Növényi RHO (ROP) GTP-áz aktivált kinázok azonosítása és jellemzése

Doktori (Ph.D.) értekezés

Készítette: DORJGOTOV Dulguun Témavezető: Dr. FEHÉR Attila

MTA SzBK Növénybiológia Intézet Funkcionális Sejtbiológia csoport

> Szegedi Tudományegyetem Természettudományi Kar Biológia Doktori Iskola

> > Szeged 2009

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	4
Bevezetés	6
Irodalmi áttekintés	8
A ROP GTP-ázok	8
A ROP GTP-ázok aminosav-sorrendbeli és térszerkezeti jellemzői	9
A ROP GTP-ázokkal kölcsönható fehérjék	11
A ROP GTP-ázok szabályozófehérjéi	12
A ROP GTP-ázok célfehérjéi	17
Növényi receptorszerű kinázok	25
Az anyagok és módszerek	27
Plazmid tisztítás	27
Különböző MsROP6 változatok előállítása	27
Élesztő-kéthibrid szűrés és élesztő-kéthibrid mátrix vizsgálatok	28
Baktériumban termeltetett fehérjék tisztítása	29
Fehérje azonosítása Western blot módszerrel	31
<i>In vitro</i> kináz reakció	31
Lúdfű protoplasztok transzformálása	32
Valósidejű polimeráz láncreakció	32
Célkitűzések	34
Eredmények és megvitatásuk	35
A ROP GTP-ázzal végzett élesztő-kéthibrid szűrés	35
A MtRRK (ROP-interacting Receptor-like Kinase) kinázok és az MsROP6 GTP-áz közötti kölcsön vizsgálata	ıhatás 38
A ROP GTP-áz-kötő mintázat azonosítása az RRK-on	41
Kölcsönhatások igazolása in vitro kináz reakció által	42
Az MsROP6 foszforilált aminosavának azonosítása MALDI vizsgálattal	47
A GTP-kötött MsROP6 aktiválja az MtRRK kinázokat in vitro	49
Kölcsönhatás specifitásának vizsgálata	52
A kináz bekapcsolásáért felelős mintázat meghatározása	54
Az MtRRK kinázok növényi sejten belüli elhelyezkedésének vizsgálata	57
Génkifejeződés vizsgálat	59
MtRRK2 lehetséges fehérje partnereinek azonosítása élesztő-kéthibrid rendszerben	61
Összefoglalás	65

Köszönetnyilvánítás	66
Thesis of PH.D	67
Introduction	67
Objectives	68
Results and discussion	69
Summary	73
Hivatkozások	74

Rövidítések jegyzéke

<u>R</u> HO protein <u>o</u> f <u>P</u> lant: Növényi RHO GTP-áz fehérje
<u>W</u> ild <u>T</u> ype: "vad" típus
<u>C</u> onstitutive <u>A</u> ctive: Konstitutivan aktív GTP-kötött
<u>D</u> ominant <u>N</u> egative: Domináns negatív
Nem izoprenilálódó, azaz lokalizációs mutáns
Inszerciós régió mutáns: ROP6 Inszerciós régióját kicsereltük a HsRAS megfelelő régiójára
<u>C</u> DC42/ <u>R</u> AC- <u>i</u> nteractive <u>b</u> inding motif: CDC42/RAC fehérje kötő szekvencia motívom
<u>R</u> OP- <u>i</u> nteractive <u>C</u> RIB-containing protein: ROP-pal kölcsönható CRIB hordozó fehérje
<u>G</u> TPase <u>A</u> ctivating <u>P</u> roteins: GTP-bontást gyorsító fehérjék
<u>G</u> uanine nucleotide <u>D</u> issociation <u>I</u> nhibitors: Nukleotidrögzítő fehérjék
<u>G</u> uanine nucleotide <u>E</u> xchange <u>F</u> actors: Nukleotidcserélő fehérjék
<u>P</u> lant specific <u>RO</u> P <u>N</u> ucleotide <u>E</u> xchanger: ROP-GEF fehérje domén
SPIKE1: Dock-szerű ROP-GEF fehérje
<u>D</u> omain of <u>U</u> nknown <u>F</u> unction: Ismeretlen funkciójú fehérje domén
<u>R</u> eceptor <u>t</u> irozin <u>k</u> ináz
<u>R</u> eceptor- <u>L</u> ike <u>K</u> inase: Receptor-szerű szerin/treonin kináz
<u>R</u> eceptor- <u>L</u> ike <u>C</u> ytosolic <u>K</u> inase: Receptorszerű citoplazmatikus kináz
ROP-interacting Receptor-like Kinase: ROP-pal kölcsönható receptor-szerű kináz
<u>p</u> 21- <u>a</u> ktivated <u>k</u> inase1: p21 aktiváló kináz, RAC/CDC42 GTP-áz aktívált kináz
<u>M</u> yelin <u>B</u> asic <u>P</u> rotein: Mielin bázikus fehérje

MBP	<u>M</u> altose <u>B</u> inding <u>P</u> rotein: Maltóz kötő fehérje
NOX	<u>N</u> ADPH <u>ox</u> idáz
RBOH	<u>R</u> espiratory <u>b</u> urst <u>o</u> xidase <u>h</u> omolog: Növényi NOX
ROS	<u>R</u> eactive <u>o</u> xygen <u>s</u> pecies: Reaktív oxigén formák
ARP	<u>A</u> ctin <u>R</u> elated <u>P</u> rotein: Aktin kapcsolt fehérje

Bevezetés

Az állatok és a növények életmódja, szó szerint értve is, "gyökeresen" eltér. Míg az állatok képesek a helyváltoztatásra, addig a növények helyhez kötött életmódot folytatnak. Ennek megfelelően a növények egyedfejlődési programja nyitott. Ez azt jelenti, hogy a program lefutását alapvetően befolyásolják a környezeti hatások. A környezet apró változása is a növényi gének százainak működését változtatja meg, amellyel a szervezet a környezethez igazítja anyagcsere folyamatait és folytonosan zajló fejlődését. Jól tetten érhető a növényi génműködés és a környezet szoros kapcsolata a növényi gének nagy számában és összetételében. Amíg a lúdfű (*Arabidopsis thaliana*) fejlődését és életét körülbelül 25 000 gén működése teszi lehetővé, addig az ember esetében ehhez körülbelül 35 000 gén áll rendelkezésre. Ez az eltérés, figyelembe véve a szervezetek bonyolultsága közötti különbséget, nem túl nagy. De nem csak gének számában, de az egyes géncsaládokat tekintve (tagok száma, család megléte vagy hiányja, domén szerkezete) nagy különbségeket tapasztalunk.

A génállományok kutatásának köszönhetően ma már ismerjük mind az ember, mind pedig a lúdfű teljes génállományának bázissorrendjét. Így azt is megvizsgálhatjuk, hogy a törzsfejlődés során milyen különbségek keletkeztek a növény és az ember (tágabb értelemben véve az állati szervezetek) génállománya között. Munkám szempontjából a leglényegesebbek a sejten belüli és a sejtek közötti jelátvitelt szabályozó gének eltérései. Az emberi génállományban több mint ezer GTP-kötő azaz G-fehérjéhez kapcsolt receptor és több mint harminc G-fehérje génje található. Ezek a sejtosztódástól kezdve a programozott sejthalálon és az immunválaszon át az ioncsatornákig rendkívül változatos folyamatokat szabályoznak. Ezzel ellentétben a lúdfű génállománya alig néhány hasonló gént tartalmaz. A lúdfű genomjában a heterotrimer G fehérjének mindössze egy α -, egy β -, és két γ -alegységét kódoló génjét azonosították [1-4]. Ráadásul az egyetlen klasszikus Gα alegység elrontásának is csak alig vehető észre a hatása [5,6]. Jelentősek a különbségek a jelátvitelben szereplő kis molekulasúlyú GTP-ázok (RAS/RHO) esetében is. A növényekből teljesen hiányoznak a sejtosztódást szabályozó RAS GTP-ázok. A sejtváz szerveződését és a stresszválaszt is befolyásoló RHO GTP-ázoknak az állati sejtekre jellemző három alcsaládja (RAC, RHO, CDC42) helyett pusztán egy alcsaládja létezik növényekben. A növényi RHO GTP-ázok különálló alcsaládot alkotnak, amelynek neve a ROP (RHO proteins of Plant). A ROP GTP-ázok családja több génből áll: lúdfűben 11, rizsben 7, kukoricában 9 ROP GTP-ázt azonosítottak [7-9]. Egyes G-fehérje típusok hiánya gyakran érthető módon együtt jár a kapcsolódó fehérjék ill. fehérje-komplexek hiányával is (pl. a <u>p</u>21-<u>a</u>ktivált <u>k</u>ináz vagyis a PAK1 kinázok hiánya növényekben) [10].

A növények ugyan kevesebb G-fehérjével és kapcsolódó receptorral, viszont annál több receptor-szerű kinázzal (RLK) rendelkeznek [11,12]. A lúdfű génállománya több mint hatszáz eltérő receptor kináz gént tartalmaz, legalább hatszor többet, mint az emberé. Összességében a lúdfű génállománya több mint ezer kináz fehérjét kódol, szemben az ember mintegy 5-600 hasonló fehérjéjével. Hasonló különbséget találhatunk a fehérje lebontásáért felelős gének számában is. A nagyszámú receptor és szabályozó fehérje bonyolult kapcsolatrendszere biztosítja a növényi sejt számára a gyors, rugalmas válaszadás lehetőségét a környezet változásaira.

Kutatásaink során ennek a bonyolult és jórészt még feltáratlan kapcsolatrendszernek egy új részletét kívántuk megismerni egy eddig nem vizsgált növényi kinázcsalád jellemzésével és a ROP GTP-ázokhoz kapcsolódó jelátvitelben betöltött szerepének tisztázásával.

Irodalmi áttekintés A ROP GTP-ázok

A sejten belüli jelátvitel jelentős szereplői az összes eukarióta élőlényben, beleértve a növényeket is, a kis molekulasúlyú GTP-kötő fehérjék, azaz kis GTP-ázok. Ezek a fehérjék kétállású molekuláris kapcsolóként működnek [10,13]. A kis GTP-kötő fehérjék körülbelül 21 kDa molekulatömegűek, GTP-kötő és GTP-bontó képességgel rendelkeznek. Az eukarióták kis GTP-ázai mind a RAS nagycsalád tagjai, amelyek további családokba sorolhatók. Ezekbe a családokba tartozó fehérjék a sejten belül változatos folyamatokat szabályoznak, például a sejtosztódást (RAS), a sejtváz szerveződését (RHO), a membrán-hólyagocskák (vezikulumok) lefűződését (ARF) és összeolvadását (RAB) [13-15]. Az állati RHO GTP-áz család tovább osztályozható a RAC, RHO és CDC42 alcsaládokra. Egyéb eukarióta szervezetekben azonban nincs meg feltétlenül mind a három csoport. Az élesztőgombák például nem rendelkeznek RAC-típusú GTP-ázokkal, a növényekben pedig csak egyetlen, a RAC GTP-ázokhoz közel álló, de azoktól egyértelműen elkülönülő csoport, a ROP (RHO proteins of plants) GTP-ázok csoportja létezik [7,10,16]. Mivel a ROP GTP-ázok valamivel jobban hasonlítanak a RAC GTP-ázokhoz, mint a RHO vagy a CDC42 GTP-ázokhoz, ezért korábban ezeket növényi RAC GTP-ázoknak is nevezték [7,10]. Aminosavsorrendjük alapján a ROP GTP-ázok egyértelműen különböznek a RHO család többi tagjától. Ezek a különbségek teszik lehetővé, hogy a ROP GTP-ázokat rendszertanilag egy különálló alcsaládba soroljuk a RHO családon belül [10,17,18].

Amikor a G-fehérjék megkötnek egy GTP molekulát, valamint amikor azt elbontják GDP-re és szervetlen foszfátra, megváltozik a térszerkezetük. Ez a szerkezeti átrendeződés a fehérjék jelátviteli aktivitásának megváltozásával jár együtt [15,19]. A kis GTP-ázok GTP-kötő alakjukban képesek kölcsönhatni a jelátviteli láncban őket követő célfehérjékkel, azaz az effektor-fehérjékkel. A kölcsönhatás eredményeként az effektor-fehérje működése megváltozik. Ebből következik, hogy a GTP-kötött alak a "bekapcsolt" alakja a G-fehérjéknek. A GDP-kötött alak ezzel szemben nem hat kölcsön a célfehérjékkel, és így nem is továbbít jeleket, azaz "kikapcsolt" alaknak nevezhetjük. A ROP GTP-ázok tehát, hasonlóan a RAS nagycsalád többi tagjához, kétállású molekuláris kapcsolóként alakjukat váltogatva kapcsolnak be és ki jelátviteli útvonalakat.

A ROP GTP-ázok aminosav-sorrendbeli és térszerkezeti jellemzői

A növényi ROP GTP-ázok története 1993-ban kezdődött, amikor megtalálták az első növényi kis G-fehérjét a kerti borsóban. Azóta már a ROP GTP-áz alcsalád több képviselőjét is azonosították a szárazföldi növények (*Embryophyta*) különféle csoportjaiban, például mohákban, nyitvatermőkben, egy- és kétszikűekben [8,20]. A ROP GTP-ázok öt jellegzetes fehérjerészlete (G1-G5) nagyon hasonlít az állatok és az élesztőgomba RHO GTP-ázainak megfelelő fehérjerészleteihez (1. ábra). Ezek a részek felelősek a GTP-/GDP- kötésért, valamint a GTP-hasításért. A GTP molekula α és β foszfátcsoportja szorosan kapcsolódik a fehérje G4 és a G5 részletének aminosavoldalláncaihoz. A γ -foszfát és a Mg²⁺ viszont a G2 és G3 részlet aminosav-oldalláncaival teremt kapcsolatot. A G1-ben található G15 glicin és a G3-ban található Q64 glutamin a GTP hasításában nélkülözhetetlenek. Elrontásuk a GTP-t elbontani és elengedni képtelen, ezért kikapcsolhatatlan CA (<u>C</u>onstitutive <u>A</u>ktive) mutáns fehérjét hoz létre. A G1-ben levő T20 treonin vagy a G4-ben található D121 aszparaginsav elrontása viszont a GTP-kötés elvesztéséhez vezet, ami csak GDP kötésére képes, ezért bekapcsolhatatlan DN (<u>D</u>ominant <u>N</u>egative) mutánst eredményez.

A ROP GTP-ázok "swich II" részlete után található egy jellegzetes "SYR" mintázat [8,20,21] Számítógépes elemzés szerint ezt a mintázatot szerin/treonin kinázok képesek felismerni és foszforilálni. Kimutatták, hogy a ROP GTP-ázok jelen vannak a receptor kinázokhoz kapcsolódó egy nagy molekulakomplexben a plazmamembrán belső felszínén [22,23]. A ROP GTP-ázok foszforilációs szabályozásáról azonban még nincs kísérleti adat.

Különleges jelentősége van az úgynevezett RHO/ROP-huroknak, vagyis RHO/ROP inszert régiónak, amely a RAS nagycsaládon belül csak a RHO családban fordul elő és egyes specifikus effektor-fehérjékkel való kölcsönhatásért illetve azok aktiválásáért felelős [24,25]. Ez a hurok a ROP GTP-ázokban rövidebb, mint a többi RHO GTP-ázban.

A ROP GTP-ázok háromdimenziós szerkezetét a lúdfű ROP4 számítógépes modelljén keresztül mutatom be [15,26] (1. ábra). Az ábrán jól kivehető a jellegzetes G-domén szerkezet, amely a következő módon szerveződik: a 6 darab β -redőt 5 darab α -helix, egy α i-helix és egy rövid η 1-helix veszi körül. Az α i-helix a ROP inszert régiójában helyezkedik el (1. ábrán a pirossal karikázott rész). Irodalmi adatok alapján a lucerna

ROP4 (korábbi elnevezésük alapján MsRAC4) modelljében ugyanakkor az inszert régiója nem tartalmaz helixet [27]. A ROP GTP-áz térbeli szerkezete alapján a fehérje felszínén elhelyezkedő néhány aminosav is eltér a RHO GTP-ázokétól (pl. R76, K90, N165).



1. ábra. A ROP GTP-áz aminosav-sorrend és térszerkezeti jellemzői. **(a)** A lúdfű ROP4 (Q38937) aminosav-sorrendjének összehasonlítása az emberi RAC1-gyel (NP_008839), RHOA-val (NP_001655) és CDC42-vel (NP_001034891). **(b)** A lúdfű ROP4-nek az emberi RAC1 szerkezetére alapozott számítógép által generált háromdimenziós szerkezete. Forrása: [26]

Ezek az aminosavak szintén szerepet játszhatnak a ROP GTP-ázokra jellemző kölcsönhatásokban, erről azonban még nincs irodalmi adat [26]. Eddig kevés ROP GTP-áz célfehérjét azonosítottak kísérletesen, emellett a lúdfű génállománya is csak néhány állati illetve élesztő célfehérje megfelelőjét kódolja. Mindez arra utal, hogy a ROP GTP-ázok jellegzetes növényi célfehérjékkel hathatnak kölcsön. A ROP GTP-ázok alcsaládja több génből áll: lúdfűben 11, rizsben 7, kukoricában 9 ROP GTP-ázt azonosítottak [7-9]. A ROP GTP-ázok aminosav sorrendje nagyon hasonló. Ebből arra lehet következetni, hogy a család tagjai nem túl régen génsokszorozódással jöhettek létre [8]. Különbségek azért természetesen vannak a ROP GTP-ázok aminosav

sorrendjében, amelyek alapján a zárvatermők ROP GTP-ázai négy csoportra oszthatók [7,9,10]. Az még nem tisztázódott, hogy a négy csoport ezen felosztásnak megfelelően működésre nézve is elkülönül-e, de már ismert olyan aminosavsorrend-beli különbség, amelynek szerepe lehet a működésben. Ez a különbség legjelentősebb a ROP GTP-ázok karboxi végén található az úgy nevezett variábilis régióban (HVR, <u>hypervariable region</u>) [28-31]. A RHO GTP-ázok a plazmamembrán és a sejtplazma között ingáznak, amit aktivációs körnek nevezünk. Irányítottan megnyúló sejtekben kimutatták, hogy a ROP GTP-ázok csak a plazmamembrán egyes kijelölt területein fordulnak elő. Ezt a fehérje karboxi végén elhelyezkedő erősen bázikus természetű fehérje részlet és az ehhez kapcsolódó CaaX prenilálási felismerőhely határozza meg [32]. Prenilálhatatlan ROP GTP-áz molekulák nem képesek а plazmamembránhoz kötődni, és így működésképtelenek [33-35]. Meg kell azonban jegyezni, hogy három lúdfű ROP GTP-áz (AtROP9, 10, 11) nem rendelkezik CaaX felismerőhellyel. Ezeknek a GTP-ázoknak a plazmamembránhoz való kötődése nem prenilálástól, hanem a bázikus részlethez kapcsolódó palmitoil-csoporttól függ [29]. A meglévő CaaX felismerőhely sem eredményez azonban teljesen azonos sejten belüli elhelyezkedést. A lúdfű ROP7 és ROP8 GTP-áz, a ROP2, ROP4 és ROP6 fehérjékkel ellentétben [36,37], például gyökérszőrsejtekben nem kötődik a plazmamembránhoz és nem vesz részt azok irányított megnyúlásának szabályozásában [29]. Lehetséges, hogy a ROP GTP-ázok sejten belüli elhelyezkedése több módon is szabályozódik, akár sejttípustól függően is.

A ROP GTP-ázokkal kölcsönható fehérjék

A kis GTP-ázokkal kölcsönható fehérjéket két fő csoportra oszthatjuk. Az egyik csoportba tartozó fehérjék működését a ROP GTP-ázok módosítják, a másik csoport tagjai viszont a ROP GTP-ázok működését befolyásolják. Az első csoport célfehérjékből, azaz effektor-fehérjékből áll. Ezek kizárólag a ROP GTP-ázok GTP-kötött alakjával hatnak kölcsön, ezáltal megváltozik a működésük. A másik csoporthoz tartozó fehérjék viszont a GTP-ázok állapotát szabályozzák. Ezek a szabályozók a ROP GTP-ázok GTP/GDP-kötött állapotát vagy a GTP-ázok sejten belüli elhelyezkedését befolyásolják. Ugyanebbe a csoportba sorolhatók azok a fehérjék is, amelyek a jelátviteli láncban közvetlenül a ROP GTP-ázok előtt találhatók, mint például a receptor fehérjék, mivel ezek közvetlenül vagy közvetve, de szintén befolyásolják a ROP GTP-ázok működését.

A ROP GTP-ázok szabályozófehérjéi

A növényi "hormonok" a növényi egyedfejlődés és a környezeti változásokra adandó válaszok elsőrendű összehangolói. Feltételezhető ezért, hogy a növényi hormonok számos sejtfolyamatban a molekuláris kapcsolók szerepét betöltő ROP GTP-ázok működését is befolyásolják, illetve, hogy a hormonális jelek továbbításában a ROP GTP-ázok fontos szerepet játszanak. A hormonok a ROP GTP-áz gének kifejeződésének szabályozása mellett a GTP-ázok működésére is hatással vannak. A dohány ROP1 (korábbi elnezezés szerint NtRAC1) GTP-áz hatékonyságát az auxin megnöveli, és ez a lépés szükséges az auxinra bekapcsolódó gének kifejeződéséhez [38]. Az abszcizinsav ezzel szemben csökkenti a lúdfű ROP6 aktivitását, amely a gázcserenyílás záródásának feltétele [39]. Hogy milyen úton-módon fejtik ki a növényi hormonok hatásukat a ROP GTP-ázok működésére, nem ismert.

A ROP GTP-ázok szabályozó fehérjéi szerepük alapján három csoportba sorolhatók: GTP-bontást gyorsító fehérjék (GAP-ok; <u>G</u>TPase <u>A</u>ctivating <u>P</u>roteins), nukleotidcserélő fehérjék (GEF-ek; <u>G</u>uanine nucleotide <u>E</u>xchange <u>Factors</u>) és nukleotidrögzítő fehérjék (GDI-k; <u>G</u>uanine nucleotide <u>D</u>issociation <u>I</u>nhibitors) [40]. A GAP és GDI fehérjék a GTP-ázokat alapvetően a GDP-kötött, kikapcsolt formába juttatják, illetve ott tartják, megakadályozva ezzel a jelátvitelt. Ezzel szemben a GEF-ek a GDP elengedését elősegítve a GTP-kötést serkentik és ezzel bekapcsolják a GTP-ázokat. A GTP-ázok jelátviteli aktivitását összességében a GDP- illetve GTP-kötött változatok aránya határozza meg.

A ROP-GAP fehérjék

Minden GTP-áz rendelkezik kismértékű saját GTP-bontó képességgel, amit azonban a GAP fehérjék képesek jelentősen felgyorsítani. Ezt úgy érik el, hogy egy átmeneti állapotot hoznak létre, amelyben egy vízmolekulát olyan helyzetben rögzítenek, hogy az meg tudja támadni a γ-foszfát csoportot [41-45].



2. ábra A ROP GTP-ázok szabályzásának sematikus ábrázolása. A ROP GTP-ázok kizárólag GTPkötött állapotukban, vagyis "aktív" formában képesek továbbítani jeleket célfehérjéik, azaz az effektor fehérjék irányába. A RLK receptorszerű kinázok továbbítják a kívülről érkező jelet a ROP-GEF-ek felé. A ROP-GEF-ek egy specifikus domént hordoznak amit PRONE-nak hívnak. A SKIPE1 egy növényi Dock-szerű ROP-GEF fehérje. A ROP-GEF-ek "aktiválják" a ROP GTP-ázokat azáltal, hogy a kötött GDP GTP-re való kicserelődését felgyorsítják. A ROP-GAP-ok viszont felgyorsítják a GTP hidrolizísét, így "inaktiválják" a ROP GTP-ázokat. A ROP-GDI-k megkötik a GDP-kötött ROP GTPázokat és megakadályozzák a GDP GTP-re történő kicserelődését. Forrása: [26]

A GAP fehérjék felgyorsítják a GTP hidrolízisét. A GAP működéséhez nélkülözhetetlen egy, a GAP aktív centrumában levő arginin oldallánc. A ROP kölcsönhatók közül a ROP-GAP fehérjék a legismertebbek. A lúdfűben a ROP-GAP család 6 tagját azonosították [46,47]. A ROP-GAP-ok doménszerkezetük alapján különlegesek a RHO család összes ismert GAP fehérjéi között, mivel a GAP domén közvetlen közelében egy CRIB mintázat is található. A CRIB (<u>CDC42/RAC-interactive b</u>inding motif) mintázat az állatoknál kizárólag a RAC és a CDC42 GTP-ázok effektorfehérjéiben található meg. *In vitro* kísérletekkel kimutatták, hogy a ROP-GAP1 valóban gyorsítja a GTP bomlását. Ezen kívül bebizonyították, hogy a CRIB mintázat nélkülözhetetlen a ROP GTP-áz kötéséhez és a GAP aktivitáshoz is [47].

Milyen élettani szerepe lehet a ROP-GAP-ok CRIB mintázatának? Ezzel kapcsolatban két elképzelés létezik. Az egyik szerint a CRIB mintázat úgy segíti elő a GTP bomlását, hogy megnöveli az átmeneti állapot élettartamát. A másik szerint, amíg a CRIB mintázat megköt egy ROP molekulát, addig a GAP domén kikapcsol egy másikat. Másszóval egyetlen egy ROP-GAP egyszerre több ROP GTP-ázt köt.

