

SZAKMAI ZÁRÓ JELENTÉS

K 49491

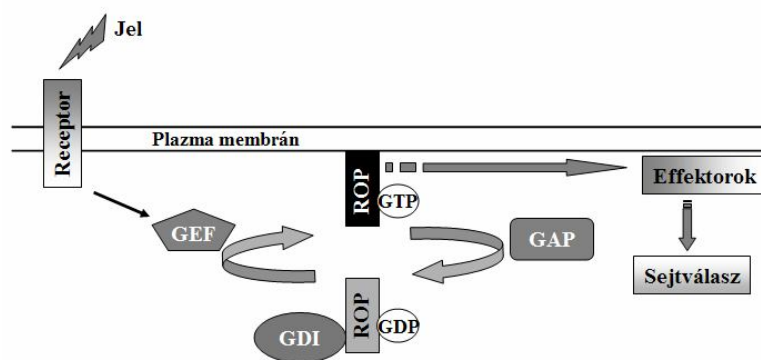
1. A téma megnevezése:

Rho-típusú GTPázokat szabályozó receptor-szerű citoplazmatikus kinázok: egy új jelátviteli kapcsolat növényekben

2. A munka kezdete és befejezése: 2005.01.01-2008.12.31.

3. Háttér, előzmények

A Rho GTPázok a kis molekulatömegű GTP-kötő Ras fehérje szupercsalád tagjai. Ezek a fehérjék molekuláris kapcsolókként működnek: GTP-kötött formában jelátviteli utakat aktiválnak, GDP-kötött formában ez az aktivitásuk megszűnik. A Rho család tagjai specifikusan a sejtvázas dinamikus változásaival kapcsolatos celluláris folyamatokban (sejtmozgás, sejtosztódás, sejtalkalakulások, intracelluláris transzport) vesznek részt. Ezen kívül szerepük van a plazmamembrán NADPH-oxidáz enzim aktiválásában („oxidative burst”) illetve génexpressziós változások elindításában MAP-kináz kaszkádok aktiválásán keresztül. Sokrétű funkciójuk megköveteli, hogy GTP/GDP-kötött állapotuk illetve fehérje-fehérje kölcsönhatásaik szoros szabályozás alatt álljanak. Ennek megfelelően a Rho fehérjék GTPáz ciklusát, és így jelátviteli aktivitását, számos szabályozó (regulátor) fehérje befolyásolja (1. ábra). A szabályozó fehérjéken keresztül érkező jelek az aktív Rho GTPázokról változatos jelátviteli (effektor) fehérjékre kerülnek (1. ábra).



1. ábra A Rho GTPáz ciklus és illeszkedése a jelátviteli rendszerbe. GEF – guanin nukleotid kicserélő faktor; GAP – GTP hidrolízist aktiváló fehérje; GDI – guanin nukleotid disszociáció inhibitor; Rop – növényi Rho GTPáz

A jeltovábbítás specificitását növeli az egyes fehérjék sejt- illetve szövetspecifikus expressziója, intracelluláris lokalizációja. **A növényi Rho (továbbiakban Rop, mint „Rho-of-plants”) fehérjékkal és partnereikkel kapcsolatos jelenlegi ismereteket a közelmúltban egy, az OTKA támogatását is feltüntető, áttekintésben foglaltuk össze és tettük közzé. Ebben elsőként analizáltuk átfogóan az Arabidopsis Rop GTPázokhoz-kapcsolt jelátvitel szereplőinek génextpressziós mintázatát in silico, aminek alapján javaslatot tudunk tenni specifikus jelátviteli hálózatok tagjaira.**

Az eukariótákra jellemző Rho GTPáz család tagjai alapvetően konzervált struktúrával rendelkeznek. A növényi Rop GTPázok azonban az alapvető, evolúciósan konzervált, jellegek mellett is jellegzetesen eltérnek az élesztőben illetve az állatokban leírt rokon fehérjétől és külön családot alkotnak. Az eltérések elsősorban azokat a fehérjerégiókat érintik, amelyek más fehérjékkal (effektorokkal, regulátorokkal) való kapcsolódást teszik lehetővé vagy segítik elő. Ezek alapján feltételezhető, hogy a növényekben, legalábbis részben, eltérő Rho GTPáz-kapcsolt jelátviteli mechanizmusok alakultak ki az evolúció során. Ezt a közelmúlt Rop GTPázokkal kapcsolatos kutatási eredményei alátámasztották. Ezek közé tartoznak az általunk az alábbiakban bemutatott eredmények, melyek a Rop GTPázok és egy növény specifikus kináz család (RLCK VI) tagjai közötti jelátviteli kapcsolatot tárták fel. **Előzetes kísérleteinkben azt tapasztaltuk, hogy lucerna RLCK VI kinázok (RRK1 és RRK2) képesek a Rop GTPázok foszforilációjára in vitro, ezért feltételeztük, hogy funkciójuk a GTPázok aktivitásának szabályozása. Jelen pályázat keretében végzett további kísérleteink azonban ennek az ellenkezőjét igazolták: az RLCK VI kinázok aktivitása függ aktív Rop GTPázokkal való kapcsolatuktól.**

Ezeknek a kutatásoknak a jelentőségét az adja, hogy míg élesztő és állati sejtekben létezik egy jól definiálható domén szerekezettel és specifikus Rho-GTPáz-kötő szekvencia motívummal (PBD vagy „P21-binding domain”; CRIB vagy „CDC42-RAC-interactive-binding motif”) kináz család (PAK vagy „P21-activated kinase”), addig növényekben hasonló szerkezetű kinázokat nem sikerült kimutatni. Ez azért is váratlan eredmény volt, mert a PAK kinázok alapvető szerepet töltenek be mind a sejtíváz szerveződésének, mind a sejtosztódásnak, mind génextpressziós változásoknak a szabályozásában élesztő és állati sejtekben. Ehhez járul még az a felismerés, hogy növényekben nincsenek Ras GTPázok sem, amelyek pedig a mitogén jelátvitel központi szereplői állati sejtekben. Így növényekben a Rop GTPázok az egyetlen olyan kis GTP-kötő fehérje család, amelyek teoretikusan részt vehetnek kináz kaszkádok aktiválásában. Erre azonban napjainkig nem volt közvetlen kísérletes bizonyíték. **Ezt a bizonyítékot szolgáltatják azok az in vitro biokémiai kísérleteink, amelyek alapján**

elmondhatjuk, hogy a Rop GTPázok képesek aktiválni egy PBD-domént illetve CRIB-motívumot nem tartalmazó növényi kináz család tagjait.

