

**A *Drosophila melanogaster* Fcp1 foszfatáz szerkezetének és
funkciójának vizsgálata**

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Tombácz István

Témavezető:

Dr. Boros Imre

Biológus Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem Természettudományi Kar
Biokémia és Molekuláris Biológiai Tanszék
Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Központ
Biokémiai Intézet

**2009.
SZEGED**

Bevezetés

Az eukarióta szervezetekben a fehérjekódoló géneket az RNS Polimeráz II (RNAPII) írja át. Legnagyobb alegysége (Rpb1) a C-terminálisán sajátos domént tartalmaz, ami a Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser konszenzus szekvencia tandem ismétlődéseiből áll. Az ismétlődések száma a különböző élőlényekben eltérő (26 élesztőben, 52 emberben), de a szekvencia konzervált. Ez a C-terminális domén (CTD) a sejtek életbemaradásához nélkülözhetetlen. Számos vizsgálat bebizonyította, hogy a CTD nagymértékben foszforilálódhat, és a foszforiláltság foka nem állandó. Az RNAP II két jól elkülöníthető konformációs állapota az RNAP IIO (hiperfoszforilált) és az RNAP IIA (hipofoszforilált), melyeknek más a funkciója a transzkripció során. A IIA formában az enzim képes a promoteren összeszerelődött preiniciációs komplexbe beépülni. A CTD foszforilálása az iniciáció során történik, és lehetővé teszi a polimeráz promoterről való elindulását, vagyis az elongációt a IIO forma végzi. Ahhoz, hogy az enzim újra átírásba kezdhesen, a CTD-nek defoszforilálódnia kell. A CTD ezen kívül kötőhelye az RNAP II-vel kölcsönható fehérjék egy részének, melyek kötődését befolyásolja a CTD foszforiláltsági mintázata. Tehát a CTD kinázoknak és foszfatáz(ok)nak rendkívül fontos szerepük van a génextpresszió szabályozásában. Több CTD-t módosító kinázt, és néhány foszfatázt már azonosítottak, utóbbiak közül a legismertebb a TFIIF-el kapcsolódó CTD-foszfatáz, az Fcp1.

Az Fcp1-et eddig elsősorban élesztőben vizsgálták *in vivo* alkalmazható módszerekkel, magasabbrendű eukariótákból főleg csak *in vitro* nyert eredmények állnak rendelkezésre, ezért kutatásom során egy olyan rendszert hoztam létre, melynek segítségével *in vivo* információkat nyerhetünk az Fcp1 szerepéről magasabbrendű szervezetekben. Modellorganizmusként a *Drosophila melanogaster*-t használtam, mert nagyszámú genetikai és biokémiai módszer áll rendelkezésre ezen élőlény vizsgálatához.

Célkitűzések

Vizsgálataim céljával az Fcp1 fehérje funkciójának, transzkripcióban betöltött szerepének megismerését tűztem ki. Az Fcp1 központi szerepe a CTD defoszforilációjában jól ismert, ám a pontos mechanizmus, ill. hozzájárulása a különböző részfolyamatok szabályozásához (pl. sapkázódás, intronkivágódás, poliadeniláció, stb.) még nem egyértelmű. Ezek pontos megértése nélkül nem alkothatunk teljes képet a transzkripcióról, azon keresztül a génexpresszió szabályozásáról. Kísérleteim középpontjába az Fcp1 *Drosophila melanogaster* ortológját állítottam. A *Drosophila* kiváló modellorganizmus, genetikai rendszere kidolgozott, egyszerűen kezelhető, és magasabbrendű eukariótaként a vizsgálatokból levont következtetések könnyebben párhuzamba állíthatóak pl. humán eredményekkel.

Mivel az Fcp1 *Drosophila melanogaster* homológjáról még nem közöltek adatokat, így első céloom a DmFcp1 fehérje azonosítása és klónozása volt.

Az Fcp1 minden eukariótában megtalálható, funkciója konzervált, ezért érdekesnek tartottam megvizsgálni, hogy az egyes ortológok képesek-e hatást kifejteni heterológ rendszerben, tehát pl. a DmFcp1 befolyásolja-e a transzkripciót humán sejtekben.

Máig nem tisztázott, hogy az Fcp1 és Rpb4 közötti kölcsönhatásnak van-e jelentősége az Fcp1 működésében. Céllal tűztem ki a *Drosophila* Fcp1 és Rpb4 közötti kölcsönhatás vizsgálatát, ill. annak megválaszolását, hogy az Fcp1 mely régiói szükségesek az Rpb4-gyel való kapcsolódáshoz.

