

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

Doktori (Ph.D.) értekezés

tézisei

Készítette: DORJGOTOV Dulguun

Témavezető: Dr. FEHÉR Attila

*MTA SzBK Növénybiológia Intézet
Funkcionális Sejtbiológia csoport*

Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi Kar

Biológia Doktori Iskola

Szeged

2009

Bevezetés

Az állatok és a növények életmódja, szó szerint értve is, „gyökeresen” eltér. Míg az állatok képesek a helyváltogatásra, 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.

A sejten belüli jelátvitel jelentős szereplői az összes eukarióta élőlényben, beleértve a növényeket is, a kis molekulású GTP-kötő fehérjék, azaz kis GTP-ázok. Ezek a fehérjék kétállású molekuláris kapcsolóként működnek [1,2]. 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 sejtvázas szerveződését (RHO), a membránhólyagocskák (vezikulumok) lefűződését (ARF) és összeolvadását (RAB) [1,3,4]. Az állati RHO GTP-áz család tovább osztályozható a RAC, RHO és CDC42 alcsaládokra.

A növényekből teljesen hiányoznak a sejtosztódást szabályozó RAS GTP-ázok, és a RHO GTP-ázok tekintetében is csak egyetlen, a RAC GTP-ázokhoz közel álló, de azoktól egyértelműen elkülönülő csoportjuk, a ROP (RHO proteins of plants) GTP-ázok alcsaládja létezik [2,5,6].

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 [4,7]. 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 GTP-kötő fehérjék, így a ROP GTPázok, „ki- illetve bekapcsolását” szabályozó (regulátor) fehérjék végzik. A ROP GTP-ázok szabályozó fehérjei szerepük alapján három csoportba sorolhatók: GTP-bontást gyorsító fehérjék (GAP-ok; GTPase Activating Proteins), nukleotidcserélő fehérjék (GEF-ek; Guanine nucleotide Exchange Factors) és nukleotidrogzító fehérjék (GDI-k; Guanine nucleotide Dissociation Inhibitors) [8]. 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 GTP-ázok családja több génből áll: lúdfűben 11, rizsben 7, kukoricában 9 ROP GTP-ázt azonosítottak [5,9,10]. A ROP GTPázok szerkezete alapvetően konzervált, de számos is jellegzetességet mutat. Ennek megfelelően szabályozó és célfehérjék között is találunk olyanokat, amelyek evolúciósan konzerválódtak illetve növény specifikusak. Például a növényi ROPGEF fehérjék egy csak a növényekre jellemző domént (Plant specific ROP Nucleotide Exchanger, PRONE) tartalmaznak, egyes ROPGAP fehérjék az állati CDC42/RAC fehérjék effektoraira jellemző CRIB (CDC42/RAC-interactive binding) motívumot hordozzák, míg a ROPGDI fehérjék felépítése megegyezik más eukarióták hasonló fehérjéivel.

Még nagyobbak a különbségek a ROP illetve RHO célfehérjék tekintetében. A ROP GTPázok legismertebb effektorai a CRIB-motívumot tartalmazó kis molekulású adaptor fehérjék (RIC, ROP-interacting CRIB-containing proteins), amelyek csak növényekben fordulnak elő. Hasonlóan növény-specifikusak a sejtfal szintézisében szerepet játszó ROP effektorok (ICR/RIP, CCR, UGT). Ugyanakkor az aktin sejtváza RHO GTPázok általi szabályozásában valamint a NADPH oxidáz enzim regulálásában sok a hasonlóság a különböző eukarióta élőlények között. Jellegzetes különbség azonban, hogy a növényekben nem ismertek CRIB motívumot hordozó ún. p21-aktivált kinázok (PAK) [2], holott ezek a kinázok, amelyeket a „bekapcsolt” CDC42/RAC GTPázok közvetlenül aktiválnak fontos szerepet töltenek be más eukariótákban mind a sejtváza, mind MAPK kaszkádok aktiválásán keresztül a génexpresszió, szabályozásában.

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 azonosítása és vizsgálata.

