

A doktori értekezés tézisei

**A növényi NRP fehérjék lehetséges szerepe a
hiszton defoszforiláció szabályozásában,
és a hőstressz válaszban.**

Bíró Judit

Témavezető: Dr. Fehér Attila

Magyar Tudományos Akadémia
Szegedi Biológiai Központ
Növénybiológiai Intézet
Funkcionális Sejtbiológia Csoport

Szegedi Tudományegyetem
Biológia Doktori Iskola

Szeged
2013

BEVEZETÉS

A hisztonok négy fajtája, a hiszton H2A, H2B, H3 és H4 egy oktamer (8 részből álló) egységet alkotva az alapját képezi a nukleoszómáknak. Erre tekeredik a DNS, minden egyes hiszton oktameren két csavarulatot alkotva. A sejtciklus S fázisában történő DNS replikáció során a hisztonok leválnak a kromoszómákról, hogy a leánysejtekben újraszerveződve ismét kromatinná alakuljanak a DNS molekulákkal. A hisztonok cserélődése, átszerveződése azonban nem csak mitózis alatt történik. Újonnan szintetizálódott hiszton variánsok épülnek be a kromatinba transzkripció, DNS javítás, és rekombináció során is. A hiszton chaperone-ok a hisztonokhoz kötődnek, és részt vesznek a kromatin folytonos újraszerveződésében, ezen kívül megakadályozzák az erősen pozitív töltésű hisztonok és az erősen negatív töltésű DNS spontán aggregációját.

A hiszton H2A és H2B proteinek hiszton csaperone-ja a NAP1 (nucleosome assembly protein 1), amely segíti azok kromatinná csomagolódását mitózis során. A NAP1 fehérjéről kialakuló kép azt mutatja, hogy a hiszton H2A és H2B fehérjék nukleoszómába való beépülésén túl segítik azok sejtmagba történő szállítását, és szabályozzák a kromatinszerkezet aktív átalakulásait. Mindemellet a kromatinnal kölcsönhatva, mint szövetspecifikus faktoroknak, szerepük van a sejtosztódás és a génkifejeződés szabályozásában

A NAP1 fehérjecsalád tagjai savas karakterű fehérjék. Mindegyikük tartalmaz egy konzervált központi NAP domént. Ezen kívül

hordoznak egy erősen savas C-terminális domént, és egy változó hosszúságú N-terminális kezdeti szakaszt. Élesztőben (*Saccharomyces cerevisiae*) egyetlen NAP1 fehérje fordul elő. Ezzel szemben a többsejtű organizmusok számos NAP1, és NAP1-szerű fehérjével rendelkeznek. Növényekben a NAP1 fehérjéknek számos fajtája fordul elő, nem egy gén által kódoltak. A NAP1 fehérjék mellett a növények rendelkeznek a NAP1 fehérjével rokon, de külön filogenetikai csoportot alkotó fehérje csoporttal, az NRP-kkel (*NAP1-related protein*). Ezek a fehérjék erősen hasonlítanak a humán SET/I₂^{PP2A} fehérjére, amely szintén a NAP1 család tagja. A lúdfű NAP1 család tehát négy NAP1 fehérjét (NAP1;1, NAP1;2, NAP1;3, és NAP1;4), és két NAP1 rokon NRP fehérjét (NRP1 és NRP2) tartalmaz.

A lúdfű NAP1-related protein 1 és 2 (NRP1 és NRP2) fontos szerepet játszik a sejtciklus szabályozásában és a gyökér merisztéma kialakulásában, továbbá valószínűsíthető hiszton chaperone funkciójuk is. Az *Arabidopsis nrp1-1 nrp2-1* dupla mutáns növények erősen érzékenyek genotoxikus stresszre, és károsult bennük a szomatikus homológ rekombináció jelensége. A *Medicago sativa nrp* génről pedig kimutatták, hogy magasabb szinten fejeződik ki 2,4-diklórfenoxiacetsav hatására bekövetkező szomatikus embriogenezis során.

ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

- Növények és sejt kultúrák fenntartása, stressz kezelések
- Lúdfü protoplasztok izolálása és transzformálása
- Foszfátáz aktivitás mérések
- Ko-immunoprecipitálás és kromatin immunoprecipitálás
- Genetikai manipulációk, GATEWAY technológia
- RNS izolálás, cDNS szintézis
- Valós idejű polimeráz láncreakció (PCR)
- Bakteriális fehérje expresszió és tisztítás, ellenanyag termelés
- Növényi fehérjék tisztítása, immunoblot analízis,
- Immunolokalizáció
- Fluoreszcencia kiégetés (FLIP)
- Pásztázó lézer konfokális mikroszkóp használata

CÉLKITŰZÉSEK

Vizsgálataink célja az volt, hogy a lúdfü NRP1 fehérjét funkcionálisan jellemezzük. Meg kívántuk határozni a szerin/treonin foszfátáz enzimekre gyakorolt hatását, a sejten belüli elhelyezkedését, a kölcsönható fehérjéket, a kifejeződésének paramétereit, és a túltermelődésének a hatásait, hogy ezáltal a sejtek életében betöltött szerepének megértéséhez közelebb kerüljünk. Mivel ecetmuslicában az At NRP proteinekkal nagyfokú homológiát mutató SET/I₂^{PP2A} szerepet játszik a hiszton H3 molekula

defoszforilálásában hősoikk folyamán, mi is kíváncsiak voltunk, vajon kölcsönhat-e az At NRP1 a hiszton H3 molekulával, és befolyásolja-e annak defoszforilálódását. Ezzel kapcsolatban az At NRP1 hősoikkban betöltött esetleges szerepét is tisztázni kívántuk. Hogy teljesebb képet kapjunk az NRP fehérjék szerepéről, néhány kísérletünkbe bevontuk a lucerna NRP fehérje vizsgálatát is. Célkitűzéseink között szerepelt az is, hogy az *nrp1-1 nrp2-1* dupla mutáns, ill. az AtNRP1-et túltermelő lúdfű növényeket jellemezzük.

EREDMÉNYEK

1. A tisztított lúdfű NRP1 fehérje és a tisztított *M. sativa* NRP fehérje szubsztrát-specifikusan gátolták a nyúl vázizomból preparált PP1 és PP2A enzimek katalitikus alegységeit.
2. Az immunoprecipitált lúdfű PP2A defoszforilálta a tizedik szerin oldalláncon foszforilált hiszton H3 molekulát (hiszton H3_(pSer10)), és ezt a reakciót a tisztított arabidopsis NRP1 (At NRP1) dóziszfüggő módon gátolta.
3. Az NRP fehérjék kölcsönhatnak a PP2A és a hiszton H3_(pSer10) molekulákkal *in vivo* (ko-immunoprecipitálás).
4. Az NRP fehérjék hiánya az *nrp1-1 nrp2-1* lúdfű mutánsokban nem befolyásolta a hiszton H3_(pSer10) általános mennyiségét.
5. Kromatin immunoprecipitálás során bebizonyosodott, hogy a hősoikk-indukálta génexpresszió összefügg a kromatin hiszton H3_(pSer10)-vel való feldúsulásával a hősoikk gének promóter régiójában lúdfű növényekben..

