

**Plant RBR proteins are phosphorylated in cell cycle-phase dependent manner and the B”
regulatory subunit containing OsPP2A holoenzyme mediates the dephosphorylation of OsRBR1**

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Ping Yu

Témavezető: Dr. Horvath Gabor

Biológia Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem

MTA Szegedi Biológiai Központ Növénybiológia Intézet

Szeged

2015

ÖSSZEFOGLALÁS

Bevezetés

A retinoblasztóma fehérjének (pRB) a sejtosztódásban játszott gátló szerepét többek között a ciklinfüggő kinázok által végrehajtott foszforiláció befolyásolja. Nyugvó (G0) és korai G1 fázisú sejtekben a pRB hipofoszforilált állapotú és képes az E2F-DP transzkripciós faktor heterodimerek kötésére, ami gátolja az E2F-függő transzkripciót. A pRB fehérje a sejtciklus S fázisába történő progressziójával foszforilálódik, ez a poszttranszlációs módosítás felszabadítja az E2F transzkripciós faktorokat a gátlás alól és lehetővé teszi a sejtciklus továbbhaladásához szükséges célgénnek átíródását. Emlős sejtekben a kezdeti foszforilációt a ciklin D-CDK4 és ciklin D-CDK6 kináz komplexek végzik, míg ezt követően a ciklin E-CDK2 kináz tovább növeli a pRB foszforiláltságát. A mitózis alatt a foszfo-RB gyorsan defoszforilálódik specifikus foszfatáz(ok) által, visszaállítva a nem- vagy hipofoszforilált pRB túlsúlyát az új G1 fázis kezdetére.

A növényi RB-szerű (RBR, RB-related) foszforilációja ugyancsak sejtciklus függő módon történik, a hiperfoszforilált RBR fehérjék megjelennek a G1/S átmenetkor és ez a magas foszforiláltság jellemző a G2 fázis végéig. Tekintettel a sejtciklust szabályozó enzimek és folyamatok jelentős konzerváltságára elmondható, hogy ez az RBR foszforiláció a növények esetében is az E2F kötési képesség csökkenését eredményezi, felszabadítva az E2F-DP transzkripciós faktorokat aktív formájukban.

Az 1 és 2A típusú foszfoprotein foszfatázok (PP1 és PP2A) szabályozó szerepe jól ismert az élesztő és emlős sejtek sejtciklusában és néhány ilyen foszfatáz spéciesz foszfo-RB és foszfo-RBR defoszforilációs képességgel bír. Yan és mtsai (1999) kimutatták, hogy a PP1 szerepet játszik a pRB közvetlen defoszforilációjában, míg a PP2A foszfatázok indirekt módon szabályozzák a G1 fázisú CDK komplexek aktivitását. A PP2A foszfatázoknak fontos szerepük van a mitotikus kinázok szabályozásában és a mikrotubulusok szerveződésében, ahogy ezt Ayaydin és mtsai (2000) lucernában kimutatták.

A PP2A típusú foszfatázok heterotrimer fehérjekomplexek, melyek egy szerkezeti alegységből (PP2Aa/PR65), egy katalitikus alegységből (PP2Ac) és egy B típusú regulátor alegységből (B, B', B'' vagy B''') állnak. Az A és C alegységek asszociációjával alakul ki az úgynevezett mag ("core")

komplex, ehhez kötődnek a különböző B regulátor alegységek széles körű szubsztrátspecifitással bíró holoenzimeket létrehozva. A PP2A holoenzimek foszfatáz aktivitásának specifikussága nagyban függ nemcsak a szubsztrát iránti affinitásuktól, de a sejten belüli lokalizációjuktól is, ezeket a tulajdonságukat túlnyomó mértékben a B regulátor alegység természete határozza meg.

Egy előzetes élesztő két-hibrid könyvtár szűrési kísérletben a *Medicago sativa* MsRBR1 fehérjéjének erős kölcsönhatóját azonosítottuk. Ez a kölcsönható fehérje aminosav sorrendjében 39 %-os azonosságot és 59 %-os hasonlóságot mutatott az egér PR59 PP2A regulátor alegységgel és erős kölcsönhatást mutatott a rizs OsRBR1 fehérjével, de nem asszociált az OsRBR2 homológgal (Lendvai és mtsai, 2007). Hasonlót tapasztalhatunk az egér RB spécieszek esetében is: csak a p107 fehérje képes erős kölcsönhatásra a PR59 PP2A B" regulátor alegységgel, a pRB nem mutat ilyen asszociációt (Voorhoeve és mtsai, 1999b). Ez a hasonlóság alátámasztja azt a feltevést, hogy a növényi RBR változatok (lásd 1.2.1. fejezet) különböző szereppel bírnak a növényi sejtosztódás és differenciálódás során (Dudits és mtsai, 2011).

