

DOKTORI (PHD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Hisztonok és hisztonmódosító fehérjék biofizikai megközelítése

Hetey Szabolcs

Témavezető: Dr. Székvölgyi Lóránt



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIAI DOKTORI ISKOLA

DEBRECEN, 2019

Hisztonok és hisztonmódosító fehérjék biofizikai megközelítése

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében az elméleti
orvostudományok tudományágban

Írta:

Hetey Szabolcs

okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem **Molekuláris Sejt- és Immunbiológia**
doktori iskolája keretében

Témavezető: Dr. Székvölgyi Lóránt, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Fésüs László, akadémikus
tagok: Prof. Dr. Erdődi Ferenc, az MTA doktora
Dr. Arányi Tamás, PhD

A doktori szigorlat helyszíne és időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Biokémiai és
Molekuláris Biológiai Intézet, 2016. november 24., 11 óra

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Bíró Sándor, az MTA doktora
Dr. Orbán Tamás, PhD

A bírálóbizottság tagjai:

elnök: Prof. Dr. Fésüs László, akadémikus
tagok: Dr. Bácsi Attila, az MTA doktora
Dr. Arányi Tamás, PhD

Az értekezés védésének helyszíne és időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati
Intézet „A” épület tanterme, 2019. március 19., 13 óra

1. BEVEZETÉS

1.1 Az eukarióta kromatin a nukleosómák és hisztonok szintjén

1974-ben Kornberg, Olins és D. Olins tanulmányai megállapították, hogy a kromatin ismétlődő hiszton-oligomer egységekből épül fel, amelyek rugalmas láncként alkotják a kromatinszálakat. Kimutatták, hogy ezek az egységek a nukleosómák, amelyek két-két kópia H2A, H2B, H3 és H4 hiszton fehérjéből és ezen oktamer köré, 1,65 fordulattal tekeredő 145-147 bp hosszúságú szuperhelikális DNS szálból épülnek fel. Az oktamerben a hisztonok egy (H3-H4)₂ tetramert képeznek, amelyet a H2A-H2B dimer szegélyez. Az ismétlődő nukleosómák egy 10-90 bp hosszúságú linker DNS-sel kötődnek össze és a kromatin magasabb rendű struktúrájába épülnek, melyet a H1 linker hiszton stabilizál.

A nukleosóma mag részét és a vele kölcsönható DNS-t 1997-ben röntgen-krisztallográfiás módszerrel karakterizálták. A tanulmány részletesen ismertette a DNS kettős hélix kis árok és a hiszton fold domén közötti kölcsönhatásokat, többek között elektrosztatikus kölcsönhatásokat, hidrogénkötéseket és nem poláris kölcsönhatásokat. A nukleosóma tipikus jellemzői a flexibilis hisztonvégek, melyek áthaladnak a szuperhélix felett és között. A nukleosóma ezen N-terminusai szabályozó szerepet töltenek be a hiszton poszt-transzlációs módosítások révén, és mechanisztikus szerepet játszanak a DNS-dinamika és a nukleosóma-konformáció szabályozásában.

Proteomikai és genomikai tulajdonságaik alapján a hisztonfehérjék két csoportba sorolhatók: kanonikus hisztonok és hiszton variánsok. A kanonikus hisztonfehérjék közé tartoznak a fő magi hisztonok: H2A, H2B, H3 (H3.1 és H3.2 humán) és H4. Az állati sejtekben a hisztonokat kódoló gének ismétlődő tömbökben csoportosulnak, és transzkripciójuk szorosan kapcsolódik a DNS-replikációhoz. Ezzel ellentétben a nem kanonikus hiszton variánsokat egyetlen, vagy alacsony kópiaszámú gének kódolják, melyek replikáció-független módon expresszálódnak a sejtciklus során. A hiszton variánsok számos folyamatban szerepet játszanak, beleértve a DNS-

javítást, a meiotikus rekombinációt, a kromoszómaszegregációt, a transzkripció iniciációt és terminációt, vagy a nemi kromoszómakondenzációt.

1.2 Hiszton poszt-transzlációs módosítások és hiszton lizin metilációk

A hisztonok poszt-transzlációs módosításai jelentősen befolyásolják a kromatinműködést, szabályozási platformot biztosítva számos fontos DNS-dependens folyamat regulációjához és finomhangolásához, beleértve a transzkripció, a DNS javító mechanizmusok, a DNS replikáció és a meiotikus folyamatok szabályozását. A hisztonokon legalább nyolc különféle módosítás található (acetiláció, lizin metiláció, arginin metiláció, foszforiláció, ubikvitiniláció, szumoiláció, ADP riboziláció, deimináció és prolinizomerizáció). A hisztonmódosítások biológiai kimenetele egyrészt lehet a nukleoszómális szerkezet közvetlen fizikai modulációja, vagy platformok biztosítása downstream "olvasó" vagy "effektor" fehérjék részére. A módosítások dinamikusak, specifikus enzimek képesek eltávolítani őket. A hisztonokat módosító enzimek preferenciáit azok az enzimkomplexek határozzák meg, amelyekben funkciójukat ellátják. Az enzimkomplexben működő fehérjék hatással lehetnek az enzimkomplex szubsztrát preferenciájára (nukleoszómális vagy szabad hisztonok), a módosítandó aminosavra és a metilációs állapot mértékére (mono-, di- vagy tri-metiláltak).

A lizin és arginin oldalláncok metilcsoportokkal történő módosítása számos biológiai folyamatban fontos szerepet játszik. Emlősök esetében a H3 hiszton K4, K9, K27, K36 és a H4 hiszton K79 oldalláncai nevezetes metilációs pozíciók. A módosítások közül a H3K4 és a H3K27 trimetiláció a két leginkább vizsgált lizinmódosítás. A H3K4me3 a gének 5'-végén helyezkedik el, és egy rendkívül konzervatív, az élesztőtől az emberig az aktív génátírásra utaló epigenetikai jel. A transzkripció start helyek körüli előfordulásai nagymértékben korrelálnak a transzkripció aktivációjával. A H3K4me3 trimetiláció a transzkripciót nukleoszóma-átalakító fehérjék és hisztonmódosító enzimek toborzásával segíti elő. Ezenkívül,

a H3K4me3 élesztőkben részt vesz a meiotikus rekombináció inicializálásában, valamint limfocitákban a V(D)J rekombináció promotálásában a RAG2 fehérje PHD doménjének kötésén keresztül. A H3K4me3 trimetilációval ellentétben a H3K27me3 gyakran szerepet játszik a géncsendesítésben, különösen a nem kívánt differenciálódási útvonalak elnyomásában a sejtvonal-specifikáció során. A H3K27me3 módosítás révén bekövetkező represszált génexpresszió a Polycomb represszív komplex 2 (PRC2) lizin-metiltranszferáz aktivitásának köszönhető, amely preferenciálisan CpG gazdag promoter régiókban helyezi el a modifikációt. A H3K27me3 trimetilációhoz köthető csendesítési folyamatok közé tartozik a homeotikus gének gátlása, a genomikus imprinting és az X kromoszóma inaktiváció.

