

Analiza interakcji genów kodujących białka kompleksów TRAPP u *Saccharomyces cerevisiae*

Edyta Michalska

1. Wstęp.

Mówimy że między genami występuje interakcja genetyczna jeśli osobniki posiadające mutacje obu genów wykazują fenotyp inny niż oczekiwany na podstawie fenotypów osobników z mutacjami tylko pojedynczych genów. Interakcja taka jest określana jako pozytywna jeśli fenotyp podwójnego mutantu charakteryzuje się lepszym dostosowaniem niż oczekiwane a jako negatywna jeśli gorszym. Na podstawie analizy interakcji genetycznych danego genu można często wyciągać wnioski o jego funkcji [1, 2]. Interakcja genetyczna dwóch genów nie musi implikować interakcji fizycznej białek przez nie kodowanych.

2. Biologia systemów.

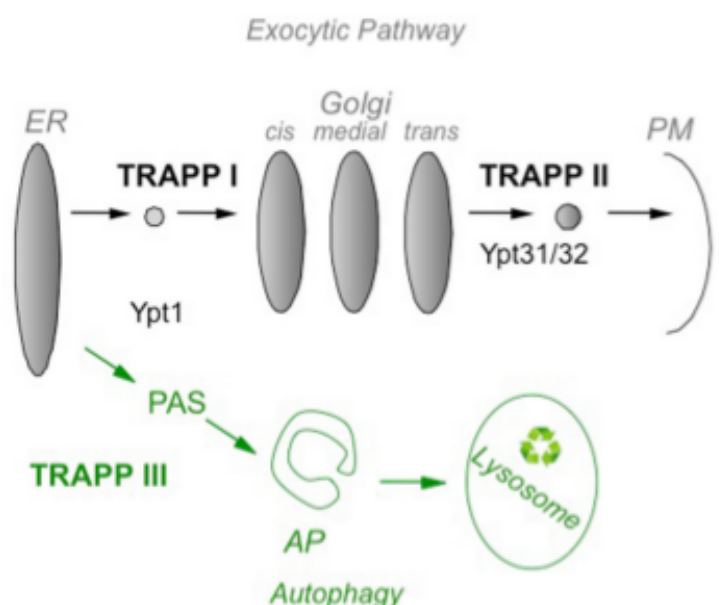
Biologia systemów to dziedzina nauki zajmująca się badaniem systemów biologicznych, takich jak sieci interakcji białek lub genów. Wykorzystuje ona narzędzia matematyczne takie jak teoria grafów oraz korzysta z danych eksperymentalnych z dziedzin takich jak genomika, transkryptomika, proteomika, czy metabolomika.

3. Cel projektu.

Celem projektu jest wybranie dowolnego systemu biologicznego u drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, zawierającego przynajmniej 10 genów oraz znalezienie interakcji genetycznych pomiędzy nimi wykorzystując bazę <http://thecellmap.org/> [1]. Należy też wytłumaczyć od strony biologicznej te interakcje, w tym dlaczego są pozytywne lub negatywne, opierając się na informacjach o funkcji biorących w nich udział genów.

4. Co wybrałam do analiz.

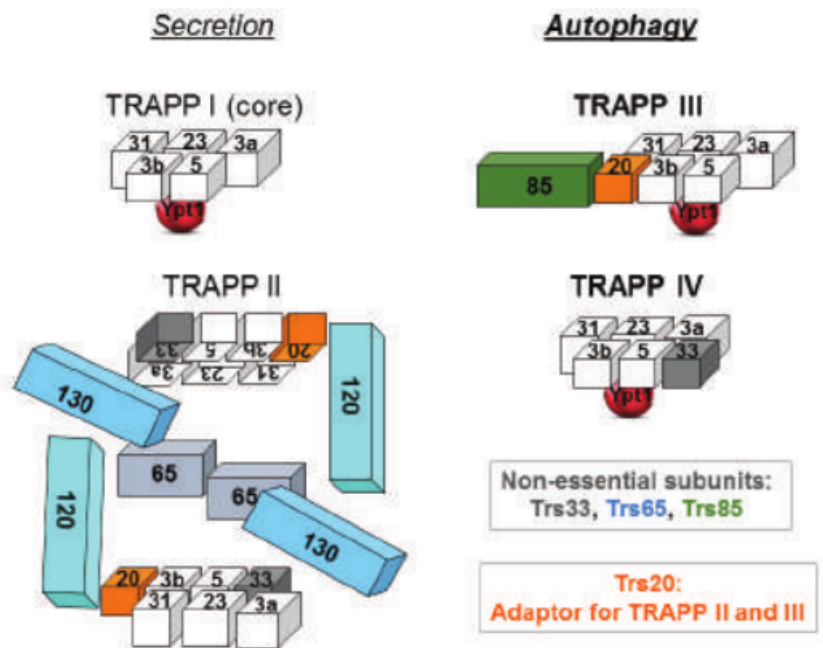
Do analizy wzięłam geny kodujące podjednostki kompleksów TRAPP (od angielskiego „Transport Protein Particle”) I, II, III, IV [3,4]. Kompleksy TRAPP są czynnikami wymiany nukleotydu guaniny aktywującymi różne GTP-azy. Jak przedstawiono na Rysunku 1 z [3], TRAPP I i II regulują w ten sposób egzocytozę, natomiast



