

A metabolizmus és a cirkadián óra kölcsönhatásainak
vizsgálata *Neurospora crassa* modellszervezetben

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Szőke Anita

Semmelweis Egyetem, Molekuláris Orvostudományok

Doktori Iskola



Témavezető:

Dr. Káldi Krisztina, DSc – egyetemi tanár

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Csermely Péter, DSc – az MTA rendes tagja, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Kardon Tamás, PhD – egyetemi docens

Dr. Wunderlich Lívius, PhD – egyetemi adjunktus

Hivatalos bírálók:

Dr. Kozma-Bognár László, PhD - egyetemi docens

Dr. Wiener Zoltán, PhD - egyetemi docens

Budapest

2023

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	3
2. Célkitűzés.....	5
3. Módszerek.....	6
4. Eredmények	11
5. Következtetések	15
6. Saját publikációk jegyzéke	17

1. Bevezetés

A cirkadián ritmus egy endogén oszcillátor által vezérelt időmérő rendszer, amely lehetővé teszi az élőlények számára, hogy élettani működéseiket a környezet ciklikusan változó tényezőihez igazítsák. A ritmosos működés pontos beállítását számos szinkronizáló hatás segíti, melyek közül az egyik legfontosabb a tápanyagkínálat. A molekuláris oszcillátor ugyanakkor eltérő szubsztrátszintek mellett is közel állandó sebességgel működik, biztosítva ezzel a 24 órához közeli periódushosszt. A metabolikus változások hatásainak kompenzálása tehát alapvető követelménye a változó tápanyagkínálat mellett működő robusztus ritmusnak. Ha a ritmus zavart szenved (pl.: váltott műszakban történő munkavégzés, vagy ún. szociális jetlag esetén), olyan patológiás folyamatok indulhatnak el, melyek számos népbetegség —köztük a metabolikus zavarra visszavezethető obesitas és a kettes típusú diabetes mellitus— kialakulásához vezethetnek. A metabolizmus és a cirkadián ritmus folyamatai kölcsönösen hatnak egymásra, evolúciós előnyt biztosítva mindazon élőlények számára, melyekben e két rendszer összehangoltan működik. A metabolizmus és a cirkadián óraműködés közötti kapcsolat fontosságát egyre több klinikai és kísérletes adat támasztja alá, azonban a kölcsönhatás pontos

mechanizmusa máig nem teljesen feltérképezett. Az azonban ismert, hogy a sejtek metabolikus környezet változásaira adott reakcióiban a RAS-mediálta jelátvitel központi szerepet tölt be. Továbbá, a legtöbb élőlényben megtalálhatók különböző RAS izoformák, melyek számos, a cirkadián ritmussal és a metabolizmussal is összefüggésbe hozható folyamatban játszanak szerepet.

A génkészlet egy meghatározó hányadának expressziója a cirkadián ritmus szabályozása alatt áll. Ez teszi lehetővé a sejtfunkciók ritmikus működését, és egyben elősegíti a változó környezeti tényezőkhez való alkalmazkodást. Arról azonban kevés adat áll rendelkezésre, hogy a molekuláris óra hogyan reagál azokra a kihívásokra, amelyeket e tényezők szélsőséges mértékű megváltozása, mint például a hosszabb ideig tartó tápanyaghiány idéz elő.

Munkám során a *Neurospora crassa* cirkadián modellszervezetben vizsgáltam a RAS2 fehérje szerepét a cirkadián ritmus metabolikus kompenzációjában. Vizsgáltuk továbbá, hogy milyen szerepet tölt be a cirkadián ritmus a hosszantartó glükózmegvonáshoz történő alkalmazkodásban.

