

Blastyák András

Zárójelentés: A SWI/SNF2 családba tartozó fehérjék DNS-szerkezet változtató képességének szisztematikus vizsgálata

I. Bevezetés

Az ún. SWI/SNF2 családba tartozó fehérjék alapvetőek olyan sejtmagi folyamatok működéséhez, amelyek a DNS hozzáférhetőségét igénylik a mechanizmus során. Az alap elképzelés, hogy ezen enzimek a kromatin átrendeződésért felelősek az utóbbi években finomodott. A jelenlegi képünk szerint nemcsak DNS-fehérje interakciók, hanem bizonyos DNS szerkezetek szintén szubsztrátjai némely SWI/SNF2 családba tartozó fehérjéknek (MCB 2010. p684). Ebből következően filogenetikai alapon nem meghatározható egy adott fehérje biokémiai funkciója, hiszen az immáron nem csak a kromatin hanem a DNS szerkezetének manipulálása is lehet.

A pályázat felvetése szerint azok a különbségek, amelyek alapján a SWI/SNF2 fehérjék filogenetikai alapon alcsaládokba tagolhatók (NAR 2006. p2887) prediktív értékűek arra nézve, hogy egy adott fehérje milyen aktivitással bír, avagy nem bír. Ebből következően létrehozható egy olyan katalógusa azon biokémiai aktivitásoknak, amelyekkel a SWI/SNF2 alcsaládok jellemezhetőek. A hipotézis szerint ezen fehérjecsalád eddig nem vizsgált tagjainak aktivitása filogenetikai alapon előrejelezhető.

A munkatervben foglalt vizsgálatok célja az volt, hogy az egyes SWI/SNF2 alcsaládokat lehetőleg minél teljesebb módon reprezentáló fehérjék gyűjteményén szisztematikus vizsgálatot végezzek azok működését olyan biokémiai kísérleti rendszerekben, mely rendszerek használatosak ezen fehérjecsalád tagjai működésének jellemzésére, de a velük kapcsolatos eredmények adat hiányában nem általánosíthatóak (avagy nem ismert, hogy általánosíthatóak-e) az ebbe a családba tartozó egyéb fehérjék működésének leírására.

A vizsgálatokhoz a CG10445, CG7376, HsSHPRH és Iodestar fehérjéket használtam. Mivel ez a készlet a korábban a munkatervben tervezetthez képest kevesebb fehérjét tartalmaz, ezért a hiányzó fehérjék helyett a vizsgálatba bevontam az ScRad5 és HsHLTF fehérjéket is. Az eltérés indokát a zárójelentés "Egyéb megjegyzések" részében adom. Az elért eredményeket az alábbiakban ismertetem.

II. Eredmények és megvitatásuk

DNS topológia megváltoztatása I.

Számos SWI/SNF2 nagycsaládba tartozó fehérjéről ismert, hogy képesek megváltoztatni a DNS topológiáját. Ilyen kísérletes elrendezés az, amely során relaxált plazmidot inkubálunk a vizsgált fehérjével ATP és Topoizomeráz I jelenlétében. A plazmid kapcsolási számában ("linking number"; Ln) bekövetkező változás a szubsztrát deproteinizálása után gélen detektálható (Curr Biol. 1999. p325). Az ún. "annealing helicase assay" ennek egy változata, mely során az egyszálú DNS kötő RPA fehérje által a "supercoiled" plazmidon létrehozott egyszálú "buborék" szerkezet záródását figyeljük meg az Ln szám változását (csökkenését) monitorozva (Genes Dev. 2009. p2394). Általában elfogadott, hogy ezen kísérleti rendszerekben az egyes SWI/SNF2 fehérjék kétszálú DNS transzlokázként működnek, de feltételezett, hogy ez az aktivitásuk nem elegendő a fentebb vázolt kísérleti rendszerben az Ln szám változásához.