4. A pályázat célkitűzései

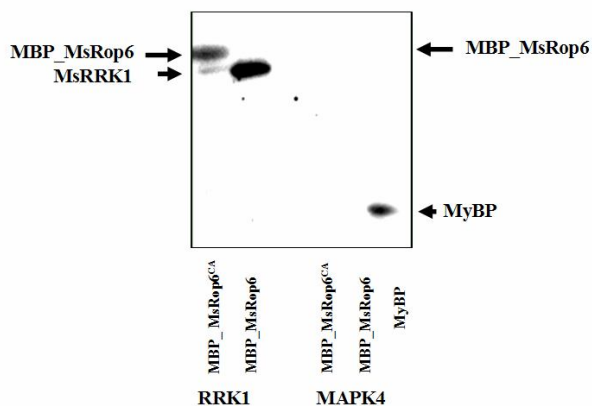
Laboratóriumunkban három különböző lucerna Rop GTPáz cDNS-t azonosítottunk és izoláltunk és jellemeztük, részben jelen pályázat keretei között. Különböző MsRop6 mutáns formákat (domináns pozitív –GTP-kötőtíltetve negatív) állítottunk elő és jellemeztünk, majd fehérje-fehérje kölcsönhatásokat tártunk fel. Jelen pályázat keretében ezeknek a kölcsönható partnereknek a további kutatását tűztük ki célul, különös tekintettel a Rop GTPázokkal kölcsönható receptor-szerű citoplazmatikus kinázok egy családjára (RLCK VI). Előzetes kísérleteink alapján azt feltételeztük, hogy ezek a kinázok a Rop GTPázok „upstream” regulátorai, ezért eredeti célkitűzéseink is ebbe az irányba mutattak.

1. Rho GTPázok foszforilációja RLCK kinázok által, és hatása a Rop GTPázok aktivitására *in vitro* és *in vivo*
2. RLCKVI kinázokkal kölcsönható fehérjék azonosítása jellemzése
3. Arabidopsis RLCKVI gén család expressziós jellemzése
4. transzgenikus növények előállítása, transzgenikus növények jellemzése, funkcionális vizsgálatok, RLCKVI kinázok hatása Rho GTPázok funkciójára *in vivo*

5. Az elvégzett feladatok, eredmények ismertetése a pályázati célkitűzések alapján

1. Rho GTPázok foszforilációja RLCK kinázok által, és hatása a Rop GTPázok aktivitására *in vitro* és *in vivo*

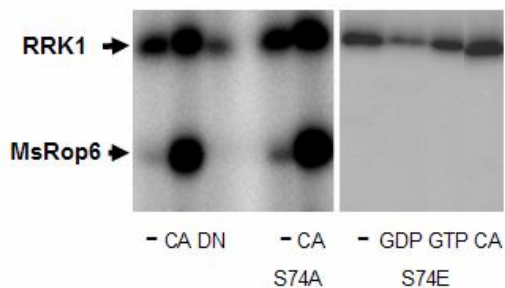
Az élesztő két-hibrid rendszerben korábban azonosított, a konstitutívan aktív MsRop6 (MsRop6CA) GTPázal kölcsönható *Medicago truncatula* RRK1 illetve RRK2 kinázokat bakteriális expressziós vektorokba klónoztuk és megtisztítottuk, hasonlóképpen az MsRop GTPáz fehérjéhez illetve annak mutáns formáihoz. Ezekkel a fehérjékkel *in vitro* kináz reakciókat végeztünk el radioaktív gamma-P32-ATP jelenlétében. Megállapítottuk, hogy mindkét lucerna RRK kináz képes az MsRop6 GTPáz-t foszforilálni, ezzel szemben egy Arabidopsis MAPK illetve egy lucerna RLK nem volt erre képes. Ezek alapján feltételeztük, hogy a Rop GTPáz nem tekinthető egy általános Ser/Thr kináz szubsztrátnak, hanem az RRK típusú RLCK kinázoknak egy specifikus szubsztrátja.



2. ábra. Az RRK1 kináz foszforilálja a maltóz-kötő fehérjéhez (MBP) kapcsolt konstitutívan aktív (de nem a vad típusú) MsRop6 GTPáz, de a MAPK4 kináz nem. Ugyanakkor ez a kináz is aktív, mert képes a mielin bázikus fehérje (MyBP) foszforilációjára. Az RRK1 fehérje autofoszforilációt is mutat.

Kísérleteinket párhuzamosan két irányban folytattuk: 1) a foszforiláció helyének meghatározása; 2) a foszforiláció hatása a GTPáz biokémiai funkciójára.

Ezirányú kísérleteinkben segítségünkre voltak azok az irodalmi adatok, amelyek szerint az állati Rho típusú GTPázok közül a Rac1 illetve a Cdc42 GTPázról is kimutatták, hogy foszforilációs szabályozás alatt is áll. Ráadásul a növényi Rop GTPázok rendelkeznek ugyanazzal a foszforilációs motívummal, amellyel a fent említett állati GTPázok. In silico analízis a kérdéses 74. szerint aminosav foszforilációjának valószínűségét szintén magasra értékelte. Ezért elhatároztuk ennek az aminosavnak a módosítását, és létrehoztuk az S74A nem-foszforilálható illetve az S74E foszforilációt mimikáló MsRop6 változatokat. Az ezekkel a fehérjékkel végzett kísérletek azonban meglepő eredménnyel jártak: az RRK1 kináz képes volt foszforilálni az S74A, de nem volt képes foszforilálni az S74E mutáns GTP fehérjét (3. ábra).

