

**Epigenetikai módosítások hatásának és a cirkadián ritmus
zavarának vizsgálata a Huntington-kór *Drosophila*
modelljében**

Doktori értekezés

Faragó Anikó

Témavezető: Dr. Bodai László
tanszékvezető egyetemi docens



Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi és Informatikai Kar,
Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék

Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi és Informatikai Kar,
Biológia Doktori Iskola

Szeged

2021

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK	1
1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	4
1.1. Az epigenetika tárgyköre	4
1.2. Hisztonok és a kromatin szerveződése.....	4
1.3. Hiszton módosítások, kromatin remodeling és hiszton variánsok	6
1.3.1. A H3 hiszton variánsai.....	8
1.3.2. A H3 hisztonok sejtmagi transzportja	9
1.4. Transzkripcionálisan akív gének jellemző hiszton módosításai.....	10
1.5. A hiszton acetiltranszferázok csoportosítása	11
1.5.1. A CBP és p300 acetiltranszferázok	12
1.5.2. A Gcn5 és Pcaf acetiltranszferázok	13
1.6. Hiszton deacetilázok csoportosítása.....	13
1.6.1. A Sir2 deacetiláz.....	14
1.7. A cirkadián ritmus szabályozása.....	15
1.7.1. A CBP szerepe a cirkadián ritmus szabályozásában	18
1.8. Huntington-kór	19
1.8.1. Huntington-kór és a hiszton acetiláció kapcsolata.....	20
1.8.2. A cirkadián ritmus zavara Huntington-kór esetén	21
1.9. <i>Drosophila melanogaster</i>, mint humán betegség modell.....	22
1.9.1. A Huntington-kór <i>Drosophila</i> modellje	22
2. CÉLKITŰZÉSEK	23
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	24
3.1. <i>Drosophila</i> genetikai módszerek.....	24
3.1.1. A kísérletek során használt <i>Drosophila melanogaster</i> törzsek	24
3.1.2. Törzsek és keresztezések fenntartása	26
3.1.3. Transzgének kifejeztetésére használt expressziós rendszer	27

3.1.4. Életképesség vizsgálat	28
3.1.5. Élettartam vizsgálat	29
3.1.6. Neurodegeneráció vizsgálat	31
3.1.7. Motoros képességek vizsgálata	31
3.1.8. Cirkadián ritmus vizsgálata	32
3.1.9. Keresztezési sémák a molekuláris kísérletekhez szükséges minták előállításához	35
3.1.9.1. RNS izoláláshoz szükséges keresztezések	35
3.1.9.2. RNS-DNS mennyiségi összehasonlításához szükséges keresztezések	36
3.1.9.3. Hiszton sóelúcióhoz szükséges keresztezések	37
3.2. Molekuláris biológiai módszerek	37
3.2.1. RNS izolálás és koncentráció meghatározás	37
3.2.2. RT-qPCR	37
3.2.3. Transzkriptomikai analízis	39
3.2.4. RNS/ DNS arány meghatározása	39
3.2.5. polyA mRNS/ totál RNS arány meghatározása	40
3.2.6. Hiszton sóelúció	41
3.2.7. Western blot	42
4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	44
4.1. Hiszton módosítások szerepe a Huntington-kór pathogenezisében	44
4.1.1. Neuronálisan expresszált <i>mHtt</i> és <i>H3.3A-mut</i> expressziós szintek validálása	44
4.1.2. Neuronálisan expresszált <i>H3.3A-mut</i> fehérjék sejtmagi lokalizációjának és kromatin kötöttségének validálása	45
4.1.3. Neuronálisan expresszált <i>H3.3A-mut</i> transzgenek életképességre gyakorolt hatásának vizsgálata	48
4.1.4. Neuronálisan expresszált <i>H3.3A-mut</i> transzgenek HD legyek életképességére gyakorolt hatásának vizsgálata	49

4.1.5. Neuronálisan expresszált <i>H3.3A-mut</i> transzgének HD legyek élettartamára gyakorolt hatásának vizsgálata.....	50
4.1.6. Neuronálisan expresszált <i>H3.3A-mut</i> transzgének HD legyek neurodegenerációjára gyakorolt hatásának vizsgálata	51
4.1.7. Adult korban neuronálisan expresszált <i>H3.3A-mut</i> transzgének HD legyek élettartamára gyakorolt hatásának vizsgálata	52
4.1.8. Adult korban neuronálisan expresszált <i>H3.3A-mut</i> transzgének HD legyek motoros képességére gyakorolt hatásának vizsgálata.....	54
4.1.9. Adult korban neuronálisan expresszált <i>H3.3A-mut</i> transzgének HD legyek napi aktivitására gyakorolt hatásának vizsgálata.....	56
4.1.10. HAT és HDAC expressziós szint változás életképességre gyakorolt hatásának vizsgálata <i>H3.3A-K14-mut</i> transzgéneket expresszáló HD legyekben.....	59
4.1.11. Transzkriptomikai változások vizsgálata <i>H3.3A-K14-mut</i> transzgéneket expresszáló HD legyekben	62
4.1.12. Totál RNS/ DNS és polyA mRNS/ totál RNS arány vizsgálata <i>H3.3A-K14-mut</i> transzgéneket expresszáló HD legyekben	67
4.2. Cirkadián ritmus zavar vizsgálata Huntington-kór modellben	71
4.2.1. HD legyek cirkadián ritmus zavarának fenotipikus jellemzése.....	71
4.2.2. HD legyek cirkadián ritmus zavarának hátterében álló molekuláris változások vizsgálata.....	74
4.2.3. A <i>dCBP/ nejire</i> funkcióvesztésének hatása a cirkadián ritmusra.....	76
4.2.4. A <i>dCBP</i> overexpresszió hatása a HD legyek cirkadián ritmus zavarára.....	80
5. DISZKUSSZIÓ.....	85
6. A DOKTORI ÉRTEKEZÉS ÖSSZEFOGLALÁSA.....	96
7. SUMMARY OF THE DISSERTATION	100
8. IRODALOMJEGYZÉK.....	104
9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	114
10. PUBLIKÁCIÓK LISTÁJA	115
11. FÜGGELÉK	116

1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1.1. Az epigenetika tárgyköre

Az epigenetika az 1940-es évek eleje óta ismert fogalom, mely Conrad Waddington nevéhez köthető¹. Eredeti definíciója szerint az epigenetika egy genotípusból adott fenotípus kialakításáért felelős molekuláris szabályozó folyamatokat vizsgálja, melyek a genetikai szerkezet „felett” (görög – epi) működnek. Később ez a definíció tovább szűkülve a molekuláris biológusok számára olyan mitotikusan vagy meiotikusan öröklődő változások tanát jelenti, amelyek nem magyarázhatóak a DNS bázissorrendjében történő változással². Az elsődleges molekuláris epigenetikai folyamatok, amelyek a kromatin szerkezet regulációján keresztül felelősek a génexpresszió szabályozásáért, a DNS metiláció, a poszt-transzlációs hiszton módosítások, a kromatin remodeling, illetve a hiszton variánsok kromatinba építése³. A DNS szekvenciáját nem érintő, sejten belüli, öröklődő módosítások összességét nevezzük epigenomnak⁴. Az epigenom plaszticitás a sejt differenciáció és a fenotipikus jellegek kialakításának kulcseleme, ami nem csak az embrionális fejlődés, hanem az adult szövetek homeosztázisának fenntartásához is elengedhetetlen⁵. A környezeti hatások, az életmód és a stressz nagy hatással vannak az epigenetikai folyamatokra⁶, továbbá azok zavara káros következményekkel jár, amely öregedéshez és betegségekhez vezethet, éppen ezért rendkívül fontos az epigenom integritásának megőrzése⁵.

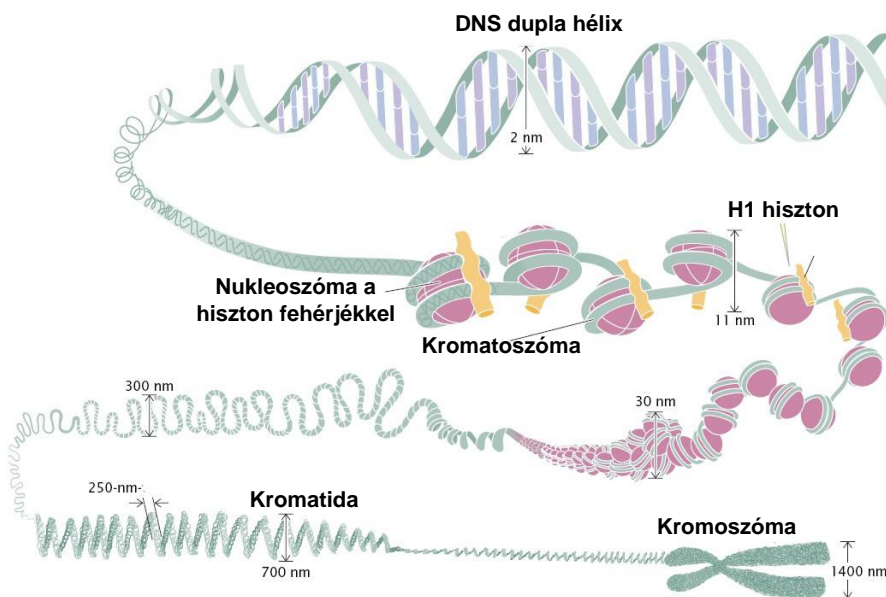
1.2. Hisztonok és a kromatin szerveződése

Ahhoz, hogy az eukarióta élőlények méteres nagyságrendű DNS állománya elférjen a mikrométeres nagyságú sejtmagban rendkívül nagymértékű tömörítésre van szükség, melyet a DNS-ből, hiszton és nem-hiszton fehérjékből álló kromatin szerkezet biztosít. A többszörösen csomagolt és tömörített kromatin struktúra miatt a DNS szál nehezen hozzáférhető a sejt működéséhez alapvetően szükséges folyamatok (DNS replikáció, DNS hibajavítás vagy transzkripció) szabályozásában rész vevő fehérje faktorok számára. Ezért a sejt normális működésének érdekében a kromatin szerkezet dinamikusan változó és szigorúan szabályozott létrejötté és felbomlása szükséges⁷.

A kromatinban legnagyobb mennyiségben jelen lévő fehérjék a kicsi, pozitív töltésű hiszton fehérjék, melyeknek 5 fő típusa van: H1, H2A, H2B, H3 és H4⁷. A hisztonokról először az 1880-as években Albrecht Kossel írt, melyeket lúd eritrocitákból nyert ki és a sejtmag pepton-szerű alkotóiként jellemzett. Megfigyelései alapján arra a következtetésre jutott, hogy a hisztonok valószínűleg nukleinsavhoz kötöttek, ugyanis sósav kezelés hiányában nem,

azonban sósavval történő izolálást követően vízben szolubilisek voltak⁸. Mára már tudjuk, hogy a kromatin szerkezet kialakításában részt vevő H2A, H2B, H3 és H4 úgynevezett „core” hisztonok evolúciósan konzervált szerkezetű fehérjék, melyeket kódoló gének a genomban, számos gépkópiát tartalmazó kanonikus gén klaszterekben helyezkednek el. Továbbá a hiszton fehérjéket kódoló mRNS-ek 3' vége a többi mRNS-től eltérően nem poliadeninált⁹. A „core” hisztonok α -helikális illetve nem-helikális ún. „loop” régiókkal rendelkeznek, melyek a „histone fold” domén és a „histone handshake” szerkezet kialakításában játszanak fontos szerepet. A hasonló szerkezetű „histone fold” doménjeiken keresztül kapcsolódva a H3 – H4, illetve a H2A – H2B létrehozzák a „histone handshake” szerkezetet. A „histone fold” domének továbbá fontos szerepet játszanak a DNS kötésben is, a hisztonok hidrogén-híd vagy ionos kölcsönhatás kialakításával kapcsolódnak a DNS foszfodiészter gerincéhez¹⁰.

A kromatin szerveződés első szintje a nukleoszóma kialakítása, ez két kópiában tartalmaz H2A, H2B, H3 és H4 „core” hisztonokat, melyek köré nagyjából kétszer tekeredik fel egy 147 bp hosszúságú DNS szál, továbbá minden nukleoszómát egy 10-60 bázispár hosszúságú linker DNS szakasz választ el egymástól. A kromatin szerveződés következő szintje a core hisztonok és a H1 hiszton kölcsönhatásának köszönhetően kialakuló kromatoszóma. A H1 hiszton egy 20-22 bp hosszúságú DNS szakaszhoz kötődik ott, ahol a DNS elhagyja a nukleoszóma magját alkotó hiszton oktamert, így egy kapocsként segíti annak rögzítését. A kromatoszómák a linker DNS által állandó távolságra helyezkednek el egymástól, így egy 11 nm átmérőjű gyöngyfűzér struktúrának nevezett szál jön létre (1. ábra)¹¹.



1. ábra: A kromatin szerveződése metafázisos kromoszómákban.

(Pierce, 2012 alapján)¹¹

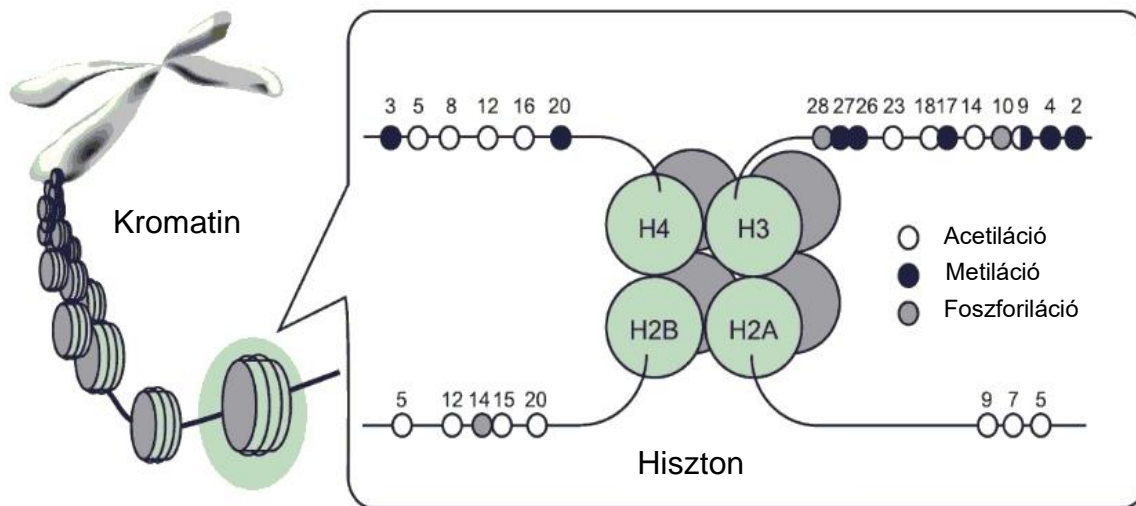
A további kondenzálódás érdekében a szomszédos nukleoszómák összekapcsolódva egy tömörebb, szorosan csomagolt 30 nm átmérőjű helikális struktúrát alakítanak ki, ez a szolenoid szerkezet. Sejtosztódás előtt a 30 nm átmérőjű struktúrák sorozatos hurkokból álló doméneket formálva még tovább kondenzálódnak egy 300 nm átmérőjű kromatin szállá. Ezek a szálak tovább tekeredve kialakítják a 700 nm átmérőjű kromatidákat, majd a testvér kromatidák összeállva egy kb. 1400 nm átmérőjű kromoszómát hoznak létre (1. ábra) ¹¹.

A kromatin két alapvető állapotban fordulhat elő: ezek a heterokromatin és az eukromatin. A heterokromatin egy erősen kondenzált és elektrondenz, génekben viszonylag szegény struktúra. A heterokromatin egyik típusa funkcionálisan teljesen inaktív (konstitutív heterokromatin), míg másik típusa bizonyos körülmények között aktívvá válhat (fakultatív heterokromatin). Ezzel szemben az eukromatin lazább szerkezetű és itt találhatóak az aktívan átíródó gének. Az eukromatin a sejtciklus során végigmegy a kondenzáció és dekondezáció folyamatán, így lehetővé téve a sejt működéséhez szükséges folyamatokat, míg a heterokromatin állandóan erősen kondenzált állapotban marad ¹².

1.3. Hiszton módosítások, kromatin remodeling és hiszton variánsok

A nukleoszómában található „core” hisztonok mindegyike 20-35 többségében bázikus aminosavakból álló, a nukleoszómából kinyúló, flexibilis N-terminális farki résszel rendelkezik. A hisztonokon ezek a farki régiók evolúciósan konzerváltak, azonban aminosav-összetételük nem kódol tipikus másodlagos szerkezeti motívumokat, általában úgynevezett „random coil” szerkezetet vesznek fel ^{10,13}. Minden hisztonban nagy mennyiségben találhatóak arginin (Arg, R) és lizin (Lys, K) pozitívan töltött aminosavak, amelyek nettó pozitív töltést kölcsönözve a hisztonnak vonzzák a DNS foszfátjának negatív töltését, ezáltal szoros kapcsolatot tartva a DNS és a hisztonok között. A kondenzált kromatin struktúra gátolja a különböző folyamatokat végző fehérjék kapcsolódását a DNS-hez, így inaktív állapotban van, azonban a replikáció vagy génexpresszió során a szabályozó fehérjéknek közvetlen kapcsolatot kell kialakítaniuk a DNS szállal, melyhez a kromatin szerkezet megváltoztatása szükséges ¹¹. Ez speciális hiszton módosító enzimek, ATP-függő kromatin remodeling komplexek, illetve hiszton variánsok segítségével valósulhat meg ¹³⁻¹⁶.

A hiszton módosító enzimek elsősorban a „core” hiszton fehérjék farki részének poszt-transzlációs módosítását végzik, leggyakrabban acetil csoport hozzáadásával (HAT – hiszton acetiltransferáz) és eltávolításával (HDAC – hiszton deacetiláz), metilációval (HMT – hiszton metiltransferáz) és eltávolításával (HDM – hiszton demetiláz), vagy foszforilációval (HK – hiszton kináz) és eltávolításával (HP – hiszton foszfatáz) (2. ábra) ¹⁵⁻¹⁷.



2. ábra: Hiszton fehérjék leggyakoribb poszt-transzlációs módosításai.

(Kishimoto, 2006 alapján) ¹⁵

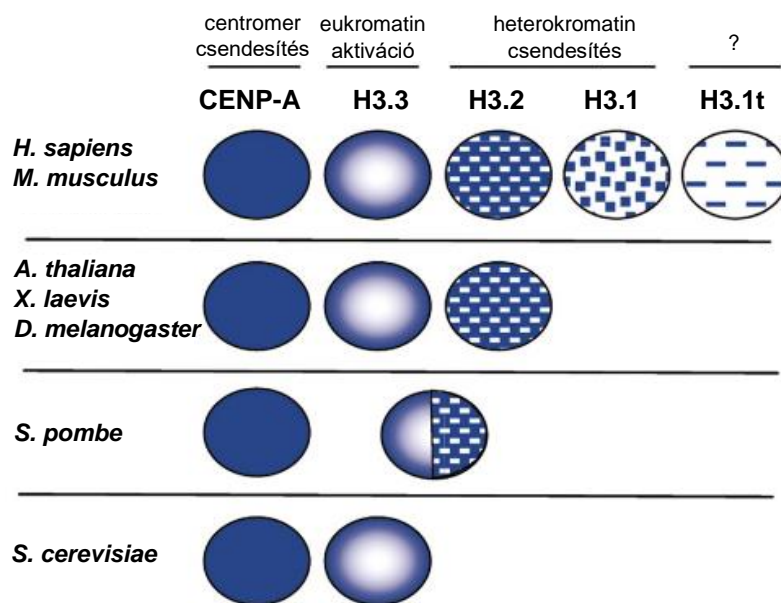
A leggyakoribb aktív állapottal együtt járó hiszton jelek közé tartozik például a H3K4me1, H3K4me3, H3K9ac, H3K27ac, H3K36me3, míg a leggyakoribb represszív hiszton jelek a H3K9me3, H3K27me3, H4K20me3 ¹³. Ezek a specifikus hiszton módosítások alapján a kromatin két fő állapota is könnyen megkülönböztethető. Míg a heterokromatin hipoacetilált, ezzel szemben az eukromatin általában hiperacetilált és nem találhatóak meg rajta a represszív H3K9me3 vagy H3K27me3 jelek. Természetesen ezek mellett számos egyéb hiszton módosítási mintázat van, amelyek együttesen finomhangolják a kromatin dinamikusan változó kondenzációját és fellazulását, így szabályozva a transzkripció aktivitást ¹².

A kromatin remodeling, másnéven nukleoszóma átrendezés olyan multiprotein komplexek révén valósul meg, melyek az ATP hidrolíziséből származó energiát felhasználva a nukleoszómákat mobilizálják, eltávolítják vagy kicserélik. Az átépítést a DNS – hiszton, illetve hiszton – hiszton kölcsönhatások gyengítése teszi lehetővé, így a DNS hozzáférhetővé válik a replikációhoz vagy génexpresszióhoz szükséges fehérjék számára ^{16,18}. A nukleoszómák elcsúsztatása vagy eltávolítása következtében átmenetileg nukleoszóma mentes, úgynevezett „nucleosome depleted region” (NDR) jön létre, ahol a különböző folyamatokhoz szükséges fehérjék képesek kapcsolódni kötőhelyükhöz a DNS-en ¹⁸, míg a hiszton variánsok beépítése által hosszabb távú epigenetikai változások alakíthatók ki és tarthatók fent. A hiszton variánsok meghatározó szerepet játszanak például a kromoszóma szegregáció, transzkripcionális reguláció vagy DNS hibajavítás során ¹⁹.

1.3.1. A H3 hiszton variánsai

A kanonikus hisztonok a sejtciklus S fázisával szinkronban szintetizálódnak, hogy a replikáció során rögtön elfoglalják helyüket az újonnan megszintetizált DNS-en. Azonban a kanonikus hisztonok helyettesíthetőek hiszton variánsokkal, melyek szintézise és beépülése a replikációtól függetlenül és szövetspecifikusan is történhet^{19,20}. A hiszton variánsokat kódoló gének a kanonikus hisztonokat kódoló génklasztereken kívül egy vagy néhány kópiában találhatóak meg, intronokat tartalmazhatnak és a róluk képződő mRNS poly(A) farokkal rendelkezik²¹. A kanonikus hisztonokhoz képest a hiszton variánsok génjei szekvencia eltéréseket hordoznak, melyeknek köszönhetően specifikus, a kanonikus hisztonoktól eltérő funkcióval is rendelkeznek¹⁹.

A CENP-A (Centromere protein A), a H3.3, a H3.2, a H3.1 és a H3.1t hisztonok a H3 hiszton eddig ismert variánsai, melyek előfordulása fajoként eltérő (3. ábra)²⁰. A CENP-A egy evolúciósan konzervált, centromerikus hiszton variáns, amely a mitotikus osztódások során a kromoszóma szegregációban játszik fontos szerepet^{20,22}. A H3.3 egy replikációtól függetlenül expresszálódó és kromatinba épülő hiszton variáns, mely eukromatikus régiókra jellemző és transzkripcionális aktivitással párosul. Ezzel szemben a H3.2 variáns expressziója replikáció függő és a transzkripcionálisan inaktív heterokromatikus régiókra jellemző. Érdekes módon csak emlősökben találhatóak meg a replikációtól függetlenül expresszálódó, heterokromatikus régióra jellemző H3.1, valamint a testszisz specifikusan kifejeződő H3.1t variánsok²⁰.



3. ábra: H3 hiszton variánsok.

(Hake, 2006 alapján)²⁰

Drosophila melanogaster-ben a H3.3 hiszton variánst kettő gén, a *His3.3A* és *His3.3B* kódolja. A két génről ugyanaz az aminosav szekvenciájú fehérje képződik, azonban a nem transzlálódó UTR régiók (untranslated region) nagyban különböznek. Mindkét gén expressziója megfigyelhető embriókban és adult legyekben, valamint a gonádokban és szomatikus sejtekben is, bár a testiszben csak a *His3.3A* mutat erős expressziót. A H3.3 variánsok a kanonikus H3 hisztontól mindössze 4 aminosavban különböznek (31 Ala → Ser, 87 Ser → Ala, 89 Val → Ile és 90 Met → Gly)²³, melyek specifikus hiszton chaperonokkal való kölcsönhatásuk révén hozzájárulnak a replikációtól független beépüléshez^{24,25}. A *Drosophila* H3.3 variánsok az aktívan átíródó gének területén találhatóak, melyek 40 %-át a riboszómális RNS-eket kódoló rDNS régiók teszik ki²⁴. Külön-külön a *His3.3A* vagy *His3.3B* null mutációja csak enyhe következményekkel jár, azonban a *His3.3A* – *His3.3B* dupla null mutánsban transzkripcionális zavarok figyelhetők meg. Annak ellenére, hogy a H3.3 variáns hiszton rendkívül konzervált, a sejtek a kanonikus H3 hiszton upregulációjával valamelyest kompenzálni képesek a transzkripcionális zavarokat, így ezt tulajdonképpen nem maga a H3.3 variáns hiánya okozza, hanem a nem elegendő mennyiségben rendelkezésre álló hisztonok miatt fellépő csökkent nukleoszóma kicserélődés, illetve a DNS nem megfelelő mértékű csomagolódása. Azonban a H3.3 variáns hisztonok hiánya csökkent életképességet és mind hímekben, mind nőstényekben sterilitást okoz, melyet a H3 upregulációja önmagában nem képes menekíteni. A konzervált H3.3 variáns a gametogenezis során játszik létfontosságú szerepet, ugyanis a csíravonal sejtek meiotikus osztódása előtti nukleoszóma kicserélődés során nélkülözhetetlen, hiányában defektust szenved a kromatin reorganizáció, illetve a kromoszóma kondenzáció és szegregáció²⁶.

1.3.2. A H3 hisztonok sejtmagi transzportja

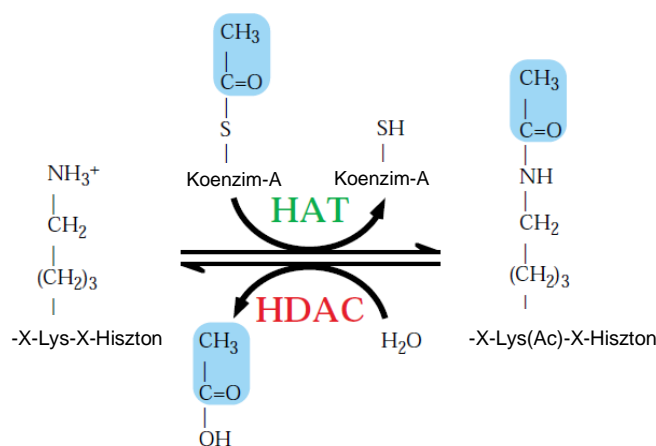
A citoplazmában szintetizálódó hisztonok N-terminális farki végén található NLS (nukleáris lokalizációs szignál) felismerését követően a hisztonok sejtmagba történő transzportját importinok mediálják²⁷. A H3 hiszton esetében az N-terminális 1-28 aminosavig terjedő régióját azonosították NLS-ként, melyen megtalálhatóak a H3K9, H3K14 és H3K18 acetilációs targetek²⁸. A H3 hiszton elsődleges nukleoszómális transzportját ugyanaz az importin mediálja, mint a H4 hisztonét²⁹, ami nem meglepő, ugyanis a nukleoszómába elsőként beépülő H3 – H4 hisztonok már a citoplazmában dimerizálódnak, így transzportjuk is főként heterodimer formában történik³⁰. Ennek köszönhetően NLS-ük redundáns, így egyik hiányában, vagy annak mutációja következtében sem sérül a nukleáris transzport³¹. A citoplazmatikus H3 hisztonok 20-30 %-a H3K14 és/ vagy H3K18 pozíciókban acetilált³²

és H4 jelenlétében acetilált formában is kötődik az importinhoz²⁹. H4 NLS hiányában az acetilációt mimikáló H3K14Q módosítás gátolja az importin kötődést, azonban érdekes módon H4 NLS hiányában a H3K14R, nem acetilálható lizint mimikáló módosítás kevésbé befolyásolja a transzportot³¹. Ezek alapján a H3K14 acetiláltsági állapota befolyásolja a H3 NLS importinok általi felismerését, azonban a H3 – H4 dimerként történő nukleáris transzportja és NLS-ük redundanciája miatt ez önmagában nem rontja a H3 sejtmagba történő bejutását.

1.4. Transzkripcionálisan aktív gének jellemző hiszton módosításai

A hiszton kód hipotézis szerint a különböző hiszton módosítások meghatározzák, hogy milyen effektor fehérjék kötődhetnek a DNS-hez, így szabályozzák a gének transzkripció aktivitását³³. Például a transzkripcionálisan aktív gének promóter és TSS (transzkripció start hely) közeli régióinak jellemző módosításai a H3K4me3/ me2 és H3K9ac. Az aktívan átíródó gének exonjaira pedig a H3K36me3, míg az intronokra a H3K27ac, H3K4me1 és H3K18ac módosítások jellemzőek³⁴. Ezeket a módosításokat a HAT – HDAC és HMT – HDM antagonisták végzik^{35,36}.

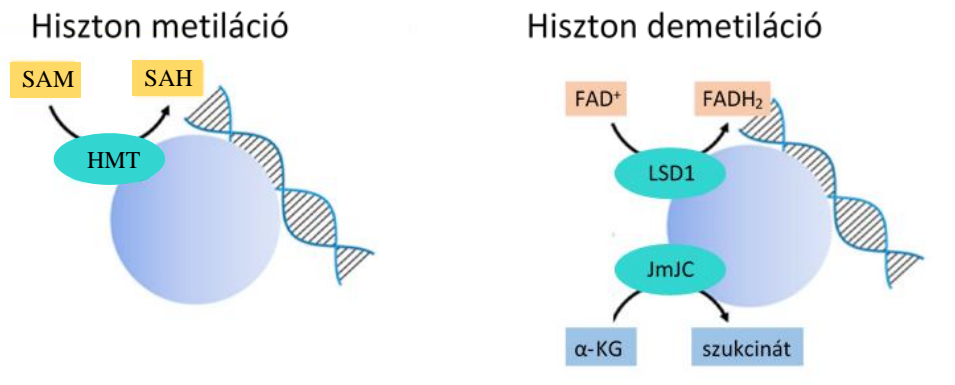
A HAT fehérjék acetil-koenzim A-ról helyezik át az acetil csoportot a hiszton fehérjék lizin aminosavának ϵ -NH₃⁺ csoportjára, így megszüntetik annak pozitív töltését. Ezzel szemben a HDAC fehérjék eltávolítják ezt az acetil csoportot, ezáltal visszaállítva az aminosav pozitív töltését (4. ábra)³⁵. Az acetiláció neutralizálja a hiszton fehérjék N-terminális farkán lévő lizin aminosavakat, így csökken az affinitásuk a DNS felé, a kromatin szerkezet fellazul és a transzkripcióhoz szükséges fehérjék képesek kapcsolódni, ezáltal génexpressziót indukálni. Az ilyen laza szerkezetű kromatin hiperacetilált állapotban van, míg a hipoacetilált állapot egy sokkal kondenzáltabb, inaktív szerkezetet eredményez³⁷.



4. ábra: Hiszton acetiláció és deacetiláció.

(Kuo, 1998 alapján)³⁵

Metiláció történhet a hiszton fehérjék lizin aminosavának $\epsilon\text{-NH}_3^+$ csoportján, illetve az arginin guanidínium csoportján is. A reakciót HMT enzimek katalizálják S-adenozil-L-metionint (SAM) használva szubsztrátként, ami a metil csoport áthelyezése következtében S-adenozil homociszteinné (SAH) alakul^{36,38} (5. ábra). A hisztonok demetilációját katalizálhatja flavin adenin dinukleotid (FAD) redukciójával a FAD-függő lizin specifikus demetiláz 1 (LSD1), illetve a Jumonji C domén (JmJC) családba tartozó demetilázok is, amelyek α -ketoglutarátot alakítanak át szukcináttá (5. ábra)³⁸.



5. ábra: Hiszton metiláció és demetiláció.

(Thomson, 2019 alapján)³⁸

1.5. A hiszton acetiltranszferázok csoportosítása

Szubcelluláris lokalizációjuk alapján a HAT-okat két fő csoportba sorolhatjuk. Az A-típusú HAT-ok sejtmagi lokalizációt mutatnak és a nukleosómális hisztonokat acetilálják, így a transzkripció aktivitás befolyásolásáért felelősek. Az A-típusú HAT-ok úgynevezett bromodoménnel rendelkezhetnek, melyek a már acetilált hisztonokat hordozó nukleosómákat felismerve elősegítik a hiszton acetiláció terjedését³⁹. Az A-típusú HAT-ok közé tartozik például a Gcn5 (General control nonderepressible 5), a p300/ CBP (protein of 300 kDa and CREB-binding protein) vagy a TAF1/ TAF_{II}250 (TATA-Box Binding Protein Associated Factor 250 kDa)⁴⁰. A B-típusú HAT-ok a citoplazmatikus térben az újonnan szintetizálódó hisztonok acetilálásáért felelősek a nukleosómák összeszerelődése előtt³⁷. Mivel a B-típusú HAT-ok targetjei nem acetiláltak ezért nem tartalmaznak bromodomént sem. Az egyetlen eddig ismert B-típusú hiszton acetiltranszferáz a HAT1⁴⁰.

Egy másik csoportosítás a katalitikus aktivitásuk és jellemző doménjeik alapján a humán HAT-ok 5 nagy családját különíti el. A GNAT (Gcn5-related N-acetyltransferase) szupercsaládba a Gcn5-tel szekvencia és szerkezeti szinten hasonló fehérjéket soroljuk, melyek N-terminális HAT doménnel és egy C-terminális bromodoménnel is rendelkeznek.

A MYST homológia doménnel rendelkező MYST (MOZ, Ybf2/ Sas3, Sas2, Tip60) család tagjai a GNAT családdhoz hasonlóan számos létfontosságú folyamat szabályozásában részt vesznek, mint például a génspecifikus transzkripcionális reguláció, DNS hibajavítás vagy DNS replikáció. A p300/ CBP koaktivátor család tagjai transzkripció faktorokkal történő kölcsönhatás révén serkentik target génjeik expresszióját. Az SRC (steroid receptor coactivator) család tagjai a szteroid típusú receptorok által szabályozott útvonalakban játszanak fontos szerepet. A TAF1 (TATA box-binding protein-associated factor 1) pedig az általános transzkripció faktorok családja, melynek képviselője a TFIID (Transcription factor II D) komplexben acetiltranszferáz funkciót betöltő TAF1/ TAF_{II}250^{41,42}.

Drosophila melanogaster-ben a humántól eltérően csak a GNAT, MYST, p300/ CBP és TAF1 családokba tartozó hiszton acetiltranszferázok találhatóak meg⁴³, melyek közül disszertációm szempontjából a p300/ CBP és GNAT család tagjai kiemelt fontosságúak, így a továbbiakban csak ezeket ismertetem részletesen.

1.5.1. A CBP és p300 acetiltranszferázok

A CBP-t elsőként CREB (cAMP-response element binding protein) kötő fehérjeként⁴⁴, a p300-at pedig adenovírus E1A kötő fehérjeként azonosították⁴⁵. Később kiderült, hogy a CBP és a p300 fehérjék több mint 70 %-os mértékű szekvencia homológiát mutatnak^{46,47}, ezért gyakran p300/ CBP fehérjeként említik őket⁴⁸. Nagymértékű átfedő funkciójuk ellenére a genetikai és molekuláris analízisek azt mutatják, hogy egyedi, nem redundáns funkciókkal is rendelkeznek⁴⁰. A p300/ CBP családba tartozó CBP és p300 fehérjék transzkripció koaktivátorok, melyek A-típusú acetiltranszferáz aktivitással is rendelkeznek, így képesek nukleoszómális hisztonokat, illetve egyéb fehérjéket is acetilálni⁴⁹. A p300/ CBP a cAMP (ciklikus adenzin monofoszfát) függő szignáltranszdukciós út egyik fontos eleme, mely a foszforilált CREB fehérjéhez kötődve transzkripciót aktivál⁵⁰. A p300/ CBP számos acetilációs targettel rendelkezik, például csak a H3 hiszton fehérjén képes acetilálni a K9⁵¹, K14⁵², K18⁵³, K23⁵⁴, K27⁵³ és K56⁵⁵ lizineket is. A p300/ CBP a H3K4me3 módosítást hordozó hisztonok K9, K14 és K18 lizinjeinek acetilációjáért felelős, amely evolúciósan konzervált jelenség és létfontosságú szerepet játszik az RNS polimeráz II összeszerelődésében, az immediate-early gének vagy a protoonkogének indukciójában⁵⁶. A p300/ CBP a cirkadián ritmus szabályozás során is fontos szerepet játszik, ugyanis direkt kölcsönhatást alakít ki a cirkadián szabályozás fő komplexével a CLOCK/ CYCLE heterodimerrel^{57,58}. Továbbá a p300/ CBP sokrétű funkciójának következtében számos betegséggel is kapcsolatba hozható annak helytelen működése vagy hiánya. A p300/ CBP gén funkcióvesztéses mutációja

Rubinstein-Taybi szindrómát okoz, amely egy mentális retardációval járó betegség^{59,60}. Továbbá a *p300/CBP* funkcióvesztéses mutációja hozzájárul olyan öröklődő, felnőtt korban manifesztálódó neurodegeneratív megbetegedések progressziójához is, mint az SBMA (spinális bulbáris izomatrófia)⁶¹, illetve a Huntington-kór, mely során érdekes módon csak a CBP csapdázódik poliglutamin aggregátumokba⁶².

Az általunk modellszervezetként használt *Drosophila melanogaster*-ben egyetlen *p300/CBP* homológ található meg, melyet a *dCBP* vagy *nejire* néven ismert gén kódol⁶³.

1.5.2. A Gcn5 és Pcaf acetiltranszferázok

A Gcn5 fehérje volt az első transzkripciós koaktivátor, amelyet eukariótákban A-típusú HAT-ként azonosítottak⁶⁴, mely a SAGA (Spt-Ada-Gcn5-Acetyltransferase), illetve az ADA (Alteration/Deficiency in Activation) hiszton acetiltranszferáz komplexek létfontosságú katalitikus alegysége⁶⁵. Gerincesekben a *Gcn5* gén duplikációjával jött létre a 75 %-ban szekvencia azonos Gcn5 és Pcaf (P300/CBP-associated factor), melyek rendkívül hasonló biokémiai sajátosságokkal rendelkeznek⁶⁶. A Gcn5 a szabad H3 hisztonok K14-es lizinjének fő acetiltranszferáz enzime, azonban a SAGA komplex alegységeként a nukleoszómális H3K9, H3K18 és H3K23, az ADA komplex részeként pedig H3K9 és H3K18 lizinek acetilációjára is képes a H3K14 acetilációja mellett⁶⁷. Emellett az ATAC (Ada2a-containing) komplex tagjaként HAT aktivitása a H4 hiszton K5 és K12-es lizinjeire irányul⁶⁸. A Gcn5/Pcaf megfelelő működése szükséges az embrionális fejlődés, a reprodukció, a neuronális fejlődés és az immunsejtek fejlődéséhez is⁶⁶. *Drosophila melanogaster*-ben például a *Gcn5* gén funkcióvesztéses mutációja súlyos fejlődésbeli rendellenességeket okoz. Zavart szenved a sejtproliferáció az imaginális szövetekben, továbbá a Gcn5 létfontosságú szerepet játszik a metamorfózis és az oogenezis során is⁶⁹. A Gcn5/Pcaf szintén összefüggésbe hozható a Huntington-kór pathogenezisével, ugyanis a betegség során egy funkcióvesztéses állapot jön létre, melynek következtében zavart szenved a hisztonok acetiláltsági állapota, amely neurodegenerációhoz vezet^{70,71}.

1.6. Hiszton deacetilázok csoportosítása

A hiszton deacetilázok (HDAC) a hiszton és nem-hiszton fehérjéken található acetyl csoportok eltávolítását katalizálják. A hisztonokról történő ϵ -N-acetyl csoport eltávolítása a kromatin szerkezet és transzkripció regulációját, az egyéb fehérjék deacetilálása a széleskörű celluláris folyamatokat szabályozza⁷². A legismertebb nem-hiszton fehérje targetek a HMG (high mobility group) fehérjék⁷³, a p53 (protein 53 kDa)⁷⁴ vagy az α -tubulin⁷⁵.

Katalitikus mechanizmusuk alapján két fő csoport, a cink-függő, illetve a NAD⁺-függő (nicotinamide adenine dinucleotide) deacetilázok ismertek, melyeket nevezhetünk hiszton deacetiláz és Sir2 (Silent information regulator 2) családnak is⁷². A szekvencia alapú csoportosítás humán esetben Class I – Rpd3-szerű (HDAC1, HDAC2, HDAC3 és HDAC8), Class II – HdaI-szerű (HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC9 és HDAC10), Class III – Sir2-szerű (SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6 és SIRT7), illetve Class IV (HDAC11) családokat különböztet meg^{76,77}. A Class I, II és IV deacetilázok cink iont, míg a Class III deacetilázok NAD⁺ kofaktort igényelnek enzimaktivitásukhoz. Számos széleskörű, illetve szelektív hiszton deacetiláz gátlószer létezik, melyek a kofaktorokon keresztül fejtik ki gátló hatásukat^{77,78}.

Drosophila melanogaster-ben az Rpd3, HDAC3, HDAC4, HDAC6-S, HDAC6-L, HDAC11, Sir2, Sirt2, Sirt4, Sirt6 és Sirt7 hiszton deacetilázok ismertek⁷⁹. A Huntington-kór pathogenezisével a Sir2 és az Rpd3 hiszton deacetilázok hozhatóak összefüggésbe⁷⁹, melyek közül disszertációmban a Sir2 hiszton deacetilázzal foglalkozom.

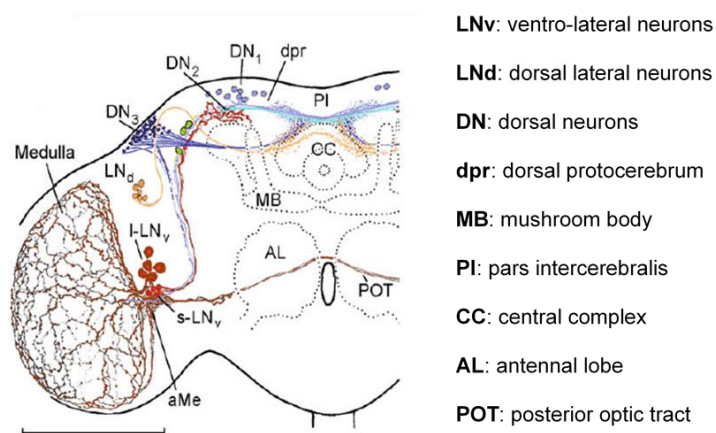
1.6.1. A Sir2 deacetiláz

A *Drosophila* Sir2 a Sirtuinok családjába tartozó, nagymértékű konzerváltságot mutató NAD⁺-függő hiszton deacetiláz, mely az élesztő Sir2 és a humán Sirt1 (Sirtuin 1) homológja⁸⁰. A *Sir2* null mutációja nem befolyásolja az életképességet és a fertilitást, azonban hiánya csökkenti, míg overexpressziója nyújtja az állatok élethosszát⁸¹. Továbbá a kalória restrikció következtében megfigyelhető élethossz növekedés is részben a *Sir2* overexpresszió indukciójának köszönhető⁸². A Sir2 targetjei között megtalálhatóak hiszton és nem-hiszton fehérjék is. A Sir2 számos lizin targettel rendelkezik⁸³, mégis elsősorban H3K9, H3K14⁸⁴ és H4K16⁸⁵ lizinek deacetilációját katalizálja, így hozzájárulva a transzkripcionális csendesítéshez. Nem hiszton targetjei közül legismertebb a p53 transzkripciós faktor, melynek a DNS károsodás kijavítása után bekövetkező deacetilációja a p53 inaktivációján keresztül a sejtciklus újraindulását, így az apoptózis elkerülését indukálja⁸⁶. Emiatt a Sir2 kapcsolatba hozható tumoros folyamatokkal is, ahol a *Sir2* overexpresszióját követő p53 gátlás abnormális sejtosztódáshoz vezet. Sirtuin specifikus inhibitorokkal tumor ellenes hatást értek el számos modellben, így ezek potenciális tumor ellenes terápiás szerként alkalmazhatóak⁸⁷. Az acetilációs egyensúly felborulásával járó neurodegeneratív megbetegedés, a Huntington-kór esetén is jótékony hatással bír a Sirtuin specifikus inhibitorok használata, ugyanis a hiszton deacetilázok gátlásával menekíthető a transzkripcionális zavarok miatt bekövetkező neurodegeneráció⁸⁸.

1.7. A cirkadián ritmus szabályozása

A cirkadián óra megtalálható minden organizmusban prokariótáktól kezdve eukarióta mikroorganizmusokon át a magasabbrendű növény, rovar és emlős fajokig⁸⁹. Maga a „cirkadián” kifejezés Franz Halberg-től származik, szó szerinti jelentése „körülbelül egy napos”, melyet a latin *circulus* (kör) és *dies, diei* (nap) szavakból alkotott meg⁹⁰. A cirkadián ritmus egy nagyjából 24 órás periódusonként ismétlődő ciklikus rendszer, mely a fiziológiai és viselkedési mintázat fluktuációjaként jellemezhető. Bár a ritmusosság párhuzamba hozható a környezet fény-sötét ciklusával, nemcsak ezek váltakozása, hanem az élőlény saját belső időmérő rendszere is vezérli, melyet CLOCK - rendszernek is neveznek (Circadian Locomotor Output Cycles Kaput)⁸⁹. A cirkadián ritmus tulajdonképpen egy három komponensű rendszer összehangolt működését jelenti. A beállító útvonal a környezetből érkező időjelző stimulusokat (zeitgeber – ZT) közvetíti a belső időmérő rendszer felé. A cirkadián óra központi komponense, az oszcillátor által közvetített szignálok pedig szabályozzák az output elemek ritmikus működését. Az oszcillátor környezeti jelek hiányában is működik, azonban szükséges a környezet finomhangolása⁸⁹.

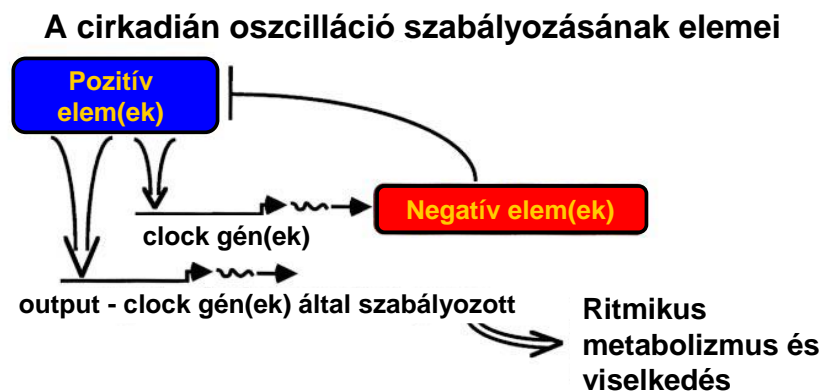
Számos különbség ellenére a cirkadián ritmus működése és szabályozása is jelentős konzerváltságot mutat az evolúció során, így a *Drosophila melanogaster* megfelelő modellszervezet ennek tanulmányozására⁹¹. Emlősökben a cirkadián ritmus szabályozásáért a hipotalamusz egy magcsoportja, a szuprachiasmatikus mag (suprachiasmatic nucleus, SCN) felelős⁹², melynek *Drosophila*-ban az aMe (accessory medulla) területén elhelyezkedő LN_v magok (ventro-lateral neurons) feleltethetők meg. Rovarok esetén azonban a központi szabályozás nem olyan centralizált, így az LN_v magokon kívül számos magcsoport részt vesz benne, melyeket pacemaker neuronoknak nevezünk (6. ábra)⁹³.



6. ábra: Cirkadián ritmust szabályozó központok *Drosophila*-ban.

(Helfrich-Förster, 2004 alapján)⁹³

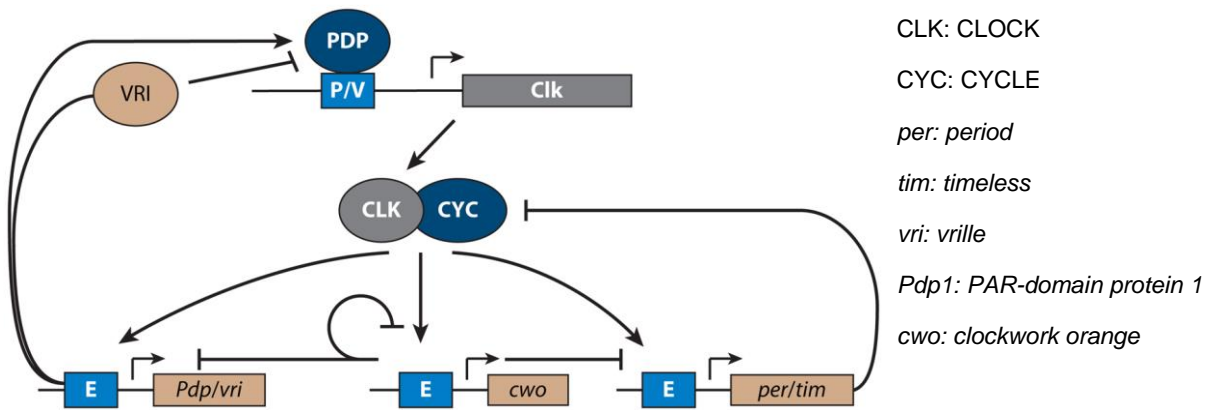
Az oszcilláció eléréséhez egy olyan folyamatra van szükség, melynek terméke negatív visszacsatolás (feedback) révén lassítja saját termelődését (negatív elem). Továbbá szükséges egy gerjesztő vagy aktiváló forrás, ami megakadályozza az óra leállítását (pozitív elem). A negatív elemek az úgynevezett „clock” gének gátolják a pozitív elemek működését, amelyek a feladata a „clock” gének aktiválása (7. ábra). Ezen kívül a pozitív elemek az output folyamatokban szereplő gének expresszióját is befolyásolják, melyet a negatív elemek által kifejtett feedback gátlás szintén gátol, így a „clock” gének által szabályozott output gének expressziója is ciklikussá válik ⁹⁴.



7. ábra: A cirkadián ritmus általános szabályozása.