1.3 A trithorax és polycomb fehérjék

Az ecetmuslicában (*Drosophila melanogaster*) a Trithorax-csoport (TrxG) és a Polycomb-csoport (PcG) fehérjéi az anteroposterior tengely sejt- és szelvényidentitását meghatározó homeotikus gének aktivátorai és represszorai. A TrxG és PcG fehérjék bár ellentétes szerepet játszanak a homeotikus génszabályozásban, közös vonásuk, hogy jelentős részük rendelkezik egy SET-domén nevű, 130-140 aminosavból felépülő motívummal. Többségük evolúciós szempontból konzerválódott az emlősökben, és az ecetmuslicához hasonló módon szabályoznak. Mindkét komplex régóta összefüggésbe hozható különböző daganatos megbetegedések kialakulásával.

A PcG fehérjékhez funkcionálisan két külön komplex köthető: PRC1 és PRC2. Mindkét komplex hisztonmódosításokat indukáló katalitikus alegységeket tartalmaz. A PRC1 E3 ligáz aktivitása a H2AK119u1 mono-ubikvitinációt katalizálja, míg a PRC2 az Ezh2 katalitikus egységen keresztül mono- és dimetilálja a H3K27-es lizint (H3K27me_{2/3}). A PRC2 komplex összetétele dinamikus. Egyrészt a H3K27me₃ módosításért és enzimatis aktivitásért felelős alegységeket tartalmazza, másrészt rendelkezik a holoenzim funkciót szabályozó számos

kiegészítő alegységgel. Az emlős PRC2 komplex fő komponensei a Suz12, az EED és az Ezh2 (kölcsonösen kizárva az Ezh1 izotípussal).

Az élesztőgombában (*Saccharomyces cerevisiae*) az összes H3K4 metilációt egyetlen SET1 komplex alkotja, amelynek neve COMPASS (Complex Proteins Associated with Set1). A COMPASS egy azonosított MLL homológ, mely hét 25-130 kDa molekulásúlyú polipeptidből épül fel. Az egyik leginkább említésre méltó COMPASS alegység az Spp1, amely nemcsak szabályozza az enzim katalitikus aktivitását, hanem közvetíti a H3K4me3 biológiai hatását is a meiotikus kettős száltörések képződése során. Az Spp1 miután kölcsönhatásba lép a H3K4me3 és a Mer2 enzimmel, elősegíti a meiotikus kettős szálú törések inicializálását a kromoszóma tengelyen, rekrutálva a Spo11 transzészterázt, amely elvégzi a kettős szál hasítását.

1.4. A PRC2 komplex szerepe a glióma progresszióban

A gyermekkori gliómákban körülbelül 70%-80% gyakorisággal jelenik meg szomatikus mutáció a H3.3 és H3.1 hisztonfehérjéken. Ezek a mutációk a H3 hiszton N-terminális végén okoznak aminosavsubsztitúciót (K27M és G34R/G34V) és kimondottan gyakoriak a glioblastoma multiforme-ban (GBM) gyermekek és fiatal felnőttek körében. Mind az anatómiai lokalizációban, mind az időbeli előfordulásukban korlátozottak. A K27M tumorok elsősorban középvonali elhelyezkedésűek (gerincvelő, talamusz, híd, agytörzs), míg a G34R/V mutációval rendelkező daganatok többnyire az agyféltekékben helyezkednek el (frontális, parietális, occipitális vagy temporális lebenyek). A K27M meghatározó szerepet játszik a represszív H3K27 metilációk globális gátlásában. Ennek magyarázata, hogy a metionin megköti és stabilizálja a PRC2 enzimkomplexet, így megakadályozza a metilcsoportok elhelyezését. A H3K27M metionin és az Ezh2 katalitikus alegység közötti kötődést és interakciót immunprecipitációs kísérletekkel és kötődési partner analízissel mutatták ki fotoreaktív, K27M mutációval rendelkező peptidek segítségével.

1.5. Az MLL komplex szerepe a glióma progresszióban

Az MLL2 és az MLL3 inaktiváló mutációit a gyermek medulloblasztómák 16%-ában azonosították. Ezeknek a mutációknak a többsége (nonszensz, inszerció-deléció vagy splicing mutációk) olyan fehérjetermékeket eredményez, amelyek nem tartalmazzák a kulcsfontosságú metiltranszferáz-domént. Parsons és munkatársai bizonyították, hogy az Mll útvonalak fontos szerepet töltenek be a medulloblasztómák kialakulásában, és hogy az Mll2 és az Mll3 tumorszuppresszor szerepet töltenek be. Ezenkívül van egy azonosított Mll-Homeobox tengely, amely jelentősen hozzájárul a glioblasztómák daganatos őssejtjeinek tumorigén viselkedéséhez. Az Mll közvetlenül aktiválja a HOXA10 Homeobox gént, mely aktiválja a downstream Homeobox hálózatot és más tumorigenezissel kapcsolatban már karakterizált géneket. Az MLL1 expressziós szintje szintén magasabb a glióma őssejtékben, mint a nem őssejt-eredetű daganatsejtékben.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Fő céljaim a következők voltak:

- A H3K27M nukleoszómák *in vitro* rekonstitúciója és a metionin mutáció, illetve az Ezh2 metiltranszferáz nukleoszóma-konformációra kifejtett hatásának tanulmányozása Förster-típusú rezonancia-energiatranszfer módszer alkalmazásával.
- A H3.3K27M sejtmagi eloszlásának vizsgálata élő sejtekben konfokális lézer pásztázó mikroszkóp segítségével és a kromatinba épült H3.3K27M hiszton fehérjék sófüggő elúciós profiljának meghatározása lézer pásztázó citometriával.
- A H3K27M hisztonokat expresszáló *Saccharomyces cerevisiae* törzsek életképességének vizsgálata.

- A vad típusú H3.3 és a H3.3K27M hisztonok diffúziós tulajdonságainak meghatározása FCS és FRAP módszerekkel. A mutáns hisztonok és az Ezh2 fehérje transzkripció kapcsolatainak a leírása.
- Az Spp1 és Set1 COMPASS alegységek diffúziós tulajdonságainak jellemzése FCS és FRAP módszerekkel.
- Az Spp1 kromatinkötődési dinamikájának és turnover rátájának kvantitatív elemzése meiotikus körülmények mellett kompetíciós ChIP-Seq alkalmazásával.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. *In vitro* nukleoszóma-rekonstitúció

A 170 bp hosszúságú, fluoreszcensen jelölt Widom-601 pozicionáló PCR-amplikont és rekombináns *Xenopus laevis* hisztonfehérjéket felhasználva vad típusú H3 hisztont vagy mutáns, H3K27M hisztont tartalmazó nukleoszómákat rekonstituáltunk. Röviden, a tisztított hiszton-oktamereket 2 M NaCl-TE pufferben helyeztük el a pozicionáló DNS fragmenttel, és lassú dialízissel, 5 mM NaCl-TE-ben indukáltuk a nukleoszómák kialakulását. Energiatranszfer kísérleteinkben a pozicionáló DNS fragment a timin nukleobázisoknál a C6-linkeren keresztül volt jelölve, a nukleoszóma tengelyhez viszonyítva -53 (Alexa 594) és +41 pozícióban (Alexa 488). Szükség esetén az aggregáció elkerülése érdekében a DNS-t a hiszton-oktamer molekula arányhoz optimalizáltuk 1:1,5 és 1:1,8 molarány között. A rekonstitúciót követően a nukleoszóma-koncentrációt Cary 4E spektrofotométerrel határoztuk meg. A nukleoszóma minőségét natív PAGE segítségével validáltuk.

