

Az AtMPK9 mitogén-aktivált protein kináz szabályozása autofoszforilációval

Doktori tézisek

Nagy Szilvia Krisztina

Semmelweis Egyetem

Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Mészáros Tamás PhD, egyetemi docens
Hivatalos bírálók: Dr. Dóczi Róbert PhD, tudományos főmunkatárs
Dr. Törőcsik Beáta PhD, egyetemi adjunktus
Szigorlati bizottság elnöke:
Dr. Varga Gábor DSc, egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai:
Dr. Jemnitz Katalin PhD, tudományos főmunkatárs
Dr. Osváth Szabolcs PhD, egyetemi adjunktus

Budapest
2015

I. Bevezetés

A sejtben zajló metabolikus folyamatok, stresszválaszok, sejtosztódás és differenciálódás szabályozását többnyire tranziens fehérje kölcsönhatások komplex hálózata végzi. Az intenzív kutatások ellenére még számos jelátviteli útvonal ismeretlen, illetve több jól ismert útvonal is tartalmaz felderítetlen kapcsolatokat. A mitogén-aktivált protein kinázok (MAPK) egy háromtagú kináz kaszkád komponenseiként az eukarióta sejtek legősibb jelátviteli útvonalainak integráns részei. A klasszikus MAP kinázok közös jellemzője, hogy az aktivációs hurokban található TXY (treonin-X-tirozin) aminosav triplet foszfoakceptor aminosavai az adekvát MAPK kinázok (MAPKK-ok) által foszforilálódnak, melynek következtében a MAPK-ok aktivitása több nagyságrenddel megemelkedik. Az atipikus MAPK-ok ezzel szemben speciális, MAPKK-független módon aktiválódnak. Némely atipikus MAPK aktiválásához elég egy szerin oldalláncon foszforilálódnia, míg más atipikus MAPK-ok, mint például az ERK7/8, a TXY motívumuk kettős, intramolekuláris autofoszforilációjával érik el maximális aktivitásukat. Ezen eredmények azt sugallják, hogy a MAP kinázok szabályozása sokkal kifinomultabb, a klasszikus aktiváció mellett az autofoszforiláció is sokkal általánosabb aktivációs mechanizmus lehet, mint azt korábban gondoltuk.

A magasabbrendű növényeknek helyhez kötött életmódjuk miatt folyamatosan alkalmazkodniuk kell az állandóan változó környezethez, adaptálódnak például a hőmérséklethez, a fényhez, a szárazsághoz. Az adaptációhoz a génexpressziós szintekben és az enzimaktivitásokban egyaránt gyors és dinamikus változások szükségesek, melyek szabályozásában a foszforilációs-defoszforilációs módosítások központi szerepet játszanak. Ennek megfelelően a zöld növények genomjának 5%-a

kódol kinázt, melyeknek mintegy 10%-a az MPK (növényi mitogén-aktivált protein kináz) kaszkádba tartozik. Az eukarióták közül a növények rendelkeznek legszerteágazóbb MAPK hálózattal, bizonyítva ezen jelátviteli rendszer rendkívüli sokoldalúságát.

Az *Arabidopsis* genomja 20 MAPK-t kódol, de közülük csak néhány – az AtMPK3, az AtMPK4 és az AtMPK6 – tanulmányozott részletesen, melyek mind TEY (treonin-glutamát-tirozin) foszforilációs motívummal rendelkeznek, aktivációs mechanizmusuk alapján a klasszikus MAPK-ok közé tartoznak, és ismert, hogy a kettős specifitású MAPKK-ok által aktiválódnak.

A TEY motívumot tartalmazó növényi MAPK-okkal összehasonlítva lényegesen kevesebb információnk van a TDY (treonin-glutamát-tirozin) motívumot tartalmazó, D-alcsaládot formáló MAPK-okról. A D-alcsalád jellemzője, hogy tagjai rendelkeznek egy hosszabb C-terminális doménnel, illetve nem rendelkeznek a MAPKK-okkal történő kölcsönhatáshoz elengedhetetlen, ún. CD (common docking) régióval. Az alcsaládba tartozó MAPK-ok a felsorolt szerkezeti jellegzetességeik alapján valószínűleg a klasszikus MAPK-októl eltérően szabályozódnak.