Szemben azzal a várakozással, hogy ezekben az elrendezésekben csak bizonyos fehérjék lesznek aktívak, az eredményeim szerint az általam vizsgált fehérjék többsége (CG10445 és ScRad5 kivételével) képes minkét kísérleti rendszerben az Ln szám változtatására. Mivel korábbi munkáim során a Rad5 és a HLTF fehérjéket a fentiekől független kísérleti elrendezésben kétszálú DNS transzlokázként tudtam azonosítani, és mert egyéb szempontból is a két fehérje valódi homológ, ezért a Rad5 esetén az aktivitás hiányát részletesebben nem vizsgáltam technikai okokra (puffer inkompatibilitás, érzékenység a használt enzimpreparátum (TopoI) valamelyik

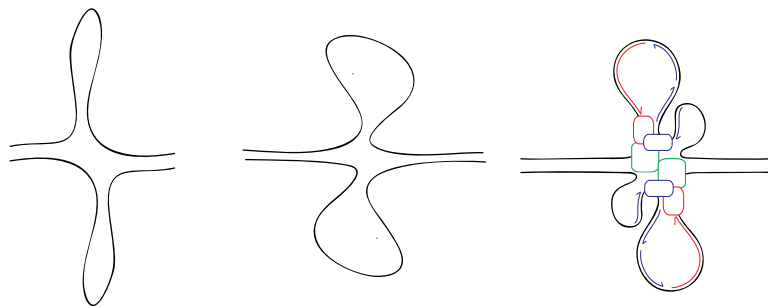
komponensére, stb.) vezetem vissza. Abból, hogy a legtöbb fehérje aktív volt ezekben a vizsgálatokban arra következtetek, hogy a fenti kísérleti elrendezések nem kellően specifikus vizsgálati módszerek, és nem, avagy nem minden esetben reflektálnak az egyes fehérjék *in vivo* szerepére, mint ahogy az pl. az “annealing helicase” aktivitás esetén a szakirodalomban diszkutált. A feltételezésem szerint ezek a kísérleti elrendezések pusztán alternatív lehetőségek a kétszálú DNS transzlokáz aktivitás detektálására.

DNS topológia megváltoztatása II.

Invertált ismétlődő szekvenciát tartalmazó “supercoiled” plazmidok esetén a szuperhelikális tekercek száma csökkenhet olyan módon, hogy az invertált szekvenciák egymással párosodva egy keresztszerű szerkezetet (“cruciform extrusion”; kruciform) hoznak létre. Az ilyen módon relaxált plazmidon a stabil kruciform jelenléte struktúraspecifikus endonukleázokkal (pl. T7 EndoI (NEB)) detektálható és velük az ilyen plazmid linearizálható. A kruciform megléte a DNS topológiájának a függvénye ezért az előzőekben leírt kísérleti rendszerekhez hasonlóan alkalmas a kétszálú DNS transzlokáció vizsgálatára (Cell 2000. p1133).

A vizsgálataim során azt találtam, hogy a Rad5 és a HLTf képes a cirkuláris plazmidon létrejövő kruciform megszüntetésére. (Felhívom a figyelmet arra, hogy ez nem a konvencionális használata a kísérleti rendszernek, amelyik jellemzően egy lineáris fragmenten ATP függő módon létrejövő topológiailag rögzített domén létrejöttét detektálja a kruciformon keresztül.)

Ez az eredmény számomra arra utal, hogy egy hasonló szerkezet (kruciform, avagy repetitív szekvencia hiányában buborék szerkezet) *in vivo* szubsztrátja lehet a fent említett fehérjéknek. Anélkül, hogy ezt itt részleteiben is kifejteném röviden összefoglalom, hogy az *in vitro* eredményekben a replikáció egy kevésbé részletezett aspektusának modelljét ismertem fel (lásd az ábrát).



Az ábra a kruciform és buborék DNS szerkezetek és egy bidirekcionálisan haladó repliszómán kialakuló DNS szerkezetének a hasonlóságát illusztrálja. Kiemelendő, hogy a Rad5/HLTF fehérjék *in vivo* szubsztrátja a repliszóma. A fekete vonalak a DNS egy-egy szálát jelképezik. A színes boxok és a színes nyilak a repliszóma komponenseit és az újonnan szintetizálódott DNS szálat jelképezik.

