



The effects of *S. pombe* TORC2 on chromatin biology and DNA damage response

השפעתו של TORC2 ב-*S. pombe* על כרומטין ועל
תגובה לנזק ב-DNA

מגישה: נגה פרמינגר

מנחים: פרופ' רונית ויסמן

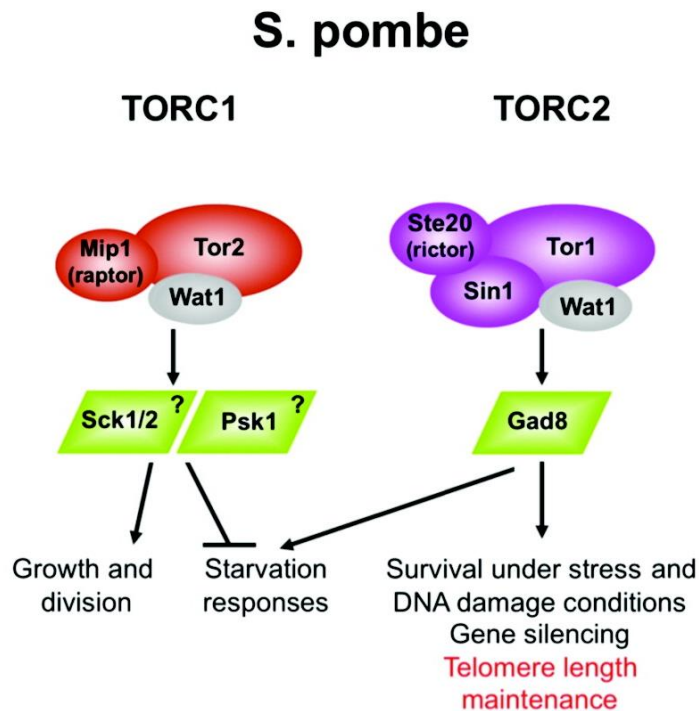
ד"ר עדי כהן

מבוא – חלבוני TOR

❖ TOR (Target of Rapamycin) הוא סריין/תראונין קינאז ממשפחת phosphatidylinositol-3 kinase related kinases (PIKKs).

❖ חלבון שמור אבולוציונית שאחראי להיבטים שונים של מטבוליזם, גדילה תאית והישרדות, וכן משתתף ברגולציה של הגנום ושל יציבות אפיגנטית.

❖ TOR משמש כתת-יחידה קטליטית בשני קומפלקסים: TORC1 ו-TORC2. בשמר *S. pombe* ישנם שני הומולוגים של TOR – Tor1 ו-Tor2. Tor1 הוא היחידה הקטליטית של הקומפלקס TORC2, ו-Tor2 הוא היחידה הקטליטית בקומפלקס TORC1.



מבוא – TORC2

❖ קומפלקסי TOR מזרחנים ומפעילים AGC-קינאזות.

❖ TORC2 מזרחן ומשפעל את הסרין/תראונין קינאז Gad8 (חלבון המטרה הידוע היחיד של TORC2).

❖ הפנוטיפים של מוטנטים ב-*gad8* דומים מאוד לאלו של מוטנטים של TORC2. פנוטיפים אלו כוללים:

❖ רגישות גבוהה ל-DNA stress

❖ אי-השתקה של גנים ב-subtelomeric regions

❖ בעיה בהפעלת קומפלקס Mlul cell cycle box-binding factor (MBF) בתנאי replication stress ועוד.

מבוא – TORC2 ו-H2A-P

- ❖ TORC2-Gad8 דרוש לפוספורילציה על ההיסטון H2A (H2A-P).
- ❖ פוספורילציה זו נצפית לאחר DNA damage והיא נחוצה עבור תיקון יעיל של ה-DNA.
- ❖ H2A-P בתגובה ל-DNA damage מתבצעת על ידי ה-Tel1 checkpoint kinases ו-Rad3.
- ❖ במוטנטים של TORC2-Gad8 רמות הפוספורילציה נמוכות בהשוואה לתאי WT.

מבוא – סופרסיה לפנוטיפ H2A-P

❖ במחקרים קודמים התגלו סופרסורים לפנוטיפ H2A-P המוטנטי של Δtor1 . ביניהם:

❖ תת-יחידות של הקומפלקס Paf1C (Δleo1 ו- Δpaf1)

❖ תת-יחידות של קומפלקס SAGA (Δgcn5 ו- Δubp8)

❖ פעילותם של כל חלבונים אלו מקושרת לעידוד של תהליך התעתוק (pro-transcription).

❖ בפרויקט זה נחקרו גנים נוספים למציאת סופרסורים לפנוטיפ H2A-P ולפנוטיפ הרגישות ל-DNA stress של מוטנטי TORC2-Gad8.

מבוא – הגנים הנחקרים

❖ **dis2** – מקודד ליחידה הקטליטית של הפוספטאז PP1, אשר מבצע דה-פוספורילציה על Thr4 ב-CTD של RNA pol II וכן מבצע דה-פוספורילציה על פקטור האלונגציה Spt5 אשר חשוב לתעתוק.

❖ **ppe1** – מקודד ליחידה הקטליטית של פוספטאז PP2A-like.

❖ **reb1** – מקודד לפקטור טרמינציית תעתוק של RNA pol I ופקטור תעתוק של RNA pol II.

❖ **ssu72** – מקודד לפוספטאז שמבצע דה-פוספורילציה על Ser5 ב-CTD של RNA pol II.

❖ **pab1** – מקודד לתת-יחידה הרגולטורית של הפוספטאז PP2A.

❖ **ppa2** – מקודד לתת-יחידה הקטליטית של הפוספטאז PP2A.

מבוא – הגנים הנחקרים

❖ **mst1** – מקודד ליחידה הקטליטית של NuA4, קומפלקס היסטון-אצטילטרנספרז שמבצע אצטילציה על ההיסטון H4 – סמן אפיגנטי המקושר לביטוי של ה-DNA.

❖ **hht2** – מקודד לתת-יחידה של היסטון H4.

❖ **wee1** – מקודד לקינאז המשפיע על מחזור התא על ידי עיכוב המעבר משלב G2 ל-M.

שיטות

❖ **PCR למחיקת גנים** – יצירת קסטה עבור ריאקציית מחיקה של גן או ריאקציית סימון ב-tag של גן.

❖ **טרנספורמציות** – החדרת הקסטה לתאים לקבלת תאים רקומביננטיים.

❖ **הכלאות** – יצירת זנים כפולים.

