

SZAKMAI ZÁRÓJELENTÉS

Témavezető neve: Dr. Káldi Krisztina

**A téma címe: A cirkadián óramű molekuláris jellemzése: Az oszcillátor fehérje
Frequency kifejeződésének transzkripció és
poszttranszkripció szinten történő szabályozása**

A kutatás időtartama: 2007-2011

A cirkadián ritmus generálásának jelenleg elfogadott modellje egy transzkripció-transzlációs visszacsatolási hurokra épül, amelynek alapvető komponensei egymás működését, illetve expresszióját szabályozva tartanak fenn egy nagyjából 24 órás periódushosszal rendelkező aktivitási ciklust. Kutatási munkánk célja e cirkadián oszcillátor működését biztosító, illetve módosító faktorok megismerése és funkcionális jellemzése volt. Vizsgálatainkat *Neurospora crassa*-n végeztük, azon a modellorganizmuson, amelynek cirkadián órája molekuláris szinten mindezidáig a legalaposabban jellemzett. Kutatási eredményeinket az eredeti munkatervben leírt kérdéskörök szerint csoportosítva részletezem:

I. A White Collar Complex (WCC) által szabályozott promoter elemek karakterizálása

1. Promoter szekvencia-mintázatok keresése a Neurospora genomban

A *Neurospora crassa* cirkadián órájának pozitív elemét képező, és így a *frequency (frq)* gén (negatív faktor) kifejeződését serkentő transzkripció faktor-komplex, a WCC inkomplett ismétlődést tartalmazó, GATA típusú szekvencia-mintázatokhoz kötődik. A BME Irányítástechnika és Informatika Tanszékének Orvosi Informatika munkacsoportja, Dr. Benyó Balázs és munkatársai közreműködésével egy olyan számítógépes programot hoztunk létre, amely a *Neurospora crassa* genomjában képes szekvencia-mintázatokot keresni.

A program segítségével olyan mintázatokat azonosítottunk, amelyek már kísérletesen igazolt WCC kötőhelyekhez (ún. clock-boxokhoz) hasonlóak. A keresési paramétereket addig szűkítettük, amíg a találatok száma 100 alá, azaz még jól vizsgálható tartományba esett. Ezen paraméterek mellett 19 gént sikerült kiválasztani. A találatok többsége hipotetikus fehérjék génjét érintette, amelyek nem mutattak hasonlóságot ismert funkciójú fehérjékhez. Két esetben azonban

nagymértékű szekvencia homológia alapján valószínűsíthető volt a funkció: egy putatív RasGEF és egy RhoGEF fehérje génjét választotta ki a program. Az alább részletezett irodalmi adatokra támaszkodva a RasGEF szerepének vizsgálatára koncentráltunk a továbbiakban.

2. Egy feltételezett RasGEF cirkadián ritmus szabályozásában betöltött szerepének vizsgálata

Korábbi eredmények szerint (Belden és munkatársai, 2007, *Genes and Dev.*, 21:1494) a konidizációs ritmus létrejöttében közvetítő szerepet játszik a Ras-1 monomer G fehérje. Pontmutációt hordozó, fokozott aktivitású Ras-1 kifejeződése esetén a konidizációs ritmus akkor is kifejezett, ha a sejtek reaktív oxigén származék (ROS) termelése bazális. A vad típusban az adott táptalajon csak akkor jelenik meg spóráképzési ritmus, ha ahhoz H₂O₂-ot vagy ROS-generálást elősegítő menadiont adagolunk. Ennek alapján feltételezték, hogy a Ras-1 a molekuláris óra kimenetére ható faktor, amely a kimenet ROS iránti érzékenységét befolyásolja. Ugyanakkor egyelőre nem sikerült kimutatni molekuláris kapcsolatot a cirkadián oszcillátor és a Ras-1 között. Egy, a Ras-aktivitást fokozó RasGEF működhetne ilyen mediátorként. Hipotézisünk vizsgálatára a Fungal Genetic Stock Center-től megvásároltuk azt a gombatorzset, amelyben a feltételezett RasGEF nem fejeződik ki és a törzs cirkadián fenotípusát, illetve molekuláris óráját vizsgálva a következőket tapasztaltuk:

a. A génhányos törzsben a konidizációs ritmus menadion iránti érzékenysége a vad típushoz képest csökken. Ez arra utal, hogy a RasGEF aktivitás szerepet játszik a spóráképzés cirkadián ritmusának szabályozásában.

