°C 30 mp	98°C 30 mp	98°C 30 mp	98°C 30 mp
Denaturáció	95°C 10 mp	98°C 10 mp	98°C 10 mp	98°C 10 mp	98°C 10 mp	98°C 10 mp
Hibridizáció	60°C 20 mp	54,8- 68,6°C 20 mp	54,8- 68,6°C 20 mp	54,8- 68,6°C 20 mp	54,8- 68,6°C 20 mp	54,8- 68,6°C 20 mp
Polimerizáció	72°C 1 p 20 mp	72°C 1 p 20 mp	72°C 1 p 20 mp	72°C 1 p 20 mp	72°C 1 p 20 mp	72°C 1 p 20 mp
Utópolimerizáció	72°C 2 perc	72°C 2 perc	72°C 2 perc	72°C 2 perc	72°C 2 perc	72°C 2 perc
Tárolás	4°C	4°C	4°C	4°C	4°C	4°C

2. táblázat: Mutagén PCR protokoll. A ciklusszámok (denaturáció-hibridizáció-polimerizáció) 32x, a gradiens esetén pedig 40x volt.

A PCR termékeket 1%-os agaróz gélen futtattuk meg, hogy ellenőrizzük a termékek meglétét és megfelelő méretét. Az agaróz gél TBE pufferrel készült (1xTBE: 0,13 M Tris; 45 mM bórsav; 2,5 mM EDTA) és 30-40 percig futtattuk 100 V-on. Ezt követően UV fény alatt ellenőriztük a gélelektroforézis eredményét.

3.7. A PCR termékek emésztése DpnI-el és tisztítás

A sikeres PCR reakciók termékeiben a templátként használt, de a reakció végtermékében megmaradt plazmidokat, DpnI-el emésztettük el tisztítás előtt. A reakcióelegyek összetétele: 10 V/V% Tango puffer; 33,3 V/V% PCR termék; 0,05U/μl DpnI. A reakcióelegyeket 37°C-on inkubáltuk 1 órán át, majd 80°C-on 20 percig tárolva inaktiváltuk az enzimet.

A megemésztett mintákat Nucleospin Gel and PCR Clean-up Kittel tisztítottuk a gyártói protokoll szerint, a DNS koncentrációkat pedig Nanodrop 2000-rel mértük le.

3.8. Szekvencia és Ligálás Független Klónozás (SLIC)

Minden SLIC reakcióelegyhez 2:3 moláris arányban mértük hozzá a két DNS fragmentumot méretükből adódóan (3. táblázat). A reakcióelegy tartalma: 5 ng/μl DNS; 10 V/V% Fermentas Green puffer; 0,4 U/μl T4 polimeráz. A kontroll mintákba nem került enzim.

SLIC reakcióelegy	A mutagén PCR során felhasznált primerek	A DNS fragmentum mérete (bp)
1.	S265A Fw és ori Rev	2393
	ori Fw és S265A Rev	3170
2.	T327A Fw és ori Rev	2198
	ori Fw és T327A Rev	3361
3.	S339A/T340A Fw és ori Rev	2163
	ori Fw és S339A/T340A Rev	3395

3. táblázat: A SLIC reakciókhoz felhasznált DNS fragmentek és méreteik.

A T4 polimeráz hozzáadása után 2 perc 50 mp-ig inkubáltuk a mintákat szobahőmérsékleten, majd jégre helyeztük őket.

3.9. pUC18 3Flag BigH1 dsRed vad típusú és NPS plazmidok emésztése BstXI-el és fragmentumok visszaizolálása agaróz gélből

A plazmidokat a BstXI restrikciós endonukleáz két helyen hasítja, ezzel mindkét vektor esetén egy 1792 bp-s és egy 3718 bp-s fragmentet létrehozva. Az emésztés reakcióelegye: 10 V/V% Puffer O; 0,2 U/μl BstXI; 60 ng/μl plazmid DNS.

37°C-on 70 percig inkubáltuk a mintákat, ez után 1%-os agaróz gélen futtattuk meg, majd a gélből visszaizoláltuk a fragmentumokat Nucleospin Gel and PCR Clean-up Kittel a gyártói protokoll alapján.

3.10. Ligálás

A fragmentumok méretét figyelembe véve a ligálási reakcióelegyeket úgy állítottuk össze, hogy az inszert:vektor arány 3:1 legyen, illetve a reakcióelegyek összesen 50-100 ng DNS-t tartalmazzanak. A reakcióelegy további tartalma: 10 V/V% 10x T4 puffer; 0,5 U/μl T4 ligáz (ThermoFisher). A ligátumot 15 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten.

3.11. Transzformálás

100 μl jégen felolvasztott 2T1 kompetens baktériumsejthez mértünk hozzá 10 μl ligálási reakcióelegyet. 20 percig inkubáltuk jégen, majd 42°C-on 45 mp-ig hősokkoltuk a mintákat. A jégre visszahelyezést követően 900μl SOB folyékony tápoldatot (SOB: standard SOC tápoldat +3 mM glükóz; 3 mM MgCl₂; 3 mM MgSO₄; 0,001 V/V% tetracyclin) adtunk a sejtekhez és 37°C-on 550 RPM rázaton 45 percig inkubáltuk. Ampicillint tartalmazó LB lemezekre (LB: 10 g/l Tripton; 5 g/l élesztő kivonat; 10 g/l NaCl pH ~7,5; 1,5 V/V% agar) szélesztettük centrifugálás nélkül, majd centrifugálás (900xg 2 perc) után is a sejteket és éjszakára 37°C-on inkubáltuk.

3.12. Kolónia PCR

A felnőtt baktériumtelepekből PCR reakcióelegyeket mértünk össze majd a termékeket megemésztettük a megfelelő enzimekkel, hogy ellenőrizzük, hogy az általunk létrehozott plazmidokat tartalmazzák-e a baktériumtelepek. A 31 ciklusból álló (denaturáció-hibridizáció-polimerizáció) PCR reakcióhoz Firepol polimerázt használtunk (4. táblázat). A reakcióelegy

tartalma: 10 V/V% 10x B puffer; 2,5 mM MgCl₂; 0,2 µM dNTP; 0,2 µM Forward primer; 0,2 µM Reverse primer; 0,1 µM Firepol polimeráz (Solis BioDyne); +templát DNS.

Forward primer	dBigH1 int Fw
Reverse primer	dsRed seq1 Rev
A felamplifikált DNS mérete (bp)	1265
Elődenaturáció	95°C 15 p
Denaturáció	95°C 20 mp
Hibridizáció	58°C 30 mp
Polimerizáció	72°C 1 p 20 mp
Utópolimerizáció	72°C 3 p
Tárolás	4°C ∞

4. táblázat: Kolónia PCR protokoll

3.13. A PCR termékek és a kombinált pUC18 plazmidok szekvenciáinak ellenőrzése restrikciós endonukleáz emésztéssel

A PCR-t követően a megfelelő restrikciós endonukleázzal megemésztettük a terméket. Az emésztéshez használt reakcióelegyek tartalma: Restrikciós endonukleáznak megfelelő 10 V/V% 10x puffer (gyártói ajánlás szerint); 0,5 U/µl XhoI, Kpn2I, SalI vagy PstI restrikciós endonukleáz (ThermoFisher); 20 V/V% PCR termék.

Az emésztés eredményeit 1%-os agaróz gélen futtattuk, majd UV fény alatt ellenőriztük.

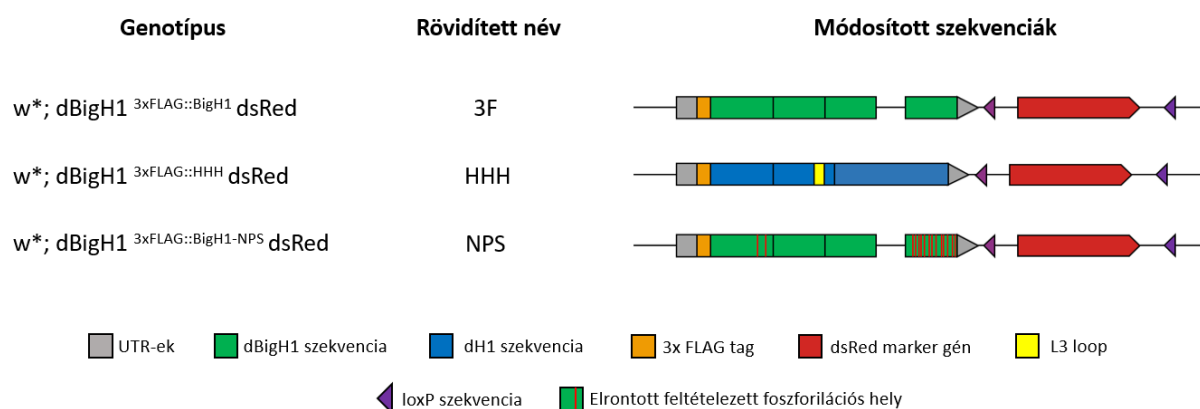
3.14. Klónozás pTZ plazmidba és előkészítés injektálásra