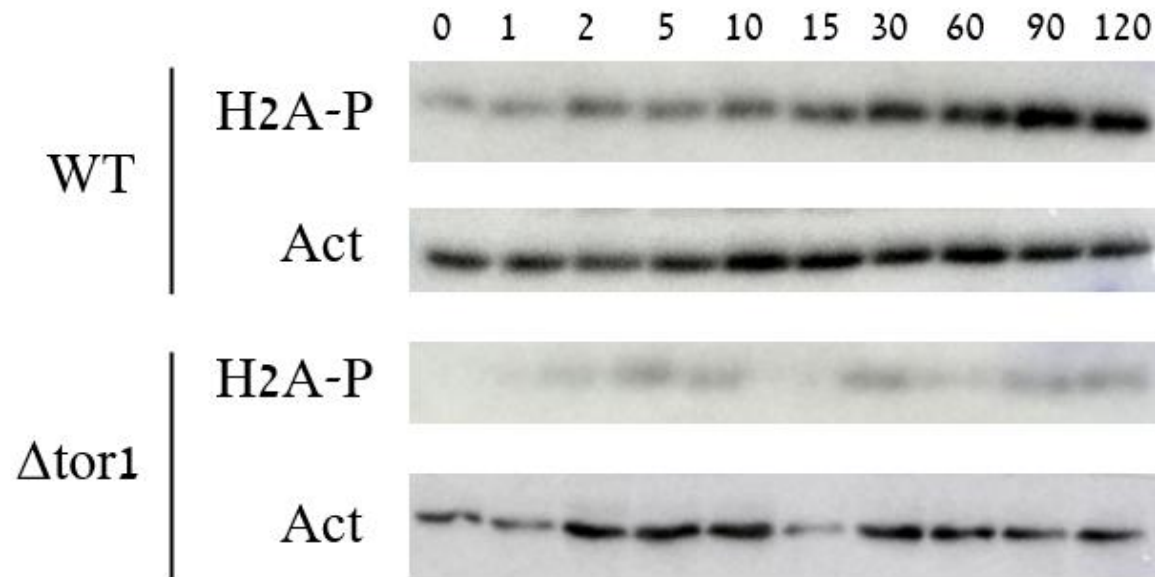
❖ **TCA protein purification** – הפקת חלבונים מהתאים בעזרת TCA.

❖ **(IP) Immunoprecipitations** – שבירת התאים והשקעה של החלבונים בעזרת sepharose beads שאליהם קשורים חלבוני A/G.

בדיקת הקינטיקה של תגובת H2A-P (Time course)

- ❖ בדיקת הקינטיקה של H2A-P בתאי WT ובמוטנטים $\Delta tor1$.
- ❖ האם הפנוטיפ המוטנטי נובע מקינטיקה איטית של התהליך או שלא מתרחשת פוספורילציה?
- ❖ התאים נחשפו לחומר הגנוטוקסי Camptothecin (CPT) בנקודות זמן שונות.
- ❖ התאים הודגרו, הופקו מהם החלבונים ובוצע Western blot.
- ❖ נוגדנים כנגד H2A-P ונוגדנים כנגד אקטין לבדיקת כמות חלבון כללית.

בדיקת הקינטיקה של תגובת H2A-P (Time course)



❖ **WT:** עלייה הדרגתית ברמת הפוספורילציה עם הגעה למקסימום בין 60 ל-90 דקות ולאחריו התייצבות.

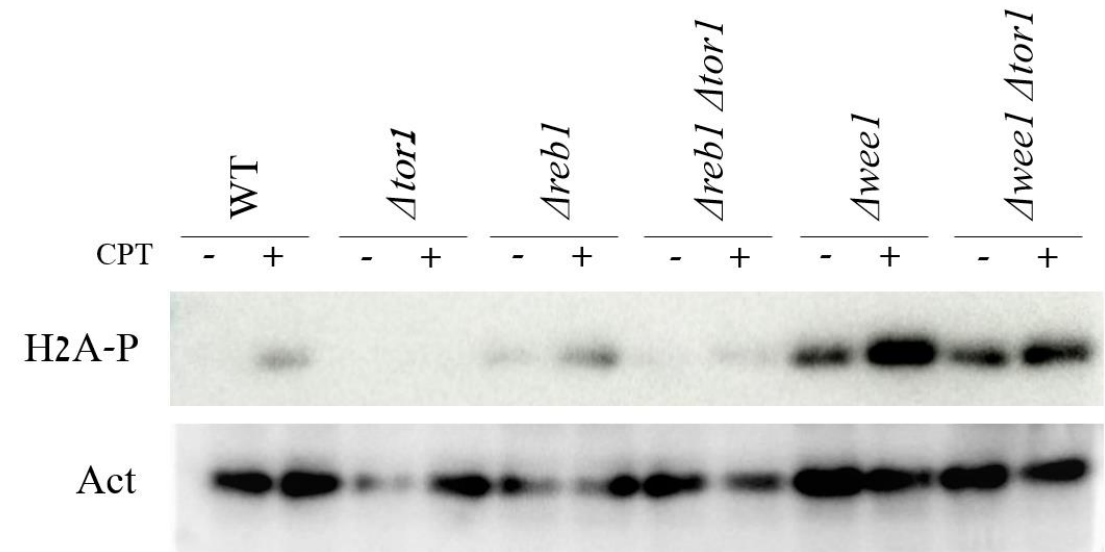
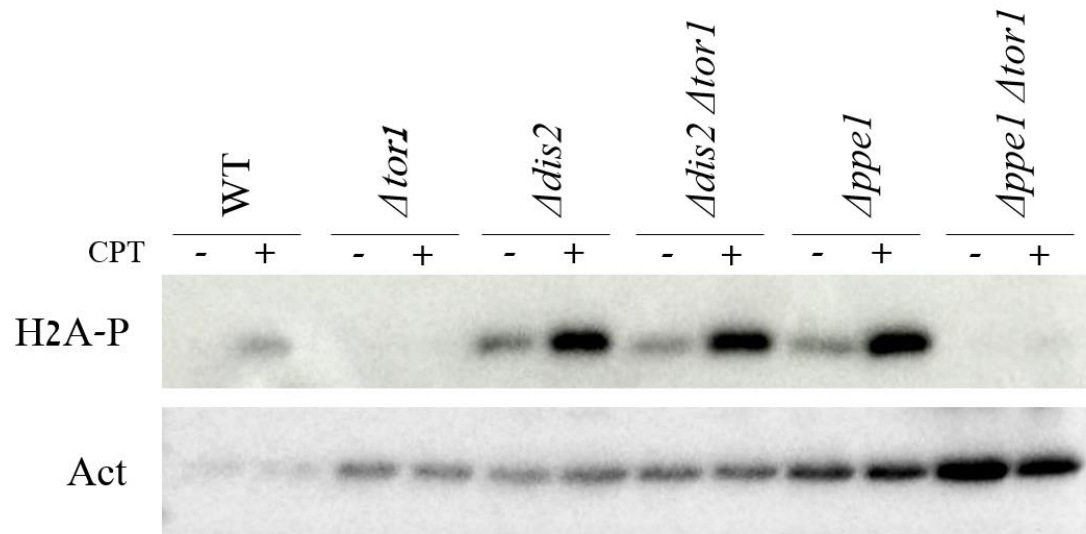
❖ **$\Delta tor1$:** רמת פוספורילציה חלשה מאוד בכל נקודות הזמן ללא שינוי ברמה לאורך הזמן.

