

**TAF10 fehérjék szerepe *Drosophila
melanogaster*-ben**

Páhi Zoltán Gábor

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Témavezetők:

Prof. Dr. Boros Imre Miklós
tanszékvezető egyetemi tanár

Dr. Pankotai Tibor
tudományos munkatárs

Biológia Doktori Iskola
Szegedi Tudományegyetem

Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar
Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék

Szeged
2017

1. Bevezetés

Eukariótákban a transzkripció iniciáció első lépése során a TFIID kötődik az átírandó gén promóteréhez. A TFIID a promóterekben gyakran megtalálható TATA szekvenciához kapcsolódó TBP-ből, valamint TAF fehérjékből áll. A *humán* és a *Drosophila* TFIID központi része az abban előforduló TAF-ok tekintetében megegyezik: a TAF4, TAF5, TAF6, TAF9, és TAF12 fehérjék mindegyike két kópiában van jelen és kétoldali szimmetrikus „core” TFIID komplexet alkotnak, melyhez a TAF8-TAF10 heterodimer kapcsolódik. Ehhez a 7 különböző TAF fehérjéből álló szub-komplexhez kapcsolódik a többi TAF fehérje, valamint a TBP is, melyek egy-egy kópiában fordulnak elő a komplexben. A TAF fehérjék azonban nemcsak a TFIID komplex részei, hanem hiszton acetil-transzferáz (HAT) komplexekben is előfordulnak. A HAT fehérjék az acetil-csoport áthelyezését katalizálják acetil-koenzim A-ról hiszton fehérjék lizin aminosav oldalláncokra, ezáltal egy nyitottabb kromatin szerkezet kialakulásához járulnak hozzá. *Drosophilában* két GCN5 tartalmú hiszton acetil-transzferáz komplex van, a dSAGA és az dATAC. Mind a dSAGA, mind az dATAC komplex több alegységből épül fel. A HAT modult alkotó dADA3, a dGCN5 és a dSGF29 alegység azonban mindkét komplexben megtalálható. A közös HAT modul

alegységek ellenére az dATAC és a dSAGA komplex eltérő biológiai folyamatok szabályozásában vesz részt és a két komplex eltérő szubsztrát specificitással rendelkezik: a H3 9-es és 14-es lizin acetiláció dSAGA specifikus, míg a H4 5-ös és 8-es lizin acetilációban az dATAC játszik szerepet.

A *Drosophila melanogaster*-ben a humán TAF10 két homológját azonosították: a dTAF10 és dTAF10b fehérjéket. Irodalmi adatok azt feltételezik, hogy a dTAF10 a dTFIID, a dTAF10b fehérje a dSAGA komplex részét képezi. Mindkét fehérje rendelkezik a TAF10 szupercsaládra jellemző konzervált C-terminális doménnal, N-terminális doménjük azonban különböző. A két fehérje aminosav sorrendje 48%-ban megegyezik egymással. A dTAF10b a *humán* TAF10 aminosav sorrendjével összehasonlítva 54%-os egyezést mutat, míg a dTAF10 és a hTAF10 közötti hasonlóság 48%. Jelenleg kevés információ áll rendelkezésre a dTAF10 és dTAF10b fehérjék funkciójáról. Nem tisztázott, hogyan befolyásolják dSAGA hiszton acetiltranszferáz aktivitását, illetve részt vesznek-e a dTFIID összeszerelésében.

Dolgozatomban a dTAF10 és dTAF10b-t nem tartalmazó *Drosophila* törzsek felhasználásával a dTAF10 tartalmú komplexek funkcionális vizsgálatát végeztem.

2. Célkitűzéseim

2.1. Megállapítani azt, hogy a dTAF10/dTAF10b fehérjék hogyan befolyásolják a *Drosophila melanogaster* egyedfejlődését.

2.2. Megállapítani azt, hogy a dTAF10/dTAF10b fehérjék hogyan befolyásolják a dSAGA hiszton acetyltransferáz komplex működését.

