

***A Drosophila melanogaster Dtl és Ada2a/Rpb4 génjeinek  
szerkezeti és funkcionális vizsgálata***

A PhD értekezés tézisei

Pápai Gábor

Témavezető: Dr. Boros Imre

MTA Szegedi Biológiai Központ  
Biokémiai Intézet

2005

## Bevezetés

Dolgozatomban két *Drosophila melanogaster* (ecetmuslica) gén szerkezetét, szabályozását és az egyik gén termékének funkcióját tárgyalom.

Az eukarióta génkifejeződés szabályozása egy bonyolult, több szinten megvalósuló folyamat. Az első lépést, a transzkripciót is számos fehérje szabályozza. Ezek az alap transzkripciós faktorok, amelyek a tényleges polinukleotid lánc szintézisét végző RNS polimeráz II mellett részt vesznek az átíródás elindításában, megkönnyítésében, valamint a startpontjának meghatározásában. Ezek az alap transzkripciós faktorok jól definiált DNS szekvenciákhoz kötődnek, és úgy fejtik ki szabályozó hatásukat. Ezek a DNS szekvenciák általában a transzkripció kezdőpontjához mintegy száz bázispáros szakaszon belül helyezkednek el a gén alap promóterét alkotva.

Az alap transzkripciós faktorokra transzkripciós aktivátorok és represszorok hatnak enhanszer szekvenciákon át. Ezek a faktorok szabályozzák a gének térben és időben való kifejeződését. Az enhanszerek a transzkripció kezdőpontjától akár több ezer bázispárra is elhelyezkedhetnek mindkét irányban.

A gén átíródását befolyásolja a gén kromatin környezete. Ezt képesek befolyásolni különböző adaptor és mediátor fehérje-komplexek. Ezek a komplexek azáltal, hogy fellazítják az aktiválandó gén kromatin struktúráját, lehetővé teszik, hogy alap transzkripciós faktorok és transzkripciós aktivátorok kötődjenek az egyes promóter elemekhez.

Egy sejt nem csak magát a transzkripciót képes szabályozni, hanem lehetőség van a transzkripció után is a gén kifejeződésének szabályozására. Az egyes gének kifejeződése függ a róluk képződő mRNS stabilitásától, esetleg szelektív bontásától, valamint a transzláció hatékonyságától is.

## **A dolgozat előzményei, célkitűzések**

A csoportunk fő érdeklődési területe az eukarióta és virális transzkripció szabályozás. A dolgozatban szereplő géneket azért kezdtük el vizsgálni, mivel a *Dtl* gén terméke, a DTL fehérje egy tesztben képes volt kötődni a HIV-1 vírus szabályozó RNS-éhez, a TAR RNS-hez, míg a mellette elhelyezkedő másik gén pedig egy transzkripciós aktivátort és egy alap transzkripciós faktort kódol.

A munka kezdetekor a *Drosophila* Genom Annotációs Program még éppen csak elkezdődött, nem állt rendelkezésünkre az ecetmuslica genomjának szekvenciája. Így először azt kívántuk kideríteni, hogy a két gén pontosan hol helyezkedik el, mekkora a kiterjedésük és milyen a szerkezetük.

Kíváncsiak voltunk arra is, hogy hol helyezkedik el a két gén alap promótere, milyen elemek alkotják, valamint hol található egyéb szabályozó régiók.

Természetesen szerettük volna meghatározni a két gén funkcióját is. A dolgozatban csak az eddig ismeretlen funkciójú DTL fehérjét kódoló gén funkcionális vizsgálatát ismertetem, mivel az *Ada2a/Rpb4* gén termékeit egy korábbi munkában már leírtuk.