מסקנה: הפנוטיפ אינו נובע מקינטיקה איטית של התהליך בתאים המוטנטיים, אלא נראה שבתאים אלה לא מתרחשת פוספורילציה.

בדיקת סופרסיה לפנוטיפ H2A-P: *dis2, ppe1, reb1, wee1*

❖ רמת H2A-P במוטנטים ובמוטנטים כפולים (עם $\Delta tor1$), בהשוואה לתאי WT ותאי $\Delta tor1$ בתנאים רגילים ובתנאי נזק ל-DNA.

❖ ללא CPT – ביקורת
עם CPT – נזק ב-DNA.



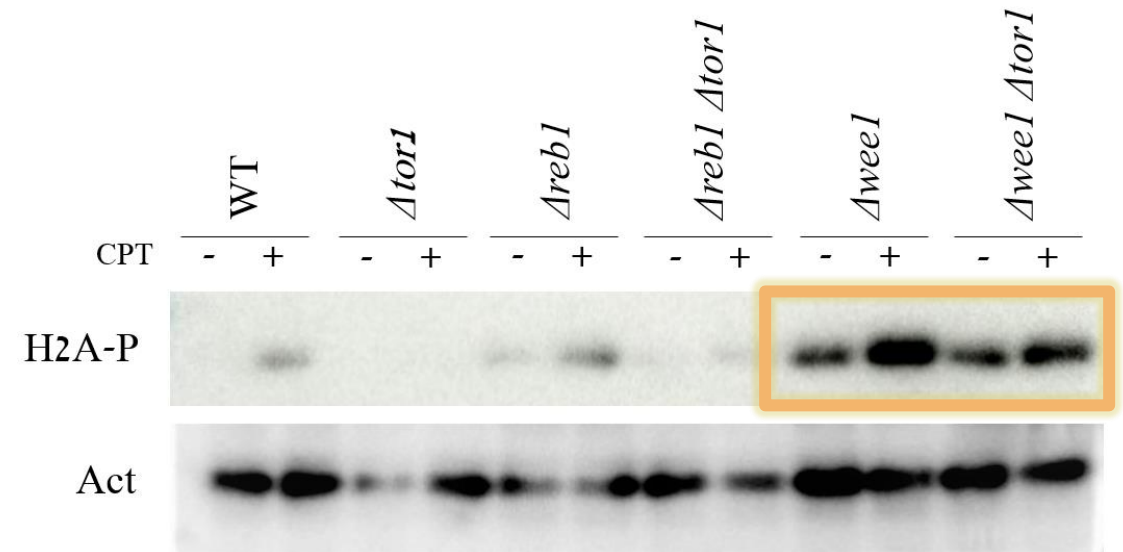
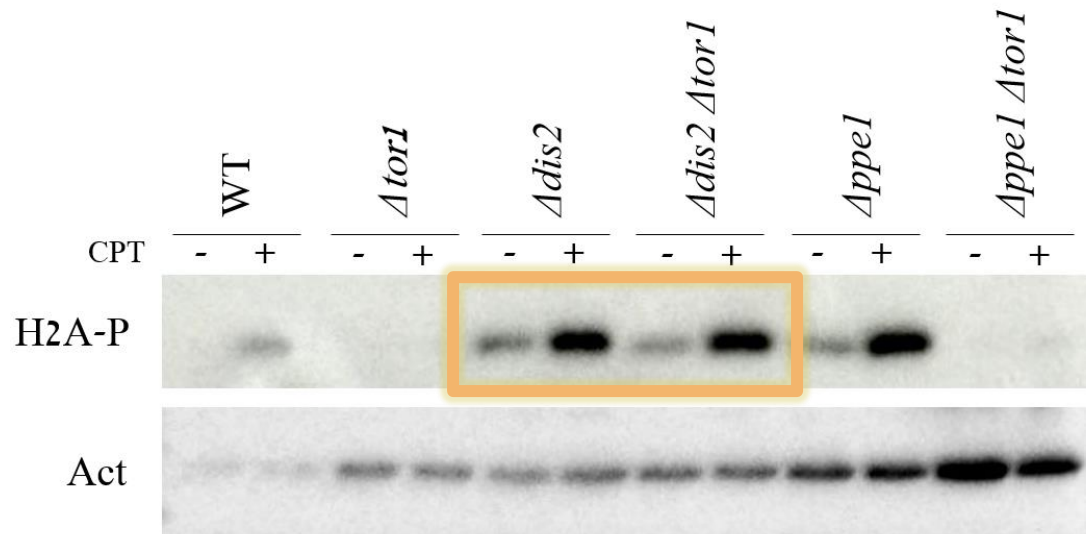
בדיקת סופרסיה לפנוטיפ H2A-P:
dis2, ppe1, reb1, wee1

מתרחשת סופרסיה במוטנטים הכפולים:

Δdis2 Δtor1 

$\Delta wee1$ $\Delta tor1$ 

❖ במוטנטים אלה רמת הפוספורילציה חוזרת לרמה התקינה.

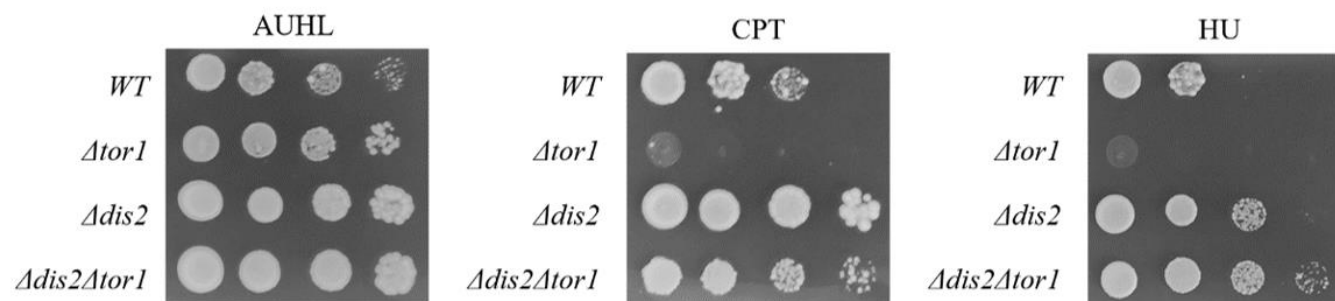


בדיקת סופרסיה לרגישות ל-DNA stress: *dis2, wee1*

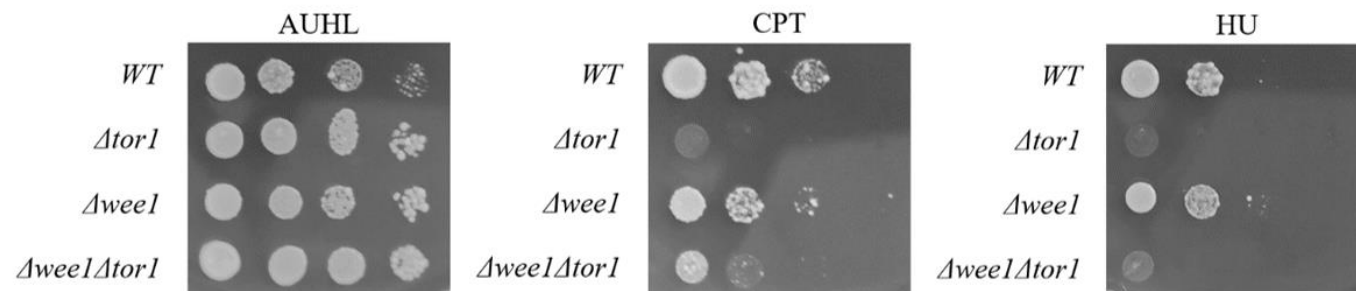
❖ תאי $\Delta tor1$ ו- $\Delta gad8$ רגישים ל-DNA stress, כלומר חל עיכוב בגידול שלהם בנוכחות CPT ו-Hydroxyurea (HU).

