

**Doktori (Ph.D.) értekezés**

**Rigó Gábor**

**Biológia Doktori Iskola**

**Szeged**

**2013**

# **Az Arabidopsis CRK5 protein kináz szerepe a gyökérgravitropizmus szabályozásában**

Ph.D. értekezés

Készítette: Rigó Gábor

Témavezetők: Dr. Cséplő Ágnes; Dr. Szabados László

Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Kutatóközpont  
Növénybiológiai Intézet Arabidopsis Molekuláris Genetikai Csoport

Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Kar

Biológia Doktori Iskola

Szeged

2013

# TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítések jegyzéke.....	1
Génszimbólumok.....	2
<b>I. BEVEZETÉS .....</b>	<b>4</b>
1.1. Előszó.....	4
1.2. Lúdfű ( <i>Arabidopsis thaliana</i> ), a növényi genetika modellnövénye.....	5
1.3. Auxin: alapvető fontosságú növényi hormon .....	7
1.4. Klasszikus élettani kísérletek auxinnal .....	8
1.5. Az indol-3-ecetsav bioszintézise.....	9
1.6. Az IES transzportja .....	11
1.7. Auxin export fehérjék .....	13
1.7.1. PGP/ABCB transzporterek .....	13
1.7.2. PIN (PINFORM) auxin efflux hordozók .....	13
1.8. Auxin jelátvitel.....	15
1.9. Az auxin szerepe a növényi gravitropikus válaszok szabályozásában.....	17
1.10. Gravitációs jelérzékelés .....	20
1.11. PIN2 szerepe a poláris aszimmetrikus auxin exportban .....	22
1.12. A hajtás gravitropizmusa .....	24
1.13. Kalcium szignálátvitel szerepe a gravitropikus válaszok szabályozásában .....	26
1.14. A CRK protein család jellemzői .....	27
<b>II. CÉLKITŰZÉSEK.....</b>	<b>30</b>
<b>III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK .....</b>	<b>31</b>
3.1 Növényekkel végzett kísérletek .....	31
3.1.1 Növények nevelése .....	31
3.1.2. <i>Arabidopsis</i> sejtkultúra fenntartása .....	31
3.1.3. <i>Arabidopsis</i> gyökérkultúra.....	31
3.1.4. <i>Arabidopsis</i> <i>Agrobacterium</i> közvetítette genetikai transzformációja .....	32
3.1.5. Transzformált növények antibiotikum szelekciója .....	32
3.1.6. <i>Arabidopsis</i> vonalak keresztezése:.....	32
3.1.7. GUS riporter aktivitás követése hisztokémiai festéssel .....	33
3.1.8. Keményítő Lugol festése .....	33
3.1.9. Gravitropikus növekedési tesztek .....	33
3.1.10. Protoplaszt transzformáció.....	34
3.1.11. A CRK5 mutánsok azonosítása.....	34
3.2. Molekuláris biológiai módszerek.....	35
3.2.1. <i>Escherichia coli</i> hősokk transzformációja .....	35

3.2.2. Baktérium sejtek antibiotikum szelekciója .....	35
3.2.3. Molekuláris biológiai alapszerek .....	36
3.2.4. Plazmid konstrukciók létrehozása.....	36
3.2.5. Háromszülős plazmidkonjugáció Agrobaktériumba .....	37
3.2.6. A His <sub>6</sub> -CRK5 és a His <sub>6</sub> -PIN2loop fehérjék tisztítása E. coliból .....	38
3.2.7. Mielin bázikus fehérje tisztítása.....	39
3.2.8. In vitro protein kináz aktivitás vizsgálatok .....	39
3.2.9. Foszfopeptid analízis.....	40
3.2.10. Mikroszómális és sejtfal frakciók izolálása .....	40
3.2.11. Western immunoblott analízis .....	41
3.2.12. RNS tisztítás és Kvantitatív Valós Idejű PCR (qRT-PCR).....	41
3.3. Mikroszkópos és sejtbiológiai módszerek .....	42
3.3.1. Konfokális lézerpásztázó mikroszkópos vizsgálatok.....	42
3.3.2. Endocitózis követése FM4-64 festéssel .....	42
3.3.3. Exocitózis gátlása BFA segítségével .....	42
3.3.4. PIN2-GFP membránlokalizáció hőérképes vizsgálata.....	43
3.3.5. PIN3-GFP membránlokalizáció hőérképes vizsgálata.....	43
3.3.6. Propídium jodid festés .....	43
3.3.7. A PIN fehérjék immunolokalizációja.....	44
3.4. Bioinformatikai módszerek.....	44
<b>IV. EREDMÉNYEK.....</b>	<b>46</b>
4.1. A CRK5 gén és inszerciós mutáns alléljeinek izolálása .....	46
4.2. Módosított génkonstrukciók előállítása a CRK5 gén és fehérje időbeli és térbeli expressziójának és lokalizációjának, ill. a <i>crk5-1</i> mutáció genetikai komplementációjának céljából .....	50
4.3. A <i>crk5-1</i> mutáns genetikai komplementációja.....	51
4.4. A <i>crk5-1</i> mutáció késlelteti a gravitopikus választ gyökérben és hajtásban .....	53
4.5. A CRK5 gén és fehérje expressziójának vizsgálata.....	56
4.6. A CRK5 kináz lokalizációja a plazmamembránban .....	58
4.7. A CRK5-GFP poláris membránlokalizációja gyökér bórszöveti, kortex és kolumella sejtjeiben .....	60
4.8. BFA exocitózis inhibitor gátolja a CRK5 fehérje membránlokalizációját .....	61
4.9. A <i>crk5-1</i> mutáció hatása az auxin eloszlásra gyökérben .....	63
4.10. A <i>crk5-1</i> mutáció késlelteti a gravistimulus indukálta auxin exportot.....	66
4.11. A <i>crk5-1</i> mutáció nem változtatja meg az AUX1 auxin influx valamint a PIN1, PIN3, PIN4 és PIN7 auxin efflux fehérjék lokalizációját .....	71
4.12. A <i>crk5-1</i> mutáció megváltoztatja a PIN2 auxin export fehérje membránlokalizációját .....	76

4.13. A crk5-1 mutáció megemeli a Brefeldin érzékenységet felgyorsítva a PIN2 fehérje internalizációját.....	83
4.14. A CRK5 géntermék tisztítása és protein kináz aktivitásának jellemzése.....	86
4.15. A CRK5 protein kináz foszforilálja in vitro a PIN2 auxin efflux hordozó citoplazmikus hurok doménjét.....	88
<b>V. DISZKUSSZIÓ.....</b>	<b>92</b>
<b>VI. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS.....</b>	<b>97</b>
<b>VII. IRODALOMJEGYZÉK.....</b>	<b>98</b>
<b>VIII. ÖSSZEFOGLALÁS .....</b>	<b>116</b>
<b>IX. SUMMARY .....</b>	<b>119</b>
<b>X. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK.....</b>	<b>122</b>
<b>XI. Függelék.....</b>	<b>124</b>

## Rövidítések jegyzéke

2,4D	2,4-diklór-fenoxi-ecetsav
BAC	Bacterial Artificial Chromosome=bakteriális mesterséges „kromoszóma”
bp	bázispár (DNS szakasz méretének kifejezése)
BFA	Brefeldin-A
Ca <sup>2+</sup> -ion	kalcium ion
CHX	cikloheximid
Dc	<i>Daucus carota</i> =sárgarépa
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
EGTA	etilén-glikol-tetraecetsav
IAAld	indol-3-acetaldehid
IAM	indol-3-acetamid
IAN	indol-3-acetonitril
IAOx	indol-3-acetaldoxim
IES	indol-3-ecetsav
IPA	indol-3-piroszölősav
IPTG	isopropil β-D-1-thiogalactopiranozid
LB	T-DNS bal oldali határoló szekvenciája
Le	<i>Lycopersicon esculentum</i> =paradicsom
MBP	Mielin bázikus fehérje
NOA	1-naftoxiecsav
NPA	9-hydroxyfluorene-9-karbonsav
Nt	<i>Nicotiana tabaccum</i> =dohány
Os	<i>Oryza sativa</i> rizs
QC	quiescent centre, vagy nyugvó központ
RB	T-DNS jobb oldali határoló szekvenciája
SDS-PAGE	Nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis
TAM	triptamin
T-DNS	transzfer DNS
X-Gluc	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glükuronsav
Zm	<i>Zea mays</i> =kukorica

## Génszimbólumok

ABCB	ATP-BINDING-CASSETTE (ABC) B SUBGROUP
ABP1	AUXIN BINDING PROTEIN 1
ACC SYNTHASE	AMINOCYCLOPROPANE-1-CARBOXYLIC ACID SYNTHASE
ACT2	ACTIN 2
AFB	AUXIN SIGNALING F-BOX PROTEIN
AGC	cAMP-DEPENDENT, cGMP-DEPENDENT PROTEIN KINASE C
AMI1	AMIDASE 1
ARA7	ARABIDOPSIS RAB GTPASE HOMOLOG F2B
ARF	AUXIN RESPONSIVE FACTOR
ARF-GEF	ADP-RIBOSYLATION FACTOR GTPASE
AUX/RES	AUXIN RESPONSIVE ELEMENTS
AUX1	AUXIN RESISTANT 1
CAM	CALMODULIN
CAMKS	CALMODULIN DEPENDENT PROTEIN KINASES
CCAMKS	CALCIUM AND CALMODULIN DEPENDENT PROTEIN KINASES
CDPK	CALCIUM DEPENDENT PROTEIN KINASE , CALMODULIN-LIKE DOMAIN PROTEIN KINASE
CDPKS	CALCIUM DEPENDENT PROTEIN KINASES
CRKS	CDPK-RELATED KINASES
CYP83B1	CYTOCHROME P450 83B1
GAPC2	GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE C-2
GFP	GREEN FLUORESCENT PROTEIN
GNL1	GUANINE-NUCLEOTIDE EXCHANGE FACTOR1
GNOM	GDP/GTP EXCHANGE FACTOR
GUS	BETA-GLUCURONIDASE
LAX1,2,3	LIKE AUX1,2,3
NIT3	NITRILASE 3
NPTII	NEOMYCIN-KANAMYCIN PHOSPHOTRANSFERASE TYPE II
PDK1	3'-PHOSPHOINOSITIDE-DEPENDENT PROTEIN KINASE 1
PGM	PHOSHOGLUCOMUTASE
PGP	PHOSPHO-GLYCOPROTEIN

PIN	PIN FORMED
PINOID (PID)	PROTEIN KINASE PINOID
PIP5K2	PHOSPHATIDYLINOSITOL-4-PHOSPHATE 5-KINASE 2.
PP2A	SERINE/THREONINE PROTEIN PHOSPHATASE 2A
SAUR	SMALL AUXIN-UP RNA
SCF	SKP-CULLIN-F-BOX
SCR/SGR1	SHOOT GRAVTROPISM1, SCARECROW
SEX1	STARCH EXCESS1
SHR/SGR7	SHOOT GRAVITROPISM7, SHORT ROOT
TAA1	L-TRYPTOPHAN-PYRUVATE AMINOTRANSFERASE 1
TIR1	TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE1
TRP2	TRYPTOPHAN SYNTHASE BETA CHAIN
TRP3	TRYPTOPHAN SYNTHASE ALPHA CHAIN
VPS9A	VACUOLAR PROTEIN SORTING9A
WAG1	PROTEIN KINASE 3 ARABIDOPSIS THALIANA
YFP	YELLOW FLUORESCENS PROTEIN
YUCCA3	FLAVIN-CONTAINING MONOOXYGENASE



# I. BEVEZETÉS

## 1.1. Előszó

A változó környezeti hatásokat, mint például a fény, hőmérséklet és vízellátás, a növények speciális érzékelő mechanizmusokkal észlelik és az ezekhez kapcsolódó jelátviteli utak segítségével képesek a megváltozott környezeti paraméterekre és stresszstimulusokra adaptív választ adni. A környezeti faktorok egy, a földi életre jellemző formája a tömegvonzás vagy gravitáció, mely a Föld középpontja felé mutató ún.  $1g$  vektoriális erő, amely  $1kg$  tömeg esetén  $9.81$  Newton. A gravitációs erő, Newton törvényei alapján, a távolság négyzetétől függő módon arányos a Föld és az azon élő növény tömegével. Mivel a két tömeg (ún. a Föld és növény) közötti különbség óriási, a növényekre gyakorolt földi gravitációs erő aránylag kis mértékben változik a különböző magassági szinteken. Ezzel szemben a növények pozíciója a Föld központja felé irányuló gravitációs erő irányától (ún. vektorától) gyakorta eltérhet az aktuális növekedési körülmények szerint. Ezért, amíg a gravitációs erőter változásaira adott válaszok tanulmányozásához az űrben  $0g$  és a földön  $1g$  körülmények között növekvő növények összehasonlítása szükséges, ezzel szemben a Föld középpontja felé mutató  $1g$  gravitációt érzékelő mechanizmusok sokkal könnyebben felderíthetők. Ennek ellenére, azonban természetesen figyelemmel kell követnünk a Föld gravitációs ereje következtében változó sűrűségi paramétereket (pl. levegő, tápoldat, növényi folyadék transzport, citoplazma stb. esetében), melyek érzékelése a gravitációval összekapcsolva vagy attól függetlenül szabályozódhat. Az evolúció során a földi gravitációs körülményhez való alkalmazkodás alapvető szerepet játszott a fejlődési folyamatokban, szervek és szervrendszerek kialakulásában és elhelyezkedésében. Így mind a szárazföldi, mind a vízi növények esetében a növekedési tengely párhuzamos a földi gravitáció irányával. A magasabbrendű növények esetén, a főgyökér növekedési iránya így mindig a Föld középpontja felé mutat (ún. pozitív geo- vagy gravitropizmus), szemben a fotoszintetizáló hajtással, amely ezzel ellentétes irányban, ún. negatív gravitropizmust mutatva fejlődik. Charles Darwin óta, aki először írta le a gyökér és hajtásfejlődés pozitív, ill. negatív gravitropikus válaszait, közel kétszáz év kísérletes fiziológiai és további molekuláris vizsgálatok betekintést adtak a földi gravitációt érzékelő növényi mechanizmusokba. Felfedezték, hogy a növények a gravitációt és annak irányát a keményítő szemcséket tartalmazó kloroplasztisz és amyloplasztisz sejtorganelleumaik segítségével érzékelik, melyeket ún. sztatolitoknak neveznek. Ennek

megfelelően a keményítő szintézisben mutáns növények lassan, vagy egyáltalán nem képesek növekedésük irányát a gravitáció iránya szerint megváltoztatni. Az is ismertté vált, hogy a sztatolitok gravitációs erő irányában mutatott mozgása megváltoztatja kölcsönhatásukat a mozgásukat biztosító és érzékelő aktin filamentumokkal. A sztatolitok gravitáció irányában történő mozgását és kölcsönhatását a sejtmembránnal számos ún. mechanoreceptor érzékeli különböző szignálátviteli utakat és ún. másodlagos hírvivő komponenseket (ún. second messenger) aktiválva. Ezek között a  $\text{Ca}^{2+}$ -ion kiszabadulás,  $\text{Ca}^{2+}$  és kalmodulin (CaM) érzékelés és általuk kiváltott foszforilációs kaszkádok alapvető szerepet játszanak. 1926-ban Nikolai Cholodny és Frits Warmolt Went a kijevi egyetemen és California Institute of Technology-ban végzett kísérleteikben kimutatták, hogy a gravitációt érzékelő szignálátviteli folyamat a sejtmegnyúlást szabályozó auxin növényi hormon aszimmetrikus eloszlásához (ún. exportjához) vezet. A vízszintes helyzetbe forgatott növényi gyökerek felső sejtrétegeiből auxin transzportálódik az alsó sejtrétegekbe, ami ott gátolja a sejtmegnyúlást. A csökkenő auxin szint következtében a felső sejtrétegek megnyúlnak, és így a gyökér a gravitáció irányába elhajlik. Az elmúlt évtizedben az auxin transzport számos részlete tisztázódott, az ún. PINFORM (PIN) auxin transzportot szabályozó membránfehérjék szerepének felfedezésével. Továbbra is megválaszolatlan maradt azonban az a fontos kérdés, hogy a gravitációs stimulust jelző másodlagos  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM szignál milyen módon szabályozza az aszimmetrikus auxin exportot, sejtmegnyúlást és ez által a gyökerek pozitív geotropikus növekedési válaszát. E doktori értekezés célja, hogy betekintést nyújtson ennek a folyamatnak egyes részleteibe egy CaM-függő protein kináz jellemzésén keresztül. Ez a kináz szabályozza a gyökerek gravitropikus válaszában kulcsszerepet játszó PIN2 protein auxin export funkcióját a molekuláris genetika modell növényében, az *Arabidopsis thaliana*-ban.

## 1.2. Lúdfű (*Arabidopsis thaliana*), a növényi genetika modellnövénye

A molekuláris növénybiológiában az *Arabidopsis thaliana* olyan szerepet tölt be, mint a klasszikus genetika esetében a *Drosophila melanogaster*. Az *Arabidopsis* magyar elnevezése a lúdfű. A lúdfű a keresztesvirágúak családjába tartozik, egynyári, rövid tenyészidejű, hosszúnappal virágzó, önmegtermékenyítő (keresztbeporzás veszélye kicsi, így sok egyed nevelhető kis területen), száraz gyepeken előforduló, rengeteg magot (5-10,000) produkáló növény (Simon, 1994). Mivel érdemelte ki ez a gyomnövény, a növénygenetikában ezt az

előkelő helyet? A zárvatermő növények körülbelül 120 millió évvel ezelőtt alakultak ki (Borhidi, 1995), ezért feltételezhető, hogy génkollekciójuk a közös eredet miatt sok hasonlóságot mutat. A zárvatermő növények között az *Arabidopsis* genom mérete az egyik legkisebb, kb. 135 Megabázis (Mbp), összehasonlítva a kisebb genommal rendelkező Dél-Afrikában honos Lentiburaceae (rencéfélék) családjába tartozó rovarermészítő *Genlisea margaretae* (haploid genom méret 63Mbp), *Genlisea aurea* (64 Mbp) ill. *Utricularia gibba* (88 Mbp) fajokkal (Greilhuber és mtsai., 2006). Az *Arabidopsis* óriási előnye a rövid vegetációs idő, nagyszámú utód és önbeporzás, ami a genetikai mutációs kísérletekben rendkívül fontos. Ennek felismerésében és az *Arabidopsis*-szal végzett klasszikus genetikai kutatások elindításban és népszerűsítésében Rédei György (1921-2008) magyar származású, a Missouri Columbia Egyetemen dolgozó genetikus játszott úttörő szerepet. A legelterjedtebb *Arabidopsis* ökotípus, a Columbia izolálása is az ő nevéhez fűződik, amelynek genomját reprezentáló 5 kromoszóma teljes szekvenciáját 2000-ben készítették el (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000). Az *Arabidopsis* genomi DNS-e alacsony metiláltsági (6-7%) foka mellett viszonylag kevés ismétlődő (20-25%) szekvenciát tartalmaz (Meyerowitz, 1992). A jelenleg elérhető legpontosabb információ az *Arabidopsis* genomjáról és génkészletéről a TAIR (<http://www.arabidopsis.org>) és NASC (<http://arabidopsis.info/>) honlapjain található naprakész formában. Jelenleg körülbelül 27,000 génről tudunk, mely 37,000 különböző fehérjét kódol (beleszámolva az alternatív intron kivágódással (ún. splicing) készülő mRNS izoformák által kódolt fehérjéket is).