A létrehozott módosított *BigH1* szekvenciákat a pUC18 plazmidból pTZ vektorba klónoztuk, ami tartalmazza az injektáláshoz szükséges homológ karokat. Ehhez az általunk tervezett mutációkat hordozó elkészült pUC18 plazmidokat és a pTZ vektort Bst1107I-el és BglII-vel emésztettük meg, majd 1% agaróz gélen futtattuk meg és visszaizoláltuk a megfelelő fragmentumokat (2843 bp méretű szekvenciarészletet, ami a módosított *BigH1* gént hordozza a pUC18 plazmidból és 5994 bp hosszúságú szakaszt a pTZ vektorból) Nucleospin Gel and PCR Clean-up Kittel a gyártói protokoll szerint. A ligálás és a transzformálás a korábban leírtak szerint zajlott. A klónozás sikerességét kolónia PCR-ral és tesztemésztéssel bizonyítottuk. A megfelelő plazmidot tartalmazó baktériumtelepeket folyékony LB tápoldatban felszaporítottuk és NucleoBond Xtra Midi Plasmid DNS purification kittel nagy mennyiségű és tiszta plazmid

DNS-t nyertünk ki belőlük a gyártói protokoll alapján. A kitisztított DNS-t 1x injektáló pufferben oldottuk vissza, amit >1000 ng/μl koncentrációra állítottunk be az injektáláshoz.

3.15. Felhasznált *Drosophila* vonalak

A BigH1 alternatív linker hiszton foszforilációjának jelentőségét a kutatócsoport által már korábban létrehozott foszforilációs mutáns BigH1 fehérjét hordozó *Drosophila melanogaster* törzsön keresztül tudtuk vizsgálni. Ebben az NPS-nek nevezett törzsben a feltételezett foszforilációra képes aminosavak mindegyikét alaninra cseréltek le (2. függelék). Ez az gén *in situ* génszintézissel készült és a törzs *TM3* balanszer kromoszómát tartalmaz, mert a hímek homozigóta formában sterilek. Ezen kívül egy *BigH1^{HHH}* genotípusú törzset is használtunk összehasonlításképpen (továbbiakban *HHH*), melyben az endogén *BigH1* fehérjekódoló szekvenciája a *H1*-ére van kicserélve. Az eddig publikált gének közül homozigóta formában ez a mutáns mutatta a legerősebb fenotípusokat (Henn et al., 2020). Kontroll csoportnak 3xFlag epitóppal ellátott vad típusú BigH1 fehérjét expresszáló *BigH1^{3F}* törzset használtunk (továbbiakban *3F*). A különböző BigH1 változatok mindegyike továbbá 3xFlag epitóp jelöléssel van ellátva, hogy a kísérletek során nyomon követhető legyen a génekről kifejeződő fehérjék lokalizációja a sejteken belül. (4. ábra). A 3xFlag-tag a kifejeződő fehérjén bizonyítottan nem okoz változást sem az expressziós mintázatban, sem pedig a fehérje funkciójában (Henn et al., 2020).



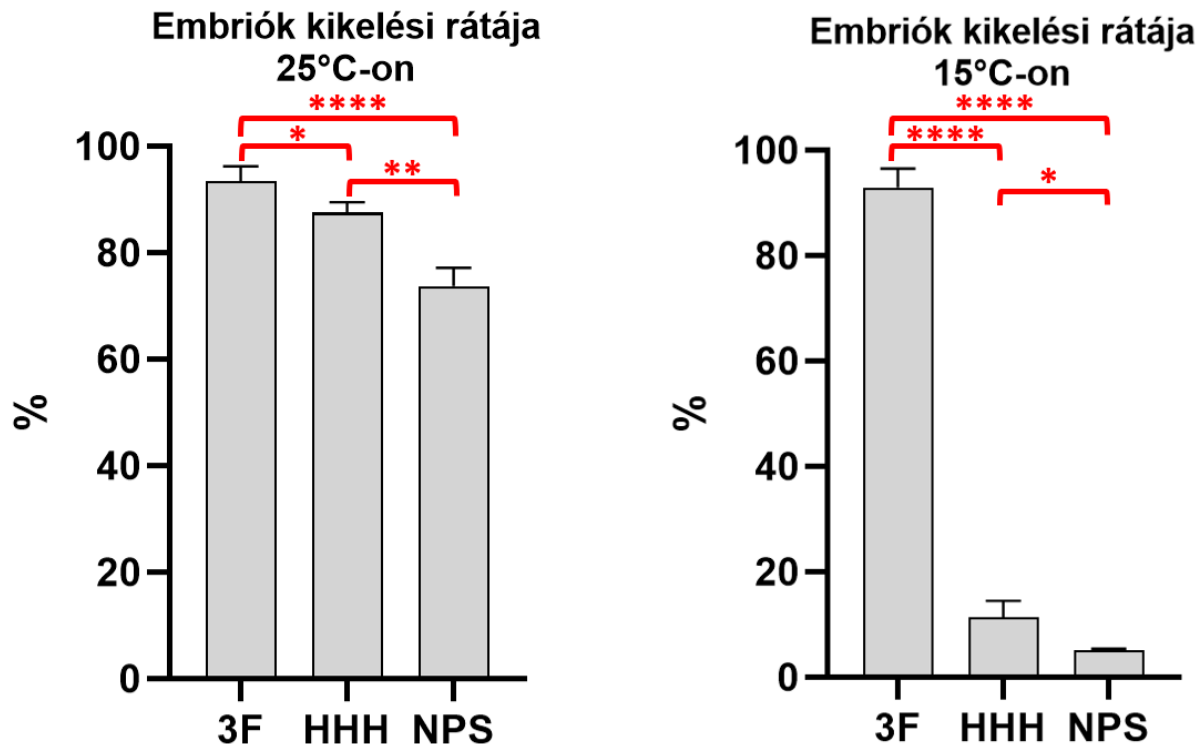
4. ábra: A módosított *BigH1* szekvenciákat hordozó *Drosophila* vonalak bemutatása.

4. Eredmények és kiértékelésük

A *NPS* mutáns alternatív linker hiszton változat vizsgálatához olyan kísérleteket állítottunk fel, melyek alkalmasak mind a külsőleges, mind a molekuláris szinten mutatott fenotípusos jellegek felderítésére. Ennek érdekében már bevett és publikált módszereket alkalmaztunk, mint például az embrionális életképesség mérést, vagy a „nuclear fallout” fenotípus vizsgálatát szinciciális blasztoderma embriókban. Mivel az *NPS* törzs *TM3* balanszer kromoszómával van fenntartva, minden kísérlethez olyan embriókat használtunk, melyek homozigóta nőstényektől származnak, így biztosítva azt, hogy ne legyen vad típusú géntermék a korai fejlődési stádiumban, tehát csak a foszforilációs mutáns fehérje legyen jelen.

4.1. Az *NPS* mutáns embriók csökkent életképességet mutatnak

Ebben a kísérletben azt vizsgáltuk, hogy az *NPS* genotípusú embriók kikelési rátája hogyan változik meg a vad típusú embriókéhoz képest normál laboratóriumi körülmények között (25°C) valamint 15°C-on. Kontrollként *3F* és *HHH* törzseket használtunk. A statisztikai eredmények alapján jól látszik, hogy bár 25°C-on a *HHH* genotípusú embriók is szignifikánsan különböznek a *3F*-től ($p < 0,015$) (Henn et al., 2020), az *NPS* mutáns embriók esetén még ennél is nagyobb mértékben csökken az életképesség mind a *HHH* genotípusú állatokhoz ($p < 0,0035$), mind a *3F* kontroll csoporthoz ($p < 0,0001$) képest. 15°C-on mindkét mutáns genotípus kikelési rátája szignifikánsan különbözik a *3F*-hez képest ($p < 0,0001$), azonban az *NPS* a *HHH* mutánsnál itt is szignifikánsan rosszabb életképességet mutat ($p < 0,024$) (5. ábra). A 25°C-on detektálható letalitás új típusú BigH1 fenotípus, ez a jelleg korábban nem volt tapasztalható egyik vizsgált genotípusnál sem.