❖ זריעת המוטנטים הכפולים ותאי WT כביקורת על צלחות AUHL, CPT ו-HU לבחינת כושר הגידול שלהם.

(a)

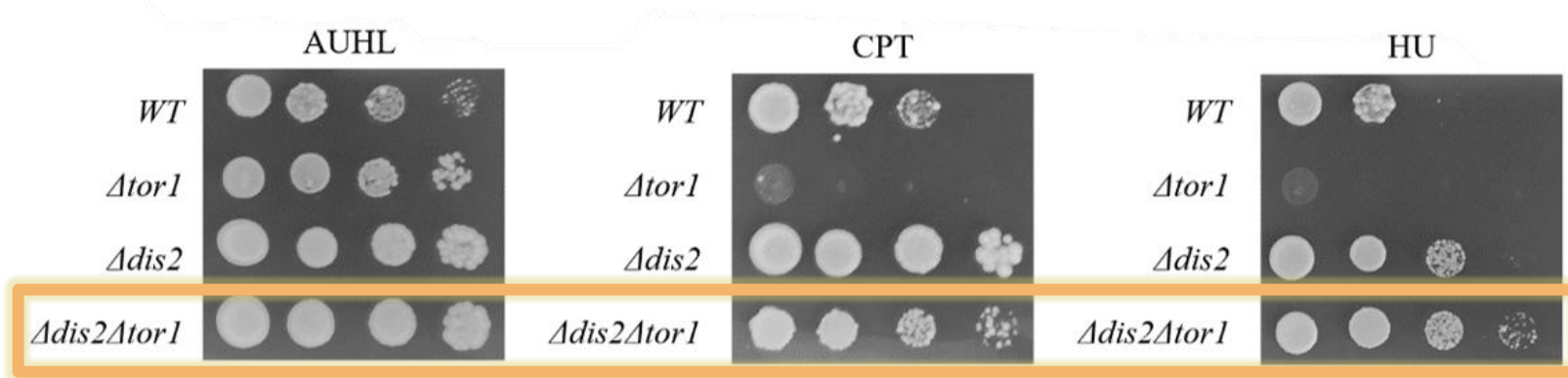


(b)



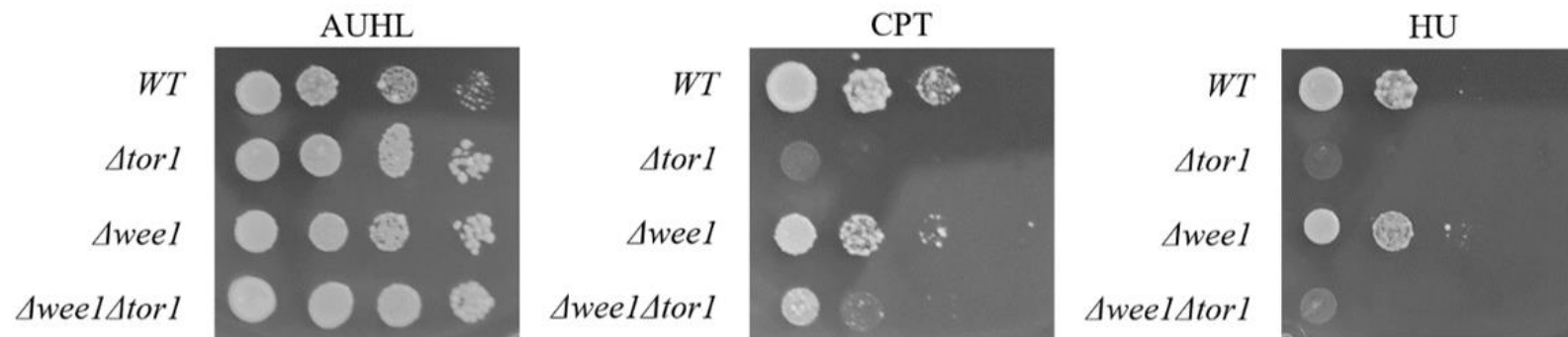
בדיקת סופרסיה לרגישות ל-DNA stress: *dis2, wee1*

(a)



❖ המוטנט הכפול $\Delta dis2 \Delta tor1$
עושה סופרסיה מלאה – התאים
גדלו באופן תקין ולא הראו
רגישות ל-CPT או ל-HU.

(b)



Co-IP בין Gad8-HA לבין:

