

Ph. D. értekezés tézisei

# **Fehérje interakciók az *ecetmuslica* telomerének retrotranszpozonjain**

**Takács Sándor**



Témavezető: Dr. Török Tibor

Biológia Doktori Iskola  
Szegedi Tudományegyetem  
Természettudományi és Informatikai Kar  
Genetikai Tanszék

2014.

Szeged



## Bevezetés

Az *ecetmuslica proliferation disrupter (prod)* génje egy 346 aminosavból álló DNS-kötő kromoszómális fehérjét kódol, mely megtalálható a második és harmadik kromoszómák centromer környéki heterokromatinján, több száz eukromatikus lókuszon, valamint az összes telomeren. A Prod fehérje erősen kötődik a második és harmadik kromoszómák centromerét határoló centromerikus heterokromatinhoz, azon belül is egy  $1,686 \text{ g/cm}^3$  fajsúlyú 10 bp-os szatellita (ProdSat) ismétlődéshez, ahol elengedhetetlen a normális kromoszóma kondenzációhoz. A Prod a heterokromatinon közvetlenül, gyenge affinitással és szekvencia specificitással, kooperatíván köti a DNS-t. Nincs jól jellemezhető DNS-kötő doménje, a fehérje 2/3-a szükséges a DNS kötéshez. A ProdSat-on kívül a fehérje több mint 400 eukromatikus helyen és az összes telomeren kimutatható immunfestéssel, azonban eukromatikus funkciója ez idáig ismeretlen. Munkám során elsősorban a Prod fehérje telomerikus szerepét vizsgáltam.

Az eukarióta telomerek olyan nukleoprotein komplexek, melyek védik a lineáris kromoszómák végeit a degradációtól és a fúziótól, valamint kiegyensúlyozzák a tökéletlen replikáció természetéből adódó rövidülést. Az *ecetmuslica (Drosophila melanogaster)* kromoszómavégei telomeráz által

generált ismétlődések helyett telomer-specifikus retrotranszpozonokat tartalmaznak. Ecetmuslicában a telomeráz enzim teljesen hiányzik, így a telomer három, terminális ismétlődést nem tartalmazó non-LTR retrotranszpozon (*HeT-A*, *TART* és *TAHRE*, továbbiakban HTT) kromoszómavégre történő célzott transzpozíciójával, valamint ezen elemek közötti homológ rekombinációval hosszabbodik. Szerkezetileg az ecetmuslicában is három telomerikus domént tudunk megkülönböztetni: a kromoszómális DNS molekula szabad végét; a retrotranszpozon ismétlődést (HTT sor), valamint a szubtelomerikus heterokromatint, a TAS-t. Bár a telomerikus DNS szekvenciák jól ismertek, a fehérje alkotókról szerzett tudásunk még messze nem teljes. A nagyszámú fehérjéből álló terminális capping komplex szekvencia-specifitással nélkül kapcsolódik a kromoszómavégekhez, és megvédi a kromoszómavéget attól, hogy azt a DNS repair mechanizmus kettős szálú törésként ismerje fel. A HTT domént nyíltabb, eukromatin-szerű szerkezet jellemzi, a retroelemek fej-farok irányultságban helyezkednek el, az oligo(A) farkukkal mindig a centromer felé nézve. A retrotranszpozon sor hosszát és összetételét tekintve jelentős különbség lehet az egyes kromoszómavégek és egyes törzsek között is, de a telomerek hossza egy bizonyos határig genetikailag szabályozott az ecetmuslicában is. A hosszkülönbségek jelentősége és következményei még nem tisztázottak, de a túlságosan hosszú HTT sor csökkenti a termékenységet. A szubtelomerikus ismétlődő szakasz (TAS) - amely a HTT doménnal közvetlenül szomszédos és

attól proximális irányban helyezkedik el - 15-26 kb hosszúságú, és olyan komplex repetitív blokkokból áll, melyek kromoszómánként némileg eltérő szekvenciájúak. A TAS-t bizonyítottan a heterokromatikus, vagyis a szorosan csomagolt kromatinszerkezet jellemzi, így képes HTT retrotranszpozonok aktivitását befolyásolni.

A fent vázolt telomerikus domének nem csak a DNS szekvencia, hanem a hozzájuk kapcsolódó kromatin fehérjék szintjén is elkülöníthetők. Hogy megértsük a telomerhossz szabályozásának mechanizmusát, elengedhetetlen feladat a telomerikus kromatint alkotó fehérjék azonosítása. A HTT sorhoz kapcsolódó fehérjéket nehéz azonosítani, mert ellentétben a capping fehérjék mutánsainak telomer fúziós fenotípusával vagy a TAS-hoz kapcsolódó fehérjék mutánsainak PEV módosító hatásával, a HTT-kötő fehérjék génjeinek nincs megjósolható mutáns fenotípusa, ami egy hatásos genetikai szűrés előfeltétele lenne. Ezért az egyik lehetséges módszer az immunfestéssel telomerikus lokalizációt is mutató ismert kromoszómális fehérjék részletes vizsgálata marad. Ily módon eddig három fehérje került azonosításra, a Prod mellett a Z4 és a JIL-1. Bizonyított, hogy a capping alkotó HP1 kis koncentrációban ugyan, de a HTT és a TAS doméneken is kimutatható kromatin immunprecipitációval. A HP1 és a Prod lehetséges szerepe a HTT soron már részben tisztázott, de a Z4 és JIL-1 fehérjéké még ismeretlen.