2. Célkitűzés

Munkánk során a *Neurospora crassa* cirkadián ritmusa és a metabolizmus közötti kapcsolat vizsgálata volt a célunk:

2.1. A RAS2 fehérje szerepének vizsgálata a cirkadián ritmus metabolikus kompenzációjában

- A $\Delta ras2$ törzs cirkadián fenotípusának jellemzése.
- A metabolikus környezet megváltozására adott fenotípus szintű válasz vizsgálata.
- A molekuláris oszcillátor jellemzése a $\Delta ras2$ törzsben. Az órakomponensek expressziós szintjének, foszforilációs állapotának és szubcelluláris lokalizációjának elemzése.
- A RAS2 jelátvitel és az óra közötti kapcsolat vizsgálata.

2.2. A cirkadián ritmus szerepének vizsgálata a tápanyagkínálat jelentős mértékű megváltozása esetén

- A központi oszcillátor működésének jellemzése tápanyaghiány esetén.
- A hosszantartó tápanyagmegvonásra adott transzkriptom szintű válasz jellemzése.
- Egyes jelátviteli utak szerepének vizsgálata az óra tápanyagmegvonáshoz való adaptációjában.
- A működőképes cirkadián óra szerepének vizsgálata az éhezésből történő regeneráció során.

3. Módszerek

3.1. Race Tube analízis

A vizsgálat során szilárd táptalajra oltottuk le a vizsgálni kívánt törzset ún. futtatócsőben. A csöveket a kísérlet célja szerint beállított körülmények között inkubáltuk. Ez idő alatt a telep közel lineáris sebességgel növekszik a leoltási helytől távolodva a futtatócső másik vége irányába. A kultúra naponta egyszer jellegzetes morfológiájú vegetatív szaporítóképletet, ún. konídiumcsomót képez. A kísérlet ideje alatt a növekedési frontot bizonyos időközönként jelöltük, ezáltal meghatározhatóvá vált a növekedési sebesség. A konídium csomók időbeli eloszlása meghatározza a konidizációs ritmust, melynek segítségével következtetni tudunk a vizsgált törzs cirkadián tulajdonságaira és ezáltal molekuláris órájának működésére. A paraméterek pontos meghatározásához a cső denzitometriás képét a ChronOSX 1.0.7 szoftver segítségével értékeltük ki.

3.2. Teljes sejtlizátum készítése

A korábban lefagyasztott micéliumot folyékony nitrogénnel hűtött kerámia mozsárban homogenizáltuk. A mintákat proteáz és protein foszfatáz inhibitorokat tartalmazó PEX (protein extraction – fehérje feltáró) oldat segítségével tártuk fel. A fehérjeizolátum koncentrációját Nanodrop One[©]

mikrovolumetrikus spektrofotométer segítségével határoztuk meg 280 nm-en.

3.3. Szubcelluláris frakcionálás

A fehérjék nukleusz és citoszol közötti megoszlásának vizsgálatához a Luo és munkatársai által leírt frakcionálási módszert alkalmaztuk (Luo et al., 1998) a puffer térfogatok csökkentése és a nukleusz és a citoszol elválasztását lehetővé tevő centrifugálási lépés paramétereinek módosítása mellett. A mintákat SDS-poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE) módszerrel analizáltuk.

3.4. Western-blot analízis

A fehérjék molekulatömeg szerinti szeparálásához SDS-poliakrilamid gélelektroforézist alkalmaztunk, majd félszáraz blottoló készülék (PerfectBlue Semi Dry-Electroblotter, Peqlab) segítségével nitrocellulóz membránra (Bio-Rad #1620094) vittük át a fehérjéket. (A blottolás paramétere: 2,5 h 350 mA (konstans) 12 V 300 W.) A fehérjemennyiség egyenletességét ún. Ponceau S (Sigma #A40000279) azofesték segítségével vizsgáltuk. Az aspecifikus kötőhelyek blokkolását követően 5% TBS-tej oldatban inkubáltuk az elsődleges, majd a másodlagos antitesttel a membránt. A fokozott kemolumineszcencia (enhanced chemiluminescence - ECL) elvén történő detektálást követően a röntgenfilmek digitalizált

képét az ImageJ szoftver segítségével denzitometrálassal elemeztük.

