



**ACADEMIA ROMÂNĂ
INSTITUTUL DE BIOCHIMIE**

**REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT
„ANALIZA PROFILULUI PROTEINELOR MODIFICATE DE
EYA PE CELULE NORMALE ȘI PATOLOGICE PRIN
SPECTROMETRIE DE MASĂ ȚINTITĂ”**

Conducător de doctorat

Prof. Dr. Ștefan - Eugen Szedlacsek

Doctorand

Ionescu Aura - Elena

**București
2020**

CUPRINS

SUMAR.....	3
INTRODUCERE.....	7
A. PARTEA TEORETICĂ	
CAPITOLUL I PROTEIN-TIROZIN-FOSFATAZE - SINOPSIS	8
I.1 CARACTERISTICI GENERALE.....	8
I.2 CLASIFICARE.....	9
I.3 MECANISM DE ACȚIUNE	10
I.4 PROTEIN-TIROZIN-FOSFATAZE - DESCRIERE A SUBTIPURILOR	12
I.5 PROTEIN-TIROZIN-FOSFATAZELE EYES ABSENT.....	20
CAPITOLUL II PROTEOMICA BAZATĂ PE SPECTROMETRIE DE MASĂ	31
II.1 CONSIDERAȚII GENERALE.....	31
II.1.1 Principiu și instrumentație.....	31
II.1.2 Tehnici de spectrometrie de masă în proteomică.....	39
II.1.3 Metode de fragmentare a peptidelor	41
II.2 FOSFOPROTEOMICA BAZATĂ PE SPECTROMETRIE DE MASĂ	44
II.3 SPECTROMETRIA DE MASĂ NATIVĂ	54
II.4 CUANTIFICAREA ÎN PREOTOMICA BAZATĂ PE SPECTROMETRIE DE MASĂ	56
B. REZULTATE EXPERIMENTALE	
CAPITOLUL III WDR1, UN NOU SUBSTRAT AL EYA3	62
III.1 MATERIALE ȘI METODE.....	62
III.2 REZULTATE ȘI DISCUȚII	69
III.2.1 Fosforilarea EYA1, EYA2 și EYA3 de către protein-tirozin-kinaza Src.....	69
III.2.2 Interacția dintre EYA3 și WDR1	85
III.3 CONCLUZII	91
CAPITOLUL IV ANALIZA PRIN SPECTROMETRIE DE MASĂ A TIROZIN-FOSFORILĂRII EYA3 DE CĂTRE KINAZA SRC. IMPLICAȚII LA NIVEL CELULAR.	93
IV.1 MATERIALE ȘI METODE.....	94
IV.2 REZULTATE ȘI DISCUȚII	113
IV.2.1 Analiza prin spectrometrie de masă nativă a EYA3 și a fosforilării <i>in vitro</i> a acesteia de către kinaza Src.....	113
IV.2.2 Detecția reziduurilor de tirozină ale EYA3, fosforilate de către Src, și identificarea situsurilor de autodefosforilare ale EYA3.....	130
IV.2.3 Dinamica tirozin-fosforilării și defosforilării <i>in vitro</i> a EYA3 D311N	134
IV.2.4 Contribuția situsurilor de tirozină identificate drept fosforilate de Src asupra fosforilării totale a EYA3	138
IV.2.5 Implicații la nivel celular pentru unele situsuri de tirozină ale EYA3 fosforilate de kinaza Src.....	141
IV.2.6 Tiparul de fosforilare al EYA3 indus de Src în celule HEK293T și MCF-7.....	147
IV.2.7 Stabilirea variabilității reziduurilor de tirozină ale EYA3 folosind unelte bioinformatiche	150
IV.3 CONCLUZII	152
DATE SUPLIMENTARE	155
LISTA ABREVIERILOR.....	180
MULȚUMIRI.....	183
LISTA PUBLICAȚIILOR ȘI PREZENTĂRIILOR DE POSTER	185
REFERINȚE	187

Obiectivele studiului

Proteinele Eyes absent aparțin grupului aspartil-protein-tirozin-fosfatazelor din cadrul superfamiliei protein tirozin-fosfatazelor (PTPazelor). Acestea au fost inițial definite drept co-activatori ai transcripției, membrii ai unei rețele reglatoare de factori de transcripție conservați de-a lungul evoluției. Această rețea interacționează cu multe alte căi de semnalizare și deține roluri importante în formarea, dezvoltarea și homeostazia unui număr variat de țesuturi și organe. De asemenea, proteinele Eya sunt capabile de interacții proteină-proteină, având roluri importante în procese fiziologice și patologice. Mutațiile de tip “pierdere de funcție” din cadrul genelor Eyes absent provoacă numeroase sindroame congenitale precum sindromul cardiofacial, sindromul bronhio-oto-renal, sindromul oto-facio-cervical, cataracta congenitală, cardiomiopatie dilatativă și debut tardiv al surzimii. Supraexpresia genelor Eyes absent sau a proteinelor EYA a fost identificată în diverse forme de cancer, precum cel de sân, ovarian epitelial, tumoarea lui Wilms, tumori maligne ale tecii nervilor periferici, adenocarcinoame pulmonare și esofagiene. Ambele funcții ale proteinelor Eya sunt implicate în procese canceroase.

Proteinele Eya își exercită funcția atât în nucleu cât și în citoplasmă. Deși Eya sunt proteine complexe, numai două substraturi au fost identificate până acum: histona H2AX (cu implicații în repararea ADN-ului) și ER β (cu implicații în creșterea tumorală). Aceste substraturi ilustrează rolul Eya în nucleul celulei. Sunt multe raportări despre rolul Eya în citoplasmă, dar, până acum, niciun substrat citoplasmatic nu a fost identificat. Prin urmare, pentru a înțelege mai bine cum funcționează Eya ca protein-tirozin-fosfatază, primul obiectiv al tezei mele a fost identificarea unor noi substraturi citoplasmaticale ale Eya. Identificarea lor poate reprezenta un punct de plecare în cautare de noi procese și căi de semnalizare în care sunt implicate proteinele Eya.

Fosforilarea este una dintre cele mai importante modificări post-tranlaționale ale proteinelor. Protein-tirozin-fosforilarea, o subcategorie, joacă rol major în transducția semnalului deși reprezintă mai puțin de 1% din totalul fosforilărilor. Sunt câteva studii care raportează tirozin-fosforilarea Eya. Pe de altă parte, autodefosforilarea Eya a fost de asemenea raportată pentru proteinele Eya non-umane. Caracterizarea echilibrului dintre cele două procese opuse, fosforilarea și (auto)defosforilarea, oferă informații despre mecanismul transducției semnalului indus de fosforilarea reziduurilor de tirozină. În cazul proteinelor Eya, este de așteptat ca această cooperare între fosforilare și (auto)defosforilare să asigure un tipar de fosforilare al Eya care să fie adecvat cerințelor fiziologie ale celulei. Astfel, cel de-al doilea obiectiv al tezei mele de doctorat a fost identificarea reziduurilor de tirozină fosforilate ale EYA3, caracterizarea echilibrului dintre fosforilarea și autodefosforilarea acesteia, precum și identificarea implicațiilor de la nivel celular al acestor procese antagonice.

INTRODUCERE

Fosforilarea și defosforilarea proteinelor sunt evenimente celulare esențiale, mediate de kinaze și fosfataze, enzime care funcționează în complementaritate și se coordonează reciproc în cadrul transducției semnalului, pentru a regla numeroase funcții celulare. Importanța acestor două procese a fost evidențiată în creștere, diferențiere, proliferare, activarea transcripției, progresia ciclului celular, motilitate și adeziune celulară. Perturbarea echilibrului fosforilării poate duce la cancer, boli (auto)immune și neurodegenerative, chiar diabet. Deși kinazele și fosfatazele modulează alte proteine atunci când își îndeplinesc activitatea, pot fi și ele modulate prin fosforilare.

Protein-tirozin-fosforilarea este unul dintre cele mai importante mecanisme de semnalizare celulară implementate de organismele eucariote¹. Dintre toate procesele de protein-fosforilare, tirozin-fosforilarea este utilizată extensiv doar de eucariotele multicelulare². Este reglată de activitățile echilibrate și opuse dintre protein-tirozin-kinaze (PTKaze) și protein-tirozin-fosfataze¹. Celulele utilizează fosforilarea la tirozină drept unealtă în cadrul comunicării intra- și intercelulare, transportului moleculelor, definirii formei celulare, în motilitate, atunci când se decide între diferențiere și proliferare, în reglarea transcripției genelor, și în procesarea acidului ribonucleic (ARN) mesager². Fosforilarea la tirozină și defosforilarea sunt implicate și în corelarea acestor evenimente între celule adiacente, de la embriogeneză până la dezvoltarea unui organ și homeostazia țesuturilor².

CAPITOLUL I PROTEIN-TIROZIN-FOSFATAZE - SINOPSIS

I.1 CARACTERISTICI GENERALE

Protein-tirozin-fosfatazele sunt enzime care catalizează îndepărtarea grupărilor fosfat de la nivelul reziduurilor de tirozină fosforilate ale proteinelor³. La început, PTPazele erau considerate enzime cu activitate nespecifică, de menaj (tip “house-keeping”), care ar fi funcționat pentru a inversa acțiunea PTKazelor^{4,5}. De-a lungul timpului, viziunea simplistă s-a dovedit a fi greșită și multe dovezi au argumentat că PTPazele dețin specificitate de substrat și cooperează într-o manieră bine definită cu kinazele, pentru a regla căile de semnalizare⁵⁻⁷. De fapt, PTPazele formează o superfamilie de enzime complexe și cu structuri diverse. Studiile au arătat că, asemenea PTKazelor, PTPazele pot avea fie influență pozitivă fie negativă asupra căilor de semnalizare și joacă roluri importante în menținerea fiziologiei celulare^{8,9}. Au fost implementate modele matematice cu scopul de a descrie cum sunt reglate căile de semnalizare de către kinaze și fosfataze^{10,11}. Ambele modele descriu kinazele ca fiind cele ce controlează amplitudinea semnalului mai mult decât durata acestuia, în timp ce fosfatazele au o influență pronunțată asupra ratei și duratei răspunsului^{10,11}. Dereglarea căilor de semnalizare mediate de PTPaze a fost raportată în cancer precum și în boli cardiovasculare, neurologice, autoimune și metabolice¹². Perturbarea funcției PTPazelor poate fi rezultatul supraexpresiei proteice, pierderii expresiei proteinei¹³⁻¹⁵, chiar și polimorfismului unui singur aminoacid¹⁶.

În concluzie, pentru a înțelege rolul tirozin-fosforilării în fiziologie și boli, trebuie acordată atenție în egală măsură ambilor parteneri.

I.2 CLASIFICARE

De-a lungul timpului au fost alcătuite multe clasificări pentru superfamilia PTPazelor, luând în considerare cele mai noi decoperiri din domeniu. Ultima clasificare a tirozin-fosfatazelor a fost făcută pe baza reziduuului catalitic care inițiază atacul nucleofilic. Astfel, sunt grupate în: cistein- (Cis-), aspartat- (Asp-), și histidin- (His-)fosfataze¹⁷ (Tabel I.1). Aceasta nouă clasificare este rezultatul adăugării unor noi membrii super-familiei PTPazelor. Astfel, a fost generat PTPomul uman extins¹⁷. Criteriile recente prin care o proteină este inclusă ca membru al familiei tirozin-fosfatazelor sunt: a) existența unui doemniu PTP sau b) prezența motivului reprezentativ “CxxxxxR” într-un domeniu non-PTPazic sau c) dacă se dovedeste că are activitate tirozin-fosfatazică sau d) prezintă similaritate mare de secvență cu membrii care au activitate PTPazică demonstrată¹⁷. Considerând aceste criterii, super-familia PTPazelor conține acum 125 de proteine, dintre care, aproximativ 40 au ca țintă substrate care conțin reziduuri de tirozină fosforilate¹⁷.

În super-familia PTPazelor, există o gamă largă de specificitate de substrat, cu accent pe hidroliza esterilor derivați ai acidului fosforic: substrat care conțin fosfoserină sau fosfotreonină, fosfoinozitid-fosfați (PIP), carbohidrați fosforilați, ARN de tip mesager, resturi anorganice. Pe de altă parte, activitatea tirozin-fosfatazică poate fi îndeplinită de proteine din familii enzimatică cu structuri diverse, precum haloacid-dehalogenazele (HAD), histidin-fosfatazele (HP), rodanazele și arsenat-reductazele¹⁷.

Tabel I.1. Clasificarea familiei extinse a PTPazelor din genomul uman (după ¹⁷). Gruparea tirozin-fosfatazelor a fost făcută pe baza rezidului catalitic nucleofil - Cis, Asp sau His - și topologiei acestora. Diferite culori sunt atribuite fiecărei familii de tirozin-fosfataze care au reziduu catalitic nucleofil comun (albastru pentru Cis-, verde pentru tip Asp- și roșu pentru His-fosfataze) și clase diferite din cadrul aceleiași familii sunt colorate în diferite tonuri ale aceleiași culori. Abrevieri: pTyr/ pSer/ pThr – substrat ce conțin fosfotirozină/ fosfoserină/ fosfotreonină; PIP - fosfatidilinozitol fosfați.

Familie de tirozin-fosfataze care au același tip de reziduu catalitic nucleofil	Clasa	Subclasa	Numele subclasei	Număr de membrii din același grup	Substrat
Cis-fosfataze	Clasa I	Subclasa I	Clasice	37	pTyr, PIP
		Subclasa II	Tip VH1	63	pTyr, pSer, pThr, PIP, altele (nonproteic)
		Subclasa III	SAC	6	PIP
		Subclasa IV	PALD1	1	Substrat necunoscut
		Subclasa V	INPP4	2	PIP
		Subclasa VI	TMEM55	2	PIP
	Clasa a II-a		LMW-PTP	1	pTyr
			SSU72	1	pSer
	Clasa a III-a		CDC25	3	pTyr, pThr
	Asp-fosfataze	HAD		EYA	4
His-fosfataze	PGM		UBASH3	2	pTyr
	Fosfataze acide		ACP	3	pTyr, pSer, pThr, nonproteic

I.3 MECANISM DE ACȚIUNE

Tirozin-fosfatazele catalizează îndepărtarea grupării fosfat de pe proteina tirozin-fosforilată (substrat) printr-un mecanism care implică doua etape (detaliat în Fig. I-1).

Reacția este inițiată de reziduu catalitic (Cis, Asp sau His, corespunzător fiecărei familii de fosfataze), care efectuează un atac nucleofil asupra grupării fosfat a substratului, formând astfel

un intermediar tranzient enzima-substrat, care apoi eliberează substratul defosforilat și formează un compus intermediar, fosfoenzima (numit “phosphoenzyme intermediate” în Etapa I – Step I, Fig. I-1). În această etapă, un reziduu de Asp funcționează ca acid general, deoarece donează un proton grupării tirozilor.

În următoarea etapă a reacției (Etapa a II-a - Step II în Fig. I-1), intermediarul fosfoenzimă este hidrolizat și enzima este recuperată. Aici, același Asp joacă acum rolul de bază generală, deprotonând o moleculă de apă, care acum acționează ca nucleofil și produce defosforilarea enzimei.

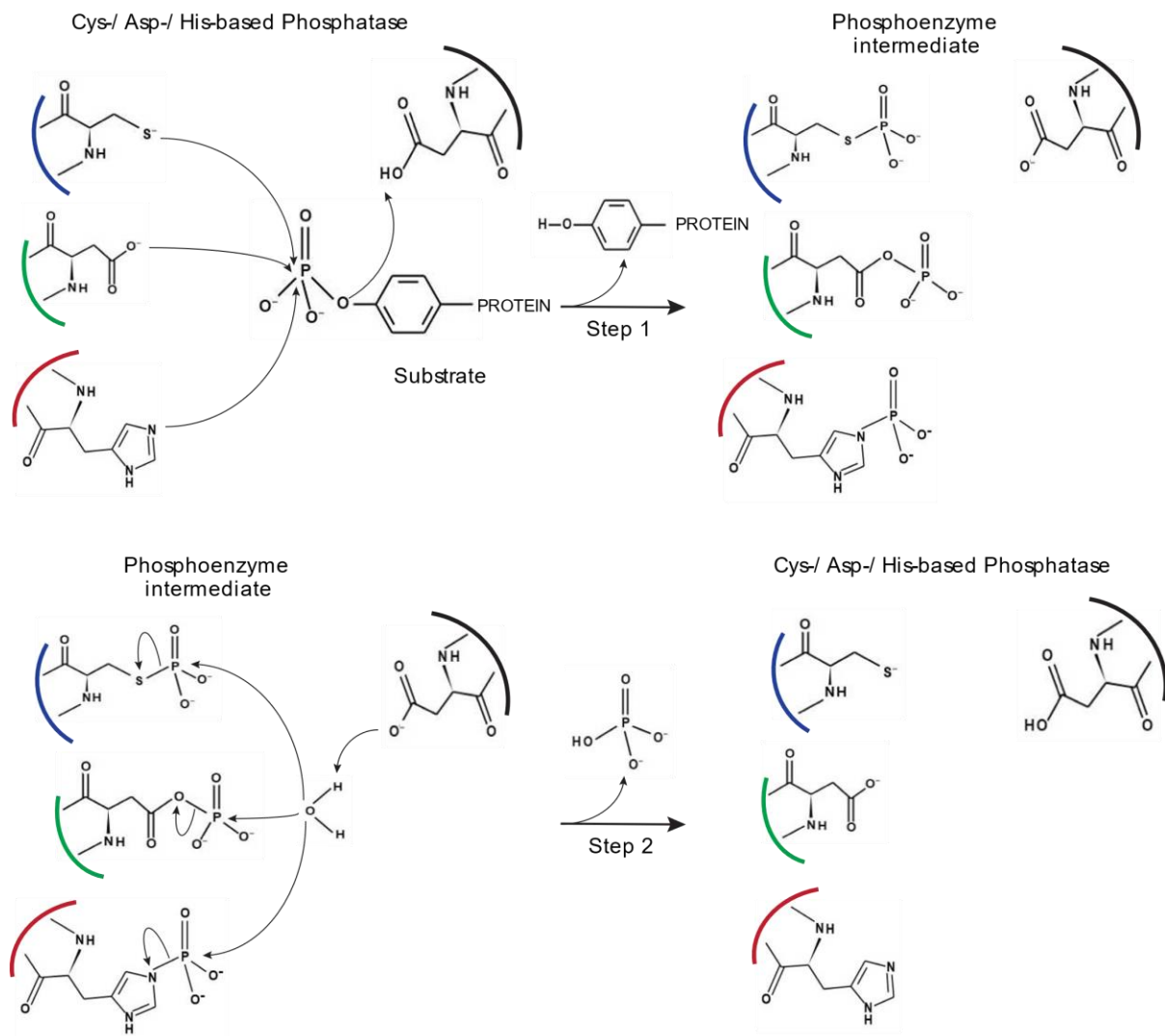


Figura I-1. Reprezentarea schematică a mecanismului catalitic al super-familiei PTPazelor umane (adaptare după ¹⁷). “Cys-/ Asp-/ His-based phosphatase” este “Cis-/ Asp-/ His-fosfataza”, “phosphoenzyme intermediate” este “intermediarul fosfoenzima”, iar “Step” este “Etapa”.

I.4 ASPARTIL-PROTEIN-TIROZIN-FOSFATAZELE

Această categorie este reprezentată doar de proteinele Eyes absent (EYA)¹⁷. Acestea au primit numele de “Eyes absent” deoarece în prima caracterizare, efectuată pe produsul genei *eyes*

absent din *Drosophila melanogaster*, s-a identificat că gena este esențială în dezvoltarea normală a ochiului musculiței¹⁸. Pierderea funcției genei *eya* a generat un fenotip de musculiță adultă careia îi lipsesc ochii și s-a descoperit că activitatea *eya* este necesară pentru supraviețuirea celulelor oculare progenitoare și mai departe, pentru diferențierea acestor celule. Inițial, au fost definite drept co-activatori ai transcripției¹⁹, dar ulterior s-a descoperit că acestea posedă și activitate protein-tirozin-fosfatazică^{20,21}. Ca și co-activator al transcripției, s-a demonstrat că *eyes absent* (*eya*) este membră a unei rețele reglatoare de factori de transcripție și cofactori evolutiv conservați, numită “retinal determination gene network” (RDGN) în *Drosophila*, alături de “twin of eyes” (*toy*), *eyeless* (*ey*), *sine oculis* (*so*) și *dachshund* (*dac*)²²⁻²⁸. De la insecte la oameni, sunt familii de gene echivalente - *Pax* (pentru *toy* și *ey*), *Six* (pentru *so*), *Eya* (pentru *eya*) și *Dach* (pentru *dac*) - care constituie rețeaua PSED (PSEDN - “Pax-Six-Eya-Dach Network”). Prin interacția cu multe alte căi de semnalizare (TGF- β ; Notch, Hedgehog, Wingless/Wnt, EGFR)²⁹ această rețea deține roluri importante în formarea, dezvoltarea și homeostazia unui număr variat de țesuturi și organe: ochi, rinichi, sistem nervos, urechi, inima, mușchi³⁰. Rețeaua PSED este de asemenea implicată în câteva procese, cum ar fi formarea membrilor^{31,32}, gonadogeneza³³ și neurogeneza³⁴. Această funcție este situată în partea N-terminală a proteinei, o regiune slab conservată³⁵. Activitatea PTPazică este localizată în partea C-terminală a proteinei, care este o regiune înalt conservată, denumită și Eya Domain (ED). Această regiune este de asemenea necesară pentru îndeplinirea proceselor de transactivare, fiind capabilă să efectueze interacții proteină-proteină cu proteinele care leagă acidul deoxyribonucleic (ADN)^{19,36,37}. Mecanismul PTPazic al Eya implică două reziduuri de Asp și un ion de Mg²⁺, drept cofactor. Motivul DxDx(T/V) din ED seamănă cu motivul 1 al superfamiliei HAD. Alinieri de secvență și analize structurale au dovedit că Eya este membră a grupului fosfatazelor din această superfamilie^{20,21}. Se cunoaște faptul că activitatea PTPazică a Eya este implicată în repararea ADN-ului^{38,39}, angiogeneza⁴⁰ și numeroase procese cancerigene⁴¹⁻⁴³.

