

Az ADA2b adaptor fehérjéket tartalmazó hiszton  
acetiltranszferáz komplexek szerepének vizsgálata  
*Drosophila melanogaster*-ben

**DOKTORI TÉZIS**

**Pankotai Tibor**

Témavezető: **Dr. Boros Imre Miklós**

Szeged, 2007

Készült a Szegedi Tudományegyetem Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszékén

## Bevezetés

A méteres hosszúságú DNS fonálnak megfelelő eukarióta genom mikrométer nagyságrendű sejtmagba történő becsomagolódásakor a genom kromatin szerkezetbe tömörül. A kromatin szerkezet a transzkripció nyitó lépéseként tömör szerkezetből nyitott állapotba kerül. A nyitott konformáció létrehozásának egyik szabályozása a hisztonok N-terminális farki részeinek acetilációja révén valósul meg, mely folyamatokat a hiszton acetiltranszferáz komplexek (HAT) katalizálják. A hiszton acetiltranszferázok öt nagy családját különítik el. A GNAT fehérjecs család HAT és bromodoméneket, a MYST család MYST homológia domént, a p300/CBP család CREB DNS kötő domént és ZZ-TAZ domént tartalmaznak. A nukleáris receptor koaktivátor család tagjai szteroid típusú receptorok által szabályozott útvonalakban közvetítik a jelet, míg a TAF<sub>II</sub>250 család a TFIID komplexben tölt be acetiltranszferáz funkciót. A transzkripció aktivációjakor létrejövő nyitott kromatin szerkezet és a hisztonok acetilációjának kapcsolatára bizonyíték, hogy a transzkripcionálisan aktív gének környezetében található hisztonok hiperacetilált állapotban találhatók és DNáz emésztésre érzékenyek, míg a transzkripcionálisan csendes régiók hipoacetiláltak.

Az egyik legjobban ismert hiszton acetiltranszferáz család a GNAT szupercsalád, melynek számos tagja ismert, mint például a GCN5 (humán homológja a PCAF). Ezen fehérjék rendszerint összetett, nagy molekulaméretű fehérje komplexekben találhatók (az élesztő SAGA és ADA, emlős STAGA és TFII250), amelyek felépítésében számos koaktivátor és adapter fehérje is részt vesz. Az ADA (*alteration/deficiency in activation*) típusú fehérjék számos GCN5 tartalmú komplexben jelen vannak. Feltételezett feladatuk a komplex szubsztrát specifikusságának szabályozása, kölcsönhatás kialakítása más alap transzkripciós faktórral és szekvencia specifikus aktivátorral.

Az ADA típusú fehérjék közé tartozó ADA2 fehérjéről általánosságban elmondható, hogy az N-terminális régióban található bennük egy Zn-ujj szerkezetű DNS-kötő motívum és egy SANT domén. Míg az élesztő genomja csak egyetlen *Ada2* gént tartalmaz addig az *Arabidopsis thaliana*-ban két eltérő, viszont egymással nagy szekvencia homológiát mutató *Ada2* gén található. Hasonlóan két *Ada2* gén található számos magasabbrendű eukariótában, köztük az egér és az ember genomában is.

Csoportunk korábbi eredményei igazolták, hogy a *Drosophila melanogaster* genomja szintén két egymással homológiát mutató ADA2 fehérjét kódoló gént tartalmaz. Az *Ada2a* gén helyzetét a 90F9, míg az *Ada2b* gént a 84F5 citológiai régióban azonosítottam. Élesztő kettős hibrid segítségével kimutattuk, hogy mind az ADA2a, mind az ADA2b képes a *Drosophila* GCN5 fehérjével kölcsönhatást kialakítani, amely bizonyítja, hogy a *Drosophila* ADA2 fehérjék hiszton acetiltranszferáz komplexek felépítésében vesznek részt. A kölcsönhatást immunoprecipitációs kísérletben is sikerült igazolnunk.