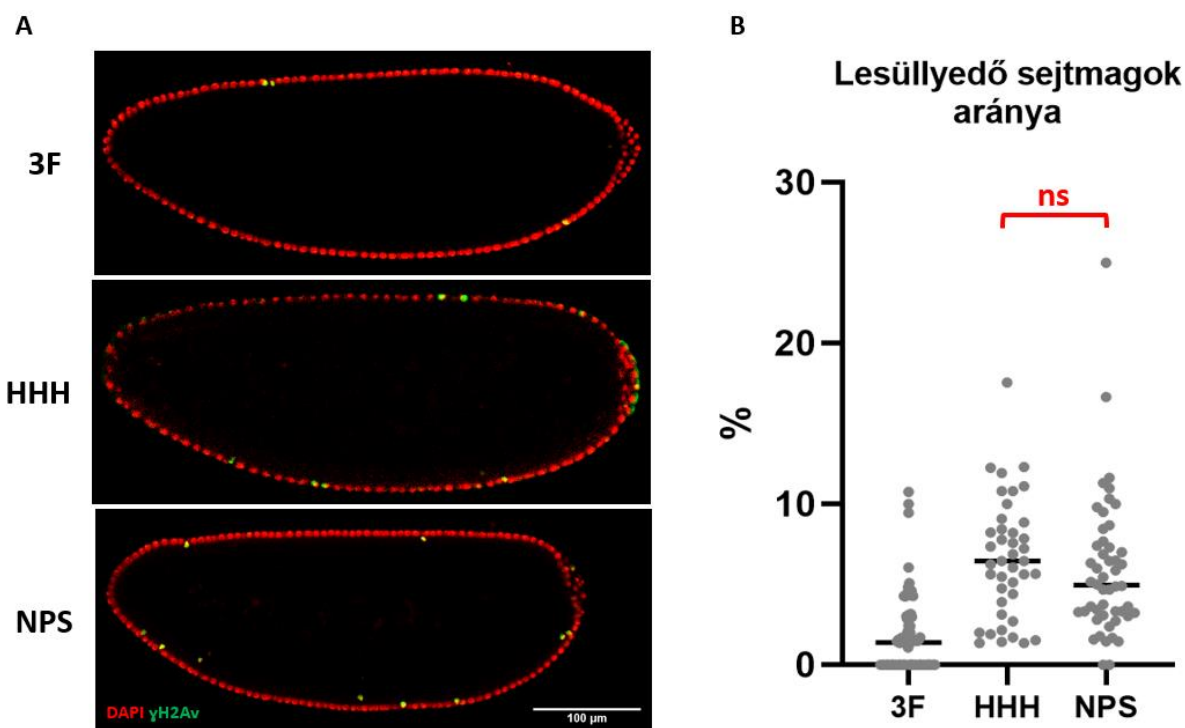


5. ábra: Az *NPS* törzs kikelési rátája 25°C-on és 15°C-on a vad típusú (*3F*) és a *HHH* variánshoz képest. Szignifikáns változások: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ****: $p < 0,0001$.

Ezekből az eredményekből arra következtethetünk, hogy a fehérje foszforiláltsága kiemelkedően fontos szerepet játszik az embrionális fejlődés során, hiszen nagyban hozzájárul az optimálistól eltérő körülmények átvészelésében ebben a korai fejlődési időszakban.

4.2. Az *NPS* mutánsban korai magosztódási hibák figyelhetők meg

A következő kísérletben megvizsgáltuk, hogy a megfigyelt letalitás a korai embriogenezis hibáinak tudható-e be. A „nuclear fallout” fenotípus kimutatására DAPI-t és γ H2Av ellenanyagot alkalmaztunk immunfestés során. Előbbi a sejtmagokat festi meg, az utóbbi pedig a duplaszálú DNS töréseket tartalmazó sejtmagokat teszi láthatóvá, ami a lesüllyedő sejtmagok egyik jellemző tulajdonsága. (6. ábra A). A kapott adatok alapján a vad típushoz (*3F*) képest (átlagosan 1,7%) a foszforilációs mutáns (*NPS*) jóval magasabb arányban tartalmaz lesüllyedő sejtmagokat (átlagosan 5,9%). Ugyanakkor a lesüllyedő magok aránya nem szignifikánsan magasabb ($p < 0,42$) a foszforilációs mutáns BigH1 fehérje (*NPS*) jelenlétében, mint H1 jelenlétében (*HHH*) (6. ábra B).



6. ábra: (A) A lesüllyedő sejtmagok fenotípusa vad típusú (3F), HHH és NPS genotípusú korai embriókban. Piros színnel a sejtmagok látszódnak, a zöld szín pedig a lesüllyedő sejtmagokat mutatja. (B) A lesüllyedő sejtmagok arányából számított statisztikai eredmények. ns: nem szignifikáns változás.

A „nuclear fallout” fenotípus a DNS szintézis során felhalmozott, vagy a magi osztódásból származó hibák következménye lehet.

4.3. Az NPS mutáns homozigóta hímek sterilek

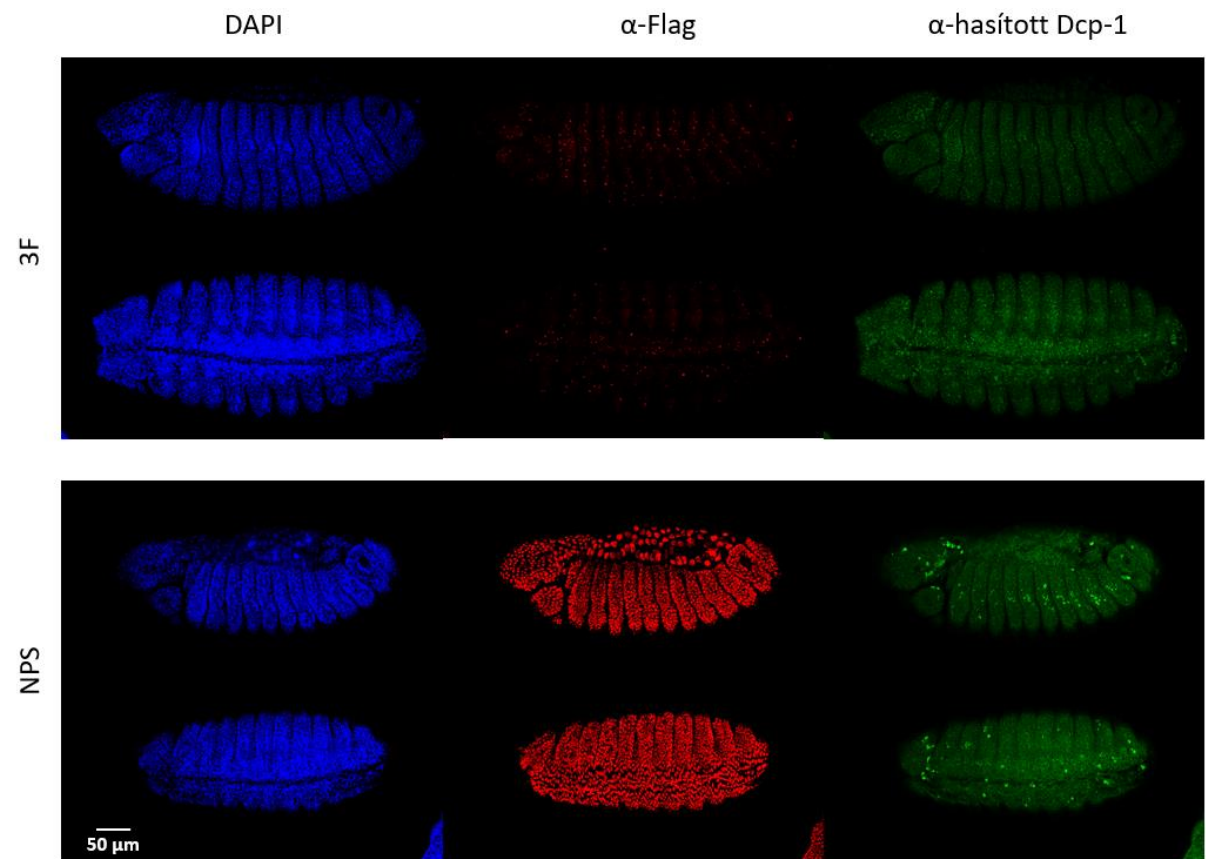
A foszforilációs mutáns homozigóta ecetmuslicák életképesnek bizonyultak, azonban észrevettük, hogy a törzsben több generáció után is még körülbelül fele arányban jelen van a *TM3* balanszer kromoszóma. Ezért elvégeztünk egy fertilitási kísérletet, melyben a homozigóta hímek és nőstények fertilitását teszteltük le. Kontrollként heterozigóta hímeket és szűz nőstényeket kereszteztünk be *w** szűz nőstényekkel, illetve hímekkel.

Abban a 28 fiolában, melyekben homozigóta *BigH1^{NPS}* hímeket kereszteztem *w** szűzekkel egyetlen kikelt lárva sem volt, ugyanakkor a heterozigóta hímek (*NPS/TM3*) mind fertilisek voltak, hiszen mind a 28 keresztezésben láthatóak voltak lárvák. A homozigóta nőstény állatok fertilisek bizonyultak, hiszen heterozigóta nőstényekhez hasonlóan az összes keresztezés (28-28) minden fiolájában életképes lárvákat figyeltünk meg.

4.4. A BigH1 foszforiláltsága befolyásolja az expressziós mintázatot

A vad típusú BigH1 fehérjéről már ismert, hogy a cellularizációval egyidejűleg a szomatikus sejtekben lecserélődik H1-re így csak az ivarvonal sejtekben marad fenn. Ekkor megy végbe a ZGA folyamata is, mely során elkezdődik az aktív génátírás a saját genomról. Korábban már kimutatták, hogy a ZGA összefüggésbe hozható a vizsgált fehérje jelenlétével, mert a BigH1 megakadályozza a túl korai intenzív génkifejeződést (Pérez-Montero et al., 2013), ugyanakkor meg kell említeni azt is, hogy a ZGA a fehérje jelenlététől függetlenül is végbemegy.