Az érdeklődésünk középpontjában lévő AtMPK9 a legkevésbé ismert, D-alcsalád egyik képviselője. Az AtMPK9-nek sem funkciója, sem aktivátor MAPKK-a, sem egyéb kölcsönható fehérjéje nem ismert jelenleg. Az IUPred program segítségével igazoltuk, hogy az AtMPK9 fehérje első 380 aminosavnyi része globuláris MAPK domén, míg utolsó 100-120 aminosavnyi régiója pedig rendezetlen szerkezetű.

A MAPK-ok eddig azonosított szubsztrátjai döntő részt transzkripció faktorok, azonban a tudományos közlemények valószínűsítik, hogy a citoskeleton organizációjában is szerepet kaphatnak ezen kinázok.

Megállapították, hogy a növényi mikrotubulusokhoz a γ -tubulin, a GCP4, az EB1 fehérjék és az aktív AtMPK6 is kapcsolódhat. Így felmerülhet a kérdés, hogy az AtMPK6 szubsztrátjaiként foszforilálja-e ezen fehérjéket. A γ -tubulin a mikrotubulusok falát alkotja az α - és β -tubulin alegységekkel együtt; az EB1 (pozitív végekötő fehérje 1) egy mikrotubulus-asszociált fehérje, mely a sejtosztódás interfázisa során a mikrotubulus pozitív végén lokalizálódik; a GCP4 (γ -tubulin komplex fehérje 4) pedig a γ -tubulin komplex része.

A fehérje-fehérje kölcsönhatások és az azokon alapuló sejten belüli jelátviteli folyamatok vizsgálatára számos módszert ismerünk, ezek közül – a viszonylagosan könnyű kivitelezhetőségük miatt – nagy jelentőségük van a különböző *in vitro* megközelítéseknek. Ezeknek az eljárásoknak egyik gyakori limitáló faktora a vizsgálandó fehérjékhez való hozzáférhetőség, mivel az ilyen irányú kísérletek natív térszerkezetű, megfelelő mennyiségű, célfehérje elérhetőségét feltételezik. A kívánt fehérje sejtes túltermelő rendszerekből való tisztítása számos alkalommal nehézségbe ütközik, költséges és kevésbé hatékony. A sejtmentes *in vitro* transzlációs rendszerek megjelenése mérföldkönek számított a molekuláris biológiai kutatások szempontjából, hiszen a genetikai kódra, az mRNS-re és a transzlációra vonatkozó ismereteink számottevő részét ennek a kísérleti megközelítésnek köszönhetjük. A jelenleg elérhető sejtmentes rendszerek előnyei, hogy egyszerűen, gyorsan, nagy hatékonysággal képesek preparatív mennyiségű fehérje termelésére. Mindezek eredményeként a sejtmentes *in vitro* transzlációs egy hiánypótló módszerként alkalmazható, a sejtes fehérjetermelő módszerek alternatívájaként.aktív rekombináns kinázok előállítására

II. Célkitűzés

A sejtben belüli jelátviteli folyamatok központi eleme a fehérjék foszforilációs-defoszforilációs ciklusa, ennek módja, szabályozása és funkciója növényekben nagyrészt feltáratlan. A MAPK-ok szerepe a sejtsztódástól a sejthalálig számos jelátviteli folyamatban számottevő, aktiválódásuk történhet a klasszikus MAPK kaszkád által (klasszikus MAPK-ok), illetve autofoszforiláció révén is (atipikus MAPK-ok).

Munkánk során az *Arabidopsis thaliana* modellorganizmus mindaddig ismeretlen aktivációjú és szabályozású képviselőjét, a D-alcsládba tartozó atipikus kinázt, az AtMPK9-et kívántuk tanulmányozni. Egyetlen kivételtől eltekintve a növényi atipikus MAP kinázok aktiválódása nem ismert. Munkacsoportunk előzetes tapasztalatai alapján a sejtmentes, búzacsíra kivonaton alapuló fehérjetermelő rendszer ideális eukarióta kinázok előállítására: a transzlációval oldott állapotban lévő, natív térszerkezetű fehérje állítható elő preparatív mennyiségben. Az *in vitro* adatok egyszerűen megerősíthetők *in vivo* körülmények közt *Arabidopsis thaliana* sejtszuspenzióon végzett tranziens fehérje expresszióval. Az atipikus MAP kinázokra jellemző autofoszforilációval történő aktiváció eredményeképp foszforilálódó aminosavak azonosítását szegedi kollégáink közreműködésével, tömegspektrometriás foszfopeptid analízissel kívántuk megvalósítani. Továbbá egy közös nemzetközi pályázat keretein belül egy általunk kidolgozott kináz szubsztrát azonosítási módszerrel kívántunk hozzájárulni cseh kollégáink kutatási eredményeihez.

