

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Citometriás módszerek fejlesztése genetikai és epigenetikai változások
detektálására

Imre László

Témavezető: Dr. Szabó Gábor



DEBRECENI EGYETEM
MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIAI DOKTORI ISKOLA

DEBRECEN, 2019

Citometriás módszerek fejlesztése genetikai és epigenetikai változások detektálására

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

Írta: **Imre László** okleveles biológus

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

Témavezető: Prof. Dr. Szabó Gábor, MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Fésüs László, akadémikus

tagok: Dr. Bálint Bálint László, PhD

Dr. Timinszky Gyula, PhD

A doktori szigorlat helyszíne és időpontja: Debreceni Egyetem, ÁOK Biokémiai és
Molekuláris Biológiai Intézet, 2019. június 28., 11 óra

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Bay Péter, MTA doktora

Dr. Pankotai Tibor, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Fésüs László, akadémikus

tagok: Dr. Bálint Bálint László, PhD

Dr. Timinszky Gyula, PhD

Prof. Dr. Bay Péter, MTA doktora

Dr. Pankotai Tibor, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A”
épület tanterme 2019. június 28., 13 óra

ELŐZMÉNYEK

Új módszerek kidolgozása hozzájárulhat már ismert jelenségek mélyebb megértéséhez. Ilyen új módszerek lehetnek már meglévő technikák új kombinációi is, melyek lehetőséget adhatnak ezen technikák új területeken történő felhasználására. Munkacsoportunk hosszú ideje fejleszt olyan metodikákat, melyek a citometriás mérési platform és molekuláris biológiai technológiák ötvözésén alapulnak. Ezt a stratégiát sikeresen alkalmaztuk számos “lab-on-beads” assay kidolgozására, valamint a sejtmag globális kromatin szerkezetére vonatkozó biológiai kérdések vizsgálatára. Ph.D. munkám is ebbe kutatási irányba illeszkedik: Megvizsgáltam a citometria alkalmazási lehetőségeit a genetikai és epigenetikai kutatás és diagnosztika egyes területein, valamint a munkacsoportunkban folyó kromatin szerkezeti alap kutatásban történő hasznosítás céljából. Kidolgoztam egy új, mikrogöngy alapú áramlási citometriás módszert genetikai betegségek diagnosztizálására, valamint áramlási és lézer pásztázó citometriás módszereket epigenetikai jellegek globális szintű vizsgálatára.

CÉLKITŰZÉSEK

Az áramlási citometrián alapuló genetikai eltérések tekintetében célunk volt:

A – mikrogöngy alapú áramlási citometriás módszerek kidolgozása, amely alkalmas inszerciók, deléciók, triplet expanziók és pontmutációk kimutatására.

Az áramlási és lézer pásztázó citometrián alapuló globális szintű epigenetikai vizsgálatokban elérendő céljaink voltak:

B – *in situ* módszer kidolgozása, amely alkalmas a nukleoszómák - génszabályozó szereppel bíró - ionerősség- és szuperhelicitás-függő stabilitásának mérésére poszt-transzlációs módosítás-, valamint hiszton variáns-függő módon, különös tekintettel a szuperhelicitás változásának kromatin hurkokra kiterjedő hatására.

C - mikrogöngy alapú citometriás módszer kidolgozása, amely alkalmas különböző kromatin jellegek detektálására egy meghatározott kromatin kontextusban.

A. GENETIKAI ANALÍZISRE ALKALMAS CITOMETRIÁS MÓDSZEREK

A. 1. BEVEZETÉS

Az áramlási citometriás eszközök által vizsgálható objektumok igen sokfélék lehetnek (pl.: élő vagy fixált sejtek, mikrogyöngyök), valamint számos parameter (pl.: oldalra szóródás, előre szóródás, fluoreszcencia intenzitás) egyidejű mérésén keresztül nagy áteresztő képességű és multiplex mérésekre is lehetőséget adnak. Az áramlási citométer érzékeny és sokoldalúan használható eszköznek bizonyult fehérjék és nukleinsavak mikrogyöngy alapú biokémiai, immunológiai, vagy molekuláris biológiai vizsgálataiban.

Munkám során két új mikrogyöngy alapú vizsgálati stratégia alkalmazhatóságát teszteltem. Egyrészt vizsgáltam, hogy a duplaszálú DNS olvadáspontjának (T_m) DNS-hossztól való függése használható-e genetikai eltérések citometriás kimutatására. A T_m hőmérséklet felett egy mikrogyöngyre kötött, egyik szálán biotinált, másik szálán fluoreszcensen jelölt PCR termék disszociál, így a mikrogyöngyön csak a biotinnal jelölt szál marad, a fluoreszcens molekulát hordozó komplementer szál szabaddá válik. A DNS denaturáció mértéke, azaz a duplaszálú-egyszálú DNS egyensúlyi aránya az inkubációs hőmérséklettől függ. A kivitelezhetőség érdekében H-híd destabilizáló molekulával (DMSO, formamid) a DNS olvadási hőmérsékletét csökkentettük. Mivel a denaturáció mértéke egy adott hőmérsékleten függ a DNS lánc hosszától, a fenti arány áramlási citometriás mérését PCR termékek összehasonlító analízisére használtuk fel olyan genetikai eltérések esetén ahol a módszernek diagnosztikai értéke lehet.

Egy másik, általam tesztelt vizsgálati stratégia különböző hosszúságú PCR termékeket tartalmazó keverék denaturációja és hibridizációja után keletkező heteroduplexek egyszálú régiójának kimutatására alkalmas, ti. egy adott restrikcós endonukleáz felismerő helyén egyszálú heteroduplexet az enzim nem képes elhasítani. Deléción vagy kromoszóma átrendeződésen átesett régióról amplifikált PCR termékek hibridizációja során keletkezhet olyan heteroduplex, melynek egyszálú szakasza ilyen módon kimutatható. A módszerben sztreptavidinált mikrogyöngyökre kötött, biotinnal és fluoreszcens molekulával jelölt hybrid PCR terméket használtam.

A. 2. EREDMÉNYEK

A. 2. 1. CAG triplet expanzió kimutatása Huntington chorea beteg mintákban

A CAG ismétlődések a huntingtin protein N-terminális végén található poliglutamin régiót kódolják, ami kulcsfontosságú a Huntington chorea kialakulása szempontjából. Ismert, hogy a betegség kialakulásának valószínűsége korrelál a CAG triplet ismétlődés hosszával. A

CAG tripletok száma alapján négy kategória állítható fel: az egészséges (<27 CAG), és a közepes hossz (27-35 CAG) nem okoz tüneteket, de az utóbbi esetben az utódokban tovább hosszabbodhat a CAG ismétlődés, ami így elérheti a patológiás tartományt. A csökkent penetranciájú kategória (35-39 CAG) esetén nem minden érintettnél alakulnak ki a betegség tünetei, míg a beteg tartományt elérve (>40 CAG) minden esetben kialakulnak a tünetek, amik általában 35 és 50 év között jelennek meg. Minnél hosszabb a CAG ismétlődés, a tünetek annál korábban jelentkeznek, 60 és afölötti ismétlődés szám esetén már 20 éves kor előtt.

Az áramlási citometriás olvadáspont analízist egy plazmid sorozaton teszteltem, melyek különböző hosszúságú CAG ismétlődéseket hordoztak. Az általam kidolgozott módszerrel, a primerek jelölésére használt fluorofóroktól függetlenül, egyértelműen meg lehetett különböztetni az egészséges és a patológiás kategóriákba tartozó ismétlődés számokat, mind homozigóta, mind heterozigóta esetet modellezve. Ezután ismert CAG ismétlődés számú Huntington chorea tüneteit mutató betegekből származó, valamint kontrollként egészséges személyekből izolált genomiális DNS-t vizsgáltam. Az egészséges tartományba eső minták mindegyikén alacsony, míg a beteg minták mindegyikén magas fluoreszcencia intenzitás volt mérhető, ami azt mutatja, hogy minden beteg minta esetén sikerült kimutatni a kórosan meghosszabodott CAG ismétlődést.

