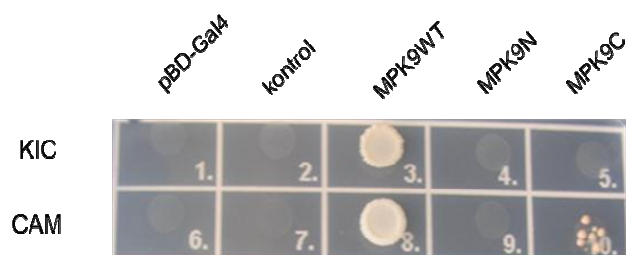


OTKA K69187 zárójelentés 2011

A mitogén aktivált protein kinázok (MAPK) minden eukarióta élőlény univerzális jelátvivő fehérjéi. A kináz család tagjai a növénybiológia kutatásoknak is központi figurái, de annak ellenére, hogy a modell növény Arabidopsisban 20 MAPK ismert, a megjelent publikációk szinte teljes mértékben csak négy-öt MAPK funkcióját taglalják. Munkánk során a növényekre specifikus D típusú MAPK család egy, amitokondriumban lokalizálódó, korábban nem tanulmányozott tagjára, az *AtMPK9*-re fókuszáltunk.

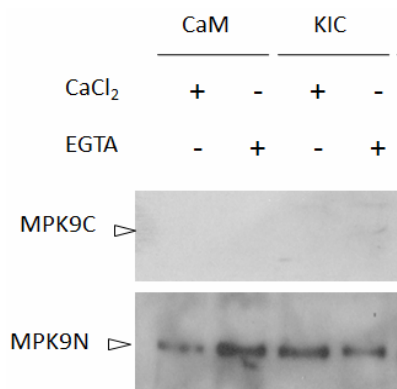
Az *AtMPK9* kölcsönható partnereinek azonosítása:

Munkánk kezdetekor az *AtMPK9* kölcsönható partnerei vonatkozó adat nem volt elérhető a szakirodalomban, ezért első célként a kináz lehetséges kölcsönható fehérjéinek és aktivátorainak élesztő kettős-hibrid rendszerrel történő meghatározását tűztük ki célul. Az azonosított kölcsönható partnerek között az Arabidopsis10 tagú MAPK kináz (MAPKK) családjának egyetlen tagját sem találtuk. Dóczy Róbert személyes közlése alapján ismertté vált számunkra, hogy a laboratóriumukban kivitelezett protoplaszt transziens expressziós kísérletek hasonló eredményre vezettek, miszerint egyetlen MAPKK sem aktiválja az *AtMPK9*-t. Ezek az eredmények a számos, élesztő kettős-hibrid rendszerrel azonosított fehérje közül két olyan fehérjére irányították a figyelmünket, amelyek esetlegesen szabályozhatják az *AtMPK9* aktivitását, nevezetesen a kalmodulinra (CAM) és a KIC fehérjére (KCBP-interacting Ca^{2+} binding protein) egy további kalcium által szabályozott fehérjére. Első lépésként élesztőben erősítettük meg az interakciókat, és azt is vizsgáltuk, hogy az *AtMPK9* mely doménjei szükségesek a kölcsönhatáshoz. Ezekhez a kísérletekhez előállítottuk a csak kinázdomént tartalmazó N-terminális, illetve a csak C-terminális, egyelőre ismeretlen funkciójú domént tartalmazó konstrukciókat. Az eredmények alapján a fehérje-fehérje kölcsönhatásokhoz mind a CAM, mind a KIC esetében szükség van a teljes fehérjére, habár a kalmodulin némi kölcsönhatást mutat önmagában a C-terminális doménnel is (1. ábra).