Rédei György korai munkássága során optimalizálta az *Arabidopsis*-szal végzett mutációs kísérleteket nagyszámú mutagén vegyületet és különböző energiájú sugárforrásokat (Röntgen, gyors neutron etc.) vizsgálva. Eredményeinek köszönhetően (Koncz és mtsai., 1992) a génmutációk gyakoriságából pontosan meg tudta becsülni az *Arabidopsis* genom által kódolt gének számát (27,875), amely közel azonos a genomszekvencia alapján talált gének számával. Továbbá kidolgozta a mutagenézis kísérletek matematikai statisztikai alapját és nagyszámú mutáns izolálásával bizonyította, hogy az *Arabidopsis*-szal végzett mutációs kísérletek költsége a genetikában használt más növényfajokhoz képest (pl. kukorica, árpa, rizs stb.) a legalacsonyabb. Koncz Csabával, a kölni Max-Planck Intézetben dolgozó magyar kutatóval együttműködve, Rédei György kidolgozta az *Arabidopsis* Agrobaktériummal történő genetikai transzformációját, amely lehetővé tette inszerciós génmutációk izolálását a növényi kromoszómákba integrálódó Agrobaktérium Ti-plazmid T-DNS-ének segítségével (Koncz és mtsai., 1992; Koncz és mtsai., 2002). A T-DNS kromoszómális határszekvenciáinak meghatározásával ezek után lehetségessé vált inszerciós mutációk

azonosítása a legtöbb *Arabidopsis* génben, kivéve azokat, amelyek mutációja gametofita letalitást eredményez. Az említett kémiai, fizikai ill. inszerciós mutagenesis módszereket használva, az *Arabidopsis* génekről kapott információ könnyen alkalmazhatóvá vált más fajok hasonló génjeinek a vizsgálatára, illetve megnyílt az út a hasonló klasszikus vagy transzformációt alkalmazó technológiák célzott és hatékony alkalmazásához a mezőgazdasági, élelmiszeripari, ill. más ipari felhasználásokat célzó növénynemesítésben.

### **1.3. Auxin: alapvető fontosságú növényi hormon**

Auxin volt az első növényi hormon, amelynek kémiai struktúráját, mint indol-ecetsav, 1938-ben Kenneth V. Thimann határozta meg. Kezdetben az auxin növekedést szabályozó hatásai váltak ismertté, az auxinok csoportjába tartozó hasonló hatású indolszármazékokat növényi növekedési faktoroknak nevezték, hogy megkülönböztessék a sejtdifferenciációt irányító állati hormonoktól. A növények esetében, az állati rendszerekhez hasonlóan, hormonoknak nevezzük az olyan, alacsony koncentrációban előforduló anyagokat, amelyek egy adott sejtcsoportban termelődnek, és legtöbb esetben más sejtekhez eljutva vagy a keletkezés helyén hatásokat fejtenek ki speciális receptorokhoz kötődve többféle jelátviteli úton keresztül. Jelenleg növényi hormonhatású anyagoknak nevezzük az: auxin, gibberellin, citokinin, abszcizinsav, brassinoszteroid, és a légnemű etilén. Ezen kívül vannak olyan anyagok, melyeket szintén nevezhetünk növényi hormonnak, mint pl. a jázmonsav, szalicilsav, vagy a peptid típusú szisztemin, amelyek a növény védekezésében, növényi kommunikációban játszanak fontos szerepet és hatásukra a célsejt(ek) tulajdonságai megváltoznak. Az alapvető fontosságú növényi hormonok a növényfejlődés, sejtdifferenciáció, szervfejlődés, növekedési és környezeti válaszok különböző fázisainak irányításában töltnek be központi szerepet. Sok esetben nem lehet egyértelműen elkülöníteni az egyes hormonok hatásait és az általuk kiváltott specifikus sejtválaszokat, mivel a különböző hormonok egymás hatásait felerősíthetik vagy gátolhatják, ami még az egymáshoz viszonyított arányuktól függően is változhat. A hormonok egymásra gyakorolt hatása komplex folyamat; jelenleg is folyik az egyes jelátviteli utak hálózatainak pontos feltérképezése és összefűzése. A hormonhatás mértéke ezen kívül a szövetek, szervek adott hormonra való érzékenységtől is függ. Auxin esetében már az 1930-as évek végén leírták ezt a dózisfüggő hatást (Thimann, 1938).

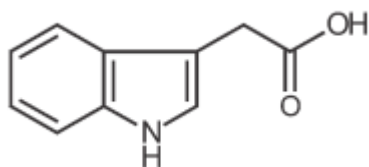
Az egyes sejtek, ill. sejtcsoportok változása az egész növény szintjén hatva megváltoztathatja annak fizikai, ill. kémiai jellemzőit. A növények különböző módon befolyásolják a hormonok szintjét. Bizonyos esetekben negatív vagy pozitív visszacsatolás vagy más hormon hatására változik az adott hormon szintje. Erre több lehetőség is adódik: a szintézis mértékének a változása; különféle molekulákkal összekapcsolódva átmenetileg vagy végleg elvesztik aktivitásukat; a transzport irányának és mértékének változása, vagy pl. a lebontó utak aktivitásának változása. Az *Arabidopsis*, mint modellnövény felhasználásával lehetővé vált a növényi hormonérzékelő és szignálátviteli mechanizmusok genetikai vizsgálata. Ezáltal különböző hormonhatásokat megváltoztató mutációkat lehetett izolálni, az azoknak megfelelő géneket azonosítani, módosítani és hatásukat vizsgálni transzformációjukat követően mutáns vagy kontrol, ún. vad típusú növényekben. Az így kapott információk felhasználásával felderíthetővé vált a különböző hormonok növekedésben és fejlődésben betöltött szerepe, az összetett jelátviteli utak egyes elemeinek részletes analízise (Erdei, 2004).

#### **1.4. Klasszikus élettani kísérletek auxinnal**

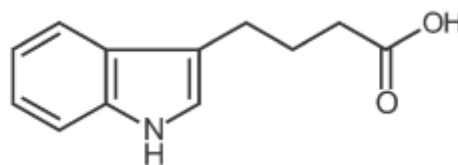
Charles Darwin az evolúció atyja, 1859-ben jelentette meg a *The Origin of Species* (magyarul először 1873-ban jelent meg: *A fajok eredete a természetes kiválasztás útján*) című könyvét. Az már kevésbé köztudott, hogy ő és fia Francis, a növények tanulmányozásával olyan következtetéseket vontak le, mely a későbbiekben kiindulópontként szolgálhatott más kutatóknak. Az 1880-as években megfigyelték, hogy az egyszikűek közé tartozó kanári köles (*Phalaris canariensis*) csírázása során megjelenő koleoptil (amely az elsődleges levelet védi), az egyirányú oldalsó megvilágításra a fény felé görbül. A görög (el) fordulni (tropos) igéből képezve alkották meg a fototropizmus kifejezést mely a fény felé fordulást jelöli. Tropizmusnak nevezünk minden olyan helyzetváltoztató mozgást, mely valamilyen kémiai vagy fizikai inger hatására jön létre. Az inger felé közeledő mozgást pozitív, míg attól távolodó mozgást negatív előjellel jelöljük (Darwin 1881).

Az 1930-as években alkották meg az auxin szót, mely a görög auxein (magnövelni/növekedni) szóból ered, kifejezve, hogy a kezdeti kísérletekben az auxint főképp különböző növekedési tesztekben vizsgálták. Az auxin fő formája, az indol-3-ecetsav (IES)

felfedezését követően (Thimann, 1938) számos más indolszármazékot azonosítottak, amelyek IES-hez hasonló aktivitással rendelkeznek (1. Ábra).



indol-3-ecetsav (IES)



indol-3-vajsav (IBA)

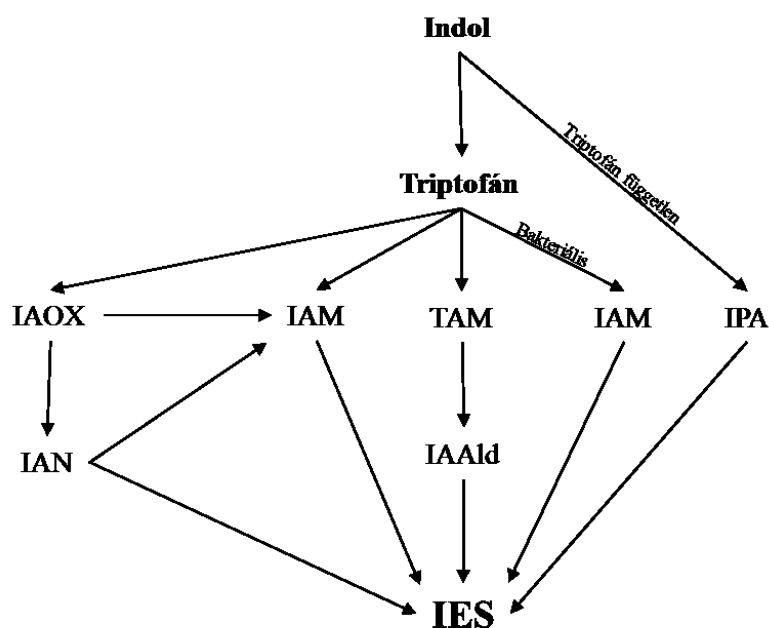
**1. Ábra: Két természetes auxinforma.** Az IES minden növényben előfordul, míg az IBA a kukoricában és pillangósokban fordul elő, illetve IES előanyaga is. Strader és Bartel (2011) alapján.

A zab koleoptil görbülési teszteken kívül megfigyelték egyéb hatását is az IES-nek. Az IES szerepet játszik az csúcsdominanciában, és hatására növényi tumor is kialakulhat (Went és Thimann, 1937), valamint fokozza a gyökeresedést is (Thimann, 1938). Az auxinok transzportjával kapcsolatban már a 30-as években rájöttek annak irányítottságára. IES tartalmú agarkockát helyeztek egy levágott zab koleoptil darabra, míg a másik végére csak agarkockát helyeztek. Azt tapasztalták, hogy az IES megjelenik a fogadó agarkockában, de csak akkor, ha a koleoptil darab csúcsi részére helyezték a hatóanyagot tartalmazó agarkockát, míg ellenkező esetben nem volt kimutatható vándorlás (Went, 1935). Ezt a transzportot a gravitáció nem befolyásolta.

### 1.5. Az indol-3-ecetsav bioszintézise

Az IES kémiai szerkezetét, gyökeresedést indukáló, illetve oldalhajtás gátló hatását, a szövetek különböző érzékenységét, irányított szállítását és szintézisét feltáró kezdeti kísérletek után az egyik legfontosabb kérdés az volt, hogyan és hol szintetizálódik az auxin. Az auxin bioszintézis folyamatának pontos felderítése még a mai napig sem zárult le. Az IES bioszintézise a gyorsan növekedő szervekhez köthető, ebből is kiemelkednek a hajtáscsúcs ill. a gyökércsúcs osztódó sejtjei.

Növényekben többféle bioszintézis utat is leírtak, ezek kiindulási alapja az indol, ami egy gyűrűs vegyület, és az ebből kialakuló triptofán aminosav az alapja az IES szintézis útnak. A triptamin (TAM) bioszintézis út során a triptofán-dekarboxiláz enzim triptamint (TAM) állít elő a triptofánból, amit az amin-oxidáz indol-3-acetaldehiddé (IAAld) alakít át, majd azt egy dehidrogenáz enzim konvertál IES-é. Az indol-3-acetonitril (IAN) bioszintézis út során, triptofánból a CYP79B2 és CYP79B3 citokróm P450 típusú enzimek az indol-3-acetaldoxim (IAOx) köztes terméket állítják elő, amiből indol-3-acetonitril (IAN), majd egy nitriláz enzim közbeiktatásával IES lesz (Zhao és mtsai., 2002). A bakteriális, ún. IAM bioszintézis út során a triptofánból monooxygenáz enzim hatására indol-3-acetamid (IAM) köztes termék egy hidroláz hatására alakul IES-é. Ez a bioszintézis út az Agrobaktériummal fertőzött növényi tumor sejtekben aktív. IES, a triptofán bioszintézisben mutáns növények (*trp2* illetve *trp3* mutánsok) esetében is kimutatható volt, vagyis létezik egy triptofán-független bioszintézis út is, ahol az indol gyűrűből indol-3-piroszőlősav (IPA) majd IES keletkezik.



**2. Ábra. Különböző IES bioszintézis utak összefoglalása Mashiguchi és mtsai. (2011) alapján.**

IAM, indole-3-acetamid; IAOx, indole-3-acetaldoxim; TAM, triptamine; IPA, indole-3-piroszőlősav; IAN, indole-3-acetonitril; IAAld, indole-3-acetaldehyd; IES indole-3-ecetsav.

Napjainkban az egyre nagyobb számban elérhető *Arabidopsis* mutánsok segítségével egyre közelebb kerülünk ahhoz, hogy jobban megismerjük az IES bioszintézisét, a különböző szintézis utak kapcsolatát egymással (2. Ábra). Ennek köszönhető annak a felismerése is, hogy az eddig baktérium

specifikusnak gondolt IAM szintézis út megtalálható *Arabidopsis*-ban és más növényfajban is (Pollmann és mtsai., 2009; Mashiguchi és mtsai., 2011). Az IES szintéziséhez hasonlóan, az IES lebontása szintén többféle úton történhet. Általában a hormonok inaktiválódása két módon történhet, visszafordítható módon, amikor a hormon még visszaalakulhat aktív formává, legtöbbször ez a hormon tárolási-szállítási formája, vagy enzimatisz módosítás révén történő teljes inaktiválódással. Az IES esetében az elsőre példa a konjugátumképzés különféle kis molekulasúlyú vegyületekkel, mint például különféle aminosavakkal; az IES glükózzal és myo-inozittal képzett észterei, valamint glükánokkal és glikoproteinekkal alkotott vegyületei. Növényi fajtól függ, hogy az IES melyik módosított formája a leggyakoribb. Az IES irreverzibilis inaktiválódása, ill. lebontása az IES-oxidáz és többféle peroxidáz segítségével történik, amelyet más molekulákkal történő konjugáció is követhet. Sejtmentes készítményekben kimutatták az IES fény hatására történő nem enzimatisz fotooxidációját is, melyet a növényi pigmentek jelenléte is fokoz (Erdei, 2004).

## 1.6. Az IES transzportja

A múlt század 30-as éveiben megjelent közlemények és könyvfejezetek sok mindent összegyűjtöttek az auxinhatás fiziológiai paramétereiről. Így nyilvánvalóvá vált, hogy az auxin aktív módon, polárisan és a gravitációtól függetlenül szállítódik a hajtáscsúcsból, ami az IES szintézis egyik fő helye, más szervek felé (Went, 1935). Ezt támasztotta alá az a klasszikus észlelés is, hogy orientációtól függetlenül egy adott szárrész mindig a bazális (gyökérfelé néző) felén hoz másodlagos gyökereket. Szöveti szinten, az auxin hosszútávú transzportja a hajtáscsúctól a gyökér irányába a szár hancselmeihez kapcsolódik, egyszikűekben pedig a parenchimális sejtekhez. A gyökérben a gyökércsúcs felé a faelemekben is történik IES szállítás, míg a gyökércsúctól a hajtás irányba az aktív IES továbbítás transzportfehérjék segítségével igényli. Az utóbbi aktív transzport játszik szerepet többek között a gravitropikus válasz, az oldalgyökér képződés illetve a gyökérmegnyúlás szabályozásában. Az embriófejlődés során az aktív transzport révén kialakuló auxingrádiensnek köszönhetően alakul ki az embrió polaritása.

Az IES transzportja a szimplasztikus, sejtek közötti térben passzív, amíg a sejtbe jutása után a citoplazmán keresztül a plazmamembránokon át aktív folyamat. Ezen kívül, az IES a hancselmekben is transzportálódhat, mint bármely más növény által előállított termék,



nem irányított (bulk flow) módon. Az aktív transzportfolyamatok esetében az auxin sejtekbe jutását segítő fehérjéket influx hordozóknak, míg az auxin sejtéből való exportját katalizáló faktorokat efflux hordozóknak nevezik. Ezek elhelyezkedése, tulajdonságai és szabályozása határozza meg az IES szállítás irányát és sebességét. A sejtekben szintetizálódó IES deprotonált anion ( $\text{IES}^-$ ) formában fordul elő, mivel gyenge sav és a citoplazmában közel semleges pH van. Ez a forma nem membrán permeábilis, a kijutáshoz szükségesek az efflux csatornamolekulák. A sejtek közötti térben, jellemzően a pH érték a savas, ezért ott az IES egy része (körülbelül 15-35%-a) protonált formában található, mely a plazmamembránon keresztül diffúzióval jut a sejtbe. Ezért a maradék IES sejtbe juttatásához szükség van az aktív transzportra is. A sejtfallal alacsonyabb pH-t okozó protontöbblet energiájára épülő transzportfolyamatok teszik lehetővé az IES sejtől sejtbe történő poláris aktív transzportját. A sejtbe az  $\text{IES H}^+$ -ionnal kapcsolt együttes transzport segítségével lép be, az AUX1 ill. LAX1, LAX2 és LAX3 (Like Aux1) nevű influx transzporterek segítségével, amelyek mind a száron, mind a gyökérben előfordulnak. Az AUX1 döntő szerepet játszik az IES gyökércsúcs felé irányított transzportjában, az elsődleges hánccselemben. Emellett, az AUX1 funkciója szükséges a gyökércsúcs nyugvó centrumából (ún. quiescent center, az auxin szintézis gyökérbeli központja) a gyökér bórszöveti sejtjein keresztül a hajtás felé irányuló IES transzportozáshoz is (Swarup és Mtsai, 2001). Az utóbbi, a gyökértől a hajtás felé irányuló AUX1 közvetített auxin transzport esszenciális a gyökerek pozitív gravitropikus válaszában szabályozásában, de lényeges szerepet játszik a gyökérszőrök differenciálódásában is. Ezzel szemben, a LAX2 fehérje a szállítóyalábok és oldalgyökerek korai fejlődésében tölt be speciális irányító szerepet. Az AUX1-hez hasonlóan, a LAX3 influx hordozó az oldalgyökér és a csírázás során észlelhető csúcsi kampó (apical hook) kialakulásában játszik szerepet. Az AUX1 és LAX influx hordozók további speciális funkcióit jelzi az, hogy a levelek megfelelő elrendeződése a növények szárán az *aux1*, *lax1* és *lax2* mutánsokban zavart szenved (Swarup és Péret, 2012).

## 1.7. Auxin export fehérjék

### 1.7.1. PGP/ABCB transzporterek

Az auxin poláris exportját irányító efflux hordozó fehérjék egyik családját a foszfo-glikoprotein (PGP) ABCB (ATP-Binding-Cassette (ABC) B subgroup) transzporterek alkotják. Jelenleg 21 PGP/ABCB transzporter ismert *Arabidopsis*-ban, amelyek közül az auxin transzport szempontjából a legjobban tanulmányozottak az ABCB1, ABCB4, ABCB19 (vagy más nevezéktan szerint PGP1, PGP4, PGP19) transzporterek. Mivel a PGP/ABCB transzporterek nem polárisan helyezkednek el a plazmamembránban, ezért az auxin grádiens kialakításában asszisztens, viszont a bazipetális (gyökértől a hajtás irányában történő) transzportban aktív szerepet játszanak (Kramer és Bennett, 2006; Geisler és Murphy, 2006; Titapiwatanakun és Murphy, 2009). A PGP/ABCB fehérjék jelentőségét mutatja az, hogy hiányukban egy pleiotróp fenotípus alakul ki, amit törpeség, rövidebb internódiumok és csökkent gravitropikus válasz jellemez az auxin transzportban bekövetkezett csökkenés következményeként. Egyszikű PGP/ABCB homológok mutációi hasonló fenotípust indukálnak (Geisler és Murphy, 2006). Az ABCB4-es fehérjének nemcsak auxin export, hanem import funkciója is van, melyet heterológ élesztő, ill. állati rendszerben való vizsgálatokkal mutattak ki (Titapiwatanakun és Murphy, 2009).

A PGP fehérjék stabilizálják más auxin transzportfehérjék (pl., PIN1 és PIN2, lásd később) komplexeit a plazmamembránban. Heterológ rendszerben kimutatták, hogy a PGP1; PGP19 és a PIN1 között szinergikus a kapcsolat, amíg ugyanezen két fehérje a PIN2-vel antagonisztikus szabályozó kapcsolatban van (Bandyopadhyay és mtsai., 2007; Blakeslee és mtsai., 2005). Az ABCB4 transzportfehérje hiánya *Arabidopsis*-ban fokozott oldalgyökér képződést, illetve hosszabb gyökérszőröket eredményez a megváltozott auxin eloszlás miatt (Santelia és mtsai., 2005; Terasaka és mtsai., 2005; Kerr és Bennett, 2007).