Az ADA2a fehérje egy 0,8-1 MDa, míg az ADA2b egy megközelítőleg 2 MDa molekula tömegű komplex tagja. Adataink alapján bizonyítható, hogy a két komplex felépítésében – a GCN5 és ADA3 fehérjéket kivéve – eltérő fehérjék vesznek részt. Az ADA2b tartalmú komplexek az élesztő SAGA komplexéhez mutatnak nagy hasonlóságot, ezért a nevük dSAGA. Az ADA2a tartalmú komplexek viszont az élesztő ADA komplexeivel közel megegyező méretet mutatnak, elnevezésük ATAC (A d a T w o A c o n t a i n g C o m p l e x).

Mivel az ADA2 fehérjék funkciójáról magasabbrendű eukarióta szervezetekben csak csekély információ állt rendelkezésre, ezért célul tűztük ki ezen ADA2 fehérjéket tartalmazó komplexek által szabályozott folyamatok megismerését. Doktori dolgozatomban főként genetikai módszerek felhasználásával az ADA2b fehérje funkcionális vizsgálatát mutatom be. Eredményeim igazolják, hogy az ADA2b fehérje esszenciális a *Drosophila melanogaster* egyedfejlődése során és a fehérje elsődlegesen a H3 hisztonok acetilálásában vesz részt, továbbá elengedhetetlen specifikus gének aktivációjához és szerepet játszik a DNS károsodás felismerésében és javításában.

## **Felhasznált módszerek**

*dAda2b* deléciós mutánsok létrehozása P-elem újramobilizálása útján és a mutánsok letális fázis meghatározása genetikai keresztezésekkel. Transzgenikus *Drosophila* törzsek létrehozása. Ősivarsejt transzplantáció és testi sejt mozaikok létrehozása és vizsgálata. Az apoptózis és fehérje kimutatása nyálmirigy

óriáskromoszóma és lárvális szövetek immunfestésével. S2 sejt kultúra transzfecció. Gén expresszió vizsgálata Affymetrix DNS chip technológia alkalmazásával és az eredmények ellenőrzése kvantitatív real-time PCR segítségével. A DNS chip bioinformatikai analízise. *In vivo* fehérje szint meghatározása *Drosophila* szövetekben a fehérjék eltérő affinitás tag jelölésével, és Western-blot analízissel.

### **Eredmények:**

Az ADA2b fehérjéket tartalmazó komplexek által szabályozott folyamatok megismerése céljából első lépésben P-elem kiugratás segítségével mutációkat hoztam létre az *Ada2b* gén kódoló régiójában. A P-elem kiugratás során azonosított feltételezett deléciós vonalak közül genetikai keresztezések és molekuláris technikák segítségével azonosítottam a csak az *Ada2b* gént érintő mutációkat. Az *Ada2b* deléciós allélokban nem tudtam az ADA2b fehérje jelenlétét kimutatni, amely alapján kijelenthető, hogy az *Ada2b* deléciós allélok null mutánsok.

Az *Ada2b* mutánsok fenotípusára jellemző, hogy az állatok fejlődése a báb állapot P5-ös fejlődési állapotában megreked. A lábaik a vad típustól eltérően nem nyúlnak megfelelően hosszúra, a fej és a szem mérete is jóval kisebb a normálisnál. Az esetek 85%-ban a homozigóta mutánsok ebben az állapotban pusztulnak el, míg a fennmaradó állatok úgynevezett farát adult (a báb állapot P12 stádiuma) állapotban pusztulnak el. Az *Ada2b* gén szabályozó és kódoló régióját tartalmazó transzgénnel az *Ada2b* hiányos állatok menekíthetőek és a kikelt állatok fertilisek. Így a P5-ös báb állapotban tapasztalható letalítás oka egyértelműen az ADA2b hiánya. Ivarsejt mozaikok létrehozásával igazoltam, hogy az anyai hatású ADA2b fehérje elegendő mennyiségben van jelen a korai egyedfejlődés szakaszaiban és ez a fehérje mennyiség képes menekíteni az állatokat a báb állapot elejéig, ugyanis az anyai fehérjetermék eltávolítása korai embrionális letalítást eredményez.