2.3. Meghatározni azt, hogy a dTAF10/dTAF10b fehérjék hogyan befolyásolják a dTFIID komplex összeszerelődését.

3. Alkalmazott módszerek

- *Taf10* mutáns *Drosophila* törzsek fenotípusának jellemzése, letális fázis meghatározása
- *dAda2b^{d842}*, *dTaf10^{d25}*, *dAda2a^{d189}* mutáns *Drosophila* lárvák transzkriptóm analízise DNS microarray módszerrel
- H3K9-, H3K14-, H4K8- és H4K12- acetiláció szintjeinek meghatározása L3-as lárvák nyálmirigy kromoszómáinak immunfestésével
- H3K14 acetilációs szintjének meghatározása Western blottal
- ADA2b lokalizációjának meghatározása immunhisztokémiai módszerrel L3-as lárvák nyálmirigy óriáskromoszómáin
- dTAF1, dTAF5, dTAF10 és dTBP fehérjék szintjének vizsgálata immunfestéssel L3-as lárvák nyálmirigy óriáskromoszómáin
- dTAF1, dTAF5, dTAF6 és dTBP fehérje szintjének vizsgálata Western blottal
- dTAF4-dTAF5 kölcsönhatás vizsgálata ko-immunprecipitációval
- ekdizon és koleszterin etetése *dTaf10^{d25}* mutáns lárvák fejlődésére kifejtett hatásának vizsgálata

- *dTaf5*, *dTaf8*, *dTaf10* expressziójának csökkentése gyűrűmirigyben RNS interferenciával
- Ekdizon bioszintézisben résztvevő P450 citokróm gének expressziójának vizsgálata RT-PCR-ral

4. Eredmények

1. Laborunkban korábban, P-elemet hordozó transzgenikus *Drosophila* vonal felhasználásával, *dTaf10b* illetve *dTaf10* géneket érintő deléció hordozó null mutáns állatokat hoztak létre. A *dTaf10^{d25}* törzsben a deléció 900 bázispár hosszúságú, érinti a *dTaf10*, illetve a *dTaf10b* géneket, ugyanakkor a szomszédos génekre (*Aph-1*, *Colt*) nem terjed ki. Fenotípus vizsgálatok során azt láttuk, hogy a dTAF10/dTAF10b fehérjék hiánya késői L3, illetve báb letalitást okoz. A vizsgált *dTaf10^{d25}* deléciót tartalmazó *Drosophila* lárvák 60%-a abnormális bábformát, 40%-a pedig a késői L3 stádiumban pusztul el.

2. Habár a dTAF10b fehérje a dSAGA acetil-transzferáz komplex része, a dTAF10/dTAF10b hiányos állatok transzkriptóm analízise az dATAC (*dADA2a^{d189}*) mutánsokhoz hasonló génexpresszió változásokat eredményezett. Ezekből az eredményekből arra következtettünk, hogy az dATAC és a dTAF10/dTAF10b tartalmú dTFIID komplex hasonló biológiai útvonalak szabályozásában vehetnek részt.

3. Immunfestéssel vizsgáltuk, hogy a dTAF10/dTAF10b hiánya hogyan befolyásolja a dSAGA specifikus H3K9-, H3K14-, valamint az dATAC specifikus H4K8- és a dGCN5 függő H4K12-acetiláció szintjét a politén kromoszómákon. Azt

tapasztaltuk, hogy az dATAC specifikus H4K8- és a dGCN5 specifikus H4K12-acetiláció szintje nem változott, míg a dSAGA specifikus H3K14-acetiláció szintje csökkent a kontrollhoz viszonyítva. Kísérleteink megerősítik, hogy a dTAF10b a dSAGA komplex része és a dTAF10/dTAF10b hiánya nem befolyásolja az dATAC HAT aktivitását.