La vertebrate sunt patru gene omoloage ale *eya* din *Drosophila*, *Eya1-4*. Mutații de tip “pierdere de funcție” în genele care codifică pentru proteinele Eyes absent (*EYA1*, *EYA4*) generează sindroame congenitale precum sindromul cardiofacial⁴⁴, sindromul bronhio-otorenal⁴⁵, sindromul oto-facio-cervical⁴⁶, cataracta congenitală⁴⁷, cardiomiopatie dilatativă⁴⁸ și debut tardiv al surzimei⁴⁹⁻⁵¹. Supraexpresia genelor Eyes absent sau a proteinelor EYA a fost detectată în cancerile de sân^{41,52} și ovarian epitelial⁵³, tumorile lui Wilms⁵⁴, tumori maligne ale tecii nervilor periferici⁵⁵, adenocarcinoame pulmonare⁵⁶ și esofagiene⁵⁷. Toate funcțiile proteinelor Eya sunt implicate în procese canceroase.

CAPITOLUL II PROTEOMICA BAZATĂ PE SPECTROMETRIE DE MASĂ

II.1 CONSIDERAȚII GENERALE

Proteomica este definită ca o ramură a biotehnologiei ce implică o caracterizare la scară largă a tuturor proteinelor dintr-o anumită celulă, anumit țesut sau organism^{58,59}. Tehnici precum biochimia, biologia celulară și moleculară, bioinformatica și genetica, sunt utilizate pentru a obține o viziune globală asupra structurilor, funcțiilor și interacțiilor proteinelor dintr-o celulă. Studiile proteomice pot fi abordate din trei perspective majore: expresia proteinelor, proteomica structurală și proteomica funcțională⁶⁰. Proteomica structurală implică determinarea tuturor proteinelor dintr-un complex proteic sau dintr-un organit celular, identificarea localizării acestora și caracterizarea interacțiilor proteină-proteină. Obiectivul final în proteomica structurală este alcătuirea arhitecturii unei celule și oferirea unor explicații cu privire la caracteristicile unice conferite la un moment dat unei celule de către proteinele exprimate⁶⁰.

Una dintre cele mai populare tehnologii aplicate în domeniul proteomicii structurale este spectrometria de masă (MS). O metodă analitică foarte sensibilă, spectrometria de masă permite determinarea de informații structurale pentru o proteină, cum ar fi secvența de aminoacizi, masele peptidelor, tipul și localizarea modificărilor (post-translaționale), interacții proteină-proteină, complexe proteice. Ceea ce face ca spectrometria de masă să fie o unealtă foarte puternică în domeniul proteomicii este faptul că informația obținută din analiza prin spectrometrie de masă a proteinelor poate fi utilizată și în determinarea profilului de expresie al proteinelor și toată informația obținută poate fi integrată în date funcționale (căi de semnalizare ale proteinelor, mecanisme ale bolilor, interacții proteină-medicament).

Principiu și instrumentație

Spectrometria de masă este o tehnică analitică în care instrumentul măsoară raportul masă-pe-sarcină (m/z) și intensitatea moleculelor sau particulelor purtătoare de sarcină. Rezultatele dobândite în urma unei analize de spectrometrie de masă sunt spectrele. Spectrul de masă al unui compus ionizat este o reprezentare a intensității semnalului dat de acesta versus raportul m/z al acestuia⁶¹. Conform principiului descris, un spectrometru de masă este practic alcătuit din trei componente: sursa de ioni, analizorul de masă (determină raportul m/z al analiților ionizați) și detectorul (înregistrează numărul de ioni pentru fiecare valoare m/z). Pe lângă aceste componente, instrumentul mai trebuie să conțină și un dispozitiv de admisie a probei, iar la final un computer. Dispozitivul de admisie este un sistem folosit pentru a introduce în sursa de ioni o

cantitate mică din proba ce trebuie analizată. Computerul dispune de un program special, necesar pentru achiziționarea și procesarea datelor obținute de la spectrometrul de masă, pentru a le genera sub forma spectrelor de masă⁶¹.

Tehnici ale spectrometriei de masă aplicate în proteomică

Tehnicile ce pot fi abordate în spectrometria de masă depind de tipul de probă pe care o avem și ce informație vrem să obținem din analiza acesteia. În spectrometria de masă aplicată proteomicii, există: i) două tehnici de bază - *bottom-up* și *top-down* - care oferă informații legate de structura primară a proteinelor (masa moleculară - MW - secvența de aminoacizi, detecția și localizarea modificărilor post-tranlaționale) și ii) tehnici structurale, care oferă informații legate de structura secundară, terțiară și cuaternară a proteinelor, dinamica conformației și compoziției compexelor proteice - spectrometria de masă nativă, cea de tip “*cross-linking*” (XL-MS), cea care implică schimbul hidrogen/deuterium (*hydrogen/deuterium exchange MS* - HDX MS), spectrometria de masă pe baza mobilității ionilor (*ion-mobility MS*), pe baza etichetării covalente sau amprentelor covalente (*covalent labeling/footprinting*).

II.2 FOSFOPROTEOMICA BAZATĂ PE SPECTROMETRIE DE MASĂ

Aspecte generale ale analizei prin spectrometrie de masă a modificărilor post-tranlaționale

Termenul “modificare post-tranlațională” (PTM) se referă la un process enzimatic ce are loc asupra unui lanț polipeptidic (proteină) după ce tranlația acestuia este completă⁶². Legarea covalentă a unei grupări funcționale sau îndepartarea unei anumite grupări chimice, o procesare proteolitică a capătului unei proteine, un process de împachetare decisiv pentru maturarea funcțională a unei proteine sau o legare covalentă între domeniile unei proteine, sunt toate PTM-uri⁶². Prin intermediul PTM-urilor, un organism exprimă un număr mai mare de proteine funcționale decât ar permite informația genetică pe care o deține, diversificând astfel proteomul.

În spectrometria de masă, tipul și natura PTM-urilor pot fi dezvăluite prin determinarea precisă a diferenței de masă dintre forma modificată și nemodificată a proteinei sau peptidelor care derivă din aceasta. Pentru a detecta care aminoacid a suferit modificarea, spectrometria de masă în tandem (MS/MS) este folosită pentru a secvențializa peptidele și proteinele. Sunt multe caracteristici ale PTM-urilor care le fac mai dificil de detectat și de a fi corect atribuite în urma MS/MS, abundența scăzută și substoechiometria lor fiind cele mai importante. Labilitatea lor face ca asignarea corectă să fie deosebit de dificilă, unele pot afecta detectarea peptidelor prin inhibarea ionizării, și multe cresc hidrofilicitatea, ceea ce face mai dificilă manipularea probei,

purificarea și chiar legarea de coloanele obișnuite ce sunt utilizate pentru purificarea peptidelor și separarea acestora înainte de analiza MS/MS^{63,64}. PTM-urile pot, de asemenea, să afecteze eficiența de tăiere a proteazelor, conducând la produși peptidici mari care pot fi problematici în cazul ionizării prin electro-spray (ESI) sau analizei MS/MS⁶⁴.

Detecția PTM-urilor este o oportunitate pentru a identifica mecanisme prin care proteinele sunt reglate dinamic și, la scară largă (nivel celular), de a obține informații calitative și cantitative importante. Cu toate acestea, analiza lor prin spectrometrie de masă este de multe ori încălțită și poate conduce la concluzii incorecte legate de datele obținute.

Metode de îmbogățire în fosfoproteomică

Se presupune că în eucariote, la un moment dat, fosforilarea are loc la o treime din numărul total de proteine⁶⁵. Fosforilarea proteinelor la reziduurile de serină, treonină și tirozină sunt evenimente cheie implicate în procese de transducție sau amplificare a semnalului în celulele eucariote⁶³. Fosforilarea proteinelor este un proces dinamic, ce implică activitatea complementară a protein-kinazelor și protein-fosfatazelor⁶⁵. Fosfoproteomica, ce cuprinde analiza completă a fosforilării proteinelor, implică nu numai identificarea fosfoproteinelor și fosfopeptidelor, dar și localizarea reziduurilor fosforilate și cuantificarea fosforilării. Sunt câteva chestiuni legate de fosforilarea proteinelor în general, și particularități legate de fiecare dintre cei trei aminoacizi ce pot fi fosforilați (S, T, Y; fosforilarea la His nu este abordată aici), care fac ca analiza sa nu fie atât de ușor de înfăptuit. Ținând cont de acești factori, au fost dezvoltate și îmbunătățite diverse tehnici de analiză. Strategiile timpurii aplicate pentru localizarea situsurilor fosforilate implicau secvențierea Erdman și maparea fosfopeptidelor cu ³²P. În cazul spectrometriei de masă, există diverse strategii de îmbogățire care pot fi cuplate cu metode de detecție⁶³. Sunt trei metode principale de îmbogățire care pot fi aplicate la nivel de proteină sau peptide:

- 1. Tehnici bazate pe afinitate:** cromatografie de afinitate cu metal imobilizat (IMAC), cromatografie de afinitate cu oxizi metalici (MOAC), Phos-tag, hidroxiapatita;
- 2. Imunoprecipitare (IP),** folosind anticorpi specifici pentru fosforilare;
- 3. Modificări chimice (covalente):** β -eliminare, condensare carbodiimidică, α -diazorașina, condensare prin oxido-reducere.

II.3 SPECTROMETRIA DE MASĂ NATIVĂ

Spectrometria de masă nativă este o tehnică prin care analitul biologic, aflat într-un solvent nedenantant, este introdus în instrument prin intermediul ionizării prin electro-spray⁶⁶. Astfel, termenul “nativă” se referă la starea biologică a analitului în soluție, înainte de a fi supus ESI,

deoarece analitul pierde parțial din starea nativă în care este împachetat atunci când are loc tranziția în stare gazoasă și până la detecție, fiind în vacuumul din analizorul de masă⁶⁷. Spectrometria de masă nativă se focusează pe investigarea structurilor secundare, terțiare și cuaternare ale proteinelor, a complexelor proteice și pe interacția acestora cu acizii nucleici (ADN, ARN, oligonucleotide), cofactori, liganzi, medicamente și alte macromoleculi precum oligozaharidele, eterii coroană sau moleculele macrociclice^{68,69}. Astfel, în domeniul biologiei structurale, spectrometria de masă nativă este complementară cu metode tradiționale precum rezonanța magnetică nucleară (RMN), microscopia electronică, cristalografia cu raze X, deoarece poate să dezvăluie atât informații structurale cât și funcționale, legate de interacțiile din complexele proteice și dinamica acestor complexe⁶⁶.

În combinație cu alte metode din spectrometria de masă, precum cea care implică schimbul hidrogen/deuteriu, cea de tip “cross-linking”, cea care implică etichetare prin legături covalente, proteomica de tip “top-down” și “middle-down”⁷⁰⁻⁷³, spectrometria de masă nativă joacă un rol unic în biologia structurală prin faptul că dezvăluie nu numai compoziția în detaliu a complexelor, dar și care sunt consecințele structurale și funcționale ale, de exemplu, legării de cofactori, liganzi, acizi nucleici, macromoleculi chiar și alte complexe proteice.

II.4 CUANTIFICAREA ÎN PROTEOMICA BAZATĂ PE SPECTROMETRIE DE MASĂ

Prin evaluarea abundenței proteinelor în diferite condiții, se poate efectua o caracterizare extensivă a proteinelor relevante biologic și apoi a sistemului biologic din care fac parte. Expresia diferențială a proteinelor poate fi semn de stres cauzat de mediu sau mai rău, semnul unei condiții patologice. Proteomica cantitativă poate fi utilizată pentru determinarea tiparului de expresie al unei proteine în condițiile “normal” versus “stresat” sau “sănătos” versus “bolnav”, și acest lucru o face o unealtă valoroasă în domeniul descoperirii de biomarkeri⁷⁴.

În proteomică, metodele de cuantificare bazate pe spectrometria de masă evaluează abundența proteinei bazându-se pe abundența peptidelor corespunzătoare detectate. Peptidele proteolitice au câteva proprietăți fizico-chimice (ex. hidrofobicitate, sarcină, dimensiune), care le fac să genereze semnale foarte diferite în spectrometria de masă; de aceea, pentru o cuantificare precisă, se recomandă în general compararea fiecărei peptide individuale între experimente⁷⁵. Cuantificarea poate fi realizată prin câteva metode, luând în considerare factorii ce țin de instrument (parametrii sursei de ioni, eficiența transmisiei și detecției ionilor, contaminarea) și cei ce provin de la probă (prepararea probei, stabilitatea și repetabilitatea semnalului; eficiența ionizării analitului, concentrația și degradarea; ionizarea, detecția și interferențele spectrale)⁷⁶. Aceste metode sunt: cuantificarea de proteine prin etichetare (labeling) (metabolică, chimică,

enzimatică); cuantificarea fără etichetă (label-free), metoda de monitorizare a unei reacții selectate (“Selected Reaction Monitoring” - SRM); cuantificarea absolută.

CAPITOLUL III WDR1, UN NOU SUBSTRAT AL EYA3

Proteinele Eyes absent posedă funcțiile de coactivator al transcripției și protein-tirozin-fosfatază pe același lanț polipeptidic, ceea ce face studiul lor și mai fascinant. Este bine stabilit faptul că proteinele Eya își exercită funcția de transactivare în nucleu. De la descoperirea activității lor enzimatică, au fost ridicate mai multe întrebări cu privire la eventuala conexiune dintre cele două funcții, în particular dacă activitatea PTPazică a Eya este implicată în funcția ei de transactivare (de exemplu, dacă prin defosforilarea unui substrat specific, Eya ar putea influența potențialul ei de transactivare) sau ele sunt independente una de cealaltă⁷⁷. În orice caz, proteinele Eya își exercită activitatea protein-tirozin-fosfatazică în ambele compartimente, nuclear și citoplasmatic. Rapoartele descriu multe procese în care este implicată activitatea PTPazică a EYA dar pentru care nu fost identificate substrat, de exemplu: inducerea transformării, migrarea și invazivitatea celulelor de cancer de sân⁴¹, angiogeneza tumorală cu consecințe în creșterea tumorilor⁷⁸.

Pentru a înțelege mai bine funcția de protein-tirozin-fosfatază a Eya, ar fi foarte importantă identificarea cât mai multor substrat și determinarea relevanței fiziologice a interacției. Aici raportăm fosforilarea EYA1, EYA2 și EYA3 de către protein-tirozin-kinaza Src, interacția dintre două proteine umane EYA și interacția dintre EYA3 umană și proteina WDR1 (WD repeat-containing protein 1).

III.1 MATERIALE ȘI METODE

Materialele necesare au constat în construcții, primeri, anticorpi, enzime, kit-uri, substanțe și soluții (având gradul de puritate biologie moleculară, pentru culturi de celule de mamifer și bacteriene, pentru expresie și purificare de proteine).

Au fost efectuate următoarele proceduri experimentale și analize: culturi de celule de mamifer, transfecții, recoltări, lize, imunoprecipitări, expresii și purificări de proteine din culturi bacteriene, reacții kinazice *in vitro*, teste *in vitro* de determinare a activității protein-tirozin-fosfatazice, experimente de *knockdown* mediate de ARN de silențiere.

III.2 REZULTATE ȘI DISCUȚII

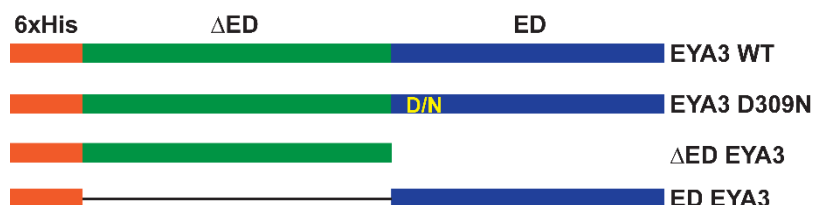
III.2.1 Fosforilarea EYA1, EYA2 și EYA3 de către protein-tirozin-kinaza Src

EYA1, EYA2 și EYA3 sunt fosforilate de către Src kinaza și toate posedă capacitate de autodefosforilare

Un raport anterior a arătat faptul că proteinele Eya au capacitate de autodefosforilare²⁰, dar nu au existat studii cu privire la omologii umani. Primele noastre obiective au fost: i) să aflăm dacă proteinele Eyes absent umane sunt tirozin-fosforilate, ii) de către care kinaza/e și iii) dacă aceste proteine au capacitate de autodefosforilare.

Am determinat că trei protein-tirozin-kinaze - Abl, Btk și Src - fosforilează EYA3 umană. Cunoscând faptul că Src kinaza este implicată în numeroase procese care duc la dezvoltarea tumorilor (supraviețuire, proliferare, migrare, adeziune, invazivitate, metastază) în variate tipuri de tumori, joaca rol în tranziția epitelial-mezenchimală (EMT) a celulelor canceroase și chiar modulează micromediul tumoral, am ales-o pentru studii aprofundate legate de fosforilarea proteinelor EYA. Am determinat că EYA1 și EYA2 umane au fost de asemenea fosforilate de Src kinaza. Faptul că pentru toți cei trei paralogi ai EYA, forma WT prezintă fosforilare mult mai mică în comparație cu forma catalitic-inactivă, sugerează că PTPazele active au activitate autocatalitică. Pentru a verifica această ipoteză, am efectuat reacții *in vitro* de fosforilare cu Src kinaza pe EYA3 WT, EYA3 D309N, EYA3 ED și EYA3 ΔED (Fig. III-1), atât în prezența cât și în absența benzbrumaronei (BB), un inhibitor specific al activității PTPazice a Eya⁴⁰. Rezultatele indică faptul că nivelul redus de fosforilare al EYA3 WT și EYA3 ED este consecința autodefosforilării EYA3. Aceste reacții *in vitro* de fosforilare arată nu numai că proteina EYA3 este capabilă de autodefosforilare ci și faptul că Src kinaza fosforilează atât ED cât și partea N-terminală a proteinei, iar reziduurile fosforilate pot fi autodefosforilate.

a



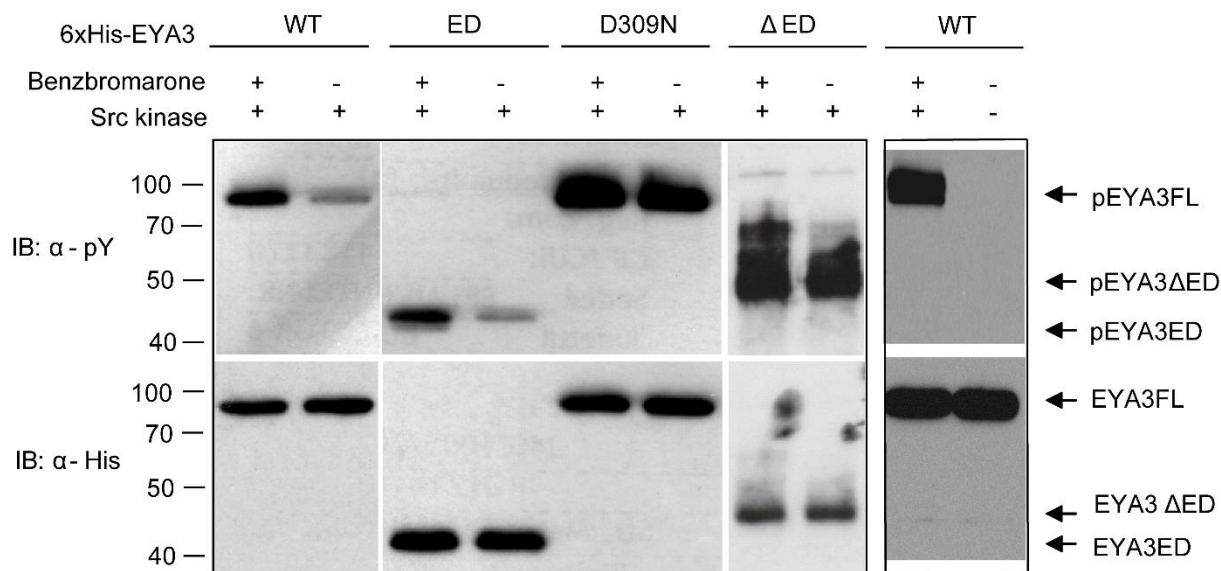
b

Figura III-1. Fosforilarea *in vitro* de către kinaza Src și autodefosforilarea EYA3.

a) Construcții EYA3, exprimate în *E. coli* și purificate. EYA3 WT umană, secvența întreagă (număr Uniprot Q99504) și mutantul EYA3 D309N, EYA3 ΔED și EYA3 ED, sunt toți construcți obținuți cu eticheta (tag) de 6xHis în partea N-terminală a secvenței acestora (figură adaptată din ⁸⁰). **b)** Tirozinfosforilarea *in vitro* a proteinelor 6xHis-EYA3 de către Src. Proteinele 6xHis-EYA3 au fost incubate cu Src kinaza activă, ce poartă tag de GST în N-terminal (GST-v-Src), cu și fără 100 μM BB. Figură din ⁷⁹.

Influența a două reziduuri de tirozină din domeniul catalitic al EYA asupra activității sale protein-tirozin-fosfatazice

Pentru a identifica reziduurile de tirozină ale EYA3 care sunt fosforilate de kinaza Src, am utilizat programe de predicție și am efectuat și analize preliminare de spectrometrie de masă.