b. A mutáció nem feltétlenül csak a cirkadián óra kimenetét befolyásolja, hanem hatással van az oszcillátor működésére is: a FRQ fehérje és *frq* RNS oszcillációjának amplitúdója kisebb mértékű, mint a vad típusban. Ezen kívül a WCC egyik komponensének, a WC-2-nek a hiperfoszforilációja, a FRQ fehérjének pedig a hipofoszforilációja volt jellemző a mutánsban. E két jelenség egymással összefügghet, hiszen a FRQ hipofoszforilált formája serkenti a WCC inaktív foszforilációját.

c. A WCC, amellett, hogy a cirkadián oszcillátor pozitív komponense, a *Neurospora* kék fényre érzékeny primér fényreceptora is. A fényviszonyok változása a WCC aktivitását közvetlenül befolyásolva tevődik át az oszcillátorra. Összehasonlítottuk a fényre adott választ a RasGEF hiányos törzsben és a vad típusban. Eredményeink szerint a WCC fényreceptor-funkcióját a géndeléción nem befolyásolja.

d. Kimutattuk, hogy a *rasgef* mRNS expressziója a vad típusban ultradián, 12 órás periódushosszú ritmust mutat állandó környezeti körülmények mellett. Hosszabb periódusú mutánsban (*frq⁷*) a *rasgef* oszcilláció periódusossza a vártnak megfelelően megnyúlik, ami alátámasztja a feltételezést, hogy a *frq* oszcillátor szabályozza a gén kifejeződését. Tekintettel arra, hogy egy intézeti beszerzés és keretszerződés kapcsán a specifikus mRNS-ek detektálása nagy hatékonysággal és viszonylag gazdaságosan megoldható, a munkatervben írt luciferáz assay alkalmazása e vizsgálatnál nem volt már indokolt.

Megfigyeléseink arra utalnak, hogy az általunk vizsgált, feltételezett RasGEF alapvető szerepet játszik a cirkadián óra működésének szabályozásában. Ezen eredmények összefoglalását tartalmazó kézirat előkészületben van.

II. Poszttranszlációs módosulás szerepe a WCC aktivitásának szabályozásában

1. A PP2A szerepe a WCC foszforilációjának szabályozásában

Korábbi eredményeink szerint a WCC FRQ-függő foszforilációja gátló hatású, mértéke cirkadián oszcillációt mutat, és függ a protein foszfatáz 2A (PP2A) aktivitásától. In vitro a WCC szubsztrátja a PP2A-nak. Jelen pályázat keretében antitestet hoztunk létre a PP2A regulációs alegységére, az RGB-1 ellen és immunprecipitáció segítségével vizsgáltuk annak valamely órakomponenssel való interakcióját. Stabil interakciót sem a WC-2, sem a WC-1 fehérjével, azaz egyik WCC alegységgel sem sikerült kimutatni. Ez arra utalhat, hogy a PP2A WCC-szel való interakciója igen dinamikus, pillanatszerű. Ezt támasztja alá az az irodalmi közlemény is (Schafmeier és munkatársai., 2008, Genes and Dev., 22:3397), amely szerint a PP2A döntően a citoszolban helyezkedik el, ahol a WCC-nek csak néhány %-a található, és a defoszforilálódó WC-2 igen gyorsan belép a magba.

2. A WC-1 foszforilációt meghatározó régióinak feltérképezése

A WC-1 funkcionális régióinak elemzésére először deléciós mutánsokat hoztunk létre:

a, Az aminoterminális részen található metioninban gazdag régió deléciója esetén a WC-1 sötétben növekvő kultúrákban hipofoszforilált, megvilágítás hatására hiperfoszforilált és defoszforilációval járó fényadaptációt nem mutat. A csak a deléciós formát expresszáló *Neurospora* törzs cirkadián ritmicitással nem rendelkezik. Ennek alapján megállapíthatjuk, hogy ezen aminoterminális fehérjerégió intaktsága a cirkadián ritmus generálása szempontjából nélkülözhetetlen.