(Dunlap, 1999 alapján) ⁹⁴

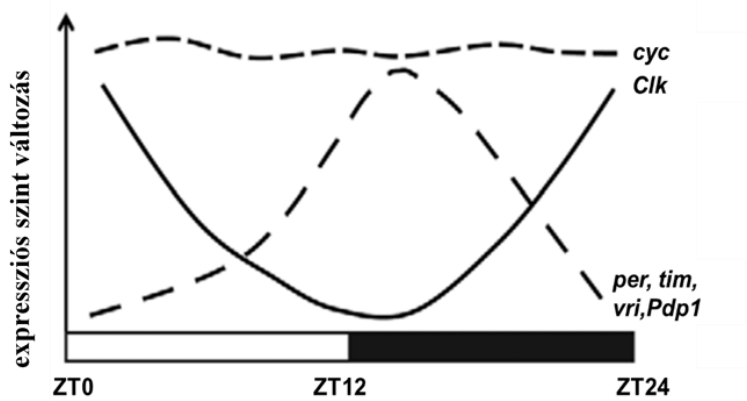
Drosophila melanogaster-ben a cirkadián ritmus molekuláris oszcillációját két bHLH/ PAS (basic helix-loop-helix/ Per-Arnt-Sim) transzkripció faktor, a dCLK (*Drosophila* CLOCK) és dCYC (*Drosophila* CYCLE – a humán BMAL1 [Brain and muscle Arnt-like protein-1] homológja) indukálja, melyek heterodimer formában a „clock” gének promóter régiójának E-box (enhancer box) doménjéhez kapcsolódnak. A cirkadián ritmust két egymásba kapcsolódó visszacsatolási kör, úgynevezett feedback loop szabályozza, melyek fenntartják a „clock” gének ciklikus expresszióját a pacemaker neuronokban ⁹⁵. A dCLK/ dCYC heterodimer szabályozza a *per* (*period*), *tim* (*timeless*), *vri* (*vrille*), *Pdp1* (*PAR-domain protein 1*) és *cwo* (*clockwork orange*) gének expresszióját (8. ábra) ^{96–98}. A központi, úgynevezett „core” feedback loop részeként a PER/ TIM komplex gátolja a dCLK/ dCYC aktivitását így gátolva saját transzkripciójukat is (8. ábra) ⁹⁹. A másodlagos feedback loop részeként a CWO gátolja a dCLK/ dCYC aktivitását ⁹⁸, míg a VRI gátolja a PDP1 pedig aktiválja magának a *dClk* génnek az expresszióját (8. ábra) ⁹⁷.



8. ábra: A cirkadián ritmus molekuláris szabályozása.

(Allada, 2010 alapján)¹⁰⁰

Ennek a kettős feedback szabályozásnak az eredményeként a *per*, *tim*, *vri*, *Pdp1* és *cwo* expressziós szintje hajnalban alacsony és alkonyatkor tetőzik, míg a *dClk* expressziója ezzel ellenkezőleg reggel mutat magas, este pedig alacsony expressziót (9. ábra)⁹⁵. A „clock” gének expressziójában bekövetkező defektus befolyásolja az output gének expresszióját, mely végül a cirkadián ritmus zavarához vezet^{101,102}.



9. ábra: A „clock” gének expressziós szintjének változása 24 órás periódus során.

(Meireles-Filho, 2012 alapján)¹⁰³

Más élőlényekhez hasonlóan az endogén cirkadián oszcilláció ciklusossága *Drosophila*-ban is csak megközelítőleg 24 óra, ezért a pacemaker apparátus napi szinten finomhangolásra szorul, mely biotikus és abiotikus környezeti tényezők, például fény, hőmérséklet, kémiai ágensek vagy szociális interakciók segítségével történik. Ezek közül a legfontosabb és molekulárisan legjobban jellemzett a fény finomhangoló szerepe. A ciklust beállító stimulus alapja, hogy a fény hatására aktiválódó CRY (CRYPTOCHROME)

a TIM fehérje ubiquitinációját és ezáltal gyors degradációját idézi elő. Ennek következtében a monomer formában lévő PER fehérje degradációja is megtörténik a DBT (DOUBLETIME) által, így a dCLK/ dCYC felszabadul a gátlás alól és egy újabb ciklus veszi kezdetét ¹⁰⁴.

1.7.1. A CBP szerepe a cirkadián ritmus szabályozásában

Emlősökben a *per* gén transzkripcionális aktivációjával egy időben megnövekedett H3 és H4 hiszton acetiláció figyelhető meg a CLOCK/ BMAL1 kötőhelyeül szolgáló E-box doméneken ^{105,106}. Ennek magyarázata, hogy a maximális target gén aktiváció érdekében a CLOCK/ BMAL1 komplex HAT aktivitású géneket irányít a regulátoros régiókhoz. Ilyen kölcsönható partnerek például a hiszton acetiltranszferáz aktivitással is rendelkező p300/ CBP transzkripciók koaktivátorok ¹⁰⁶. Érdekes módon a p300 mind a CLOCK, mind a BMAL1 fehérjével képes kölcsönhatást kialakítani, míg a CBP csak a BMAL1-hez kötődik, továbbá egyedül a CBP kiütése okoz transzkripcionális zavarokat. Még fontosabb, hogy a CBP a CREB mediálta transzkripcionális szabályozásának ellenére (*a per* gén promóterében 3 darab CREB kötőhelyeül szolgáló CRE [cAMP response element] szekvencia található) ¹⁰⁷ a *per* gén E-box doménjének acetilálása (a BMAL1-hez való erősebb affinitása révén) sokkal nagyobb szerepet játszik a cirkadián ritmussal összefüggő génexpresszió indukciójában ¹⁰⁸. *Drosophila*-ban a p300/ CBP ortológja, a dCBP (nejire) cirkadián ritmusra gyakorolt hatását vizsgáló két kutatócsoport egyaránt direkt kölcsönhatást mutatott ki a dCBP és a dCLK fehérjék között. Ennek ellenére részben eltérő, egymásnak ellentmondó eredményre jutottak a dCBP cirkadián ritmus szabályozásában játszott szerepét illetően ^{57,58}. Az egyik kutatás eredményei szerint a dCBP kötődve a dCLK PAS doménjéhez gátolja annak dimerizációját és transzkripcionális aktivitását. A *dCBP* gén kiütése meghosszabbította a *per* és *tim* gének expresszióját, így megnőtt a cirkadián periódusok hossza is. Ezzel szemben a *dCBP* gén overexpressziója aritmiát okozott és megszüntette az úgynevezett „clock controlled” vagy output gének ciklusos expresszióját ⁵⁸. A másik kutatás eredményei alapján a dCBP a dCLK/ dCYC komplex koaktivátora, mivel a *dCBP* gén csendesítése csökkent dCLK/ dCYC aktivitást eredményezett. A *dCBP* gén overexpressziója következtében szintén csökkent a „clock controlled” gének expressziója, de ez feltételezhetően dCLK/ dCYC hiperaktivációját kompenzáló feedback reguláció következménye ⁵⁷. A cirkadián ritmus defektusa neurodegeneratív betegségek esetén is megfigyelhető, azonban a molekuláris hátterük nem tisztázott. Alzheimer-kór esetén már sikerült kimutatni, hogy a β -amiloid peptid által mediált BMAL1 sumoiláció, illetve az N-cadherin C-terminális fragmentjének CBP-hez való kötődése a fehérjék degradációját idézi elő, így a cirkadián ritmus is zavart szenved ¹⁰⁹.

1.8. Huntington-kór

A Huntington-kór (Huntington's disease, HD) egy autoszómális, domináns öröklődésű, gyógyíthatatlan neurodegeneratív betegség, melyet először George Huntington írt le 1872-ben ¹¹⁰. A Huntington-kór 100000 emberből ~5-öt érintő megbetegedés, melynek tünetei 35-50 éves kor környékén jelentkeznek és általában 10-15 éven belül halálos kimenetelűek. A betegség legfőbb tünetei közé sorolhatóak a jellegzetes úgynevezett „choreiform” akaratlan izommozgások, a kognitív képességek romlása, illetve különböző pszichiátriai tünetek. A korai tünetek közé sorolhatóak a személyiség megváltozása, agresszivitás, depresszió, érdeklődés elvesztése, nehézség a döntéshozatalban, új információk megtanulásában, kérdések megválaszolásában, továbbá egyensúlyozási problémák, akaratlan arcmozgások, grimaszolás is megfigyelhető. A betegség előrehaladtával jelentkező későbbi tünetek az akaratlan izommozgások és rángatózások megjelenése a test egész területén, komoly koordinációs és egyensúlyproblémák, kapkodó, gyors szemmozgás, hezitáló, vagy artikulálatlan beszéd, dűnnyögés, nyelési nehézségek, illetve demencia ^{111,112}. A Huntington-kór kialakulásáért a *Huntingtin* (*Htt*) gén mutációja felelős, melyet 1993-ban azonosítottak ¹¹³. A 180 kbp méretű, 67 exont tartalmazó *Huntingtin* gén a 4. kromoszóma rövid karjának végén található ¹¹⁴. A génről egy 3144 aminosavból álló, 348 kDa méretű Huntingtin fehérje (Htt) készül. A *Htt* első exonjának 5' végén található egy tiszta poliglutamin domént (polyQ) kódoló CAG ismétlődés, melynek abnormális expanziója idézi elő a betegség kialakulását ¹¹⁵. Normál esetben a poliglutamin domén 9-29 aminosavat tartalmaz, beteg egyénekben azonban ez a szám 39 feletti. Inverz korreláció figyelhető meg a CAG ismétlésszám és betegség kialakulása, illetve lefolyása között, ugyanis minél nagyobb számú az ismétlődés, annál hamarabb jelentkeznek a tünetek és súlyosabb, gyorsabb lefolyású a betegség ¹¹². A poliglutamin domén meghosszabbodásának következtében egy aggregációra hajlamos, toxikus, mutáns Htt (mHtt) fehérje keletkezik. A mutáns fehérje abnormális interakciókat alakít ki más fehérjékkel, illetve az aggregátumba csapdázza azokat, így gátolva megfelelő működésüket. Továbbá bizonyos értelemben a *Htt* gén funkcióvesztéses mutációjáról is beszélhetünk, ugyanis egyes források szerint az mHtt fehérje nem képes maradéktalanul ellátni normál funkcióját ¹¹⁶, más tanulmányok azonban cáfolják ezt ¹¹⁷. A Htt fehérje pontos funkciója az elmúlt évtizedek intenzív kutatásainak ellenére sem tisztázott teljes mértékben. Jelenlegi tudásunk szerint a Htt egy úgynevezett scaffold fehérje, mely szerepet játszik az axonális transzport, a szignáltranszdukció, illetve a szinaptikus transzmisszió során, így ezen útvonalak károsodott működése is hozzájárul a neurodegeneráció kialakulásához ¹¹⁸. A neurodegeneratív hatások főként a striátumot és a nagyagykérget érintik, melynek következtében a betegek agya

hozzávetőleg 20-30 %-kal kisebb méretű¹¹⁹. A striatális atrófiát főként a GABAerg (γ -aminovajsav) közepes tüskés idegsejtek (MSN – medium spiny neuron), míg a kortex neurodegenerációját a kortikális piramissejtek (CPN – cortical pyramidal neuron) pusztulása okozza. A neuronok pusztulását megelőzően már megfigyelhetőek funkcionális zavarok, melyek feltételezhetően hozzájárulnak a korai tünetek kialakulásához, később pedig a neurodegeneráció mértékétől függ a motoros és szellemi funkciók zavarának súlyossága¹²⁰. Sajnos a mai tudásunk szerint még nem áll rendelkezésre olyan gyógymód, amely megakadályozná a betegség kialakulását. Gyógyszeres kezeléssel csak a tünetek enyhítésére van lehetőség, de a fizikai és szellemi leépülést nem lehet megakadályozni, továbbá súlyos mellékhatások léphetnek fel egyes gyógyszerek alkalmazása során. A Tetrabenazine az első olyan gyógyszer, amely segít csökkenteni az akaratlan mozgásokat, azáltal, hogy reverzibilisen gátolja a VMAT2 (vezikuláris monoamin transzporter 2) működését. Mivel a VMAT2 felelős a dopamin, szerotonin és norepinefrin citoszolból preszinaptikus vezikulákba történő csomagolásáért, annak gátlása fokozza ezen molekulák lebomlását. Bár a dopamin mennyiségének csökkenése enyhíti az akaratlan „choreiform” mozgásokat, a szerotonin és norepinefrin csökkenése rontja a betegek egyébként is súlyos depressziós és szorongásos állapotát, mely akár öngyilkossághoz is vezethet¹²¹.

1.8.1. Huntington-kór és a hiszton acetiláció kapcsolata

A Huntington-kór során megfigyelhető neurodegeneráció kialakulásának egyik fő oka a transzkripció zavara, mely elsősorban a CBP és Pcaf (Gcn5) hiszton acetiltranszferázokhoz köthető^{70,122}. Microarray vizsgálatok során kiderült, hogy diszreguláció figyelhető meg neurotranszmitter receptorok, neuronális struktúrák kialakításában résztvevő fehérjék, valamint a stresszválaszban és axonális transzportban fontos fehérjék expressziójában^{123,124}. Az mHtt fehérje a CBP és Pcaf acetiltranszferáz doménjével interakciót kialakítva gátolja a hisztonok acetilációját⁷⁰. Emellett a CBP az aggregátumokba történő csapdázódása miatt is gátlás alá kerül, így nem képes ellátni további funkcióit sem¹²⁵. Mivel a hisztonok megfelelő helyen történő acetilációja szabályozza a génexpressziót a CBP funkcióvesztésének következtében zavart szenved a transzkripció, amely végül neurodegenerációhoz vezet¹²², azonban a *CBP* gén overexpressziója képes menekíteni az mHtt okozta neuronális toxicitást¹²⁶. Érdekes módon a CBP és p300 fehérjék nagymértékű homológiájának ellenére az mHtt fehérje aggregátumokba csak a CBP csapdázódik¹²⁷. A Pcaf Huntington-kór során betöltött szerepéről kevesebb információval rendelkezünk. A Pcaf részleges hiánya súlyosbítja a neurodegeneráció mértékét, azonban annak overexpressziója nem képes menekítésre. Feltételezhető, hogy a Pcaf

és az mHtt abnormális interakciója nemcsak magát a Pcaf fehérjét, hanem a Pcaf-ot tartalmazó teljes multiprotein komplex működését is gátolja, így önmagában a komplex egyetlen komponensének overexpressziója nem képes menekítésre⁷¹. A hiszton acetiltransferázok gátlása következtében kialakuló csökkent hiszton acetilációs szintet és az ebből fakadó neurodegenerációt a szélesspektrumú SAHA (suberoxylanilide hydroxamic acid)¹²⁸, TSA (Trichostatin A)¹²⁹ vagy NaBu (nátrium-butirát)¹³⁰ hiszton deacetiláz gátlószerek menekíteni képesek. Ezek mind arra utalnak, hogy a hisztonok acetilációs állapot változása rendkívül nagy szereppel bír és potenciális terápiás target lehet a Huntington-kór pathogenezisében⁷⁰.

1.8.2. A cirkadián ritmus zavara Huntington-kór esetén

Hasonlóan más neurodegeneratív betegségekhez a Huntington-kór esetén is megfigyelhető a cirkadián ritmus defektusa. Általános zavar figyelhető meg a nyugalmi és aktív periódusokban, felborul a nappal-éjjeli ritmus, ami a betegség előrehaladtával egyre súlyosbodik¹³¹. Zavart szenved a betegek éjszakai alvása, hosszabb ideig tartó látencia (elalváshoz szükséges idő) és fragmentált, rendszertelen alvási periódusok jellemzőek. Ezek következtében megnő az ébren töltött órák száma, míg nappal megnövekedett aluszékonyosság jellemző¹³²⁻¹³⁵. Az alvászavarok súlyos következményekkel járnak egészséges egyének esetén is, például agresszivitás, depresszió vagy memória zavarok figyelhetőek meg¹³⁶, melyek a Huntington-kór során egyébként is jellemző tünetek¹³⁷. Ezt az alvászavar csak még inkább súlyosbítja és felgyorsítja a betegség progresszióját, ezért rendkívül fontos megérteni azok hátterében álló molekuláris folyamatokat¹³⁸.

A Huntington-kór egér és *Drosophila* modelljében is megfigyelhető a cirkadián ritmust szabályozó gének megváltozott expressziós mintázata^{139,140}. Vizsgálataink alapján *Drosophila*-ban a *per* és *tim* gének akrofázisa (génexpressziós csúcs eléréséig eltelt idő) kitolódik, ami párhuzamba hozható az este jelentkező hosszabb látencia idővel. A *Clock* gén akrofázisa kitolódik, emellett az amplitúdója (génexpressziós csúcs átlagtól való eltérése) is csökken. A *vri* génnek szintén csökken az amplitúdója, amely mint a másodlagos feedback loop részvevője befolyással lehet az output gének expressziójára¹⁴⁰. Microarray vizsgálatokkal számos olyan gént azonosítottak, melyek expressziós csúcsa a *Clock* génnel szinkronban, a hajnali órákban figyelhető meg, melyek feltételezhetően a másodlagos feedback loop targetjei és szabályozzák az organizmus szintű napi ritmust¹⁴¹⁻¹⁴⁴. Ennek ellenére napjainkig sajnos pontosan még nem ismert, hogy a molekuláris cirkadián szabályozó rendszer defektusa milyen módon idézi elő a betegeknél megfigyelt alvási defektusokat.

1.9. *Drosophila melanogaster*, mint humán betegség modell

A *Drosophila melanogaster*, másnéven ecetmuslica a genetikai és molekuláris biológiai kutatások egyik leggyakrabban használt modellszervezete, melyhez nagy számú, a tudományos élet számára meghatározó jelentőségű felfedezés köthető¹⁴⁵. Az ecetmuslica életsiklusa meglehetősen rövid, kis helyen olcsón eltartható, politén óriáskromoszómákkal rendelkezik, genom szekvenciája ismert és nagyszámú kísérleti módszer áll rendelkezésre genetikai manipulációjához. Továbbá balanszer kromoszómákkal és változatos morfológiai markerekkel is rendelkezik, melyek használata egyszerűen követhetővé teszi a vizsgált egyedek genetikai hátterét. A fejlődés- és viselkedésbeli különbségek ellenére a *Drosophila* nagymértékű biológiai, fiziológiai és neurológiai hasonlóságot mutat az emberrel. Hasonló a génexpresszió szabályozás mechanizmusa, az idegrendszer alapvető felépítése és működése, a sejtek közötti kommunikáció, vagy a sejthalál¹⁴⁵. Az emberi betegségekkel kapcsolatba hozható gének ~75 %-a rendelkezik funkcionális homológgal *Drosophila*-ban, melyek vizsgálatával számos betegség háttere felderíthető, valamint a terápiás szerek tesztelése is könnyen kivitelezhető. Vizsgálhatóak például olyan súlyos központi idegrendszeri megbetegedések, mint a neurodegenerációval járó Alzheimer-kór, Parkinson-kór vagy Huntington-kór, továbbá az epilepszia, az alvási rendellenességek vagy a pszichotikus zavarok. Emellett a *Drosophila* a gyulladásos és rákos megbetegedések, illetve a kardiovaszkuláris megbetegedések és a metabolikus zavarok molekuláris vizsgálatára is kitűnően alkalmas¹⁴⁶.

1.9.1. A Huntington-kór *Drosophila* modellje

A Huntington-kór egy monogénes, domináns öröklődésű neurodegeneratív megbetegedés, mely egyszerűen modellezhető a betegséget okozó génváltozat túltermelésével. A *Huntingtin (Htt)* gén homológja *Drosophila*-ban is megtalálható, azonban a betegség hiteles modellezése érdekében transzgénként a humán *Htt* gén normál hosszúságú (Q25), illetve patológiás hosszúságú (Q120) poliglutamin doménnel rendelkező első exonját expresszáltatjuk, mely a toxicitás vizsgálatok alapján a legmegfelelőbb a modellezéshez¹⁴⁷. A *Drosophila* modellben (HD legyek) a betegség progressziója során leírt tünetek jelentős része vizsgálható, melyek közül a legfontosabbak a neurodegeneráció és az aggregátumok képződése, a csökkent életképesség és élettartam, a motoros képességek romlása, illetve a cirkadián ritmus zavara. Modellünkben a *Htt* transzgének expressziója a *Drosophila*-ban rutinszerűen használt GAL4/ UAS expressziós rendszer segítségével történik¹⁴⁸, melynek során neuronspecifikus driver használatával a transzgének meghajtása szövetspecifikusan, csak az idegrendszerben történik.

2. CÉLKITŰZÉSEK

A Huntington-kór kialakulásáért felelős, egyetlen gént érintő mutáció már évtizedek óta ismert, azonban a betegség a mai napig gyógyíthatatlan. Tudjuk, hogy a mutáns Huntingtin (mHtt) fehérje abnormális interakciók révén gátolja egyes HAT enzimek működését, valamint a pathogenezist nagyban befolyásolja a hisztonok megfelelő acetiláltsági állapota, ennek ellenére a Huntington-kór szempontjából létfontosságú acetilációs target pozíciók nem ismertek.

- **Ezért céljaink között szerepelt *Drosophila* HD modellben jellemezni a potenciális acetilációs target pozíciók hatását H3.3A hiszton variáns mutációs analízisével, melyhez a következő kísérleteket hajtottuk végre:**

- H3.3A poszt-transzlációs módosításait mimikáló pontmutáns transzsgénekről képződő fehérjék sejtmagi transzportjának és kromatin kötöttségének validálása.
- H3.3A mutáns transzsgének vad típusú állatok életképességére gyakorolt hatásának vizsgálata.
- H3.3A mutáns transzsgének HD legyek életképességére, élettartamára, neurodegenerációjára, motoros képességeire és napi aktivitására gyakorolt hatásának vizsgálata.
- Az azonosított potenciális acetilációs target pozíciók validálása HAT és HDAC enzimek funkcióvesztésének vizsgálatával.
- HD legyek transzkriptomikai analízise, valamint a potenciális acetilációs target pozíciók mutációinak transzkripciót befolyásoló hatásának vizsgálata.
- A potenciális acetilációs target pozíciók mutációinak hatása a sejtek általános transzkripció aktivitására, totál RNS/ DNS és polyA mRNS/ totál RNS arányára.

- **További célunk volt a *Drosophila* HD modellben vizsgálni a dCBP hiszton acetiltranszferáz Huntington-kór esetén megfigyelhető cirkadián ritmus zavar szabályozásában betöltött szerepét, melyhez a következő kísérleteket hajtottuk végre:**

- HD legyek cirkadián ritmus zavarának részletes vizsgálata.
- Cirkadián szabályozó gének expresszió változásának vizsgálata HD legyekben.
- *dCBP* csendesítés cirkadián ritmusra gyakorolt hatásának vizsgálata.
- *dCBP* overexpresszió HD legyek cirkadián ritmus fenotípusára gyakorolt hatásának vizsgálata.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. *Drosophila* genetikai módszerek

3.1.1. A kísérletek során használt *Drosophila melanogaster* törzsek

A disszertációhoz kapcsolódó kísérletek során különböző genotípusú törzsekkel dolgoztam, melyeket a laboratóriumunkban állítottunk elő, illetve törzsközpontból vagy kooperációs partnertől szereztük be. Ezek mindegyike genetikailag módosított, azaz a természetben előforduló vad típustól eltérő tulajdonságúak.

w; +; H3.3A-mut: A kutatócsoportunkban korábban Dr. Zsindely Nóra által előállított **w; +; UAS-His3.3A-mut^{3xFLAG}** törzsekben a transzgénnek ϕ C31 integráz mediálta helyspecifikus integrációval lettek beépítve az attP-ZH86Fb 3. kromoszómás dokkoló helyre. A transzgénnek a H3.3A hiszton variáns K9, K14 vagy K27 lizinjének pontmutáns formáit hordozzák (1. táblázat), melyek expresszióját az UAS-GAL4 rendszer szabályozza. A K \rightarrow Q (lizin \rightarrow glutamin) cserével az acetilált, K \rightarrow R (lizin \rightarrow arginin) cserével a nem módosított, míg a K \rightarrow M (lizin \rightarrow metionin) cserével a metilált lizint mimikáljuk.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	
H3.3A	M	A	R	T	K	Q	T	A	R	K	S	T	G	G	K	A	P	R	K	Q	L	A	T	K	A	A	R	K	S	A	P
H3.3A-K9Q	M	A	R	T	K	Q	T	A	R	Q	S	T	G	G	K	A	P	R	K	Q	L	A	T	K	A	A	R	K	S	A	P
H3.3A-K9R	M	A	R	T	K	Q	T	A	R	R	S	T	G	G	K	A	P	R	K	Q	L	A	T	K	A	A	R	K	S	A	P
H3.3A-K9M	M	A	R	T	K	Q	T	A	R	M	S	T	G	G	K	A	P	R	K	Q	L	A	T	K	A	A	R	K	S	A	P
H3.3A-K14Q	M	A	R	T	K	Q	T	A	R	K	S	T	G	G	Q	A	P	R	K	Q	L	A	T	K	A	A	R	K	S	A	P
H3.3A-K14R	M	A	R	T	K	Q	T	A	R	K	S	T	G	G	R	A	P	R	K	Q	L	A	T	K	A	A	R	K	S	A	P
H3.3A-K27Q	M	A	R	T	K	Q	T	A	R	K	S	T	G	G	K	A	P	R	K	Q	L	A	T	K	A	A	R	Q	S	A	P
H3.3A-K27R	M	A	R	T	K	Q	T	A	R	K	S	T	G	G	K	A	P	R	K	Q	L	A	T	K	A	A	R	R	S	A	P
H3.3A-K27M	M	A	R	T	K	Q	T	A	R	K	S	T	G	G	K	A	P	R	K	Q	L	A	T	K	A	A	R	M	S	A	P

1. táblázat: A kísérletekben felhasznált H3.3A mutációk.

elav-GAL4: A Bloomington törzsközpontból származó $P\{GawB\}elav^{C155} w^{1118}$; $P\{UAS-Dcr-2.D\}2$ törzs (BDSC – 458) egy mesterségesen létrehozott, GAL4 driver vonal. Ezt az X kromoszómán található neuronális kifejeződésű *elav* (*embryonic lethal abnormal vision*) gén promótere elé kb. 120 bp távolságra történő *GawB* transzpozon inszerciójával hozták létre, így az *elav* gén enhanszere biztosítja a *GAL4* gén szöveti kifejeződését.

w; +; Sb/TM6, Ubx: 3. kromoszómás balanszeres törzs mely *Sb* (*Stubble* – rövid szőrzet) és *Ubx* (*Ultrabithorax* – szőrös és pigmentált billér) markereket hordoz.

***elav-GAL4*; +; *Sb/TM6*, *Ubx*:** A Bloomington törzsközpontból származó $P\{GawB\}elav^{C155} w^{1118}$; $P\{UAS-Dcr-2.D\}2$ törzs 3. kromoszómás balanszeres változata, mely mely *Sb* (*Stubble* – rövid szőrzet) és *Ubx* (*Ultrabithorax* – szőrös és pigmentált billér) markereket hordoz.

***elav-GAL4*; +; *tub-GAL80^{ts}*:** A törzs a Bloomington törzsközpontból származó $P\{GawB\}elav^{C155} w^{1118}$ (*BDSC* – 458) és a w^* ; sna^{Sco}/CyO ; $P\{tubP-GAL80^{ts}\}7$ (*BDSC* – 7018) törzsek kombinálásával jött létre. Az X kromoszómán található a neuronspecifikus *elav* promóter által meghajtott *GAL4* gén, míg a 3. kromoszómán található az *alphaTub84B* promóter által meghajtott *GAL80* fehérje hőmérsékletszenzitív változatát kódoló transzgén ¹⁴⁹.

***yw*, *Df(His3.3A)*:** A Konrad Basler (University of Zurich) laboratóriumából származó *yw*; *Df(2L)His3.3A*; + törzset P elem remobilizáció segítségével hozták létre, a 2. kromoszómán található endogén *His3.3A* homozigóta delécióját hordozza ¹⁵⁰.

***elav-GAL4*; *Df(His3.3A)*; *tub-GAL80^{ts}*:** Laboratóriumunkban az *elav-GAL4*; *tub-GAL80^{ts}* és a *yw*, *Df(His3.3A)* kombinációjával létrehozott törzs.

***w*; *HttQ25*; + és *w*; *HttQ120*:** A J. Lawrence Marsh laboratóriumából (University of California, Irvine) származó w ; $UAS-HTTex1Q25$; + és w ; $UAS-HTTex1Q120$; + törzsek a humán *Huntingtin* (*Htt*) gén első exonját tartalmazzák normál hosszúságú (Q25) illetve patológiás hosszúságú (Q120) poliglutamin doménnel, melyek expresszióját az UAS-GAL4 rendszer szabályozza. A transzgéneket azonos pozícióba, a 2. kromoszómás attP-ZH51D ϕ C31 dokkoló helyre inszertálták ¹⁴⁷.

***w*; *Df(His3.3A)* *HttQ120*:** Laboratóriumunkban a *yw*, *Df(H3.3A)* és a w ; *HttQ120* törzsek rekombinációjával létrehozott törzs.

***w*; *Df(His3.3A)* *HttQ120*; *H3.3A-mut*:** Laboratóriumunkban a w ; *Df(His3.3A)* *HttQ120* és a w ; +; *H3.3A-mut* törzsek rekombinációjával létrehozott törzsek.

***yw*; *per-GAL4*:** A Bloomington törzsközpontból származó $y^l w^*$; $P\{w^{+mC}=GAL4-per.BS\}3$ (*BDSC* - 7127) törzs a 2. kromoszómán hordozza a *period* gén promótere által szabályozott *GAL4* gént, így a *GAL4* expressziós mintázata megegyezik a cirkadián ritmus során megfigyelhető ciklikus *period* génexpresszióval ¹⁵¹.

nej^{EP1179}: A Bloomington törzsközpontból származó $w^*P\{w^{+mC}=EP\}$ *nej^{EP1179}* (BDSC – 30733) törzs a *nejire/dCBP* gén egy GAL4 általi túltermelésre alkalmas allélját hordozza, amelyet egy UAS szekvenciát is tartalmazó P{EP} mobilis genetikai elem inszerciója okoz. A transzpozon a gén 5' régiójában található így az endogén *dCBP* overexpresszióját teszi lehetővé megfelelő GAL4 driver jelenlétében ¹⁵².

nej^{EP1179}; HttQ120: Laboratóriumunkban a *nej^{EP1179}* és *w; HttQ120* törzsek kombinációjával létrehozott törzs.

w; nej-RNAi^{v105115}: A bécsi törzsközpontból származó *w; UAS-Dcr2/UAS-CBP RNAi^(v105115)* (VDRC – KK105115) RNS interferenciás törzs a 2. kromoszómán UAS kontroll alatt a *nejire* 5. exonjával homológ dsRNS hairpint kódol. GAL4 jelenlétében a beépített 370 nukleotid hosszúságú szakasz expressziója a *nejire* mRNS csendesítését idézi elő.

w; Sirt1¹⁷/SM6a: A Bloomington törzsközpontból származó *w¹¹¹⁸; Sirt1¹⁷/SM6a* (BDSC – 24857) Sir2 funkcióvesztéses törzs, melyben egy P{lacW} elem imprecíz excíziója következtében a *Sirt1* ORF nagy része elveszett ⁸¹.

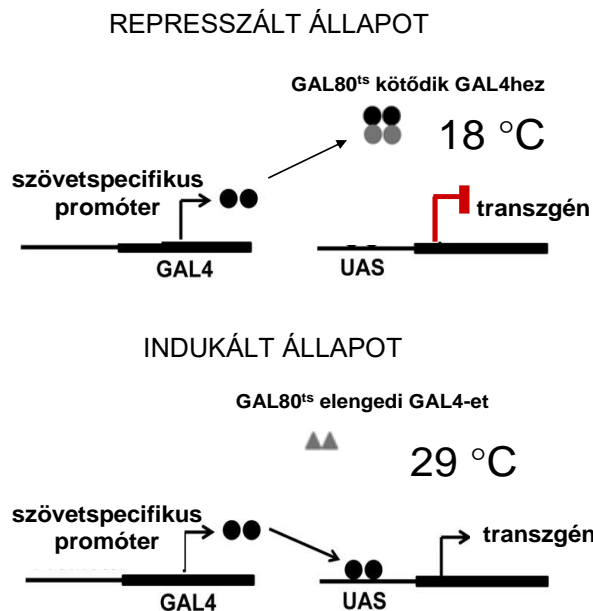
w; +; Gcn5^{E333st}/TM3: A Bloomington törzsközpontból származó *w¹¹¹⁸; Gcn5^{E333st} P\{w^{+mW.hs}=FRT(w^{hs})\}2A e¹/TM3, P\{w^{+mC}=ActGFP\}JMR2, Ser¹* (BDSC – 9333) törzs a *Gcn5* gén EMS (etil-metán-szulfonát) mediálta mutagenézissel létrehozott nonsense allélját hordozza, amely trunkált, funkcióvesztéses *Gcn5* fehérjét eredményez ⁶⁹.

3.1.2. Törzsek és keresztezések fenntartása

A kísérleteink során használt *Drosophila* törzseket standard táptalajon (3 % száraz élesztő, 4 % kukoricadara, 2 % búzaliszt, 9 % glükóz, 0,7 % agar és 0,15 % Tegosept), 25 °C-os légtermosztátban tartottam fenn. A keresztezéseket kísérlettől függően 25 °C-os, illetve 30 °C-os légtermosztátban, vagy 18 °C-ra termosztált szobában tartottam. A törzseket kéthetente, a keresztezéseket hetente ráztam át friss fiolába, míg a kísérletekhez legyűjtött egyedeket 2-3 naponta ráztam át, hogy elkerüljem a táptalaj befertőződéséből, illetve az állatok táptalajba való ragadásából eredő veszteségeket. A cirkadián ritmus kísérleteket elkülönített inkubátorban végeztem, melyben az állatokat 12/ 12 órás fény/ sötét (08⁰⁰-20⁰⁰; ~250 lux) ciklusban tartottuk.

3.1.3. Transzgének kifejeztetésére használt expressziós rendszer

Kutatásunk során a transzgének kifejeztetésére a kétkomponensű GAL4/ UAS expressziós rendszert használtam, amely sejt- vagy szövetspecifikus irányított génexpressziót tesz lehetővé. A GAL4 transzkripció faktor csak olyan promóterrel rendelkező transzgének expresszióját teszi lehetővé, amelyben jelen van a GAL4 kötőhelyként szolgáló UAS szekvencia¹⁴⁸. A GAL4/ UAS expressziós rendszer egy hőmérséklet szenzitív szabályozó elemmel, a GAL80^{ts} fehérjével is bővíthet, így a target gének expressziója indukálhatóvá válik (10. ábra). 18 °C-on a GAL80^{ts} kötődve a GAL4-hez gátolja annak bekötését az UAS szekvenciához, így gátlódik a transzgen kifejeződése is. 30 °C-on azonban egy konformáció változás következtében a GAL80^{ts} disszociál a GAL4-ről, mely a target szekvenciához kötődve indukálja a célgén kifejeződését¹⁵³.



10. ábra: A GAL4/ UAS rendszer szabályozása.

(Wolf, 2011 alapján)¹⁵³

A kísérleteinkhez szükséges keresztezésekhez szűz nőtényeket használtam, melyeket a bábból kikelés után 0-4 órás időintervallumban gyűjtöttem. Keresztezéseimbe fiolánként 5-10 hímét és 5-10 szűz nőtényt helyeztem, majd a fiolát a kísérletnek megfelelő hőmérsékleten tároltam. A 25 °C-on történő transzgen expresszióhoz az *elav-GAL4* vagy *elav-GAL4; Sb/ TM6, Ubx* neuronális, illetve a *per-GAL4* pacemaker neuron specifikus driver törzseket használtam. A 30 °C-on történő transzgen expresszióhoz pedig az *elav-GAL4; tub-GAL80^{ts}* vagy *elav-GAL4; Df(His3.3A); tub-GAL80^{ts}* neuronális driver törzseket használtam.

3.1.4. Életképesség vizsgálat

Az életképesség vizsgálatok során a keresztezéseket 18 °C-on vagy 25 °C-on végeztem, mely körülmények között a transz gének embrionális kortól kezdve kifejeződnek. A kísérletekhez genotípusonként minimum 20 párhuzamos keresztezést állítottam össze. A kikelő állatokat 25 °C-on tartva, 5 napon keresztül naponta gyűjtöttem és számoltam, majd a nem expresszáló kontrollra normalizálva kaptam meg a százalékos kikelési arányt. Az eredmények a fiolák átlagát és a standard error-t mutatják, statisztikai analízisként t-tesztet és OWA (One-Way ANOVA, egyszempontos varianciaanalízis) tesztet végeztem.

A mutáns *H3.3A* (*H3.3A-mut*) transz gének vad típusú állatok fenotípusára gyakorolt hatásának vizsgálatához *elav-GAL4* driver törzsek szüzeit használtam a keresztezéseimhez, így vizsgálni tudtam mind a nőstény, mind a hím utódok kikelését. Ehhez első lépésként *w; Sb/TM6, Ubx* szüzekkel keresztezve létrehoztam a *w/Y; H3.3A-mut/Sb* hímekeket, melyeket felhasználtam a kísérlethez szükséges keresztezésekhez. A kikelő utódok közül a transz gént nem hordozó egyedek szolgálták kontrollként az analízis során.

Keresztezési séma:

- 1. *w; +; Sb/TM6, Ubx* ♀ × *w/Y; +; H3.3A-mut* ♂
 - *w/Y; +; H3.3A-mut/Sb* ♂
- 2. *elav-GAL4; +; +* ♀ × *w/Y; +; H3.3A-mut/Sb* ♂
 - *elav-GAL4/w; +; H3.3A-mut/+* ♀
 - *elav-GAL4/w; +; Sb/+* ♀
 - *elav-GAL4/Y; +; H3.3A-mut/+* ♂
 - *elav-GAL4/Y; +; Sb/+* ♂

A *H3.3A-mut* transz gének HD legyek (120 glutamint kódoló *mHtt* transz gént kifejező *Drosophilák*) fenotípusára gyakorolt hatásának vizsgálatához szintén kétlépcsős keresztezéssel 25 °C-on állítottam elő a vizsgálni kívánt egyedeket. Az első lépésben előállított *elav-GAL4/Y; H3.3A-mut/Sb* hímekeket *w; HttQ120* szüzekkel keresztezve a kikelő hím utódok szolgálták nem expresszáló kontrollként, míg a nőstények esetén össze lehetett hasonlítani az *mHtt* transz gént, illetve az *mHtt* és a *H3.3A-mut* transz géneket együtt expresszáló egyedek kikelési arányát.

Keresztezési séma:

- 1. *elav-GAL4; +; Sb/TM6, Ubx* ♀ × *w/Y; +; H3.3A-mut* ♂
 - *elav-GAL4/Y; +; H3.3A-mut/Sb* ♂

- **2. *w; HttQ120* ♀ × *elav-GAL4/Y; +; H3.3A-mut/Sb* ♂**
 - *elav-GAL4/w; HttQ120/+; H3.3A-mut/+* ♀
 - *elav-GAL4/w; HttQ120/+; Sb/+* ♀
 - *w/Y; HttQ120/+; H3.3A-mut/+* ♂
 - *w/Y; HttQ120/+; Sb/+* ♂

A HAT és HDAC enzimek csendesítésének hatását a H3.3A, H3.3A-K14Q és H3.3A-K14R transzgenikus vonalakon végeztem el, melyhez 18 °C-on *elav-GAL4* driverrel hajtva, szintén kétlépcsős keresztezéssel állítottam elő a vizsgálni kívánt egyedeket.

Gcn5 csendesítés keresztezési séma:

- **1. *elav-GAL4; +; Sb/TM6, Ubx* ♀ × *w/Y; +; Gcn5^{E333st}/TM3* ♂**
 - *elav-GAL4/Y; +; Gcn5^{E333st}/TM6, Ubx* ♂
- **2. *w; Df(His3.3A) HttQ120; H3.3A-mut* ♀ × *elav-GAL4/Y; +; Gcn5^{E333st}/TM6, Ubx* ♂**
 - *elav-GAL4/w; Df(His3.3A) HttQ120/+; H3.3A-mut/Gcn5^{E333st}* ♀
 - *elav-GAL4/w; Df(His3.3A) HttQ120/+; H3.3A-mut/TM6, Ubx* ♀
 - *w/Y; Df(His3.3A) HttQ120/+; H3.3A-mut/Gcn5^{E333st}* ♂
 - *w/Y; Df(His3.3A) HttQ120/+; H3.3A-mut/TM6, Ubx* ♂

Sirt1 csendesítés keresztezési séma:

- **1. *elav-GAL4; Sp/SM6b; +* ♀ × *w/Y; Sirt1¹⁷/SM6a; +* ♂**
 - *elav-GAL4/Y; Sirt1¹⁷/Sp; +* ♂
- **2. *w; Df(His3.3A) HttQ120; H3.3A-mut* ♀ × *elav-GAL4/Y; Sirt1¹⁷/Sp; +* ♂**
 - *elav-GAL4/w; Df(His3.3A) HttQ120/Sirt1¹⁷; H3.3A-mut/+* ♀
 - *elav-GAL4/w; Df(His3.3A) HttQ120/Sp; H3.3A-mut/+* ♀
 - *w/Y; Df(His3.3A) HttQ120/Sirt1¹⁷; H3.3A-mut/+* ♂
 - *w/Y; Df(His3.3A) HttQ120/Sp; H3.3A-mut/+* ♂

3.1.5. Élettartam vizsgálat

A keresztezésekből kikelő nőstény és hím állatok élettartamát 25 °C-on és 30 °C-on is vizsgáltam. Egy fiolában maximum 30 db állatot tartottam, melyeket 2-3 naponta ráztam át friss fiolába, hogy egészségesek maradjanak, ne ragadjanak bele a tápba, és ne fertőződjön be a fiola gombával, baktériummal vagy atkával. 25 °C-on genotípusonként minimum 150 db,

30 °C-on genotípusonként minimum 200 db egyed túlélését követtem. A túlélés analízis során naponta számoltam az elpusztuló egyedeket, így egy túlélés görbét kaptam. Az adatok további elemzését az OASIS (Online Application and Screening Information System) program ¹⁵⁴ segítségével végeztem, mely statisztikai elemzéseket és összehasonlításokat végez a vizsgált fenotípusú és a kontroll legyek túlélése között. A program a Kaplan-Meier módszert (pontbecslés: a kockázatot és a túlélési valószínűséget minden olyan időpontban meghatározzuk, amelyben legalább egy „halálozás” történt) alapul véve kiszámítja a túlélésre vonatkozó általános adatokat: átlag életkor, medián életkor (50 %-os mortalitás: a vizsgált populáció fele még életben van), túlélés százalékos aránya az idő függvényében. Ezen kívül a program számos statisztikai teszt segítségével képes összehasonlítani az egyes túlélési görbéket. Ezek közül a Fisher-egzakt tesztet használtam, mely meghatározott időpontokban hasonlítja össze a túlélési arányokat. Az eredmények az állatok összesített túlélési görbéjét, illetve a medián élettartamot mutatják a Fisher-egzakt teszt P értékeivel.

A 25 °C-on történő élettartam vizsgálatot az életképesség vizsgálat során kétlépcsős keresztezésekből kikelt, *elav-GAL4* driverrel hajtott transzgéneket expresszáló nőstény egyedeken végeztem. Vizsgáltam a *H3.3A-mut* transzgenek HD legyek élettartamára gyakorolt hatását, illetve a *Gcn5* és *Sirt1* gének funkcióvesztésének *H3.3A*, *H3.3A-K14Q* és *H3.3A-K14R* transzgéneket expresszáló HD legyek élettartamára gyakorolt hatását.

A 30 °C-on történő élettartam vizsgálatához az *elav-GAL4; tub-GAL80^{ts}* és az *elav-GAL4; Df(His3.3A); tub-GAL80^{ts}*, valamint a *w; Df(His3.3A) HttQ120; H3.3A-mut* törzseket használtam. A keresztezéseket 18 °C-on állítottam össze, majd a kikelt utódokat 30 °C-ra helyezve indukáltam az *mHtt* és a *H3.3A-mut* transzgenek expresszióját. A *H3.3A-mut* hisztonok HD legyek élettartamára gyakorolt hatását az endogén *His3.3A* génre nézve mind heterozigóta, mind homozigóta deléciós háttéren vizsgáltam.

Keresztezési séma:

- *elav-GAL4/w; +; tub-GAL80^{ts} ♀ × w/Y; Df(His3.3A) HttQ120; H3.3A-mut ♂*
 - *elav-GAL4/w; Df(His3.3A) HttQ120/+; H3.3A-mut/tub-GAL80^{ts} ♀*
 - *elav-GAL4/Y; Df(His3.3A) HttQ120/+; H3.3A-mut/tub-GAL80^{ts} ♂*
- *elav-GAL4/w; Df(His3.3A); tub-GAL80^{ts} ♀ × w/Y; Df(His3.3A) HttQ120; H3.3A-mut ♂*
 - *elav-GAL4/w; Df(His3.3A)/Df(His3.3A) HttQ120; H3.3A-mut/tub-GAL80^{ts} ♀*
 - *elav-GAL4/Y; Df(His3.3A)/Df(His3.3A) HttQ120/+; H3.3A-mut/tub-GAL80^{ts} ♂*

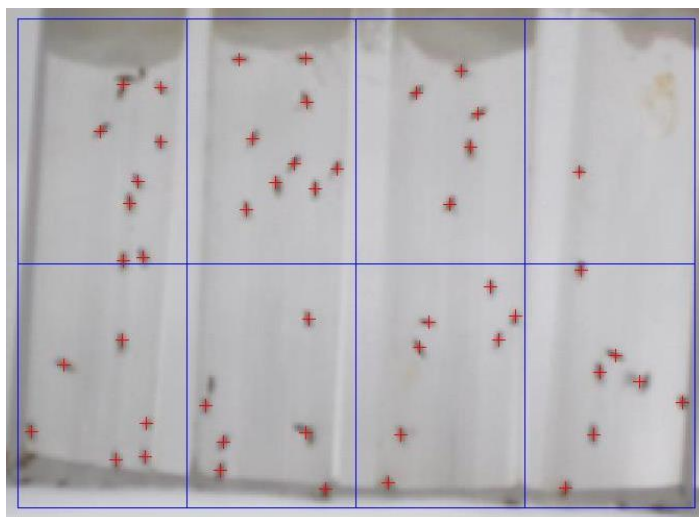
3.1.6. Neurodegeneráció vizsgálat

A neurodegeneráció mértékének vizsgálatát pseudopupil assay segítségével végeztem. A frissen dekapitált állatok fejét átlátszó körömlakkal 45 °-os szögben döntve tárgylemezre rögzítettem, majd az összetett szemeket *Nikon Eclipse 80i* mikroszkóp 50× nagyítású immerziós lencséjével vizsgáltam. A *Drosophila* összetett szem ~700-750 db ommatídiumból épül fel, melyek egyenként tartalmaznak 8 db fotoreceptor neuront, továbbá minden fotoreceptorhoz egyetlen rhabdomernek nevezett fénygyűjtő szerkezet tartozik. A 7. és 8. rhabdomer térben egymás felett helyezkedik el, így mikroszkópban nézve csak 7 db rhabdomer látható¹⁵⁵. A kísérlet során az ommatídiumonként megfigyelhető rhabdomerek számát jegyeztem fel, genotípusonként minimum 10 egyedet és egyedenként minimum 30 db ommatídiumot vizsgáltam. Az eredmények a kontrollra normalizált átlagos rhabdomer szám változást és a standard error-t mutatják, statisztikai analízisként OWA tesztet végeztem.

A pseudopupil assay-hez az életképesség vizsgálat során is használt kétlépcsős keresztezési sémával állítottam elő a vizsgálni kívánt egyedeket. A H3.3A-mut hisztonok HD legyek neurodegenerációja gyakorolt hatásának vizsgálatához 25 °C-on állítottam össze a keresztezéseket, majd a kísérletet az *elav-GAL4* neuronspecifikus driver által meghajtott *mHtt* és *H3.3A-mut* transzgéneket hordozó 3 napos, nőstény utódokon végeztem. A *Gcn5* és a *Sirt1* gének funkcióvesztésének *H3.3A*, *H3.3A-K14Q* és *H3.3A-K14R* transzgéneket expresszáló HD legyek neurodegenerációjára gyakorolt hatásának vizsgálatához 18 °C-on állítottam össze a keresztezéseket, majd kikelés után 25 °C-ra téve az *elav-GAL4* driver által meghajtott transzgéneket hordozó 2 napos nőstény utódokat vizsgáltam.

3.1.7. Motoros képességek vizsgálata

A legyek motoros képességét mászási teszttel tanulmányoztam, mely az adult legyekre jellemző ösztönös, negatív geotaxison alapul. A kísérlethez genotípusonként 20-30 db állatot üres fiolában helyeztem, majd legalább fél óra adaptációs idő után kezdtem meg a mérést, melyet videóra vettem. Egy saját készítésű állvány segítségével egyszerre 4 db fiola vizsgálatára volt lehetőségem, melyek közül minden egyes mérésnél legalább az egyik a kontroll volt. Az állatok lerázását követően 15 mp-ig követtem nyomon a mászási képességüket, majd ezt 20× ismételttem meg ugyanazokon a fiolákon. A videófájlokat a *Flytracker*¹⁵⁶ nevű program segítségével analizáltam (11. ábra), melyet később szükség esetén manuálisan korrigáltam. A végső eredmények a fiolák átlagának eredményeit és a standard error-t mutatják, statisztikai analízisként OWA tesztet végeztem.



11. ábra: Flytracker analízis. Az ábrán kék körvonallal a program által felismert fiola határok, piros kereszttel pedig a beazonosított legyek láthatóak. A kiértékelés során minden egyes másodpercben rögzítésre kerül az egyedi legyek aktuális pozíciója, mely alapján a program átlagos mászási magasságot és sebességet is számol.

