

Ph.D. értekezés tézisei

**A PP4 foszfatáz kölcsönható partnereinek azonosítása és
szubsztrátum-felismerő mechanizmusának feltárása**

Kármán Zoltán

Témavezető: Dr. Lipinszki Zoltán
csoportvezető, tud. főmunkatárs



SZTE TTIK, Biológia Doktori Iskola

Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Biokémiai Intézet

2020

Bevezetés

A reverzibilis fehérje foszforiláció az eukarióta sejtekben az egyik leggyakoribb poszttranszlációs módosítás, mely számos fiziológias folyamat szabályozásában nélkülözhetetlen. A fehérjék foszforilációs állapotát a fehérje kinázok és fehérje foszfatázok időben és térben precízen összehangolt működése határozza meg. Míg a fehérje kinázok régóta az egyik legintenzívebben kutatott és legjobban ismert enzimes család, addig a fehérje foszfatázokról jóval kevesebbet tudunk.

A Ser/Thr foszfatázok PPP családjába tartozó PP4 foszfatáz leggyakrabban három alegységes holoenzim komplexként funkcionál. A holoenzim egy katalitikus (PP4c), egy szerkezeti (R2) és egy regulátor (R3, ecetmuslicában Falafel) alegységből áll, utóbbi felelős a szubsztrátum felismerésért és kötésért. A PP4 egy esszenciális foszfatáz, mely nélkülözhetetlen szerepet tölt be a sejtciklus, sejtosztódás, differenciálódás, programozott sejthalál, DNS hibajavítás, több jelátviteli útvonal, valamint az immunrendszer és a metabolizmus szabályozásában. Mind a PP4 hiánya, mind túlzott aktivitása súlyos sejtosztódási rendellenességeket okozhat, mely különböző rákos megbetegedések kialakulásához vezethet.

A sejtek alapvető működésében betöltött szerepük ellenére a legtöbb PPP esetében még mindig nem ismert hogyan választják ki a szubsztrátumaikat. Az intenzíven kutatott foszfatázok esetében, mint a PP1, PP2A és PP2B már ismertek azok a konzervált kötőmotívumok, melyek meghatározzák a foszfatáz specificitását a katalitikus alegységen keresztül direkt, vagy közvetett módon, egy szubsztrátum specifikus regulátor fehérje segítségével. Ezek a kötőmotívumok az úgynevezett rövid lineáris motívumok (SLiM, short linear motif) közé tartoznak. A SLiM-ek a fehérjék

alapvetően rendezetlen részein helyezkednek el, általában egy rövid, körülbelül 10 aminosav hosszú fehérjeszakaszt jelentenek, melyen belül pár, evolúciósan erősen konzervált aminosav helyezkedik el.

A SLiM-ek nem minden esetben cisz-hatású elemek, azaz jelenlétük nem feltétlenül elegendő a foszfatázok dokkolásához. Még nem teljesen értjük, de feltételezzük, hogy a SLiM-ek környezete és a fehérje szerkezete is befolyásolhatja ezt a tulajdonságot. Ezeknek a motívumoknak az ismerete lehetőséget ad a PPP-k és szubsztrátumaik kölcsönhatásának precíz manipulációjára, ezáltal az egyes folyamatokban betöltött funkciójuk vizsgálatára.

Célkitűzés

A PP4 a sejtműködés folyamatainak esszenciális szabályozója. A különböző regulátor alegységein keresztül számos fehérjével interakcióba lép, munkánk kezdetekor azonban a szubsztrátum felismerésének módja még nem volt ismert. A PP4 szubsztrátum felismerésének vizsgálatához *Drosophila* modellorganizmusban a következő célokat tűztük ki:

- 1.) a Falafel alegység konzervált doménjeinek segítségével új PP4 interakciós fehérjék azonosítása
- 2.) az új interakciós partnerek és a Falafel domének közötti kölcsönhatási felületek térképezése
- 3.) az új eredmények és a szakirodalomban igazolt interakciós fehérjék segítségével meghatározni a szubsztrátum felismerésért felelős konzervált konszenzus kötő motívumot

Az előbb felsorolt célok vizsgálatával nem csupán jobban feltérképezhetjük a PP4 sejthomeosztázis szabályozásában betöltött szerepét és szubsztrátum felismerésének lehetséges módjait, hanem egy konzervált szubsztrátum felismerési motívum a további potenciális PP4 szubsztrátumok azonosítását is nagyban megkönnyítené.

Anyagok és módszerek

DNS konstrukciók és klónozás

A kísérletekben felhasznált fehérjék cDNS-eit a *Drosophila* Gene Collection-ből (Berkeley *Drosophila* Genome Project, *Drosophila* Gold Collection) szereztük be. Az *in vivo* és *in vitro* kísérletekben használt DNS konstrukciók létrehozásához klasszikus (restrikciós) és Gateway technikákat használtunk.

Drosophila törzsek fenntartása és embriók gyűjtése

A kísérleteink során felhasznált vad típusú (*white*¹¹¹⁸) *Drosophila* törzset klasszikus kukoricaliszt alapú táptalajon, 25°C-on tartottuk fenn, a korai embriókat szinkronpetéztetéssel gyűjtöttük a tömegspektrometriai kísérletekhez.