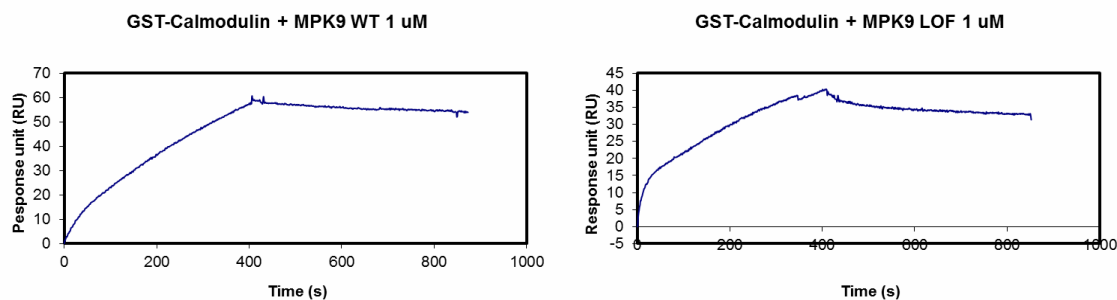
1. ábra

A kölcsönhatás további igazolására fehérje *in vitro* transzlációs vizsgálatokat végeztünk, melynek során az *AtMPK9* C- és N-terminális doménjét 6xHis fúziós formában állítottuk elő, a CAM és KIC fehérjék pedig GST fúziós fehérjeként kerültek termelésre. Ezt követően a CAM és KIC fehérjéket MagneGST ággyal affinitás tisztítottuk, majd *AtMPK9* C- és N-terminális fehérjékkel inkubáltuk. A kölcsönhatásokat 6xHis ellenanyag alkalmazásával igazoltuk. Az eredmények alapján a CAM és KIC fehérjék az N-terminális doménon keresztül lépnek kölcsönhatásba az *AtMPK9*-cel, és a kölcsönhatás kalcium független (2. ábra). Ezek az eredmények ellentmondanak az élesztő kettős-hibrid adatoknak, így további különböző mértékben csonkolt *AtMPK9* változatokkal kívánjuk a kölcsönhatásért felelős régiót meghatározni.



2. ábra

Az *At*MPK9-CAM asszociáció jellemzőit Erdődi Ferenc kutatócsoportjának közreműködésével határoztuk meg. A vizsgálatainkhoz *in vitro* transzlációval előállítottunk His₆-MPK9WT és His₆-MPK9LOF (a kináz ATP kötéséhez elengedhetetlen lizin módosításával, *in vitro* mutagenezissel előállított változat), valamint GST-CAM fehérjét. A kötéserősség meghatározásához a GST-CAM fehérjét GST ellenanyaggal fedett lemezen immobilizáltuk, majd ezen His₆-MPK9 fehérjéket Ca²⁺-tartalmú pufferben folytattuk át. A kísérleti eredmények alapján kijelenthető, hogy a CAM vad típusú és az inaktív mutánszhoz is erősen kötődik, a kötés azonban a vad típusú kináz esetében egy nagyságrenddel erősebb (3. ábra).



	KA (1/M)	KD (M)
GST-Cal. + MPK9WT=2 - 1	1,83E+07	5,45E-08

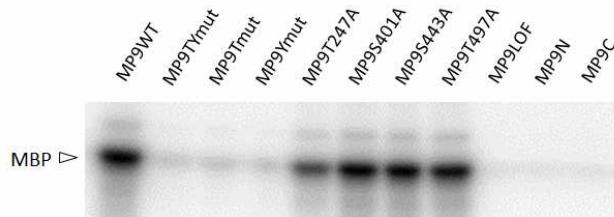
	KA (1/M)	KD (M)
GST-Cal. + MPK9LOF=2 - 1	9,23E+06	1,08E-07

3. ábra

*At*MPK9 *in vitro* kináz aktivitásának vizsgálata:

A funkcionális tanulmányokhoz *in vitro* transzlációval termeltünk *At*MPK9-t és annak különböző *in vitro* mutagenizált változatait. A vad típusú kináz minden további aktiváció nélkül nagy mértékben foszforilálta a mesterséges szubsztrátként alkalmazott mielin bázikus fehérjét (MBP), míg az ATP kötésre képtelen LOF változat nem rendelkezett *in vitro* kináz aktivitással (4. ábra). A kináz C- és N-terminálisan csonkolt változatai ugyancsak elvesztették aktivitásukat (4. ábra). A D típusú MAPK család tagjai az aktivációért felelős T hurokban egy, az általánostól eltérő TDY foszforilációs motívumot

hordoznak. A motívumban található treonin és tirozin szerepének tisztázásához T/A, Y/F, illetve kettős aminosav cseréket hajtottunk végre *in vitro* mutagenézissel. A mutáns kinázok mindegyikének drasztikusan visszaesett a kináz aktivitása, gyakorlatilag a LOF változattal megegyezőnek mutatkozott (4. ábra). Mindezek alapján kijelenthető, hogy a kináz aktivitáshoz elengedhetetlen a C-terminális domén, és a TDY motívum foszforilációja meghatározza a kináz aktivitását. A TDY motívumon történő tirozinfoszforilációt a vad típusú kináz esetében anti-foszfo-tirozin ellenanyag felhasználásával is bizonyítottuk.