A. 2. 2. A BRCA1 5382insC mutáció vizsgálata

A BRCA1 pontmutációt hordozó nőkben nagyobb valószínűséggel alakul ki emlő- és petefészekrák. Ezek között a BRCA1 mutációk között a 185delAG, 5382insC és a C61G mutációk a leggyakoribbak.

A BRCA1 5382insC pontmutáció kimutatására egy módosított allél-specifikus PCR-t használtam. Három primert alkalmaztam multiplex módon egy reakcióban: mutáció specifikus forward primer, vad típusra specifikus forward primer és egy közös reverse primer. A mutáció specifikus forward primer 5'végére egy CAG ismétlődésekből álló Tag-et illesztettem, így a mutációt hordozó és nem hordozó allélokról kétféle hosszúságú termék keletkezik a PCR reakció során, amelyeket citometriás olvadáspont analízissel ki lehet mutatni. A módszert egy mutációt hordozó betegből izolált genomiális DNS mintán teszteltem.

A. 2.3. Egyszálú DNS régiók detektálása

Két, részlegesen komplementer szál hibridizációja után a nem komplementer régió egyszálú marad. Egyik végén biotinnal, másik végén fluoreszcensen jelölt PCR termékekből létrehoztam ilyen heteroduplexeket, melyeket restriktációs endonukleázzal történő kezelés után sztreptavidinált mikrogöngyök felszínére kötöttem. Amennyiben az enzim hasító helye a

heteroduplex egyszálú részére esik, az emésztés nem történik meg, míg a homoduplexekben megtörténik. Ilyen módon a heteroduplex tartalmú minta áramlási citométerrel kimutatható, az emésztés után megmaradó fluoreszcencia detektálásán keresztül.

A. 3. DISZKUSSZIÓ

A fentiekben bemutatott mikrogyöngy alapú módszerek olyan genetikai eltérések detektálására használhatók, melyek során a DNS hosszában vagy szekvenciájában történik változás. Ilyenek a triplet expanziók, SNP-k, pont mutációk, microszatellita polimorfizmusok, inszerciós/deléciós polimorfizmusok és átrendeződések.

A mikrogyöngy alapú olvadáspont analízist sikeresen alkalmaztam a Huntington chorea, és a BRCA1 gén egyik pont mutációjának detektálására.

B. EPIGENETIKAI VIZSGÁLATOK KVANTITATÍV KÉPALKOTÓ CITOMETRIÁVAL

B. 1. BEVEZETÉS

A kromatin szerkezeti alapegysége a nukleoszóma, amelyben a négy különböző hiszton fehérje által alkotott oktamer köré egy 146 bázispár hosszú DNS szakasz tekeredik fel. Ez alkotja a kromatin szerveződésének első szintjét. Az oktamer két H2A-H2B dimerből és egy (H3-H4)₂ tetramerből (tetraszómából) áll. Az egymást követő nukleoszóákat linker DNS régió köti össze, melyhez a H1 linker hiszton kötődik. A nukleoszóáknak kulcsfontosságú szerepe van a transzkripcionálisan aktív és inaktív kromatin állapotok közti átmenet szabályozásában. A nukleoszóák stabilitása szabályozza a transzkripció során kialakuló nukleoszóma mentes régiók (nucleosome free region; NFR) létrjöttét, mely elengedhetetlen ahhoz, hogy a génátíródás végbe tudjon menni. A hiszton fehérjék N- és C-terminális végeinek poszt-transzlációs módosítása (post-translational modification; PTM) befolyásolja a intranukleoszóális hiszton-DNS és internukleoszóális interakciókat egyaránt, mindezen keresztül pedig a nukleoszóák stabilitását.

Az evolúciósan konzervált hiszton fehérjéknek számos variánsa alakult ki, melyeknek fontos szerepe van a génátíródás szabályozásában. A PTM-ek mellett a hiszton variánsok is befolyásolhatják a nukleoszóák stabilitását.

Kidolgoztunk egy kvantitatív képalkotó citometrián alapuló módszert, amely hiszton variáns és hiszton PTM specifikus módon szolgáltat információt a nukleoszóák stabilitásáról. A módszer alkalmas endogén vagy ektopikus módon expresszált hisztonok *in situ* vizsgálatára egyedi sejt és sejtpopuláció szinten. A vizsgálat során agarózba ágyazott élő sejteket permeabilizálunk, majd kezeljük só- vagy interkalátor-oldattal. A kezelés után a kromatinban maradó hisztonokat specifikus antitesttel jelöljük és kvantitatív módon detektáljuk lézer pásztázó citométerrel (laser scanning cytometer; LSC). A módszert QINESIn-nek (Quantitative Imaging of Nuclei after Elution with Salt/Intercalators) neveztük el.

B. 2. EREDMÉNYEK

B. 2. 1. PTM függő nukleoszóma stabilitás

A promóter régiókra jellemző H3K4me3 hisztonok destabilizáltabbnak bizonyultak a módosítást nem hordozó H3 hisztonokhoz képestl interkalátor elúciós assay-vel mérve, ahol doxorubicint használtam interkalátorként. A H3K4me3 doxorubicin hatására történő

disszociációját az LSC méréssel párhuzamosan ChIP-Seq (chromatin immunoprecipitation sequencing) analízissel is kimutattuk

GFP-vel fuzionált H2B és H3 hisztonok szintén eltérő doxorubicin érzékenységet mutattak.

Korábban már leírták, hogy a H3K4me3 és H3K27me3 hisztonok is eltérő doxorubicin érzékenységet mutatnak, amit az általam kidolgozott QINESIn módszerrel egy másik interkalátor, az etídium-bromid (EBr), esetén is sikeresen kimutattam.

Teszteltem, hogy a H2A-H2B dimerek és a (H3-H4)₂ tetramerek ismert eltérő só-érzékenysége kimutatható-e QINESIn-el. A különbség a kétféle hiszton komplex között látványosan demonstrálható volt eljárásunkkal.

B. 2. 2. Hiszton variánsok hatása a nukleoszóma stabilitásra.

Először a H2A.Z hiszton variáns nukleoszóma stabilitásra gyakorolt hatását vizsgáltam QINESIn módszerrel, melyhez két különböző gyártótól származó antitestet használtam. A H2A.Z tartalmú dimerek kromatinról történő sófüggő disszociációjának mérésekor a kétféle antitest eltérő elúciós profilt eredményezett. Meglepő módon, az Abcam-tól származó anti-H2A.Z antitest által felismert H2A.Z tartalmú dimerek a tetramerhez hasonló stabilitást mutattak, míg a Thermo Fisher Scientific (TFS) által forgalmazott antitesttel jelölhető dimerek a kanonikus (replikáció függő módon kifejeződő) H2A-t tartalmazó dimerekhez voltak hasonlóak stabilitás szempontjából.

Felmerült a lehetősége annak, hogy a kétféle antitest a H2A.Z kétféle izotípusát ismeri fel, ezért összehasonlítottam tranziensen transzfektált, különböző fluoreszcens fehérjékkel fuzionált H2A.Z1 és H2A.Z2 hisztonoknak, valamint H2A.Z1 KO és H2A.Z2 KO sejtvonalakban az endogen H2A.Z1 és H2A.Z2 hisztonoknak az elúciós profilját. Az Abcam antitest a Z1 és Z2 hisztonokat is felismerte és nem volt különbség a kétféle izotípus stabilitásában.