## **Célkitűzések**

Célunk a Prod eukromatikus lokuszokon és a telomereken betöltött szerepének tisztázása volt. Sejtbiológiai, molekuláris biológiai és biokémiai módszerekkel terveztük azonosítani a Prod pontos helyét a telomeren. Mivel a Prod nagy valószínűséggel nem egyedül, hanem több más fehérjével együtt, komplexben található meg a telomerikus kromatinban, célul tűztük ki Prod-dal kölcsönható fehérje partnerek azonosítását. Erre élesztő két-hibrid szűrést alkalmaztunk, majd a kölcsönhatást biokémiai és immunfestési kísérletekkel próbáltuk igazolni.

## **Alkalmazott módszerek**

- Kromoszóma immunfestések
- UV keresztkötés, formaldehid keresztkötés és kromatin tisztítás
- GST-pulldown
- BAC filterek és Southern blot hibridizáció
- RNS- és DNS kivonás, cDNS szintézis, qPCR
- Élesztő két-hibrid kísérlet
- Immunprecipitáció

## Eredmények

Ecetmuslica lárva nyálmirigy politén kromoszómáinak immunfluoreszcens festése alapján a Prod fehérje számos eukromatikus helyen túl egyértelműen kijelöli az összes telomert. A telomerek Prod festődési mintázata jól megfelel a *HeT-A* próbákkal történt *in situ* hibridizáció eredményének, ez a Prod-*HeT-A* kapcsolatra utaló jel azonban önmagában nem zárja ki a többi telomerikus szekvenciához való lehetséges kötődést. Az X kromoszómáján TAS-deletált *yellow*<sup>1</sup> törzs Prod immunfestése alapján a Prod fehérje a TAS domén hiányában is kötődik a telomerekhez, ez azonban nem zárja ki a TAS-hoz való kötődést. A domináns *Tel* mutációt tartalmazó törzs a vad típusnál mintegy tízszer hosszabb HTT doménnel rendelkezik, ami főleg a *HeT-A* retrotranszpozon megnövekedett példányszámának köszönhető. Ezt a törzset vad típusú Oregon-R törzssel keresztezve olyan heterozigóta telomereket állíthatunk elő, melyeknek a hosszú HTT-t hordozó *Tel* homológja jóval túlnyúlik a rövidebb Oregon-R homológon. A Prod festődés a túlnyúló HTT sor teljes hosszán látható, tehát a Prod fehérje a HTT doménhez kapcsolódik. A TAS-t és a terminális retrotranszpozonokat egyaránt eltávolító deficiencia esetében a Prod fehérje telomerikus jelenléte megszűnik. Mivel ezekben az esetekben a terminális cap ép marad, ez bizonyítja, hogy a Prod fehérje nem része a terminális capping komplexnek.

A citológiai bizonyítékokon túl kromatin immunprecipitációval is igazoltuk a Prod fehérje és a *HeT-A* szekvenciák kölcsönhatását. Az UV- és FA-keresztkötött embrió kromatinból kinyert DNS-t  $^{32}\text{P}$ -jelöltük és egy olyan Southern blot-hoz hibridizáltuk, amely a teljes *HeT-A* szekvenciát azonosított helyzetű szubklónok formájában tartalmazta. Ez alapján a Prod közvetlenül a *HeT-A* promóter régió elé kötődik, ami a Prod a *HeT-A* transzkripcióban betöltött lehetséges szabályozó szerepére enged következtetni.

Ezért kvantitatív PCR (qPCR) segítségével megvizsgáltuk, hogy a *prod/CyO* heterozigóta legyekben megváltozott-e a *HeT-A* kópiaszáma. A mérésekből arra lehet következtetni, hogy a *prod* géndózis 50%-os csökkenése nem befolyásolja a transzpozíciók gyakoriságát. Ezután arra voltunk kíváncsiak, hogy a *HeT-A* transzkripció szintje megváltozhatott-e ezekben a heterozigótákban a vad típushoz képest. Ezt kvantitatív reverz-PCR-el (qRT PCR) vizsgáltuk és azt tapasztaltuk, hogy a mért *HeT-A* transzkriptum szint *prod<sup>k08810</sup>/CyO* esetében 6,5-ször, míg *prodH/CyO* esetében 12,5-ször magasabbnak bizonyult, mint az Oregon-R kontrollban. Ezen eredmények alapján a vad típusú Prod fehérje represszió alatt tartja a *HeT-A* transzkripció szintjét, de expressziós szintjének 50%-os csökkenése mégsem emeli a transzpozíciók gyakoriságát.