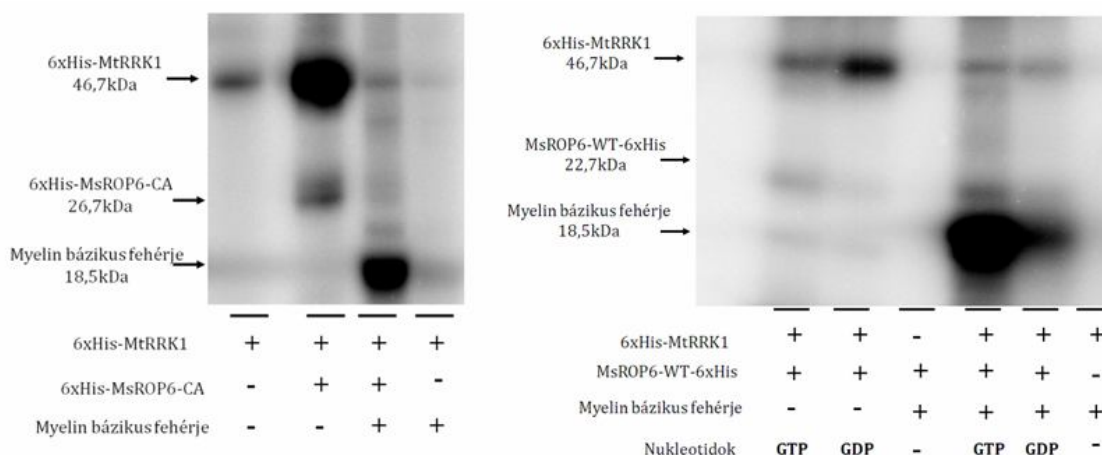


3. ábra Az RRK1 kináz foszforilálja az aktív (CA) S74A de nem az S74E MsRop6 mutáns formát in vitro. – vad típusú GTPáz; CA konstitutív aktív, DN domináns negatív forma; GTP/GDP vad típus GTP vagy GDP jelenlétében.

Nem támasztották alá feltételezéseinket a foszforilált MsRop6 GTPáz fehérje szekvenálásával kapott eredmények sem. Ezekben a kísérletekben tömegspektroszkópiával kíséreltük meg meghatározni a proteáz emésztett foszfo-MsRop6 fehérjéből nyert foszfo-peptidek aminosav sorrendjét. A kapott eredmények nem az S74 aminosav foszforilációját igazolták, hanem kimutatták, hogy a fehérje extrém N-terminálisán jelenlevő szerin aminosavak váltak foszforilálhatóvá. Ez annak volt a következménye, hogy a fehérje tisztításhoz N-terminálisan a GTPáz fehérjéhez kapcsoltunk egy 6xhisztidin (6xHIS) jelölt (tag) és így olyan extra aminosavak kerültek a kérdéses szerin csoportok elé, amelyek elősegítették azok foszforilációs helyként való felismerését az RRK kinázok által (részleteket lásd). Az MsRop6 GTPáz foszforilációja az RRK kinázok által tehát egy kísérleti hibának tekinthető.

Ez a felismerés nem magyarázta meg ugyanakkor, hogy az S74E mutáns esetében ez a szerin csoport miért nem foszforilálódik. Ugyanakkor előtérbe került az a lehetőség, hogy nem a kináz szabályozza a Rop GTPáz, hanem fordítva. További kísérleteinkben ezekre a kérdésekre kerestük a választ.

A 3. ábrán is látható, hogy az RRK1 kináz in vitro aktivitása függ a GTP jelenlététől. Korábban azt gondoltuk, hogy a kináz csak az aktív, GTP-kötött, GTPáz foszforilálja, ugyanakkor természetesen az is lehetséges, hogy a kináz csak az aktív GTPáz aktiválja. Ez utóbbi lehetőséget igazolták a mielin bázikus fehérje, mint általános Ser/Thr kináz szubsztrát, alkalmazásával végzett kísérleteink 4. ábra, illetve részleteként lásd).



4. ábra Az RRK1 kináz csak az aktív (CA vagy GTP-kötött) MsRop6 GTPáz jelenlétében foszforilálja hatékonyan a mielin bázikus fehérjét.

Hasonló eredményeket értünk el az RRK2 kinázzal is. Ezzel tehát igazoltuk, hogy az RRK kinázok feltehetően nem regulátorai, hanem effektor fehérjéi a Rop GTPázoknak. Hogy ezt a feltételezést megerősítsük, bevontunk a vizsgálatokba egyéb kináz illetve Rop GTPáz fehérjéket. Mivel az Arabidopsis genom teljesen ismert, ezért tudjuk, hogy ebben a növényfajban 14 RLCK VI kináz és 11 Rop GTPáz fehérje génje található meg. Ezek mindegyikét megkíséreltük PCR technikával klónozni. Végül 8 Arabidopsis Rop GTPáz és 10 RLCK VI kináz cDNS-ét sikerült így bevonnunk a kísérletekbe. Először egy kölcsönhatási mátrixot hoztunk létre élesztő két-hibrid rendszerben végzett vizsgálatok alapján. Ezek eredményeként megállapíthattuk, hogy a szekvencia hasonlóság alapján két csoportra osztható RLCK VI kinázoknak csak egyik csoportja (RLCK VI_A, kivéve RLCK VI_A7) képes a Rop GTPázokkal való kölcsönhatásra ebben a rendszerben. Ugyanakkor a vizsgált Rop GTPázok mindegyike képes volt erre a kölcsönhatásra, amely erősebb volt az aktív (CA) GTPáz formák esetében. Néhány más RLCK családba tartozó kinázt is bevontunk a vizsgálatokba, ezek sem

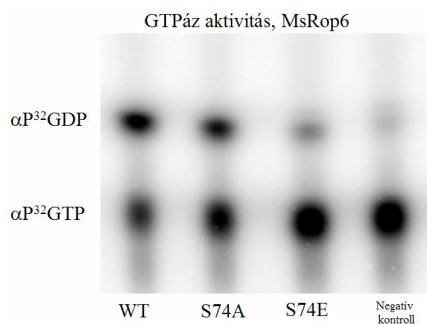
mutattak kölcsönhatást a GTPázokkal. Azt is kimutattuk, hogy a megfelelő lucerna és arabidopsis fehérjék is kölcsön hathatnak egymással. In vitro kináz aktivitásmérésekkel azt is igazoltuk, hogy az Arabidopsis RLCK VI_A, de nem az RLCK VI_B vagy egyéb RLCK, kinázok aktivitása szintén Rop GTPáz függő. Ezekben a kísérletekben is megvolt a fajok közötti átjárhatóság.

A pályázat háttérének ismertetése kapcsán említésre került, hogy az élesztő illetve állati Rho GTPáz-függő kinázok rendelkeznek specifikus Rho GTPáz-kötő doménnel. Ugyanakkor, az RLCK VI kinázokban hasonló szekvencia régió nem ismerhető fel, sőt egyes esetekben a fehérje alig hosszabb, mint a tényleges kináz domén. Érdekes kérdés, hogy ebben az esetben milyen fehérje régiók, szekvencia motívumok lehetnek felelősek a GTPáz kötésért illetve milyen mechanizmus alapján aktiválódhat a kináz? Nyilvánvalóan ezek a mechanizmusok alapvetően eltérnek az egyéb eukariótákban tapasztaltaktól. Ennek megválaszolására lerövidített RRK1 fehérje változatokat termeltettünk az élesztő két-hibrid rendszerben. Azt tapasztaltuk, hogy a Rop GTPázokkal való kölcsönhatás csak nagyon rövid N- illetve C-terminális rövidítést (kb. egy tucat aminosav) tolerál, azaz gyakorlatilag a teljes kináz szekvencia szükséges a hatékony GTPáz kötéshez. Ezért feltételezhető, hogy a kináz több régiójában is vannak a kötésben szerepet játszó aminosavak.