Stabilan transzfektált D.Mel-2 sejtvonalak létrehozása

A különböző transzgénikus fehérjéket termelő *Drosophila* sejtvonalatokat Cellfectin II reagens segítségével állítottuk elő a gyártó (Gibco) protokollja szerint.

Fehérje termeltetés és tisztítás

Az *in vitro* kísérletek során használt próba fehérjét *E. coli*-ban termeltettük és Glutathione Sepharose 4B gyöngyök segítségével tisztítottuk homogenitásig.

Affinitás-tisztításhoz kötött tömegspektrometriai azonosítás (AP-MS)

A Falafel interakciós partnereinek azonosításához az embrionális lizátumokat és a kitisztított próba fehérjét együtt inkubáltuk, majd az aspecifikusan kötődő fehérjét több mosási lépéssel eltávolítottuk. A mintákat tripszines emésztést követő tömegspektrometriai analízissel vizsgáltuk.

In vitro kötési kísérlet és autoradiográfia

A valós fizikai kölcsönható partnerek azonosításához a próba fehérjét *in vitro* transzkripcós/transzlációs (IVTT) rendszerrel megtermeltetett, ³⁵S-metioninnal jelölt fehérjékkel inkubáltuk, majd denaturáló gélelektroforézist és gélzsáritást követően autoradiográfiával detektáltuk az interakciók meglétét vagy hiányát. Az interakciós felületek behatárolásához az egyes fehérjékből kisebb, átfedő szakaszokat generáltunk, majd a fenti mód szerint vizsgáltuk őket.

Helyspecifikus mutagenézis

Az FxxP és MxPP motívumok dupla aminosav szubsztitúciós mutánsait (AxxA és AxPA), illetve a *Drosophila* és humán EVH1 domének L70A és L69A mutánsait QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies) használatával hoztuk létre.

Ko-immunprecipitáció D.Mel-2 sejtekből

Az *in vivo* interakciós kísérletekhez tranziensen transzfektált D.Mel-2 sejteket gyűjtöttünk. A feltárás után a lizátumokból GFP-trap gyöngyök (Chromotek) segítségével izoláltuk a fehérjéket, majd Western-blot segítségével vizsgáltuk a mintákat.

Western-blot

A mintákat hagyományos denaturáló géleken futtattuk, majd PVDF membránra blottoltuk. Tejporos blokkolást követően a membránokat a megfelelő elsődleges és másodlagos ellenanyagokkal inkubáltuk, majd a HRP szubsztrát hasításából keletkező fényt gél dokumentációs rendszer használatával detektáltuk.

Eredmények összefoglalása

A PP4 foszfatáz interakciós partnereinek azonosításához a *Drosophila melanogaster* PP4 Falafel alegységének konzervált EVH1 és Smk-1 doménjeit N-terminálisan GST fúziós fehérjével jelölt formában *E. coli* sejtekkel megtermeltettük és homogenitásig tisztítottuk, majd korai szinciciális embriókból származó lizátummal inkubáltuk együtt. Affinitás-tisztítást követő tömegspektrometriai analízissel 40 fehérjét azonosítottunk, mint a PP4 potenciális új interakciós partnerei.

Az EVH1 és Smk-1 doménnel valódi fizikai kölcsönhatást kialakító fehérjék azonosításához *in vitro* kötési kísérleteket végeztünk. Ehhez próba fehérjeként baktérium sejtekből homogenitásig kitisztított és affinitás gyöngyökön immobilizált GST-EVH1-et és GST-Smk-1-et használtunk. A vizsgálni kívánt fehérjéket kapcsolt *in vitro*

transzkripció/transzláció rendszerrel termeltettük és az autoradiográfiás detekció érdekében ^{35}S -metioninnal jelöltük. Ezen módszerrel sikerült nyolc fehérjét (Prp16, Psc, Incenp, Sowah, Stw1, Centrobin, Mira és CG8478) azonosítanunk, mint új EVH1 kölcsönható partner és nyolc olyan fehérjét (Licorne, Nipsnap, RfC4, Zwilch, ZW10, spindle A, γTub23C és Grip75), melyek a Falafel Smk-1 doménjével lépnek specifikus kölcsönhatásba.

Kutatásunk egyik fő célja a PP4 foszfatáz szubsztrátum-felismerési módjainak vizsgálata és egy lehetséges konzervált szubsztrátum-felismerési motívum azonosítása volt. Ehhez első lépésként az egyes domének és az újonnan meghatározott interakciós fehérjék közötti lehető legrövidebb kölcsönhatási felületet határoztuk meg. A fehérjékből rövidebb, egymással átfedő szakaszokat hoztunk létre és a korábban is alkalmazott *in vitro* kötési kísérletekkel azonosítottuk azon részeit, melyek szükségesek az EVH1 vagy Smk-1 doménhez való kötődéshez.