3.5. A GST-AC-RBD és a RAS₂^{FLAG,STREP} fehérjék interakciójának vizsgálata

A RAS2 fehérje és az adenilát-cikláz közötti kölcsönhatás vizsgálatához *Escherichia coli* sejtekben fejeztük ki az adenilát-cikláz RAS-kötő doménjét (RBD – RAS-binding domain), melyhez N-terminálisan Glutation-S transzferázt (GST-t) kapcsoltunk. A fúziós fehérjét glutation-agaróz gyöngy (Sigma Aldrich #G4510) segítségével tisztítottuk, majd 30 mg *Neurospora* fehérjével inkubáltuk. A fehérjéket 10 percig 95°C-on történő mintapufferrel való inkubáció során eluáltuk a gyöngyről, majd SDS-PAGE-t követően Western blot segítségével detektáltuk.

3.6. RNS szint meghatározás valós idejű kvantitatív PCR-rel

A folyékony nitrogén segítségével homogenizált micéliumból TriReagent[®] oldattal (Sigma Aldrich #93289) RNS-t izoláltunk, majd a QuantiTect[®] Reverse Transcription Kit (QIAGEN #205314) segítségével cDNS-t szintetizáltunk. A transzkript szinteket valós idejű kvantitatív PCR (qPCR) módszerrel határoztuk meg. Mintánként három ismétléssel

dolgoztunk. A C_t értékek meghatározását a LightCycler Relative Quantification Software segítségével végeztük.

3.7. RNS szekvenálás

Az RNS szekvenáláshoz a mintákat folyékony kultúrában növesztettük standard körülmények, illetve glükózmegvonás mellett 12-12 órás fény-sötétség ciklusban 48 órán keresztül. A mintákat (n=4) ZT12 időpontban takarítottuk be. RNS-t preparáltunk, majd DNáz kezelést követően az RNS minőségét Nanodrop™ One[©] spektrofotométerrel, Qubit™ 4.0 fluoriméterrel (Invitrogen) és Agilent TapeStation 4150 rendszer segítségével ellenőriztük. A könyvtár készítést (PE-100 könyvtár) és a szekvenálást a BGI Genomics végezte.

3.8. *In vivo* luciferáz assay

A *frq* promóter ritmicitását *in vivo* luciferáz assay segítségével vizsgáltuk, melynek során a luciferáz enzim génje a *frq* promótert követően került beépítésre a megfelelő törzsekben. A promóter aktiválódása esetén a luciferáz gén átíródik és a keletkező enzim oxidálja a táptalajhoz adott biolumineszcens D-luciferin szubsztrátot (Promega #E1602). A reakció eredményeként bekövetkező fényemissziót 4-5 napon át detektáltuk.

3.9. PP2A aktivitás mérés

A PP2A aktivitást a Promega Serine/Threonine Phosphatase Assay System (#V2460) segítségével végeztük a leírásnak megfelelően. Minden reakció 10 μ g fehérjét tartalmazott és 20 percig zajlott szobahőmérsékleten.

3.10. A kísérletek során alkalmazott számítógépes programok és statisztikai módszerek

A race tube kísérletek kiértékeléséhez a ChronOSX 1.0.7 programot használtuk. A kísérletek statisztikai értékelését Microsoft 365 (Excel) programmal, valamint a Statistica 13 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA) szoftverrel végeztük. A luciferáz assay során a berendezés szoftverét, a Reader Control és a MARS Data Analysis programokat használtuk. A qPCR során a C_t értékeket a LightCycler Relative Quantification Software-rel számítottuk. A hatásokat szignifikánsnak tekintettük, amennyiben a p érték kevesebb volt, mint 0,05. A hibavonalakat az átlag szórásaként (\pm SEM) adtuk meg.