A következőkben megvizsgáltam, hogy a C-terminálison deléciót hordozó mutáns H2A.Z (ΔC), illetve az N-terminálison aminosav cserét hordozó H2A.Z hisztonok (5KR) mutatnak-e eltérő stabilitást. Az előbbi esetben a H2A.Z reader fehérje, a PWWP2A kötőhelye lett eltávolítva a C-terminálisról, míg az utóbbi esetben annak N-terminális lizin aminosavai lettek kicserélve argininre, így megakadályozva az N-terminális acetilációját. A PWWP2A kötőhely eltávolítása a ΔC mutánsban a H2A.Z dimereket destabilizálta, sóelúciós profilja balra tolódott és a kanonikus H2A-hoz volt hasonló. Ezek alapján a PWWP2A reader fehérjének

kulcsfontosságú szerepe van a H2A.Z tartalmú dimerek stabilitásának meghatározásában. Az 5KR mutáns a kontrollhoz képest nem mutatott különbséget.

EBr interkalátor assay-vel vizsgálva a H2A.Z stabilitását, az Abcam antitesttel detektálva az a kanonikus H2A tartalmú dimerekéhez volt hasonló. Ugyanakkor a H2A.Z-nek egy jelentős hányada interkalátor rezisztens maradt extrém magas EBr koncentrációknál is és ezen frakció mérete PWWP2A-függőnek bizonyult.

Az interkalátor rezisztens frakció fehérje összetételét nagy koncentrációjú sóoldattal történő eluálás után tömegspektrometriás módszerrel vizsgáltam.

A QINESIn módszert felhasználtam további hiszton variánsok, pl. a H2A.X valamint annak foszforillált formája, a γ H2A.X vizsgálatára is. A γ H2A.X tartalmú dimerek esetén destabilizációt lehetett kimutatni a nem foszforillált H2A.X dimerekhez képest, sóelúciós assay-vel.

B. 2. 3. Szuperhelicitás függő nukleoszóma stabilitás

Az QINESIn módszer alkalmasnak bizonyult a nukleoszóma stabilitás és a DNS szuperhelicális állapota közti összefüggés vizsgálatára is: Ha gyakran hasító nickáz enzimmel egyszálú hasítást (nick) vagy DNáz enzimmel duplaszálú hasítást hozunk létre, a nukleoszómák stabilitása jelentősen csökken. A stabilitásbeli csökkenés a dimerek esetén sóelúciós, tetramerek esetén interkalátor (EBr) elúciós assay-vel volt detektálható.

További kísérletekben meghatároztam, az egyszálú hasítások átlagos távolságát, az elúciós assay során alkalmazott nickase koncentrációnál (0.05 U/ml), ami 10 kb-nak adódott. Mivel a nukleoszómák többsége ennél 10-szer kisebb enzim koncentrációnál is destabilizálódik, levonható az a következtetés, hogy elegendő akár egyetlen hasítás is kromatin hurkonként, hogy a nukleoszóma destabilizáció a teljes hurokra kiterjedjen.

B. 2. 4 Az elúciós assay további jellemzői

Teszteltem, hogy a hiszton fehérjék elúciója független-e azok expressziójától. H2B-GFP-t expresszáló sejtek közül a kiértékelő programban kapuztam az eltérő expressziót mutató sejteket, három kategóriát definiálva: alacsony, közepes és magas. Mindhárom esetben meghatároztam a H2B hisztonok só elúciós profilját, ahol mindhárom görbe lefutása szinte azonos volt.

A só és interkalátor elúciós módszerek reprodukálhatóságát demonstrálva meghatároztam az elúciós profilt három független mérés átlaga és szórása alapján, H2B, H3, H3K4me3 és H3K27me3 hisztonok esetén is.

Vizsgáltam továbbá, hogy a hisztonok elúciós profilját befolyásolhatják-e azok intra- vagy inter-nukleosómális interakciói. A H3-szerű stabilitást mutató H2A.Z esetén felmerült a lehetősége annak, hogy a stabilitás növekedés oka a H2A.Z C-terminális végének tetramerrel történő interakciója, amelynek szabályozásában a H2A.Z C-terminálisához kötődő PWWP2A reader fehérjének lehet szerepe. Immuno-keresztkötéses kísérletben vizsgáltuk, hogy a H2A.Z antitest keresztkötéssel történő immobilizációja hatással van-e a tetramer elúciójára. Eredményeink alapján a H2A.Z ionerősség függő módon interakcióba lép a (H3-H4)₂ tetramerrel.

Ezzel ellentétben egy nukleosómán belül a dimer két tagja egymástól teljesen függetlenül disszociál a kromatinról, só vagy interkalátor elúció során egyaránt.

B. 3. MEGBESZÉLÉS

A kifejlesztett citometriás módszer lehetővé teszi a nukleosómák stabilitásának mérését *in situ*, azok saját kromatin környezetében.

A citometriás mérési platformból adódóan számos paraméter egyidejű mérésére van lehetőség (pl.: hiszton PTM vagy hiszton variáns).

A QINESIn módszerrel kimutattam, hogy a H2A.X C-terminálisának foszforilációja destabilizálja a dimert. A H2A.X hisztonok foszforilációja duplaszálú DNS töréseket határoló hosszú kromatin régiókra jellemző, így a destabilizáció maguknak a töréseknek a nukleosóma destabilizáló hatásával is összefüggésben lehet.

Kimutattam továbbá, hogy a H2A.Z tartalmú dimerek meglepően és antitest-függő módon sokkal stabilabbak a kanonikus H2A, vagy H2A.X tartalmú dimereknél. A H2A.Z-re specifikus PWWP2A reader fehérje kötőhelyének eltávolítása jelentősen csökkentette a H2A.Z dimerek stabilitását, ami arra enged következtetni, hogy a PWWP2A fehérjének jelentős szerepe van a H2A.Z dimerek stabilitásának szabályozásában. Ez a megfigyelés rávilágíthat a nukleosómák hiszton összetételének transzkripció szabályozásban betöltött szerepére is, ahol a nukleosóma stabilitásnak kulcsfontosságú szerepe van.

A nick-ek jelentős hatása a nukleosóma stabilitásra felveti a lehetőségét annak, hogy a DNS szuperhelikális állapotának változása a transzkripció egy lényeges szabályozó mechanizmusa. A szuperhelikális kromatin hurkok relaxációja ≥ 10 kb-onként létrehozott nickek-el már elegendő volt a nukleosóák destabilizációjához a teljes kromatin hurok mentén. Ezek alapján fiziológias körülmények között létrejött nickek-nek (pl.: topoizomeráz által) jelentős szerepe lehet relative nagy számú nukleosóma stabilitásának

meghatározásában. A nukleoszómák destabilizációja feltehetően “olvasható” a sejt számára reader fehérjék, vagy remodellingben szerepet játszó fehérjék által.

C. EPIGENETIKAI VIZSGÁLATOKRA ALKALMAS CITOMETRIÁS MIKROGYÖNGY ALAPÚ ASSAY-K

C. 1. BEVEZETÉS

Az áramlási citometriás mikrogyöngy alapú mérésekkel szerzett tapasztalataimat, epigenetikai kérdések vizsgálatára is alkalmaztam, ahol a célom olyan poszt-transzlációs hiszton módosítások (PTM-ek) kimutatása volt, amelyek ugyanazon a nukleoszómán találhatók. Mivel eltérő hiszton PTM-ek ugyanazon a nukleoszómán, vagy egyazon hiszton N-terminális végén is előfordulnak, a hiszton módosítások különböző kombinációi jelentős szerepet tölthetnek be az epigenetikai szabályozásban.

Demonstráltam, hogy az intranukleoszómális hiszton PTM kombinációk detektálása lehetséges cytometriás mérési platform felhasználásával. Ennek során mononukleoszómákat immobilizáltam mikrogyöngyök felszínén egy hiszton PTM specifikus antitest segítségével, majd immunfluoreszcens jelöléssel detektáltam más hiszton PTM-eket a mikrogyöngyökön áramlási citométerrel.

Ezt a stratégiát felhasználtam endogén vagy exogén nick-ek és azok kromatin környezetének vizsgálatára.