A szakirodalomból két, kísérletesen is igazolt *Drosophila* fehérjét ismerünk (CENP-C és Miranda), amelyet a Falafel EVH1 doménje köt meg. Mindkét fehérjében található egy rövid motívum (FxxP), mely az általunk azonosított interakciós fehérjékben több helyen is megtalálható (kivéve CG8478), ezért nagy a valószínűsége, hogy ez a peptid a PP4 foszfatáz konzervált felismerési motívuma. 2019 végén megjelent egy közlemény, melyben Ueki és munkatársai azonosították a humán PP4 szubsztrátum felismerési motívumát. Megfigyeléseik egybevágnak a mi eredményeinkkel *Drosophila*-ban. Az FxxP motívum mellett egy MxPP motívumot is leírtak, ezért további vizsgálatainkat mi is kiterjesztettük erre a motívumra. A legtöbb fehérjénk esetében mindkét motívum több helyen is előfordult az aminosav

szekvenciában, ezért helyspecifikus mutagenézis segítségével a motívumok első és negyedik pozíciójában lévő F és P, illetve M és P aminosavakat alaninokra cseréltük. Minden vizsgált fehérje esetében találtunk egy kiemelt helyen lévő FxxP vagy MxPP motívumot, melynek mutációja az EVH1-el kialakított kölcsönhatás nagymértékű gyengüléséhez vagy teljes eltűnéséhez vezet.

Bebizonyítottuk, hogy a Falafel EVH1 doménjének 70. pozíciójában lévő leucinnak kiemelten fontos szerepe van a kölcsönható fehérjék megkötésében. Ezen aminosav alaninra történő cseréje esetén a vizsgált *Drosophila* fehérjékkel szemben az EVH1 domén teljesen elveszítette a kötőképeségét. Kimutattuk azt is, hogy nem csak az EVH1-en keresztüli szubsztrátum kötés, hanem ezen leucin nélkülözhetetlen szerepe is erősen konzervált a fajok között. Míg a humán SMEK1 EVH1 doménje képes volt megkötni a vizsgált *Drosophila* fehérjéket, addig a konzervált leucin alaninra történő cseréje itt is a kötődés teljes megszűnéséhez vezetett.

Eredményeink azt mutatták, hogy az Smk-1 doménen keresztüli interakciós partnerek felismerése és megkötése az EVH1 doméntól független módon történik, az Smk-1 doménnel kölcsönhatásba lépő fehérjék egyike sem kötődik az EVH1 doménhez. Az Smk-1 interakciós fehérjék közül csupán a ZW10 hordoz két FxxP motívumot, azonban ezek mutációja *in vivo* ko-immunprecipitációs kísérleteink alapján nincs hatással a kölcsönhatásra. Annak meghatározása, hogy az Smk-1-en keresztül hogyan valósul meg az interakciós fehérjék kötődése, még további vizsgálatokat igényel.

Kollaborációs partnereinkkel közösen kimutattuk, hogy a PP4-nek fontos szerepe van a Barrier-to-autointegration factor (BAF)

foszforegulációjában a sejtosztódás során. A PP4 a CENP-C-vel és a BAF-al egy egymástól függő, pozitív visszacsatolási hálózatot alkot a centroméránál, bármely komponens kiütése közvetett vagy közvetlen módon hatással van a másik két fehérje funkciójára és lokalizációjára. Kötési kísérleteink alapján a BAF nem kötődik sem a Flfl EVH1, sem az Smk-1 doménjéhez, azonban a PP4/Flfl komplex bizonyítottan defoszforilálja. Ebből az következik, hogy a PP4 szubsztrátum felismerése nem csak közvetlen módon, a konzervált doménjein keresztül valósulhat meg, hanem egy harmadik, közvetett módon is, egy közvetítő fehérjén keresztül, amely a BAF esetében a CENP-C.

A doktori eljárás alapiát képező közlemények:

Karman, Z.; Rethi-Nagy, Zs.; Abraham, E.; Fabri-Ordogh, L.; Csonka, A.; Vilmos, P.; Debski, J.; Dadlez, M.; Glover, D.M.; Lipinszki, Z.: *Novel perspectives of target-binding by the evolutionarily conserved PP4 phosphatase*. OPEN BIOLOGY 10: 200343. (2020) (IF: 4,931)

Torras-Llort, M.; Medina-Giró, S.; Escudero-Ferruz, P.; Lipinszki, Z.; Moreno-Moreno, O.; **Karman, Z.**; Przewlaka, M.R.; Azorín, F.: *A fraction of barrier-to-autointegration factor (BAF) associates with centromeres and controls mitosis progression*. COMMUNICATIONS BIOLOGY 3:1 Paper: 454 (2020) (IF: 4,165)

Egyéb közlemények:

Olah, Z.; Bush, A.I.; Aleksza, D.; Galik, B.; Ivitz, E.; Macsai, L.; Janka, Z.; **Karman, Z.**; Kalman, J.; Datki, Z.: *Novel in vivo experimental viability assays with high sensitivity and throughput capacity using a bdelloid rotifer*. ECOTOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL SAFETY 144 pp. 115-122., 8 p. (2017) (IF: 3,974)