4. További kísérleteinkben immunfestéssel vizsgáltuk, hogy a dTFIID és a dSAGA alegységek megfigyelhető-e a *Drosophila* politén kromoszómákon dTAF10 fehérjék hiányában. Azt tapasztaltuk, hogy a dTAF10 fehérjéket nem tartalmazó *Drosophila* törzsekben a dTAF5 fehérje mennyisége csökken a kromoszómákon, azonban a dTAF1 és a dTBP mennyisége a kontrollhoz képest nem változik. Továbbá a dADA2b dSAGA alegység lokalizációja sem változik a kromoszómák különböző régióiban a kontrollhoz viszonyítva. Mivel a dTAF5 hiánya a dTFIID degradációját is előidézheti, Western-blot segítségével megvizsgáltuk az egyes dTFIID alegységek fehérjeszintjét kontroll és dTAF10 fehérjéket nem tartalmazó *Drosophilákban*. A kontroll és a dTAF10 hiányos állatokban közel azonos dTAF5 és dTAF1 fehérje szintet detektáltunk, míg a dTBP és a dTAF6 fehérjék szintje a kontrollhoz képest jelentősen lecsökkent. Eredményeinkből arra következtettünk, hogy a dTAF10 fehérjék nincsenek hatással a dTAF5 fehérje szintjére, viszont a jelenlétük

szükséges ahhoz, hogy a dTAF5 tartalmú dTFIID kötődni tudjon a gének promóter régióihoz. Ezzel ellentétben a dTAF1, valamint a dTBP tartalmú dTFIID lokalizációja nem függ a dTAF10/dTAF10b fehérjék jelenlététől.

5. A dTAF4 és a dTAF5 fehérjék kölcsönhatásának központi szerepe van a dTFIID komplex integritásának fenntartásában. Kísérleteink során ko-immunprecipitációval vizsgáltuk, hogy a dTAF4-dTAF5 interakció kialakulhat-e dTAF10 fehérjék hiányában is. Azt tapasztaltuk, hogy a dTAF4 és a dTAF5 fehérjék közti kölcsönhatás kimutatható a kontroll és a dTAF10 fehérjéket nem tartalmazó transzgenikus lárvákban is. Eredményeink alapján arra következtetünk, hogy a dTAF10 fehérjék hiányában is kialakulhat funkcionálisan működő dTAF4 és dTAF5 tartalmú dTFIID komplex.

6. Fenotípus vizsgálatok során azt láttuk, hogy a *dTaf10^{d25}* mutáns állatok körülbelül 40%-a késői L3 stádiumban elpusztul. Korábbi kísérleteinkben igazoltuk, hogy a dATAC mutánsok L3 lárvális letalitása az ekdizon hiánya miatt következik be, ezért feltételeztük, hogy a dTAF10 fehérjéket nem tartalmazó *Drosophilákban* is az ekdizon hiánya lehet felelős az L3 végi letalításért. Ezért a *dTaf10^{d25}* L3 lárvákat ekdizonnal kiegészített standard, illetve normál táptalajon neveltük. Azt láttuk, hogy az ekdizonnal kiegészített táptalajon fenntartott lárvák több, mint 80%-a elérte a báb stádiumot.

Eredményeinkből feltételeztük, hogy az L3 végi letalitás az ekdizon hiánya miatt következik be és megvizsgáltuk, hogy ezt mi okozhatja. Az ekdizon a táplálékkal felvett koleszterinből szintetizálódik a gyűrűmirigy sejtjeiben, majd a hemolimfába szekretálódik, ahol a zsírtestben expresszáldó *shade* által kódolt enzim átalakítja 20-hidroxi-ekdizonná. Ekdizon hiányos állapotot okozhat az, ha nem áll rendelkezésre elegendő koleszterin, melyet a lárvák a táptalajból vesznek fel. Ezért *dTaf10^{d25}* lárvákat koleszterinnel kiegészített normál táptalajon, valamint standard táptalajon tartottuk fent. Azt láttuk, hogy a koleszterin nem menekítette az L3 végi letális fenotípust. Ezáltal megállapítható, hogy az ekdizon hiánya a *dTaf10^{d25}* mutánsoknál nem abból adódik, hogy nem áll rendelkezésre elegendő metabolikus prekursor az ekdizon szintéziséhez.