Kísérletes munkánk során az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

- Előállítható-e funkcionális vizsgálatokra alkalmas AtMPK9 *in vitro* transzlációs, illetve bakteriális rendszerben?

- Kimutatható-e a D-alcsaládra jellemző, TDY aktivációs hurok foszforilációja *in vivo* és *in vitro*?
- Milyen mechanizmussal aktiválódik az AtMPK9? Autofoszforiláció esetén cisz- vagy transzaufoszforiláció történik?
- Aktiválja-e az AtMPK9-et bármely MAPK kináz az *in vivo* tranziens expressziós rendszerben?
- Mely egyéb aminosavak foszforilálódnak az aktivált AtMPK9-ben?
- Az *in vitro* translációval előállított AtMPK6 mely fehérjéket foszforilálja feltételezett, mikrotubulus-asszociált szubsztrátjai közül?

III. Módszerek

Gateway rendszerrel történő és ligálás independens klónozás

Az AtMKK4-GOF-ot tartalmazó konstrukciót Gateway klónozással hoztuk létre, mely az Invitrogen cég által kifejlesztett technika, amely a λ -bakteriofág DNS rekombinációs mechanizmusán alapul. A translációs vektorkonstrukciókat ligálás independens klónozással alkottuk meg, mely egyszerűen kivitelezhető, mivel csak egy enzimreakcióra van szükség és univerzális, mert nem korlátozzák a klónozendő DNS szekvenciában található restrikciós endonukleáz helyek.

***In vitro* mutagenézis**

A Stratagene cég, megfelelő mutációkat kódoló primereket alkalmazó, *in vitro* mutagenézis rendszerével állítottuk elő az AtMPK9 kináz inaktív és TDY mutánsainak tranziens expressziós és *in vitro* translációs konstrukcióit.

Protoplaszt tranziens expresszió

A rekombináns fehérjéket növényekben is termeltethetjük, melyet metodikailag legegyszerűbben sejt kultúrákban valósíthatjuk meg. A szuszpenzióból származó sejtek celluláz, hemicelluláz és pektináz

enzimek keverékével történő kezeléssel a sejtfal eltávolítható, azaz létrehozhatók a protoplasztok, melyek direkt transzformálhatóak a célfehérjét kódoló plazmid DNS-sel, és egy éjszakán át tartó inkubálást követően tranziens fehérjeexpresszió érhető el.

***In vitro* fehérje transzláció**

Az általunk alkalmazott elegy búzacsíra kivonaton alapszik, melynek előnye, hogy egyszerűen, gyorsan, nagy hatékonysággal képes preparatív mennyiségű fehérje termelésére. A transzlációs elegy tartalmazza az endogén riboszómákat, a transzlációs faktorokat (iniciációs, elongációs és terminációs), aminoacil-tRNS-szintetázokat, tRNS-eket, illetve a hozzáadott mRNS templátot, kreatin-foszfátot, kreatin-kinázt, aminosavakat. Az elegy az aminosavak aktiválásához szükséges ATP-t, a fehérjék elongációjához szükséges GTP-t is tartalmazza, míg az ATP regenerálásáról a kreatin-foszfát, kreatin-kináz rendszer gondoskodik. Kísérleteinkhez az AtMPK9 különféle konstrukcióit, az AtMPK6-ot és annak szubsztrátjait is *in vitro* transzlációval állítottuk elő.

***In vitro* kináz reakció**

In vitro kináz aktivitás vizsgálathoz *in vitro* transzlált vagy protoplasztból izolált kinázzal foszforiláltunk *in vitro* transzlált, affinitás ágyhoz kötött fehérjét vagy az MBP (mielin bázikus fehérje) mesterséges szubsztrát fehérjét [γ - 32 P]ATP jelenlétében. A foszforilált szubsztrátokat denaturáló SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) választottuk el, majd fixáltuk és Coomassie festéssel tettük őket láthatóvá. A géleket szárítás után kazettába helyeztük, foszfoszenzor screen-t helyeztünk rá, majd Typhoon Phosphorimager készülék alkalmazásával detektáltuk a kináz aktivitást.