A lúdfűben már kimutatták, hogy oxigénhiány közben a ROP-GAP-ok egy negatív visszacsatolásos rendszer elemeként működnek [48]. Az oxigénhiányos körülmények között egy ismeretlen ROP GTP-áz a NADPH oxidáz (NOX) enzim bekapcsolásán keresztül hidrogén-peroxid termelődését indítja meg. A hidrogén-peroxid viszont serkenti az alkohol-dehidrogenáz enzim kifejeződését, amely közreműködik az alkohol lebontásában. A hidrogén-peroxid azonban nem csak az alkohol-dehidrogenáz kifejeződését serkenti, hanem a ROP-GAP-okét is. A ROP-GAP-ok a ROP GTP-ázok kikapcsolásával csillapítják a ROP GTP-ázok által beindított jelátviteli folyamatot. Így mérsékelhetővé válnak az oxigéngyök-felhalmozódás által okozott károk.

A lúdfű génállományában további két géncsaládot találtak, amelyek tagjai az állati RHO-GAP-ok GAP doménjéhez hasonló elemet hordoznak. Az egyik család három tagból álló kis géncsalád. Ezek szerkezete is érdekes, mivel a GAP domén előtt egy PH (<u>P</u>leckstrin <u>H</u>omology) domén is található. A PH doménről tudjuk, hogy 100-120 aminosavból áll és foszfatidilinozitol 3,4,5-trifoszfátot képes kötni. Ez az elem más fehérjékben is megtalálható, például az állati RHO-GAP-okban és RHO-GEF-ekben [49]. A PH domén jelenléte miatt feltételezhetjük, hogy ezen fehérjék működésének vagy elhelyezkedésének szabályozásában a lipid jelátvitelnek fontos szerepe lehet [50]. Továbbra is kérdés azonban, hogy van-e tényleges GAP hatása ezeknek a fehérjéknek. A harmadik ROP-GAP család még kisebb, a lúdfűben csak egy tagja van (At5g61530). Ez a fehérje igazából csak egy GAP doménből áll, többet nem is tudunk róla.

A ROP-GDI fehérjék

A RHO-GDI-k a RHO GTP-ázokhoz kötődve a nukleotidcsere megakadályozásával gátolják a működésüket. A GDI-hez kötött GTP-ázok nem képesek kölcsönhatni célfehérjéikkel, továbbá megváltozik a sejten belüli elhelyezkedésük is: a plazmamembránhoz kötött GTP-áz a sejtplazmába szállítódik (2. ábra) [51,52]. A lúdfű génállományában három, az emlős RHO-GDI-khez hasonló fehérjét kódoló gént találtak. Ezek – az első 50 aminosavat kivéve – nagyon hasonlítanak az állati RHO-GDI-kre.

Lehetséges, hogy a GDI-t használó szabályozórendszer akkor keletkezett, amikor az állatok és a növények törzsfejlődése még nem vált szét. A ROP-GDI és ROP GTP-áz kölcsönhatását igazolták *in vivo* lúdfűben és dohányban is [53,54]. Az emberi RHO-GDI1 aminosav-sorrendjében a 45-ös és 185-ös helyzetben levő aszparaginsav-oldalláncok nélkülözhetetlenek a CDC42-ről történő GDP-leválás gátlásában [55]. Ezek az aminosavak megvannak mindhárom ROP-GDI-ben. A lúdfű ROP-GDI-nek a gyökérszőr növekedést gátló hatását már bebizonyították. A ROP-GDI-k feltehetően a ROP sejten belüli elhelyezkedésének módosításán keresztül fejtik ki hatásukat [56]. Az *scn1* (*supercentipede1*) mutáns lúdfű változatban, amelyben egy ROP-GDI romlott el, a gyökérszőr-sejteknek több csúcsi kinövése fejlődik ki, miközben a vad típusban csak egy. A ROP a vad típusú növényekben csak egy helyen, mégpedig a növekvő gyökérszőr csúcsán fordul elő. Az *scn1* változatban viszont a ROP a sejt teljes felszínén megfigyelhető.

A ROP-GEF fehérjék

Az állati RHO család ismert GEF fehérjéi doménszerkezetük alapján két csoportra oszthatók. Az egyik csoport fehérjéiben a PH domén mellett egy DH (Dbl Homology) domén is van [57]. Az ismert növényi génállományok átvizsgálása során azonban eddig DH domént tartalmazó fehérjét kódoló gént nem találtak. A másik RHO-GEF család jellegzetessége az, hogy két Dock homológ régió, azaz DHR (Dock Homology Region) alapján azonosították, ezért tagjait Dock180-nak vagy Dock1-nek nevezték el [58]. A DHR2-es domén önmagában elegendő a RHO GTP-áz kötéséhez és a GDP/GTP nukleotidcsere gyorsításához is [59]. A lúdfű génállománya csak egyetlen egy Dock-szerű fehérjét kódol, a SPK1-et (SPIKE1) [60]. A *spk1* mutáns változatban az aktin és a mikrotubulus-hálózat hibásan alakul ki, ami csíranövény korban halálos. A közelmúltban igazolták az SPK1 fehérje ROP-GEF aktivitását és szerepét az aktin sejtváz szerveződésének szabályozásában a WAVE illetve ARP2/3 fehérje komplexeken (ezen komplexeket később fogom tárgyalni) keresztül [61,62]. Az SPK1 fehérje gyorsítja a GDP-kötött ROP-ok nukleotidcseréjét, ugyanakkor követlenül kölcsön hat a WAVE komplex alegységeivel [61,62].

Egy élesztő-kéthibrid szűrésben egy nukleotid-mentes ROP mutáns változatot használtak fel csaliként, és így bukkantak rá egy jellegzetes növényi géncsaládra, amelynek tagjai képesek a ROP nukleotidcsere gyorsítására [63,64]. Ennek az ún. ROP- GEF családnak eddig a lúdfűben 14 tagját azonosították, melyek mindegyike egy specifikus domént hordoz amit PRONE-nak (<u>Plant specific ROP N</u>ucleotide <u>Exchanger</u>) neveztek el [43-45]. A saját munkánk során mi is találkoztunk ilyen domént (korábbi elnevezés DUF315; Domain of Unknown Function 315) hordozó lucernafehérjével, amiről a dolgozatom "Eredmények és megvitatásuk" részében számolok be. A DUF315/PRONE domén nélkülözhetetlen a ROP-GEF fehérjék által végzett nukleotidcsere gyorsításához [43-45,63]. A domén két oldalán a fehérjék működését szabályozó szakaszok vannak. A növényi ROP-GEF fehérje doménszerkezete nem hasonlít semmilyen eddig ismert GEF-éhez. A ROP-GEF/ROP molekulakomplex röntgenkrisztallográfiás módszerrel meghatározott térszerkezete azonban emlékeztet az állati GEF/RHO-komplex térszerkezetére, ami igazolja a megfigyelt GEF hatást [45,65]. A ROP-GEF-ek növényspecifikus voltát az is alátámasztja, hogy nem fejtenek ki semmilyen nukleotidcserét gyorsító hatást az emberi RAC1-re, ugyanakkor a DH-PH doméneket tartalmazó emberi RHO-GEF-nek, a Tiam1-nek van ilyen hatása az Arabidopsis ROP4-re [63].

A lúdfű ROP-GEF1 pollencsőben való túltermelése irányítatlan növekedést eredményez, amihez hasonlót a konstitutívan aktív (GTP-kötött) ROP CA változat túltermelésekor figyelhetünk meg [64]. Ezt a hatást a ROP fehérje domináns negatív (GDP-kötött) DN változatának egyidejű kifejeztetése elfojtja. A fentiekből arra következtethetünk, hogy a ROP-GEF1 a ROP bekapcsolójaként a jelátviteli láncban azt megelőzően helyezkedik el.

Az állati sejtek leggyakoribb felszíni receptorai az igen változatos, plazmamembránon átnyúló receptor tirozin kinázok (RTK). Ezeknek a receptoroknak fontos szerepük van a sejtek alapvető folyamatainak szabályozásában (pl. sejtosztódás, szöveti differenciálódás, mintázatképzés) [66]. Több RHO-GEF-et is az RTK-k kapcsolnak be [67,68]. Bár az RTK-k hiányoznak a növényekből, van bennük egy óriási géncsalád, a receptorszerű szerin/treonin kinázoké (RLK). Az RLK-k egy nagyon változatos, sejtfelszíni jelfelismerő doménből, egy transzmembrán doménből és egy citoplazmán belüli szerin/treonin kináz doménből állnak. Ezek a kinázok különféle jelátviteli utak szabályozásában vesznek részt (pl. hormonválaszok, kórokozók felismerése, osztódószövet fejlődése, önbeporzás megakadályozása, stb.) [69,70]. A ROP-GEF-eket valójában már korábban is megtalálták egy másik élesztő-kéthibrid szűrés során, amelyet a paradicsom pollenében kifejeződő két RLK-val (LePrk1 és LePrk2) végeztek. A kölcsönható fehérjéket kinázzal kölcsönható fehérjéknek (KPP; <u>K</u>inase <u>P</u>artner <u>P</u>rotein) nevezték el [71]. Akkor még nem tudták, hogy ezeknek a fehérjéknek ROP nukleotidcserét gyorsító hatásuk van. A KPP a LePrk-k kináz doménjével hatott kölcsön, ami arra utalt, hogy a KPP-t a kináz foszforilálja. Ezt a feltételezést *in vivo* igazolták is.

A ROP fehérjék feltételezhetően résztvesznek a CLV1 (<u>Clav</u>ata1) RLK-tól eredő jelek továbbításában is. A CLV1 egy nagy fehérje-komplex része, amely a sejtosztódás és a differenciálódás közti egyensúlyt szabályozza a hajtás-merisztémában [72]. A 450 kDa molekulasúlyú működőképes CLV1 fehérje-komplexen belül eddig csak egy ismeretlen ROP-ot és egy KAPP (Kinase Associated Protein Phosphatase) foszfatázt azonosítottak immunológiai eljárással. A többi alkotórész egyelőre ismeretlen.

A ROP GTP-ázok célfehérjéi

Az aktin sejtvázat szervező célfehérjék

Mind az állati RHO GTP-ázok, mind pedig a ROP GTP-ázok döntő szerepet játszanak a sejtváz szerkezetének szabályozásában [73-75]. Emlős sejtekben a sejt alakja, polaritása és mozgása különböző RHO GTP-ázok összehangolt működésétől függ. A CDC42, a RAC és a RHO fehérjéknek a CA és a DN mutáns változatainak sejten belüli termeltetése különböző szerkezetű sejtváz kialakulásához vezet [76-78]. A CDC42 CA változat egy aktinban gazdag ujjszerű nyúlvány kifejlődését idézi elő. A RAC CA változatnál szintén egy aktingazdag felületi kidomborodás alakul ki. A RHO CA viszont összeszereli az aktin és miozin szálakat – létrehozva ezzel az úgynevezett stressz-rostokat [79,80]. Az állati sejt mozgásában a RAC az aktin-összeszerelődés szabályozásáért, a CDC42 pedig a mozgás irányának meghatározásáért felelős, emiatt ezek a mozgó sejt kidomborodó csúcsi részén találhatók. A RHO viszont a mozgó sejten belül hátul helyezkedik el [81]. Az aktin-miozin összeszerelés révén összehúzza a sejtet, ezáltal a mozgó sejt előrehaladását segíti elő [81]. A növényi sejteket merev sejtfal veszi körül, így mozgásra nincs lehetőségük. Ugyanakkor a sejten belüli turgornyomás a sejtfal és a sejtváz tulajdonságainak szabályozásán keresztül ösztönzi a sejtek növekedését [82,83]. A ROP GTP-ázoknak kulcsszerepük van a növényi sejtek növekedésének szabályozásában, mivel a ROP GTP-ázok határozzák meg a sejtek csúcsi növekedésének irányát [34,35,37,84-88].

Az ARP2/3 és WAVE fehérje-komplex

Az ARP2/3 (Actin Related Protein 2/3) fehérje-komplex – már létező aktinszál végéhez kötődve – egy elágazó szál növekedését indítja el, ami az eredeti szálhoz képest pontosan 70 fokot zár be. Az állati sejtekben az ARP2/3 fehérje-komplex hét alegységből áll. A RAC és a CDC42 képes szabályozni az ARP2/3 komplex működését, mégpedig a WAVE és a WASP fehérjéken keresztül. A WAVE és WASP fehérjék az új aktinág összeszerelődését a szabad aktin-elemek és az ARP2/3 összehozásával indítják meg [81,89]. A WASP fehérje megfelelőjét nem azonosították növényekben. Az emlős RAC az NCK nevű csatolófehérjével (adaptor fehérje) együtt nem közvetlenül, hanem egy négytagú fehérje-komplexen keresztül szabályozza a WAVE fehérjecsalád három tagjának működését [90]. Ezt WAVE/SCAR fehérje-komplexnek nevezik, ez a WAVE1 komplex a következő alegységekből áll: PIR121/SRA1, NAP1/HEM1, ABI1/ABI2 és BRK1/HSPC300. Az ARP2/3 és a WAVE komplex összes alegységének megfelelőjét azonosították lúdfűben [91,92]. Kérdéses, hogy a lúdfű ARP2/3 komplexe ugyanúgy működik-e, mint a többi eukarióta élőlényben előforduló megfelelői. Mindenesetre a lúdfű ARP2/3 komplex ARP3 és ARPC2 alegységei képesek helyreállítani élesztőben a megfelelő gének hiányát [93,94]. A lúdfű ARP2, ARP3, ARPC2a, ARPC5 és NAP1 génjeinek elrontása a sejtnövekedés hiányosságát idézi elő [93-101]. A lúdfűben a WAVE komplex SCAR alegységének T-DNS beépülésével való teljes elrontása is hasonló, de enyhébb hatású [102,103]. A legszembeszökőbb eltérést a levélszőr-sejteknél figyelték meg. A sejtek úgy néztek ki, mintha egy aktin-szétesést kiváltó vegyszerrel kezelték volna őket [104,105]. A lúdfű SCAR2 fehérje aktiválja a lúdfű ARP2/3 komplexet, és in vitro körülmények között kölcsönhatást mutatott szarvasmarha ARP2/3 komplex-szel [62]. Az élesztő-kéthibrid kölcsönhatás vizsgálat szerint a ROP2 kölcsönhat a WAVE komplex PIR121/SRA1 alegységével [84]. A ROP2 CA változat túltermeltetése levélszőr-sejtekben olyan hatással jár, ami nagyon emlékeztet az ARP2/3 és a WAVE hiányára. Ez alapján valamilyen működésbeli kapcsolatot feltételeztek a ROP és a WAVE-ARP2/3 között, és ki is mutattak ilyen kölcsönhatást [61]. A lúdfű ROP2, 4 és 6-os GTP-ázok GTP kötött formában kölcsönhatnak a WAVE komplex SRA1 alegységeivel, míg a lúdfű ROP5 és 10 nem mutatnak kölcsönhatást [61]. Más élőlényekben az ARP2/3 és a WAVE elrontása sokkal komolyabb zavarokat okoz. Sarjadzó élesztőben (Schizosaccharomyces pombe) például az ARP2 vagy az ARPC1 elrontása halálos [106,107]. Az ecetmuslica (Drosophila melanogaster) és a talaj fonalféreg

(*Caenorhabditis elegans*) ARP2/3 és WAVE alegységeiben bekövetkező hibák, illetve kifejeződésük RNS-interferenciával (RNSi) való elfojtása az embrió halálához vezetnek [108,109]. A fentiek alapján a növényi ARP2/3 által létrehozott aktin-váz ugyan nem létfontosságú a növény életében, fontos viszont a sejtalak meghatározásában, és így a teljes növényi jelleg-komplex kialakulásában. Az ARP2/3 komplex tagjainak elrontása nincs hatással a pollencső irányított megnyúlására. Ezek szerint a pollencsőben az aktin összeszerelése ARP2/3-től független [50]. Talán itt is arról lehet szó, mint a levél bőrszöveti sejtek alakjának meghatározásánál, ahol egy kizárólag növényekre jellemző célfehérjének, a RIC-nek (<u>Rop-interacting CRIB- containing protein</u>) van fontos szerepe [110].

A forminok

A forminok aktin-szintetizáló fehérjék, képesek új aktin-szálak kialakulását megindítani [111,112]. A forminok két domént tartalmaznak, az FH1-et (Formin Homology 1) és az FH2-t, amelyek az eukarióta élőlények világában meglehetősen változatlanok. Különösen az FH2 domén, amely létfontosságú az aktin lineáris hosszabbításában. Az FH1 prolinban gazdag és profilin megkötéséért felelős. A forminok egyik alosztálya a Diaphanous-rokon forminok (Drf), amelyek RHO GTP-áz kötő domént tartalmaznak. RHO kötésével kerülnek működőképes állapotba. Úgy tűnik, hogy a növényi forminok családja sokkal kiterjedtebb, mint az állatoké. A lúdfű génállománya 21 feltételezett formint kódol [113], míg az emlősöknek csak 9 forminjuk van [99]. A növényi forminok az FH1 és az FH2 domént is tartalmazzák, de a GTP-áz kötő domén hiányzik belőlük. Lehet, hogy a ROP GTP-ázok nem közvetlenül szabályozzák a forminok tudni, ROP működését? Ezt biztosan nem lehet mivel а GTP-ázok formin-szabályozásának növényi módját még nem vizsgálták. A pollen irányított megnyúlásában az aktin-szálak növekedése alapvető folyamat, amit ROP GTP-ázok szabályoznak [85,87,114].

A RIC mint efffehérje

A CRIB (<u>CDC42/R</u>AC-<u>i</u>nteractive <u>b</u>inding) mintázatról már esett szó a ROP-GAP-oknál. Állatokban ez a motívom számos RAC-kal és CDC42-vel kölcsönható effektor fehérjében megvan, de nem minden effektor fehérje hordozza a CRIB motívomot. A domén jellegzetessége az, hogy csak a bekapcsolt GTP-ázzal hat kölcsön. Az állati effektor fehérjék közül a PAK1 (<u>p</u>21-<u>a</u>ktivated <u>k</u>inase1) kinázokra jellemző a p21-kötő domén (PBD), ami CRIB motívomot tartalmaz. A PAK1 kinázok PBD doménjükkel megkötik a bekapcsolt állapotú RAC-ot vagy CDC42-t, és ebben az állapotban képesek foszforilálni különféle szubsztrátfehérjéket [115,116]. A MAP kinázláncolaton keresztül például a génkifejeződésre vannak hatással, az aktin és tubulin foszforilálásával pedig a sejtváz átrendeződését irányítják. A eukarióta élőlények génállománya legalább egy, de inkább több, PAK1 kináznak megfelelő fehérjét kódol. A növények úgy tűnik kivételnek számítanak, mivel a lúdfű genom nem kódol semmilyen PAK1 kináz-megfelelőt, rengeteg különféle egyéb kinázzal ellentétben.



3. ábra. A növényi ROP GTP-ázok jelátviteli rendszerének sematikus ábrázolása. A szaggatott vonalak azt jelölik, hogy nem teljesen ismerjük a jelátviteli útvonalban közvetítő fehérjéket. A pirossal karikázott fehérjék bizonyítottan a ROP effektor fehérjéi, részletes leírásuk a szöveges részben található. RIC (<u>R</u>OP-<u>i</u>nteractive <u>C</u>RIB-containing protein) [117], PIR WAVE komplex alegysége [84], CCR1 (Oriza sativa <u>C</u>innamoyl-<u>C</u>oA <u>r</u>eductase1) enzim [50], UGT1 (<u>U</u>DP-<u>g</u>lucose <u>t</u>ransferase. Forrás: [26].

Eddig csak két növényi fehérjecsaládról tudjuk, hogy rendelkeznek CRIB doménnel. Az egyik a növényi ROP-GAP család, amelyről korábban már volt szó. A másik egy jellegzetesen növényi, kisméretű fehérjéket (kb. 150 aminosav) kódoló géncsalád, a RIC-ek (<u>ROP-interactive CRIB-containing protein</u>) [117]. Lúdfűben 11 RIC van, amelyek aminosav-sorrendjük alapján további 5 alcsaládba rendezhetők [117]. A RIC-ek élettani szerepét eddig két kísérleti rendszerben vizsgálták: a pollen irányított megnyúlásában [87], a levél bőrszöveti sejtjeinek alaki meghatározásában [85]. A RIC fehérjékről azt feltételezik, hogy ezeknek a viszonlag kis méretű (140-180 aminosav) fehérjéknek inkább csatolófehérje, azaz adaptor-fehérje szerepük van a jelátviteli "láncban" [117]. Ez azt jelenti, hogy a GTP kötött ROP GTPáz kölcsönhat a RIC fehérjével, és így komplexet alkotva kölcsönhatásba kerülhet ismeretlen effektor fehérjékkel, és így közvetve okozhat térszerkezeti változást az ismeretlen fehérjében, azaz aktiválhatja azt.

A ROP1 a pollencső növekedését két ellentétes jelátviteli útvonalon keresztül szabályozza. A pollencső csúcsi részén a ROP1 a RIC4 bekapcsolásával az aktin-szálak összeszerelődését, a RIC3 bekapcsolásával viszont a kálcium koncentrációjának megnövelésén keresztül az aktin-szálak szétszerelődését indítja el [87]. Ez azt jelenti, hogy a pollencső növekedését egy egymásba fonódó pozitív (RIC4) és negatív (RIC3) visszacsatolásos ROP1 jelátviteli rendszer szabályozza. A ROP1 így kialakuló hullámzó működése összefügg a pollencső megfigyelt hullámzó növekedésével [118].

A levél bőrszöveti sejtek végső formájának kialakulását legalább részben a ROP/RIC jelátvitel szabályozza [85]. A ROP2/4 a RIC4-et bekapcsolva a plazmamembrán-menti aktin-hálózat összeszerelésével egy kitüremkedést, a RIC1-et kikapcsolva a plazmamembrán-menti mikrotubulusok elrendezésével pedig egy nyakszerű szűkületet hoz létre a sejt felszínén. Ezeken a területeken ugyanakkor a ROP/RIC4 jelátvitel gátolt. A két ellentétes folyamat végül összefonódva határozza meg a levél bőrszöveti sejtjeinek alakját, amely egy kirakós játék darabkáira emlékeztet.

A lúdfű ROP2-ről kimutatták, hogy fény hatására a RIC7 bekapcsolásával a gázcsere-nyílások működését szabályozza [119]. A RIC fehérjék a fentiek ellenére még mindig rejtélyesnek számítanak. Tudjuk ugyan, hogy a ROP-ok célfehérjéiként részt vesznek az aktin-hálózat, a mikrotubulusok és a kálciumszint szabályozásában, de működésük molekuláris részletei még nem ismertek.

Az ICR/RIP1 egy új ROP-célfehérje

2007-ben számoltak be először egy új ROP-célfehérjéről, az ICR-ről (<u>I</u>nteractor of <u>c</u>onstitutively active <u>R</u>OPs), amely fontos szerepet tölt be a gyökérmerisztéma fenntartásában és a levél bőrszöveti sejtek (pl. levél bőrszövet) alakjának

meghatározásában [110]. ICR hiányában négyzet alakú sejtek jönnek létre. Élesztő-kéthibrid szűréssel az ICR fehérjével a SEC3 kölcsönható "partner" fehérjét azonosították. Az élesztő SEC3 a CDC42 célfehérjéje, az exocitózis során a hólyagocskák plazmamembránhoz való rögzítéséért felelős. Az ICR-ről ezek alapján feltételezik, hogy szerepe van az exocitózisban [120]. Egy újabb beszámolóban az ICR1-t RIP1-nek (<u>R</u>OP Interactive <u>P</u>artner 1) nevezték el [121]. A lúdfű RIP1-nek a karboxi vége felelős a lúdfű ROP1-gyel való kölcsönhatásért. A RIP1 fehérje érett pollen sejtmagjában lokalizálódik nyugalmi állapotban, és amikor a pollen csírázni kezd, azaz elindul a pollen irányított megnyúlása, akkor átmegy a citoplazmába és a csírázó illetve a növekvő pollen csúcsán, a plazmamembrán alatt lokalizálódik, ott ahol GTP-kötött ROP1 is [121]. A RIP1 csúcsi lokalizációja befolyásolta a ROP1 aktivitását, és a RIP1 túltermelése a pollencsőben ugyanolyan lufiszerű megjelenést okozott, mint a ROP1 túltermelése [121]. Ezenkívül a RIP1 túltermelés a ROP1 fehérjék plazmamembránhoz való lokalizációját megnövelte, ami alapján feltételeznek egy pozitív visszacsatolásos rendszert is [121].

A sejtvázat szabályozó kinázok

Az állati RAC1/CDC42 GTP-ázok bekapcsolják a PAK1 (p21-aktivated kinase1) kinázt, amely foszforilálással a Lim kinázt hozza működésbe. Ez viszont az ADF (Actin Depolimerising Factor) fehérjét kapcsolja be, szintén foszforilálással. A foszforilált ADF hatására az aktin-növekedés lassul, és megváltozik az aktin-hálózat felépítése [21,122]. Pollencsőben az ADF-szint emelkedése visszafogja az irányított megnyúlást. A növényi ADF foszforilált állapotát utánzó változata ugyanolyan hatást vált ki, mint állati megfelelőjének hasonló változata [21,122,123]. Növényekben azonban még nem ismerünk olyan ROP GTP-áz által működtetett kinázláncolatot, ami az ADF foszforilálásához vezet.