Cu scopul de a valida fosforilarea la aceste reziduuri de tirozină, s-au efectuat câteva experimente care au implicat EYA3 D309N, în celule HEK293T. Rezultatele arată că niciunul dintre reziduurile de tirozină mutate (Y96, Y105, Y208, Y237) nu contribuie la fosforilarea totală a EYA3 D309N. De asemenea, am testat patru reziduuri de tirozină din ED al EYA3 - Y426, Y496, Y508 și Y532. Rezultatele indică faptul că niciunul din aceste reziduuri nu are contribuție majoră la fosforilarea EYA3.

Totuși, nivelul de fosforilare al EYA3 Y508F și EYA3 Y532F a fost similar cu cel al EYA3 D309N, mutantul PTP inactiv. Cunoșcând faptul că proteinele EYA au capacitate de autodefosforilare²⁰, comportamentul EYA3 Y508F și EYA3 Y532F poate fi explicat prin faptul că mutația Y→F a acestor reziduuri specifice scade activitatea autocatalitică. Astfel, am efectuat teste *in vitro* de determinare a activității PTPazice pe proteine imunoprecipitate EYA3 întregi respectiv EYA3 ED, utilizând p-nitrofenilfosfatul (pNPP) ca substrat artificial. Rezultatele arată

că oricare dintre mutațiile Y508F sau Y532F generează proteine EYA3 întregi sau ED EYA3, catalitic-inactive.

Din experimentele efectuate, nu putem spune dacă Y496, Y508 sau Y532 sunt situsuri de fosforilare pentru Src. O posibilă explicație poate fi că fosforilarea reziduurilor din N-terminal acoperă variația în fosforilare a ED. Așadar, am căutat eventuale variații în nivelul de fosforilare numai în ED. Am detectat că Y508 și Y496 sunt fosfositusuri ale kinazei Src.

Ambele reziduuri Y508 și Y532 sunt conservate printre proteinele Eyes absent de la mamifere și *Drosophila*, de aceea am evaluat dacă activitatea catalitică a altor membrii EYA este influențată de mutația Y→F a acestor două reziduuri. În acest scop, am folosit construcții ce codificau pentru EYA1 și EYA2 care să conțină mutații corespunzătoare lui Y508 (Y494F pentru EYA1 și Y473F pentru EYA2) și Y532 (Y518F pentru EYA1 și Y497F pentru EYA2) din EYA3. Surprinzător, mutațiile Y494F și Y518F nu inactivează fosfataza EYA1. În ceea ce privește EYA2, rezultatele Western blot cuantificate arată că mutația Y473F scade capacitatea de autodefosforilare a EYA2 (și astfel activitatea PTPazică), în timp ce Y497F nu o afectează. Controlul direct sau indirect pe care îl au aceste două reziduuri de tirozină asupra activității PTPazice a EYA pare că este specific pentru fiecare proteină umană EYA.

EYA3 Y508F și EYA3 Y532F se comportă ca mutanți cu capacitate de prindere a substratului

Am decis să ne folosim de capacitatea de autodefosforilare a EYA, demonstrată atât mai sus, cât și într-un studiu ce implică alte proteine Eya²⁰, pentru a investiga dacă cei doi mutanți Y→F ai EYA3 au capacitate de prindere a substratului (*trapping capacity*), testând dacă aceștia pot interacționa și prinde altă proteină EYA3 inactivă.

Am determinat că EYA3 Y508F și EYA3 Y532F interacționează cu, și prind EYA3 D309N cu o afinitate similară proteinei EYA3 D311N (Fig. III-2a), mutantul despre care se cunoaște că are capacitate de prindere a substratului (*trapping mutant*)⁸². Într-un experiment similar, mutația Y508F adăugată mutantului EYA3 D309N (constructul EYA3 D309N Y508F), a transformat proteina, care era incapabilă de captare, într-un mutant cu capacitate de prindere eficientă (Fig. III-2b). Prinderea EYA3 D309N de către EYA3 Y508F are loc numai în cazul co-expresiei Src, indicând că interacțiunea dintre două molecule EYA depinde de inducerea tirozinfosforilării lor (Fig. III-2b). Aceste ultime două experimente dovedesc că EYA3 Y508F și EYA3 Y532F sunt proteine cu capacitate eficientă de prindere a substratului și pot fi folosite ulterior în studii funcționale pentru căutarea de noi substraturi ale fosfatazei EYA3.

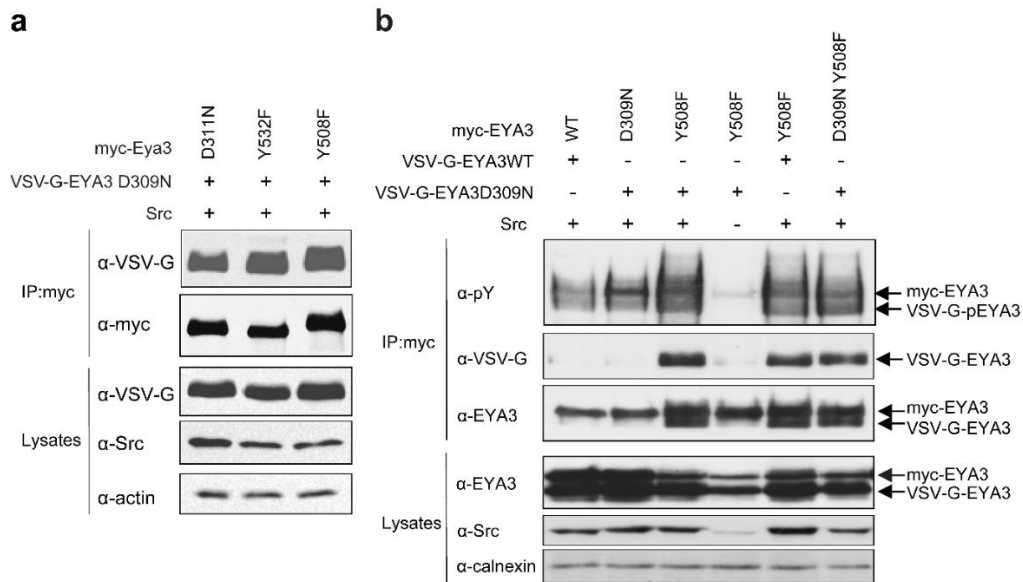


Figura III-2. EYA3 Y508F și EYA3 Y532F se comportă ca mutații cu capacitate de prindere a substratului.

Celule HEK293T au fost co-transfectate tranzient cu vectori ce codifică pentru kinaza c-Src Y527F și perechi de proteine EYA3 cu etichete diferite: **a**) VSV-G-EYA3 D309N (momeala) și proteine c-myc-EYA3 cu mutații singulare (D311N, Y508F sau Y532F) și **b**) VSV-G-EYA3 WT și D309N drept momeală, cu c-myc-EYA3 WT/D309N/Y508F/D309N Y508F. Figurile sunt adaptate după ⁷⁹.

Pentru a determina care regiuni din proteina EYA participă la reacția de autodefosforilare, am co-exprimat VSV-G-EYA3 Y508F cu diferite fragmente ale EYA, cu eticheta de c-myc – N-terminalul (EYA3 ΔED) și ED (WT/D311N/Y508F). Rezultatele arată că interacția intermoleculară este condiționată de prezența ED în ambele molecule și că ΔED nu este necesar pentru ca reacția să aibă loc (Fig. III-3a). Un alt experiment de imunoprecipitare din celule HEK293T, în care VSV-G-EYA3 ED Y508F a fost co-exprimat cu c-myc-EYA3 Y508E (care imită sarcina negativă dată de fosforilare) cu și fără Src, a demonstrat că interacția dintre ED EYA3 și proteina EYA3 întreaga, este condiționate de fosforilarea lor (Fig. III-3b).

Odată ce am determinat condițiile pentru interacția EYA3-EYA3, am dorit să verificăm dacă interacția poate avea loc între doi membrii diferiți ai familiei de proteine EYA umane. Am verificat dacă EYA3 interacționează cu EYA1, în celule HEK293T. Rezultatele arată că EYA1 D297N nu este capabilă să prindă EYA3 Y508F. Lipsa interacțiunii dintre EYA1 și EYA3 indică faptul că interacția EYA-EYA are loc numai între același tip de paralogi.

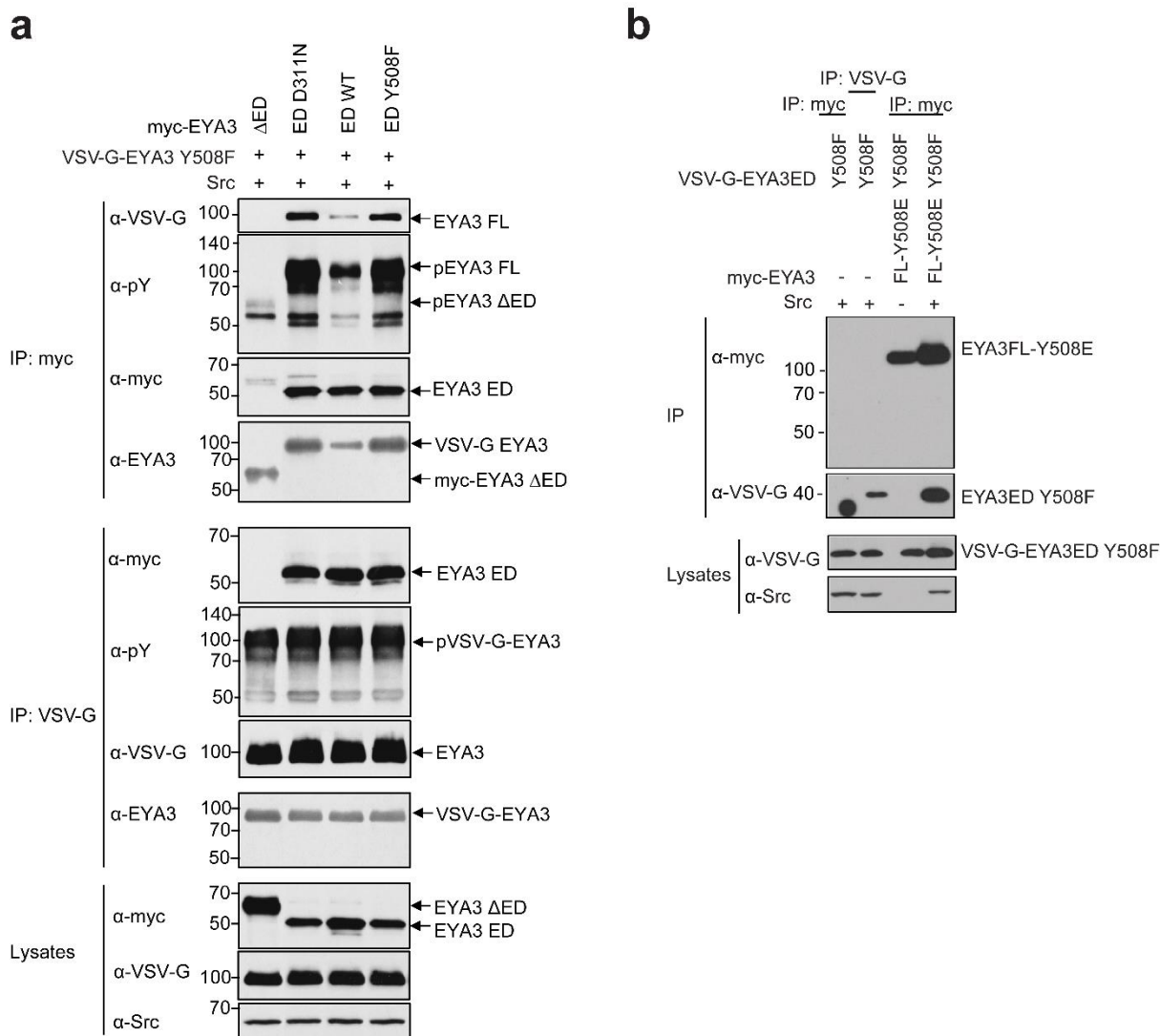


Figura III-3. Interacția dintre EYA3, proteină cu secvența întreagă, și fragmente ale EYA3 (ΔED, ED).

a) VSV-G-EYA3 Y508F a fost co-exprimată tranzient cu c-Src Y527F și diferite fragmente, etichetate cu c-myc, ale proteinei EYA3 (ΔED, ED WT, ED D311N și ED Y508F), în celule HEK293T. **b)** VSV-G-EYA3 ED Y508F și c-myc-EYA3 Y508E au fost co-exprimate cu și fără c-Src Y527F, în celule HEK293T. Figurile sunt adaptate după ⁷⁹.

III.2.2 Interacția dintre EYA3 și WDR1

Pentru a identifica noi substraturi pentru EYA3, s-a alcătuit un profil al activității protein-tirozin-fosfataze pe microarray de peptide, de către JPT Peptide Technologies, folosind His-EYA3 WT purificată din bacterii, activă ca protein-tirozin-fosfatază (experiment descris de Dr. Mihaela Mențel în Teza dumneaei de Doctorat și în ⁷⁹). Au fost testate 6207 de peptide cu un reziduu de tirozină fosforilat (pY) (lungimea de 13 aminoacizi, cu pY în mijlocul secvenței), derivate de la proteine umane tirozin-fosforilate. Dintre acestea, 68 de fosfopeptide au fost defosforilate peste 75%, în timp ce 7 dintre ele au fost defosforilate 100%.

Având rezultatele de la profilul activității protein-tirozin-fosfatazice a EYA3, am ales o proteină drept substrat candidat, bazându-ne pe datele publicate despre implicațiile celulare ale activității enzimatică a EYA. Din cele 7 fosfopeptide care au fost defosforilate 100% de EYA3, a fost aleasă pentru investigații cea corespunzătoare proteinei ce conține secvențe repetitive WD (WD repeat-containing protein 1, pe scurt WDR1). WDR1 este o proteină citoscheletică ce se asociază cu cofilina și îi îmbunătățește capacitatea de dezasamblare a filamentelor de actină⁸⁵. Este implicată în reglarea dinamicii citoscheletului actinic cortical (localizează cofilina la nivelul domeniilor de actină corticală - *cortical actin patches*)⁸⁴ și migrarea celulară direcțională⁸⁵. Fosfopeptida corespunzătoare din microarray, AHDGGI-pY-AISWSP, conține reziduul Y238.

Pentru a valida rezultatele obținute în experimentul de microarray (pe un model celular), prima oară am fost interesați să obținem WDR1 WT tirozin-fosforilat. În acest scop, am co-exprimit WDR1 și Src în celule HEK293T. Rezultatele Western blot au indicat că WDR1 WT este fosforilat de Src și Y238 este unul dintre reziduurile ce sunt fosforilate (Fig. III-4a). Știind aceste lucruri, în celule HEK293T a fost efectuat un experiment care viza testarea defosforilării fosfo-WDR1 WT de către EYA3 endogenă. WDR1 WT și Src au fost co-exprimate și 24 h post-transfecție, fie benzbramarona (inhibitor specific al activității PTPazice a EYA)⁴⁰, fie PP2 (inhibitor al familiei de kinaze Src)⁸⁶ sau ambele, au fost adăugate în mediul proaspăt al celulelor. Rezultatele indică faptul că EYA defosforilează phospho-WDR1 WT (pY-WDR1 WT) când Src este inhibat de PP2 și constituie un argument important în favoarea ipotezei că WDR1 WT tirozin-fosforilat este substrat al PTPazei EYA3 (Fig. III-4b).

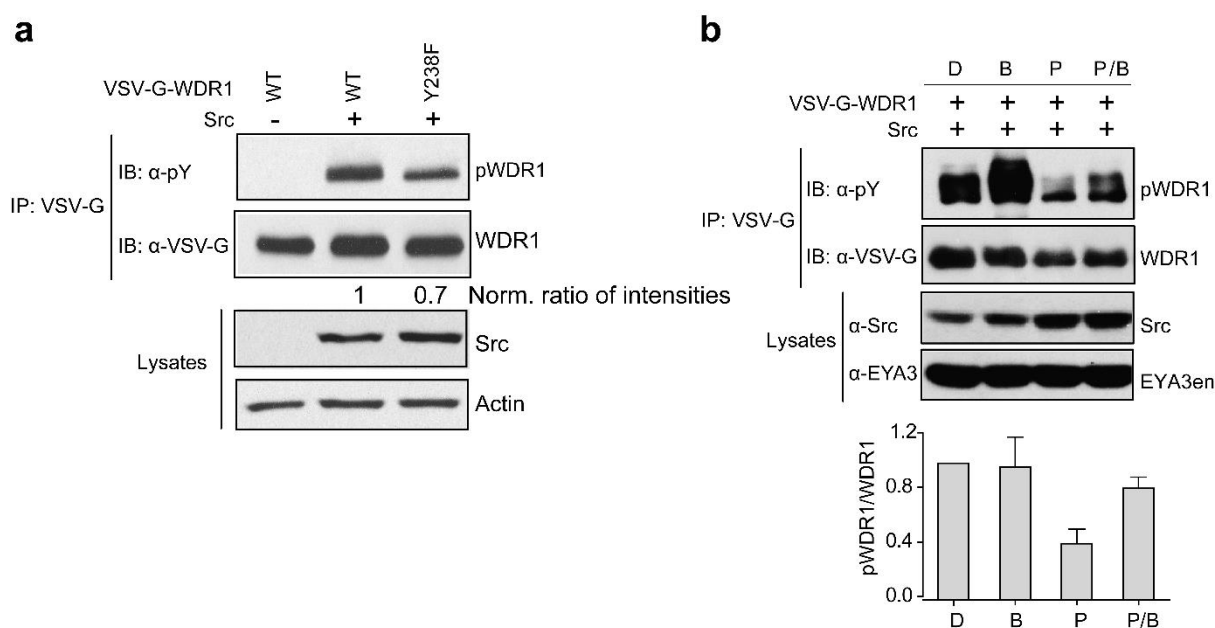


Figura III-4. WDR1 este tirozin-fosforilată de către kinaza Src și defosforilată de EYA3 endogenă.

a) VSV-G-WDR1 WT respectiv Y238F au fost co-exprimate tranzient cu sau fără c-Src Y527F, în celule HEK293T. Tirozin-fosforilarea a fost cuantificată folosind programul ImageJ⁸¹. Valoarea obținută pentru WDR1 Y238F (pWDR1 Y238F/WDR1 Y238F) a fost normalizată la cea pentru WDR1 WT (pWDR1WT/WDR1WT).

b) VSV-G-WDR1 WT și c-Src Y527F Y238F au fost co-exprimate tranzient în celule HEK293T și 24 h post-transfecție, celulele au fost tratate cu DMSO, benzobromaronă (notată aici B), PP2 sau ambele - B și PP2 - pentru 20 h. Benzile au fost cuantificate folosind programul ImageJ⁸¹. Graficul indică intensitățile relative ale VSV-G-WDR1 WT (pWDR1/WDR1) din fiecare din cele patru probe, normalizate la intensitatea relativă obținută în proba tratată cu DMSO. Valorile reprezintă media ± SD a trei experimente independente.

Figurile sunt adaptate după ⁷⁹.

Pentru a verifica ipoteza că WDR1 WT este substrat al EYA3, am verificat mai departe dacă WDR1 WT și EYA3 interacționează una cu alta. În Fig. III-5a, WDR1 WT este captat de EYA3 Y508F (inactiv ca PTPază și mutant cu capacitate de prindere a substratului) numai în prezența kinazei Src (când WDR1 WT este fosforilat), indicând faptul că tirozin-fosforilarea este o condiție esențială pentru ca interacția să aibă loc. Nici EYA3 WT și nici mutantul inactiv EYA3 D309N nu au putut capta WDR1 WT (Fig. III-5a). Proteina a interacționat și a putut fi imunoprecipitată cu aceeași afinitate, de toți mutații EYA3 care au capacitate de prindere a substratului - D311N, Y508F și Y532F (Fig. III-5b).

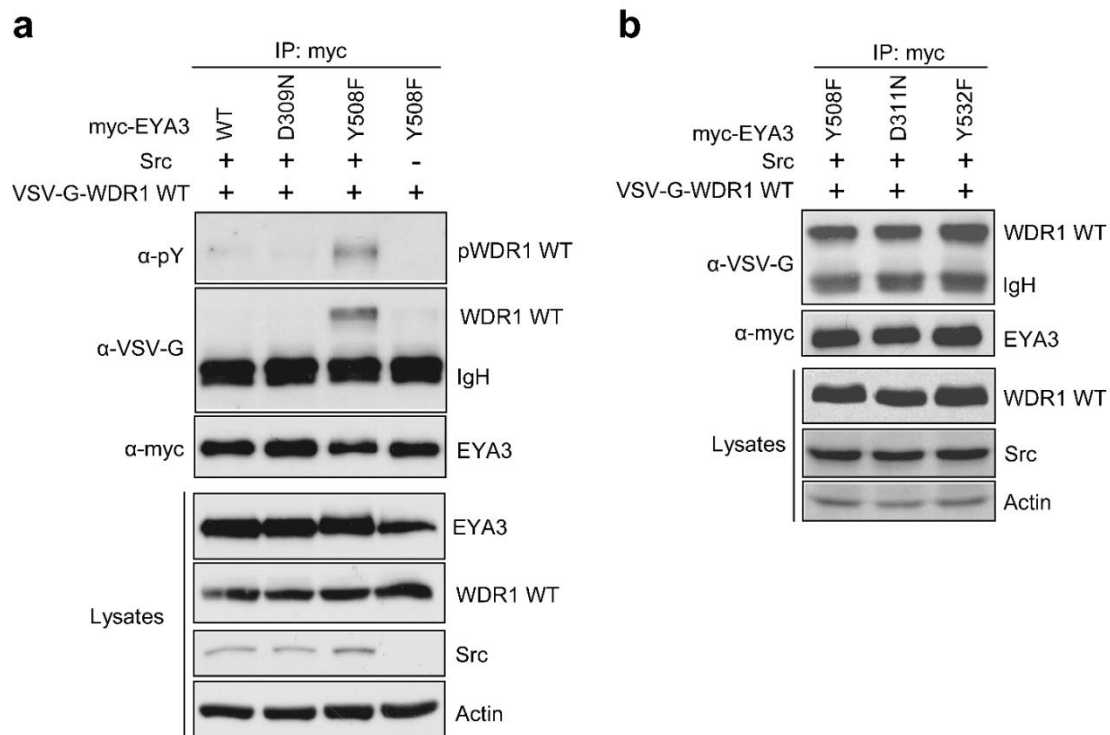


Figura III-5. WDR1 WT fosforilat de Src este imunoprecipitat de mutații EYA3 ce au capacitate de prindere a substratului.

a) VSV-G-WDR1 WT a fost co-exprimit în celule HEK293T cu diferite proteine c-myc-EYA3 (EYA3 WT, D309N și Y508F) cu și fără c-Src Y527F. **b)** Construcții care codifică pentru VSV-G-WDR1 WT, c-Src Y527F și diferite proteine c-myc-EYA3 (EYA3 Y508F, D311N și Y532F) au fost transfectați în celule HEK293T. Figurile sunt din ⁷⁹.