## **Alkalmazott módszerek**

- DNS modifikációs technikák
- RNS preparálás kifejlett ecetmuslicákból
- cDNS-ek 5' végeinek klónozása (5' RACE)
- Southern hibridizáció
- RT-PCR
- Ecetmuslica szöveteinek festése
- Schneider S2 sejtek transzfektálása és lumineszcencia mérés

- Schneider S2 sejtmagi extraktum készítése
- Gélretardáció
- *Drosophila melanogaster* embrió kivonat készítése
- RNS stabilitás vizsgálat
- Formaldehides gélelektroforézis
- Duplaszálú RNS kimutatás (RNase Protection Assay)
- Denaturáló poliakrilamid gélelektroforézis
- Immunprecipitáció
- Northern hibridizáció

## **Tudományos eredmények és következtetések**

### *A Drosophila melanogaster Ada2a/Rpb4 és Dtl gének szerkezeti analízise*

Dolgozatomban a *Drosophila melanogaster* 90F9-11-es citológiai régiójában található két gént vizsgáltam különböző *in vivo* és *in vitro* technikák alkalmazásával. A munka kezdetekor még nem azonosították egyik gént sem, így nekünk adatott meg a lehetőség erre. Sikerült megállapítanunk mindkét gén pontos elhelyezkedését és exon-intron struktúráját. Homológiák alapján neveztük el a két gént. Az első gént, mivel terméke hasonlóságot mutatott a HIV vírus TAT fehérjéjével, a *Dtl* (*Drosophila* Tat-Like) nevet kapta. A másikat az élesztő *Ada2* génnel való nagyfokú homológiája alapján, valamint a róla alteratív RNS éréssel képződő másik fehérjének az RNS polimeráz II 4. legnagyobb alegségével mutatott azonossága alapján elneveztük *Ada2a/Rpb4*-nek. Az *Ada2a/Rpb4* génről bebizonyítottuk, hogy alternatív éréssel két mRNS képződik róla, míg a *Dtl* gén két nyitott leolvasási keretet tartalmaz. Az *Ada2a/Rpb4* génről képződő két mRNS-nek ugyanott kezdődik a

transzkripciója. Ez azt jelenti, hogy a két mRNS ugyanarról a promoterről íródik át, egy pre-mRNS-ből képződnek alternatív éréssel.

#### *Az Ada2a/Rpb4 gén in vitro és in vivo vizsgálata*

A két gén pontos elhelyezkedésének térképezésekor megállapítottuk, hogy az 5' végük csupán 73 bázispárra van egymástól. Egyes megállapítások szerint egy átlagos *Drosophila melanogaster* promóter 70-80 bázispár kiterjedésű, míg mások ezt több mint száz bázispárra teszik. A két gén meglehetősen közeli elhelyezkedése felveti annak a lehetőségét, hogy a promóterek részben, vagy teljesen átfednek. Az is elképzelhető, hogy egyes regulátor szakaszok a másik gén kódoló régiójában foglalnak helyet. Ennek kiderítésére szövettényészetben végzett kísérletekkel és transzgenikus legyek felhasználásával térképeztük a gének szabályozó elemeit. Az *Ada2a/Rpb4 in vivo* promóter analízise azt mutatta, hogy a transzkripció iniciációjához szükséges promóter elemek egy rövid, 79 bázispáros szakaszon vannak.

Transzgenikus legyekben az *Ada2a/Rpb4* promóter szövetspecifikus expressziót mutat: lárvákban az agyban, a herében és az imágó korongokban észleltünk promóter működésre utaló  $\beta$ -galaktozidáz kifejeződést, míg a kifejlett egyedeknek csak a gonádjai festődtek. Mivel az ADA2a egy általános koaktivátor, valamint az RPB4 az RNS polimeráz II alegysége, valószínű, hogy az észlelt génkifejeződés más szövetspecifikus enhancerek hiányában jöhetett létre. Az eredmény viszont megerősíti, hogy a vizsgált promóter fragmentumon megtalálhatók a transzkripció iniciációjához szükséges alap-promóter elemek.

#### *A Dtl gén in vitro és in vivo vizsgálata*

A *Dtl* gén promóterét Schneider S2 sejtekben analizálva megállapítottuk, hogy a vizsgált promóter szakaszon a transzkripció erősségét jelentősen

befolyásoló szekvencia elem(ek) található(k). Ezen elem, vagy elemek helyzetét luciferáz riportergén kísérletekkel a transzkripciós startponttól számított (-412)-(-616)-os promóter szakaszra lokalizáltuk. A szabályozó cisz elem(ek) az *Ada2a/Rpb4* gén kódoló régiójában található(k), nem pedig intronban. Az exonokban található promóter szekvenciák általában az RNS érésben vesznek részt, nem a transzkripció erősségének szabályozásában.