### 1.7.2. PIN (PINFORM) auxin efflux hordozók

Az auxin exportot szabályozó efflux hordozók (vagy angolul facilitator-ok) legjobban tanulmányozott családját a PIN fehérjék alkotják. Nevüket a *pin1* (pinform-1) mutáns jellegzetes túszerű (nem elágazó, egyenes) virágtengelyéről kapták (Goto és mtsai., 1987),

amelynek jellemzői a deformált levélstruktúra, a levelek nem szabályos elhelyezkedése és a komplex karfiolra, ill. tumorra emlékeztető, a virág helyett fejlődő degenerált reprodukzív szövetek. Az auxin transzport és a PIN1 fehérje közötti funkcionális kapcsolatot jelzi az, hogy NPA (9-hydroxyfluorene-9-carboxylic acid vagy N-(1-naphthyl) phthalamic acid) auxin transzport inhibitorral kezelt *Arabidopsis* növények tipikus pinform mutáns fenotípust mutatnak. A *pin1* mutánsban a hajtáscsúctól a gyökér felé irányuló (ún. bazipetális) poláris auxin transzport 80-90%-al kevesebb a vadtípushoz hasonlítva. Az NPA-val kezelt *Arabidopsis* növények virágzati tengelyében az IES transzport hasonló gátlást mutat (Okada és mtsai., 1991). A PIN1 fehérje volt az első, amelyről kimutatták, hogy esszenciális a poláris auxin export fenntartásához, bár a fehérje maga nem rendelkezik tipikus transzporterekre jellemző doménnel. Habár a PIN1 fehérje *Xenopus* éretlen petesejtjeiben és élesztőben is serkenti az auxin exportot (Petrásek és mtsai., 2006), nem teljesen kizárható, hogy ehhez egy konzervált endogén transzporter szükséges. Ezért, a PIN faktorok elnevezésében még ma is előnyben részesített az auxin transzportot segítő (ún. facilitátor) megjelölés a transzporter vagy csatorna elnevezés helyett.

A PIN1 fehérje szükséges a hajtáscsúcsból gyökérbe irányuló sejtből sejtbe történő auxin exporthoz, ennek megfelelően a virágzati tengely xilém-parenchima sejtek gyökérhez közelebbi alsó membránjaiban lokalizálódik (Gälweiler és mtsai., 1998; Palme és Gälweiler, 1999). A PIN1 fehérje hét további PIN homológgal mutat közeli rokonságot *Arabidopsis*-ban. A PIN család tagjai hordoznak egy citoplazmatikus hidrofíl hurkot, amelyet mindkét oldalon 4-5 transzmembrán régió határol. A plazmamembránban lokalizált PIN1, PIN2, PIN3, PIN4 és PIN7 esetében a citoplazma felé néző hurok hosszabb a PIN5, PIN6 és PIN8 fehérjékhez hasonlítva, amelyek az endoplazmatikus retikulum asszociált fehérjék (Swarup és Péret, 2012). A centrális hidrofíl hurkon történik a PIN fehérjék poszttranszlációs módosítása, mely hatással van a fehérje lokalizációjára, aktivitására, ill. stabilitására (Ganguly és mtsai., 2012; Löffke és mtsai., 2013).

A PIN auxin export fehérjék térbeli és időbeli expressziós különbségének köszönhetően minden egyes PIN fehérje más-más folyamatot szabályoz, amelyek biztosítják a növényekben az intra- ill. intercelluláris auxin homeosztázis fenntartását a többi transzport fehérjével együttműködve. A PIN1 fehérje a szállítónyalábok differenciálódásában játszik fő szerepet (Gälweiler és mtsai., 1998) a PIN4 és PIN7 fehérjékkel együtt fő funkciója a bazipetális (hajtáscsúctól gyökér felé irányuló) auxin áramlás irányítása az embriófejlődés során, amely az embrió tengely csúcs-gyökér polaritását határozza meg (Friml és mtsai.,

2003b). A csíranövény csúcsi kampójának kialakításában az etilén hormonnal kölcsönhatásban szükséges a megfelelő auxingrádiens kialakulása, amelyben a PIN3 efflux hordozó a PIN1, PIN4 és PIN7 fehérjékkel együttműködésben játszik fő szerepet (Zádníková és mtsai., 2010). A PIN6 fehérje szükséges a normális gyökérfejlődéshez (Cazzonelli és mtsai., 2013), de a porzófejlődésben és nektártermelésben is lényeges szerepet játszik (Bender és mtsai., 2013). A PIN5 és PIN8 fehérjék a sejten belüli auxin homeosztázis fenntartásáért felelősek (Mravec, 2009), de a PIN8 funkció szükséges a pollenfejlődés folyamataiban is (Dal Bosco és mtsai., 2012a; Dal Bosco és mtsai., 2012b).

## 1.8. Auxin jelátvitel

Az auxin jelátvitel is azt az általánosan leírható utat követi, mikor a célállomásra transzport segítségével eljutott hormon a receptorhoz kapcsolódva kifejti a hatását. A receptor kapcsolódást követően aktiválódhatnak másodlagos hírvivő rendszerek, amelyek megfelelő transzkripciós faktorok aktiválásán vagy gátlásán keresztül befolyásolják a célgén transzkripcióját, létrehozva a megfelelő választ. Az auxinhatás közvetítése legalább két receptorhoz köthető. Az egyik, az ABP1 (Auxin Binding Protein 1) fehérje, amely a plazmamembránhoz kapcsolódik egy rögzítő fehérje segítségével. Az *abp1* mutáció embrió letalitást okoz, az embrió azon stádiumában, amikor a globuláris fázisból a szívfézisba alakul át (Chen és mtsai., 2001). Az ABP1 fehérje jelentős része az endoplazmatikus retikulum membránrendszerében található, csak kisebb hányada fordul elő a plazmamembránban. Azonban, csak a plazmamembránban található ABP1 képes az IES-t kötni, mégpedig az ottani alacsonyabb pH miatt (Tomas és mtsai., 2010). Az ABP1 fehérje IES kötés után többféle jelátviteli faktort képes aktiválni, mint például az ATP-függő proton pumpát, amely hozzájárul a sejtfal savasodásához és ez által a sejtmeagnyúláshoz is. Az ABP1 továbbá indukálja az ionszatórnák és vízszatórnák aktiválását, a citoszólikus  $\text{Ca}^{2+}$ -ion koncentráció emelkedését, valamint a másodlagos hírvivő rendszereket is. Érdekes módon az IES kötődése az ABP1-hez gátolja a PIN1 fehérje klatrin-függő endocitózist (Chen és mtsai., 2012; Strader és Nemhauser, 2013; Sauer és mtsai., 2013). Az ABP1 fehérje által kiváltott auxin válasz a gyors génexpresszió megváltozása nélküli auxin hatásokért felelős, ugyanakkor a másodlagos jelátviteli utak aktiválása révén bizonyos gének expressziójára is hatással van.

Ezzel szemben a második auxin jelátviteli út, közvetlenül a génexpresszió megváltoztatásában nyilvánul meg. Ennek az alapja az, hogy egy szolubilis auxinkötő fehérje struktúrája úgy változik meg auxin hatására, hogy az képes az auxin-indukált géneket gátlás alatt tartó AUX/IAA transzkripciós represszor fehérjét ubiquitinhoz kapcsolni és ez által proteoszóma közvetítette lebontásra előkészíteni, ami a célgének transzkripciós derepressziójához vezet. Auxin hiányában az AUX/IAA represszorfehérjék az ARF (Auxin Responsive Factor) transzkripciós aktivátorok működését gátolják, miután komplexet képeznek velük. Az auxin, az ARF aktivátorok révén szabályozza azokat a géneket, amelyek promóter régiójában AuxREs (auxin responsive elements) szekvencia elemek találhatók. *Arabidopsis*-ban 23 ARFs kapcsolódik sejt- és szövetspecifitásuknak megfelelő kombinációkban 29 AUX/IAA represszorral. Az auxin a TIR1 (Transport Inhibitor Response1)/AFB (Auxin Signaling F-box) nevű F-box domént tartalmazó fehérjéhez kötődik, amelyek az auxin receptor fehérjék másik családját képviselik. A TIR1/AFB F-box fehérjék SCF (SKP-cullin-F-box) ubiquitin E3 ligáz komplex szubsztrát adaptor alegységeiként működnek, amelyek az AUX/IAA represszorok felismeréséért felelősek. Az auxin kötődése a TIR1/AFB F-box fehérjék egyik leucin-gazdag ismétlődő doménjéhez olyan konformáció változást indukál, amely lehetővé teszi az AUX/IAA represszor fehérjék stabil kötődését (ragasztó effektus) a TIR1/AFB F-box fehérjékhez és ez által az SCF<sup>TIR1/AFB</sup> ubiquitin ligáz komplexekhez. Ennek következtében az AUX/IAA represszorok poliubiquitinálódnak és így a 26S proteoszóma által degradálódhatnak. Az AUX/IAA represszorok eltávolítása következtéppen aktiválja ARF-regulált gének transzkripcióját (Woodward és Bartel, 2005; Paciorek és Friml, 2006; Quint és Gray, 2006; Sauer és mtsai., 2013; Saini és mtsai., 2013). Az ARF-regulálta ún. korai gének közé tartoznak a SAUR (Small Auxin-Up RNA) és GH3 (auxin konjugáció) transzkripcióban, jelátvitelben és auxin lebontásban szerepet játszó fehérjéket kódoló családok, amelyek aktiválódása percekben belül bekövetkezik (Kumar és mtsai., 2012). Az AUX/IAA represszorokat kódoló gének is a korai auxin aktivált gének családjába tartoznak, azaz az AUX/IAA faktorok saját maguk expresszióját is szabályozzák mintegy negatív visszacsatolásként. Az ún. auxin-indukált késői gének, mint pl. a glutathion-S-transferáz és ACC szintáz (1-Aminociklopropánkarbonsav szintáz; etilén prekursor) enzimek aktiválódása 2-4 órával az auxinszint emelkedése után észlelhető. A késői auxin-indukált gének főleg a stressz adaptációban játszanak szerepet. A transzportfehérjék hatására kialakuló helyi auxinszint változások, a megfelelő szignálátviteli utak aktiválásán vagy éppen gátlásán keresztül génexpressziós válaszokat hoznak létre, amelyek hatására alakul ki a környezeti és fejlődésbeli válaszok bonyolult mintázata.

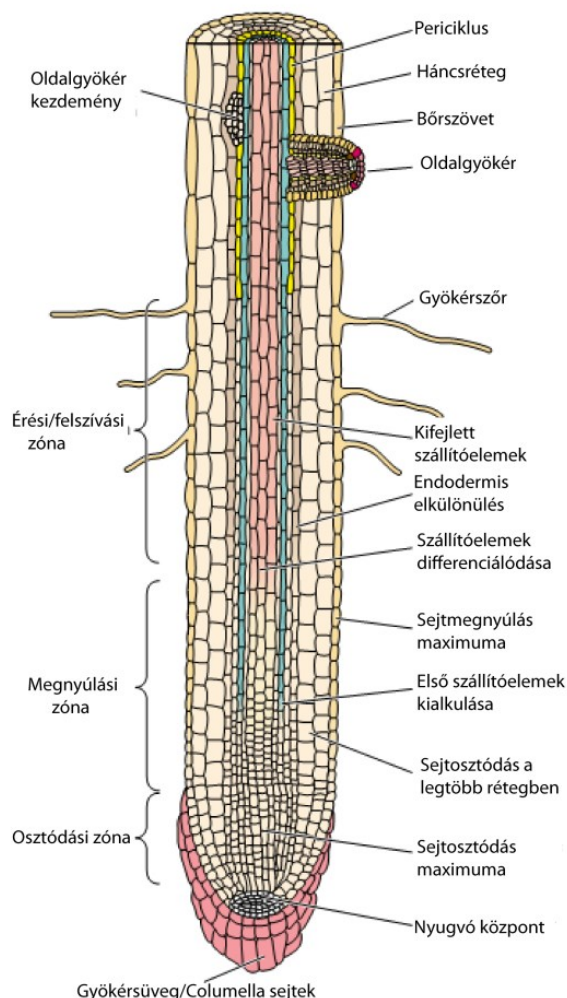
## 1.9. Az auxin szerepe a növényi gravitropikus válaszok szabályozásában

Mint azt már említettük, a tropizmus görög eredetű szó (trope), mely fordulást jelent. A jellegét tekintve kétféle típusa van, negatív tropizmus mikor a stimulustól el, amíg pozitív mikor a kiváltó stimulus felé történik a fordulás/növekedés iránya növények esetében. A növényi tropikus válaszok három fő formáját különböztetjük meg: a gravitropizmus (gravitáció hatása), a fototropizmus (fény hatása) és tigmotropizmus (érintésre való reagálás). Az auxinnak különösen fontos szerepe van a gravitropizmusban. Amint azt már korábban említettük, a magból kicsírázó növények gyökere pozitív gravitropizmust mutat, a Föld középpontja felé indul fejlődésnek. A földben találhatóak azok a vízben oldott ásványi anyagok (makro és mikroelemek), amelyeket a növények a gyökéren keresztül vesznek fel és nélkülözhetetlenek a növények fejlődéséhez. Ezzel szemben, a földfeletti fotoszintetizáló hajtás negatív gravitropikus növekedését összehangolja a fény irányába történő pozitív fototropikus megnyúlási válaszával. A fototropikus válasz eredeti leírása során, Darwin és fia figyelték meg azt a jelenséget, hogy a fűfélék koleoptilja képes az aszimmetrikus megvilágítás során a fény felé nőni, míg ha letakarják a csúcsot, akkor nincs ilyen irányú növekedés a csúcs alatti régióban. Feltételezték egy közvetítő anyag jelenlétét a csúcs és a fordulásért felelős régió között (Darwin, 1880). Később világossá vált, hogy a fototropizmus által indukált asszimmetrikus sejtmegnyúlás a hajtásban, a gyökér gravitropikus válaszához hasonlóan összefüggést mutat az auxin aszimmetrikus eloszlásával.

Amennyiben valamely fizikai hatásra nyugalmi helyzete megváltozik, a növény az érzékelő rendszerei segítségével felismeri a megváltozott körülményeket, és megfelelő válaszreakciót ad. Jó példa erre, amikor a gyökér növekedése közben akadályba ütközik, akkor azt megkerüli egy tigmotropizmus irányította válasszal, majd növekedése visszaáll az eredeti, Föld középpontja felé mutató gravitropikus vektor irányába. Hasonlóan, a víz- vagy táplálékvektor is eltérítheti a gyökér növekedését a függőleges iránytól, ami által akár egy torz gyökérstruktúra is képes kialakulni a növény stabilitását is veszélyeztetve. Amint ez a kényszerítő erő megszűnik, a gyökér újból a föld középpontja felé fordul. A gravitropikus érzékelés négy jól körülhatárolt fázisra különíthető el: érzékelés, jelformálás, intra-/intercelluláris jelátvitel, majd az ezt követő válasz, ami egy aszimmetrikus megnyúlásban jelentkezik az adott szerv két oldala között (Morita és Tasaka, 2004; Morita és mtsai., 2006).

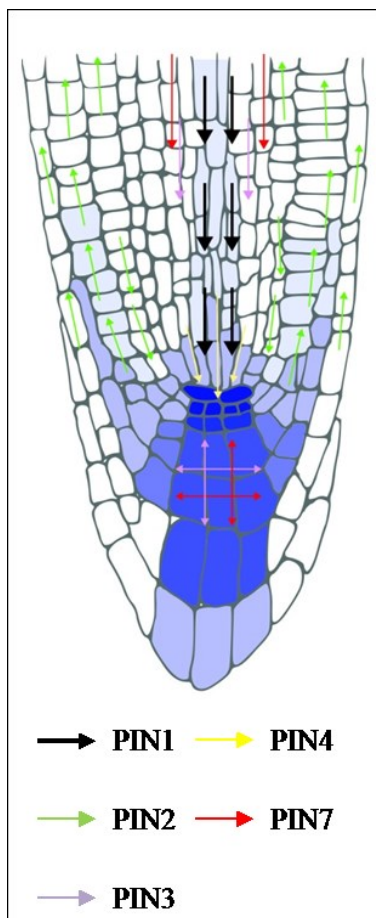
A legtöbb magasabbrendű növénynek két gravitációt érzékelő sejtszoportja, ill. szerve van. Az egyik a hipokotil és szár, ill. a virágzati tengely endodermisz sejtrétege (Tasaka és mtsai., 1999; Morita és Tasaka, 2004), amely a hajtás negatív geotropikus válaszainak irányításáért felelős. A gyökérben található másik szervet a gyökérsüveg kolumella sejtjei alkotják, amely specifikus szenzorként érzékeli a gravitációs vektor megváltozott irányát (Sack 1997; Perrin és mtsai., 2005).

Az *Arabidopsis thaliana* gyökérfelépítését a 3. Ábra szemlélteti. A gyökér osztódási zónáját (melynek része a nyugvó központ, quiescent center, QC is) a gyökérsüveg védi. Itt található a gyökér gravitropikus jelérzékelésének a helye, a kolumella sejtréteg, amely segíti a gyökér előrejutását a talajban a csúcsi sejtek leválása és elfolyósodása révén. Az osztódási régióban történik a sejtosztódás, a megnyúlási zóna a sejtek megnyúlásáért felelős régió, ez a helye a gravitropikus fordulásnak is. A sok gyökérszört tartalmazó érési vagy felszívási zóna a következő, ahol a gyökér végleges struktúrája kialakul, amely a tápanyagok és víz talajból történő felvételéért felelős. Ezen régiók együttes hossza *Arabidopsis* esetében a gyökércsúcstól számítva mindösszesen csak néhány milliméter.



**3. Ábra. Az *Arabidopsis* gyökér szerkezeti felépítése Taiz és Zeiger (2010) alapján.**

Amint azt fentebb említettük, a tropikus válaszok esetében észlelt aszimmetrikus sejtmegnyúlási reakciókért döntő részben az auxin aszimmetrikus térbeli és időbeli eloszlása felelős, amelynek kialakulását az auxin transzportfehérjék szabályozzák. A hajtáscsúcsban szintetizálódó auxin a gyökércsúcs felé vándorol, amíg az itt szintetizálódó auxin az bőrszöveti sejtrégeken keresztül a hajtáscsúcs felé elhelyezkedő gyökér megnyúlási zónába transzportálódik. A függőlegesen növekvő gyökérben a különböző PIN fehérjék elhelyezkedése, és azok lokalizációja alakítja ki a megfelelő auxin eloszlást. A hajtásból az auxin a hánccselemek ABCB19/PGP19, PIN1 és PIN3 exportfehérjéinek irányításával a gyökér felé transzportálódik. A PIN1 fehérje elhelyezkedése már az embrionális korban meghatározza a leendő gyökér kialakulásának a megfelelő helyét (Reinhardt és mtsai., 2000; Heisler és mtsai., 2005). A gyökérben, a központi henger/bélszövet részen áramlik az auxin a gyökércsúcs felé, amelyben a PIN1, PIN3, PIN4 és PIN7 fehérjék vesznek részt (Ganguly és mtsai., 2012). A nyugvó centrum alatti úgynevezett oszlopos vagy kolumella régióban éri el az auxinszint a maximumát. Ezután, az auxin transzportja a gyökércsúcstól a szár felé folytatódik a bőrszöveti rétegben a megnyúlási zónáig, majd ott visszaáramlik a kortex rétegben a gyökércsúcs felé 4. Ábra.