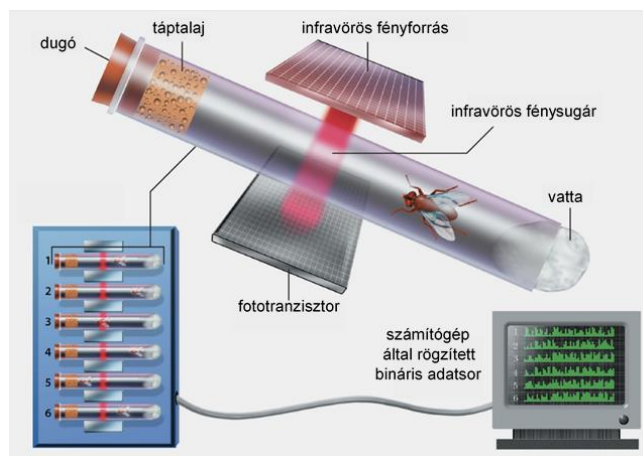
A mászási képesség méréséhez a 18 °C-on történő keresztezésből kikelő utódokat 30 °C-ra téve indukáltam a *tub-GAL80^{ts}* által 18 °C-on inaktív állapotban tartott *elav-GAL4* driverrel hajtott transzgének expresszióját, majd 10 napos hím állatokat vizsgáltam. Genotípusonként legalább 3 ismétlést végeztem különböző napokon, különböző időben gyűjtött egyedekkel.

Keresztezési séma:

- *elav-GAL4/w; +; tub-GAL80^{ts} ♀ × w/Y; Df(His3.3A) HttQ120; H3.3A-mut ♂*
 - *elav-GAL4/Y; Df(His3.3A) HttQ120/+; H3.3A-mut/tub-GAL80^{ts} ♂*
- *elav-GAL4/w; Df(His3.3A); tub-GAL80^{ts} ♀ × w/Y; Df(His3.3A) HttQ120; H3.3A-mut ♂*
 - *elav-GAL4/ Y; Df(His3.3A)/Df(His3.3A) HttQ120/+; H3.3A-mut/ tub-GAL80^{ts} ♂*

3.1.8. Cirkadián ritmus vizsgálata

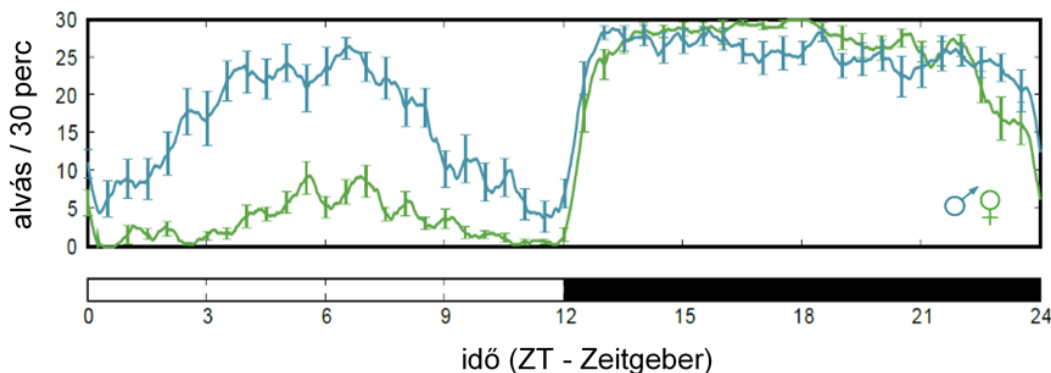
Kísérleteink során a cirkadián ritmus vizsgálatához az állatok napi aktivitását *DAM2 Drosophila Activity Monitor* (TriKinetics Inc, Waltham, MA, USA) segítségével tanulmányoztam. A készülék egyszerre 32 db egyedi légy aktivitását képes detektálni optikai úton. Ha a légy átlép a fiola közepén áthaladó infravörös sugárnyaláb előtt megszakítja azt, amit egy detektor érzékel (12. ábra). A percnkénti felbontásban gyűjtött nyers mozgási adatokat adattáblákba írva tovább analizáltam.



12. ábra: TriKinetics aktivitás monitor sematikus működése.

(Young, 2000 alapján) ¹⁵⁷

Az adatok kiértékelését *DAMFileScan 110* (TriKinetics Inc, Waltham, MA USA) és *PySolo* ¹⁵⁸ programok, valami *Excel* függvények segítségével végeztem. A nyers adatokból alvási és aktivitási görbéket generáltam, kiszámítottam az állatok összesített napi mozgását, a nappali, illetve éjszakai alvással töltött időt, az alvási periódusok hosszát és mennyiségét, illetve a látencia időt. A mérések előtt az állatokat 12/ 12 órás fény/ sötét (08⁰⁰-20⁰⁰; ~250 lux) ciklusban tartottam csak erre a célra használt 25 °C-os, illetve 30 °C-os inkubátorban. Az állatokat az adaptálódás érdekében már előző délután a *DAM2* mérőbe helyeztem, de a tényleges mérést 24 órán keresztül, reggel 8 órától másnap reggel 8 óráig végeztem. A hím muslicákra általánosságban két aktivitás csúccsal rendelkező alvásmintázat jellemző, az ezek közti időben a legyek kevésbé aktívak, éjjel pedig szinte teljesen inaktívak. A hímek és nőstények alvási mintázata eltérő, a nőstényekre nem jellemző a nappali nyugalmi állapot ¹⁵⁹ (13. ábra), ezért az aktivitás mérések során csak hímeket használtam.



13. ábra: A *Drosophila melanogaster* alvási mintázata.

(Gilestro, 2009 alapján) ¹⁵⁹

Az aktivitás- és alvásgörbék esetén feltüntetett ZT (Zeitgeber) idő a lámpa felkapcsolásától számított időt mutatja 24 órán keresztül, melyen ZT0 a lámpa felkapcsolásának és ZT12 a lámpa lekapcsolásának időpontjával egyezik meg (13. ábra). Genotípusonként legalább 30 db egyedi légy aktivitását mértem, melyet legalább 3 ismétlésben végeztem különböző napokon, különböző időben gyűjtött egyedekkel. Az eredmények az adott genotípusú állatok átlagát és a standard error-t mutatják, statisztikai analízisként t-tesztet vagy OWA tesztet végeztem.

A *H3.3A-mut* transzgének HD legyek cirkadián ritmusára gyakorolt hatásának vizsgálatához 18 °C-on történő keresztezésből kikelő utódokat 30 °C-ra téve indukáltam a *tub-GAL80^{ts}* által 18 °C-on inaktív állapotban tartott *elav-GAL4* driverrel hajtott transzgének expresszióját, majd 10 napos hím állatokat vizsgáltam.

Keresztezési séma:

- *elav-GAL4/w; +; tub-GAL80^{ts} ♀ × w/Y; Df(His3.3A) HttQ120; H3.3A-mut ♂*
 - *elav-GAL4/Y; Df(H3.3A)-HttQ120/+; H3.3A-mut/tub-GAL80^{ts} ♂*
- *elav-GAL4/w; Df(His3.3A); tub-GAL80^{ts} ♀ × w/Y; Df(His3.3A) HttQ120; H3.3A-mut ♂*
 - *elav-GAL4/Y; Df(His3.3A)/Df(His3.3A) HttQ120/+; H3.3A-mut/tub-GAL80^{ts} ♂*

A HD modellben megfigyelhető cirkadián ritmus defektus részletes analiziséhez a 18 °C-on történő keresztezésből kikelő utódokat 30 °C-ra téve indukáltam a transzgén expresszióját, majd 8 napos hím állatokat vizsgáltam.

Keresztezési séma:

- *elav-GAL4/w; +; tub-GAL80^{ts} ♀ × w/Y; HttQ25; + ♂*
w/Y; HttQ120; + ♂
 - *elav-GAL4/Y; HttQ25/+; + ♂*
 - *elav-GAL4/Y; HttQ120/+; + ♂*

A *dCBP/nejire* csendesítés hatásának vizsgálatához szintén a 18 °C-on történő keresztezésből kikelő utódokat 30 °C-ra téve indukáltam a transzgén expresszióját, majd 8 napos hím állatokat vizsgáltam.

Keresztezési séma:

- *elav-GAL4/w; +; tub-GAL80^{ts} ♀ × w/Y; nej-RNAi^{v105115}; + ♂*
 - *yw/Y; elav-GAL4/nej-RNAi^{v105115}; tub-GAL80^{ts}/+ ♂*

A *dCBP/nejire* overexpresszió hatásának vizsgálatához a 25 °C-on történő keresztezésekben *per-GAL4* driver által hajtottam az endogén *dCBP* gén expresszióját, majd 2 hetes hím állatokat vizsgáltam.

Keresztezési séma:

- *nej^{EP1179}; HttQ120; + ♀ × yw/Y; per-GAL4; + ♂*
- *nej^{EP1179}/Y; per-GAL4/HttQ120; + ♂*

3.1.9. Keresztezési sémák a molekuláris kísérletekhez szükséges minták előállításához

3.1.9.1. RNS izoláláshoz szükséges keresztezések

Az *mHtt* és a *H3.3A-mut* transzgének megfelelő expressziójának méréshez a 18 °C-on történő keresztezésből kikelő utódokat 30 °C-ra téve indukáltam a *tub-GAL80^{ts}* által 18 °C-on inaktív állapotban tartott *elav-GAL4* driverrel hajtott transzgenek expresszióját, majd az RNS izoláláshoz 3-5 napos hím állatokat használtam.

Keresztezési séma:

- *elav-GAL4/w; +; tub-GAL80^{ts} ♀ × w/Y; Df(His3.3A) HttQ120; H3.3A-mut ♂*
- *elav-GAL4/Y; Df(His3.3A) HttQ120/+; H3.3A-mut/tub-GAL80ts ♂*

Az *mHtt* és a *dCBP* génexpresszió validálásához, valamint a cirkadián ritmus szabályozó gének expressziójának meghatározásához a 25 °C-on tartott keresztezésekben, *per-GAL4* driver által hajtottam a transzgeneket, majd a 12/ 12 órás fény/ sötét ciklusban tartott 2 hetes hím utódokat használtam. A cirkadián ritmus gének expressziójának vizsgálatához a mintavételek 4 órás időintervallumonként, reggel 8 órától másnap reggel 8 óráig történtek.

Keresztezési séma:

- *yw; per-GAL4; + ♀ × w/Y; HttQ25; + ♂*
- w/Y; HttQ120; + ♂*
- w/Y; nej-RNAi^{v105115}; + ♂*
- nej^{EP1179}/Y; HttQ120; + ♂*
- *yw/Y; per-GAL4/HttQ25; + ♂*
- *yw/Y; per-GAL4/HttQ120; + ♂*
- *yw/Y; per-GAL4/nej-RNAi^{v105115}; + ♂*
- *nej^{EP1179}/Y; per-GAL4/HttQ120; + ♂*

A H3.3A-K14 pozíció acetilációt (Q), illetve nem módosítható lizint (R) mimikáló mutációinak transzkriptómra gyakorolt hatásának vizsgálatához a 18 °C-on történő keresztezésből kikelő utódokat 30 °C-ra téve indukáltam a *tub-GAL80^{ts}* által 18 °C-on inaktív állapotban tartott *elav-GAL4* driverrel hajtott transzgénnek expresszióját, majd 10 napos korban gyűjtött hím állatokból izoláltam RNS-t. Genotípusonként 2 db párhuzamos, különböző időben gyűjtött biológiai replikátummal dolgoztam.

Keresztezési séma:

- *elav-GAL4/w; +; tub-GAL80^{ts} ♀ × yw/Y; Df(His3.3A); + ♂*
 - w/Y; Df(His3.3A) HttQ120; + ♂*
 - w/Y; Df(His3.3A) HttQ120; H3.3A ♂*
 - w/Y; Df(His3.3A) HttQ120; H3.3A-K14Q ♂*
 - w/Y; Df(His3.3A) HttQ120; H3.3A-K14R ♂*
- *elav-GAL4/Y; Df(His3.3A)/+; tub-GAL80^{ts}/+ ♂*
- *elav-GAL4/Y; Df(His3.3A) HttQ120/+; tub-GAL80^{ts}/+ ♂*
- *elav-GAL4/Y; Df(His3.3A) HttQ120/+; H3.3A/tub-GAL80^{ts} ♂*
- *elav-GAL4/Y; Df(His3.3A) HttQ120/+; H3.3A-K14Q/tub-GAL80^{ts} ♂*
- *elav-GAL4/Y; Df(His3.3A) HttQ120/+; H3.3A-K14R/tub-GAL80^{ts} ♂*

3.1.9.2. RNS-DNS mennyiségi összehasonlításához szükséges keresztezések

A H3.3A-K14 pozíció acetilációt, illetve nem módosítható lizint mimikáló mutációinak RNS/ DNS arányra gyakorolt hatásának vizsgálatához a 18 °C-on történő keresztezésből kikelő utódokat 30 °C-ra téve indukáltam a *tub-GAL80^{ts}* által 18 °C-on inaktív állapotban tartott *elav-GAL4* driverrel hajtott transzgénnek expresszióját, majd 3, 5 és 10 napos hím állatokon, genotípusonként minimum 6 db párhuzamos, különböző időben gyűjtött biológiai replikátumot vizsgáltam.

Keresztezési séma:

- *elav-GAL4/w; +; tub-GAL80^{ts} ♀ × yw/Y; Df(His3.3A); + ♂*
 - w/Y; Df(His3.3A) HttQ120; + ♂*
 - w/Y; Df(His3.3A) HttQ120; H3.3A ♂*
 - w/Y; Df(His3.3A) HttQ120; H3.3A-K14Q ♂*
 - w/Y; Df(His3.3A) HttQ120; H3.3A-K14R ♂*

- *elav-GAL4/Y; Df(His3.3A)/+; tub-GAL80^{ts}/+ ♂*
- *elav-GAL4/Y; Df(His3.3A) HttQ120/+; tub-GAL80^{ts}/+ ♂*
- *elav-GAL4/Y; Df(His3.3A) HttQ120/+; H3.3A/tub-GAL80^{ts} ♂*
- *elav-GAL4/Y; Df(His3.3A) HttQ120/+; H3.3A-K14Q/tub-GAL80^{ts} ♂*
- *elav-GAL4/Y; Df(His3.3A) HttQ120/+; H3.3A-K14R/tub-GAL80^{ts} ♂*

3.1.9.3. Hiszton sóelúcióhoz szükséges keresztezések

A H3.3A-mut hisztonok kromatin kötöttségének sóelúcióval történő vizsgálatához 25 °C-on *elav-GAL4* driver által hajtott transz géneket expresszáló 1-3 napos hímeket, illetve kontrollként az *elav-GAL4* törzsből származó hímeket gyűjtöttem. Genotípusonként 3 db párhuzamos, különböző időben gyűjtött biológiai replikátummal dolgoztam.

Keresztezési séma:

- *elav-GAL4; +; + ♀ × w/Y; +; H3.3A-mut ♂*
- *elav-GAL4/Y; +; H3.3A-mut/+ ♂*

3.2. Molekuláris biológiai módszerek

3.2.1. RNS izolálás és koncentráció meghatározás

A génexpressziós mintázatok meghatározásához, illetve a transzkriptomikai analízishez *TriPure Isolation Reagent* (Roche) segítségével a gyártó által mellékelte protokoll szerint izoláltam RNS-t. Mintánként 20 db állat fejét használtam fel, genotípusonként minimum 3 párhuzamos biológiai replikátumot készítettem. Az RNS koncentrációját és tisztaságát *NanoDrop ND-1000* spektrofotométer segítségével határoztam meg, melyhez mintánként 1 µl RNS oldatot használtam fel. Az RNS koncentrációját a 260 nm-en mért fényelnyelés alapján határoztam meg; minőségét a 260 nm és 280 nm-en mért fényelnyelés (fehérje szennyezettség), illetve a 260 nm és 230 nm-en mért fényelnyelés (szerves oldószer szennyezettség) hányadosával jellemeztem, melyeket 1,8-2 közötti érték esetén tekintettem megfelelőnek.

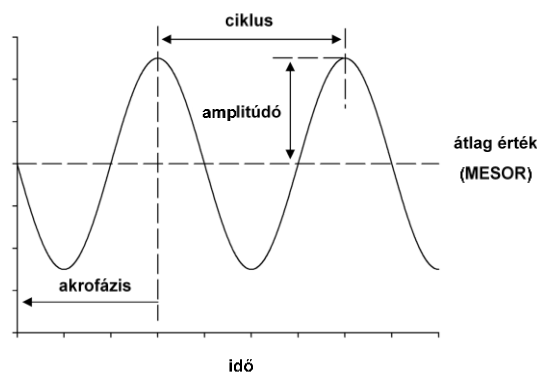
3.2.2. RT-qPCR

Az *mHtt* és a *H3.3A-mut* transz gének, a *dCBP*, valamint a cirkadián ritmus szabályozó *per*, *tim*, *Clk*, *vri*, *Pdp1* és *cwo* gének expresszióját RT-qPCR (reverz transzkripció kapcsolt real-time PCR) segítségével vizsgáltam. A PCR során használt Taq polimeráz csak DNS-t képes templákként használni, ezért első lépésként a korábban izolált RNS mintákról reverz transzkriptáz segítségével cDNS-t készítettem. A reverz transzkripciót megelőzően az RNS

mintákat RNáz mentes DNáz I-el (Thermo Scientific) kezeltem a gyártó által mellékelt protokoll alapján. Ezután a reverz transzkripciót *TaqMan® Reverse Transcription Reagents* (Thermo Scientific) és random hexamer primerek használatával, a gyártó által mellékelt protokoll szerint végeztem. A qPCR reakció lehetővé teszi a PCR ciklusok során keletkező termékek valós idejű detekcióját és mennyiségi mérését. A mérést *Luna® Universal qPCR Master Mix* (New England Biolabs) és a vizsgálni kívánt génekre tervezett primerek (Függelék F1. táblázat) segítségével, a gyártó által mellékelt protokoll szerint végeztem *PikoReal™ Real-Time PCR System* (Thermo Scientific) gépben az alábbi PCR programmal:

- Kezdeti denaturáció: 10 perc 95 °C
 - Denaturáció 15 mp 95 °C
 - Annealing és elongáció 1 perc 60 °C
 - Fluoreszcencia mérés
 - Melting Curve analízis 60 → 95 °C
 - Tárolás ∞ 20 °C
- } 40× ismételve

A kiértékelés során egy 4 lépcsős kalibrációs egyenes segítségével validáltam a primerek megfelelő hatékonyságát ($\geq 75\%$) és R^2 ($\geq 0,98$) értékét, az egyes Ct értékekhez tartozó templát koncentrációkat pedig a kalibrációs egyenesre vetítve határoztam meg. Ezután minden esetben a *tubulin* háztartási génre normalizálva kaptam meg az egyes minták relatív expressziós értékét. A cirkadián szabályozó gének expressziós mintázatának amplitúdóját (génexpressziós csúcs átlagtól való eltérése) és akrofázisát (génexpressziós csúcs elérésének a görbe alapján becsült fázisa) a *Cosinor* program¹⁶⁰ segítségével határoztam meg (14. ábra). A génexpresszió mérés eredmények az átlagos relatív expressziós szinteket és a standard error-t mutatják, statisztikai analízisként t-tesztet vagy TWA (Two-Way ANOVA, kétszemponos varianciaanalízis) tesztet végeztem. Az amplitúdó és akrofázis értékek esetén szintén az átlag és standard error látható, statisztikai analízisként Mann-Whitney U tesztet végeztem.



14. ábra: Amplitúdó és akrofázis meghatározása.

(Refinetti, 2007 alapján)¹⁶⁰

3.2.3. Transzkriptomikai analízis

Az RNS szekvenáláshoz a korábban említett módon izoláltam és határoztam meg az RNS minták koncentrációját és tisztaságát. Az RNS integritását a *2100 Bioanalyzer* (Agilent) kapilláris gélelektroforézis berendezésben *RNA 6000 Nano Kit* (Agilent) segítségével vizsgáltam. A szekvenáló könyvtárhoz 800 ng totál RNS-ből kiindulva polyA RNS-t tisztítottam a *NEBNext Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module* (New England Biolabs) segítségével, a gyártó által mellékelt protokoll szerint. Ezután a szekvenáló könyvtár a *NEBNext Ultra Directional RNA Library Prep Kit for Illumina* (New England Biolabs) segítségével készült a gyártó által mellékelt protokoll szerint. A szekvenáló könyvtárak koncentrációjának és fragment hosszúságának ellenőrzését a *2100 Bioanalyzer* (Agilent) kapilláris gélelektroforézis berendezésben *High Sensitivity DNA Kit* (Agilent) segítségével végeztem. A könyvtárakat 10 nM koncentrációra hígítottam, majd pool-oztam. A könyvtár poolt denaturáltam és 8 pM-os hígításban *MiSeq Reagent Kit v3-150* (Illumina) segítségével *MiSeq System* (Illumina) készülékben szekvenáltuk. A Fastq formátumú 2×75 bp paired-end szekvencia leolvasások minőségi ellenőrzése *FastQC* programmal, minőségi vágása pedig a *Trimmomatic v0.33* programban {ILLUMINACLIP:TruSeq3-PE.fa:2:30:10:8:true LEADING:3 TRAILING:3 SLIDING-WINDOW:4:20 MINLEN:36} paranccsal készült. A szekvenciák illesztése a *Dmr6.13 Drosophila melanogaster* referencia genomhoz *TopHat v2.0.9* program segítségével történt. Az illesztett szekvenciák indexelése és deduplikálása a *Samtools 0.1.19* program segítségével, majd a differenciál génexpresszió analízis a *Cuffdiff v2.1.1* program és a *FlyBase dmr6.13.gtf* transzkript annotáció felhasználásával történt. A génontológiai analízist és vizualizációt a *GOrilla* (Gene Ontology enRIchment anaLysis and visuaLizAtion tool) és a *MetaChart* programok segítségével végeztem. Az eredmények az egészséges kontrollhoz viszonyított szignifikáns expressziós szint változást mutató gének számát és a génexpresszió változás irányát ábrázolják az *mHtt*, illetve az *mHtt* és a *H3.3A-mut* transzgéneket együttesen expresszáló egyedekben, továbbá az egyes minták közötti gének átfedéseit és azok sejtben betöltött szerepét ábrázolják.

3.2.4. RNS/ DNS arány meghatározása

A sejtekben található RNS/ DNS arány meghatározásához egy módosított és optimalizált *Drosophila* genomi DNS izoláló protokollt használtam, melynek segítségével teljes nukleinsav preparátumokat készítettem. Az RNS/ DNS arány meghatározásához 30 db fejet homogenizáltam 100 µl Solution A (0,1 M Tris-HCl pH 8,5; 0,1 M EDTA; 1 % SDS) oldatban homogenizáló rotorra rögzített *Axygen™ Tissue Grinder* (Corning) pisztillus

segítségével, majd a mintákat 30 percig jégen inkubáltam. Mintánként 14 µl 8 M K-acetátot adtam hozzá, majd 10 mp összerázást követően ismét 30 percig jégen inkubáltam. A mintákat 4 °C-on 15 percig 13000 rpm-en centrifugáltam, majd a ~100 µl felülúszót tiszta Eppendorf-csőbe pipettáztam. 100 µl fenol-kloroformot (1:1) adtam hozzá, majd 10 mp összerázást követően ismét 4 °C-on 15 percig 13000 rpm-en centrifugáltam. A felülúszót ismét átmértem új Eppendorf-csőbe, 100 µl fenol-kloroformot (1:1) adtam hozzá, majd 10 mp összerázást követően 4 °C-on 15 percig 13000 rpm-en centrifugáltam. A ~85 µl felülúszót új Eppendorf-csőbe mértem, 62,5 µl izopropanolt adtam hozzá, majd 10 mp összerázást követően 4 °C-on 15 percig 13000 rpm-en centrifugáltam. A felülúszó eltávolítása után a mintákat 500 µl 70 %-os RNáz mentes etanol segítségével mostam, vortexeltem, majd 4 °C-on 10 percig 13000 rpm-en centrifugáltam. A felülúszó eltávolítása után a csapadékot ~5 percig szárítottam, majd a mintákat 50 µl RNáz mentes H₂O-val reszuszpendáltam. A minták megfelelő RNS-DNS tartalmát és tisztaságát *NanoDrop* spektrofotométer segítségével határoztam meg, melyhez mintánként 1 µl -t használtam fel. A túl tömény mintákat 80 µl végtérfogatra hígítottam, majd a pontos koncentrációk meghatározását *Qubit 2.0 Fluorometer* (Thermo Scientific) segítségével végeztem. Az RNS koncentráció méréshez *Qubit RNA HS (High Sensitivity) Assay Kit*-et, a DNS koncentráció méréshez pedig *Qubit dsDNA HS Assay Kit*-et használtam a gyártó által mellékelt protokoll alapján. Mintánként 3×1 µl-t használtam fel, majd a mért technikai replikátum értékek átlagát a kontrollra normalizáltam. Az eredmények a biológiai replikátumok átlagát és a standard error-t mutatják, statisztikai analízisként OWA tesztet végeztem.

3.2.5. polyA mRNS/ totál RNS arány meghatározása

A polyA mRNS/ totál RNS arány meghatározásához a korábbiakban izolált totál RNS-DNS mintákból a *NEBNext PolyA mRNA Magnetic Isolation Module* (New England Biolabs) segítségével a gyártó által mellékelt protokoll szerint izoláltam mRNS-t. Mintánként 3×1 µg totál RNS-ből indultam ki, majd az izolált polyA mRNS minták koncentrációját a *Qubit RNA HS Assay Kit* segítségével mértem a teljes mintatérfogat felhasználásával. A párhuzamosan mért 3 db technikai replikátum érték átlagát a kontrollra normalizáltam. Az eredmények 4 db biológiai replikátum átlagát és a standard error-t mutatják, statisztikai analízisként OWA tesztet végeztem.

3.2.6. Hiszton sóelúció

A H3.3A-mut hiszton fehérjék sóelúciójához a Dr. Boros Imre laborjából származó hiszton sóelúciós protokoll *Drosophila* fejekre optimalizált változatát alkalmaztam. A hiszton sóelúciót az alábbi protokoll szerint végeztem.

A kísérlethez szükséges oldatok:

- *A1 puffer*: 0,23 M szacharóz; 15 mM Tris-HCl pH 7,5; 60 mM KCl; 15 mM NaCl; 0,15 mM spermin; 0,5 mM spermidin; 0,2 mM PMSF; 14 mM merkaptotanol; 0,25 mM MgCl₂

- *A2 puffer*: 15 mM Tris-HCl pH 7,5; 60 mM KCl; 15 mM NaCl; 0,15 mM spermin; 0,5 mM spermidin; 0,2 mM PMSF; 14 mM merkaptotanol; 0,25 mM MgCl₂

- *A2 + só puffer*: A2 puffer kiegészítve 0 mM/ 100 mM/ 500 mM/ 800 mM/ 1400 mM/ 2000 mM NaCl-dal

Hiszton sóelúció protokoll:

A kísérlethez 100 db fejet homogenizáltam 120 µl A1 pufferben homogenizáló rotorra rögzített *Axygen™ Tissue Grinder* (Corning) pisztillus segítségével. Ezután tiszta Eppendorf-csövekbe 6×20 µl (0/ 100/ 500/ 800/ 1400/ 2000 mM NaCl sóelúciós minták esetében) vagy 2×60 µl (0/ 1400 mM NaCl sóelúciós minták esetében) párhuzamos mintát mértem szét, majd a mintákat 4 °C-on 15 percig 3300 g-vel centrifugáltam. Az egyes felülúszók térfogatát megmértem, majd FÚ1 (citoplazmatikus frakció) feliratú tiszta Eppendorf-csövekbe mértem. A pelletet 50 µl/ 100 µl A1 pufferrel mostam, majd a mintákat 4 °C-on 15 percig 3300 g-vel centrifugáltam. A felülúszó eltávolítása után a pelletet 50 µl/ 100 µl A2 pufferrel mostam, majd a mintákat 4 °C-on 15 percig 3300 g-vel centrifugáltam. A felülúszó eltávolítása után a pelletet FÚ1 térfogatával megegyező térfogatú és megfelelő sókoncentrációjú A2 + só pufferrel reszuszpendáltam, majd gyakori rázás mellett 10 percig jégen inkubáltam. A mintákat 4 °C-on 15 percig 3300 g-vel centrifugáltam, majd a felülúszót FÚ2 (sóeluált magi frakció) feliratú tiszta Eppendorf-csövekbe mértem. A pelletet (P, nem eluált magi frakció pellet) FÚ1 térfogatával megegyező térfogatú A2 pufferben reszuszpendáltam, majd az összes mintához 1× térfogatnyi denaturáló mintafelvívő puffert (0,125 mM Tris-HCl pH 6,8; 4 % SDS; 21 % glicerin, brómfenolkék, 200 mM DTT) adtam és 100 °C-on 5 percig forraltam.

3.2.7. Western blot

A sóelúcióval izolált mintákban található hisztonok arányát western blot segítségével vizsgáltam. A különböző sókoncentrációkat alkalmazva előállított FÚ1, FÚ2 és pellet mintákat tricin-SDS-PAGE (poliakrilamid gélelektroforézis) segítségével választottam el, majd nitrocellulóz membránra blottolva vizsgáltam a H3.3A-mut fehérjék mennyiségét az egyes mintákban. A western blot kísérleteket az alábbi protokoll szerint végeztem.

A kísérlethez szükséges oldatok:

- *szeparáló gél:*

- 7 ml 3× gél puffer (3 M Tris-HCl, 0,3 % SDS, pH 8,45)
- 7 ml 29:1 AA:bisAA (30 % akrilamid: biszakrilamid)
- 7 ml H₂O
- 100 µl 10 % APS (ammónium-perszulfát)
- 50 µl TEMED (tetrametil-etilén-diamin)

- *stacking gél:*

- 2 ml 3× gél puffer (3 M Tris-HCl, 0,3 % SDS, pH 8,45)
- 1 ml 29:1 AA:bisAA (30 % akrilamid: biszakrilamid)
- 3 ml dH₂O
- 40 µl 10 % APS
- 20 µl TEMED

- *anód puffer:* 100 mM Tris-HCl pH 8,9

- *katód puffer:* 100 mM Tris-HCl; 100 mM tricín; 0,1 % SDS, pH 8,25

- *10× transzfer puffer:* 1,92 M glicin; 250 mM Tris; 0,1% SDS

- *1× transzfer puffer (1 literre):* 100 ml 10× transzfer puffer; 200 ml metanol; 700 ml dH₂O

- *10× TBS:* 50 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; (pH 7,4)

- *1× TBST (1 literre):* 100 ml 10× TBS; 900 ml H₂O; 1 ml Tween-20

- *fehérje marker:*

- 4 µl LONZA ProSieve® QuadColor™ Protein Marker (gélen látható)
- 0,2 µl SuperSignal Molecular Weight Protein Ladder (gélen nem látható)
- 5 µl 2× SDS loading + DTT

- *5 % tej 1× TBST-ben:* 2,5 g tejpor 50 ml 1× TBST-ben oldva

Western blot protokoll:

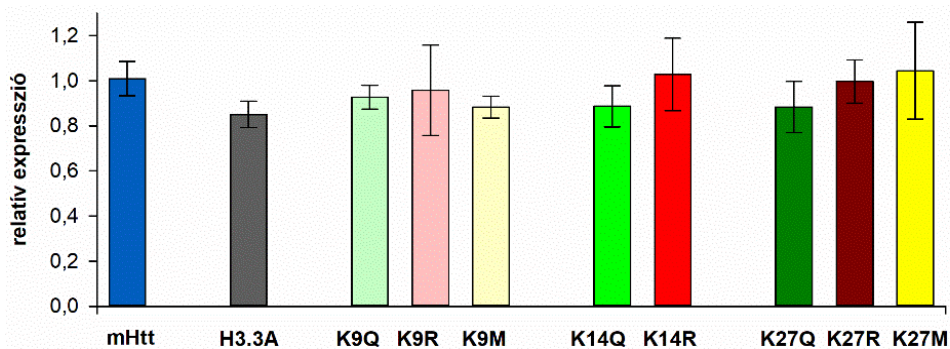
A fehérjeanalízishez mintánként 20-20 μl -t futtattam 10 %-os tricines akrilamid gélen 4 °C-on (45 V ~30 perc \rightarrow 90 V ~120 perc), majd a fehérjéket elektroblottolással 35 V-on 90 perc alatt 0,45 μm pórusméretű nitrocellulóz membránra rögzítettem. A fehérjeelválasztás és a blottolás megfelelő minőségéről Ponceau festéssel győződtem meg (festés 100 ml Ponceau S oldatban 2-3 percig, mosás dH_2O -val). Ezt követően a membránt 5 % tejpport tartalmazó TBST oldatban 1 órán keresztül szobahőn blokkoltam, majd a membrán 1 \times 5 perc TBST-vel történő mosása után az immunreakcióhoz 5 % tejpport tartalmazó TBST oldatban hígított elsődleges ellenanyaggal 4 °C-on overnight inkubáltam. A FLAG-H3.3A-mut fehérjék kimutatására egérben termeltetett monoklonális *anti-FLAG M2* (Sigma, F3165) ellenanyagot használtam 1:5000 hígításban. Az endogén H3 és H4 fehérjék kimutatására nyúlban termeltetett poliklonális *anti-H3* (Abcam, ab1791), illetve *anti-H4* (Abcam, ab10158) ellenanyagot használtam 1:5000, illetve 1:1000 hígításban. A 3 \times 5 perc TBST-vel történő mosás után a kötődött elsődleges ellenanyagok kimutatásához a membránt 1 órán keresztül inkubáltam 5 % tejpport tartalmazó TBST oldatban 1:5000 arányban hígított, torma peroxidázzal kapcsolt másodlagos ellenanyagokkal (egér elleni másodlagos ellenanyag *RAM* – Dako, P0260; nyúl elleni másodlagos ellenanyag *GAR* – Dako, P0448). A membránt 3 \times 5 percig TBST-vel mostam, majd *Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate* (Millipore) reagenssel 5 percig inkubáltam, a képződött kemilumineszcens jelet *LI-COR C-DiGit Blot Scanner* segítségével detektáltam. A jelintenzitás értékeket az *Image Studio Lite 5.2* programmal határoztam meg, majd azokat a H4 kontrollra normalizáltam. Az eredmények 3 biológiai replikátum átlagát és a standard error-t mutatják, statisztikai analízisként OWA tesztet végeztem.

4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

4.1. Hiszton módosítások szerepe a Huntington-kór pathogenezisében

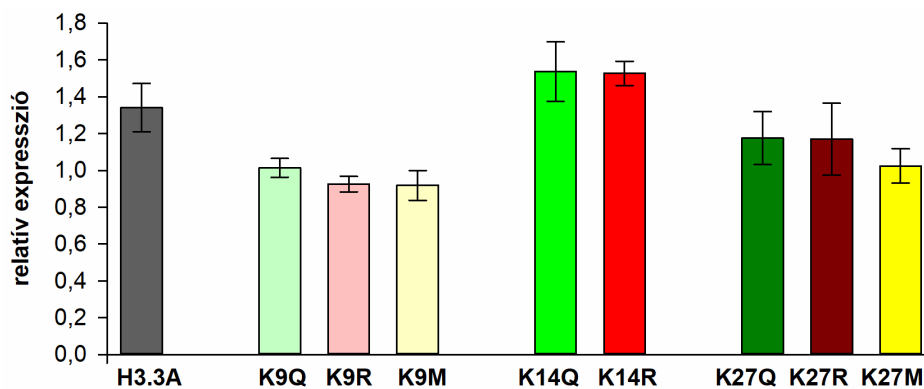
4.1.1. Neuronálisan expresszált *mHtt* és *H3.3A-mut* expressziós szintek validálása

A Huntington-kór pathogenezisét nagyban befolyásolja a hiszton fehérjék megfelelő acetiláltsági állapota, ezért a betegség szempontjából kiemelt jelentőségű acetilációs target pozíciók azonosítása érdekében H3.3A hiszton variáns mutációs analízist végeztük, melyhez a *H3.3A-mut* transzgenikus törzsek előállítását és validálását Dr. Zsindely Nóra végezte. Western blot-tal kimutatta, hogy a neuronális *elav-GAL4* driver által hajtott *H3.3A-mut* transzgénekről a fehérjék megfelelő módon expresszálódnak, immunhisztokémiai analízissel pedig igazolta, hogy a sejtmagban lokalizálódnak (Függelék F1. ábra). Kísérleteink során a GAL4-UAS rendszer által expresszáltatjuk az *mHtt* és a *H3.3A-mut* transzgéneket is, így előfordulhat, hogy az UAS szekvenciák között nem egyenlő arányban oszlik meg a GAL4 transzkripció faktor, mely eltérő mértékű génexpresszióhoz és fals pozitív eredményekhez vezethet. Annak igazolására, hogy a HD legyekben tapasztalt változások nem az *mHtt* expressziójának csökkenése, hanem az egyes *H3.3A-mut* transzgenek hatására következnek be RT-qPCR segítségével megmértük a transzgenek expresszióját. Ehhez a 18 °C-on történő keresztezésből kikelő utódokat 30°C-ra téve indukáltuk a *tub-GAL80^{ts}* által 18 °C-on inaktív állapotban tartott *elav-GAL4* driverrel hajtott transzgenek expresszióját, majd 3-5 napos legyeket vizsgáltunk. Az *mHtt* expressziójában nem figyelhető meg szignifikáns csökkenés az *mHtt* és a *H3.3A* (*mHtt – H3.3A*) transzgenek együttes hajtása során a csak *mHtt*-t expresszáló kontrollhoz képest (15. ábra). Továbbá az *mHtt* és a *H3.3A-mut* (*mHtt – H3.3A-mut*) transzgenek együttes expressziója esetén szintén nem figyelhető meg szignifikáns eltérés a kísérleteink során kontrollként használt *mHtt – H3.3A* transzgéneket expresszáló legyekhez képest (15. ábra).



15. ábra: *mHtt* expressziós szintek az *mHtt – H3.3A-mut* transzgéneket expresszáló egyedekben. A diagram a *tubulin* háztartási génre normalizált relatív *mHtt* expressziós szintek átlagát és a standart error-t ábrázolja, statisztikai analízisként OWA tesztet végeztünk.

A *H3.3A-mut* transzgének expresszió mérése során kontrollként szintén az *mHtt – H3.3A* transzgéneket együttesen expresszáló törzset használtuk. Az egyes pozíciókat érintő pontmutációkat tartalmazó *H3.3A* transzgének hasonló expressziós szintet mutatnak, mely a *H3.3A-K9* és *H3.3A-K27* módosítások esetén a kontrollhoz képest egységesen alacsonyabb, míg a *H3.3A-K14* pozíció esetén egységesen magasabb (16. ábra). Ez az expresszióbeli eltérés feltételezhetően a módosított lizin pozíciójától függ, azonban a különbség statisztikailag egyik esetben sem bizonyult szignifikánsnak. Továbbá az azonos pozícióban található különböző módosítások egységes expressziós szintje is arra utal, hogy az *mHtt* és a *H3.3A-mut* transzgének együttes hajtása nem csökkenti a *H3.3A-mut* génextpressziót, tehát a kísérleteink során megfigyelhető fenotípusbeli különbségek ténylegesen az adott módosítás következtében alakulnak ki.

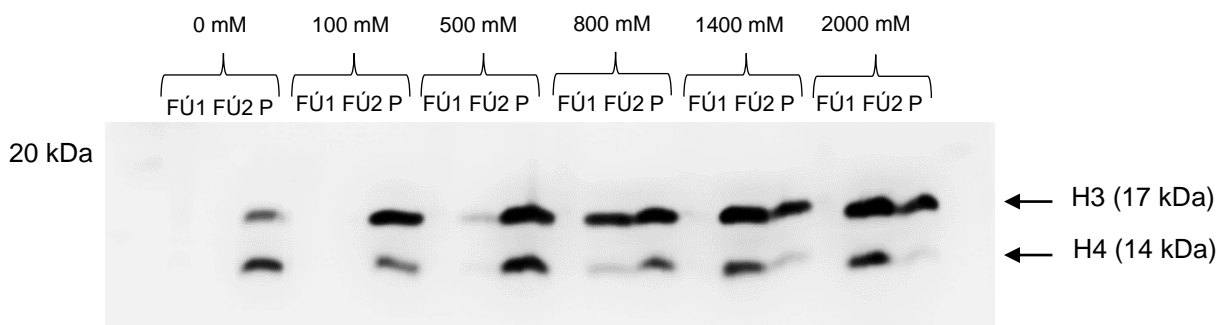


16. ábra: *H3.3A-mut* expressziós szintek az *mHtt – H3.3A-mut* transzgéneket expresszáló egyedekben. A diagram a *tubulin* háztartási génre normalizált relatív *H3.3A-mut* expressziós szintek átlagát és a standard error-t ábrázolja, statisztikai analízisként OVA tesztet végeztünk.

4.1.2. Neuronálisan expresszált *H3.3A-mut* fehérjék sejtmagi lokalizációjának és kromatin kötöttségének validálása

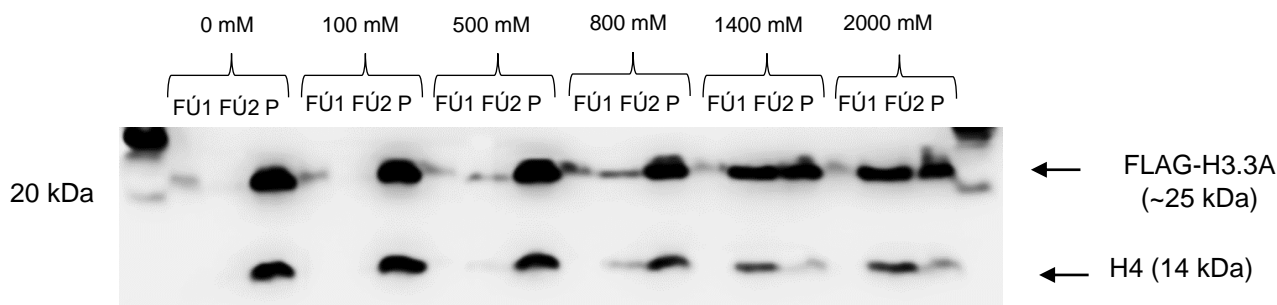
Szakirodalmi adatok alapján a hisztonok sejtmagba történő transzportját befolyásolhatja azok acetilációs állapota. A H3 hiszton esetén több független publikáció szerint is a H3K14 pozíció acetilációja jelentős mértékben befolyásolhatja a magi transzportot²⁷⁻³². Korábban a *H3.3A-mut* hisztonok sejtmagi lokalizációját immunfestéssel validáltuk (Függelék F1. ábra), de pontosabb információval nem rendelkezünk a hisztonok kromatin kötöttségéről. Ezért kromatin kötött és nem-kötött frakciók izolálásával, és a kromatin kötött hisztonok sóelúciójával vizsgáltuk a *H3.3A* és *H3.3A-mut* hisztonok kromatin kötöttségének mértékét. Ehhez *elav-GAL4* driver által 25 °C-on hajtottuk meg a *H3.3A-mut* transzgéneket és 1-3 napos

hímekből származó mintákban western blot analízissel vizsgáltuk, hogy a sejtlizátum frakcionálását követően a citoplazmatikus felülúszó (FÚ1), valamint a sóelúciót követően elválasztott magi felülúszó (FÚ2, nem kromatin kötött magi frakció) és magi pellet (P, kromatin kötött magi frakció) frakciók között hogyan oszlanak meg a H3.3A-mut hisztonok. A megfelelő sókoncentráció (amelynél a hisztonok egy része már eluálódik, de még kromatin kötött formában is jelen van) kiválasztása érdekében egy 0-2000 mM NaCl grádiens segítségével vizsgáltuk, hogy a kanonikus H3 és H4 hisztonokhoz képest az általunk kontrollként használt nem módosított, vad típusú *H3.3A* transzgén expresszálo egyedekben hogyan oszlik meg a FLAG-H3.3A és H4 hisztonok aránya a különböző frakciókban. Az *elav-GAL4* driver törzsből készített kontroll mintákban a citoplazmatikus FÚ1 frakcióban a vártan megfelelően nem található hiszton fehérje (17. ábra). A magi frakciók esetén a hisztonok túlnyomó része a pelletben található, mely arra utal, hogy a H3 és H4 hisztonok kromatin kötöttek. Elsőként 800 mM sókoncentrációnál figyelhető meg jelentős mennyiségű eluált H3 és H4 hiszton a FÚ2 frakcióban, azonban a nagyobb részük még a pelletben található kromatin kötötten. 1400 mM sókoncentráció esetén azonban már nagyobb mennyiségű hiszton eluálódik, melyen 2000 mM sókoncentráció alkalmazása nem változtat jelentősen (17. ábra).



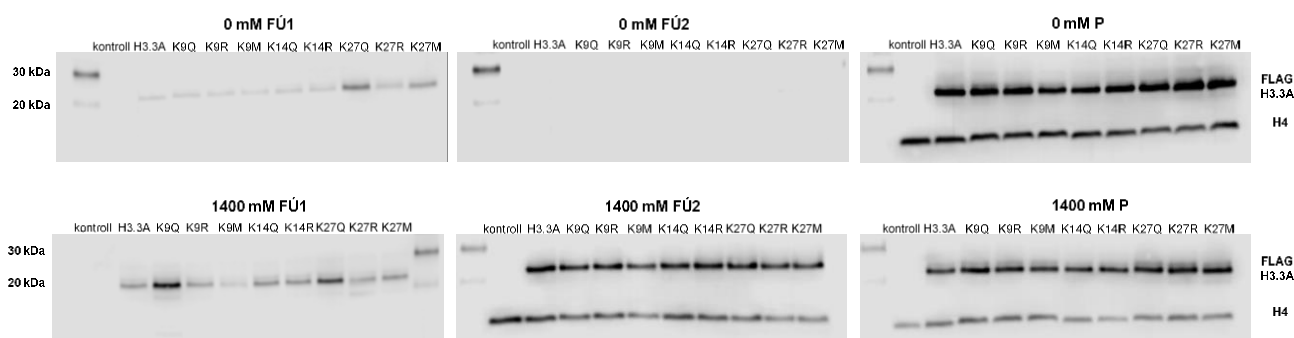
17. ábra: H3 és H4 hisztonok megoszlása a különböző frakciókban 0-2000 mM sóelúció grádiens kezelést követően kontroll mintákban. Az ábrán a citoplazmatikus felülúszó (FÚ1), valamint a sóelúciót követően elválasztott magi felülúszó (FÚ2) és magi pellet (P) frakciókon anti-H3 és anti-H4 ellenanyaggal készült western blot kísérlet eredménye látható.

A nem módosított *H3.3A* transzgén expresszálo minták esetén feltételezhetően az overexpresszió következtében már a citoplazmatikus FÚ1 frakcióban is megfigyelhető minimális mennyiségű hiszton (18. ábra). A kanonikus H3 hisztontól eltérően 800 mM sókoncentrációnál az elúciót követően a transzgénként expresszált H3.3A még csak igen kis mennyiségben jelenik meg a FÚ2 frakcióban, viszont 1400 mM sókoncentráció esetén már jelentős mértékű elúció figyelhető meg (18. ábra).



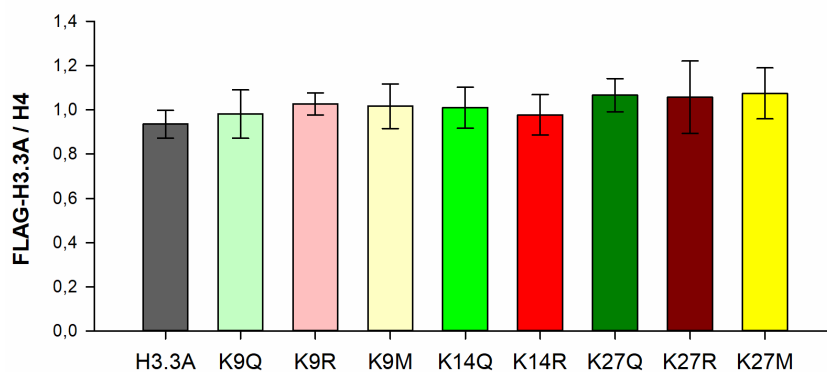
18. ábra: FLAG-H3.3A és H4 hisztonok megoszlása a különböző frakciókban 0-2000 mM sóelúció grádiens kezelést követően a *H3.3A* transzgén expresszáló mintákban. Az ábrán a citoplazmatikus felülúszó (FÚ1), valamint a sóelúciót követően elválasztott magi felülúszó (FÚ2) és magi pellet (P) frakciókon anti-FLAG és anti-H4 ellenanyaggal készült western blot kísérlet eredménye látható.

A sóelúció grádiens eredményei alapján a H3.3A kromatin kötése stabilabbnak bizonyul a kanonikus H3-hoz képest, ezért a H3.3A-mut hisztonok sóelúcióval szemben mutatott stabilitását és a frakciók közötti megoszlását 0 mM és 1400 mM sókoncentrációknál vizsgáltuk. Eredményeink azt mutatják, hogy a citoplazmatikus FÚ1 frakcióban várakozásainknak megfelelően a kanonikus H4 hiszton jelenléte nem kimutatható, azonban a H3.3A-mut hiszton variáns fehérjék kis mennyiségben megjelennek (19. ábra). Ennek magyarázata lehet, hogy a H3 és H4 hiszton fehérjék magi transzportja általában dimer formában történik, azonban az overexpresszió következtében felbomlik a sztöchiometriai egyensúly, így a citoplazmában feleslegben marad a H3.3A-mut fehérjék egy része. Sókezelés hiányában a magi pellet frakcióban található minden hiszton fehérje, így a magi FÚ2 frakció üres (19. ábra).



19. ábra: H3.3A-mut hisztonok megoszlása a citoplazmatikus felülúszó, magi felülúszó és pellet frakciók között sóelúció következtében. Az ábrán a citoplazmatikus felülúszó (FÚ1), valamint a 0 mM és 1400 mM sóelúciót követően elválasztott magi felülúszó (FÚ2) és magi pellet (P) frakciókon anti-FLAG és anti-H4 ellenanyaggal készült western blot kísérlet eredménye látható.

Ez tehát bizonyítja, hogy az általunk használt hiszton módosításokat mimikáló mutációk egyike sem befolyásolja a magi transzport hatékonyságát, illetve a hisztonok kromatin kötöttségét. Magas sókoncentráció kezelést követően a hisztonok egy része eluálódik a kromatinról és megjelenik a magi felülúszó frakcióban, azonban jelentős részük a magi pellet frakcióban található, tehát a sókezelést követően is kromatin kötött állapotban marad (19. ábra). Az 1400 mM-os sókezelés következtében eluálódott H3.3A-mut fehérjék FÚ2 magi felülúszó frakcióban található mennyiségi analízise során nem tapasztaltunk különbséget az egyes transz gének között (20. ábra), mely arra utal, hogy az egyes módosítások nem befolyásolják a H3.3A hiszton kromatin kötöttségét, tehát a kísérletek során megfigyelt fenotípusbeli különbségek ténylegesen az adott PTM mimikáló módosításnak, nem pedig a H3.3A eltérő mértékű kromatinba épülésének a következményei.