A sejtmagban fiziológias körülmények között is létrejönnek programozott módon tranziens egyszálú vagy duplaszálú DNS törések, pl. transzkripció során. A transzkripcióban az elongáció során az RNS-polimeráz II mozgása következtében a polimeráz előtt pozitív, mögötte negatív szuperhelicitás keletkezik. Az így kialakult torziós feszültséget topoizomeráz enzimek szüntetik meg, amelyek így nélkülözhetetlenek a transzkripcióhoz. Másfelől, promóter közeli DNS törések is keletkeznek a génaktiváció során, melyek kialakulásáért a TOP2 β felelős.

Transzkripció során keletkeznek az R-loop-ok is, melyekben a DNS egyik szálához komplementer RNS szál kötődik RNS-DNS hibrid-et létrehozva és kiszorítva a másik, immár egyszálú DNS szálát. Az R-loop-oknak többek között, a magas GC tartalmú promóterek DNS metilációjának megakadályozásában, bizonyos gének terminátor régiójában a transzkripció terminációjának elősegítésében, valamint izotípus váltás során az immunglobulin lókuszon történő rekombinációban van szerepe.

C. 2. EREDMÉNYEK

C. 2. 1. Hiszton PTM kombinációk detektálása

Kidolgoztam egy mikrogyöngy alapú citometriás módszert hiszton PTM-ek azonos nukleoszómán, vagy azonos hiszton molekulán történő együttes előfordulásának detektálására.

Ezt a módszert alkalmaztam endogén (DNS károsító ágensek távollétében kimutatható) γ H2A.X hiszton variánsokkal együtt előforduló hiszton PTM-ek vizsgálatára. Sztreptavidinált mikrogyöngyök felszínéhez γ H2A.X specifikus antitesteket kötöttem, melyen 200-750 bp-os kromatin fragmenteket immobilizáltam. Az endogén γ H2A.X-en keresztül a mikrogyöngyök felszínéhez kötött nukleoszómákon további hiszton PTM-eket jelöltem: H3K4me3-at és H3K27ac-t. Mindkét vizsgált PTM esetén kolokalizációt mutattam ki endogén γ H2A.X hiszton variánssal azonos vagy szomszédos nukleoszómákon. Az eredményeket megerősítettem STED mikroszkópiás módszerrel.

C. 2. 2. Endogén nick-ek és RNS-polimeráz II, valamint R-hurkok közelségének vizsgálata

Egy korábbi megfigyelésünk megerősítésére, miszerint *Saccharomyces cerevisiae* genomban az endogén nickek RNS-polimeráz II-vel és R-hurkokkal együtt találhatók meg, preferenciálisan a transzkripcióban aktív gének promóterein, az előzőekhez hasonló kísérleti stratégiát alkalmaztam, ahol biotinnal jelöltünk endogén nick-eket, nick transzláció segítségével.

Nick – RNS-polimeráz II kolokalizáció kimutatására a teljes genomra kiterjedő „ChIP-on-beads” vizsgálatot végeztem. A nick transzlációval megjelölt endogén nick-ek mellett, a Ser5-P RNS-polimeráz II szint magasabb volt, mint a Ser2-P RNS-polimeráz II. Negatív kontrollként nickáz enzimmel genomszerte létrehozott nick-eket használtam, amelyek esetén nem vártunk RNS-polimeráz II felhalmozódást.

Nick – R-loop kolokalizáció kimutatására szintén egy mikrogyöngy alapú módszert dolgoztam ki, mellyel R-hurkokat detektáltam endogén nick-ek közelében, DNS-polimeráz I-el végzett nick-transzláció segítségével.

C. 3. DISZKUSSZIÓ

A bemutatott mikrogyöngy alapú citometriás módszerek az együtt előforduló epigenetikai jellegek vizsgálatában lehetnek hasznosak, akár önállóan, vagy ChIP (re-ChIP) módszerekkel kombinálva. A módszert validáltuk γ H2A.X és H3K4me3, valamint H3K27ac közti kolokalizáció kimutatásával, melyekről ismert, hogy azonos nukleoszómákon fordulnak

elő transzkripciósan aktív gének promóter régiójában. Az eredményeket STED mikroszkópiás módszerrel erősítettük meg.

A módszer alkalmazási köre kiterjeszthető, ha a mikrogöngyök felszínének bevonására biotinált másodlagos antitestet alkalmazunk. Ezen keresztül bármilyen hiszton PTM, vagy hiszton variáns ellenes antitesttel be lehet vonni a mikrogöngyök felszínét, így a módszer alkalmas hiszton PTM és/vagy variáns kombinációk szűrésére.

A mikrogöngy alapú módszerek továbbá alkalmasak endogén nick-ek és RNS-polimeráz II, valamint R-hurkok molekuláris közelségének kimutatására. Az R-hurkok jelenléte a nick-transzlációt követő precipitátumban megerősíti azokat a korábbi észleleteinket, melyek arra utalnak, hogy a két entitás egy nukleoszómányi távolságon belül található meg.

A nick-ek és az RNS-polimeráz II Ser 5-P együttes előfordulása *S. cerevisiae* genomban összhangban van azzal az elképzeléssel, hogy a nick-ek szerepet játszhatnak a transzkripció szabályozásában.

A bemutatott eredmények alapján a “ChIP-on-beads” módszerek, melyek kivitelezhetők áramlási és lézer pásztázó citometriás mérési platformokon egyaránt, sokoldalúan használhatóak az epigenetikai kutatások területén.

ÁLLTALÁNOS DISZKUSSIÓ ÉS KONKLÚZIÓK

ÁLLTALÁNOS DISZKUSSIÓ

Az itt bemutatott eredmények alapján a citometria alkalmas *lokális genetikai* eltérések kimutatására. Ezeknek a módszereknek a rutin klinikai diagnosztikába történő bevezetése szempontjából előnyös, hogy áramlási citométer a klinikák többségén rendelkezésre áll, jelentős tapasztalati háttérrel. Leginkább ott lehet kihasználni a módszerben rejlő lehetőségeket, ahol egy meghatározott genetikai eltérést kell kimutatni nagy számú mintában. A PCR termékek T_m hőmérséklet különbségén alapuló áramlási citometriás mikrogöngy eljárás szabadalmaztatásra került a Magyar Szabadalmi Hivatalban, melynek címe: „Eljárás PCR-termékek hosszának összehasonlító analízisére citométeren és ezen eljárás alkalmazásai”.

A kvantitatív mikroszkópia szintén új lehetőségeket nyitott meg az *epigenetikai jellegek teljes genom szintjén történő vizsgálatában*. Az általunk kidolgozott QINESIn eljárás kiterjeszti a kvantitatív mikroszkópia alkalmazhatóságát az epigenetikai alap kutatás kérdéseire, nagy áteresztő képessége pedig alkalmassá teszi kromatin támadáspontú kismolekulák PTM ill. hiszton variáns specifikus hatásainak szűrésére.

A H2A.Z hiszton variáns tartalmú dimerek sajátos stabilitásának kimutatása jól mutatja, hogy az általunk kidolgozott QINESIn módszer jól használható eszköz a reader fehérjék nukleoszóma stabilitásra gyakorolt hatásának vizsgálatára is.

Az eljárás szabadalmi beadványként regisztrációra került a Magyar Szabadalmi Hivatalban, melynek címe: „Hiszton-DNS kölcsönhatás kvantitatív *in situ* mérése.”

A ChIP és MMA (multiplex microbead assay) kombinálásával létrehozott új módszerek azon biokémiai és genomikai módszereknek lehetnek alternatívái vagy kiegészítői, melyek a nukleoszómák hiszton PTM ill. hiszton variáns kombinációinak vizsgálatát célozzák.