6. Az NRP fehérjék ennek ellenére közvetlenül nem befolyásolják hősokk gének kifejeződését, tekintve hogy valós idejű PCR kísérletünkben nem találtunk különbséget a dupla mutáns és a vad típusú növények között az általunk vizsgált hősokk gének kifejeződésében.
7. Immunolokalizáció, és immunoblot eredményeink tükrében elmondható, hogy:
 - a. Az At NRP1 fehérje a sejtmagban található
 - b. Szobahőmérsékleten (25°C) a sejtmagban szolubilis formában van jelen, és kis méreténél fogva könnyen kijut a sejtmagból a sejtek feltárása során.
 - c. 45°C-on az At NRP1 erősen kötődik a sejtmagi fehérjékhez (a kromatinhoz?), ezért a sejtmagok izolálása során is a sejtmagban marad.
 - d. Más típusú stresszkezelések, beleértve az alacsonyabb hőmérsékletű hősokkot (37 °C), só-, nehézfém-, és genotoxikus stresszt, nem okozták az At NRP1 immobilizálódását.
8. Az At NRP1 túltermelése kismértékben megnövelte a növények túlélését magas hőmérsékletű (45°C) hősokk után.
9. Az At NRP1 túltermelő növények nem mutattak sem eltérő fenotípust, sem eltérő hiszton H3_(pSer10) szintet a null szegregáns növényekhez képest.

AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

Az NRP fehérjék humán homológja, a SET/I₂^{PP2A} ismert Protein Foszfataz 2A (PP2A) gátló. Deléciós mutánsok segítségével kimutatták, hogy a PP2A-gátláshoz elengedhetetlen a SET/I₂^{PP2A} 25-119-ig terjedő aminosav szekvenciája. Mivel ez a régió nagyfokú hasonlóságot mutat a lúdfű és lucerna növények azonos helyen lévő aminosav szekvenciájával, mi is megvizsgáltuk a növényi NRP fehérjék foszfataz gátló tulajdonságát. Kísérleteinkben a két legfontosabb szerin/treonin foszfataz, a PP1 és a PP2A aktivitását vizsgáltuk. Mindkét enzim számtalan folyamat irányítását végzi mind állati, mind növényi sejtekben. Eredményeink azt mutatták, hogy a lúdfű, és a lucerna NRP fehérjék *in vitro* gátolják az állati PP2A aktivitását. Az *Arabidopsis thaliana* NRP1 (At NRP1) ezen felül gátolja az immunoprecipitált lúdfű PP2A enzimet, és *in vivo* kölcsönhat vele.

Mivel ecetmuslicában az At NRP proteinnel nagyfokú homológiát mutató SET/I₂^{PP2A} szerepet játszik a hiszton H3 molekula defoszforilálásában hősokk folyamán, mi is kíváncsiak voltunk, vajon kölcsönhat-e az At NRP1 a hiszton H3 molekulával, és befolyásolja-e annak defoszforilálódását. Ezen kívül az At NRP1 hősokkban betöltött esetleges szerepét is tisztázni kívántuk.

Kísérleteinkben mind a lúdfű, mind a lucerna NRP fehérjék nagy affinitással gátolták a hisztonok defoszforilációját *in vitro*, valamint *in vivo* kölcsönhatnak a hiszton H3 molekulával. Így valószínű, hogy a velük rokon NAP1 proteinekhez hasonlóan a növényi NRP

fehérjék is részt vesznek a kromatin átformálásával kapcsolatos folyamatokban.

Állatokban a hiszton H3 tizedik szerinen történő foszforilálódása (hiszton H3_(pSer10)) a transzkripció szabályozásával függ össze. Mivel ecetmuslicánál ezt a fajta hiszton modifikációt a hősokk gének átíródásakor tapasztalták, mi is a hősokk fehérjék (HSP, heat shock protein) kifejeződésének vizsgálatára koncentráltunk. Valós idejű polimeráz láncreakcióval vizsgáltuk hősokk gének kifejeződését, különbséget azonban nem találtunk a dupla mutáns *nrp1-1 nrp2-1* és a vad típusú növények között az általunk vizsgált gének tekintetében. Kimutattuk azonban, hogy a hőindukálta génexpresszió a hiszton H3_(pSer10)-et tartalmazó kromatinhoz kötődik. Ennek a fajta hisztonmodifikációnak a szerepét korábban még nem mutatták ki a hősokk közvetítette génkifejeződésben növényekben.