Rysunek 1: Rola kompleksów TRAPP w transporcie wewnątrzkomórkowym z [3].

TRAPP III i niewymieniony na tym rysunku TRAPP IV – autofagię. TRAPP I aktywuje Ypt1 w celu regulacji transportu z retikulum endoplazmatycznego do aparatu Golgiego, TRAPP II aktywuje Ypt31 lub Ypt32 regulując transport z aparatu Golgiego do błony plazmatycznej, natomiast TRAPP III i IV aktywują Ypt1 i regulują składanie struktury preautofagosomalnej (ang. pre-autophagosomal structure, PAS) [3,4]. PAS jest wymagane do stworzenia autofagosomu (AP) w którym przenoszony jest ładunek do degradacji w lizosomie.

Na Rysunku 2 przedstawiono struktury kompleksów TRAPP według [4]. Rdzeń TRAPP I zawiera białka Trs31, Trs23, Bet5, i dwie kopie Bet3. Jest on zdolny do wiązania i aktywacji Ypt1 poprzez Bet5 i Trs23. TRAPP III zawiera wszystkie białka z rdzenia TRAPP I, oraz Trs85 połączony z resztą kompleksu przez łącznik Trs20. TRAPP II, oprócz rdzenia TRAPP I i Trs20, zawiera dwie niezbędne do działania jednostki Trs120 i Trs130, oraz



Ilustracja 1: Struktury kompleksów TRAPP z [4]. N na pojedynczo nieistotne dla jego działania podjednostkach oznacza BetN dla N= 3 lub 5 oraz TrsN dla pozostałych N.

przyłączenia Trs120 do TRAPP II, a Trs65 lub Trs33 są wymagane do działania TRAPP II in vivo. TRAPP II jest na Rysunku 2 przedstawiony jako dimer, ponieważ wykazano że ma on zdolność do dimeryzacji [5], niemniej jej niezbędność dla działania kompleksu jest wątpliwa ponieważ Trs65, który jest konieczny do dimeryzacji, nie jest niezbędny dla działania kompleksu [3]. Według [6], w skład TRAPP II wchodzi jeszcze nieprzedstawione na rysunku białko Tca17, będące paralogiem Trs20. Odgrywa ono rolę w składaniu i utrzymaniu stabilności TRAPP II oddziałując z Trs130. TRAPP IV zawiera, oprócz rdzenia TRAPP I, białko Trs33.

4. Wyniki i ich interpretacja.

W bazie <http://thecellmap.org/> wyszukałam interakcje genetyczne między 11 genami TrsN dla N=20, 23, 31, 33, 65, 85, 120, 130, oraz Bet5, Bet3 i Tca17, kodującymi białka o tych samych nazwach, wymienione w poprzedniej sekcji. W bazie nie było tylko genu Trs120 a gen Trs31 wystąpił dla dwóch różnych szczepów. Znalezione interakcje przedstawiono w Tabeli 1.

	Bet3-5001	Bet5-5001	Trs23-5001	Trs31-5002	Trs31-5003	Trs20-5001	Trs33	Trs85	Trs130	TRS65	Tca17
Bet3-5001		-	-			-	-	-	-	-	
Bet5-5001	-				-	-	-	-	-	-	
Trs23-5001	-	-				-			-	-	
Trs31-5002								-			
Trs31-5003		-				-					
Trs20-5001	-	-	-		-		-	+	-	-	
Trs33	-	-						-	-	-	
Trs85	-	-		-	-	+			-	-	
Trs130	-	-	-				-	-		-	
TRS65	-	-	-			-	-	-	-		
Tca17											

Tabela 1: Interakcje między genami. Na niebiesko przedstawiono interakcje negatywne, na żółto pozytywne, natomiast kolor zielony oznacza brak interakcji.