Ennek a hasonlóságnak a kifejtése/vizsgálata egy olyan felismeréshez vezetett, amely magyarázza azt a megfigyelést, mely szerint a replikációs villa megfordulásához szükséges, hogy a DNS szintézis vezető szálának blokkja után is a késlekedő szál szintézise folytatódjon; korábbi DNS replikáció modellek ezt a megfigyelést nem magyarázták. Az eredményt az OTKA támogatásának feltüntetésével közöltem, a részletek itt kerültek kifejtésre (TIBS 2014. p301).

DNS-fehérje interakció megszüntetése

A DNS a sejten belül fehérjékkel alkotott komplex formájában van jelen. Egy szoros DNS-fehérje interakció bármilyen DNS tranzakciónak (transzkripció, replikáció, repair) akadálya lehet, ezért a lehetőség, hogy egy kétszálú DNS transzlokáz képes lenne egy ilyen helyzetet kezelni ilyen folyamatok számára kulcsfontosságú lehet egyes SWI/SNF2 családba tartozó fehérjék szerepének a megértéséhez. A kísérletes megközelítés során azt vizsgáltam, hogy egyes fehérjék képesek-e megszüntetni az EcoRI E111Q-DNS interakciót a kétszálú DNS mentén történő transzlokáció során. Az E111Q az EcoRI restriktív endonukleáz aktív hely mutáns változata, amely nagy affinitással képes a felismerőhelyét kötni, de azt hasítani nem. A kísérlet során alkalmas szubsztrát

DNS-t szilárd hordozóhoz rögzíték és inkubálok E111Q-val. Az E111Q kötését vizsgálom az egyes fehérjék (és +/- ATP) jelenlétében. Az eltávolított E111Q a felismerőhelyét tartalmazó oligonukleotiddal csapdázható és a reakció felülúszója az E111Q jelenlétére vizsgálható. Mivel az egyes fehérjék aktivitásának optimális kondíciója és az E111Q optimális kötési kondíció nem minden esetben átfedő, ezért ez a megközelítés nem használható minden fehérjére. A használt fehérjék: CG10445, SHPRH, CG7376 és HLTF.

Az eredmények szerint a vizsgált fehérjék egyike sem(!) képes a kétszálú DNS transzlokáció során az E111Q eltávolítására. Ez az alább közölt eredményekkel együtt arra utal, hogy a kromatin átrendeződésére való képessége egyes fehérjéknek nem pusztán annak következménye, hogy ezen fehérjék képesek a DNS mentén történő transzlokációra. Megjegyzem, hogy a HLTF kapcsán a saját eredményem ellentmond a szakirodalomban megjelent adattal (PNAS 2011. p14073). A mások által közölt eredmények alapján nem zárható ki, hogy a közölt aktivitás indirekt következménye annak, hogy az itt vizsgált rendszerben replikációs modell szubsztrát átrendezésével együtt(!) vizsgálták az E111Q kötését. Saját adataim alapján a közölt következtetést nem kellően megalapozottnak tartom.

Kromatinkötés és szerkezetváltoztatás

A human SHPRH fehérje tartalmaz egy PHD-finger domént és egy hiszton-szerű homológia domént. Ezek a domének nincsenek jelen az SHPRH-val közös leszármazási vonalat alkotó Rad5/16, Ris1 és Iodestar fehérjékben. A PHD finger ismert szerepe hiszton oldalláncokban található lizinek poszt-transzlációs (trimetiláció) módosításának a felismerése. A PHD finger jelenlétére lehetséges magyarázat, hogy az SHPRH a hiszton metabolizmusban játszik szerepet, de az is nyitott lehetőség, hogy a hisztonok poszt-transzlációs módosítása szükséges az SHPRH *in vivo* kontextusának a felismeréséhez. Az előbbi felvetés tisztázása lényeges abból a szempontból, hogy vajon adott alcsaládok egységesen jellemezhetőek-e bizonyos biokémiai aktivitásokkal, avagy sem.

Az SHPRH és *Drosophila* homológjának (CG7376) PHD fingerét ún. "overlay" kísérletben próbaként használva gélen elválasztott és filteren renaturált teljes hisztonokat (élesztő, *Drosophila* és humán, egyaránt) használva hiszton (H3 és H4) interakciót detektáltam. A kísérletet rekombináns (*E. coli* eredetű) hisztonokkal megismételve hasonló eredményt kaptam. Ez utóbbi eredmény egyértelműen arra utal, hogy a hiszton-PHD finger interakció során ebben az esetben nem szükséges a hiszton oldalláncok poszt-transzlációs módosulása. Időközben mások a H3 kapcsán hasonló következtetésre jutottak (J Biomol NMR 2013. p393).