KONKLÚZIÓK:

1. Módszertani konklúzió: A „lab-on-beads” koncepciót megvalósító új módszereink genetikai és epigenetikai eltérések kimutatására alkalmasak, amelyek akár high-throughput tesztek formájában is kivitelezhetőek.
2. Biológiai konklúziók: Az alábbiakban összefoglalom azokat a biológiailag releváns konklúziókat, amelyeket az új módszereinkel végzett vizsgálatok alapján vonhattunk le, egyúttal azt is demonstrálva, milyen sokféle biológiai kérdés vizsgálható a segítségükkel:

- 2.1. A H3K4me3 nukleoszómák destabilizációja a transzkripciósan aktív gének promóter-közei nukleoszómáin általános jelenség, sejttípustól és differenciációs állapottól független.
 - 2.2. A nick-ek okozta DNS relaxációnak jelentős hatása van a nukleoszómák stabilitására.
 - 2.3. A nick-ek nukleoszóma destabilizáló hatása DNS hurok méretű távolságokra terjedhet.
 - 2.4. A H2A.X hiszton variánsok foszforilációja csökkenti a nukleoszóma stabilitását.
 - 2.5. A H2A.Z hiszton variáns tartalmú nukleoszómák többségének stabilitása a kanonikus hiszton tartalmú dimerekétől nagyobb.
 - 2.6. A H2A.Z hiszton variáns tartalmú nukleoszómák stabilitása független a H2A.Z izotípusától.
 - 2.7. A H2A.Z hiszton variáns tartalmú nukleoszómák egy szubpopulációja interkalátor kezelésre rezisztens.
 - 2.8. A H2A.Z tartalmú nukleoszómák stabilitását a PWWP2A reader fehérjét kötő hiszton domén szabályozza.
3. Megfigyeléseink számos további kérdést vetettek fel:
- 3.1. Vajon más hiszton PTM-ek befolyásolják-e a nukleoszómák stabilitását?
 - 3.2. A PWWP2A általi nukleoszóma destabilizáció vajon egy általános, reader fehérjék általi stabilitás-szabályozó mechanizmus egy példája, melynek relevanciája kiterjeszthető lehet további hiszton variánsokra, esetleg hiszton PTM-ekre?
 - 3.3. Az R-loop-közelinek talált nick-ek valódi nickek-e, vagy egy részük R-hurkok szabad, tehát enzimatisus jelölésre alkalmas végálló 3'OH csoportját jelenti?

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Vegyszerek, DNS tisztítás, plazmidok

A genomiális és plazmid DNS tisztításához Intron G-DEX Genomic DNA Extraction Kit-et és DNA-midi Plasmid DNA Purification Kit-et (Intron Biotechnology, Seongnam-Si, South Korea) használtam, a gyártó utasításai szerint. A tisztítást megelőzően a különböző hosszúságú CAG ismétlődéseket tartalmazó plazmidokat, valamint a H2A.Z variánsokat tartalmazó plazmidokat *Escherichia coli* DH5 α baktériumtörzsbe transzformáltam hősokk módszer segítségével, majd 100 μ g/ml ampicillin tartalmú LB táptalajon növesztettem.

Sejtek, klinikai minták

A H2B-GFP, H3-GFP és H4-GFP fehérjét expresszáló HeLa sejteket, valamint a HCT116 sejteket (Developmental Therapeutics Branch, National Cancer Institute, Bethesda, Bethesda, MD, 20892) 10% FCS, 2 mM l-glutamin, 100 μ g/ml sztreptomycin, 100 U/ml penicillin tartalmú DMEM sejtenyésző médiumban növesztettük. A Jurkat sejteket 10% FCS, 2 mM l-glutamin 100 μ g/ml sztreptomycin, 100 U/ml penicillin tartalmú RPMI1640 sejtenyésző médiumban növesztettük, A vad típusú, a H2A.Z1 knock-out, a H2A.Z2 knock-out, valamint a mutáns H2A.Z1-et expresszáló dupla knock-out csirke DT-40 B sejteket (amelyeket Dr. Masahiko Harata, (Tohoku University) bocsátott a rendelkezésünkre) 2% csirke szérum, 8% FCS, 2 mM l-glutamin, 100 μ g/ml sztreptomycin, 100 U/ml penicillin tartalmú DMEM sejtenyésző médiumban növesztettük.

A Huntington choreával diagnosztizált betegek limfocitáiból a Pécsi Egyetem Klinikai Központ Orvosi Genetikai Intézetében tisztítottak genomiális DNS-t, valamint itt határozták meg a CAG ismétlődések számát is. A BRCA1 gén 5382 insC pont mutációját hordozó genomiális DNS minta a Debreceni Egyetem Klinikai Központ Laboratóriumi Medicina Intézetéből származik. Egészséges egyének limfocitáiból genomiális DNS mintákat saját magunk izoláltuk a Debreceni Egyetem Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet dolgozóitól vett perifériás vérből.

PCR reakciók

Huntington chorea:

A Huntingtin gén (IT15/HTT/HD) 1-es exonjában található CAG ismétlődések PCR amplifikációjához a primerek az Integrated DNA Technologies (Coralville, Iowa, USA) gyártótól származtak. Forward primer, Hunt1: biotin-5'-CAT GGC GAC CCT GGA AAA

GCT G-3', reverz primer, Hunt2: Cy5-5'-GGC GGT GGC GGC TGT TGC TGC TGC TGC TG-3' és reverz primer, Hunt3: Cy3-5'-GGC GGT GGC GGC TGT TGC TGC TGC TGC TG-3'. A PCR reakciót publikált protokoll alapján végeztük.

BRCA1 5382 insC pont mutáció:

A vad típusú allélra specifikus forward primert (BRCA1: Cy5-5'-AAA GCG AGC AAG AGA ATC GCA-3'), a mutációra specifikus forward primert (BRCA2: Cy5-5'-CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAC CTT AGC GAG CAA GAG AAT CAC C-3', ami 18 bp CAG ismétlődést tartalmazott az 5' végen) és a közös reverz primert (BRCA3: biotin-5'-AGT CTT ACA AAA TGA AGC GGC CC-3') egyszerre alkalmaztam egy multiplex PCR reakcióban. Az amplifikáció során a BRCA1 génből egy 126 bp hosszú szakaszt sokszorozítottam fel.

Heteroduplex analízis:

Templátként pMEP4 plazmid DNS-t alkalmaztam, amely tartalmazta a humán MLL gén breakpoint cluster régióját (a plazmid Peter Aplantól származik, NIH, Bethesda). A PCR amplifikációhoz használt primerek (pIL1 forward 5'-ATA TGA ATA CTC ATC ACT GAG TGC CTT TGG C-3'; pIL1-biotin forward 5'-(biotin)-ATA TGA ATA CTC ATC ACT GAG TGC CTT TGG C-3'; pM3 forward 5'-GCT GGA GTG TAA TAA GTG CCG A-3'; pM6 reverz 5'-AGC GAA CAC ACT TGGTAC AGATC-3'; pM6-6FAM reverz 5'-(6FAM)-AGC GAA CAC ACT TGG TAC AGA TC-3') az Integrated DNA Technologies (Coralville, IA) gyártótól származtak.

Egyszálú DNS létrehozása lineáris PCR-el:

Az amplifikációhoz csak a pIL1-biotin (forward) vagy a pM6-6FAM (reverz) primert használtuk. Templátként nem jelölt 574 vagy 357 bp hosszúságú PCR termékeket használtunk.

PCR termékek hibridizációja és emésztése Pvu II restrikciós endonukleázzal

A hosszú (574 bp) 6FAM-jelölt ill. a rövid (357 bp) 6FAM-jelölt egyszálú DNS fragmentet egyenlő arányban összekevertem biotin-jelölt, hosszú (574 bp) egyszálú komplementer lineáris PCR termékkel, 1 M NaCl-ot tartalmazó TE pufferben. A két mintát 95°C-ra melegítettem 5 percig, majd 2 órán át szobahőmérsékleten hibridizáltam.

Ezután 200 ng hibridet, 10 U Pvu II restrikciós endonukleázzal (Fermentas, Life Sciences) emésztettem.

PCR termékek bead-re kötése

A biotinnal és fluoreszcens festékkel jelölt PCR termékeket 10 000 sztreptavidinnel bevont polisztirol mikrogönggyel (6 µm diameter, purchased from Polysciences Inc., Warrington, Pennsylvania, USA) inkubáltam 40 percig 200 µl 1×PBS pufferben (150 mM NaCl, 3.3 mM KCl, 8.6 mM Na₂HPO₄, 1.69 mM KH₂PO₄, pH 7.4) szobahőmérsékleten fénytől védett helyen. Ezután a göngyöket 1×PBS pufferrel mostam 3-szor.