Az *Ada2b* Northern-blot vizsgálata során kiderült, hogy róla két fehérjét kódoló mRNS képződik. Az ADA2b<sup>1</sup> és ADA2b<sup>2</sup> fehérjék követésére létrehoztam a fehérjék GFP-jelölt formáit és ezeket *Drosophila* sejtek és állatok transzformációjára alkalmas

vektorba építettem. A GFP tag-gel jelölt fehérjét kódoló plazmidokkal transzfektált S2 sejtek vizsgálata során megállapítottam, hogy mindkét fehérje termelődik *in vivo*. Sejten belüli elhelyezkedésükben viszont eltérés mutatkozik, ami arra utal, hogy a két fehérje elkülönült feladatokat lát el a sejtben. Az ADA2b<sup>1</sup> a citoplazmában volt megfigyelhető, míg az ADA2b<sup>2</sup> a sejtek magi régiójában helyezkedett el. Az ADA2b<sup>1</sup>-EGFP és ADA2b<sup>2</sup>-EGFP konstrukciókat tartalmazó transzgenikus állatok segítségével megállapítottam, hogy mindkét transzgén csak részlegesen képes az *Ada2b* hiányos állatok menekítésére. Az *Ada2b*<sup>1</sup> és *Ada2b*<sup>2</sup> transzgén együttes jelenléte viszont közel 100%-os menekítést eredményez, amely alapján feltételezhető, hogy a két fehérje egyidejű jelenléte szükséges a normális egyedfejlődés lejátszódásához.

Az ADA2 fehérjék hiszton acetilációt végző komplexek tagjai, ezért megvizsgáltam, hogy az ADA2b tartalmú komplexek mely hisztonok lizinjeinek acetilációját befolyásolják. Megállapítottam, hogy az *Ada2b* null mutáció hatására a H3 hisztonok 9. és 14. lizinjének acetiláltsági szintje csökken. Az ADA2b<sup>1</sup> és ADA2b<sup>2</sup> fehérjék eltérően képesek szabályozni a H3 9. és 14. lizinjeinek acetilációját. Az ADA2b<sup>2</sup> hiánya nem okoz acetilációs csökkenést egyik vizsgált hiszton esetében sem. Az ADA2b<sup>1</sup> hiányában viszont az acetiláció szintje csökkenést mutat – a csökkenés szintje megegyezik az *Ada2b* null mutánsban tapasztalt szinttel - mind a H3 9. és 14. lizinjén. Az acetilációs szint vizsgálata során tapasztalt eredmények előrevetítik azt a feltevést, hogy a két ADA2b fehérje izoforma eltérő folyamatok szabályozásában játszik szerepet.

Az ADA2a és az ADA2b fehérjék eltéréseket mutatnak a szempigment kialakítás, az apoptózis és a mitózis folyamatainak szabályozásában. Az *Ada2* heterozigóta állatokban végzett vörös szempigment mérés eredményei arra engednek következtetni, hogy csak az *Ada2b* gén termékei szükségesek ezen pigment kialakításában. A vörös pigment kialakításban szerepet játszó gének közül a *rosy* gén esetében az expressziós szint ötödére csökkent az *Ada2b* mutánsokban a kontroll állatokhoz képest, míg az *Ada2a* mutáció hatására ez az expressziós szint a vad típusnak megfelelő volt. A két ADA2b fehérje izoforma szintén eltérést mutat a *rosy* gén szabályozásában. Az ADA2b<sup>2</sup> jelenléte szükséges a *rosy* gén expressziójához. Az ADA2b<sup>1</sup> – amely hiányában a H3K9 és H3K14 acetilációja csökken – nem befolyásolta a *rosy* kifejeződést. Így arra következtettem,

hogy a *rosy* gén specifikus aktivitásáért csak az ADA2b<sup>2</sup> szükséges, míg az ADA2b<sup>1</sup> feladata az általános acetilációs mintázat létrehozása a kromoszómán.