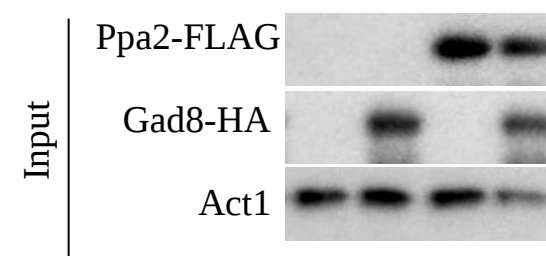
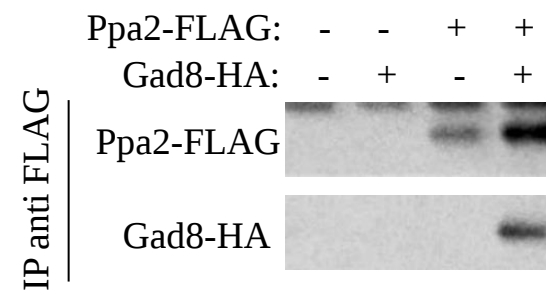
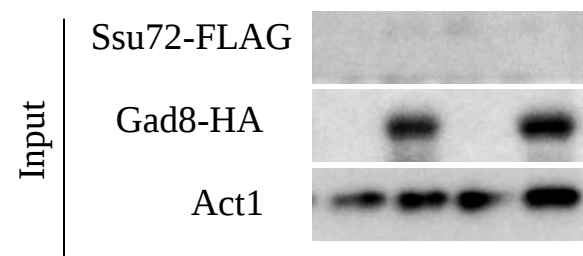
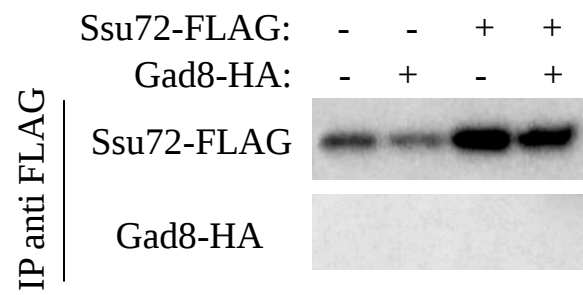
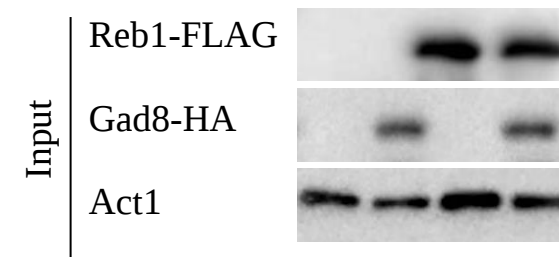
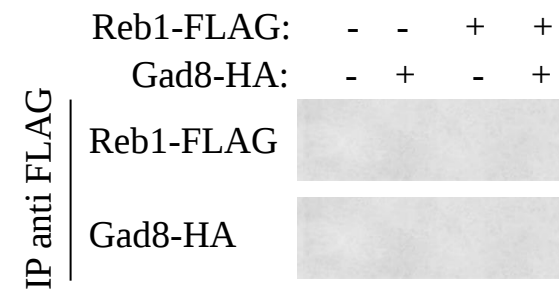
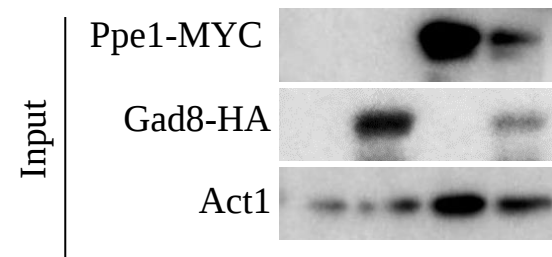
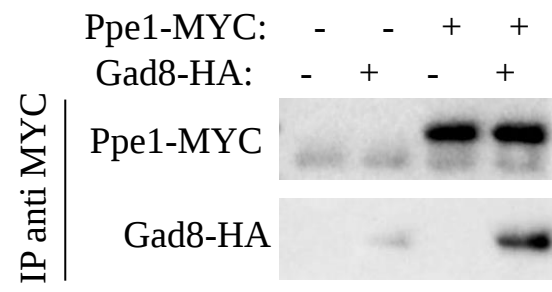
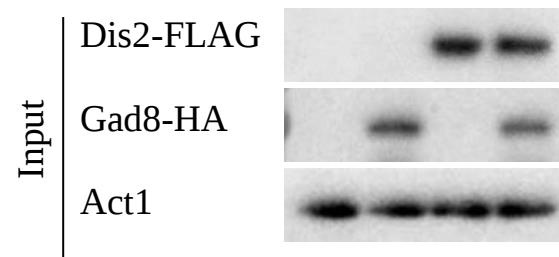
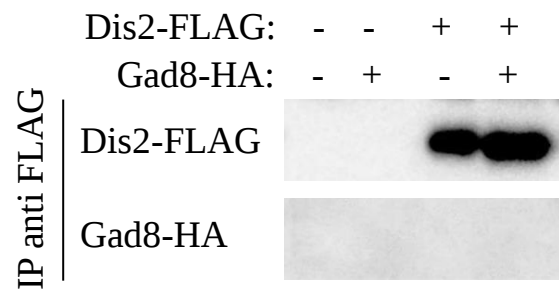
Ppe1-MYC, Reb1-FLAG, Ssu72-FLAG, Ppa2-FLAG

❖ האם החלבונים הנבדקים יוצרים אינטראקציה עם Gad8?

❖ Co-Immunoprecipitation (Co-IP) – השקעה של חלבון רצוי ובחינת החלבונים ששקעו יחד איתו, ובכך להסיק על האינטראקציות ביניהם.

❖ החלבונים הנבדקים סומנו בתגיות FLAG או MYC ו-Gad8 סומן ב-HA.

❖ ההשקעה נעשתה בעזרת נוגדנים כנגד התגיות.



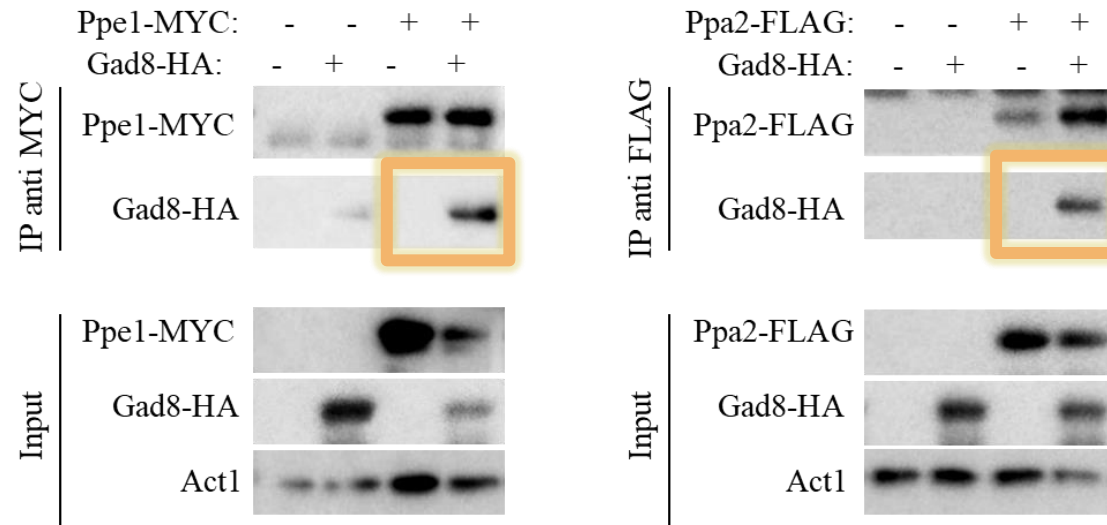
Co-IP בין Gad8-HA לבין:

Ppe1-MYC, Reb1-FLAG, Ssu72-FLAG, Ppa2-FLAG

❖ עבור החלבונים Ppe1 ו-Ppa2 ניתן לראות כי התקבל זיהוי ב-Total extract של כלל החלבונים בתא, וכן זיהוי של החלבונים ב-IP.

❖ Gad8 זוהה ב-IP רק כאשר היה חלבון שמסומן ב-FLAG, כלומר הייתה אינטראקציה ספציפית ולא קישור לא-ספציפי.

❖ ישנה אינטראקציה בין Gad8 ו-Ppe1 ובין Gad8 ו-Ppa2.



מעכבים כימיים ו-H2A-P

❖ נבדקה ההשפעה של חומרים המעכבים תעתוק וחמצון על רמות H2A-P בתגובה לנזק ב-DNA (CPT).