Având în vedere implicațiile EYA3 în procese tumorigene, în special în celulele cancerului mamar, am investigat dacă interacția EYA3-WDR1 WT poate avea loc și în astfel de celule, în particular în celule MCF-7. Rezultatele Western blot arată că EYA3 Y508F, însă nu EYA3 WT, poate capta pY-WDR1 WT. Un alt tip de verificare efectuată în celulele MCF-7 a aratat ca tirozin-fosforilarea WDR1 endogenă a crescut considerabil în celulele în care expresia EYA3 a fost diminuată.

Deoarece proteinele EYA (EYA1-4) au domeniul catalitic foarte bine conservat, am vrut să determinăm dacă pY-WDR1 WT poate fi defosforilat de alți membrii ai familiei EYA umane. WDR1 WT și c-Src Y527F au fost co-exprimate tranzient împreună cu proteinele EYA1, EYA2 sau EYA3, în celule HEK293T. Interacția puternică dintre WDR1 și EYA3, lipsa interacției cu EYA1 și interacția slabă cu EYA2 sugerează că interacția EYA-WDR1 este paralog-specifică, favorizând EYA3.

III.3 CONCLUZII

1. EYA3 este tirozin-fosforilată de către kinazele Src, Abl și Btk.
2. EYA1, EYA2 și EYA3 sunt tirozin-fosforilate de către kinaza Src și au capacitate de autodefosforilare.
3. Kinaza Src fosforilează partea N-terminală a EYA3 precum și ED, iar reziduurile pot fi autodefosforilate.
4. Introducerea mutațiilor singulare Y→F (Y96, Y105, Y208 sau Y237) în secvența mutantului inactiv EYA3 D309N nu scade nivelul tirozin-fosforilării în cazul co-expresiei cu c-Src Y527F în celule HEK293T.
5. Introducerea a patru mutații Y→F (Y426F Y496F Y508F Y532F) în secvența EYA3 D309N nu scade nivelul tirozin-fosforilării în cazul co-expresiei cu c-Src Y527F în celule HEK293T.
6. Două reziduuri de tirozină din partea C-terminală a EYA3 (ED), ce are grad mare de conservare, influențează activitatea sa protein-tirozin-fosfatazică. Mutația lui Y508 sau a lui Y532 la fenilalanină, în EYA3 WT sau EYA3 ED WT, le abolește activitatea catalitică.
7. Y508 și Y496 ale EYA3 sunt situsuri de fosforilare pentru Src, iar Y508 este, în plus, situs de autodefosforilare.
8. Introducerea mutației Y→F corespunzătoare lui EYA3 Y508F în EYA1 (Y494F) nu abolește activitatea PTPazică, dar scade capacitatea de autodefosforilare a EYA2, scăzându-i astfel și activitatea PTPazică (Y473F). Cu toate acestea, niciuna dintre mutațiile Y→F din EYA1 (Y518F) sau EYA2 (Y497F), corespunzătoare lui EYA3 Y532F, nu le abolesc activitatea

PTPazică. Influența celor două reziduuri de tirozină asupra activității PTPazice a EYA pare să fie specifică fiecărei proteine EYA umană.

9. EYA3 Y508F și EYA3 Y532F interacționează cu, și prind EYA3 D309N într-o manieră similară mutantului EYA3 D311N, dovedind că ambii mutații Y→F pot fi folosiți drept protein-tirozin-fosfataze EYA3 ce au capacitate de prindere a substratului, în studii funcționale și în studii de identificare a substratelor.

10. Interacțiunea dintre două molecule EYA3 este condiționată de prezența ED-ului în ambele proteine și are loc numai în prezența tirozin-fosforilării induse de Src.

11. EYA1 nu interacționează cu EYA3. Interacțiunea EYA-EYA este paralog-specifică.

12. Proteina WDR1 este tirozin-fosforilată de kinaza Src și Y238 este unul dintre situsurile de fosforilare.

13. Tirozin-fosforilarea WDR1 este crescută în celule în care activitatea fosfatazică a EYA3 este inhibată (HEK293T) sau în care expresia EYA3 este inhibată cu ajutorul ARN-ului de silențiere pentru EYA3 (MCF-7).

14. EYA3 interacționează cu WDR1 WT numai în cazul tirozin-fosforilării induse de Src asupra proteinei citoscheletale.

15. Proteina WDR1 este substrat al EYA3, însă nu și al fosfatazei EYA1. Interacțiunea dintre EYA2 și WDR1 este mult mai slabă, în comparație cu EYA3.

CAPITOLUL IV ANALIZA PRIN SPECTROMETRIE DE MASĂ A TIROZIN-FOSFORILĂRII EYA3 DE CĂTRE KINAZA SRC. IMPLICAȚII LA NIVEL CELULAR.

Src este una dintre cele mai studiate protein-tirozin-kinaze, activarea ei fiind raportată în peste 50% din tumorile din ficat, pancreas, colon, sân și plămân⁸⁷. Am demonstrat că Src fosforilează EYA1, EYA2 și EYA3 umane și că aceste proteine sunt capabile de autodefosforilare. Aceste date indică faptul că fosforilarea EYA de către Src și autodefosforilarea EYA pot fi implicate în reglarea unor procese fiziologice sau în generarea și/sau menținerea unor condiții patologice. Prin intermediul autodefosforilării, proteinele EYA ar putea fi capabile să își contoleze și regleze rolurile în procesele celulare, dar există puțina informație (prezentată în capitolul anterior) despre reziduurile specifice care sunt fosforilate de Src și niciuna legată de măsura în care acestea sunt modificate sau de dinamica echilibrului fosforilare/ defosforilare.

Aici am combinat două tehnici de spectrometrie de masă - nativă și de tip *bottom-up* - pentru a caracteriza tirozin-fosforilarea EYA3 de către Src kinaza și autodefosforilarea EYA3. De asemenea, am evaluat contribuția la fosforilarea totală a EYA3 pentru unele dintre reziduurile

de fosfotirozină identificate. Implicațiile în proliferarea celulelor HEK293T, MCF-7 și MDA-MB-231 și invazivitatea celulelor MCF-7 au fost investigate pentru trei dintre reziduurile de fosfotirozină detectate. S-a făcut și o comparație între tiparul de fosforilare a trei proteine EYA3, în HEK293T și MCF-7, prin spectrometrie de masă de tip *bottom-up*. În final, s-a folosit o metodă bioinformatică pentru a stabili gradul de conservare pentru situsurile de tirozină din EYA3 identificate aici ca fiind fosforilate.

IV.1 MATERIALE ȘI METODE

Materialele necesare au constat în construcți, primeri, anticorpi, enzime, kit-uri, substanțe (având gradul de puritate biologie moleculară sau cromatografie de lichide/spectrometrie de masă, pentru: culturi de celule de mamifer și bacteriene, pentru expresie și purificare de proteine, analize de peptide prin cromatografie de lichide cuplată cu spectrometrie de masă - nLC-MS/MS - și de proteine prin spectrometrie de masă nativă).

Următoarele proceduri experimentale și analize au fost efectuate: expresie și purificare de proteine din culturi bacteriene, culturi de celule de mamifer, transfecții, recoltări și lize, imunoprecipitări, reacții kinazice *in vitro*, teste cinetice, teste *in vitro* de determinare a activității protein-tirozin-fosfatazice, spectrometrie de masă nativă (ESI-MS), respectiv de tip *bottom-up* cuplată cu cromatografie de lichide, îmbogățire de fosfopeptide utilizând TiO₂, teste MTS (de viabilitate celulară), teste de analiză a distribuției ciclului celular și de proliferare (ce implică marcarea celulelor cu CFSE) - ambele analizate prin citometrie în flux - teste de invazivitate, alinieri de secvențe efectuate utilizând programe bioinformatic.

IV.2 REZULTATE ȘI DISCUȚII

IV.2.1 Analiza prin spectrometrie de masă nativă a EYA3 și a fosforilării *in vitro* a acesteia de către kinaza Src

Analiza EYA3 prin spectrometrie de masă nativă

Interacția dintre două molecule EYA3 este mediată de partea C-terminală (ED) a fiecărei proteine și are loc atunci când este indusă tirozin-fosforilarea lor. În cazul fosforilării EYA3 de către Src, am folosit prima oară tehnica spectrometriei de masă nativă pentru a evalua dinamica celor două procese opuse (tirozin-fosforilarea și autodefosforilarea) la nivelul proteinei intacte. În acest scop, inițial am caracterizat comportamentul în spectrometria de masă nativă a celor două proteine EYA3 care urmau să fie folosite în experimentele de fosforilare - 6xHis-EYA3 WT și 6xHis-EYA3 D311N (Fig. IV-1).

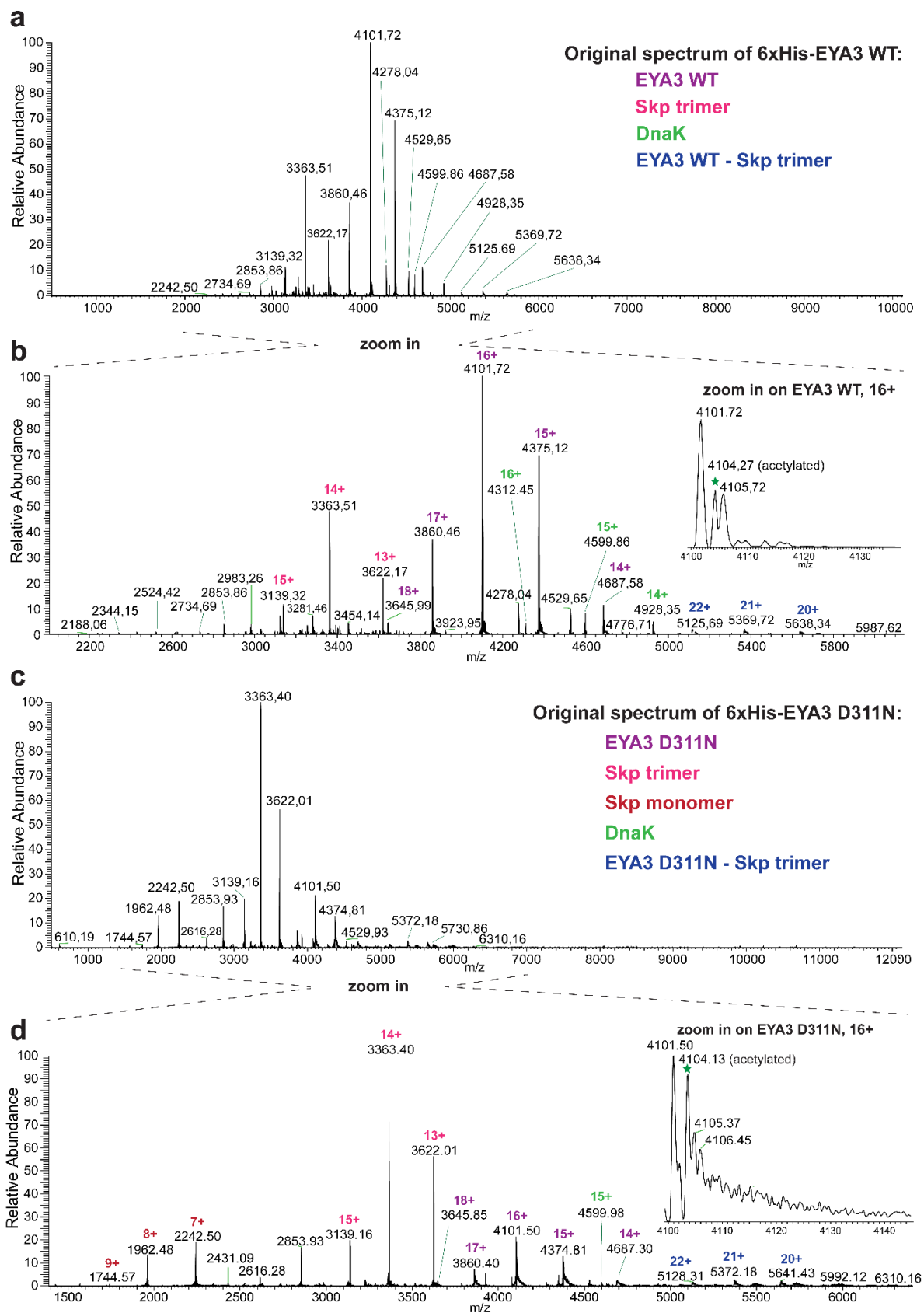


Figura IV-1. Analiza 6xHis-EYA3 WT și 6xHis-EYA3 D311N prin spectrometrie de masă nativă.

Spectrul original al 6xHis-EYA3 WT (a) și 6xHis-EYA3 D311N (c) la pH 6.8, cu imaginile focalizate pe o anumită zonă, în b) respectiv d), care sunt spectre adnotate.

Masele moleculare ale proteinelor EYA3 pot fi calculate cu precizie (folosindu-ne de valorile m/z ale tuturor sarcinilor identificate pentru acea proteină, evidențiate aici în violet) și valorile obținute corespund secvențelor de proteine cărora le lipsește Met start: 65611.22 ± 0.9 Da pentru 6xHis-EYA3 WT și 65608.09 ± 1.1 Da pentru 6xHis-EYA3 D311N. Masele moleculare teoretice ale proteinelor purificate sunt: 65742.1 Da (6xHis-EYA3 WT) și 65741.1 Da (6xHis-EYA3 D311N).

În spectrele adnotate ale 6xHis-EYA3 WT (**b**) și 6xHis-EYA3 D311N (**d**):

- masa moleculară (MW) calculată 47075.05 ± 0.2 Da (sarcini evidențiate în roz), reprezentând homo-trimerul proteinei șaperon (*chaperone*) Skp, al cărui monomer este evidențiat mai bine în **d**) și care a avut MW calculată de 15691.49 ± 0.87 Da (îi lipsesc primii 20 de aminoacizi).
- MW calculată 68983 ± 0.2 Da (sarcini evidențiate în verde), reprezentând proteina șaperon DnaK, căreia îi lipsește Met start.
- anvelopa de sarcini pentru complexul dintre EYA3 și trimerul de Skp (sarcini evidențiate în albastru), pentru care MW s-a calculat în Fig. IV-2.

În imaginile din **b**) și **d**), ce conțin un interval m/z îngust, corespunzător sarcinii 16+ a fiecărei proteine EYA3, două vârfuri (*peaks*) majore pot fi observate, iar acestea corespund la două proteoforme ale EYA3:

- EYA3 cu prima Met clivată: m/z de 4101.72 în **b**) și 4101.50 în **d**)
- moleculelor acetilate ale EYA3 ce are prima Met clivată (stea verde deasupra vârfului corespunzător): m/z de 4104.27 în **b**) și 4104.13 în **d**). MW calculată pentru proteina 6xHis-EYA3 WT acetilată este 65652.45 ± 0.3 Da și 65650.82 ± 2 Da pentru proteina 6xHis-EYA3 D311N acetilată.

Ambele proteine au fost exprimate în sistem procariot, apoi purificate la grad înalt de puritate. Masele lor moleculare au fost calculate bazându-ne pe valorile m/z ale vârfurilor contigue din anvelopa sarcinilor (Fig. IV-1). Masele moleculare corespund secvențelor proteinelor 6xHis-EYA3 cărora le lipsește Met start. Datorită rezoluției mari a spectrometrului de masă, spectrele din nativ ale ambelor proteine dezvăluie o însușire interesantă: sunt două proteoforme pentru EYA3 (vezi imaginile focusate din Fig. IV-1b și 1d, pentru $z = 16+$). Pentru a elucida originea celei de-a doua forme moleculare (m/z de 4104.27 pentru WT și 4104.13 pentru D311N), am efectuat analize suplimentare de spectrometrie de masă de tip *bottom-up*. Rezultatele arată că reziduul de Ser ce urmează după Met start (îndepărtată), a fost acetilat în timpul expresiei în sistem procariot.

O analiză atentă a spectrelor ESI-MS (Fig. IV-1) a dezvăluit alte două tipare de proteine ionizate, ceea ce indică faptul că în probele de EYA3 mai sunt prezente încă două proteine. Pentru a identifica aceste două proteine, am supus probele de proteină purificată unui protocol de digestie din gel, urmat de o analiză nLC-MS/MS. Două proteine șaperon au fost identificate: Skp și DnaK (Fig. IV-1). Acoperirea de secvență pentru Skp indică faptul că șaperonului îi lipsesc primii 20 de aminoacizi din partea N-terminală. Din calculele precise efectuate din datele de spectrometrie de masă nativă, am determinat că Skp se prezintă ca homotrimer cu exact 20 de aminoacizi lipsă, din fiecare monomer. Atunci când se aplică o energie mai mare probei, trimerul de Skp disociază în monomer și dimer.

Optimizări ulterioare ale instrumentului Orbitrap™ EMR, astfel încât să se poată achiziționa spectre de la valori m/z mai mari, ne-au condus la identificarea unei alte distribuții de sarcină. Masa moleculară calculată denotă prezența complexului dintre EYA3 și trimerul de Skp,

notat mai departe ca EYA3-(Skp)₃ (Fig. IV-1b și 1d). Atunci când se aplică o energie mai mare, complexul disociază în monomer de Skp și complexul EYA3 cu dimerul de Skp.

Din analiza ESI-MS a ambelor proteine EYA3 se poate observa că EYA3 este atât liberă în soluție (sub forma de monomer) cât și în complex cu trimerul de Skp. Întrebarea care apare este dacă Skp se leagă preferențial de unul dintre domeniile EYA3, împiedicând astfel fosforilarea unor reziduuri. Pentru a elucida acest aspect, pe lângă EYA3 WT și EYA3 D311N, prezența Skp a fost căutată și în alte proteine purificate EYA3: EYA3 D309N, EYA3 ΔED WT (N-terminalul EYA3) și EYA3 ED WT. Prezența Skp a fost confirmată prin analiza nLC-MS/MS, după supunerea benzii respective de proteină (dintr-un gel tip SDS-PAGE) unui protocol de digestie din gel. Rezultatele de la toate cele cinci proteine dezvăluie faptul că Skp se asociază atât cu proteina întreagă cât și cu domeniul N-terminal al EYA3. Astfel, prezența domeniului N-terminal pare să fie esențială în formarea complexului.

Am încercat să exprim EYA3 WT respectiv D311N într-o tulpină bacteriană în care gena pentru Skp a fost scoasă (MC 4100 ΔSkp). Analiza Western blot folosind anticorp anti-EYA3 a indicat că niciuna dintre proteinele EYA3 nu s-a exprimat, sugerând că, în absența șaperonului Skp, EYA3 este instabilă și nu poate fi exprimată ca proteină solubilă. Folosind programul PrDos⁸⁸, am efectuat o predicție a gradului de dezordine pentru EYA3 și rezultatele au indicat faptul că regiunea N-terminală este foarte dezordonată (Fig. IV-2). Această descoperire, și faptul că EYA3 nu a putut fi exprimată în celule MC 4100 ΔSkp, sugerează că Skp are rol în stabilizarea EYA3, atașându-se de structura dezordonată a părții N-terminale. Probabil că în absența Skp regiunile dezordonate ale EYA3 sunt expuse proteazelor, conducând astfel la degradarea EYA3 prin proteoliză.

Nu am putut identifica niciun complex între EYA3 și DnaK.

1	MEEEQDLPEQ	FVKKAKMQES	GEQTISQVSN	PDVSDQKPET	SSLASNLFMS	50
51	EEIMTCTDYI	FRSSNDYTSQ	MYSAKPYAHI	LSVPVSETAY	PGQTQYQTLQ	100
101	QTQPYAVYEQ	ATQTYGLPPF	GALWFGMKKE	SGLIQTSPSPS	QHSVLTCTTG	150
151	LTTSQPSPAH	YSYPIQASST	NASLISTSST	IANIPAAAVA	SISNQDYPTY	200
201	TILGQNQYQA	CYPSSSFGVT	GQTNSDAEST	TLAATTYQSE	KPSVMAEAPA	250
251	AQRLSSGDPS	TSFSLSQTFP	SKDTRDQSRK	NMTSKNRGKR	KADATSSQDS	300
301	ELERVFLWDL	DETIIFHSL	LTGSYAQKYG	KDPTVVIGSG	LTMEEMIFEV	350
351	ADTHLFFNDL	EECDQVHVED	VASDDNGQDL	SNYSFSTDGF	SGSGGSGSHG	400
401	SSVGVQGGVD	WMRKLAFRYR	KVREIYDKHK	SNVGLLSPQ	RKEALQRLRA	450
451	EIEVLTDSWL	GTALKSLLLI	QSRKNCVNL	ITTTQLVPAL	AKVLLYGLGE	500
501	IFPIENIYSA	TKIGKESCFE	RIVSRFGKKV	TYVVIQDGRD	EEIAAKQHNM	550
551	PFWRITNHGD	LVSLHQALEL	DFL			600

Figura IV-2. Reprezentare a profilului de dezordine al EYA3 WT⁸⁰:

Predicția gradului de dezordine al EYA3 WT, folosind PrDos⁸⁸, la 5% rată de fals pozitive, mapat pe secvența proteinei (roșu/ negru - deasupra/ dedesubtul pragului de dezordine).