Számos korábbi adat utalt arra, hogy a hiszton acetiltranszferázok a programozott sejthalál szabályozásában fontos szerepet töltenek be. Élesztőben és humán sejtvonalakon végzett kísérletek igazolták, hogy a p53 acetilációját GCN5 tartalmú komplexek végzik, de az ADA2 fehérjék és a p53 kapcsolatára kevés számú kísérleti eredmény utalt. A *Drosophila* p53 és az ADA2b fehérjék kölcsönhatására először Kusch és munkatársai élesztő kettős hibrid kísérletei világítottak rá. Az általam használt *in vivo* rendszerben igazoltam, hogy az *Ada2b* mRNS szintjének csökkenése mutációk felhalmozódását okozta, és ennek következtében a markerként vizsgált *mwh* (multiple wing hair - több szőrszálalat eredményező fenotípus) fenotípus gyakrabban figyelhető meg, mint a vad típusú állatokban. Ez arra utal, hogy az ADA2b fehérjék szükségesek a genom stabilitásának fenntartásában, jelenlétükkel képesek segíteni a DNS károsodást felismerő folyamatokat.

A nagy dózisu röntgen sugárzás hatására aktiválódó p53 által szabályozott apoptotikus folyamatok sem tökéletesek az ADA2b fehérjék hiányában. A 40 Gy dózisu röntgen sugárzás hatására elpusztult sejtek mennyisége alacsonyabb a kontroll állatokban tapasztalt szinthez viszonyítva. Megfigyelték, hogy a DNS károsodás hatására a töredezett kromoszóma fragmentumokon erőteljes acetilációs jel figyelhető meg. Feltételezhetően ez a folyamat szükséges a kromatin szerkezet fellazulásához és a törést felismerő és javító komplexek kötődéséhez. Acetiltranszferáz komplexek hiányában pedig a kromatin kisebb mértékben képes fellazulni. Így a sejt nem érzékeli a DNS törését és nem képes a sejtet apoptózisba küldeni. Az ADA2a és ADA2b fehérjék az apoptózisban betöltött szabályozó feladatát a gének szintjén is sikerült kimutatnom. Az ADA2b fehérjék hiányában az *Ark* gén expressziója csökkenést mutat, és korábban bizonyították, hogy az *Ark* géntermék csökkenése az apoptózis aktivációjának elmaradását okozza. Így elképzelhető, hogy a csökkent mennyiségű *Ark* mRNS nem elegendő az apoptózis elindításához. A p53 által szabályozott gének közül vizsgáltam továbbá a *reaper* aktivációját. Röntgen sugárzás után az ADA2b fehérjék hiánya nem volt hatással a *reaper* génre, ugyanis hasonló *reaper* transzkripció növekedést láttunk az *Ada2b* mutánsban, mint a kontroll állatokban. Az ADA2a hiányában viszont nem történt

*reaper* aktiváció. Így arra következtethetünk, hogy az ADA2b és ADA2a fehérjék a p53 által szabályozott apoptózisban szerepet játszó, de különböző gének szabályozását végzik.

A mitótikusan osztódó szövetekben az *Ada2b* mutáció hatására megemelkedik a mitózis M fázisában lévő sejtek száma a kontroll állatokban tapasztalt szinthez képest. Ennek egyik oka lehet, hogy a sejteknek több idő szükséges a G2/M átmenethez. Így egy sejt több időt tölt a sejtciklus egyes lépéseiben és ezért tapasztalható a M fázisú sejtek számának megemelkedése. Ezzel összhangban azt tapasztaltam, hogy a mitózisban nélkülözhetetlen *Map205* gén expressziója *Ada2b* mutánsokban csökken. Megállapítottam, hogy az ADA2b<sup>1</sup> és ADA2b<sup>2</sup> eltérő módon befolyásolja a *Map205* gén kifejeződését. Az *Ada2b* mutáció jelenlétében a *Map205* expressziója jóval alacsonyabb, mint a kontroll állatokban és az ADA2b<sup>2</sup> fehérje hiánya is hasonló változást eredményez. Ez az eredmény bizonyítja, hogy az ADA2b<sup>2</sup> fehérje felelős a *Map205* gén specifikus aktivációjáért, míg az általános acetilációt végző ADA2b<sup>1</sup> nem vesz részt a gén szabályozásában.