Hőkezelés formamid oldatban

A PCR termékeket hordozó mikrogöngyöket különböző koncentrációjú formamid oldatban hőkezelttem. A Huntington chorea kimutatásához a formamid koncentrációt 65-75 v/v % koncentráció tartományban titráltam, míg a BRCA1 5382insC pont mutáció esetén 57-62 v/v % koncentráció tartományban. A hőkezelést mintánként 10 000 mikrogönggyel, 200 µl térfogatban 3 percig végeztem, PCR csőben, 40°C-on sötétben, melyet mosás és áramlási citometriás analízis követett.

Mikrogöngyök felületének bevonása biotinált anti-γH2A.X antitesttel

10 µg biotinált egér monoklonális anti-γH2A.X antitestet (Merck-Millipore, Darmstadt, Germany; 1 mg/ml) inkubáltam 0.1 mg sztreptavidinált mágneses Dynabeaddel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), egy éjszakán át kevertetve 4°C-on.

Hiszton PTM kombinációk detektálása

Jurkat sejteket fixáltam 5 ml 1% formaldehiddel. Fixálás után a formaldehidet quench-eltem 2.5 M glicinnel. Mosás után a sejteket IP pufferben (1% SDS, 50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA, 1mM PMSF) szuszpendáltam és fel-le pipettázással lizáltam. A lizátumot lecentrifugáltam (12 000 g, at 4°C), majd a csapadékot IP pufferben történő szuszpendálás után szonikáltam (Bioruptor, Diagenode, New Jersey, USA). A szonikált mintákat centrifugálás után hideg IP pufferben szuszpendáltam és 10⁷ sejtnek megfelelő aliquot-okra osztottam. 500,000 előzőleg anti-γH2A.X antitesttel bevont Dynabead-et adtam az egyes aliquot-okhoz és overnight kevertettem 4°C-on. Ezután a mikrogöngyöket mostam és felszínükön megkötött nukleoszómákat immunofluoreszcens módszerrel jelöltem nyúlban termeltetett poliklonális anti-H2A.X (Abcam, Cambridge, UK; 1 mg/ml), poliklonális anti-H3K4me3 (Abcam, Cambridge, UK; 1 mg/ml) vagy poliklonális anti-H3K27ac (Abcam, Cambridge, UK; 1 mg/ml) elsődleges antitesttel, amelyeket fluoreszcensen jelölt másodlagos antitestekkel jelöltem a DNS propidium-jodid festésével párhuzamosan.

Nick-ek és nick-ekhez közel eső R-hurkok kimutatása

Humán perifériás vérből Ficoll gradiens centrifugálással limfocitákat izoláltam. A sejteket mostam 1×PBS pufferrel és fixáltam 1% formaldehiddel. A sejtszuspenziót 1:1 arányban kevertem 1×PBS-ben oldott 1% LMP-vel, amelyből agaróz blokkokat készítettem. A blokkokat mostam 1×PBS-el, majd a sejteket lízis pufferben (1% Sarcosyl, 10 mM Tris-HCl pH 8, 0.4 M EDTA, 0.5 mg/ml Proteinase K) lizáltam 55°C-on, 24 órán keresztül. Ezután a blokkokat mostam TE pufferben (10mM Tris, 1 mM EDTA pH 8.0) és kezeltem PMSF-el. Enzimes kezelés előtt a blokkokat ekvilibráltam DNS-polimeráz I vagy TdT pufferrel, majd nick-transzláltam DNS-polimeráz I (1×DNS-polimeráz I puffer, 5 µM ddNTP mix, 1 µM dNTP mix, 22.5 U/block DNS-polimeráz I enzyme), vagy TdT (1×TdT buffer, 5 µM biotin-dUTP, 10 U/block TdT enzyme) enzimekkel. Mosás után a blokkokat felolvasztottam és β-agaráz enzimmel emésztettem. A megemésztett blokkokat szonikáltam, majd a kitisztított DNS fragmenteket sztreptavidinnel bevont Dynabead-ek felszínére kötöttem. Mosás után a mikrogöngyöket immunfluoreszcensen jelöltem S9.6 RNS/DNS-hibrid ellenes antitesttel. Az elsődleges antitestet fluoreszcensen jelölt másodlagos antitesttel jelöltem és a DNS-t propidium-jodiddal festettem. A jelölt mikrogöngyöket mosás után áramlási citométerrel analizáltam.

Áramlási citometria

Az áramlási citometriás olvadáspont méréseket Becton Dickinson FACSAria készülékkel (San Jose, California, USA) végeztem. Az emittált fluoreszcens fényt PI/Yellow és Far Red csatornában detektáltam 585/42 és 675 LP szűrőkön keresztül.

A heteroduplexek detektálását Becton Dickinson FACScan készüléken (San Jose, California, USA) végeztem. Az emittált fluoreszcens fényt 530/30 és 585/42 szűrőkön keresztül FL1 és FL2 csatornában detektáltam.

A hiszton kombinációk és a nick-ekhez közel eső R-hurkok kimutatásához Becton Dickinson FACS Aria III készüléket (San Jose, California, USA) használtam. Az emittált fluoreszcens fényt PI/Yellow és Far Red csatornában 585/42 és 675 LP szűrőkön keresztül detektáltam.

A FACS Aria III készülékkel végzett méréseket Tarapcsák Szabolcs végezte el.

Teljes genom „ChIP-on-beads” vizsgálat

Sejtmag izolálás:

S. cerevisiae sejteket fixáltam 4% paraformaldehiddel, majd quenchelem 2.5 M glicinnel. A fixált sejteket 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)/30 mM DTT oldatban mostam kétszer, majd kezeltem lítikáz enzimmel. A szferoplasztokat lizáltuk és homogenizáltam N pufferben (30 mM HEPES pH 7.6, 3 mM DTT, 25 mM Na₂SO₄, 5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 10% glycerol, 0.5% NP-40, 7.2 mM spermin, 1 mM PMSF). A homogenizáláshoz Dounce homogenizátort használtam.

Nickáz kezelés és nick-transzláció:

Az élesztő sejtmagokat mostam 1×PBS/EDTA oldatban, majd nickáz pufferben (10 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mg/ml BSA). A kontroll mintákban random nick-eket hoztam létre genom szerte Nt.CviPII nickáz enzimmel (felismerő hely: CCD; New England Biolabs Inc., Ipswich, Massachusetts, USA). Az endogén, illetve nickáz kezeléssel létrehozott nick-eket a korábban leírtak szerint nick-transzláltam.

A kromatin fragmentációja és bead-re kötése:

A nick-transzlált sejtmagokat FastPrep-24™ 5G Instrument bead beater-el (MP Biomedicals, Santa Anna, California, USA) homogenizáltam, majd szonikáltam Bioruptor Plus sonicator (Diagenode, Denville, New Jersey, USA) készülékkel. A szonikált mintákhoz sztreptavidinnel bevont Dynabead-eket (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) adtam, majd mosást követően a mikrogöngyöket agarózba ágyaztam 8-lyukú Ibidi kamrában (Ibidi, Martinsried, Germany).

Immunofluoreszcens jelölés:

Az agarózba ágyazott mikrogöngyöket 360 mM NaCl-al kiegészített lízis pufferrel, mosó pufferrel (10 mM Tris-HCl pH 8, 250 mM LiCl, 0.5% Na-deoxycholate, 1 mM EDTA), végül 1×PBS/EDTA-val mostam. Mosás után indirekt immunofluoreszcenciás jelölést végeztem nyúlban termeltetett poliklonális anti-RNS-polimeráz II Ser2-P (Abcam, Cambridge, UK; 1 mg/ml) vagy poliklonális anti-RNS-polimeráz II Ser5-P (Abcam, Cambridge, UK; 1 mg/ml) elsődleges antitestekkel, majd mosás után fluoreszcensen jelölt másodlagos antitestekkel. Antitest jelölés után a DNS-t propidium jodiddal festettem és a fluoreszcenciát lézer pásztázó citometriával detektáltam (LSC; lásd később).