Analiza prin spectrometrie de masă nativă a tirozin-fosforilării *in vitro* a EYA3 de către Src

Având datele de spectrometrie de masă nativă pentru cele două proteine purificate, am detectat câte situsuri de tirozină din EYA3 sunt fosforilate de Src. În acest scop, fiecare din proteinele EYA3 purificate au fost fosforilate *in vitro* și apoi probele au fost analizate prin spectrometrie de masă nativă. Pe scurt, 6xHis-EYA3 WT și 6xHis-EYA3 D311N au fost fiecare incubate cu Src (GST-v-Src) și ATP, pentru 5 min respectiv 2 h. În cazul incubării cu Src și ATP pentru 2 h, doar molecule cu un singur reziduu fosforilat au fost detectate (Fig. IV-3a comparativ cu IV-3c). Atunci când a fost fosforilată EYA3 D311N, forma inactivă ca și PTPază, după doar 5 min au fost detectate molecule cu până la trei reziduuri fosforilate. În orice caz, după 2 h, s-au putut detecta molecule ale EYA3 D311N cu până la 12 reziduuri fosforilate (Fig. IV-3b comparativ cu IV-3d). Diferența dintre comportamentul EYA3 WT și cel al EYA3 D311N, atunci când sunt fosforilate, evidențiază importanța activității ED în controlarea fosforilării EYA3.

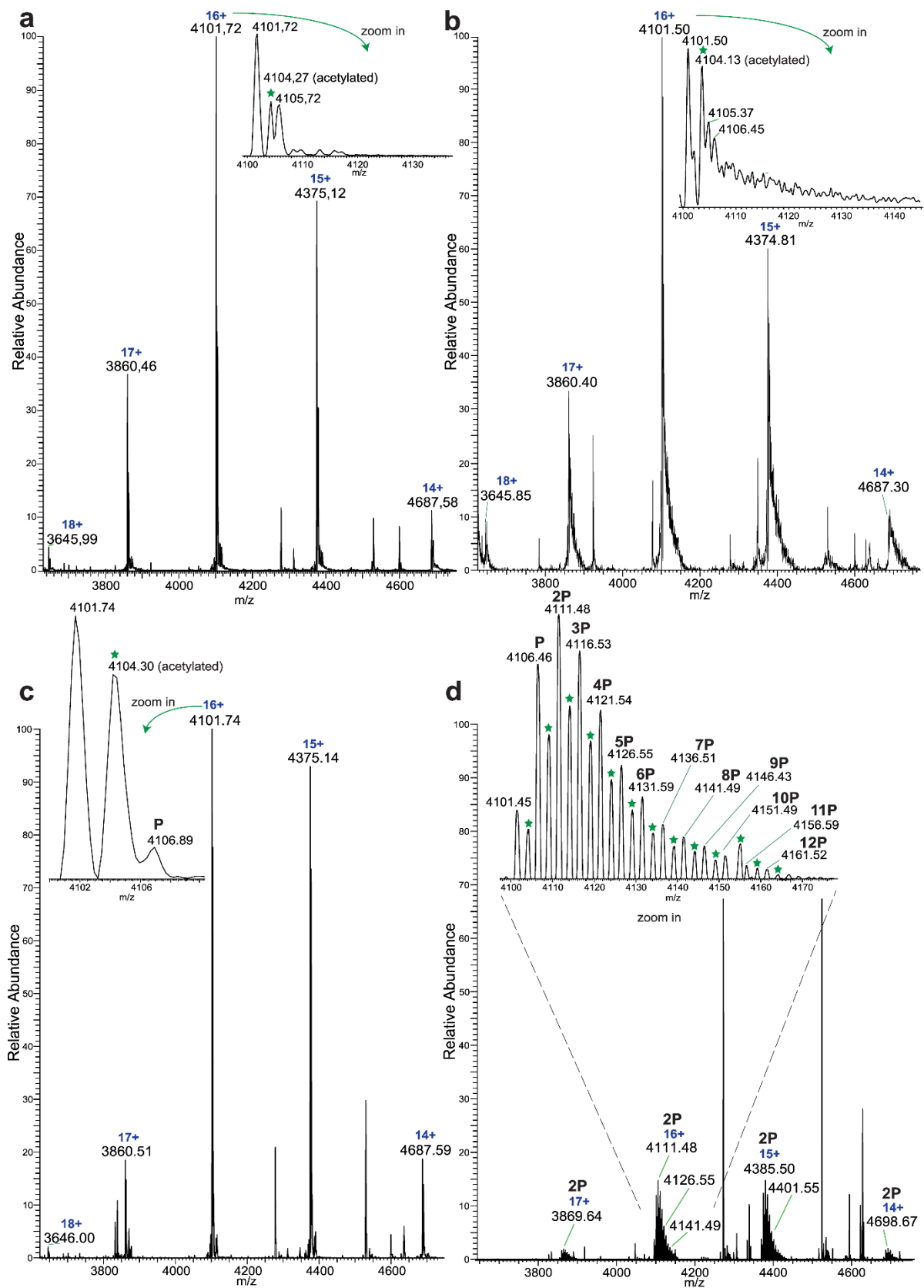


Figura IV-3. Analiza prin spectrometrie de masă nativă a proteinelor EYA3 WT și D311N înainte și după fosforilarea de către Src⁸⁰.

Spectrul de masă nativ al 6xHis-EYA3 WT (a) și 6xHis-EYA3 D311N (b) purificate, cu imaginile focalizate pe sarcina 16+. Aceste spectre sunt comparate cu cele obținute în reacțiile de fosforilare *in vitro* (v-Src, ATP) ale 6xHis-EYA3 WT (c) și 6xHis-EYA3 D311N (d).

c) Vârfuri adiacente ale anvelopei de sarcini ale 6xHis-EYA3 WT după 2 h de tirozin-fosforilare. Focalizare pe sarcina 16+: au fost detectate molecule nefosforilate ($m/z = 4101.74$, respectiv 4104.30 pentru cele acetilate) și molecule cu un singur reziduu fosforilat (P, $m/z = 4106.89$)

d) Spectrul de masă nativ al 6xHis-EYA3 D311N, după 2 h de tirozin-fosforilare. Focalizare pe sarcina 16+: au fost detectate molecule cu până la 12 reziduuri fosforilate (P până la 12P). Moleculele acetilate au același număr maxim de reziduuri fosforilate.

Dinamica fosforilării EYA3 de către Src și a autodefosforilării acesteia, analizate prin spectrometrie de masă nativă

Am folosit avantajele oferite de spectrometria de masă nativă pentru a investiga dinamica globală a tirozin-fosforilării și autodefosforilării EYA3. Experimentul a constatat într-un set de reacții în care mutantul inactiv și tirozin-fosforilat al EYA3 a fost defosforilat direct de către EYA3 WT (Fig. IV-4a). Am cuantificat datele brute de spectrometrie de masă nativă, corespunzătoare moleculelor de 6xHis-EYA3 D311N ce purtau sarcina 16+, din fiecare reacție (Fig. IV-4b). Am observat o creștere în fosforilare pentru EYA3 D311N de la 5 min la 4 h de incubare cu Src. În proba incubată pentru două ore cu EYA3 WT, nu s-a detectat niciun semnal pentru moleculele cu cel mai mare număr de grupări fosfat (7 până la 9) și semnalul a scăzut pentru cele care purtau între șase și două grupări fosfat. Formele monofosforilate au fost cele mai abundente, dar foarte important, intensitatea moleculelor nefosforilate a crescut semnificativ, ele devenind a doua cea mai abundentă formă a EYA3. Cuantificarea proteoformelor acetilate ale EYA3 din cele patru probe a dezvăluit un comportament similar. Aceasta demonstrează că acetilarea nu împiedică fosforilarea EYA3. Comparând rezultatele probei “2 h/Src + 2 h/EYA3 WT” cu cele ale probei “4 h/Src”, putem concluziona că EYA3 WT a defosforilat direct EYA3 inactivă, tirozin-fosforilată.

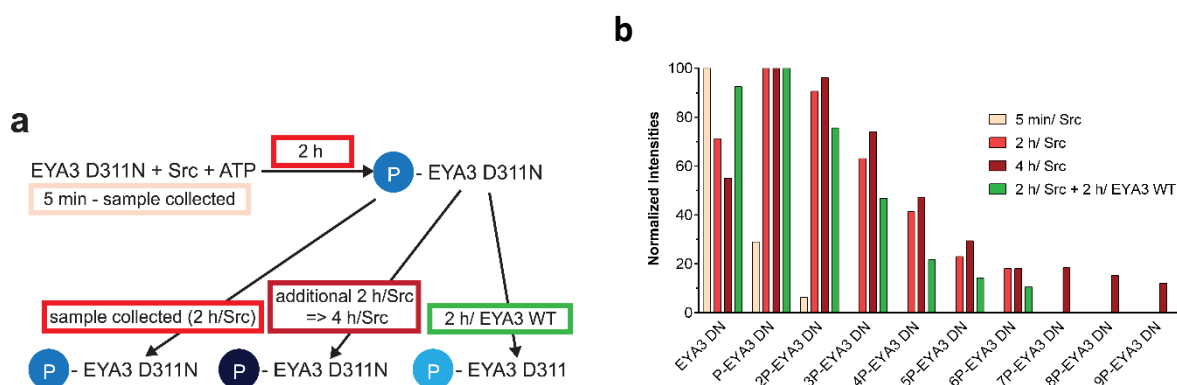


Figura IV-4. Dinamica tirozin-fosforilării EYA3 de către kinaza Src și a autodefosforilării acesteia, analizate prin spectrometrie de masă nativă⁸⁰.

a) Schema experimentului: 6xHis-EYA3 D311N a fost fosforilat *in vitro* de către Src pentru 2 h și o probă a fost colectată după 5 min de la startul reacției. După cele 2 h, o altă probă a fost colectată, iar restul reacției a fost împărțit în două: o jumătate a fost incubată pentru încă două ore și în cealaltă am adăugat EYA3 WT și am incubat-o tot pentru 2 h. Toate reacțiile au fost efectuate la 30°C. **b)** Cuantificarea datelor brute corespunzătoare moleculelor de 6xHis-EYA3 D311N care au sarcina 16+.

În cazul complexului EYA3 D311N-(Skp)₃, s-a observat un comportament similar cu proteina EYA3 D311N monomer. Subliniem că, deși Src a fost activă în timpul celor 2 h de incubare cu EYA3 WT menționate, așadar ambele reacții opuse au avut loc simultan, defosforilarea EYA3 D311N a fost evidentă.

IV.2.2 Detecția reziduurilor de tirozină ale EYA3, fosforilate de către Src, și identificarea situsurilor de autodefosforilare ale EYA3

Fosforilarea EYA3 de către Src și autodefosforilarea EYA3 sunt două procese opuse, care, cel puțin *in vitro*, au loc simultan. Prin urmare, analiza lor detaliată necesită separarea acestora. Inițial, am investigat tirozin-fosforilarea cu Src utilizând forma catalitic-inactivă, EYA3 D311N. Apoi, pentru a studia autodefosforilarea, am folosit forma WT a EYA3. Pentru că este activă ca PTPază, când este incubată cu Src și ATP putem observa care reziduuri au fost defosforilate și variația în timp a nivelului de fosforilare pentru reziduurile care încă sunt fosforilate. Pentru scopul nostru, am efectuat un set de reacții *in vitro*, iar probele au fost analizate prin spectrometrie de masă tip *bottom-up*, folosind HCD ca metodă de fragmentare.

Fosforilarea la diverse momente de timp a EYA3 D311N a dezvăluit cinci reziduuri de tirozină fosforilate după 5 min de reacție (Y72, Y77, Y96, Y105, Y237) și unsprezece reziduuri după 6 h (Y67, Y72, Y77, Y90, Y96, Y105, Y108, Y208, Y237, Y426, Y532) (Fig. IV-5a). Toate reziduurile de tirozină detectate au fost fosforilate în 30 min de incubare cu Src, dar evoluția lor în timp este diferită.

Fosforilarea la diverse momente de timp a EYA3, de către Src (Fig. IV-5b), a dezvăluit patru reziduuri de tirozină fosforilate după 5 min (Y77, Y96, Y105 și Y237). Aceleași reziduuri au fost detectate după 6 h. La momentul de timp 30 min și chiar și 2 h, Y72 a fost de asemenea identificat drept fosforilat, dar acest reziduu a fost defosforilat în cele din urmă. Cele șapte reziduuri - Y67, Y72, Y90, Y108, Y208, Y426, Y532 - care nu au fost detectate aici, dar au fost identificate în cazul fosforilării EYA3 D311N de către Src, pot fi considerate principalele situsuri de autodefosforilare.

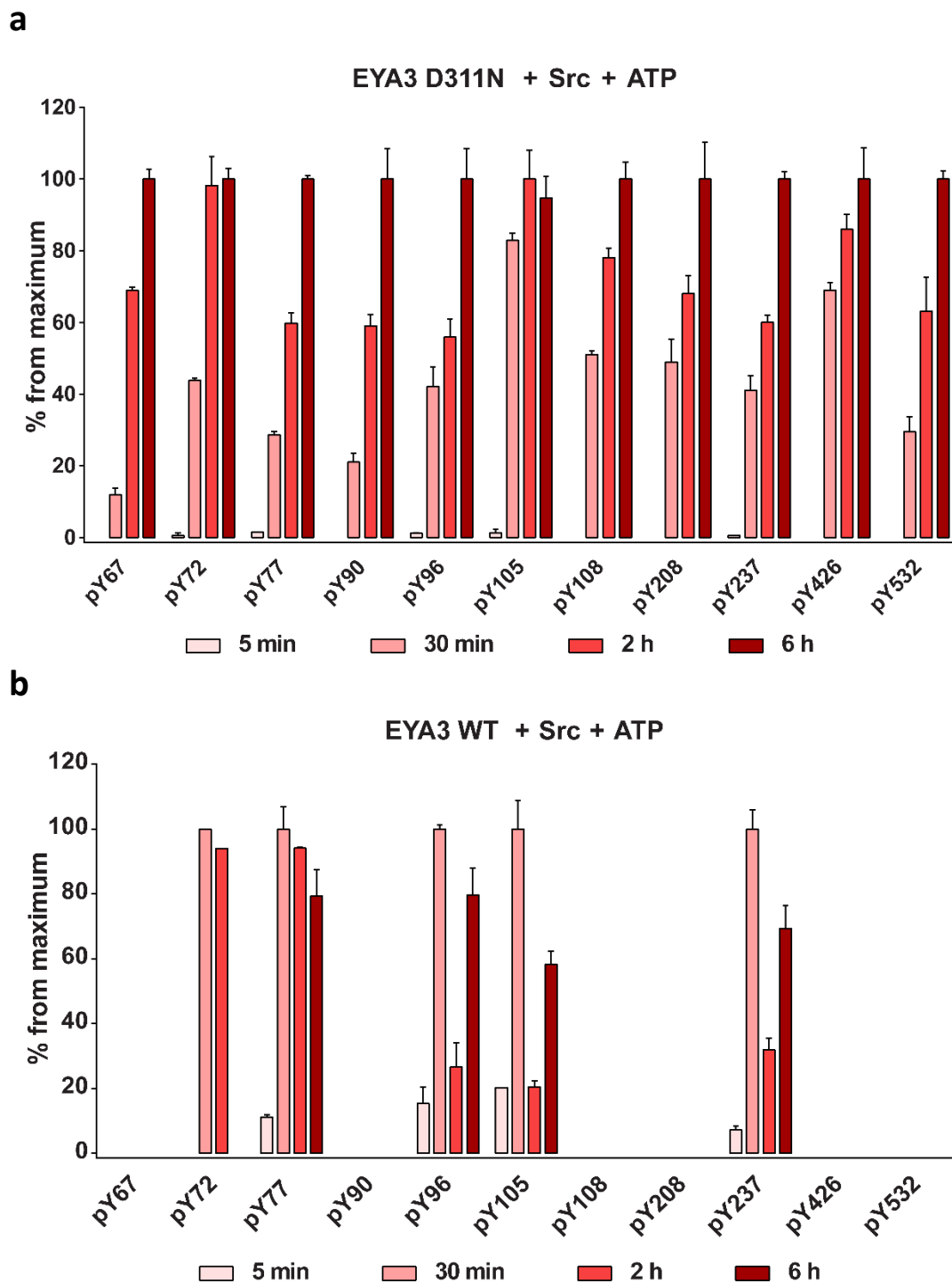


Figura IV-5. Reziduurile de tirozină Src-fosforilate ale EYA3 și reziduurile ce sunt autodefosforilate⁸⁰.

a) și b) Rezultate obținute după analiza nLC-MS/MS urmată de interpretarea datelor, cuantificare relativă și normalizare: reprezentarea grafică a evoluției fosforilării pentru fiecare reziduu de tirozină care a fost identificat ca fiind fosforilat în reacțiile *in vitro* EYA3 D311N + Src + ATP (**a**) și EYA3 WT + Src + ATP (**b**).

Pentru majoritatea acestor reziduuri s-a efectuat o caracterizare în ceea ce privește cinetica dependentă de timp și rezistența la autodefosforilare. Aceste rezultate ne permit să presupunem

că, în comparație cu forma nefosforilată, EYA3 WT fosforilat de Src are activitate PTPazică, și astfel capacitate de autodefosforilare, diferită. Pentru a verifica această ipoteză, inițial am efectuat o reacție *in vitro* de fosforilare a 6xHis-EYA3 WT de către v-Src, apoi am determinat activitatea enzimatică a 6xHis-EYA3 WT folosind pNPP drept substrat. Rezultatele obținute dezvăluie faptul că forma Src-fosforilată a EYA3 are activitate PTPazică ușor crescută.

Astfel, tendința de fosforilare a reziduurilor Y72, Y77, Y96, Y105 și Y237 din EYA3 WT fosforilată de kinaza v-Src (Fig. IV-5b) poate fi explicată luând în considerare această nouă informație. În primele 30 min, Src fosforilează EYA3 WT, generând multe molecule de EYA3 WT tirozin-fosforilată, cu activitate PTPazică crescută. Aceste molecule defosforilează intens fosfo-Y96, Y105 și Y237 și reușesc să defosforileze, într-o manieră mai mică, însă, și fosfo-Y72 și Y77. Numărul de molecule EYA3 WT nefosforilate crește și starea inițială este restaurată. În timp, procesul se dezvoltă spre o stare de echilibru (*steady state*).

Cele patru reziduuri de tirozină care au rămas fosforilate chiar și atunci când EYA3 WT a fost incubată cu Src pentru 6 h, pot fi considerate reziduuri cu rezistență crescută la autodefosforilare.

IV.2.3 Dinamica tirozin-fosforilării și defosforilării *in vitro* a EYA3 D311N

Următorul nostru obiectiv a fost să determinăm ordinea în care reziduurile fosforilate ale EYA3 D311N sunt defosforilate de forma activă a PTPazei. Studiul în profunzime al variației în timp a fosforilării/ defosforilării EYA3 poate furniza informații importante pentru determinarea relevanței *in vitro* a acestei modificări post-tranșlaționale în ceea ce privește EYA3 și partenerii ei de interacție.

Diferența dintre acest experiment și cele prezentate anterior în acest capitol, a fost că în acest caz, Src a fost inactivat, pentru ca procesul de fosforilare să nu interfere cu defosforilarea EYA3 D311N. Setul de reacții *in vitro* efectuate pentru a ne atinge scopul a constat în tirozin-fosforilarea EYA3 D311N de către Src, inactivarea kinazei (cu PP2) și în final, defosforilarea mutantului inactiv de către o formă activă catalitică a EYA3 (ED EYA3 WT). Probele au fost verificate prin Western blot cu anticorpi anti-pY și anti-His și benzile de 6xHis-EYA3 D311N au fost digerate din gel folosind chimotripsina. Peptidele extrase au fost analizate prin nLC-MS/MS, folosind metodele de fragmentare CID și ETD. Determinarea variației fosforilării pentru fiecare din reziduurile de fosfotirozină a fost efectuată prin cuantificare relativă (Fig. IV-6).