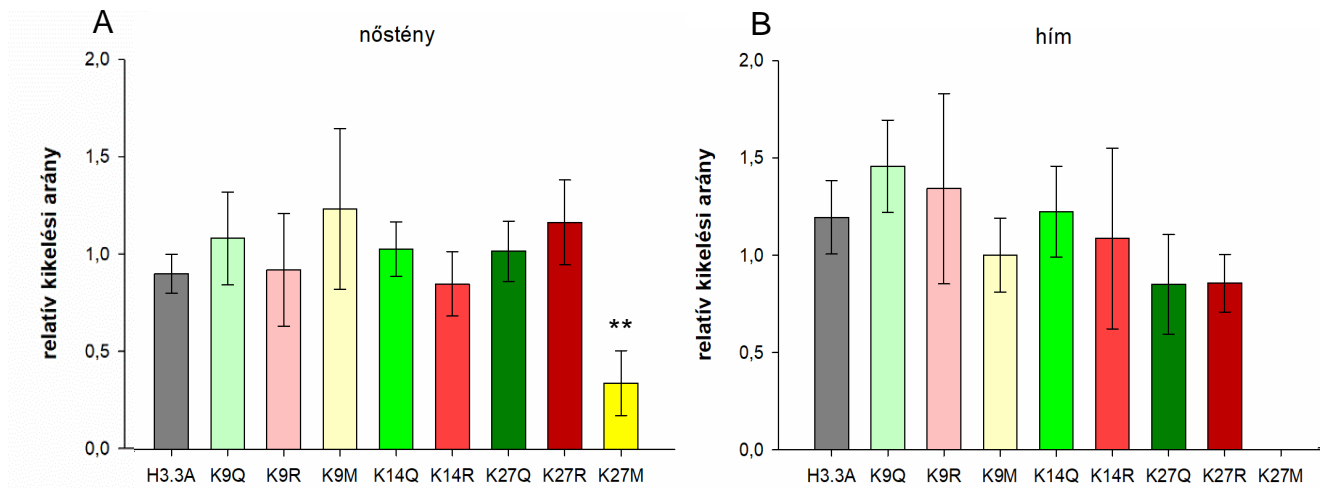
20. ábra: Sókezelés következtében eluálódó H3.3A-mut fehérjék relatív mennyisége.

A diagram az egyes transz génekhez tartozó FLAG-H3.3A jelek kanonikus H4-re normalizált relatív intenzitás értékeinek átlagát és a standard error-t ábrázolják, statisztikai analízisként OWA tesztet végeztünk.

4.1.3. Neuronálisan expresszált H3.3A-mut transz gének életképességre gyakorolt hatásának vizsgálata

Mielőtt a Huntington-kór vonatkozásában vizsgáltuk volna a *H3.3A-mut* transz gének hatását, elsőként kíváncsiak voltunk arra, hogy önmagában a transz gének neuronális kifejeződése milyen hatással bír a vad típusú állatok életképességére. Ehhez *elav-GAL4* driverrel 25 °C-on vizsgáltuk a legyek kikelési arányát. Elsősorban a nőstények kikelésére voltunk kíváncsiak, mivel a későbbiekben az *mHtt*-t expresszáló törzzsel való keresztezések utódai közül is a nőstényeket vizsgáljuk. Az *elav-GAL4* driverrel hajtott *H3.3A-mut* transz gének a H3.3A-K27M módosítás kivételével nem befolyásolják jelentős mértékben az állatok életképességét sem nőstények (21/ A. ábra), sem hímek (21/ B. ábra) esetén.

A H3.3A-K27M metilációt mimikáló módosítás esetén szignifikánsan romlik a kikelési arány a nem módosított *H3.3A* transzgént expresszáló kontrollhoz képest, a nőstények csökkent életképességet mutatnak (21/ A. ábra), míg a hímek egyáltalán nem kelnek ki (21/ B ábra).

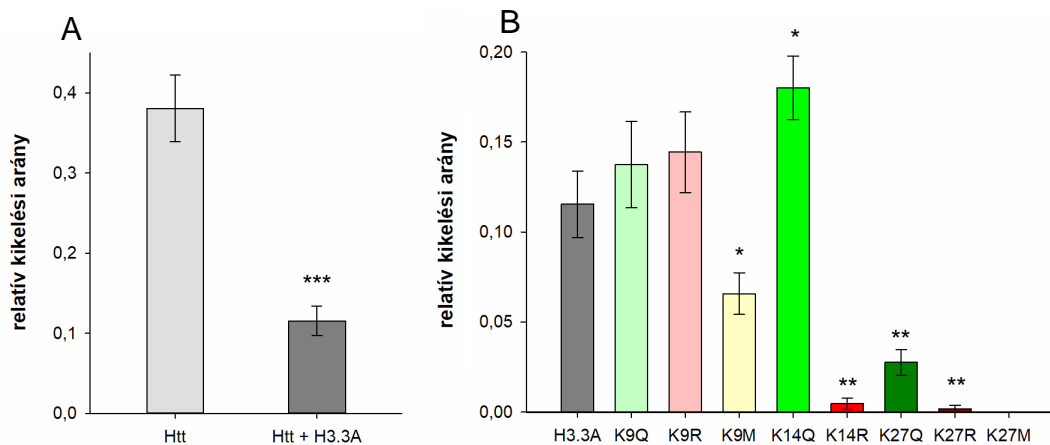


21. ábra: *H3.3A-mut* transzgének vad típusú állatok életképességére gyakorolt hatása.

A: nőstények kikelési aránya, B: hímek kikelési aránya; a diagramok minden transzgén esetén a nem expresszáló kontrolljukra normalizált kikelési arány átlagát és a standard error-t ábrázolják, statisztikai analízisként OWA tesztet végeztünk (**: $p < 0,01$).

4.1.4. Neuronálisan expresszált *H3.3A-mut* transzgének HD legyek életképességére gyakorolt hatásának vizsgálata

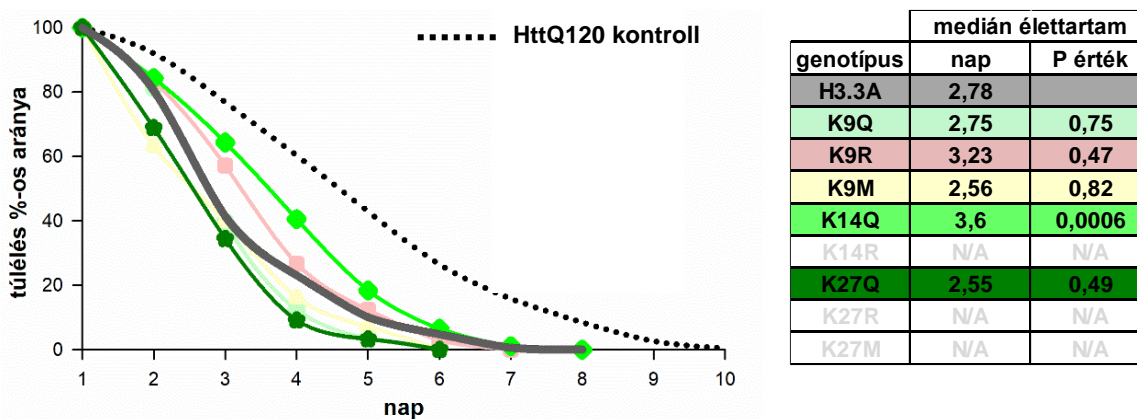
Miután megbizonyosodtunk arról, hogy a *H3.3A-mut* transzgének megfelelően expresszálódnak, sejtmagi lokalizációt mutatnak és a H3.3A-K27M módosítás kivételével a transzgének expressziója nem befolyásolja a vad típusú egyedek életképességét, megvizsgáltuk a HD legyek életképességére gyakorolt hatásukat. Ehhez 25 °C-on az *elav-GAL4* driver segítségével expresszáltattuk az *mHtt* és a *H3.3A-mut* transzgéneket. A nőstény utódok egyik fele csak az *mHtt*-t expresszálta, másik fele az *mHtt* és a *H3.3A-mut* transzgéneket együttesen, míg a hím utódok szolgáltak nem expresszáló kontrollként. Már a vad típusú *H3.3A* transzgén expressziója is jelentősen csökkenti a HD legyek életképességét (22/ A. ábra), így a további kísérletek során az *mHtt* – *H3.3A* transzgéneket expresszáló állatokat tekintettük kontrollnak. A *H3.3A* transzgént expresszáló kontrollhoz képest egyedül a H3.3A-K14Q acetilált lizint mimikáló módosítás javít szignifikánsan a HD legyek kikelésén, míg a H3.3A-K9M (metilált), H3.3A-K14R (nem módosítható), H3.3A-K27Q (acetilált) és H3.3A-K27R (nem módosítható) és H3.3A-K27M (metilált) módosítások jelentősen csökkentik azt (22/ B. ábra).



22. ábra: *H3.3A-mut* transz gének HD legyek életképességére gyakorolt hatása. A: *mHtt* és *mHtt + H3.3A* transz gének expresszálo egyedek összehasonlítása, B: *mHtt + H3.3A* és *mHtt + H3.3A-mut* transz gének expresszálo egyedek összehasonlítása; a diagramok minden transz gének esetén a nem expresszálo kontrolljukra normalizált kikelési arány átlagát és a standard error-t mutatják, statisztikai analízisként OWA tesztet végeztünk (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

4.1.5. Neuronálisan expresszált *H3.3A-mut* transz gének HD legyek élettartamára gyakorolt hatásának vizsgálata

Az életképesség vizsgálat során kikelt, 25 °C-on *elav-GAL4* driver által hajtott transz gének expresszálo nőstény egyedek túlélését vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a csak *mHtt*-t expresszálo állatokhoz képest a vad típusú *H3.3A* transz gént expresszálo HD legyek rövidebb ideig élnek (23. ábra).

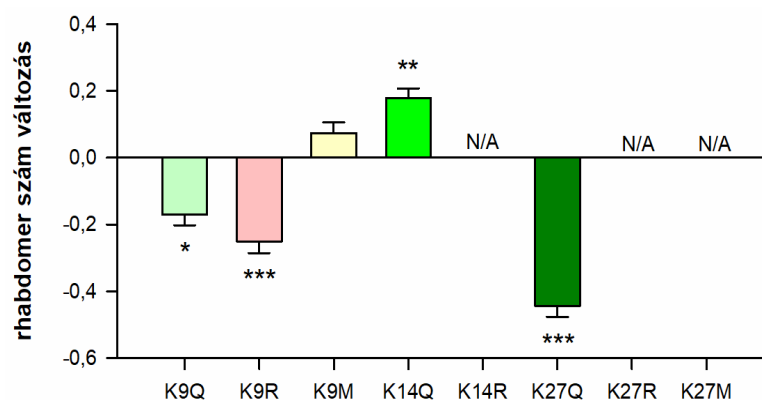


23. ábra: *H3.3A-mut* transz gének HD legyek élethosszára gyakorolt hatása. A diagram a túlélés százalékos arányát ábrázolja az idő függvényében, táblázatban a medián élettartam látható, statisztikai analízisként Fisher-egzakt tesztet végeztünk.

A *H3.3A-mut* transz gének esetén az életképesség vizsgálathoz hasonlóan azt láttuk, hogy a H3.3A-K14Q, acetilációt mimikáló módosítás a H3.3A-t expresszáló kontrollhoz képest szignifikánsan javítja a HD legyek fenotípusát. A maximális élethosszt ugyan nem javítja a H3.3A-K14Q módosítás a kontrollhoz képest, azonban a medián élettartam közel 1 nappal későbbre tolódik (23. ábra). A H3.3A-K9Q, H3.3A-K9R, H3.3A-K9M és H3.3A-K27Q módosítások enyhén javítják vagy rontják a HD legyek túlélését, azonban egyik változás mértéke sem szignifikáns (23. ábra). A H3.3A-K14R, H3.3A-K27R és H3.3A-K27M módosítások túlélésre gyakorolt hatását a korábban bemutatott alacsony kikelési aránnyal járó utódszámok miatt nem tudtuk vizsgálni.

4.1.6. Neuronálisan expresszált *H3.3A-mut* transz gének HD legyek neurodegenerációjára gyakorolt hatásának vizsgálata

A H3.3A mutációk neurodegenerációra gyakorolt hatásának tanulmányozásához a 25 °C-on *elav-GAL4* driver által hajtott *mHtt* és *H3.3A-mut* transz géneket együttesen kifejező 3 napos korú nőstény egyedeket vizsgáltunk. A H3.3A-K9Q, H3.3A-K9R és H3.3A-K27Q módosítások HD legyekben szignifikánsan csökkentik az ommatídiumonkénti rhabdomerek számát az összetett szemben, míg a H3.3A-K14Q acetilációt mimikáló módosítás az életképességhez és élettartamhoz hasonlóan szignifikánsan javítja a fenotípust (24. ábra). A H3.3A-K14R, H3.3A-K27R és H3.3A-K27M módosítások neurodegenerációra gyakorolt hatását a korábban bemutatott alacsony utódszámok miatt nem állt módunkban vizsgálni.

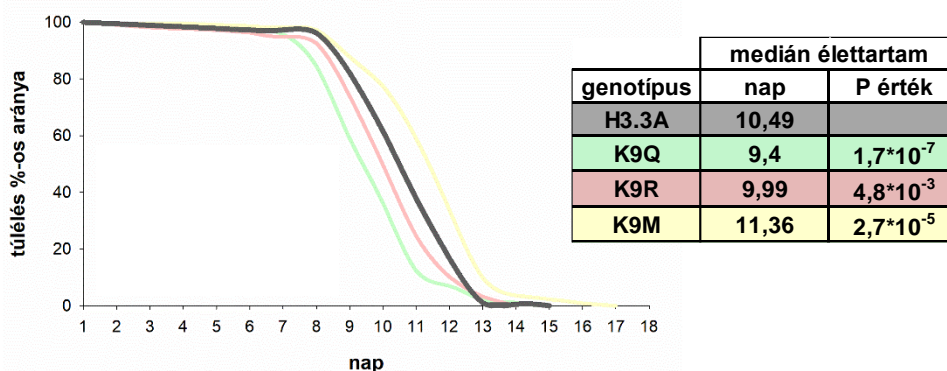


24. ábra: *H3.3A-mut* transz gének HD legyek neurodegenerációjára gyakorolt hatása.

A diagramon a vad típusú *H3.3A* transz gént expresszáló egyedek rhabdomer számára normalizálva láthatóak az átlagok és a standard error, statisztikai analízisként OWA tesztet végeztünk (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

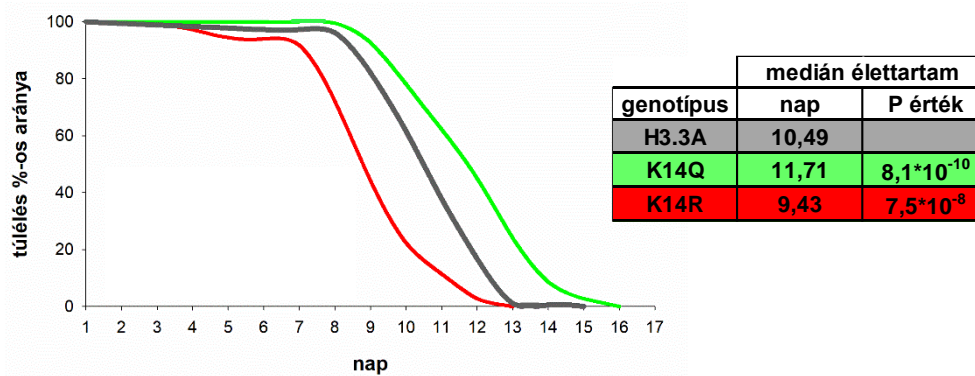
4.1.7. Adult korban neuronálisan expresszált *H3.3A-mut* transzgének HD legyek élettartamára gyakorolt hatásának vizsgálata

Az *elav-GAL4* driver által 25 °C-on hajtott *mHtt* és *H3.3A-mut* transzgének okozta gyenge életképesség miatt további fenotipikus vizsgálatokra nem volt alkalmas azok embrionális kortól kezdődően történő meghajtása, így a továbbiakban a transzgének kifejeződését az imágók idegsejtjeire korlátoztuk az *elav-GAL4*; *tub-GAL80^{ts}* driver elemek kombinált használatával. A hőmérséklet érzékeny *GAL80^{ts}* represszor 18 °C-on gátolja a *GAL4* működését, azonban ez a gátlás 30 °C-on megszűnik. Kísérleteinkhez a keresztezéseket 18 °C-on végeztük, majd a kikelést követően 30 °C-ra helyezve indukáltuk a transzgének neuron specifikus kifejeződését. A korábbi eredmények alapján a vad típusú *H3.3A* transzgén overexpressziója is csökkenti a HD legyek életképességét, ezért olyan *H3.3A-mut* transzgenikus törzseket állítottunk elő, melyek az endogén *His3.3A* gén deléciós allélját is hordozzák, így csökkentve a *H3.3A* dózist. A kísérleteket elvégeztük az endogén *His3.3A* gén homozigóta, illetve heterozigóta deléciója mellett is. Adult korban hajtva az *mHtt – H3.3A-mut* transzgéneket expresszáló nőstények esetén homozigóta és heterozigóta *His3.3A* deléciós háttéren is romlik az élettartam, továbbá egyik módosítás sem képes menekíteni a beteg legyek medián élettartamát a vad típusú *H3.3A* transzgént expresszáló HD kontrollhoz képest (Függelék F2-3. ábra). Hímeknél a homozigóta deléciós háttéren szintén romlik a fenotípus (Függelék F4. ábra), azonban a heterozigóta deléciós háttéren megfigyelhető javulás egyes *H3.3A-mut* transzgének expressziója esetén. A *H3.3A-K9* pozíció acetilációt (Q), illetve a nem módosítható lizint (R) mimikáló módosítása szignifikánsan rontja, míg az egész életen át hajtott transzgének eredményeivel ellentétben a metilációt (M) mimikáló mutáció szignifikánsan javítja a HD legyek medián élettartamát a kontrollhoz viszonyítva (25. ábra).



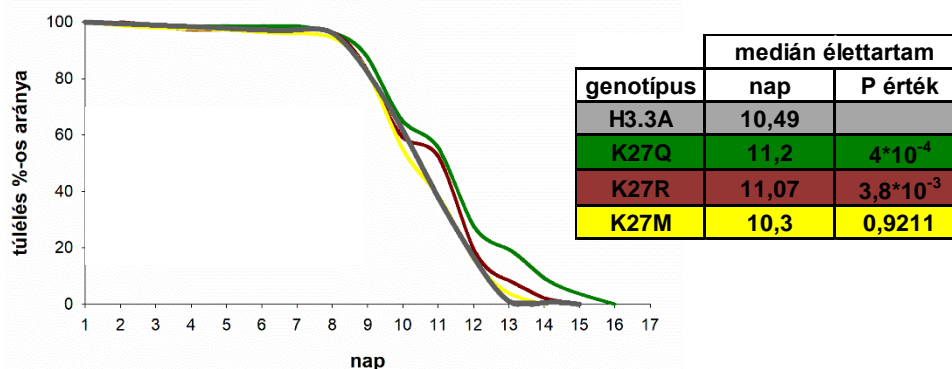
25. ábra: Adult korban hajtott *H3.3A-K9* módosítást mimikáló transzgének hím HD legyek élethosszára gyakorolt hatása heterozigóta *His3.3A* deléciós háttéren. A diagram a túlélés százalékos arányát ábrázolja az idő függvényében, táblázatban a medián élettartam látható, statisztikai analízisként Fisher-egzakt tesztet végeztünk.

A korábban egész élettartam során meghajtott transzgénekkal kapott eredményekhez hasonlóan a H3.3A-K14 pozíció esetén az acetilációt mimikáló (Q) módosítás szignifikánsan javítja, míg a nem módosítható lizint (R) mimikáló mutáció szignifikánsan rontja a HD legyek medián élettartamát a nem módosított, vad típusú *H3.3A* transzgént expresszáló HD legyekhez viszonyítva (26. ábra).



26. ábra: Adult korban hajtott H3.3A-K14 módosítást mimikáló transzgének hím HD legyek élethosszára gyakorolt hatása heterozigóta *His3.3A* deléciós háttéren. A diagram a túlélés százalékos arányát ábrázolja az idő függvényében, táblázatban a medián élettartam látható, statisztikai analízisként Fisher-egzakt tesztet végeztünk.

A H3.3A-K27 pozíció esetén a korábban kapott, az egész élettartam során meghajtott transzgének eredményeivel ellentétben az acetilációt (Q), illetve a nem módosítható lizint (R) mimikáló mutáció szignifikánsan javítja a HD legyek medián élettartamát, míg a metilációt (M) mimikáló módosítás hatása nem mutat jelentős változást a vad típusú *H3.3A* transzgént expresszáló HD kontrollhoz képest (27. ábra).



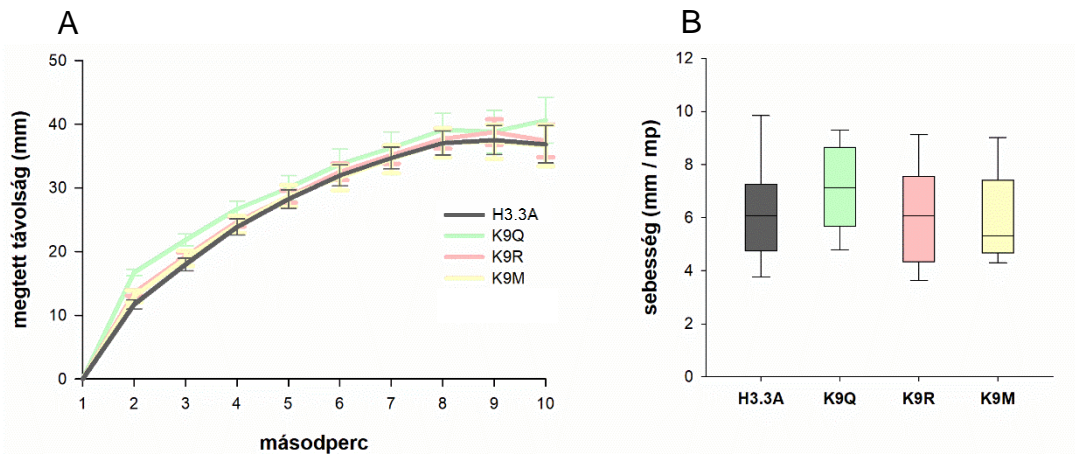
27. ábra: Adult korban hajtott H3.3A-K27 módosítást mimikáló transzgének hím HD legyek élethosszára gyakorolt hatása heterozigóta *His3.3A* deléciós háttéren. A diagram a túlélés százalékos arányát ábrázolja az idő függvényében, táblázatban a medián élettartam látható, statisztikai analízisként Fisher-egzakt tesztet végeztünk.

Összességében tehát, mivel a korábbi, egész élettartam során meghajtott transz gének esetén az életképesség vizsgálat eredménye (22/ A. ábra) azt mutatta, hogy endogén H3.3A jelenlétében a transz géneként bevitt vad típusú *H3.3A* overexpressziója negatívan befolyásolja a HD legyek fenotípusát, ezért az adult kortól expresszáldó *H3.3A-mut* transz gének hatását az endogén H3.3A csökkentett dózisa (homozigóta vagy heterozigóta *His3.3A* deléció) mellett vizsgáltuk. Eltérően a teljes élettartam során meghajtott *H3.3A-mut* transz génekkel kapott eredményektől, a homozigóta *His3.3A* deléciós háttéren adult kortól expresszáldó *H3.3A-mut* transz gének mindegyike negatívan befolyásolja a hím és nőstény HD legyek élethosszát. Heterozigóta deléciós háttéren egyes *H3.3A-mut* transz géneket kifejező hímek esetén megfigyelhető fenotípusbeli javulás, ami arra utal, hogy a H3.3A-mut hisztonok jelenléte mellett mindenképpen szükség van mérsékelt dózisban az endogén, nem módosított H3.3A hisztonra is, ezért kutatásunk során a HD legyek további fenotipikus vizsgálatát heterozigóta *His3.3A* deléciós háttéren végeztük.

4.1.8. Adult korban neuronálisan expresszált *H3.3A-mut* transz gének HD legyek motoros képességére gyakorolt hatásának vizsgálata

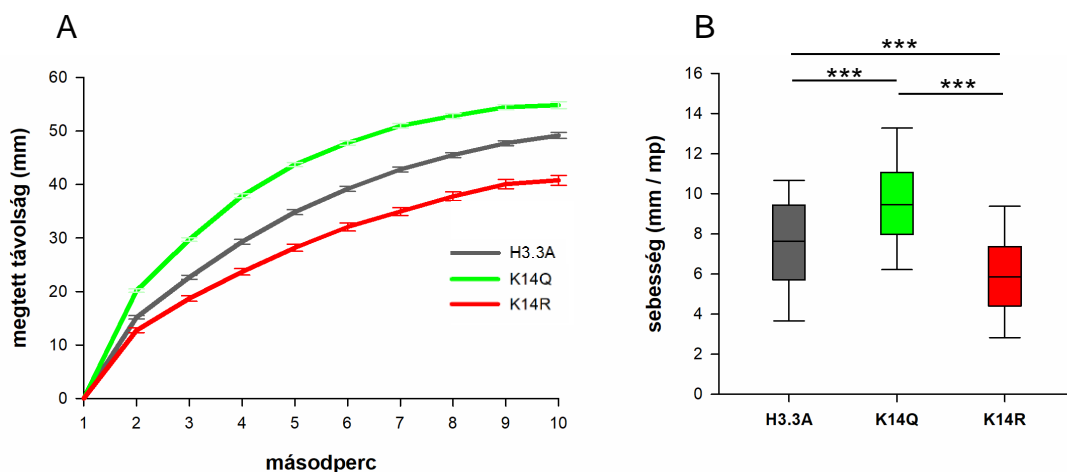
Mivel az adult kori élettartam vizsgálatok során heterozigóta *His3.3A* deléciós háttéren a nőstények élethosszára nem volt pozitív hatással a *H3.3A-mut* transz gének expressziója, a HD legyek motoros képességét hímek esetén vizsgáltuk. A kísérlethez szintén az *elav-GAL4; tub-GAL80^{ts}* expressziós rendszer segítségével a keresztezéseket 18 °C-on végeztük, majd a kikelést követően a fiolákat 30 °C-os inkubátorba helyezve indukáltuk a transz gének neuron specifikus kifejeződését. Az élettartam vizsgálatok alapján a betegség progressziójának következtében nagyjából a 9. nap környékén indul meg a tömeges elhalálozás, ezért az állatok mászási képességét 10 napos korban vizsgáltuk, amikor az egyedek 50 %-a még életben van, azonban a betegség fenotípusa elég súlyos ahhoz, hogy a *H3.3A-mut* transz gének hatását vizsgálni lehessen.

A mászási tesztek eredményei alapján a H3.3A-K9 módosítások egyike sem befolyásolja jelentős mértékben a HD legyek motoros képességét a vad típusú *H3.3A* transz gént expresszáldó HD kontrollhoz képest. Összességében nem figyelhető meg jelentős különbség a mászási képességben (28/ A. ábra) és az állatok lerázása utáni 2-3. másodperc között mért mászási sebesség sem változik szignifikánsan a kontrollhoz képest (28/ B. ábra).



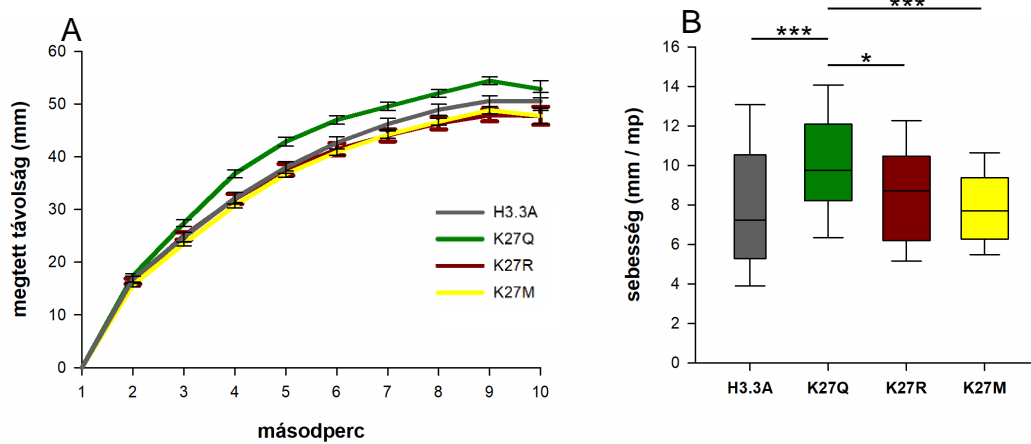
28. ábra: Adult korban hajtott H3.3A-K9 módosítást mimikáló transzgének hím HD legyek motoros képességére gyakorolt hatása heterozigóta *His3.3A* deléziós háttéren. A: 10 mp alatt megtett távolság, B: sebesség a lerázás utáni 2-3 másodperc között mért elmozdulás alapján; a diagramok az átlag értékeket és a standard error-t ábrázolják, statisztikai analízisként OWA tesztet végeztünk.

A korábbi fenotipikus vizsgálatok eredményeihez hasonlóan a H3.3A-K14 pozíció esetén a vad típusú *H3.3A* transzgént expresszáló HD legyekhez viszonyítva az acetilációt mimikáló (Q) módosítás szignifikánsan javítja, míg a nem módosítható lizint (R) mimikáló mutáció szignifikánsan rontja a HD legyek mászási képességét, mely a mászási magasságban (29/ A. ábra) és a mászás sebességében (29/ B. ábra) is megfigyelhető.



29. ábra: Adult korban hajtott H3.3A-K14 módosítást mimikáló transzgének hím HD legyek motoros képességére gyakorolt hatása heterozigóta *His3.3A* deléziós háttéren. A: 10 mp alatt megtett távolság, B: sebesség a lerázás utáni 2-3 másodperc között mért elmozdulás alapján; a diagramok az átlag értékeket és a standard error-t ábrázolják, statisztikai analízisként OWA tesztet végeztünk (***: $p < 0,001$).

A H3.3A-K27 pozíció esetén az acetilációt (Q) mimikáló módosítás szignifikánsan javítja a HD legyek motoros képességét, míg a nem módosítható lizint (R) és a metilációt (M) mimikáló mutáció nem okoz fenotípusbeli változást a vad típusú *H3.3A* transzgént expresszáló HD kontrollhoz képest (30/ A-B. ábra).



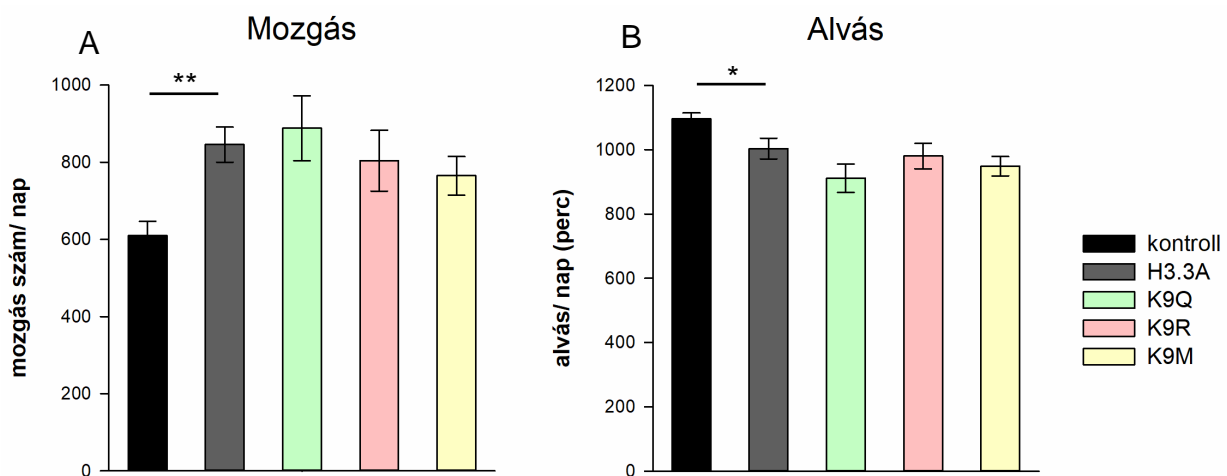
30. ábra: Adult korban hajtott H3.3A-K27 módosítást mimikáló transzgének hím HD legyek motoros képességére gyakorolt hatása heterozigóta *His3.3A* deléciós háttéren.

A: 10 mp alatt megtett távolság, B: sebesség a lerázás utáni 2-3 másodperc között mért elmozdulás alapján; a diagramok az átlag értékeket és a standard error-t ábrázolják, statisztikai analízisként OWA tesztet végeztünk (*: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$).

4.1.9. Adult korban neuronálisan expresszált *H3.3A-mut* transzgének HD legyek napi aktivitására gyakorolt hatásának vizsgálata

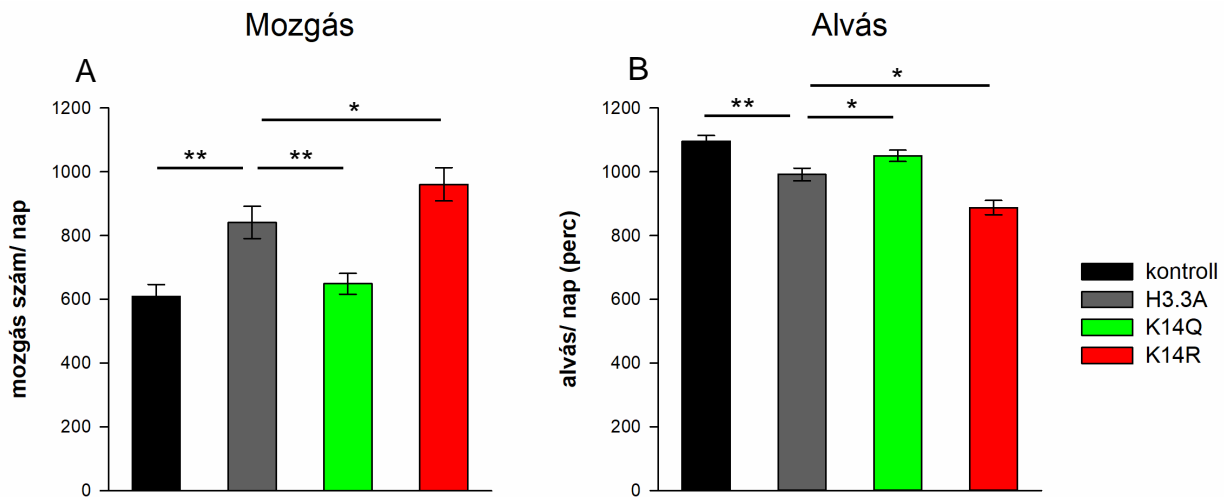
A hiszton acetiltransferáz aktivitással is rendelkező CBP transzkripciós koaktivátor fehérje a cirkadián génexpresszió szabályozás egyik fontos részvevője, mely a „clock” gének regulátoros régióiban a H3 és H4 hisztonok acetilációjáért felelős^{105,106}. A Huntington-kór során az aggregátumokba történő csapódzódása következtében a CBP gátlás alá kerül¹²⁵, ezért feltételezhető, hogy a betegség esetén is megfigyelhető cirkadián ritmus defektust a regulátoros régiók nem megfelelő acetiláltsági állapota idézi elő. A betegség során fellépő cirkadián ritmus zavar általánosságban fokozott aktivitással és ezzel párhuzamosan kevesebb alvással jellemezhető¹³¹, ezért megvizsgáltuk, hogy a különböző acetiláltsági, illetve metilációs állapotot mimikáló H3.3A-mut hisztonok hogyan befolyásolják a HD legyek napi aktivitását. A *H3.3A-mut* transzgéneket expresszáló HD legyek aktivitás mérését hím egyedeken vizsgáltuk heterozigóta *His3.3A* deléciós háttéren. A kísérlethez az *elav-GAL4; tub-GAL80^{ts}* expressziós rendszer segítségével a 18 °C-on történő kikelést követően 30 °C-os inkubátorba helyezve hajtottuk meg a transzgéneket, majd a 10 napos állatok napi aktivitását mértük.

A cirkadián ritmus mérések eredményeiből egyértelműen látszik, hogy a kísérleteinkben kontrollként használt, vad típusú *H3.3A* transzgén expresszálo HD legyek 24 óra alatt többet mozognak (31/ A. ábra) és kevesebbet alszanak (31/ B. ábra) az egészséges egyedekhez képest. Ez a megfigyelés teljesen egybevág a betegeknel jelentkező, klinikumban leirt alvászavarokkal, tehát a vad típusú *H3.3A* transzgén overexpressziója nem befolyásolja a Huntington-kór során fellépő cirkadián ritmus defektust. A beteg legyeknel megfigyelhető fokozott aktivitást és az ezzel párhuzamosan kevesebb alvással töltött időt jelentős mértékben nem befolyásolja a *H3.3A-K9* pozíció acetilációt, nem módosított lizint, illetve metilációt mimikáló módosítása sem (31/ A-B. ábra).



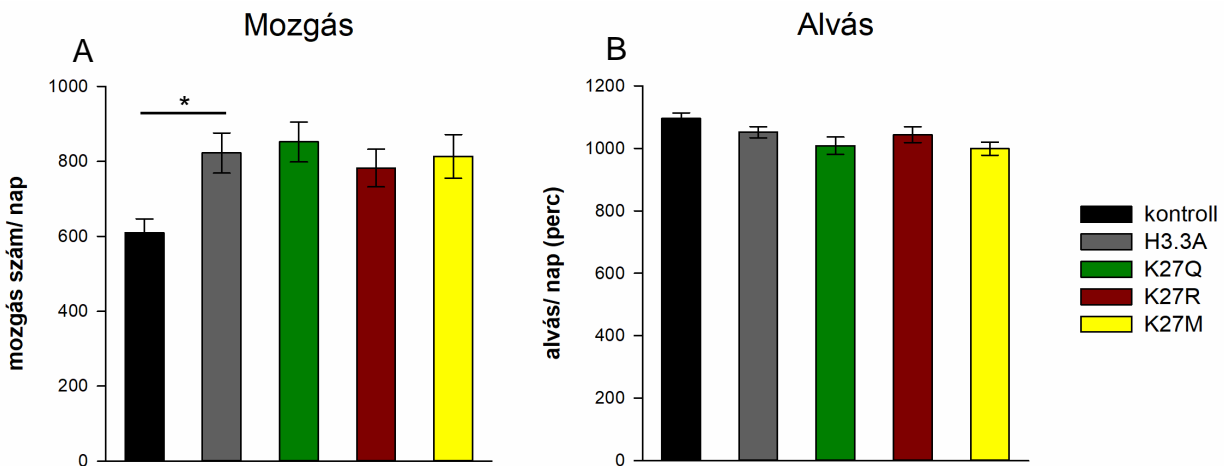
31. ábra: Adult korban hajtott *H3.3A-K9* módosítást mimikáló transzgénnek hím HD legyek napi aktivitására gyakorolt hatása heterozigóta *His3.3A* deléciós háttéren. A: 24 óra alatt megtett mozgások száma, B: 24 órából avással töltött idő; a diagramok az átlag értékeket és a standard error-t ábrázolják, statisztikai analízisként OWA tesztet végeztünk (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$).

A *H3.3A-K14* lizin módosítása esetén azonban jelentős különbségek figyelhetők meg a HD legyek napi aktivitásában. A *H3.3A-K14Q* acetilációt mimikáló módosítás esetén az egészséges állatokéhoz hasonló szintre csökken a HD legyek napi mozgása, míg a *H3.3A-K14R* nem módosított lizint mimikáló mutáció hatására tovább nő az egyébként is fokozott mértékű mozgási aktivitás (32/ A. ábra). Ezzel párhuzamosan a *H3.3A-K14Q* módosítás hatására a HD legyek az egészséges állatokhoz hasonlóan többet alszanak, míg a *H3.3A-K14R* módosítás hatására tovább csökken az alvással töltött idő (32/ B. ábra).



32. ábra: Adult korban hajtott H3.3A-K14 módosítást mimikáló transzgénnek hím HD legyek napi aktivitására gyakorolt hatása heterozigóta *His3.3A* deléciós háttéren. A: 24 óra alatt megtett mozgások száma, B: 24 órából avással töltött idő; a diagramok az átlag értékeket és a standard error-t ábrázolják, statisztikai analízisként OWA tesztet végeztünk (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$).

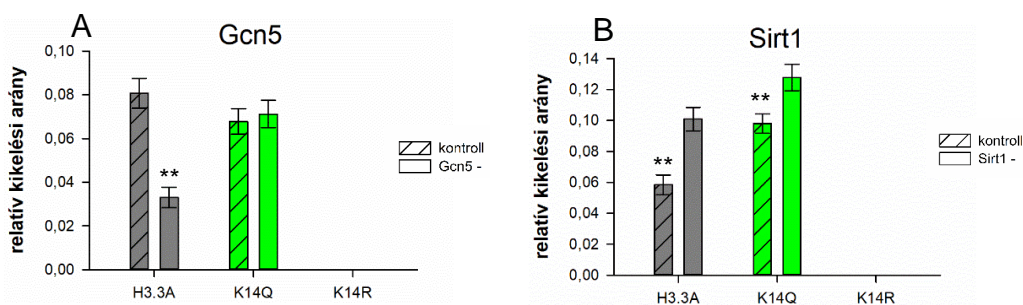
A vad típusú *H3.3A* transzgént expresszáló HD kontroll legyeknél megfigyelhető fokozott aktivitást és kevesebb alvással töltött időt jelentős mértékben nem befolyásolja a H3.3A-K27 pozíció egyik módosítása sem (33/ A-B. ábra).



33. ábra: Adult korban hajtott H3.3A-K14 módosítást mimikáló transzgénnek hím HD legyek napi aktivitására gyakorolt hatása heterozigóta *His3.3A* deléciós háttéren. A: 24 óra alatt megtett mozgások száma, B: 24 órából avással töltött idő; a diagramok az átlag értékeket és a standard error-t ábrázolják, statisztikai analízisként OWA tesztet végeztünk (*: $p < 0,05$).

4.1.10. HAT és HDAC expressziós szint változás életképességre gyakorolt hatásának vizsgálata *H3.3A-K14-mut* transzgéneket expresszáló HD legyekben

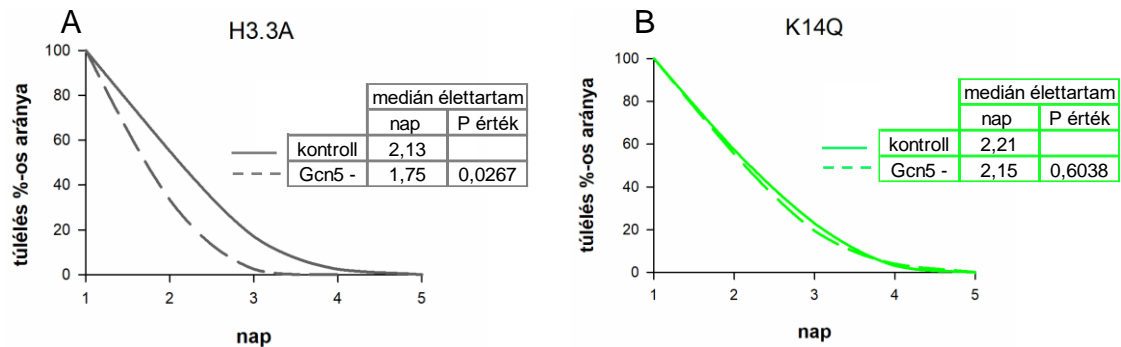
Eredményeink egybevágóan arra utalnak, hogy a H3.3A-K14 pozíció módosítása befolyásolja a Huntington-kór manifesztációját. Ennek validálása érdekében megvizsgáltuk, hogy a H3K14 specifikus *Gcn5* HAT, illetve a *Sirt1* HDAC heterozigóta funkcióvesztése hogyan befolyásolja a vad típusú *H3.3A*, valamint *H3.3A-K14-mut* transzgéneket expresszáló HD legyek életképességét, élettartamát és neurodegenerációját. Várhatóan a vad típusú *H3.3A* transzgént expresszáló HD legyek esetén a *Gcn5* és *Sirt1* gének funkcióvesztése is befolyásolja a fenotípust, ugyanis ebben az esetben módosítható a H3.3A-K14 lizin acetilációs állapota. Feltételezhetően a *Gcn5* gént kiütve csökken a K14 pozíció acetilációja, míg a *Sirt1* gén kiütése fokozott mértékű acetilációt eredményez. A H3.3A-K14 módosítások esetén lizin hiányában nem változtatható az acetilációs állapot, ezért nem várunk fenotípusbeli változást, amennyiben a K14 lizin valóban kiemelt jelentőséggel bír a Huntington-kór pathogenezise szempontjából. A nagyszámú genetikai elem használata következtében gyenge életképességet tapasztaltunk, így optimalizálás után az *elav-GAL4* driverrel 18 °C-on hajtva, majd kikelés után 25 °C-ra helyezve vizsgáltuk az legyeket. Várakozásunknak megfelelően a *Gcn5* funkcióvesztése szignifikánsan csökkenti a vad típusú *H3.3A* transzgént expresszáló HD legyek életképességét, azonban nincs hatása a H3.3A-K14 módosítások esetén (34/ A. ábra). A *H3.3A-K14R* transzgént expresszáló legyek hasonlóan korábbi kísérletünkhöz nem kelnek ki (22/ B. ábra). A *Sirt1* gén funkcióvesztése várakozásunknak megfelelően szignifikánsan javítja a vad típusú *H3.3A* transzgént expresszáló HD legyek életképességét, azonban a H3.3A-K14Q módosítás esetén is javul a fenotípus, míg a H3.3A-K14R módosítás esetén a korábbiakhoz hasonlóan nem kelnek ki utódok (34/ B. ábra).



34. ábra: *Gcn5* és *Sirt1* heterozigóta funkcióvesztésének hatása a *H3.3A*, *H3.3A-K14Q* és *H3.3A-K14R* transzgéneket expresszáló HD legyek életképességére.

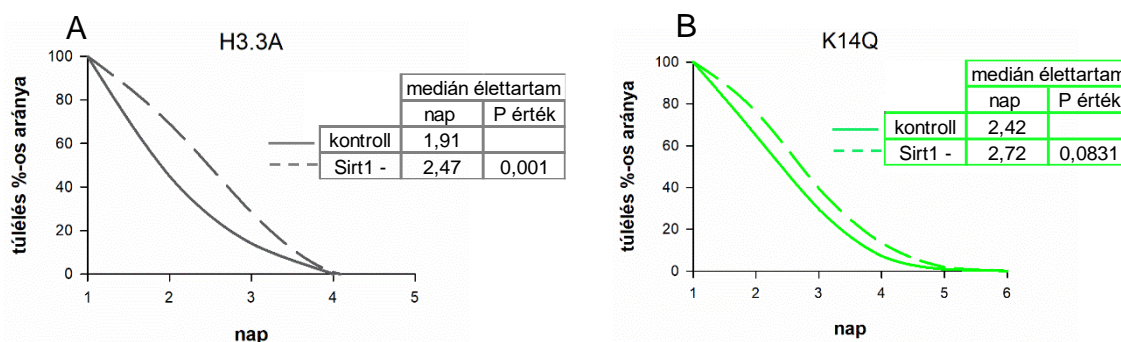
A: *Gcn5* funkcióvesztésének hatása, B: *Sirt1* funkcióvesztésének hatása; a diagramok minden transzgén esetén a nem expresszáló kontrolljukra normalizált kikelési arány átlagát és a standard error-t ábrázolják, statisztikai analízisként t-tesztet végeztünk (**: $p < 0,01$).

A 18 °C-on kikelt, majd 25 °C-ra helyezett *elav-GAL4* driver által hajtott transzgéneket expresszáló egyedek élettartamának vizsgálata során a kikelésnél megfigyeltékhez hasonló eredményeket kaptunk. A *Gcn5* heterozigóta funkcióvesztése szignifikánsan rontja a *H3.3A* transzgént expresszáló HD legyek medián élettartamát (35/ A. ábra), azonban nincs hatása a *H3.3A-K14Q* módosítás esetén (35/ B. ábra).



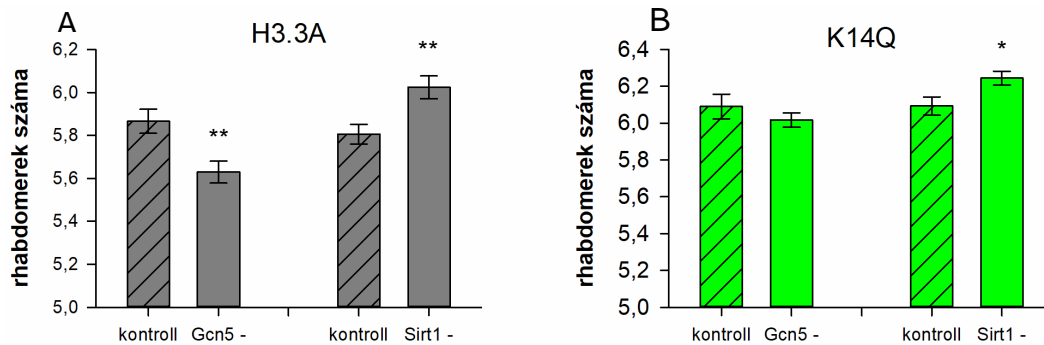
35. ábra: *Gcn5* heterozigóta funkcióvesztésének hatása a *H3.3A* és *H3.3A-K14Q* transzgéneket expresszáló HD legyek élettartamára. A: *mHtt* – *H3.3A* transzgéneket expresszáló egyedek, B: *mHtt* – *H3.3A-K14Q* transzgéneket expresszáló egyedek; a diagram a túlélés százalékos arányát ábrázolja az idő függvényében, táblázatban a medián élettartam látható, statisztikai analízisként Fisher-egzakt tesztet végeztünk.

A *Sirt1* heterozigóta funkcióvesztésének hatására szignifikánsan javul a *H3.3A* transzgént expresszáló HD legyek medián élettartama (36/ A. ábra), továbbá a *H3.3A-K14Q* módosítás esetén is enyhén javul a fenotípus, bár ez nem szignifikáns (36/ B. ábra).