Végül azt vizsgáltam, hogy az ADA2 fehérjék milyen specifikus gének szabályozásában vesznek részt. Az ADA2b hiányában kialakuló genom szintű génextpressziós változások detektálásához a DNS microarray technikát alkalmaztam. Megállapítottam, hogy az *Ada2b* mutáció hatására a genom mintegy 6 százaléka mutat az expresszióban eltérést a vad típusú állatokhoz képest. A mutáció 461 gén esetében okoz expresszió növekedést és 368 gén esetében csökkenést. Az expressziós változást mutató gének funkciójuk alapján összhangban vannak a korábbi kísérleti eredményeimmel, miszerint az *Ada2b* mutációja hatással van a szempigment kialakításban, apoptotikus és mitótikus útvonalak szabályozásában. Kimutattam továbbá, hogy a kutikula kialakításában és az immunválaszban az ADA2b fehérje szabályozószerepet tölt be. Annak tisztázása, hogy ezen érintett folyamatokban az ADA2b közvetlen szabályozó funkciót tölt be vagy a hatás csak közvetett folyamatok eredménye további vizsgálatokat igényel.

## **Fő eredményeim**

1. P-elem mutagenézis segítségével létrehoztam egy olyan eddig alig ismert HAT komplex felépítésében részt vevő fehérje mutációját, amely segítségével vizsgálható a komplex *in vivo* funkciója.
2. Kimutattam, hogy az ADA2b fehérje a H3 9. és 14. lizinének acetilációjában vesz részt.
3. Igazoltam, hogy az ADA2b szerepet játszik specifikus gének transzkripcionális aktivációjában, amelyek szükségesek a pigment kialakításához, az apoptózishoz és a mitózis szabályozásához.



## **Publikációs jegyzék**

Komonyi, O., G. Papai, I. Enunlu, S. Muratoglu, **T. Pankotai**, D. Kopitova, P. Maroy, A. Udvardy, and I. Boros. 2005. DTL, the Drosophila homolog of PIMT/Tgs1 nuclear receptor coactivator interacting protein/RNA methyltransferase, has an essential role in development. *Biol Chem.* 2005 Apr 1; 280(13): 12397-404. Epub 2005 Jan 31.

(IF: 5,854)

Pápai, G., O. Komonyi, Z. Tóth, **T. Pankotai**, S. Muratoglu, A. Udvardy, and I. Boros. 2005. Intimate relationship between the genes of two transcriptional ca-activators, ADA2a and PIMT of Drosophila. *Gene.* 2005 Mar 28; 348:13-23.

(IF: 2,694)

**Pankotai T.**, O. Komonyi, L. Bodai L, Zs. Újfaludi, S. Muratoglu, A. Ciurciu, L. Tora, J. Szabad, I. Boros. 2005 The homologous Drosophila transcriptional adaptors ADA2a and ADA2b are both required for normal development, but have different functions *Mol Cell Biol.* 2005 Sep; 25(18):8215-27.

(IF: 7,093)

Ciurciu A., Komonyi O., **Pankotai T.**, Borosi I., 2006. The Drosophila HAT Gcn5 and transcriptional adaptor Ada2a are involved in nucleosomal histone H4 acetylation. *Mol Cell Biol.* 2006 Dec;26(24):9413-23. Epub 2006 Oct 9.

(IF: 7,093)