

# **A Drosophila telomer védelmét szolgáló fehérjék fajképzésben betöltött lehetséges szerepének vizsgálata**

Ph. D. értekezés tézisei

**Vedelek Balázs**

Témavezetők:

Prof. Boros Imre Miklós  
tanszékvezető egyetemi tanár

Dr. Blastyák András  
Tudományos munkatárs



Biológia Doktori Iskola  
Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék / Biológia  
Intézet  
SZTE TTIK,  
2017  
Szeged

## Bevezetés

Eukariótákban a lineáris kromoszómák végei speciális kromatinszerkezetbe szerveződnek, melyet telomernek nevezünk. A telomer meggátolja a különböző kromoszómák fúzióját és megakadályozza a kromoszómavégek degradációját, hozzájárulva ezzel a genom integritásának megőrzéséhez. Ezekben a folyamatokban kulcsfontosságú szerepet játszik a telomer végét sapkaszerűen borító telomer capping fehérje komplex. Emlősökben shelterinnek nevezzük ezt a komplexet, melynek tagjai nagyfokú konzerváltságot mutatnak.

A telomer biológiában érdekes kivételt képez a *Drosophila* nemzetség, mert ezekben az állatokban a telomer fenntartásának mechanizmusa és a capping komplex összetétele is jelentősen különbözik a kanonikustól. *Drosophilában* a kromoszóma végeket borító fehérje komplexet termininnek nevezzük. A terminin komplexet alkotó fehérjéknek nem ismertek homológjai a *Drosophilák* rokonsági körén kívül. Ellentétben a konzervált shelterin fehérjékkel a terminin tagjai gyors

evolúciót mutatnak. A különbségek ellenére ezek a fehérjék ugyanazt a funkciót látják el, és sok esetben ugyanazokkal a fehérjékkel hatnak kölcsön, mint más fajokban a kanonikus komplex tagjai.

A gyors evolúció és a sejt fenntartásához nélkülözhetetlen funkció, melynek a *Drosophila* telomer capping komplexnek meg kell felelnie, ellentmondásosnak tűnik. A sejtműködés során a fontos funkciókhoz általában konzervált fehérjéket társítunk, mert a változás a fehérje működésképtelenné válását eredményezheti. Mégis előfordul, hogy egy-egy fontos funkciót gyorsan evolválódó protein lát el. Ilyen például egérben a PRDM9, mely a meiotikus forrópontok kijelölését végzi, vagy *Drosophilában* a Hmr és Lhr fehérjék, melyek a centromer kialakításában vesznek részt. Ahhoz, hogy megértsük, hogy egy élőlény miért használhat mégis gyors evolúciójú fehérjét ilyen fontos molekuláris szerepek betöltésére, evolúciós léptékben kell gondolkodnunk. A gyorsan változó, ugyanakkor esszenciális funkcióval rendelkező PRDM9 és a Hmr és Lhr fehérjéknek van egy nem triviális funkciójuk, mégpedig az, hogy felgyorsítják a speciációs

folyamatokat azáltal, hogy meggátolják a hibrid utódok létrejöttét. A fajképzés felgyorsítása megfelelő környezet esetén pedig szelekciós előnyt jelenthet a fajok számára.

Jelenleg nem bizonyított, hogy a *Drosophila* capping komplex részt vesz-e a fajképzésben. Természetesen a gyors evolúció és konzervált funkció kettősségének feloldására más megoldásokat is találhatunk, mint a fajképzésben betöltött szerep. Elképzelhető például, hogy a fehérjék működéséhez és a térszerkezetük fenntartásához nem igénylik a teljes polipeptidlánc konzerválódását. Bármelyik eset vizsgálatához azonban szükségünk van a terminin komplexről rendelkezésünkre álló, korlátozott mennyiségű tudásunk bővítésére. Főként genetikai kísérletek alapján feltételezzük, hogy a *Drosophila* capping komplex öt fehérjéből áll, a Verrocchio (Ver), a DTL, a HOAP, a HipHop és a HP1 fehérjékből. A HP1 az egyetlen konzervált tagja a termininnek, melynek funkciója nem korlátozódik a telomerre, míg a többi fehérje gyors evolúciót mutat és csak a telomeren található meg.

Amennyiben már két közel rokon fajból származó fehérje nem alkot hibrid komplexet, vagy alkot, de a komplex funkciója sérül, akkor ezeknek a fehérjéknek szerepük lehet a fajképzésben. A fehérjék közti interakciónak és a komplex elsődleges funkciójának, a DNS-kötésnek a vizsgálatára *in vitro* módszerekkel lehetőségünk van, azonban a terminin holokomplex összeállítására és vizsgálatára eddig még nem történtek ilyen jellegű kísérletek.