3.2. Bulk FRET (μ psFRET) analízis mikrolemez szkennelg módszerrel

Annak érdekében, hogy meghatározzuk az átlag proximitási arányt a fluorofórok között a nukleoszóma-populáció szintjén, Typhoon 9400 (GE Healthcare) fluoreszcens szkennert használtunk. A mérés előtt a nukleoszómákat különböző NaCl-koncentrációjú só-pufferben

inkubáltuk 384-lyukú mikrolemezen (μ psFRET). A jelölt nukleoszómák végső koncentrációja körülbelül 1 nM volt. A fluoreszcens emissziót három spektrális csatornában detektáltuk: donor csatorna (gerjesztés 488 nm-en, detektálás 500-540 nm-en); akceptor csatorna (gerjesztés 532 nm-nél, detektálás 595-625 nm-en); energiatranszfer csatorna (gerjesztés 488 nm-en, detektálás 595-625 nm-nél). A két fotomultiplikáló cső (PMT) detektálási feszültségét 600 V és 700 V között állítottuk be. A proximitási arányokat az egyes felvett képek intenzitásának értéke alapján számítottuk ki. A korrekciós tényezőket minden mérés előtt meghatároztuk.

3.3. Single-pair FRET kísérletek

Az spFRET mérésekhez az intakt nukleoszómákat frissen hígítottuk 0,02 μ m-es szűrővel szűrt kísérleti pufferben, amely tartalmazott különböző koncentrációban NaCl-t, 10 mM Tris-HCl-t, 0,1 mM EDTA-t (pH 7,5) és kiegészítettük 0,01% Nonidet P40-nel és 1 mM aszkorbinsavval, hogy elkerüljük a fluorofór kiégését. A nukleoszómákat 384-lyukú mikrolemezekbe (SensyPlate Plus, Greiner Bio-One) helyeztük el, melyeket előtte Sigmacote®-tal (Sigma-Aldrich) passziváltunk. A jelzett nukleoszómák végkoncentrációja körülbelül 50 pM volt, amelyet kiegészítettünk 250 pM jelöletlen nukleoszómával, hogy megakadályozzuk az alacsony nukleoszóma koncentráció okozta disszociációt. A kísérleteket speciális konfokális rendszer alkalmazásával végeztük el 491 nm-es lézerrel (Cobolt) folyamatos gerjesztés mellett. A burst analízis előtt a nukleoszómákat Ezh2 komplexszel (Active Motif, Ezh2, Eed1, Suz12 alegység) vagy Ezh2 komplex nélkül, 60 percen keresztül inkubáltuk szobahőmérsékleten kísérleti pufferben. A donor gerjesztés után a fluoreszcens emissziót két detektáló ablakra különítettük el, a donor (520-560 nm) és akceptor (> 600 nm) fluorofóroknak megfelelően. A kibocsátott fotonokat két lavina fotodióda detektor (APD, Perkin Elmer Optoelectronics) gyűjtötte össze. Az egyedi molekuladetektálás TimeHarp2000-rel (PicoQuant) történt, és a Fretchen szoftverrel elemeztük úgy, hogy egy eseményt (burst) legalább 50 fotononként

definiáltunk, 120 μ s-nál rövidebb, kölcsönös elválasztási idő mellett. A proximitási arány (P) hisztogramokat a kiválasztott egyedi események alapján készítettük el és IGOR Pro szoftverrel (WaveMetrics) elemeztük. P a fluorofórok közötti távolság függvényében kapcsolódik az energiaátvitel hatékonyságához. Mind az spFRET, mind a bulk rendszer esetében a P meghatározásához szükséges korrekciós tényezőket (háttérintenzitás és cross-talk események) független mérésekkel határoztuk meg.

3.4. *In situ* sóelúciós vizsgálat lézer pásztázó citométerrel (LSC)

A pEGFP-N1-H3.3 vagy pEGFP-N1-H3.3K27M konstruktot konstitutívan expresszáló HeLa sejteket 8 üregű kamrába (Ibidi, Martinsried, Németország) ágyasztuk be és kvantitatív mikroszkópiával tanulmányoztuk sókezelést követően Imre és mtsi. protokollja alapján. A sóelúció tartománya 0-1400 mM NaCl volt a hiszton elúciós kísérletekben és 0-400 mM NaCl az Ezh2-t vizsgáló kísérletekben. A sókezelést követően a sejtmagban maradt EGFP-hisztonok vagy immunjelölt Ezh2 fehérjék intenzitását LSC-vel kvantifikáltuk.

3.5. A kontroll és H3K27M mutáns *Saccharomyces cerevisiae* sejtek növekedése és életképessége

A kontroll (H3 vad típusú), H3K27M és K27R/Q mutáns élesztősejtek SK1 genomi háttérrel rendelkeztek és egy plazmid kicserélő (plasmid shuffle) technikával hoztuk létre őket. A sejteket optikai denzitás (OD600) alapján 0,7-1,0 értékre növesztettük, és tízszeres sorozathígításokat alkalmazva különböző metabolikus és stressz körülmények között figyeltük meg szilárd táptalajon. A kolónia méreteit két napos, 30 °C-on történő növekedés után ellenőriztük. A kinetikus növekedési méréseket folyadékkultúrákban végeztük, úgy, hogy az optikai sűrűségeket 25 órán keresztül követtük. Az 1,5-nél nagyobb OD600 értékeket hígított tenyészetekből extrapoláltuk, és a hígítási tényezővel korrigáltuk. A sporulációt diploid

törzsekben indukáltuk, nem fermentálható szénforrásként 1% (w/v) kálium-acetátot alkalmazva. 24 órás sporuláció után 30 °C-on az aszkusz zsákokat Zymolyase 20T (MP Biomedicals) enzimmel emésztettük 30 °C-on 10 percig, és a tetrádokat mikromanipulátor segítségével boncoltuk. A fertilitást (spóra-életképesség) az életképes spórák számának meghatározásával határoztuk meg két napos növekedés után YPD táptalajon.

3.6. Sejtkultúra és transzfekció

A HeLa sejteket 10% (v/v) magzati borjúsérummal, 2 mM glutaminnal, penicillinnel és sztreptomocinnal kiegészített RPMI-1640 tápfolyadékban (Sigma, R5886) tenyésztettük 5% széndioxid koncentráció mellett. A H3.3K27M pontmutációt egy pEGFP-N1-H3.3 és pmCherry-N1-H3.3 konstrukcióban hoztuk létre (quick change) mutagenézis technikával. Az Ezh2 plazmidok esetében, először az NM_004456 (Ezh2) humán cDNS ORF-et (OriGene) amplifikáltuk PCR segítségével, majd az amplicont pEGFP-N1 és pmCherry-N1 plazmidba klónoztuk. A pEGFP-N1-H3.3/H3K27M, a pmCherry-N1-H3.3 / H3K27M tranziens és stabil transzfekciókat önmagukban, vagy pEGFP-N1-Ezh2, vagy pmCherry-N1-Ezh2 kombinációval Lipofectamine 2000 (Invitrogen) reagens vagy polietilén-imin (PEI-B) segítségével végeztük el a gyártó javaslatai szerint. Ahol jeleztük, a sejteket kísérlet előtt 60 percig előkezeltük actinomycin D-vel (Act D, 5 µg/ml), cikloheximiddel (CHX, 20 µg / ml) és flavopiridollal (flav, 100 nM).