Háttér fluoreszcencia meghatározása:

Az első LSC mérést követően az agaróz gélét equilibráltam DNáz I pufferrel (10 mM Tris-HCl pH 8, 0.1 mM CaCl₂, 2.5 mM MgCl₂) és mikrogöngyökon lévő DNS-t DNáz I enzimmel emésztettem. Enzim kezelés után a mikrogöngyöket mostam, majd újra lemértem LSC-vel. A DNáz kezelés után mért fluorszcencia intenzitást levontam a kezelés előtt mért fluoreszcencia intenzitásból.

Élő sejtek beágyazása alacsony olvadáspontú agarózba

Beágyazás előtt a 8-lyukú Ibidi kamrákat (Ibidi, Martinsried, Germany) 2-szer bevontam 1% (m/v) low melting point (LMP) agarózzal.

Beágyazáshoz a sejteket összekevertük 1% LMP agarózzal, a well-ek közepére pipettáztam és lefedtem házi készítésű fedőlemezekkel.

Permeabilizálás és só vagy interkalátor kezelés

Agarózba ágyazás után a sejteket permeabilizáltam 1% (v/v) Triton X-100 detergenssel. Permeabilizálás után kimostam a detergenst és a sejtmagokat különböző koncentrációjú só, vagy interkalátor oldatokkal kezeltem.

Immunofluoreszcens jelölés

Só, vagy interkalátor kezelés után a sejtmagokat blokkoltam Blotto Non-Fat Dry Milk tejpörrel (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, California, USA). Blokkolás után a sejtmagban maradt hiszton fehérjét immunofluoreszcens módszerrel jelöltem nyúlban termeltetett poliklonális anti-H2A (Abcam, Cambridge, UK; 0.4 mg/ml), anti-H2A.X (Abcam, Cambridge, UK; 1 mg/ml), egérben termeltetett monoklonális anti-γH2A.X (Merck-Millipore, Darmstadt, Germany; 1 mg/ml), anti-H3K4me3 (0,5 mg/ml) vagy anti-H3K27me3 (0,5 mg/ml) elsődleges, majd fluoreszcensen jelölt másodlagos entitestekkel. Antitest jelölés után a sejtmagokat fixáltam 1% formaldehiddel és festettem propidium-jodiddal. A fluoreszcencia intenzitást lézer pásztázó citometriás módszerrel detektáltam.

Etopozid kezelés

Az agarózba ágyazott élő sejtek kezeléséhez az etopozidot (TEVA, Debrecen, Hungary) sejttenyésztő médiumban hígítottam. A sejtek kezelése sejttenyésztő médiumban, 37°C-on történt.

Nickáz és DNáz I kezelés

Élő sejtek ágyaztam agarózba a fent leírtak szerint, majd lízis pufferrel (0.4% (v/v) Triton X-100, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH8) és 1% (v/v) Triton X-

100-al kezeltem. Ezután Nt.CviPII nickáz enzimmel (recognition site: CCD; New England Biolabs Inc., Ipswich, Massachusetts, USA) vagy DNáz I enzimmel kezeltem a sejtmagokat, a korábban leírtak szerint.

Immuno- keresztkötéses kísérletek

Agarózba ágyazott és permeabilizált sejteket blokkoltam, majd indirekt immunofluoreszcens módszerrel jelöltem nyúlban termeltetett poliklonális anti-H2A elsődleges és A647-konjugált másodlagos antitesttel. Antitest jelölés után a sejtmagokat mostam és kezeltem különböző koncentrációjú só, vagy interkalátor oldatokkal. Ezután a mintákat formaldehiddel fixáltam, a DNS-t propidium-jodiddal festettem és s fluoreszcenciát LSC-vel detektáltam.

Gélelektroforetikus analízis

Az agarózba ágyazott sejteket permeabilizáltam és deproteináltam. A nem denaturáló gélelektroforézishez a nickeket duplaszálú törésekké alakítottam S1 nukleázzal (1000 U/ml) emésztve a sejtmagokat (1h, 37°C). A 3-300 kb fragment méret analíziséhez CHEF mapper XA Pulse Field Electrophoresis System készüléket (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, California, USA), vagy MJ Research PPI-200 power inverter (Field Inversion Gelectrophoresis; FIGE) készüléket alkalmaztam. DNS markernek O'GeneRuler 1kb DNA ladder (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), lambda DNS-t (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) és Pulse Marker 2200-225 kb markereket használtam.

Automatizált mikroszkópia

Automatizált mikroszkópiás képalkotáshoz iCys lézer pásztázó citométert használtam (iCys® Research Imaging Cytometer; CompuCyte, Westwood, Massachusetts, USA). A GFP-t, SYBR Gold-ot, A488-at, doxorubicint és PI-ot 488 nm Argon ion lézerrel, az A647-et pedig 633 nm HeNe lézerrel gerjesztettem. Az elúciós mérések során az emittált fluoreszcens fényt UPlan FI 20× (NA 0.5) objektíven keresztül gyűjtöttem, 1.5 µm-es lépésekkel. Az agarózba ágyazott mikrogöngyök esetén az emittáltfluoreszcens fényt UPlan FI 40× (NA 0.65) objektíven keresztül gyűjtöttem, 0.5 µm-es lépésekkel. A GFP és az A488 fluoreszcens jeleket 510/21 nm és 530/30 nm szűrőkön keresztül detektáltam, míg a doxorubicin, A647 és PI fluoreszcens jeleket 650/LP nm szűrőn keresztül detektáltam. A méréshez és s kiértékeléshez az iCys 7.0 programot használtam. A G1 sejtciklus fázisú sejteket a megfestett DNS által kibocsátott fluorszcencia alapján különítettem el.

Konfokális Lézer Pásztázó Mikroszkópia (CLSM)

A konfokális képeket FLUOVIEW FV 1000 mikroszkóppal (Olympus, Center Valley, Pennsylvania, USA) készítettem, UPLS APO 60× (NA 1.35) objektívet használva. A GFP-t és A488-at 488 nm Argon ion lézerrel gerjesztettem. Az A647-et és PI-ot 633 nm és 543 nm HeNe lézerrel gerjesztettem. A képek kiértékeléséhez Image J programot (<http://imagej.nih.gov/ij/>) használtam.

STED mikroszkópia

A szuperrezolúciós mikroszkópos felvételeket Nikon NiE (Upright) mikroszkóppal készítettük, 100x NA=1.45 objektívet használva. Az immunofluoreszcens jelölés során a másodlagos antitestek Abberior star 580 és Abberior star red festékekkel voltak konjugálva. A ko-lokalizáció mértékének meghatározásához Image J programot használtunk. A STED mikroszkópiás képeket Péter Nánási készítette.

Kromatin immunoprecipitáció, szekvenálás, bioinformatikai analízis

A kromatin immunoprecipitáció szekvenálás (ChIP-Seq) és ChIP-qPCR kísérletekben a ChIP-Seq könyvtárak két biológiai replikátumból készültek. A ChIP-Seq kísérleteket Simándi Zoltánnal együtt végeztem, a bioinformatikai analízist Horváth Attila végezte.

Mintakészítés MS analízishez

Élő sejteket ágyaztam agaróz blokkokba, majd a sejteket detergenssel permeabilizáltam a febt leírt módon. A permeabilizált sejtmagokat EBr-al kezeltem, majd az interkalátorra rezisztens nukleoszómákat 2 M NaCl oldattal kimostam. A fehérjéket ezután 10K Amicon szűrőn (Merck-Millipore, Darmstadt, Germany) betöményítettem és a 2 M NaCl-ot 1×PBS pufferre cseréltem. A szűrőről lemosott fehérjéket -20°C-on tároltam.