A NADPH oxidáz (NOX) szabályozása

A növényi GAP-okról szóló részben már említettem, hogy oxigénhiány során a ROP-ok működésbe hozzák a NADPH oxidáz enzimet, ami elviselhetőbbé teszi az oxigénhiányt. Az állatokban a reaktív oxigéngyökök fontosak a kórokozók elleni védelemben. A falósejtek működésük során szuperoxidot [O₂-] termelnek, amely gyorsan átalakul más reaktív oxigén formákká (ROS). A ROS molekulák egyik fontos feladata, hogy megöljék a támadó mikrobákat. A falósejtekben a ROS-ok termelését a NADPH oxidáz enzimkomplex végzi. Az enzimkomplex katalitikus alegysége a gp91^{phox} nevű plazmamembrán fehérje, amit NOX-nak is hívnak. A többi alegység között van még egy plazmamembrán fehérje, a p22phox, valamint három sejtplazma fehérje, a p40phox, a p47phox, és a p67phox. A falósejtekben a NADPH oxidáz beindulásához feltétlenül szükséges, hogy az aktív RAC2 kölcsönhasson a gp91phox és a p67phox alegységekkel. NADPH oxidáz nem csak falósejtekben van, hanem sok más sejttípusban is előfordul. A reaktív oxigén formáknak a gazdaszervezet védelme mellett más élettani folyamatokban is van szerepük. A gp91^{phox} alegység megfelelőjét néhány növényben már azonosították [124-126]. A lúdfű génállomány 10 darab gp91^{phox} megfelelőt kódol, ezeket RBOH-nak (<u>Respiratory Burst Oxidase Homolog</u>) nevezték el [127]. Érdekes módon a növényi génállomány nem kódolja a NADPH-oxidáz komplex többi alegységét. Ennél fogva a NADPH-oxidáz szabályozása az állatokban és a növényekben különbözik. A összes növényi RBOH- fehérje amino végén egy kálcium megkötéséért felelős, EF karnak nevezett, domén található, amely az állati falósejtek gp91^{phox} alegységéből hiányzik [125]. Az emlős NOX fehérjecsalád nem falósejtekben előforduló tagjai viszont tartalmazzák ezt a domént [128]. A RBOH-ok in vitro képesek szuperoxidot termelni, és ehhez kálciumra van szükség [129]. Ez azt jelenti, hogy a kálcium közvetlenül szabályozza a RBOH-k szuperoxid termelését. Kísérletek szerint a ROP-ok is részt vesznek a RBOH-ok szabályozásában [48,130]. Rizsben (Oryza savita) például kórokozó gomba támadásakor egy OsROP (OsRAC1) bekapcsolja a NADPH oxidázt, így a rizs a gombatámadással szemben ellenállóvá válik [130-132]. A rizs RBOH az aminovégén két EF karral rendelkezik, és ez a része az élesztő-kéthibrid rendszerben kölcsönhat a rizs OsROP1-gyel [133]. A növényi sejten belüli kálciumkoncentráció növekedése csökkentette OsROP1 és OsRBOH kölcsönhatását, miközben a ROS-ok termelődése megemelkedett [133]. A lúdfű ROP2 a gyökérszőr-sejtekben a NADPH oxidázon keresztül beindítja a reaktív oxigén formák termelődését, ami átmeneti kálciumkoncentráció-emelkedést hoz létre. Ez az átmenetes kálciumjel nélkülözhetetlen a gyökérszőr irányított megnyúlásában [134]. A lúdfű ROP2 CA mutánsa a gyökérszőr-sejtekben megnövelte a ROS-ok termelődését, DN mutánsa csökkentette azt [135]. Az rhd2-1 NOX hiányos mutánsban a ROP2 CA változatának termelése a ROS termelődést és a gyökérszőr mutáns külső megjelenését helyreállította [135]. Ezek alapján azt lehet mondani, hogy a ROP GTP-ázok és a NOX között növényekben is van közvetlen kapcsolat és a ROP GTP-ázok befolyásolják a ROS termelődését RBOH enzim szabályozásán keresztül [133-135].

Az OsCCR1

A hemicellulózok öt és hat szénatomos cukrokból felépülő, többnyire elágazó polimerek, a növényi sejtfal fő alkotóelemei. A növényi sejtfal másik fontos alkotórésze a lignin. Ez a változatos szerkezetű molekula fenil-propán vázakból épül fel. A lignin polimer összeköti, és így merevvé teszi a cellulóz rostokat.

A ROP effektor fehérjék többségének megfelelőit más élőlénycsoportokban nem találjuk meg, ezek kifejezetten a növényekre jellemzőek. Egy ilyen célfehérje, amit rizsben találtak meg, a lignin termeléséért felelős OsCCR1 (*Oriza sativa C*innamoyl-<u>C</u>oA <u>R</u>eductase1) enzim is. Ez az enzim kizárólag a bekapcsolt ROP-pal (OsRAC1 CA) lép kölcsönhatásba [50]. A kölcsönhatás serkenti az OsCcr1 enzim működését *in vitro*. A keletkező lignin hatására merevebb sejtfal képződik, amely ellenállóvá teszi a növényt a kórokozókkal szemben. A hidrogén-peroxid (H₂O₂) a NADPH oxidáz másodlagos terméke, szintén szükséges a monolignolok (a lignin monomerjei) polimerizálódásához. Ezek szerint a rizs ROP GTP-áz (OsRAC1) két útvonalon (CCR1, RBOH) szabályozza a lignin termelését, és ezen keresztül a sejtfal tulajdonságait [50].

Az UGT1 enzim

Egy másik célfehérje a lúdfű UGT1 (<u>U</u>DP-glucose <u>t</u>ransferase) enzim, amely a kallóz szintázt is magában foglaló fehérje-komplex része [136]. Az UGT1 a többi ROP GTP-áz célfehérjéhez hasonlóan kizárólag a bekapcsolt ROP GTP-ázzal hat kölcsön. Emiatt az UGT1-et egy lehetséges ROPGTP-áz célfehérjének tartják, hasonló mechanizmust tételezve fel mint ahogy a RHO1p GTP-áz közvetlenül szabályozza a kallóz szintáz működését az élesztő katalitikus alegységgel való kölcsönhatás útján [137].

ROP GTP-ázok és kinázok

A ROP GTP-ázok jelátviteli rendszerével kapcsolatban sok részlet továbbra sem tisztázott. Az ismert célfehérjék és a hozzárendelhető jelátviteli utak majdnem kizárólag az irányított megnyúláshoz köthetők. A ROP GTPázok által a MAP kináz láncolaton keresztül szabályozott génkifejeződés jelátviteli rendszeréről növényekben igazából nem tudunk semmit. Állatokban ezt a jelátviteli rendszert a RAS GTPázok Raf kinázok, a RHO-típusú GTP-ázok PAK1-kinázok közreműködésével kapcsolják be. Növényekben azonban sem RAS GTPázok, sem CRIB doménnel rendelkező PAK1 kinázok nincsenek. Ennél fogva a jelátviteli rendszer kis GTPáz-okat a kinázláncolathoz kapcsoló része egyelőre teljesen feltáratlan, pedig a növényi génállomány nagyon sok kinázt kódol.

Növényi receptorszerű kinázok

A növényi receptorszerű kinázok (RLK) a növényi kinázoknak igen nagy hányadát teszik ki. A lúdfű génállománya mintegy 610 RLK fehérje génjét tartalmazza, és ez az összes fehérjekódoló gén 2,5 %-a [138]. A RLK-k többsége rendelkezik valamilyen sejten kívüli ligand-kötő doménnel, egy plazmamembránon átnyúló szakasszal és egy sejten belüli kináz doménnel [11,70]. Ebből a szempontból hasonlók az állati sejtek receptor kináz fehérjéihez, ezen túl azonban jelentősek az eltérések: az állati receptor kináz fehérjék, a TGF receptorok kivételével tirozin kinázok (elnevezésük ezért receptor tirozin kinázok, RTK-k). Ezzel szemben a növényi receptor kinázok szerin/treonin kinázok. Ráadásul a növényi RLK-k többsége az állati RTK-któl eltérő extracelluláris rendelkezik. kináz domének aminosav-sorrendjének doménekkel А átfogó származástani vizsgálata szerint a növényi receptorszerű kinázok egy különálló ágat képviselnek az eukarióta kinázok nagycsaládján belül, ugyanakkor az állati receptor kinázokkal, Raf-típusú kinázokkal és a receptor tirozin kinázokkal együtt egy nagyobb, közös eredetű csoportba tartoznak. A növényi RLK-k azonban nem az állati receptor kinázokra hasonlítanak a legjobban, hanem a sejtplazmában működő Raf-típusú Pelle kinázokra [11,70].

A növényi receptorszerű kinázokat elsősorban az eltérő sejten kívüli doménjeik alapján osztályozzák [11,70], ezen belül pedig a kináz domének aminosav-sorrendjének hasonlósága alapján képeznek csoportokat. A növényi kinázok aminosav-sorrendjének elemzése során azonban találtak olyan kinázokat is, melyek nem rendelkeznek sem plazmamembránon átnyúló szakasszal, sem sejten kívüli ligandkötő doménnel, de kináz doménjük aminosav-sorrendje alapján a receptorszerű kinázok családjába tartoznak. Ezeket receptorszerű citoplazmatikus kinázoknak (RLCK, <u>R</u>eceptor-<u>L</u>ike <u>C</u>ytosolic <u>K</u>inase) nevezték el.

A hatalmas növényi RLK családnak még csak néhány tagjának működéséről vannak ismereteink. Ezek többsége sejten kívüli doménnel is rendelkező RLK, amelyek az egyedfejlődést és a környezeti hatásokra adott válaszokat meghatározó jeltátviteli utakhoz kapcsolódnak [69]. Csak néhány fontosabbat említek ezek közül: brasszinoszteroid jelátvitel (BRI1), osztódószövet-fejlődés (CLV1), levélfejlődés (CRINKLY4), levélhullás (HAESA), önbeporzás gátlása (SRK), flagellin-érzékelés (FLS2), baktérium-ellenállóság (XA21, PTO). Nagyon keveset tudunk arról, hogy milyen módon vesznek részt ezek a receptor fehérjék a jelek továbbításában. Az egyik legjobban jellemzett RLK a Clavata1 (CLV1). Ez a receptor kináz heterodimert képez egy hasonló fehérjével (CLV2), amely egy sejten kívüli és egy plazmamembránon átnyúló domént tartalmaz, de nincs sejten belüli kináz doménje. A két sejten kívüli domén komplexen képes csak kötni azt a peptidligandot, melyet a Clavata3 gén kódol. A Clavata gének jellegzetes térbeli kifejeződési mintázata biztosítja, hogy a hajtás osztódószövetében a sejtosztódás és a szöveti differenciáció egyensúlya megfelelő legyen. A CLV1 kinázzal kölcsönható fehérjék azonosítása során egy foszfatázt (kináz-asszociált fehérje foszfatáz, KAPP), és ami a mi szempontunkból lényeges, egy ROP GTP-ázt azonosítottak [139]. Nincs azonban semmilyen adat arról, hogy a ROP GTP-áz hogyan kapcsolódik az osztódószövet jellemzőit meghatározó jelátviteli folyamatokhoz.

Még kevesebbet tudunk a receptorszerű citoplazmatikus kinázokról (RLCK-k). Ezek a fehérjék tíz csoportba sorolhatók (RLCK I-X), és mintegy 193 fehérje tartozik közéjük. A tudományos irodalomban csak néhány közleményt találhatunk ezeknek a fehérjéknek a szerepéről. Néhány esetben az RLCK fehérjék működése az RLK jelátvitelhez kapcsolható: a PTI1 RLCK fehérjét a PTO RLK foszforilálja, és ilyen módon részt vesz a baktérium-ellenállóság kialakulásában [140]. Hasonlóképpen а baktérium-ellenállósághoz kötődik a RPS5/PBS1 (RLK/RLCK) kináz-páros, bár a köztük levő kapcsolatot nem tisztázták [141]. Szintén nem mutattak ki közvetlen kölcsönhatást, csak genetikai összefüggést az önbeporzás gátlásának szabályozásában a SRK (RLK) és az MLPK (RLCK) között [142]. Búzában egy sóra és abszcizinsavra (ABA) bekapcsolódó génről mutatták ki, hogy egy RLCK fehérjét kódol [143]. Eddig ROP aktivált RLCK-ról nem számoltak be. Mivel a növényekben nincsenek az állati sejtekben a mitogén jelátvitelben fontos szerepet betöltő RAS GTPázok sem, ezért a GTPázok és a kinázok közötti kapcsolat növényekben nyilvánvalóan teljesen eltér attól, mint amit más organizmusokban leírtak. Ugyanakkor nagyon valószínűtlen, hogy ez a kapcsolat növényekben nem létezik, különös tekintettel arra, hogy a növények hatalmas számú kináz fehérjét kódoló génnel rendelkeznek. A ROP GTPázoknak a növényi egyedfejlődésben betöltött teljes szerepének tisztázásához elengedhetetlen a ROP GTPáz aktivált kinázok azonosítáa és vizsgálata.

Az anyagok és módszerek

Plazmid tisztítás

A plazmidok tisztítását 4 ml éjszakán át növesztett baktérium kultúrából végeztük el. Ehhez részben a módosított lúgos feltárás módszerét használtuk [144], majd áttértünk az E.Z.N.A. plazmid tisztító egységcsomag (OMEGA BIO_TEK) használatára, amit a gyártó leírása alapján végeztünk.

Különböző MsROP6 változatok előállítása

A kis GTP kötő fehérjéknek alapvetően két térbeli szerkezete van. Az első a bekapcsolt alak, amely GTP-t köt, a második pedig a GDP-kötő, kikapcsolt alak. Ezek a fehérjék a karboxi-végen elhelyezkedő cisztein oldalláncon izoprenilálódva a sejtmembránhoz kötődnek. Kísérleteinkhez, elsősorban az élesztő-két hibrid kísérlethez, szükséges volt CA (konstitutivan aktív), DN (domináns negatív) és L (lokalizációjában mutáns) változatok előállítása. A CA változatnál a 15. glicin oldalláncat csereltük ki valin oldalláncra. Ezzel a módosítással értünk el olyan térszerkezeti állapotot, hogy a ROP GTP-áznak a GTP-t bontó aktivitása drasztikusan lecsökken és így folyamatosan GTP kötött, azaz "aktív" állapotban marad. A DN változatnál 20. aszpargin oldalláncot csereltük ki threoninra, ami folyamatosan GDP kötött állapotot jelentő térszerkezeti változást eredményezett. Ez azt jelenti, hogy a ROP GTP-áznak a GTP kötő aktivitása több ezerszer gyengébb, mint a "vad" típusú ROP GTP-ázoké. A nem prenilálódó (lokalizációs, L) változat esetében az izoprenilációért felelős ciszteint glutaminra cseréltük. A MsROP6ΔI^{RAS} változat esetében a ROP GTP-áz inszerciós régióját az emberi RAS1 fehérje megfelelő régiójára csereltük ki.

Fent említett változatok előállításánál hagyományos molekuláris biológiai módszereket alkamaztunk (PCR reakció, restrikciós endonukleázokkal történő hasítások és T4 ligázzal való beillesztések).

Az MsROP6 változatok előállításához a következő primereket használtuk, amelyeken megfelelő mutációkat és restrikciós helyeket hordozzák:

MsROP6 elejére és végére tervezett primerek:

Full-fw (EcoRI): GCGGAATTCATGAGTGGTTCCAGGTTCA Full-rev-ként (SalI): GCGGTCGACTCACAAAATGGAACATGCT CA-változatnál :

Mut-fw-ként: GTTGGTGATGTAGCTGTTGG Mut-rev: CCAACAGCTACATCACCAAC DN-változatnál :

Mut-fw: GGAAAAAATTGTTTGCTTAT Mut-rev: CAATTTTTTCCAACGGCACC Az MsROP6-L előállításához a következő primert használtuk:

Full-revL (SalI): GCGGTCGACTCACAAAATGGAACCTGCT

 ΔI^{RAS} változatnál:

5 C insHRAS psti: GAGCTGCAGTGGAAAGCGCACAGGGTGAGGAACTG 3 N insHRAS psti: GAGCTGCAGGTGCGCGCGCGCAAGATCAAGTTTTGT Következő primerek a MsROP6 eljére és végére lettek tervezve:

Full-fw (NdeI): GCGCATATGAGTGGTTCCAGGTTCATC Full-rev stop kodon nélküli (XhoI): GCGCTCGAGCAAAATGGAACATGCTTTTT

Élesztő-kéthibrid szűrés és élesztő-kéthibrid mátrix vizsgálatok

Munkánk során fehérje-fehérje kölcsönhatások kimutatására elsődlegesen az élesztőkéthibrid rendszert választottuk. Az élesztő-kéthibrid rendszer számos előnnyel rendelkezik az egyéb fehérje-fehérje kölcsönhatás kimutatásra szolgáló biokémiai módszerekhez képest: a kölcsönhatás sejten belül, természetes körülmények között jön létre; nincs szükség a célfehérje ellen termeltetett ellenanyagra; a célfehérjével kölcsönható fehérjét kódoló gén (vagy génszakasz) azonnal kinyerhető; számos más biokémiai módszernél érzékenyebb, vagyis gyenge és időleges kölcsönhatások kimutatására is alkalmas; végül pedig olcsóbb és egyszerűbb kivitelezni. A módszer alapja az, hogy az élesztő GAL4 transzkripciós faktor két fő doménjét szét lehet választani anélkül, hogy működőképességük sérülne. A fehérje egyik része (a DNS-kötő domén) a gének promóterében lévő megfelelő DNS-mintázathoz kötődik, a másik pedig (az aktivátor domén) a transzkripciós fehérjekomplex-szel hat kölcsön. Az élesztő GAL4 transzkripciós faktor DNS-kötő doménjét egy X fehérjével, míg az aktivátor doménjét egy Y fehérjével illesztjük össze. Az X és az Y fehérjék kölcsönhatása esetén a GAL4 kötőhelyet tartalmazó promóterrel rendelkező jelzőgének átírása beindul. A módszernek természetesen hátrányai is vannak: a vizsgálat előtt rendelkeznünk kell a célfehérje génjével; a mérgező fehérjék csak nagyon alacsony szinten termeltethetők élesztőben; egyes fehérjék túl gyorsan bomlanak az élesztősejtekben történő vizsgálatok elvégzéséhez; önmagukban transzaktiváló hatású fehérjéket nem, vagy csak nagyon körülményes módon lehet vizsgálni; számos fehérjének (plazmamembránfehérjék, sejtszervecskékbe irányított fehérjék) csak darabjai juttathatók az élesztő sejtmagba, ahol a kéthibrid módszer által mérhető kölcsönhatások kialakulnak.

Az élesztő-kéthibrid szűrés során a *Saccharomyces cerevisiae* PJ69-4a [145] élesztő törzsét Gietz és Woods [146,147] által leírt módon transzformáltuk egy *Medicago truncatula* λHybriZAP cDNS könyvtárral [148]. Csaliként a következő plazmid konstrukciókat használtuk: pBD-GAL4/MsROP6 CA L, pBD-GAL4/MsROP6 DN L, pBD-GAL4/RRK2. A transzformánsokat -Trp, -Leu, -His, -Ade minimál táptalajon növesztettük, ahol a triptofán és leucin prototrófia a két plazmid komplex jelenlétét, míg az adenin és hisztidin prototrófia a "csali" és a "zsákmány" fehérje kölcsönhatását jelzi.

A pAD-GAL4, pBD-GAL4 vektorok a Stratagene-től származtak.

A Saccharomyces cerevisiae PJ69-4a élesztő törzs genotípusa: MATa, trp1-901, leu2-3,-112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, GAL2-ADE2, LYS2:GAL1-HIS3 met2:GAL7-lacZ

Dr. Györgyei János személyes tanácsára a fehérje-fehérje kölcsönhatások összehasonlítására kétszeres (-Trp, -Leu), háromszoros (-Trp, -Leu, -His) és négyszeres (-Trp, -Leu, -His, -Ade) szelekciós lemezeken nőtt élesztő telepek számarányát vettük figyelembe, mivel a háromszoros és négyszeres szelekciós lemezen nőtt telepek száma egyenesen arányos a kölcsönhatás erősségével. Pozitív (azaz bebizonyítottan erős kölcsönható) kontrollnak Horváth V. Gábor és munkatársai által leírt a RepA(C1)/pGAD424 és ZmRB/pGBT9 konstrukciókat [149], negatív kontrollnak pedig a pAD-GAL4, pBD-GAL4 üres vektorokat tekintettük.

Baktériumban termeltetett fehérjék tisztítása

Az MsROP6 fehérjét és annak összes változatát pMAL2c (New England Biolabs), pTRC-HISA, pTRC-HISB, pTRC-HISA (Invitrogen) és pET26b (Novagen) vektorokba klónoztuk a megfelelő leolvasási keretbe, majd Escherichia coli Rosetta[™] törzsébe [BL21 (DE3)/(pLysS)] transzformáltuk. A kinövő telepeket 20 ml LB tápoldatba (10 g/l NaCl, 10 g/l Tripton, 5 g/l élesztő kivonat) oltottuk le és 12–14 órán keresztül növesztettük 37 °C-on állandó rázatással (250 rpm). A felnőtt baktériumokból 10 ml-t átoltottunk 200 ml LB-be, majd további 1 órán át növesztettük őket. A kívánt fehérjék kifejeződését 0,5 mM IPTG-vel indítottuk be 3–4 órán keresztül 37 °C-on való állandó rázatással. A fehérje tisztítás során a pMal2c vektor konstrukciók esetében pontosan követtük a gyártó New England Biolabs honlapján található utasításokat Az MBP farokkal rendelkező fehérjék esetében amilóz gyantát (New England Biolabs) használtunk. A pTRC-HIS és a pET26b alapú konstrukcióknál nikkel gélt (Sigma) alkalmaztunk és az Invitrogen (http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/ptrchis_man.pdf) által leírtakat követtük azzal a különbséggel, hogy másfajta kötő-, mosó- és elúciós puffert használtunk. A 6xHis farokkal rendelkezőknél használt pufferek összetétele a következő:

kötő puffer:20 mM Tris-HCl pH=8.0, 200 mM NaCl, 5 mM imidazolmosó puffer:20 mM Tris-HCl pH=8.0, 200 mM NaCl, 20 mM imidazol, 0,05 mM

Tween®20

elúciós puffer: 20m M Tris-HCl pH=8.0, 200 mM NaCl, 120 mM imidazol

Az eluálás után a fehérjeoldatot CentRICon® cső (Millipore) alkalmazásával 10szeres töménységűre sűrítettük be. Az MBP-hez illesztett MsROP6 fehérjék esetében Y30-as, a 6×His-hez illesztetteknél viszont Y10-es csövet alkalmaztunk. Centrifugálásnál a Millipore leírását követtük. A besűrített fehérjékhez glicerint (96% glycerol, Sigma) adtunk 1:1 térfogat arányban és alaposan összekevertük. Ezek után megmértük a fehérjék koncentrációját Bradford reagenssel (BioRad), tisztaságukat SDS-poliakrilamid gélen Coomassie Brilliant Blue festéssel ellenőriztük. A mintákat –20 °C-on tároltuk. Az így tárolt MsROP6 fehérjék enzimaktivitásukat 0,5–1 évig őrizték meg (4 °C-on csak 24 óráig őrizték meg enzimaktivitásukat, –80 °C-on való tárolással viszont teljesen elveszítették azt).

Az MtRRK1 és MtRRK2 tisztítása kicsit bonyolultabbnak bizonyult. Az MtRRK fehérjék génjeit az általunk hozzáférhető összes IPTG-vel beindítható baktériumos fehérjetermeltető vektorba beklónoztuk: 6×His-illesztést lehetővé tevő pTRC-HISB és pET28a vektorokba, MBP-illesztést lehetővé tevő pMAL2c vektorba, továbbá GSTillesztést lehetővé tevő pGEX4b vektorba. Sajnos egyik konstrukció esetében sem láttuk a kinázok kifejeződését. Ezért a pET28a/MtRRK konstrukciókból a kinázgéneket NcoI és HindIII darabként átemeltük pBAD24 vektorba. Az így kapott pBAD24/6×His-RRK konstrukciókat hordozó sejtek 0,2% arabinóz hatására termeltek ugyan 6×His-RRK fehérjéket, de azok a kezelést követően csak 30-45 percig voltak kimutathatók az anti-His peroxidáz ellenanyaggal (Sigma) végzett Western blot szerint. A 30-45 perces indukciót követően termelődött 6×His-RRK fehérjék tisztítása és tárolása megegyezett az MsROP6-6×His fehérjénél leírtakkal.

Fehérje azonosítása Western blot módszerrel

A mintákban található fehérjéket molekulatömegük alapján SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel (PAGE) választottuk el. Az elektroforézis végeztével a gélből a fehérjéket polivinilén-difluorid (PVDF) membránra (Millipore) vittük át. A lapokat két órán keresztül szobahőmérsékleten blokkoltuk 5% tejport és 0,05% Tween®20-at tartalmazó TBS (25 mM Tris-HCl, pH=8.0, 150 mM NaCl) blokkoló pufferben, majd az adott elsődleges ellenanyaggal (1 µg/ml) egy óráig szobahőmérsékleten kezeltük. Az alkalmazott elsődleges ellenanyagok a maltózkötő fehérjét felismerő anti-MBP (New England Biolabs) és a 6×hisztidint felismerő anti-His (Sigma) voltak. Az elsődleges ellenanyaggal történt kezelés után a membránt 0,2% Tweent tartalmazó TBS-vel mostuk. Ezt követően a membránt peroxidázhoz kapcsolt másodlagos ellenanyagnak a gyártó (Sigma) által javasolt koncentrációjú, blokkoló pufferben készült oldatával kezeltük. Az anti-His ellenanyag eleve peroxidázhoz kapcsolt. Újabb mosás után a peroxidáz szubsztrátját ("Lumi-Light Western Blotting Substrate", Roche) tartalmazó hívóoldattal kezeltük a membránt, a lumineszcens jelet pedig röntgenfilmen rögzítettük.

In vitro kináz reakció

1 μl (2 pmol) tisztított kinázt és 2μl (5 pmol) tisztított kis GTP kötő fehérjét 17 μl kináz reakció pufferben (20 mM Tris-HCl pH=7,6, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 10 μM ATP, 0,2 MBq [γ-32P] ATP) tartottuk szoba hőmérsékleten 30 percig. A reakciót 5 μl 5×SDSmintafelvivő puffer hozzáadásával állítottuk le. A fehérjemintákat SDS-poliakrilamid gélen elválasztottuk és szárítás után autoradiogramot készítettünk. A kiértékeléshez a Molecular Dynamics cég Phosphorimager 445 SI berendezését és kiértékelő alkalmazását (ImageQuant 5) használtuk.