3.7. Konfokális lézer pásztázó mikroszkópos (CLSM) analízis

A HeLa sejteket minden mérés előtt 1%-os formaldehiddel fixáltuk. A CLSM képeket Olympus FluoView 1000 konfokális mikroszkóppal vettük fel, amelyhez 60x olajimmerziós objektívet (NA 1,35) használtunk. A gerjesztési és emissziós szűrők a következők voltak: EGFP, 488 nm gerjesztés, 500-540 nm detektálás; mCherry, 543 nm gerjesztés, 600-680 nm detektálás. Tíz,

0,7-1,1 μm vastagságú optikai szeletet gyűjtöttünk minden egyes mag esetében, Kalman szűrőmódot alkalmazva a zaj és alternatív gerjesztés csökkentése érdekében és a cross-talk kizárására. A kolokalizáció mértékét az ImageJ program JACoP pluginjével számoltuk ki.

3.8. Fluoreszcencia-visszatérés fotoelhalványodás után (FRAP)

A FRAP méréseket HeLa sejtekben végeztük Olympus FluoView 1000 IX-81 invertált konfokális mikroszkóppal, UPlanAPO 60x (NA 1.2) vízimmerziós objektívvel. Az EGFP-t 488 nm-en gerjesztettük argon-ion lézerrel és a fluoreszcenciát egy 500-550 nm-es sávszűrőn detektáltuk. A hiszton FRAP mérésekben a H3.3-EGFP vagy a H3.3K27M-EGFP HeLa sejteket véletlenszerűen kiválasztottuk, és öt előképet készítettünk (256×256 képpontos terület, 10x zoom, $\sim 9 \mu\text{W}$ lézer teljesítmény), amelyet egy 500 ms-os kioltási idővel követett egy 100%-os lézer teljesítményű ($900 \mu\text{W}$) fotokioltás. Kioltási régióknak négyzet alakú területeket választottunk a magon belül. Az első 90 percben a képeket tíz percenként, majd 30 percenként, legfeljebb 420 percig (7 óra) gyűjtöttük. A transzkripciót flavopiridollal (100 nM) vagy actinomycin D-vel ($5 \mu\text{g/ml}$), míg a translációt cikloheximiddel ($20 \mu\text{g/ml}$) gátoltuk. A kezelést 60 perccel a mérések kezdete előtt végeztük el. Az EZH2-EGFP FRAP-kísérleteket hasonló körülmények között hajtottuk végre, mint a hiszton FRAP kísérleteket (a fotokioltás paraméterei és a konfokális beállítások azonosak voltak), azzal az eltéréssel, hogy a gyorsan visszatérő EZH2-EGFP fluoreszcens jeleket csak tíz másodpercig követtük nyomon.

A sporuláló élesztősejtekben elvégzett FRAP kísérletekhez (0-6 óra SPM-ben) szintén Olympus FluoView 1000 konfokális mikroszkópot használtunk a fentebb leírt paraméterekkel. A sporulációs tenyészetekből óránként vettünk mintákat, és a méréseket 1% kálium-acetáttal bevont mikroszkópos tárgylemezekon végeztük el. A GFP-t a 488 nm-es argon-ion lézerrel gerjesztettük, és az 500-550 nm sáváteresztő szűrőn detektáltuk. A Set1-GFP vagy Spp1-GFP fehérjéket expresszáló sejteket véletlenszerűen választottuk ki $100 \mu\text{M}$ CuSO_4

indukciót követően, majd öt előképet (256×256 képpontos terület, 15x zoom, $\sim 9 \mu\text{W}$ lézer teljesítmény) készítettünk és 500 ms-os kioltási idő mellett, 100%-os lézer teljesítménnyel ($900 \mu\text{W}$) végeztük el a sejtmag fotokioltását. A képeket másodpercenként gyűjtöttük 1 percen át.

3.9. Fluoreszcencia-korrelációs spektroszkópia

A H3.3-EGFP-vel vagy H3.3K27M-EGFP-vel transzfektált HeLa-sejteket fluoreszcencia-korrelációs spektroszkópia (FCS) és konfokális lézer szkennig mikroszkóppal (CLSM) kombinált speciális fluoreszcencia-fluktuációs mikroszkóppal (FFM) analizáltuk. Az FFM FCS modulból áll, melyet egy UplanApo / IR 606 vízimmerziós objektívlencsével (NA 1.2) és egy 5%-os CO_2 -dal dúsított, fix hőmérsékletű inkubációs kamrával ellátott invertált IX-70 mikroszkóppal (Olympus, Hamburg, Németország) kombináltak. Az EGFP fluoreszcens gerjesztését Cobolt lézerrel (491 nm-en, 5-15 μW kimenő teljesítmény, 1 μW végső gerjesztési teljesítmény) végeztük. Az EGFP-emissziót egy 515-545 nm sáváteresztő szűrőn detektáltuk egy lavina fotodióda (APD) alkalmazásával. A méréseket 37°C -on végeztük.

Az EZH2-EGFP-vel transzfektált HeLa-sejteket az Olympus FluoView 1000 konfokális mikroszkóppal analizáltuk (a FRAP kísérletekben leírt módon). Az autokorrelációs görbéket egy ALV-5000E korrelációs kártyával számoltuk ki az egyes sejtekben három, véletlenszerűen kiválasztott pontban elvégzett 10×8 másodperces mérést követően. Minden mérés szobahőmérsékleten (22°C) történt.

A Set1 és Spp1 FCS kísérletekhez szintén az Olympus FluoView 1000 konfokális mikroszkópot használtuk. Sporuláló élesztősejteket mintavételeztünk minden órában folyékony sporulációs tenyészetekből, és a sejteket 1% kálium-acetáttal bevont mikroszkópos tárgylemezre cseppentettük. Mérés előtt a Set1/Spp1 expressziót $100 \mu\text{M}$ CuSO_4 oldattal indukáltuk. Az autokorrelációs görbéket egy ALV-5000E korrelációs kártyával számoltuk ki az egyes magokban, három véletlenszerűen kiválasztott pontban, 10×8 másodperces mérést

követően. Gazdag táptalajon növesztett sejtek esetében, a sejteket $A_{260} = 1,0$ optikai denzitás értékig növesztettük, és YPD agarral bevont tárgylemezen, indukciót követően mértük.

3.10. Spp1 c-ChIP kísérletek *Saccharomyces cerevisiae* élesztősejtekben

Meiotikus élesztősejteket (4×10^7 sejt/ml) 50 ml térfogatban gyűjtöttünk össze a jelzett időpontokban és 1% formaldehiddel 20 percig, szobahőmérsékleten fixáltuk. A reakciót 125 mmol glicinnel, 5 perces, szobahőmérsékleten történő inkubálással állítottuk le, és a sejteket háromszor jéghideg, 1x TBS, pH 7,5 (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl) oldatban mostuk. Ezt követően a sejteket 500 μ l lízispufferben (50 mM Hepes, KOH pH 7,5, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0,1% Na-deoxikolát, 1 tableta teljes protein inhibitor koktél (Roche)), savval mosott üveggyöngyökkel lizáltuk 10 percig FastPrep bead beater segítségével. A kromatinmintákat ultrahanggal (Bioruptor, Diagenode) fragmentáltuk 300 bp méretűre. A teljes sejtexteraktum eléréséhez kivettünk 50 μ l immunoprecipitáció előtti mintát, és teljes sebességgel 10 másodpercig centrifugáltuk a sejtörmelék elválasztásához (felülúszó = teljes sejtexteraktum). A többi mintát 20 másodpercig centrifugáltuk (12000 fordulat/perc, 4 °C) a sejtörmelék elválasztásához. Az immunoprecipitációt (IP) úgy hajtottuk végre, hogy 450 μ l extraktumot adtunk a mágneses protein G dynabeads (Dyna) pellethez, amelyből 50 μ l 2×10^7 gyöngynek felelt meg. A gyöngyöket előinkubáltuk 9E11 (monoklonális egér anti-myc, ab56, Abcam) vagy anti-GFP (poliklonális nyúl, ab290, Abcam) antitestekkel egy éjszakán át 4 °C-on. Az IP mintákat kétszer mostuk lízispufferrel, kétszer 360 mM NaCl-dal kiegészített lízispufferrel, kétszer mosópufferrel (10 mM Tris HCl pH 8,0, 250 mM LiCl, 0,5% NP-40, 0,5% Na-deoxikolát, 1 mM EDTA) és végül egyszer 1x TE-vel, pH 7,5, a Dynal mágneses szeparátor segítségével. A keresztkötéseket TE-1% SDS oldatban oldottuk fel, egy éjszakán át, 65 °C-on. Ezután a fehérjéket proteináz K-val (12 μ l 20 mg/ml törzsoldat) emésztettük 3 órán