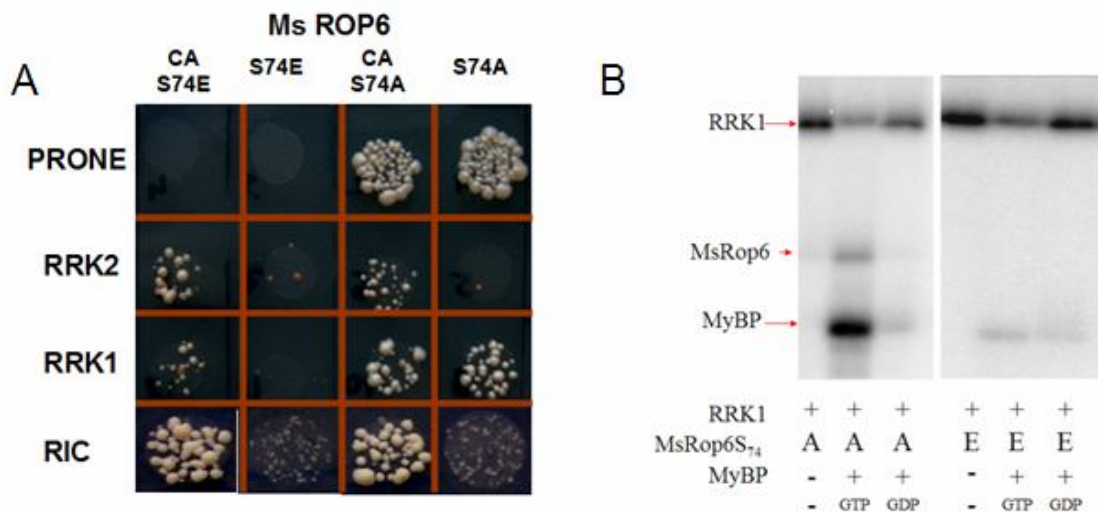
Az élesztő illetve állati Rho GTPázok esetében az is ismert, hogy részben az ún. Rho-inszert régiójuk felelős az effektorok kötéséért és leginkább az aktiválásáért. A Rop GTPázok Rho-inszert régiója eltér az egyéb eukarióta Rho GTPázokétól és a funkciójára vonatkozó adatok sem állnak még rendelkezésre. Ezért módosítottuk az MsRop GTPáznak ezt a régióját: kicseréltük a humán Ras GTPáz megfelelő régiójára (a Ras GTPázoknak nincs Rho-inszert régiójuk, azt a néhány aminosavat helyeztük a Rop GTPázba ami ehelyett található meg a Ras GTPázban, így a térszerkezetet nem tettük tönkre, csak megváltoztattuk). Azt tapasztaltuk, hogy az inszert régió hiánya nem akadályozza meg az RRK1 kinázhoz való kötődést, viszont megakadályozza a kináz aktiválását. Ezek alapján feltételezhetjük, hogy a Rop GTPázok specifikus inszert régiója felelős lehet a specifikus Rop GTPáz effektorok, de legalábbis az RRK kinázok, aktiválásáért.

Ezeknek az eredményeknek a fényében felmerül újra a kérdés, hogy az S74E MsRop6 mutáció esetében miért marad el a GTPáz foszforilációja amikor az S74A mutáció nem okoz ilyen változást? Tudnunk kell, hogy a 74. szerin az ún switch II régióban van, amely egyrészt a GTP kötésben szerepel, másrészt közismerten a Rho effektorok kötési helye. Az S74 aminosav mutációja így közvetlenül hathat a GTPáz aktivitására illetve az effektor kötésre ill.

aktiválásra. Kimutattuk, hogy az S74E, de nem az S74A, mutáció megakadályozza az MsRop6 fehérje GTPáz aktivitását (5. ábra). Továbbá, differenciált módon befolyásolja regulátor illetve effektor fehérjék kötődését/aktiválását (6. ábra). Az S74E mutáció kombinálva a domináns pozitív CA mutációval nem befolyásolja a növényi CRIB- motívumot tartalmazó adaptor fehérjék (RIC vagy Rop-interacting CRIB-domain containing protein) illetve az RRK kinázok kapcsolódását, de megakadályozza a GTPáz pozitív regulátorának a PRONE domént tartalmazó GEF fehérjének a kötődését. Ugyanakkor az RRK kinázokat sem képes aktiválni (6.ábra). Mindezek alapján feltételezhető, hogy a Rop GTPázok konzervált 74. szerin aminosav csoportja valóban egy potenciális foszforilációs szabályozó hely, hasonlóan az állati Rho GTPázok hasonló pozíciójú szerin csoportjához, de, mint korábban láttuk, foszforilációját nem az RRK kinázok végzik el. A Rho GTPázok foszforilációs szabályozása részleteinek feltárása további kutatásokat igényel.



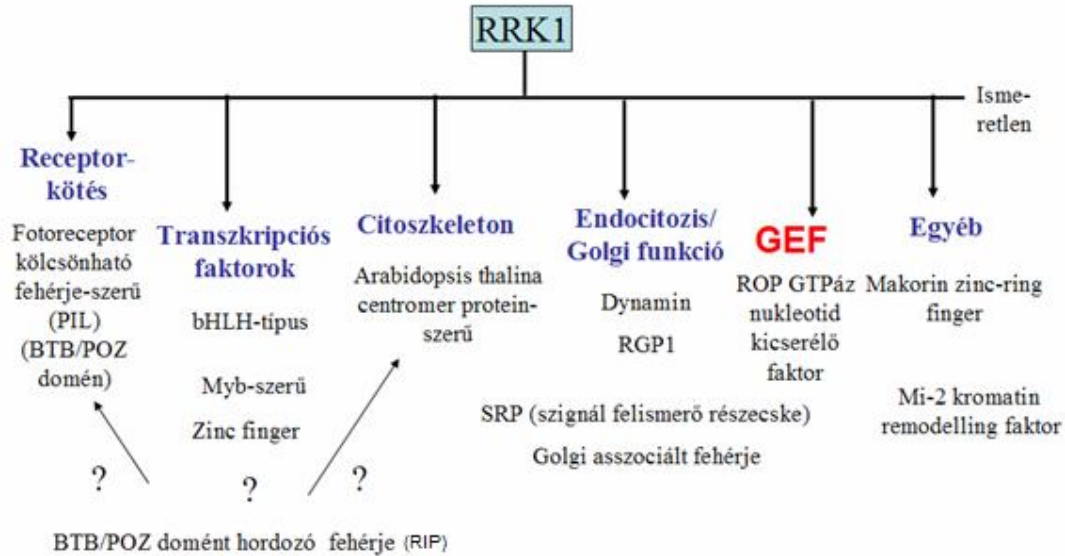
5. ábra MsRop6 és mutáns formáinak (S74A ill. S74E) in vitro GTPáz aktivitása