❖ המעכבים:

❖ Phenanthroline (PH) – כלטור של ברזל ומעכב של RNA pol II

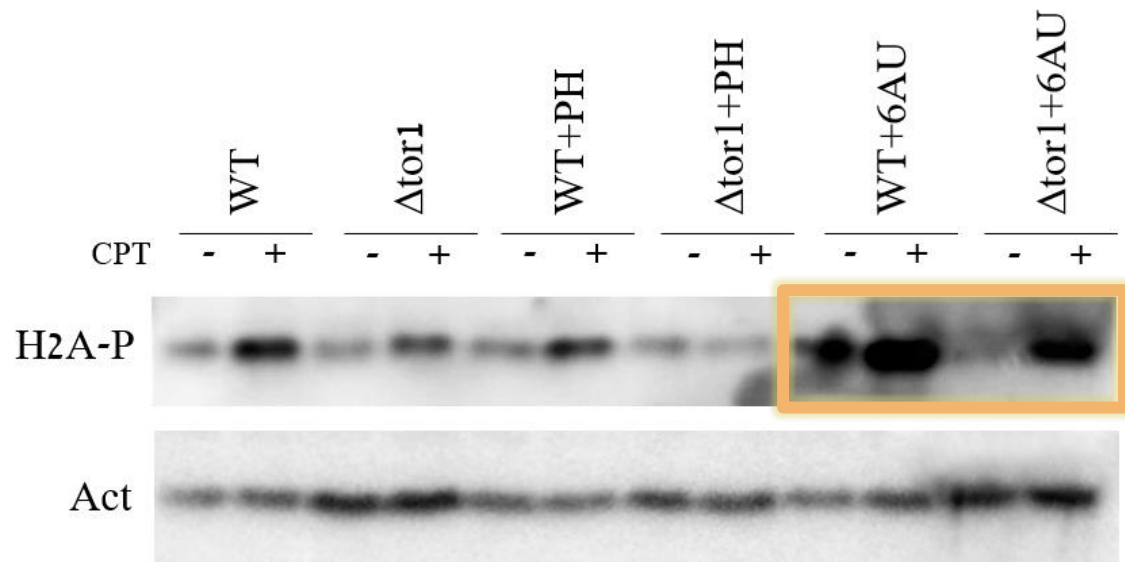
❖ 6-azauracil (6AU) – מדלל את מאגר הנוקלאוטידים UTP ו-GTP בתאים

❖ N-acetylcysteine (NAC) – מנטרל רדיקלים חופשיים (ROS scavenger)

❖ cyclopentylidene-[4-(4'-chlorophenyl)thiazol-2-yl]hydrazine (CPTH) – מעכב של תת-היחידה הקטליטית Gcn5 של קומפלקס SAGA

❖ התאים הודגרו עם המעכבים ולאחר מכן הופקו מהם החלבונים לביצוע Western blot.

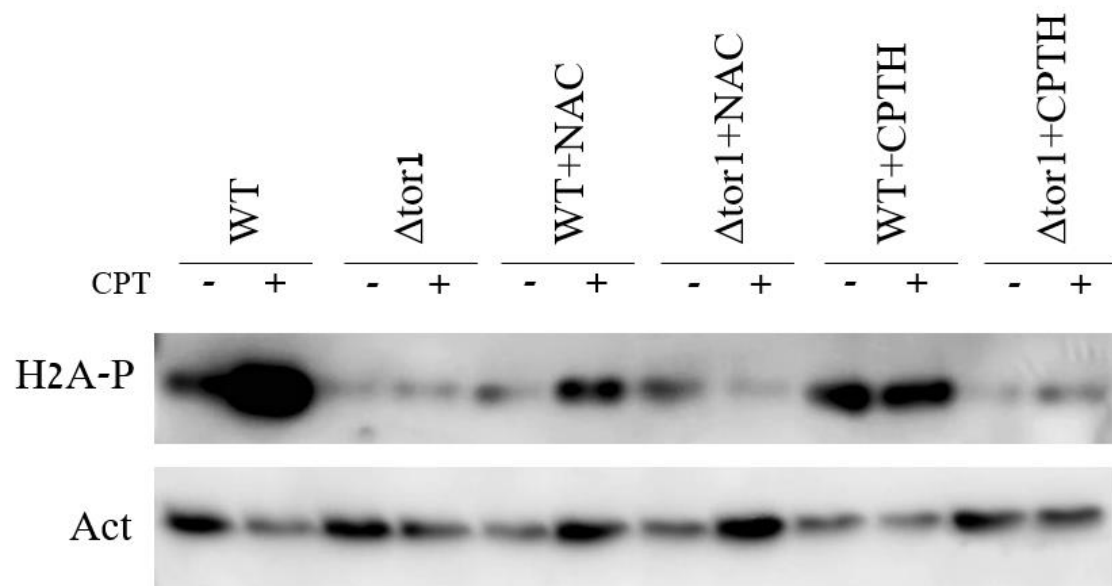
❖ נוגדנים כנגד H2A-P ונוגדנים כנגד אקטין לבדיקת כמות חלבון כללית.