A *Dtl* gén promóterét is megvizsgáltuk transzgenikus ecetmuslicák segítségével. Itt két promóter szakaszt is vizsgáltunk, egy hosszabb, az általunk vizsgált teljes promóterszakaszt, és egy rövidebb, a transzkripciós startpont előtt mintegy 141 bázispárt tartalmazót. Hasonlóan az *Ada2a/Rpb4* promóternél tapasztaltakkal, itt is limitált szöveti kifejeződést észleltünk, bár a *Dtl* expressziója több szövetben nyilvánult meg. Különbség mutatkozott a vizsgált két promóter szakasz között. A hosszabb fragmentum nem mutatott olyan kifejezett expressziót a lárvák nyálmirigyében és belében, mint a rövidebb. Az észlelt különbség oka lehet, hogy a hosszabb promóter fragmentumon elhelyezkedhet olyan cisz elem, amely ezekben a szövetekben fejt ki represszálo hatását.

#### *A két gén promóterének in vitro DNS-fehérje kötési vizsgálata*

A Schneider S2 sejtekben tapasztaltak alapján azt feltételeztük, hogy a *Dtl* gén szabályozó régiója belenyúlik az *Ada2a/Rpb4* gén kódoló régiójába. Ezt a feltételezést próbáltuk alátámasztani *in vitro* DNS-fehérje kötési vizsgálatokkal. Specifikus DNS-fehérje komplexeket mutattunk ki az *Ada2a/Rpb4* gén transzlálódó szakaszán, valamint a két gén között. Ezen a szakaszon *in silico* vizsgálatok három transzkripciós faktor kötőhelyet jósoltak, a Tramtrack, a Fushi Tarazu és a Suppressor of Hairless fehérjékét. Ezeknek a transzkripciós faktoroknak a *Dtl* gén expressziójában játszott szerepe még nem tisztázott.

Specifikus DNS-fehérje komplexet detektáltunk EMSA-val a két gén transzkripciós startpontja közötti szakaszon is. Szintetikus duplaszálú oligonukleotid és  $\alpha$ -DREF (DRE binding Factor) ellenanyag segítségével bizonyítottuk, hogy a DNS-fehérje kölcsönhatásért a DRE (DNA replication-related element) elem a felelős. DRE mutáns promóterszekvenciát tartalmazó konstrukciókkal kimutattuk, hogy a DRE elem az *Ada2a/Rpb4* gén expressziójában játszik szerepet, miközben a *Dtl* expressziója a mutáció hatására nem változott.

#### *Az Ada2a/Rpb4 és Dtl gén RNS szintű szabályozása*

Ribonukleáz védési vizsgálatokkal az *Ada2a/Rpb4* gén utolsó négy exonját tartalmazó genomikus régióban ellentétes irányú, átfedő RNS transzkriptumot detektáltunk, valamint erről a régióról *in vitro* transzkripcióval átírt radioaktív egyesszálú RNS specifikus bomlást mutatott *Drosophila* embrió kivonatban. Abban az esetben, ha ezt a radioaktív RNS-t olyan embrió kivonatban inkubáltuk, amelyből a nagy molekulatömegű enzim-komplexeket kiülepítettük, akkor az RNS intakt maradt. Ebből arra következtettünk, hogy a bomlásért egy nagy molekulatömegű enzim-komplex a felelős. Ezek alapján feltételeztük, hogy a folyamatért az RNS interferencia felelős.