IV. Eredmények

Az *in vitro* transzlált AtMPK9 meglepően magas kináz aktivitást mutatott MAPK kinázok hozzáadása nélkül, mely a TDY motívum kettős foszforilációjával járt együtt. A TDY motívum két foszfoaceptor aminosavjának foszforilációja elengedhetetlen a kináz aktiválódásához, mivel mind a treonin, mind a tirozin *in vitro* mutagenézise drámaian lecsökkentette a kináz aktivitását. LC-MS/MS analízissel bizonyítottuk, hogy az egyszeres mutánsok esetén a nem mutált aminosav foszforilálódik, tehát a két aminosav foszforilációja egymástól függetlenül is bekövetkezhet.

Az *in vitro* transzlált, affinitás kromatográfiával tisztított AtMPK9 komplex MS analízisével nem azonosítottunk búzacsíra fehérjekivonatból származó kölcsönható partnereket.

In vivo sejtes rendszerben, *Arabidopsis thaliana* protoplasztokban végzett tranziens expresszióval az AtMPK9 sókezelésre aktiválódott, viszont egyetlen, vele együtt expresszált, konstitutívan aktív MAPKK sem tudta aktiválni. A sóaktivált vad típusú (wild-type, WT) AtMPK9-cel szemben a kináz inaktív mutáns (loss-of-function, LOF) nem volt detektálható az anti-p-ERK ellenanyaggal immunoblot során, azaz nem foszforilálódott, mely autofoszforilációs mechanizmusra utalhat.

Foszfátáz inhibitorok *in vivo* rendszerben való alkalmazásával további bizonyítékot találtunk az autoaktivációra, kimutattuk, hogy az AtMPK9 aktivitása foszfátázokkal szabályozott. Az okadánsav kezelés hatására a vad típusú kinázt expresszáló sejtekben szignifikánsan megnövekedett AtMPK9 foszforilációt és kináz aktivációt tapasztaltunk. Ezzel szemben a LOF mutánst túltermelő sejtekben az okadánsav kezelés hatására sem következett be foszforiláció.

Az *in vitro* transzlált, inaktív LOF AtMPK9-et, mint szubsztrátot az *in vitro* kináz reakcióban a hozzáadott, eluált WT kináz nem volt képes foszforilálni. A WT kináz önmagát azonban foszforilálta, tehát az autofoszforiláció intramolekuláris mechanizmussal történik.

LC-MS/MS analízisünk során a WT fehérje rendezetlen C-terminális doménjében is azonosítottunk három foszforilált szerin aminosavat, míg a LOF-ban egyetlen foszfoaminosav sem volt kimutatható. Az egyik szerin esetében nem teljesül a MAP kinázok foszforilációs helyének feltétele, azaz a foszfoakceptor szerint nem prolin követi, azaz az AtMPK9-nek a klasszikus MAPK-oknál szélesebb szubsztrát specifikációja van.

Az *in vitro* transzlált AtMPK6 a mikrotubulus-asszociált szubsztrátok közül kizárólag a prediktált MAPK kötőhelyet tartalmazó, növény-specifikus EB1c-t foszforilálja *in vitro*.

V. Következtetések

Az *Arabidopsis thaliana* MAP kinázok D-alcsaládjába tartozó, TDY aktivációs hurkot tartalmazó AtMPK9 aktivációja mindeddig felderítetlen volt. A búzacsíra alapú, sejtmentes *in vitro* transzlációs rendszerben előállított AtMPK9 SDS-PAGE-en a fehérje foszforilációjának következményeként a klasszikus AtMPK6-tól eltérő migrációs képet mutat, és az MBP modell szubsztráttal történő, radioaktív kináz reakcióban szokatlanul magas alapaktivitással rendelkezik. Anti-p-ERK ellenanyaggal végzett immunoblot bizonyította, hogy az aktivitás a TDY hurok foszforilációjához köthető, melyet tömegspektrometriai analízissel is igazoltunk.

A TDY hurok mindkét foszfoakceptor aminosavának foszforilálnia kell a kináz aktivitás elnyeréséhez. A TDY hurok, *in vitro* mutagenézissel létrehozott T185A, Y187F és kettős T185A/Y187F mutánsai, illetve a

kináz inaktív mutáns a vad típustól eltérő migrációs képet mutatnak, aktivitással nem rendelkeznek. LC-MS/MS analízissel kimutattuk, hogy az egyszeres mutánsok esetén a másik foszfoakceptor aminosav foszforilált, a TDY hurok kettős mutánsában és a LOF-ban nem azonosítható foszforiláció. A TDY motívum foszforilációja tehát mind a treonin, mind a tirozin aminosavon megtörténik, és ez elengedhetetlen az AtMPK9 teljes aktiválásához.