Ezek az adatok utalnak arra, hogy az SHPRH szerű fehérjéknek szerepe van a kromatin szerkezetének átrendezésében. *Drosophila* sejmagokból alacsony sóval történő extrakció után limitált *Micrococcus* nukleáz emésztéssel rendezett polinukleoszóma izolálható, ahol a rendezettség a nukleoszómák közötti "spacer" DNS meghatározott távolságára utal. Ez a periodikusan rendezett szerkezet a nukleoszómák szerkezetének átrendezésével megszűnik, amely változás gélen detektálható. Ebben a klasszikus assay-ben a rendelkezésemre álló fehérjék mikrogramnyi mennyiségét használva az SHPRH és a CG7376 aktívnak bizonyult. Konceptcionálisan fontos eredményről van szó, ugyanis ez arra utal, hogy ugyanazon alcsaládba tartozó fehérjék között a kromatin szerkezetét és DNS struktúrákat átrendező enzimek egyaránt megtalálhatóak. Ebből következően az a feltevés, hogy az egyes alcsaládok bizonyos diszkrét biokémiai aktivitásokkal jellemezhetőek legalább egy esetben nem tartható.

Genetikai megközelítés

A CG7376 gén (dmSHPRH) P inszerciós alléljének (Exelixis Collection; C00342) vizsgálatával bemutattam, hogy a homozigóta legyek fokozottan érzékenyek a táptalajhoz adott DNS alkiláló szer (0.025% MMS, krónikus kezelés) jelenlétére: annak hatására azok elpusztulnak, míg a heterozigóták túlélnek a kezelést. A kezelt állatok harmadik stádiumú lárvaként pusztulnak el. Némileg árnyalja a megfigyelést, hogy vannak lárvák, amelyek túlélnek a kezelést, bebábozódnak és némileg váratlanul, de a kikelő legyek nem mutatnak nyilvánvaló abnormalitásokat. Ennek okát nem ismerem, de ezzel együtt is az alapmegfigyelést jelentősnek tartom, mert egyértelműen utal arra, hogy a SWI/SNF2 családba tartozó fehérjék egy része csak bizonyos környezeti eredetű

perturbációk esetén (pl. környezeti eredetű DNS károsodás) játszik szerepet. (Ez nem előzmények nélküli felismerés, de mindazonáltal nem széleskörűen dokumentált, és különösen nem *Drosophilában*.)

Megkísértem a fenti megfigyelést független allélt, RNAi konstruktot (VDRC Stock Center) használva megerősíteni. Megfigyelésem szerint a dmSHPRH RNAi indukált legyek alkilálószer hiányában is elpusztulnak, de mert a dmSHPRH gén P-alléljai homozigóta életképesek, ezért az RNAi konstrukttal kapott eredmény valószínűleg off-target hatásra utal, és eképpen ez a kísérletes megközelítés zsákutcának bizonyult. Tekintettel arra, hogy a fenotípus nem teljes penetranciájú, ezért az eredmény megbízhatóságához és későbbi közléséhez feltétlenül szükséges lesz független allél vizsgálatára. Erre jelenleg csak kooperáció kiépítésében és annak keretében látok lehetőséget.