Késői *3F* és *NPS* embriókon (>13. osztódási stádium) végeztünk immunfestést DAPI-val, valamint α -Flag és α -Dcp1 ellenanyagokkal, amik lehetővé tették a sejtmagok, a BigH1 és az apoptotikus sejtek kimutatását egyidejűleg. A kísérletből kiderült, hogy míg a vad típusú embrióknál (*3F*) már nem kimutatható a fehérje ebben a késői embrionális stádiumban, az *NPS* mutánsban még mindig jelen van, továbbá sokkal nagyobb arányban láthatóak apoptotikus sejtek is (7. ábra).



7. ábra: A BigH1 és az apoptotikus sejtek kimutatása immunfestéssel a gasztrulálódott *3F* és *NPS* embriókban. Kék színnel a sejtmagok látszódnak, pirossal a BigH1 fehérje, zölddel pedig az apoptotikus sejtek.

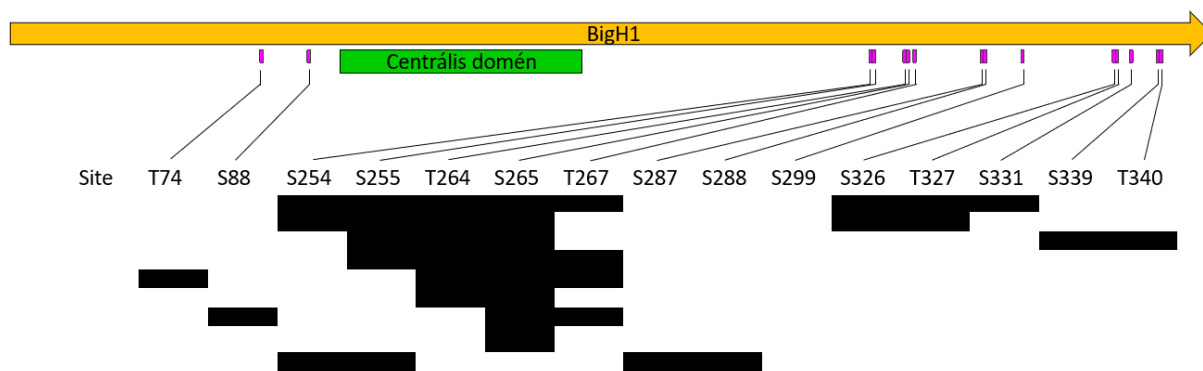
A késői embrionális stádiumban is jelenlevő *NPS* mutáns fehérje észlelése például azzal magyarázható lenne, hogy a vad típusú fehérje negatívabb töltéssel rendelkezik a foszforiláltság miatt, így mobilisabbnak bizonyul, könnyebben le tud válni a szintén negatív töltésű DNS-ről. Ezzel szemben a nem foszforilált forma, az *NPS* fehérje a vad típushoz képest mindenképpen pozitívabb töltéssel rendelkezik. A hipotézis tesztelése azonban további vizsgálatokat igényel.

Kimutattuk, hogy az *NPS* foszforilációs mutánsban a vad típusnál jóval több apoptotikus sejt figyelhető meg. Ebből arra következtethetünk, hogy azokban a szomatikus sejtekben, ahol a BigH1-nek már nem szabadna jelen lennie, a fehérje stabilabban kötődik a nukleoszómákhoz. Ezzel a hibajavító mechanizmusok, vagy a transzkripcióban résztvevő molekulák kromatinhoz való hozzáférhetőségét változtathatja meg és ezért indulhat be a programozott sejthalál.

4.5. BigH1 mutánsok tervezése a foszforilációs helyek jelentőségének vizsgálatához

A BigH1 foszforilációjának jelentőségéről már rendelkezünk pár irodalmi adattal és a saját, *NPS* törzsünk vizsgálata is jól mutatja, hogy ennek a PTM-nak a fehérjén nagy jelentősége van az életképesség tekintetében. Az azonban nem ismert, hogy egy általános hiperfoszforilált állapot a legkedvezőbb a BigH1 megfelelő működéséhez, vagy pedig kimondottan van egy domén, vagy aminosav melynek foszforilációja nagyban befolyásolja a fehérje funkcióját. Ezzel a kísérletsorozattal ötféle foszforilációs mutáns *BigH1* gént állítottunk elő abból a célból, hogy kiderítsük a fenti kérdésre a választ.

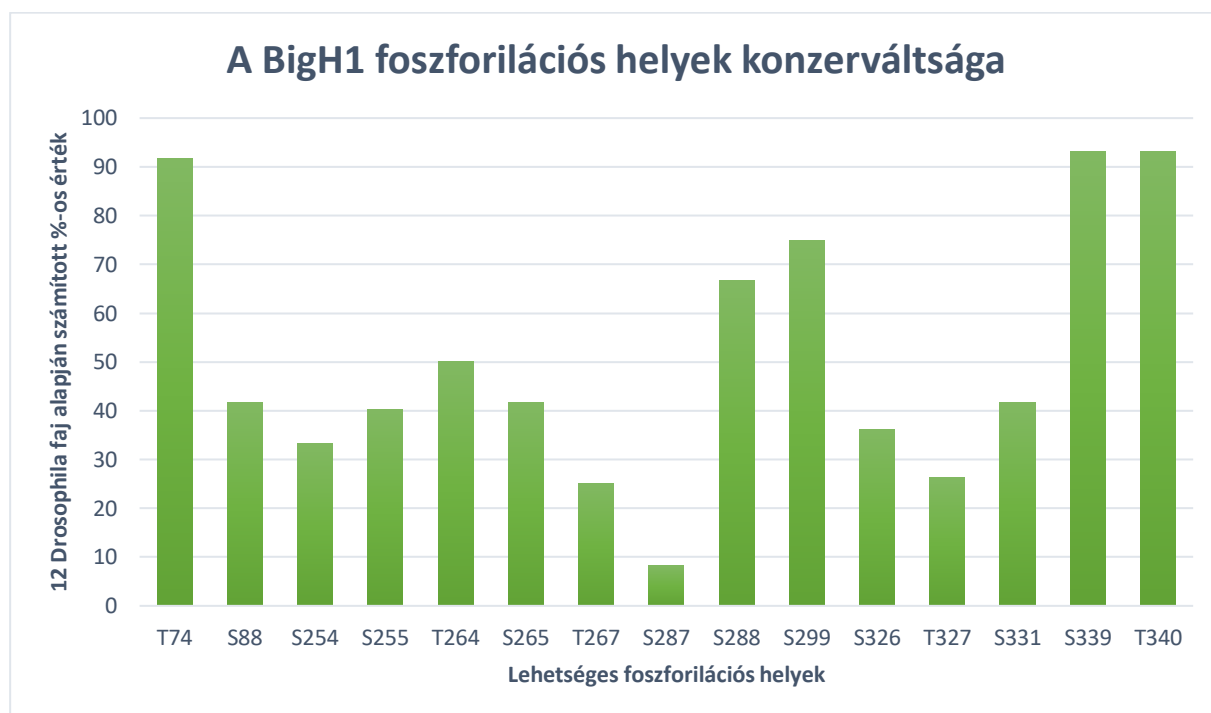
Három létrehozott módosítási helyet az génen saját, még nem közölt adatok alapján választottunk ki. Prof. Boros Imre kutatócsoportjában egy proteomikai kísérlettel korábban már kimutatták, hogy 15 olyan aminosav van jelen a fehérjén, amely képes lehet foszforilálódni. Mivel a tömegspektrometriás mérések csak hozzávetőlegesen adnak információt a foszforilációs helyek helyzetéről a fehérjén, így nagyon közeli aminosavak esetén nem lehetett eldönteni, hogy melyik képes ténylegesen foszforilálódni (8. ábra). Az kimutatott aminosavak közül így valójában körülbelül 10 lehet érintett a foszforilációban. Ez az eredmény vezetett az *NPS* genotípus létrehozásához is, ahol az érintettnek vélt foszforilációra képes aminosavak mindegyikét lecserélték alaninra (2. függelék).



8. ábra: A proteomikai kísérletek eredménye. A fekete vízszintes vonalak olyan azonosított peptideket jelölnek, ahol az aminosavak valamelyikén foszforilációt detektáltak.

