

**Laboratory:** Isabel Abreu's Laboratory (PRPlants) at ITQB-NOVA. At PRPlants we are interested in how protein function is regulated and how it impacts the cell metabolism. We study important cellular processes, using plants as models, such as growth regulation, photosynthesis and abiotic stress response.

**Title/Tema:**

***Identification of the E3-ligase mediating phosphoenolpyruvate (PEPC) ubiquitination /  
Identificação da E3-ligase envolvida na ubiquitinação da enzima fosfoenolpiruvato  
carboxilase (PEPC)***

**Supervisor /Orientador:** Isabel A. Abreu (ITQB-UNL, [abreu@itqb.unl.pt](mailto:abreu@itqb.unl.pt))

**Project description:**

The enzyme phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) catalyzes carbon fixation, as bicarbonate, in a pyruvate molecule to produce oxaloacetate. There are two known mechanisms that regulate its activity: activation by phosphorylation, and inactivation by ubiquitination. The phosphorylation process is well described and we know which enzymes are responsible for PEPC phosphorylation and dephosphorylation. The (mono-)ubiquitination was discovered recently and the E3-ligase that does it is unknown. Finding it is the main goal of this project.

In plants, PEPC has an important role as carbon fixation enzyme, in energy production, and in the availability of carbon-scaffolds for amino acid and lipid production. In this work, we will study the photosynthetic PEPC, involved in C4 carbon fixation, in the C4 plant maize.

We will:

Characterize PEPC interactome, using the Yeast Two-Hybrid (Y2H) system and PEPC immunoprecipitation (IP) followed by Mass Spectrometry (MS) for the identification of Co-IPed proteins.

Specifically, for the Y2H experiment, the PEPC gene will be cloned in fusion with a Gal4 protein domain and the construct will be used to transform a yeast library that is expressing maize proteins in fusion with a second Gal4 domain. If PEPC can interact with one of these proteins, the two Gal4 domains can interact, leading to active Gal4 that will allow yeast cells to grow in a selective medium. The resulting yeast colonies will be analyzed to identify PEPC-interacting protein.

For immunoprecipitation, we will use a specific anti-PEPC antibody fused to magnetic beads. These beads will be introduced in a native protein extract from maize, allowing the antibody to bind native PEPC. The beads will then be collected, using a magnet. Since the antibody will bind PEPC, if PEPC is interacting with other proteins, these will also be collected. All recovered proteins will be identified using MS.

**In the end the student will have done, cloning, cell transformation, protein extracts, PAGE, SDS-PAGE, immunoprecipitations, MS. Other common techniques done at the lab may also be used, when needed.**

### **Descrição do Projeto:**

A enzima fosfoenolpiruvato carboxilase catalisa a fixação de carbono, na forma de bicarbonato, produzindo oxaloacetato. A literatura reporta a dois mecanismos de regulação da atividade desta enzima: ativação através da fosforilação; inativação por ubiquitinação da proteína. A fosforilação encontra-se bem caracterizada, conhecendo-se a cinase e a fosfatase responsáveis pela introdução da modificação postraducional. Por outro lado, a ubiquitinação foi descoberta recentemente e desconhece-se qual a E3-ligase que medeia a interação entre a maquinaria de ubiquitinação e a PEPC.

Nas plantas, a PEPC desempenha funções importantes ao nível da fixação de carbono, produção de energia, e produção de esqueletos de carbono para síntese de aminoácidos e lípidos. Neste estudo serão usadas folhas de milho onde a PEPC está envolvida no metabolismo fotossintético onde desempenha um papel primordial na fixação do dióxido de carbono atmosférico.

Neste projeto pretende-se identificar a E3-ligase envolvida na ubiquitinação da PEPC fotossintética de milho. De modo a atingir o objetivo proposto, realizar-se-ão estudos de caracterização do interactoma da PEPC usando dois sistemas: yeast two-hybrid (Y2H) e imunoprecipitação seguida de identificação por espectrometria de massa das proteínas precipitadas.

Resumidamente, no sistema de Y2H o gene da PEPC será clonado em fusão com um domínio da proteína Gal4 e de seguida usado para transformar leveduras. As leveduras a transformar são parte de uma biblioteca de leveduras que têm a capacidade de expressar uma miríade de proteínas de milho em fusão com um segundo domínio da proteína Gal4. Caso a PEPC seja capaz de interagir com alguma proteína contida na biblioteca, os dois domínios da proteína Gal4 ficam suficientemente próximos para tornar a proteína Gal4 ativa e permitir o crescimento da levedura em meio seletivo. Para todas as colónias de levedura que apresentem crescimento, será identificada a proteína que interage com a PEPC.

No segundo sistema, o anticorpo contra a PEPC será imobilizado em esferas magnéticas. As esferas com o anticorpo serão incubadas em extratos nativos de proteínas de folhas de milho, onde a PEPC presente irá interagir com o anticorpo. Em condições nativas, a PEPC manterá também as suas interações com a E3-ligase e outros interatores. Por fim, com a utilização de um magneto as esferas com o complexo anticorpo:antígeno são isoladas do extrato. As proteínas que interagem com o complexo anticorpo:antígeno são depois recuperadas das esferas e identificadas por espectrometria de massa.