át 65 °C-on. A nukleinsavakat PCR clean-up oszlopon tisztítottuk, majd RNS-emésztést (10 ug RNáz) végeztünk 1 órán át 37 °C-on. A DNS-t végül 50 µl nukleázmentes dH₂O-ban oldottuk. A szekvenáló könyvtárakat az Illumina TruSeq ChIP mintaelőkészítési protokollja szerint állítottuk elő. A könyvtárakat 50 bázispáros egyedi readekre szekvenáltuk Illumina HiScan SQ (Debreceni Egyetem Genomikai Orvostudományi és Bioinformatikai Tanszéke); vagy Illumina HiSeq 2500 (EMBL Genomics Core Facility, Heidelberg, Németország) szekvenátorral.

3.11. Turnover ráta becslése c-ChIP adatokból

Az Spp1 kötési helyek átlagos lefedettségét (ún. okkupanciáját) a GFP- és a MYC-kompetíciós ChIP-seq adatok alapján különítettük el minden egyes időpontban. Ezután kiszámítottuk a GFP/MYC okkupancia arányokat, és exponenciális modellt illesztettünk rájuk. A modell illesztése után kiszámítottuk a becslések standard hibáját, és t-próbát végeztünk a modell illeszkedésének jóságának becslésére. Összesen 977 kötőhelyet írtunk le a modellel (p-érték <0,05).

4. EREDMÉNYEK

4.1. A K27M nukleoszómák szerkezeti analízise Förster-típusú rezonancia-energiatranszferrel (FRET)

A vad típusú nukleoszómák és a H3K27M nukleoszómák ekvilíbrio stabilitását µpsFRET technikával tanulmányoztuk. Az energiatranszfer proximitási arányait (P) fokozatosan növekvő sókoncentrációk mellett számoltuk ki, amellyel irányított módon a nukleoszómák disszociációját idéztük elő. A vad típusú és mutáns minták disszociációs kinetikájának összehasonlítását követően megállapítottuk, hogy a K27M mutáció kis mértékben csökkenti a nukleoszómák sófüggő stabilitását. A szerkezeti különbség nem volt statisztikailag szignifikáns. Hasonlóan, a rekombináns Ezh2-kompleksszel (rekombináns Ezh2, EED és Suz12

fehérjék) történő kiegészítést követően a nukleoszóma-stabilitásban nem mutattunk ki változásokat.

A só-disszociációs méréseket spFRET technikával is megismételtük, amely lehetővé tette számunkra, hogy nyomon kövessük és megfigyeljük a nukleoszómák lehetséges szerkezeti szubpopulációit. Az egyedi nukleoszómák szintjén a szétszerelési folyamat nem mutatott szignifikáns különbséget vagy strukturális heterogenitást a vad típusú és a H3K27M minták között.

4.2. A H3.3K27M és Ezh2 *in situ* sóelúciós vizsgálata

Az *in situ* sóelúciós módszerrel sikerült összehasonlítani a H3.3K27M hisztonokat tartalmazó kromatin-inkorporálódott nukleoszómák stabilitását a beépült vad típusú nukleoszómák stabilitásával szemben. Ezenkívül egy optimalizált só-tartományban megfigyeltük az Ezh2 elúciós profilját a vad típusú H3.3 vagy H3.3K27M transzgénnel transzfektált HeLa sejtekben. Három független kísérlet alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a K27M szubsztitúció nem változtatta meg a H3.3 hiszton kromatin inkorporációs tulajdonságát és hasonlóképpen, az Ezh2 elúciós profilt sem befolyásolta. Vizsgálatunk azt erősíti, hogy a mutáció nem befolyásolja a H3.3K27M hisztonok kromatin-beépülését.

4.3. A K27M mutáns hisztonok hatása a H3K27M-t expresszáló élesztősejtek proliferatív kapacitására és stressztűrésére

A K27M pontmutációt hordozó HHT2 gént (pCEN-ARS-hht2K27M-HHF2-TRP1 plazmid) egy hht1 Δ recipiens törzsbe transzformáltuk, amely a H3 hiszton (Hht2) URA3 markerrel ellátott plazmidról (pCEN-ARS-HHT2-HHF2-URA3) expresszálta. A vad típusú ura⁺ és a mutáns trp⁺ plazmidokat plasmid shuffle technikával cseréltük ki, és a trp⁺/ura⁺ kolóniákat tartottuk meg. A tesztörzsek növekedését és túlélését kinetikai és végpontos növekedési

vizsgálatban követtük nyomon, amelyeket különböző anyagcsere- és stressz-körülmények között végeztünk el. A sporuláció és a meiózis folyamatát diploid K27M törzsekben teszteltük a differenciálódási képesség és a termékenység meghatározása céljából. Hasonló növekedési jellemzőket és stressztoleranciát véltünk felfedezni minden tesztelt kondícióban, ami azt sugallja, hogy az élesztősejtek alapvető metabolikus folyamatait, javító mechanizmusait és meiotikus differenciálódását nem zavarta meg a H3K27M hiszton homozigóta expressziója.

4.4. A vad típusú és H3K27M nukleoszómák, illetve az Ezh2 nukleáris eloszlásának mikroszkópos analízise

Az Ezh2-t mCherry fluoreszcens fehérjével jelöltük meg és a H3.3-EGFP vagy H3.3K27M-EGFP fúziós fehérjével koexpresszáltuk élő HeLa sejtekben. Konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal (CLSM) az EZH2-mCherry szubcelluláris eloszlását tanulmányoztuk a H3.3-EGFP vagy H3.3K27M-EGFP eloszláshoz viszonyítva. A Manders' kolokalizációs együtthatók alapján az Ezh2 készlet fele körülbelül a H3.3 vagy H3.3K27M hisztonnal, míg a másik fele különálló nukleáris kompartmentekkel fedett át. Az actinomycin D és a flavopiridol kezelések által kiváltott transzkripció gátlás, illetve a K27M mutáció jelenléte nem változtatta meg jelentősen az Ezh2 kolokalizációjának és genomiális eloszlásának mintázatát.