**4. Ábra. A PIN auxin transzport fehérjék elhelyezkedése az *Arabidopsis* gyökércsúcsi régiójában, függőleges helyzetű gyökér esetében. A kék szín mélysége az auxin tartalommal arányos. A nyilak az auxináramlás irányát mutatják Krecek és mtsai., 2009 alapján.**



A gyökérben az auxin transzportfehérjék elhelyezkedését mindig a függőlegesen álló gyökércsúcsához viszonyítjuk (ami a gravitációs vektorral megegyező irányt jelöl), akárcsak az adott sejt helyzetét is. Vagyis egy sejt alsó fele ebben az esetben a gyökércsúcs felőli oldalát jelenti, míg a felső része a sejtnak a csúcstól nézve a távolabbi oldala. A PIN1, PIN3, PIN4 és a PIN7 fehérjék a központi henger/bélszöveti sejtek, a PIN4 hordozók pedig a középső osztódási/QC sejtek alsó membránjaiban lokalizálódnak (Kleine-Vehn és Friml, 2008). A kolumella sejtekben a PIN3 és a PIN7 a sejtmembránban egyenletesen oszlik el. Szerepük az auxin gyökér bórszöveti sejtsora felé irányításában van. A PIN2 auxin export fehérje a bórszöveti sejtek felső plazmamembránjában, míg a fiatal hancssejtek (ún. kortex, a gyökér osztódási és megnyúlási rész) alsó membránjában helyezkedik el, összhangban azzal, hogy a bórszövetben a hajtáscsúcs felé, míg a fiatal hancssejteken a gyökércsúcs felé mutató auxin körforgásban vesz részt (Kleine-Vehn és mtsai., 2008) 4. Ábra.

## 1.10. Gravitációs jelérzékelés

A gravitropikus válaszhoz szükséges speciális jelátviteli út elemei a jelérzékelés, jelformálás és jelátvitel, valamint az ezt követő válasz (Masson és mtsai., 2002). A jelérzékelés fő helye az elsődleges gyökérben a kolumella sejtek 3-4 rétegű csoportja, ahol is a sejtek keményítőt tartalmazó amyloplasztiszai (sztatolitjai) a gravitációs vektor változó irányának megfelelően elmozdulnak. A kolumella sejtekben az endoplazmatikus retikulum (körben a sejtek alapi részén) és a sejtmag (a sejtek nyugvó zónához közelebbi felén, csúcán) elhelyezkedése is segíti a jelérzékelést (Morita, 2010). A gyökérben a jelérzékelés helye és a válasz helyileg eltér egymástól, a gyökércsúcstól távolabb, a megnyúlási zónában történik meg a gyökér pozitív gravitropikus elhajlása. Ezzel szemben a szárban és a hipokotilban, az endodermisz sejtsora tartalmaz gravistimulust érzékelő sztatocitákat. A gyökér és hajtás gravitációt érzékelő sejtrétegeinek funkcionális különbségét illusztrálja az, hogy az *Arabidopsis scarecrow* (*scr*) és a *short-root* (*shr*) transzkripciós faktor mutánsokban, ahol sem a gyökérben sem a szárban nem alakul ki az endodermisz sejtrétege, a szár/hipokotil gravitációs válasza megszűnik, míg a gyökéré változatlanul működőképes marad. Ugyanakkor a keményítőszintézisben hibás mutánsok, mint például a keményítónélküli *pgm* (phosphoglucomutase) mutáns, csak nagy késéssel mutat gyöngre gravitropikus választ mind

gyökérben, mind hajtásban (Morita, 2010; Hashiguchi és mtsai., 2013; Baldwin és mtsai., 2013). Ennek az az oka, hogy a keményítővel teli amiloplasztisz gyorsabban változtatja a helyzetét, mint az üres, de helyileg ott van az üres is szemben az endodermisz mutánsokkal, ahol egyáltalán nincs amiloplasztisz tartalmú sejtréteg. Így az utóbbi esetben habár késve, de érzékelik a gravitációs jelet. A keményítőlebontásban hiányos *sex1* (starch excess) mutáns viszont gyorsabb gravitropikus választ ad szárban és gyökérben is (Vitha és mtsai., 2007). Az endoplazmatikus retikulumra egyenletes terhelés esik a gyökér függőleges növekedése esetében. A gravitációs vektor irányának megváltozásakor, az elmozduló sztatolitok révén ez az egyenletes nyomás megváltozik, a sejt is deformálódik, ami aktiválja a mechanoszenzitív (nyomásra érzékeny) ioncsatornákat, megváltoztatva a lokális  $\text{Ca}^{2+}$  ion koncentrációt a sejten belül (Baldwin és mtsai., 2013; Toyota és Gilroy, 2013; Kurusu és mtsai., 2013). A teljes mechanizmus azonban még nem felderített. Gombák esetében hasonló rendszert találtak, csak ott olajtartalmú liposzómák töltik be a keményítőtartalmú sztatolitok funkcióját (Grolig és mtsai., 2006).

A  $\text{Ca}^{2+}$  ionkoncentráció megemelkedésével párhuzamosan, a sztatolit tartalmú sejtek (sztatociták) pH értéke pár percen belül megemelkedik kb. 0.5 értékkel, amit pH érzékeny festékekkel mutattak ki (Fasano és mtsai., 2001). Az apoplasztikus (sejtek közötti) tér pH-ja pedig csökken kb 1.0 egységgel. Ennek következtében, a kalcium/kalmodulin és az inozitol-foszfát jelátviteli út elemei aktiválódnak, mely révén a gravitáció fizikai jele kémia jellé alakul át, ami elindítja a gyökérgörbülési folyamatot. A görbülés egy aszimmetrikus növekedési forma, melyhez auxin grádiensnek kell kialakulnia. Az előzőekben tárgyalt PIN efflux fehérjéknek ebben van meghatározó szerepük.

A gravistimulált gyökér sztatocitáiban (kolumella sejteiben) elhelyezkedő PIN3 auxin efflux transzportfehérje lokalizációja átmenetileg megváltozik, a gravitációs vektor irányába újrapozícionált sejtek gravistimulus felé néző alsó membránjaiban halmozódik fel (Kleine-Vehn és mtsai., 2010). Együttműködve a szintén ebben a régióban elhelyezkedő PIN4 ill. PIN7 transzportfehérjékkel, a PIN3-nak igen fontos szerepe van a sztatociták mozgása által indukált gravitációs jelérzékeléshez kapcsolt auxin áramlás irányának megváltoztatásában (Friml és mtsai., 2002; Baldwin és mtsai., 2013). Ezt nevezzük a gravitációs és auxin jelek konvergenciájának.

### 1.11. PIN2 szerepe a poláris aszimmetrikus auxin exportban

Amint ezt a 4. Ábra is mutatja, a különböző auxin transzportfehérjék speciális, poláros elhelyezkedést mutatnak a sejtmembránban. Az endoplazmatikus retikulumban szintetizálódó fehérjék a Golgi membránrendszeren keresztül, speciális poszt-transzlációs módosításokat követően jutnak el a plazmamembránhoz. Egy dinamikus szállítórendszer, az endocitózison alapuló körforgás révén az auxin transzporterek kezdeti apoláris/egyenteles membránlokalizációja aszimmetrikussá válik a sejtekben (Dhonukshe és mtsai., 2008), amely feltétele a poláris auxin transzportnak. Mivel ez a folyamat dinamikus, ezért többféle hatás közrejátsszik a megfelelő poláris PIN mintázat kialakulásban. A folyamat részleteibe a PIN1 és PIN2 fehérjék részletes tanulmányozása adott betekintést.

A PIN fehérjek endoszómából a plazmamembránba történő transzportjának szabályozásában a Rab5-GTPáz ARA7 (RabF2b) és VPS9A (Vacuolar protein Sorting) faktorok együttműködnek a Brefeldin-A (BFA) érzékeny GNOM ADP-riboszilációs GDP/GTP-exchange faktorról. Amíg a PIN gyökércsúcsához közelebbi alsó membránbeli lokalizációját a GNOM szabályozza, a Rab5-GTPázok mind az alsó, mind a hajtás felé néző felső poláris PIN prezentációban szerepet játszanak (Dhonukshe és mtsai., 2008). A gyökérben, a VPS9A Rab5-GTPáz aktivátor szükséges a PIN2 fehérje poláris elhelyezkedéséhez és a vakuólumokba történő szállításhoz is (Inoue és mtsai., 2013). Mivel a Brefeldin-A (BFA) blokkolja a PIN proteinek transzportját az endoszómákból a plazmamembránba, és ez által fokozza a visszafelé irányuló transzportot, BFA kezelt sejtekben a PIN fehérjék úgynevezett BFA testekben halmozódnak fel (Geldner és mtsai., 2001). Az endocitózis folyamata az FM4-64 speciális membránfesték internalizációját detektálva nyomon követhető a PIN fehérjék transzportfolyamataiban bekövetkező változásokkal párhuzamosan (Ganguly és mtsai., 2012).

A PIN auxin export hordozó citoplazmatikus hidrofíl hurok doménjének szekvenciáit számos protein kináz és foszfatáz ill. ubiquitinációért felelős enzim képes felismerni. A visszafordítható foszforiláció meghatározó szerepet tölt be a PIN fehérjék aktivitásában, poláris lokalizációjának és stabilitásának szabályozásában. A szerin/treonin kinázcsaládba tartozó *Arabidopsis* AGC3 kinázok családjába tartozó PINOID (PID), WAG1 és WAG2 kinázok foszforilálják a PIN1 fehérje hidrofíl hurok doménjét, valószínűleg a három hasonló TPRxS(S/N) motívumon, amelyekben az xS a foszforilált szerin aminosavnak felel meg

(Michniewicz és mtsai., 2007; Huang és mtsai., 2010). A foszforilált PIN-ek internalizálódása a csúcsi/felső sejtmembránból klatrin-függő endocitózis révén történik. Ezt a folyamatot az ARA7 és BFA érzéketlen GNOM szerű GNL1 GTPázok szabályozzák (Löfke és mtsai., 2013). A PIN2 endocitózisa a felső membránból BFA-val gátolható a *gnl1* mutánsban, ezért feltételezhetjük, hogy az apikális PIN endocitózis út vagy függ, vagy együtt regulálódik a BFA-érzékeny GNOM-függő bazális/alsó membránból történő endocitotikus reciklizálásával (Teh és Moore, 2007).

A PIN1 fehérje hidrofil hurok régiójában nemrég két nem PINOID kináz-függő foszforilációs helyet is azonosítottak (Zhang és mtsai. 2010), amely azt jelzi, hogy az eddig ismert AGC kinázokon kívül más protein kinázok is szerepet játszhatnak a PIN1 auxin efflux hordozó poláris lokalizációjában (Ganguly és mtsai., 2012). Az AGC1 családba tartozó négy D6 és D6-szerű kináz szintén foszforilálja a PIN1 és PIN2 fehérjéket, azonban nem befolyásolják ezek poláris membránlokalizációját, de módosítják az auxin export aktivitásukat (Zourelidou és mtsai., 2009; Dhonukshe és mtsai., 2010). Az AGC1 és AGC3 kinázok által foszforilált PIN fehérjék szerin és treonin csoportjairól PP2A típusú foszfatázok távolítják el a foszfát csoportot, ami fokozza a PIN fehérjék GNOM-függő bazális lokalizációját az alsó (gyökércsúcs felé néző) sejtmembránban (Kleine-Vehn és mtsai., 2011). Mivel mind a foszforiláció, mind a foszfát csoport eltávolítása befolyásolja a PIN fehérjék lokalizációját, a *pid* (*pinoid*) kináz ill. *pp2A* foszfatáz mutáns növények csökkent gravitropikus választ mutatnak. A PIN1 és PIN2 auxin export fehérjék a *pid* kináz mutánsban fokozott bazális, míg a *pp2a* foszfatáz mutánsban fokozott apikális membránlokalizációt mutatnak (Michniewicz és mtsai., 2007). A PIN fehérjék gyors membránreciklizálása és transzcitózisa (a felső membránból való internalizáció következtében megemelkedett reprezentációja az alsó membránban) lehetővé teszi az auxináramlás irányának és mennyiségének gyors megváltoztatását, ami fontos az adaptív növekedési válaszok végrehajtásához.

A vízszintesen elhelyezett *Arabidopsis* gyökér gravitációs vektor irányába történő görbülésének folyamata ma már mechanisztikusan leírható molekuláris szinten. A megváltozott gravitációs stimulus következtében a PIN3 auxin export fehérjét tartalmazó kolumella sejtek gravitációs vektor felé mutató membránjaiba vándorol (melyek a gyökér elforgatás előtt, a kolumella sejtek oldalsó ún. laterális sejtmembránszekcióknak felelnek meg) (Kleine-Vehn és mtsai., 2010). Ezáltal a gyökér két oldala közötti az eddigi egyenletes auxin eloszlás megszűnik, a gyökér új alsó felének irányába tolódik el. A gyökér felső bőrszöveti sejtsorában a PIN2 csúcsi/apikális lokalizációja csökken, amíg a PIN2 szint a

gyökércsúcs felé néző alsó membránban növekszik (lásd: transzcitózis) (Abas és mtsai., 2006). A gyökér alsó szekciója felé irányuló auxin transzport következtében, az itt elhelyezkedő bórszövetben és kortexben a PIN2 mennyisége megnő. Az auxin felhalmozódása az elforgatott gyökér alsó szekciójában az auxin-indukálható DR5-GFP riportergén segítségével elegánsan követhető (Ottenshläger és mtsai., 2003). Amíg a lecsökkent auxinszint a gyökér felső szekciójának bórszöveti és kortex sejtjeiben stimulálja a sejtmeinyúlást, addig a megemelkedett auxin koncentráció az alsó szekcióban a megnyúlását gátolja, és ezért a gravitációs vektor irányába fordul el a gyökér. E folyamat során az alsó gyökérszekció epidermális sejtjeinek felső (hajtásfelé néző) membránjaiban az ABP1 receptor a megemelkedett auxinszint következtében gátolja a PIN2 fehérje klatrin-függő endocitózist és ubiquitinációtól függő lebontását (Robert és mtsai., 2010). Ezzel szemben, a gyökér felső szekciójában a csökkenő auxinszint miatt a PIN2 endocitózisa fokozódik megemelve a PIN2 ubiquitinációját és degradációját, ami a felső gyökérszekcióból az alsóba irányuló auxin transzportot fokozatosan csökkenti. Ezért, egy idő után az auxinszint az alsó szekcióban is csökkenni kezd, ami ott is indukálja a PIN2 internalizációját, és ezzel a PIN2 (és azzal arányos auxin) mennyiségi különbsége a gyökér két oldala között kiegyenlítődik és megáll a gyökér további görbülése (Abas és mtsai., 2006; Leitner és mtsai., 2012).

## 1.12. A hajtás gravitropizmusa

A csíranövények hipokotiljában, a későbbi szárban, és *Arabidopsis* esetén a virágzati tengelyben, a gravitropikus jelérzékelés helye a keményítő tartalmú endodermisz réteg. Amint említettük, két negatív szár gravitropizmus mutánsról, nevezetesen az *sgr1* ill. *sgr7* *Arabidopsis* vonalakról kiderült, hogy az endodermisz hiányos *scarecrow* (*scr*) és *shortroot* (*shr*) mutánsokkal allélikusak. Ez bizonyította, hogy az amiloplasztisz tartalmú endodermisz réteg jelenléte elengedhetetlen a szár gravitropos és fototropikus válaszaihoz. (Friml és mtsai., 2002; Morita., 2010; Hashiguchi és mtsai., 2013; Baldwin és mtsai., 2013). A szárban az apikális merisztémában szintetizálódó auxin a gyökér felé vándorol, mely folyamatban a PIN1 mellett szerepet játszik a PIN3 auxin efflux fehérje is. Az endodermisz sejtjeinek gyökér felé néző alsó membránjaiban lokalizált PIN3 fehérje, a gravitációs stimulust követően megváltoztatja pozícióját és átvándorol a szár elforgatásának megfelelő új bazális (gravitáció irányába néző) sejtmembránokba. Ezáltal az auxin áramlás iránya megváltozik. Azonban, a

gyökérrel ellentétben, a szár alsó szekciójában a megnövekedett auxinszint nem gátolja sejtmelegnyúlást, hanem fokozza azt. Ennek következtében a vízszintesen újrapozicionált szár alsó fele, ahol auxin többlet alakul ki, melegnyúlik, míg a felső fele nem. Ezért a szár a gravitációs vektorral ellenkező irányban nyúlik, meg és fölfelé hajlik (Friml és mtsai., 2002; Petrásék és mtsai., 2006; Rakusová és mtsai. 2011). A *pin3* mutáns növényeknek, szemben a *pin4* illetve *pin7* mutánsokkal, valamint azok *pin4/pin7* dupla mutáns kombinációjával összehasonlítva, a *pin3* mutánsban a hipokotil gravitropikus válasza sérült. A fehérjék bioszintézisét gátló cikloheximid kezeléssel kimutatták, hogy nem szükséges újabb *de novo* fehérjeszintézis a PIN3 fehérje poláris membrán relokalizációjához. A gyökérrel ellentétben, a fehérjelebontás gátlása az MG132 proteaszóma inhibitorral sem befolyásolta a hipokotil gravitropikus válaszát. PIN fehérjék folyamatos membrán reciklizálás eredményeként nyerik el bazális (a gravitáció irányába néző) poláris membránlokalizációjukat, amelyet a BFA érzékeny ARF-GEF/GNOM protein szabályoz. A hipokotil gravitropikus válasza gátlódik BFA jelenlétében. Ezzel szemben, BFA érzéketlen mutáns GNOM fehérjét tartalmazó vonalakban BFA jelenlétében is bekövetkezik a szár gravitropikus felhajlása, a PIN3 poláros relokalizációjával együtt. A PINOID kináz túltermelése és az ennek következtében feltehetően megemelkedő PIN3 foszforiláció gátolja a PIN3 poláris relokalizációját és ezzel a szár gravitropikus válaszát. Ugyanakkor, a *pid/wag1/wag2* hármas PIN-kináz mutáns háttérben a PIN3 membrán relokalizációja, ill. a szár gravitropikus válasza gyorsabb, vad típusú kontroll növényekhez hasonlítva (Rakusová és mtsai., 2011; Ding., 2011). Azaz, hasonlóan a gyökér PIN1 és PIN2 fehérjeihez, az AGC3 kináz foszforiláció gátolja a PIN3 fehérje endocitózisát és reciklizálását (transzcitózist) új membrán doménekbe.

A PIN3 a szár fototropikus válaszában is központi szerepet játszik az aszimmetrikus auxin eloszlást stimuláló funkciójának köszönhetően. Azonban, szemben a gravitropos válasszal, mind az AGC3 PID kináz túltermelése, ill. hiánya a *pid/wag1/wag2* hármas mutánsban gátolja a fototropikus választ (Ding és mtsai., 2011). Az utóbbi különbség figyelembe vételével ezért megállapítható, hogy a szárban is hasonló folyamatok együttműködésének hatására alakul ki az auxin efflux fehérjék polarizált elhelyezkedése, a gyökérhez hasonlóan, amely révén kialakuló auxin grádiens egyenlőtlen növekedést, melegnyúlást és ez által görbülést hoz létre. Szemben a gyökérben, a szár alsó szekciójában melegnövekvő auxin szint sejtmelegnyúlást indukál, és az által a hajtás a gravitációval ellentétes irányban növekedik.