36. ábra: *Sirt1* heterozigóta funkcióvesztésének hatása a *H3.3A* és *H3.3A-K14Q* transzgéneket expresszáló HD legyek élettartamára. A: *mHtt* – *H3.3A* transzgéneket expresszáló egyedek, B: *mHtt* – *H3.3A-K14Q* transzgéneket expresszáló egyedek; a diagram a túlélés százalékos arányát ábrázolja az idő függvényében, táblázatban a medián élettartam látható, statisztikai analízisként Fisher-egzakt tesztet végeztünk.

A neurodegeneráció vizsgálatához szintén az *elav-GAL4* driverrel hajtva 18 °C-on állítottuk össze a keresztezéseket, majd kikelés után 25 °C-ra helyezve 2 napos korban vizsgáltuk az egyedeket. Hasonlóan az életképességhez a vad típusú *H3.3A* transzgént expresszáló HD legyek esetén a *Gcn5* funkcióvesztése szignifikánsan rontja, míg a *Sirt1* funkcióvesztése szignifikánsan javítja a neurodegeneráció mértékét (37/ A. ábra). A *H3.3A-K14Q* módosítás esetén a *Gcn5* funkcióvesztése nem befolyásolja, míg a *Sirt1* funkcióvesztése javítja a HD legyek neurodegenerációját (37/ B. ábra).



37. ábra: *Gcn5* és *Sirt1* heterozigóta funkcióvesztésének hatása *H3.3A* és *H3.3A-K14Q* transzgéneket expresszáló HD legyek neurodegenerációjára. A: *mHtt* – *H3.3A* transzgéneket expresszáló egyedek, B: *mHtt* – *H3.3A-K14Q* transzgéneket expresszáló egyedek; a diagram a rhabdomerek számának átlagát és a standard error-t ábrázolja, statisztikai analízisként t-tesztet végeztünk (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$).

Összességében a *Gcn5* HAT heterozigóta funkcióvesztése rontja a vad típusú *H3.3A* transzgént expresszáló HD legyek fenotípusát, ezzel szemben, amikor a lizin glutaminra történő módosítása következtében egy állandó acetilációs állapotot mimikálunk, nem befolyásolja a vizsgált fenotípusokat a *Gcn5* hiánya, mely arra utal, hogy a *Gcn5* hatása a *H3.3A-K14* acetilációján keresztül valósul meg. A *Sirt1* HDAC funkcióvesztése várakozásunkkal ellentétben nemcsak a vad típusú *H3.3A* transzgént expresszáló HD legyek fenotípusát javítja, ugyanis a *H3.3A-K14Q* módosítás esetén is javulás figyelhető meg, mely arra utal, hogy a *Sirt1* a *H3K14*-es lizin deacetilációján kívül más célpontok deacetilációjában is szerepet játszhat a Huntington-kór pathogenezise során. Eredményeink alapján tehát a *H3.3A-K14* pozíció acetilációs állapotának változása jelentős hatással bír a Huntington-kór szempontjából, ugyanis annak acetilációt mimikáló módosítása javítja a HD legyek fenotípusát, míg a *H3.3A-K14R* nem módosított lizint mimikáló mutáció rontja azt. Ezen módosítások hatását HD legyekben a *K14* specifikus *Gcn5* HAT funkcióvesztése nem befolyásolja, illetve a *Sirt1* HDAC funkcióvesztése a *H3.3A-K14Q* jótékony hatását enyhe mértékben képes csak tovább javítani.

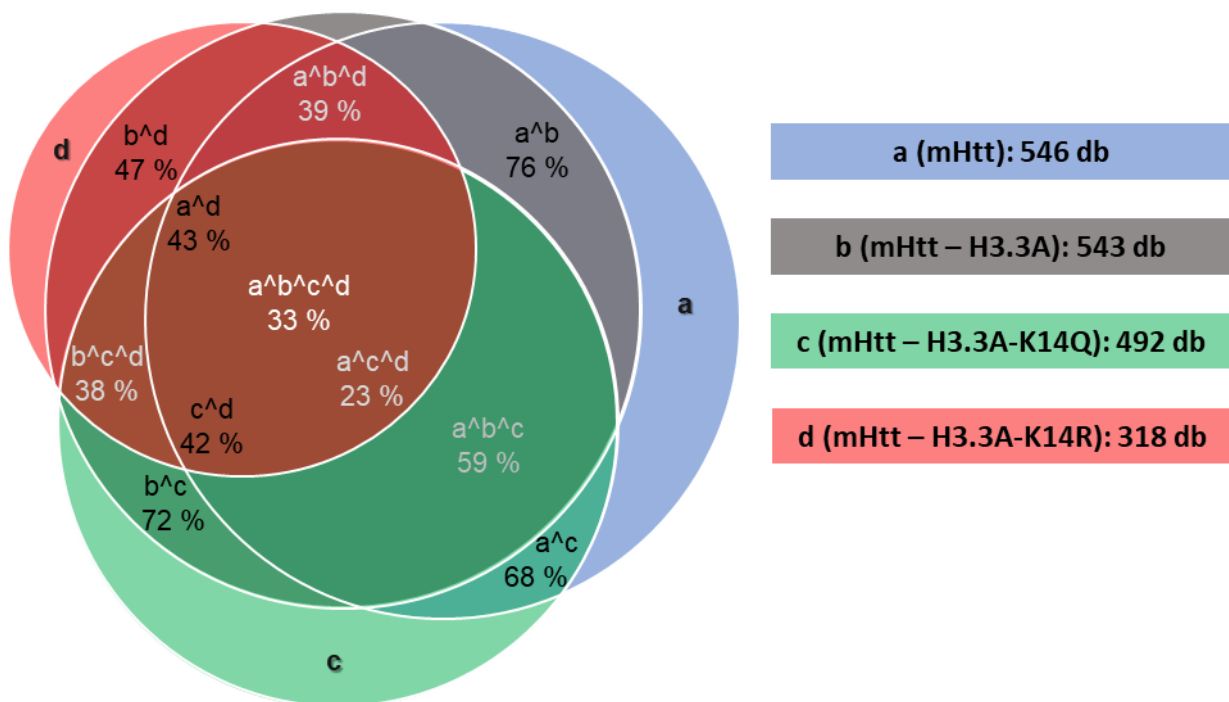
4.1.11. Transzkriptomikai változások vizsgálata *H3.3A-K14-mut* transzgéneket expresszáló HD legyekben

A Huntington-kór során megfigyelhető neurodegeneratív fenotípusok kialakulásának egyik fő oka a transzkripció zavara^{123,124}, melyben a hisztonok acetilációs állapotának változása meghatározó szerepű¹²². Eredményeink alapján a Huntington-kór pathogenezisében a H3.3A hiszton K14 pozíciójában található lizin acetilációs állapotának változtatása jelentős mértékben befolyásolja a HD legyek összes vizsgált fenotípusát, ezért kíváncsiak voltunk, hogy ezek háttérében transzkriptomikai változások állnak-e. A kísérlethez az *elav-GAL4; tub-GAL80^{ts}* expressziós rendszert felhasználva a 18 °C-on történő keresztezésekből kikelő utódokat 30 °C-ra téve adult korban indukáltuk az *mHtt* és a *H3.3A-mut* transzgenek neuronális expresszióját, majd a transzkriptomikai analízist 10 napos egyedeken végeztük. Az egészséges kontroll állatok transzkriptomikai adataihoz hasonlítva az *mHtt*, *mHtt – H3.3A*, illetve *mHtt – H3.3A-K14Q* és *mHtt – H3.3A-K14R* transzgéneket expresszáló legyek esetén érdekes módon nagyságrendileg hasonló számú gén expressziós szintje változik szignifikánsan. Az *mHtt* transzgent önmagában expresszáló legyekben 546 db gén expressziója változik az egészséges állatokhoz képest. A kísérleteink során kontrollként használt *mHtt – H3.3A* transzgéneket együttesen expresszáló legyekben ezzel szinte teljesen megegyező számú, 543 db gén expressziója változik az egészséges állatokhoz képest. Az *mHtt – H3.3A-K14Q* transzgéneket expresszáló mintában 492 db gén expressziója változik az egészséges kontrollhoz képest, míg az *mHtt – H3.3A-K14R* transzgenek expressziója esetén 318 db gén expressziója változik szignifikánsan (2. táblázat).

	kontroll	<i>mHtt</i>	<i>mHtt – H3.3A</i>	<i>mHtt – H3.3A-K14Q</i>	<i>mHtt – H3.3A-K14R</i>
kontroll	-	546	543	492	318
<i>mHtt</i>	-	-	14	20	31
<i>mHtt – H3.3A</i>	-	-	-	2	10
<i>mHtt – H3.3A-K14Q</i>	-	-	-	-	6
<i>mHtt – H3.3A-K14R</i>	-	-	-	-	-

2. táblázat: Transzkriptomikai változások az *mHtt*, *mHtt – H3.3A* és *mHtt – H3.3A-K14-mut* transzgéneket expresszáló egyedekben. A táblázat a differenciál génexpresszió analízis eredményét ábrázolja, melyben az egyes minták közötti statisztikailag szignifikáns változást mutató gének darabszáma látható.

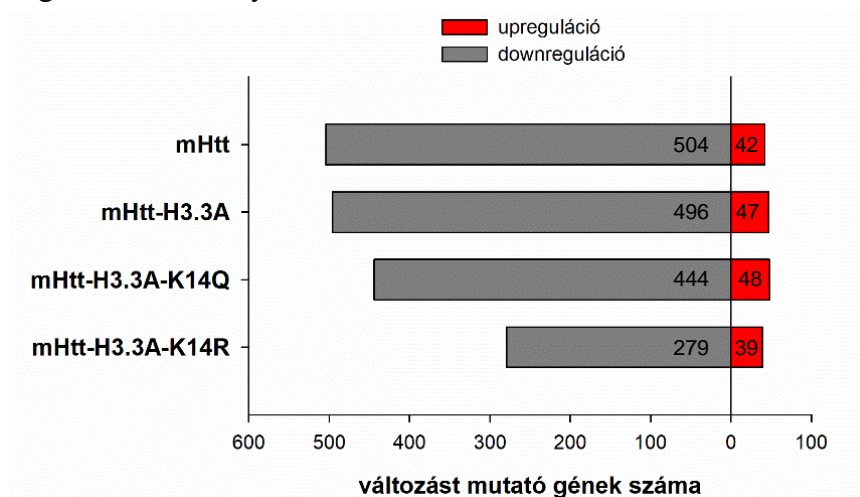
Az *mHtt* transzgénét önmagában expresszáló legyekhez képest azonban már csak elenyésző számú gén expressziója változik az *mHtt – H3.3A* (14 db), illetve *mHtt – H3.3A-K14Q* (20 db) és *mHtt – H3.3A-K14R* (31 db) transzgéneket együttesen expresszáló mintákban (2. táblázat). A kísérleteink során kontrollként használt *mHtt – H3.3A* expresszáló legyekhez képest pedig az *mHtt – H3.3A-K14Q* transzgéneket expresszáló állatok esetén összesen 2 db, az *mHtt – H3.3A-K14R* transzgénnek esetén pedig 10 db gén expressziója változik csak szignifikáns mértékben. Az *mHtt – H3.3A-K14Q* és az *mHtt – H3.3A-K14R* transzgéneket expresszáló legyek között szintén alig tapasztalható génexpresszióbeli változás, mindössze 6 db gén expressziója változik szignifikánsan (2. táblázat). Tehát a transzkriptomikai analízis eredménye azt mutatja, hogy az egészséges kontroll állatokhoz hasonlítva az *mHtt*, *mHtt – H3.3A*, illetve *mHtt – H3.3A-K14Q* és *mHtt – H3.3A-K14R* transzgéneket expresszáló legyek esetén nagyságrendileg hasonló számú gén expressziós szintje változik szignifikánsan, míg egymáshoz viszonyítva elhanyagolható mértékű a különbség. Az adatok további vizsgálata során kiderült, hogy az egészséges kontrollhoz képest változást mutató gének nagymértékben átfednek (38. ábra).



38. ábra: *mHtt*-t nem expresszáló kontrollhoz viszonyított transzkriptomikai változások összehasonlítása *mHtt*, *mHtt-H3.3A*, illetve *mHtt – H3.3A-K14-mut* transzgéneket expresszáló egyedekben. Az ábrán az átfedést mutató gének száma látható Venn-diagram formájában.

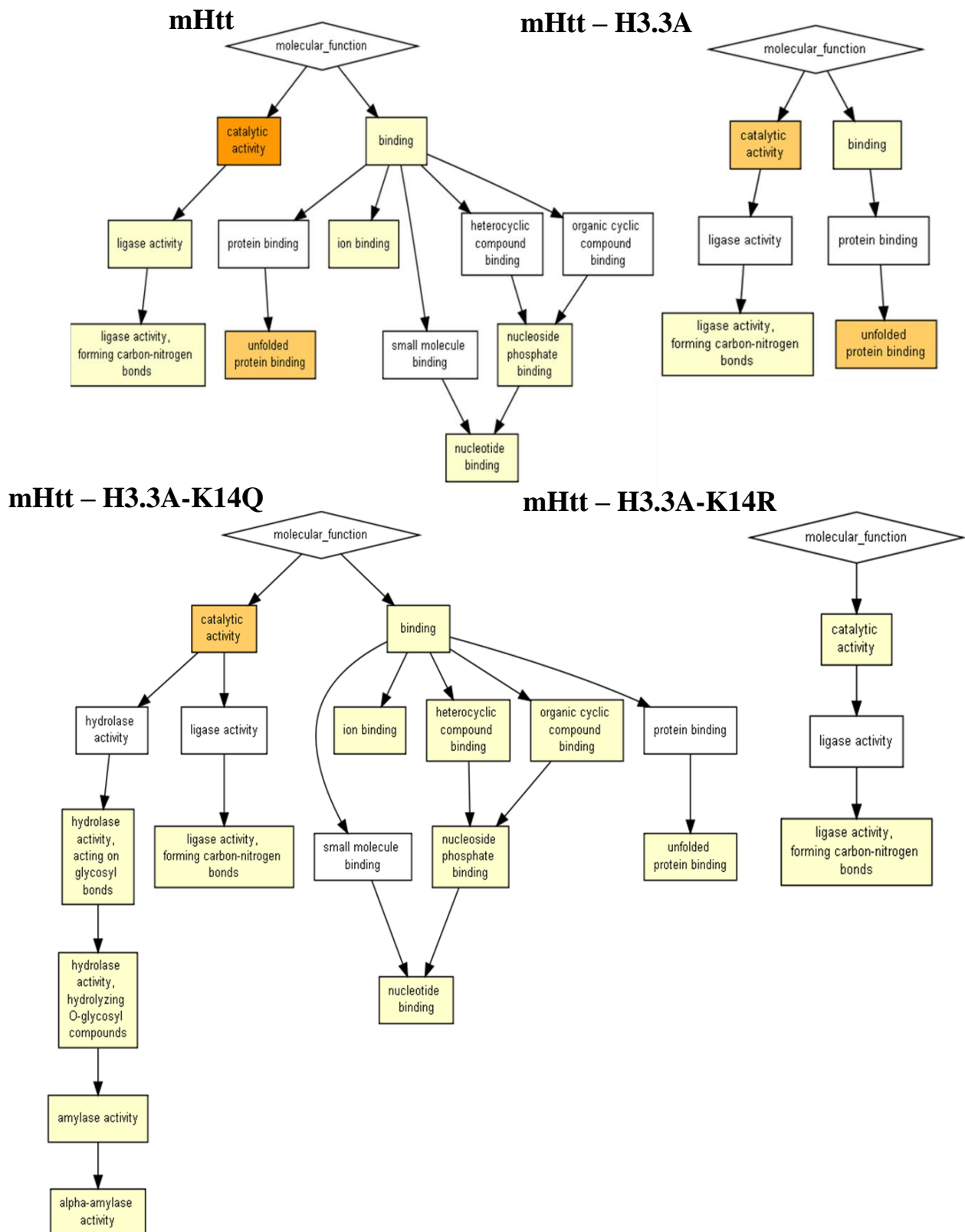
A csak *mHtt*-t expresszáló és az *mHtt – H3.3A* transzgéneket expresszáló kontrollok között 76 %-os egyezés figyelhető meg a változást mutató génekben, ez az arány 68 % az *mHtt – H3.3A-K14Q* esetén, míg az *mHtt – H3.3A-K14R* esetén 43 %-os az egyezés. Az *mHtt – H3.3A* és *mHtt – H3.3A-K14Q* transzgéneket expresszáló legyek között 72 %-os, míg az *mHtt – H3.3A-K14R* esetén szintén alacsonyabb, 47 %-os egyezés látható. Az *mHtt – H3.3A-K14Q* és *mHtt – H3.3A-K14R* transzgenek expressziójának hatására változást mutató gének között pedig szintén 47 %-os egyezés figyelhető meg (38. ábra).

Az egészséges kontroll egyedekhez viszonyított transzkriptomikai változások irányultságának vizsgálata során kiderült, hogy a változást mutató gének ~90 %-a downregulálódik az *mHtt*, *mHtt – H3.3A* és *mHtt – H3.3A-K14-mut* transzgenek hatására is (39. ábra). Ez tehát arra utal, hogy az általunk használt *Drosophila* HD modellben a transzkripcionális diszreguláció nagymértékű génexpresszió csökkenés formájában valósul meg, mely egybevág korábbi microarray vizsgálatok eredményeivel^{123,124}.



39. ábra: Upregulált és downregulált gének megoszlása az *mHtt*, *mHtt – H3.3A* és *mHtt – H3.3A-K14-mut* transzgéneket expresszáló egyedekben. A diagramon az egészséges kontrollhoz viszonyított génexpresszió változások iránya látható.

Az egészséges egyedekhez viszonyított transzkriptomikai változásokat génontológiai analízissel molekuláris funkciójukat tekintve is vizsgáltuk. Azonosítani tudtunk számos olyan géncsoportot, melyben dúsulás figyelhető meg HD legyekben, azonban a *H3.3A-mut* transzgenek expressziója ezen jelentős mértékben nem változtat. Molekuláris funkciójukat tekintve az UPR (unfolded protein response) válaszban szerepet játszó hősokk fehérjéket (Hsp), illetve a nukleotid kötő fehérjéket kódoló gének esetén figyelhető meg dúsulás. Emellett érdemes kiemelni még a katalitikus aktivitással rendelkező fehérjék csoportján belül a C-H kötések kialakításáért felelős ligáz aktivitású enzimek dúsulását (40. ábra).



40. ábra: *mHtt*-t nem expresszáló kontrollhoz viszonyított transzkriptomikai változások molekuláris funkció szerint az *mHtt*, *mHtt – H3.3A*, illetve *mHtt – H3.3A-K14-mut* transzgéneket expresszáló egyedekben. Az ábrán a génontológiai analízis alapján molekuláris funkciójuk szerint dúsulást mutató gének csoportosítása látható.

Érdeemes megjegyezni, hogy HD legyekben a nagymértékű génextpresszióbeli csökkenés ellenére egyes *Hsp* gének expressziója upregulálódik az egészséges legyekhez viszonyítva. Ez az upreguláció megfigyelhető az *mHtt*, *mHtt – H3.3A*, illetve *mHtt – H3.3A-K14Q* transzgéneket expresszáló egyedeknél, azonban a H3.3A-K14R módosítás hatására csak a *Hsp23* expressziója mutat emelkedett szintet (3. táblázat).

	<i>mHtt</i>	<i>mHtt – H3.3A</i>	<i>mHtt – H3.3A-K14Q</i>	<i>mHtt – H3.3A-K14R</i>
<i>Hsp23</i>	1,572	2,117	1,349	1,353
<i>Hsp26</i>	1,716	2,031	1,203	0,504
<i>Hsp27</i>	0,921	1,835	1,122	0,130
<i>Hsp68</i>	2,545	2,760	2,115	1,229
<i>Hsp83</i>	1,640	1,577	1,094	0,574

3. táblázat: *Hsp* gének expressziós szintjének változása az *mHtt*, *mHtt – H3.3A* és *mHtt – H3.3A-K14-mut* transzgéneket expresszáló egyedekben. A táblázatban az egészséges kontrollhoz viszonyított génextpresszió változások $\log_2[\text{fold change}]$ értéke látható, a zöld-piros színátmenet az upreguláció mértékét, a vastag kiemelés a szignifikáns eltérést mutatja.

A kísérleteink során kontrollként használt *mHtt – H3.3A* transzgéneket együttesen expresszáló legyekhez viszonyítva az acetilációt mimikáló H3.3A-K14Q módosítás hatására enyhén csökken a *Hsp* gének expressziós szintje, azonban ez a változás nem szignifikáns. Ezzel szemben a nem módosítható lizint mimikáló H3.3A-K14R mutáció hatására a *Hsp23* gén kivételével szignifikánsan csökken az expressziójuk (4. táblázat).

	<i>mHtt – H3.3A-K14Q</i>	<i>mHtt – H3.3A-K14R</i>
<i>Hsp23</i>	-0,768	-0,764
<i>Hsp26</i>	-0,828	-1,527
<i>Hsp27</i>	-0,713	-1,705
<i>Hsp68</i>	-0,645	-1,131
<i>Hsp83</i>	-0,483	-1,003

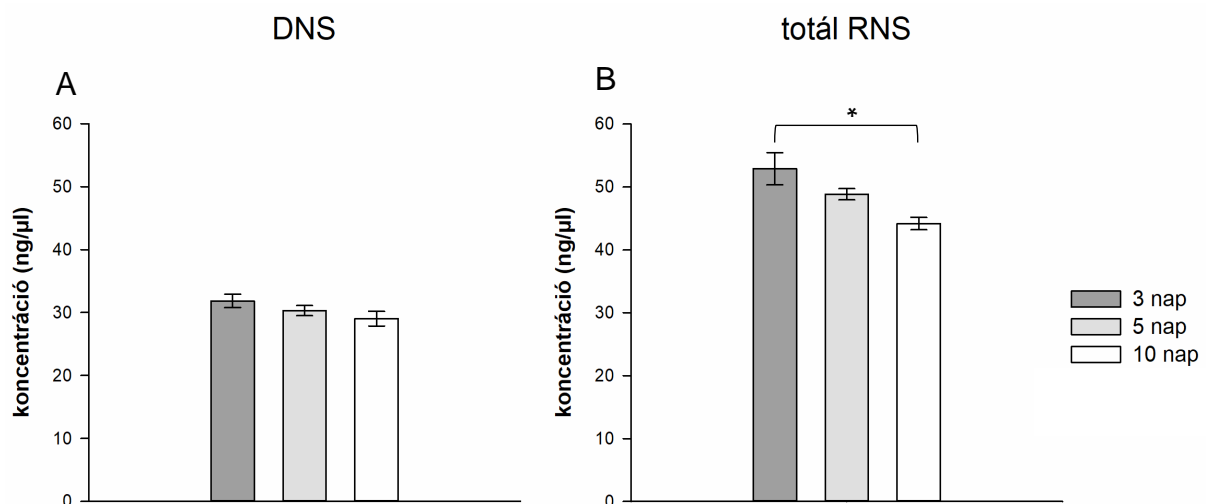
4. táblázat: *Hsp* gének expressziós szintjének változása az *mHtt – H3.3A* kontrollhoz viszonyítva az *mHtt – H3.3A-K14-mut* transzgéneket expresszáló egyedekben. A táblázatban a génextpresszió változások $\log_2[\text{fold change}]$ értéke látható, a zöld-piros színátmenet a downreguláció mértékét, a vastag kiemelés a szignifikáns eltérést mutatja.

Összességében tehát a transzkriptomikai analízis eredményei alapján úgy tűnik, hogy HD legyekben az acetilációt mimikáló H3.3A-K14Q és a nem módosítható lizint mimikáló H3.3A-K14R módosítások hatására nem következik be jelentős mértékű transzkripcionális változás az *mHtt – H3.3A* transzgéneket expresszáló kontrollhoz viszonyítva, mely arra utal, hogy a HD legyekben a H3.3A-K14Q módosítás következtében megfigyelhető fenotípusbeli javulás nem egyszerűen a transzkripció zavarának helyreállításával valósul meg.

4.1.12. Totál RNS/ DNS és polyA mRNS/ totál RNS arány vizsgálata *H3.3A-K14-mut* transzgéneket expresszáló HD legyekben

A transzkriptomikai analízis eredménye nem mutatott jelentős különbséget a *H3.3A* kontrollhoz képest a *H3.3A-K14Q* és *H3.3A-K14R* transzgének expressziójának következtében, mely magyarázná a HD legyek fenotípusában bekövetkező javulást vagy romlást. Érdeemes megjegyezni azonban, hogy az RNS szekvenáláson alapuló transzkriptomikai vizsgálat egyik hátránya, hogy ezzel a módszerrel egyedi gének transzkriptum szintjének növekedését vagy csökkenését tudjuk kimutatni, általános transzkripciós csökkenést vagy növekedést nem. Ezért megvizsgáltuk, hogy a 18 °C-on történő kikelést követően az egyes transzgéneket az *elav-GAL4; tubulin-GAL80^{ts}* driver által 30 °C-on, adult kortól expresszáló HD legyekben megfigyelhető-e eltérés a DNS és a totál RNS mennyiségében, illetve a totál RNS/ DNS és a polyA mRNS/ totál RNS arányában, ami esetleg magyarázatot adna a fenotípusbeli változásokra *H3.3A-K14Q* és *H3.3A-K14R* transzgének expressziójának következtében. A DNS és RNS mennyiségének mérését 3, 5, illetve 10 napos korban is vizsgáltuk, melynek köszönhetően a betegség progressziójának hatását is megfigyelhettük.

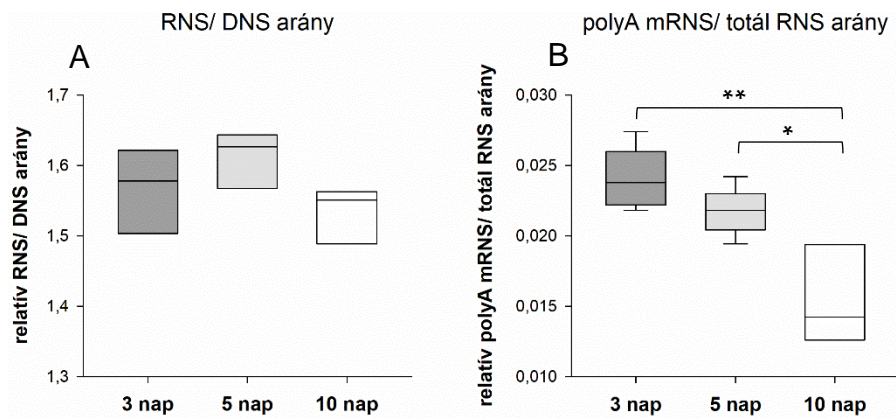
30 °C-on tartva az egészséges állatok is gyorsabban öregednek ¹⁶¹, illetve az öregedés során csökken a totál RNS mennyisége ¹⁶², ami az általunk használt kontroll esetén is megfigyelhető. Kísérletünkben az idő előrehaladtával nagyon enyhe csökkenés figyelhető meg a DNS mennyiségében (41/ A. ábra), míg a totál RNS mennyiségében a 10. napra szignifikáns, ~10 %-os csökkenés látható (41/ B. ábra).



41. ábra: A DNS és totál RNS mennyiségének változása vad típusú kontroll egyedekben.

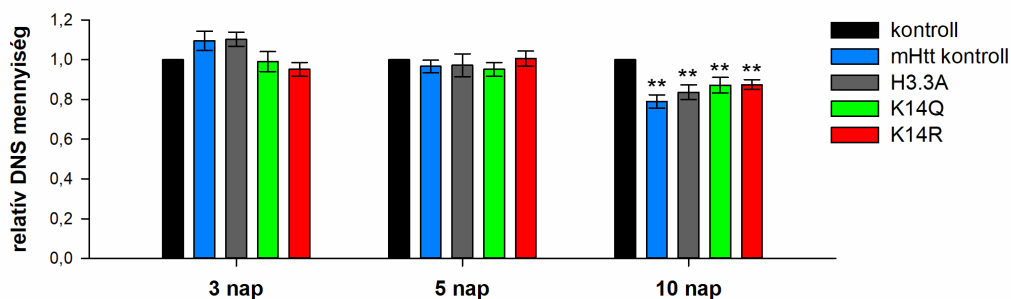
A: DNS mennyiségi változása, B: totál RNS mennyiségi változása; a diagramok az átlag értékeket és a standard error-t ábrázolják, statisztikai analízisként OVA tesztet végeztünk (*: $p < 0,05$).

Továbbá a 10. napra lecsökken a totál RNS/ DNS arány (42/ A. ábra) és szignifikánsan csökken a polyA mRNS/ totál RNS arány is (42/ B. ábra), ami arra utal, hogy az egészséges kontroll egyedekben az öregedés során általánosan csökken a génexpresszió.



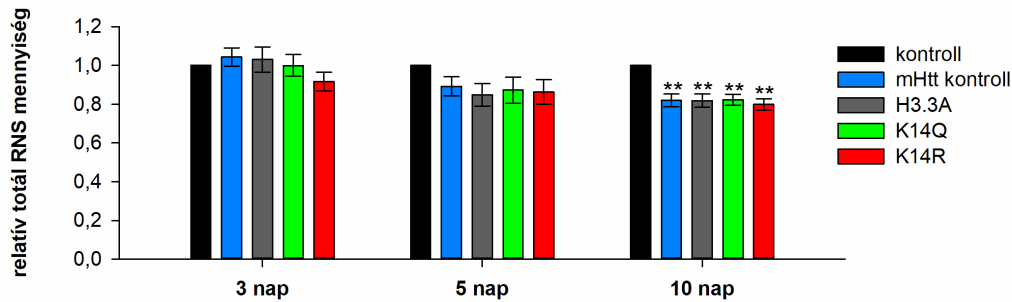
42. ábra: A totál RNS/ DNS arány és a polyA mRNS/ totál RNS arány változása vad típusú kontroll egyedekben. A: totál RNS/ DNS arány változása, B: polyA mRNS/ totál RNS arány változása 1 µg totál RNS-re vonatkoztatva; a diagram a mediánt, illetve a 25 %-os és 75 %-os, valamint a 10 %-os és 90 %-os percentilis értékeket ábrázolja, statisztikai analízisként OWA tesztet végeztünk (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$).

Az *mHtt*, *mHtt – H3.3A*, illetve *mHtt – H3.3A-K14-mut* transzgéneket expresszáló egyedeknél mért DNS mennyiségében az egészséges kontroll állatokhoz képest a 10. napra szignifikáns csökkenés látható, mely a Huntington-kór progressziójának hatására bekövetkező sejtpusztulással magyarázható. Érdeemes megjegyezni, hogy a *H3.3A-K14-mut* mutáns transzgenek expressziója nem eredményez javulást vagy további sejtpusztulást a HD legyekben a vad típusú H3.3A-t expresszáló egyedekhez képest (43. ábra).



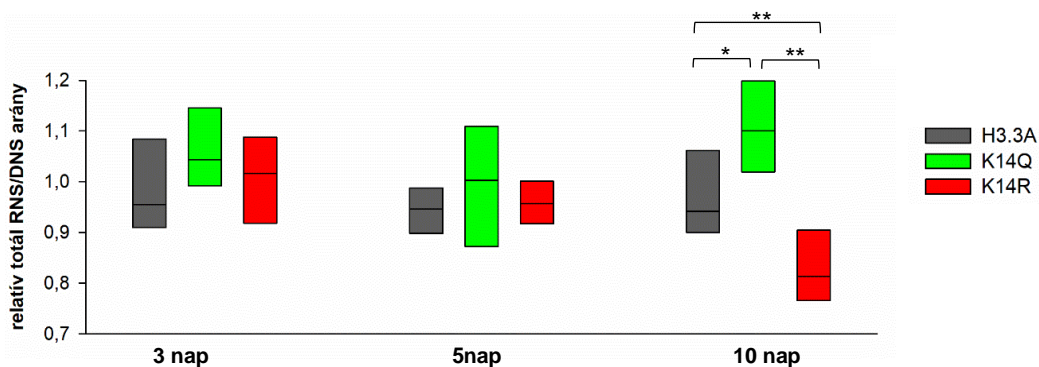
43. ábra: A DNS mennyiségének változása *mHtt*, *mHtt – H3.3A*, illetve *mHtt – H3.3A-K14-mut* transzgéneket expresszáló egyedekben. A diagram a vad típusú kontrollra normalizált átlag értékeket és a standard error-t ábrázolja, statisztikai analízisként OWA tesztet végeztünk (**: $p < 0,01$).

Az RNS szint változás mérése nagyon hasonló eredményt mutat, az *mHtt*, *mHtt – H3.3A*, illetve *mHtt – H3.3A-K14-mut* transzgéneket expresszáló egyedeknél a kontrollhoz képest a 10. napra szignifikáns csökkenés látható a totál RNS mennyiségében, és a *H3.3A-K14-mut* transzgenek expressziója nem eredményez magasabb vagy alacsonyabb RNS szintet a HD legyekben a vad típusú *H3.3A* transzgenet expresszáló egyedekhez képest (44. ábra).



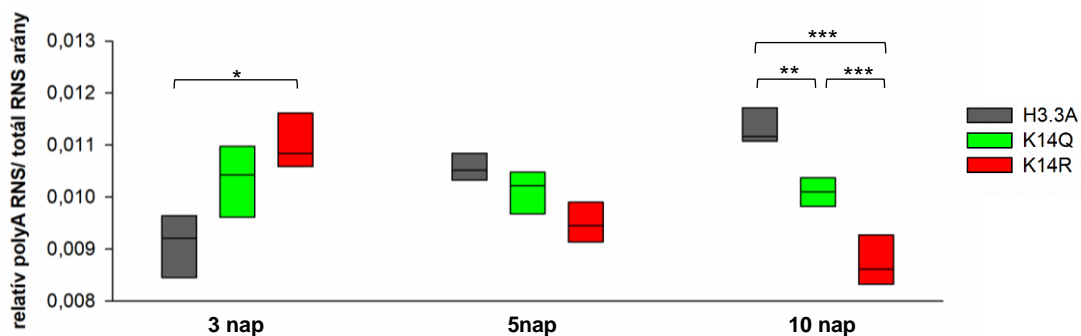
44. ábra: A totál RNS mennyiségének változása *mHtt*, *mHtt – H3.3A*, illetve *mHtt – H3.3A-K14-mut* transzgéneket expresszáló egyedekben. A diagram a vad típusú kontrollra normalizált átlag értékeket és a standard error-t ábrázolja, statisztikai analízisként OVA tesztet végeztünk (**: $p < 0,01$).

A DNS mennyiségére normalizált totál RNS mennyiségében (RNS/ DNS arány) a transzgenek indukcióját követő 3. és 5. napon az *mHtt – H3.3A*, illetve *mHtt – H3.3A-K14-mut* transzgéneket expresszáló egyedeknél még nincs jelentős különbség, a 10. napra viszont már szignifikáns eltérések figyelhetők meg. A kísérleteink során kontrollként használt *mHtt – H3.3A* transzgéneket expresszáló HD állatokhoz képest a *H3.3A-K14Q* módosítás következtében magasabb RNS/ DNS arány figyelhető meg, míg a *H3.3A-K14R* módosítás esetén a változás pont ellentétes irányú (45. ábra).



45. ábra: A totál RNS/ DNS arány változása az *mHtt – H3.3A*, illetve *mHtt – H3.3A-K14-mut* transzgéneket expresszáló egyedekben. A diagram az *mHtt* kontrollra normalizált totál RNS/ DNS arány mediánját, illetve a 25 %-os és 75 %-os percentilis értékeket ábrázolja, statisztikai analízisként OVA tesztet végeztünk (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$).

Érdeemes megemlíteni, hogy a vad típusú *H3.3A* transzgént expresszáló HD legyekben nem változik a totál RNS/ DNS arány az idő előrehaladtával, azonban a *H3.3A-K14Q* módosítás esetén enyhén nő, míg a *H3.3A-K14R* módosítás esetén jelentősen csökken a totál RNS/ DNS arány, mely arra utal, hogy a betegség progressziója során a *H3.3A-K14* lizin acetilációja növeli a totál RNS szintézis mértékét, míg az acetiláció hiánya csökkenti azt. Ezután megvizsgáltuk a polyA mRNS/ totál RNS arányt az *mHtt – H3.3A*, illetve *mHtt – H3.3A-K14-mut* transzgéneket expresszáló legyekben. Az *mHtt – H3.3A* transzgenek esetén nagy mértékű mRNS szint növekedés figyelhető meg a Huntington-kór progressziója során (46. ábra).



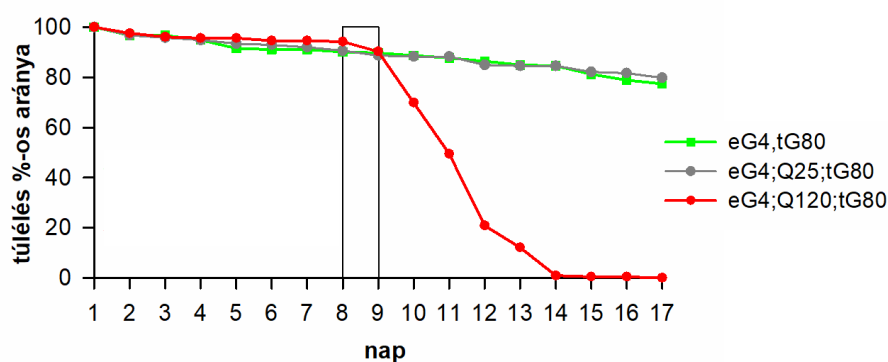
46. ábra: A polyA mRNS/ totál RNS arány változása az *mHtt*, *mHtt – H3.3A*, illetve *mHtt – H3.3A-K14-mut* transzgéneket expresszáló egyedekben. A diagram az *mHtt* kontrollra normalizált polyA mRNS/ totál RNS arány mediánját, illetve a 25 %-os és 75 %-os percentilis értékeket ábrázolja 1 µg totál RNS-re vonatkoztatva, statisztikai analízisként OWA tesztet végeztünk (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

Az indukciót követő 3. napon a *H3.3A-K14Q* módosítás hatására enyhe, a *H3.3A-K14R* módosítás hatására szignifikáns növekedés figyelhető meg a HD legyek mRNS/ totál RNS arányában a vad típusú *H3.3A* transzgént expresszáló kontrollhoz képest, ami arra utal, hogy a *H3.3A-K14* lizin acetilációja és annak hiánya is kezdetben magasabb RNS polimeráz II transzkripcionális aktivitáshoz vezet (46. ábra). Az 5. napon ez az arány átfordulni látszik, azonban szignifikáns különbség csak a 10. napon mérhető. Ekkor a vad típusú *H3.3A* transzgént expresszáló HD legyekhez képest a *H3.3A-K14Q* és *H3.3A-K14R* módosítások hatására jóval alacsonyabb a polyA mRNS aránya, tehát csökken a génexpresszió, mely a *H3.3A-K14R* módosítás esetén a legalacsonyabb (46. ábra). Érdeemes megjegyezni, hogy ellentétben vad típusú *H3.3A* transzgént expresszáló HD legyeknél megfigyelt meredek génexpresszióbeli növekedéssel, a *H3.3A-K14Q* módosítás esetén alig történik változás a betegség progressziója során, míg a *H3.3A-K14R* módosítás esetén jelentősen csökken a polyA mRNS szintje.

4.2. Cirkadián ritmus zavar vizsgálata Huntington-kór modellben

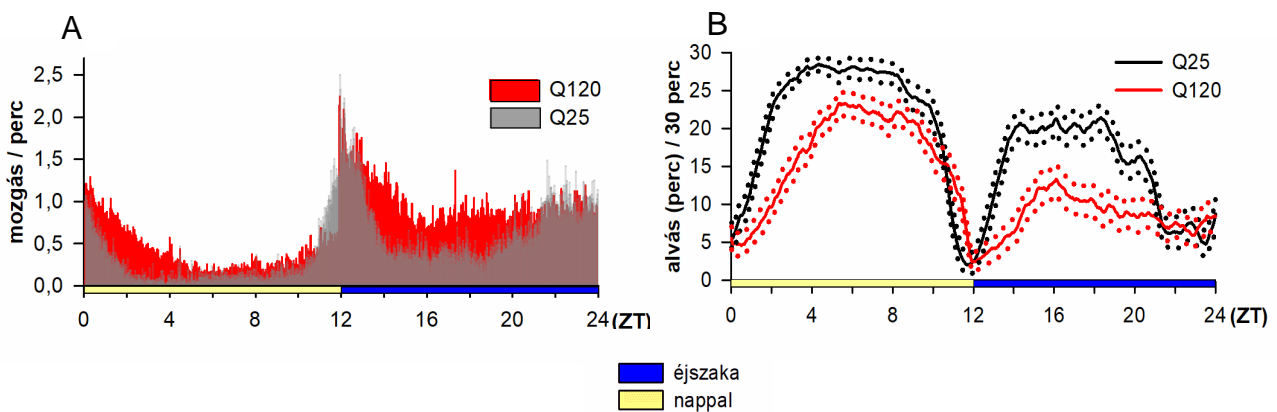
4.2.1. HD legyek cirkadián ritmus zavarának fenotipikus jellemzése

Hasonlóan más neurodegeneratív betegségekhez a Huntington-kór esetén is megfigyelhető a cirkadián ritmus defektusa, melyről a klinikumban is beszámoltak, illetve egyes modellszervezetekben is vizsgálták azt. Ennek ellenére részletes fenotipikus és molekuláris szintű jellemzés még nem készült a betegség során fellépő cirkadián ritmus zavarról. Ezért kutatásunk során összehasonlítottuk a 12/12 órás fény/sötét ciklusban tartott, normál hosszúságú (Q25) illetve patológiás hosszúságú (Q120) poliglutamin domént hordozó *Htt* transzgéneket expresszáló egyedek napi aktivitását. A mutáns *HttQ120* transzgént *elav-GAL4* driver által 25 °C-on teljes élettartamuk alatt neuronálisan kifejező állatok nagyon gyenge életképességűek, mely nem teszi lehetővé a cirkadián ritmus vizsgálatát. Ezért a hőmérsékletszenzitív, indukálható, neuronális kifejeződést biztosító *elav-GAL4*; *tubulin-GAL80^{ts}* expressziós rendszer segítségével fejztettük ki a *HttQ25* és *HttQ120* transzgéneket úgy, hogy a 18 °C-on fejlődő muslicákat a kikelést követően 30 °C-os inkubátorba helyezve indukáltuk expressziójukat. A mutáns *HttQ120* transzgént adult kortól expresszáló egyedek élethossza jelentősen rövidebb a *HttQ25* kontrollokhoz képest, már az indukciót követő 11. napon eléri az 50 % mortalitást. Továbbá a beteg fenotípus megjelenése és az elhalálozás között nagyon szűk az az időintervallum, amely során még nem figyelhető meg tömeges pusztulás viszont a cirkadián ritmus mérés kivitelezése még éppen megfelelő, ezért a 8-9. nap közötti, 24 órás periódusra korlátozódott a mérési tartományunk (47. ábra).



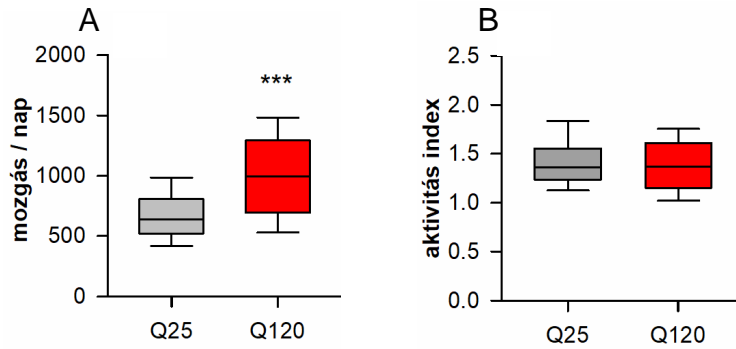
47. ábra: Mutáns *HttQ120* transzgént expresszáló legyek túlélési aránya a kontrollhoz képest. A diagram a túlélés százalékos arányát ábrázolja az idő függvényében, a kijelölt terület a cirkadián ritmus mérés intervallumát jelöli.

Meglepődve tapasztaltuk, hogy a várthoz képest eltérő alvási mintázat figyelhető meg már a *HttQ25* kontroll legyek esetében is. A *Drosophila*-ra jellemző reggeli és esti aktivitás csúcs megfigyelhető mind a *HttQ25* és *HttQ120* transzgéneket expresszáló állatoknál, azonban a szobahőmérsékleten jellemző alvási mintázattal ellentétben ¹⁵⁹ éjszaka kevesebbet alszanak. Szakirodalmi adatok alapján a *Htt* expressziótól független jelenségről van szó, magasabb hőmérsékleten megváltozik az állatok alvási mintázata (Függelék F5. ábra) ¹⁶³. A kísérletek során felhasznált alap törzsek esetén (*elav-GALA*; *tub-GAL80^{ts}*, valamint *w*; *HttQ25* és *w*; *HttQ120*) nem figyelhető meg semmiféle cirkadián ritmus zavar (Függelék F6. ábra), tehát a mérések során látott eltérések biztosan a mutáns *HttQ120* transzgén expresszió következtében alakulnak ki. Kísérleteinkben jelentős különbség volt megfigyelhető a meghajtott transzgének között, a kontrollhoz képest a mutáns *HttQ120* transzgént expresszáló állatok magasabb napi aktivitást mutatnak (48/ A. ábra) és ezzel párhuzamosan kevesebb időt töltenek alvással (48/ B. ábra).



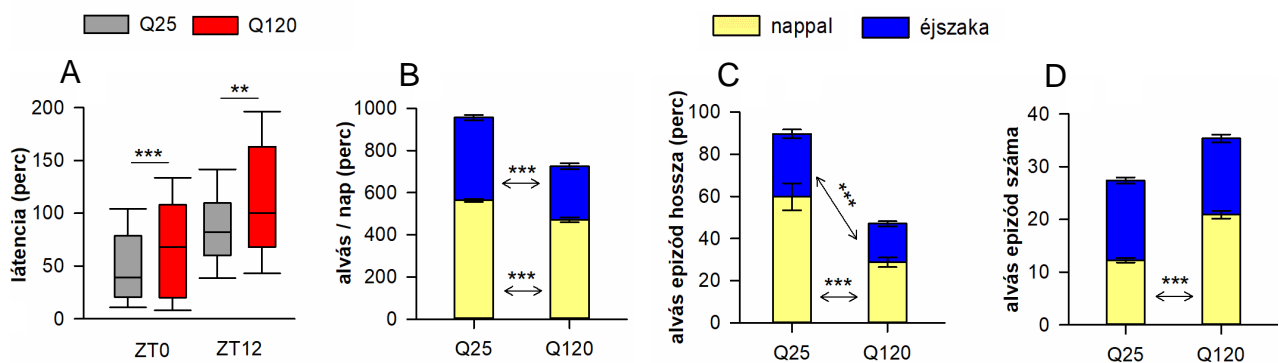
48. ábra: *HttQ25* és *HttQ120* transzgéneket expresszáló legyek aktivitás- és alvásmintázata. A: percenkénti mozgások átlagos száma, B: 30 perc alatt alvással töltött idő; a diagram az átlagot és a konfidencia intervallumot ábrázolja; ZT0 a lámpa felkapcsolásának, ZT12 pedig a lámpa lekapcsolásának időpontjával egyezik meg.

Az összesített napi mozgás adatok alapján a kontrollhoz képest a *HttQ120* transzgént expresszáló legyek szignifikáns hiperaktivitást mutatnak (49/ A. ábra), azonban az aktivitás index (aktivitás az ébren töltött időre normalizálva) érdemben nem különbözik (49/ B. ábra), ami azt mutatja, hogy ez a hiperaktivitás csak az ébren töltött idő növekedéséből fakadó többlet mozgás következménye.



49. ábra: *HttQ25* és *HttQ120* transzgéneket expresszáló legyek napi mozgása és aktivitás indexe. A: összes mozgás 24 óra alatt, B: aktivitás az ébren töltött időre normalizálva; a diagramok a mediánt, illetve a 25 %-os és 75 %-os, valamint a 10 %-os és 90 %-os percentilis értékeket ábrázolják, statisztikai analízisként t-tesztet végeztünk (***: $p < 0,001$).

A *HttQ120* transzgént expresszáló legyek alvási defektusának további vizsgálata alapján kiderült, hogy a látencia idejük is megnövekedett, tehát szignifikánsan hosszabb időbe telik visszatérniük a nyugalmi állapotba az aktivitás csúcsokat követően (50/ A. ábra). Az alvásprofil vizsgálata azt mutatja, hogy a *HttQ120* transzgént expresszáló legyek mind nappal, mind éjszaka kevesebb időt töltenek nyugalomban (50/ B. ábra), továbbá az alvással töltött idejük fragmentáltabb az egészséges kontroll egyedekhez képest. A *HttQ25* transzgént expresszáló kontroll legyekre kevesebb, de hosszabb alvási periódus jellemző, míg a mutáns *HttQ120* transzgént expresszáló beteg legyeknél nappal és éjszaka is szignifikánsan csökken az alvási epizódok hossza (50/ C. ábra), azok száma azonban nappal szignifikánsan megnő (50/ D. ábra).