Lúdfű protoplasztok transzformálása

Lúdfűből készült sejtszuszpenzióből származó protoplasztokban fehérjék átmeneti kifejeződését vizsgáltuk. Mivel a sejtfal megakadályozza az idegen DNS bevitelét, erős enzimoldattal leemésztettük a sejtek falát. A protoplasztokat szacharóz tartalmú B5 tápoldaton centrifugálással tisztítottuk. Ebben a sűrű oldatban az ép protoplasztok a centrifugálás hatására felúsznak a felszínre, ahonnan pipettával összegyűjthetőek. A tisztított protoplasztokat glükózt és mannitolt (1:1) tartalmazó tápoldatban mostuk, majd Bürker kamrában megszámoltuk. Mintánként 200 000 protoplasztot használtunk, amelyet 50 µl tápoldatban vettünk fel.

A protoplasztokhoz ezután hozzáadtuk a plazmidot (5–15 µg). A génbevitelt polietilén-glikol (PEG) segítségével valósítottuk meg (150 µl). A PEG egy nagy molekulatömegű, ozmotikusan igen aktív anyag. Jelenlétében ezért a sejtek vizet vesztenek, és összezsugorodnak. Az inkubációs idő letelte után felhígítottuk a közeget mosóoldattal (0,275 M Ca(NO₃)₂). Ekkor történik a génbevitel; az ozmózis iránya ugyanis megfordul, és a beáramló vízzel együtt a képződő pórusokon a DNS is a sejtekbe jut. A protoplasztokat B5 tápoldattal is átmostuk és ebben tároltuk.

Oldatok:

Enzim oldat: 1% Cellulase Y-14 (Yakult), 0,5% Macerozyme (Onozuka), 0,34M glükóz:mannitol (1:1) B5 tápoldatban (Duchefa) sterilre szűrve.

PEG oldat: 25% polietilén-glikol 6000 (Merck), 0,45 M mannitol, 0,1 M Ca(NO3)2, pH=9,0 KOH-dal beállítva, sterilre szűrve.

B5 szacharóz: 0,28 M szacharóz B5 tápoldatban (Duchefa), pH=5,5, sterilre szűrve.

Ca(NO₃)₂ oldat: 0,275 M Ca(NO₃)₂ vízben, sterilre szűrve.

Valósidejű polimeráz láncreakció

Az általunk vizsgált gének kifejeződését is megvizsgáltuk különböző szövetekben: gyökérben, gyökérgümőben, levélben, szárban és virágban. A mintákat kifejlett üvegházi *Medicago truncatula* növényekről gyűjtöttük be. Emellett, exponenciálisan növekvő sejtszuszpenzió kultúrából is mintát vettünk, majd közvetlenül a mintavétel után növényi anyagainkat folyékony nitrogénben fagyasztottuk le. Ezen fagyasztott növényi mintáinkat eldörzsöltük, majd RNAzol reagens (Sigma, St-Louis, USA) segítségével összRNS-t izoláltunk. Annak érdekében, hogy elkerüljük a genomi DNS szennyeződést, minden tisztított RNS mintánkat RNáz-mentes DNáz kezelésnek vetettük alá, a gyártó utasításai alapján (Sigma). A mintáink RNS tartalmát ezt követően spektrofotométer segítségével 260 nm-es hullámhosszon abszorbancia méréssel határoztuk meg, végül denaturáló agaróz gélen is ellenőriztük a koncentrációjukat és az integritásukat.

Mintánként 2,5 µg össz-RNS-t felhasználva oligo dT primer és reverz transzkriptáz (RevertAid M-MuLV, Fermentas) segítségével a gyártó utasításait követve cDNS-eket szintetizáltunk. A cDNS-eket steril vízzel 200µl-re higítottuk.

Az alkalmazott primerek:

MtR3(91)L: GCAGTTCGAAATCACAGCAG MtR3(91)R: TTGGTGGTTGAAGGACAACTC MtR5(46)L: AGAACGTGAAGGCGGTGTT MtR5(46)R: CTTCTGCTTTGGTGGTTGAAG MtR6(83)R: GCTTTTTGCCCCTTTCTCTT MtR6(83)L: TTGATTCGGCCATCAAAGTA MtR7(1)R: TCACCCTTAGCAGTTGTTATTTGT MtR7(1)L: GCGAGACGACAAGCAATTTT MtR8(68)R: TGAGTAGTGAAAAGGCCAACAA MtR8(68)L: AACAGGCTTAGGCCATTGAG MtR9(97)R: CGGACCTGCTAACAGTAGCC MtR9(97)L: CGGAGATGGAGAAGTATGTGTTT MtRRK1_Fw: TGCAAGGCTTGAAGGAGAATA MtRRK1_Rev: TCGCCAAGTGGAAGATGC MtRRK2_Fw: TTGGTGTATTGCTATTAGAATTGGTC MtRRK2_Rev: GGCTTTGTTGTGAATAATCAAGTG SecA_Rev: AACCTCCCTCCTGCTTGATT SecA_Fw: CGTTTCTCTCTCTCCACCGTTT

A megfelelő primer párokat és hozzávaló szekvencia-specifikus primerek nevében jelzett számú UPL TaqMan próbákat felhasználva (Universal Probe Library Assay Design Center, Roche Applied Science) kvantitatív RT-PCR-t végeztünk ABI Prism 7700 készüléket (Applied Biosystems) alkalmazva. Belső kontrollként az adatok normalizálásához egy folyamatosan kifejeződő gént (The Secret Agent (O-linked Nacetyl glucosamine transferase) használtunk [150].

Célkitűzések

A növényi egyedfejlődés szabályozása rendkívül rugalmas. Laboratóriumunkban azokat a sejt- illetve molekuláris szintű folyamatakat viszgáljuk, amelyek lehetővé teszik a növényi sejtek osztódásának, alakjának, differenciálódásának gyors, a környezeti feltételekhez alkalmazkodó szabályozását. Ehhez kapcsolódva laboratóriumunkban több éve kutatjuk a RHO-típusú (ROP) GTP-ázok szerepét a növényi sejtek jelátviteli hálózataiban. Amikor elkezdtünk foglalkozni a növényi jelátviteli rendszerrel, az ebben a rendszerben kulcs szerepet játszó kis GTP-ázok kölcsönhatóiról (célfehérjéről és szabályozóiról) alig volt fellelhető irodalmi adat. Így eléggé egyszerű volt kitűzni célunkat: új elemeket tárjunk fel az addig alig ismert növényi ROP GTP-áz által aktivált jelátviteli rendszerben. Célunk volt az azonosított új elemek és a ROP GTP-áz közötti kölcsönhatás egymástól független módszerekkel való igazolása illetve megerősítése in vitro és in vivo körülmények között. Elsősorban arra kerestük a választ, hogy ezek a molekuláris kapcsolóként szolgáló kisméretű fehérjék, az élesztő és az állati sejtekhez hasonlóan, részt vesznek-e kinázláncolatok aktiválásában. Végül az újonnan azonosított elemeknek meghatározzuk a biológia szerepét. Mindezeknek köszönhetően azt reméltük, hogy hozzájárulhatunk a növényi sejtek jelátviteli hálózataival kapcsolatos jelenleg még meglehetősen hiányos ismereteket bővítéséhez.

Eredmények és megvitatásuk

A ROP GTP-ázzal végzett élesztő-kéthibrid szűrés

PhD munkám első szakasza abból állt, hogy ROP GTP-ázokkal kölcsönható fehérjéket (szabályozókat vagy célfehérjéket) találjunk az élesztő-kéthibrid rendszer alkalmazásával. Ennek során elsőként azonosítottuk három lucerna ROP GTP-áz cDNSét, részlegesen jellemeztük őket [151], majd azt választottuk ki a további vizsgálatokhoz, amelyről irodalmi adat még nem állt rendelkezésre. Ebből az MsROP6 jelű GTP-ázból kétlépcsős PCR-rel a következő változatokat állítottuk elő: kikapcsolt (DN-<u>D</u>ominant <u>N</u>egative), folyamatosan bekapcsolt (CA-<u>C</u>onstutively <u>A</u>ctive) illetve nem izoprenilálódó (elrontott intracelluláris lokalizációjú, L).

A kodonok cseréjét a következő módon végeztük: a kívánt aminosavcsere helyét tartalmazó szakaszra 2 átfedő primert terveztünk, túlnyúló végek nélkül. Ezek a primerek ellentétes irányba néztek; az egyik mut-fw (mutáció-előre), a másik mut-rev (mutáció-hátra). Ezeken kívül két másik primerre is szükség volt, amelyeket a génünk legelejére (full-fw (EcoRI)) és legvégére (full-rev (SalI)) terveztünk. A primereket a klónozáshoz szükséges restrikciós enzimek felismerőhelyeit tartalmazó 5' túlnyúló végekkel (EcoRI SalI) láttuk el. Az első lépcsőben a full-fw (EcoRI)/mut-rev és a mutfw/full-rev (SalI) primerpárral végeztük a PCR-t. A reakció termékeit agaróz gélen megfuttattuk, a megfelelő méretű termékeket tisztítottuk. A gélből tisztított két DNS darabot összekevertük és templátként használtuk fel a második lépcsőben. A második PCR-t a full-fw (EcoRI)/full-rev (SalI) primerpárral végeztük, és a termékeket szintén megfuttattuk agaróz gélen. Gélből tisztítottuk a helyes méretű DNS darabot, amit a klónozáshoz kiválasztott restrikciós enzimekkel kezeltünk és a megfelelően előkészített vektorokba illesztettünk be. A nem prenilálódó (lokalizációs) változatot, az MsROP6-L-t egy egyszerű PCR-rel állítottuk elő, amihez a full-rev primerben az izoprenilációért felelős ciszteint kódoló szakaszt egy nukleotid cserével glutamint kódoló szakaszra cseréltük. A lokalizációs változatot elsődlegesen az élesztő-kéthibrid szűréshez készítettük. Ahhoz, hogy az élesztő-kéthibrid rendszerben fehérje-fehérje kölcsönhatást tudjunk mérni, mindkét fehérjének a sejtmagban kell tartózkodnia, és emiatt fontos a ROP GTP-ázok plazmamembránhoz való kötődésének megszüntetése. A kikapcsolt állapotú, sejtmagba irányított (DN+L) változattal végzett élesztő-kéthibrid szűréssel nem találtunk értékelhető erős kölcsönható fehérjét, viszont sikerült azonosítanunk a

bekapcsolt (CA+L) alak kölcsönható fehérjéit. A MsROP6 CA+L változat a lucerna (*Medicago truncatula*) gümőjéből készült cDNS könyvtárból származó több fehérjével is kölcsönhatást mutatott. A jelöltek azonosítása céljából aminosavsorrend alapú keresést végeztünk a GenBank adatbázisában (Blastx: http://www.ncbi.nih.gov/BLAST). A kísérletek eredményeként, a kölcsönhatásokat többszörösen ellenőrizve (élesztő-kéthibrid rendszerrel), eddig még nem ismert ROP GTP-áz-kötő fehérjékre bukkantunk. Ezek között két szerin/threonin kináz fehérjét is találtunk. Ezek egy eddig teljesen feltáratlan növényi kináz családhoz tartoznak, melyet receptor-szerű citoplazmás kináz VI családnak (RLCK VI) hívnak (5. ábra). A család egyetlen tagjának élettani szerepéről sem állt adat rendelkezésre.

Szintén a kölcsönhatók között volt egy egér NEDD1 jelű (Neuron-precursor-cell-Expressed Developmentally Downregulated Protein 1) β transzducinszerű WD40 ismélődéseket tartalmazó fehérjével homológ fehérje és két p65 mikrotubulus-kapcsolt fehérje. Az élesztő-kéthibrid szűrés eredmények legelső értékélésekor még a NEDD1 és a p65 mikrotubulus-kapcsolt fehérjékről nem találtunk semmilyen funkcionális adatot az irodalomban.

Jérémie Gaillard és munkatársai által 2008-ban publikált cikkben azonban arról számoltak be, hogy a lúdfű p65 mikrotubulus-kapcsolt fehérjék dimerizálódnak és az egységek szabad C-terminális részei megkötik az ellentétes irányba futó mikrotubulus szálakat, és így mikrotubulus kötegeket hoznak létre [152]. De itt nincs említés arról, hogy milyen kölcsönhatás vagy szabályozás lehet a ROP GTP-ázok és a p65 mikrotubulus-kapcsolt fehérjék között. Dr. Marylin Vantard (Grenoble, Franciaország) rendelkezésünkre bocsátotta a dohány (*Nicotina tobacum*) p65 MAP fehérjéjét termelő baktérium törzset. A tisztított p65 fehérjével nem sikerült az MsROP6 GTPáz *in vitro* kölcsönhatását kimutatni, ezért a kísérleteket nem folytattuk.

A NEDD1 homológ fehérjéről, a nevében említett expressziós mintázaton kívül, nem találtunk semmilyen funkcionális adatot az irodalomban. A közelmúltban megjelentek azonban az állati NEDD1 funkciójával kapcsolatos kísérleti adatok. Az állati NEDD1 homológ fehérjéről az első publikáció 2006-ban jelent meg és eddig mindössze két tudományos közlemény számolt be az állati NEDD1 biológiai funkciójáról [153,154]. Az állati NEDD1-ek a γ-tubulint kötik és a centroszómában helyezkednek el, a mikrotubulus nukleációjában betöltött szerepük nélkülözhetetlen [153,154]. Az állati RHO GTP-ázok
és a NEDD1 közötti kölcsönhatásról nincs adat. Az lúdfű genomi adatbázisban (http://www.arabidopsis.org/) egyetlen egy NEDD1-homológ fehérjét kódoló gén található. Egy úttörő kísérletben a lucerna NEDD1 homológ cDNS-t beklónoztuk a pYawohl20 nevű RNS interferenciás vektorba. Ezt Agrobakterium közreműködésével bejuttattunk lucernába (*Medicago truncatula*), hogy a lucerna saját belső NEDD1 homológ fehérje kifejeződését leállítsuk. Mivel a kontrollokkal szemben nem kaptunk egyetlen fejlődő transzgenikus sejtkolóniát sem, feltételeztük, hogy a NEDD1 homológ fehérje hiánya letális. Mivel így a funkcionális vizsgálatokra nem kerülhetett sor és az állati rendszerekből sem álltak rendelkezésre adatok, valamint a kapacitásunk is korlátozott volt, ezzel a fehérjével sem foglalkoztunk tovább.

A többi potenciális kölcsönható partnerről, azaz az MtN24-ről és a DUF1620 domént hordozó fehérjéről sincs elérhető információ az irodalomban.

A pillangós növények jellemzője az, hogy talajbaktériumokkal -nevezetesen a Rhizobium fajok valamelyikével- kölcsönhatásba kerülnek, és ennek következményeként közösen létrehoznak egy teljesen új szervet, a gyökérgümőt, amelyben az atmoszférikus nitrogén megkötése megy végbe. A gümőképző folyamatot jellegzetes gének illetve géncsaládok kifejeződése jellemzi és az egyik ilyen fehérje az MtN24, ami 234 aminosavból áll, négy membránon átnyúló régióval rendelkezik, de pontos biológiai szerepe eddig ismeretlen.

A kölcsönhatók között volt továbbá két teljesen ismeretlen fehérje, melyek közül az egyik tartalmazott egy DUF1620 domént (<u>D</u>omain of <u>U</u>nknown <u>F</u>unction 1620), aminek a funkciója szintén teljesen ismeretlen.

Dr. Györgyei János személyes tanácsára a fehérje-fehérje kölcsönhatások erősségének számszerűsítésére kétszeres (-Trp, -Leu), háromszoros (-Trp, -Leu, -His) és négyszeres (-Trp, -Leu, -His, -Ade) szelekciós lemezeken nőtt élesztő telepek számarányát vettük figyelembe, mivel a háromszoros és négyszeres szelekciós lemezeken nőtt telepek száma egyenesen arányos a kölcsönhatás erősségével. Másképpen mondva, ugyanolyan transzformációs hatékonyság mellett erősebb kölcsönhatóknál több élesztő telep nő ki, mint a gyengébb kölcsönhatóknál. Pozitív kontrollnak a REP-A(C1)/pGAD424, ZmRB/pGBT9 konstrukciókat használtuk, mivel Dr. Horváth Gábor és munkatársai ezekről bebizonyították, hogy erős kölcsönhatóak az élesztő-kéthibrid rendszerben

[149]. A REP-A (C1) a kukorica csíkoltságáért felelős vírus replikációért felelős fehérjéje, amely erősen kölcsönhat a kukorica retinablasztóma (ZmRB) fehérjével [149]. Negatív kontrollként a pAD-GAL4, pBD-GAL4 üres vektorokat transzformáltuk be az élesztőbe (4. ábra).



4. ábra. A kölcsönhatás erőssége szempontjából a két p65 MAP homológ és a Nedd1 homológ β -transducin-szerű (WD40) fehérje erősebben hatott kölcsön az MsROP6 CA+L változattal, mint a pozitív kontrollként használt fehérjék. Ezzel szemben a két kináz (MtRRK1 és MtRRK2) és az MsROP6 CA+L változata a pozítív kontrollnál gyengébben hat kölcsön. Pozitív kontroll: REP-A(C1) (a kukorica csíkoltságáért felelős vírus replikációért felelős fehérjéje) és ZmRB (a kukorica retinablasztóma fehérje). A szaggatott vonal pozitíz kontroll szintjét jelzi.

Ebben a rendszerben a két különöző p65 MAP homológ és a Nedd1 homológ fehérje erősebben hatott kölcsön az MsROP6 CA+L változatával, mint a pozitív kontrollunk. Ez azt jelenti, hogy -legalább is az élesztő-kéthibrid rendszerben- ezek a fehérjék erős kölcsönhatással rendelkeznek. Ugyanakkor a kináz fehérjék gyengébb, de még jól detektálható kölcsönhatást mutattak a GTP-ázzal.

A MtRRK (ROP-interacting Receptor-like Kinase) kinázok és az MsROP6 GTP-áz közötti kölcsönhatás vizsgálata

További munkánk során két receptor-szerű citoplazmatikus kinázra koncentráltunk, mivel növényi ROP GTP-ázzal kölcsönható kinázokról eddig nem voltak adatok, ugyanakkor az ilyen tulajdonsággal rendelkező fehérjék alapvető szerepet töltenek be egyéb eukarióta szervezetek sejtfunkcióiban, mint például a GTP-kötött CDC42/RAC GTP-ázzal kölcsönható PAK1 (p21 protein activated kinase) családhoz tartozó kinázok [155-157]. Valamennyi PAK1 kináz hordozza a CRIB (CDC42/Rac-interactive binding) motívumot, ami a GTP-ázokkal való kölcsönhatásért felelős. Ezt úgy kell elképzelni, hogy a CRIB motívumot tartalmazó N-terminális domén (p21-binding domén vagy PBD) úgy hajlik rá a kináz doménre, hogy az nem képes kölcsönhatni a célfehérjével. Amikor a GTP-kötött (aktív) kis GTP-ázok kölcsönhatásba kerülnek a PAK1 kinázok CRIB doménjével, akkor a kináz fehérjében történik egy térszerkezeti változás, aminek következményeként a kináz doménfelülete már kölcsönhatásba kerülhet a specifikus célfehérjével és foszforilálhatja azt. A PAK1 kinázok kizárólag GTP-kötött kis GTP-ázzal hatnak kölcsön.



5. ábra. A lúdfű RLCK VI kinázok aminosavsorrend alapú osztályozása. A hasonlósági diagramm a PHYLIP programcsomaggal készült. Az összehasonlításhoz az RLCK VI családon kívüli kinázokat is felhasználtunk, amelyek a MAPK illetve RLCK IV, VII, IX családokba tartoznak [158].

A két receptor-szerű citoplazmatikus kinázt elneveztük ROP-pal kölcsönható receptor-szerű kináznak (<u>R</u>OP-interacting <u>R</u>eceptor-like <u>K</u>inase), rövidítve RRK-nak. A két lucerna-RRK, ahogy korábban említettem, egy eddig teljesen feltáratlan növényi

kinázcsaládhoz tartozik, melyet receptor-szerű citoplazmatikus kináz VI családnak (RLCK VI) hívnak (5. ábra [158]).

A lúdfű esetében az RLCK VI családba 14 kináz fehérje tartozik, amelyek élettani szerepéről kísérleteink idejében semmilyen adat nem állt rendelkezésre. A lúdfű RLCK VI kinázok génjeinek szerkezeti és expressziós jellemzését laboratóriumunkban végezték el [158]. Az RLCK VI kinázok doménjük alapján két alcsoportra oszthatók (5, ábra;[158]). A kináz doménen kívüli részekben azonban meglehetősen nagyok az eltérések az RLCK VI családon belül is. Az 5. ábrán látható (piros nyílak), hogy aminosav sorrendjük alapján a lucerna RRK1 és RRK2 kinázok az A alcsaládba tartoznak és az AtRLCKVI_A2 illetve A_5 lúdfű kinázok homológjai.



6. ábra. (A) Az RRK1 és az RRK2 kizárólag az MsROP6 CA+L változatával hat kölcsön, a GDP-kötő alakot utánzó DN+L változattal nem. AD: aktivátor domén, BD: DNS-kötő domén. **(B)** Az RRK1 szintén kölcsönhat az – ebben az esetben "vad" típusnak tekinthető – MsROP6 L változattal is.

Mivel a teljes lucerna RRK gén nem állt rendelkezésünkre, a teljes bázissorrend megismeréséhez további cDNS-eket azonosítottunk radioaktív próba hibridizálásával. A kapott cDNS-ek bázissorrendjét meghatároztuk. Megállapítottuk, hogy az RRK1 esetében a kezdő metionint kódoló ATG-ből az AT nukleotidok, az RRK2 amino-terminális végéből pedig 12 aminosavnyi darab hiányzott. Mindkét RRK igazából csak egy nagy kináz doménból áll. A karboxi- és amino-végi túlnyúló részek kicsik és nem található bennük semmilyen ismert szerepű peptidmintázat vagy domén.

Következő kísérletünkben arra voltunk kíváncsiak, hogy az MtRRK kinázok kölcsönhatnak-e az MsROP6 DN+L és MsROP6 L változatokkal? Az élesztő-kéthibrid rendszerben ellenőriztük kölcsönhatásukat (6. ábra). Az élesztő-kéthibrid kísérlet eredményéből arra a következtetésre jutottunk, hogy a két RRK kináz kizárólag az MsROP6 CA+L és L változatával hat kölcsön, a DN formával nem (6. ábra). Eszerint a két MtRRK kináz a GDP-kötött ROP GTP-ázzal nem mutat kölcsönhatást, hasonlóan az állati vagy az élesztő-gomba PAK1 kinázokhoz.

A ROP GTP-áz-kötő mintázat azonosítása az RRK-on

Korábban már említettem, hogy az állati és az élesztő-gomba rendszerekből ismerjük, hogy a RHO/RAC/CDC42 GTP-ázok által bekapcsolt kinázokban általában található CRIB motívum (pl. PAK1 kinázokon [155]), ugyanakkor a lúdfű teljes genom szekvenciájában nem található olyan kináz, ami rendelkezik a CRIB motívummal. Nos, ha nem a CRIB mintázat, akkor a kinázok mely részlete felelős a kölcsönhatásért? Van-e olyan elkülöníthető szakasz vagy aminosav mintázat, amely felelős a bekapcsolt ROP GTPázhoz való kötődésért?



7. ábra. (A) Az RRK1 kinázokat különböző részekre daraboltuk. Az N900 és a C1000 darabok esetében a karboxi- és amino-végi túlnyúló részeket vágtuk le a fehérjéből. Az N200 változat csak az amino végi túlnyúló darabot tartalmazta. Az N500 változatban a kináz domén középétől a kaboxi-végig tartó részt hagytuk ki. (B) Az RRK1 különböző trunkált változatainak MsROP6 CA+L változattal való kölcsönhatása élesztő-kéthibrid rendszerben.

Ennek a kérdésnek a megválaszolására az MtRRK1 kinázt különböző részekre daraboltuk (7. ábra). Az N900 és a C1000 darabok esetében a karboxi- és amino-végi túlnyúló részeket vágtuk le a fehérjéből (7. ábra A). Az N200 változat csak az amino-végi túlnyúló darabot tartalmazta (7. ábra A). Az N500 változatban a kinázdomén középétől a kaboxivégig tartó részt hagytuk ki (7. ábra A). A kináz szakaszok ROP GTP-ázzal való kölcsönhatását az élesztő-kéthibrid rendszerben vizsgáltuk meg (7. ábra B). A kísérletet többször megismételtük, és arra a következtetésre jutottunk, hogy a kinázokban nem azonosítható egy olyan jól elhatárolható szakasz vagy régió, amely a bekapcsolt ROP GTP-ázzal való kölcsönhatásért önmagában felelős. Valószínű, hogy a kölcsönhatásért nem egy elkülöníthető peptidmintázat a felelős, hanem a kináz különböző részein található aminosav-oldalláncok vesznek részt a kölcsönhatásban.

Kölcsönhatások igazolása in vitro kináz reakció által

Az irodalmi adatokban már találkozhatunk mind a kis GTP-ázoknak (pl. RHOA, RAB, RIC1), mind szabályzó fehérjéiknek (GEF, GDI) direkt foszforiláció általi szabályzásával [159-161]. Mivel az MtRRK-k kinázok nem rendelkeznek CRIB mintázattal, értelemszerűen felmerült az a kérdés, hogy az MsROP6 valójában nem a szubsztrátja-e az MtRRK kinázoknak. Ehhez radioaktívan jelölt [γ-32P] ATP-vel végzett kináz reakciót terveztünk, amihez bakteriálisan túltermeltetett fehérjéket tisztítottunk.