### 1. 13. Kalcium szignálátvitel szerepe a gravitropikus válaszok szabályozásában

Szemben a PIN fehérjék poláris membránlokalizációjával és az ez által kialakuló aszimmetrikus auxin export szabályozásával, jelenleg a korai jelátviteli folyamatok szereplői kevésbé ismertek, a gravitációs stimulusokra adott növényi válaszokban. A gravitációs jelérzékelés korai fázisában a mechanoszenzitív ioncsatornák által megemelkedett kalciumszintet a kalcium/kalmodulin és inozitol-foszfát jelátviteli utak aktiválása követi, és ez kapcsolódik a poláris PIN és ABCB/PGP lokalizáció indukciójához (Baldwin és mtsai., 2013; Blancaflor és mtsai., 2013; Kurusu és mtsai., 2013). Újabb adatok alátámasztják, hogy a plazmamembrán alatt található aktin filamentumok (kortikális aktin filamentumok) befolyással vannak a PIN fehérjék klatrin függő endocitózisára (Lin és mtsai., 2012; Nagawa és mtsai., 2012). A megemelkedett inozitol trifoszfát és  $\text{Ca}^{2+}$ -ion szint lecsökkenti a PIN1 és PIN2 fehérjék exocitózisát, hasonlóan az inozitol polifoszfát-1-foszfataz, és foszfatidilinozitol-monofoszfát-5-kináz génekben bekövetkező mutációk hatásaihoz (Zhang és mtsai., 2011; Mei és mtsai., 2012). A jelátvitelben feltehetően szerepet játszik a 3-foszfoinozitid-függő kináz 1 (PDK1) és ennek kölcsönhatása a kalciumkötő és kalmodulinszerű proteinekkel, ami úgy tűnik, hogy hatással van az AGC kinázok működésére, melyek foszforilálják a PIN fehérjék hidrofíl hurkának speciális motívumait, valamint az ABCB/PGP auxin transzport fehérjéket, befolyásolva ezzel azok működését (Benjamins és mtsai., 2003; Zegzouti és mtsai., 2006; Henrichs és mtsai., 2012). A jelenleg ismert adatok alapján így valószínű, hogy az állati rendszerekben jól tanulmányozott másodlagos hírvivők, mint az inozitol és kalcium, a növények esetében is fontos szerepet játszanak az auxinfüggő gravitropikus jelátviteli rendszerben. Az alábbiakban tárgyalt kísérleti eredmények alapot szolgáltatnak az utóbbi konklúzióhoz azzal, hogy először azonosítanak egy olyan kalmodulin-függő protein kinázt, amelynek mutációja kompromittálja a gravitropikus válaszok szabályozását *Arabidopsis*-ban. A dolgozatban tanulmányozott CRK5 protein kináz az AGC3 kináz család tagjaihoz hasonlóan képes a PIN2 fehérje funkcióját és poláris membránlokalizációját szabályozó citoplazmás hidrofíl hurok foszforilációjára, és így direkt kapcsolatot teremt a  $\text{Ca}^{2+}$ /kalmodulin függő korai szignálátviteli folyamatok és a PIN-függő aszimmetrikus auxin eloszlás által irányított gravitropikus sejtmegegyülési és növekedési válaszok között. Mivel a CRK5 egy eddig kevésbé ismert kisebb protein kináz család első tagja, bevezetésünk végén e protein kináz családról eddig ismert jellemzőit foglaljuk össze.

### 1.14. A CRK protein család jellemzői

A jelen munkában tanulmányozott CRK5 kináz, az *Arabidopsis* CDPK típusú kináz családjába tartozik. Nevüket a Calcium Dependent Protein Kinase vagy a Calmodulin-like Domén Protein Kinase szavakból képzett rövidítés alapján kapták. A CDPK szupercsalád a szerin/treonin típusú protein kinázokat foglalja magában, a CDPKs (Calcium Dependent Protein Kinases), CRKs (CDPK-related Kinases), CCaMKs (Calcium and Calmodulin Dependent Protein Kinases), és CaMKs (Calmodulin Dependent Protein Kinases) alcsaládokban (Harmon és mtsai., 2000). *Arabidopsis*-ban 34 CDPK kinázt azonosítottak. A CDPK-ra jellemző, hogy a szerin/treonin kináz katalitikus doménjüket egy variábilis N-terminális előzi meg. Az autoinhibíciós domént követően található a kalcium kötésért felelős, kalmodulinhoz nagy hasonlóságot mutató szekvenciamotívum. Ezt a helix-loop-hélix struktúrát szokták EF-kéz szerkezetként is jelölni, ami 4  $\text{Ca}^{2+}$  iont tud kötni (Liese és Romeis., 2013). A CDPK-at csak növényekben és protozoákban mutatták ki, amíg az élesztőben és a fonálféreg *Ceanorabditis elegans*-ban nem fordulnak elő. A CDPK-k funkcióját tekintve főképp a gyors biotikus/abiotikus stressz és immunválaszokban, valamint hosszú távú stressz adaptációban játszott szerepüket vizsgálták (Schulz és mtsai., 2013).

Szemben a CDPK család többi tagjával, a CRK kinázcsaládra jellemző, hogy a C-terminális kalciumkötő domén módosult, és alacsonyabb (kb. 22%) homológiát mutat kalmodulinhoz. Az *Arabidopsis* CRK család nyolc tagból áll (CRK1-8). Más növényfajból leírt CRK kinázok nagyfokú szekvencia homológiát mutatnak a család *Arabidopsis*-ban azonosított tagjaival (Harper és mtsai., 2004). Az eddig ismert növényi CRK kinázok szekvenciáinak és funkcionális doménjeinek összehasonlítását a Függelék 1. Ábrája mutatja, melyen a pontos szerkezeti doménegységeket kiemeléssel jelöltük. A CRK család tagjainak sematikus struktúráját az 5. Ábra illusztrálja.





**5. Ábra. A CRK kinázok sematikus szerkezete.** A feketével jelölt N-terminális variábilis régiót követi a világoskék jelölésű kináz katalitikus domén, majd a feltételezett kalmodulin kötéseért felelős kapcsoló, ill. autóinhibíciós motívumok narancssárgával kiemelve. A fehérjemodell végén négy módosult  $\text{Ca}^{2+}$ -t nem kötő EF kéz motívum található, sötétékével kiemelve.

Az N-terminális variábilis régióban van egy konzervált motívum, mely az összes CRK-ban előfordul. Ez a fehérjék N-terminális végén található kezdő metionin (M) aminosavat követő MGxC mirisztilációs és/vagy palmitoilációs motívum. Ennek a fehérjemotívumnak a membránlokalizációban van szerepe. Ha az MGxC szekvencia motívumban módosítjuk a Gly-2 illetve Cys-4 aminosavakat alaninra, akkor nem membránkötött, hanem egy kevert citoplazmikus sejtmagi lokalizációt kapunk (Leclercq és mtsai., 2005). Ennek megfelelően egy sejtmagi lokalizációs szignál is található a CRK fehérjék N-terminális részén. A szerin/treonin kináz domén, mely tartalmazza az ATP-kötő, aktív hely, illetve aktivációs T-hurok szekvenciákat, a CRK kinázok között nagyfokú, több mint 80%-os szekvencia homológiát mutat. Az *Arabidopsis* CRK3 és CRK6 kináz autofoszforylálódik a T-hurok szerin-310 és szerin-311 aminosavain, mely a kinázok aktivitását befolyásolhatja (Hegeman és mtsai., 2006). A CRK kinázok C-terminális régiói egy konzervált kalmodulin-kötő domént hordoznak, amelyek átfednek az autoinhibíciós régióval (Zhang és mtsai., 2002).

Korábbi különböző  $\text{Ca}^{2+}$  agonistákat és antagonistákat felhasználó növényélettani tanulmányok megállapították, hogy a  $\text{Ca}^{2+}$ /kalmodulin jelátvitel kémiai manipulálása befolyásolja a gravitropikus válaszok sebességét és létrejöttét (Sinclair és Trewavas, 1997). Például, a KN-93 nevű vegyület, ami az állati kalmodulin aktiválta II-es típusú kinázt gátolja, kukorica csíranövényekben megszüntette a gravitropikus választ, valószínűleg a CRK-típusú MCK1 kináz gátlásának köszönhetően (Lu és mtsai., 1996). Azonban feltehető, hogy a KN-93 inhibitor nem csak a CRK család tagjaira specifikus, ezért az említett eredmények alapján nem lehetett egyértelműen eldönteni, hogy a nagy CDPK család melyik alcsaládja vesz részt a gravitropikus válaszok szabályozásában (Zhang és Lu, 2003). Állatokban, a KN-93 vegyület a CCaMK (Calcium and Calmodulin Dependent Protein Kinases) kinázok specifikus

inhibitora, azonban az *Arabidopsis* genom nem kódol tipikus CCaMK kinázokat (Hrabak és mtsai., 2003; Harper és mtsai., 2004). Ezzel szemben valószínű, hogy a CRK kinázok egy olyan alcsaládot képviselnek *Arabidopsis*-ban, melyek aktivitását kalmodulin befolyásolja. A CRK1 ill. a CRK3 kinázról kimutatták, hogy képesek kalmodulint kötni kalcium-ion jelenlétében, ami bár tízszeresére emeli az aktivációs T-hurok autofoszforilációját, csak megközelítően kétszer jobban stimulálja a szubsztrát foszforiláció hatékonyságát (Wang és mtsai., 2004; Du és mtsai., 2005; Jeong és mtsai., 2007). A CRK kinázok ugyanakkor kalmodulin ill. kalcium hiányában is aktívak (Lindzen és mtsai., 1995; Furumoto és mtsai., 1996; Lu és mtsai., 1996; Wang és mtsai., 2001; Wang és mtsai., 2004; Leclercq és mtsai., 2005). Ezen eredmények alapján elképzelhető, hogy a CRK család tagjai képesek kalmodulint kötni, és ők képviselik az eddig hiányzó kalmodulin aktiválta kinázokat *Arabidopsis*-ban. Az is lehetséges azonban, hogy a kalmodulin kölcsönhatás szükséges a CRK kinázok más fehérjékkel, vagy aktiváló faktorokkal való kapcsolódásához (Harmon, 2003). Mivel a mirisztillációs hely módosítása után a CRK1 a sejtmagban is megjelenik (Leclercq és mtsai., 2005; amiben szerepe lehet a CRK fehérjék N-terminális régiójában található sejtmagi lokalizációs szignálnak is) elképzelhető, hogy a CRK kinázoknak bizonyos speciális helyzetekben szerepük lehet a sejtmagi folyamatok szabályozásában is. A CRK kinázok lehetséges plazmamembránbeli és sejtmagi funkcióinak vizsgálata érdekes jövőbeli perspektívákat rejt magában. Továbbá, a CRK5 vizsgálatával kapott alábbi eredmények alapján felmerül a kérdés CRK család további tagjainak gravitropikus szignálátvitelben játszott szerepéről, szubsztrátjaikról és sejtspecifikus szabályozásukról, ami az itt megkezdett munka fontos távlati perspektíváit illusztrálja.

## II. CÉLKITŰZÉSEK

Munkám célja az *Arabidopsis thaliana* CRK (CDPK Related Kinases) kináz családba tartozó CRK5 kináz regulátor funkcióinak felderítése volt. A CRK5 kinázteredetileg a sejtmagi splicing mechanizmust aktiváló NTC (nineteen complex) komplex PRL1 alegységével kölcsönható faktoraként izolálták élesztő kéthibrid fehérjekölcsönhatási tesztekben. A CRK5 gén funkcióinak jellemzéséhez a következő célokat tűztem ki:

1. Előállítani, ill. azonosítani olyan *Arabidopsis* mutánsokat, ahol a CRK5 gén funkciója hiányzik (null mutáns), és a *crk5* mutáció által indukált fejlődési rendellenességek vizsgálata.
2. A vizsgált *crk5-1* T-DNS inszerciós mutáció a gyökérnövekedés gátlása és az oldalgyökér differenciálódás stimulációja mellett jelentősen késleltette a gyökér és a hajtás gravitropikus válaszait, ezért további célunk volt annak felderítése, hogy a CRK5 kináz inaktiválása változtatja-e meg az auxin hormon által szabályozott gravitropikus növekedési válaszokat.
3. A *CRK5* gén szabályozásának jellemzése, ill. a CRK5 kináz fehérje szubcelluláris lokalizációjának vizsgálatára célunk volt olyan génkonstrukciók elkészítése, amelyek pontosan megtartják a *CRK5* gén természetes regulációs jellemzőit amellet, hogy lehetőséget biztosítanak a kináz géntermék *in vivo* detektálására GFP (zöld fluoreszcens fehérje) és  $\beta$ -glükuronidáz reporter fehérjékkel fuzionálva. Ezeknek a konstrukciónak a felhasználásával egyben lehetőségünk volt a *crk5* null mutáns genetikai komplementációjára és annak igazolása, hogy az észlelt gravitropikus defektet valóban a *CRK5* gén inaktiválása okozta.
4. A gyökér auxinfüggő gravitropikus válaszában az AUX1 auxin influx ill. PIN (főleg PIN3 és PIN2) efflux hordozók döntő szerepet játszanak, célunk volt annak felderítése, hogy a CRK5 kináz hiánya hogyan befolyásolja az AUX1 és PIN fehérjék funkcióit, membránlokalizációját, stabilitását és az általuk szabályozott aszimmetrikus auxin eloszlás létrejöttét, amelyet egy auxin-indukált DR5-GFP riporter segítségével terveztünk követni a gravitropikus válasz alatt.
5. Végül a CRK5 protein kináz tisztítását és biokémia jellemzését követően terveztük annak vizsgálatát, hogy a gravitropikus válaszokat szabályozó PIN auxin efflux hordozók aktivitását modulálja-e a CRK5 kináz e fehérjék, mint közvetlen szubsztrátok foszforilációja által.

## III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### 3.1 Növényekkel végzett kísérletek

#### 3.1.1 Növények nevelése

A munkánk során az *Arabidopsis thaliana* Columbia (Col-0) ökotípusát használtuk fel, mint vad típusú vonal és ebben a háttérben izoláltuk a vizsgált mutációkat, ill. fejeztettük ki a felhasznált módosított géneket. A növényeket a kísérlet jellegétől függően, különböző körülmények között neveltük. *In vitro* steril körülmények: 8 óra megvilágítás 16 óra sötét, vagy folyamatos fény, sötét szakasz nélkül 22°C állandó hőmérséklet mellett. A táptalaj mindkét esetben ½ MSAR volt 0,8% agar és 0,5% cukortartalommal (Koncz és mtsai., 1994). A magvakat 5% Domestosban történő felületi sterilizálást követően egy éjszakán át 4°C-on steril vízben hideg kezeltük, mielőtt a steril táptalajra szélesztettük volna.

A növényeket üvegházban rövidnappalos körülmények között neveltük 8 óra megvilágítás 16 óra sötét periódus mellett, a nem kívánt korai virágzás elkerülése végett föld:vermiculit 10:1 arányú keverékében, hetente tápoldattal (Volldünger Linz 1-3%) öntözve. A megfelelő méret elérése után, hosszúnappalos körülményeket alkalmazva 16 óra megvilágítás és 8 óra sötét mellett, az *Arabidopsis* virágzatot majd termést hozott.

#### 3.1.2. *Arabidopsis* sejtkultúra fenntartása

*Arabidopsis* Columbia ökotípusú sejtszuszpenziót 3% szacharózt, 0,24 mg/l 2,4D, 0,014 mg/l kinetin tartalmú MS tápoldatban tartottuk fenn, 8 óra megvilágítás mellett 22°C hőmérsékleten állandó 125 fordulat/perc sebességű vízszintes rázógépen. Hetente cseréltük a szuszpenziókon a táptalajt, 5:45 arányban hígítva az 1 hetes sejteket friss médiummal (Fülöp és mtsai., 2005).

#### 3.1.3. *Arabidopsis* gyökérkultúra

5-10 darab, 7-10 napos *Arabidopsis* növényt 50 ml folyékony ½ MSAR tartalmazó 250 ml-es Erlenmeyer lombika helyezettük, majd 3-4 héten keresztül, a megfelelő gyökérmennyiség

eléréséig vízszintes rázógépen állandó 125 fordulat/perc sebesség mellett 22°C-on, rövidnappalos körülményen növesztetünk. (Mathur és Koncz, 1998).

#### **3.1.4. *Arabidopsis Agrobaktérium* közvetítette genetikai transzformációja**

A bináris vektorok T-DNS-ébe épített különböző génkonstrukciókat *Agrobaktérium* közvetítette genetikai transzformációval juttattuk be a megfelelő vad, ill. mutáns *Arabidopsis* vonalakba. A 4-6 hetes virágzó *Arabidopsis* növényeket 5% cukor, 0.01% Silwet L77 tartalmú *Agrobaktérium* oldatba merítettük, majd egy éjszakán át lefedve tároltuk (Clough és mtsai., 1998). Ezt a lépést 7-10 nap múlva újra megismételtük a közben megjelenő új virágokkal, a transzformáció hatékonyságának növelése céljából. Ezt követően hagytuk a növényeket elvirágozni, majd az érett magokat begyűjtöttük a transzformánsok további szelekciója céljából.

#### **3.1.5. Transzformált növények antibiotikum szelekciója**

Kísérleteink során, a felületi csíramentesített magokat ½ MSAR 0.8% agar tartalmú médiumon az alábbi antibiotikumok egyikét, vagy ezek megfelelő kombinációjának jelenlétében csíráztattuk: Kanamicin: 30 mg/l, Hygromicin 15-20 mg/l, Sulfadiazin: 15.75 mg/l, Claforan-Karbenicillin 200-200 mg/l. Az antibiotikum rezisztens növényegyedek megjelenéséig 22°C-on 8 óra megvilágításra helyeztük növénynevelő helységbe a Petri csészéket, majd az üvegházba való kiültetést követően, az érett magokat papírzacskóban fogtuk fel.

#### **3.1.6. *Arabidopsis* vonalak keresztezése:**

A keresztezés klasszikus módszerét használtuk abban az esetben, ha nem volt mód a kívánt genetikai tulajdonság bejuttatására a növénybe *Agrobaktérium* transzformáció segítségével. Az anyai alanynak a bimbó állapotban lévő virágjáról csipesszel eltávolítjuk a csésze és szíromleveleket, majd a porzókat is. A megmaradt csupasz bibére ráporzunk a másik egyed pollenjével. Sikeres keresztezés esetén a bibe pár napon belül megnyúlik, és további fejlődésnek indul. Az érett magokat óvatosan Eppendorf csőbe gyűjtöttük és levegőn szárítottuk 1-2 hétig a további genetikai vizsgálatok előtt.

### 3.1.7. GUS riporter aktivitás követése hisztokémiai festéssel

A  $\beta$ -glücuronidáz (GUS) riporter enzimaktivitás hisztokémiai kimutatása során a növényi mintákat 0.2-0.5 ml X-Gluc (1 mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glükuronsav, 50 mM NaHPO<sub>4</sub> (pH 7.0), 10 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, 10 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 0.1% Triton X-100) oldatba vittük és 5 percig vákuumban tartottuk. A vákuumkezelés után a mintákat 6-8 órán át 37°C-ra helyeztük, majd a reakcióelegyet 70%-os alkohol és 87% glicerin 1:1 arányú keverékére cseréltük a klorofill eltávolítása és a minták tartósítása céljából (Gallagher, 1992).

### 3.1.8. Keményítő Lugol festése

Lugol festéssel a keményítőszemcséket lehet kimutatni a növények sejtjein belül. A gyökereket Lugol (Fluka) oldatba helyeztük 10 percre, majd steril desztillált vízzel a fölösleges festéket kimostuk. A keményítőszemcsék sötét-kékes elszíneződést mutatnak.

### 3.1.9. Gravitropikus növekedési tesztek

A magokat a fent említett módon sterilizáltuk, táptalajra szélesztettük, majd növénynevelő kamrában folyamatos fényen, vagy teljes sötétben a Petri csészéket függőlegesen orientálva neveltük. A növények 5 napos korában a Petri csészéket 90 vagy 135°-al elforgattuk, a kísérlet jellegétől függően. A kísérlet kezdete után 12 órával a növények gyökerének, ill. szárának helyzetét digitális képalkotó eszközzel rögzítettük további számítógépes kiértékelés céljából és ezt 12 óra múlva újra megismételtük. Több biológiai ismétlést is végrehajtottunk, a kísérlet jellegétől függő számú növényekkel és ismétléssel.

Az *Arabidopsis* virágzati tengelyének gravitropikus válaszának tesztelése esetén, 4-5 hetes, hosszúnappalon nevelt üvegházi növényeket használtunk, melyeknek 8-12 cm-es virágzati tengelyük volt. A cserepeket oldalukra fektettük így a virágzati tengely 90°-al fordult el. A kísérletet sötétben hajtottuk végre, kizárva a fototropizmus okozta virágzati tengely elhajlást, majd 3 óra elteltével lefényképeztük a növényeket a további kiértékelés céljából.