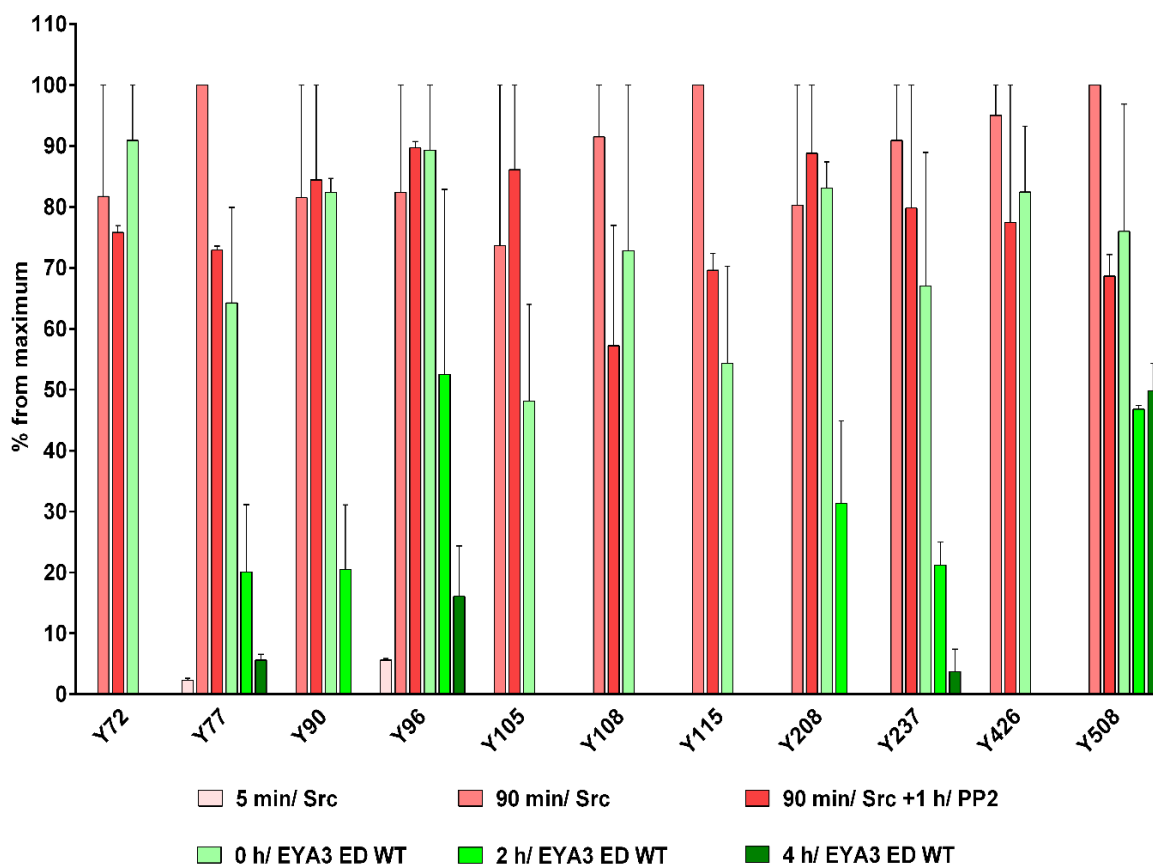


Figure IV-6. Dinamica tirozin-fosforilării *in vitro* a EYA3 D311N (de către v-Src) și a defosforilării (de către ED EYA3 WT), analizată prin nLC-MS/MS⁸⁰.

Cuantificarea relativă situs-specifică a variațiilor fosforilării pentru reziduurile de fosfotirozină ale EYA3 D311N detectate. Graficul arată media \pm SEM a două experimente independente, fiecare analizat în două replicare tehnice ($n = 4$).

Au fost identificate unsprezece reziduuri de fosfotirozină (Fig. IV-6). Numai șase reziduuri - Y77, Y90, Y96, Y208, Y237 și Y508 - au rămas fosforilate după 2 h de incubare cu domeniul catalitic al EYA3 și după 4 h, doar patru dintre ele au ramas fosforilate (Y77, Y96, Y237 și Y508). Fosfo-Y77, -Y96 și -Y237 prezintă cinetici de defosforilare similare între 0 h și 4 h de incubare cu EYA3 ED WT, dar fosfo-Y508 este la același nivel de fosforilare după 2 h și 4 h de activitate a ED WT. Aceasta face ca fosfo-Y508 sa fie un alt reziduu cu rezistență crescută la autodefosforilare și singurul din regiunea C-terminală a EYA3 care a dovedit rezistență la acest proces.

Bazându-ne pe toate datele obținute din analizele de spectrometrie de masă tip *bottom-up*, putem concluziona că *in vitro*, kinaza Src poate fosforila treisprezece reziduuri de tirozină din EYA3: Y67, Y72, Y77, Y90, Y96, Y105, Y108, Y115, Y208, Y237, Y426, Y508, Y532. Faptul că Y77, Y96 și Y237 nu au fost complet defosforilate după 4 (Fig. IV-6) sau chiar 6 h (Fig. IV-5b) de incubare cu o forma catalitic-activă a EYA3 (WT întreaga sau ED WT) susține ideea că aceste reziduuri au rezistență crescută la autodefosforilare. Deși Y508 nu a fost detectat în reacția *in vitro* efectuată la diverse momente de timp, acest reziduu poate fi de asemenea considerat situs cu

rezistență crescută la autodefosforilare, deoarece a fost detectat ca fiind fosforilat chiar și după 4 h de incubare a fosfo-EYA3 D311N cu ED WT.

IV.2.4 Contribuția situsurilor de tirozină identificate drept fosforilate de Src, asupra fosforilării totale a EYA3

Treisprezece situsuri de tirozină ale EYA3 au fost detectate ca fiind fosforilate de către Src în reacțiile kinazice *in vitro*. Validarea acestor situsuri de tirozină este necesară pentru a înțelege mai bine impactul tirozin-fosforilării EYA3 induse de Src în celulele de mamifer. Pentru a aborda această problemă, am introdus mutații succesive Y→F pentru reziduurile de fosfotirozină identificate anterior în secvența EYA3 D309N, prin mutageneză situs-direcționată.

Am efectuat co-transfecții tranziente cu vectori ce codifică pentru EYA3 WT, EYA3 D309N (DN) sau mutații lor Y→F (notați de la T0 la T11) și c-Src (număr de identificare Uniprot: P00523) cu mutația Y527F (crește considerabil activitatea protein-tirozin-kinază^{89,90}), în celule HEK293T. După IP pentru EYA3, experimentele Western blot au fost cuantificate pentru a detecta variația nivelului de fosforilare al mutațiilor. Primii mutații, T0 - T3, conțin mutații Y→F la reziduurile ce au fost detectate cu rezistența crescută la autodefosforilare (Y77, Y96, Y105 și Y237, vezi Fig. IV-5, 6).

O scădere treptată a nivelului de fosforilare poate fi observată între DN și primii șase mutații consecutivi Y→F (Fig. IV-7a). Aceste rezultate arată că fosforilarea reziduurilor Y96, Y77, Y105, Y90 și Y115 are o contribuție determinabilă la fosforilarea totală a EYA3. Cuantificarea și normalizarea datelor de la toți ceilalți mutații (T6 - T11) care au fost co-exprimați cu Src, a dezvăluit variații nereproductibile ale nivelului de fosforilare și nu am putut determina nicio tendință. Este posibil ca numărul relativ mare de mutații să inducă modificări conformaționale, ce pot conduce în final la o tirozin-fosforilare aberantă.

Pentru a obține o evaluare mai precisă a contribuției fiecărui reziduu fosforilat la fosforilarea totală a EYA3, am obținut și alți mutații, derivați din DN, T0 și T1, și am efectuat experimente similare pentru a determina fosforilarea lor relativă (Fig. IV-7b, c). Rezultatele de la cuantificare au arătat că Y77 și Y96 au avut cea mai mare contribuție la fosforilare. Y237 nu pare să aibă vreo contribuție la fosforilare. Când Y90 și Y105 au fost introduse în mutantul T0, nu s-a detectat vreo scădere semnificativă în intensitate. Contribuția lui Y90 și Y105 a putut fi observată numai când acele reziduuri precum Y77 și Y96 (cu o contribuție majoră la fosforilare) au fost mutate la fenilalanină (Fig. IV-7a).

Dintre aceste experimente de mutageneză cuplate cu IP și Western blot, Y77 și Y96 se remarcă drept reziduurile cu cea mai mare contribuție la fosforilarea EYA3. Acest rezultat va fi

util în cercetări ulterioare ce implică proteine EYA3, de exemplu în determinarea căilor de transducție a semnalului.

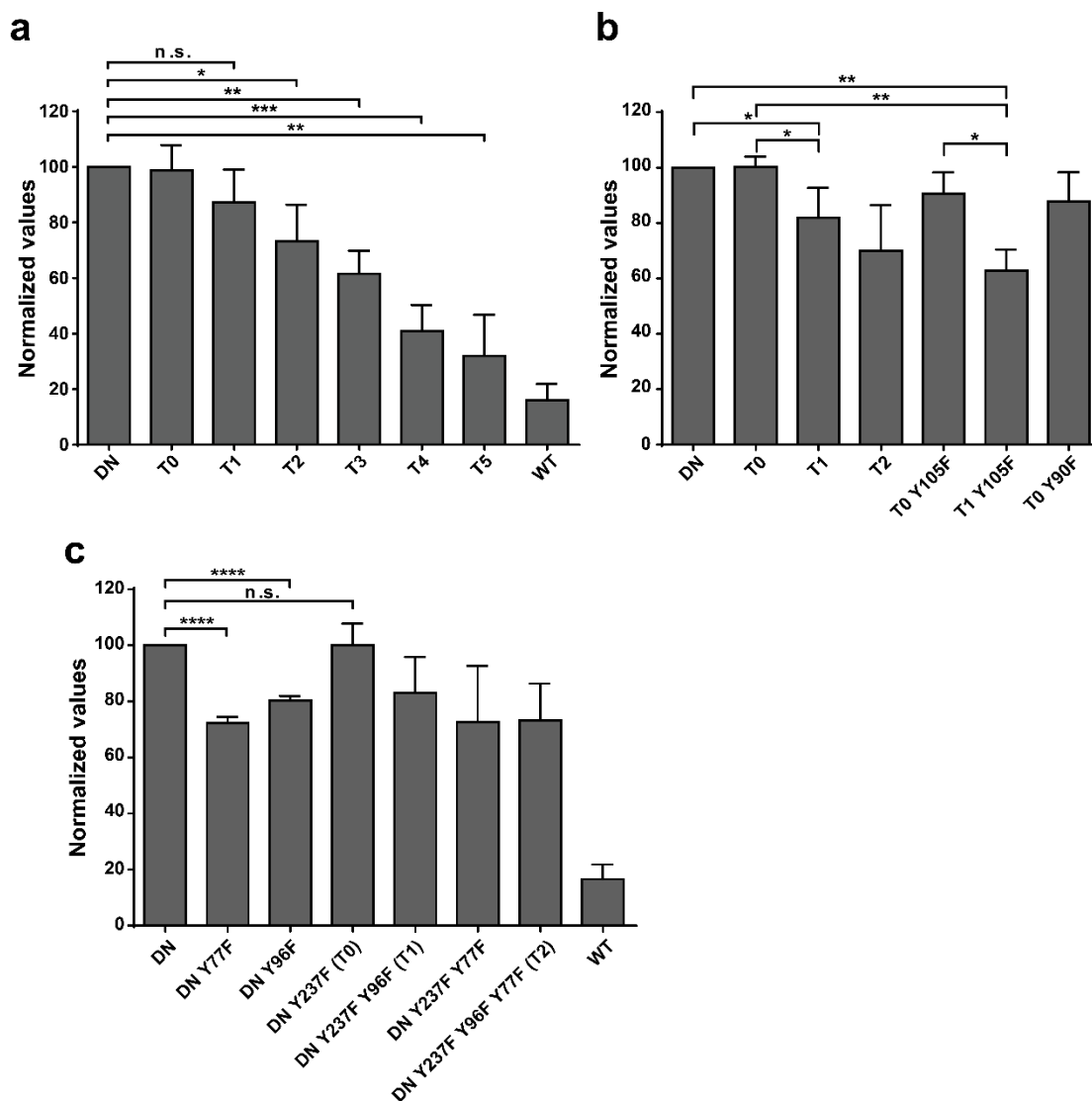


Figura IV-7. Tirozin-fosforilarea unui număr variat de mutații EYA3, în celule HEK293T⁸⁰. Pentru fiecare proteină EYA3 imunoprecipitată, intensitatea benzii obținută în urma Western blot-ului cu anti-pY a fost divizată la cea obținută în Western blot-ul anti-c-myc. Graficul reprezintă valorile fosforilărilor cuantificate ale probelor, normalizate la fosforilarea cuantificată a EYA3 D311N (n.s. pentru nesemnificativ; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$). Cuantificarea benzilor de la Western blot a fost făcută cu programul ImageJ⁸¹. Pentru fiecare din experimentele descrise (a, b, c), valorile reprezintă media \pm SD pentru trei experimente independente ($n = 3$) și statistica (unpaired t-test, two-tailed) a fost efectuată folosind programul GraphPad Prism6.

IV.2.5 Implicații la nivel celular pentru unele situsuri de tirozină ale EYA3 fosforilate de kinaza Src

Știind faptul că proteinele EYA sunt implicate în multe procese cancerigene^{41,78}, am investigat dacă anumite reziduuri de tirozină fosforilate de Src pot fi implicate în proliferare și invazivitate celulară. Prima oară, am investigat dacă EYA3 endogenă este tirozin-fosforilată în

celule HEK293T ce exprimă tranzient c-Src Y527F. EYA3 a fost tirozin-fosforilată numai în celule HEK293T care supraexprimau c-Src Y527F. Tratamentul cu benzobromaronă a indus o creștere a tirozin-fosforilării proteinei EYA3 endogenă, prin comparație cu celulele tratate doar cu DMSO, celulele control. Aceasta demonstrează că EYA3 endogenă are capacitate de autodefosforilare.

Astfel, am ales ca pentru efectele celulare menționate, să investigăm situsurile de tirozină din partea N-terminală, dar și pe cele care prezintă rezistență crescută la autodefosforilarea EYA3. Ne-am gândit că, mai ales reziduurile din EYA3 care rămân fosforilate pentru o perioadă mai lungă de timp ar putea face parte dintr-o cascadă de semnalizare activată de tirozin-fosforilare. Am ales doi mutații EYA3 WT Y→F: EYA3 Y237F Y96F Y77F (EYA3 WT T2) și unul care avea toate situsurile de tirozină din N-terminal detectate ca fiind fosforilate de Src, mutate la fenilalanina (EYA3 WT T9). Inițial, am determinat activitatea lor PTPazică folosind pNPP ca substrat și am comparat-o cu activitatea EYA3 WT. Numai EYA3 WT T2 a fost aleasă pentru investigații suplimentare, deoarece a reținut mare parte din activitatea PTPazică (90%).

Testul MTS, prin care se poate determina viabilitatea celulară, a fost prima oară efectuat pe celule HEK293T. Rezultatele arată că în absența expresiei c-Src Y527F, celulele care supraexprimau mutantul EYA3 WT T2 au avut valori ale absorbantei mai mici în comparație cu cele care supraexprimau EYA3 WT sau celulele control (vector gol) (***) $p < 0.001$, Fig. IV-8a). Aceste rezultate sugerează că unul sau mai multe din aceste reziduuri de tirozină pot fi implicate în evenimente induse de EYA3 ce conduc la proliferare celulară. De asemenea, am observat că supraexpresia EYA3 WT a crescut valoarea absorbantei celulelor HEK293T respective (Fig. IV-8a). Totuși, acest efect a fost abolit atunci când c-Src Y527F a fost co-exprimat cu EYA3 WT (Fig. IV-8a).

Deoarece rezultatele testului MTS ar putea fi explicate prin creșterea supraviețuirii celulare sau a metabolismului, pe lângă creșterea ratei de proliferare, am efectuat o analiză a distribuției ciclului celular pentru a determina dacă EYA3 are rol în proliferarea celulelor HEK293T. Analiza ciclului celular cu ajutorul citometriei în flux (Fig. IV-8b) a fost efectuată la 24 h după ce au fost transfectate celulele. Rezultatele arată că cea mai mare proporție de celule în fazele S+G2/M s-a găsit în cazurile în care forma dominant-negativă a kinazei a fost exprimată tranzient. Probele în care nu a fost supraexprimată nicio formă a c-Src au avut cea mai mică proporție de celule în fazele S+G2/M. Atunci când c-Src Y527F K295R a fost prezent, supraexpresia EYA3 WT a generat o proporție mai mare de celule în fazele S+G2/M comparativ cu EYA3 WT T2. Interesant este faptul că acumularea în G0/G1, și astfel o proporție redusă de celule în fazele

S+G2/M, generate de mutantul WT T2 al EYA3, nu a fost observată atunci când forma constitutiv-activă a c-Src a fost supraexprimată.

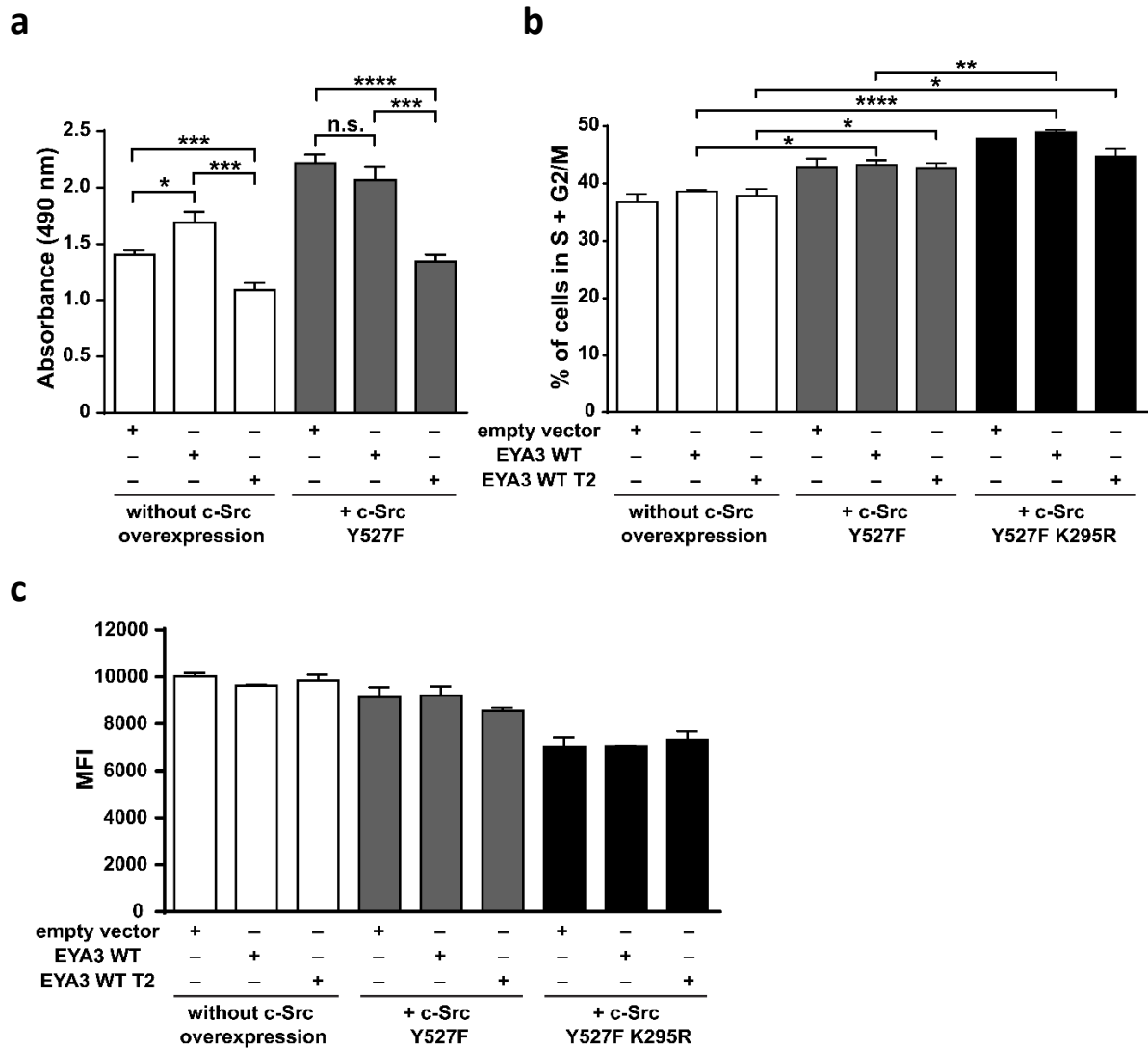


Figura IV-8. Implicații la nivel celular pentru mutațiile Y→F ale unor situsuri de fosfotirozină ale EYA3, în celule HEK293T⁸⁰.

a) Test MTS pe celule HEK293T la 72 h după transfecție. Rezultatele reprezintă media \pm SEM a trei experimente independente, fiecare având trei replicare ($n = 9$). Analiza statistică s-a făcut prin aplicarea testului t-Student (*unpaired test, two-tailed*; * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$).

b) Analiza prin citometrie în flux a distribuției ciclului celular pentru celulele HEK293T care exprimă tranzient EYA3 WT sau EYA3 WT T2 cu sau fără expresia c-Src Y527F sau c-Src Y527F K295R, la 24 h post-transfecție. Valorile reprezintă cumulum valorilor procentuale pentru celulele din fazele S și G2/M. Rezultatele reprezintă media \pm SEM a două experimente independente ($n = 3$). Analiza statistică s-a făcut prin aplicarea testului t-Student (*unpaired test, two-tailed*; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$).

c) Analiza prin citometrie în flux a celulelor HEK293T marcate cu CFSE. Graficul indică valoarea mediană a intensității fluorescenței CFSE (*median fluorescence intensity - MFI*), la 48 h post-transfecție. Valorile reprezintă media \pm SD a unui experiment reprezentativ din două efectuate ($n = 2$).

Mai departe, am vrut să verificăm dacă acea creștere detectată a proporției de celule în fazele S+G2/M a fost cauzată de o rată crescută de proliferare sau a fost o consecință a blocării ciclului celular în fazele G2/M. În acest scop, am marcat celulele cu CFSE și am urmărit

proliferarea prin măsurarea gradului de diluare al acestui colorant în timp. Analiza de citometrie în flux (Fig. IV-8c) a dezvăluit că celulele au avut cea mai mică rată de proliferare (deci cele mai mari valori ale MFI) în absența supraexpresiei c-Src, și cea mai mare rată de proliferare atunci când a fost supraexprimată forma dominant-negativă a kinazei. Valorile MFI (măsurători efectuate la 48 h post-transfecție) reflectă rezultatele de la analiza distribuției ciclului celular (măsurători efectuate la 24 h post-transfecție). Așadar, profilele de proliferare obținute în testul MTS (ilustrat în Fig. IV-8a) reflectă într-adevăr o modificare a distribuției ciclului celular. În concluzie, mutația Y→F a celor trei reziduuri - Y77, Y96 și Y237 - abolește efectul pro-proliferativ al supraexpresiei EYA3.