Célkitűzések

A növényi egyedfejlődés szabályozása rendkívül rugalmas. Laboratóriumunkban azokat a sejt- illetve molekuláris szintű folyamatokat vizsgáljuk, 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 kölcsönhatásairól (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 kináz láncolatok aktiválásában. Végül az újonnan azonosított elemeknek meg kívántuk határozni a biológia szerepét. Mindezeknek köszönhetően azt reméltük, hogy hozzájárulhatunk a növényi sejtek jelátviteli hálózataival kapcsolatos jelenleg még meglehetősen hiányos ismereteket bővítéséhez.

Az anyagok és módszerek

- Plazmid tisztítás
- Különböző MsROP6 mutáns változatok előállítása PCR reakcióval
- Élesztő-kéthibrid szűrés és élesztő-kéthibrid mátrix vizsgálatok
- Baktériumban termeltetett fehérjék tisztítása

- Fehérje azonosítása Western blot módszerrel
- In vitro* kináz reakció
- Lúdfű protoplasztok transzformálása
- Fluoreszcens mikroszkópia
- RNS tisztítás és cDNS szintézis
- Valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció

Eredmények

-A ROP GTP-ázzal végzett az élesztő-kéhibrid szűrés

PhD munkám első szakasza abból állt, hogy ROP GTP-ázokkal kölcsönható fehérjéket (szabályozókat vagy célfehérjéket) találjunk az élesztő-kéhibrid rendszer alkalmazásával. Ennek során elsőként azonosítottuk három lucerna ROP GTP-áz cDNS-ét, részlegesen jellemeztük őket [11], 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-Dominant Negative), folyamatosan bekapcsolt (CA-Constitutively Active) illetve nem izoprenilálódó (elrontott intracelluláris lokalizációjú, L).

A lucerna gümőből származó cDNS könyvtáron végeztünk élesztő kéhibrid szűrést. A szűrés után a MsROP6 GTP-áz CA+L mutánsával „kihalászott” gének szekvenciáit azonosítottuk a GenBank adatbázisában (Blastx: <http://www.ncbi.nih.gov/BLAST>). Az így kapott eredmények szerint a cDNS-ek a következő fehérjéket kódolták: két receptorszerű citoplazmatikus kinázt (RLCK, Receptor-like Cytosolic Kinase), két p65 mikrotubulus kapcsolt fehérjét, egy NEDD1 homológ fehérjét, egy MtN24 (234as) gümőjellegzetes fehérjét, egy darab DUF1620 (domain unknown function) nevű domént hordozó fehérjét és egy darab teljesen ismeretlen fehérjét.

Munkánk során két receptorszerű 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 [12-14]. Valamennyi PAK1 kináz hordozza a CRIB (CDC42/Rac-interactive binding) motívumot,

ami a GTP-ázokkal való kölcsönhatásért felelős. A két receptor-szerű citoplazmatikus kinázt elneveztük ROP-pal kölcsönható receptor-szerű kináznak (ROP-interacting Receptor-like Kinase), rövidítve RRK-nak. A két lucerna-RRK egy eddig teljesen feltáratlan növényi kinázcsaládhoz tartozik, melyet receptor-szerű citoplazmatikus kináz VI családnak (RLCK VI) hívnak [15].

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

A RRK kinázok és különböző MsROP6 GTPáz mutánsok közötti élesztő-kéhibrid kísérlet ek eredményéből arra a következtetésre jutottunk, hogy **a két RRK kináz az MsROP6 CA+L és L változatával hat kölcsön**, a DN formával nem. 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 rendszerekből ismerjük, hogy a RHO/RAC/CDC42 GTP-ázok által bekapcsolt kinázokban általában található CRIB motívum (pl. PAK1 kinázokon [12]), 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 GTP-ázhoz való kötődésért? Ennek a kérdésnek a megválaszolására az MtRRK1 kinázt különböző részekre daraboltuk. A kináz szakaszok ROP GTP-ázzal való kölcsönhatását az élesztő-kéhibrid rendszerben vizsgáltuk meg. 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.