### 3.1.10. Protoplaszt transzformáció

Protoplaszt izoláláshoz, 4-5 napos *Arabidopsis* sejtsuszpenziós kultúrát használtunk (Mathur és Koncz, 1995). A sejtekről alacsony sebességű ülepítés után leöntöttük a tápfolyadékot. A sejteket 20 ml steril, 30.5 g/l glükózt és 30.5 g/l mannitolt tartalmazó, 0.34M GM oldatban (Gamborg B5 powder, Duchefa G0210, (pH 5.5 KOH-al) szuszpendáltuk fel, ami 1% cellulase R10 (Serva), 0.2% macerozyme (Yakult) és 0.2% driselase (Sigma) sejtfalemészítő enzimkeveréket tartalmazott, majd a Petri csészébe átvitt sejtsuszpenziót vízszintes rázón 3-5 órán keresztül alacsony fordulatszámon sötét körülmények között inkubáltuk. Óránkénti mintavétellel mikroszkóp alatt ellenőriztük a protoplasztálási folyamatot. A protoplasztokat centrifugálással gyűjtöttük össze: 10-10 ml 0.28M SZB5 (Gamborg B5 powder (Duchefa G0210), 96 g/l szacharóz; pH 5.5 KOH-al) oldatot adtunk hozzá, majd 15 ml-es falcon csőbe pipettáztuk óvatosan a sejteket. Alacsony sebességű centrifugálást követően a jó minőségű protoplasztok egy gyűrűt formáltak az oldat tetején. Ezt vágott végű 5 ml-es pipettával óvatosan összegyűjtöttük egy steril 2 ml-es Eppendorf csőbe. 50szeres hígítás készítése után a protoplasztok mennyiségét egy térfogategységben Bürker kamrás számolással határoztuk meg, majd transzformációnként legalább  $5 \times 10^5$  sejtet, ill. 5  $\mu$ g nagy tisztaságú plazmid DNS-t használtunk. 50  $\mu$ l protoplaszthoz 15  $\mu$ l plazmidot adtunk, majd azonnal 150  $\mu$ l PEG (25% PEG6000, 0.45 M mannitol, 0.1 M  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ; pH 9.0 KOH-val) oldattal kevertük össze óvatosan. A transzformált sejteket 15-30 percen keresztül sötétben tartottuk szobahőmérsékleten. Ezt követően két lépésben 500  $\mu$ l 0.275 M  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  oldatot adtunk a transzformált protoplasztokhoz. Gyengéd összerázás után, alacsony centrifugálással (1,500xg) különítettük el a PEG-es oldatot a sejtektől. A felső PEG-es oldat fázis eltávolítása után, 0.5 ml 0.34 M GM oldatban vettük vissza a sejteket, majd növénynevelő kamrában és sötétben tartottuk 22°C állandó hőmérséklet mellett felhasználásig (12-24 óra) (Rigó és mtsai., 2008).

### 3.1.11. A CRK5 mutánsok azonosítása

A *crk5-1* (MPIZ38225) és a *crk5-2* (SALK\_003774) T-DNS inszerciós mutánsokat használtuk fel kísérletes munkáinkhoz. A *crk5-1* mutánst a kölni Max Planck Növénynevelési Kutatóintézet (Max-Planck Institut für Züchtungsforschung), Koncz Csaba által vezetett kutatócsoportjában izoláltuk (Ríos és mtsai., 2002). A *crk5-2* mutánst a SALK T-DNS inszerciós mutáns kollekcióban azonosítottuk (Alonso és mtsai., 2003). A T2

nemzedék vizsgálata során T-DNS helyzetének pontos meghatározásához, a homozigóta és heterozigóta vonalak kiszűréséhez T-DNS és génspecifikus primereket használtunk az irodalmi hivatkozásoknak megfelelő elrendezésben, az ott ajánlott reakciókörülményeket figyelembe véve (Ríos és mtsai., 2002). A polimeráz láncreakció során a *crk5-1* mutáns esetében a *crk5-1* F és *crk5-1* R gén specifikus, ill. Fish1 és Fish2 T-DNS specifikus, a *crk5-2* mutáns esetében a *crk5-2* F és *crk5-2* R gén specifikus, ill. LBa1 és Fish2 T-DNS specifikus primereket használtunk. A reakció során kapott DNS fragmentek nukleinsav sorrendjét DNS szekvenálással határoztuk meg. A felhasznált primerek listáját a Függelék 1. Táblázata tartalmazza. A T2 utódok T-DNS kódolta antibiotikum rezisztencia markereinek Mendeli szegregációja alapján tudtunk következtetni az egymástól függetlenül szegregáló T-DNS inszerciók számára.

## 3.2. Molekuláris biológiai módszerek

### 3.2.1. *Escherichia coli* hősokk transzformációja

Munkánk során az *Escherichia coli* DH5  $\alpha$  F<sup>-</sup> [*fhuA2*  $\Delta$ (*argF-lacZ*)*U169 phoA glnV44*  $\Phi$ 80  $\Delta$ (*lacZ*)*M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*] törzsét használtuk a plazmid manipulációs lépések során. A bakteriális fehérje tisztítás céljából, a biokémiai munkák során a BL21DE3Rosetta F<sup>-</sup> [*ompT hsdS<sub>B</sub>*(r<sub>B</sub><sup>-</sup>, m<sub>B</sub><sup>-</sup>) *gal dcm* (DE3) *pRARE* (*argU, argW, ileX, glyT, leuW, proL*) (CamR) típusú sejteket alkalmaztunk. Mindkét esetben Inoue és munkatársai által leírt módszert alkalmaztunk (Inoue és mtsai., 1990) kompetens sejtek készítésére és transzformációjára hősokk felhasználásával.

### 3.2.2. Baktérium sejtek antibiotikum szelekciója

*E. coli* sejtek növesztése LB táptalajon történt Sambrook és mtsai, 1989 útmutatásai alapján 37°C-on. A kísérletenként változó szelekcióhoz használt antibiotikumok koncentrációja a következő volt: Karbenicillin 100 mg/l, Kanamicin 25 mg/l, Klóramfenikol 34 mg/l, Spektinomycin 50 mg/l.

*Agrobaktérium* sejtek esetében YEB (Koncz és mtsai., 1994) táptalajt használtunk 28°C-on az alábbi antibiotikumokkal amennyiben az szükséges volt: Gentamicin 25 mg/l,



Spectinomycin 100 mg/l és Rifampicin 100 mg/l. Szilárd táptalajok esetében 15 g/l agart használtunk.

### 3.2.3. Molekuláris biológiai alapszerek

*Sambrook és mtsai, 1989* útmutatásait követtük a plazmid DNS-t izolálás és a DNS minták agaróz gél elektroforézissel történő méret szerinti elválasztása során 1kb-os GeneRuler DNS molekulalétrát (Fermentas, SM0311) alkalmazva DNS referencia markerként. A kísérletek során a plazmid DNSek manipulálását, restrikciós endonukleáz emésztését, a DNS fragmentumok ligálását minden esetben a gyártó által ajánlott körülmények között hajtottuk végre. DNS minták agaróz gélből történő izolálására a Fermentas cég GeneJET™ (K0691) gélextrakciós rendszerét használtuk a gyártó előírásai szerint.

### 3.2.4. Plazmid konstrukciók létrehozása

Munkánk során kétféle típusú konstrukció előállítására volt szükség. A CRK5 fehérje lokalizációjához növényi szinten, a *CRK5* gén saját promóterét és eredeti exon-intron szerkezetét tartalmazó konstrukciót állítottunk elő. A CRK5 fehérje kináz *in vitro* jellemzéséhez, His<sub>6</sub>-CRK5 fúziós fehérjét expresszáló plazmid előállítása volt a cél.

A *CRK5* genomikus konstrukció előállítása az alábbi lépések szerint történt. Az Arabidopsis Resource Center-től ([www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)) megrendeltük a T20E23 jelű BAC klónt. Ezt a plazmidot BpmI-BstXI restrikciós enzimeket használva megemésztettük, majd izoláltunk egy 7809 bp DNS szakaszt, amely tartalmazta a *CRK5* gént, 4414 bp méretű promóter régióját is. A szabad DNS végeket DNS polimeráz Klenow fragment kezeléssel kitöltöttük és az így módosított DNS fragmentet a pBluescript vektor SmaI helyére klónoztuk, miután a vektor ApaI helyét eltávolítottuk egy hasonló végkitöltést és ligálást követően (Székely és mtsai., 2008). Az így előállított pBSKΔApaIgCRK5 plazmidban a *CRK5* gén Stop kodonját egy kétlépéses PCR reakció segítségével módosítottuk egy ApaI felismerő helyre, amelyhez nagy másolási hűségű Pfu (Fermentas EP0501) polimeráz enzimet használtunk a pBSKΔApaIgCRK5 DNS templát és T3, CRK5 SauI és CRK5 Stop to ApaI primerek jelenlétében. A polimeráz láncreakcióval kapott módosított DNS fragmentet SauI-SacII hasítás után a pBSKΔApaIgCRK5 SauI-SacII fragmentjének helyére beépítettük, így előállítva a pBSKΔApaIgCRK5ApaI plazmidot. Az eGFP (Clontech) és az *uid*a/GUS

gének kódoló régióját Pfu (Fermentas) polimeráz enzimet és eGFP ApaI 5'- eGFP ApaI 3' ill. GUS ApaI 5'-GUS ApaI 3' primer kombinációkat használva úgy módosítottuk, hogy a pBSKΔApaIgCRK5ApaI konstrukció ApaI helyére klónozva 3' végi transzlációs fúziós fehérjét tudjunk előállítani a CRK5 kódoló régiójával. Az így elkészített *gCRK5:GFP* és *gCRK5:GUS* génkazettákat, PstI-NotI(Klenow kezelt tompa vég) fragmentekként gélből izoláltuk, és a pK7FWG2 bináris növényi transzformációs bináris vektor (Karimi és mtsai., 2002) PstI-Ecl132II(tompa vég) hasító helyeire beépítettük. A kész bináris vektor konstrukciókat *Agrobaktérium*-ba jutattuk triparentális (háromszülős) konjugációval, majd növényi transzformációt hajtottunk végre a fent leírt módon.

A His<sub>6</sub>-CRK5 fúziós konstrukció előállításához, a CRK5 cDNS-t, Pfu (Fermentas) polimeráz enzim, ill. a CRK5BamHI-F és CRK5XhoI-R primerkombináció segítségével úgy módosítottuk, hogy a pET28c (Novagen) vektorba klónozva, egy N-terminális His<sub>6</sub>-CRK5 fúziós fehérje konstrukciót kapjuk. A kész konstrukciót, a BL21(DE3) Rosetta (Novagen) sejtbe juttattuk. Az fent leírt konstrukciók helyességet DNS szekvenálattal ellenőriztük az SZBK-ban működő DNS Szekvenáló Laboratórium segítségével. A leírt vektor konstukciók sematikus térkéit a Függelék 2. és 3. Ábrái mutatják.

### 3.2.5. Háromszülős plazmidkonjugáció *Agrobaktérium*ba

A bináris növényi transzformációs vektrokat egy háromszülős konjugációs módszert (Koncz és mtsai., 1994) felhasználva juttattuk át *E. coli* sejtekből *Agrobaktérium*-ba. Ehhez egy HB101 (pRK2013/Km<sup>r</sup>) (Ditta és mtsai., 1980) segítő (helper) törzsre is szükség volt mely a pRK2013-as plazmidot tartalmazta. Kísérleteink során az *Agrobaktérium* GV31001 (pMP90) törzset (Koncz és Schell, 1986) használtuk. Mindhárom törzset (adó, segítő, fogadó) a nekik megfelelő antibiotikumon és hőmérsékleten neveltük szilárd táptalajon. *E.coli* esetében 37°C *Agrobaktérium* esetében 28°C-on. A felnőtt törzsekből hasonló (OD<sub>600</sub>: 0.8; 1ml) mennyiséget összekevertünk, majd 50μl keveréket tartalmazó cseppeket szilárd LB táptalajra szárítottunk és inkubáltunk 28°C-on egy éjszakán át. Másnap a bináris vektornak megfelelő antibiotikumot tartalmazó szelektív YEB táptalajra szélesztettünk a pöttyökben fölnőtt baktérium keveréket és az *Agrobaktérium* telepek megjelenéséig 28°C-on inkubáltuk. Ezt a lépést még egyszer megismételtük. A telepek kolónia PCR-al történő ellenőrzése után rövidtávon 4°C-on, hosszabb távon -80°C-on 30% glicerinben tároltuk a törzseket.

### 3.2.6. A His<sub>6</sub>-CRK5 és a His<sub>6</sub>-PIN2loop fehérjék tisztítása E. coliból

Mindkét konstrukció pET28 vektor alapú volt, ezért hasonlóan jártunk el az indukció és az affinitástisztítás tekintetében. A pET28a-PIN2loop konstrukciót Xugang Li készítette Klaus Palme csoport tagjaként (Institute of Biology II/Botany, Centre of Biological Systems Analysis; Freiburg Institute of Advanced Sciences (FRIAS), D-79104 Freiburg, Germany) (Müller és mtsai.,1998). A konstrukciókat BL21DE3Rosetta sejtbe transzformáltuk és 25 mg/l kanamicin, 34 mg/l klóramfenicol, 0.4% glükóz tartalmú LB táptalajra kentük ki, majd egy éjszakán át 37°C-on növesztettük. A telepeket 50 ml folyékony LB médiumba oltottuk le, kiegészítve a fenti antibiotikumokkal és glükózzal, majd 37°C-on 16 órán keresztül 250 fordulat/perc sebességű síkrázón neveltük. Ezt a kultúrát tízszeresére hígítottuk a korábban említett antibiotikum tartalmú LB oldattal. A sejteket tartalmazó Erlenmeyer lombikokat szobahőmérsékleten 250 fordulat/perc sebességű síkrázón a kultúra OD<sub>600</sub>= 0.7-0.9 értékéig növesztettük. 1mM IPTG (Duchefa I1401)-vel bekapcsoltuk a His<sub>6</sub>-CRK5, és His<sub>6</sub>-PIN2loop fúziós fehérjéknek a termelését, folyamatos rázás mellett tartva kultúrát további 4-5 órán keresztül. A baktériumsejteket centrifugálással (szobahőmérsékleten 2500xg 20 perc) gyűjtöttük össze. A felülúszó eltávolítása után a leülepített baktérium pasztát -20°C-on tároltuk felhasználásig. Az indukált sejtmennyiség minden 50 ml-ére, előzőleg jégen lehűtött 5 ml 1 mg/ml lizozimet tartalmazó lízis puffert (50 mM NaP (pH 8.0), 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol-HCl (pH 8.00), 10% Glicerol, 2 mM β-merkaptoetanol) alkalmaztunk. Ebben a sejteket maradéktalanul homogenizáltuk és tíz percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. 0.5%-nyi Triton X-100 hozzáadása után a minta viszkozitása megnőtt, ami a megfelelő lízisre utalt. Ezt 1 mM MgSO<sub>4</sub> valamint kis mennyiségű DNase (Fermentas EN0525) 100μg/ml hozzáadásával le tudtuk csökkenteni. A lizátumot 15000xg 15 percig centrifugáltuk 4°C-on, majd a tiszta felülúszóhoz 200-300 μl ülepedett Ni-NTA Agarózt (Invitrogen R901-15) adtunk. Hidegszobában lassú forgatás mellett 30-40 percig kevertettük, ekkor történt meg a His<sub>6</sub> jelölt fehérjék kikötődése a Ni-NTA agarózhoz. Ezek után a Ni-NTA agarózt alacsony sebességű centrifugálással, vagy hidegszobában ülepitéssel összegyűjtöttük, majd a Ni-NTA agaróz hordozót 1x5 ml 0.5% TritonX-100-et tartalmazó, majd 2 x 5 ml 10 mM imidazolt és 0.5% Triton X-100-et tartalmazó, és végül 2 x 5 ml 10 mM imidazol+0.1% TritonX-100-et tartalmazó lízis pufferrel mostuk. Minden egyes mosási lépés között az Ni-NTA agarózt centrifugálással ülepitettük. A specifikusan kötődött fehérjéket 3 x 300 μl elúciós pufferrel (lízis puffer+70 mM imidazol, 0.1% Triton X-100) oldottuk le a Ni-NTA agaróz hordozóról.

Az összegyűjtött mintákat *Sambrook és mtsai, 1989* útmutatásait követve egy éjszakán át dializáltuk az alábbi oldat 2 literében: 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10% Glicerol 5 mM  $\beta$ -mercaptoetanol hidegszobában. A mintákat -80°C-on tároltam felhasználásig. A minták fehérjetartalmát Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad) segítségével határoztuk meg.

A 3.2.10 pontban leírt Western immunoblot technikával, anti-His<sub>6</sub>-Peroxidáz (Roche 11965085001) ellenanyag használatával ellenőriztük a His<sub>6</sub>-CRK5 fehérje helyes méretét.

### **3.2.7. Mielin bázikus fehérje tisztítása**

Mielin bázikus fehérjét sertésagyból Bellini és mtsai. (1986) alapján tisztítottunk az alábbiak szerint 0-4°C-on. Hentestől friss, jégen hűtött sertésagyat szereztünk be. A fehérállományra volt szükségünk ezért a szürkeállományt szikével eltávolítottuk. 3 gramm tisztított fehérállományt 10 térfogat 2-butanolban homogenizáltunk, a szilárd részeket 1200xg 10 perc centrifugálással gyűjtöttük össze, a felső zsírban gazdag részt eldobtuk. Ezt a lépést még kétszer megismételtük. A továbbiakban a pelletet 6 térfogatnyi 50 mM triethanolamin pufferrel (pH 7.5) mostuk a fentebb leírt módon kétszer, majd egyszer 6 térfogatnyi 50 mM trietanolamin pufferrel (pH 8.5). A mielin bázikus fehérjét 3 térfogatnyi 50 mM acetát pufferrel (pH 4.5) vontuk ki. Ezt a lépést még kétszer megismételtük, azzal a különbséggel, hogy 0.5 M NaCl-al egészítettük ki a kivonó puffert. A fehérjetartalmat Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad) reagenssel határoztuk meg. A mintákat ezután *Sambrook és mtsai, 1989* útmutatásait követve egy éjszakán át dializáltuk az alábbi oldat 2 literében: 10 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), hidegszobában. A mintákat -80°C-on tároltuk felhasználásig.

### **3.2.8. In vitro protein kináz aktivitás vizsgálatok**

*In vitro* kináz aktivitás vizsgálathoz 1  $\mu$ g His<sub>6</sub>-CRK5, 2  $\mu$ g His<sub>6</sub>-PIN2loop, vagy 2  $\mu$ g MBP szubsztát fehérjét foszforiláltunk kináz pufferben (20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ditiotritol) 5  $\mu$ Ci( $\gamma$ -<sup>32</sup>P)ATP jelenlétében 30 percig 20°C-on 20  $\mu$ l végtérfogatban. A kináz tesztekhez 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>-ot vagy 1 mM Ca<sup>2+</sup>-kelátképző EGTA-t adtunk, a CRK5 Ca<sup>2+</sup>-függő aktivitásának tesztelése során. A foszforilált szubsztát ill. kináz fehérjéket 12%-os denaturáló SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel választottuk el, majd Coomassie festéssel tettük láthatóvá *Sambrook és mtsai, 1989* útmutatásait követve. A géleket szárítás után

ólomkazettába helyeztük kék érzékeny röntgenfilmmel (Kodak) 12, 24 vagy 48 óra időtartamra, majd a filmet előhívtuk és a kapott eredményt digitális képalkotó eszközzel rögzítettük további számítógépes kiértékelés céljából.

### 3.2.9. Foszfopeptid analízis

A 3.2.8 pontban leírtak szerint kináz aktivitás vizsgálatot hajtottunk végre, nem radióaktív ATP jelenlétében (1mM), 1 µg His<sub>6</sub>-CRK5, 2 µg His<sub>6</sub>-PIN2loop fehérjét felhasználva. A kináz reakció fehérjét 12%-os szeparáló SDS-poliaktilamid gélen elválasztottuk, majd Coomassie festést követően a megfestett His<sub>6</sub>-PIN2 fehérjét a gélből kivágtuk, majd gélben való tripszin emésztés után az SZBK tömegspektrometriai csoportjának segítségével felhasználtuk a His<sub>6</sub>-PIN2 *in vitro* foszforilációs helyeinek meghatározására. A triptikus peptidek egy részét TiO<sub>2</sub> mátrixon tisztítottuk, majd a lehetséges foszfopeptidek feldúsulását LC-MS/MS analízissel vizsgáltunk egy Thermo Orbitrap-Elite készülékben Orbitrap MS és HCD MS/MS adatgyűjtést majd lineáris ioncsapdában CID MS/MS adatgyűjtést felhasználva. Az azonosított PIN2 foszfopeptidek listáját az 1. Táblázat mutatja.