Am efectuat atât teste MTS cât și experimente de invazivitate celulară pe MCF-7, o linie celulară de cancer de sân. Nu am detectat diferențe semnificative între celulele care au supraexprimat EYA3 WT și EYA3 WT T2, indiferent dacă c-Src Y527F a fost supraexprimat sau nu. Aceasta sugerează o specificitate celulară în ceea ce privește efectul proliferativ al EYA3.

Influența fosforilării EYA3 WT și EYA3 WT T2 indusă de Src asupra proliferării celulare a fost testată și în celule MDA-MB-231, o linie de cancer de sân triplu-negativ, foarte agresivă. Testele MTS arată că celulele MDA-MB-231 care au supraexprimat EYA3 WT au avut proliferare crescută comparativ cu cele care au supraexprimat EYA3 WT T2 și probele control (Fig. IV-9a). Analizele Western blot ale probelor colectate la 24 h respectiv 48 h post-transfecție arată că supraexpresia c-Src Y527F diminuează drastic expresia EYA3 WT și EYA3 WT T2 (Fig. IV-9b). De remarcat este faptul că în celulele HEK293T și MCF-7 nu am detectat nicio scădere în expresia EYA3 atunci când a fost co-exprimată cu c-Src Y527F, nici la 48 h și nici la 72 h post-transfecție. Toate aceste rezultate indică o specificitate celulară în ceea ce privește consecințele interacției dintre EYA3 și Src.

Am vrut să investigăm și dacă c-Src Y527F influențează expresia proteinei EYA3 endogenă. Expresia EYA3 endogenă a scăzut în celulele care au supraexprimat cea mai mare cantitate de c-Src Y527F și din această categorie, cea mai mică expresie a EYA3 s-a detectat în celulele recoltate 48 h post-transfecție. Aceste rezultate indică faptul că supraexpresia c-Src constitutiv-activă scade expresia EYA3.

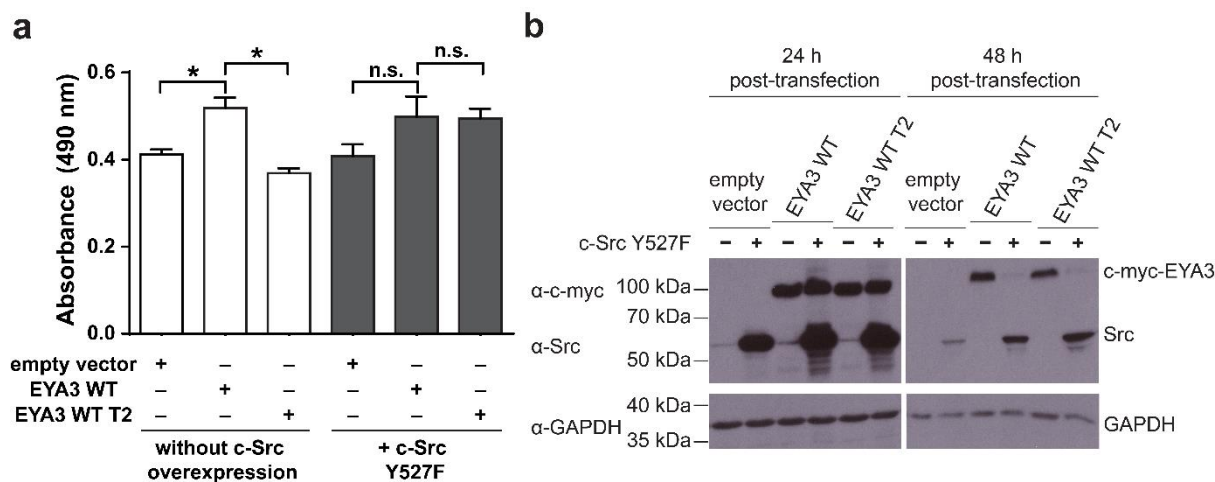


Figura IV-9. Experiment de proliferare în celulele MDA-MB-231. Influența supraexpresiei c-Src Y527F asupra EYA3 endogenă.

a) Rezultatul testelor de proliferare efectuate pe celule MDA-MB-231 folosind MTS. Rezultatele reprezintă media \pm SEM a trei experimente independente, fiecare având trei replicare ($n = 9$). Analiza statistică s-a făcut prin aplicarea testului t-Student (*unpaired, two-tailed*; n.s. - nesemnificativ statistic; * $p < 0.05$), folosind GraphPad Prism6.

b) Rezultat Western blot reprezentativ, obținut din analiza celulelor MDA-MB-231 supuse testului de proliferare. Probele au fost colectate la 24 h post-transfecție și după măsurarea absorbanțelor (48 h post-transfecție).

IV.2.6 Tiparul de fosforilare al EYA3 indus de Src în celulele HEK293T și MCF-7

Am determinat că, în aceleași condiții experimentale (EYA3 WT sau WT T2 supraexprimată singură sau cu c-Src Y527F), EYA3 are efecte diferite asupra proliferării pentru celulele HEK293T și MCF-7. Având aceste rezultate, am dorit să identificăm tiparul de fosforilare al EYA3 indus de Src în aceste două linii celulare, așa că am exprimat tranzient proteine EYA3 (EYA3 WT, EYA3 D309N și EYA3 D309N Y77F) cu și fără c-Src Y527F. Apoi am identificat reziduurile fosforilate ale proteinelor EYA3 prin nLC-MS/MS (cu metodele de fragmentare CID și ETD) după îmbogațirea probelor în peptide fosforilate, folosind TiO_2 . EYA3 D309N Y77F conține mutația Y→F la reziduu care a prezentat cea mai mare contribuție la fosforilarea EYA3.

Majoritate acestor fosforeziduuri detectate sunt aceleași cu cele identificate în reacțiile de fosforilare *in vitro* a EYA3 D311N. Y325 și Y329 sunt fosfositusuri noi. Au fost detectate și reziduuri de serină fosforilate, datorită utilizării strategiei de îmbogațire cu TiO_2 . Tiparul de fosforilare diferit al EYA3 în cele două linii celulare, ne face să presupunem că fosforilarea EYA3 indusă de Src declanșează procese diferite în funcție de tipul de celulă în care are loc. De asemenea, rezultatele obținute sugerează că există o interacțiune complexă între fosforilarea indusă de Src și autodefosforilarea EYA3, cu potențiale implicații în fiziologia și patologia

celulară, și identificarea interactorilor pentru EYA3 ar fi foarte folositoare în determinarea căilor de transducție a semnalului.

IV.2.7 Stabilirea variabilității reziduurilor de tirozină ale EYA3 folosind unelte bioinformatic

Identificare *in vitro* a unui reziduu fosforilat nu înseamnă neapărat că acest reziduu are vreun rol funcțional, rezultatul poate fi un artefact experimental. În multe rapoarte s-a dovedit că fosfositurile cu rol funcțional prezintă un grad de conservare semnificativ mai mare decât fosforeziduurile cu funcție necunoscută⁹¹. Aceasta face din analiza de conservare a secvenței o abordare utilă pentru a prezice care fosfosituri au roluri funcționale. De aceea, am efectuat o analiză de conservare a secvenței pentru EYA3, cautând să determinăm gradul de conservare pentru toate situsurile de fosfotirozină identificate în acest capitol (cincisprezece în total: Y67, Y72, Y77, Y90, Y96, Y105, Y108, Y115, Y208, Y237, Y325, Y329, Y426, Y508, Y532).

Analiza de variabilitate a fost efectuată pe un set de 721 de omologi ai EYA3, care au fost selectați din baza de date “Representative Proteomes RP55”⁹². Am putut estima gradul de conservare al reziduurilor de tirozină și să vedem și cât de conservate sunt și celelalte reziduuri ale EYA3 printre cei 721 omologi. Reziduuri de tirozină atât din N-terminal, cât și din ED, prezintă un grad mare de conservare. Acest lucru sugerează că ar putea avea implicații fiziologice și constituie un argument în favoarea unor viitoare studii funcționale. Reziduurile de tirozină Y72, Y77, Y90, Y105, Y108 și Y208 sunt toate foarte bine conservate. Aceste reziduuri au fost identificate drept fosfosituri atât în celulele HEK293T cât și în celulele MCF-7, ceea ce sugerează că ar trebui luate în considerare în viitoare studii funcționale. Y237 și Y426, fosforeziduuri detectate doar în celulele MCF-7, sunt de asemenea foarte bine conservate și ar trebui luate în considerare atunci când se investighează implicațiile fosforilării EYA3 în această linie celulară. EYA3 ar putea fi implicată în căi de transducție a semnalului și prin intermediul altor reziduuri de tirozină care au prezentat grad înalt de conservare, așa că nici aceste situsuri nu ar trebui ignorate în viitoare studii cu privire la această proteină.

IV.3 CONCLUZII

1. Analizele de spectrometrie de masă, nativă și tip *bottom-up*, dezvăluie faptul că proteinelor EYA3 WT și EYA3 D311N, exprimate în sistem procariot, le lipsește reziduu inițial de metionină, iar serina, reziduu ce urmează, a fost acilată în timpul expresiei în procariote.

2. Proteinele purificate EYA3, exprimate în sistem procariot, formează un complex cu trimerul proteinei Skp. Este posibil ca Skp să stabilizeze EYA3, în special partea N-terminală a proteinei, care este foarte dezordonată.

3. Analiza prin spectrometrie de masă nativă, după două ore de fosforilare *in vitro* a EYA3 D311N de către Src, a dezvăluit 12 reziduuri fosforilate. Același experiment făcut pe EYA3 WT a dezvăluit numai un reziduu fosforilat, demonstrând următoarele: capacitatea de autodefosforilare a enzimei depășește fosforilarea realizată de Src, dar și importanța ED-ului în controlarea stării de fosforilare.

4. Analiza prin spectrometrie de masă nativă a arătat că EYA3 WT defosforilaează direct proteina EYA3 D311N, fosforilată de Src. Forma acetilată a fosfo-EYA3 D311N a fost de asemenea defosforilată. Pentru EYA3 D311N care este în complex cu Skp, s-a observat că proteina șaperon induce o ușoară piedică în ceea ce privește fosforilarea de către Src.

5. Unsprezece reziduuri de tirozină (Y67, Y72, Y77, Y90, Y96, Y105, Y108, Y208, Y237, Y426, Y532) au fost detectate ca fiind fosforilate în EYA3 D311N, prin analize de spectrometrie de masă de tip *bottom-up* ale reacției de fosforilare *in vitro* a EYA3 D311N de către kinaza Src la diverse momente de timp. În cazul EYA3 WT, în același tip de experiment, patru reziduuri de tirozină (Y77, Y96, Y105 și Y237) au fost detectate drept fosforilate și pot fi considerate reziduuri cu rezistență crescută la autodefosforilare. Cele șapte reziduuri de tirozină - Y67, Y72, Y90, Y108, Y208, Y426, Y532 - pot fi considerate situsurile principale de autodefosforilare.

6. Analiza prin spectrometrie de masă de tip *bottom-up* a fosforilării EYA3 D311N de către kinaza Src și defosforilarea de către EYA3 ED WT a dezvăluit nu numai două noi reziduuri de fosfotirozină (Y115 și Y508), dar și dinamica fosforilării/defosforilării pentru fiecare din reziduurile de tirozină fosforilate. În acest experiment, doar Y77, Y96, Y237 și Y508 au fost identificate ca fiind fosforilate după 4 h de incubare cu EYA3 ED WT. Y508 a fost detectat ca alt reziduu cu o rezistență ridicată la autodefosforilare și singurul reziduu din ED care a avut această caracteristică.

7. *In vitro*, kinaza Src ar putea fosforila treisprezece reziduuri de tirozină din EYA3: Y67, Y72, Y77, Y90, Y96, Y105, Y108, Y115, Y208, Y237, Y426, Y508 și Y532.

8. Fosforilarea Y96, Y77, Y105, Y90 și Y115 a dovedit că are o contribuție măsurabilă la fosforilarea totală a EYA3. Y77 și Y96 au avut cea mai mare contribuție la fosforilarea totală. Contribuția Y90 și Y105 poate fi observată numai când reziduurile cu o contribuție mare la fosforilarea totală (Y77 și Y96) au fost mutate la fenilalanină.

9. EYA3 endogenă are capacitate de autodefosforilare și este tirozin-fosforilată în celule HEK293T care supraexprimă tranzient c-Src Y527F.

10. Experimentele de proliferare făcute în celulele HEK293T sugerează că unul sau mai multe din cele 3 reziduuri de tirozină care au fost mutate la fenilalanină în EYA3 WT T2 (Y77, Y96 și Y237) ar putea fi implicate în evenimente de proliferare. În testele MTS și analiza distribuției ciclului celular, tripla mutație menționată abolește efectul pro-proliferativ al supraexpresiei EYA3. Testele de proliferare au arătat că supraexpresia EYA3 WT a crescut proliferarea celulelor HEK293T, dar efectul a fost mascat atunci când c-Src Y527F a fost co-exprimat.

11. Nu au fost găsite diferențe semnificative în proliferare între celulele MCF-7 care au supraexprimat tranzient EYA3 WT și EYA3 WT T2, indiferent de supraexpresia c-Src Y527F, sugerând că efectul pro-proliferativ al EYA3 este specific tipului de celulă.

12. În ceea ce privește capacitatea EYA3 de a influența invazivitatea celulelor de cancer mamar, în celulele MCF-7 nu au fost detectate diferențe în urma supraexpresiei EYA3 WT sau EYA3 WT T2, nici cu nici fără ca c-Src Y527F să fi fost co-exprimat.

13. Experimentele de proliferare efectuate pe celulele de cancer mamar MDA-MB-231 arată că expresia tranzientă a EYA3 WT induce o creștere în proliferare comparativ cu supraexpresia EYA3 WT T2 și probele control. Aceste rezultate sunt similare cu cele detectate în celulele HEK293T și conturează un potențial rol în proliferarea MDA-MB-231 pentru unul sau mai multe din cele 3 reziduuri tirozină ce au suferit mutații la fenilalanină în EYA3 WT T2 (Y77, Y96, Y237).

14. În celulele MDA-MB-231, expresia EYA3 a scăzut drastic la 48 h după transfecție atunci când a fost co-exprimată împreună cu c-Src Y527F. Studii ulterioare efectuate pe aceeași linie celulară au arătat că expresia EYA3 endogenă a scăzut atunci când c-Src activ constitutiv a fost exprimat tranzient. Aceste rezultate sugerează că expresia proteinei EYA3 scade atunci când kinaza Src este menținută într-o stare activă.

15. Analiza prin spectrometrie de masă de tipul *bottom-up* a tiparului de fosforilare al EYA3, indus de Src, a dezvăluit două noi situsuri de fosfotirozină: Y325 în celulele HEK293T și Y329 în celulele MCF-7. Reziduurile de fosfotirozină care au dovedit o rezistență crescută la autodefosforilare în ambele linii celulare au fost Y77, Y108 și Y208. Reziduuri de fosfoserină au fost de asemenea detectate pe proteine EYA3, în ambele linii celulare, ceea ce evidențiază complexitatea fosforilării induse de Src.

16. Rezultatele de la analiza conservării secvențelor, efectuată utilizând resurse bioinformatiche, au arătat că reziduurile de tirozină din partea N-terminală cât și cele din ED sunt foarte conservate printre cei 721 de omologi ai EYA3, indiferent dacă au fost sau nu fosforeziduuri induse de acțiunea kinazei Src. Acest fapt sugerează că ele ar putea avea roluri

funcționale și ar trebui luate în considerare atunci când se fac cercetări ce vizează implicările EYA3 în transducția semnalului sau alte procese celulare.

CONCLUZII FINALE

Identificarea lui WDR1 ca prim substrat citoplasmatic al EYA3 deschide noi căi în căutarea unor procese citoplasmatică inedite ce implică EYA3. Ținând cont de capacitatea paralogilor umani de a se autodefosforila, EYA tirozin-fosforilată este propriul ei substrat. Faptul că interacțiunile EYA-WDR1 și EYA-EYA sunt paralog-specifice reprezintă o altă descoperire importantă. Cu alte cuvinte, cel puțin în aceste situații, proteinele EYA nu se substituie reciproc. Cu toate că ED-ul este foarte conservat, se poate presupune că particularitățile interacțiunilor și specificitatea de substrat a paralogilor sunt încorporate în regiunile lor neconservate din secvența. Probabil, slab conservata regiune N-terminală conferă specificitate proteinei EYA corespunzătoare. Noii mutații ai EYA3, ce posedă capacitate de pridere a substratului, identificați în această teză, vor fi folositori pentru identificarea altor substraturi și implicit de noi roluri fiziologice ale EYA3.

Caracterizarea detaliată a fosforilării/(auto)defosforilării EYA3 indusă de Src a dezvăluit faptul că un număr de reziduuri de tirozină cu o rezistență crescută la autodefosforilare sunt implicate în proliferarea celulară dependentă de EYA3. Interesant este că experimentele făcute în liniile celulare canceroase au reliefat că aceste efecte sunt specifice fiecărui tip de celulă în parte.

Cumulate, rezultatele obținute în această teză evidențiază necesitatea unor viitoare studii în profunzime, pentru a desluși semnificația fiziologică și patologică a echilibrului dintre fosforilarea și autodefosforilarea EYA3.

MULȚUMIRI

În primul rând, aș dor să-i mulțumesc domnului Prof. Dr. Ștefan-Eugen Szedlacsek, pentru toată îndrumarea științifică, pentru încredere, susținere, răbdare și pentru înțelegerea oferită pe timpul pregătirii doctorale! Pentru toate momentele în care m-am motivat și m-a sfătuit!

Am mai făcut această afirmație și o voi face din nou, sperând că oricine va citi această lucrare va avea o percepție mai bună despre Institutul de Biochimie al Academiei Române:

Institutul nu este doar un loc de muncă unde ai oportunitatea de a învăța și a avansa pe plan profesional, este un loc unde cunoști oameni serioși, muncitori, dedicați și, în primul rând, onești, modești, discreți și buni la suflet.

Voi menționa o parte din colegii cu care am colaborat și cu care am discutat „chestiuni științifice” de-a lungul anilor, dar le mulțumesc tuturor. Cu toții m-au impresionat într-un anumit mod, iar eu am încercat să iau cea mai bună parte din personalitatea fiecăruia, sperând să devin măcar o persoană mai bună, dacă nu un cercetător bun!

Aș dori să îi/le mulțumesc:

- Dr. Mihaela Mențel pentru îndrumarea științifică, pentru discuțiile și pentru ajutorul în ceea ce privește tehnicile experimentale!

- Dr. Georgiana Necula-Petrăreanu pentru că m-a învățat purificarea proteinelor și Dr. Rodica-Aura Badea pentru că m-a învățat bazele biologiei celulare și moleculare!
 - Dr. Sorin Tunaru, pentru că m-a ajutat să îmbunătățesc calitatea primului meu articol și pentru că m-a încurajat non-stop și mi-a oferit sfaturi bune!
 - Doctorandei Alexandra Manolache, pentru toate discuțiile științifice și pentru că m-ai inclus ca și co-autor în primul tău articol!
 - Celorlalți colegi de la Departamentul de Enzimologie, pentru că au fost întotdeauna alături de mine: Horea S., Alexandra B., Simona C. și Cristina Otilia Donțu (contabilul nostru). Aș dori, de asemenea, să îi mulțumesc Adinei Monea, fostul nostru tehnician, pentru toate soluțiile și gelurile de poliacrilamidă.
 - Dr. Cristian V.A. Munteanu, pentru tot ajutorul tău în ceea ce privește problemele legate de spectrometria de masă, urgențe etc.! De asemenea, multe mulțumiri pentru sfaturile legate de știință!
 - Dr. Livia Elena Sima, pentru ajutorul legat de experimentele de citometrie în flux și pentru discuțiile legate de știință!
 - Dr. Ioana Popa, pentru că m-a învățat bazele culturilor celulare de mamifer și pentru că mi-a dat sfaturi științifice prețioase! Dr. Simona Ghenea și Anca Filimon, pentru valoroasele sugestii tehnice și pentru sfaturile grozave! Dr. Gabriela și Mărioara Chirițoiu pentru că au fost atât de drăguțe și săritoare vis-a-vis de mine în toți acești ani!
 - Dr. Gabriela Negroiu, Dr. Florentina Pena și tuturor celor de la Departamentul de Glicoproteine virale pentru sfaturile științifice grozave!
 - Mulțumiri speciale doamnei Dr. Mihaela Trif pentru tot ajutorul oferit în ceea ce privește documentele necesare terminării doctoratului!
 - Doctorandei Eliza Cristina Martin, pentru că m-a ajutat cu analiza de variabilitate și cu alte proiecte - urgențe legate (sau nu) de lucrare! De asemenea, multe mulțumiri tuturor celor de la Departamentul de Bioinformatică, nu doar pentru parolă!
- Dragă doamnă Dr. Adina Milac, sunteți un exemplu pentru noi toți! Odihniți-vă în pace!

Doresc să le mulțumesc, de asemenea, colaboratorilor noștri: Prof. Dr. Albert J. Heck de la Biomolecular Mass Spectrometry and Proteomics Bijvoet Centre for Biomolecular Research and Utrecht Institute for Pharmaceutical Sciences (Universitatea Utrecht, Netherlands Proteomics Center, Olanda) pentru că m-a primit în laborator și pentru că m-a ghidat, împreună cu Dr. Aneika C. Leney, în efectuarea unor experimente de spectrometrie de masă nativă și de tip *bottom-up*.

