

Marta Rowińska

„Identyfikacja partnerów białkowych laminy Dm i topoizomerazy II w warunkach szoku termicznego w układzie modelowym *Drosophila melanogaster*”

Streszczenie

Laminy stanowią główny element strukturalny i funkcjonalny jądra komórkowego. Są to białka klasyfikowane jako filamenty pośrednie typu V, tworzące polimerowe struktury nazywane blaszką jądrową, które połączone są z wewnętrzną błoną jądrową. Laminy możemy podzielić na dwa typy w zależności od ich wzoru ekspresji: laminy A (ekspresjonowane jedynie w komórkach zróżnicowanych) oraz laminy typu B (ekspresjonowane we wszystkich typach komórek). Wszystkie laminy bez względu na typ są poddawane szeregowi modyfikacji potranslacyjnych. Poza etapem dojrzewania, modyfikacje potranslacyjne warunkują specyficzne dla lamin właściwości i funkcje. Najlepszym tego przykładem może być fosforylacja, która reguluje ich import do jądra, stopień polimeryzacji lamin oraz wiązanie do DNA i chromatyny. Mutacje w obrębie genu *LMNA* są przyczyną heterogennej grupy chorób nazywanych laminopatiami. Przykładami schorzeń, które zaliczamy do tej grupy mogą być dystrofia mięśniowa, kardiomiopatie, lipodystrofia, neuropatie, zaburzenia metaboliczne oraz syndrom przedwczesnego starzenia się. Bardzo często ogólny fenotyp u pacjentów objawia się kombinacją nieprawidłowości w obrębie układów mięśniowego, szkieletowego, sercowo-naczyniowego, a także zaburzeniami metabolizmu oraz starzenia się. Mutacje w genach kodujących białka oddziałujące z laminami (emeryna, LAP2, kompleks LINC) również powodują rzadkie zaburzenia o podobnym fenotypie. Udowodniono również, że wyciszenie genu laminy B daje efekt letalny we wczesnych stadiach rozwoju u *Metazoan*.

Uważa się, że laminy i białka z nimi oddziałujące funkcjonują jako mechaniczne wsparcie dla jądra komórkowego oraz są zaangażowane we wszystkie procesy jądrowe, sygnalizację oraz transport pomiędzy jądrem, a cytoplazmą. Laminy odgrywają kluczową rolę (bezpośrednio i pośrednio) w utrzymaniu prawidłowej struktury jądra komórkowego i organizacji chromatyny. Są one także zaangażowane w przestrzenną organizację i rozmieszczenie kompleksów porów jądrowych oraz stanowią swoiste połączenie karioszkieletu z cytoszkieletem. Ponadto laminy odgrywają ważną rolę w mechanotransdukcji. Pełnią także istotną rolę w replikacji, transkrypcji, a także modulacji sygnalizacji wewnątrzkomórkowej. Specyficzne miejsca fosforylacji dla kinazy Cdk1 (tzw. „miejsca mitotyczne”) mają kluczowe znaczenie dla udziału lamin w demontażu jądra na początku podziału oraz jego ponownego złożenia w trakcie mitozy.

Topoizomeraza II (Top2) jest bardzo istotnym białkiem zaangażowanym w takie procesy, jak replikacja, naprawa DNA, transkrypcja, modyfikacja topologii DNA oraz organizacja chromatyny. Białko to zaangażowane jest także w proces kondensacji chromosomów podczas mitozy oraz stanowi swoiste rusztowanie dla chromosomów.

U *Drosophila melanogaster* zidentyfikowano jedynie dwa geny kodujące laminy: jeden dla laminy typu B (laminę Dm) oraz jeden gen kodujący laminę typu A (lamina C). Dodatkowo zidentyfikowany został tylko jeden gen kodujący białko topoizomerazę II. Z tego powodu ten model eksperymentalny jest relatywnie prostym układem i stanowi dobre narzędzie do badań nad laminami i topoizomerazą II *in vivo*. *D. melanogaster* jest także pierwszym organizmem modelowym, u którego zidentyfikowano oraz zbadano komórkową odpowiedź na stres