E fehérjerégióon belül a struktúra-funkció kapcsolatának alaposabb vizsgálatára

rövidebb régiók delécióját hoztuk létre. Sajnos ezek a fehérjemódosulatok igen alacsony mértékű expressziót mutattak, ezért a törzsek funkcionális vizsgálata nem volt lehetséges. Az adott régió fehérjeszerkezeti elemzése során viszont felfigyeltünk egy, a MAPK felismerési helyekkel hasonlóságot mutató fehérjerészletre. Itt két treonint alaninra cserélve egy olyan mutánst sikerült előállítani, ami jellegzetes cikadián fenotípussal rendelkezik: periódushossza mintegy két órával hosszabb a vadtypusénál, fény-sötétség ciklusban pedig fáziskésést mutat. Ezen eredmények felvetik a lehetőségét annak, hogy e régió MAPK általi foszforilációja szerepet játszik a cirkadián periódus szabályozásában.

b, A WC-1 C-terminális részén található poliglutamin domén deléciója egy hiperfoszforilált WC-1 forma kifejeződéséhez vezet. A mutáns törzs ritmusos, de periódushossza 3 órával hosszabb a vadtypusénál. Ugyanakkor a WC-1 fényreceptor funkcióját nem befolyásolja a deléció, ugyanis a fény-indukálta génexpresszióban nem tapasztalható változás. Eredményeink arra utalnak, hogy a C-terminális poliglutamin domén alapvető meghatározója a „sötét“-komplex aktivitásának, és ezen keresztül a cirkadián ritmus periódushosszának.

3. A *FRQ* WCC foszforilációt befolyásoló szerepének vizsgálata

E kérdés megközelítéséhez egy olyan *frq*-génhiányos törzset hoztunk létre, amelyben a PP2A regulátoros alegységének, az RGB-1-nek a szintjét csendesítő RNS segítségével csökkentettük. Míg a *frq*-génhiányos törzsben hipofoszforilált WC-1 detektálható, addig mutánsunkban megjelentek hiperfoszforilált formák is, arra utalva, hogy FRQ hiányában is bizonyos kinázok elérik és foszforilálják a WCC-et.

4. A *VIVID* (*VVD*) szerepe a WCC szerkezetének és funkciójának szabályozásában

A természetes körülményeket modellező fény-sötétség ciklusok mellett a napi ritmus fázisának egyik meghatározó faktora a *Neurospora* szekunder fényreceptora, a *VVD*. *VVD* hiányában a fényadaptációs válaszok csökkennek, és a cirkadián óra fázisa későbbre tolódik. A *VVD* szerepének és a WCC-re irányuló molekuláris hatásainak vizsgálatát a Heidelbergi Egyetem Biokémiai Centrumának Michael Brunner által vezetett munkacsoportjával együttműködésben végeztük. Alábbiakban azokat az eredményeket foglalom össze, amelyek a budapesti laboratóriumban születtek:

a. A *VVD* expressziója igen széles tartományban a környezeti fényintenzitás indikátora, mennyisége a fényerősséggel arányosan növekszik. Ennek megfelelően várható volt, hogy a fényérzékelő rendszerre, a fény által aktivált WCC-re kifejtett hatása is fényerősségtől függően differenciált.

b. Keresztkötő jelenlétében a VVD szignifikáns mennyiségben detektálható a magfrakcióban. A VVD-GFP a GFP-hez viszonyítva a magban dúsul. Megfigyeléseink arra utalnak, hogy szemben a korábbi feltevessel, a VVD fehérje mintegy 50 %-a a sejtmagba lokalizált, azaz az aktív WCC-szel azonos kompartmentben is megtalálható.

c. A VVD egy kis frakciója a WCC-szel stabil komplexet alkot. A komplex létrejöttéhez mindkét fehérje intakt LOV(light, oxygen and voltage)-doménjére van szükség. A VVD/WCC-komplex kialakulása fényfüggő, csak világosban mutatható ki.

d. A VVD gátolja a WCC fény hatására bekövetkező hiperfoszforilációját és bomlását, azaz stabilizálja a komplexet inaktív állapotában. Ezzel párhuzamosan gátolja a WCC aktivitását is, azaz elősegíti egy stabil, inaktív WCC frakció felhalmozódását.

e. Természetes fotociklusok során kis intenzitású zavaró fényjelek kiszűrése, és ezáltal az óra működésének zavartalansága VVD jelenlétéhez kötött: hiányában a holdfény megzavarja az óra működését, a Δvvd törzs elveszíti konidizációs ritmusát. Eredményeink egyértelműen rámutatnak a VVD fiziológias szabályozó szerepére: a fehérje, a környezeti fényintenzitásra vonatkozó molekuláris memóriaként működve, a WCC-szel kölcsönhatásba lépve gátolja annak fényfüggő aktiválódását, és ezáltal természetes fényperiódusok mellett is stabilizálja a cirkadián óra működését.

Megfigyeléseinket egy megosztott elsőszerezős közleményben a német munkacsoporttal közösen közöltük a Cell című folyóiratban 2010-ben.