Această lucrare a beneficiat de suport financiar de la următoarele proiecte: “Idei”, cod proiect PN-II-ID-PCE-2011-3-0743 cu număr contract 296/05.10.2011; “CERO - Profil de carieră: Cercetător Român”, cu număr de proiect POSDRU/159/1.5/S/135760, co-finanțat prin Fondul Social European pentru Programul Operațional Sectorial “Dezvoltarea Resurselor Umane” 2007-2013; Proiectul CNCS-UEFISCDI “Artemis”, ce are codul PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0737, cu numărul de contract 35/01.04.2018.

LISTA PUBLICAȚIILOR ȘI PREZENTĂRILOR DE POSTER

Publicații:

1. Analysis of EYA3 Phosphorylation by Src Kinase Identifies Residues Involved in Cell Proliferation

Aura E. Ionescu; Mihaela Mentel; Cristian V.A. Munteanu; Livia E. Sima; Eliza C. Martin; Georgiana Necula-Petrareanu; Stefan E. Szedlacsek

International Journal of Molecular Sciences 2019, Volume 20, Issue 24, 6307.

<https://doi.org/10.3390/ijms20246307>

2. Regulation of TRPM8 Channel Activity by Src-mediated Tyrosine Phosphorylation

Alexandra Manolache, Tudor Selescu, Georgiana Maier, Mihaela Mentel, Aura Ionescu, Cristian Neacsu, Alexandru Babes, Stefan Szedlacsek

Journal of Cellular Physiology, 2019 Nov 14. doi: 10.1002/jcp.29397.

3. WDR1 is a novel EYA3 substrate and its dephosphorylation induces modifications of the cellular actin cytoskeleton

Mihaela Mentel, Aura E. Ionescu, Ioana Puscalau-Girtu, Martin S. Helm, Rodica A. Badea, Silvio O. Rizzoli & Stefan E. Szedlacsek

Scientific Reports, 2018 Feb 13;8(1):2910. doi: 10.1038/s41598-018-21155-w.

4. Expression, Purification, and Kinetic Analysis of PTP Domains

Mihaela Mențel, Rodica A. Badea, Georgiana Petrăreanu, Sujay T. Mallikarjuna, Aura E. Ionescu, Ștefan E. Szedlacsek

Methods in Molecular Biology, Vol. 1447, Protein Tyrosine Phosphatases, 2016.

5. Phosphoketolases from Lactococcus lactis, Leuconostoc mesenteroides and Pseudomonas aeruginosa: dissimilar sequences, similar substrates but distinct enzymatic characteristics

Georgiana Petrăreanu, Mihaela C Balașu, Andrei M Vacaru, Cristian V A Munteanu, Aura E Ionescu, Iulia Matei, Ștefan E Szedlacsek

Applied Microbiology and Biotechnology. 04/2014; DOI:10.1007/s00253-014-5723-6.

6. Synthesis and Biological Evaluation of Some New N¹-[4-(4-Chlorophenylsulfonyl)benzoyl]-N⁴-(aryl)-thiosemicarbazides and Products of Their Cyclization

Ștefania-Felicia Bărbuceanu, Gabriela Băncescu, Gabriel Șaramet, Florica Bărbuceanu, Constantin Drăghici, Flavian Ștefan Rădulescu, Aura Ionescu and Simona Negreș

Heteroatom Chemistry, Volume 24, Issue 4, pages 309-321, July 2013.

Prezentări de poster:

1. Aura-Elena Ionescu, Mihaela Mențel, Aneika C. Leney, Cristian V.A. Munteanu, Albert J. Heck, Ștefan E. Szedlacsek, “EYA3 tyrosine phosphorylation by Src kinase. From mass spectrometry to implications in proliferation.” The 12th Central and Eastern European Proteomic Conference “Advances in Proteomics and Progress in Precision Medicine”, 24-26 octombrie 2018, București, România. Premiul al III-lea în cadrul competiției “Cel mai bun poster”.
2. Aura-Elena Ionescu, Mihaela Mențel, Rodica Aura Badea, Ștefan Eugen Szedlacsek, “Evidence for intermolecular autodephosphorylation of human Eya3”, Europhosphatase 2017 “Phosphatases in cell fates and decisions”, 23 - 28 of iulie, Paris, Franța.
3. Aura Elena Ionescu, Mihaela Mențel, Cristian V. A. Munteanu, Cristian Marian Butnaru, Rodica Aura Badea, Ioana Iancu, Ștefan Eugen Szedlacsek, “Mass Spectrometric investigations regarding phosphorylation of human Eya3 by Src kinase”, Europhosphatase 2015 “Phosphorylation switches and cellular homeostasis”, 24 - 29 iunie, Turku, Finlanda.

REFERINȚE

1. Hunter, T. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* **80**, 225–236 (1995).
2. Alonso, A. *et al.* Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell* **117**, 699–711 (2004).
3. Montalibet, J., Skorey, K. I. & Kennedy, B. P. Protein tyrosine phosphatase: enzymatic assays. *Methods San Diego Calif* **35**, 2–8 (2005).
4. Danforth, W. H., Helmreich, E. & Coricf, null. The effect of contraction and of epinephrine on the phosphorylase activity of frog sartorius muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **48**, 1191–1199 (1962).
5. Tonks, N. K. Protein tyrosine phosphatases—from housekeeping enzymes to master regulators of signal transduction. *FEBS J.* **280**, 346–378 (2013).
6. Wang, W.-Q., Sun, J.-P. & Zhang, Z.-Y. An overview of the protein tyrosine phosphatase superfamily. *Curr. Top. Med. Chem.* **3**, 739–748 (2003).
7. Soulsby, M. & Bennett, A. M. Physiological signaling specificity by protein tyrosine phosphatases. *Physiol. Bethesda Md* **24**, 281–289 (2009).
8. Hunter, T. Signaling—2000 and Beyond. *Cell* **100**, 113–127 (2000).
9. Neel, B. G. & Tonks, N. K. Protein tyrosine phosphatases in signal transduction. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 193–204 (1997).
10. Heinrich, R., Neel, B. G. & Rapoport, T. A. Mathematical models of protein kinase signal transduction. *Mol. Cell* **9**, 957–970 (2002).
11. Hornberg, J. J. *et al.* Principles behind the multifarious control of signal transduction. *FEBS J.* **272**, 244–258 (2005).
12. He, R.-J., Yu, Z.-H., Zhang, R.-Y. & Zhang, Z.-Y. Protein tyrosine phosphatases as potential therapeutic targets. *Acta Pharmacol. Sin.* **35**, 1227–1246 (2014).
13. Tautz, L., Pellecchia, M. & Mustelin, T. Targeting the PTPome in human disease. *Expert Opin. Ther. Targets* **10**, 157–177 (2006).
14. Ostman, A., Hellberg, C. & Böhmer, F. D. Protein-tyrosine phosphatases and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 307–320 (2006).
15. Easty, D., Gallagher, W. & Bennett, D. C. Protein tyrosine phosphatases, new targets for cancer therapy. *Curr. Cancer Drug Targets* **6**, 519–532 (2006).
16. Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* **447**, 661–678 (2007).

17. Alonso, A. & Pulido, R. The extended human PTPome: a growing tyrosine phosphatase family. *FEBS J.* **283**, 1404–1429 (2016).
18. Bonini, N. M., Leiserson, W. M. & Benzer, S. The eyes absent gene: genetic control of cell survival and differentiation in the developing *Drosophila* eye. *Cell* **72**, 379–395 (1993).
19. Silver, S. J., Davies, E. L., Doyon, L. & Rebay, I. Functional dissection of eyes absent reveals new modes of regulation within the retinal determination gene network. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 5989–5999 (2003).
20. Tootle, T. L. *et al.* The transcription factor Eyes absent is a protein tyrosine phosphatase. *Nature* **426**, 299–302 (2003).
21. Rayapureddi, J. P. *et al.* Eyes absent represents a class of protein tyrosine phosphatases. *Nature* **426**, 295–298 (2003).
22. Bonini, N. M., Leiserson, W. M. & Benzer, S. Multiple roles of the eyes absent gene in *Drosophila*. *Dev. Biol.* **196**, 42–57 (1998).
23. Halder, G. *et al.* Eyeless initiates the expression of both sine oculis and eyes absent during *Drosophila* compound eye development. *Dev. Camb. Engl.* **125**, 2181–2191 (1998).
24. Leiserson, W. M., Benzer, S. & Bonini, N. M. Dual functions of the *Drosophila* eyes absent gene in the eye and embryo. *Mech. Dev.* **73**, 193–202 (1998).
25. Bonini, N. M., Bui, Q. T., Gray-Board, G. L. & Warrick, J. M. The *Drosophila* eyes absent gene directs ectopic eye formation in a pathway conserved between flies and vertebrates. *Dev. Camb. Engl.* **124**, 4819–4826 (1997).
26. Pappu, K. & Mardon, G. Retinal specification and determination in *Drosophila*. *Results Probl. Cell Differ.* **37**, 5–20 (2002).
27. Kumar, J. P. Retinal determination the beginning of eye development. *Curr. Top. Dev. Biol.* **93**, 1–28 (2010).
28. Wawersik, S. & Maas, R. L. Vertebrate eye development as modeled in *Drosophila*. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 917–925 (2000).
29. Silver, S. J. & Rebay, I. Signaling circuitries in development: insights from the retinal determination gene network. *Dev. Camb. Engl.* **132**, 3–13 (2005).
30. Tadjuidje, E. & Hegde, R. S. The Eyes Absent proteins in development and disease. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **70**, 1897–1913 (2013).
31. Galindo, M. I., Bishop, S. A., Greig, S. & Couso, J. P. Leg patterning driven by proximal-distal interactions and EGFR signaling. *Science* **297**, 256–259 (2002).
32. Xu, P. X., Cheng, J., Epstein, J. A. & Maas, R. L. Mouse *Eya* genes are expressed during limb tendon development and encode a transcriptional activation function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 11974–11979 (1997).
33. Bai, J. & Montell, D. Eyes absent, a key repressor of polar cell fate during *Drosophila* oogenesis. *Dev. Camb. Engl.* **129**, 5377–5388 (2002).
34. Li, X., Perissi, V., Liu, F., Rose, D. W. & Rosenfeld, M. G. Tissue-specific regulation of retinal and pituitary precursor cell proliferation. *Science* **297**, 1180–1183 (2002).
35. Xu, P. X., Woo, I., Her, H., Beier, D. R. & Maas, R. L. Mouse *Eya* homologues of the *Drosophila* eyes absent gene require Pax6 for expression in lens and nasal placode. *Dev. Camb. Engl.* **124**, 219–231 (1997).
36. Chen, R., Amoui, M., Zhang, Z. & Mardon, G. Dachshund and eyes absent proteins form a complex and function synergistically to induce ectopic eye development in *Drosophila*. *Cell* **91**, 893–903 (1997).
37. Pignoni, F. *et al.* The eye-specification proteins So and Eya form a complex and regulate multiple steps in *Drosophila* eye development. *Cell* **91**, 881–891 (1997).
38. Krishnan, N. *et al.* Dephosphorylation of the C-terminal tyrosyl residue of the DNA damage-related histone H2A.X is mediated by the protein phosphatase eyes absent. *J. Biol. Chem.* **284**, 16066–16070 (2009).
39. Cook, P. J. *et al.* Tyrosine Dephosphorylation of H2AX Modulates Apoptosis and Survival Decisions. *Nature* **458**, 591–596 (2009).
40. Tadjuidje, E. *et al.* The EYA Tyrosine Phosphatase Activity Is Pro-Angiogenic and Is Inhibited by Benzbromarone. *PLoS ONE* **7**, (2012).
41. Pandey, R. N. *et al.* The Eyes Absent phosphatase-transactivator proteins promote proliferation, transformation, migration, and invasion of tumor cells. *Oncogene* **29**, 3715–3722 (2010).

42. Wu, K. *et al.* EYA1 phosphatase function is essential to drive breast cancer cell proliferation through cyclin D1. *Cancer Res.* **73**, 4488–4499 (2013).
43. Yuan, B. *et al.* A phosphotyrosine switch determines the antitumor activity of ER β . *J. Clin. Invest.* **124**, 3378–3390 (2014).
44. Shimasaki, N., Watanabe, K., Hara, M. & Kosaki, K. EYA1 mutation in a newborn female presenting with cardiofacial syndrome. *Pediatr. Cardiol.* **25**, 411–413 (2004).
45. Abdelhak, S. *et al.* A human homologue of the Drosophila eyes absent gene underlies branchio-otorenal (BOR) syndrome and identifies a novel gene family. *Nat. Genet.* **15**, 157–164 (1997).
46. Rickard, S. *et al.* Oto-facio-cervical (OFC) syndrome is a contiguous gene deletion syndrome involving EYA1: molecular analysis confirms allelism with BOR syndrome and further narrows the Duane syndrome critical region to 1 cM. *Hum. Genet.* **108**, 398–403 (2001).
47. Azuma, N., Hirakiyama, A., Inoue, T., Asaka, A. & Yamada, M. Mutations of a human homologue of the Drosophila eyes absent gene (EYA1) detected in patients with congenital cataracts and ocular anterior segment anomalies. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 363–366 (2000).
48. Schönberger, J. *et al.* Mutation in the transcriptional coactivator EYA4 causes dilated cardiomyopathy and sensorineural hearing loss. *Nat. Genet.* **37**, 418–422 (2005).
49. Wayne, S. *et al.* Mutations in the transcriptional activator EYA4 cause late-onset deafness at the DFNA10 locus. *Hum. Mol. Genet.* **10**, 195–200 (2001).
50. Sun, Y. *et al.* A novel mutation of EYA4 in a large Chinese family with autosomal dominant middle-frequency sensorineural hearing loss by targeted exome sequencing. *J. Hum. Genet.* **60**, 299–304 (2015).
51. Liu, F. *et al.* Exome Sequencing Identifies a Mutation in EYA4 as a Novel Cause of Autosomal Dominant Non-Syndromic Hearing Loss. *PLoS One* **10**, e0126602 (2015).
52. Farabaugh, S. M., Micalizzi, D. S., Jedlicka, P., Zhao, R. & Ford, H. L. Eya2 is required to mediate the pro-metastatic functions of Six1 via the induction of TGF- β signaling, epithelial-mesenchymal transition, and cancer stem cell properties. *Oncogene* **31**, 552–562 (2012).
53. Zhang, L. *et al.* Transcriptional Coactivator Drosophila Eyes Absent Homologue 2 Is Up-Regulated in Epithelial Ovarian Cancer and Promotes Tumor Growth. *Cancer Res.* **65**, 925–932 (2005).
54. Drake, K. M. *et al.* Loss of heterozygosity at 2q37 in sporadic Wilms' tumor: putative role for miR-562. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **15**, 5985–5992 (2009).
55. Miller, S. J. *et al.* Inhibition of Eyes Absent Homolog 4 expression induces malignant peripheral nerve sheath tumor necrosis. *Oncogene* **29**, 368–379 (2010).
56. Guo, J., Liang, C., Ding, L., Zhou, N. & Ye, Q. Drosophila Eyes Absent Homologue 2 is up-regulated in lung adenocarcinoma. *Chin.-Ger. J. Clin. Oncol.* **8**, 681–684 (2009).
57. Li, H. *et al.* Relationship between the expression of hTERT and EYA4 mRNA in peripheral blood mononuclear cells with the progressive stages of carcinogenesis of the esophagus. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* **28**, 145 (2009).
58. Wilkins, M. R. *et al.* From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnol. Nat. Publ. Co.* **14**, 61–65 (1996).
59. James, P. Protein identification in the post-genome era: the rapid rise of proteomics. *Q. Rev. Biophys.* **30**, 279–331 (1997).
60. Graves, P. R. & Haystead, T. A. J. Molecular Biologist's Guide to Proteomics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**, 39–63 (2002).
61. Stroobant V., de H. E. *Mass Spectrometry Principles and Applications.* (John Wiley & Sons Ltd, 2007).
62. Boyer, R. Posttranslational modification of proteins: Expanding nature's inventory. Christopher T. Walsh, Roberts & Company Publishers, Greenwood Village, CO, 2005, 576 pp., ISBN 0-9747077-3-2, \$98.00. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* **34**, 461–462 (2006).
63. Mann, M. *et al.* Analysis of protein phosphorylation using mass spectrometry: deciphering the phosphoproteome. *Trends Biotechnol.* **20**, 261–268 (2002).
64. Larsen, M. R., Trelle, M. B., Thingholm, T. E. & Jensen, O. N. Analysis of posttranslational modifications of proteins by tandem mass spectrometry. *BioTechniques* **40**, 790–798 (2006).
65. Zolnierowicz, S. & Bollen, M. Protein phosphorylation and protein phosphatases De Panne, Belgium, September 19–24, 1999. *EMBO J.* **19**, 483–488 (2000).
66. van den Heuvel, R. H. H. & Heck, A. J. R. Native protein mass spectrometry: from intact oligomers to functional machineries. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **8**, 519–526 (2004).
67. Leney, A. C. & Heck, A. J. R. Native Mass Spectrometry: What is in the Name? *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **28**, 5–13 (2017).

68. Heck, A. J. R. & Van Den Heuvel, R. H. H. Investigation of intact protein complexes by mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* **23**, 368–389 (2004).
69. Loo, J. A. Electrospray ionization mass spectrometry: a technology for studying noncovalent macromolecular complexes. *Int. J. Mass Spectrom.* **200**, 175–186 (2000).
70. Heck, A. J. R. Native mass spectrometry: a bridge between interactomics and structural biology. *Nat. Methods* **5**, 927–933 (2008).
71. Sharon, M. & Sinz, A. Studying Protein–Protein Interactions by Combining Native Mass Spectrometry and Chemical Cross-Linking. in *Analyzing Biomolecular Interactions by Mass Spectrometry* 55–79 (John Wiley & Sons, Ltd, 2015). doi:10.1002/9783527673391.ch2.
72. Lössl, P., van de Waterbeemd, M. & Heck, A. J. The diverse and expanding role of mass spectrometry in structural and molecular biology. *EMBO J.* **35**, 2634–2657 (2016).
73. Toby, T. K., Fornelli, L. & Kelleher, N. L. Progress in Top-Down Proteomics and the Analysis of Proteoforms. *Annu. Rev. Anal. Chem. Palo Alto Calif* **9**, 499–519 (2016).
74. Rifai, N., Gillette, M. A. & Carr, S. A. Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility. *Nat. Biotechnol.* **24**, 971–983 (2006).
75. Bantscheff, M., Schirle, M., Sweetman, G., Rick, J. & Kuster, B. Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Anal. Bioanal. Chem.* **389**, 1017–1031 (2007).
76. Urban, P. L. Quantitative mass spectrometry: an overview. *Philos. Transact. A Math. Phys. Eng. Sci.* **374**, (2016).
77. Rebay, I. Multiple Functions of the Eya Phosphotyrosine Phosphatase. *Mol. Cell. Biol.* **36**, 668–677 (2015).
78. Wang, Y. *et al.* The protein tyrosine phosphatase activity of Eyes Absent contributes to tumor angiogenesis and tumor growth. *Mol. Cancer Ther.* (2018) doi:10.1158/1535-7163.MCT-18-0057.
79. Mentel, M. *et al.* WDR1 is a novel EYA3 substrate and its dephosphorylation induces modifications of the cellular actin cytoskeleton. *Sci. Rep.* **8**, 2910 (2018).
80. Ionescu, A. E. *et al.* Analysis of EYA3 Phosphorylation by Src Kinase Identifies Residues Involved in Cell Proliferation. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, (2019).
81. Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* **9**, 671–675 (2012).
82. Jung, S.-K. *et al.* Crystal structure of ED-Eya2: insight into dual roles as a protein tyrosine phosphatase and a transcription factor. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **24**, 560–569 (2010).
83. Rodal, A. A., Tetreault, J. W., Lappalainen, P., Drubin, D. G. & Amberg, D. C. Aip1p interacts with cofilin to disassemble actin filaments. *J. Cell Biol.* **145**, 1251–1264 (1999).
84. Okada, K., Obinata, T. & Abe, H. XAIP1: a *Xenopus* homologue of yeast actin interacting protein 1 (AIP1), which induces disassembly of actin filaments cooperatively with ADF/cofilin family proteins. *J. Cell Sci.* **112 (Pt 10)**, 1553–1565 (1999).
85. Kato, A. *et al.* Critical roles of actin-interacting protein 1 in cytokinesis and chemotactic migration of mammalian cells. *Biochem. J.* **414**, 261–270 (2008).
86. Hanke, J. H. *et al.* Discovery of a Novel, Potent, and Src Family-selective Tyrosine Kinase Inhibitor. Study of Lck- and FynT-dependent T activation. *J. Biol. Chem.* **271**, 695–701 (1996).
87. Dehm, S. M. & Bonham, K. SRC gene expression in human cancer: the role of transcriptional activation. *Biochem. Cell Biol.* **82**, 263–274 (2004).
88. Ishida, T. & Kinoshita, K. PrDOS: prediction of disordered protein regions from amino acid sequence. *Nucleic Acids Res.* **35**, W460-464 (2007).
89. Cooper, J. A., Gould, K. L., Cartwright, C. A. & Hunter, T. Tyr527 is phosphorylated in pp60c-src: implications for regulation. *Science* **231**, 1431–1434 (1986).
90. Zhang, Y., Tu, Y., Zhao, J., Chen, K. & Wu, C. Reversion-induced LIM interaction with Src reveals a novel Src inactivation cycle. *J. Cell Biol.* **184**, 785–792 (2009).
91. Levy, E. D., Michnick, S. W. & Landry, C. R. Protein abundance is key to distinguish promiscuous from functional phosphorylation based on evolutionary information. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **367**, 2594–2606 (2012).
92. Chen, C. *et al.* Representative proteomes: a stable, scalable and unbiased proteome set for sequence analysis and functional annotation. *PLoS One* **6**, e18910 (2011).