Az MsROP6 CA és DN változatait hagyományos módszerrel beklónoztuk pMAL2c és pTRC-HisB IPTG-vel beindítható baktériumos fehérjetermelő vektorokba. Az MsROP6 W vad típust viszont LR klonáz alkalmazásával rekombinációval klónoztuk be a pMAL2c-Dest és pDEST17 vektorokba, amelyek szintén IPTG-re bekapcsolódó baktériumos fehérjetermelő vektorok. A pMAL2c és pMAL2c-dest vektorok segítségével amino-végi MBP-hez (Maltose Binding Protein) illesztett fehérjét lehet termeltetni, amelyet azután amilóz oszlopon kell tisztítanunk. A pTRC-HisB és a pDEST17 vektorokkal viszont amino-végi 6×His-t tartalmazó fehérjét lehet termeltetni, amelyet Ni-NTA oszlopon keresztül tisztíthatunk. Se az MBP-s, se a 6×His-es MsROP6 CA, DN és W fehérjék baktériumos túltermelése és tisztítása nem volt különösebben nehéz (8 ábra A.). Kivétel a 6×His-MsROP6 DN változata volt, amely gyakran került fehérjezárványokba.



8. ábra. (A) (1-3) Anti-His ellenanyaggal végzett Western blot. 4-11 Anti-MBP ellenanyaggal végzett Western blot. 1. 6×His-RRK2; 2. 6×His-RRK1; 3. 6×His-NEDD1β-transzducin-szerű, 4-11 MBP-MsROP6 W; 4. nem-indukált; 5. indukált, fehérjezárványba kerül;, 6. indukált felülúszó; 7. amilóz gyantához kötés után visszamaradt minta; (8-11) maltózzal eluált minták 1. 2. 3. és 4. frakciók. (B) 6×His-RRK-k baktériumos túltermelésének időfüggése. Beindítás után 1. 15 perc; 2. 30 perc; 3. 45 perc; 4. 1 óra; 5. 1 óra 20 perc.

Az MtRRK-ákkal nem voltunk ilyen szerencsések. Sokat próbálkoztunk, hogy a baktériumokat fehérjetermelésre bírjuk. Több különböző vektorba is beklónoztuk a gént. Végül egy arabinózzal beindítható rendszernél jöttünk rá a RRK túltermelés és tisztítás titkára: beindítás után nem szabad sokáig hagyni növekedni a baktériumokat. Az RRK-k az indukciót követően körülbelül 45 perc után eltűnnek a rendszerből, de nem fehérjezárványokba kerülnek át (8. ábra B). Ezért a kísérlethez szükséges fehérje mennyiség kinyerése érdekében megnöveltem a baktérium mennyiségét. Most már kezünkben voltak a tisztított MBP-MsROP6 és a 6×His-MsROP6 W, CA, és DN változatai, valamint a 6×His-MtRRK1 és 6×His-MtRRK2 fehérjék.

A 6×His-MtRRK2 kinázzal és [γ -32P] ATP-vel egy kináz reakciót végeztünk az MBP-MsROP6-on (9. ábra A). Ebben a kísérletben azt figyeltük meg, hogy az MtRRK2 kináz az MsROP6 W és CA változatát foszforilálta. Mivel csak magát a MBP-t nem foszforilálta, ezért azt feltételezhetjük, hogy a foszforilálás az MsROP6 GTP-ázon belül történhetett. A következő kináz reakcióban az MBP-MsROP6 W és a 6×His-MsROP6 CA változatot 1 mM GTP és 1 mM GDP jelenlétében foszforiláltuk 6×His-MtRRK2-vel (9. ábra B). Az ábrán látszik, hogy az MtRRK2 kináz az MBP-ROP6 W változatot gyengén, a CA változatot erősen, a DN változatot nem foszforilálta. Ezzel összhangban a 6xHIS-ROP6 változatok közül is a CA mutáns illetve GTP jelenlétében a vad típus mutatott erős foszforilációt. Ez utóbbi GDP jelenlétében csak gyengén foszforilálódott.



9. ábra. Az autoradiogrammokon MBP- és 6His-farokkal rendelkező MsROP6 különböző változatának az MtRRK-val törtenő foszforilása látható **(A)** Balról kezdve: Negatív kontrollként tisztított MBP (Maltose Binding Protein); MBP-MsROP6 vad típuson (W), GDP kötött mutánson (DN) és GTP-kötött mutánson (CA). **(B)** Az első oszlopon csak 6×His-MtRRK2 MsROP6 nélkül; a második oszlopon 6×His-MsROP6 CA+RRK2; a harmadik oszlopon csak 6×His-MsROP6 kináz nélkül; a negyedik oszlopon MBP-MsROP6W (vad típus)+1mM GTP+RRK2; az ötödik oszlopon MBP-MsROP6 W (vad típus) +1mM GDP+RRK2.

Ugyanezeket a kísérleteket végrehajtottuk MtRRK1-gyel is (10. ábra). A pTRC-HisB vektorról származó 6×His-MsROP6 28 kDa, az MBP-MsROP6 viszont 65 kDa. A pBAD24-His vektorról termeltetett és tisztított 6×His-MtRRK-k molekulasúlya 49 kDa. A 6×His-RRK1-gyel végzett kináz reakciók eredménye hasonló volt, mint a 6×His-MtRRK2-val végzetteké (10. ábra A), azzal a kis különbséggel, hogy a 6×His-RRK1 saját magát is képes volt foszforilálni. Mindez arra utalt, hogy a MsROP6 GTP-áz bekapcsolt (GTPkötött) formában foszforilálódik az RRK kinázok által.

Ebben a kísérletben szubsztrátnak sertésagyvelőből tisztított mielin bázikus fehérjét (Myelin Basic Protein, MyBP) is használtunk. A MyBP-t a szerin/treonin kinázok általános szubsztrátjaként tartják számon. A 6×His-MtRRK1 gyengén ugyan, de foszforilálta a MyBP-t is (10. ábra B).



10. ábra. A 6×His-MtRRK1-gyel végzett kináz reakciók. (A) Balról kezdve: MBP-MsROP6-DN (GDP-kötött mutáns); MBP-MsROP6 (vad típus) GTP nélkül; MBP-MsROP6 (vad típus) + 1mM GTP. (B) 1. 6×His-MsROP6-CA (GTP-kötött mutáns); Mielin bázikus fehérje (MyBP).

Eddigi eredményeink alapján úgy tűnt, az MsROP6-nak a CA változata az RRK-ák szusztrátja. Itt viszont az a kérdés merült fel, hogy az MsROP GTP-áz GTP-kötő alakja esetleg nem egy általános szubsztrát-e a növényi szerin/treonin kinázok számára. Az is lehetséges, hogy ilyen *in vitro* körülmények között bármilyen más növényi szerin-treonin típusú kináz képes foszforilálni az MsROP6 GTP-ázt. Ezt a kérdést úgy tisztáztuk, hogy egy másik szerin/treonin kinázzal próbáltuk foszforilálni az MsROP6 GTP-kötő formáját. Erre a célra egy lúdfű szerin/treonin kinázt alkalmaztunk, mégpedig AtMAPK4-gyet. Az AtMAPK4 foszforilálta a MyBP-t, ami azt jelenti, hogy működőképes volt ebben rendszerben. Ennek ellenére nem volt képes foszforilálni az MsROP6-t (11. ábra). Az *in vitro* körülmények között az MtRRK-k csak a "GTP-kötött" MsROP6-ot foszforilálták, ami egyben kölcsönhatásukat is igazolta. Ezek az eredmények kölcsönhatás szempontjából megerősítették az élesztő-kéthibrid rendszerben kapot eredményeket. Egy tudományos folyóiratban találtunk egy számunkra érdekes beszámolót arról, hogy az emberi Akt kináz képes foszforilálni a szintén emberi RAC1





11. ábra. 1-2. oszlopokon 6×His-RRK1-gyel végzett kináz reakció; 1. MBP-MsROP6-CA (GTP-kötött mutáns) 2. MBP-MsROP6 (vad típus); a pirossal karikázott részen az RRK1 autofoszforilációja látható. 3-5. oszlopokon GST-AtMAPK4-gyel végzett kináz reakció. 3. MBP-MsROP6-CA (GTP-kötött mutáns) ; 4. MBP-MsROP6 (vad típus); 5. MyBP-mielin bázikus fehérje.

A mi lucerna MsROP6-unk a 74. szerinnél a NetPhos2 server programmal (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/) végzett számítógépes előrejelzés alapján egy nagyon jól foszforilálható kináz felismerőhelyet tartalmaz, ami nagymértékben hasonló a RAC1-ben található felismerő helyben. Elkészítettuk a 6×His-MsROP6 S74A mutáns változatot. amelyben a 74. szerint alaninra cseréltük. Ugyanezt a mutánst a GTPáz CA változatban is előidéztük. Az MtRRK1-gyel végzett kináz reakcióban a 6×His-MsROP6 S74A és a 6×His-MsROP6 S74A es a 6×His-MsROP6 S74A es a 6×His-MsROP6 S74A+CA változatokat újra tisztítottuk és megismételtük a kináz reakciót (12. ábra).

A 6×His-MsROP6 S74A ugyanúgy foszforilálódott, mint a 6×His-MsROP6 W vad típusú fehérje. A 6×His-MsROP6 S74A+CA is a 6×His-MsROP6 CA-hoz hasonlóan foszforilálódott. Az MtRRK1 továbbra is nagyon gyengén foszforilálta a mielin bázikus fehérjét. Ezek alapján úgy gondoltuk, hogy a GTP-áz a 74-es szerin helyett máshol is foszforilálódhat. Ezt MALDI vizsgálattal szerettük volna bizonyítani.



12. ábra. MtRRK1 törtenő kináz reakciók. Balról kezdve: csak MtRRK1; 6×His-MsROP6 vad típus (WT); 6×His-MsROP6 GTP-kötött mután (CA); 6×His-MsROP6 GDP-kötött mutáns (DN); S74A: 6×His-MsROP6-nak 74 szerin/alanin mutánsa (S74A); 6×His-MsROP6 S74A+CA dupla mutáns; MyBP (mielin bázikus fehérje).

Az MsROP6 foszforilált aminosavának azonosítása MALDI vizsgálattal

A MALDI vizsgálathoz nem radioaktív ATP-vel foszforiláltuk az MsROP6 fehérje CA változatát az MtRRK1 kináz által. Az MTA SzBK Proteomikai laboratóriumában kapott vizsgálatok eredményét a fehérje szekvenciákon mutatom be. A 6×His-MtRRK1-ben az önfoszforilált aminosavakat pirossal emeltem ki. Az aláhúzás azt jelenti, hogy az aminosavak közül egyszerre csak az egyik foszforilálódhatott, de mivel nagyon közel vannak, pontosan nem állapítható meg, hogy valójában melyik foszforilálódott. Zölddel jelöltem a fehérje kináz részét. Az MtRRK1 kináz kezdő metioninja hiányzott. Az MsROP6 CA fehérjét kék színnel jelöltem, a fekete színű rész viszont a 6×His epitópot és a klónozás során keletkezett kapcsoló szakaszt jelöli. A piros színű szerin a MALDI által kimutatott foszforilált aminosav, amely ezek szerint nem az MsROP6-ra esik.

A 6×His-MtRRK1 foszforiláció helyének meghatározása:

MG<u>SSHHHHHHSS</u>GLVPRGSHMASMTGGQQMGRG<u>SEFGT</u>RRYIR<u>TGS</u>FKRLFSFTKRGLGEPV LSPKGEENEKSLKILPYEEETCQRPTWKCFSYEELFDATNGFNSENMVGKGGYAEVYKGTLKN GEEIAVKRLTRASKDERKEKEFLTEIGTIGHVRHSNVLSLLGCCIDNGLYFVFELSTTGSVSSILH DEKLAPLDWKTRHKIVVGTARGLHYLHKGCKRRIIHRDIKASNILLTKDFEPQISDFGLAKWLP SQWTHHSIAPIEGTFGHLAPEYYLHGVVDEKTDVFAFGVFLLEVISGRKPVDVSHQSLHSWAK PILNKGDIEELVDARLEGEYDITQLKRLAFAASLCIRASSTWRPSMTEVLEIMEEGEMDKEKWK MPEEEEEQEEEFWGFEDLEYEYDSSFSMSLIDSIESN

6×His-MsROP6 CA foszforiláció helyének meghatározása:

MGGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRTLYDDDDKDRWGSELEIRYRIPMSGSRFIKCVTVGDVA VGKTCLLISYTSNTFPTDYVPTVFDNFSANVVVDGSTINLGLWDTAGQEDYNRLRPLSYRGAD VFLLAFSLISKASYENIAKKWIPELRHYAPGVPIILVGTKLDLRDDSQFFQDHPGAAPITTAQGE ELRKLIGAPVYIECSSKTQKNVKAVFDSAIKVVLQPPKQKKTKRKGQKACSIL

Ezután sem adtuk fel, még mindig reménykedtünk a GTP-áz foszforilálásában. Ezért lecseréltük ezt a szerint, az így kapott két fehérjét foszforiláltam és leadtam MADLI vizsgálatra.

MsROP6 CA változat aminosavsorrendje:

MGGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKHRWI<u>RYRIP</u>MSGSRFIKCVTVGDVAVGKT CLLISYTSNTFPTDYVPTVFDNFSANVVVDGSTINLGLWDTAGQEDYNRLRPLSYRGADVFLLA FSLISKASYENIAKKWIPELRHYAPGVPIILVGTKLDLRDDSQFFQDHPGAAPITTAQGEELRKLI GAPVYIECSSKTQKNVKAVFDSAIKVVLQPPKQKKTKRKGQKACSIL

A két darab piros szerin nem azt jelenti, hogy két foszforilálási helyet azonosítottak, hanem hogy túl közel vannak egymáshoz, ezért nem tudták meghatározni a foszfátcsoport pontos helyét. Ez a foszforiláció is mesterségesnek tekinthető, mivel a szerinek, a NetPhos2 program által megállapíthatóan, a megelőző <u>RYRIP</u> mintázat miatt váltak foszforilálhatóvá. Ezért ettől a mintázattól is megszabadultunk és így a harmadik 6×His farokkal rendelkező változatot adtuk le MALDI vizsgálatra.

MsROP6 CA változat aminosavsorrendje:

MGG<u>SHHHHHHGMAS</u>MTGGQQMGRDLYDDDDKDRWIRPRDLQMVPYGN<u>SMSGS</u>RFIKCVTV GDVAVGKTCLLISYTSNTFPTDYVPTVFDNFSANVVVDGSTINLGLWDTAGQEDYNRLRPLSY RGADVFLLAFSLISKASYENIAKKWIPELRHYAPGVPIILVGTKLDLRDDSQFFQDHPGAAPITT AQGEELRKLIGAPVYIECSSKTQKNVKAVFDSAIKVVLQPPKQKKTKRKGQKACSIL

Nem sikerült kimutatnunk a GTP-áz foszforilálását. Sőt, úgy nézett ki mintha az aminovégen elhelyezkedő valamennyi szerin képes lenne foszforilálódni. Ezért készítettünk egy újabb 6×His farokkal rendelkező változatot. Ebben a 6×His farok a fehérje karboxivégére került és a klónozáshoz használt restrikciós endonukleáz (XhoI) felismerő helye által kódolt két aminosavon kívül más idegen aminosav nem található benne.

MsROP6 CA-6×His fehérje aminosavsorrendje:

MSGSRFIKCVTVGDVAVGKTCLLISYTSNTFPTDYVPTVFDNFSANVVVDGSTINLGLWDTAGQ EDYNRLRPLSYRGADVFLLAFSLISKASYENIAKKWIPELRHYAPGVPIILVGTKLDLRDDSQFF

QDHPGAAPITTAQGEELRKLIGAPVYIECSSKTQKNVKAVFDSAIKVVLQPPKQKKTKRKGQKA CSILLEHHHHHH

Itt viszont a MALDI vizsgálat nem mutatott ki foszforilált aminosavat és *in vitro* kináz reakció sen bizonyult pozitívnak. Az MsROP6 CA-6×His-szel végzett kináz reakcióban halvány jel ugyan látható volt, de erről kiderült, hogy E. coli fehérje szennyezés okozza. Később a szakirodalomban megjelentek az adatok arról, hogy a kereskedelemben kapható, N-terminálisan 6xHis farokkal rendelkező bakteriálisan túltermelő vektor konstrukcióknál maga a 6xHis epitóp sok olyan szerint tartalmaz, ami könnyen foszforilálható különböző szerin-treonin kinázokkal [163,164]. A 12. ábrán bemutatott kináz reakción jól látszott, hogy az MtRRK1 önfoszforilálása legerősebb az MsROP6 CA GTP-áz jelenlétében, viszont MsROP6 DN jelenlétében alig kivehető. Ez felvetette annak a lehetőségét, hogy bár a kináz nem rendelkezik CRIB motívummal a GTPáz mégis szabályozhatja a kináz aktivitását.

A GTP-kötött MsROP6 aktiválja az MtRRK kinázokat *in vitro*

Előző kísérletekből az derült ki, hogy a kináz aktivitása mégis "GTP-kötött" ROP GTPáz függő lehet. Ezért olyan kináz reakciót állítottunk össze, ahol 6×His-RRK1 kináz és 6×His-MsROP6 CA GTP-áz változat mellé tettük a mielin bázikus fehérjét (MyBP) (13 ábra). Az már ismert tény, hogy a mielin bázikus fehérje kinázok számára univerzális szubsztrát fehérje. Ebben a kísérletben a mielin bázikus fehérje RRK1 kináz általi foszforilálódása aktív GTP-áz jelenlétében határozottan erős volt, míg a 6×His-MsROP6 CA foszforiláció a kontrollhoz képest lecsökkent. GTP-áz hiányában a MyBP foszforiláció alig volt kimutatható.

Azt a következtetést vontuk le, hogy nemcsak az MtRRK1 önfoszforilálása függ az MsROP6 CA változat jelenlététől, de az MtRRK1 kináz csak akkor képes erőteljesen foszforilálni a mielin bázikus fehérjét, ha jelen van az MsROP6 CA fehérje. Röviden: a "GTP-kötött", azaz bekapcsolt alakot utánzó CA változat pozitív hatással van az MtRRK1 kináz működésére. Ezt az eredményt a kináz reakcióban résztvevő összetevők moláris arányának módosításával akartuk megerősíteni. A fehérjék koncentrációját Bradford (BioRad) festéssel határoztuk meg. Ez a módszer nem biztosít abszolút pontos értékeket, hanem csak közelítő érteket ad. Itt azonban szeretnénk hangsúlyozni, hogy a következő kísérletekben nem enzim kinetikát vizsgáltunk, hanem csak azt a tényt akartuk igazolni, hogy az RRK-k foszforilációs képességét a ROP6 GTP-áz ténylegesen befolyásolja.



13. ábra. 6×His-RRK1-gyel végzett kináz reakció. Az autoradiogramm alatt a pozitív jelek (+) jelzik a reakcióban levő fehérjék kombinációját MyBP mielin bázikus fehérje.

Ezért következő kísérletben a kináz reakció során megvízsgáltuk, hogy az MsROP6-WT ("vad") változat GTP jelenlétében az MsROP6-WT a MtRRK1 kináz aktivitását pozitívan befolyásolja, mivel a MyBP-t megfoszforilálta, míg GDP jelenlétében nem (14. ábra). A GTP/GDP jelenléte szintén befolyásolta az MtRRK1 önfoszforilálását is.



14. ábra. Az változatlan mennyiségű MsROP6 WT (vad típus) jelenlétében 6×His-RRK1-gyel végzett foszforilációk GTP és GDP jelnlétében. Az autoradiogramm alatt a reakcióban levő fehérjék egymáshoz viszonyított mennyisége látható.

A következő kísérletben állandó mennyiségű MyBP mellett csökkentettük az MsROP6-CA változatának mennyiségét (15. ábra). Itt az MsROP6-CA mennyiségének csökkenésével együtt az MtRRK1 kináz aktivitása megszűnt.



15. ábra. A 6xHis-MsROP6-CA koncentráció csökkenésével MtRRK1-nek kináz aktivitása látványosan csökkent változatlan szubsztrát és kináz mennyiség mellett. A számuk a fehérje koncentrációjának arányát jelzik a kinázhoz (1) viszonyítva.

Ezek után azt a következtetést vontuk le, hogy a GTP-kötött MsROP6 aktiválja az MtRRK1-et. Mivel WT "vad" típusa csak GTP jelenlétében befolyásolta pozitívan a kináz akivitását, a GTP-kötött formát imitáló CA változat is pozitiv hatással volt kináz-aktivitásra. Így az RRK1 kinázok a jelátviteli útvonalban a ROP GTP-ázok után foglalhatnak helyet, mivel kizárólag GTP-kötött, azaz "aktív" ROP által aktiválódnak.

Korábban már említettem, hogy állati és élesztő rendszerben elég jól ismertek a RHO/RAC/CDC42 GTP-ázok által aktivált kinázokból álló jelátviteli útvonalak [155]. Kísérleteinkkel egyidőben egy német kutatócsoport beszámolt arról, hogy három általuk azonosított a lúdfű RLCK (ebből kettő az PLCK VI család RRK1-től és RRK2-től különböző tagja) képes *in vitro* és *in vivo* ROP GTP-áz kötésre[165]. Ők viszont kizárták azt a lehetőséget, hogy ezek a kinázok aktivilálódnak a GTP-ázok által. Kutatócsoportunkban azóta igazoltuk, hogy ezek a lúdfű kinázok is ROP GTP-áz függőek (nem közölt adatok).

Kölcsönhatás specifitásának vizsgálata

Ha a jelátviteli útvonalban az MtRRK-k a MsROP6-t követik, akkor az MsROP6 specifikus-e az MtRRK1/2 számára, vagy más GTP-kötött ROP GTP-áz is képes aktiválni kináz aktivitásukat? Erre a kérdésre azt a megoldást választottuk, hogy a fentiekhez hasonló kísérleteket végeztünk néhány lúdfű ROP GTP-áz jelenlétében is. A 16. ábra (A) részen az figyelhető meg, hogy az MtRRK1 ugyanúgy aktiválódik AtROP1 CA+L által, mint MsROP6 CA által. Továbbá a lúdfű AtROP6 is képes volt bekapcsolni a 6×His-MtRRK1 kinázt (16. ábra (B)). Az N-terminálisan epitóp-jelölt 6×His-ROP fehérje esetében az adott ROP GTP-áznak a foszforilálása látható volt. De a C-termináisan 6×His-jelölt ROP-oknál nincs foszforilációs jel, mivel itt az epitóp részen nincs foszforiláció.



16. ábra. (A) Az 6xHis-AtROP1-CA,L mutáns bekapcsolta az 6xHis-MtRRK1 kináz aktivitását. Az autoradiogramm alatt a pozitív jelek (+) jelzik a reakcióban levő fehérjék kombinációját. **(B)** A lúdfű ROP GTP-ázok az AtROP1 és az AtROP6 képesek aktiválni az 6xHis-MtRRK1 kinázt. Pozitív kontrollnak MsROP6-CA-6xHis látható. Az AtROP1-WT-6xHis és az AtROP6-WT-6xHis "vad" tipusú fehérjék csak akkor kapcsolták be az 6xHis-MtRRK1 kináz aktivitását, amikor reakcióelegyben jelen volt 1mM GTP.

16. ábrán mutatott kísérletek eredményéből arra következtettünk, hogy a lucerna RRK kinázaink nem tesznek különbséget a növényi ROP GTP-ázok között. A fent említett kísérletet több más lucerna és egy kukorica ROP GTP-ázzal is megismételtük, ugyanezen eredményekkel. Ezekről a kísérletekről kép nem került be a dolgozatomba.

A következő kérdés ami felmerült az volt, hogy az MtRRK-ok vajon más kis GTP-ázzal is kölcsönhatásba lépnek-e? Erre a kérdésre úgy kerestük a választ, hogy kiválasztottunk

egy nem növényi eredetű RHO-típusú GTP-ázt (RX) (17. ábra). Sajnos mi sem tudjuk pontosan mely élőlényből származik ez a GTP-ázunk. Dr. Szűcs Attila és munkatársai *Medicago sativa* gyökérgümő cDNS könyvtárból nyerték ki, de nem növényi szekvencia. Azt tartják valószínűnek, hogy egy szimbionta vagy parazita gombából eredő, a CDC42 GTP-áz alcsaládhoz tartozó kis GTP-kötő fehérjéről van szó [151].



17. ábra. Három lucerna, három lúdfű ROP GTP-áz, egy emberi RAC1 GTP-áz, egy élesztő CDC42 GTP-áz és az ismeretleneredetű RX GTP-áz aminosav sorrendjének összehasonlítása. A pirossal bekeretezett terület a RHO- inszert régiót jelzi. Jól látható, hogy az RX GTP-áz a humán és élesztő GTP-ázokkal mutat hasonlóságot.

A kísérleteink szempontjából megfelelt ez a GTP-áz, mivel tudtuk, hogy nem növényi ROP GTP-áz. A RX GTP-ázból készítettünk egy CA+L változatot, és beklónoztuk a pBD-GAL4 csalivektorba. Az élesztő-kéthibrid rendszerben megvizsgáltuk a kölcsönhatásukat mindkét MtRRK-val. Az 18. ábrán látható, hogy a lucerna RRK kinázaink nem léptek kölcsönhatásba a nem növényi eredetű RX GTP-ázzal az élesztő-kéthibrid rendszerben.