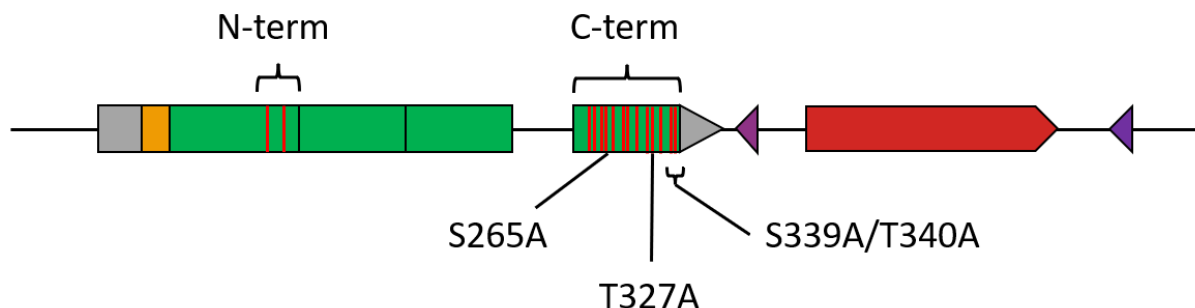
Ahhoz, hogy a vizsgálatainkhoz nagyobb eséllyel válasszunk ki jelentős foszforilációs helyeket, először statisztikát készítettem a foszforilációra alkalmas aminosavak konzerváltságát illetően. 12 *Drosophila* faj (*Drosophila melanogaster*, *Drosophila simulans*, *Drosophila sechellia*, *Drosophila yakuba*, *Drosophila erecta*, *Drosophila suzukii*, *Drosophila willistoni*, *Drosophila mojavensis*, *Drosophila grimshawi*, *Drosophila ananassae*, *Drosophila persimilis*

és *Drosophila pseudoobscura pseudoobscura*) a BigH1 fehérjével homológiát mutató fehérjeszekvenciáját illesztettem össze Jalview szoftverrel az összes algoritmus (Tcoffee; Probcons; Muscle; Mafft; MSAProbs; LGprobs) eredményét figyelembe véve, és diagramot készítettem az egyezésekből (9. ábra). Az ábrából arra következtethetünk, hogy a magasabb egyezést mutató aminosavak nagyobb valószínűséggel rendelkeznek kardinális szereppel, hiszen evolúciósan konzerváltabbak mert a rokonfajok nagyrésznél is jelen vannak.



9. ábra: A lehetséges foszforilációs helyek konzerváltságának szemléltetése. Az S szerint, a T treonint jelöl, a számok pedig az aminosavak helyzetét mutatják a fehérjében.

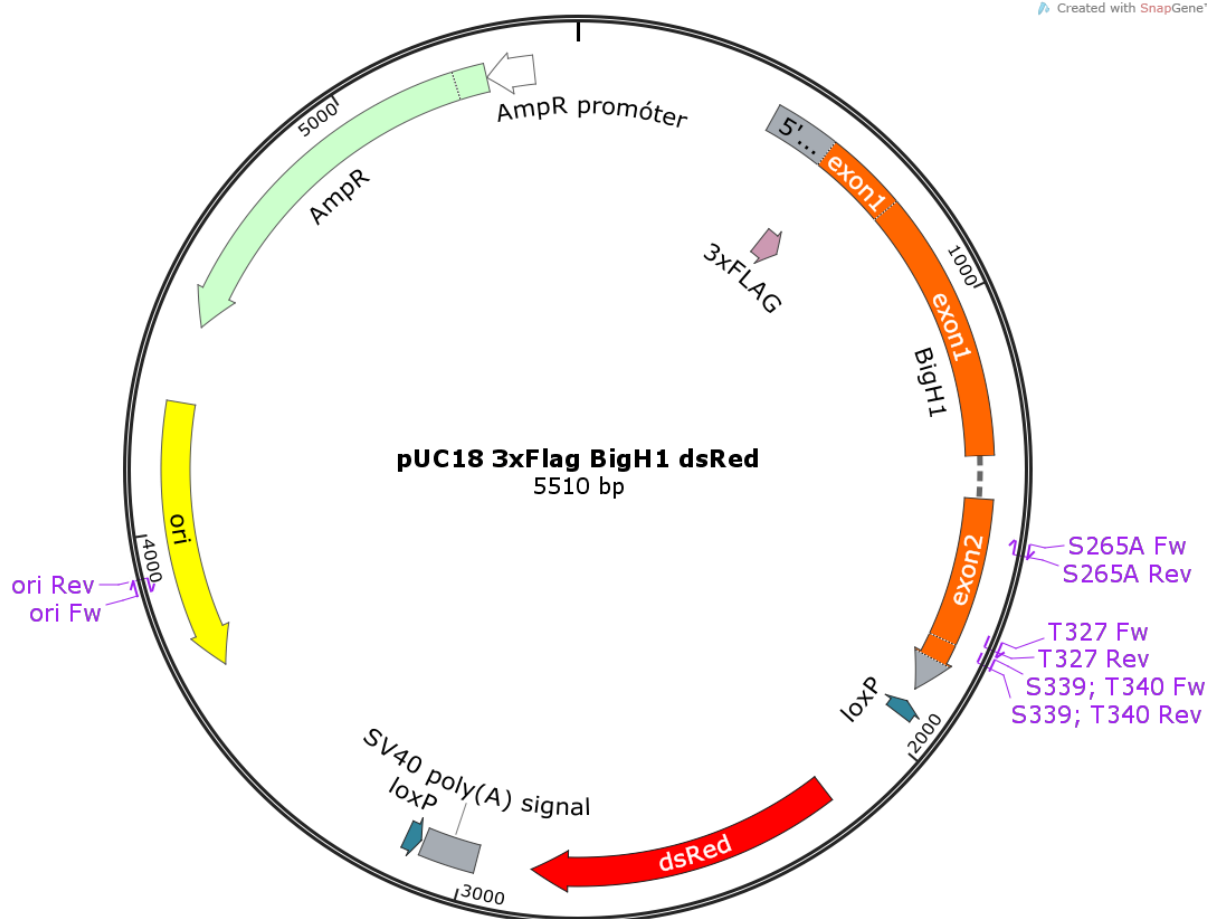
Ezen felül figyelembe vettük még a kutatócsoport korábbi eredményeit is a témában, mi szerint az S287/S288-as, S299-es és az S331-es aminosavak kicserélése nem okozott jelentősen eltérő fenotípust, tehát ezek további vizsgálatát elvetettük (Szabó, 2020). Választásunk így az S265-ös, a T327-es és egy dupla aminosav cserére, az S339/T340-es aminosavak kicserélésére esett. Ezen felül még egy-egy olyan szekvenciaváltozatot is létrehoztunk a már meglévő *NPS* génből, melyek csak az N- illetve csak a C-terminális doménen hordoznak elrontott foszforilációs helyeket, így összesen ötféle változatot fogunk tudni megvizsgálni a további kísérletek során (10. ábra).



10. ábra: A tervezett szekvenciamódosítások bemutatása az *NPS* génen keresztül. Az N-term és a C-term módosítások csak az N- illetve C-terminális domén-en jelentenek elrontott foszforilációs helyeket a vad típushoz képest, az S265A és a T327A egy-egy aminosav cseréjét jelentik, az S339A/T340A pedig egy dupla aminosav cserét jelöl.

4.6. Egyedi foszforilációs helyek elrontása PCR-ral

A korábban említett háromféle mutációt mutagén PCR segítségével hoztuk létre. Templátként olyan plazmidot használtunk, ami a vad típusú *BigH1* szekvenciát tartalmazza (pUC18 3xFlag BigH1 dsRed). A PCR összeállításához mutagén primereket terveztünk, melyek néhány bázispár megváltoztatásával aminosav cserét okoztak ezzel missense mutációt létrehozva (11. ábra). A pontmutációk mindegyike lehetséges foszforilációs helyek elrontását eredményezte úgy, hogy a szerin vagy treonin aminosavak alaninra cserélődtek. Egy további fontos szempont volt még a primerek tervezésénél, hogy később könnyen tudjunk szelektálni az általunk tervezett szekvenciákra. Ennek érdekében a primereket úgy terveztük meg, hogy a megváltoztatott szekvencia restrikciós endonukleáz emésztéssel azonosítható legyen. Az S265 aminosav cseréjét *XhoI*, a T327 cseréjét *Kpn2I* egyedi restrikciós hasítóhelyek létrejötte jelzi, az S339/T340 aminosavak cseréjét pedig a *Sall* egyedi restrikciós hasítóhely indikálja (1. függelék).