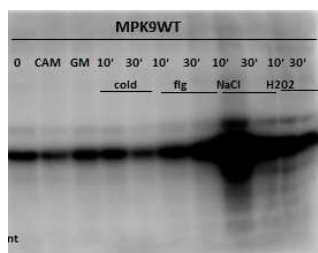
4. ábra

AtMPK9 foszforilációs mintázatának meghatározása:

A kináz és annak mutáns változatai érdekes különbséget mutattak a poliakrilamidgél-elektroforézissel történő elválasztás során, a vad típusú kináz diffúz sávként jelent meg, ezzel szemben mindegyik mutáns határozott vonalat adott. Mindezek alapján feltételeztük a vad típusú fehérjeautofoszforilációját, és tömegspektrometriával, az MTA SZBK proteomikai laboratóriumának segítségével meghatároztuk az *AtMPK9* foszforilációs mintázatát. Várakozásunknak megfelelően a vad típusú kináza T és Y aminosavakon egyaránt foszforilált volt, míg a mutáns változatok egyikében sem azonosítottunk ezeken az aminosavakon foszfát csoportot. Eredményeik alapján nem csak a kináz aktivitásért felelős T hurokban található aminosavak foszforilálódnak, ugyanis a C-terminális doménben is találtunk négy foszfát csoportot hordozó aminosavat (T247, S401, S443, T497). Hasonlóan a T hurokban látottakhoz, ezek az aminosavak is csak a vad típusú kináz esetében foszforilálódtak. A C-terminálisban azonosított foszforilációs helyek mindegyikét külön-külön mutagenizáltuk, és az egyes mutánsok *in vitro* kináz aktivitását meghatároztuk. A mutáns változatok T247A aminosav csere kivételével gyakorlatilag a vad típusú *AtMPK9*-cel megegyező aktivitással rendelkeztek (4. ábra).

AtMPK9 funkcionális vizsgálata protoplasztban:

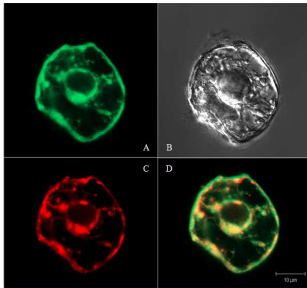
A létrehozott transziens expresszióra alkalmas vektor konstrukciókban a CAM és KIC kalcium-kötő fehérjék C terminális myc jelölést hordoznak, míg az *AtMPK9* és annak *in vitro* mutagenézissel előállított katalitikusan inaktív és csonkolt változatai C terminális HA jelölést kaptak. A konstrukciókkal *Arabidopsis* sejtszuszpenzióból előállított protoplasztokat transzformáltunk és a transzformáció hatékonyságát a megfelelő ellenanyagokkal Western bloton ellenőriztük. Ezt követően az *AtMPK9* aktivitásának indukálhatóságát vizsgáltuk különböző stressz kezelésekkel (5. ábra). Az eredmények alapján a NaCl kezelés növeli leghatékonyabban a kináz aktivitást, így a továbbiakban ezt a kezelést alkalmazzuk a CAM kináz aktivitásra kifejtett hatásának vizsgálatára.



5. ábra

AtMPK9 lokalizációjának vizsgálata:

A korábban publikált tömegspektrometriás analízis eredményei alapján az *AtMPK9* mitokondriumban lokalizálódó fehérje. Ezt az adatot más megközelítéssel is igazolni kívántuk, így egy 35S promóterrel rendelkező tranziens expresszióra alkalmas vektorban *AtMPK9-GFP* konstrukciót hoztunk létre. Az *Arabidopsis* sejtszuszpenzióból előállított protoplasztokat a vektor konstrukcióval transzformáltuk, majd konfokális, fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk. A transzformált protoplasztok mitokondrium specifikus Mitotracker festékekkel történt jelölése megerősítette a korábban közölt eredményt, miszerint az *AtMPK9* mitokondriumban lokalizálódik (6. ábra). Az ábra A paneljén az *AtMPK9*, a B-n a Mitotracker festés, a D-n pedig a két felvétel összeolvasztott képe látható. A B panel a protoplaszt fáziskontraszt mikroszkópos felvételét mutatja.



6. ábra

AtMPK9 specifikus ellenanyag előállítása:

Az *AtMPK9* *in vivo* funkciójának további vizsgálataihoz specifikus ellenanyagot állítottunk elő. A kináz C-terminális doménjét 6x His jelölést biztosító *E. coli* vektorba illesztettük, majd a zárványtestként termelődő fehérjét affinitás kromatográfiával tisztítottuk. Az ily módon nyert fehérjével nyulakat immunizáltunk. A negyedik oltást követő vérszérumot DEAE-AffiBlue oszlopon tisztítottuk, és az ellenanyag specifikusát *in vitro* transzlációval termelt *AtMPK9*-cel Western bloton igazoltuk. Az ellenanyaggal alkalmazásával további vizsgálatok egyelőre nem történtek.

AtMPK9 null-mutáns növények vizsgálata:

A SALK Intézet T-DNS könyvtárából származó *AtMPK9* null-mutáns vonalból előállított homozigótákkal lemezen csíráztatási tesztek végeztünk. Ezek alapján a mutánsok a vad típusal azonos csírázási képességgel rendelkeznek, és nem mutatnak eltérést ozmotikus, só és hideg stressz körülmények között sem.