Az MsROP6 GTPáz nem szubsztrátja az RRK kinázoknak

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 - 32 P] ATP-vel végzett kináz reakciót terveztünk, amihez bakteriálisan túltermeltetett fehérjéket tisztítottunk. Azt tapasztaltuk, hogy az N-terminálisan 6xHIS farokkal jelölt és annak segítségével tisztított MsRop6 GTPázt az

RRK kinázok megfelelő körülmények képesek foszforilálni. Azonban további részletes vizsgálatok, beleértve a foszforilált MsRop6 GTPáz tömegspektroszkópiás (MALDI) vizsgálatát, egybehangzóan azt igazolták, hogy **az MsROP6 GTP-áz nem szusztrátja az MtRRK kinázoknak.** A megfigyelt foszforiláció az N-terminális 6xHIS farok következménye.

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

Azt vizsgáltuk, hogy MtRRK kinázok kináz aktivitása függ-e az MsROP6 GTPáz jelenlététől. Kísérleteink során a mielin bázikus fehérje (MYBP, univerzális szubsztrát szerin treonin kinázok számára) RRK1 kináz általi foszforilálódását vizsgáltuk aktív GTP-áz jelenlétében. Az MtRRK1 kináz csak akkor volt képes erőteljesen foszforilálni a mielin bázikus fehérjét, ha jelen volt az MsROP6 CA mutánsa vagy MsROP6 WT vad típusa és 1mM GTP. A GTP-áz hiányában a MyBP foszforiláció alig volt kimutatható. Úgy szintén nagyon gyenge volt a foszforiláció MsROP6 WT vad típusa és 1mM GDP jelenlétében. Arra következtetünk, hogy **a GTP-kötött MsROP6 aktiválja az MtRRK1-et.**

Kölcsönhatás specifikásának 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 kísérletek azt eredményezték, hogy az AtROP1 és AtROP6 GTPáz ugyanúgy aktiválta az MtRRK1 kinázt, mint az MsROP6 GTPáz. ***Az in vitro MtRRK1 - MtROP6 kölcsönhatás nem specifikus,*** más ROP-ok is képesek aktiválni az RRK1 kinázt.

Megvizsgáltuk azt is, hogy nem növényi eredetű, a RHO családhoz sorolható, GTP-áz is képes-e aktiválni a kinázokat. Erre a célra kiválasztottunk egy nem növényi eredetű RHO-típusú GTP-ázt (RX). 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 alcsaládnhoz tartozó kis GTP-kötő fehérjéről van szó [11]. Az élesztő-kéthibrid rendszerben megvizsgáltuk a kölcsönhatásukat mindkét MtRRK-val. Azt kaptuk, hogy a lucerna RRK kinázaink nem léptek kölcsönhatásba a nem növényi eredetű RX GTP-ázzal az élesztő-kéthibrid

rendszerben. Tehát a **MtRRK kinázok csak növényi ROP GTP-ázzal lépnek kölcsönhatásba, és csak ROP GTP-ázok által aktiválódnak.**

A kináz bekapcsolásáért felelős mintázat meghatározása

A fent említett kísérleti eredményekből az következik, hogy a növényi ROP GTP-ázok tartalmaznak egy (vagy több) olyan mintázatot, amely felelős az RRK kinázokkal való specifikus kölcsönhatásért és annak bekapcsolásáért; ennek a mintázatnak viszont más, nem növényi eredetű RHO GTP-ázokból hiányoznia kell. Az irodalomból tudjuk, hogy az állati RHO/RAC/CDC42 GTP-ázokban egy jellegzetes peptidhuroknak (RHO-inszert régió) van fontos szerepe egyes célfehérjék bekapcsolásában [16,17]. Ennek a szakasznak a kicserélése ugyanakkor nem befolyásolja a célfehérjével való kölcsönhatást [18-20]. A növényi ROP GTP-ázoknak is van jellegzetes RHO-inszert régiója, amelynek aminosav sorrendje a növényi ROP GTP-áz alcsaládon belül alig változik. Ugyanakkor a növényi ROP GTP-ázoknak ez a szakasza a többi RHO családdhoz tartozó GTP-áz hasonló peptidhurokától nagyon eltérő. Irodalmi adatok alapján kicseréltük az MsROP6 GTPáz RHO-inszert régióját a humán RAS GTPáz megfelelő szakaszára. Ez a csere nem változtatja meg alapvetően a GTP-áz fehérje térszerkezetét, de érinti a célfehérje bekapcsoló képességét [18,20]. Az így létrehozott mutánst MsROP6 inszerciós régió mutánsnak vagyis MsROP6 Δ ^{IRAS} változatnak neveztük el. A Δ ^{IRAS} MsROP6 fehérjék (CA, L és L változat) és mindkét RRK közötti kölcsönhatást megvizsgáltuk az élesztő-kéthibrid rendszerben. Az élesztő-kéthibrid vizsgálat alapján a ROP-inszert régió megváltoztatása nem szüntette meg a kinázok és a GTP-ázok közötti kölcsönhatást. Ugyanakkor a MsROP6 Δ ^{IRAS}+CA mutáns fehérjével végzett kináz reakció egyértelműen kimutatta, hogy az MsROP6 Δ ^{IRAS}+CA mutáns változat nem képes aktiválni az MtRRK1 kinázt. **Kimutattuk** tehát, **hogy a ROP-inszert régió fontos szerepet tölt be effektor fehérjék**, legalábbis az RRK kinázok, **aktiválásában.**