מעכבים כימיים ו-H2A-P

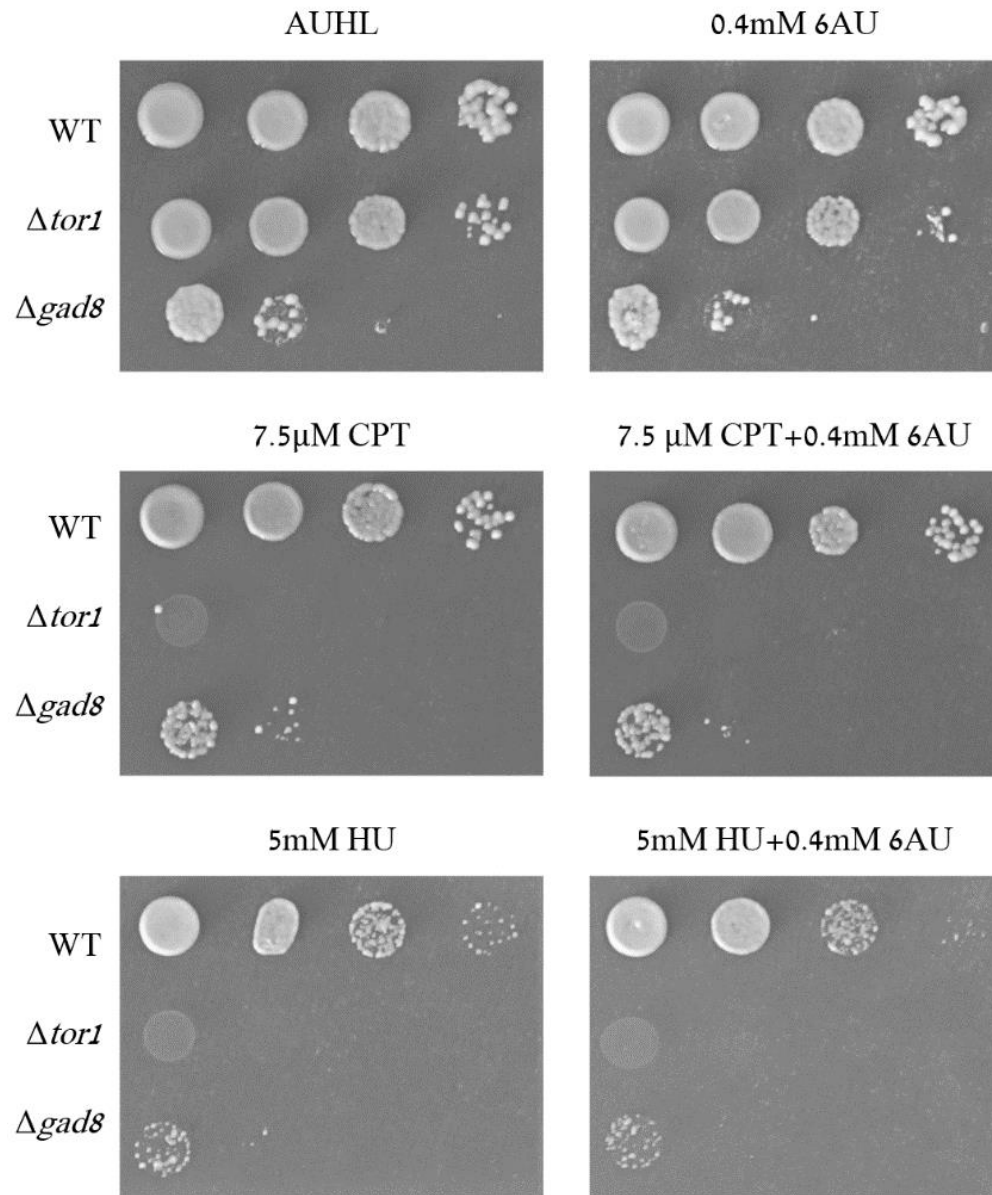
❖ בתאים שהודגרו עם המעכב 6AU התקבלה רמת פוספורילציה הדומה לזו של תאי WT

❖ 6AU עושה סופרסיה לחוסר ב-H2A-P של תאי Δ tor1



ההשפעה של 6AU על רגישות ל-DNA stress

- ❖ השפעתו של 6AU נבחנה על פנוטיפ מוטנטי נוסף – רגישות של תאי $\Delta tor1$ לגידול בתנאי DNA stress.
- ❖ תאי WT, $\Delta tor1$ ו- $\Delta gad8$ נזרעו על צלחות המכילות 6AU יחד עם CPT או HU בהשוואה לצלחות שלא מכילות 6AU.



ההשפעה של 6AU על רגישות ל-DNA stress

❖ לא נראים הבדלים משמעותיים בין הגידול בצלחות 6AU לעומת צלחות הביקורת.

❖ 6AU לא משפיע על הרעילות של HU ו-CPT לתאים המוטנטיים.

❖ 6AU לא גורם לסופרסיה לרגישות של התאים המוטנטיים לתנאי DNA stress.

דיון – סופרסורים

❖ סופרסורים שנמצאו לפנוטיפ H2A-P:

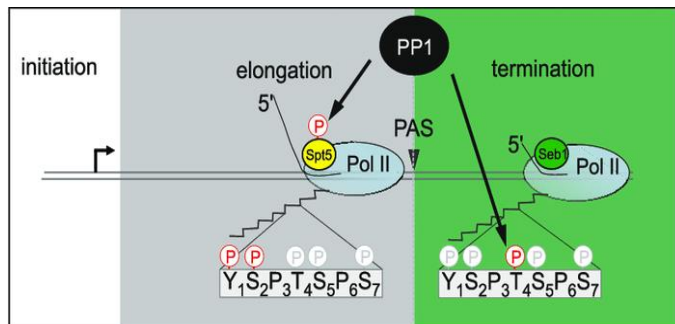
❖ **Dis2** הוא היחידה הקטליטית של PP1 שעושה דה-פוספורילציה ל-CTD של RNA pol II וכן לפקטור האלונגציה Spt5. בסוף התעתוק, Spt5 עובר דה-פוספורילציה על ידי Dis2, אשר עשויה להשפיע על היכולת של Spt5 ליצור אינטראקציה עם RNA pol II או עם פקטור הטרמינציה Seb1.

מסתמן שפעילותו של Dis2 חשובה בתהליך התעתוק למעבר משלב האלונגציה לטרמינציה בכך שהוא מתווך בין פקטור אלונגציה (Spt5) לבין פקטור טרמינציה (Seb1).

❖ **Wee1** הוא קינאז שקשור במחזור התא, מעכב כניסה של התא ל-M-phase. מהתוצאות נראה כי ל- $\Delta wee1$ ול- $\Delta wee1\Delta tor1$ יש רמת פוספורילציה גבוהה יותר באופן כללי, עם ובלי CPT.

ייתכן שהסופרסיה שהתקבלה נובעת מעניין כמותי – רמת הפוספורילציה גבוהה ב- $\Delta wee1$, רמת פוספורילציה נמוכה ב- $\Delta tor1$, ובמוטנט הכפול $\Delta wee1\Delta tor1$ מתקבל איזשהו איזון שמביא לרמת פוספורילציה תקינה.

❖ מבין שני אלו – רק במוטנט של Dis2 נצפתה סופרסיה גם לפנוטיפ הגידול ב-DNA stress.



Kecman et al., *Cell Reports*. (2018)

דיון – סופרסורים

❖ סופרסורים שנמצאו לפנוטיפ H2A-P:

❖ **Ssu72** מבצע דה-פוספורילציה על ה-CTD של RNA pol II ופעולתו מקושרת לאלונגציה של תעתוק יחד עם הפרולין-איזומראז Pin1.

סופרסיה זו יכולה להצביע על כך שאלונגציה קשורה בפנוטיפ המוטנטי של $\Delta tor1$. ניתן לבחון הלאה את הקשר הזה בעזרת מוטנטים של Pin1 אשר פועל יחד עם Ssu72 ויוצר איתו אינטראקציה ישירה.

❖ **Mst1** הוא היחידה הקטליטית של ההיסטון-אצטילטרנספרז NuA4 שפועל על ההיסטון H4 ומזרז יצירת H4K12Ac – סמן אפיגנטי המקושר לביטוי של ה-DNA. פעולתו של Mst1 משפיעה חיובית על התעתוק ועל כן מציאת סופרסיה זו מחזקת את ההשערה לקשר שבין TORC2 לבין התעתוק, ולקשר שבין המוטנטים של $\Delta tor1$ לבין תעתוק-יתר.

דיון – אינטראקציות

❖ התגלתה אינטראקציה בין **Gad8** ל-**Ppe1**.