#### *A Dtl gén funkcionális vizsgálata*

A DTL fehérje működésének megértésére hiánymutáns állatokat hoztunk létre, és megállapítottuk, hogy a fehérje hiányában az ecetmuslicák L2-L3 lárvális stádiumban elpusztulnak. Immunhisztokémiai és immunprecipitációs kísérletek alapján, DTL hiányában az ecetmuslica kromoszómái a mitózis folyamán rendellenesen szegregálódnak, és a kis RNS-ek rendellenes érésen mennek keresztül: az 5' cap struktúra megváltozik, nem trimetilálódik. A

mutáns törzsek különböző transzgénekkal való menekítési kísérletei azt mutatták, hogy a mutáns fenotípust a DTL fehérje, és a gén 5' végén található másik nyitott leolvasási keret (DTLu) együttes hiánya okozza. A DTL fehérjén található egy RNS-metiltranszferáz domén, valamint egy feltételezett RNS kötő motívum is. Ennek a két motívumnak a szerepe a mutáns fenotípus kialakításában még nem tisztázott. A DTLu-nak eddig csak egy rokon élőlényben a *Drosophila pseudoobscurában* találtunk homológját, pontos funkciójának meghatározása még várat magára.

### **Legfontosabb Eredmények**

1. Különböző térképezési módszerek használatával meghatároztuk a *Dtl* és *Ada2a/Rpb4* gének szerkezetét és a róluk folyó transzkripció kezdőpontjait.
2. *In vivo* és *in vitro* módszerekkel térképeztük az egyes gének szabályozó elemeit, meghatároztuk, hogy ezek átfednek, ami egy esetleges funkcionális kapcsolatra utal a két gén termékei között.
3. Bizonyítottuk, hogy a két gén transzkripció startpontja között egy működő DRE elem található, valamint, hogy ennek hiánya csak az *Ada2a/Rpb4* gén kifejeződésére van hatással.
4. Kísérleteink arra utalnak, hogy a két génnek egy közös, RNS szintű szabályozása is megvalósul.
5. Megállapítottuk, hogy a DTL fehérje esszenciális, hiányában az *ecetmuslica* lárvák osztódó szöveteiben a kromoszómák rendellenesen szegregálódnak, valamint a kis RNS-ek cap struktúrája megváltozik.



## Közlemények, előadások

### *Közlemények*

Rakonczay Z. Jr, Takács T., Mándi Y., Iványi B., Varga I., **Pápai G.**, Boros I., Lonovics J.: Water immersion pretreatment decreases pro-inflammatory cytokine production in cholecystokinin-octapeptide-induced acute pancreatitis in rats: possible role of HSP72.

Int J Hyperthermia. 2001, 17: 520-535

Rakonczay Z. Jr, Takács T., Iványi B., Mándi Y., **Pápai G.**, Boros I., Varga I., Jost K., Lonovics J.: The effects of hypo- and hyperthermic pretreatment on sodium taurocholate-induced acute pancreatitis in rats.

Pancreas 2002, 24: 83-89

Rakonczay Z. Jr, Takács T., Iványi B., Mándi Y., **Pápai G.**, Boros I., Varga I., Jost K., Lonovics J.: Induction of heat shock proteins fails to produce protection against trypsin-induced acute pancreatitis in rats.

Clin Exp Med. 2002, 2: 89-97

\*Muratoglu S., Georgieva S., **Pápai G.**, Scheer E., Enünlü I., Komonyi O., Cserpán I., Lebedeva L., Nabirochkina E., Udvardy A., Tora L., Boros I.: Two different *Drosophila* ADA2 homologues are present in distinct GCN5 histone acetyltransferase-containing complexes

Mol Cell Biol. 2003, Jan;23(1): 306-21.

Enunlu I., **Pápai G.**, Cserpan I., Udvardy A., Jeang KT., Boros I. Different isoforms of PRIP-interacting protein with methyltransferase domain/trimethylguanosine synthase localizes to the cytoplasm and nucleus

Biochem Bioph Res Co. 2003, 309: 44-51

\***Pápai G.**, Komonyi O., Tóth Z., Pankotai T., Muratoglu S., Udvardy A., Boros I. Intimate relationship between the genes of two transcriptional co-activators, ADA2a and PIMT of *Drosophila*

Gene – Közlés alatt

\*Komonyi O., **Pápai G.**, Enunlu I., Muratoglu S., Pankotai T., Kopitova D., Maróy P., Udvardy A., Boros I. DTL the *Drosophila* homologue of PIMT/Tgs1, nuclear receptor coactivator interacting protein/RNA methyltransferase, has essential role in development