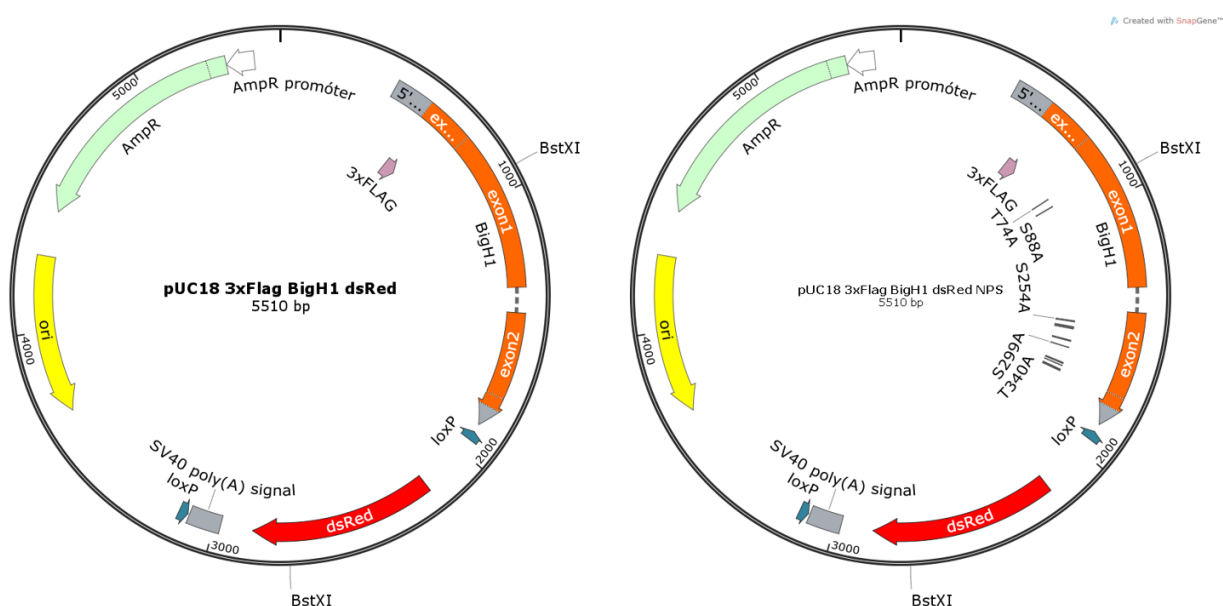


11. ábra: A mutagén PCR-hoz használt primerek helyzete a vad típusú *BigH1* szekvenciát hordozó plazmidon.

A PCR termékeket DpnI-el emésztettük, hogy a PCR-hoz használt eredeti metilált DNS templát ne zavarjon be a további reakciók során, majd kitisztítottuk a mintákat. Az így kapott DNS fragmenteket Szekvencia és Ligálás Független Klónozás (SLIC) reakció alkalmazásával tudtuk összeilleszteni újra plazmiddá. Az elkészült plazmidokat kompetens sejtekbe transzformáltuk. A SLIC lényege, hogy lehetővé teszi a PCR technikával felamplifikált DNS szálak egyszerű összekapcsolását, melyek kb. 25 bázispár átfedésben vannak egymással. A módszer a T4 polimeráz exonukleáz aktivitásán alapszik, mely visszaemésztí az átfedő végeket $3' \rightarrow 5'$ irányba, így hibridizálni tudnak a fragmentumok és cirkuláris DNS jön létre nick-ekkel, melyeket a kompetens baktériumsejt hibajavító mechanizmusai javítanak ki.

4.7. Foszforilációs mutáns *BigH1* szekvenciák előállítása pUC18- vad típusú és NPS plazmidok klónozásával

További két foszforilációs mutánst állítottunk elő pUC18 3xFlag *BigH1* dsRed vad típusú és pUC18 3xFlag *BigH1* dsRed NPS plazmidok hagyományos klónozásával. A BstXI restrikciós endonukleáz alkalmazásával a plazmidokat megemésztettük (12. ábra), majd agaróz gélen megfuttattuk és visszaizoláltuk a fragmentumokat. A kisebb fragmentum a *BigH1* globuláris doménjét, C-terminális végét és a *dsRed* gén egy darabját hordozza, a nagyobb pedig a *BigH1* N-terminális végét, illetve a plazmid többi részét.



12. ábra: A vad típusú pUC18 3xFlag *BigH1* dsRed és a pUC18 3xFlag *BigH1* dsRed NPS plazmidok térképe feltüntetett BstXI hasítóhelyekkel és foszforilációs helyekkel a *BigH1*-en.

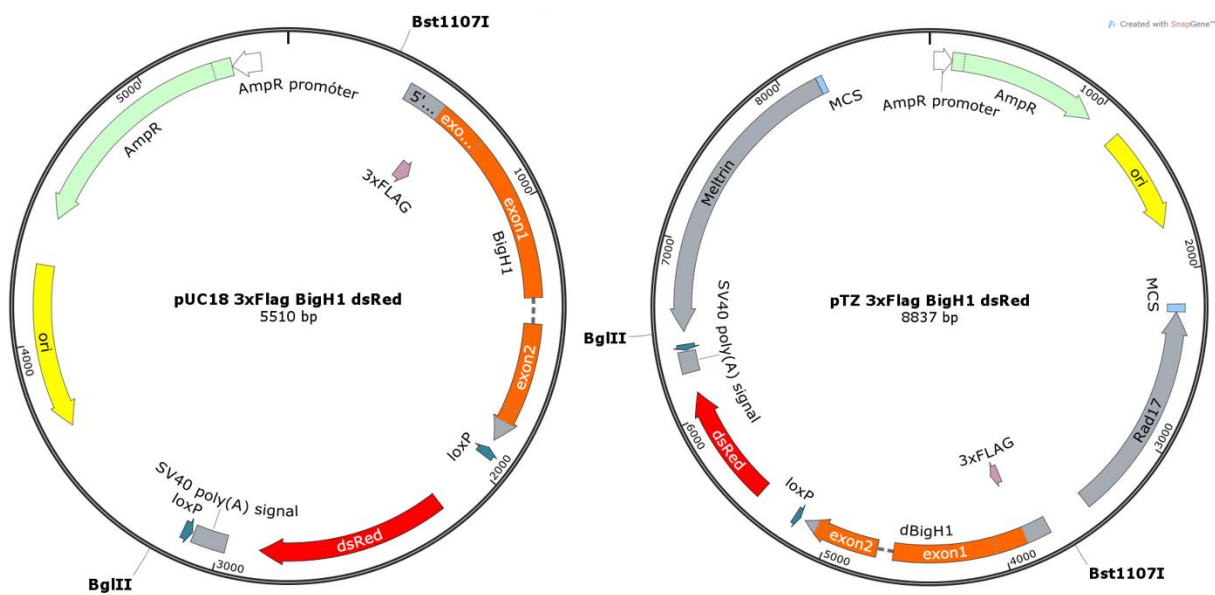
A klónozás alapja itt az volt, hogy az enzim a C-terminális foszforilációs helyeket elválasztja az N-terminális végen található foszforilációs helyektől, mert a génen belül úgy helyezkedik el a BstXI felismerő szekvenciája. Így a vad típusú és az NPS mutáns szekvenciák kombinálásával lehetővé válik két olyan változat előállítása, melyeknél az egyik csak az N-terminális doménjén hordozza majd az elrontott foszforilációs helyeket, a másik pedig csak a C-terminális doménjén. Ezek alapján mértük össze a foszforilációs mutáns és a vad típusú *BigH1* szekvenciákat tartalmazó ligálási reakcióelegyeket majd kompetens sejtekbe transzformáltuk a rekombináns plazmidokat. Az általunk tervezett kombináció létrejöttére PstI restrikciós endonukleáz emésztéssel tudunk szelektálni, mivel az enzim a *BigH1* N-terminális

doménjén található egyedi felismerési helye egy általunk elrontott foszforilációs hellyel esik egybe.

4.8. Klónozás pTZ vektorba

A rekombináns pUC18 vektorokat hordozó felnőtt telepeken kolónia PCR-t alkalmaztunk és a megfelelő restrikciós endonukleázokkal (XhoI, Kpn2I, SalI és PstI) megemésztettük a PCR termékeket, ami lehetőséget adott a mutációt hordozó baktériumtelepek kiválasztására a további folyamatokhoz (3. függelék). A megfelelőnek bizonyult telepeket folyékony tápoldatban felszaporítottuk és kitisztítottuk belőlük a plazmidokat. Az így kapott DNS szakaszokat elküldtük szekvenálni, hogy megbizonyosodjunk a szekvencia pontosságáról (4. függelék).

A megfelelő szekvenciákat ezek után egy nagyobb plazmidba, a pTZ vektorba kellett klónozni, ami már tartalmazza az injektáláshoz szükséges homológ karokat, amik kijelölik a gén környezetét a *Drosophila* genomban. Ezt úgy tudtuk megtenni, hogy mindkét vektort megemésztettük Bst1107I és BglII restrikciós endonukleázokkal, melyek egyedi hasítóhelyei a klónozni kívánt szakaszt határolják (13. ábra). Az emésztés termékeit agaróz gélen futtattuk meg és visszaizoláltuk a megfelelő fragmentumokat. A fragmentumokat összeligáltuk és az így elkészült pTZ vektort betranszformáltuk kompetens sejtekbe. A klónozás sikerességét kolónia PCR-al és a korábban tervezett egyedi hasítóhelyek segítségével, restrikciós endonukleáz emésztéssel (XhoI, Kpn2I, SalI és PstI) bizonyítottuk. A kívánt mutációkat tartalmazó baktériumtelepeket felszaporítottuk és nagy mennyiségű, tiszta plazmid DNS-t nyertünk ki belőlük, amit injektáló pufferben oldottunk vissza. A plazmidok szekvenciáját Sanger szekvenálással ellenőriztük. A nagy tisztaságú, injektáló pufferben felvett plazmidokat az SZBK *Drosophila* Injektáló szolgálatának adtuk át, hogy ezek segítségével új típusú *BigH1* foszforilációs mutáns *Drosophila* vonalakat állítsanak elő.