7. További kísérleteinkben vizsgáltuk, hogy a dTAF10 hiánya befolyásolja-e a gyűrűmirigyben végbemenő ekdizon szintézist. Ehhez először azt vizsgáltuk, hogy a *dTaf10* mRNS szintjének csökkentése RNS interferencia módszerrel specifikusan a gyűrűmirigyben milyen fenotípust eredményez. Azt láttuk, hogy a *dTaf10* expressziójának csökkentése - a *dTaf10^{d25}* mutánsokhoz hasonlóan - L3 végi-korai báb letalitást eredményezett. Az ekdizon etetés azonban menekítette a *dTaf10* expresszió csökkenése miatt kialakuló L3 végi letalitást. Ezért feltételeztük, hogy a dTAF10 hiánya befolyásolja a

gyűrűmirigyben végbemenő ekdizon bioszintézist. További kísérleteinkben azt láttuk, hogy nemcsak a *dTaf10* de a *dTaf5* és a *dTaf8* gyűrűmirigybeli expressziójának csökkentése is L3 végi letalitást eredményezett. Ekdizon etetése, hasonlóan a *dTaf10* estében tapasztalhoz, a *dTaf5* és a *dTaf8* expresszió csökkentése miatt kialakult L3 végi letális fenotípust is menekítette. Eredményeink azt sugallják, hogy a dTAF5, dTAF8, dTAF10 tartalmú dTFIID komplex fontos szerepet játszik a gyűrűmirigyben végbemenő ekdizon szintézisben.

8. Kutatócsoportunk korábban kimutatta, hogy az *dAda2a^{d189}* (dATAC) mutánsokban az ekdizon szintézisben résztvevő *Halloween* gének expressziója csökken. Microarray adatok összehasonlításával pedig azt tapasztaltuk, hogy a dTAF10/dTAF10b hiányában kialakuló transzkripciós változások nagy mértékben hasonlítanak a dADA2a hiányában bekövetkező transzkripciós változásokhoz. Ezért vizsgáltuk, hogy dTAF10/dTAF10b hiánya befolyásolja-e az ekdizon bioszintézisben szerepet játszó gének expresszióját. A microarray adatok azt mutatták, hogy a *dTaf10^{d25}* mutánsokban csökken a gyűrűmirigyben expresszálódó ekdizon bioszintézisben szerepet játszó *Halloween* gének (*spookier*, *phantom*, *disembodied*, *shadow*, *neverland*) mRNS szintje. A perifériális szövetekben expresszálódó *shade* mRNS szintje viszont emelkedett dTAF10/dTAF10b hiány esetén.

Eredményeink azt sugallják, hogy a dTAF10/dTAF10b tartalmú komplexek befolyásolják a gyűrűmirigyben expresszáldó *Halloween* gének transzkripcióját.

A *dAda2a^{d189}* valamint a *dTaf10^{d25}* mutánsok micorarray adatainak összehasonlításánál azt láttuk, hogy az ekdizon bioszintézisben résztvevő gének expressziós mintázata a dATAC és a *dTaf10^{d25}* mutánsokban nagymértékben hasonlít. Eredményeink arra utalnak, hogy az dATAC, valamint a *dTaf10^{d25}* mutánsokban tapasztalt transzkripciós változások nagyrészt az ekdizon hormon hiánya miatt alakulnak ki, továbbá, hogy mind az dATAC, mind a dTAF10/dTAF10b tartalmú komplexek működése nélkülözhetetlen az ekdizon által szabályozott egyedfejlődésben.

5. Publikációs lista

MTMT azonosító: 10048807

A dolgozat alapjául szolgáló közlemény:

Pahi Z, Kiss Z, Komonyi O, Borsos BN, Tora L, Boros IM, Pankotai T.

dTAF10- and dTAF10b-Containing Complexes Are Required for Ecdysone-Driven Larval-Pupal Morphogenesis in *Drosophila melanogaster*

PLoS One 10:(11) Paper e0142226. (2015)

IF: (2015) 3,06

Egyéb közlemények:

Borsos BN, Pankotai T, Kovacs D, Popescu C, Pahi Z, Boros IM.