Munkám során az előzetesen azonosított MsPP2A B" gén rizs homológját, az OsPP2A B"-t izoláltam és jellemeztem a kódolt protein OsRBR1-el történő kölcsönhatását és ennek következményeit.

Célkitűzések

Első feladatom volt a *Medicago sativa* és *Oryza sativa* RBR fehérjéket (foszforilált és nem foszforilált formájukban) specifikusan felismerő ellenanyagok vizsgálata, mivel ezek segítségével követhettük az egyes fehérje spécieszek mennyiségének és a foszforilációs szintjüknek változását a sejtciklus progressziója során.

A következőekben az OsPP2A B" regulátore alegység és az OsRBR1 fehérje közötti specifikus kölcsönhatást vizsgáltam. Kíváncsi voltam arra, hogy a két fehérje mely doménjei szükségesek ehhez az asszociációhoz, valamint arra, hogy az OsPP2A B" feltételezett poszttranszlációs módosítása milyen hatással van a fehérje funkciójára.

Munkám során az alábbi fő célkitűzésekre koncentráltam:

1. Megfigyeltem az MsRBR1 és OsRBR1 fehérjék foszforilációjának változását a sejtciklus különböző fázisaiban, különös figyelemmel arra, hogy mutat-e ez valamilyen különbséget az egyszikű és kétszikű modellnövényeinkben.

2. Analizáltam az OsRBR1 és OsPP2A B" fehérjék *in vitro* és *in vivo* kölcsönhatását.

3. Megvizsgáltam, hogy a fenti fehérjék mely doménjei szükségesek a kölcsönhatáshoz.

4. A komputeres foszforilációs hely azonosítást követően megkezdtem az OsPP2A B" foszforilációjának kísérletes bizonyítását, elemeztem ennek hatását az OsRBR1 fehérje kötésére és a PP2A holoenzim aktivitására. Ez utóbbi tulajdonságokat még nem foszforilálható és konstitutív foszforilációt utánzó mutáns fehérjék segítségével is megvizsgáltam.

Felhasznált anyagok és módszerek

- *Oryza sativa* var. japonica cv. UNGGI-9 növényekből és szuszpenziós kultúrából cDNS könyvtár létrehozása az élesztő két-bibrid rendszer vektorában.

- A könyvtár szűrése az élesztő két-hibrid rendszerben, páronkénti kölcsönhatási vizsgálatok, a kötési erősség kvantitálása β -galactozidáz méréssel.

- A szuszpenziós kultúrák sejtciklus szinkronizálásának optimalizálása, áramlásos citometriás mérések.

- GST és His₆ fúziós rekombináns fehérjék termeltetése.

- a deléciós és helyspecifikus mutáns OsPP2A B" fehérjék foszforilációjának vizsgálata.

- Ko-immunoprecipitáció.

- A különbözőképpen módosított OsPP2A B" fehérjét tartalmazó holoenzimek foszfoprotein foszfatáz aktivitásának vizsgálata.

Eredmények és rövid megvitatásuk

Munkám a MsRBR1/OsRBR1 fehérjét és ezek foszforilált formáit felismerő ellenanyagok jellemzésével kezdődött. Az anti-AtRBR1 ellenanyag az Arabidopsis AtRBR1 fehérjének C-terminális 236 aminosavas régiója ellen készült (Horváth mtsai, 2006). Az antigén kompetíciós kísérleteink alátámasztották ennek az ellenanyagnak lucerna rendszerben történő használatát. Az MsRBR1 fehérje C-terminálisán található NVYVSPLRS_u motívum megfeleltethető az emberi pRB fehérje NIYISPLKS_u motívumának, mely foszforilált változatát felismerő ellenanyag (foszfo-hsRb Ser(807/811) kereskedelmi forgalomban van. Kísérleteket végeztünk, melyekben az MsRBR1 His₆-C-terminális fragmentjének foszforilációját követtük radioaktív ³²P jelöléssel és a rendelkezésre álló foszfo-pRB ellenanyaggal. Az egybevágó eredmények alapján megállapítottuk, hogy az ellenanyagunk jól használható a foszfo-MsRBR1 szintjének detektálására. Hasonló kísérleteket végeztünk a rizs OsRBR1 fehérjével és ennek foszforilált C-terminális szakaszával is, megállapítván, hogy a tisztított monoklonális anti-OsRBR1 ellenanyag specifikusan csak ezt a rizs retinoblasztóma fehérje fajtát ismeri fel, illetve a foszfo-pRB ellenanyag a rizs rendszerben is jól használható.