Az MtRRK kinázok növényi sejten belüli elhelyezkedésének vizsgálata

Az MtRRK kinázokat 35S promóter által hajtott GFP (green fluorescent protein) gén mögé klónoztuk be a megfelelő leolvasási keretbe. 35S-MtRRK1-GFP és 35S-MtRRK2-GFP génfüziókat tartalmazó plazmid molekulákat polietilén glikol (PEG) alkalmazásával bejuttattuk lúdfű sejt kultúrából izolált protoplasztokba és egy napos tenyésztést követően a sejteket konfokális mikroszkóp segítségével megvizsgáltuk. **Arra a**

következtetésre jutottunk, hogy mind a két kinázunk a sejten belül citoplazmatikus elhelyezkedésű.

A YFP-MtRRK1 és a CFP-MsROP6+CA vektor konstrukciót együtt juttattuk be lúdfű-protoplaszt sejtekbe (YFP, yellow fluorescent protein; CFP, cyan fluorescent protein). A mikroszkópos vizsgálat eredményeként azt láttuk, hogy **a MsROP6 CA mutáns 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.

Génkifejeződés vizsgálat

Meghatároztuk az ismert Medicago truncatula ROP GTPázok és RRK kinázok SecA gén kifejeződésével normalizált, viszonylagos génkifejeződési értékek a lucerna egyes szerveiből származó mRNS (cDNS) mintákban. A mérések értékelése után azt állapíthattuk meg, hogy **az MtRRK1 gyökérben és gümőben jobban kifejeződik,** mint a többi szervben, míg az MtRRK2 a sejt kultúrában és a virágban mutat nagyon alacsony relatív kifejeződést. **Az MsROP6 GTPáz az MtRRK2 kinázhoz hasonlóan szintén mindenhol közel azonos mennyiségben fejeződik ki,** azonban viszonylag magas a relatív kifejeződése a virágban.

MtRRK2 lehetséges fehérje partnereinek azonosítása élesztő-kéthibrid rendszerben

Az MtRRK2-vel végzett élesztő-kéthibrid szűrés során további potenciális kölcsönható fehérjéket azonosítottunk. A kölcsönhatás ellenőrzése után a jelöltek aminosavsorrend alapú azonosítása a következő eredménnyel járt:

Golgi szervecskékhez, hólyagocskák (vezikulumok) lefűződéséhez és sejt falszintézishez kapcsolható fehérjék: Dinamin, RGP1 (Reversibly glycosylated protein), SRP (Signal recognition particle), Golgi szervecskéhez kapcsolódó fehérje (Golgi associated protein), Fasciclin-szerű fehérje, Kinezin-szerű fehérje.

Transzkripcióhoz kapcsolható fehérjék (transzkripciós faktorok): bHLH transzkripciós faktor fehérje, Myb-szerű transzkripciós fehérje, Cink-ujj transzkripciós fehérje, Makorin cink-ujj fajtájú RNS-kötő fehérje, Mi-2 kromatinátalakító fehérje.