6. ábra MsRop6 S74 mutánsok élesztő két-hibrid fehérje-fehérje kötése (A) illetve in vitro RRK kináz aktiválása (B). A) A szelektív körülmények között kolóniát képző, a jelzett fehérjéket együttesen termelő, élesztők fehérje-fehérje kölcsönhatást jeleznek. B) Az MsRopS74A mutáns képes az RRK kinázt aktiválni, az S74E mutáns nem.

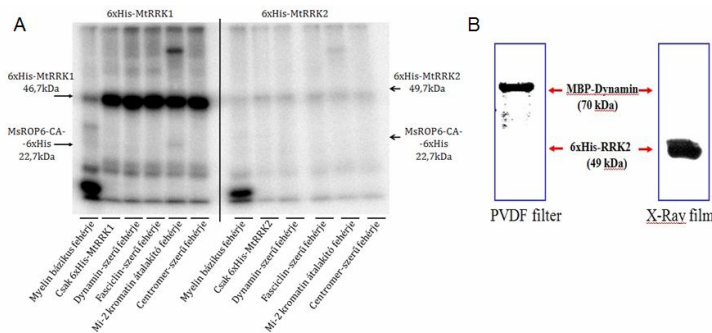
2. RLCKVI kinázokkal kölcsönható fehérjék azonosítása jellemzése

Az RRK1 kinázzal újabb élesztő két-hibrid szűrést végeztünk, a jelátviteli hálózat további elemeinek azonosítására. Számos potenciális partnert azonosítottunk (7. ábra).



7. ábra A lucerna RRK1 kináz élesztő két-hibrid rendszerben azonosított potenciális partnerei.

Első közelítésben néhány kiválasztott fehérjét baktériumokban megtermeltettünk és megvizsgáltuk, hogy szubsztrátjai-e az RRK1 kináznak. Csak egy kiválasztott fehérje, egy potenciális kromatin módosító faktor (Mi-2) esetében tudtuk ezt igazolni (8. ábra). Egy részleges dynamin fehérje esetében a foszforilációt nem, de az in vitro kölcsönhatást ki tudtuk mutatni (8. ábra).

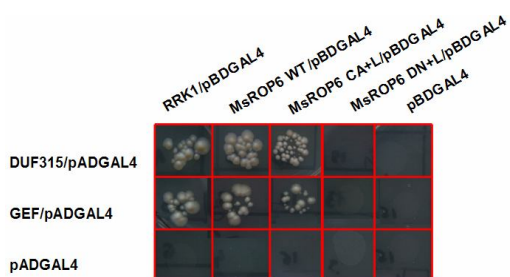


8. ábra Potenciális RRK1 kölcsönható/szubsztrát fehérjék tesztelése kináz esszében (A) illetve in vitro kölcsönhatásban.

Továbbiakban a fotoreceptor kölcsönható fehérjét (PIL) és egy másik BTP/POZ domént tartalmazó fehérjét (RIP) is megvizsgáltuk, abban a reményben, hogy egy potenciális receptort is azonosíthatunk rajtuk keresztül. Első megközelítésként a RIP fehérjét termeltettük, tisztítottuk, illetve a fehérjével szemben ellenanyagot is készítettünk. Részletes vizsgálataink azonban nem igazolták egyértelműen az RRK2 kinázzal való kapcsolatot, és nem bizonyult RRK2 kináz szubsztrátnak sem. A PIL fehérjét kódoló cDNS-t több próbálkozás után sem sikerült teljes hosszúságban előállítani, így ezzel a fehérjével sem foglalkoztunk tovább.

Az RRK1 kölcsönható fehérjék között szerepelt egy ismeretlen funkciójú, DUF315 domént tartalmazó fehérje is. Időközben két kutatócsoport is megállapította, hogy ez a domén növényi Rop GTPáz-specifikus nukleotid kicserélő (GEF) aktivitással rendelkezik és elnevezték PRONE („plant Rop GTPase nucleotide exchange”) doménnek. A Rop GTPázokkal való kölcsönhatást kimutattuk az azonosított lucerna RopGEF esetében is (11. ábra), illetve azonosítottuk az eddig ismert lucerna RopGEF fehérje géneket és meghatároztuk expressziós mintázatukat. A RopGEF aktivitás mérésére is több próbálkozást tettünk, de eddig technikai okok miatt nem jártunk sikerrel.

Ez a felfedezés kutatásaink középpontjába helyezte ezt a fehérjét, hiszen egyrészt egy „upstream” Rop GTPáz regulátor, másrészt a Rop GTPáz effektor RRK kináz kölcsönható partnere. Ez egy potenciális visszacsatolási körre utal. Bár ez alapján a PRONE/GEF fehérje RRK általi foszforilációja lenne várható, ezt in vitro kísérleteink nem tudták igazolni sem a teljes hosszúságú, sem részleges RopGEF fehérjék esetében.



11. ábra Lucerna DUF315 domén illetve a domént hordozó GEF fehérje kölcsönhatása az RRK1 kinázzal és Rop GTPáz formákkal és az ezzel kapcsolatos két hibrid rendszerben. A kolóniák növekedése kölcsönhatást jelez.

A RopGEF fehérjék funkcionális vizsgálatát transzgenikus lucerna növények előállításával illetve Arabidopsis mutánsok bevonásával kívánjuk vizsgálni, amely kísérletek elkezdődtek és további támogatás függvényei.