### **Célkitűzések**

A terminin fajképzésben betöltött szerepének tanulmányozáshoz a terminin fehérjék pontosabb ismerete szükséges.

Ezért célunk volt a fehérjék *in silico* vizsgálata, hogy megállapítsuk azonos sebességgel változnak-e az egyes terminin fehérjék részei, vagy vannak-e az evolúció sebességét tekintve eltérő tulajdonságot mutató domének fehérjéken belül is.

Célom volt továbbá a komplex szerveződésének és működésének vizsgálata, heterológ előállított fehérjék

interakciójának, a komplex vagy alkomplokkek formálódásának tanulmányozása révén.

A terminin komplex speciációban játszott szerepére vonatkozó elképzelés megerősítésére célom volt annak vizsgálata, hogy kialakul-e terminin alkomplokkek eltérő fajokból származó alegységekből.

Végül célom volt, hogy az egyes alegységek jellemzésével megállapításokat tegyek az általánostól eltérő szerkezetű *Drosophila* telomer védelmét biztosító terminin komplex és az emlős shelterin komplex működésének hasonlóságairól és sajátosságairól.

### **Felhasznált módszerek**

- a fehérjéket kódoló szakaszok többszörös illesztésével és szinonim és nem szinonim mutációk arányának meghatározásával vizsgáltuk a fehérje domének evolúciójának sebességét
- fehérje szerkezet predikciókat végeztünk a fehérjék interakciós felszíneinek vizsgálata érdekében

- monocisztronos és policisztronos terminin fehérjék baktériumban történő termelésére alkalmas vektorokat állítottunk elő
- a fehérjetermeltetés optimalizálása érdekében többféle expressziós körülményt és baktérium törzset vizsgáltunk és szolubilitási tesztek végeztünk
- a vizsgált fehérjéket tricín-poliakrilamid gélen analizáltuk és western blottal, immunológiai módszerrel azonosítottuk
- a fehérjék azonosítását tömegspektrometriával is elvégeztük
- a fehérjék tisztítását heparin-Sepharose kromatográfiával, vagy immunaffinitás kromatográfiával végeztük
- az alkompexek kialakulását méretkizárásos kromatográfiával erősítettük meg
- a fehérjék DNS kötő képességét DNS-sel borított mágneses gyöngyökkel, bioréteg interferenciával és közvetett módon far-western blot segítségével igazoltuk

## Eredmények

1. Munkám során az *in vitro* kísérleteket megelőzően bioinformatikai módszerekkel részletesen megvizsgáltam a *Drosophila* terminin fehérjék evolúciós sebességét. A számításokba 21 fajt bevonva megállapítottam, hogy a komplex tagjainak interakciós doménjei is felgyorsult evolúciót mutatnak. Ez azt jelenti, hogy a fehérjék közti interakciók nem konzervált doméneken keresztül valósulnak meg, mely a fajképzésben betöltött szerep vizsgálatát indokolja. A fehérjék homológia alapú molekulamodellézését is elvégeztem, azonban a gyorsan evolválódó fehérjék közül csak a Ver esetében sikerült közel megbízható modellt előállítanom. Ezt követően a térszerkezetet és az aminosav konzerváltsági értékeket együtt vizsgálva, a DNS-kötésben, a magi lokalizációban és a szerkezet kialakításában fontos konzervált aminosavakra predikciókat tettem.

2. Immunprecipitációs adatok szerint, a Ver interakcióba lép a DTL-lel és a HOAP-pal, a DTL interakcióba lép a Ver, a HOAP és a HP1 proteinekkal,



míg a HipHop kölcsön hat a HP1-gyel és a HOAP-pal, de nem lép kölcsönhatásba a Ver vagy a DTL fehérjékkel. A komplex további szerveződéséről, sztöchiometriájáról nincs információnk. Annak érdekében, hogy az öt fehérjéből álló komplexet izoláljuk, bakteriális rendszerben termeltettük a *Drosophila melanogaster* fehérjét. Sikeresen előállítottam a HP1, a HOAP, a Ver és a DTL proteineket. A HipHop expressziós szintje azonban többféle expressziós plazmidot és indukciós körülményt kipróbálva is alacsony volt. Mivel az interakciós adatok arra utalnak, hogy a HipHop nélkül is kialakulhat egy stabil komplex, a későbbiekben csak a maradék négy fehérjét vizsgáltuk.

3. A Ver és a DTL fehérjék magas expressziós szintet mutattak ugyan, azonban oldhatatlan formában keletkeztek a baktériumban. A terminin fehérjék oldhatóságán sokat javított az együttes termelésük, és ez lehetővé tette tisztításukat.