Jelátviteli útvonalakhoz kapcsolható fehérjék: POZ/BTB domént hordozó fehérje, PIL (Photoreceptor Interacting-like Protein), DUF315 (Domain of unknown function 315) domén hordozó fehérje, amiről később kiderült, hogy ROP-GEF funkciója van.

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 találhatóak meg, és a növényi receptorszerű citoplazmatikus kinázok VI. családjának tagjai (RLCK VI).

-Ezek a kinázokon a kináz doménon 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 növény-specifikusnak 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 szövetekben 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) GTPáz-függő jelátvitelben. Ez a jelátviteli lépés számos növény-specifikus vonással rendelkezik, amelyeknek további vizsgálata érdekes betekintési lehetőséget nyújt a jelátviteli hálózatok evolúciójába is, amellyel, hogy értékes információkat szolgáltat a növényi egyedfejlődés szabályozásával kapcsolatban.

Hivatkozások

- [1] Takai, Y., Sasaki, T. and Matozaki, T. (2001). Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* 81, 153-208.
- [2] Zheng, Z.L. and Yang, Z. (2000). The Rop GTPase: an emerging signaling switch in plants. *Plant Mol Biol* 44, 1-9.
- [3] Wennerberg, K., Rossman, K.L. and Der, C.J. (2005). The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci* 118, 843-6.
- [4] Vetter, I.R. and Wittinghofer, A. (2001). The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* 294, 1299-304.
- [5] Yang, Z. (2002). Small GTPases: versatile signaling switches in plants. *Plant Cell* 14 Suppl, S375-88.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] Christensen, T.M., Vejlupekova, Z. and Sharma, Y.K. (2003). Conserved subgroups and developmental regulation in the monocot rop gene family. *Plant Physiol* 133, 1791-1808.
- [11] Szucs, A. et al. (2006). Characterization of three Rop GTPase genes of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Biochim Biophys Acta* 1759, 108-15.
- [12] Hofmann, C., Shepelev, M. and Chernoff, J. (2004). The genetics of Pak. *J Cell Sci* 117, 4343-54.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] 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.

Publikációs lista

A dolgozat anyagából megjelent publikációk:

Dorjgotov D, Jurca E.M, Dunaine-Fodor Cs, Szucs A, Otvos K, Klement E, Biro J, Fehér A
Plant Rho-type (Rop) GTPase-dependent activation of receptor-like cytoplasmic kinases
in vitro
FEBS letters (2009) (in press)
Impact factor: 3.263

Egyéb publikációk:

Attila Feher, Manuela E. Jurca, Csilla Fodor-Dunai and Dulguun Dorjgotov
Regulation of ROP GTPase Signalling at the Gene Expression Level: A Review
The Open Plant Science Journal, 2008, 2, 21-30

Eve Kevei, Peter Gyula, Balazs Feher Reka Toth, Andras Viczian, Stefan Kircher, Dean Rea, Dulguun Dorjgotov, Eberhard Schafer, Andrew J. Millar, Laszlo Kozma-Bognar, Ferenc Nagy
Arabidopsis thaliana Circadian Clock Is Regulated by the Small GTPase LIP1
Current biology 17, 1456-1464. (2007)
Impact factor: 11

Szucs A, Dorjgotov D, Otvos K, Fodor C, Domoki M, Gyorgyey J, Kalo P, Kiss GB, Dudits D, Fehér A
Characterization of three Rop GTPase genes of alfalfa (*Medicago sativa* L.)
BBA-GENE STRUCT EXPR, **1759**, 108-115 (2006)
Impact factor: 2.506

Otvos K, Pasternak TP, Miskolczi P, Domoki M, Dorjgotov D, Szucs A, Bottka S, Dudits D, Fehér A
Nitric oxide is required for, and promotes auxin-mediated activation of, cell division and embryogenic cell formation but does not influence cell cycle progression in alfalfa cell cultures
PLANT J, **43**, 849-860 (2005)
Impact factor: 6.969

Dorjgotov D, Szucs A, Otvos K, Szakonyi D, Kelemen Z, Lendvai A, Ponya Z, Barnabas B, Brown S, Dudits D, Fehér A
Specific features of RHO GTPase-dependent signaling in plants
CELL BIOL INT, **27**, 191-192 (2003) Impact factor: 1.092