### 3.2.10. Mikroszómális és sejtfal frakciók izolálása

A *gCRK5:GFP*-t tartalmazó növényvonalból a fent leírt módon gyökérkultúrát állítottuk elő. 15 gramm összegyűjtött gyökérmintát folyékony nitrogén jelenlétében eldörzsöltünk, majd 2 térfogat pufferben (100 mM Tris-HCl [pH 7.5], 300 mM szacharóz, 10 mM EDTA, 2 mM EGTA, és 0.1% Proteáz Inhibitor Koktél (Sigma P9599) felfuszpendáltuk (Dammann és mtsai. 2003). Alapos keverést követően, Miracloth (Calbiochem 475855-1R) filteren átszűrtük, eltávolítva ezzel, és az ezt követő 2000xg-s centrifugálással 4°C-on a nem feltárt sejteket. Az így kapott teljes növényi kivonatból (T) a mikroszómális membrán frakciót (Mi) 1 órás 100,000xg-n történő centrifugálással gyűjtöttük össze szeparálva a membránmentes citoplazmatikus fehérjefrakciótól (Ci). A sejtfalfrakció (Sf) izolálásakor Feiz és mtsai. (2006) leírását követtük. 15g gyökeret folyékony nitrogénben porrá dörzsöltünk, majd 2 térfogat pufferben (5 mM acetát [pH 4.6] 0.4 M szacharóz, 0.1% proteáz inhibitor koktél (Sigma P9599) homogenizáltuk, majd 1000xg-vel 4°C-on 15 percig centrifugáltuk. Az összegyűjtött sejtfalfrakciót emelkedő 0.4, 0.6 és 1M szacharóz tartalmú fentiekkel megegyező pufferrel

mostuk. Az utolsó mosás szacharózt nem tartalmazó 5 mM acetát pufferrel (pH 4.6) végeztük. A mintákat liofilizáltuk és -20°C-on tárueltuk felhasználásig.

### 3.2.11. Western immunoblott analízis

A növényi kivonatok fehérjetartalmát Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad) reagens segítségével állapítottuk meg. Minden mintából 25µg-nyi fehérjét *Sambrook és mtsai, 1989* szerint méret szerint elválasztottunk 8% SDS-PAGE gélen ismert fehérje molekulalétra mellett (Fermentas SM0661), majd Immobilon-P (Millipore IPVH00010) membránra vittük át elektroblottolással. A membránt 1 órán keresztül 1xTBST telítő oldatban (50mM Tris-HCl pH:8.0, 150mM NaCl, 0.05% Tween-20, 5% sovány tejpor) tartottuk. Ezt követően további két órán keresztül anti-GFP ellenanyagot (Roche 1814460) 1:1000 hígításban tartalmazó telítő oldatban inkubáltuk. A reakció után 3 x 10 percig mostuk 1xTBST oldattal a membránt. Másodlagos ellenanyagként peroxidáz kapcsolt anti-egér ellenanyagot (Pierce-31430) 1:5000 hígításban használtuk telítő oldatban 1,5 órán át. A reakció lejártát követően 3 x 10 percig mostuk 1xTBST oldattal a membránt majd a gyártó útmutatásait követve Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore WBKLS0500)-t reagenst használtunk az ellenanyaggal reagáló CRK5-GFP fúziós fehérje detektálására.

### 3.2.12. RNS tisztítás és Kvantitatív Valós Idejű PCR (qRT-PCR)

RNS izoláláshoz 3 hetes növényekből TRI-reagenst (Sigma T9424) használtunk, követve a gyártó utasításait. A *crk5* allélokot hordozó mutánsokban a *CRK5* génről átíródó mRNS szintjét, valamint a *CRK5* gén szerv- ill. szövet specifikus kifejeződésének a szintjét Kvantitatív Valós Idejű PCR segítségével határoztuk meg, a Függelék 1. Táblázatában szereplő primereket felhasználva. A szükséges cDNS templatok előállításához 1 µg DNáz (Fermentas EN0525) kezelt RNS-t használtunk kiindulásként, amelyet a RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas EP0441) segítségével írtunk át a gyártó ajánlása szerint. Kvantitatív Valós Idejű PCR-hoz a SYBR® Green JumpStart™ Taq ReadyMix™ (Sigma D7440) reakcióelegyet használtunk a gyártó ajánlása szerint. A qRT-PCR méréseket egy ABI PRISM 7700 sequence detection system (Applied Biosystems) készülékben végeztük az alábbi programot használva: denaturáció 95°C 10 perc, 40 ciklus: 95°C 10 másodperc és

60°C 60 másodperc. A kapott adatokat az Applied Biosystems megfelelő szoftverével értékeltük ki.

### **3.3. Mikroszkópos és sejtbiológiai módszerek**

#### **3.3.1. Konfokális lézerpásztázó mikroszkópos vizsgálatok**

A különböző GFP-riporterhez fuzionált fehérjekonstrukciókat expresszáló növényvonalakat a kísérletek céljainak megfelelő körülmények között csíráztattuk ki. A GFP-vel jelölt célfehérjék térbeli és időbeli expressziójának és lokalizációjának vizsgálatához legalább 20 növényt használtunk fel. A kísérletek során Olympus FV1000 lézerpásztázó mikroszkópot használtunk az alábbi konfigurációval: objektív lencsék: UPLSAPO 20x (dry, NA:0.75), UPLFLN 40x (oil, NA:1.3) and UPLSAPO 60x (oil, NA:1.35); mintaszedési sebesség: 4µs/pixel; sorátlagolás 2x; szkennelési mód: egyirányú sorrendben. Gerjesztési hullámhossz 488 nm, lézer áteresztő képesség <10%, fő szelektáló nyalábosztó: DM405/488; köztes szelektáló nyalábosztó: SDM 490. A GFP fluoreszcenciáját 505-530 nm között észleltük.

#### **3.3.2. Endocitózis követése FM4-64 festéssel**

FM4-64 (Invitrogen T3166) sejtmembrán specifikus festéket DMSO-ban oldottuk fel és felhasználásig -20°C-on tároltuk. A csíranövényeket az FM4-64 festék steril vízben frissen készített 5 µM-os oldatába helyeztük 30 percre. Ezt követően konfokális lézerpásztázó mikroszkóppal 543 nm-es gerjesztő fény mellett vizsgáltuk a minták speciális fluoreszcenciáját 560 nm-en. A membrán így piros színben jelölődött.

#### **3.3.3. Exocitózis gátlása BFA segítségével**

A Brefeldin-A (BFA) egy gomba által termelt toxin, mely specifikusan gátolja a fehérjék vezikuláris szállítását a sejten belül. A BFA-t (Sigma B-7651) DMSO-ban oldottuk fel és felhasználásig -20°C-on tároltuk. A csíranövényeket kísérletek során 50 µM koncentrációjú BFA oldattal kezeltük a kísérlet elrendezésétől függően. Amennyiben az szükséges volt, párhuzamosan FM4-64 festést is alkalmaztunk.

### 3.3.4. PIN2-GFP membránlokalizáció hőterképes vizsgálata

A PIN2-GFP fehérje szintjét vad típusú ill. *crk5-1* mutáns gyökerek átmeneti zónáinak sejtjeiben vizsgáltuk. A növényeket sötétben vagy folyamatos fényen neveltük a fent leírt (lásd 3.1.1.; 3.1.9.) körülményeket és táptalajokat alkalmazva. Az 5 napos függőlegesen nevelt növényeket gravistimuláltuk 90°-al elforgatva, majd a növények bőrszöveti sejtsoráról konfokális lézerpásztázó mikroszkóppal felvételeket készítettünk, a 3.3.1. pontban leírtak szerint, detektálva a PIN2-GFP jelet. Kontrollként nem gravistimulált növényeket használtuk, hasonló kezelés mellett. A fluoreszcencia intenzitásvizsgálatot, hőterképes képalkotást Kleine-Vehn és mtsai. (2008b) és Baster és mtsai. (2013) alapján készítettük el. A vezikula transzport inhibitor BFA-t (Sigma-Aldrich B-7651) 50  $\mu$ M-nyi koncentrációban használtuk. A gravitropikus stimulálást követően a PIN2-GFP fehérje lokalizációját 0, 0.5, 1, és 2 órát követően regisztráltuk. Hasonló kontroll kísérleteket végeztünk FM4-64 membránfestést alkalmazva a fent leírt módon. Amikor a BFA kezelést cikloheximid (CHX) fehérje bioszintézis gátlószerezrel együtt történt, akkor Kakar és mtsai. (2013) útmutatásait követtük.

### 3.3.5. PIN3-GFP membránlokalizáció hőterképes vizsgálata

A PIN3-GFP fehérje szintjének nyomon követésére a kolumella sejtekben, a vad típusú, ill. a *crk5-1* mutáns háttérrel használtuk. Egyhetes folyamatos fényen függőlegesen nevelt, (lásd 3.1.1.; 3.1.9. pontban leírtak szerint), ill. különböző ideig 135°-ban elforgatott csíranövényeket használtunk fel. Konfokális lézerpásztázó mikroszkóppal felvételeket készítettünk, a fent leírtak szerint a fluoreszcencia intenzitásvizsgálathoz, majd az ezt követő hőterképes képalkotás során Kleine-Vehn és mtsai. (2010) cikkében leírtak alapján jártunk el.

### 3.3.6. Propídium jodid festés

A propídium jodid festést az AUX1-YFP konstrukciót tartalmazó növényvonalak esetében használtuk a konfokális lézerpásztázó mikroszkópos vizsgálatok előtt a sejt fal festésére. A Propidium Iodide-t (Fluka 81845) steril vízben oldottuk fel és 4°-on tároltuk felhasználásig. A vizsgálni kívánt csíranövényeket 5  $\mu$ g/ml-es propidium-jodid oldattal kezeltük 5-20 percig a mikroszkópos vizsgálatok előtt. A sejt fal piros színben jelölődött.



### 3.3.7. A PIN fehérjék immunolokalizációja

A PIN1 illetve PIN2 fehérjék immunolokalizációját Olaf Tietz (Institute of Biology II/Botany, Centre of Biological Systems Analysis; Freiburg Institute of Advanced Sciences (FRIAS), Germany) készítette Firml és mtsai. (2003a) alapján. A növényeket ½ MS táptalajon neveltük 0.5% cukor jelenlétében 7 napig teljes megvilágítás mellett. Elsődleges ellenanyagok a munkánk során a következők voltak: anti-PIN2 tengerimalacban termeltetve 1:66 hígításban, anti-PM H<sup>+</sup>-ATPáz nyúlban termeltetve (Agisera AS07 260) 1:1000 hígításban alkalmazva. Másodlagos ellenanyagok: ALEXA Fluor 488 kecskében termeltetett tengerimalac ellenanyag (Invitrogen A-11073), illetve ALEXA Fluor 555 kecskében termeltetett nyúl ellenanyag (Invitrogen A-21428). Mindkét ellenanyagot 1:600 hígításban használtuk. A kísérletek során az alábbi mikroszkóp beállításokat használtuk: 510 Confocal Microscope (Zeiss) 20x-, 40x- and 63x-nagyító lencsékkel. 488 nm illetve 561 nm hullámhosszúságú gerjesztő fényt használtunk. A minták fluoreszcenciáját 505-550 nm illetve 575-615 nm hullámhossznál szelektív filterrel fogtuk fel. Az összetett képeket Adobe Photoshop/Adobe Illustrator programokkal dolgoztuk fel.

### 3.4. Bioinformatikai módszerek

Munkánk során az alábbi programokat, internetes portálokat használtuk fel. Az aminosav és nukleotid sorrendet az *Arabidopsis* génekre a TAIR (<http://www.arabidopsis.org/>) adatbázisból nyertük, más szekvenciákhoz az NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) weboldal használatával jutottunk. A fehérjék szerkezetének vizsgálatához, feltételezett lokalizációs jelek feltérképezéséhez, doménszerkezetek azonosításához a TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP>) Myristoylation Predictor (<http://plantsp.genomics.purdue.edu/myrist.html>) és cNLS Mapper (<http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp>) adatbázisokat és programokat használtuk. A fehérjék közötti szekvencia homológiák vizsgálatához az NCBI BLAST szolgáltatását (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) használtuk. Többszörös fehérje szekvencia összehasonlításokat az NCBI COBALT (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pub/agarwala/cobalt>), illetve a ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) programokkal készítettük. Az eredmények statisztikai analíziséhez az SPSS szoftver 14.0 verzióját használtuk. A konfokális pásztázó mikroszkóp által készített képeket a Fluoview szoftver segítségével (<http://www.olympusconfocal.com/>) értékeltük ki. A DNS manipuláláshoz, plazmid

konstrukciók és PCR primerek tervezéséhez, a Lasergene (<http://www.dnastar.com/t-allproducts.aspx>) a VectorNTI (<http://www.lifetechnologies.com>) programcsomagokat, és a Primer3 (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) weboldalt használtuk. Az összetett mikroszkópos képeket Adobe Photoshop és Adobe Illustrator (<http://www.adobe.com>) segítségével hoztuk létre, valamint a Microsoft Office programcsomagot használtuk az dolgozat szerkesztéséhez, adatok-táblázatok kezeléséhez (<http://www.microsoft.com>).

## IV. EREDMÉNYEK

### 4.1. A CRK5 gén és inszerciós mutáns alléljeinek izolálása

A CRK5 fehérjét kódoló cDNS-t élesztő két-hibrid rendszerben azonosították, a szplicing apparátust aktiváló NTC (nineteen complex) PRL1 sejtmagi alegységének kölcsönható partnerei után kutatva (Németh és mtsai., 1998; Koncz 2012). A teljes hosszúságú cDNS-t Klaus Salchert izolálta Koncz Csaba laborjában (Max Planck Intézet Köln), és az NCBI adatbázisba Y09418.1 néven került regisztrálásra (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/Y09418.1>). A kölcsönhatást eddig *in vitro* ill. heterológ rendszerekben sikerül bizonyítani, amíg normális növekedési körülmények között *Arabidopsis*-ban nem volt detektálható. Az *Arabidopsis* genom szekvenálását követően a gén az At3g50530-as nevet kapta (*Arabidopsis* Genome Initiative 2000). Az At3 jelöli, hogy a 3-as kromoszómán helyezkedik el a gén. A gén 11 exonból és 10 intronból épül fel. A CRK5 cDNS kódoló szekvencia hossza 1806 bp, ami egy 601 aminosavból álló fehérjét kódol 67 kDa tömeggel (6. Ábra).

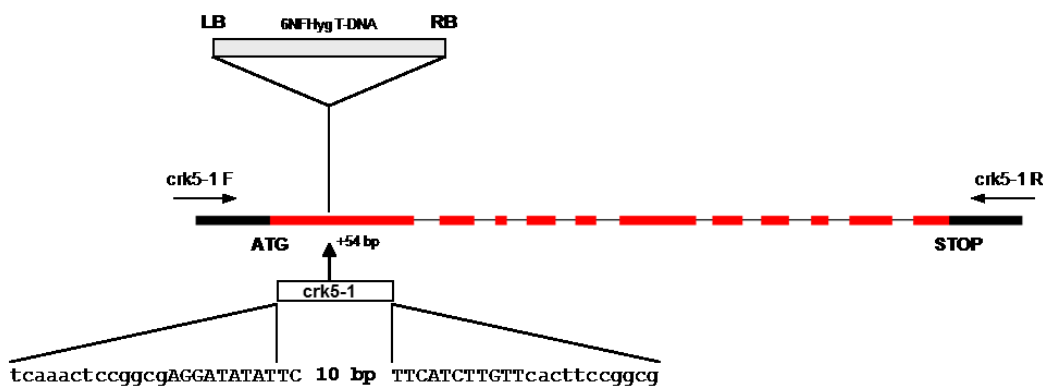
MGLCTSKPNSSNSDQTPARNSPLPASESVKPSSSSSVNGEDQCVTTTNNEGKKSPPFFPFYSPSPAHYFFSKK  
TPARSPATNSTNSTPKRFFFKRPFPPSPAKHIRAVLARRHGSVKPNSSAIPEGSEAEGGGVGLDKSFQFSK  
SFASKYELGDEVGRGHFGYTCAAKFKKGDNGQQVAVKVIPKAKMTTAAIEDVRREVKILRALSGHNNLP  
HFYDAYEDHDNVYIVMELCEGGELLDRIILSRGGKYTEEDAKTVMIQILNVVAFCHLQGVVHRDLKPENFLF  
TSKEDTSQKLAIDFGLSDYVRPDERLNDIVGSAYYVAPEVLHRSYSTEADIWSVGIVYILLCGSRPFWAR  
TESGIFRAVLKADPSFDDPPWPLLSSEARDFVKRLLNKDKPRKRLTAAQALSHPWIKDSNDAKVPMDILVFK  
LMRAYLRSSSLRKAALLRALSKTLTVDEL FYLREQFALLEPSKNGTISLENIKSALMKMATDAMKDSRIPEF  
LGQLSALQYRRMDFEEFCAAALSVHQLEALDRWEQHARCAYELFEKEGNRPIMIDELASELGLGPSVPVHA  
VLHDWLRHTDGKLSFLGFVKLLHGVSSRTIKAH.

**6. Ábra. A CRK5 fehérje aminosav sorrendje.** A főbb szerkezeti egységek kiemeléssel jelölve.

Mirisztilációs hely, sejtmagi lokalizációs jel, szerin/treonin kináz katalitikus alegység, az autóinhibíciós rész a kalmodulinkötő résszel átfedve és módosult EF motívumok,

A CRK5 gén jellemzésére és funkciójának felderítésére többféle megközelítési módszert alkalmaztunk. Ezek közül az egyik lehetőség volt az, hogy a génmutáció hatásainak vizsgálatával próbálunk a gén funkciójáról információt szerezni. Ezért először T-DNS inszerciókat kerestünk több *Arabidopsis* mutánspopuláció vizsgálatával a *CRK5* génben.

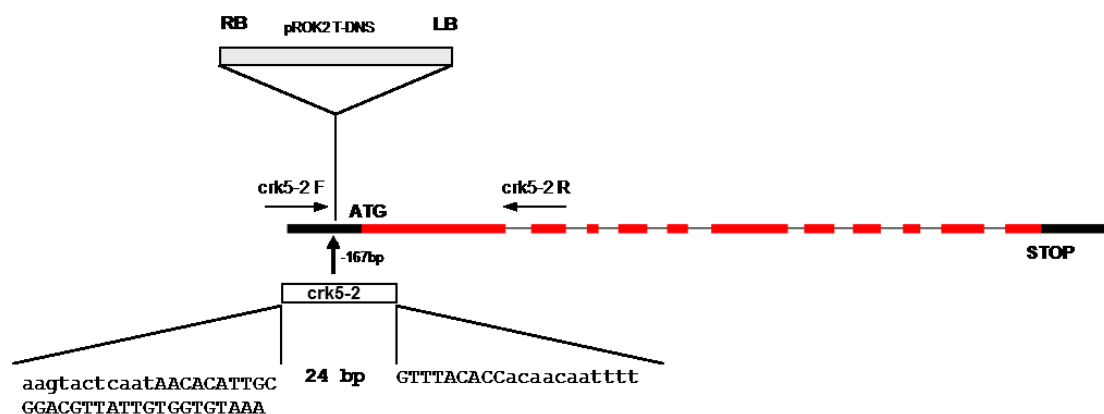
Koncz Csaba laborjában (Max Planck Intézet Köln) izoláltuk Gabino Ríos vezetésével a MPIZ38225-ös számú T-DNS inszerciós mutánst kb. 100,000 vonalat megvizsgálva polimeráz láncreakciót felhasználó tesztekkel (Ríos és mtsai., 2002). A továbbiakban erre a mutánsvonalra a *crk5-1* nevet használjuk. Egy másik, független mutáns allélt (Salk\_00374) a SALK Intézetben elkészített *Arabidopsis* inszerciós mutáns kollekcióban (Alonso és mtsai., 2003) találtunk és a további vizsgálatok során ezt *crk5-2* allélként jelöltük. A következő fázisban T-DNS ill. génspecifikus primerek segítségével betérképeztük a T-DNS inszerciók pontos pozíciót a CRK5 génben, melyet a 7. és 8. ábrák szemléltetnek.