Ezek után megvizsgáltuk az RBR és foszfo-RBR szintek változását szinkronizált lucerna és rizs szuszpenziós kultúrákban. Megállapítottuk, hogy míg az MsRBR1 és OsRBR1 fehérjék szintje alig változik a sejtciklus progressziója során, addig a foszfo-RBR szintje erőteljes, az elmélet alapján elvárható sejtosztódási fázis függőséget mutat.

Miután kimutattuk, hogy az OsRBR1 és OsPP2A B" fehérjék *in vitro* és *in vivo* is kölcsönhatnak, kíváncsi voltam, hogy az OsRBR1 mely doménja felelős az asszociációért. A deléciós mutánsokkal elvégzett élesztő két-hibrid kísérlet megmutatta, hogy a fehérje B "zseb" doménje szükséges és elegendő ehhez a kölcsönhatáshoz, míg az OsRBR1 C-terminális régiójának jelenléte nem szükséges.

Az OsPP2A B" regulátor alegység aminosavsorrendjének analízise megmutatta, hogy a fehérje két, valószínűleg kalciumkötési képességgel rendelkező EF-hand domént tartalmaz. Annak meghatározására, hogy ezek az EF-hand domének szükségesek-e az OsRBR1 kötéséhez, egy sorozat B" deléciós mutánsnal kötési kísérletet végeztem az élesztő két-hibrid rendszerben. Mint az kiderült, egyetlen csonka változat sem tudta az OsRBR1-et megkötni. Ez a kísérlet jól demonstrálta az OsPP2A B" C-terminálisának fontosságát a kölcsönhatásban, de azt is bebizonyította, hogy önmagában ez a domén nem elegendő az asszociációhoz. Az élesztő két-hibrid rendszer másik vektorába klónozva

kiderült, hogy az OsPP2A B" erősen transzaktivál, ami magyarázható a fehérje C-terminálisának savas karakterével.

A rendelkezésre álló élesztő két-hibrid adatok alapján megállapítottam, hogy az OsRBR1 és az OsPP2A B" fehérjék kölcsönhatásához az előbbi intakt B doménje és az utóbbi teljes hosszúságú proteinje szükséges. Az EF-hand motívumok jelenléte a kalcium ionok szerepét mutatja az RBR defoszforilációjában (erre a dolgozatomban kísérletes bizonyítékot is megadok), ami összeköti a sejtciklus szabályozását a környezeti stresszfaktorokkal.

Ko-immunoprecipitációs és rekombináns fehérje foszforilációs kísérletekkel bizonyítottuk, hogy az OsPP2A B" regulátor alegység PSTAIRE motívumot tartalmazó CDK-kal foszforilálható. A számítógépes predikció alapján mindhárom foszforilációs hely a fehérje aminoterminálisára volt térképezhető. A proteomikai megközelítés technikai problémák miatt csak a Ser95 és Ser119 aminosavak foszforilációját mutatta ki, míg deléciós mutánsokkal mindhárom (Ser95, Ser102 és Ser119) szerinen történő foszforilációt bebizonyítottuk.

A betérképezett szerin aminosav maradékok alaninra történő cseréje a foszforilálhatósági vizsgálatok jól bevált eszköze, így hasonló változtatást az OsPP2A B" regulátor alegységen is elvégeztem. A rekombináns fehérjéken elvégzett kináz reakciók bizonyították az egyszeres, kétszeres és háromszoros cserét tartalmazó fehérjeváltozatok eltérő foszforilálhatóságát, bebizonyították az előző vizsgálatok eredményét és azt, hogy a feltételezett három foszforilálható helyen kívül nincs több a fehérje teljes hosszán.