4. A négy fehérjét tartalmazó komplex tisztításának első lépéseként a mintát a DNS-kötő fehérjék izolálására gyakran alkalmazott heparin-sepharose oszlopra vittem. Az oszlopról történő elúció során a terminin fehérjék több

alkomplex formájában jelentek meg a frakciókban. A Ver és DTL fehérjék alacsony só koncentráció mellett, míg a HOAP, a HP1 (és a HipHop) fehérjék magas só koncentráció mellett távoztak az oszlopról. A teljes komplex formálódását az elválasztás során alkalmazott só koncentráció változtatásával sem lehetett kimutatni, helyette két alkomplexet azonosítottunk. A Ver és a DTL egyértelműen egy stabil heterodimert alkotott, míg a HOAP és a HP1 egy nehezebben meghatározható sztöchiometriájú másik komplexbe szerveződött. Ezek a szerkezetre vonatkozó adatok összeegyeztethetőek az irodalomból ismert funkcióra utaló adatokkal, miszerint a Ver és a DTL az egyes-szálú hibajavítási mechanizmusok gátlásában vesznek részt, míg a HOAP, a HP1 és a HipHop a kettős-szálú DNS hibajavítás gátlásában.

5. A további kutatásokhoz a Ver-DTL heterodimert választottuk és a két fehérje kifejeződését biztosító plazmidot hoztunk létre. A fajképzésben betöltött szerep vizsgálata érdekében készítettünk egy olyan plazmid konstrukciót is, amely egy közeli rokonból, a *Drosophila yakuba* fajból származó Ver ortológ és *D. melanogaster* DTL kódoló régióját tartalmazza. Az expressziót követően

heparin-Sepharose oszlopon tisztítottuk mind a kétféle plazmidról expresszált fehérjéket. A számunkra érdekes proteineket tartalmazó frakciókat immunaffinitás kromatográfiával és méretkizárásos kromatográfiával is tovább vizsgáltuk. Eredményeink alapján a *D. yakuba* Ver és a *D. melanogaster* DTL fehérjék a köztük lévő szekvencia különbségek ellenére - a *D. melanogaster* Ver-DTL dimerhez hasonlóan - stabil komplexet alkotnak.

6. A Ver-DTL dimerek DNS-kötő képességét is megvizsgáltuk. Ehhez mágneses gyöngyökre egyes-szálú, kettős-szálú és 3' túlnyúló végű oligonukleotidokat kötöttünk és megállapítottuk, hogy a különböző DNS konformációk mennyi fehérje megkötésére alkalmasak. A kísérlet eredményei alapján mind a *D. melanogaster*, mind a hibrid heterodimer nagyobb affinitással kötötte az egyes-szálú DNS-t, mint a kettős-szálút. Ezt az eredményt bioréteg interferencia mérésekkel is megerősítettük.

A Ver térszerkezeti modellje alapján feltételezhetjük, hogy a Ver-DTL interakció a Ver részéről egy konzervált felszínen valósulhat meg, ami azt jelenti, hogy a gyors

evolúció nem az interakciókban részt vevő aminosavakat érinti. Ezért a Ver és a DTL esetében valószínűtlen, hogy a fehérjék gyors változása hozzájáruljon a fajképzéshez az alkompex funkcióvesztése miatt. Más módon természetesen ezek a fehérjék még működhetnek fajképzési korlátként, például hasonlóan a Hmr és Lhr proteinekhez, melyek interakciója elengedhetetlen ehhez a funkcióhoz

Munkámmal hozzájárultam a *Drosophila* telomer capping komplex esszenciális funkciója és a gyors evolúciója között látszó ellentmondás feloldásához. Habár a terminin fehérjék fajképzésben betöltött szerepére nem találtam egyértelmű bizonyítékot, biokémiai megközelítéssel új adatokat nyertem a telomer capping komplexről. A Ver, illetve a Ver-DTL alkompex vizsgálatával bemutattam, hogy hogyan lehetséges egy konzervált funkció elvégzése gyorsan evolválódó fehérjék segítségével.

## Publikációs lista

MTMT azonosító: 10029430

A dolgozat alapját képező közlemény:

### **Cross-Species Interaction between Rapidly Evolving Telomere-Specific *Drosophila* Proteins**

Balázs Vedelek, András Blastyák, Imre M. Boros

Research Article | published 13 Nov 2015 | PLOS ONE (2015 Impact Factor 3.057)

<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0142771>

Egyéb közlemény:

### **mRNA Levels of Related *Abcb* Genes Change Opposite to Each Other upon Histone Deacetylase Inhibition in Drug-Resistant Rat Hepatoma Cells**

Ádám Sike, Enikő Nagy, Balázs Vedelek, Dávid Pusztai, Péter Szerémy, Anikó Venetianer, Imre M. Boros

Research Article | published 07 Jan 2014 | PLOS ONE (2014/2015 Impact Factor 3.234)

<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0084915>

Összesített impact factor: 6,291