Az élesztő kettős hibrid rendszerrel végzett kísérlet során a teljes *prod* cDNS-t használva csaliként sikeresen azonosítottunk Prod-dal kölcsönható



fehérjéket, melyek közt megtalálható maga a Prod fehérje is, így most közvetlen igazolást nyert az, hogy a Prod multimerként kötődik a DNS-hez. Azonosításra került a szumoilációs útvonal két fő tagja, ezért feltételezhetjük, hogy a Prod fehérje szumoilálódik, vagy a szumoilációs komplexet köti ki Prod-interaktorok módosításához. A Prod fehérje telomerikus szerepéhez szorosan köthető a Z4 és a Chromator fehérjékkal mutatott kölcsönhatás. A Z4 egyike az ez idáig azonosított telomerikus HTT doménhez kötődő fehérjének, a Chromator a Z4 fehérjével való interakciója alapján azonosították és leírták, hogy jelen van az X és 2L telomereken.

S2 sejtekkel végzett koimmunprecipitációs kísérletekkel igazoltuk, hogy a Chromator *in vivo* kapcsolódik a Prod-hoz, és az ismert Chromator-Z4 interakció alapján feltételezhetünk egy közös komplexet, melynek mindhárom fehérje alkotója, legalábbis a kromoszóma azon helyein, ahol kolokalizálódnak.

Immunfluoreszcens festéseket végeztünk *Tel/Oregon-R* hibrid politén kromoszómákon, melyek során megerősítést nyert, hogy a Z4 kötődik a HTT-hez és kimutattuk, hogy a Chromator is jelen van az összes telomeren. További festésekkel igazoltuk, hogy a telomeren belül mindkét fehérje a HTT sorhoz kötődik, vagyis a HTT domén lehet a potenciális Z4/Chromator/Prod fehérje komplex elsődleges célpontja.

Az élesztő két-hibrid adatok alapján a Prod kölcsönhatásba léphet a szumoilációs enzim kaszkád két legfontosabb tagjával, az Uba2 és az lwr

fehérjékkal. Mivel az Smt3 az egyetlen SUMO homológ ecetmuslicában, egy anti-Smt3 ellenanyaggal való festéssel azonosíthatóak a szumoilált fehérjék a politén kromoszómákon. A már említett festési módszerekkel megvizsgáltuk ezen módosítás jelenlétét és eloszlását a telomereken. Az Smt3 telomerikus lokalizációja jelzi, hogy a HTT sor erősen szumoilált. A telomerek szumoilációs mintázata egybevág a Prod lokalizációval, azaz az Smt3 végig megtalálható a HTT soron, de nem kapcsolódik a TAS-hoz és nem része a telomerikus cap-nek sem.

A HTT domén kromatin állapota a retrotranszpozíció és a génkonverzió szabályozásán keresztül befolyásolhatja a telomerhosszt. Heterozigóta mutánsokban a fehérje koncentráció a felére csökken, ami mutáns fenotípus megjelenéséhez vezethet, ha a fenotípus kellően érzékeny a géndózisra. Esetünkben a telomerikus fehérjék heterozigóta törzseiben ez megváltoztathatja a telomerek hosszát. Ennek vizsgálatára kvantitatív PCR segítségével megmértük a mutáns heterozigóták *HeT-A* tartalmát, és összehasonlítottuk a vad típusal. Kísérletünk eredményéből kiderült, hogy a csökkent mennyiségű Prod és a Chromator null allél a vad típusnál némileg hosszabb telomert okoz, míg a Z4 és SUMO redukált szintje nincs hatással a telomerhosszra. Tehát a kromatin szerkezetében vagy a HTT fehérjék szumoiláltságában bekövetkező változás nem feltétlenül elég a transzpozíciók vagy a génkonverzió gyakoriságának megemeléséhez a telomereken.

Az eddig ismert adatok és a kísérleti eredményeink alapján létrehoztuk a *Drosophila* telomerek HTT doménjének lehetséges működési modelljét. A HTT domén fehérje interakciónak központi mediátora a Chromator lehet, amely közvetlenül kölcsönhat a Prod, a JIL-1 és Z4 fehérjékkel. A Z4 a DREF komplex része lehet, a Prod pedig multimerként specifikusan kötődik a *HeT-A* promótert közvetlenül megelőző szakaszhoz. A Prod horgonyozhatja ki a szumoilációs komplexet, és ezzel módosíthatja a különböző komplex alkotók kötési sajátosságait. A szumoilált Egless metilálja a H3 hisztont a 9. lizinjén, mely módosítást felismerve kötődik ide a HP1 és gátolja a transzkripciót.

### **Saját közlemények listája**

Török, T., Benitez, C., Takács, S., és Biessmann, H. (2007). **The protein encoded by the gene proliferation disrupter (prod) is associated with the telomeric retrotransposon array in *Drosophila melanogaster*.** *Chromosoma* **116**, 185-195. IF: 4,337

Takács, S., Biessmann, H., Reddy, H.M., Mason, J.M., Török, T. (2012) **Protein interactions on telomeric retrotransposons in *Drosophila*.** *Int J Biol Sci* **8(7)**:1055-61. IF:3,168