termiczny (HS) oraz wykazano związek pomiędzy szokiem cieplnym, a zmianami we wzorze ekspresji genów dzięki badaniom nad zlokalizowanymi na chromosomach politenicznych regionami, tzw. pufami (inaczej pierścieniami Balbianiego), które stanowią regiony aktywnej transkrypcji. Ponadto model ten był pierwszym, u którego zbadano skład macierzy jądrowej oraz zmiany w jej składzie w odpowiedzi na szok termiczny. Wykazano, że stres cieplny zwiększa ilość laminy Dm i topoizomerazy II związanych z izolowanymi strukturami chromosomów politenicznych oraz z izolowaną chromatyną z oocytów, czemu towarzyszy zmiana miejsc wiązania topoizomerazy II *in vivo* do chromatyny. Kilka niezależnych grup badawczych zidentyfikowało także nowe miejsca wiązania się Top2 do chromatyny po indukcji szoku termicznego. Niektóre z nich zostały przypisane do tzw. *loci* szoku cieplnego w chromosomach politenicznych, co sugeruje zależność pomiędzy szokiem termicznym, zmianą struktury chromatyny, zmianami w ekspresji genów oraz zmianami w oddziaływaniu laminy Dm i topoizomerazy II. Powyższe obserwacje doprowadziły do powstania hipotezy badawczej związanej z niniejszą pracą doktorską o udziale lamin i topoizomerazy II w regulacji ekspresji genów w odpowiedzi na szok termiczny.

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej była identyfikacja nowych partnerów białkowych dla laminy Dm, laminy C oraz topoizomerazy II w warunkach standardowych oraz po indukcji szoku termicznego w układzie modelowym *D. melanogaster*, analiza potencjalnych zmian składu w kompleksach białek oddziałujących z laminami i Top2 pod wpływem szoku termicznego oraz określenie potencjalnej funkcji lamin i topoizomerazy II w odpowiedzi na stres cieplny. Dodatkowym celem było sprawdzenie zmian w poziomie rozpuszczalności (związanej potencjalnie między innymi ze zmianami w fosforylacji, oraz oddziaływaniach białkowych) laminy Dm oraz topoizomerazy II w odpowiedzi na stres. W tym celu przeprowadzono analizy poziomu białek frakcjonując ekstrakty z wykorzystaniem buforów o różnej sile jonowej. Na pierwszym etapie pracy nad celem głównym postanowiono zweryfikować fizyczne oddziaływanie laminy Dm i topoizomerazy II. Kolejnym krokiem była identyfikacja białek oddziałujących z laminą Dm, laminą C oraz topoizomerazą II w warunkach standardowych oraz po indukcji szoku termicznego. Eksperymenty zostały przeprowadzone przy wykorzystaniu techniki immunoprecypitacji w połączeniu z analizą LC-MS/MS, uzyskane dane analizowane były przy użyciu różnych dostępnych narzędzi bioinformatycznych. Trzecim etapem w tej części niniejszej rozprawy było zestawienie uzyskanych interaktomów lamin i topoizomerazy II ze sobą w celu wyszczególnienia potencjalnie wspólnych kompleksów białek oraz zmian w ich składzie w odpowiedzi na szok termiczny. Na ostatnim etapie podjęto próbę identyfikacji procesów molekularnych, w które zaangażowane są badane białka w warunkach standardowych oraz pod wpływem stresu cieplnego. W przeprowadzonych eksperymentach wykorzystano organizm modelowy *D. melanogaster* oraz musze linie komórkowe Kc (charakteryzująca się obecnością obu typów lamin) i S2 (brak endogennej laminy C).

Analiza zmian w poziomie rozpuszczalności białek po indukcji szoku termicznego wykazała istotne statystycznie zmiany zarówno dla laminy Dm, jak i topoizomerazy II. Zaobserwowano m.in. wzrost w poziomie tych białek po indukcji stresu w stosunku do warunków standardowych we frakcjach ekstrahowanych buforami o wyższym stężeniu soli. Wykazane różnice sugerują zmianę w poziomie fosforylacji, możliwą zmianę lokalizacji lub rearanżację kompleksów białkowych oddziałujących z laminą Dm oraz topoizomerazą II w odpowiedzi na stres termiczny. Przeprowadzone w ramach kolejnego etapu pracy badania potwierdziły bezpośrednie oddziaływanie laminy Dm z topoizomerazą II oraz wykazały, że po indukcji