13. **ábra:** A pUC18 3xFlag BigH1 dsRed és a pTZ 3xFlag BigH1 dsRed vektorok térképe feltüntetve a Bst1107I és BglII restrikciós endonukleázok hasítóhelyeit.

5. Összefoglalás

A BigH1 alternatív linker hiszton foszforilációs konzerváltsága már bizonyított, azonban a pontos szerepe még nem ismert. Munkánk célja ezen poszttranszlációs módosítás jelentőségének tanulmányozása volt. Kísérleteinket egy foszforilációra képtelen mutáns fehérjét (NPS) hordozó törzsön végeztük el.

Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a foszforilációra képtelen fehérje jelenléte hím sterilitást okoz homozigóta állatoknál, továbbá lecsökkenti az embriók életképességét. Már a 25°C-on is alacsonyabb a kikelő *NPS* embriók aránya a *3F* és a *HHH* kontrolloknál, alacsonyabb hőmérsékleten, 15°C-on azonban jóval szignifikánsabb különbség detektálható. Mikroszkópos vizsgálatokkal kimutattuk, hogy a foszforilációs mutáns fehérje expressziós mintázata tovább fennmarad az embrionális fejlődés során. Ezzel egyidejűleg megállapítottuk, hogy a késői mutáns embriókban sokkal több apoptotikus sejt figyelhető meg, mint a vad típusban. Azt is kimutattuk, hogy az *NPS* mutáns korai embriókban megfigyelhető lesüllyedő sejtmagok aránya nem szignifikánsan magasabb a *HHH* mutánsénál, azonban mivel az *NPS* mutáns embriók kikelési rátája jóval alacsonyabb, arra következtethetünk, hogy ez a mutáció késői embrionális fejlődésben is okozhat defektusokat. Eredményeink arra utalnak, hogy a BigH1 foszforilációjának nagy jelentősége van az embrionális magosztódások során, valamint szerepet játszik a fehérje kromatinról történő távozásában cellularizációt követően.

Annak érdekében, hogy kiderítsük, hogy a helyes BigH1 funkcióhoz mely aminosavak foszforilációja szükséges, ötféle foszforilációs mutáns *BigH1* gént hordozó plazmidot állítottunk elő *in vitro*, melyek segítségével CRISPR/Cas9 génszerkesztéssel új típusú mutáns állatokat tudunk létrehozni.

Reményeink szerint vizsgálataink túlmutatnak a *Drosophila* BigH1 fehérje foszforilációjának vizsgálatán és eredményeink hosszútávon hozzájárulhatnak majd a kromatin komplex szerkezetének és működésének megértéséhez.

6. Köszönetnyilvánítás

Elsősorban szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Henn Lászlónak, hogy mindig türelmes volt hozzám és sokat tanulhattam tőle, mert soha nem sajnálta idejét és energiáját a közös munkánkra. Ezen kívül köszönöm a sok jó tanácsát és segítségét a TDK dolgozatom megírásában. Szeretném megköszönni Dr. Boros Imre Tanár Úrnak, hogy támogatta a témaválasztásomat és elvállalta a belső konzulensem szerepét.

Szeretném megköszönni Dr. Timinszky Gyula csoportvezetőnknek, hogy lehetőségem volt a laborjában elvégezni a dolgozatomhoz szükséges kísérleteket. Ezen kívül köszönöm a csoport többi munkatársának is, hogy mindig azonnali segítséget nyújtottak bármilyen felmerülő kérdésem esetén.

7. Irodalomjegyzék

- Allan, J., Mitchell, T., Harborne, N., Bohm, L., & Crane-Robinson, C. (1986). Roles of H1 Domains in Determining Higher Order Chromatin Structure and H1 Location. *Journal of Molecular Biology*, 187(4), 591–601. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(86\)90337-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(86)90337-2)
- Bannister, A. J., & Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research*, 21(3), 381–395. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.22>
- Bian, Q., & Belmont, A. S. (2012). Revisiting higher-order and large-scale chromatin organization. *Current Opinion in Cell Biology*, 24(3), 359–366. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2012.03.003>
- Brandt, W. F., Schwager, S. U. L., Rodrigues, J. A., & Busslinger, M. (1997). Isolation and amino acid sequence analysis reveal an ancient evolutionary origin of the cleavage stage (CS) histones of the sea urchin. *European Journal of Biochemistry*, 247(3), 784–791. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.00784.x>
- Carbonell, A., Henn, L., Pérez-Roldán, J., Tamirisa, S., Szabó, A., Boros, I. M., & Azorín, F. (2020). In response to Li et al.: Linker histones function in Drosophila embryogenesis. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2020.03.21.001529>
- Carbonell, A., Pérez-Montero, S., Climent-Cantó, P., Reina, O., & Azorín, F. (2017). The Germline Linker Histone dBigH1 and the Translational Regulator Bam Form a Repressor Loop Essential for Male Germ Stem Cell Differentiation. *Cell Reports*, 21(11), 3178–3189. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.11.060>
- Cho, H., & Wolffe, P. A. (1994). Xenopus laevis B4, and intron-containing oocyte-specific linker histone-encoding gene. *Gene*, 143(2), 233–238. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(94\)90102-3](https://doi.org/10.1016/0378-1119(94)90102-3)
- Climent-Cantó, P., Carbonell, A., Tamirisa, S., Henn, L., Pérez-Montero, S., Boros, I. M., & Azorín, F. (2021). The tumour suppressor brain tumour (Brat) regulates linker histone dBigH1 expression in the Drosophila female germline and the early embryo. *Open Biology*, 11(5), 200408. <https://doi.org/10.1098/rsob.200408>
- Fan, Y., Nikitina, T., Zhao, J., Fleury, T. J., Bhattacharyya, R., Bouhassira, E. E., Stein, A., Woodcock, C. L., & Skoultschi, A. I. (2005). Histone H1 Depletion in Mammals Alters Global Chromatin Structure but Causes Specific Changes in Gene Regulation. *Cell*, 123(7), 1199–1212. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.10.028>
- Farrell, J. A., & Farrell, P. H. O. (2014). *From Egg to Gastrula : How the Cell Cycle is*

- Remodeled During the Drosophila Mid-Blastula Transition. August*, 269–294.
<https://doi.org/10.1146/annurev-genet-111212-133531>
- Foe, V. E., & Alberts, B. M. (1983). Studies of nuclear and cytoplasmic behaviour during the five mitotic cycles that precede gastrulation in *Drosophila* embryogenesis. *Journal of Cell Science*, 61(1), 31–70. <https://doi.org/10.1242/jcs.61.1.31>
- Funaya, S., Ooga, M., Suzuki, M. G., & Aoki, F. (2018). Linker histone H1FOO regulates the chromatin structure in mouse zygotes. *FEBS Letters*, 592(14), 2414–2424. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13175>
- Fyodorov, D. V., Zhou, B. R., Skoultchi, A. I., & Bai, Y. (2018). Emerging roles of linker histones in regulating chromatin structure and function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(3), 192–206. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.94>
- Happel, N., & Doenecke, D. (2009). Histone H1 and its isoforms: Contribution to chromatin structure and function. *Gene*, 431(1–2), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2008.11.003>
- Henn, L., Szabó, A., Imre, L., Román, Á., Ábrahám, A., Vedelek, B., Nánási, P., & Boros, I. M. (2020). Alternative linker histone permits fast paced nuclear divisions in early *Drosophila* embryo. *Nucleic Acids Research*, 48(16), 9007–9018. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa624>
- Izzo, A., Kamieniarz, K., & Schneider, R. (2008). The histone H1 family: specific members, specific functions? *Biological Chemistry*, 389(4), 333–343. <https://doi.org/10.1515/BC.2008.037>
- Li, K. K., Han, D., Chen, F., Li, R., Zhou, B. R., Bai, Y., Yuan, K., & Rong, Y. S. (2019). Compensatory replacement of the BigH1 variant histone by canonical H1 supports normal embryonic development in *Drosophila*. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/789735>
- Lu, M. J., Dadd, C. A., Mizzen, C. A., Perry, C. A., McLachlan, D. R., Annunziato, A. T., & Allis, C. D. (1994). Generation and characterization of novel antibodies highly selective for phosphorylated linked histone H1 in *Tetrahymena* and HeLa cells. *Chromosoma*, 103(2), 111–121. <https://doi.org/10.1007/BF00352320>
- Lu, M. J., Mpoke, S. S., Dadd, C. A., & Allis, C. D. (1995). Phosphorylated and dephosphorylated linker histone H1 reside in distinct chromatin domains in *Tetrahymena* macronuclei. *Molecular Biology of the Cell*, 6(8), 1077–1087. <https://doi.org/10.1091/mbc.6.8.1077>
- Luger, K., Mäder, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F., & Richmond, T. J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 389(6648), 251–260. <https://doi.org/10.1038/38444>