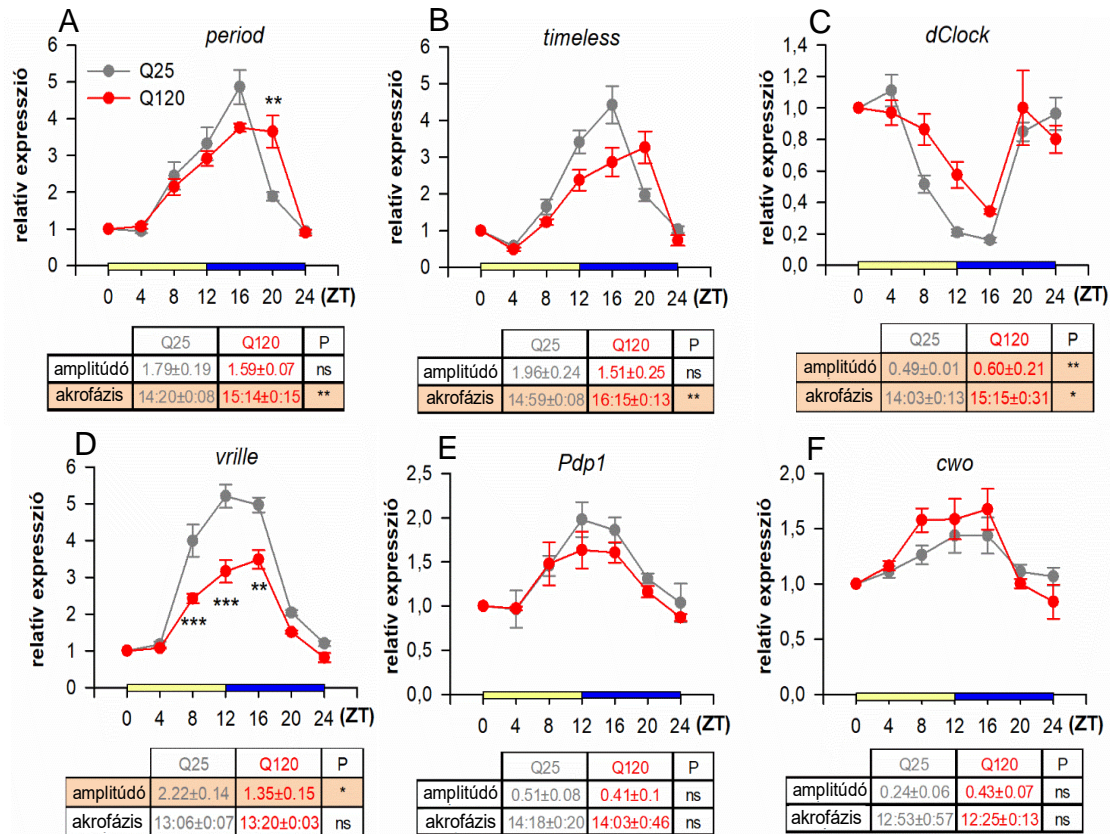


50. ábra: *HttQ25* és *HttQ120* transzgént expresszáló legyek alvásának jellemzői. A: látencia idő; a diagram a mediánt, illetve a 25 %-os és 75 %-os, valamint a 10 %-os és 90 %-os percentilis értékeket ábrázolja, B: alvással töltött percek száma 24 óra alatt, C: alvási epizódok hossza, D: alvási epizódok száma; a diagramok a nappal és éjszaka mért átlag értékeket és a standard error-t ábrázolják, statisztikai analízisként t-tesztet végeztünk (**: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

A *HttQ25* és *HttQ120* transzgéneket expresszáló legyek cirkadián ritmus vizsgálata során megfigyelt eredményeink teljes mértékben egybevágnak a Huntington-kóros páciensek beszámolóival^{134,135}, illetve a korábban bányó¹⁶⁴, egér¹⁶⁵ és *Drosophila*¹⁶⁶ Huntington-kór modellben végzett kísérletek eredményeivel. Fontos azonban megemlíteni, hogy az általunk vizsgált modell az első, amelyben a betegnél megfigyelt összes eddig leírt fenotípus jelentkezik, így a további kutatások során megbízható modellként használható és a cirkadián zavarok enyhítését szolgáló potenciális terápiás szerek hatásának vizsgálatára is alkalmas lehet.

4.2.2. HD legyek cirkadián ritmus zavarának hátterében álló molekuláris változások vizsgálata

A HD legyek cirkadián ritmus defektusának fenotipikus jellemzését követően kíváncsiak voltunk, hogy azok hátterében milyen molekuláris szintű szabályozásbeli zavarok állhatnak. Mutáns analízissel kimutatták, hogy a szabályozásban részvevő gének kiütésének következtében felborul a cirkadián ritmus^{96,101}, mely alapján feltételezhető, hogy a HD legyekben megfigyelhető cirkadián ritmus zavarokért a „clock” gének szabályozásában bekövetkező defektus felelős. Ezért megvizsgáltuk a szabályozásban szerepet játszó „core” és másodlagos feedback loopok génejeinek, illetve magának a *dClk* génnek az expressziós szint változását. Ehhez *perGAL4* driverrel 25 °C-on a pacemaker neuronokban hajtottuk a transzgéneket, így kiküszöbölve a mutáns *HttQ120* transzgen *elavGAL4* általi minden idegsejtben történő expressziója következtében okozott neurodegeneratív fenotípusokat. A 24 órás időtartam alatt történő génexpresszió változásokat 2 hetes 12/ 12 órás fény/ sötét ciklusban tartott legyekben vizsgáltuk, 4 órás mintavételekkel RT-qPCR segítségével. A HD legyekben a *period* (51/ A. ábra) és *timeless* (51/ B. ábra) „core” feedback loop génjeinek amplitúdója (génexpressziós csúcs átlagtól való eltérése) valamivel alacsonyabb a *HttQ25* transzgent expresszáló kontrollhoz képest, továbbá az akrofázisukban (génexpressziós csúcs elérésének a görbe alapján becsült fázisa) szignifikáns időbeli eltolódás figyelhető meg, mely a *period* gén esetén ZT20 időpontban szignifikáns eltérést okoz. A központi szabályozó *dClock* gén expressziója szignifikáns amplitúdóbeli emelkedést, illetve szintén akrofázisbeli eltolódást mutat a kontrollhoz képest (51/ C. ábra). A másodlagos feedback loop génjei közül egyedül a *vrille* expressziójában figyelhető meg szignifikáns amplitúdóbeli csökkenés, mely ZT8, ZT12 és ZT16 időpontokban eredményez szignifikáns eltérést (51/ D. ábra). A *Pdp1* és *cwo* másodlagos feedback loophoz tartozó gének viszont nem mutatnak jelentős változást a mutáns *HttQ120* transzgent expresszáló állatokban (51/ E-F. ábra).



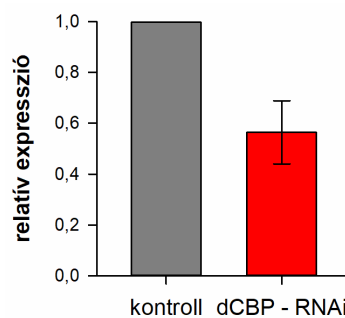
51. ábra: *HttQ25* és *HttQ120* transzgéneket expresszáló legyek cirkadián szabályozó géneinek expressziós mintázata. A: *period*, B: *timeless*, C: *dClock*, D: *vrille*, E: *Pdp1*, F: *cwo*; a diagramok a mért expressziós értékek átlagát és a standard error-t ábrázolják, statisztikai analízisként TWA tesztet végeztünk, táblázatban a görbék alapján meghatározott amplitúdó és akrofázis értékek átlaga és a standard error látható, statisztikai analízisként MWU tesztet végeztünk (ns: $p > 0,05$; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

Összeségében tehát a cirkadián ritmus szabályozó gének ciklikus expressziós mintázata zavart szenved, de nem szűnik meg teljesen a ciklizálás, ami arra utal, hogy a pacemaker neuronok nem pusztulnak el csak funkciójuk sérül. Változás figyelhető meg a „core” és a másodlagos feedback loop génei esetén is, ami egy összetettebb szabályozásbeli zavarra utal. A dCLK negatív regulátoraként funkcionáló VRILLE fehérje ZT8-16 között mért alacsonyabb mRNS szintje hozzájárulhat a megemelkedett dCLK expresszióhoz. A *per* és *tim* gének kitolódott expressziós csúcsa pedig a feltételezhetően hosszabb ideig jelen lévő PER/TIM által mediált dCLK gátlás kitolódásához vezet. A dCLK kitolódott inaktivitása következtében a target gének expressziója csökken, ami magyarázza az alacsonyabb *per*, *tim* és *vrille* expressziót ZT8-16 között. Továbbá az aktív dCLK későbbi felhalmozódása magyarázatot adhat a *per* és *tim* gének akrofázisában megfigyelhető eltolódásra.

4.2.3. A *dCBP/nejire* funkcióvesztésének hatása a cirkadián ritmusra

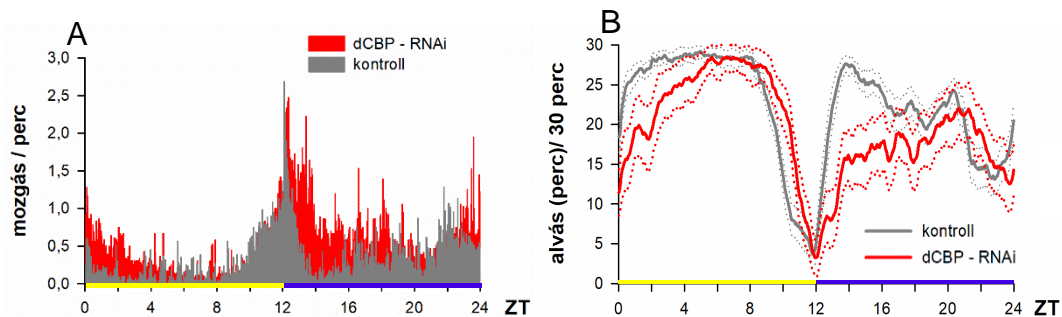
A CBP egy hiszton acetiltransferáz aktivitással is rendelkező transzkripció koaktivátorként funkcionáló fehérje, továbbá a cirkadián génexpresszió szabályozás egyik fontos részvevője^{105,106}, mely a Huntington-kór során az aggregátumokba csapódva gátlás alá kerül¹²⁵. Ez alapján feltételezhető, hogy a betegség esetén is megfigyelhető cirkadián ritmus defektust a CBP hiánya idézi elő, ezért megvizsgáltuk, hogy a *dCBP* csendesítése esetén a Huntington-kórhoz hasonló cirkadián ritmus zavarok figyelhetőek-e meg. A *dCBP* csendesítését RNS interferencia segítségével érték el, mely során a *dCBP* gén egy rövid szakaszával komplementer duplaszálú RNS termelését indukáltuk egy GAL4 által szabályozott transzgenikus konstrukcióról. A kísérlethez az *elav-GAL4; tub-GAL80^{ts}* expressziós rendszer segítségével a 18 °C-on történő kikelést követően 30 °C-os inkubátorba helyezve hajtottuk meg az RNS interferenciát kiváltó transzgént, majd 2 hetes, 12/12 órás fény/sötét ciklusban tartott állatok napi aktivitását mértük.

Elsőként az RNS interferencia hatására bekövetkező géncsendesítés hatékonyságát validáltuk RT-qPCR segítségével. A 2 hetes legyek fejéből származó RNS mintákban az *elav-GAL4; tub-GAL80^{ts}* driverrel hajtott *dCBP* RNS interferencia következtében ~50 %-ra csökken a *dCBP* gén expressziós szintje a nem indukált kontrollhoz képest, mely elfogadható mértékű *dCBP* csendesítésnek felel meg az állatok neuronjaiban (52. ábra).



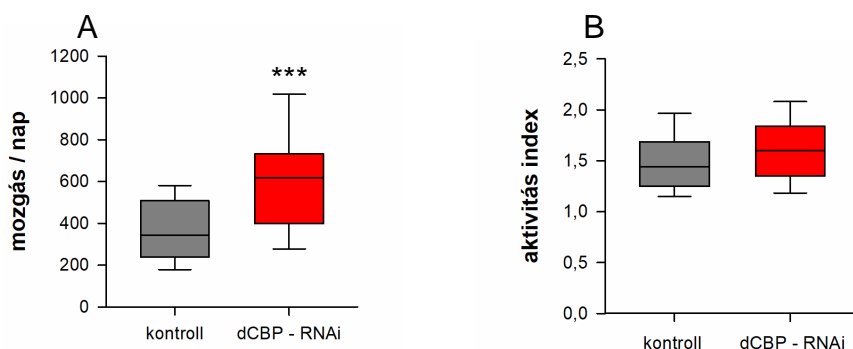
52. ábra: *dCBP* RNS interferencia hatékonysága. A diagram a *tubulin* háztartási génre, majd a kontrollra normalizált expressziós értékek átlagát és a standard error-t ábrázolja.

A génexpresszió validálás után a 2 hetes, *elav-GAL4; tub-GAL80^{ts}* driverrel hajtott *dCBP* RNS interferenciás hím muslicák cirkadián ritmusát vizsgáltuk ugyanazzal a módszerrel, mint korábban a mutáns *HttQ120* transzgént expresszáló állatoknál. A HD legyekhez hasonlóan a *dCBP* csendesítés következtében is jelentős különbség figyelhető meg az állatok napi ritmusában. A kontrollhoz képest a *dCBP* RNS interferenciás állatok magasabb napi aktivitást mutatnak (53/ A. ábra) és ezzel párhuzamosan kevesebb időt töltenek alvással (53/ B. ábra).



53. ábra: *dCBP* RNS interferenciás legyek aktivitás- és alvásmintázata. A: percenkénti mozgások átlagos száma, B:30 perc alatt alvással töltött idő; a diagram az átlagot és a konfidencia intervallumot ábrázolja; ZT0 a lámpa felkapcsolásának, ZT12 pedig a lámpa lekapcsolásának időpontjával egyezik meg.

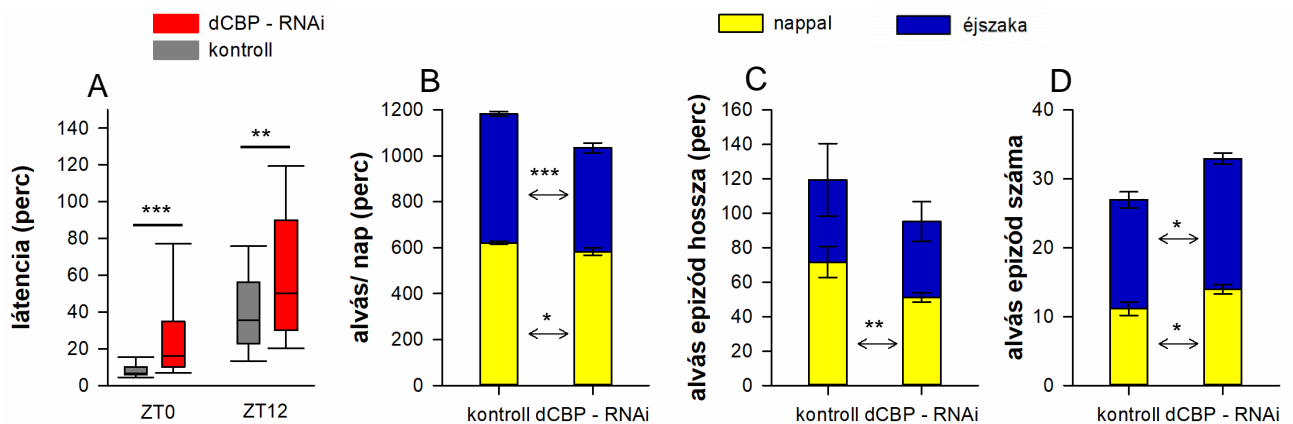
Az összesített napi mozgás alapján a kontrollhoz képest a *dCBP* RNS interferenciás legyek szignifikáns hiperaktivitást mutatnak (54/ A. ábra), azonban hasonlóan a HD legyeknél tapasztaltakhoz az aktivitás index azt mutatja, hogy ez a hiperaktivitás csak látszólagos, mely az ébren töltött idő növekedéséből fakadó többlet mozgás következménye (54/ B. ábra).



54. ábra: *dCBP* RNS interferenciás legyek napi mozgása és aktivitás indexe. A: összes mozgás 24 óra alatt, B: aktivitás az ébren töltött időre normalizálva; a diagramok a mediánt, illetve a 25 %-os és 75 %-os, valamint a 10 %-os és 90 %-os percentilis értékeket ábrázolják, statisztikai analízisként t-tesztet végeztünk (***: $p < 0,001$).

Az alvási defektus további vizsgálata kimutatta, hogy a *Drosophila*-ra jellemző reggeli és esti aktivitás csúcsokat követően a *dCBP* csendesített legyek hosszabb látencia idővel rendelkeznek, azaz nehezebben térnek vissza nyugalmi állapotba (55/ A. ábra), ami a HD legyek cirkadián ritmus zavarának vizsgálatakor szintén megfigyelhető volt. Az alvási profil részletes vizsgálata pedig azt mutatja, hogy a *dCBP* csendesített legyek nappal és éjszaka is szignifikánsan kevesebb időt töltenek nyugalomban (55/ B. ábra), továbbá az alvással töltött idejük fragmentáltabb a kontrollhoz képest. A *dCBP* csendesített állatok esetén az alvási

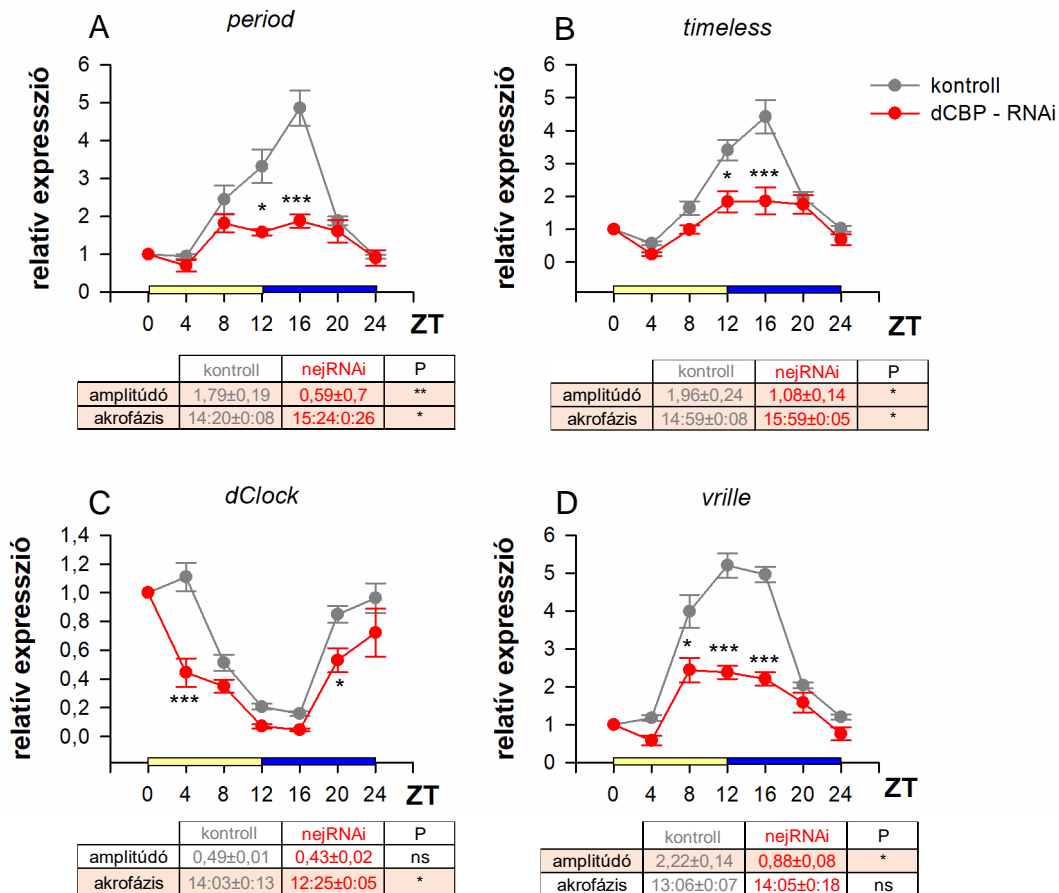
epizódok hossza nappal szignifikánsan csökken (54/ C. ábra), míg szignifikánsan nő a nappali és éjszakai alvási epizódok száma (55/ D. ábra), mely szintén megfigyelhető volt a HD legyek vizsgálata során is.



55. ábra: *dCBP* RNS interferenciás legyek alvásának jellemzői. A: látencia idő; a diagram a mediánt, illetve a 25 %-os és 75 %-os, valamint a 10 %-os és 90 %-os percentilis értékeket ábrázolja, B: alvással töltött percek száma 24 óra alatt, C: alvási epizódok hossza, D: alvási epizódok száma; a diagramok a nappal és éjszaka mért átlag értékeket és a standard error-t ábrázolják, statisztikai analízisként t-tesztet végeztünk (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

A *dCBP* csendesítés következtében megfigyelhető cirkadián ritmus zavar nagyon hasonlít a HD legyeknél tapasztalt napi ritmusbeli változásokhoz, ezért a következő lépésként megvizsgáltuk a mutáns *HttQ120* transzgén expressziójának hatására változást mutató *period*, *timeless*, *Clock* és *vriille* cirkadián szabályozó gének expressziós mintázatát a *dCBP* RNS interferenciás legyekben is. Ehhez *perGAL4* driverrel 25 °C-on a pacemaker neuronokban hajtottuk meg az RNS interferenciát kiváltó transzgént, majd a 24 óra alatt történő génexpresszió változásokat 12/ 12 órás fény/ sötét ciklusban tartott 2 hetes legyekben vizsgáltuk, 4 órás mintavételekkel RT-qPCR segítségével. A *dCBP* csendesítésének következtében a cirkadián ritmus szabályozásában létfontosságú szerepet játszó gének expressziójában jelentős zavarok lépnek fel, melyek nagyban hasonlítanak a HD modellben tapasztalt génexpressziós változásokhoz. A *period* (56/ A. ábra) és *timeless* (56/ B. ábra) „core” feedback loop génjeinek amplitúdója szignifikánsan alacsonyabb, mely ZT12 és ZT16 időpontban mutat szignifikáns csökkenést a kontrollhoz képest. Továbbá a *dCBP* RNS interferenciás legyekben mindkét gén esetén szignifikáns időbeli eltolódás is megfigyelhető az akrofázis tekintetében (56/ A-B. ábra). A központi szabályozó *dClock* gén esetén rövidül az akrofázis, valamint ZT4 és ZT20

időpontokban a kontrollhoz képest szignifikánsan alacsonyabb expressziós szint mérhető, azonban ez összességében nem eredményez szignifikáns amplitúdóbeli különbséget (56/ C. ábra). A másodlagos szabályozó feedback loop génjei közül a *vrille* expressziójában szintén szignifikáns amplitúdóbeli csökkenés figyelhető meg, mely ZT8, ZT12 és ZT16 időpontban mutat szignifikáns csökkenést a kontrollhoz képest (56/ D. ábra).



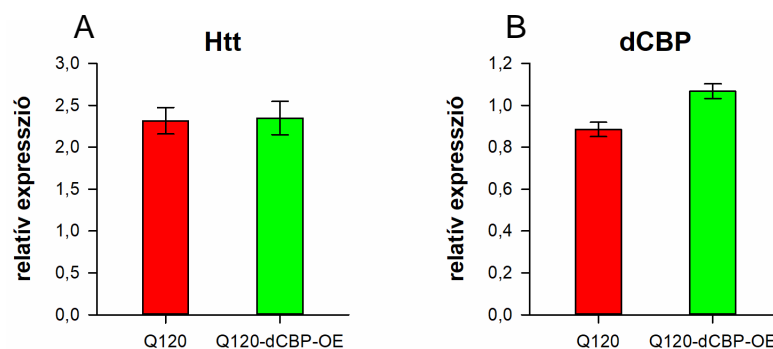
56. ábra: *dCBP* RNS interferenciás legyek cirkadián génjeinek expressziós mintázata.

A: *period*, B: *timeless*, C: *dClock*, D: *vrille*; a diagramok a mért expressziós értékek átlagát és a standard error-t ábrázolják, statisztikai analízisként TWA tesztet végeztünk, táblázatban a görbék alapján meghatározott amplitúdó és akrofázis értékek átlaga és a standard error látható, statisztikai analízisként MWU tesztet végeztünk (ns: $p > 0,05$; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

Összességében tehát a *dCBP* csendesítése és a mutáns *HttQ120* transzgén expressziójának hatására is hasonló cirkadián ritmus defektusok jelentkeznek, illetve a cirkadián szabályozó gének ciklikus expressziós mintázata is hasonló zavart szenved, mely alátámasztja feltételezésünket, miszerint a Huntington-kór esetén is megfigyelhető cirkadián ritmus defektust a hiszton acetiltranszferáz aktivitással is rendelkező, transzkripció koaktivátorként funkcionáló CBP hiánya idézheti elő.

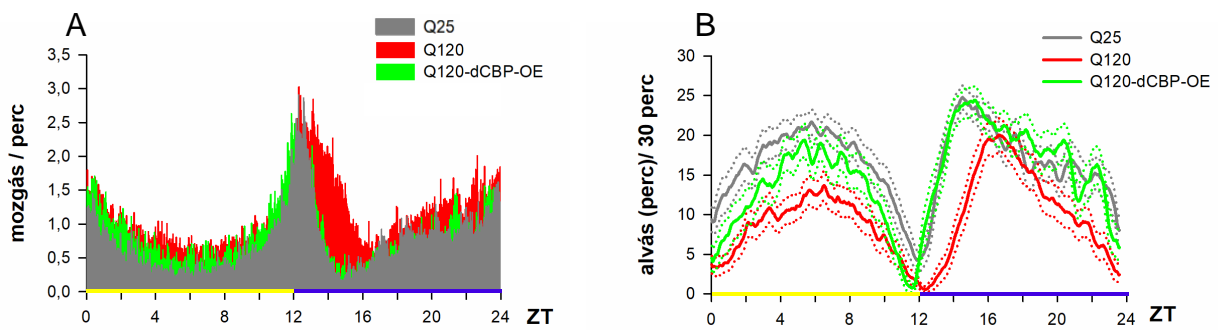
4.2.4. A *dCBP* overexpresszió hatása a HD legyek cirkadián ritmus zavarára

Annak érdekében, hogy alátámasszuk hipotézisünket, mely szerint modellünkben a mutáns *HttQ120* transzgén expressziójának hatására fellépő cirkadián ritmus defektust a CBP hiánya idézheti elő, megvizsgáltuk, hogy HD legyekben a *dCBP* overexpressziója képes-e menekíteni a cirkadián ritmus zavarokat. Ehhez az endogén *dCBP* gént hajtottuk meg egy UAS szekvenciát tartalmazó EP elem segítségével, mely a gén 5' UTR régiójába inszertálódott. Mivel a *dCBP* gén az X kromoszómán helyezkedik el az eddigi aktivitás mérésekkel ellentétben nem tudtuk használni az *elav-GAL4*; *tub-GAL80^{ts}* drivert, ezért a *dCBP* overexpressziójának hatását a génextpresszió mérések során is használt pacemaker neuron specifikus *perGAL4* driverrel 25 °C-on hajtva vizsgáltuk. Első lépésként, hogy megbizonyosodjunk a megfelelő *HttQ120* génextpresszióról és a *dCBP* overexpressziójáról RT-qPCR segítségével megmértük a *perGAL4* driver által hajtott transzgének expresszióját. A *HttQ120* expressziójában nem figyelhető meg csökkenés annak ellenére, hogy a *HttQ120* és a *dCBP* hajtása is a GAL4-UAS rendszer által történik, tehát a kísérlet során megfigyelhető változások biztosan nem az alacsonyabb szintű *HttQ120* expresszióval járó gyengébb fenotípusnak köszönhetőek (57/ A. ábra). A *dCBP* expressziójának mérése során nem állt módunkban csak azok által a sejtcsoportok által termelt *dCBP* mRNS-t vizsgálni, amelyekben a *perGAL4* driver a *dCBP* túlermelését indukálta, ugyanis ellentétben a *HttQ120* expressziójával, ebben az esetben nem transzgénről van szó, hanem az endogén génbe inszertálódott UAS szekvenciát hordozó P-elem hatására indukálódik az overexpresszió. Továbbá csak a pacemaker neuronokban hajtottuk meg a géneket, az RT-qPCR reakcióhoz pedig fejből állítottuk elő a mintákat, így arányaiban kevés sejtben történt *dCBP* overexpresszió, melynek mértéke összességében csak enyhe génextpresszióbeli emelkedést eredményezett (57/ B. ábra).



57. ábra: *HttQ120* és *dCBP* génextpresszió validálása. A diagramok a *tubulin* háztartási génre normalizált expressziós értékek átlagát és a standard error-t ábrázolják.

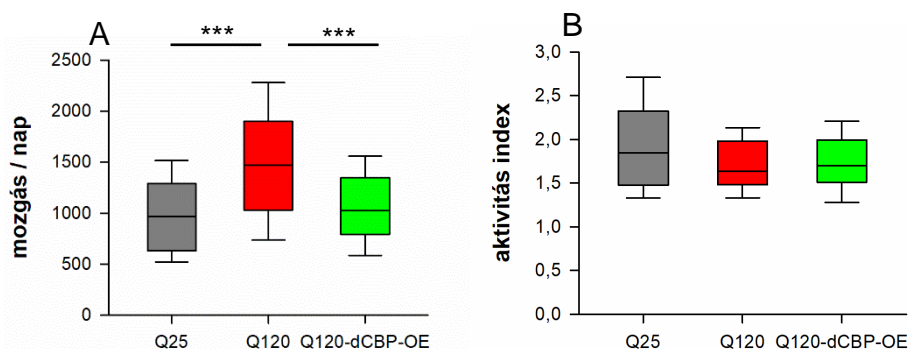
A 12/12 órás fény/sötét ciklusban tartott 2 hetes, *per-GAL4* driverrel 25 °C-on hajtott *dCBP* overexpressziós hím HD legyek cirkadián ritmusát ugyanazzal a módszerrel vizsgáltuk, mint korábban a *HttQ120* túltermelés és a *dCBP* csendesítés esetén is. A *HttQ25* transzgén expresszálo kontrollhoz viszonyítva az *elav-GAL4; tub-GAL80^{ts}* driver használatánál kapott eredményekhez hasonlóan jelentős különbséget figyeltünk meg a HD legyek napi ritmusában. A *HttQ120* transzgén expresszálo legyek magasabb napi aktivitást mutatnak (58/ A. ábra) és kevesebb időt töltenek alvással (58/ B. ábra) a kontrollhoz képest. A *dCBP* overexpressziója következtében azonban a HD legyeknél jelentkező cirkadián ritmus zavarok enyhülnek és az egészséges egyedekhez nagyon hasonló aktivitás- és alvásmintázat látható (58/ A-B. ábra).



58. ábra: *dCBP* overexpresszió hatása a HD legyek aktivitás- és alvásmintázatára.

A: percenkénti mozgások átlagos száma, B: 30 perc alatt alvással töltött idő; a diagram az átlagot és a konfidencia intervallumot ábrázolja; ZT0 a lámpa felkapcsolásának, ZT12 pedig a lámpa lekapcsolásának időpontjával egyezik meg.

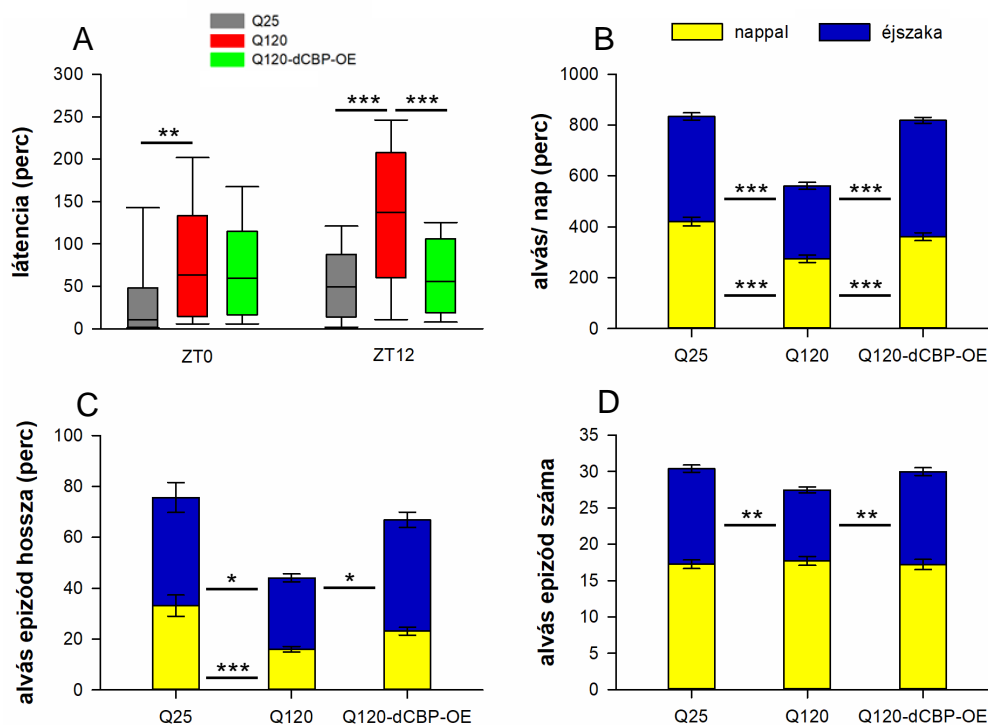
Az összesített napi mozgás alapján szintén látható, hogy a kontrollhoz képest a HD legyek szignifikáns hiperaktivitást mutatnak, melyet a *dCBP* overexpresszió menekít (59/ A. ábra).



59. ábra: *dCBP* overexpresszió hatása a HD legyek napi mozgására és aktivitás indexére.

A: összes mozgás 24 óra alatt, B: aktivitás az ébren töltött időre normalizálva; a diagramok a mediánt, illetve a 25 %-os és 75 %-os, valamint a 10 %-os és 90 %-os percentilis értékeket ábrázolják, statisztikai analízisként t-tesztet végeztünk (***: $p < 0,001$).

Ahogy az *elav-GAL4; tub-GAL80^{ts}* rendszer által meghajtott *HttQ120* transzgen expressziója esetén is tapasztaltuk, az aktivitás index azt mutatja, hogy a HD legyekben megfigyelt hiperaktivitás csak látszólagos, mely az ébren töltött idő növekedéséből fakadó többlet mozgás következménye (59/ B. ábra). A legyek alvási defektusának további vizsgálata kimutatta, hogy a *Drosophila*-ra jellemző reggeli és esti aktivitás csúcsokat követően az *elav-GAL4; tub-GAL80^{ts}* driver használatánál kapott eredményekhez hasonlóan a *per-GAL4* driver esetén is a HD legyek hosszabb látencia idővel rendelkeznek, azaz nehezebben térnek vissza nyugalmi állapotba az aktivitás csúcsok után (60/ A. ábra). Ezt a *dCBP* overexpressziója ZT0 időpontban nem befolyásolja, azonban ZT12 időpontban képes menekíteni, így a *dCBP*-t túltermelő HD legyek a kontrollhoz hasonló látencia idővel rendelkeznek (60/ A. ábra).



60. ábra: *dCBP* overexpresszió hatása a HD legyek látenciájára és alvási profiljára.

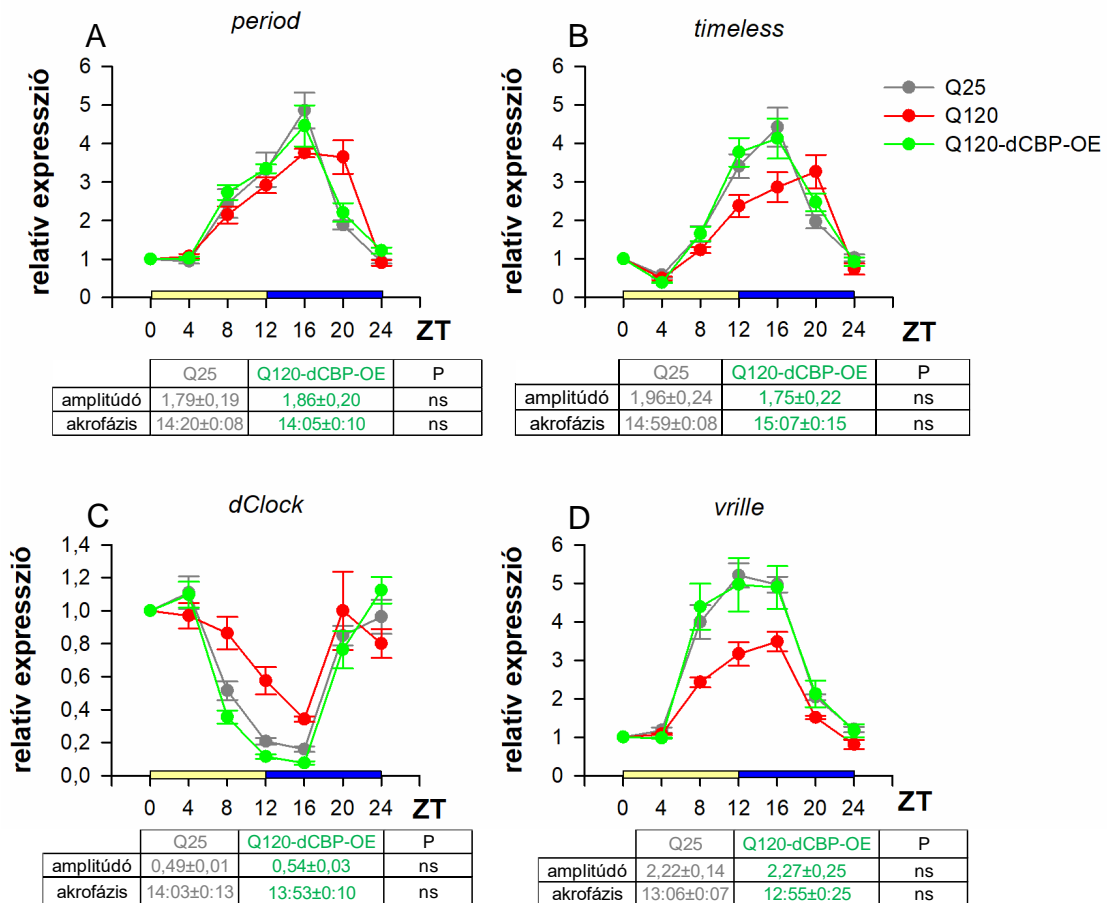
A: látencia idő; a diagram a mediánt, illetve a 25 %-os és 75 %-os, valamint a 10 %-os és 90 %-os percentilis értékeket ábrázolja, B: alvással töltött percek száma 24 óra alatt, C: alvási epizódok hossza, D: alvási epizódok száma; a diagramok a nappal és éjszaka mért átlag értékeket és a standard error-t ábrázolják, statisztikai analízisként t-tesztet végeztünk (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

Az alvási profil további részletes vizsgálata pedig azt mutatja, hogy az *elav-GAL4; tub-GAL80^{ts}* driver használatánál kapott eredményekhez hasonlóan a HD legyek nappal és éjszaka szignifikánsan kevesebb időt töltenek nyugalomban, ezt azonban a *dCBP* overexpressziója

menekíteni képes (60/ B. ábra). Továbbá a HD legyek alvással töltött ideje is fragmentáltabb a kontrollhoz képest, az *elav-GAL4; tub-GAL80^{ts}* driver használatánál kapott eredményekhez hasonlóan a HD legyek esetén szignifikánsan csökken a nappali és éjszakai alvási epizódok hossza, melyet a *dCBP* overexpresszió enyhe mértékben kompenzálni képes (60/ C. ábra). Érdekes módon a HD legyekben az alvási epizódok számának változása eltér az *elav-GAL4; tub-GAL80^{ts}* driverrel kapott eredményektől. Nappal egyáltalán nem figyelhető meg különbség az alvási epizódok számában, míg azok éjjel szignifikánsan csökkennek, azonban a *dCBP* overexpressziója ezt is kompenzálja (60/ D. ábra). Összességében tehát a *per-GAL4* driverrel is jelentkeznek cirkadián ritmus defektusok a HD legyeknél, melyeket a *dCBP* overexpresszió menekíteni képes.

Korábban kimutattuk, hogy a mutáns *HttQ120* expressziójának hatására megváltozik a *period*, *timeless*, *Clock* és *vriille* cirkadián szabályozó gének expressziós mintázata (51. ábra), ezért megvizsgáltuk, hogy a *dCBP* overexpressziója képes-e menekíteni ezeket a génexpresszióbeli zavarokat is. Ehhez *perGAL4* driverrel 25 °C-on a HD legyek pacemaker neuronjaiban hajtottuk meg az endogén *dCBP* gént, majd a 24 óra alatt történő génexpresszió változásokat 12/ 12 órás fény/ sötét ciklusban tartott 2 hetes legyekben vizsgáltuk, 4 órás mintavételekkel RT-qPCR segítségével. Az eredményeket a korábban mért *HttQ25* és *HttQ120* transzgeneket expresszáló legyeken végzett génexpresszió mérésekhez hasonlítottuk. A HD legyekben a *period* és *timeless* „core” feedback loop génjeinek amplitúdója alacsonyabb a kontrollhoz képest, továbbá az akrofázisukban szignifikáns időbeli eltolódás figyelhető meg. Ezeket a génexpresszióbeli zavarokat a *dCBP* overexpressziója teljes mértékben képes menekíteni és szinte az egészséges kontrollal megegyező expressziós szintek láthatók (61/ A-B. ábra). HD legyekben a központi szabályozó *dClock* gén expressziója szignifikáns amplitúdóbeli emelkedést, illetve akrofázisbeli eltolódást mutat a kontrollhoz képest, melyet a *dCBP* overexpresszió szintén menekít (61/ C. ábra). A másodlagos feedback loop génjei közül pedig a *vriille* expressziójában figyelhető meg szignifikáns amplitúdóbeli csökkenés, mely a *dCBP* overexpresszió következtében szintén helyreáll (61/ D. ábra).

Összességében tehát eredményeink arra utalnak, hogy a Huntington-kór *Drosophila* modelljében megfigyelhető cirkadián ritmus zavarokat a *dCBP* funkcióvesztése okozza, ugyanis a *dCBP* csendesítésének hatására a HD legyekéhez nagyon hasonló alvási defektus és génexpressziós zavarok figyelhetőek meg. Továbbá a HD legyekben az endogén *dCBP* overexpresszió következtében helyreáll a cirkadián ritmus és az azt szabályozó „clock” gének expressziója is. Feltételezhetően a *dCBP* overexpresszióval kompenzáljuk az aggregátumokba csapódzott dCBP fehérjék mennyiségét így megszüntetjük a funkcióvesztéses állapotot.



61. ábra: *dCBP* overexpresszió hatása a HD legyek cirkadián szabályozó génjeinek expressziós zavarára. A: *period*, B: *timeless*, C: *dClock*, D: *vrille*; a diagramok a mért expressziós értékek átlagát és a standard error-t ábrázolják, statisztikai analízisként TWA tesztet végeztünk, táblázatban a görbék alapján meghatározott amplitúdó és akrofázis értékek átlaga és a standard error látható, statisztikai analízisként MWU tesztet végeztünk (ns: $p > 0,05$).

5. DISZKUSSZIÓ

Az epigenetikai módosításoknak köszönhetően a kromatin szerkezet dinamikusan változó és szigorúan szabályozott létrejötté és felbomlása valósul meg, mely a megfelelő génextpresszió szabályozás kulcseleme⁷. Az egyre szélesebb körben elterjedő epigenetikai kutatásoknak köszönhetően mára már tudjuk, hogy számos betegség esetén figyelhető meg az epigenetikai módosítások zavarának következtében kialakuló transzkripcionális diszreguláció^{5,6}. Ilyen betegség például a Huntington-kór (HD) is, amely egy gyógyíthatatlan neurodegeneratív megbetegedés¹¹⁰. A betegség során megfigyelhető neurodegeneráció kialakulásának egyik fő oka a transzkripció zavara, mely elsősorban a CBP és Gcn5 hiszton acetiltransferázok mutáns Huntingtin (mHtt) általi gátlásához köthető^{70,122,125}. Ez alapján feltételezhető, hogy a hisztonok acetilációs állapot változása rendkívül nagy szereppel bír és potenciális terápiás célpont lehet a Huntington-kór kezelésében, ennek ellenére a betegség szempontjából jelentős acetilációs target pozíciók még nem ismertek. Ennek felderítése érdekében kutatásunk során a Huntington-kór *Drosophila* modelljében (HD legyek) H3.3A hiszton variáns transzgének poszt-transzlációs módosításokat mimikáló pontmutációinak analízisével vizsgáltuk a H3 hisztonon található potenciális acetilációs target pozíciókat. Kísérleteink során a hiszton gén klaszterben elhelyezkedő H3 módosítása helyett azért használtuk a H3.3A variánst, mert így csökkenteni tudtuk a fejlődési rendellenességek kialakulásának esélyét, valamint ismert, hogy a H3.3A az aktív géneken lecseréli a H3 hisztont²³.

A Huntington-kór modellezéséhez transzgenként a humán *Huntingtin* (*Htt*) gén patológiás hosszúságú poliglutamin (Q120) doménnel rendelkező első exonját¹⁴⁷ expresszáltattuk az idegrendszerben a kétkomponensű GAL4/ UAS expressziós rendszer segítségével¹⁴⁸. A Huntington-kór szempontjából fontos hiszton acetilációs target pozíciók azonosításához *in vitro* mutagenézissel állítottuk elő a mutáns *H3.3A* (*H3.3A-mut*) transzgeneket. A H3 hisztonon számos CBP és Gcn5 acetilációs target pozíció ismert^{51–55,67}, melyek közül kísérleteink során a 9-es, 14-es és 27-es lizinek módosításait teszteltük úgy, hogy a lizin aminosavak acetilált (glutaminra cserélve, K → Q), nem módosított (argininre cserélve, K → R) vagy metilált (metioninra cserélve, K → M) állapotát mimikáló transzgenek hatását vizsgáltuk HD legyekben. A *H3.3A-mut* transzgenek megfelelő expresszióját, a fehérjék sejtmagi lokalizációját és kromatin kötöttségét is igazoltuk. A H3 hiszton esetén több

független publikáció szerint is a H3K14 pozíció acetilációja jelentős mértékben befolyásolhatja a magi transzportot^{27–32}, azonban a kromatin kötöttségi vizsgálattal igazoltuk, hogy az általunk expresszált *H3.3A-mut* transzgenek esetén ez nem fordul elő. Ennek magyarázata, hogy a H3 és H4 hisztonok általában dimerként transzportálódnak a sejtmagba³⁰, továbbá a H3 és H4 hisztonok farki végén található NLS (nukleáris lokalizációs szignál) redundáns, így akár az egyik hiányában, vagy annak mutációja következtében sem sérül a nukleáris transzport³¹. Az idegrendszerben expresszálandó *H3.3A-mut* transzgenek egészséges egyedek életképességére gyakorolt hatásának vizsgálatával kimutattuk, hogy a H3.3A-K27M módosítás kivételével önmagában egyik transzgen sem okoz életképesség csökkenést, így a Huntington-kór modellben vizsgálható azok hatása. Mivel a *H3.3A-mut* transzgenek kifejeztetése szintén a GAL4/ UAS expressziós rendszer által történt, ezért RT-qPCR segítségével igazoltuk, hogy a mutáns *Huntingtin (mHtt)* és a *H3.3A-mut* transzgenek együttes expressziója nem befolyásolja egyik transzgen kifejeződését sem.

Miután meggyőződünk arról, hogy a H3.3A hiszton variáns mutáns analízissel kapcsolatos potenciális technikai problémák nem állnak fenn, a *H3.3A-mut* transzgenek expressziójának HD legyek fenotípusára gyakorolt hatásának vizsgálatába kezdtünk. Kutatásunk során az egyes fenotipikus vizsgálatokhoz az *mHtt* és a *H3.3A-mut* transzgeneket embrionális kortól, vagy csak adult kortól expresszáltattuk az idegrendszerben a kísérletek kivitelezhetőségének függvényében. A Huntington-kór *Drosophila* modelljében a betegség előrehaladtával jelentkező neurodegeneráció és aggregátum képződés, csökkent életképesség és élettartam, motoros képességek romlása¹¹¹, illetve a cirkadián ritmus zavara¹³¹ is vizsgálható. A HD legyekben embrionális kortól expresszált *H3.3A-mut* transzgenek vizsgálata esetén általánosságban gyenge életképességet és rövid élethosszt tapasztaltunk, mely csak a neurodegeneráció vizsgálatát tette lehetővé, további fenotipikus vizsgálatokra a betegség gyors progressziója miatt nem volt lehetőség. Ezért a motoros képességek és a napi aktivitás vizsgálatát csak az adult kortól expresszálandó egyedeken végeztük el. Továbbá adult korban már az endogén *His3.3A* deléciós háttéren expresszáltattuk az *mHtt* és a *H3.3A-mut* transzgeneket, ezzel csökkentve a vad típusú H3.3A dózist a sejtekben, melyről a kísérletek során kiderült, hogy önmagában annak overexpressziója is rontja az életképességet. Az alábbi táblázat a kísérleteink során elvégzett általános fenotipikus analízisek összesített eredményét mutatja be (5. táblázat).

	egész életen át expresszáva				adult kortól expresszáva		
	életképesség	élethossz	neurodegeneráció		élethossz	motoros képesség	napi aktivitás
K9Q	—	—	↓	K9Q	↓	—	—
K9R	—	—	↓	K9R	↓	—	—
K9M	↓	—	—	K9M	↑	—	—
K14Q	↑	↑	↑	K14Q	↑	↑	↑
K14R	↓	N/A	N/A	K14R	↓	↓	↓
K27Q	↓	—	↓	K27Q	↑	↑	—
K27R	↓	N/A	N/A	K27R	↑	—	—
K27M	N/A	N/A	N/A	K27M	—	—	—

5. táblázat: A H3.3A-mut transzgének hatása a Huntington-kór *Drosophila* modelljében vizsgált fenotípusokra. A táblázatban használt szimbólumok jelentése: nincs hatással a fenotípusra (—), szignifikáns fenotípusbeli javulás (↑), szignifikáns fenotípusbeli romlás (↓), nem vizsgálható (N/A).

Az összesített eredmények alapján jól látszik, hogy a H3.3A-K9 és H3.3A-K27 pozíciók módosításának hatására nem történik változás, illetve az egyes fenotipikus vizsgálatok eredményei ellentmondóak. A H3.3A-K9-es pozíció esetén az acetilált (K9Q) és a nem módosított (K9R) lizint mimikáló mutáció egyaránt rontja a neurodegeneráció mértékét és csak adult kortól expresszáva az élethosszt is, azonban a többi fenotípus vizsgálata során nem tapasztalható változás. A H3.3A-K9M metilációt mimikáló módosítás esetén egymásnak ellentmondó eredményeket kaptunk, embrionális kortól hajtva romlik az életképesség, csak adult kortól expresszáva azonban javítja az élethosszt, míg a többi fenotípusra nincs hatással. A H3.3A-K27-es pozíció esetén hasonló volt megfigyelhető, embrionális kortól hajtva a K27Q és K27R módosítás is rontja az életképességet, illetve a neurodegenerációt, míg adult kortól hajtva javítja, vagy nem befolyásolja a vizsgált fenotípusokat. A H3.3A-K27M módosítás hatását csak adult kortól expresszáva tudtuk vizsgálni, azonban az semmilyen hatással nem bír a Huntington-kór vizsgált fenotípusaira. A H3.3A-K14-es pozíció esetén azonban minden egyes vizsgált fenotípusnál egybehangzóan ugyanazt az eredményt kaptuk, az acetilált lizint mimikáló módosítás (K14Q) minden esetben javítja a Huntington-kór tüneteit, míg a nem módosított lizint mimikáló módosítás (K14R) rontja azokat. Ezek alapján feltételezhető, hogy a H3.3A-K14-es pozíció acetiláltsági állapota fontos szerepet játszhat a Huntington-kór progressziója során, melyet a H3K14 specifikus hiszton acetiltransferáz (HAT) és hiszton deacetiláz (HDAC) enzimek funkcióvesztésének hatásával igazoltunk.