4.5. Az Ezh2 és a H3.3K27M kinetikai vizsgálata különböző térbeli és időbeli felbontásokban

4.5.1. A H3.3K27M nukleoszómák és az Ezh2 kinetikájának meghatározása élő sejtekben FRAP technikával
Ahhoz, hogy az Ezh2, illetve a H3.3 és H3.3K27M hisztonok diffúziós tulajdonságait különböző térbeli és időbeli felbontásokban leírjuk, kinetikai méréseket végeztünk el. Élő HeLa sejteket, amelyek a hiszton H3.3-EGFP / H3.3K27M-EGFP fehérjéket stabilan expresszáltak vagy az EZH2-EGFP fehérjét mutáns vagy vad típusú H3.3-mCherry jelenlét mellett expresszáltak, FRAP analízisnek vetettük alá és meghatároztuk a H3.3 / H3.3K27M-EGFP,

valamint az EZH2-EGFP mobilitását és a mobilitás transzkripció-függését kezeletlen és transzkripció-gátolt kondíciókban.

A H3.3 / H3.3K27M-EGFP fluoreszcencia visszatérése nem érte el a kezdeti, kioltás előtti értéket, mivel a legtöbb hisztonmolekula a lassan cserélődő frakcióban maradt. Az actinomycin D növelte a H3.3 és a H3.3K27M (55% és 85% közötti) immobilizált (nem visszatérő) frakcióját, ami erős és közvetlen kromatinkötést és a transzkripció folyamatához való kötődését sugallja.

Érdekes módon, a pTEFb (transzkripció elongációs faktor) inhibitor flavopiridol nem változtatott szignifikánsan a H3.3 / H3.3K27M hisztonok repopulációjának sebességén, ami arra utal, hogy a naszcens RNS elongációja nem lényeges a H3.3 kromatin-inkorporációhoz. A cikloheximid kezelés a kezeletlen mintához hasonló profilt eredményezett.

A statikus hisztonmolekulákkal ellentétben a flavopiridol és az actinomycin D kezelések az Ezh2 stabil, nem-mobilis frakciójának kialakulását eredményezték (15% és 35%).

4.5.2. A H3.3K27M nukleoszómák és az Ezh2 kinetikájának meghatározása élő sejtekben FCS technikával

A nukleoplazmában szabadon diffundáló molekulák gyors komponensének eloszlása 61% (SD=19) volt a H3.3-EGFP esetében és 56% (SD=20) a H3.3K27M-EGFP esetében. Ez a mobilis pool a H3.3K27M-EGFP esetében 10%-kal nőtt az actinomycin D kezelés hatására ($p < 0,05$). Az átlagos diffúziós együttható (D) azonos volt a vad típusú és a K27M mutáns hisztonok között ($31 \pm 19 \mu\text{m}^2/\text{s}$ és $29 \pm 16 \mu\text{m}^2/\text{s}$, 37 °C-on mérve), és ezt az értéket nem befolyásolta a transzkripció gátlása vagy a gátolt fehérjeszintézis. A gyors komponens átlagos frakciója körülbelül 60% volt az EZH2-EGFP esetében, amely kissé megnövekedett a H3.3K27M-mCherry ($p < 0,05$) jelenlétében és a flavopiridol transzkripció gátlása után ($p < 0,05$). A flavopiridol hatására az EZH2-EGFP nagyobb mobilitást is mutatott, amit a flavopiridol kezelt sejtek megnövekedett EZH2-EGFP diffúziós együtthatója ($p < 0,05$) tükrözött. Nem volt szignifikáns különbség a H3.3 / H3.3K27M-EGFP molekulák valós és

látszólagos molekula tömege között (55,9 kDa / 49,26 kDa vs. 42,26 kDa). Ezzel szemben az EZH2-EGFP körülbelül 10-szer nagyobb átlagos molekulatömeget mutatott, mint a fúziós fehérje valós molekulatömege (1.221 kDa / 1.900 kDa vs. 102.36 kDa).

4.6. Az Spp1 és Set1 COMPASS alegységek kinetikai vizsgálata FRAP és FCS technikával

A COMPASS két alegységén, a Set1 és Spp1 fehérjéken végeztünk el FRAP és FCS kísérleteket, hogy megállapítsuk kinetikai tulajdonságaikat. A FRAP alkalmazásával a teljes sejtmagot kioltottuk, és fluoreszcens visszatérést vizsgáltunk a meiózis első öt órájában SPM sporulációs táptalajon és exponenciális fázisban YPD gazdag táptalajon. A GFP-Spp1 és a GFP-Set1 intenzitás kevesebb mint 50 másodpercen belül érte el a plató fázist. A FRAP jel fele nem tért vissza a kezdeti kioltást követően, jelezve, hogy az Spp1 és a Set1 ~ 50%-a szorosan kötődik a kromatinhoz, reprezentálva az immobilis frakciót.

Az FCS mérések alapján a gyors és lassú komponensek eloszlása nem mutatott különbséget az Spp1 és Set1 között, azonban az Spp1 átlagos diffúziós együtthatója (D) szignifikánsan lassabb volt a Set1-hez képest. A GFP-Set1 látszólagos molekulásúlya megegyezett a COMPASS (379 kDa) várható molekulatömegével, míg a GFP-Spp1 kb. 43-szor nagyobb molekulatömegű (1764 kDa) volt a fúziós fehérje valós molekulatömegéhez képest.

4.7. Az Spp1 kromatin kötődés kvantitatív elemzése kompetíciós ChIP alapján

Létrehoztuk az Spp1 egy konstitutív és egy indukálható izoformáját a 9 x myc és GFP epitópokkal ellátva a fehérjét. Az indukció kivitelezéséhez egy indukálható allélt (pCUP1 promoter) használtunk, amelyet réz hozzáadásával tudtunk bekapcsolni a meiózis alatt. Egymáshoz közel álló, meiotikus időpontokban (4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5 óra SPM-ben) mintavételeztünk, majd mindkét Spp1 izoformát immunoprecipitáltuk anti-myc és anti-GFP antitestek segítségével. Ezt követően a kromatin kötődési helyeket a hagyományos ChIP-Seq

kötőhely definiálás alapján határoztuk meg. Az Spp1 turnover rátáját kiszámítottuk a GFP (új Spp1) és a myc (régi Spp1) CHIP jel arányának meghatározásával és egy exponenciális modell illesztésének a segítségével. Elemzésünk során kiderült, hogy az Spp1 kötőhelyek eltérő kicserélődési dinamikát mutatnak a COMPASS (Spp1 és Bre2) kötőhelyekhez képest. A csak Spp1 kötőhelyek jelentősen lassabban jelennek meg a géntestek, a TTS, az RPG/Ribi gének és a Mer2/Red1 helyek feletti régiókban. Ha az Spp1 kötőhelyeket kinetikus viselkedésük szerint csoportosítjuk, akkor az eltűnő és megjelenő Spp1 kötőhelyek jelentősen eltérnének a turnover arányok és az okkupancia alapján, úgy, hogy az eltűnő Spp1 helyek általában nagyobb turnover rátát és nagyobb mértékű okkupanciát prezentálnak a megjelenő kötődésekhez képest. A megjelenő Spp1 helyek erősen összefüggésbe hozhatóak a nagymértékű Mer2 elhelyezkedéssel, az alacsony H3K4me3-val és Bre2 okkupanciával, illetve az alacsony turnover rátával, míg az eltűnő Spp1 helyek alacsony Mer2 lefedettséget, magas H3K4me3 jelet és Bre2 okkupanciát mutatnak, magas turnover rátával párosulva.