18. ábra. RX GTP-áz és két MtRRK közötti kölcsönhatás vizsgálata az élesztő-kéthibrid rendszerben. 1. BD-RX GTP-áz és AD-MtRRK1. 2. BD-RX GTP-áz és AD-MtRRK2. 3. negatív kontroll

AD és BD "ürés" vektorok. 4. pozitív kontroll AD-RepA(C1) és BD-ZmRb. Az aminosav szelekciók: (a) -Trp, -Leu. (b) -Trp.-Leu.-His. (c)-Trp, -Leu, -His, -Ade.

A fenti kísérletből az következik, hogy a növényi ROP GTP-ázok tartalmaznak egy (vagy több) olyan mintázatot, amely felelős az RRK kinázokkal való kölcsönhatásért és annak bekapcsolásáért; ennek a mintázatnak viszont más, nem növényi eredetű RHO GTPázokból hiányoznia kell.

A kináz bekapcsolásáért felelős mintázat meghatározása

Az irodalomból tudjuk, hogy az állati RHO/RAC/CDC42 GTP-ázokban egy jellegzetes peptidhuroknak (RHO-inszert régió) van fontos szerepe egyes célfehérjék bekapcsolásában [25,166]. Ennek a szakasznak a kicserélése ugyanakkor nem befolyásolja a célfehérjével való kölcsönhatást [167-169]. A növényi ROP GTP-ázoknak is van jellegzetes RHO-inszert régiója, amelynek aminosav sorrendje a növényi ROP GTP-áz alcsaládon belül alig változik (17. ábra). Ugyanakkor a növényi ROP GTPázoknak ez a szakasza a többi RHO családhoz tartozó GTP-áz hasonló peptidhurkától nagyon eltérő (lásd 1. és 18. ábrák). Az állati RHO/RAC/CDC42 GTP-ázok inszert régiójának élettani jelentőségét úgy vizsgálták, hogy azt a RAS GTP-ázok néhány aminosavból álló, hasonló pozícióban levő, peptidhurkával cserélték ki [167]. A RAS GTP-ázoknak ez a régiója nem tekinthető funkcionális inszert régiónak, az csak a RHOtípusú GTPázokra jellemző. Az irodalmi adatok alapján ez a csere nem változtatja meg alapvetően a GTP-áz fehérje térszerkezetét, de érinti a célfehérjebekapcsoló képességét [167,169]. Mi is ugyanilyen cserét hajtottuk végre az MsROP6 GTP-ázon, és elneveztük az így létrehozott mutánst MsROP6 inszerciós régió mutánsnak vagyis MsROP6ΔIRAS változatnak (19. ábra).

A kicserélést speciális PCR reakcióval végeztük el. Előszöris megfelelő primereket terveztünk. Ezek felépítése az alábbi volt:

5 C insHRAS psti (reverz): a RAS inszerció (AARTVES) első három aminosavát kódoló nukleotidok; a ROP GTP-áz inszerciós régió N-terminális régiójával határos szakaszt kódoló nukleotidok; túlnyúló *Pst*I restrikciós hely.

3 N insHRAS psti (forward): a RAS inszerció (AARTVES) utolsó négy aminosavát kódoló nukleotidok; a ROP GTP-áz inszerciós régió C-terminális régiójával határos szakaszt kódoló nukleotidok; túlnyúló *Pst*I restrikciós hely.



19. ábra. Az MsROP6ΔI^{RAS} mutáns megfelelő régiójának összehasonlítása a növényi és az emberi RHO családba tartozó GTP-ázok inszerciós régiójával.

A mindkét primer túlnyúló végén található PstI enzimfelismerő hely 6 bázispárjából csak 5 az igazi túlnyúló. A legbelső 6-ik bázis része a RAS inszerciós régiót kódoló bázissorrendnek. Első lépésként 2 külön PCR reakciót állítottunk össze a következő primer párosítással:

- 5 C insHRAS psti/Full-fw (NdeI)
- 3 N insHRAS psti/Full-rev stop kodon nélküli (XhoI)

A Full-fw és Full-rev primerek a teljes hosszúságú MsRop6 GTPáz kódoló szekvencia amplifikálását teszik lehetővé. A PCR reakciókban az MsROP6 CA változatát választottuk templát molekulának. Az első PCR terméket az NdeI és a PstI restrikciós endonukleázokkal, amíg a másik két PCR terméket az XhoI és a PstI restrikciós endonukleázokkal megemésztettük. A pET26b (Novagen) vektort célvektor plazmidnak választottuk, és az NdeI és a XhoI restrikciós endonukleázokkal emésztettük meg. A már megemésztett PCR reackió termékeket megfelelően hasított pET26b vektorba illesztettük be T4 ligázzal. A sikeres ligázreakció termékeit újra megemészettük a PstI restrikciós endonukleázzal. Az emésztés után kialakult ragadós túlnyúló végek eltüntetésehez a Klenow polimeráz nagy fragmentjének exonukleáz-aktivását használtuk. Az így kialakult tompavégű lineáris plazmidokat T4 ligázzal cirkulárisra zártuk vissza. Az így létrejött vektor-konstrukciót MsROP6ΔI^{RAS} +CA/pET26b-nek neveztük el. A MsROP6ΔI^{RAS} változat előállításnál ugyanilyen módszert követtünk, csak azzal a kis különbséggel, hogy a PCR reakció során az MsROP6 W típust választottuk templátként.

Egy újabb PCR reakcióban a MsROP6 Δ^{IRAS} +CA/pET26b és A MsROP6 Δ^{IRAS} /pET26b kontrukciókat használtuk templátként, hogy a Δ^{IRas} változatokra nézve az élesztőkéthibrid vizsgálathoz alkalmas vektorkonstrukciókat előállíthassuk. Full-fw (EcoRI) és Full-revL (SaII) primerpárokkal végeztünk PCR reakciót, és a reakció terméket megemésztettük EcoRI és a SaII restrikciós endonukleázokkal. A reverz primer segítségével alakítottuk ki a GTPázok izoprenilációban mutáns (L) változatát, amely a kéthibrid vizsgálathoz elengedhetetlen (lásd korábban).



20. ábra. Az MsROP6 Δ^{IRAS} +CA,L és az MsROP6 Δ^{IRAS} +L (piros vonal) mutánsoknak az MtRRK kinázokkal való kölcsönhatását megvizsgáltuk élesztő két-hibrid rendszerben. Összehasonlításképpen az MsROP6-nak vad típusát (WT) és GTP-kötött (CA) mutánsát párhuzamosan vizsgáltuk. (+)kontroll: REP-A(C1)/ZmRb. (-) kontroll AD/BD.

A pBD-GAL4 vektort szintén EcoRI és SalI restrikciós endonukleázokkal hasítottuk, és a hasított PCR fragmenteket beillesztettük ebbe a vektorba a T4 ligáz közreműködésével, így az MsROP6Δ^{IRAS}+CA,L/pBD-GAL4 és az MsROP6Δ^{IRAS}+L/pBD-GAL4 konstrukciókat már használhattuk az élesztő két hibrid reakcióban.

A Δ^{IRAS} MsROP6 fehérjék és mindkét RRK közötti kölcsönhatását megvizsgáltuk az élesztő-kéthibrid rendszerben (20. ábra). Az élesztő-kéthibrid vizsgálat alapján a ROPinszert régió megváltoztatása nem szűntette meg a kinázok és a GTP-ázok közötti kölcsönhatást.

Ezek után arra kerestük a választ, hogy a régiónak esetleg van-e szerepe az RRK kinázok bekapcsolásában. Ehhez a kísérlethez karboxi-végi 6×His farokkal rendelkező, baktériumban termeltethető génkonstrukciót állítottunk elő az MsROP6Δ^{IRAS}+CA

változatából. A módosított Δ^{IRAS} fehérjével végzett kináz reakció egyértelműen kimutatta, hogy az MsROP6 Δ^{IRAS} +CA változat nem képes bekapcsolni a 6×His-MtRRK1 kinázt (21. ábra).



21. ábra. Az MsROP6Δ^{IRAS}-CA mutánst megvizsgáltuk, hogy bekapcsolja-e az MtRRK1 kináz aktivitását. Az oszlopon az látszik, hogy az MsROP6Δ^{IRAS}-CA mutáns nem képes bekapcsolni de a pozitív kontrollnak vett az MsROP6-CA mutáns bekapcsolta MtRRK1 kináz aktivitásukat. Az autoradiogramm alatt a pozitív jelek (+) jelzik a reakcióban levő fehérjék kombinációját.

Fenti kísérletekből azt a következtetés vontuk le, hogy az MsROP6 GTP-áznak az inszerciós régiója nem felelős a kölcsönhatásért, de az MtRRK kinázok bekapcsolásáért igen. Az MtRRK1 nem tett különségét különböző növényből származó ROP GTP-ázok között, ami talán azzal magyarázható, hogy az általunk vizsgált növényi ROP GTPázoknak az inszerciós régiói meglehetősen nagyfokú homológiát mutatnak egymásal, sőt azonosnak is mondhatók.

A különböző lúdfű ROP GTP-ázok inszerciós régiói azonban sokkal jobban hasonlítanak egymásra (1. és 18. ábra), mint az állati RHO család kis GTP-ázaira. Az általunk izolált két kináz kizárólag növény specifikus. Ez azt jelenti, hogy a növényi ROP GTP-áz az effektor kinázok (RRK-k) bekapcsolásához nem igényel CRIB domént, mint az állati RHO tipusú GTP-ázok.

Az MtRRK kinázok növényi sejten belüli elhelyezkedésének vizsgálata

Eddigi eredményeink mind mesterséges, azaz *in vitro* körülmények között végzett kísérletekből származtak. Kíváncsiak voltunk az MtRRK kinázok növényi sejten belüli elhelyezkedésére, hogy vajon ugyanott találhatók-e, mint az MsROP6 GTP-áz.



22. ábra. A GFP-MtRRK1 fuziós fehérje fluoreszcenciája citoplazmatikus elhelyezkedésű.

Ebből a célból az MtRRK kinázokat 35S promóter által hajtott GFP (green flourescent protein) gén mögé klónoztuk be a megfelelő leolvasási keretbe. 35S-MtRRK1-GFP és 35S-MtRRK2-GFP génfúziókat tartalmazó plazmid molekulákat polietilén glikol (PEG) alkalmazásával bejuttattuk lúdfű sejtkultúrából izolált protoplasztokba és egy napos tenyésztést követően a sejteket konfokális mikroszkóp segítségével megvizsgáltuk (22. ábra). Arra a következtetésre jutottunk, hogy mind a két kinázunk a sejten belül citoplazmatikus elhelyezkedésű. Következő kísérletünk célja az volt, hogy a GTP kötött MsROP GTP-áz és az MtRRK1 kináz sejten belüli elhelyezkedését összehasonlítsuk, ezzel megerősítve in vivo kölcsönhatásuk lehetőségét. Ebből a célból előállítottuk a következő vektor konstrukciókat: a pRT102-3xHA vektor molekulába beillesztettük a MtRRK1-et illetve az MsROP6-CA mutánst kódoló cDNS szakaszokat. A pRT102-3xHA-MtRRK1 vektor konstrukcióba a háromszor egymást követő HA epitóp és a MtRRK1 kináz közé beklónoztuk a YFP (yellow flourescent protein) fehérjét kódoló DNS szakaszt, amit a pEarleyGate101 vektorból PCR reakcióval izoláltunk [170]. Hasonlóképpen izoláltuk a CFP (cyan flourescent protein) fehérjét kódoló DNS szakaszt a pEarleyGate102 hasonlóképpen a pRT102 3xHA-MsROP6 CA vektor vektorból [170] és ezt konstrukcióba, a háromszor HA farok és a MsROP6 GTP-áz közé ékeltük. Ezekután rendelkezésre álltak a kövezkező konstrukciók: pRT102 3xHA-YFP-MtRRK1 és pRT102 3xHA-CFP-MsROP6 CA. A két vektor konstrukciót együtt juttattuk be lúdfű-protoplaszt sejtekbe.



23. ábra. Bal alsó sarokban zöld színnel a 3xHA-YFP-MtRRK1 fúziós fehérje fluoreszcenciája látható. Jobb felső sarokban piros színnel 3xHA-CFP-MsROP6-CA fúziós fehérje fluoreszcenciája látható. Jobb alsó részben fehér fényben látható ugyanaz a sejt. A bal felső részben látható sárga szín azt jelzi, hogy a 3xHA-YFP-MtRRK1 és 3xHA-CFP-MsROP6-CA fúziós fehérjék fluoreszcenciája átfedésben vannak.

A mikroszkópos vizsgálat eredményeként azt láttuk, hogy a MsROP6 CA mutáns (ami imitálja a ROP GTP-áz GTP kötött formájának a térszerkezetét és *in vitro* képes az MtRRK1 kináz aktiválására) és az MtRRK1 kináz sejten belüli elhelyezkedésében van átfedés. Következésképpen a két fehérje növényi sejten belüli kölcsönhatásának megvan a lehetősége, legalábbis nem láttuk ennek térbeli akadályát (23. ábra). A kölcsönhatásuk tényleges *in vivo* azonosítására a fluoreszcens energia transzfer (FRET) módszert próbáltuk alkalmazni, de sajnos ezeket a kísérleteket technikai nehézségek miatt nem tudtuk végrehajtani.

Génkifejeződés vizsgálat

A növényfajok, így a lucerna is, több nagyon hasonló szerkezetű ROP GTPázzal rendelkeznek. A növényi ROP GTP-ázok aminosav sorrendjében 95% felletti hasonlóság mutatható ki. A két kinázunk kináz doménje szintén nagyon hasonló. Ezért az *in vitro* illetve élesztő-kéthibrid kísérletek nem adnak tájékoztatást arról, hogy mely kináz mely GTPázzal hathat kölcsön *in planta*. Ez természetesen függ a fehérjék előfordulásától a növényen belül, az egyes szervekben és szövetekben. Ezért össze kívántuk hasonlítani az ismert lucerna ROP GTPázok és a két RRK kináz génexpressziós mintázatát. Ezt valósidejű RT-PCR reackióval végeztük el. Belső kontrollnak a SecA gén kifejeződését használtuk [171].



24. ábra. Lucerna ROP GTP-ázok és RRK kinázok relatív génkifejeződésének összehasonlítása valósidejű kvantitatív PCR-ral. A SecA gén kifejeződésére normalizált és az adott gén átlagos kifejeződéséhez viszonyított értékek.

A 24. ábrán láthatóak a SecA gén kifejeződésével normalizált, viszonylagos génkifejeződési értékek a lucerna egyes szerveiből származó mRNS (cDNS) mintákban. Az egyes géneknek a kifejeződését nem egymáshoz viszonyítottuk, hanem mindig az adott génnek az összes mintában mért normalizált kifejeződésének áltagértékéhez.

Így ebben a kísérletben az adott gének kifejeződésének mértékét hasonlítottuk össze különböző szervekben és sejtszuszpenzióban, a különböző gének kifejeződésének az egymáshoz való viszonyát nem vizsgáltuk. Így pl. az MtRRK1 gyökérgümőben mutatta a legmagasabb értéket a többi szervhez képest, de ezt az érteket nem lehet összevetni az MtRRK2 gyökérgümőben mért kifejeződési értékével. A mérések értékelése után azt állapíthattuk meg, hogy az MtRRK1 gyökérben és gümőben jobban kifejeződik, mint a többi szervben, míg az MtRRK2 a sejtkultúrában és a virágban mutat nagyon alacsony relatív kifejeződést (24. ábra). Az MsROP6 GTPáz az MtRRK2 kinázhoz hasonlóan szintén mindenhol közel azonos mennyiségben fejeződik ki, azonban viszonylag magas a relatív kifejeződése a virágban. Érdekes megfigyelni az MsROP9 GTPáz erőteljes relatív kifejeződését a gyökérgümőben, ami felveti, hogy ennek a GTPáznak, hasonlóan az MtRRK1 kinázhoz, szerepe lehet a gümőfejlődésben. De ezt még kísérletesen igazolni kell.

MtRRK2 lehetséges fehérje partnereinek azonosítása élesztő-kéthibrid rendszerben

Az MtRRK2 kináz kódoló szekvenciáját beklónoztuk a pBD-GAL4 nevű élesztőkéthibrid vektorba, majd ezzel végrehajtottunk még egy élesztő-kéthibrid szűrést. Azért esett választásunk az MtRRK2-re, mert az MtRRK1 a csalivektorban (pBD-GAL4) autoaktivációt mutatott. Az MtRRK2-vel végzett élesztő-kéthibrid szűrés során további érdekes potenciális kölcsönható fehérjéket azonosítottunk. A kölcsönhatás ellenőrzése után a jelöltek aminosavsorrend alapú azonosítása a következő eredménnyel járt:

Golgi szervecskékhez, hólyagocskák (vezikulumok) lefűződéséhez és sejtfalszintézishez kapcsolható fehérjék

-Egy dinamin homológ fehérje. A dinamin egy nagy GTP-áz fehérje, ami az állati sejtekben membránvezikulák befelé irányuló leválasztásában (endocitózis) motor molekulaként vesz részt [172]. A növényekben fontos szerepet tulajdonítanak hasonló fehérjéknek a tilakoid membrán kialakításban és a kloroplasztiszok osztodásában, mivel az osztódási gyűrűben mikrotubulus-kötő fehérjékkel együtt fordulnak elő [173].

-Egy RGP1 (Reversibly glycosylated protein) homológ fehérje. A Golgi szervecskében glükozilálódnak és fontos szerepük van a sejtfalszintézisben [174].

-Egy SRP (Signal recognition particle) homológ fehérje. Ennek a fehérjének az állati homológjai a membrán integrált vagy a szekréciós fehérjék szignálpeptidjét felismerik a transzláció során, és végrehajtják a transzlokációt [175]. A SRP-knek is van GTP-áz aktivitásuk.

-Egy Golgi szervecskéhez kapcsolódó fehérjével (Golgi associated protein) homológ fehérje.

 Fasciclin-szerű fehérje homológ. Az állati megfelelői a sejtadhézióban játszanak szerepet [176]. Növényekben a pontos biológia funkciójuk még ismeretlen, valószínűleg az endoszomák kiszorításában játszanak szerepet [176].

-Egy CNP-E (centromere-like) centromér-szerű illetve kinezin-szerű fehérjével homológ fehérje. Van egy mikrotubulus-kötő részlete. Állatokban a kinezinek a mikrotubulus mentén szállítják a vezikulumokat [177]. Ezen kívül ez a fehérje homológiát mutatott egy KIP1 (kinase interacting protein) nevű fehérjével is, ami kizárólag a növényekben előforduló fehérje. A KIP1 fehérjéken két coiled-coil motívumot hordozó régió található, ami a kinázok kináz doménjével való kölcsönhatásért felelős [178]. A növényi kinezinszerű fehérjék nagy családot alkotnak, de többségükről nincs irodalmi adat. Néhány növényi kinezin-szerű fehérjének az aktin mikrofilament-kötő aktivitása ismert és a kortikális mikrotubulusokkal is kölcsönhathatnak [179]. De ezek a kinezin-szerű fehérjék csak távoli rokonai az általunk izolált kinezin-szerű fehérjének.

Transzkipcióhoz kapcsolható fehérjék: bHLH transzkipciós faktor fehérje, Myb-szerű transzkipciós faktor fehérje, Cink-ujj transzkipciós faktor fehérje, Makorin cink-ujj fajtájú RNS-kötő fehérje, Mi-2 kromatinátalakító fehérje. Nem rendelkezünk további információval ezekkel a fehérjékkel kapcsolatban.

Jelátviteli útvonalakhoz kapcsolható fehérjék

-POZ/BTB domént hordozó fehérje. Ez a domén fehérje-fehérje kölcsönhatásban játszik szerepet [180]. Ilyen domént hordozó fehérjéből nagyon sok van a lúdfű genomjában.

-PIL (Photoreceptor Interacting-like Protein). Ebben két elkülöníthető domén található, POZ/BTB és NPH3. A NPH3 doménnel rendelkező fehérjéknek fontos szerepük van a foto- vagy gravitropizmusban, mint receptor molekuláknak [181].

-DUF315 (Domain of unknown function 315) doménnel rendelkező fehérje. Később kiderült, hogy ez egy növényjellegzetes ROP GTP-áz szabályozó GEF fehérje [43].

A fent felsorolt fehérjéket egy kis képzelőerővel könnyedén beilleszthetjük egy jelátviteli rendszerbe. A Golgi szervecskéhez és a hólyagocskákhoz kapcsolható fehérjéknek szerepük lehet a sejt megnyúlásában és a sejtváz átrendeződésében. A transzkripciós faktor-szerű fehérjék szerepet játszhatnak a génkifejeződés szabályozásában, mivel állati rendszerből tudjuk, hogy a TGFβ és a citokin receptor kináz fehérjekomplexek képesek közvetlenül foszforilálni az átírófehérjéket a sejtplazmában. Azok viszont a foszforilálást követően a sejtmagba vándorolnak, és serkentik vagy elnyomják a megfelelő gének kifejeződését. A jelátviteli útvonalakhoz kapcsolható fehérjék viszont a külső inger által kiváltott jelet továbbítják a célfehérjékhez. A GEF például bekapcsolva a ROP GTP-ázokat az egész jelátviteli útvonalat működésbe hozza.



25. ábra. Mi-2 kromatinátalakító helikáz homológ fehérjére, Fasciclin-szerű fehérje homológra, centromér-szerű illetve kinezin-szerű fehérjével homológ fehérjére és dinamin homológ fehérjére megvizsgáltuk foszforilációt MsROP6-CA-6xHis jelenlétében. A Mi-2 kromatinátalakító helikáz homológ fehérjét mindkét kináz képés volt foszforilálni.

Az élesztő-kéthibrid szűrés során az MtRRK2 által "kihalászott" valamennyi géndarabot átklónoztuk pMAL2c vektorba és megvizsgáltuk, hogy ezeket képes-e foszforilálni a kinázunk az MsROP6 CA mutáns jelenlétében. Az alanyok a következők voltak: Mi-2 kromatinátalakító helikáz homológ fehérje, Fasciclin-szerű fehérje homológ, centromér-szerű illetve kinezin-szerű fehérjével homológ fehérje és dinamin homológ fehérje. Sajnos ezeknek csak az egyikét foszforilálta az MtRRK2, méghozzá a Mi-2 kromatinátalakító helikáz homológ fehérjét (25. ábra). A többi fehérje esetében a foszforiláció hiánya amiatt is lehetséges, hogy ezeknek egyike sem teljes hosszúságú fehérje, talán ez okozza a foszforilálás hiányát.

A dinamin homológ fehérjével csináltunk egy lehúzásos kísérletet, amely sikeres volt, és igazolta az *in vitro* kölcsönhatásukat (26. ábra). Ennek ellenére nem tapasztaltunk ebben az esetben sem foszforilációt. A továbbiakban a dinamin homológgal nem foglalkoztunk, mivel a teljes hosszúságú cDNS kinyerése igen nagy mérete miatt nehézkes lett volna.



26. ábra. Az MBP-Dinaminnal húztam le a 6×His-RRK2-t és anti-His ellenanyaggal Western-blottal igazoltam a 6×His-RRK2 jelenlétét. Az MBP-Dinamin jelenlétét CBB (<u>C</u>oomassie <u>B</u>rilliant <u>B</u>lue) festéssel ellenőriztem.

Összefoglalás

- Az élesztő-kéthidrib szűrés során MsROP6 GTP-ázzal erősen kölcsönható potenciális partner fehérjéket azonosítottuk. Ezek közül két receptorszerű citoplazmatikus kinázt választottunk ki a további vizsgálatokra. A két receptorszerű citoplazmatikus kinázt MtRRK1-nek és MtRRK2-nek neveztük el (RRK=ROP interacting Receptor-like Kinase).
- Ezek a kinázok kizárólag növényekben találhatók meg, és a növényi receptorszerű citoplazmatikus kinázok VI. családjának tagjai (RLCK VI).
- Ezeken a kinázokon a kináz doménen kívüli rövid amino- és karboxi- túlnyúló végéken nem azonosítható a ROP GTPáz kötésért felelőssé tehető ismert domén vagy motívum. A kináz fehérje egésze (rövid terminális szakaszok kivételével) szükséges a kölcsönhatáshoz.
- Az MsROP6 GTP-áz nem szubsztrátja ezeknek a kinázoknak, hanem GTP kötött formájában aktivátora, ami azt jelenti, hogy képesek bekapcsolni az MtRRK fehérjék kináz aktivitását. A kináz nem mutat specifitást a növényi ROP GTPázokon belül, míg egy nem növényi eredetű CDC42-szerű GTP-áz nem volt képes indukálni az aktivitását. Következésképpen ez egy növényspecifikusnak tekinthető jelátviteli kapcsolat.
- Az MsROP6 GTP-áznak az inszerciós régiója felelős az MtRRK kinázok bekapcsolásáért, de az elrontott inszerciós régió nem szünteti meg a kölcsönhatást.
- > Mindkét RRK kináz a citoplazmában helyezkedik el.
- Az MsROP6 és az MtRRK1 fehérjék sejten belüli lokalizációja és növényi szervekben mért génexpressziója részben átfed.

Összességében elmondható, hogy elsők között azonosítottunk olyan növényi kináz molekulákat, amelyek mint ROP GTP-áz effektorok részt vehetnek a RHO (ROP) GTPázfüggő jelátvitelben. Ez a jelátviteli lépés számos növényspecifikus vonással rendelkezik, amelyeknek további vizsgálata érdekes betekintési lehetőséget nyújt a jelátviteli hálózatok evolúciójába is, amellett, hogy értékes információkat szolgáltathat a növényi egyedfejlődés szabályozásával kapcsolatban.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr Fehér Attilának a munkámban nyújtott sokféle segítségért. Dr. Horháth V. Gábornak és Dr. Györgyei Jánosank és Dr. Szilák Lászlónak a biokémiai ismereteim bővítésében elengedhetetlen közreműködésért. Dr. Szücs Attilának, Gyula Péternek és Rigó Gábornak az általános, bio- és laborfilozófiai kérdések megvitatásáért. Dunainé Fodor Csillának, Bíró Juditnak és Feltóti Zsófiának segítőkészségükért. Tusz Jennifernek az angol nyelvvel kapcsolatos problémáim megoldásáért. Az egész *Funkcionális Sejtbiológia Csoport* valamennyi tagjának munkájáért és a türelméért.