Acetylations of Ftz-F1 and histone H4K5 are required for the fine-tuning of ecdysone biosynthesis during *Drosophila* metamorphosis.

Developmental Biology 404:(1)pp. 80-87.(2015)

IF: (2015) 3,16

Villanyi Z, Ribaud V, Kassem S, Panasenko OO, Pahi Z, Gupta I, Steinmetz L, Boros I, Collart MA.

The not5 subunit of the ccr4-not complex connects transcription and translation.

PLoS Genetics 10:(10)Paper e1004569. 15 p.(2014)

IF: (2014) 7,15

Összesített impakt faktor: 13,37

Konferencia poszterek:

Annual Meeting of the Hungarian Biochemical Society Szeged 2016

Zoltan Gabor Pahi, Zsuzsanna Kiss, Orbán Komonyi, Barbara N. Borsos, Laszlo Tora, Imre M. Boros, Tibor Pankotai
The role of TAF10/TAF10b containing complexes in *Drosophila melanogaster*.

FEBS3+ Meeting Molecules of Life. Portoroz, Slovenia 2015

Zoltan Gabor Pahi, Zsuzsanna Kiss, Orbán Komonyi, Barbara Nikolett Borsos, Laszlo Tora, Imre Miklos Boros, Tibor Pankotai
The TAF10-containing TFIID is necessary for the ecdysone induced larval-pupal transition of *Drosophila melanogaster*.

Hungarian Molecular Life Sciences Conference, Eger 2015

Zoltán Gábor Páhi, Zsuzsanna Kiss, Orbán Komonyi, Barbara Nikolett Borsos, László Tora, Imre Miklós Boros, Tibor Pankotai

The TAF10-containing TFIID is necessary for the ecdysone inducing larval-pupal transition in *Drosophila melanogaster*.

Danube Scientific conferences on epigenetics 2014

Barbara N. Borsos, Tibor Pankotai, Dávid Kovács, Christina Popescu, Zoltán Páhi, Imre M. Boros.

Acetylations of Ftz-F1 and histone H4K5 are required for the fine-tuning of ecdysone biosynthesis during *Drosophila* metamorphosis.

The 18Th Annual Meeting of The RNA Society; Davos, Switzerland 2013

Zoltan Villanyi, Sujatha Subbana, Olesya Panasenka, Zoltan Páhi, Imre Boros, Martine Collart.

A New Role for NOT5 of the CCR4-NOT Complex in Connecting Transcription with Translation

Hungarian Molecular Life Sciences Conference, Siófok 2013

Zoltán Gábor Páhi, Tibor Pankotai, Barbara Nikolett Borsos, Imre Miklós Boros. TAF10 proteins indicate structural and functional links between histone acetyltransferase and basal transcription factor complexes.

Magyar Biokémiai Egyesület 2011. évi Vándorgyűlése

Páhi Z. G., Pankotai T, Boros I. M.;

The role of TAF10 in *Drosophila melanogaster*.

Magyar Biokémiai Egyesület 2010. évi vándorgyűlése

Páhi Z. G., Schauer T., Boros I. M. Investigation of mutant DTL proteins in *Drosophila melanogaster*.

Ismeretterjesztő közlemények:

Páhi Zoltán Gábor

Mérföldkövek a rákkutatásban

ÉLET ÉS TUDOMÁNY 70:(6) pp. 174-175. (2015)

Páhi Zoltán Gábor

Mérföldkövek a rákkutatásban. 2. rész.

ÉLET ÉS TUDOMÁNY 70:(7) pp. 206-207. (2015)

Borsos Barbara, Majoros Hajnalka, Újfaludi Zsuzsanna, Páhi Zoltán, Pankotai Tibor

DNS-hibák és ami mögöttük van

ÉLET ÉS TUDOMÁNY LXXI:(6) pp. 180-182. (2016)