4. Eredmények

4.1. A RAS2 jelpálya szerepének vizsgálata a cirkadián ritmus metabolikus kompenzációjában

4.1.1. A *Δras2* törzs fenotípusának és cirkadián kimenetének vizsgálata

A *Δras2* törzs cirkadián fenotípusát jellemezve megállapítottuk, hogy a RAS2 hiánya morfológiai defektusokat eredményez, és jelenléte szükséges a megfelelő konidizációs ritmus fenntartásához. A *Δras2* törzsben ugyanis állandó körülmények között megváltozik a konidizációs ritmus, változó körülmények mellett pedig késik a konidizáció fázisa. RAS2 hiányában a táptalaj glükózkoncentrációjának emelkedése esetén a ritmusos oszcilláció gyorsan lecseng, a cirkadián periódus pedig fokozatosan hosszabbodik.

4.1.2. A molekuláris órakomponensek jellemzése a *Δras2* törzsben

Kísérleteink során azt találtuk, hogy a RAS2 aktivitása alapvető jelentőségű a cirkadián óra normál működése szempontjából. A *Δras2* mutáció ugyanis nem csak a ritmusos kimenetet érinti, hanem a központi oszcillátor működésére is hatással van: a FRQ fehérje oszcillációja kevésbé robusztus, az oszcilláció fázisa pedig molekuláris szinten is késik a

génhiányos törzsben. A WC-1 szintje is kevésbé robusztus oszcillációt mutatott a $\Delta ras2$ törzsben a vad típushoz képest. A *ras2* mutáció a molekuláris óra komponenseinek expresszióját, foszforilációs állapotát, valamint szubcelluláris megoszlását is megváltoztatja. A génhiányos törzsben a negatív visszacsatolásban aktív hipofoszforilált FRQ alakok dominálnak, melyek a sejtmagban dúsulnak és ez a magi akkumuláció glükóz hozzáadására tovább fokozódik. A WC-1 ennek megfelelően főként inaktív citoszolikus formában van jelen a génhiányos törzsben.

4.1.3. A RAS2 jelátvitel és a molekuláris óra közötti kapcsolat vizsgálata

Munkánk során kimutattuk, hogy interakció jön létre a RAS2 fehérje és az adenilát cikláz RAS-kötő doménje között. A RAS2 eredményeink alapján tehát az adenilát-ciklázon keresztül fejt ki hatását a molekuláris órára.

4.2. A cirkadián ritmus szerepe a tápanyagmegvonáshoz való alkalmazkodásban

4.2.1. A tápanyagmegvonás hatása a központi órára és a cirkadián időmérésre

Kísérleteink során azt találtuk, hogy a hosszantartó glükózmegvonás megváltoztatja a központi órakomponensek

sztochiometriáját: míg a FRQ hiperfoszforilált lesz, a citoszolikus WC-1 mennyisége csökken. Az órakomponensek RNS-szintjei ezzel szemben nem mutatnak változást éhezésben. A tápanyaghiányos állapotban megfigyelhető alacsony WCC mennyiség ellenére a sejtmagban állandó marad a WC fehérjék szintje, amely lehetővé teszi a fenntartott WC aktivitást. A fehérjeszinten megfigyelt jelentős mértékű különbség ellenére a cirkadián időmérés működőképes marad hosszantartó éhezés esetén is: az oszcillátor fehérjének, vagyis az óra negatív faktorának, valamint a kimeneti géneknek is fenntartott marad a ritmusa hosszantartó glükózmegvonás esetén.

4.2.2. A molekuláris óra modulátorai tápanyagmegvonás esetén

Az órakomponensek éhezésre adott válaszában számos szabályozó faktor játszik szerepet, így többek között a FRQ és a PP2A is. A *frq* promóter aktivitása éhezésben megváltozik a *frq*-hiányos *frq*⁰ törzsben. A PP2A pedig csökkent aktivitást mutat éhezésben, amely részben hozzájárulhat a FRQ éhezés során bekövetkező hiperfoszforilációjához. A funkcióképes PP2A-t nem tartalmazó törzs esetében az órakomponensek éhezésre adott válasza eltér a vad típusban megfigyelhetőtől.