5. MEGBESZÉLÉS

Az spFRET és μ psFRET mérések során megállapítottuk, hogy a H3K27M hisztonokat tartalmazó nukleosómák disszociációs mechanizmusa megegyezik a vad típusú nukleosómák disszociációjával. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a H3K27M nukleosómák fenntartják vad típusú molekuláris szerkezetüket és stabilitásukat, jelezve, hogy az N-terminális H3 domén egyetlen aminosavszubsztitúciója nem okoz észrevehető átrendeződést a nukleosóma szerkezetében. A kromatin-inkorporálódott H3.3K27M hisztonok sóelúciós profilja bizonyítékot szolgáltatott arra, hogy ezek a mutáns nukleosómák hasonló szerkezeti tulajdonságokkal rendelkeznek a natív kromatinban, mint vad típusú megfelelőik. Feltételeztük, hogy az Ezh2 és a H3K27M nukleosómák közötti interakció strukturális változásokat is eredményez, ezért megismételtük a μ psFRET kísérleteket kiegészítve a rekonstituált

nukleoszóákat Ezh2 komplexszel. Különböző kondíciókat tesztelve, beleértve az Ezh2/nukleoszóma molekuláris arány, az összekeverést követő inkubációs idő és a fluorofór pozíció optimalizációját, nem találtunk az Ezh2 komplex által okozott szerkezeti változást. H3.3K27M-EGFP transzgén expresszáló HeLa sejtmagokban megbecsültük a magban maradó Ezh2 frakciót sóelúciós kísérletekkel. Ebben a rendszerben arra a következtetésre jutottunk, hogy a mutáns hiszton nem befolyásolja az Ezh2 elúciós profilt a 0-400 mM NaCl tartományban.

Ahhoz hogy megvizsgáljuk a H3K27M mutációt hordozó sejtek életképességét és a mutáció kromatin-folyamatokra gyakorolt hatását, H3K27 mutáns élesztő törzseket hoztunk létre és különböző stressz- és anyagcsere-kondíciók mellett növekedési vizsgálatokkal egybekötött genetikai esszét végeztünk el. Ennek a vizsgálatnak a célja az volt, hogy felderítsük a H3K27M mutáció és a glióma genomi instabilitásának kapcsolatát. A kísérletek azt mutatták, hogy a H3 hiszton mutáns formájával rendelkező *Saccharomyces cerevisiae* sejtek nem mutatnak növekedési defektust és stresszérzékenységet sem vegetatív, sem meiotikus körülmények között. Mivel a PRC2 komplex nem létezik az élesztőgombában, ezek az eredmények azt sugallják, hogy a PRC2 útvonal bevonása a K27M fenotípus meghatározó pontja, és a mutáció önmagában nem képes jelentős mértékben befolyásolni a vizsgált nukleáris folyamatokat.

További célkitűzésünk volt a H3K27M karakterizálással kapcsolatban egy *in vivo* funkcionális analízis megvalósítása humán sejtvonalon, amely során megállapítjuk a mutáns hisztonok nukleáris eloszlását a vad típusú hisztonok és az Ezh2 vonatkozásában, illetve ezen fehérjék diffúziós tulajdonságait különböző térbeli és időbeli felbontásokban a FRAP és FCS módszerek segítségével. Az Ezh2 és H3.3/H3.3K27M sejtmagi eloszlása a CLSM analízis alapján nem mutatott meggyőző különbséget a kolokalizációs analízis során, sem a kezeletlen, sem a transzkripciót gátló állapotban. A Manders' koefficiens alapján az Ezh2 lokalizációja nem változott jelentősen a K27M mutáció vagy a transzkripciógátlás miatt. Bár, az Ezh2-eloszlás

nukleoszóma szinten ettől függetlenül mutathat eltérést (például az Ezh2 felhalmozódása a K27M nukleoszómák közelében a metionin kötődés következtében).

Humán sejtvonalon elvégzett *in vivo* kísérletek alapján a H3.3K27M hisztonok hasonló diffúziós kinetikát követtek, mint a vad típusú megfelelőik és reprezentálták a kanonikus (replikációfüggő) H3 molekulák lassú kinetikáját és szoros kromoszóma kötődését. Továbbá megállapítottuk, hogy az actinomycin D (de nem flavopiridol) kezelés jelentősen megnöveli a H3.3 hisztonok immobilizált frakcióját, amely egy mobilis, transzkripció-függő H3.3 komponensre utal. A FRAP és az FCS eredmények alapján az Ezh2 transzkripció stressz hatására egy figyelemre méltó diffúziós eltérést mutat, amelyet a mobilis frakció jelentős megnövekedése és az immobilis frakció gyorsabb diffúziója kísért. Az Ezh2 eltérő diffúziós tulajdonságát a transzkripció gátlása nagyobb mértékben befolyásolta, mint a K27M mutáció jelenléte. A H3.3 és H3.3K27M kotranszfektált sejtek Ezh2 gyors frakciójának szignifikáns különbségét leszámítva, az inhibitor jelenléte minden esetben zavart okozott az Ezh2-kinetikában. Az FCS által megfigyelt gyorsabb Ezh2 diffúziós ráta egy magyarázata lehet, hogy a gátolt transzkripció lehetővé tesz egy mobilisabb, esetleg PRC2 független funkciót az Ezh2 számára. Az Ezh2 látszólagos molekulatömegének becslése csekély, de nem szignifikáns, megnövekedett molekulatömeget mutatott a H3.3K27M-EGFP transzfektált sejtekben. Ez a növekedés a metionin "ragasztószerű" tulajdonságának eredménye lehet, amely nem specifikus kötést eredményez a PRC2 alegység és a H3.3K27M hordozó nukleoszóma között.

Végezetül, célul tűztük ki, hogy a COMPASS Spp1 alegységének diffúziós viselkedését összevessük a Set1 katalitikus alegység diffúziós tulajdonságaival meiotikus körülményekben. Az eredmények felvetették annak lehetőségét, hogy az Spp1-nek COMPASS-független funkciója van a kromoszóma axiális részein, és hozzájárul a kromatinváltozásokhoz, amelyek potenciális rekombinációt iniciáló helyeket alakítanak ki a meiotikus DNS-töréseket (DSB) megelőzően. A vizsgálat olyan szempontból is izgalmasnak számított, hogy a COMPASS

fehérje komplex diffúziós tulajdonságai, a TrxG és PcG fehérjék mobilitásához hasonlóan, mindezidáig nem voltak ismertek. Hasonló fluoreszcencia visszatérési kinetikát figyeltünk meg mind az Spp1-ben, mind a Set1-ben FRAP alkalmazásával. Az intenzitás görbék 50 másodpercen belül elérték a platófázist a mérések során, jelentős különbségek nélkül. A becsült, körülbelül 50%-os immobilis frakció azt jelzi, hogy az egész frakció közel fele szorosan kötődik a kromatinhoz vagy egy másik nagy molekulatömegű komplexhez. Ezeket a kísérleteket megismételtük YPD tápközegben, és a profil nagy hasonlóságot mutatott. Csak szerény mértékű különbséget véltünk felfedezni az Spp1 és a Set1 visszatérések között.