A Huntington-kór pathogenezisével kapcsolatba hozható hiszton acetiltransferázok a CBP és a Gcn5^{70,122}, melyek felelősek a H3K14 lizin acetilációjáért^{52,67}. Mivel a CBP számos egyéb acetilációs targettel is rendelkezik⁵¹⁻⁵⁵, a validáláshoz a *Gcn5* funkcióvesztését vizsgáltuk, mely a H3K14 lizin fő acetiltransferáz enzime⁶⁷. A Sirt1 hiszton deacetiláz targetjei között megtalálhatóak hiszton és nem hiszton-fehérjék is, azonban elsősorban egyéb lizin pozíciók mellett a H3K14 acetilációját is katalizálja⁸³⁻⁸⁵, ezért a *Sirt1* funkcióvesztésének hatásait is vizsgáltuk a H3.3A-K14 módosításokat hordozó HD legyekben. Kísérleteinkben a *Gcn5* és *Sirt1* gének heterozigóta funkcióvesztéses mutációjának életképességre és élettartamra, valamint neurodegenerációra gyakorolt hatását vizsgáltuk. Korábbi tanulmányok alapján tudjuk, hogy a *Gcn5* gén funkcióvesztése tovább súlyosbítja a Huntington-kór tüneteit⁶⁹, míg a *Sirt1* gátlása menekíti a beteg fenotípusokat⁸⁸, melyet az általunk használt Huntington-kór modellben is sikerült kimutatni. A H3.3A-K14 módosítások esetén lizin hiányában nem változtatható az acetilációs állapot, ezért amennyiben a K14 lizin valóban kiemelt jelentőséggel bír a Huntington-kór pathogenezise szempontjából, nem várható fenotípusbeli változás a *Gcn5* és *Sirt1* funkcióvesztésének következtében az *mHtt* és a *H3.3A-mut* transzgeneket expresszáló legyekben. A H3.3A-K14Q esetén a lizin glutaminra történő módosítása következtében egy állandó acetilációs állapotot mimikálunk, így javítva a Huntington-kór tüneteit. Ezt a fenotípusbeli javulást a *Gcn5* hiszton acetiltransferáz hiánya nem befolyásolja, a *Sirt1* hiszton deacetiláz hiánya pedig csak enyhe mértékben képes javítani. Ez arra utal, hogy a *Gcn5* hiánya a H3K14 lizin acetilációs szintjének változása által gyakorol hatást a Huntington-kór pathogenezisére, a *Sirt1* viszont a H3K14-es lizin deacetilációján kívül más célpontok deacetilációjában is szerepet játszhat a betegség pathogenezise során. A *Gcn5* HAT és *Sirt1* HDAC enzimek funkcióvesztésének vizsgálata alapján igazolódott feltevésünk, miszerint részben a H3K14-es lizin acetilációs állapotának befolyásolásán keresztül érvényesül a Huntington-kór pathogenezisében szerepet játszó HAT és HDAC enzimek hatása. Így a továbbiakban szeretnénk volna felderíteni, hogy az acetilált lizint mimikáló módosítás milyen molekuláris változásokat idéz elő, amely képes enyhíteni a betegség tüneteit.

Mivel a Huntington-kór manifesztációja során transzkripcionális diszreguláció figyelhető meg¹²² transzkriptóm analízissel kívántuk vizsgálni a H3.3A-K14módosítások hatását. Azonban a transzkriptomikai vizsgálat eredményei alapján nem találtunk magyarázatot a H3.3A-K14 módosítások Huntington-kór pathogenezisére kifejtett hatására.

Az egészséges legyekhez képest összességében nagyságrendileg hasonló számú gén (318-546 db) expressziója változik a HD legyekben és a *H3.3A-mut* transzgéneket expresszáló HD legyekben is. Ezek molekuláris funkciójukat tekintve dúsulást mutatnak az UPR (unfolded protein response) válaszban szerepet játszó hősokk fehérjék (Hsp), illetve a nukleotid kötő fehérjéket kódoló gének tekintetében. Emellett érdemes kiemelni még a katalitikus aktivitással rendelkező fehérjék csoportján belül a C-H kötések kialakításáért felelős ligáz aktivitású enzimek dúsulását is. A változást mutató gének között nagymértékű átfedés (43-76 %) figyelhető meg, azonban a H3.3A-K14Q és H3.3A-K14R módosítások hatására nem figyelhető meg jelentős mértékű génexpresszió változás a vad típusú *H3.3A* transzgént expresszáló HD kontrollhoz képest. A génexpresszió változás irányultságának tekintetében az egészséges legyekhez képest változást mutató gének közel 90 %-a downregulálódik mind a HD legyekben, mind a *H3.3A* és a *H3.3A-mut* transzgéneket expresszáló HD legyekben. Ez tehát arra utal, hogy az általunk használt *Drosophila* HD modellben a transzkripcionális diszreguláció nagymértékű génexpresszió csökkenés formájában valósul meg, mely egybevág korábbi microarray vizsgálatok eredményeivel^{123,124}. Érdemes megjegyezni azonban, hogy HD legyekben a nagymértékű génexpresszióbeli csökkenés ellenére a *Hsp23*, *Hsp26*, *Hsp27*, *Hsp68* és *Hsp83* gének expressziója upregulálódik az egészséges legyekhez viszonyítva. Ez az upreguláció megfigyelhető az *mHtt*, *mHtt – H3.3A*, illetve *mHtt – H3.3A-K14Q* transzgéneket expresszáló egyedeknél, azonban a H3.3A-K14R módosítás hatására csak a *Hsp23* expressziója mutat emelkedett szintet. Ez nem teljesen meglepő, hiszen az *mHtt* fehérjék által képződő aggregátumok kialakulásának következtében stresszválasz indul be a sejtekben, mely a Hsp fehérjék expresszióját indukálja¹⁶⁷, továbbá számos hősokk fehérjéről kimutatták, hogy erős kolokalizációt mutat a poliglutamin aggregátumokkal¹⁶⁸. A kísérleteink során kontrollként használt *mHtt – H3.3A* transzgéneket együttesen expresszáló legyekhez viszonyítva az acetilációt mimikáló H3.3A-K14Q módosítás hatására enyhén alacsonyabb a *Hsp* gének expressziós szintje, bár ez a változás nem szignifikáns. Ezzel szemben a nem módosítható lizint mimikáló H3.3A-K14R mutáció hatására a *Hsp23* gén kivételével már jelentős mértékben alacsonyabb az expressziójuk. Összességében azonban a transzkriptóm analízis eredményei alapján úgy tűnik, hogy HD legyekben a H3.3A-K14 pozíció módosításainak hatására nem következik be jelentős mértékű génexpresszió változás, mely arra utal, hogy a HD legyekben a H3.3A-K14Q acetilált lizint mimikáló módosítás következtében megfigyelhető fenotípusbeli javulás nem egyszerűen a transzkripció zavarának helyreállításával valósul meg.

Érdeemes megjegyezni azonban, hogy az RNS-szekvenáláson alapuló transzkriptomikai vizsgálat egyik hátránya, hogy csak egyedi gének transzkriptum szintjének növekedését vagy csökkenést tudjuk kimutatni, általános transzkripcióbeli csökkenést vagy növekedést nem. Ezért megvizsgáltuk, hogy a H3.3A-K14 pozíció módosításainak hatására HD legyekben bekövetkezik-e változás a DNS és a totál RNS mennyiségében, illetve a totál RNS/ DNS és a polyA mRNS/ totál RNS arányában. Ismert tény, hogy az öregedés során csökken az RNS mennyisége a sejtekben ¹⁶², melyet az általunk vizsgált egészséges egyedekben is kimutattunk. Eredményeink továbbá azt mutatják, hogy az öregedés során HD legyekben a neurodegeneráció következtében csökken a DNS és totál RNS mennyisége is, míg a totál RNS/ DNS arány nem változik. Azonban a betegség progressziója során nő a polyA mRNS/ totál RNS mennyiségének aránya, mely feltételezhetően a transzkripcionális diszreguláció következménye. Érdekes módon a H3.3A-K14 pozíció módosításainak hatására nem figyelhető meg különbség a DNS és a totál RNS mennyiségében, tehát a HD legyekben korábban megfigyelt fenotípusbeli javulás és romlás nem a sejtpusztulás mértékében bekövetkező változás eredménye. A betegség progressziójával azonban a H3.3A-K14Q módosítás hatására a totál RNS/ DNS arány megnő, míg a H3.3A-K14R módosítás következtében csökken. A polyA mRNS/ totál RNS vizsgálat eredménye azonban azt mutatja, hogy a H3.3A-K14Q és H3.3A-K14R módosítások hatására is jóval alacsonyabb a polyA mRNS aránya a HD legyekben, tehát a génexpresszió mindkét esetben csökken. Mivel a sejtben megtalálható RNS féleségek döntő többségét (~90 %) a riboszómális RNS-ek (rRNS) teszik ki ¹⁶⁹, a totál RNS/ DNS arányban bekövetkező változások nagy valószínűséggel az rRNS mennyiségének változását jelentik. Tehát az acetilált lizint mimikáló H3.3A-K14Q módosítás esetén annak ellenére, hogy a polyA mRNS aránya az összes RNS-hez viszonyítva alacsonyabb, azaz csökken az RNS polimeráz II általi transzkripció mértéke, a feltételezhetően a nagy mennyiségben expresszálódó rRNS-ek emelkedett fehérjeszintézisre utalnak, ezzel szemben a H3.3A-K14R módosítás esetén nemcsak a polyA mRNS, hanem a fehérjeszintézis mértéke is lecsökken.

Összességében tehát a Huntington-kór *Drosophila* modelljében kapott eredményeink arra utalnak, hogy a betegség pathogenezeise szempontjából a H3K14 acetiláltsági állapota kiemelt jelentőségű. Annak ellenére azonban, hogy a megfelelő hiszton acetiláció elengedhetetlen a zavartalan transzkripció érdekében ³³⁻³⁵, az acetilált lizint mimikáló H3.3A-K14Q módosítás hatására bekövetkező fenotípusbeli javulás nem egyszerűen a transzkripcionális diszreguláció helyreállításával valósul meg. Eredményeink alapján egy ettől eltérő folyamatról van szó, mely háttérének feltérképezése még nem teljes. A nukleinsav

mennyiségi analízis eredményeink és szakirodalmi adatok alapján elképzelhető, hogy a Huntington-kór során zavart szenvedő RNS turnover¹⁷⁰ mérséklésének köszönhető a fenotípusbeli javulás. Celluláris stressz hatására a transzláció iniciáció gátlása érdekében úgynevezett stressz granulomok alakulnak ki, melyekbe a túlélés szempontjából nem létfontosságú mRNS-ek gyűlnek össze, így a sejt az energiáit és erőforrásait homeosztázis helyreállítására tudja fordítani¹⁷¹. Neurodegeneratív betegségek esetén is megfigyelhető a stressz granulomok kialakulása, azonban a betegség során jelentkező, hosszantartó stressz állapot fennmaradása miatt, a stressz granulomok felbomlásának hiányában az mRNS homeosztázis helyreállása is zavart szenved, ezáltal pedig a nem megfelelő fehérje homeosztázison keresztül hozzájárulhat a downstream toxicitáshoz¹⁷⁰. A HD legyekben megfigyelhető mRNS szint növekedést tehát magyarázhatja a stressz granulomokban történő egyre nagyobb mértékű felhalmozódásuk és csapdázódásuk, melyet az acetilációt mimikáló H3.3A-K14Q módosítás mérsékelni képes. Így elképzelhető, hogy a granulomokból felszabaduló mRNS-ek hatására mérséklődik a fehérje homeosztázis zavara (a kontrollhoz képest emelkedett fehérjeszintézisre utaló totál RNS arány növekedése következtében) és ezáltal a sejt homeosztázisa zavara is, mely fenotípus javulást eredményez. A H3.3A-K14R módosítás következtében pedig az acetiláció teljes hiánya miatt elképzelhető, hogy általánosságban zártabb a kromatin szerkezet, így sokkal kevesebb mRNS képződik. Ezek a celluláris stressz következtében ugyanúgy felhalmozódnak és a stressz granulomokba csapdázódnak, így nincs szükség nagy mennyiségű rRNS szintézisére. Feltételezhetően ezért csökken jelentős mértékben a totál RNS aránya, így megfelelő transzláció hiányában, a fehérje homeosztázis zavarának hatására romlik a HD legyek fenotípusa. Ezen hipotézisünk igazolásához természetesen a jövőben további kísérletek szükségesek.

Kutatásunk másik irányvonala a Huntington-kór során fellépő cirkadián ritmus zavar fenotipikus vizsgálata és a cirkadián szabályozás molekuláris hátterének feltérképezése, melyet szintén a Huntington-kór *Drosophila* modelljében¹⁴⁷ végeztünk. A betegeknél általános zavar figyelhető meg a nyugalmi és aktív periódusokban, felborul a nappal-éjjeli ritmus, ami csak még inkább súlyosbítja és felgyorsítja a betegség progresszióját^{132-135,138}, ezért rendkívül fontos megérteni az alvászavarok hátterében álló molekuláris folyamatokat. A cirkadián ritmus szabályozásában részt vesz a hiszton acetiltranszferáz aktivitással is rendelkező transzkripció koaktivátor, a CBP fehérje¹⁰⁶, továbbá a Huntington-kór során a CBP az aggregátumokba csapdázódva gátlás alá kerül¹²⁵, ezért feltételezhető, hogy a betegség során fellépő cirkadián ritmus zavar hátterében a CBP nem megfelelő működése áll.

Elsőként összehasonlítottuk a normál hosszúságú (Q25) illetve patológiás hosszúságú (Q120) poliglutamin domént hordozó *mHtt* transzgént¹⁴⁷ expresszáló legyek napi aktivitását. A *Drosophila*-ra két aktivitás csúccsal rendelkező alvásmintázat jellemző, az ezek közti időben a legyek kevésbé aktívak, éjjel pedig szinte teljesen inaktívak¹⁵⁹, mely az általunk vizsgált kontroll legyeknél is megfigyelhető. Ehhez képest a HD legyek alvási mintázata szembetűnő zavarokat szenved. A cirkadián ritmus vizsgálataink eredményei alapján a HD legyek magasabb napi aktivitást mutatnak és ezzel párhuzamosan kevesebb időt töltenek alvással, továbbá a nyugalmi állapot elérése hosszabb időt vesz igénybe. Emellett az alvással töltött idejük is fragmentáltabb, nő az alvási epizódok száma, hosszuk azonban csökken, mely eredmények teljes mértékben egybevágóak a Huntington-kóros páciensek beszámolóival^{132–135}, illetve a korábban bárány¹⁶⁴, egér¹⁶⁵ és *Drosophila*¹⁶⁶ Huntington-kór modellben végzett részleges kísérletek eredményeivel.

Mutáns analízissel korábban kimutatták, hogy a cirkadián szabályozásban résztvevő gének kiütésének következtében felborul a cirkadián ritmus^{96,101}, mely alapján feltételezhető, hogy a HD legyekben megfigyelhető napi ritmusbeli zavarokért a „clock” gének szabályozásában bekövetkező defektus felelős. Tehát a Huntington-kór során fellépő cirkadián ritmus defektus molekuláris hátterének vizsgálata érdekében meghatároztuk a kettős feedback szabályozásban szerepet játszó *per*, *tim*, *vri*, *Pdp1*, *cwo* és *dClk* gének expressziós szint változását. A cirkadián oszcillációt a dCLK/ dCYC transzkripciós faktorok indukálják, melyek feladata az úgynevezett „clock” gének (*per*, *tim*, *vri*, *Pdp1*, *cwo*) aktiválása^{95–98}. A központi, úgynevezett „core” feedback loop részeként a PER/ TIM komplex gátolja a dCLK/ dCYC aktivitását így gátolva saját transzkripciójukat is⁹⁹. A másodlagos feedback loop részeként a CWO gátolja a dCLK/ dCYC aktivitását⁹⁸, míg a VRI gátolja a PDP1 pedig aktiválja magának a *dClk* génnek az expresszióját⁹⁷. Ennek a kettős feedback szabályozásnak az eredményeként a *per*, *tim*, *vri*, *Pdp1* és *cwo* gének expressziós szintje hajnalban alacsony és alkonyatkor tetőzik, míg a *dClk* expressziója ezzel ellenkezőleg reggel mutat magas, este pedig alacsony expressziót^{95–102}. A génexpresszió mérés során ugyanezt a mintázatot figyeltük meg a kontroll legyek esetén, azonban HD legyekben az egyes gének esetén jelentős expressziós zavarok jelentkeznek. Eredményeink alapján a HD legyekben a *per* és *tim* „core” feedback loop génjeinek amplitúdója (génexpressziós csúcs átlagtól való eltérése) alacsonyabb, továbbá az akrofázisukban (génexpressziós csúcs elérésének a görbe alapján becsült fázisa) is időbeli eltolódás figyelhető meg. A központi szabályozó *dClock* gén expressziója szignifikáns amplitúdóbeli emelkedést, illetve akrofázisbeli eltolódást mutat. A másodlagos feedback loop

génjei közül pedig egyedül a *vriille* expressziójában figyelhető meg szignifikáns amplitúdóbeli csökkenés, míg a *Pdp1* és *cwo* gének nem mutatnak jelentős változást. A *Drosophila* modellünkben megfigyelt eltérésekhez hasonló génexpresszióbeli változásokat figyelték meg korábban a Huntington-kór egér modelljében is a *per* és a *Bmal1(Clock)* gének esetén ¹³⁹, azonban a többi cirkadián ritmus szabályozó gén expresszióját nem vizsgálták.

A HD legyek cirkadián ritmus zavarának fenotipikus és molekuláris szintű jellemzése után kíváncsiak voltunk arra, hogy a megfigyelt defektusok háttérében hipotézisünknek megfelelően valóban a CBP nem megfelelő működése áll-e. Ehhez elsőként a *dCBP* gén RNS interferencia általi csendesítésének hatását vizsgáltuk. Az RNS interferencia hatékonyságának validálása során kiderült, hogy a *dCBP* expressziós szintje ~50 %-ra esett vissza, tehát ebben az esetben csak részleges funkcióvesztésről beszélhetünk. Eredményeink alapján a *dCBP* csendesítés következtében megfigyelhető cirkadián ritmus zavar nagyon hasonlít a HD legyeknél tapasztalt napi ritmusbeli változásokhoz. Ugyanúgy magasabb napi aktivitás és ezzel párhuzamosan kevesebb alvással töltött idő figyelhető meg, továbbá a nyugalmi állapot elérése is hosszabb ideig tart, valamint az alvással töltött idő is hasonlóképp fragmentáltabb. A *dCBP* csendesítés következtében a cirkadián ritmus szabályozásában létfontosságú szerepet játszó gének expressziójában is jelentős zavarok lépnek fel, melyek nagyban hasonlítanak a HD modellben tapasztalt génexpressziós változásokhoz, sőt a *per* és *tim* gének esetén még súlyosabbnak is bizonyulnak.

Összességében a *dCBP* csendesítés következtében kapott eredményeink alátámasztják feltételezésünket, miszerint a Huntington-kór esetén megfigyelhető cirkadián ritmus defektust a mutáns Huntingtin aggregátumokba csapódó ¹²⁵ hiszton acetiltranszferáz aktivitással is rendelkező, transzkripciós koaktivátorként funkcionáló CBP hiánya idézheti elő. Ennek további bizonyítására megvizsgáltuk, hogy HD legyekben a *dCBP* gén overexpressziója képes-e menekíteni a cirkadián ritmus zavarokat. Mivel a *dCBP* overexpressziója szintén a GAL4/ UAS expressziós rendszer által történt, elsőként igazoltuk, hogy az *mHtt* és a *dCBP* együttes expressziója nem befolyásolja egyik kifejeződését sem. Eredményeink alapján a *dCBP* overexpressziója következtében a HD legyeknél jelentkező cirkadián ritmus zavarok enyhülnek és az egészséges egyedekhez nagyon hasonló aktivitás- és alvásmintázat látható. Továbbá a génexpresszió mérés eredményei alapján jól látszik, hogy a *dCBP* overexpressziója következtében a HD legyeknél teljes mértékben helyreáll a cirkadián szabályozó gének expressziós mintázata is. Feltételezhetően HD legyekben a *dCBP* overexpresszióval

kompenzáljuk az aggregátumokba csapdázódott dCBP fehérjék mennyiségét így megszüntetjük a funkcióvesztéses állapotot. Egyelőre a CBP cirkadián ritmus szabályozásával kapcsolatban annyi információval rendelkezünk csak, hogy a CBP a központi cirkadián szabályozó CLOCK fehérjével direkt kölcsönhatásba lép^{57,58}, és feltételezhetően a „clock” gének E-box doménjének acetilációjáért felelős¹⁰⁶, azonban egyelőre nincs szakirodalmi adat arról, hogy ez a kölcsönhatás pontosan milyen folyamatokat szabályoz és hogyan befolyásolja a „clock” gének, illetve az output gének expresszióját és ezáltal az állatok napi viselkedését. Ezért folyamatban van egy tagelt *dCBP* transzgént hordozó törzs előállítás is, mellyel követni tudjuk a dCBP kromatin kötöttségének, illetve interakciós partnereinek változását a HD legyekben, így pontosabb információt kaphatunk a CBP cirkadián ritmus szabályozásban betöltött szerepéről.

Eredményeink alapján feltételezhető, hogy HD legyekben a dCBP csapdázódása következtében a cirkadián ritmus szabályozó gének ciklikus expressziós mintázata zavart szenved, azonban nem szűnik meg teljesen a ciklizálás, ami arra utal, hogy a pacemaker neuronok nem pusztulnak el csak funkciójuk sérül. Változás figyelhető meg a „core” és a másodlagos feedback loop génei esetén is, ami egy összetettebb szabályozásbeli zavarra utal. A dCLK negatív regulátoraként funkcionáló VRILLE fehérje⁹⁷ ZT8-16 között mért alacsonyabb mRNS szintje hozzájárulhat a megemelkedett *dCLK* expresszióhoz. A *per* és *tim* gének kitolódott expressziós csúcsa pedig a feltételezhetően hosszabb ideig jelen lévő PER és TIM fehérjék által mediált dCLK gátlás⁹⁹ kitolódásához vezet. A dCLK kitolódott inaktivitásának következtében a target gének expressziója csökken, ami magyarázza az alacsonyabb *per*, *tim* és *vrille* expressziót ZT8-16 között. Továbbá az aktív dCLK későbbi felhalmozódása pedig magyarázatot adhat a *per* és *tim* gének akrofázisában megfigyelhető eltolódásra. Ezen hipotéziseink kísérletes igazolására azonban fehérjeszintű vizsgálatok szükségesek, melyekhez megkezdtük az előkészületeket. Fontos továbbá megemlíteni, hogy az általunk vizsgált Huntington-kór modell az első, amelyben a betegnél megfigyelt összes eddig leírt fenotípus jelentkezik, és a cirkadián szabályozó gének expressziós mintázatát sem vizsgálták más modellben ilyen széles körben. Éppen ezért a további kutatások során megbízható modellként használható és a cirkadián zavarok enyhítését szolgáló potenciális terápiás szerek hatásának vizsgálatára is alkalmas lehet.

Kutatásunk során az mHtt által kötött és/vagy aggregátumokba csapdázódó hiszton acetiltransferázok^{70,125} által befolyásolt jelenségek vizsgálatára fókuszáltunk a Huntington-kór *Drosophila* modelljében, melyek hozzájárulnak a betegség pathogeneziséhez.

- A HAT enzimek a hisztonok megfelelő acetilációs állapotának kialakításán keresztül szabályozzák a transzkripciót⁵¹⁻⁵⁴, melyről tudjuk, hogy a Huntington-kór során diszregulációt szenved¹²². Hiszton acetilációs target pozíciók mutáns analízisével azonosítottuk a H3K14 pozíciót, melynek acetilált állapotát mimikálva menekíthető a Huntington-kór számos tünete.
- A CBP részt vesz a cirkadián ritmus szabályozásában^{57,58,106}, melyről tudjuk, hogy a Huntington-kór progressziója során zavart szenved¹³³⁻¹³⁶. A CBP funkcióvesztéses vizsgálatával ugyanolyan cirkadián ritmusbeli zavarokat figyeltünk meg, mint a Huntington-kór modellezése esetén, illetve a CBP overexpressziójával menekítettük a cirkadián ritmus zavarokat a Huntington-kór modellben.

Számos tanulmány beszámolt már a hiszton acetiláció és a Huntington-kór kapcsolatáról, melyeket a dolgozatban bemutatott eredményeink tovább árnyalnak és remélhetőleg egy lépéssel közelebb visznek a Huntington-kór tüneteinek enyhítésében, illetve a betegség kialakulásának megelőzésében.

6. A DOKTORI ÉRTEKEZÉS ÖSSZEFOGLALÁSA

Kutatásunk során a Huntington-kór epigenetikai hátterét, illetve a betegség során fellépő cirkadián ritmus zavart vizsgáltuk. A Huntington-kór (HD) egy gyógyíthatatlan neurodegeneratív megbetegedés, melynek kialakulásáért a *Huntingtin* (*Htt*) génben található poliglutamin domént kódoló CAG ismétlődés abnormális expansziója felelős. A betegség jellemzői az akaratlan „choreiform” izommozgások, a kognitív képességek romlása, illetve a viselkedésbeli és pszichiátriai tünetek. A neurodegeneráció egyik fő oka a transzkripció zavara, mely elsősorban a CBP és Gcn5 hiszton acetiltransferázok (HAT) mutáns Huntingtin (mHtt) általi gátlásához köthető. Ezt a HAT-ok overexpressziója, illetve az acetil csoportot eltávolító hiszton deacetyláz (HDAC) enzimek gátlása menekíti. Ezek alapján a hisztonok acetilációs állapot változása terápiás célpont lehet, azonban a betegség szempontjából jelentős acetilációs target pozíciók nem ismertek. Ezért kutatásunk során *Drosophila melanogaster* modellben, a fejlődésbeli rendellenességek kiküszöbölése érdekében H3.3A hiszton variáns mutáns analízissel vizsgáltuk a H3 hiszton potenciális acetilációs target pozícióit. A betegség modellezéséhez a patológiás hosszúságú poliglutamin (Q120) doménnel rendelkező humán *Htt* gént expresszáztattuk az idegrendszerben. A Huntington-kór *Drosophila* modelljében (HD legyek) a betegség előrehaladtával jelentkező neurodegeneráció és aggregátum képződés, csökkent életképesség és élettartam, motoros képességek romlása, illetve a cirkadián ritmus zavara is vizsgálható. Kutatásunk során megvizsgáltuk, hogy a H3.3A variáns hisztonon a 9-es, 14-es és 27-es pozícióban található lizin aminosavak acetilált (glutaminra cserélve, K → Q), nem módosított (argininre cserélve, K → R) vagy metilált (metioninra cserélve, K → M) állapotának mimikálása hogyan hat a HD legyekre jellemző fenotípusokra. A H3.3A módosítások életképességre, élettartamra, neurodegenerációra, motoros képességre és napi aktivitására gyakorolt hatását vizsgáltuk. A 9-es és 27-es pozíciók módosítása nem befolyásolja a vizsgált fenotípusokat, azonban a H3.3A-K14-es pozíció esetén az acetilált lizint mimikáló módosítás (K14Q) javítja a Huntington-kór tüneteit (magnövekedett életképesség és élettartam, enyhébb neurodegeneráció, motoros képességek javulása, cirkadián ritmus zavar javulása), míg a nem módosított lizint mimikáló módosítás (K14R) rontja azokat, mely alapján feltételezhető, hogy a H3.3A-K14-es pozíció acetiláltsági állapota fontos szerepet játszhat a betegség progressziója során. Ezt a H3K14 specifikus Gcn5 HAT és Sirt1 HDAC enzimek funkcióvesztésének hatásával igazoltuk. A *Gcn5* funkcióvesztése tovább súlyosbítja, míg a *Sirt1* funkcióvesztése menekíti a Huntington-kór tüneteit. A 14-es lizin glutaminra történő módosítása következtében egy állandó acetilációs állapotot mimikálva javulnak

a betegség tünetei, melyet a Gcn5 hiánya nem befolyásol, a Sirt1 hiánya pedig csak enyhe mértékben képes javítani. Ahhoz, hogy megtudjuk, hogy az acetilált lizint mimikáló módosítás milyen molekuláris változásokat idéz elő, amelyek képesek enyhíteni a betegség tüneteit, transzkriptóm analízist végeztünk. A HD legyekben a K14Q és K14R módosítások hatására azonban nem figyelhető meg jelentős mértékű génexpresszió változás. A HD legyekben változást mutató gének molekuláris funkciójukat tekintve dúsulást mutatnak az UPR (unfolded protein response) válaszban szerepet játszó hősokk fehérjék (Hsp), a nukleotid kötő fehérjék, illetve a ligáz aktivitású enzimek tekintetében. Ezek közel 90 %-a downregulálódik, azonban érdekes módon HD legyekben egyes *Hsp* gének expressziója upregulálódik. Ezen a H3.3A-K14Q módosítás nem változtat, míg a H3.3A-K14R módosítás hatására szignifikánsan csökken az expressziójuk. Összességében a K14 pozíció módosításainak hatására nem következik be jelentős mértékű génexpresszió változás, mely arra utal, hogy HD legyekben az acetilált lizint mimikáló módosítás következtében megfigyelhető fenotípusbeli javulás nem egyszerűen a transzkripció zavarának helyreállításával valósul meg. Annak ellenére, hogy a transzkriptóm vizsgálat eredménye alapján bizonyos funkciót betöltő gének transzkripciója csökken a betegség progressziója során, a totál RNS/ DNS arány nem változik, azonban nő a polyA mRNS/ totál RNS mennyisége a sejtekben, mely feltételezhetően a hiszton acetiltransferázok funkcióvesztésének hatásra bekövetkező globális transzkripcionális diszreguláció következménye. A K14Q acetilált lizint mimikáló módosítás következtében nő a totál RNS szintézis mértéke, azonban csökken a polyA mRNS/ totál RNS arány, míg a K14R nem módosítható lizint mimikáló mutáció esetén mindkét arány jelentős mértékben csökken. Mivel a sejtben megtalálható RNS féleségek döntő többségét (~90 %) a riboszómális RNS-ek (rRNS) teszik ki, a totál RNS/ DNS arányban bekövetkező változások nagy valószínűséggel az rRNS mennyiségének változását jelentik. Tehát az acetilált lizint mimikáló módosítás esetén annak ellenére, hogy a polyA mRNS mennyisége, azaz az RNS polimeráz II általi transzkripció csökken, a feltételezhetően nagy mennyiségben expresszálódó rRNS-ek emelkedett fehérjeszintézisre utalnak, ezzel szemben a K14R módosítás esetén nemcsak a polyA mRNS, hanem a fehérjeszintézis mértéke is lecsökkenhet. A nukleinsav mennyiségi analízis eredményeink és szakirodalmi adatok alapján elképzelhető, hogy a K14Q módosítás hatására a Huntington-kór során zavart szenvedő RNS turnover mérséklésének köszönhető a fenotípusbeli javulás. Neurodegeneratív betegségek esetén a celluláris stressz hatására kialakuló stressz granulomokban összegyűlő mRNS-ek lebomlásának homeosztázisa zavart szenved, mely magyarázatot adhat a HD legyekben megfigyelhető mRNS szint növekedésére. Ezt az acetilációt mimikáló H3.3A-K14Q módosítás mérsékelni képes, mely arra utalhat,

hogy a stressz granulumból felszabaduló mRNS-ek hatására mérséklődik a sejt homeosztázisa (a kontrollhoz képest emelkedett fehérjeszintézisre utaló totál RNS arány növekedése következtében). A H3.3A-K14R módosítás következtében pedig az acetiláció teljes hiánya miatt elképzelhető, hogy általánosságban zártabb a kromatin szerkezet, így sokkal kevesebb mRNS képződik, mely a sejt homeosztázisának zavarán keresztül rontja a HD legyek fenotípusát. Ezen hipotézisünk igazolásához természetesen a jövőben további kísérletek szükségesek.

A Huntington-kór során jelentkező cirkadián ritmus zavar szintén összefüggésbe hozható a CBP hiszton acetiltranszferáz fehérjével, mely transzkripciós koaktivátorként is funkcionál. A cirkadián ritmus egy nagyjából 24 órás periódusonként ismétlődő negatív feedback visszacsatoláson alapuló ciklikus rendszer. Az oszcillációt *Drosophila*-ban a dCLK/ dCYC transzkripciós faktorok indukálják az úgynevezett „clock” gének (*per*, *tim*, *vri*, *Pdp1*, *cwo*) aktiválásán keresztül, melyek negatív feedback révén gátolják a dCLK/ dCYC transzkripciós faktorokat. A feedback szabályozás eredményeként a *per*, *tim*, *vri*, *Pdp1* és *cwo* gének expressziós szintje hajnalban alacsony és alkonyatkor tetőzik, míg a *dClk* expressziója ezzel ellenkezőleg reggel mutat magas, este pedig alacsony expressziót. A cirkadián ritmus szabályozásában továbbá részt vesz a CBP is, mely a dCLK/ dCYC heterodimerrel alakít ki kölcsönhatást. Mivel a Huntington-kór során a CBP az aggregátumokba csapódva gátlás alá kerül feltételezhető, hogy a betegség során fellépő cirkadián ritmus zavar hátterében is a CBP nem megfelelő működése áll. A betegeknek általános zavar figyelhető meg a nyugalmi és aktív periódusokban, felborul a nappal-éjjeli ritmus, ami súlyosbítja és felgyorsítja a betegség progresszióját, ezért rendkívül fontos megérteni az alvászavarok hátterében álló molekuláris folyamatokat. Az általunk használt Huntington-kór modellben is megfigyelhetőek a cirkadián ritmus zavarok. A HD legyek magasabb napi aktivitást mutatnak és ezzel párhuzamosan kevesebb időt töltenek alvással, továbbá a nyugalmi állapot elérése hosszabb időt vesz igénybe. Emellett az alvással töltött idejük is fragmentáltabb, nő az alvási epizódok száma, hosszuk azonban csökken. Jelentős változások figyelhetőek meg továbbá a *per*, *tim*, *vri* és *dClk* gének expressziós mintázatában, melyek feltételezhetően hozzájárulnak a cirkadián ritmus defektus kialakulásához. A *dCBP* gén csendesítésének hatására nagyon hasonló cirkadián ritmusbeli zavarok jelentkeznek, míg a *dCBP* overexpressziója teljes mértékben menekíteni képes a HD legyek alvászavarait és a cirkadián szabályozó gének expressziója is helyreáll. Eredményeink tehát arra utalnak, hogy a Huntington-kór *Drosophila* modelljében megfigyelhető cirkadián ritmus zavarokat ténylegesen a *dCBP* funkcióvesztése

okozza. Egyelőre a CBP cirkadián ritmus szabályozásával kapcsolatban nincs szakirodalmi adat arról, hogy a CLK/ CYC heterodimerrel való kölcsönhatása pontosan milyen folyamatokat szabályoz, illetve hogyan befolyásolja a „clock” gének expresszióját és ezáltal a napi ritmust. Ezért folyamatban van egy jelölt *dCBP* transzgént hordozó törzs előállítása, mellyel követni tudjuk a dCBP kromatin kötöttségének, illetve interakciós partnereinek változását a HD legyekben, így pontosabb információt kaphatunk a CBP cirkadián ritmus szabályozásban betöltött szerepéről.

Röviden összefoglalva kutatásunk során olyan, a Huntington kór pathogenezisével kapcsolatos jelenségeket vizsgáltunk, melyekben szerepet játszanak a mutáns Huntingtin által gátolt HAT enzimek. A HAT enzimek a hisztonok megfelelő acetilációs állapotának kialakításán keresztül szabályozzák a transzkripciót, mely a Huntington-kór során diszregulációt szenved. A CBP és a Gen5 acetilációs target pozícióinak mutáns analízisével azonosítottuk a H3K14 pozíciót, melynek acetilált állapotát mimikálva menekíthető a Huntington-kór számos tünete. Emellett a CBP részt vesz a cirkadián ritmus szabályozásában is, melyről kimutattuk, hogy mutáns Huntingtin hatására zavart szenved. A CBP funkcióvesztéses vizsgálatával ugyanolyan cirkadián ritmusbeli zavarokat figyeltünk meg, mint a Huntington-kór modellezése esetén, illetve a CBP overexpressziójával menekítettük a cirkadián ritmus zavarokat a Huntington-kór modellben. Számos tanulmány beszámolt már a CBP és a Huntington-kór kapcsolatáról, melyeket a dolgozatban bemutatott eredményeink tovább árnyalnak és remélhetőleg egy lépéssel közelebb visznek a Huntington-kór tüneteinek enyhítésében, illetve a betegség kialakulásának megelőzésében.

7. SUMMARY OF THE DISSERTATION

In our research we were investigating the epigenetic background and the circadian rhythm defects of Huntington's disease (HD). HD is an incurable neurodegenerative disease, that is caused by the abnormal expansion of a polyglutamine coding CAG repeat in the *Huntingtin (Htt)* gene. It is characterized by choreiform abnormal involuntary movements, cognitive, behavioral and psychiatric symptoms. One of the main causes of neurodegeneration is transcriptional dysregulation caused by the inhibition of CBP and Gcn5 histone acetyltransferase (HAT) enzymes through abnormal interactions with the mutant Huntingtin (mHtt) protein. Neurodegeneration can be alleviated by the overexpression of HAT enzymes or by inhibiting the histone deacetylase (HDAC) enzymes that catalyze the removal of acetyl groups. Thus, histone acetylation might be a therapeutic target in the treatment of HD, however, the lysine residues of vital importance are yet to be identified. To do so, in our study we investigated potential H3 acetylation target positions by H3.3A variant mutational analysis (to minimize the developmental defects) in a fruitfly (*Drosophila melanogaster*) model of HD. To model HD we expressed a toxic fragment of the human Huntingtin protein with expanded polyQ domain (Q120) in neuronal tissues. In our *Drosophila* model of HD (HD flies) all the characteristic symptoms such as aggregate formation and neurodegeneration, reduced viability and lifespan, motor function abnormalities and circadian rhythm defects can be investigated. We studied the effect of mutations of lysine residues K9, K14, and K27 of H3.3A variant histone on the pathogenesis of HD. Mutants in which lysine is substituted with glutamine (K → Q) can be used as a mimic of acetylated-lysines, arginine substitution (K → R) mimic non-acetylated lysines, while methionine substitution (K → M) mimic methylated lysines. We studied the effect of H3.3A modifications on viability, longevity, neurodegeneration, motor functions and daily activity of HD flies. Our results show that the modifications of K9 and K27 lysine have no influence on HD symptoms. However, in the case of H3.3A-K14Q modification we observed amelioration in all tested phenotypes (viability and longevity, neurodegeneration, motor functions, circadian rhythm defects), while the H3.3A-K14R modification worsen the phenotype of HD flies. Thus, we can assume that the acetylation state of H3K14 plays an important role in the progression of the disease. We confirmed this theory by epistasis analysis using loss of function alleles of Gcn5 HAT and Sirt1 HDAC enzymes. While the loss of function of *Gcn5* accelerates the progression of the disease, that of *Sirt1* ameliorates HD phenotypes. By mutating K14 lysine to glutamine we mimic a constant acetylation state that ameliorates the phenotype of HD flies. Heterozygous loss of *Gcn5* does not modify the positive

effects of H3.3-K14Q expression on HD phenotypes, while heterozygous loss of *Sirt1* only has a mild effect. To assess what molecular changes lead to the amelioration of HD phenotypes observed in flies expressing acetylation mimetic H3.3-K14Q we performed transcriptome analysis. In HD flies we observed the enrichment of *Hsp* genes that play a major role in the UPR (unfolded protein response) pathway. Enrichment of nucleotide binding proteins and proteins with ligase activity was also identified. Approximately 90 % of these genes are downregulated, however, it is worthy of note that the expression of *Hsp* genes is upregulated. The upregulation of *Hsp* genes could be also observed in H3.3A-K14Q expressing flies, but in not in flies expressing H3.3A-K14R. Interestingly, very few changes occur in the gene expression patterns of HD flies when expressing H3.3A-K14Q or H3.3A-K14R histones compared to controls expressing wild type H3.3A. In conclusion, very limited changes occur in the gene expression pattern of HD flies in response to post-translational mimetic mutations of H3K14, suggesting that the amelioration of HD symptoms caused by the H3.3-K14Q transgenes cannot be explained by the restoration of proper gene expression profile. Despite the fact that the transcriptome analysis shows downregulation of a selected number of genes during the pathogenesis of HD, the total RNA/ DNA ratio doesn't change, while the polyA mRNA/ total RNA ratio increases, suggesting that RNA polymerase II mediated transcription is dysregulated, that is probably caused by the reduced activity of HAT enzymes. K14Q modification leads to increased total RNA levels, however, it decreases the polyA mRNA/ total RNA ratio, while K14R modification remarkably decreases both. As the vast majority (~90 %) of cellular RNA consists of rRNAs, changes in the ratio of total RNA/ DNA most likely reflects changes in the amount of rRNA. Thus, in the case of K14Q modification despite the fact that the amount of polyA mRNA decreases, the presumably elevated level of rRNAs suggests increased protein synthesis. In contrast, in the case of K14R modification both the amount of polyA mRNA and the rate of protein synthesis might decrease. Based on our results and the literature it is feasible that the amelioration of HD phenotypes observed H3.3A-K14Q expressing flies is the consequence of the moderation of disturbed RNA turnover that is a characteristic feature of neurodegenerative diseases. Upon stress mRNAs are sequestered in so called stress granules that fail to dissolve during prolonged periods of stress, that might explain the increase in the mRNA level observed in HD flies. As H3.3A-K14Q modification alleviates symptoms it is feasible that in this case the disassembly of stress granules is more efficient, thus mRNAs are released and proper mRNA turnover and cellular homeostasis can be restored (indicated by higher level of total RNA compared to the control). As in the case of H3.3A-K14R we mimic a lysine residue that cannot be acetylated, it is possible

that due to a more condensed chromatin state less mRNA is expressed, that through the deterioration of already poor cellular homeostasis worsen the phenotype of HD flies. Evidently, to test this hypothesis further experiments need to be performed.

Circadian rhythm defects observed in HD are also in connection with the CBP histone acetyltransferase that also functions as a transcriptional coactivator. Circadian rhythm is a cyclical, approximately 24-hour period of biological activity that is regulated by negative feedback. In *Drosophila* the oscillation is induced by the dCLK/ dCYC transcription factors that activate the so called “clock” genes (*per*, *tim*, *vri*, *Pdp1*, *cwo*). By negative feedback the „clock” genes inhibit the activity of the dCLK/ dCYC heterodimer, subsequently repressing their own transcription. As a result of this feedback regulation the expression of *per*, *tim*, *vri*, *Pdp1* and *cwo* is low at dawn and peaks at dusk, however, that of *dClk* is antiphase with high expression in the morning and low expression in the evening. Another member of the circadian rhythm regulation is CBP, which directly interacts with the dCLK/ dCYC heterodimer. As CBP is sequestered into the aggregates during the pathogenesis of HD, it is presumable that the circadian rhythm defects are caused by the loss of function of CBP. HD patients have disturbed day-night rhythm, fragmented and irregular sleep stages and increased wakefulness, that can lead to severe symptoms, which accelerate the progression of the disease, therefore understanding the defects of the underlying molecular mechanisms are essential. In our *Drosophila* model of HD all the circadian rhythm defects can be observed. HD flies show considerable hyperactivity while spend less time asleep and they have prolonged sleep-onset latency. Furthermore, fragmented sleeps stages are also characteristic features of HD flies, as the number of sleep episodes is higher, however they are shorter in length. In addition, remarkable changes can be observed in the gene expression pattern of *per*, *tim*, *vri* and *dClk*, that presumably contribute to the circadian rhythm defects of HD flies. Silencing of *dCBP* results in quite similar circadian rhythm defects that we observed in HD flies. Moreover, the overexpression of *dCBP* in HD flies rescued both the sleep defects and the disrupted expression pattern of the „clock” genes, confirming our theory that the circadian rhythm disruption in HD is caused by the loss of function of CBP. So far there is no consensus in the literature describing how the interaction between CBP and CLK/ CYC regulates the circadian clock system thereby the daily rhythm. Therefore, we are generating a tagged *dCBP* expressing *Drosophila* strain to be able to track the changes of the chromatin binding ability and the interaction partners of CBP in HD flies, thus gaining a more accurate insight into the function of CBP in the regulation of the circadian rhythm.

In a nutshell, we were investigating phenomena related to pathogenic processes of HD in which histone acetyltransferase enzymes play an important role. HAT enzymes regulate transcription by maintaining the proper acetylation state of histone proteins, that is known to be dysregulated during HD. By mutational analysis of several acetylation target positions of CBP and Gcn5 we identified H3K14 as a key acetylated target residue important in HD pathogenesis, as mimicking the acetylated status of this position ameliorated the investigated HD phenotypes. Furthermore, CBP also plays a role in the regulation of the circadian rhythm, which is also disturbed in HD. Upon the loss of function of CBP quite similar circadian rhythm defects can be observed as in HD, while its overexpression rescues these phenotypes. There are numerous studies discussing the role of CBP in Huntington's disease, that are further expanded by our results and hopefully in the future they might serve as potential therapeutic targets in the treatment or the prevention of the manifestation of the disease.

8. IRODALOMJEGYZÉK

1. Waddington, C. H. The Epigenotype. *Int. J. Epidemiol.* **41**, 10–13 (2012).
2. Riggs, A. D., Martienssen, R. A. & Russo, V. E. A. Introduction. *Cold Spring Harbor Monograph Archive* **32**, 1–4 (1996).
3. Dupont, C., Armant, D. R. & Brenner, C. A. Epigenetics: Definition, Mechanisms and Clinical Perspective. *Semin Reprod Med* **27**, 351–357 (2009).
4. Bernstein, B. E., Meissner, A. & Lander, E. S. The Mammalian Epigenome. *Cell* **128**, 669–681 (2007).
5. Dabin, J., Fortuny, A. & Polo, S. E. Epigenome maintenance in response to DNA damage. *Mol Cell* **62**, 712–727 (2016).
6. Pérez, R. F., Santamarina, P., Fernández, A. F. & Fraga, M. F. Epigenetics and Lifestyle: The Impact of Stress, Diet, and Social Habits on Tissue Homeostasis. in *Epigenetics and Regeneration* 461–489 (Elsevier, 2019). doi:10.1016/B978-0-12-814879-2.00020-0.
7. Kornberg, R. D. Chromatin Structure: A Repeating Unit of Histones and DNA. *Science* **184**, 868–871 (1974).
8. Doenecke, D. & Karlson, P. Albrecht Kossel and the discovery of histones. *Trends in Biochemical Sciences* **9**, 404–405 (1984).
9. Marzluff, W. F. Histone 3' ends: essential and regulatory functions. *Gene Expr* **2**, 93–97 (1992).
10. Luger, K. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389**, 10 (1997).
11. Pierce BA. *Genetics: A Conceptual Approach 4th Edition*. (W. H. Freeman and Company, 2012).
12. Murakami, Y. Heterochromatin and Euchromatin. in *Encyclopedia of Systems Biology* (eds. Dubitzky, W., Wolkenhauer, O., Cho, K.-H. & Yokota, H.) 881–884 (Springer, 2013). doi:10.1007/978-1-4419-9863-7_1413.
13. Peterson, C. L. & Laniel, M.-A. Histones and histone modifications. *Current Biology* **14**, R546–R551 (2004).
14. Allis, C. D. & Jenuwein, T. The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nat Rev Genet* **17**, 487–500 (2016).
15. Kishimoto, M. *et al.* Nuclear Receptor Mediated Gene Regulation through Chromatin Remodeling and Histone Modifications. *Endocr J* **53**, 157–172 (2006).
16. Li, E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet* **3**, 662–673 (2002).
17. Watson, N. A. & Higgins, J. M. G. Histone Kinases and Phosphatases. in *Chromatin Signaling and Diseases* 75–94 (Elsevier, 2016). doi:10.1016/B978-0-12-802389-1.00004-6.
18. Venkatesh, S. & Workman, J. L. Histone exchange, chromatin structure and the regulation of transcription. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **16**, 178–189 (2015).
19. Henikoff, S. & Smith, M. M. Histone Variants and Epigenetics. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **7**, (2015).