4.2.3. Az éhezés során bekövetkező transzkriptom-szintű változások vizsgálata

Hosszantartó tápanyagmegvonás hatására a kódoló gének több, mint 20%-ának expressziója mutatott változást kísérleteinkben. Ezek közül 90 génről leírták korábban, hogy a WCC közvetlen célpontja lehet. Megfigyeltük továbbá, hogy a *wc-1* hiánya jelentős mértékben befolyásolta a transzkriptom éhezés során bekövetkező átszerveződését.

4.3.4. A működőképes óra szerepének vizsgálata az éhezésből való regeneráció során

Amikor az éhezésből történő regenerációt a vad típusú és az óragén hiányos törzsekben vizsgáltuk, azt találtuk, hogy működőképes óra hiányában a tápanyag újbóli rendelkezésre állása esetén a biomassa növekedése elmarad a vad típusban megfigyelhetőtől mind folyékony kultúrában (fény-sötétség ciklusban, illetve állandó körülmények között), mind pedig szilárd táptalajon. Megfigyeltük továbbá, hogy működőképes cirkadián óra hiányában a *gl1-1* glükóztranszporter expressziója sem képes alkalmazkodni a környezet glükózsintjének változásához.

5. Következtetések

5.1. A RAS2 az óra metabolikus kompenzációjának egy új faktora

- A RAS2 hatással van a fenotípusra és a cirkadián kimenetre *Neurospora crassa*-ban.
- A RAS2 szerepet játszik a cirkadián ritmus glükóz kompenzációjában.
- A *Δras2* törzsben a kevésbé robusztus ritmus és a fázis késése molekuláris szinten is megfigyelhető.
- A *ras2* mutáció a molekuláris óra komponenseinek expresszióját, foszforilációját és szubcelluláris lokalizációját is megváltoztatja.
- A RAS2 az adenilát-ciklázon keresztül fejt ki hatását a molekuláris órára.

5.2. A tápanyagmegvonás a molekuláris óra újraszerveződését eredményezi

- Glükóz megvonás hatására megváltozik a központi óraféhrjék szintje és foszforilációs állapota.
- A cirkadián időmérés fenntartott marad hosszantartó éhezés során is.
- Az órakomponensek éhezésre adott válaszát a PKA mellett modulálja a FRQ és a PP2A is.

- A glükóz megvonás eltérő módon hat a transzkriptomra a *wt*-ban és a $\Delta wc-1$ -ben - a gének 13%-ának expressziója mutat törzs-specifikus változást.
- Az éhezésből való regeneráció hatékonyságát növeli a működőképes cirkadián óra jelenléte.

Munkánk során tehát a metabolizmus és a cirkadián óra működésének kapcsolatát vizsgálva jellemeztük egy eddig ismeretlen óraszabályozó faktor, a RAS2 szerepét a molekuláris oszcillátor stabilizálásban és felhívtuk a figyelmet a cirkadián óraműködés és annak molekuláris megváltozásának jelentőségére tápanyaghiányos körülmények mellett.

6. Saját publikációk jegyzéke

6.1. Az értekezéshez kapcsolódó közlemények

Szőke, A., Sárkány, O., Schermann, G., Kapuy, O., Diernfellner, A. C. R., Brunner, M., Gyöngyösi, N. and Káldi, K.: Adaptation to glucose starvation is associated with molecular reorganization of the circadian clock in *Neurospora crassa*. *Elife* 2023 Jan 10 12:e79765 doi: 10.7554/eLife.79765

Gyöngyösi, N.*, **Szőke, A.***, Ella, K. and Káldi, K.: RAS2 is involved in the metabolic compensation of the circadian clock in *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* 2017 Sep 8 292(36):14929-14939

* megosztott első szerzős közlemény

6.2. Az értekezéshez nem kapcsolódó publikáció

Kurilla, A., **Szőke, A.**, Auber, A., Káldi, K. and Silhavy, D.: Expression of the translation termination factor eRF1 is autoregulated by translational readthrough and 3'UTR intron-mediated NMD in *Neurospora crassa*. *FEBS Lett.* 2020 Sep 1 doi: 10.1002/1873-3468.13918.