

**A felgyorsult fehérje körforgás szerepe a
transzlációs hibákkal szembeni
alkalmazkodási folyamatokban**

Ph.D. értekezés tézisei

Kalapis Dorottya

Témavezető:

Dr. Pál Csaba

tudományos főmunkatárs

Biológia Doktori Iskola

MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biokémia Intézet

Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és
Informatikai Kar

Szeged

2017

Bevezetés

A transláció egyike az élő szervezetekben lejátszódó alapvető felépítő folyamatoknak. A fehérjék az élőlények sejtjeinek fontos építőkövei, ezért a transláció pontos menete a sejtek életműködéseinek szempontjából kiemelt jelentőségű. Ismert azonban, hogy a fehérjék képződése nem hibamentes folyamat, ez pedig hatással van az élőlények életképességére, és számos betegség kialakulásával is összefüggésbe hozható.

A fehérjék képződésének minden részfolyamatában bekövetkezhetnek hibák. Friss kutatások azt is kimutatták, hogy előfordulási gyakoriságuk 3-5 nagyságrenddel meghaladja a DNS másolási hibák előfordulási gyakoriságát. Felmerül a kérdés, hogy ha a translációs rendszer ilyen nagy hibázási valószínűséggel dolgozik, hogyan képesek mégis a sejtek normális életműködéseiket fenntartani?

A folyamatok irányát tekintve a translációs hibákkal szemben kialakult védekező rendszerek két csoportja ismert; a hibák megjelenési arányának csökkentésére

irányuló, valamint a már meglévő hibák által okozott káros hatások mérséklését célzó folyamatok. Jelenleg keveset tudunk arról, hogy ezen védekező mechanizmusok közül melyek és milyen arányban járulnak hozzá a normális sejtműködést biztosító fehérjetartalom kialakításához. Munkánk célja volt felderíteni azokat az alapelveket, melyek mentén a sejtek képesek alkalmazkodni a translációs hibák okozta káros hatásokhoz. Vizsgálatainkat *Saccharomyces cerevisiae* modellszervezeten végeztük, melyben a translációs hibák egy speciális fajtájának, a kétértelmű aminosav kódolásnak a hatásait elemeztük.

Célkitűzések

Munkánk során az evolúcióbiológia, a biokémia, és funkcionális genomika eszközeit ötvözve a következő kérdésekre kerestük a választ:

1. *Saccharomyces cerevisiae* sejtekben laboratóriumi evolúció során mérsékelhető-e a mesterségesen megemelt translációs hibarata okozta rátermettség csökkenés?

2. A translációs hibák okozta rátermettség csökkenés hátterében milyen okok állhatnak?
3. Milyen genetikai és sejtélettani változások teszik lehetővé az emelkedett translációs hibaráttával szembeni alkalmazkodást?
4. Az emelkedett translációs hibaráttával szembeni alkalmazkodással párhuzamosan milyen evolúciós mellékhatások azonosíthatók?

Anyagok és módszerek

- Magas translációs hibaráttájú *Saccharomyces cerevisiae* törzs előállítása *Candida albicans* tRNS_{CAG}^{szerin} génjének alacsony kópiaszámú vektorról történő expressziójával - transzformálás
- Transzlációs hibaráta mérése β -galaktozidáz enzim aktivitás reakcióval
- Laboratóriumi evolúció alacsony és magas translációs hibaráttájú törzsekkel folyadék kultúrában
- Élesztő törzsek rátermettségének meghatározása növekedési ráta méréssel

- Magas transzlációs hibarátájú törzsekből vektor csere segítségével alacsony transzlációs hibarátájú törzsek készítése - transzformálás
- A fehérje aggregációs ráta mérése vörös fluoreszcens fehérjével (mCherry) összekapcsolt humán fehérje, a von Hippel–Lindau protein (VHL) segítségével
- A β -galaktozidáz enzim fehérje szintjének meghatározása Western blottal
- A tRNS_{CAG}^{szerin} expressziós szintjének meghatározása Northern blottal
- A fehérjeszintézis ráta meghatározása „Pulse-labeling” technikával
- Proteaszóma kimotripszin-szerű aktivitásának mérése fluorogén szubsztrát (s-LLVY-MCA) alkalmazásával
- A glükóz felvételi ráta meghatározása a tápoldat glükóz tartalmának meghatározásával
- A kronológiai élettartam mérése sorozatos élősejtszám meghatározással

- A riboflavin mértékének számszerűsítése GFP-vel fluoreszcensen jelölt Rpl25p-t lokalizációjának meghatározásával
- A génexpresszió microarray alapú vizsgálata
- DNS szekvencia meghatározása Illumina platform segítségével

Eredmények

1. A magas translációs hibaráta okozta rátermettség csökkenés laboratóriumi evolúció alatt gyorsan kompenzálható

A translációs hibák rátermettségre gyakorolt hatásainak vizsgálatához egy korábban létrehozott *Saccharomyces cerevisiae* alapú modellt használtunk. *Candida albicans* tRNS_{CAG}^{szerin} génjének egyszeres kópiaszámú plazmidról történő expressziójával diploid péklesztő sejtekben mesterségesen megemeltük a translációs hibarátat. Az új mutáns tRNS kifejeződésével a CUG pozíciókba az eredeti leucin mellett szerin beépülése is lehetségessé vált.