J Biol Chem. – Közlés alatt

\* A disszertáció alapjául szolgáló közlemények

*Nemzetközi tudományos folyóiratban megjelent összefoglalók*

Szabolcs A., Hegyi P., **Papai G.**, Varga I., Kaszaki J., Letoha T., Sari R., Rakonczay Z., Lonovics J., Reiter R.J., Takacs T.  
Effect of Melatonin on the severity of L-arginine-induced experimental acute pancreatitis in rats.  
Z Gastroenterol. 2004, 42: 439

Szabolcs A., Hegyi P., **Papai G.**, Varga I., Kaszaki J., Letoha T., Sari R., Rakonczay Z., Lonovics J., Reiter R.J., Takacs T.  
The effect of a free radical scavenger on the severity of L-arginine-induced experimental acute pancreatitis in rats. (poszter)  
Pancreatology. 2004, 4: 177

**Gábor Pápai**

Study of two overlapping genes in *Drosophila melanogaster*  
Acta Biol Szeged. 2002, 46: 43

**Papai G.**, Muratoglu S., Boros I., Udvardy A.  
Novel Drosophila genes controlled by RNA interference  
European Journal of Biochemistry 2001 268. Supl. 1.

*Előadások, poszterek*

**Pápai G.**, Komonyi O., Deák P., Boros I.  
RNA methylation and telomere – is there a link? Szeged 2004.

**Pápai G.**, Komonyi O., Pál M., Deák P., Udvardy A., Szabad J., Boros I.  
DTL, egy RNS metiláz hiánya kromoszóma aberrációkhoz vezet. Pécs 2004.

Komonyi O., **Pápai G.**, Pankotai T., Muratoglu S., Boros I.  
RNS polimeráz II alegységet, transzkripció ko-aktivátort és RNS metiltranszferázt kódoló, egymással átfedő *Drosophila* gének analízise. Pécs 2004.

Pankotai T., Komonyi O., **Pápai G.**, Tora L., Szabad J., Muratoglu S., Boros I.  
ADA2 fehérjék – hasonló szerkezet eltérő funkcióval. Sopron 2004.

Komonyi O., Pankotai T., Pal M., **Papai G.**, Deak P., Szabad J., Udvardy A., Boros I.

Mutation of *dtl*, a newly identified gene encoding an RNA-methyltransferase, results in discless phenotype and chromosome aberrations. Göttingen 2003.

Komonyi O., Pál M., Deák P., **Papai G.**, Udvardy A., Szabad J., Boros I.  
Egy discless fenotípust okozó *Drosophila* mutáció jellemzése. Siófok 2003.

Pankotai T., Komonyi O., **Papai G.**, Szabad J., Boros I.  
*Drosophila Melanogaster* ADA2 transzkripció koaktivátorok. Siófok 2003.

Muratoglu S., Enünlü I., Komonyi O., **Papai G.**, Pankotai T., Baráth Á., Boros I.  
ADA2 transzkripció adaptorok *Drosophilában*. Tihany 2003.

**Papai G.**, Muratoglu S., Enünlü I., Komonyi O., Tóth Z., Cserpán I., Udvardy A., Boros I.  
Egy komplex genetikai rendszer vizsgálata ecetmuslicában. Keszthely 2002.

**Papai G.**, Enünlü I., Muratoglu S., Tóth Zs., Pankotai T., Komonyi O., Maróy P., Deák P., Cserpán I., Tora L., Udvardy A., Boros I.  
ADA2 transzkripció koaktivátorok *Drosophilában*. Szeged 2002.

**Papai G.**, Muratoglu S., Boros I., Udvardy A.  
In vivo RNS interferencia *Drosophilában*. Sárospatak 2001.

Enünlü I., **Papai G.**, Udvardy A., Jeang KT, Boros I.  
*Drosophila* Tat-rokon fehérje emlős homológja. Sopron 2000.

**Papai G.**, Cserpán I., Muratoglu S., Udvardy A., Boros I.  
HIV TAT fehérjével rokon fehérjék *Drosophilában* és emlősökben. Eger 1999.