III. Egyéb megjegyzések, különös tekintettel az eredeti munkatervvel kapcsolatos néhány eltérés indokára

A tervezett vizsgálatokhoz szükséges fehérjék előállítását és tisztítását *Saccharomyces cerevisiae* alapú expressziós rendszerre alapoztam. Ez a rendszer kínálja lényegében az összes olyan előnyt, amelyet egy eukarióta expressziós rendszer egy prokarióta expressziós rendszerrel szembeállítva kínálni tud. Kísérleteim arra, hogy az általam vizsgálni kívánt valamennyi fehérjét GST fúzió formájában élesztőben termeltessem jórészt, és számomra váratlanul, sikertelenek voltak. Korábbi elképzelésem szerint ennek az oka a tisztításhoz felhasználni kívánt GST-tag méretében keresendő, mely méreténél fogva interferálhat bizonyos esetekben a fúziós fehérje "folding"-jával. További eredményeim szerint ez ténylegesen egy valós probléma de plauzibilis lehetőség az is, hogy az indukció a gazdasejt számára olyan hátrányt jelenthet, mely interferál annak normális életfolyamataival, a velük kapcsolatos munka sikertelenségének eképpen objektív okát látom. Az irodalomban nemrégiben megjelent rendszerbiológiai megközelítések eredményei alapján élesztőben azonosítani lehetett azokat az élesztő ORF-eket, amelyek túltermelése a sejt számára drasztikus fitness-csökkenéssel jár. Figyelemreméltó módon az így azonosított fehérjék között számos nem más, mint az élesztő SWI/SNF2 fehérjék valamelyike, ami a legmesszemenőbben alátámasztja a fenti hipotézist (Genes, Genomes and Genetics. 2012. p1279)

Az eredeti munkatervben olyan kísérleti elrendezések használatát is terveztem, amelyek radioaktív nyomjelzésen alapulnak. Ezt a munkát az MTA Szegedi Biológiai Központ-ban terveztem végezni és a munkához abszolút szükségesnek tartottam a PhosphorImager Analyzer készülék használatát. Ez a készülék a pályázat benyújtásakor még igen, de az utóbbi években már nem működött az Intézetben és pótlásáról sem volt tudomásom a legutóbbi időkig. A pályázat pénzügyi zárójelentésében a maradvány az ilyenformán infrastrukturális okokból nem végrehajtható kísérleteket fedezte volna.

IV. Összefoglalás

A meglevő eredmények alapján véleményem szerint kijelenthető, hogy a SWI/SNF2 család evolúciós szempontok alapján történő tagolása nem(!) feleltethető meg egy olyan tagolásnak, amely az egyes alcsaládokhoz a kromatin-szerkezet változtató, avagy a DNS-szerkezet változtató diszkrét képességek valamelyikét rendelhetné. Az is megalapozottnak tűnik, hogy az irodalomban is fellelhető SWI/SNF2 tagok vizsgálatára alkalmas kísérleti elrendezések egy része nem interpretálható a modellezni szándékozott *in vivo* folyamatra és ezek valójában mindössze alternatív eszközök a nagycsalád legtöbb tagját jellemző kétszálú DNS transzlokáz aktivitásra. Ez azonban a leghatározottabban nem diszkvalifikálja az ilyen és hasonló biokémiai eszközök használatát egyes folyamatok biokémiai modelljeként, hiszen az *in vivo* kontextusból levont következtetések szükségessé teszik, hogy azok *in vitro* is bemutattassanak. (Röviden: az *in vitro* eredményekből nem következik ugyan az *in vivo* kontextus, de az *in vivo* kontextusból következnek bizonyos elvárások a fehérje aktivitásával kapcsolatban.) Megjegyzem, hogy pontosan az a megközelítés, hogy egyes fehérjék ismert *in vivo* kontextusa összevetve az *in vitro* aktivitással rámutathat az *in vivo* kontextussal kapcsolatos elképzelés túlzottan egyszerűsített mivoltára vezetett el a DNS replikáció *in vivo* mechanizmusával kapcsolatos alapvetően újszerű megközelítésre, amelyből közlemény is született.

Visszatérve a fenti gondolatmenet fősodrához; bizonyos értelemben a fenti okfejtés interpretálható úgy, hogy ezek az enzimek promiszkuózusabbak *in vitro*, mint *in vivo*. Ebből az következik, hogy a SWI/SNF2 nagycsalád vizsgálatában annak, hogy az egyes fehérjék milyen módon ismerik fel azt a kontextust, amelyben *in vivo* működniük kell valószínűleg jelentősebb kérdés, mint az, hogy egy adott fehérje milyen módon különböztethető meg biokémiai alapon rokon fehérjéktől.

V. Közlemény

A Blastyák. 2014. DNA replication: damage tolerance at the assembly line.

Trends in Biochemical Sciences 39(7): 301-304