β -galaktozidáz enzim aktivitás mérésén keresztül igazoltuk, hogy a tRNS_{CAG}^{szerin} kifejeződése valóban megemeli a translációs hibarátát péklesztő sejtekben. Kimutattuk, hogy a mutáns tRNS expressziója szignifikáns, 62%-os β -galaktozidáz enzim aktivitás csökkenést, ezzel együtt pedig a translációs hibaráta szignifikáns emelkedését eredményezte.

Növekedési ráta méréssel kimutattuk, hogy a tRNS_{CAG}^{szerin} gén expressziójával megemelt translációs hibaráta 40%-os rátermettség csökkentést okozott vad típusú törzshöz képest. Ezt követően egy megközelítőleg 250 generációig tartó laboratóriumi evolúciót végeztünk 11 alacsony és 11 magas translációs hibarátájú vonallal. Az evolúciót követően megállapítottuk, hogy a kezdeti növekedési rátához képest mind a 11 párhuzamosan evolváló vonal növekedési rátája szignifikánsan, 13,3%–51,7% közötti mértékben emelkedett. Ezek az adatok arra engedtek következtetni, hogy a magas translációs hibaráta okozta kezdeti rátermettség csökkenés már egy viszonylag rövid idejű alkalmazkodási periódus alatt is részben kompenzálható.

2. A magas translációs hibaráta elsősorban a fehérjék aggregációján keresztül okoz rátermettség csökkenést

Ismert, hogy a magas translációs hibaráta rátermettség csökkentő hatása a fehérjék hibás feltekeredése, összecsapódása, és a létrejött fehérje-aggregátumok sejtkárosító hatása révén is megvalósulhat. Ezek tekintetében vizsgáltuk a translációs hibaráta és a fehérje aggregáció kapcsolatát. Egy fluoreszcens, aggregációra hajlamos riporter fehérje (VHL-mCherry) sejteken belüli eloszlását vizsgálva következtettünk a fehérje aggregáció mértékének laboratórium evolúció alatti változására. Megállapítottuk, hogy az ősi állapotban a magas translációs hibaráta szignifikánsan növelte a fehérje aggregáció mértékét. Az evolúciót követően azonban mind a 11 evolúciós vonalban az aggregáció mértékének szignifikáns csökkenése volt megfigyelhető. Ezek alapján arra következtettünk, hogy a laboratóriumi evolúció alatt a szelekció elsősorban a fehérje aggregáció csökkentésére irányult.

3. Az adaptációs folyamatokban a translációs hibaaráta csökkentése csak kisebb mértékben játszik szerepet

Biokémiai teszt segítségével megállapítottuk, hogy az evolúció során kis mértékben ugyan, de csökkent a tRNS_{CAG}^{szerin}-t expresszáló vonalakban a translációs hibaaráta mértéke. Ennek legvalószínűbb oka az adaptáció alatt a translációs hibaarátaért felelős tRNS_{CAG}^{szerin} expressziójának csökkenése, melyet Northern Blot segítségével mutattunk ki. Véleményünk szerint azonban sem a translációs hibaaráta, sem a mutáns tRNS expressziójának csökkenése nem volt olyan mértékű, hogy ezt tekinthessük az adaptáció fő mechanizmusának.

4. A translációs hibákkal szembeni toleranciát az evolúció alatt felgyorsuló fehérje körforgás biztosítja

Biokémiai tesztek segítségével kimutattuk, hogy a magas translációs hibaarátajú vonalakban az evolúció során szignifikánsan emelkedett a fehérjeszintézis rátája és a proteaszómális lebontás mértéke is. A fehérjeszintézis ráta emelkedését radioaktívan jelölt aminosavak beépülési arányának mérésével határoztuk

meg, a proteaszómális lebontási ráta emelkedését pedig s-LLVY-MCA fluorogén szubsztrátot alkalmazva mutattuk ki. Méréseink alapján így arra következtettünk, hogy a translációs hibákkal szembeni robusztusságot az evolúció alatt elsősorban a felgyorsuló fehérje körforgás biztosította.