- Marzluff, W. F., Wagner, E. J., & Duronio, R. J. (2008). Metabolism and regulation of canonical histone mRNAs: life without a poly(A) tail. *Nature Reviews Genetics*, 9, 843–854. <https://doi.org/10.1038/nrg2438>
- Millán-ariño, L., Izquierdo-bouldstridge, A., & Jordan, A. (2016). Specificities and genomic distribution of somatic mammalian histone H1 subtypes. *BBA - Gene Regulatory Mechanisms*, 1859(3), 510–519. <https://doi.org/10.1016/j.bbagrmm.2015.10.013>
- Millar, C. B. (2013). Organizing the genome with H2A histone variants. *Biochemical Journal*, 449(3), 567–579. <https://doi.org/10.1042/BJ20121646>
- Mizusawa, Y., Kuji, N., Tanaka, Y., Tanaka, M., Ikeda, E., Komatsu, S., Kato, S., & Yoshimura, Y. (2010). Expression of human oocyte-specific linker histone protein and its incorporation into sperm chromatin during fertilization. *Fertility and Sterility*, 93(4), 1134–1141. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.11.028>
- Patterson, H. G., Church, C., Landsman, D., Peterson, C. L., & Simpson, R. T. (1998). The Biochemical and Phenotypic Characterization of Hho1p, the Putative Linker Histone H1 of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 273(13), 7268–7276. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.13.7268>
- Pérez-Montero, S., Carbonell, A., Morán, T., Vaquero, A., & Azorín, F. (2013). The embryonic linker histone H1 variant of *Drosophila*, dBigH1, regulates zygotic genome activation. *Developmental Cell*, 26(6), 578–590. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.08.011>
- Rice, J. C., & Allis, C. D. (2001). Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation. *Current Opinion in Cell Biology*, 13(3), 263–273. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(00\)00208-8](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(00)00208-8)
- Rossetto, D., Avvakumov, N., & Côté, J. (2012). Histone phosphorylation A chromatin modification involved in diverse nuclear events. *Epigenetics*, 7(10), 1098–1108. <https://doi.org/10.4161/epi.21975>
- Sirotkin, A. M., Edelmann, W., Cheng, G., Klein-szantot, A., Kucherlapatit, R., & Skoultchi, A. I. (1995). *Mice develop normally without the Hi0 linker histone*. 92(July), 6434–6438.
- Sullivan, W., Daily, D. R., Fogarty, P., Yook, K. J., & Pimpinelli, S. (1993). Delays in anaphase initiation occur in individual nuclei of the syncytial *Drosophila* embryo. *Molecular Biology of the Cell*, 4(9), 885–896. <https://doi.org/10.1091/mbc.4.9.885>
- Szabó, A. (2020). *A BigH1 alternatív linker hiszton szerepe a Drosophila korai fejlődésben*. <https://doi.org/10.14232/phd.10786>
- Th'ng, J. P. H., Sung, R., Ye, M., & Hendzel, M. J. (2005). H1 Family Histones in the Nucleus. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(30), 27809–27814.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M501627200>

- Villar-Garea, A., & Imhof, A. (2008). Fine mapping of posttranslational modifications of the linker histone H1 from *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE*, 3(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001553>
- Vyas, P., & Brown, D. T. (2012). N- and C-terminal domains determine differential nucleosomal binding geometry and affinity of linker histone isoforms H1.0 and H1c. *Journal of Biological Chemistry*, 287(15), 11778–11787. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.312819>
- Wibrand, K., & Olsen, L. C. (2002). Linker histone H1M transcripts mark the developing germ line in zebrafish. *Mechanisms of Development*, 117(1–2), 249–252. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(02\)00173-9](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(02)00173-9)
- Woodcock, C. L., & Ghosh, R. P. (2010). Chromatin Higher-order Structure and Dynamics. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(5), a000596. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000596>
- Xu, N., Lu, X., Kavi, H., Emelyanov, A. V., Bernardo, T. J., Vershilova, E., Skoultschi, A. I., & Fyodorov, D. V. (2016). BEN domain protein Elba2 can functionally substitute for linker histone H1 in *Drosophila* in vivo. *Scientific Reports*, 6, 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep34354>
- Zhou, B. R., Feng, H., Kato, H., Dai, L., Yang, Y., Zhou, Y., & Bai, Y. (2013). Structural insights into the histone H1-nucleosome complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(48), 19390–19395. <https://doi.org/10.1073/pnas.1314905110>

Internet:

http1: <https://flybase.org/reports/FBgn0038252> Utolsó hozzáférés dátuma: 2022. 04. 09.

8. Függelékek

Primer neve	Olvadáspont	Primer hossza (bp)	Primer szekvenciája	A primer által létrehozott/elrontott egyedi restrikciós hasítóhely
S265A Fw	68°C	26	CCATGCTCGAGACAG CCCAGACAGCG	+XhoI
S265A Rev	70°C	29	CTGTCTGGGCTGTCTC GAGCATGGCCTGC	
T327A Fw	65°C	29	CCTCCGCTCCGGATC TTTCCATAATGGAG	+Kpn2I
T327A Rev	67°C	24	GGAAAGATCCGGAGC GGAGGCTCC	
S339A/ T340A Fw	68°C	22	GCCACGGCGGCTCCT CAAGGAG	-SalI
S339A/ T340A Rev	68°C	22	CTTGAGGAGCCGCCG TGGCCTG	
ori Fw	65°C	29	GCTCACGCTGTAGGT ATCTCAGTTCGGTG	-
ori Rev	65°C	29	CACCGAACTGAGATA CCTACAGCGTGAGC	

1. függelék: A mutagén PCR-hoz felhasznált primerek.

Aminosav száma a <i>BigH1</i> génben	Vad típus	Mutáns
74	Thr	Ala
88	Ser	Ala
254	Ser	Ala
255	Ser	Ala
264	Thr	Ala
265	Ser	Ala
267	Thr	Ala
287	Ser	Ala
288	Ser	Ala
299	Ser	Ala
326	Ser	Ala
327	Thr	Ala
331	Ser	Ala
339	Ser	Ala
340	Thr	Ala

2. függelék: A *BigH1*-ben létrehozott pontmutációk.

Primer neve	Olvadáspont	Primer hossza (bp)	Primer szekvenciája
dBigH1 int Fw	57°C	20	CCCAAACCAAAGGGTACGC
dsRed seq1	60°C	18	GACGTCCTCGGAGGAGGC

3. függelék: Restrikciós endonukleázzal való emésztés előtti PCR-hoz használt primerek.

Primer neve	Olvadáspont	Primer hossza (bp)	Primer szekvenciája
dBigH1 int Rev	57°C	20	TCTCCACAGCCTTTGAGGAG
dsRed seq1	60°C	18	GACGTCCTCGGAGGAGGC

4. függelék: Szekvenáláshoz használt primerek.

**A 36. OTDK
BIOLÓGIA SEKCIÓ FELHÍVÁSÁNAK
2. SZÁMÚ MELLÉKLETE**

9. Tételes Szerzői Hozzájárulás

Alulírott **Pék Ramóna** nyilatkozom, hogy a Biológia TDK 2022, tavaszi fordulójára benyújtott: **Az alternatív linker hiszton foszforilációjának szerepe *Drosophilában*** című dolgozatomban leírtak esetében az alábbi munkafolyamatok elvégzésében vettem részt:

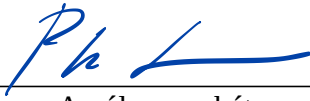
Rész/feladat*	Felkészítés után önállóan végeztem a dolgozathoz szükséges mennyiségben (%-ban megadva)	Folyamatos segítséggel végeztem a dolgozathoz szükséges mennyiségben (%-ban megadva)
<i>Az embriók életképességének vizsgálatához szükséges teendők elvégzése¹</i>	70	30
<i>Embriók előkészítése immunfestéshez</i>	100	0
<i>Immunfestések lebonyolítása</i>	100	0
<i>Mikroszkópos képek kiértékelése és szerkesztése</i>	60	40
<i>NPS fertilitási teszt lebonyolítása</i>	100	0
<i>Primerek tervezése²</i>	50	50
<i>DNS munkák elvégzése: PCR reakciók, enzimatis reakciók (SLIC, ligálás, DNS emésztése), transzformálás, klónozás, agaróz gélelektroforézis, DNS tisztítása és visszaizolálása agaróz gélből</i>	100	0
<i>Az adatok statisztikai feldolgozása</i>	50	50

Magyarázat:

¹A petéztető táptalajt és a kísérletet a hallgató maga végezte el, az kikelő embriók számolásában a témavezetője segített neki.

²A felhasznált primerek közül a mutagén primereket a hallgató tervezte, a többi készen kapta.

Kelt: Szeged, 2022. 04. 11.



A pályamunkát
benyújtó hallgató
(*Pék Ramóna*)
aláírása

A nyilatkozatban foglaltak helyességét megerősítem:



Témavezető (Dr.
Henn László Dániel,
SZBK Genetikai
Intézet) aláírása