Az NRP fehérjék állati homológia, a SET/I₂^{PP2A} egy multifunkciós fehérje, amely szerepet tölt be többek között a PP2A gátlásban, a transzkripció, a hiszton deacetiláció, az apoptózis, a DNS-metiláció, és a sejtosztódás szabályozásában. Ezen funkciók egy része a sejtmaghoz kötődik. Ennek megfelelően a SET/I₂^{PP2A} sejtmagi lokalizációt mutat, továbbá kimutatták, hogy a kromatinhoz kötődik. Ismereteink a növényi NRP fehérjékről korlátozottabbak, mégis úgy tűnik, hogy ezek a fehérjék is számos funkcióval bírnak. Befolyásolják a sejtosztódást, a géncsendesítést, és a DNS károsító ágensek iránti érzékenységet.

Ezeknek a folyamatoknak a nagy része is sejtmagi lokalizációt igényel, ezzel egyetértésben mi is a sejtmagban mutattuk ki a

fluoreszcens fehérjékkel megjelölt lúdfű NRP proteinekét. Eredményeink azonban azt mutatták, hogy standard körülmények között az At NRP1 a sejtmagban oldott állapotban van, és erősen mobilis. Ez teszi lehetővé azt, hogy a sejtek feltárása során könnyen kijut a sejtmagból. Azt is megfigyeltük, hogy magas hőmérsékleten végzett hősokk következtében az NRP fehérjék kötött formába kerülnek. Ez a kötődés stabilan fennmarad (kísérleti körülményeink között legalább 42 óráig), és alacsonyabb hőmérsékleten (37°C) történő stresszkezelés, valamint más típusú stresszkezelések (só, nehézfém, UV, és genotoxikus stressz) nem váltják ki.

Hogy az NRP fehérjék szerepét jobban megértjük, kísérleteinkbe bevontunk *nrp1-1 nrp2-1* dupla mutáns, és az At NRP1 fehérjét túltermelő lúdfű növényeket is. A dupla mutáns növényekben nem találtunk eltérő foszfohiszton H3 szintet, és eltérő génkifejeződést hősokk után a vad típusú növényekhez képest. Az At NRP1-et túltermelő vonal nem mutat semmilyen szemmel látható fenotípust. A dupla mutáns növényekhez hasonlóan eltérő hiszton H3_(pSer10) szintet sem tapasztaltunk bennük a kontroll növényekhez képest. Különböző módszerekkel megvizsgálva a növények túlélését azonban azt tapasztaltuk, hogy a túltermelő növények csekély mértékben jobban tűrik az erős hőkezelést a null szegregáns növényekhez képest. Hogy az NRP proteinek milyen folyamatot indítanak magas hőmérséklet hatására, még nem tudjuk. Izgalmas feladat lesz a jövőben feltárni a növényi NRP fehérjék szerepét ebben a sokrétű és szövevényes rendszerben, a hősokkválaszban.

KÖZLEMÉNYEK

¹**Bíró, J.**, Farkas, I., Domoki, M., Otvös, K., Bottka, S., Dombrádi, V., & Fehér, A. (2012). The histone phosphatase inhibitory property of plant nucleosome assembly protein-related proteins (NRPs). *Plant physiology and biochemistry: PPB / Société française de physiologie végétale*, 52, 162–8.

Bíró, J. (2008): Functional characterization of the plant SET protein: from phosphatase inhibition to heat stress tolerance. *Acta Biologica Szegediensis*, Volume 52(2):333-356, 2008

Domoki, M., Györgyey, J., **Bíró, J.**, Pasternak, T. P., Zvara, Á., Bottka, S., Puskás, L. G., et al. (2006). Identification and characterization of genes associated with the induction of embryogenic competence in leaf-protoplast-derived alfalfa cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1759(11–12), 543–551.

Dorjgotov, D., Jurca, M. E., Fodor-Dunai, C., Szucs, A., Otvös, K., Klement, E., **Bíró, J.**, et al. (2009). Plant Rho-type (Rop) GTPase-dependent activation of receptor-like cytoplasmic kinases in vitro. *FEBS letters*, 583(7), 1175–82.

¹ Az értekezés alapjául szolgáló közlemény.