5. Az alkalmazkodási folyamatok genetikai hátterét elsősorban az evolúció alatt megjelenő nagy genomi átrendeződések biztosították

Az adaptáció genetikai hátterének megismeréshez teljes genom szekvenálást végeztünk a 11 evolúciós vonalon. A szekvenciaadatokat elemezve megfigyeltük, hogy a magas translációs hibarátahoz való alkalmazkodás nagy genomi átrendeződéseket indukált az evolált vonalakban. A megjelent nagy genomi átrendeződések többek között riboszóma biogenezisben, -összeszerelésben, és az RNS feldolgozásban részt vevő gének kópiaszámának együttes emelkedését eredményezték. Ezen változások feltételezhetően a felgyorsuló fehérjeszintézis genetikai hátterét biztosíthatták. Az evolált vonalak több mint

90%-ában két, deubiquitinációban szerepet játszó enzim gén (UBP3, UBP5) kópiaszám csökkenését is azonosítottuk. Ezek a gének a fehérjék lebontási útról való eltérítésében játszanak szerepet, a csökkenő dózisuk pedig növelheti a proteaszómális lebontási útra terelt fehérjék arányát, mely magyarázatul szolgálhat az evolvált vonalakban megfigyelt magasabb proteaszómális lebontási rátára.

A genomi mutációk vizsgálatán felül azok génexpresszióra gyakorolt hatásait is vizsgáltuk. Két, jellemző mutációs mintázattal rendelkező evolúciós vonalban a kromoszóma átrendeződések által nem érintett gének expressziós szintjét vizsgálva megállapítottuk, hogy a laboratóriumi evolúció során emelkedett a riboszómális RNS feldolgozás, a riboszóma biogenezis és az aminosav bioszintézis útvonal egyes génjeinek expressziós szintje. Ezek az eredmények valószínűsítik, hogy a kromoszóma átrendeződések mellett génexpressziós változások is elősegíthették a magas transzlációs hibarátához való alkalmazkodást, a fehérjeszintézis rátájának emelésén keresztül.

6. A translációs hibákkal szembeni robusztusság kialakulásának mellékterméke a sejtek megnövekedett energiaigénye

Ismert, hogy mind a fehérjeszintézis, mind a proteaszómális lebontás nagy energiaigényű folyamat. A sejtek glükózfelvételi rátájának mérésével igazoltuk, hogy a evolúciós vonalakban felgyorsuló fehérje körforgás megnövekedett energiaigényének fedezésére a sejtek növelték a tápoldatból felvett cukor mennyiségét. Kimutattuk továbbá, hogy a felgyorsult fehérjeszintézis és az emelkedett fehérje-lebontási ráta a megnövekedett energiaigény következtében tápanyagszegény környezetben a sejtek rátermettségének csökkenését és az evolvált populációk kronológiai élettartamának csökkenését vonta maga után. A magas translációs hibarátahoz történő alkalmazkodás mellékhatásaként az evolúciós vonalakban csökkenő mértékű riboszóma lebontási folyamatokat azonosítottunk, melyek az éhezési körülmények között megfigyelt jelentős életképesség csökkenéshez, és a populációk gyors kihalásához vezethettek.

Összefoglalás

Jelen munka bizonyítja, hogy a felgyorsult fehérje körforgás a magas transzlációs hibarátához történő alkalmazkodás egy gyors, és hatékony módja, kiemelkedően magas energetikai költsége miatt azonban csak tápanyagban gazdag környezeti feltételek között nyújthat valós megoldást. Dolgozatomnak nem célja azt állítani, hogy a felgyorsult fehérje körforgás az egyetlen lehetséges védekező mechanizmus a magas transzlációs hibaráta káros hatásaival szemben. Könnyen elképzelhető, hogy a különböző környezeti körülmények és tápanyag ellátottsági feltételek között élő fajok különböző natív transzlációs hibarátával rendelkeznek, és ezzel párhuzamosan akár más jellegű védekező mechanizmusokat is kialakíthattak.

Referált folyóiratban megjelent közlemények

MTMT azonosító: 10046224

1.1. A disszertáció témájához kapcsolódó közlemények

Kalapis D, Bezerra A R, Farkas Z, Horvath P, Bódi Z, Daraba A, Szamecz B, Gut I, Bayes M, Santos MA, Pál Cs. Evolution of Robustness to Protein Mistranslation by Accelerated Protein Turnover PLOS BIOLOGY Nov 6;13(11):e1002291 (2015)

IF: 8.66

1.2. Egyéb közlemények

Szamecz B, Boross G, Kalapis D, Kovács K, Fekete G, Farkas Z, Lázár V, Hrtyan M, Kemmeren P, Groot Koerkamp M J, Rutkai E, Holstege F C, Papp B & Pál Cs. The genomic landscape of compensatory evolution PLOS BIOLOGY Aug 26; 12(8):e1001935 (2014)

IF: 9.34