Ezenkívül a két alegység diffúziós jellemzéséhez FCS-t is alkalmaztunk a sporuláció első hat órájában. Hasonló mértékű gyors frakció eloszlást kaptunk, de eltérő diffúziós együtthatóval az Spp1 és a Set1 között. Hogy jobban megértsük a lassabb Spp1 mobilitás mögötti mechanizmust, megbecsültük a GFP-Spp1 és a GFP-Set1 látszólagos molekulatömegét hasonlóan, mint az Ezh2 és a H3.3 kísérleteinkben. Eredményeink alapján a GFP-Spp1 látszólagos molekulatömege megnövekedett, és jelentős különbséget eredményezett az Spp1 várható és megfigyelt molekulatömege között. Ezek az adatok alátámasztottak egy korábbi modellt, amelyben az Spp1 és Mer2 közötti kölcsönhatás lehetséges meiotikus DSB helyeket eredményez a kromoszómatengelyen, ezáltal lehetővé téve a Spo11-nek a nukleoszóma depletált, tengely-proximális régiókban a DNS hasítását.

A genomszintű kompetíciós CHIP-Seq lehetővé tette az Spp1 és a DNS közötti dinamizmus vizsgálatát, illetve a biofizikai eredményeink kiegészítését a kötődési turnover meghatározásával a teljes genom szintjén. A COMPASS és COMPASS független Spp1 csúcsok differenciális turnover értékei két olyan Spp1 pool jelenlétét bizonyították, amelyek eltérően oszlanak meg a Set1 komplex és a meiotikus DSB fehérjék között. Megállapítottuk, hogy az Spp1 Mer2 axiális helyekkel való kapcsolata csökkenti az Spp1 *bona fide* turnover rátáját a kromatin-kötődés után. Ezt a megnövekedett kromatin tartózkodási időt az Spp1 csökkent

sejtmagi dinamikája is alátámasztja az élő meiotikus sejtekben. Összefoglalva, a c-ChIP által mért kötési kinetika összhangban volt az FCS becslésekkel és a feltételezett hurok-tengely modellel. Ezek az adatok körvonalazták az Spp1 multifunkcióját és segítenek abban, hogy jobban megértsük, hogyan működik az Spp1 kapcsoló a meiózis során, és hogyan választja ki a potenciális meiotikus DSB helyeket a COMPASS-tól függetlenül.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A H3K27M irányító (driver) mutációjának molekuláris biológiai következményei, valamint a szubsztitúció tumor iniciációra és progresszióra kifejtett hatásai tisztázatlanok. Jelen disszertációban megvizsgáltuk a H3K27M mutációt *in vivo* és *in vitro* kísérleti rendszerek alkalmazásával, és meghatároztuk biofizikai jellemzőit kromatin, nukleoszóma és nukleáris diffúzió szinten. Ezenkívül tanulmányoztuk az Ezh2 fehérjét, amelyről közismert, hogy a PRC2 fehérje komplex katalitikus alegysége és a K27M mutáció metioninjával kialakított kölcsönhatás révén megváltoztatja a tumorsejtek epigenetikai mintázatát. Végezetül megvizsgáltuk a COMPASS fehérje komplex diffúziós tulajdonságait, amelynek emlős homológja hematólógiai és agyi malignus folyamatokban is érintett. Megfigyeltük, hogy a COMPASS Spp1 alegysége a meiózisban COMPASS-független működésre vált, és elősegíti a lehetséges rekombinációt iniciáló helyek kialakulását.

Kísérleti eredményeink biofizikai kontextusban karakterizálták a H3K27M onkohisztont és betekintést nyújtottak az Ezh2 metiltranszferáz diffúziós tulajdonságaiba, ezáltal segítve a gyermekkori gliómapatogenezis molekuláris részleteinek a megértését. Megállapítottuk, hogy a H3.3K27M hisztonok hasonló diffúziós kinetikával rendelkeznek, mint a vad típusú megfelelőik, valamint a mutáns nukleoszómák fenntartják a vad típusú molekuláris architektúrát és kromatin beépülési profilt. Ezenkívül a K27M mutáció nem eredményez növekedési defektusokat H3K27M hisztonkészlettel rendelkező élesztőtörzsekben. Első

alkalommal mutattuk be a H3.3 hiszton variáns *in vivo* nukleáris mobilitását különböző időbeli és térbeli felbontásban, és becsültük meg az Ezh2 transzkripció-függő mobilitását és diffúziós paramétereit. A COMPASS alegységeken végzett kísérletek különbségeket mutattak a Set1 és az Spp1 diffúziós tulajdonságai között. Ezek az eredmények alátámasztják azt a hipotézisünket, hogy az Spp1 COMPASS-független szabályozó szerepet kaphat, és együttműködik a nagy molekulatömegű makromolekuláris komplexekkel, például a kromoszóma axiális részeivel. Kimutattuk, hogy az Spp1 dinamikus turnover rátája fontos szerepet tölt be a meiózis során bekövetkező tranzien kromatinváltozások kialakulásában és a DNS-rekombináció iniciációjának kialakításában.

7. KULCSSZAVAK

hiszton, hiszton modifikáció, H3K27M, glioblasztóma, Ezh2, rekombináció, COMPASS, Spp1, duplaszáltörés

8. PUBLIKÁCIÓK



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/10/2019.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Hetey Szabolcs

Neptun kód: CNDDBL

Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Karányi, Z., Halász, L., Acquaviva, L., Jonás, D., **Hetey, S.**, Boros-Oláh, B., Peng, F., Chen, D., Klein, F., Géli, V., Székvölgyi, L.: Nuclear dynamics of the Set1C subunit Spp1 prepares meiotic recombination sites for break formation.
J. Cell Biol. 217 (10), 3398-3415, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201712122>
IF: 8.784 (2017)
2. **Hetey, S.**, Boros-Oláh, B., Kuik-Rózsa, T., Li, Q., Karányi, Z., Szabó, Z., Roszik, J., Szalóki, N., Vámosi, G., Tóth, K. Á., Székvölgyi, L.: Biophysical characterization of histone H3.3 K27M point mutation.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 490 (3), 868-875, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.06.133>
IF: 2.559

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 11,343

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 11,343

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.



Debrecen, 2019.01.10.

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném őszinte hálámat kifejezni Dr. Székvölgyi Lórántnak, a Ph.D. tanulmányaim alatt nyújtott kiváló képzésért, folyamatos támogatásért, motiválásért, az átadott ismeretekért és a tudományos diszkusszióért. Hálás vagyok Dr. Tóth Katalinnak (Heidelberg, DKFZ, Németország), aki Heidelbergben tanácsokkal látott el és bevezetett a FRET és FCS kísérletek rejtelmeibe. Irányításuk segített nekem a kutatás minden aspektusában, a disszertáció elkészítésében és a kapcsolódó publikációk megírásában. Hálás vagyok Prof. Dr. Tózsér Józsefnek, a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet vezetőjének és a tanácsadó bizottságomnak, Prof. Dr. Fesüs Lászlónak és Dr. Bácsi Attilának. Külön köszönet Prof. Dr. Szabó Gábornak, Dr. Vámosi Györgynek, Dr. Imre Lászlónak és a Biofizikai és Sejtbiológiai Tanszék sejtbiológiai kutatócsoport munkatársainak az értékes és konstruktív javaslatokért. Hálás vagyok a genomarchitektúra és rekombináció kutatócsoport valamennyi korábbi és jelenlegi tagjának, különösen Karányi Zsoltnak, Halász Lászlónak, Dr. Sipos Évának és Dr. Mosolygó-Lukács Ágnesnek, hogy szakértelemmel és tanácsokkal láttak el. Ugyancsak köszönöm a technikusoktól, Vezendiné Nagy Adéltól és Fürtös Ibolyától kapott rengeteg segítséget. Végül, de nem utolsó sorban, szeretném kifejezni a legmélyebb hálámat kedves családomnak, akik támogatták szakmai előremeneteletemet.