20. Hake, S. B. & Allis, C. D. Histone H3 variants and their potential role in indexing mammalian genomes: The “H3 barcode hypothesis”. *PNAS* **103**, 6428–6435 (2006).
21. Schümperli, D. Cell-cycle regulation of histone gene expression. *Cell* **45**, 471–472 (1986).
22. Régnier, V. *et al.* CENP-A Is Required for Accurate Chromosome Segregation and Sustained Kinetochore Association of BubR1. *Mol Cell Biol* **25**, 3967–3981 (2005).
23. Akhmanova, A. S. *et al.* Structure and expression of histone H3.3 genes in *Drosophila melanogaster* and *Drosophila hydei*. *Genome* **38**, 586–600 (1995).
24. Ahmad, K. & Henikoff, S. The Histone Variant H3.3 Marks Active Chromatin by Replication-Independent Nucleosome Assembly. *Molecular Cell* **9**, 1191–1200 (2002).
25. Szenker, E., Ray-Gallet, D. & Almouzni, G. The double face of the histone variant H3.3. *Cell Research* **21**, 421–434 (2011).
26. Sakai, A., Schwartz, B. E., Goldstein, S. & Ahmad, K. Transcriptional and Developmental Functions of the H3.3 Histone Variant in *Drosophila*. *Curr Biol* **19**, 1816–1820 (2009).
27. Bernardes, N. E. & Chook, Y. M. Nuclear import of histones. *Biochemical Society Transactions* **48**, 2753–2767 (2020).
28. Ling, X., Harkness, T. A., Schultz, M. C., Fisher-Adams, G. & Grunstein, M. Yeast histone H3 and H4 amino termini are important for nucleosome assembly in vivo and in vitro: redundant and position-independent functions in assembly but not in gene regulation. *Genes & Development* **10**, 686–699 (1996).
29. Mosammaparast, N., Guo, Y., Shabanowitz, J., Hunt, D. F. & Pemberton, L. F. Pathways mediating the nuclear import of histones H3 and H4 in yeast. *J Biol Chem* **277**, 862–868 (2002).
30. Campos, E. I. *et al.* The Program for Processing Newly-synthesized Histones H3.1 and H4. *Nat Struct Mol Biol* **17**, 1343–1351 (2010).
31. Blackwell, J. S., Wilkinson, S. T., Mosammaparast, N. & Pemberton, L. F. Mutational Analysis of H3 and H4 N Termini Reveals Distinct Roles in Nuclear Import. *J. Biol. Chem.* **282**, 20142–20150 (2007).
32. Jasencakova, Z. *et al.* Replication Stress Interferes with Histone Recycling and Predeposition Marking of New Histones. *Molecular Cell* **37**, 736–743 (2010).
33. Jenuwein, T. & Allis, C. D. Translating the Histone Code. *Science* **293**, 1074–1080 (2001).
34. Kharchenko, P. V. *et al.* Comprehensive analysis of the chromatin landscape in *Drosophila melanogaster*. *Nature* **471**, 480–485 (2011).
35. Kuo, M. H. & Allis, C. D. Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *Bioessays* **20**, 615–626 (1998).
36. Shi, Y. & Whetstine, J. R. Dynamic Regulation of Histone Lysine Methylation by Demethylases. *Molecular Cell* **25**, 1–14 (2007).
37. Grunstein, M. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* **389**, 349–352 (1997).
38. Thomson, T. M., Balcells, C. & Cascante, M. Metabolic Plasticity and Epithelial-Mesenchymal Transition. *Journal of Clinical Medicine* **8**, 967 (2019).

39. Josling, G. A., Selvarajah, S. A., Petter, M. & Duffy, M. F. The Role of Bromodomain Proteins in Regulating Gene Expression. *Genes (Basel)* **3**, 320–343 (2012).
40. Roth, S. Y., Denu, J. M. & Allis, C. D. Histone Acetyltransferases. *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 81–120 (2001).
41. Lee, K. K. & Workman, J. L. Histone acetyltransferase complexes: one size doesn't fit all. *Mol. Cell* **12** (2007).
42. Carrozza, M. J., Utley, R. T., Workman, J. L. & Côté, J. The diverse functions of histone acetyltransferase complexes. *Trends in Genetics* **19**, 321–329 (2003).
43. Sterner, D. E. & Berger, S. L. Acetylation of Histones and Transcription-Related Factors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**, 435–459 (2000).
44. Chrivia, J. C. *et al.* Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature* **365**, 855–859 (1993).
45. Eckner, R. *et al.* Molecular cloning and functional analysis of the adenovirus E1A-associated 300-kD protein (p300) reveals a protein with properties of a transcriptional adaptor. *Genes Dev* **8**, 869–884 (1994).
46. Valor, L. M., Viosca, J., Lopez-Atalaya, J. P. & Barco, A. Lysine Acetyltransferases CBP and p300 as Therapeutic Targets in Cognitive and Neurodegenerative Disorders. *Curr Pharm Des* **19**, 5051–5064 (2013).
47. Chan, H. M. & La Thangue, N. B. p300/CBP proteins: HATs for transcriptional bridges and scaffolds. *J Cell Sci* **114**, 2363–2373 (2001).
48. Lundblad, J. R., Kwok, R. P. S., Lurance, M. E., Harter, M. L. & Goodman, R. H. Adenoviral E1A-associated protein p300 as a functional homologue of the transcriptional co-activator CBP. *Nature* **374**, 85–88 (1995).
49. Martinez-Balbas, M. A. The acetyltransferase activity of CBP stimulates transcription. *The EMBO Journal* **17**, 2886–2893 (1998).
50. Bisotto, S., Minorgan, S. & Rehfuss, R. P. Identification and Characterization of a Novel Transcriptional Activation Domain in the CREB-binding Protein. *J. Biol. Chem.* **271**, 17746–17750 (1996).
51. Flici, H. *et al.* Gcm/Glide-dependent conversion into glia depends on neural stem cell age, but not on division, triggering a chromatin signature that is conserved in vertebrate glia. *Development* **138**, 4167–4178 (2011).
52. Yuan, H. *et al.* Involvement of p300/CBP and epigenetic histone acetylation in TGF- β 1-mediated gene transcription in mesangial cells. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **304**, F601–F613 (2013).
53. Jin, Q. *et al.* Distinct roles of GCN5/PCAF-mediated H3K9ac and CBP/p300-mediated H3K18/27ac in nuclear receptor transactivation: Histone acetylation and gene activation. *The EMBO Journal* **30**, 249–262 (2011).
54. Daujat, S. *et al.* Crosstalk between CARM1 Methylation and CBP Acetylation on Histone H3. *Current Biology* **12**, 2090–2097 (2002).
55. Das, C., Lucia, M. S., Hansen, K. C. & Tyler, J. K. CBP/p300-mediated acetylation of histone H3 on lysine 56. *Nature* **459**, 113–117 (2009).

56. Crump, N. T. *et al.* Dynamic acetylation of all lysine-4 trimethylated histone H3 is evolutionarily conserved and mediated by p300/CBP. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 7814–7819 (2011).
57. Hung, H.-C., Maurer, C., Kay, S. A. & Weber, F. Circadian transcription depends on limiting amounts of the transcription co-activator neji1/CBP. *J Biol Chem* **282**, 31349–31357 (2007).
58. Lim, C. *et al.* Functional Role of CREB-Binding Protein in the Circadian Clock System of *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol* **27**, 4876–4890 (2007).
59. Petrij, F. *et al.* Rubinstein-Taybi syndrome caused by mutations in the transcriptional co-activator CBP. *Nature* **376**, 348–351 (1995).
60. Korzus, E. Rubinstein-Taybi Syndrome and Epigenetic Alterations. *Adv Exp Med Biol* **978**, 39–62 (2017).
61. Pourshafie, N. *et al.* Linking epigenetic dysregulation, mitochondrial impairment, and metabolic dysfunction in SBMA motor neurons. *JCI Insight* **5**,.
62. Landles, C. & Bates, G. P. Huntingtin and the molecular pathogenesis of Huntington's disease: Fourth in Molecular Medicine Review Series. *EMBO Rep* **5**, 958–963 (2004).
63. Fernandez-Nicolas, A. & Belles, X. CREB-binding protein contributes to the regulation of endocrine and developmental pathways in insect hemimetabolite pre-metamorphosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1860**, 508–515 (2016).
64. Brownell, J. E. *et al.* Tetrahymena Histone Acetyltransferase A: A Homolog to Yeast Gcn5p Linking Histone Acetylation to Gene Activation. *Cell* **84**, 843–851 (1996).
65. Grant, P. A. *et al.* Yeast Gcn5 functions in two multisubunit complexes to acetylate nucleosomal histones: characterization of an Ada complex and the SAGA (Spt/Ada) complex. *Genes Dev.* **11**, 1640–1650 (1997).
66. Koutelou, E., Farria, A. T. & Dent, S. Y. R. Complex functions of Gcn5 and Pcaf in development and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 194609 (2020) doi:10.1016/j.bbagr.2020.194609.
67. Grant, P. A. *et al.* Expanded Lysine Acetylation Specificity of Gcn5 in Native Complexes. *J. Biol. Chem.* **274**, 5895–5900 (1999).
68. Ciurciu, A., Komonyi, O., Pankotai, T. & Boros, I. M. The *Drosophila* Histone Acetyltransferase Gcn5 and Transcriptional Adaptor Ada2a Are Involved in Nucleosomal Histone H4 Acetylation. *Molecular and Cellular Biology* **26**, 9413–9423 (2006).
69. Carré, C., Szymczak, D., Pidoux, J. & Antoniewski, C. The Histone H3 Acetylase dGcn5 Is a Key Player in *Drosophila melanogaster* Metamorphosis. *Mol Cell Biol* **25**, 8228–8238 (2005).
70. Steffan, J. S. *et al.* Histone deacetylase inhibitors arrest polyglutamine-dependent neurodegeneration in *Drosophila*. *Nature* **413**, 739–743 (2001).
71. Bodai, L., Pallos, J., Thompson, L. M. & Marsh, J. L. Pcaf Modulates Polyglutamine Pathology in a *Drosophila* Model of Huntington's Disease. *Neurodegenerative Dis* **9**, 104–106 (2012).
72. Seto, E. & Yoshida, M. Erasers of Histone Acetylation: The Histone Deacetylase Enzymes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **6**, (2014).

73. Sterner, R., Vidali, G. & Allfrey, V. G. Studies of acetylation and deacetylation in high mobility group proteins. Identification of the sites of acetylation in HMG-1. *J Biol Chem* **254**, 11577–11583 (1979).
74. Luo, J., Su, F., Chen, D., Shiloh, A. & Gu, W. Deacetylation of p53 modulates its effect on cell growth and apoptosis. *Nature* **408**, 377–381 (2000).
75. Hubbert, C. *et al.* HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature* **417**, 455–458 (2002).
76. Gregoret, I., Lee, Y.-M. & Goodson, H. V. Molecular Evolution of the Histone Deacetylase Family: Functional Implications of Phylogenetic Analysis. *Journal of Molecular Biology* **338**, 17–31 (2004).
77. Dai, Y. & Faller, D. V. Transcription Regulation by Class III Histone Deacetylases (HDACs)—Sirtuins. *Transl Oncogenomics* **3**, 53–65 (2008).
78. Kristensen, H. M. E., Madsen, A. S. & Olsen, C. A. Inhibitors of the Zinc-Dependent Histone Deacetylases. in *Epigenetic Drug Discovery* 153–184 (John Wiley & Sons, Ltd, 2019). doi:10.1002/9783527809257.ch7.
79. Pallos, J. *et al.* Inhibition of specific HDACs and sirtuins suppresses pathogenesis in a Drosophila model of Huntington’s disease. *Human Molecular Genetics* **17**, 3767–3775 (2008).
80. Frankel, S., Ziafazeli, T. & Rogina, B. dSir2 and longevity in Drosophila. *Exp Gerontol* **46**, 391–396 (2011).
81. Aström, S. U., Cline, T. W. & Rine, J. The Drosophila melanogaster sir2+ gene is nonessential and has only minor effects on position-effect variegation. *Genetics* **163**, 931–937 (2003).
82. Rogina, B. & Helfand, S. L. Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 15998–16003 (2004).
83. Parsons, X. H., Garcia, S. N., Pillus, L. & Kadonaga, J. T. Histone deacetylation by Sir2 generates a transcriptionally repressed nucleoprotein complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 1609–1614 (2003).
84. Imai, S., Armstrong, C. M., Kaerberlein, M. & Guarente, L. Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* **403**, 795–800 (2000).
85. Vaquero, A. *et al.* SirT2 is a histone deacetylase with preference for histone H4 Lys 16 during mitosis. *Genes Dev* **20**, 1256–1261 (2006).
86. Vaziri, H. *et al.* hSIR2/SIRT1 Functions as an NAD-Dependent p53 Deacetylase. *Cell* **107**, 149–159 (2001).
87. Hu, J., Jing, H. & Lin, H. Sirtuin inhibitors as anticancer agents. *Future Med Chem* **6**, 945–966 (2014).
88. Smith, M. R. *et al.* A potent and selective Sirtuin 1 inhibitor alleviates pathology in multiple animal and cell models of Huntington’s disease. *Human Molecular Genetics* **23**, 2995–3007 (2014).

89. Hardin, P. E. From biological clock to biological rhythms. *Genome Biology* **1**, reviews1023.1 (2000).
90. Halberg, F. Circadian (about Twenty-four-hour) Rhythms in Experimental Medicine [Abridged]. *Proc R Soc Med* **56**, 253–257 (1963).
91. Panda, S., Hogenesch, J. B. & Kay, S. A. Circadian rhythms from flies to human. *Nature* **417**, 329–335 (2002).
92. Hastings, M. H., Maywood, E. S. & Brancaccio, M. The Mammalian Circadian Timing System and the Suprachiasmatic Nucleus as Its Pacemaker. *Biology (Basel)* **8**, (2019).
93. Helfrich-Förster, C. Neurobiology of the fruit fly’s circadian clock. *Genes Brain Behav* **4**, 65–76 (2005).
94. Dunlap, J. C. Molecular Bases for Circadian Clocks. *Cell* **96**, 271–290 (1999).
95. Hardin, P. E. Molecular genetic analysis of circadian timekeeping in *Drosophila*. *Adv Genet* **74**, 141–173 (2011).
96. Allada, R., White, N. E., So, W. V., Hall, J. C. & Rosbash, M. A mutant *Drosophila* homolog of mammalian clock disrupts circadian rhythms and transcription of period and timeless. *Cell* **93**, 791–804 (1998).
97. Cyran, S. A. *et al.* vrille, Pdp1, and dClock Form a Second Feedback Loop in the *Drosophila* Circadian Clock. *Cell* **112**, 329–341 (2003).
98. Kadener, S. *et al.* Clockwork Orange is a transcriptional repressor and a new *Drosophila* circadian pacemaker component. 1675–1686 (2007) doi:10.1101/gad.1552607.
99. Yu, W., Zheng, H., Hou, J. H., Dauwalder, B. & Hardin, P. E. PER-dependent rhythms in CLK phosphorylation and E-box binding regulate circadian transcription. *Genes and Development* **20**, 723–733 (2006).
100. Allada, R. & Chung, B. Y. Circadian organization of behavior and physiology in *Drosophila*. *Annu Rev Physiol* **72**, 605–624 (2010).
101. Sehgal, A., Price, J. L., Man, B. & Young, M. W. Loss of circadian behavioral rhythms and per RNA oscillations in the *Drosophila* mutant timeless. *Science* **263**, 1603–1606 (1994).
102. Allada, R. A recessive mutant of *Drosophila* Clock reveals a role in circadian rhythm amplitude. *The EMBO Journal* **22**, 3367–3375 (2003).
103. Meireles-Filho, A. C. A. & Kyriacou, C. P. Circadian rhythms in insect disease vectors. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **108**, 48–58 (2013).
104. Özkaya, Ö. & Rosato, E. The Circadian Clock of the Fly: A Neurogenetics Journey Through Time. in *Advances in Genetics* vol. 77 79–123 (Elsevier, 2012).
105. Etchegaray, J.-P., Lee, C., Wade, P. A. & Reppert, S. M. Rhythmic histone acetylation underlies transcription in the mammalian circadian clock. *Nature* **421**, 177–182 (2003).
106. Curtis, A. M. *et al.* Histone Acetyltransferase-dependent Chromatin Remodeling and the Vascular Clock. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 7091–7097 (2004).
107. Belvin, M. P., Zhou, H. & Yin, J. C. The *Drosophila* dCREB2 gene affects the circadian clock. *Neuron* **22**, 777–787 (1999).

108. Lee, Y. *et al.* Coactivation of the CLOCK-BMAL1 complex by CBP mediates resetting of the circadian clock. *Journal of Cell Science* **123**, 3547–3557 (2010).
109. Song, H. *et al.* A β -induced degradation of BMAL1 and CBP leads to circadian rhythm disruption in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegeneration* **10**, 13 (2015).
110. Huntington, G. On Chorea. (1872).
111. Ross, C. A. & Margolis, R. L. Huntington's disease. *Clinical Neuroscience Research* **1**, 142–152 (2001).
112. Anderson, K. E. Huntington's disease. in *Handbook of Clinical Neurology* vol. 100 15–24 (Elsevier, 2011).
113. Macdonald, M. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* **72**, 971–983 (1993).
114. Ambrose, C. M. *et al.* Structure and expression of the Huntington's disease gene: Evidence against simple inactivation due to an expanded CAG repeat. *Somat Cell Mol Genet* **20**, 27–38 (1994).
115. McFarland, K. N. & Cha, J.-H. J. Molecular biology of Huntington's disease. *Handb Clin Neurol* **100**, 25–81 (2011).
116. Cattaneo, E. Loss of normal huntingtin function: new developments in Huntington's disease research. *Trends in Neurosciences* **24**, 182–188 (2001).
117. White, J. K. *et al.* Huntingtin is required for neurogenesis and is not impaired by the Huntington's disease CAG expansion. *Nat Genet* **17**, 404–410 (1997).
118. Imarisio, S. *et al.* Huntington's disease: from pathology and genetics to potential therapies. *Biochemical Journal* **412**, 191–209 (2008).
119. G. Vonsattel, J. P. & DiFiglia, M. Huntington Disease: *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* **57**, 369–384 (1998).
120. Waldvogel, H. J., Kim, E. H., Tippett, L. J., Vonsattel, J.-P. G. & Faull, R. L. The Neuropathology of Huntington's Disease. in *Behavioral Neurobiology of Huntington's Disease and Parkinson's Disease* (eds. Nguyen, H. H. P. & Cenci, M. A.) vol. 22 33–80 (Springer Berlin Heidelberg, 2014).
121. Wyant, K. J., Ridder, A. J. & Dayalu, P. Huntington's Disease—Update on Treatments. *Curr Neurol Neurosci Rep* **17**, 33 (2017).
122. Steffan, J. S. *et al.* The Huntington's disease protein interacts with p53 and CREB-binding protein and represses transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**, 6763–6768 (2000).
123. Moumné, L., Betuing, S. & Caboche, J. Multiple Aspects of Gene Dysregulation in Huntington's Disease. *Front Neurol* **4**, (2013).
124. Luthi-Carter, R. *et al.* Dysregulation of gene expression in the R6/2 model of polyglutamine disease: parallel changes in muscle and brain. *Human Molecular Genetics* **11**, 1911–1926 (2002).
125. Jiang, H. *et al.* Depletion of CBP is directly linked with cellular toxicity caused by mutant huntingtin. *Neurobiology of Disease* **23**, 543–551 (2006).
126. Nucifora Jr., F. C. Interference by Huntingtin and Atrophin-1 with CBP-Mediated Transcription Leading to Cellular Toxicity. *Science* **291**, 2423–2428 (2001).

127. Cong, S.-Y. *et al.* Mutant huntingtin represses CBP, but not p300, by binding and protein degradation. *Mol Cell Neurosci* **30**, 560–571 (2005).
128. Hockly, E. *et al.* Suberoylanilide hydroxamic acid, a histone deacetylase inhibitor, ameliorates motor deficits in a mouse model of Huntington’s disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 2041–2046 (2003).
129. Dompierre, J. P. *et al.* Histone Deacetylase 6 Inhibition Compensates for the Transport Deficit in Huntington’s Disease by Increasing Tubulin Acetylation. *J Neurosci* **27**, 3571–3583 (2007).
130. Ferrante, R. J. *et al.* Histone deacetylase inhibition by sodium butyrate chemotherapy ameliorates the neurodegenerative phenotype in Huntington’s disease mice. *J Neurosci* **23**, 9418–9427 (2003).
131. Morton, A. J. Circadian and sleep disorder in Huntington’s disease. *Experimental Neurology* **243**, 34–44 (2013).
132. Hansotia, P., Wall, R. & Berendes, J. Sleep disturbances and severity of Huntington’s disease. *Neurology* **35**, 1672–4 (1985).
133. Wiegand, M. *et al.* Nocturnal sleep in Huntington’s disease. *Journal of neurology* **238**, 203–8 (1991).
134. Goodman, A. O. G., Morton, A. J. & Barker, R. A. Identifying sleep disturbances in Huntington’s disease using a simple disease-focused questionnaire. *PLoS Curr HD* 1–16 (2010) doi:10.1371/currents.RRN1189.Abstract.
135. Goodman, A. O. G. *et al.* Asymptomatic Sleep Abnormalities Are a Common Early Feature in Patients with Huntington’s Disease. 211–217 (2011) doi:10.1007/s11910-010-0163-x.
136. Orzeł-Gryglewska, J. Consequences of sleep deprivation. *Int J Occup Med Environ Health* **23**, 95–114 (2010).
137. Aziz, N. A., Anguelova, G. V., Marinus, J., Lammers, G. J. & Roos, R. A. C. Sleep and circadian rhythm alterations correlate with depression and cognitive impairment in Huntington’s disease. *Parkinsonism Relat Disord* **16**, 345–350 (2010).
138. Musiek, E. S. Circadian clock disruption in neurodegenerative diseases : cause and effect ? **6**, 1–6 (2015).
139. Morton, A. J. *et al.* Disintegration of the Sleep-Wake Cycle and Circadian Timing in Huntington’s Disease. *Journal of Neuroscience* **25**, 157–163 (2005).
140. Faragó, A., Zsindely, N. & Bodai, L. Mutant huntingtin disturbs circadian clock gene expression and sleep patterns in *Drosophila*. *Scientific Reports* **9**, 7174 (2019).
141. Claridge-Chang, a *et al.* Circadian regulation of gene expression systems in the *Drosophila* head. *Neuron* **32**, 657–671 (2001).
142. Ceriani, M. F. *et al.* Genome-wide expression analysis in *Drosophila* reveals genes controlling circadian behavior. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **22**, 9305–19 (2002).
143. McDonald, M. J. & Rosbash, M. Microarray analysis and organization of circadian gene expression in *Drosophila*. *Cell* **107**, 567–578 (2001).

144. Wijnen, H., Naef, F., Boothroyd, C., Claridge-Chang, A. & Young, M. W. Control of daily transcript oscillations in *Drosophila* by light and the circadian clock. *PLoS Genetics* **2**, 0326–0343 (2006).
145. Yamaguchi, M. & Yoshida, H. *Drosophila* as a Model Organism. in *Drosophila Models for Human Diseases* (ed. Yamaguchi, M.) vol. 1076 1–10 (Springer Singapore, 2018).
146. Pandey, U. B. & Nichols, C. D. Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. *Pharmacol Rev* **63**, 411–436 (2011).
147. Barbaro, B. A. *et al.* Comparative study of naturally occurring Huntingtin fragments in *Drosophila* points to exon 1 as the most pathogenic species in Huntington’s disease. *Human Molecular Genetics* **24**, 913–925 (2015).
148. Brand, A. H. & Perrimon, N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401–415 (1993).
149. McGuire, S., Le, P. T., Osborn, A., Matsumoto, K. & Davis, R. Temporal and regional gene expression targeting with the conventional GAL4/UAS system in *Drosophila*. *A Dros Res Conf* **44**, (2003).
150. Hödl, M. & Basler, K. Transcription in the Absence of Histone H3.3. *Current Biology* **19**, 1221–1226 (2009).
151. Kaneko, M., Park, J. H., Cheng, Y., Hardin, P. E. & Hall, J. C. Disruption of synaptic transmission or clock-gene-product oscillations in circadian pacemaker cells of *Drosophila* cause abnormal behavioral rhythms. *Journal of Neurobiology* **43**, 207–233 (2000).
152. Marek, K. W. *et al.* A Genetic Analysis of Synaptic Development: Pre- and Postsynaptic dCBP Control Transmitter Release at the *Drosophila* NMJ. *Neuron* **25**, 537–547 (2000).
153. Wolf, M. J. & Rockman, H. A. *Drosophila*, genetic screens, and cardiac function. *Circ Res* **109**, 794–806 (2011).
154. Han, S. K. *et al.* OASIS 2: online application for survival analysis 2 with features for the analysis of maximal lifespan and healthspan in aging research. *Oncotarget* **7**, 56147–56152 (2016).
155. Cagan, R. Principles of *Drosophila* Eye Differentiation. *Curr Top Dev Biol* **89**, 115–135 (2009).
156. Barbaro, B. *brettbarbaro/Flytracker*. (2016).
157. Young, M. W. The tick-tock of the biological clock. *Sci Am* **282**, 64–71 (2000).
158. Gilestro, G. F. Video tracking and analysis of sleep in *Drosophila melanogaster*. *Nat Protoc* **7**, 995–1007 (2012).
159. Gilestro, G. F. & Cirelli, C. pySolo: a complete suite for sleep analysis in *Drosophila*. *Bioinformatics* **25**, 1466–1467 (2009).
160. REFINETTI, R., LISSEN, G. C. & HALBERG, F. Procedures for numerical analysis of circadian rhythms. *Biol Rhythm Res* **38**, 275–325 (2007).
161. Miquel, J., Lundgren, P. R., Bensch, K. G. & Atlan, H. Effects of temperature on the life span, vitality and fine structure of *Drosophila melanogaster*. *Mechanisms of Ageing and Development* **5**, 347–370 (1976).
162. Brewer, G. Messenger RNA decay during aging and development. *Ageing Research Reviews* **1**, 607–625 (2002).

163. Lamaze, A. *et al.* Regulation of sleep plasticity by a thermo-sensitive circuit in *Drosophila*. *Sci Rep* **7**, 40304 (2017).
164. Jennifer Morton, A. *et al.* Early and progressive circadian abnormalities in Huntington's disease sheep are unmasked by social environment. *Human Molecular Genetics* **23**, 3375–3383 (2014).
165. Kudo, T. *et al.* Dysfunctions in circadian behavior and physiology in mouse models of Huntington's disease. *Experimental Neurology* **228**, 80–90 (2011).
166. Gonzales, E. & Yin, J. *Drosophila* Models of Huntington's Disease exhibit sleep abnormalities. *PLoS currents* **2**, (2010).
167. Leak, R. K. Heat shock proteins in neurodegenerative disorders and aging. *J Cell Commun Signal* **8**, 293–310 (2014).
168. Chai, Y., Koppenhafer, S. L., Bonini, N. M. & Paulson, H. L. Analysis of the Role of Heat Shock Protein (Hsp) Molecular Chaperones in Polyglutamine Disease. *J Neurosci* **19**, 10338–10347 (1999).
169. Palazzo, A. F. & Lee, E. S. Non-coding RNA: what is functional and what is junk? *Front Genet* **6**, 2 (2015).
170. Weskamp, K. & Barmada, S. J. RNA Degradation in Neurodegenerative Disease. in *RNA Metabolism in Neurodegenerative Diseases* (eds. Sattler, R. & Donnelly, C. J.) vol. 20 103–142 (Springer International Publishing, 2018).
171. Buchan, J. R. & Parker, R. Eukaryotic Stress Granules: The Ins and Out of Translation. *Mol Cell* **36**, 932 (2009).

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném megköszönni mindenekelőtt témavezetőmnek, **Dr. Bodai Lászlónak** azt, hogy évekkkel ezelőtt bekapcsolódhattam a csoportjában folyó kutatómunkába. Köszönettel tartozom az átadott szaktudásért, a lelkiismeretes irányításért és támogatásért, hogy türelemmel és kitartással precíz és önálló kutatómunkára tanított és mert nem sajnálta az időt és fáradságot, ha segítségre volt szükségem.

Továbbá köszönettel tartozom kutatócsoportunk tagjainak, **Dr. Zsindely Nórának**, **Farkas Anitának** és **Siági Fruzsínának**, hogy szint vittek a szürke hétköznapiakba, mindig támogattak és hasznos tanácsokkal láttak el.

Köszönettel tartozom a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék összes jelenlegi és volt munkatársának, főképpen **Bakosné Moráth Csillának** és **Huliák Ildikónak**, hogy személyes és szakmai támogatásukkal segítették munkámat.

Hálásan köszönöm **szüleimnek**, hogy mindig mellettem álltak és támogattak; **Enikőnek**, aki nővéremként egész életemben példaként állt előttem; és **barátaimnak**, akik mindig bíztattak és velem örültek a sikereimnek.

Végül köszönetet szeretnék mondani férjemnek, **Szabó Mártonnak**, aki mindvégig kitartott mellettem. Köszönöm **Neked**, az együtt töltött időt, a törődést és szeretetet, és azt, hogy a nehézségek ellenére is mindig ott voltál és erőt adtál.

A dolgozat megvalósításához hozzájárultak a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal által támogatott **OTKA/NKFIH-(K112294)**, **GINOP-2.3.2-15-2016-00032** és **GINOP-2.3.2-15-2016-00034** pályázatok. Továbbá az Emberi Erőforrások Minisztériuma által támogatott Nemzet Fiatal Tehetségeiért Ösztöndíj **NTP-NFTÖ-18-B-0359**, az Innovációs és Technológiai Minisztérium által támogatott Új Nemzeti Kiválósági Program **ÚNKP-19-3-SZTE-72** és a Fulbright Hungary által támogatott **Fulbright Posztgraduális Hallgatói Ösztöndíj 2019** pályázatok.

10. PUBLIKÁCIÓK LISTÁJA

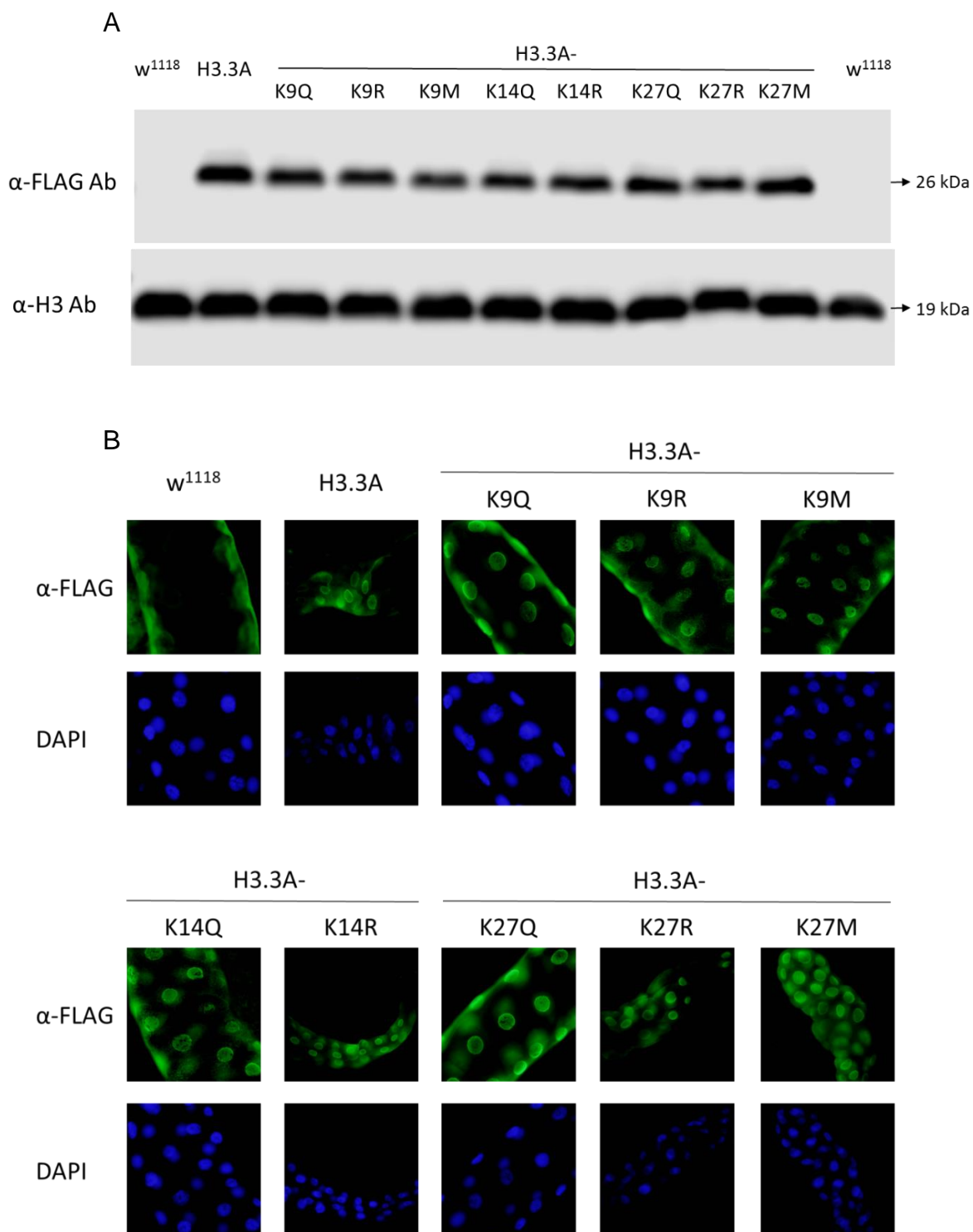
A dolgozat alapját képező publikációk:

- **Faragó A**, Zsindely N, Bodai L. Mutant huntingtin disturbs circadian clock gene expression and sleep patterns in *Drosophila*. *Sci Rep*. 2019 May 9;9(1):7174. doi: 10.1038/s41598-019-43612-w.
- Song W, Zsindely N, **Faragó A**, Marsh JL, Bodai L. Systematic genetic interaction studies identify histone demethylase Utx as potential target for ameliorating Huntington's disease. *Hum Mol Genet*. 2018 Feb 15;27(4):649-666. doi: 10.1093/hmg/ddx432.

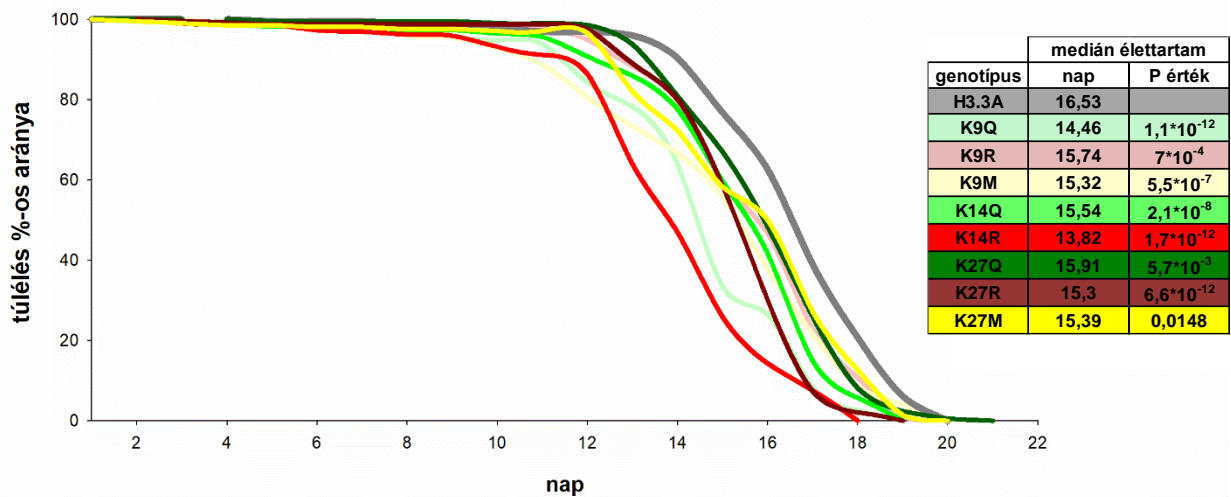
további publikációk:

- **Faragó A**, Ürmösi A, Farkas A, Bodai L. The histone replacement gene His4r is involved in heat stress induced chromatin rearrangement. *Sci Rep*. 2021 Mar 1;11(1):4878. doi: 10.1038/s41598-021-84413-4.
- Valkai I, Kénesi E, Domonkos I, Ayaydin F, Tarkowská D, Strnad M, **Faragó A**, Bodai L, Fehér A. The Arabidopsis RLCK VI_A2 Kinase Controls Seedling and Plant Growth in Parallel with Gibberellin. *Int J Mol Sci*. 2020 Oct 1;21(19):E7266. doi: 10.3390/ijms21197266.
- Spohn R, Daruka L, Lázár V, Martins A, Vidovics F, Grézal G, Méhi O, Kintses B, Számel M, Jangir PK, Csörgő B, Györkei Á, Bódi Z, **Faragó A**, Bodai L, Földesi I, Kata D, Maróti G, Pap B, Wirth R, Papp B, Pál C. Integrated evolutionary analysis reveals antimicrobial peptides with limited resistance. *Nat Commun*. 2019 Oct 4;10(1):4538. doi: 10.1038/s41467-019-12364-6.
- Dunai A, Spohn R, Farkas Z, Lázár V, Györkei Á, Apjok G, Boross G, Szappanos B, Grézal G, **Faragó A**, Bodai L, Papp B, Pál C. Rapid decline of bacterial drug-resistance in an antibiotic-free environment through phenotypic reversion. *Elife*. 2019 Aug 16;8:e47088. doi: 10.7554/eLife.47088.
- Jankovics F, Bence M, Sinka R, **Faragó A**, Bodai L, Pettkó-Szandtner A, Ibrahim K, Takács Z, Szarka-Kovács AB, Erdélyi M. *Drosophila* small ovary gene is required for transposon silencing and heterochromatin organization, and ensures germline stem cell maintenance and differentiation. *Development*. 2018 Dec 4;145(23):dev170639. doi: 10.1242/dev.170639.

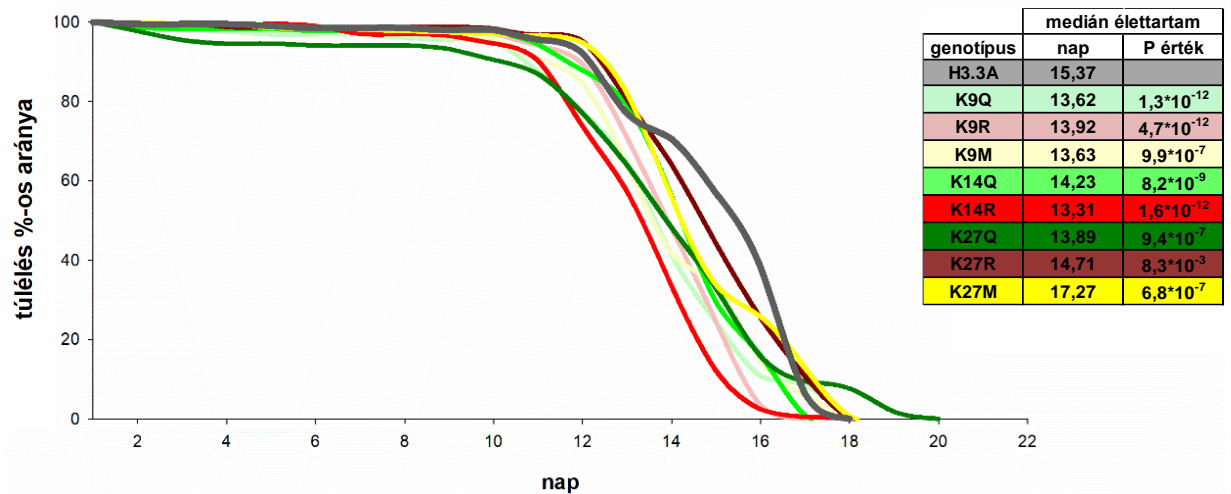
11. FÜGGELÉK



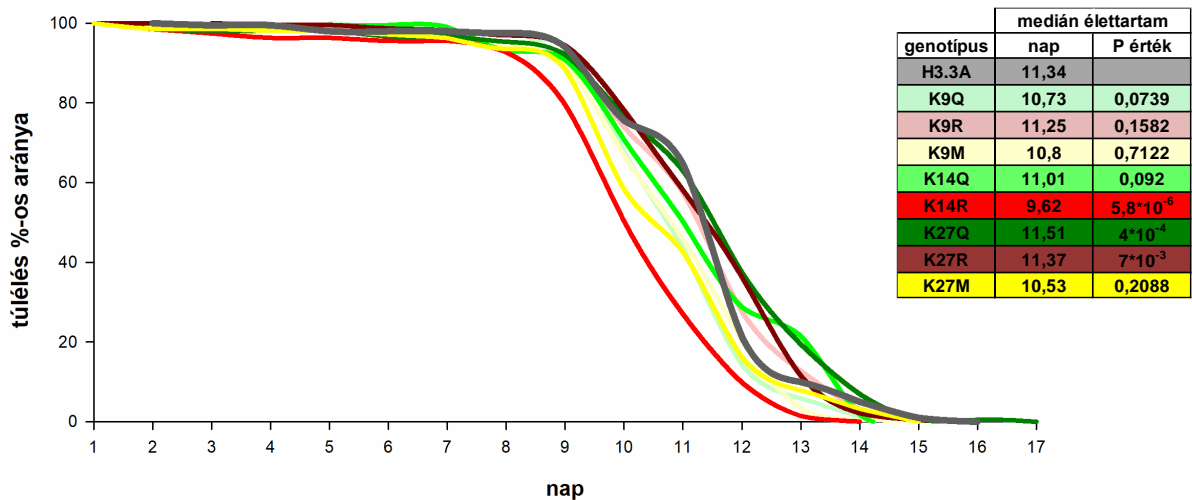
F1. ábra: *H3.3A-mut* transzgének expressziójának validálása western blot és immunhisztokémiai analízissel. A: western blot eredménye fejekből készült mintákon anti-FLAG és anti-H3 ellenanyaggal, B: immunhisztokémiai analízis eredménye lárvális nyálmirigyekben anti-FLAG ellenanyaggal és DAPI festéssel.



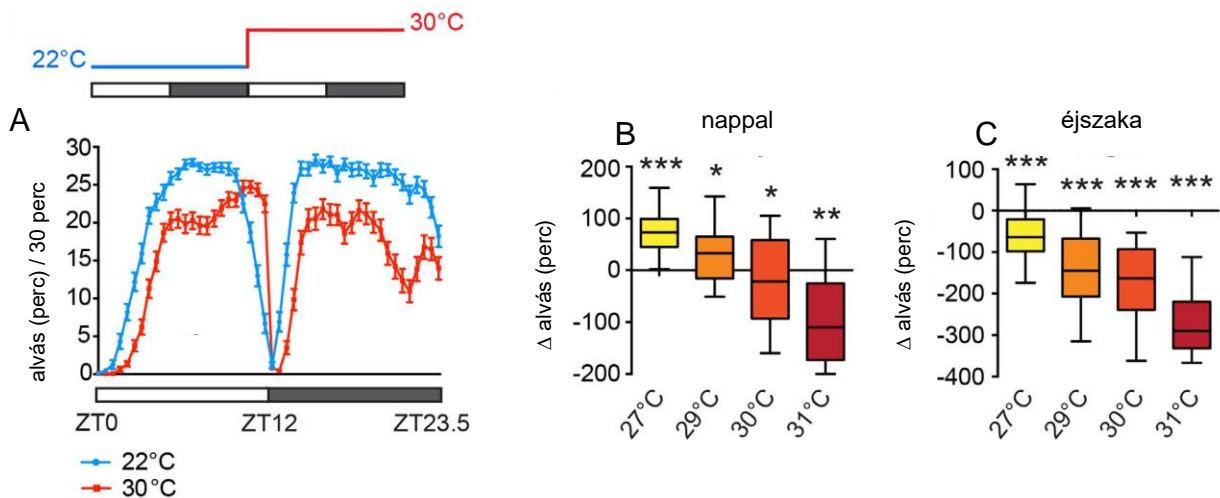
F2. ábra: Adult korban hajtott *H3.3A-mut* transzgénnek nőstény HD legyek élethosszára gyakorolt hatása homozigóta *His3.3A* deléciós háttéren. A diagram a túlélés százalékos arányát ábrázolja az idő függvényében, táblázatban a medián élettartam látható, statisztikai analízisként Fisher-egzakt tesztet végeztünk.



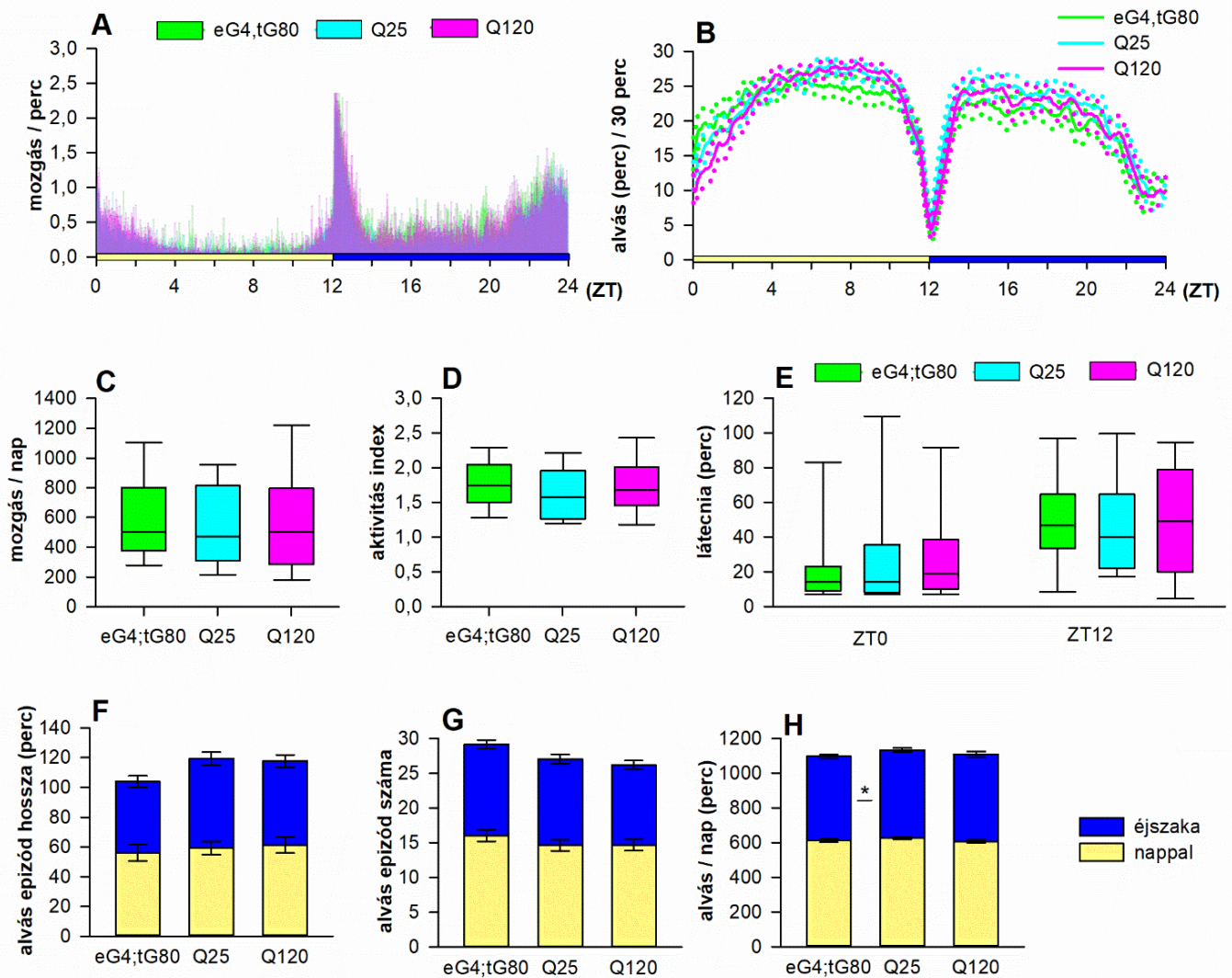
F3. ábra: Adult korban hajtott *H3.3A-mut* transzgénnek nőstény HD legyek élethosszára gyakorolt hatása heterozigóta *His3.3A* deléciós háttéren. A diagram a túlélés százalékos arányát ábrázolja az idő függvényében, táblázatban a medián élettartam látható, statisztikai analízisként Fisher-egzakt tesztet végeztünk.



F4. ábra: Adult korban hajtott *H3.3A-mut* transzgének hím HD legyek élethosszára gyakorolt hatása homozigóta *His3.3A* deléciós háttéren. A diagram a túlélés százalékos arányát ábrázolja az idő függvényében, táblázatban a medián élettartam látható, statisztikai analízisként Fisher-egzakt tesztet végeztünk.



F5. ábra: Alvási mintázat változás a hőmérséklet függvényében. (Lamaze, 2017 alapján)¹⁶³ A: 22 °C-on és 30 °C-on megfigyelhető alvás mintázat; a diagram az átlag értéket és a standad error-t ábrázolja, B: nappali alvás mennyiségének változása a hőmérséklet emelésével, C: éjszakai alvás mennyiségének változása a hőmérséklet emelésével; a diagramok a mediánt, illetve a 25 %-os és 75 %-os percentilis értékeket ábrázolják, statisztikai analízisként Wilcoxon tesztet végeztek (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).



F6. ábra: A cirkadián ritmus kísérletek során használt alap törzsek alvási mintázata.

A: percenkénti mozgások átlagos száma, B: 30 perc alatt alvással töltött idő; a diagram az átlagot és a konfidencia intervallumot ábrázolja; ZT0 a lámpa felkapcsolásának, ZT12 pedig a lámpa lekapcsolásának időpontjával egyezik meg, C: összes mozgás 24 óra alatt, D: aktivitás az ébren töltött időre normalizálva, E: látencia idő; a diagramok a mediánt, illetve a 25 %-os és 75 %-os, valamint a 10 %-os és 90 %-os percentilis értékeket ábrázolják, statisztikai analízisként OWA tesztet végeztünk, F: alvási epizódok hossza, G: alvási epizódok száma, H: alvással töltött percek száma 24 óra alatt; a diagramok a nappal és éjszaka mért átlag értékeket és a standard error-t ábrázolják, statisztikai analízisként OWA tesztet végeztünk (*: $p < 0,05$).

Primer neve	5'-3' szekvencia
HttQ120-qF	GCCTCTGCACCGACCATAA
pUAST-qR	TGGAAGCTGATGAATGGGAGCA
H3.3A-qF	TTGGAGCCCTACAGGAGGC
pTWF-seqR	AAGGTTTCCTTCACAAAGATCCTCT
per-qF	GCTACAAGGTTCCCGACGAG
per-qR	GTGCGATATGATCCCGGTGG
tim-qF	AATGCGAAGGTGCCCATGA
tim-qR	CTCCTGTCGGGCATTCAGTT
Clk-qF	TGAAGAGCTAAGGCAAACGGG
Clk-qR	CTCGGCATAGCTGACAACCT
vri-qF	GTTCGCCAGTCATCTCCGAT
vri-qR	CAAGCTGTCCAGATCCTCGG
Pdp1-qF	ACGAATTCCTGTCGGAGAACA
Pdp1-qR	TGTGGCCAAGACCAAGAGAC
cwo-qF	TTCACGGACAGGGCAACTAC
cwo-qR	CGTTGATGTTGATGGGGTGC
tubulin-qF	TGTCGCGTGTGAAACACTTC
tubulin-qR	AGCAGGCGTTTCCAATCTG
nejEP ¹¹⁷⁹ -qF	AAGTGGATGTCTCTTGCCGA
nejEP ¹¹⁷⁹ -qR	TTAACCGCTGTCGGAACACT

F1. táblázat: Primer szekvenciák