Meg kell itt jegyeznünk, hogy sikerült együttműködést kezdeményeznünk azzal anémet kutatócsoporttal, akik a PRONE domént illetve biokémiai aktivitását elsőként leírták (Antje Berken, Dortmund, Max Planck Institute of Molecular Physiology). Az együttműködés

kölcsönös előnyökön alapul: a dortmundi laboratórium nagy tapasztalatokkal rendelkezik fehérje szerkezet vizsgálatok terén, így elkezdtek számunkra a Rop/RRK komplex kristályosítását és szerkezet meghatározását a két fehérje kapcsolódásának és a kiná aktiválásának mechanizmusába engedhet bepillantást. A csoportjuk kutatásának középpontjában állnak továbbá a GEF fehérjékhez kapcsolódó, azokat potenciálisan foszforiláló transzmembrán receptor kinázok. Ezek biokémiai aktivitását mi vizsgáljuk laboratóriumunkban.

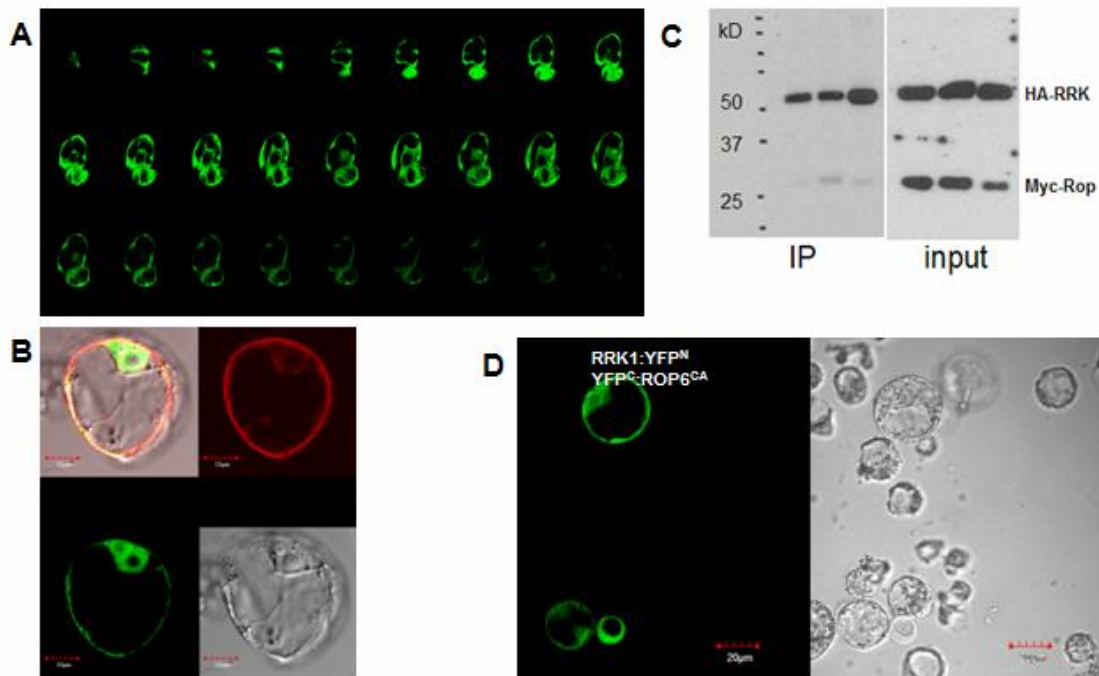
3. Arabidopsis RLCKVI gén család expressziós jellemzése

Az Arabidopsis genom 14 RLCK VI kináz génjét tartalmazza. Ezek biológiai funkciójáról semmit sem tudunk. Ezzel kapcsolatban elsődleges információkat nyerhetünk a kinázok expressziós mintázatának vizsgálatából. A valószerű kvantitatív RT-PCR (RT-qPCR) technika alkalmazásával meghatároztuk a kináz gének relatív kifejeződési mintázatát különböző növényi szervekben illetve biotikus stresszhatásoknak valamint hormon kezeléseknél kitett csíranövényekben. Megállapítottuk, hogy a kinázok kifejeződése a szervekben változatos mintázatot mutat, számos esetben komplementer, illetve vannak stressz által erőteljesen és alig befolyásolt génkifejeződést mutató RLCK kinázok. Ez változatos biológiai funkciókra utal. Elvégeztük az Arabidopsis in silico mikroarray hibridizációs adatok elemzését is, de ezekbe a vizsgálatokba bevontunk minden ismert Rop GTPáz jelátvitelben szerepet játszó fehérje gént. Sikerült olyan kifejeződési mintázatokat megállapítanunk ami alapján ezek a fehérjék egy-egy jelátviteli láncba rendezhetőek.

4. Transzgenikus növények előállítása, transzgenikus növények jellemzése, funkcionális vizsgálatok, RLCKVI kinázok hatása Rho GTPázok funkciójára *in vivo*

Több stratégiát is követtünk transzgenikus növények előállítására, ezek egy része azonban nem bizonyult sikeresnek. Az MBP-taggelte RRK1 kináz konstitutív túltermeltetése transzgenikus dohány növényekben valószínűleg letális lehetett, mert nem kaptunk transzgenikus növényeket, szemben a kontrol kísérletekkel. Így az RRK kináz Rop GTPáz *in vivo* kölcsönhatást transiens expressziós rendszerekben teszteltük.

Arabidopsis protoplastokat transzformáltunk különböző RRK kináz/Rop GTPáz konstrukciókkal és vizsgáltuk a jelölt fehérjék lokalizációját, kölcsönhatását (12. ábra).