SDS-PAGE és LC-MS/MS analízis

A fehérjéket Bio-Rad mini tetra cell (Bio-Rad) készülék segítségével, 10%-os SDS poliakrilamid gélen analizáltuk. Az SDS-PAGE analízis Kalló Gergő végezte a Proteomics Core Facility keretein belül.

Az SDS-PAGE gélen látott csíkokat kivágtuk, tripszinnel emésztetteük és dithiothreitolal redukáltuk. Az LC-MS/MS adataiból a fehérjék azonosítását a Protein-Pilot 4.0 (ABSciex) programmal végeztük a SwissProt adatbázis alapján.

Az MS analízist Kalló Gergő végezte a Proteomics Core Facility keretein belül.

ÖSSZEFOGLALÁS

Új citometriai módszereket dolgoztam ki genetikai és epigenetikai kérdések megválaszolására: (A) rövid DNS régiókban bekövetkező hossz-változások, illetve DNS szekvenciabeli eltérések detektálására, (B) nukleoszóma stabilitás *in situ* mérésére, valamint (C) nukleoszómákkal asszociált epigenetikai módosítások analízisére.

(A) Az áramlási citometriás platformra épülő genetikai teszt sztreptavidint hordozó mikrogöngyök felszínén immobilizált és fluoreszcensen jelölt PCR termékek T_m analízisén alapul. A módszer felhasználhatóságát, érzékenységét a Huntington chorea hátterében álló triplet expanzió, illetve a BRCA1 gén egyik pontmutációjának kimutatásával demonstráltam.

(B) A pásztázó lézermikroszkópos (citometriás) platformra épülő nukleoszóma stabilitást vizsgáló *in situ* módszer a hisztonok sókezelés vagy interkalátorral történő kezelés hatására bekövetkező, kromatinról történő disszociációjának mérésén alapul. A sókezelés a nukleoszómák ionerősség-függő, az interkalátor kezelés a nukleoszómák DNS szuperhelicitás-függő stabilitásának mérését teszi lehetővé, hiszton PTM ill. hiszton variáns specifikus módon. A módszert különböző hiszton PTM-ek, illetve a H2A.Z, H2A.X és γ H2A.X hiszton variánsok összehasonlító vizsgálatára használtam fel. Kimutattam, hogy a kromatin relaxációja (nick-ek létrehozásával) nukleoszóma destabilizációt okoz, amelynek jelentős szerepe lehet a DNS hozzáférhetőségének epigenetikai szabályozásában. A ≥ 10 kb távolságban létrehozott nick-ek általi relaxáció már elégségesnek bizonyult a nukleoszómák többségének destabilizációjához, ami azt mutatja, hogy a bevitt nick-ek hatása nem lokális, a relaxáció tovaterjed kromatin hurok méretű távolságokra. A módszerrel végezhető megfigyelések potenciális biológiai jelentőségét mutatja a H2A.Z reader protein nukleoszóma stabilitást befolyásoló funkciójának kimutatása is.

(C) Az áramlási citometriás és pásztázó lézermikroszkópos citometriás platformra épülő epigenetikai teszt izolált, mikrogöngyökön immobilizált mononukleoszómák epigenetikai módosítás kombinációinak analízisén alapul. Ez a mérési elv alkalmasnak bizonyult nick-ekhez közeli, iniciáló ill. elongáló RNS-polimeráz II molekulák ill. R-loop-ok differenciális detektálására.

Általános konklúzióként megállapítható, hogy a citometriás analízisre épülő és a molekuláris biológiai metodikák előnyös kombinációi alapvető genetikai és epigenetikai kérdések megválaszolására, gyakorlati problémák megoldására kínálnak új, még kevésbé kiaknázott lehetőségeket.



Nyilvántartási szám: DEENK/358/2018.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Imre László

Neptun kód: LQVY78

Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

MTMT azonosító: 10038939

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Hegedűs, É., Kókai, E., Nánási, P. P., **Imre, L.**, Halász, L., Jossé, R., Antunovics, Z., Webb, M. R., El Hage, A., Pommier, Y., Székvölgyi, L., Dombrádi, V., Szabó, G.: Endogenous single-strand DNA breaks at RNA polymerase II promoters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 2018, 1-20, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gky743>
IF: 11.561 (2017)
2. **Imre, L.**, Simándi, Z., Horváth, A., Fenyőfalvi, G., Ifj., N. P. P., Niaki, E. F., Hegedűs, É., Bacsó, Z., Weyemi, U., Mauser, R., Ausio, J., Jeltsch, A., Bonner, W., Nagy, L., Kimura, H., Szabó, G.: Nucleosome stability measured in situ by automated quantitative imaging. *Sci Rep.* 7 (1), 1-15, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-12608-9>
IF: 4.122
3. **Imre, L.**, Balogh, I., Kappelmayer, J., Szabó, M., Melegh, B., Wanker, E., Szabó, G.: Detection of mutations by flow cytometric melting point analysis of PCR products. *Cytometry A.* 79 (9), 720-726, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.a.21104> [doi]
IF: 3.729
4. Hegedűs, É., **Imre, L.**, Pataki, J., Lizanecz, E., Székvölgyi, L., Fazakas, F., Bacsó, Z., Tóth, A., Szabó, M., Seres, Z., Szabó, G.: Heteroduplex analysis using flow cytometric microbead assays to detect deletions, insertions, and single-strand lesions. *Cytometry A.* 73 (3), 238-245, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.a.20492>
IF: 3.259





További közlemények

5. Hrubí, E., **Imre, L.**, Robaszkiewicz, A., Virág, L., Kerényi, F., Nagy, K., Varga, G., Jenei, A., Hegedűs, C.: Diverse effect of BMP-2 homodimer on mesenchymal progenitors of different origin.
Hum. Cell. 31 (2), 139-148, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s13577-018-0202-5>
IF: 2.109 (2017)
6. Hrubí, E., **Imre, L.**, Bacsó, Z., Biró, S., Jenei, A., Hegedűs, C.: BMP-2 hatása a humán embrionális szájpadról származó mesenchymalis preosteoblast sejtek morfológiájára és proliferációjára.
Fogorv. Szle. 108 (3), 99-105, 2015.
7. Simándi, Z., Czipa, E., Horváth, A., Kőszeghy, Á., Bordás, C., Pólska, S., Juhász, I., **Imre, L.**, Szabó, G., Dezső, B., Barta, E., Sauer, S., Károlyi, K., Kovács, I., Hutóczki, G., Bognár, L., Klekner, Á., Szűcs, P., Bálint, B. L., Nagy, L.: PRMT1 and PRMT8 regulate retinoic acid-dependent neuronal differentiation with implications to neuropathology.
Stem Cells. 33 (3), 726-741, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/stem.1894>
IF: 5.902
8. Székvölgyi, L., **Imre, L.**, Doan-Xuan, Q. M., Hegedűs, É., Bacsó, Z., Szabó, G.: Flow Cytometric and Laser Scanning Microscopic Approaches in Epigenetics Research.
Methods Mol. Biol. 567, 99-111, 2009.
DOI: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-60327-414-2_7
9. Székvölgyi, L., Rákossy, Z., Bálint, B. L., Kókai, E., **Imre, L.**, Vereb, G., Bacsó, Z., Goda, K., Varga, S., Balázs, M., Dombrádi, V., Nagy, L., Szabó, G.: Ribonucleoprotein-masked nicks at 50-kbp intervals in the eukaryotic genomic DNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 104 (38), 14964-14969, 2007.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0702269104>
IF: 9.598





10. Székvölgyi, L., Bálint, B. L., **Imre, L.**, Goda, K., Szabó, M., Nagy, L., Szabó, G.: Chip-on-beads:
flow-cytometric evaluation of chromatin immunoprecipitation.
Cytometry A. 69A (10), 1086-1091, 2006.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.a.20325>
IF: 3.293

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 43,573

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
22,671**

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, 2018.11.15.