Thesis of PH.D

Introduction

The lifestyles of plants and animals differ at the most basic level. While animals are capable of changing their location, plants's lifestyles must accomodate to their unchanging location. As such, plants' do not have a determined developmental program. This means that environmental factors have a primary influence on the developmental program. Small environmental changes cause variation in the functions of hundreds of plant genes, thus allowing the organism to adapt its metabolic pathways and continual development to the given situation.

When G-proteins bind a GTP molecule and when they release GDP and inorganic phosphate, their structure changes. This structural change is associated with the change in the protein's signaling activity as well [15,19]. In their GTP-bound form, the small GTPases are capable of interacting with the end-products, or effector proteins, in the signaling pathway. This interaction results in a change in the functioning of the effector proteins, thus the conclusion that the GTP-bound form is the "switched on" form of the G-proteins. In contrast, the GDP-bound form has no interaction with the end-products and does not pass on signals, thus is considered the "switched off" form. Thus the ROP GTPases, like other members of the RAS superfamily, function as 2-state molecular switches, which, depending on their form, switch on or off signaling pathways. ROP GTPase regulating proteins can be placed in three role-based groups: proteins that speed up GTP degradation (GAPs; GTPase Activating Proteins), nucleotide-exchanging proteins (GEFs; Guanine nucleotide Exchange Factors) and nucleotide-anchoring proteins (GDIs; Guanine nucleotide Dissociation Inhibitors) [40]. GAP and GDI proteins typically interact with GTPases, resulting in or restricting to the GDP-bound, deactivated form, thus inhibiting signaling. In contrast, GEFs assist in releasing GDP, stimulating GTP binding and the activation of the GTPases. On the whole, GTPase signaling activity is determined by the ratio of GDP- and GTP-bound proteins.

Significant variations between plants and animals exist with respect to small GTPases (RAS/RHO) too, which play a role in signaling. The cell division controlling RAS GTPases are completely lacking in plants and only group of RAC-related GTPases, the ROP (<u>R</u>HO proteins of plants) GTPase group exists, but it distinctly differs from them [7,10,16] ROP

GTPases play a key role in the regulation of plant cell growth as they determine the direction apical growth [34,35,37,84-88]. Among the known ROP GTPase effector proteins, there are numerous proteins which play a role in the reorganization of the cytoskeleton (for example, RIC, ARP, WAVE, formin, RBOH, ICR/RIP, CCR, UGT) [50,84,85,87,114,118,121,133-135,137]

Plants have fewer G-proteins and associated receptors, but more receptor-like kinases (RLK) [11,12]. The wall cress genome contains more than six hundred different receptor kinase genes, which is at least six times more than the human genome. In total, the wall cress genome encodes more than a thousand kinase proteins, while the human genome has only 500-600 similar proteins. Comparable differences can be seen when considering the genes responsible for protein degradation as well. The large number of receptors and signaling proteins guarantees the plant cell a rapid, flexible response to environmental change. In spite of the fact that plants code for an extremely large number of kinase genes, the ROP GTPase-activated plant kinase effectors have not been identified.

Objectives

Regulation of plant development is extremely variable. In our laboratory, we are studying those processes, at the cell and molecular level, which allow for the regulation of rapid and environmentally-adaptive plant cell division, shape and differentiation. In association with this, our laboratory has been studying the role of RHO-type (ROP) GTPases in plant cell signaling pathways. When we began working with plant signaling pathways, and specifically the key role of GTPase interactions (end-products and regulators), there was little information available in the literature. Thus it was relatively simple to state our objectives: to discover new elements in the primarily unknown plant ROP GTPase-activated signaling pathways. Our goal was to use independent methods to reveal and confirm interactions between newly identified elements ansd ROP GTPases, both *in vitro* and *in vivo*. Primarily, we were interested in whether these small proteins, functioning as molecular switches, were taking part in the activation of kinase reaction chains, as in yeasts and animals. Finally, we aimed to determine the biological role of the newly identified elements. In this way, we hoped to expand upon the presently limited known information about signaling pathways in plant cells.

Results and discussion

The first part of my PhD work was to find proteins (regulators and end-products) that interacted with ROP GTPases using the yeast-dihybrid system. Initially we identified three ROP GTPase cDNA in alfalfa and fully characterized them [151]. We then chose to further study the cDNA for which no data was available in the literature. We labeled it as MsROP6 GTPase and using a 2-step PCR, we produced the following: deactivated (DN-Dominant Negative), continually activated (CA-Constutively Active) and nonisoprenilated (incorrect intracellular localization, L).

-We carried out yeast-dihybrid screening on the cDNA library generated from alfalfa root. After the screening, the gene sequences that were "fished out" using the MsROP6 GTPase CA+L mutants (CA-<u>C</u>onstutively <u>A</u>ctive + non-isoprenilated-incorrect intracellular localization, L) were identified in the GenBank data (Blastx: http://www.ncbi.nih.gov/BLAST). The results indicated that the cDNAs code for the following proteins: two receptor-like cytoplasmic kinases (RLCK, Receptor-like Cytosolic Kinase), two p65 microtubule-bound proteins, one protein homologous to NEDD1, one MtN24 (234as) root-specific protein, one DUF1620 (domain unknown function) domain carrying protein and one part of a completely unknown protein

-We concentrated on two receptor-like cytoplasmic kinases, since there was no available information about plant ROP GTPase interactions with kinases, yet proteins with similar characteristics play basic roles in the cell function of other eukaryotes, such as the GTP-bound CDC42/RAC GTPase interaction with the PAK1 (p21 protein activated kinase) kinase family [155-157]. All PAK1 kinases have a CRIB (CDC42/Rac-interactive binding) motif, which is responsible for the interaction with GTPases. We named the two receptor-like cytoplasimic kinases ROP-interacting Receptor-like Kinases (RRK for short). The two alfalfa-RRK, as previously stated, belong to a previously unknown plant kinase family, which is called receptor-like cytoplasmic kinase VI family (RLCK VI) [158].

-From the yeast two hybrid experiment, we came to the conclusion that the *two RRK kinases interact with the MsROP6 CA+L forms* and not with the DN form. Thus the two MtRRK kinases do not interact with the GDP-bound ROP GTPase, similar to the animal and yeast PAK1 kinases.

-In animal and yeast systems the kinases that bind RHO/RAC/CDC42 GTPases usually have a CRIB motif (for example, PAK1 kinases [155]), yet in the complete genome sequence of wall cress, no kinases were found to contain the CRIB motif. If the CRIB motif isn't present, then which part of the kinase is responsible for the interaction? Is there a distinct region or amino acid sequence which is responsible for binding to the activated ROP GTPase? To answer this question, we broke the MtRRK1 kinase into various pieces. We tested the interaction of the segments with ROP GTPase using the yeast-dihybrid system. We came to the conclusion that <u>there is no identifiable part or region of the kinase</u> which is, by itself, responsible for the interaction with activated ROP GTPase. It is probable that there is not one, single peptide pattern that is responsible, but rather amino acid side chains found on various parts of the kinase take part in the interaction.

-In the literature there are examples of the small GTPases (such as RHOA, RAB, RIC1) as well as regulatory proteins (GEF, GDI) which are regulated by direct phosphorylation [159-161]. Since the MtRRK kinases do not possess CRIB motifs, a logical question developed as to whether MsROP6 is actually the substrate for the MtRRK kinases. To test this, we planned a kinase reaction using radioactively labeled [γ -32P] ATP, for which we overexpressed proteins in bacteria and purified them. Using the MALDI technique, we the MsROP6 protein CA form was phosphorylated with non-radioactive ATP by the MtRRK1 kinase. The results of the investigation in the MTA SzBK Proteomic Laboratory and the radioactive kinase reactions both showed that the <u>MsROP6 GTPase</u> is not the substrate of the MtRRK kinases.

-We examined whether the kinase activity of MtRRK kinases is dependent on MsROP. We examined the phosphorylation of myelin basic protein (a universal substrate for serine threonine kinases) by RRK1 kinase in the presence of activated GTPase. The MtRRK1 kinase is only able to significantly phosphorylate the myelin basic protein if the MsROP6 CA mutant or MsROP6 WT wild type and 1mM GTP are present. In the absence of GTPase, MyBP phosphorylation was barely observable. Likewise, phosphorylation was very weak with MsROP6WT wild type and 1mM GDP. <u>GTP-bound MsROP6 GTPase</u> <u>activates MtRRK.</u>

-If MtRRKs follow MsROP6 in the signaling pathway, then is MsROP6 specify for MtRRK1/2, or will other GTP-bound ROP GTPases also be able to activate their kinase

activity? To answer this question, we carried experiments similar to those above in the presence of some wall cress ROP GTPases as well. The experiments showed that AtROP1 and AtROP6 also activated the MtRRK1 kinase. Thus it is not a specific reaction, other ROPs can activate the kinase *in vitro*.

-We also examined whether GTPases in non-plant RHO families are capable of activating it. We chose a non-plant RHO-type GTPase (RX). Unfortunately, we are not sure of which organism the GTPase is from. Dr. Attila Szűcs and his colleagues found it in the cDNA library of *Medicago sativa* root, but it is not a plant sequence. They believe that it originated from a symbiotic or parasitic fungus. It is a small GTP-bound protein belonging to the CDC42 GTPase sub-family [151]. We studied its interaction with both MtRRKs using the yeast-dihybrid system. The alfalfa RRK kinases did not interact with the non-plant RX GTPas in the yeast-dihybrid system. *The MtRRK kinases only interact with plant ROP GTPases and are only activated by ROP GTPases. In other words, they are plant-specific effectors of ROP GTPases.*

-The results of the above experiments lead to the conclusion that plant ROP GTPases contain one (or more) patterns that are responsible for the interactions with RRK kinases and kinase activation, and that this pattern is missing in other, non-plant RHO GTPases. We know from the literature that animal RHO/RAC/CDC42 GTPases have a characteristic peptide loop (RHO insertion region) which has an important role in activation [25,166]. Nonetheless, variation of this region does not affect the interaction between the proteins [167-169]. Plant ROP GTPases also have a characteristic RHOinsertion region and its amino acid sequence hardly varies within the plant ROP GTPase sub-family, yet this region is extremely different from the peptide loop found on GTPases in other RHO families. This can't be considered a functional insert region in RAS GTPases, as it is only characteristic of RHO-type GTPases. According to the literature, this change doesn't affect the GTPase proteins' structure, but it does affect its ability to activate the effetor protein [167,169]. We also carried out a similar exchange on the MsROP6 GTPase and we named the produced mutant MsROP6 insertion region mutant, or MsROP6 Δ I^{RAS}. We examined the interactions between the Δ ^{IRAS} MsROP6 proteins and both RRKs using the yeast-dihybrid system and found that the change in the ROP-insert region did not affect the interaction between the kinases and the GTPases. Nonetheless, the reaction with MsROP6Δ^{IRAS}+CA mutant protein did show that it was not capable of activating the MtRRK1 kinase. *The ROP insert region responsible for activation of RRK, but not binding of RRK kinases.*

-We cloned the MtRRK kinases into the appropriate reading frame behind a 35S promoted GFP (green fluorescent protein) gen. The plasmids containing 35S-MtRRK1-GFP and 35S-MtRRK2-GFP gene fusions were transformed into wall cress protoplasts using polyethylene glycol (PEG) and after one day of growth, the cells were observed under a confocal microscope. *We determined that both kinases are localized within the cell's cvtoplasm*.

-We transformed both YFP-MtRRK1 and CFP-MsROP6+CA vector constructions into wall cress protoplast cells (YFP, yellow fluorescent protein; CFP, cyan fluorescent protein). Microscopic examination showed that <u>MsROP6 CA mutant and MtRRK1 kinase have</u> <u>common localization in the cell.</u> Thus there is the possibility of interactions within the cell, since they are in the same vicinity.

-The SecA gene has normal expression in sample of mRNA (cDNA) from different parts of alfalfa. The expression of different genes were not compared to one another, but rather in relation to the given genes normalized, average expression in all samples. We were able to determine that *MtRRK1 is more highly expressed in the roots and tubers* than in other plant parts, while MtRRK2 shows very low relative expression in cell cultures and flowers. *Like MsROP6 GTPase and MtRRK2 kinase, it expresses in relatively constant amounts everywhere*, but has rather high relative expression in the flower.

-We identified other potential interacting proteins for MtRRK2 in the yeast-dihybrid screening. After testing interaction, the amino acid-based identification of partners produced the following:

Proteins interacting with the Golgi apparatus, vesicular trafficking and cell wall synthesis: Dynamin, RGP1 (Reversibly glycosylated protein), SRP (Signal recognition particle), Golgi associated protein, Fasciclin-like protein, Kinesin-like.

Proteins associated with transcription (transcription factors): bHLH transcription factor protein, Myb-like transcription protein, Zinc-finger transcription protein, Makorin zinc-finger type RNA-binding protein, Mi-2 chromatin remodeling protein

Proteins associated with signaling pathways: POZ/BTB domain-carrying protein, PIL (Photoreceptor Interacting-like Protein), DUF315 (Domain of unknown function 315) domain carrying protein, which was later discovered to have ROP-GEF function.
Summary

- We identified strongly interacting potential partners for MsROP6 GTPase using the yeast-dihybrid screening. Amongst these, we chose 2 receptor-like cytoplasmic kinases for further study. We named the two receptor-like cytoplasmic kinases MtRRK1 and MtRRK2 (RRK=ROP interacting Receptor-like Kinase).
- These kinases are only found in plants and are members of the plant receptor-like cytoplasmic kinases VI. family (RLCK VI).
- A domain or motif responsible for ROP GTPase binding in the short amino and carboxy groups outside the kinase domain was not found. The whole kinase protein (with the exception of the short terminal regions) is necessary for interaction.
- The MsROP6 GTPase is not a substrate for these kinases, but in GTP-bound form an activator, which means that it is able to activate the MtRRK kinases kinase activity. While they don't show specificity within the plant ROP GTPases, a non-plant CDC42-like GTPase was not able to induce activity. Thus we consider the signaling connection to be plant-specific.
- The insertion region of the MsROP6 GTPase is responsible for activating the MtRRK kinases, but an altered insertion region doesn't inhibit interaction.
- > Both RRK kinases are found in the cytoplasm.
- > The cellular localization of MsROP6 and MtRRK1 overlaps.

In summary, we were among the first to identify plant kinase molecules which taken part in RHO (ROP) GTPase-dependent signaling. This signaling step has several plant-specific aspects, of which further studies will provide interesting insight into the evolution of the signaling pathway, as well as providing valuable information about the regulation of plant development.

Hivatkozások

- [1] Johnston, C.A. et al. (2007). GTPase acceleration as the rate-limiting step in Arabidopsis G protein-coupled sugar signaling. Proc Natl Acad Sci U S A 104, 17317-22.
- [2] Johnston, C.A., Temple, B.R., Chen, J.G., Gao, Y., Moriyama, E.N., Jones, A.M., Siderovski, D.P. and Willard, F.S. (2007). Comment on "A G protein coupled receptor is a plasma membrane receptor for the plant hormone abscisic acid". Science 318, 914; author reply 914.
- [3] Jones, A.M. (2002). G-protein-coupled signaling in Arabidopsis. Curr Opin Plant Biol 5, 402-7.
- [4] Jones, A.M. and Assmann, S.M. (2004). Plants: the latest model system for G-protein research. EMBO Rep 5, 572-8.
- [5] Ullah, H., Chen, J.G., Young, J.C., Im, K.H., Sussman, M.R. and Jones, A.M. (2001). Modulation of cell proliferation by heterotrimeric G protein in Arabidopsis. Science 292, 2066-9.
- [6] Wang, X.Q., Ullah, H., Jones, A.M. and Assmann, S.M. (2001). G protein regulation of ion channels and abscisic acid signaling in Arabidopsis guard cells. Science 292, 2070-2.
- [7] Yang, Z. (2002). Small GTPases: versatile signaling switches in plants. Plant Cell 14 Suppl, S375-88.
- [8] Winge, P., Brembu, T., Kristensen, R. and Bones, A.M. (2000). Genetic structure and evolution of RAC-GTPases in Arabidopsis thaliana. Genetics 156, 1959-71.
- [9] Christensen, T.M., Vejlupkova, Z. and Sharma, Y.K. (2003). Conserved subgroups and developmental regulation in the monocot rop gene family. Plant Physiol 133, 1791-1808.
- [10] Zheng, Z.L. and Yang, Z. (2000). The Rop GTPase: an emerging signaling switch in plants. Plant Mol Biol 44, 1-9.
- [11] Shiu, S.H. and Bleecker, A.B. (2001). Plant receptor-like kinase gene family: diversity, function, and signaling. Sci STKE 2001, RE22.
- [12] Shiu, S.H. and Bleecker, A.B. (2001). Receptor-like kinases from Arabidopsis form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. Proc Natl Acad Sci U S A 98, 10763-8.
- [13] Takai, Y., Sasaki, T. and Matozaki, T. (2001). Small GTP-binding proteins. Physiol Rev 81, 153-208.
- [14] Wennerberg, K., Rossman, K.L. and Der, C.J. (2005). The Ras superfamily at a glance. J Cell Sci 118, 843-6.
- [15] Vetter, I.R. and Wittinghofer, A. (2001). The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. Science 294, 1299-304.
- [16] Vernoud, V., Horton, A.C., Yang, Z. and Nielsen, E. (2003). Analysis of the small GTPase gene superfamily of Arabidopsis. Plant Physiol 131, 1191-208.
- [17] Valster, A.H., Hepler, P.K. and Chernoff, J. (2000). Plant GTPases: the Rhos in bloom. Trends Cell Biol 10, 141-6.
- [18] Gu, Y., Vernoud, V., Fu, Y. and Yang, Z. (2003). ROP GTPase regulation of pollen tube growth through the dynamics of tip-localized F-actin. J Exp Bot 54, 93-101.
- [19] Dvorsky, R. and Ahmadian, M.R. (2004). Always look on the bright site of Rho: structural implications for a conserved intermolecular interface. EMBO Rep 5, 1130-6.
- [20] Christensen, T.M. et al. (2003). Conserved subgroups and developmental regulation in the monocot rop gene family. Plant Physiol 133, 1791-808.
- [21] Nibau, C., Wu, H.M. and Cheung, A.Y. (2006). RAC/ROP GTPases: 'hubs' for signal integration and diversification in plants. Trends Plant Sci 11, 309-15.
- [22] Trotochaud, A.E., Hao, T. and Wu, G. (1999). The CLAVATA1 receptor-like kinase requires CLAVATA3 for its assembly into a signaling complex that includes KAPP and a Rho-related protein. Plant Cell 11, 393-406.

- [23] Wengier, D., Valsecchi, I., Cabanas, M.L., Tang, W.H., McCormick, S. and Muschietti, J. (2003). The receptor kinases LePRK1 and LePRK2 associate in pollen and when expressed in yeast, but dissociate in the presence of style extract. Proc Natl Acad Sci U S A 100, 6860-5.
- [24] Bishop, A.L. and Hall, A. (2000). Rho GTPases and their effector proteins. Biochem J 348 Pt 2, 241-55.
- [25] Thapar, R., Karnoub, A.E. and Campbell, S.L. (2002). Structural and biophysical insights into the role of the insert region in Rac1 function. Biochemistry 41, 3875-83.
- [26] Berken, A. (2006). ROPs in the spotlight of plant signal transduction. Cell Mol Life Sci 63, 2446-59.
- [27] Brecht, M., Sewald, K., Schiene, K., Keen, G., Fricke, M., Sauer, M. and Niehaus, K. (2004). The use of surface plasmon resonance (SPR) and fluorescence resonance energy transfer (FRET) to monitor the interaction of the plant G-proteins Ms-Rac1 and Ms-Rac4 with GTP. J Biotechnol 112, 151-64.
- [28] Ivanchenko, M., Vejlupkova, Z., Quatrano, R.S. and Fowler, J.E. (2000). Maize ROP7 GTPase contains a unique, CaaX box-independent plasma membrane targeting signal. Plant J 24, 79-90.
- [29] Lavy, M., Bracha-Drori, K., Sternberg, H. and Yalovsky, S. (2002). A cell-specific, prenylationindependent mechanism regulates targeting of type II RACs. Plant Cell 14, 2431-50.
- [30] Schultheiss, H., Dechert, C., Kogel, K.H. and Huckelhoven, R. (2003). Functional analysis of barley RAC/ROP G-protein family members in susceptibility to the powdery mildew fungus. Plant J 36, 589-601.
- [31] Glomset, J.A. and Farnsworth, C.C. (1994). Role of protein modification reactions in programming interactions between ras-related GTPases and cell membranes. Annu Rev Cell Biol 10, 181-205.
- [32] Michaelson, D., Silletti, J., Murphy, G., D'Eustachio, P., Rush, M. and Philips, M.R. (2001). Differential localization of Rho GTPases in live cells: regulation by hypervariable regions and RhoGDI binding. J Cell Biol 152, 111-26.
- [33] Lin, Y., Wang, Y., Zhu, J.K. and Yang, Z. (1996). Localization of a Rho GTPase Implies a Role in Tip Growth and Movement of the Generative Cell in Pollen Tubes. Plant Cell 8, 293-303.
- [34] Li, H., Lin, Y. and Heath, R.M. (1999). Control of pollen tube tip growth by a Rop GTPasedependent pathway that leads to tip-localized calcium influx. Plant Cell 11, 1731-1742.
- [35] Kost, B., Lemichez, E. and Spielhofer, P. (1999). Rac homologues and compartmentalized phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate act in a common pathway to regulate polar pollen tube growth. J Cell Biol 145, 317-330.
- [36] Molendijk, A.J., Bischoff, F. and Rajendrakumar, C.S. (2001). Arabidopsis thaliana Rop GTPases are localized to tips of root hairs and control polar growth. Embo J 20, 2779-2788.
- [37] Jones, M.A., Shen, J.J., Fu, Y., Li, H., Yang, Z. and Grierson, C.S. (2002). The Arabidopsis Rop2 GTPase is a positive regulator of both root hair initiation and tip growth. Plant Cell 14, 763-76.
- [38] Tao, L.Z., Cheung, A.Y. and Wu, H.M. (2002). Plant Rac-like GTPases are activated by auxin and mediate auxin-responsive gene expression. Plant Cell 14, 2745-60.
- [39] Lemichez, E., Wu, Y., Sanchez, J.P., Mettouchi, A., Mathur, J. and Chua, N.H. (2001).
 Inactivation of AtRac1 by abscisic acid is essential for stomatal closure. Genes Dev 15, 1808-16.
- [40] Geyer, M. and Wittinghofer, A. (1997). GEFs, GAPs, GDIs and effectors: taking a closer (3D) look at the regulation of Ras-related GTP-binding proteins. Curr Opin Struct Biol 7, 786-92.
- [41] Moon, S.Y. and Zheng, Y. (2003). Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. Trends Cell Biol 13, 13-22.
- [42] Moon, S.Y. and Zheng, Y. (2003). Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. Trends Cell Biol 13, 13-22.
- [43] Berken, A., Thomas, C. and Wittinghofer, A. (2005). A new family of RhoGEFs activates the Rop molecular switch in plants. Nature 436, 1176-80.

- [44] Thomas, C. and Berken, A. (2007). Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the plant Rho protein ROP5. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun 63, 1070-2.
- [45] Thomas, C., Fricke, I., Scrima, A., Berken, A. and Wittinghofer, A. (2007). Structural evidence for a common intermediate in small G protein-GEF reactions. Mol Cell 25, 141-9.
- [46] Borg, S., Podenphant, L. and Jensen, T.J. (1999). Plant cell growth and differentiation may involve GAP regulation of Rac activity. FEBS Lett 453, 341-345.
- [47] Wu, G., Li, H. and Yang, Z. (2000). Arabidopsis RopGAPs are a novel family of rho GTPaseactivating proteins that require the Cdc42/Rac-interactive binding motif for rop-specific GTPase stimulation. Plant Physiol 124, 1625-1636.
- [48] Baxter-Burrell, A., Yang, Z. and Springer, P.S. (2002). RopGAP4-dependent Rop GTPase rheostat control of Arabidopsis oxygen deprivation tolerance. Science 296, 2026-2028.
- [49] Lemmon, M.A., Ferguson, K.M. and Abrams, C.S. (2002). Pleckstrin homology domains and the cytoskeleton. FEBS Lett 513, 71-76.
- [50] Brembu, T., Winge, P., Bones, A.M. and Yang, Z. (2006). A RHOse by any other name: a comparative analysis of animal and plant Rho GTPases. Cell Res 16, 435-45.
- [51] DerMardirossian, C. and Bokoch, G.M. (2005). GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation. Trends Cell Biol 15, 356-363.
- [52] Dovas, A. and Couchman, J.R. (2005). RhoGDI: multiple functions in the regulation of Rho family GTPase activities. Biochem J 390, 1-9.
- [53] Bischoff, F., Vahlkamp, L. and Molendijk, A. (2000). Localization of AtROP4 and AtROP6 and interaction with the guanine nucleotide dissociation inhibitor AtRhoGDI1 from Arabidopsis. Plant Mol Biol 42, 515-530.
- [54] Kieffer, F., Elmayan, T. and Rubier, S. (2000). Cloning of Rac and Rho-GDI from tobacco using an heterologous two-hybrid screen. Biochimie 82, 1099-1105.
- [55] Dransart, E., Morin, A. and Cherfils, J. (2005). Uncoupling of inhibitory and shuttling functions of rho GDP dissociation inhibitors. J Biol Chem 280, 4674-4683.
- [56] Carol, R.J., Takeda, S. and Linstead, P. (2005). A RhoGDP dissociation inhibitor spatially regulates growth in root hair cells. Nature 438, 1013-1016.
- [57] Rossman, K.L., Der, C.J. and Sondek, J. (2005). GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. Nat Rev Mol Cell Biol 6, 167-180.
- [58] Brugnera, E., Haney, L. and Grimsley, C. (2002). Unconventional Rac-GEF activity is mediated through the Dock180-ELMO complex. Nat Cell Biol 4, 574-582.
- [59] Cote, J.F. and Vuori, K. (2002). Identification of an evolutionarily conserved superfamily of DOCK180-related proteins with guanine nucleotide exchange activity. J Cell Sci 115, 4901-13.
- [60] Qiu, J.L., Jilk, R. and Marks, M.D. (2002). The Arabidopsis SPIKE1 gene is required for normal cell shape control and tissue development. Plant Cell 14, 101-118.
- [61] Basu, D., Le, J., Zakharova, T., Mallery, E.L. and Szymanski, D.B. (2008). A SPIKE1 signaling complex controls actin-dependent cell morphogenesis through the heteromeric WAVE and ARP2/3 complexes. Proc Natl Acad Sci U S A 105, 4044-9.
- [62] Uhrig, J.F. et al. (2007). The role of Arabidopsis SCAR genes in ARP2-ARP3-dependent cell morphogenesis. Development 134, 967-77.
- [63] Berken, A., Thomas, C. and Wittinghofer, A. (2005). A new family of RhoGEFs activates the Rop molecular switch in plants. Nature 436, 1176-1180.
- [64] Gu, Y., Li, S. and Lord, E.M. (2006). Members of a Novel Class of Arabidopsis Rho Guanine Nucleotide Exchange Factors Control Rho GTPase-Dependent Polar Growth. Plant Cell 18, 366-381.
- [65] Sormo, C.G., Leiros, I., Brembu, T., Winge, P., Os, V. and Bones, A.M. (2006). The crystal structure of Arabidopsis thaliana RAC7/ROP9: the first RAS superfamily GTPase from the plant kingdom. Phytochemistry 67, 2332-40.
- [66] Schlessinger, J. (2000). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. Cell 103, 211-225.