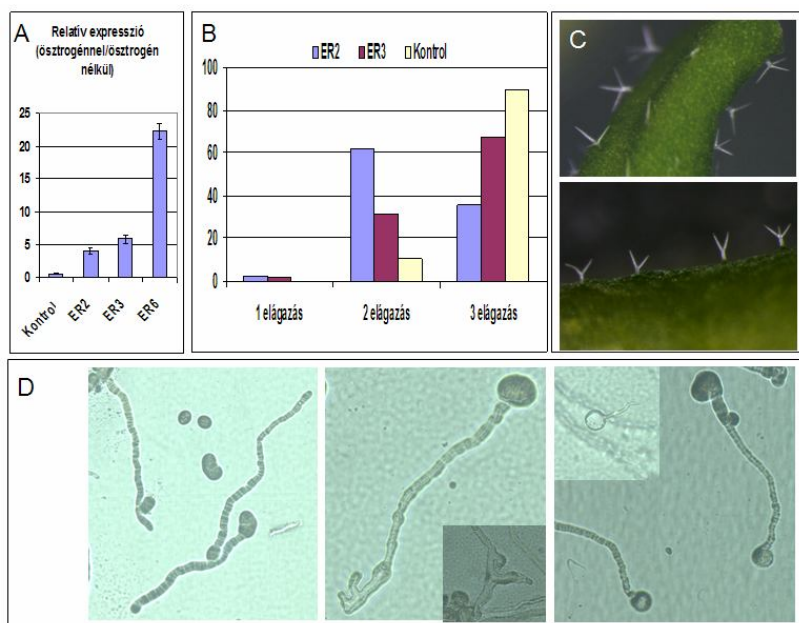


12. ábra RRK-Rop kapcsolat vizsgálata tranziens expressziós rendszerben, Arabidopsis protoplasztokban. A) GFP-RRK1 kináz citoplazmatikus lokalizációja transzfektált sejtek optikai szeleteiben. B) CFP-ROP^{CA} (piros) és YFP-RRK1 (zöld) ko-lokalizációja a sejt membrán-közeli régiójában (narancs sárga). C) HA-epitóppal taggelt RRK1 kináz immunprecipitációja (IP) Myc-taggelt MsRop6 WT, CA, DN (jobbról balra) GTPázal transzfektált protoplasztokból. D) Bimolekuláris fluoreszcencia komplementáció YFP^C-MsRop6^{CA} és RRK1:YFP^N fehérjék között.

Az RRK1 kinázok növényi fejlődésre gyakorolt hatásának vizsgálata céljából Arabidopsis növényeket transzformáltunk az Arabidopsis RLCK VI_A2 (AtRRK1) kináz cDNS konstrukciójával. Mivel a konstitutív promotérral nem jártunk sikerrel, ösztrogén-indukálható promotérral vezérelt génkonstrukciót hoztunk létre. Mivel kinázok esetében a túltermelés gyakran nem okoz fenotípust (pl. a ko-faktor, mint a Rop GTPáz, túltermelésének hiányában) ezért nagyobb hangsúlyt fektettünk az RNS interferencia (RNAi) konstrukciókra, amelyek a géneket kikapcsolják. Ebben az esetben is az ösztrogén indukálható promotert használtuk. In silico olyan rövid cDNS szakaszokat azonosítottunk, amelyek egy-egy RLCK VI gént specifikusan kapcsolnak ki. Így az alábbi RNAi transzformánsokat hoztuk létre: *rlckVI_A1*, *rlckVI_A2*, *rlckVI_A3*, *rlckVI_A4*, *rlckVI_A5*, *rlckVI_A6*, *rlckVI_A7*, *rlckVI_B2*, *rlckVI_B3*, *rlckVI_B6*, *rlckVI_B7*. Az RLCK VI_A2 túltermelő növényből a T2, azb RNAi vonalából a T1 generációval rendelkezünk. Jelenleg folyik a homozigóta transzformánsok azonosítása, amelyekkel a részletes vizsgálatokat elvégezhetjük. Eddig még csak előzetes eredményekkel

rendelkezünk. Igazoltuk a túltermelő transzformánsokban az RLCK VI_A2 kináz mRNS szintjének ösztrogén hatására való megemelkedését (13. ábra) és azt, hogy ennek hatása van a levélszőrök morfológiájára (13. ábra). A csökkent elágazást mutató trichomák gyakoriságának megemelkedése a mikrotubulusokkal kapcsolatos sejtvez változásokra utal a transzformánsokban. A transzformáns pollecsövek növekedését is vizsgáltuk in vitro, ösztrogén jelenlétében. Megnövekedett arányban figyeltünk meg abnormális, elágazó illetve gömbszerűen felfúvódott végű pollencsöveket. Hasonló fenotípust okoz konstitutívan aktív Rop GTPázok illetve aktív GEF fehérjék pollencsőben való kifejeztetése.

A Rop GTPázok szerepe a sejtvez szabályozásában és a poláris sejt-növekedésben, így a trichomák morfológiájának alakulásában és a pollencső növekedésében is, jól ismert. Ezért ezek a megfigyelések biztatóak az in vivo RLCK VI_A/Rop kölcsönhatás biológiai jelentősége szempontjából. Hasonlóan biztató az egyik RNAi transzformáns pollencső növekedésének megfigyelése. Ebben az esetben is a pollencső polaritásának az elvesztése volt megfigyelhető ösztrogén jelenlétében.



13. ábra Arabidopsis RLCK VI transzformánsok előzetes jellemzése. A) Esztradiol-indukált RLCK VI expresszió növekedés az RLCK VI A_2 túltermelő transzformánsokban. B) 1,2 illetve 3 elágazással rendelkező trichomák aránya esztradiol kezelt kontrol és transzgenikus (RLCK VI_A2 ER2, ER3) növényekben. C) Esztradiolon nőtt kontrol (fent) és transzgenikus (lent) növény trichomái. D) Pollencső növekedés esztradiol jelenlétében. Balra kontrol, középen RLCK VI_A2 termelő, jobbra RLCK VI_A5 RNAi növény.

A transzformánsok részletes jellemzése meghaladta jelen pályázat időtartamát, de ezeket a vizsgálatokat mindenképpen szeretnénk folytatni és ehhez további támogatást próbálunk elnyerni.

5. Főbb eredmények összefoglalása, kapcsolódó publikációk

Elsőként jellemeztük (cDNS izolálás, térképezés, génexpresszió) három lucerna (*Medicago sativa* L.) Rop GTPáz génjét. Megállapítottuk a gének differenciális expresszióját a gyökérgümő illetve szomatikus embrió fejlődés során. (Szűcs A, Dorjgotov D, Ötvös K, Fodor C, Domoki M, Györgyey J, Kaló P, Kiss GB, Dudits D, Fehér A: **Characterization of three Rop GTPase genes of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Biochimica et Biophysica Acta* (2006) 1759, 108–115. If.: 2.293)**

Az MsRop6 GTPáz domináns pozitív mutánsával végzett élesztő két-hibrid szűrés eredményeként fiatal lucerna gyökérgümőből azonosítottunk két RopGTPáz-kölcsönható kináz (Rop-interacting receptor-like kinase, RRK) cDNS-t. Megállapítottuk, hogy mindkét kináz az RLCK VI kinázcsalád tagja. A lucerna GTPáz és RRK kináz fehérjéket bakteriális rendszerben megtermeltettük és igazoltuk a kölcsönhatást, illetve az RRK kináz specifikus in vitro aktiválását a GTP-kötött (aktív) Rop GTPáz által. Ezek az eredmények az elsők amelyek növényekben igazolják RopGTPázok és kinázok közvetlen funkcionális kapcsolatát, illetve az RRK kinázok az első növényi Rop effektor kinázok. Arabidopsis RLCK VI család tagjainak vizsgálatával megállapítottuk, hogy a Rop GTPáz/RLCK VI kináz kölcsönhatás és in vitro aktiválás specifikus az RLCK VI család egyik alcsaládjára (RLCK VI_A). Meghatároztunk a fehérjéken olyan strukturális régiókat/motívumokat, amelyek a kölcsönhatásban, aktiválásban részt vesznek. (Dorjgotov D, Jurca ME, Dunainé-Fodor C, Szűcs A, Ötvös K, Klement É, Bíró J, Fehér A (2009) **Plant Rho-type (Rop) GTPase-dependent activation of receptor-like cytoplasmic kinases in vitro. *FEBS Letters*, accepted for publication, If.: 3.372)**