Az Fcp1 funkcióját a fehérjeszint in vivo megváltoztatásával kívántam megvizsgálni, a dmfcpl1 gén transzgénekkel történő csendesítésével ill. túltermelésével.

Anyagok és módszerek

In vitro rekombináns DNS technikák

Nukleinsav-preparálás

Polimeráz láncreakció, reverz transzkripcó-kapcsolt PCR

Élesztő két-hibrid kísérletek

Transzgenikus *Drosophila melanogaster* törzsek létrehozása P-elem inszercióval

In vivo funkcionális vizsgálatok UAS/GAL4 rendszerrel

Drosophila szárnydiszkusz festése acridin-orange festékkel

Humán (HeLa) sejt kultúra fenntartása és transzformáció

Drosophila S2 sejt transzformáció

Luciferázaktivitás mérése

Eredmények

A *D. melanogaster* Fcp1 fehérjéről eddig nem közöltek eredményeket, ezért azonosítani kellett az enzim *Drosophila* homológját. A BLAST keresőprogram segítségével meghatároztam az Fcp1 *Drosophila* ortológját és az azt kódoló gént (CG12252), ezután a cDNS és genomi szekvenciát klónoztam.

A szakirodalom szerint az élesztő és humán Fcp1 kölcsönhat az RNAP II 4. legnagyobb alegységével, az Rpb4-gyel. Élesztő két-hibrid módszerrel kimutattam, hogy az általam azonosított CG12252 gén terméke szintén képes kapcsolódni a dRpb4-hez, valamint hogy a DmFcp1 C-terminálisán egy transzkripció-aktiváló domént tartalmaz. Ezt szintén kimutatták más Fcp1 ortológok esetében is.

Az Fcp1 mennyiségének *in vivo* változtatása céljából transzgenikus *Drosophila* törzseket hoztam létre; a transzgenek az UAS-GAL4 rendszerrel fejezhetőek ki. Ez a rendszer lehetővé teszi adott szekvenciák szövet- és/vagy fejlődési stádium-specifikus expresszióját. Az *fcp1* gént *Drosophila melanogaster*-ben túltermeltetve, vagy az endogén Fcp1 szintet RNS interferenciával lecsökkentve azt tapasztaltam, hogy az állatok különböző fejlődési stádiumokban elpusztulnak, vagy adott szerveiken defektusokat hordoznak, az alkalmazott GAL4-forrás függvényében. A megfigyelt fenotípusok arra engedtek következtetni, hogy az állatokban apoptózis játszódik le. Acridin-orange festéssel kimutattam, hogy valóban erről van szó, a mutánsok azon szöveteiben, ahol az Fcp1 szint megváltozik, nagyszámú apoptotizáló sejtet láthatunk.

Az apoptózis mechanizmusának egyik kulcsfehérjéje a p53, ezért felmerült a kérdés, hogy a megváltozott Fcp1 szint okozta fenotípusok kialakulásában szerepet játszik-e a p53. Kimutattam, hogy p53 hiányában az Fcp1 szint csökkenés hatására kialakuló fenotípusok enyhülnek, míg abban az esetben, ha túltermeltem egy domináns negatív hatású (transzkripció-aktivációra képtelen) p53-at, a fenotípusok súlyosbodnak. A domináns-negatív p53 nem képes az apoptotikus kaszkádban részt vevő célgenjeit aktiválni, közreműködhet azonban transzkripciót nem igénylő apoptózis indukálásában. Mivel az Fcp1 szint változása a transzkripciót globálisan gátolja, így egy transzkripciófüggő apoptotikus útvonal nem lehetne hatékony, viszont transzkripciótól független úton lejátszódhat az apoptózis.

Az Fcp1 konzervált funkciója felvetette a kérdést, hogy képes-e egy adott ortológ más rendszerben hatást kifejteni. A HeLa sejtvonalon végzett kísérletek megmutatták, hogy a DmFcp1 gátolja a sejtek transzkripcióját, az R251G (foszfátázdoménben) pontmutációt hordozó változat pedig a vad típusnál kisebb mennyiségben is aktivitáscsökkenést okoz. Ennek oka valószínűleg az endogén és az ektópikus fehérjék kompetíciója.