Jak widać z Tabeli 1, między genami Trs85 i Trs20 występuje pozytywna interakcja. Według [5], trs85 rekrutuje rdzeń TRAPP to struktury preautofagosomalnej używając trs20 jako łącznika. Ponadto, Trs85 wiąże się do kompleksu TRAPP III tylko w obecności Trs20 ale nie jego pewnych mutantów i pewne mutanty trs20 charakteryzują się upośledzoną selektywną i nieselektywną autofagią. Można zatem wysunąć hipotezę że pozytywna interakcja genetyczna między Trs85 i Trs20 wynika stąd że skoro przy zmutowanym Trs20 TRAPP III i tak nie może pełnić swojej funkcji w autofagii, to dodatkowa mutacja Trs85, kodującego białko występujące tylko w tym kompleksie, nie może już w żaden sposób pogorszyć sytuacji. Innymi słowy, mutacje w genie Trs20 mogą maskować mutacje Trs85 - mechanizm taki nazywa się epistazą [8].

Wszystkie pozostałe interakcje genetyczne w Tabeli 1 są negatywne. Negatywną interakcję Trs33 i Trs85 można wyjaśnić następująco. Według [4], w nieobecności Trs85, zawierający Trs33 kompleks TRAPP IV może w dużej mierze zastępować TRAPP III, aktywując Ypt1 w autofagii i przyłączając się do PAS i analogicznie w nieobecności Trs33 zawierający Trs85 TRAPP III może zastępować TRAPP IV. Nieobecność zarówno Trs85 jak i Trs33 uniemożliwia aktywację Ypt1 i formowanie się PAS, blokując mediowaną przez Ypt1 autofagię i dając fenotyp cięższy niż oczekiwany na podstawie mutacji tylko Trs85 i Trs33. Zatem interakcja Trs85 i Trs33 jest szczególnym przypadkiem syntetycznego wzmocnienia [8].

Można się domyślać że analogiczny mechanizm odpowiada za negatywną interakcję występującego w TRAPP III ale nie IV Trs20 i w TRAPP IV ale nie III Trs33.

Przypadkiem syntetycznego wzmocnienia jest też negatywna interakcja Trs33 i Trs65. Można ją wyjaśnić tym że według [9], do złożenia i działania kompleksu TRAPP II wystarczy Trs33 lub Trs65, natomiast brak obu blokuje składanie i działanie tego kompleksu.

Można domniemywać że za pozostałymi negatywnymi interakcjami w Tabeli 1 stoją podobne mechanizmy jak opisano wyżej - dzięki pewnej redundancji mutacje prowadzące do uszkodzeń lub

braku niektórych pojedynczych podjednostek kompleksów TRAPP mogą być częściowo kompensowane przez dobrze działające pozostałe podjednostki tych samych kompleksów lub inne kompleksy, natomiast uszkodzenia lub brak kilku jednostek może w poważnym stopniu uniemożliwiać funkcjonowanie kompleksów a co za tym idzie funkcjonowanie egzocytozy i autofagii. Dominacja negatywnych interakcji wśród genów związanych z istotnymi systemami biologicznymi takimi jak kompleksy TRAPP jest typowa (w przeciwieństwie do systemów mało istotnych gdzie dominują interakcje pozytywne) i można ją tłumaczyć ograniczoną zdolnością komórek do radzenia sobie z kilkoma poważnymi uszkodzeniami takich systemów [1, 2].

Co ciekawe, dla genu Tca17 nie wystąpiły żadne interakcje z innymi genami w Tabeli 1. Może to mieć związek z tym że nie jest on niezbędny dla funkcjonowania komórki [3] i może wskazywać na jego niewielki wpływ na działanie kompleksów TRAPP.

5. Bibliografia.

1. Usaj M. et al. „TheCellMap.org: A web-accessible database for visualizing and mining the global yeast genetic interaction network”, G3: Genes|Genomes|Genetics Early Online, 2017
2. Costanzo M. et al., „A global genetic interaction network maps a wiring diagram of cellular function”, Science, 2016
3. Kim J. J. et al. „TRAPP complexes in secretion and autophagy”, Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2016
4. Lipatova Z. et al. „Trs33-containing TRAPP IV: a novel autophagy-specific Ypt1 GEF”, Genetics, 2016
5. Taussig D. et al. „Trs20 is required for Trapp III complex assembly at the PAS and its function in autophagy”, Traffic, 2014
6. Yip C.K. et al. „Molecular architecture of the TRAPP II complex and implications for vesicle tethering”, Nat. Struct. Mol. Biol., 2010
7. Choi C. et al. „Organization and assembly of the TRAPP II complex”, Traffic, 2011
8. Interakcje genetyczne. Genetyczne podstawy biologii systemów. Instytut Genetyki i Biotechnologii UW. www.igib.uw.edu.pl/index.php/download_file/view/107/271/
9. Tokarev A. A. et al., „TRAPP II complex assembly requires Trs33 or Trs65”, Traffic, 2009