Meghatároztuk az Arabidopsis RLCK VI család 14 tagjának génexpressziós profilját különböző növényi szervekben, illetve különféle abiotikus stresszhatások valamint hormonkezelések alatt. Megállapítottuk, hogy a család tagjai változatos génkifejeződési mintázatot mutatnak, ami változatos biológiai funkciókra utal. Korreláltuk a mintázatot a család tagjainak rokonsági fokával. (Jurca ME, Bottka S, Fehér A (2008) **Characterization of a family**

of Arabidopsis receptor-like cytoplasmic kinases (RLCK class VI). *Plant Cell Rep* 27:(4) 739-748 If.: 1.974)

Összefoglaltuk a Rop GTPáz jelátvitelről jelenleg rendelkezésre álló ismereteket. Korrelációt állapítottunk meg a Rop GTPáz jelátvitelhez kapcsolható egyes Arabidopsis fehérjék génjeinek expressziós mintázata között, ezzel meghatározva specifikus Rop GTPáz függő jelátviteliutak potenciális résztvevőit. (Fehér A, Jurca ME, Fodor-Dunai C, Dorjgotov D (2008) Regulation of ROP GTPase Signalling at the Gene Expression Level: A Review. *The Open Plant Science Journal* 2: 37-46, If.:-)

In silico azonosítottuk Medicago RopGEF fehérjék cDNS-eit és specifikus primerek segítségével meghatároztuk expressziós mintázatukat növényi szövetekben. (Dunainé-Fodor C, Fehér A (2008) Investigation of the elements of Rho (Rop) GTPase-depent signalling in Medicago sp.: Identification of Rop guanine nucleotide exchange factors (ROPGEFs) in Medicago truncatula *Acta Biol Szeged* 2008, 52(1):123-125, If.:-)

Azonosítottunk RRK1 kinázzal kölcsönható fehérjéket. Ezek között azonosítottunk egy RopGEF fehérjét, amely a Rop GTPázok aktiváló faktora. Ezzel egy potenciális, eddig ismeretlen, visszacsatolási kört tártunk fel a Rop GTPázok szabályozásában. (nem publikált, további kutatásokat igényel)

In vitro kísérletekkel megállapítottuk, hogy az MsRop6 GTPáz S74E, foszforilációt mimikáló, mutációja gátolja a GTP hidrolízist és differenciálisan befolyásolja a GTPáz kölcsönhatását regulátorokkal és effektorokkal. (nem publikált, további kutatásokat igényel)

In vivo kísérletekben igazoltuk az RRK kinázok és Rop GTPázok kölcsönhatását. A funkcionális vizsgálatokhoz transzgenikus növényeket hoztunk létre. Kezdeti eredményeink igazolják az RRK kinázok funkcionális szerepét a Rop GTPáz-mediált jelátvitelben, a sejtek morfológiájában és a poláris sejtnevekedésben. (nem publikált, további kutatásokat igényel)

6. Az eredmények értékelése a kutatási terület fejlődésének tükrében, a továbblépés lehetőségei

A Rop GTPázok és kapcsolt jelátviteli hálózatok kutatása napjainkban a növényi molekuláris sejtbiológia homlokterében áll. Ezek a kis molekuláris kapcsolók számos alapvető fejlődési folyamatban (pl. sejtek alakjának, polaritásának kialakulása, fenntartása, sejtosztódás, kórokozó válasz, oxidatív folyamatok szabályozása, szállító elemek differenciálódása, sejtfa szintézis stb.) szerepet játszanak, de a pontos molekuláris mechanizmusok alig ismertek. Csak aközelmúltban kerültek azonosításra azok a potenciális fehérje partnerek, amelyek a Rop GTPázok felé, vagy azokról a sejt egyéb alkotói felé, a jeleket továbbíthatják. Ezek közé a fehérjék közé tartoznak az általunk azonosított RRK kinázok. Bár hasonló kinázokat már azonosítottak a közelmúltban, mi voltunk az elsők akik biokémiai módszerekkel ki tudták mutatni, hogy ezek a kinázok potenciális Rop GTPáz effektorok. Ennek a jelentőségét az adja, hogy bár az élesztő és állati sejtekben hasonló jelátviteli kapcsolatok (Rho GTPáz – kináz) elterjedtek és alapvető fontosságúak, növényekben erre eddig nem volt példa. Felismerésünk új lendületet adhat a Rop GTPázok és a MAPkináz kaszkádok közötti kapcsolat kutatásának növényekben.

Rendkívül izgalmas az a kérdés is, hogy hogyan történik meg az RRK kinázok aktiválása a Rop GTPázok által. Mivel az RRK kinázok növény-specifikusak és teljesen eltérnek más eukarióták Rho GTPáz-kapcsolt kinázaitól, ez a mechanizmus nyilvánvalóan más, mint amit élesztő illetve állati sejtekből ismerünk. Az RRK-ROP komplex kristályosítása, szerkezetének azonosítása fontos lépés lehet akár egy teljes új kináz aktiválási mechanizmus feltárásának. A kötődésben szerepetjátszó aminosav csoportok azonosítása révén akár további potenciális Rop effektor kinázok, fehérjék *in silico* azonosítása is lehetségessé válna.

Érdekes az eredmények evolúciós vonatkozása is. A Rho GTPáz jelátviteli út egyes elemei jellegzetes eltéréseket mutatnak az egyes élőlénycsoportok között. Több esetben előfordul hasonló fehérje domének/motívumok eltérő funkciókra való specializálódása (pl. CRIB motívum) illetve azonos funkciók eltérő domének általi ellátása (pl. GEF/PRONE domének).

Fontos felismerés az RRK kinázok és a RopGEF fehérjék kölcsönhatása, ami egy eddig ismeretlen növény-specifikus Rop GTPáz szabályozó jelátviteli kör feltárásához vezethet.