A háromszoros alanin mutánst (TMutA) és a konstitutív foszforilációt utánzó háromszoros glutamát mutánst (TMutE) használtuk a foszforiláció hatásának vizsgálatára mind a PP2A holoenzim összeszerelődése, mind az OsRBR1 fehérje kötése szempontjából. Az eredmények jó egyezést mutattak a Davis által publikáltakkal (2005): a foszforilációs helyek megváltoztatása nem okoz számottevő különbséget a B" regulátor alegység és a PP2A mag asszociációjában. Élesztő két-hibrid mérések és "pull-down" vizsgálatok azt mutatták, hogy a mutációk nem változtatták meg számottevően a B" és a katalitikus alegység kapcsolatát, de hatással voltak a regulátor alegység és az OsRBR1 kölcsönhatására.

Alacsony szabad Ca^{2+} jelenlétében a TMutA változatot tartalmazó holoenzim mind a vad típusú enzimhez képest, mind a TMutE formához képest alacsonyabb defoszforilációs aktivitást mutatott foszfo-OsRBR1 szubsztrát felé, a TMutE formát tartalmazó holoenzimmel pedig magasabb foszfatáz aktivitást mérhettünk. A kísérlet másik része rávilágított a Ca^{2+} szerepére a folyamatban, kapcsolatot létesítve a Ca^{2+} jelátvitel és a sejtciklus szabályozása között.

Publikációk

Ábrahám E*, **Yu P***, Farkas I, Darula Z, Varga E, Lukács N, Ayaydin F, Medzihradszky KF, Dombrádi V, Dudits D, and Horváth GV. (2015) The B'' regulatory subunit of protein phosphatase 2A mediates the dephosphorylation of rice retinoblastoma-related protein-1. *Plant Molecular Biology* 87: 125-141.

*: Equal contribution

IF: 4,257

Ábrahám E, Miskolczi P, Ayaydin F, **Yu P**, Kotogány E, Bakó L, Ötvös K, Horváth GV, and Dudits D. (2011) Immunodetection of retinoblastoma-related protein and its phosphorylated form in interphase and mitotic alfalfa cells. *Journal of Experimental Botany* 62: 2155-2168.

IF: 5,364

Yu P, Ábrahám E, Darula Z, Dudits D, Horváth VG (2011)
The Role of Phosphorylation in the Function of RBR-interacting Phosphatase Subunit. *ACTA BIOLOGICA SZEGEDIENSIS* 55: 189-193.

Konferencia közlemény/előadás /poszter

Ábrahám E, **Yu P**, Farkas I, Darula Zs, Varga E, Lukács N, Ayaydin F, Medzihradszky KF, Dombrádi V, Dudits D, and Horváth GV.(2014) The role of the B'' subunit of PP2A phosphatase complex in the dephosphorylation of *Oryza sativa* retinoblastoma-related protein-1. *Biokémia* 38: pp. 63-63.

Farkas I., Ábrahám E., **P Yu**, Dombrádi V., Dudits D., Horváth VG.(2010) A protein foszfatáz 2A B'' regulátor alegységével kölcsönható fehérjék vizsgálata rizsben. *Biokémia* 34: pp. 33-33.

Ábrahám E, **Yu P**, Ayaydin F, Darula Zs, Farkas I, Lukács N, Dudits D and Horváth GV.(2010)
Plant phosphatases, cyclin-dependent kinases and retinoblastoma-related proteins: let's dance together
Lecture on Straub-Days, BRC HAS

Farkas I., Ayaydin F., Kókai E., Ábrahám E., **Yu P.**, Dombrádi V., Dudits D., Horváth VG.(2009)

Rizsből származó protein foszfatáz 2A B" regulátor alegység szerepének vizsgálata rizsben és dohányban, Biokémia 33, pp. 25-25.

TÁRSSZERZŐI NYILATKOZAT

Alulírott nyilatkozom, hogy a jelölt téziseit ismerem, a tézisekben foglalt tudományos eredményeket PhD fokozat megszerzéséhez nem használtam fel és azokat ilyen célból a jövőben sem fogom használni. Elismerem, hogy Yu Ping-nek az alábbi közlemények eredményeinek elérésében meghatározó fontosságú szerepe volt, így a közlemények anyagát Ph.D értekezésében felhasználhatja.

.....

Dr. Ábrahám Edith