Ppe1 הוא פוספטאז מסוג PP2A-like. במחקר קודם הוצג כי TORC1 מעכב את **Ppe1** אשר מבקר את הדה-פוספורילציה של פקטור התעתוק **Gaf1** (כלומר, TORC1 מבקר חיובית את הפוספורילציה). רבים מהפנוטיפים של שני קומפלקסי TOR הם משותפים אך הפוכים, ועל כן הקשר בין **Ppe1** לבין TORC2 מעורר עניין. באותו מחקר עולה כי רמת הפוספורילציה של **Gaf1** במוטנטים של TORC2 היא גבוהה יחסית ל-WT. כלומר, ייתכן של-TORC2 יש השפעה שלילית על הפוספורילציה.

❖ התגלתה אינטראקציה בין **Gad8** ל-**Ppa2**.

Ppa2 הוא היחידה הקטליטית של הפוספטאז PP2A. מניסויים קודמים ידוע כי פגיעה ב-**Ppa2** עושה סופרסיה לפנוטיפ H2A-P של **Δtor1**. כמו כן, ידוע כי ל-**Dis2** יש השפעה חיובית על **Ppa2**. **Dis2** אמנם אינו עובר אינטראקציה ישירה עם **Gad8**, אבל אם הוא נמצא upstream ל-**Ppa2** שכן מתקשר ישירות ל-**Gad8**, דרך אפקט חיובי על **Ppa2** הוא יכול להשפיע על **Gad8**. ההשפעה הזו יכולה להתבטא בסופרסיה ש-**Dis2** עושה לפנוטיפ H2A-P ולרגישות ל-DNA stress.

דיון – מודל מוצע

❖ Sds23 הוא מעכב פוספטאזות אשר מעכב את הפוספטאז PP2A ו-Ppe1.

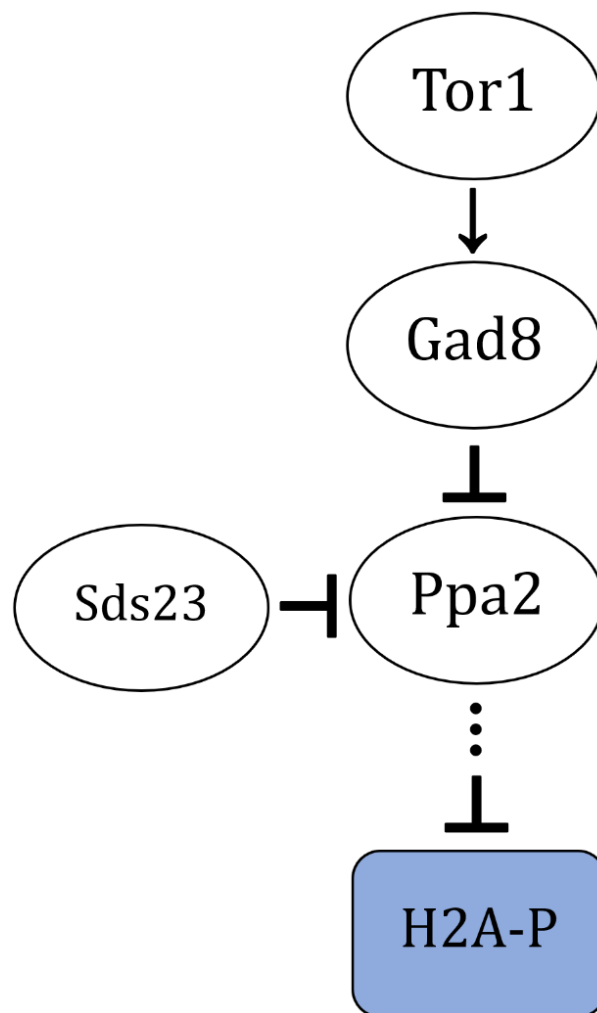
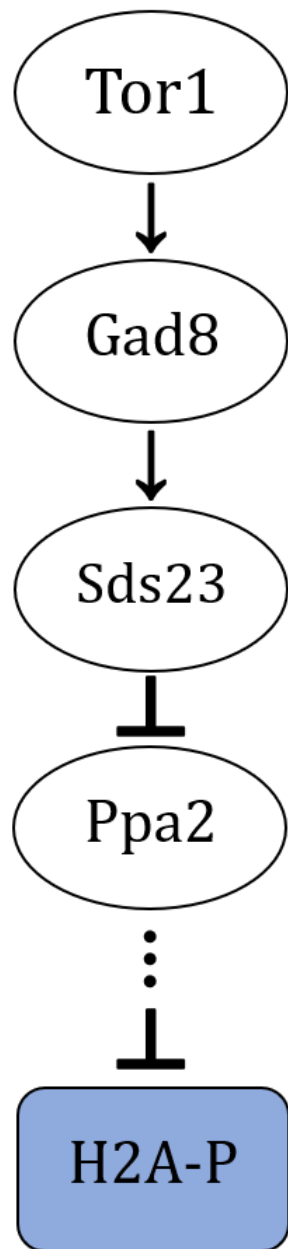
❖ יחד עם המידע שקיבלנו לגבי Ppa2 ו-Ppe1, ייתכן שניתן לשרטט קשר משוער בין החלבונים ופעילותם בהקשר H2A-P.

❖ אם פגיעה ב-Ppa2 גורמת לסופרסיה, מסתמן של-Ppa2 יש השפעה מעכבת (ישירה או עקיפה) על יצירת H2A-P. Ppa2 יוצר אינטראקציה עם Gad8, מעוכב על ידי Sds23 ומושפע חיובית על ידי Dis2. על כן, פגיעה ב-Dis2 תיצור סופרסיה, כפי שהתקבלה בניסויים, שכן Dis2 מעודד את העיכוב של Ppa2 על יצירת H2A-P.

❖ Sds23 יכול לפעול במסלול נפרד או להיות חלק מהמסלול בו פועלים Tor1 ו-Gad8.

מסלולים אפשריים

ההשפעות המעכבות או המשפעות של כל
אחד מהחלבונים מוצגות במסלול האיתות
המשפיע על יצירת H2A-P.



דיון – מעכבים כימיים

- ❖ סופרסיה לפנוטיפ H2A-P: **6AU** הוא מעכב שגורם לדילול של GTP ו-UTP בתא. צמצום של נוקלאוטידים, ובעיקר של UTP, פוגע בסינתזת RNA ועל כן 6AU יכול להיחשב כמעכב של תעתוק.
- ❖ עם זאת, פגיעה ב-GTP יכולה לשבש פונקציות רבות בתא אשר תלויות בנוקלאוטיד זה, כמו פעולתם של GTPases. גם במקרה של 6AU וגם במקרה של המעכבים האחרים שנבדקו, מדובר בעיכוב שאינו ספציפי והוא יכול לפגוע בתפקודים שאינם המטרה. על כן, קשה יותר להסיק מכך מסקנות חד-משמעיות לגבי הפעילות של TORC2 ולגבי תהליך הפוספורילציה של H2A, והקשר ביניהם.
- ❖ 6AU לא השפיע על הרעילות של HU ו-CPT עבור תאי $\Delta tor1$, כך שהמעכב עושה סופרסיה רק לפנוטיפ H2A-P ולא לרגישות לתנאי DNA stress.