A dmfcpl1 gén promoterének további analízise fényt derít arra, hogy milyen faktorok befolyásolják a DmFcp1 szintjének változását az egyedfejlődés során, ill. a különböző szövetekben.

Vizsgálataimmal bizonyítottam, hogy az Fcp1 helyes működése elengedhetetlen a *D. melanogaster* normális egyedfejlődéséhez. Mennyisége szigorúan szabályozott, hiszen expressziója szintjének növelése, vagy kismértékű csökkentése is az állatok halálához vagy hibás szövetek/szervek kialakulásához vezet. Ezen defektusok a transzkripció helyes működésének akadályoztatása révén jönnek létre, mely esetben az érintett sejtek apoptotizálnak. Ebben a folyamatban a p53 fontos szerepet játszik, célgénjeinek aktiválása nélkül, transzkripció-független úton. Kísérleteim során létrehoztam egy olyan rendszert, mellyel az Fcp1 funkciója és a CTD foszforilációjának szerepe *in vivo* vizsgálható egy magasabbrendű eukariótában.

Közlemények jegyzéke

A doktori értekezésben közvetlenül felhasznált közlemények:

The RNA Pol II CTD phosphatase Fcp1 is essential for normal development in *Drosophila melanogaster*.

Tombácz I, Schauer T, Juhász I, Komonyi O, Boros I.

Gene. 2009 Oct 15;446(2):58-67. Epub 2009 Jul 24.

Misregulated RNA Pol II C-terminal domain phosphorylation results in apoptosis.

Schauer T, Tombácz I, Ciurciu A, Komonyi O, Boros IM.

Cell Mol Life Sci. 2009 Mar;66(5):909-18.

Egyéb közlemény:

GAL4 induces transcriptionally active puff in the absence of dSAGA- and ATAC-specific chromatin acetylation in the *Drosophila melanogaster* polytene chromosome.

Ciurciu A, Tombácz I, Popescu C, Boros I.

Chromosoma. 2009 Aug;118(4):513-26. Epub 2009 May 2.

Konferencia előadások és poszterek

30. FEBS Kongresszus – 9. IUBMB Konferencia, 2005

Structure and function of the *Drosophila melanogaster* Fcp1 phosphatase (poszter)

I. Tombácz, I. Török and I. M. Boros

20. Nemzetközi IUBMB Kongresszus, 2006

The role of the *Drosophila melanogaster* FCP1 phosphatase in transcription regulation (poszter)

I. Tombácz, A. Ciurciu, O. Komonyi and I. M. Boros

Genetikai Műhelyek Magyarországon – VI. Minikonferencia, 2007

A *Drosophila melanogaster* FCP1 foszfatáz szerepe a transzkripció szabályozásában (előadás)

Magyar Biokémia Egyesület Vándorgyűlése, 2008

Az RNS polimeráz CTD foszfatáz FCP1 szerepe (előadás)

Tombácz István, Schauer Tamás, Komonyi Orbán, Horváth András, Boros Imre Miklós

Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Boros Imrének szakmai irányítását, hasznos tanácsait, valamint a dolgozatom átolvasását és észrevételeit. Hálásan köszönöm Ökrösné Katalin gyakorlati tanácsait és önzetlen segítségét, mellyel munkámhoz hozzájárult. Kéziratom nélkülük nem jöhetett volna létre. Ezen felül köszönettel tartozom csoportunk minden tagjának, mert lehetővé tették, hogy munkámat kellemes, vidám légkörben végezhettem.

Társszerzői nyilatkozat

Alulírott Prof. Dr. Boros Imre kijelentem, hogy Tombácz István „*A Drosophila melanogaster* Fcp1 foszfatáz szerkezetének és funkciójának vizsgálata” című PhD értekezésében felhasznált **Misregulated RNA Pol II C-terminal domain phosphorylation results in apoptosis.** (Schauer T, Tombácz I, Ciurciu A, Komonyi O, Boros IM. *Cell Mol Life Sci.* 2009 Mar;66(5):909-18.) publikációból származó eredményekhez meghatározó fontossággal hozzájárult.

Kijelentem, hogy az eredményeket az első szerző/társszerzők nem használták fel tudományos fokozat megszerzéséhez, és azt a jövőben sem teszik. Más jelöltnek nem adok ki hasonló jellegű nyilatkozatot a fenti publikációt illetően.

Prof. Dr. Boros Imre

Szeged, 2009. december 17.