stresu zwiększa się ilość obserwowanych kompleksów Lam-Top2. Na kolejnych etapach pracy zaobserwowano, że skład kompleksu białek oddziałujących z laminą Dm zmienia się znacząco po indukcji szoku termicznego. Zidentyfikowano grupę białek specyficznych wyłącznie dla kompleksów powstałych pod wpływem stresu lub znacząco zwiększających swoją ilość po indukcji szoku termicznego, m.in. zaangażowanych w regulację transkrypcji, transport mRNA i splicing. Dane uzyskane z eksperymentów dotyczących laminy C nie wykazały podobnej tendencji, co więcej statystyczna analiza ilościowych zmian w kompleksach laminy C po indukcji stresu termicznego wykazała globalny spadek w liczbie oddziaływań białkowych (a nie, jak w przypadku laminy Dm wzrost). Obserwacje te sugerują bezpośrednie zaangażowanie lamin typu B w wymienione powyżej procesy. Dodatkowo zaobserwowano, że po indukcji stresu do kompleksu z laminą Dm przyłączane zostają białka bezpośrednio zaangażowane w odpowiedź na stres termiczny, regulację ekspresji genów, metabolizm RNA oraz uczestniczące w procesie wyciszenia transkrypcji oraz translacji. Identyfikacja takiej grupy białek pozwoliła postawić hipotezę o zaangażowaniu laminy Dm w organizację, bądź regulację struktur ściśle związanych z odpowiedzią na stres oraz zatrzymaniem procesów syntezy białek w strukturach zwanych granulami stresu. Granule stresu były do tej pory uznawane za struktury głównie cytoplazmatyczne, jednakże zaangażowanie laminy, która jest białkiem jądrowym (jedynie nieznaczna frakcja nowo zsyntezowanej puli białek znajduje się w cytoplazmie) sugeruje tworzenie się granul stresu również w jądrze komórkowym. Dokładniejsze analizy oddziaływania laminy Dm z markerem granul stresu – Fmr1 przy użyciu immunoprecypitacji potwierdziły obserwowane oddziaływanie. Analizy przy użyciu mikroskopii konfokalnej wykazały, że granule stresu formowane są nie tylko w obrębie cytoplazmy, ale częściowo także w jądrze komórkowym oraz, że lamina Dm ko-lokalizuje z Fmr1, a także zmienia swoją lokalizację w odpowiedzi na stres termiczny (po indukcji szoku termicznego zaobserwowano sygnał od specyficznych dla Lam Dm przeciwciał nie tylko w obrębie otoczki jądrowej ale także pewną pulę rozproszoną w obrębie nukleoplazmy).

Na kolejnym etapie wykazano, że zidentyfikowane białka oddziałujące z topoizomerazą II w warunkach standardowych są w głównej mierze białkami oddziałującymi z chromatyną, zaangażowanymi w regulację transkrypcji oraz transport mRNA. Po indukcji stresu termicznego zaobserwowano statystycznie istotny przyrost (w porównaniu z warunkami standardowymi) w liczbie oddziaływań białkowych z Top2 w obrębie grup białek biorących udział w organizacji struktury chromatyny, regulacji ekspresji genów, replikacji, eksporcie jądrowym oraz procesowaniu RNA. Wspólnymi dla interaktomów laminy Dm i topoizomerazy II elementami po indukcji stresu termicznego (których zmiana w obu grupach była istotna statystycznie) były białka zaangażowane w regulację transkrypcji, białka opiekuńcze oraz białka zaangażowane w transport mRNA i splicing.

Przedstawione obserwacje potwierdzają założoną na wstępie pracy hipotezę badawczą o udziale obu tych białek – laminy Dm i topoizomerazy II, w procesach regulacyjnych ekspresji genów oraz procesach zaangażowanych w zmiany organizacji chromatyny w odpowiedzi na stres. Uzyskane w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej oraz całego projektu (OPUS 11) dane wskazują na udział laminy Dm i topoizomerazy II w formowaniu złożonych kompleksów białkowych, które zmieniają swoją kompozycję pod wpływem stresu termicznego. Wszystkie zidentyfikowane grupy białkowe oddziałujące z laminą Dm i topoizomerazą II biorą udział w ważnych procesach jądrowych, w których udział jest również przypisywany laminom i topoizomerazie II. Podsumowując, wyniki uzyskane w ramach niniejszej pracy doktorskiej umożliwiły stworzenie modelu oddziaływań białkowych dla laminy Dm, laminy C

oraz topoisomerazy II, które odzwierciedlają powiązane ze sobą rzeczywiste interakcje pomiędzy tymi białkami. Przedstawione wyniki ponadto dobrze ilustrują podsumowanie nowej sieci interakcji wykazanych w wyniku globalnych analiz interaktomów lamin i topoisomerazy II, a także ich modyfikacji po indukcji szoku termicznego. Dodatkowo wyniki uzyskane w ramach niniejszej rozprawy wskazujące na zmiany w składzie kompleksów oddziałujących z laminami oraz topoisomerazą II w odpowiedzi na szok termiczny stanowią dobre podstawy do szerszych badań dotyczących zaangażowania tych białek w regulację komórkowej odpowiedzi na stres.