- [67] Noren, N.K. and Pasquale, E.B. (2004). Eph receptor-ephrin bidirectional signals that target Ras and Rho proteins. Cell Signal 16, 655-666.
- [68] Van Aelst, L. and Cline, H.T. (2004). Rho GTPases and activity-dependent dendrite development. Curr Opin Neurobiol 14, 297-304.
- [69] Morris, E.R. and Walker, J.C. (2003). Receptor-like protein kinases: the keys to response. Curr Opin Plant Biol 6, 339-342.
- [70] Shiu, S.H. and Bleecker, A.B. (2001). Receptor-like kinases from Arabidopsis form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. Proc Natl Acad Sci U S A 98, 10763-10768.
- [71] Kaothien, P., Ok, S.H. and Shuai, B. (2005). Kinase partner protein interacts with the LePRK1 and LePRK2 receptor kinases and plays a role in polarized pollen tube growth. Plant J 42, 492-503.
- [72] Clark, S.E., Williams, R.W. and Meyerowitz, E.M. (1997). The CLAVATA1 gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in Arabidopsis. Cell 89, 575-585.
- [73] Hall, A. (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. Science 279, 509-514.
- [74] Hussey, P.J., Ketelaar, T. and Deeks, M.J. (2006) Control of the actin cytoskeleton in plant cell growthed.^eds)
- [75] Raftopoulou, M. and Hall, A. (2004). Cell migration: Rho GTPases lead the way. Dev Biol 265, 23-32.
- [76] Nobes, C.D. and Hall, A. (1995). Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. Cell 81, 53-62.
- [77] Ridley, A.J. and Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. Cell 70, 389-399.
- [78] Ridley, A.J., Paterson, H.F. and Johnston, C.L. (1992). The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. Cell 70, 401-410.
- [79] Ridley, A.J. and Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. Cell 70, 389-99.
- [80] Nobes, C.D. and Hall, A. (1995). Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. Cell 81, 53-62.
- [81] Disanza, A., Steffen, A. and Hertzog, M. (2005). Actin polymerization machinery: the finish line of signaling networks, the starting point of cellular movement. Cell Mol Life Sci 62, 955-970.
- [82] Bannigan, A. and Baskin, T.I. (2005). Directional cell expansion[mdash]turning toward actin. Curr Opin Plant Biol 8, 619-624.
- [83] Smith, L.G. and Oppenheimer, D.G. (2005). Spatial control of cell expansion by the plant cytoskeleton. Annu Rev Cell Dev Biol 21, 271-295.
- [84] Basu, D., El-Din El-Assal, D. and Le, J. (2004). Interchangeable functions of Arabidopsis PIROGI and the human WAVE complex subunit SRA1 during leaf epidermal development. Development 131, 4345-4355.
- [85] Fu, Y., Gu, Y. and Zheng, Z. (2005). Arabidopsis interdigitating cell growth requires two antagonistic pathways with opposing action on cell morphogenesis. Cell 120, 687-700.
- [86] Fu, Y., Li, H. and Yang, Z. (2002). The ROP2 GTPase controls the formation of cortical fine Factin and the early phase of directional cell expansion during Arabidopsis organogenesis. Plant Cell 14, 777-794.
- [87] Gu, Y., Fu, Y. and Dowd, P. (2005). A Rho family GTPase controls actin dynamics and tip growth via two counteracting downstream pathways in pollen tubes. J Cell Biol 169, 127-138.
- [88] Molendijk, A.J., Bischoff, F., Rajendrakumar, C.S., Friml, J., Braun, M., Gilroy, S. and Palme, K. (2001). Arabidopsis thaliana Rop GTPases are localized to tips of root hairs and control polar growth. EMBO J 20, 2779-88.

- [89] Pollard, T.D. and Borisy, G.G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. Cell 112, 453-465.
- [90] Eden, S., Rohatgi, R. and Podtelejnikov, A.V. (2002). Mechanism of regulation of WAVE1induced actin nucleation by Rac1 and Nck. Nature 418, 790-793.
- [91] Brembu, T., Winge, P. and Bones, A.M. (2005). Catching the WAVEs of plant actin regulation. Journal of Plant Growth Regulation 24, 55-66.
- [92] Deeks, M.J. and Hussey, P.J. (2005). Arp2/3 and SCAR: plants move to the fore. Nat Rev Mol Cell Biol 6, 954-964.
- [93] El-Din El-Assal, S., Le, J. and Basu, D. (2004). DISTORTED2 encodes an ARPC2 subunit of the putative Arabidopsis ARP2/3 complex. Plant J 38, 526-538.
- [94] Le, J., El-Din El-Assal, D. and Basu, D. (2003). Requirements for Arabidopsis ATARP2 and ATARP3 during epidermal development. Curr Biol 13, 1341-1347.
- [95] Brembu, T., Winge, P. and Seem, M. (2004). NAPP and PIRP encode subunits of a putative wave regulatory protein complex involved in plant cell morphogenesis. Plant Cell 16, 2335-2349.
- [96] Deeks, M.J., Kaloriti, D. and Davies, B. (2004). Arabidopsis NAP1 is essential for Arp2/3dependent trichome morphogenesis. Curr Biol 14, 1410-1414.
- [97] Djakovic, S., Dyachok, J. and Burke, M. (2006). BRICK1/HSPC300 functions with SCAR and the ARP2/3 complex to regulate epidermal cell shape in Arabidopsis. Development 133, 1091-1100.
- [98] El-Din El-Assal, D., Le, J. and Basu, D. (2004). Arabidopsis GNARLED encodes a NAP125 homolog that positively regulates ARP2/3. Curr Biol 14, 1405-1409.
- [99] Li, F. and Higgs, H.N. (2003). The mouse Formin mDia1 is a potent actin nucleation factor regulated by autoinhibition. Curr Biol 13, 1335-1340.
- [100] Mathur, J., Mathur, N. and Kernebeck, B. (2003). Mutations in actin-related proteins 2 and 3 affect cell shape development in Arabidopsis. Plant Cell 15, 1632-1645.
- [101] Mathur, J., Mathur, N. and Kirik, V. (2003). Arabidopsis CROOKED encodes for the smallest subunit of the ARP2/3 complex and controls cell shape by region specific fine F-actin formation. Development 130, 3137-3146.
- [102] Basu, D., Le, J. and El-Essal Sel, D. (2005). DISTORTED3/SCAR2 is a putative arabidopsis WAVE complex subunit that activates the Arp2/3 complex and is required for epidermal morphogenesis. Plant Cell 17, 502-524.
- [103] Zhang, X., Dyachok, J. and Krishnakumar, S. (2005). IRREGULAR TRICHOME BRANCH1 in Arabidopsis encodes a plant homolog of the actin-related protein2/3 complex activator Scar/WAVE that regulates actin and microtubule organization. Plant Cell 17, 2314-2326.
- [104] Mathur, J., Spielhofer, P. and Kost, B. (1999). The actin cytoskeleton is required to elaborate and maintain spatial patterning during trichome cell morphogenesis in Arabidopsis thaliana. Development 126, 5559-5568.
- [105] Szymanski, D.B., Marks, M.D. and Wick, S.M. (1999). Organized F-actin is essential for normal trichome morphogenesis in Arabidopsis. Plant Cell 11, 2331-2347.
- [106] Morrell, J.L., Morphew, M. and Gould, K.L. (1999). A mutant of Arp2p causes partial disassembly of the Arp2/3 complex and loss of cortical actin function in fission yeast. Mol Biol Cell 10, 4201-4215.
- [107] Winter, D.C., Choe, E.Y. and Li, R. (1999). Genetic dissection of the budding yeast Arp2/3 complex: a comparison of the in vivo and structural roles of individual subunits. Proc Natl Acad Sci U S A 96, 7288-7293.
- [108] Hudson, A.M. and Cooley, L. (2002). A subset of dynamic actin rearrangements in Drosophila requires the Arp2/3 complex. J Cell Biol 156, 677-687.
- [109] Sawa, M., Suetsugu, S. and Sugimoto, A. (2003). Essential role of the C. elegans Arp2/3 complex in cell migration during ventral enclosure. J Cell Sci 116, 1505-1518.
- [110] Li, S., Blanchoin, L. and Yang, Z. (2003). The putative Arabidopsis arp2/3 complex controls leaf cell morphogenesis. Plant Physiol 132, 2034-2044.

- [111] Wallar, B.J. and Alberts, A.S. (2003). The formins: active scaffolds that remodel the cytoskeleton. Trends Cell Biol 13, 435-446.
- [112] Zigmond, S.H. (2004). Formin-induced nucleation of actin filaments. Curr Opin Cell Biol 16, 99-105.
- [113] Deeks, M.J., Hussey, P.J. and Davies, B. (2002). Formins: intermediates in signal-transduction cascades that affect cytoskeletal reorganization. Trends Plant Sci 7, 492-498.
- [114] Fu, Y., Wu, G. and Yang, Z. (2001). Rop GTPase-dependent dynamics of tip-localized F-actin controls tip growth in pollen tubes. J Cell Biol 152, 1019-1032.
- [115] Bokoch, G.M. (2003). Biology of the p21-activated kinases. Annu Rev Biochem 72, 743-781.
- [116] Hofmann, C., Shepelev, M. and Chernoff, J. (2004). The genetics of Pak. J Cell Sci 117, 4343-4354.
- [117] Wu, G., Gu, Y. and Li, S. (2001). A genome-wide analysis of Arabidopsis Rop-interactive CRIB motif-containing proteins that act as Rop GTPase targets. Plant Cell 13, 2841-2856.
- [118] Hwang, J.U., Gu, Y. and Lee, Y.J. (2005). Oscillatory ROP GTPase activation leads the oscillatory polarized growth of pollen tubes. Mol Biol Cell 16, 5385-5399.
- [119] Jeon, B.W. et al. (2008). The Arabidopsis small G protein ROP2 is activated by light in guard cells and inhibits light-induced stomatal opening. Plant Cell 20, 75-87.
- [120] Yang, Z. and Fu, Y. (2007). ROP/RAC GTPase signaling. Curr Opin Plant Biol 10, 490-4.
- [121] Shundai Li, Y.G., An Yan, Elizabeth Lord, and Zhen-Biao Yang (2008). RIP1 (ROP Interactive Partner 1)/ICR1 Marks Pollen Germination Sites and May Act in the ROP1 Pathway in the Control of Polarized Pollen Growth Molecular Plant, 1021-1035.
- [122] Chen, C.Y., Cheung, A.Y. and Wu, H.M. (2003). Actin-depolymerizing factor mediates Rac/Rop GTPase-regulated pollen tube growth. Plant Cell 15, 237-49.
- [123] Bamburg, J.R. (1999). Proteins of the ADF/cofilin family: essential regulators of actin dynamics. Annu Rev Cell Dev Biol 15, 185-230.
- [124] Groom, Q.J., Torres, M.A. and Fordham-Skelton, A.P. (1996). rbohA, a rice homologue of the mammalian gp91phox respiratory burst oxidase gene. Plant J 10, 515-522.
- [125] Keller, T., Damude, H.G. and Werner, D. (1998). A plant homolog of the neutrophil NADPH oxidase gp91phox subunit gene encodes a plasma membrane protein with Ca2+ binding motifs. Plant Cell 10, 255-266.
- [126] Torres, M.A., Onouchi, H. and Hamada, S. (1998). Six Arabidopsis thaliana homologues of the human respiratory burst oxidase (gp91phox). Plant J 14, 365-370.
- [127] Torres, M.A. and Dangl, J.L. (2005). Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. Curr Opin Plant Biol 8, 397-403.
- [128] Banfi, B., Tirone, F. and Durussel, I. (2004). Mechanism of Ca2+ activation of the NADPH oxidase 5 (NOX5). J Biol Chem 279, 18583-18591.
- [129] Sagi, M. and Fluhr, R. (2001). Superoxide production by plant homologues of the gp91(phox) NADPH oxidase. Modulation of activity by calcium and by tobacco mosaic virus infection. Plant Physiol 126, 1281-1290.
- [130] Suharsono, U., Fujisawa, Y. and Kawasaki, T. (2002). The heterotrimeric G protein alpha subunit acts upstream of the small GTPase Rac in disease resistance of rice. Proc Natl Acad Sci U S A 99, 13307-13312.
- [131] Kawasaki, T., Henmi, K. and Ono, E. (1999). The small GTP-binding protein rac is a regulator of cell death in plants. Proc Natl Acad Sci U S A 96, 10922-10926.
- [132] Ono, E., Wong, H.L. and Kawasaki, T. (2001). Essential role of the small GTPase Rac in disease resistance of rice. Proc Natl Acad Sci U S A 98, 759-764.
- [133] Wong, H.L. et al. (2007). Regulation of rice NADPH oxidase by binding of Rac GTPase to its Nterminal extension. Plant Cell 19, 4022-34.
- [134] Foreman, J. et al. (2003). Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. Nature 422, 442-6.

- [135] Jones, M.A., Raymond, M.J., Yang, Z. and Smirnoff, N. (2007). NADPH oxidase-dependent reactive oxygen species formation required for root hair growth depends on ROP GTPase. J Exp Bot 58, 1261-70.
- [136] Hong, Z., Zhang, Z. and Olson, J.M. (2001). A novel UDP-glucose transferase is part of the callose synthase complex and interacts with phragmoplastin at the forming cell plate. Plant Cell 13, 769-779.
- [137] Qadota, H., Python, C.P. and Inoue, S.B. (1996). Identification of yeast Rho1p GTPase as a regulatory subunit of 1,3-beta-glucan synthase. Science 272, 279-281.
- [138] Assaad, F.F. (2001). Of weeds and men: what genomes teach us about plant cell biology. Curr Opin Plant Biol 4, 478-87.
- [139] Trotochaud, A.E., Hao, T., Wu, G., Yang, Z. and Clark, S.E. (1999). The CLAVATA1 receptor-like kinase requires CLAVATA3 for its assembly into a signaling complex that includes KAPP and a Rho-related protein. Plant Cell 11, 393-406.
- [140] Zhou, J., Loh, Y.T., Bressan, R.A. and Martin, G.B. (1995). The tomato gene Pti1 encodes a serine/threonine kinase that is phosphorylated by Pto and is involved in the hypersensitive response. Cell 83, 925-35.
- [141] Swiderski, M.R. and Innes, R.W. (2001). The Arabidopsis PBS1 resistance gene encodes a member of a novel protein kinase subfamily. Plant J 26, 101-12.
- [142] Murase, K., Shiba, H., Iwano, M., Che, F.S., Watanabe, M., Isogai, A. and Takayama, S. (2004). A membrane-anchored protein kinase involved in Brassica self-incompatibility signaling. Science 303, 1516-9.
- [143] Shen, W., Gomez-Cadenas, A., Routly, E.L., Ho, T.H., Simmonds, J.A. and Gulick, P.J. (2001).
 The salt stress-inducible protein kinase gene, Esi47, from the salt-tolerant wheatgrass
 Lophopyrum elongatum is involved in plant hormone signaling. Plant Physiol 125, 1429-41.
- [144] Feliciello, I. and Chinali, G. (1993). A modified alkaline lysis method for the preparation of highly purified plasmid DNA from Escherichia coli. Anal Biochem 212, 394-401.
- [145] James, P., Halladay, J. and Craig, E.A. (1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. Genetics 144, 1425-36.
- [146] R.D. Gietz, R.A.W. (1998). Transformation of yeast by the lithium acetate/single-stranded carrier DNA/PEG method. Methods in Microbiology 26
- [147] Gietz, R.D. and Woods, R.A. (2006). Yeast transformation by the LiAc/SS Carrier DNA/PEG method. Methods Mol Biol 313, 107-20.
- [148] Gyorgyey, J., Vaubert, D., Jimenez-Zurdo, J.I., Charon, C., Troussard, L., Kondorosi, A. and Kondorosi, E. (2000). Analysis of Medicago truncatula nodule expressed sequence tags. Mol Plant Microbe Interact 13, 62-71.
- [149] Horvath, G.V., Pettko-Szandtner, A., Nikovics, K., Bilgin, M., Boulton, M., Davies, J.W., Gutierrez, C. and Dudits, D. (1998). Prediction of functional regions of the maize streak virus replication-associated proteins by protein-protein interaction analysis. Plant Mol Biol 38, 699-712.
- [150] Lohar, D.P., Sharopova, N., Endre, G., Penuela, S., Samac, D., Town, C., Silverstein, K.A. and VandenBosch, K.A. (2006). Transcript analysis of early nodulation events in Medicago truncatula. Plant Physiol 140, 221-34.
- [151] Szucs, A. et al. (2006). Characterization of three Rop GTPase genes of alfalfa (Medicago sativa L.). Biochim Biophys Acta 1759, 108-15.
- [152] Gaillard, J., Neumann, E., Van Damme, D., Stoppin-Mellet, V., Ebel, C., Barbier, E., Geelen, D. and Vantard, M. (2008). Two Microtubule-associated Proteins of Arabidopsis MAP65s Promote Anti-Parallel Microtubule Bundling. Mol Biol Cell
- [153] Manning, J. and Kumar, S. (2007). NEDD1: function in microtubule nucleation, spindle assembly and beyond. Int J Biochem Cell Biol 39, 7-11.
- [154] Manning, J.A., Colussi, P.A., Koblar, S.A. and Kumar, S. (2008). Nedd1 expression as a marker of dynamic centrosomal localization during mouse embryonic development. Histochem Cell Biol 129, 751-64.

- [155] Hofmann, C., Shepelev, M. and Chernoff, J. (2004). The genetics of Pak. J Cell Sci 117, 4343-54.
- [156] Leveleki, L., Mahlert, M., Sandrock, B. and Bolker, M. (2004). The PAK family kinase Cla4 is required for budding and morphogenesis in Ustilago maydis. Mol Microbiol 54, 396-406.
- [157] Mahlert, M., Leveleki, L., Hlubek, A., Sandrock, B. and Bolker, M. (2006). Rac1 and Cdc42 regulate hyphal growth and cytokinesis in the dimorphic fungus Ustilago maydis. Mol Microbiol 59, 567-78.
- [158] Jurca, M.E., Bottka, S. and Feher, A. (2008). Characterization of a family of Arabidopsis receptor-like cytoplasmic kinases (RLCK class VI). Plant Cell Rep 27, 739-48.
- [159] Chiariello, M., Bruni, C.B. and Bucci, C. (1999). The small GTPases Rab5a, Rab5b and Rab5c are differentially phosphorylated in vitro. FEBS Lett 453, 20-4.
- [160] Tatsumoto, T., Xie, X., Blumenthal, R., Okamoto, I. and Miki, T. (1999). Human ECT2 is an exchange factor for Rho GTPases, phosphorylated in G2/M phases, and involved in cytokinesis. J Cell Biol 147, 921-8.
- [161] SAWADA N, I.H., NAKAO K. (2002). Direct Phosphorylation and Inactivation of Small GTPase RhoA by cGMP-Dependent Protein Kinase in vitro and in vivo-Possible Role in the Pathogenesis of Atherosclerosis. Future Advances and Breakthroughs in the Diagnosis, Treatment and Prevention of Atherosclerosis 34th, 86.
- [162] Kwon, T., Kwon, D.Y., Chun, J., Kim, J.H. and Kang, S.S. (2000). Akt protein kinase inhibits Rac1-GTP binding through phosphorylation at serine 71 of Rac1. J Biol Chem 275, 423-8.
- [163] Du, P. et al. (2005). Phosphorylation of serine residues in histidine-tag sequences attached to recombinant protein kinases: a cause of heterogeneity in mass and complications in function. Protein Expr Purif 44, 121-9.
- [164] Lomas-Lopez, R., Cozzone, A.J. and Duclos, B. (2008). A modified His-tag vector for the production of recombinant protein kinases. Anal Biochem 377, 272-3.
- [165] Molendijk, A.J. et al. (2008). A cysteine-rich receptor-like kinase NCRK and a pathogeninduced protein kinase RBK1 are Rop GTPase interactors. Plant J 53, 909-23.
- [166] Karnoub, A.E., Worthylake, D.K., Rossman, K.L., Pruitt, W.M., Campbell, S.L., Sondek, J. and Der, C.J. (2001). Molecular basis for Rac1 recognition by guanine nucleotide exchange factors. Nat Struct Biol 8, 1037-41.
- [167] Zong, H., Kaibuchi, K. and Quilliam, L.A. (2001). The insert region of RhoA is essential for Rho kinase activation and cellular transformation. Mol Cell Biol 21, 5287-98.
- [168] Freeman, J.L., Abo, A. and Lambeth, J.D. (1996). Rac "insert region" is a novel effector region that is implicated in the activation of NADPH oxidase, but not PAK65. J Biol Chem 271, 19794-801.
- [169] Karnoub, A.E., Der, C.J. and Campbell, S.L. (2001). The insert region of Rac1 is essential for membrane ruffling but not cellular transformation. Mol Cell Biol 21, 2847-57.
- [170] Earley, K.W., Haag, J.R., Pontes, O., Opper, K., Juehne, T., Song, K. and Pikaard, C.S. (2006). Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. Plant J 45, 616-29.
- [171] Kuppusamy, K.T., Endre, G., Prabhu, R., Penmetsa, R.V., Veereshlingam, H., Cook, D.R., Dickstein, R. and Vandenbosch, K.A. (2004). LIN, a Medicago truncatula gene required for nodule differentiation and persistence of rhizobial infections. Plant Physiol 136, 3682-91.
- [172] Henley, J.R., Cao, H. and McNiven, M.A. (1999). Participation of dynamin in the biogenesis of cytoplasmic vesicles. FASEB J 13 Suppl 2, S243-7.
- [173] Gao, H., Kadirjan-Kalbach, D., Froehlich, J.E. and Osteryoung, K.W. (2003). ARC5, a cytosolic dynamin-like protein from plants, is part of the chloroplast division machinery. Proc Natl Acad Sci U S A 100, 4328-33.
- [174] Sagi, G., Katz, A., Guenoune-Gelbart, D. and Epel, B.L. (2005). Class 1 reversibly glycosylated polypeptides are plasmodesmal-associated proteins delivered to plasmodesmata via the golgi apparatus. Plant Cell 17, 1788-800.

- [175] Lutcke, H. (1995). Signal recognition particle (SRP), a ubiquitous initiator of protein translocation. Eur J Biochem 228, 531-50.
- [176] Johnson, K.L., Jones, B.J., Bacic, A. and Schultz, C.J. (2003). The fasciclin-like arabinogalactan proteins of Arabidopsis. A multigene family of putative cell adhesion molecules. Plant Physiol 133, 1911-25.
- [177] Miki, H., Setou, M., Kaneshiro, K. and Hirokawa, N. (2001). All kinesin superfamily protein, KIF, genes in mouse and human. Proc Natl Acad Sci U S A 98, 7004-11.
- [178] Skirpan, A.L., McCubbin, A.G., Ishimizu, T., Wang, X., Hu, Y., Dowd, P.E., Ma, H. and Kao, T. (2001). Isolation and characterization of kinase interacting protein 1, a pollen protein that interacts with the kinase domain of PRK1, a receptor-like kinase of petunia. Plant Physiol 126, 1480-92.
- [179] Preuss, M.L., Kovar, D.R., Lee, Y.R., Staiger, C.J., Delmer, D.P. and Liu, B. (2004). A plantspecific kinesin binds to actin microfilaments and interacts with cortical microtubules in cotton fibers. Plant Physiol 136, 3945-55.
- [180] Costoya, J.A. (2007). Functional analysis of the role of POK transcriptional repressors. Brief Funct Genomic Proteomic 6, 8-18.
- [181] Motchoulski, A. and Liscum, E. (1999). Arabidopsis NPH3: A NPH1 photoreceptor-interacting protein essential for phototropism. Science 286, 961-4.