Az AtMPK9-nek nem ismert MAPK kináz aktivátora. *In vivo*, protoplaszt transziens expressziós kísérleteinkkel bebizonyítottuk, hogy az AtMPK9-nek nincs kimutatható aktivitás növekedése egyetlen konstitutívan aktív MAPK kinázzal történő koexpresszió esetén sem, viszont a fiziológias stimulusok közül a NaCl, a H₂O₂ és a flagellin is aktiválja. Az *in vivo* rendszerben, anti-p-ERK ellenanyaggal végzett immunoblot alapján csak a sóaktivált WT AtMPK9 rendelkezik foszforilált aktivációs hurokkal, a LOF viszont nem. Az AtMPK9 tehát MAPKK-független módon, autofoszforilációval aktiválódik.

A foszfatázok negatívan regulálják a MAP kinázokat. Az okadánsav gátolja a PP2A, PP2B és kissé a PP1 fehérje foszfatázokat. Okadánsavval kezelt, WT AtMPK9-t túltermelt sejtek aktivitása drámaian megnövekszik, és ezzel párhuzamosan nő a TDY hurok foszforiláltsági állapota, a LOF esetén nem történik változás. Tehát az AtMPK9-et fiziológiásan okadánsav-érzékeny foszfatázok defoszforilálhatják.

Az autofoszforiláció mechanizmusa lehet intra- és intermolekuláris. *In vitro* transzlált vad típusú és kináz inaktív fehérjét szubsztrátként használva a hozzáadott WT AtMPK9 nem foszforilálta a LOF-ot, így kijelenthetjük, hogy az aktiváció intramolekulárisan történik.

A C-terminális rendezetlen domén funkciója ismeretlen, a D-alcsaládon belül minden tag esetén különböző aminosav szekvenciával rendelkezik. Tömegspektrometriás mérésekkel a WT AtMPK9 C-

terminális doménjében három foszfoszerint (Ser401, Ser443 és Ser464) azonosítottunk, melyből egy nem felel meg a MAP kinázokra jellemző, szerin/treonin-prolin foszforilációs helynek. Feltételezzük, hogy a C-terminális domén regulátor funkcióval rendelkezhet, viszont a pontos mechanizmus feltáráshoz még további kísérletek szükségesek.

A növényi sejtosztódásban feltételezett szerepet játszó, mikrotubulus-asszociált fehérjék (EB1a, EB1c, γ -tubulin és GCP4) az AtMPK6 feltételezett szubsztrátjai. *In vitro* fehérjetermeléssel előállított fehérjékkel kináz reakciót végezve kimutattuk, hogy a négy vizsgált fehérje közül az AtMPK6-nak csak az EB1 fehérje növény-specifikus c izoformája a szubsztrátja. A foszforilációnak fontos szerepe lehet a mitotikus orsó szabályozásában.

VI. Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés témájához kapcsolódó közlemények:

- ▲ Nagy, S. K., Darula, Z., Kállai, B. M., Bögre, L., Bánhegyi, G., Medzihradzky, K. F., Horváth, G. V. and Mészáros, T. (2015) Activation of AtMPK9 through autophosphorylation that makes it independent of the canonical MAPK cascades. *Biochem. J.* **467**, 167–175. [IF: 4.396](#)
- ▲ Kohoutová, L., Kourová, H., Nagy, S. K., Halada, P., Mészáros, T., Irute, M., Bögre, L. and Binarová, P. (2015) The Arabidopsis mitogen-activated protein kinase 6 is associated with γ -tubulin on microtubules, phosphorylates EB1c and maintains spindle orientation under nitrosative stress. *New Phytol.* in press. [IF: 7.672](#)
- ▲ Nagy, S. K. and Mészáros, T. (2014) In vitro translation-based protein kinase substrate identification. In *Cell-Free Protein Synthesis, Methods in Molecular Biology*, pp 231–243, Humana Press, New York.

Egyéb közlemények:

- ▲ Szeitner, Z., Lautner, G., Nagy, S. K., Gyurcsányi, R. E. and Mészáros, T. (2014) A rational approach for generating cardiac troponin I selective Spiegelmers. *Chem. Commun. (Camb.)* **50**, 6801–4. [IF: 6.834](#)
- ▲ Kálmán, F. S., Lizák, B., Nagy, S. K., Mészáros, T., Zábó, V., Mandl, J., Csala, M. and Kereszturi, É. (2013) Natural mutations lead to enhanced proteasomal degradation of human Ncb5or, a novel flavoheme reductase. *Biochimie* **95**, 1403–1410. [IF: 3.123](#)