III. A *frq* expresszió szabályozásának vizsgálata: Reaktív oxigén származékok szerepe a cirkadián ritmus szabályozásában

Tekintettel arra, hogy időközben tudomásunkra jutott, hogy a munkatervben eredetileg szereplő témával, a *frq* RNS posztttranszkripciós szintű szabályozásával más munkacsoportok már előrehaladottabb formában foglalkoznak, és 2009-ben egy rangos közlemény is megjelent ezzel kapcsolatban (Guo et al., 2009, Cell, 138:1236), mi az utóbbi időszakban más aspektusból kezdtük vizsgálni a *frq* expresszió szabályozását: figyelmünk a reaktív oxigén származékok (ROS) szerepére irányult. Irodalmi adatok és saját kísérletes megfigyeléseink szerint is, vad típusú *Neurospora crassa* csak akkor mutat ritmusos spóráképzést (konidizációt) állandó körülmények között, ha a sejtekben a ROS szint a bazálisnál magasabb. Ez elérhető H₂O₂-nak a táptalajba történő adagolásával, vagy a szuperoxid termelését indukáló menadion hozzáadásával. Több más organizmusban (drosophila, zebrahal) tett megfigyelés is arra mutat, hogy a szabadgyökök hatással vannak a cirkadián

ritmusra, ugyanakkor ennek molekuláris mechanizmusairól szinte semmilyen ismereteink nincsenek. Vizsgálataink ezért a szabadgyökök cirkadián ritmusra kifejtett hatásainak pontos megismerésére és elemzésére irányultak. Ezzel kapcsolatos eredményeink a következők:

a. Amennyiben Neurosporát fény-sötétség ciklusok mellett tenyészünk, ritmikus spóratermelés figyelhető meg normál táptalajon is. Ugyanakkor ilyen körülmények mellett is befolyásolja a ROS generátor menadion jelenléte a ritmust, mégpedig annak fázisát állítja át koncentráció-függő módon: minél nagyobb mennyiségben alkalmazzuk a menadiont, annál korábbi időpontra tevődik a spóráképzés.

b. Szuperoxid dizmutázt (SOD-1) nem expresszáló törzsben a fázis előretolódott, és menadionra érzékenyebb, mint a vadtypusban. Mivel SOD-1 hiányában a szuperoxid felhalmozódik, és nem alakul át hidrogén peroxiddá, ez a megfigyelés a szuperoxid primér szerepére hívja fel a figyelmet. H_2O_2 jelenléte a táptalajban szintén korábbi fázist eredményez, feltételezhetően indirekt módon a szuperoxid továbbalakulásának gátlásával.

c. Kimutattuk, hogy mind menadion hatására, mind a SOD-1-et nem kifejező törzsben a kontrollhoz képest korábbra tolódott a *frq* expressziója mind RNS, mind fehérje szinten. Ez arra utal, hogy a szuperoxid elsődlegesen az oszcillátor működését befolyásolja, és ezáltal közvetetten hozza létre a kimeneti (konidizációs) fázis megváltozását.

d. Állandó körülmények mellett, SOD-1 hiányában a periódus a vadtypushoz viszonyítva rövidebb, a fehérje túltermelése esetén pedig annál hosszabb. Amennyiben a ROS szintet antioxidáns alkalmazásával csökkentjük a bazális szint alá, fény-sötétség ciklusban a fázis későbbre tolódik. Ezek az eredmények elsőként mutatnak rá arra, hogy mind állandó körülmények mellett, mind a környezeti stimulusok által diktált ritmus esetén a bazális ROS termelésnek fontos szerepe van az óra beállításában.

e. Korábbi adataink és más irodalmi források szerint is a WCC aktiválásában központi szerepet játszik a PP2A. Eredményeink szerint mind a ROS termelés serkentése, mind a sod-1 delécióna fokozott PP2A aktivitást eredményez. Ezzel párhuzamosan menadion hatására a WCC defoszforilációja figyelhető meg. Mindezek alapján valószínűsíthető, hogy a ROS emelkedése a PP2A aktiválása útján hat a molekuláris oszcillátorra.

Fenti eredményeink tehát arra utalnak, hogy a ROS termelés mind oxidatív stressz állapotában, mind bazális körülmények között fontos tényezője a cirkadián óra szabályozásának. Az ezen adatokat összefoglaló kéziratot heteken belül

szeretnénk közlésre benyújtani.

Budapest, 2011. november 30.

Dr. Káldi Krisztina
témavezető