Mitokondriálisan lokalizált kinázokamplifikálása:

A publikált tömegspektrometriás eredmények alapján 9 protein kináz lokalizálódik a mitokondriumban. A KESTREL vizsgálatainkhoz ezek közül hetet (az 1. táblázatban vastagon jelölve) sikeresen amplifikáltunk DNS könyvtárból. Ezek közül kettőt *in vitro* transzláltunk, de további vizsgálatok egyelőre nem történtek.

At4g23290.1 PPC:1.7.2 Ser/Thrkinase-like protein
At5g14210.1 PPC:1.9.5 Receptor protein kinase-like protein
At3g45420.1 PPC:1.11.1 Receptor-like protein kinase
At1g74360.1 PPC:1.12.4 Putative receptor protein kinase
At2g26330.1 PPC:1.12.4 Putative receptor-like protein kinase
At1g64210.1 PPC:1.13.3 Putative KRR receptor-like kinase
At3g27560.1 PPC:2.1.5 Protein kinase ATN1
At1g69220.1 PPC:4.1.2 Putative STE20/PAK-like protein kinase
At3g18040.1 PPC:4.5.1 <i>AtMPK9</i>

1. táblázat

Fehérje *in vitro* transláció alapuló együttműködések:

Munkacsoportunk hazai és külföldi munkacsoportokkal történő együttműködések keretében mostanra közel száz különböző fehérjét állított elő *in vitro* translációval.

PavlaBinarová, Cseh Tudományos Akadémia Mikrobiológiai Intézete:

γ tubulinfoszforilációs vizsgálata: Az együttműködő munkacsoport korábban igazolta, hogy a γ tubulin elengedhetetlen az acentroszomálistubulinnukleációhoz, és a sejtekből izolált γ tubulin komplexben azonosította az *AtMPK6*-ot. Kollaborációnk célja az *AtMPK6* foszforilációs helyeinek meghatározása. Laboratóriumunk előállítja a kérdéses fehérjéket és *in vitro* kináz reakcióban foszforilálja a tubulint. A fehérjék előállítása megtörtént, a kináz reakciót követő MS analízis a közeli jövőben várható.

Aurora kinázok vizsgálata: Emlős sejtekben igazolt, hogy az Aurora B a retinoblasztoma fehérje posztmitotikusfoszforilációjával gátolja az endoreduplikációt. PavlaBinarová laboratóriumában az Aurora null mutáns és géncsendesített növények az emlős sejteknél látottakhoz hasonló morfológia változásokat mutattak. Munkacsoportunk előállított az Aurora 1 és 3 fehérje kinázokat és az Rb-t is. Az *in vitro* kináz reakciókat elvégeztük, mely alapján a növényi Aurora kinázok nem foszforilálják az Rb-t.

Bögre László, School of Biological Sciences, Royal Holloway University of London és Magyar Zoltán MTA, SZBK:

Növényi sejtciklus szabályozás vizsgálata: Az együttműködő partnerek egy évtizede tanulmányozzák az E2F és DP fehérjékből felépülő transzkripció faktorok sejtciklus szabályozásban betöltött szerepét. Kollaborációnk során azt vizsgáljuk, mely kinázok felelősek az egyes transzkripció faktorok és regulátorok foszforilációjáért. Kísérleteink alapján a CycD3/CDKA komplex az Rb és E2FA fehérjéket, a CycB1/CDKB és CycD6/CDKB komplexek az E2FC fehérjét, míg az *AtMPK6* az Rb és E2FA fehérjéket foszforilálják specifikusan.

Alberto Paccanaro, Department of Computer Science, Royal Holloway University of London:

***In silico* MAPK dokkoló domének *in vitro* verifikációja:** Az angliai munkacsoport mikrocip kísérletekből származó több ezer MAPK szubsztrát szekvenciáját elemezte, és ezek alapján új, feltételezett MAPK dokkoló motívumokat azonosított. Laboratóriumunk 18 reprezentatív fehérje kódoló régióját cDNS könyvtárból amplifikálta és *in vitro* translációs vektorba inszertálta. A translációval előállítandó szubsztrát fehérjéket *in vitro* kináz reakcióban teszteljük.

A zárójelentésben bemutatott eredmények elmaradnak az eredeti munkatervben vázoltakhoz képest. Az elmaradás egyik fő oka, hogy a témán dolgozó PhD hallgató másfél év után közös megegyezéssel távozott laboratóriumunkból, és az általa létrehozott vektor konstrukciók döntő részét újra elő kellett állítani. A nemzetközi együttműködés keretében a hangsúly a KESTREL módszerről átmenetileg áthelyeződött ismeretlen fehérje kölcsönhatások *in vitro* translációval történő azonosítására. Mindezek következtében igényelni szeretnék a pályázat szakmai bírálatának egy-két éven belüli felülvizsgálatát.