**7. Ábra. T-DNS helyzetének meghatározása a *crk5-1* mutáns allélban a genotipizáláshoz használt génspecifikus primerekkel.** Pirossal az exon, vékony feketével az intron, vastag feketével az 5' illetve 3' nem transzlálódó mRNS szekvenciák jelöltük. Kisbetű: növényi DNS nagybetű: T-DNS-ből származó nukleotidok jelölve.

A *crk5-1* mutáns esetében a T-DNS inszerció az első exonban található, 54 bázispárnyira az ATG start kodontól és orientációját tekintve LB-RB irányultságú (ahol LB és RB: a T-DNS bal és jobboldali határszekvenciái). A T-DNS inszerció 10 bázispárnyi deléciót okozott a beépülés folyamata során. A baloldal (LB) 25bp méretű T-DNS határszekvenciából 21 bázispár megmaradt (a kisbetűs rész: növényi DNS-tcaaactccggcg/AGGATATATTC-LB amit a nagybetűs T-DNS szekvencia követ). A jobboldali (RB) határszekvencia esetén egy megtartott bázispár jelzi az inszerció precíz pozícióját (nagybetűs RB-T/cacttccggcg-növényi DNS). A mutagenézishez használt T-DNS vektor higromicin rezisztencia markergénjére szelektálva csíráztatás után a rezisztens: szenzitív utódok aránya 705:233 volt, ami megfelelt egy egy kópiában jelen lévő T-DNS inszerció várt 3:1 arányú Mendeli szegregációjának.

A *crk5-2* T-DNS inszerciós mutáns vonalat a SALK intézettől rendeltük meg, melynek T-DNS helyzetét a következő ábra szemlélteti:

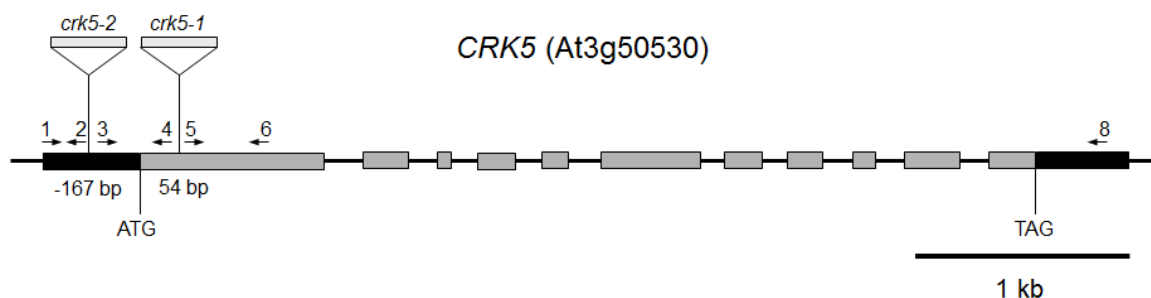


**8. Ábra. A T-DNS inszerció pozíciója a *crk5-2* mutáns allélban.** A genotipizáláshoz használt génspecifikus primereket nyilak jelzik. Pirossal az exon, vékony feketével az intron, vastag feketével az 5' illetve 3' mRNS nem transzlálódó régióit jelöltük. Kisbetű: növényi DNS nagybetű: T-DNS bázisai.

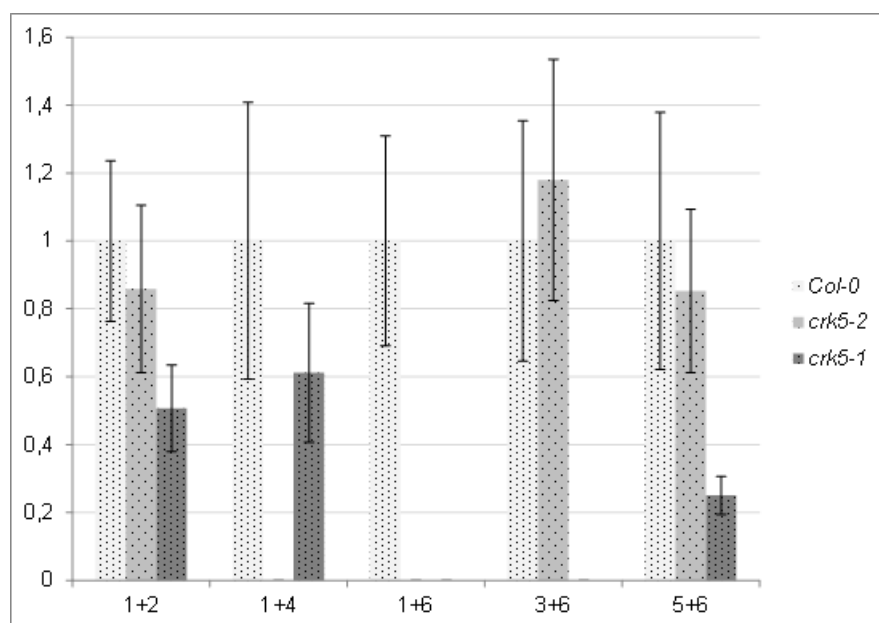
A *crk5-2* (SALK\_003774) T-DNS mutánsban az inszerció a *CRK5* gén ATG start kodonja előtt található, 167 bázispárnyira, a *CRK5* mRNS 5' végétől RB-LB orientációban. A T-DNS beépülése a génbe egy 24 bp célhely deléciót okozott. A jobboldali növényi és T-DNS szekvenciákat összekapcsoló határrégióban (RB) egy 29 bp nagybetűvel jelölt kitöltő DNS szakasz található, amelyet a nemhomológ DNS végeket összekapcsoló DNS javító mechanizmus szintetizált eddig ismeretlen templátról a genomban. A baloldali (LB) határrégióban, a 25bp-nyi T-DNS véget jelölő ismétlődő szekvenciából 9 bp maradt, melyet nagybetűs rész jelöl. A mutagenézishez felhasznált T-DNS vektor, pROK2, kanamicin (ún. neomicin foszfortransferáz, NPTII) génje a mutáns vonal utódaiban lecsendesítődött (a SALK kollekció erre külön fel is hívja a figyelmet ([http://signal.salk.edu/tdna\\_FAQs.html](http://signal.salk.edu/tdna_FAQs.html))), ezért az inszerció szegregációját nem tudtuk az antibiotikum rezisztenciára szelektálva követni. Ezért a *crk5-2* allélt homozigóta formában hordozó M2 vonalakat a gén- és T-DNS specifikus primerek felhasználásával PCR-rel azonosítottuk.

A következő lépésben, a homozigóta *crk5-1* és *crk5-2* mutáns vonalak felhasználásával valós idejű kvantitatív PCR (qRT-PCR) segítségével vizsgáltuk a T-DNS inszerciók által a *CRK5* gén kifejeződésében okozott változásokat. A 9. ábra szemlélteti a

kísérlet során használt primerek helyzetét, amíg azok szekvenciáját a Függelék 1. Táblázata mutatja.



**9. Ábra. A T-DNS inszerciók pozíciói a *crk5-1* és *crk5-2* mutáns allélekban.** A világosszürke kiemelés exont, a vékony fekete vonal intront, amíg a vastag fekete kiemelés az mRNA nem transzlált 5' illetve 3' szekvenciáit jelöli.



**10. Ábra. A CRK5 gén transzkripciójának vizsgálata homozigóta *crk5-1* és *crk5-2* mutánsokban valós idejű kvantitatív PCR-rel.** A felhasznált primerek génbeli helyzetét a 9. Ábra, amíg szekvenciájukat a Függelék 1. Táblázata mutatja. A qRT-PCR mérésekhez három biológiai replikát használtunk, a mért mRNA szinteket a *GAPC2* (At1g13440) mRNA kontrollhoz hasonlítva normalizáltuk. SE, az átlag hibája.

Az 9. és 10. ábrákon látható, hogy a *crk5-1* mutáns esetében a 3+6-os primer elrendezés esetében nem íródik át a teljes hosszúságú CRK5 gén, így teljes hosszúságú funkcionális fehérje sem képződhet. A *crk5-2* mutáns esetében ugyanennek a (3+6)

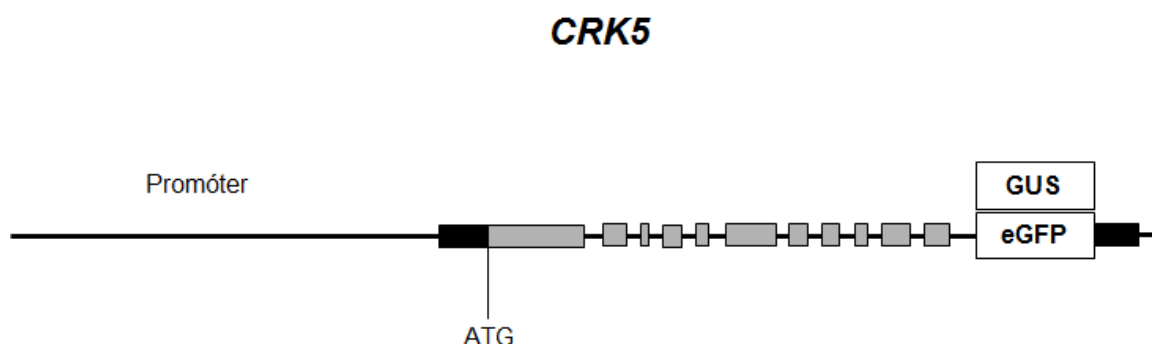
primerpárnak felhasználásával észleltünk transzkriptet, amelynek a mennyisége még valamivel meg is haladta a vad típusú kontrollban mért értéket. Ez azzal magyarázható, hogy a SALK mutáns populáció előállításánál alkalmazott pROK2 plazmid T-DNS-e a baloldali határszekvenciához kapcsolva tartalmaz, egy a növényi szekvenciák felé mutató karfiol mozaik vírus 35S promótert (Alonso és mtsai., 2003). Ezért a *crk5-2* allélban egy olyan génfüzió keletkezett, amelyben a CRK5 gén 5' nem transzlálódó régiójába integrálódott egy erős konstitutív promóter, amely biztosítja a teljes hosszúságú CRK5 gén transzkripcióját (ill. megemelkedett expresszióját). Ezért, a továbbiakban ezzel a mutáns vonallal nem foglalkoztunk.

A *crk5-1* mutáns allél esetében, a T-DNS inszerció előtti átíró régió egy mindössze 18 bp, ami igen rövid fehérjét kódol a CRK5 fehérjéből (aminek prediktált szekvenciája MGLCTSKPNSSNSDQTPA). Az inszerciót követő első ATG (Metionin start kodon) egy szintén rövid, a CRK5 fehérjétől különböző szekvenciát ad (MKAKSLRFSLFIVQVQLTISSPRRLRRDLRRLRLRLRSDSLNGRFLRLRLNISELF). Következésképpen, a *crk5-1* mutánsban nem keletkezik funkcióképes CRK5 fehérje, azaz a *crk5-1* inszerció egy null (knock out) mutációnak felel meg.

#### **4.2. Módosított génkonstrukciók előállítása a CRK5 gén és fehérje időbeli és térbeli expressziójának és lokalizációjának, ill. a *crk5-1* mutáció genetikai komplementációjának céljából**

A *CRK5* gén expressziójának ill. a CRK5 fehérje sejtspecifikus és intracelluláris lokalizációjának vizsgálatára a növényfejlődés különböző fázisaiban és a *crk5-1* mutáns genetikai komplementálása céljából különböző módosított génkonstrukciókat állítottunk elő. A *CRK5* precíz módosítása során egy BAC (Bacterial artificial chromosome/mesterséges bakteriális kromoszóma) klón felhasználásával a gén stop kodonját kicseréltük zöld fluoreszcens fehérjét (GFP, green fluorescent protein) ill.  $\beta$ -glükuronidáz (GUS) riporter enzimeket kódoló DNS szekvenciákkal, a gén természetes szabályozó elemeit tökéletesen megtartva. A 3. kromoszómán lokalizált *CRK5* gént T20E23 BAC klón hordozza, amelyet az ohioi *Arabidopsis* törzsgyűjteményből (ABRC) szereztünk be. A *CRK5* gént tartalmazó sejtmagi DNS (továbbiakban *gCRK5*) teljes hossza 7809 bp, amely magában foglalta a 4414 bp méretű promóter régiót is. A *gCRK5* szekvenciában a stopkodont egy PCR-alapú technikával módosítottuk, és ennek helyére egy *ApaI* restrikciós enzim felismerő helyet

építettünk be. Az UV fény alatt zölden világító GFP ill. az *E. coli*-ból származó  $\beta$ -glükuronidáz (*uidA*/GUS) kódoló régióit a *CRK5* gén leolvasási fázisával megegyezően a stopkodont helyettesítő ApaI helyre építettük a gCRK5:GFP ill. gCRK5:GUS konstrukciókban. Így mindkét esetben 3' végi transzlációs génfüziót állítottunk elő, amelyek végein az új stopkodonokat a beépített riporter génszekvenciák szolgáltatták. A 11. Ábra mutatja az így nyert konstrukciók sematikus szerkezetét.



**11. Ábra. A gCRK5:GFP ill. a gCRK5:GUS génfüziók szerkezetének sematikus ábrázolása.** A *CRK5* gén exonjait szürke, 5' és 3' nem transzlálódó szabályozó szekvenciáit fekete négyzetek, ill. az ezeket elválasztó intronokat fekete vonalak jelölik

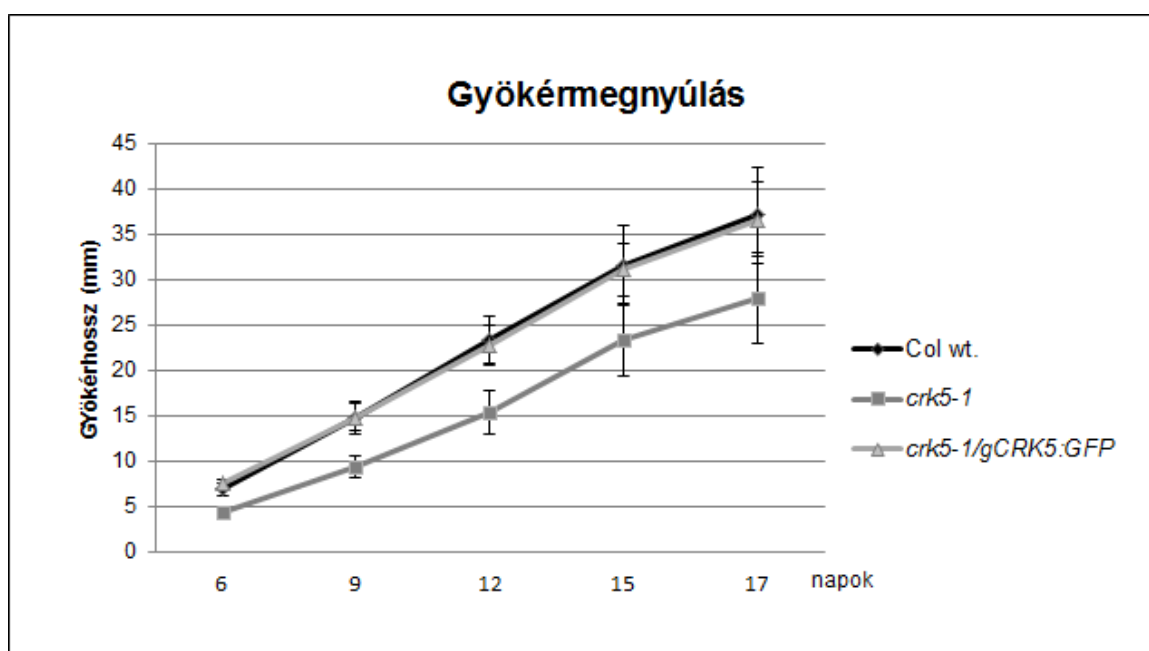
A következő lépésben mindkét génkonstrukció helyességét DNS szekvenálással ellenőriztük, majd a génkonstrukciókat növényi génátviteli, ún. bináris vektorokba klónoztuk és *Agrobaktérium* közvetítette transzformáció segítségével *crk5-1* mutáns, ill. vad típusú növények kromoszómáiba építettük. A génátviteli vektorok által kódolt növényben expresszálódó antibiotikum rezisztencia gének kifejeződésére szelektálva konstrukciónként több, legalább 20 független vonalat állítottunk elő.

#### 4.3. A *crk5-1* mutáns genetikai komplementációja

A *crk5-1* T-DNS inszerciós mutáns korai jellemzése során azt észleltük, hogy a mutáns a vad típushoz képest  $\frac{1}{2}$  MSAR médiumon és teljes fényen növesztve (lásd 3.1.1.) lassabb gyökérmegnyúlást mutat. Mivel a CRK5 fehérjét eredetileg Németh és mtsai., (1998) a sejtmagi splicing apparátus aktiváló komplex PRL1 alegységének kölcsönható partnereként azonosították, amelynek mutációja a gyökérmegnyúlás drasztikus gátlását okozza, feltehető



volt, hogy a két fehérje egy közös szabályozó folyamatban játszhat szerepet. Annak céljából, hogy genetikailag bizonyítsuk azt, hogy a gyökérmegnyúlási hibáért (rövid gyökér fenotípus) valóban a *crk5-1* mutánsban azonosított egyedi T-DNS inszerció a felelős (és nem egy esetleg ettől független, a T-DNS transzformáció folyamata során létrejött változás, pl. a génhez nem kapcsolt pontmutáció vagy delécio) megvizsgáltuk a gCRK5-GFP génfüziót hordozó *crk5-1* mutáns gyökérfenotípusát. Ezzel egyben genetikai módszerrel teszteltük azt is, hogy a gCRK5-GFP fúziós gén/fehérje képes e tökéletesen helyettesíteni a vadtypusú CRK5 gén/fehérje funkcióját. E kísérlet során (12. Ábra), a vad, *crk5-1* és *crk5-1::gCRK5-GFP* növények csíráztatása a 3.1.1. fejezetben leírtak alapján történt. A gyökérmegnyúlás időbeli sebességének követése céljából a Petri-csészékben csírázó növényeket függőleges helyzetben tartottuk, és a csírázást követő hatodik nap után három naponként megmértük a gyökerek hosszát. Az adatokat Microsoft Excel program segítségével értékeltük, majd ábrázoltuk.



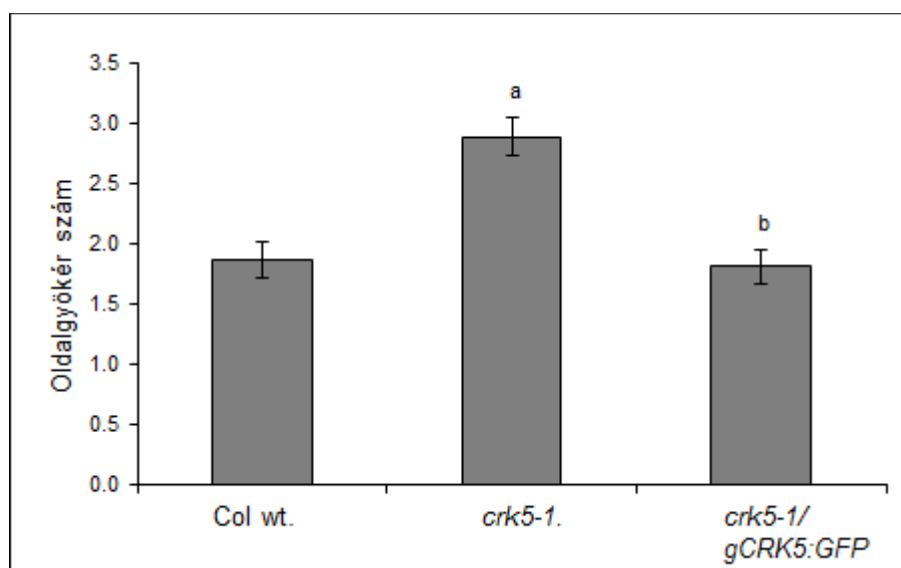
**12. Ábra.** Az elsődleges gyökérmegnyúlás mértéke a vadtypusú (Col wt.), a *crk5-1* mutáns és genetikailag komplementált *crk5-1::gCRK:GFP* vonalakban. A vízszintes tengely az időt (napok), a függőleges a növekedés mértékét, ill. gyökérhosszat (mm) jelöli. SE, az átlag hibája három biológiai ismételtesben ahol legalább 50 gyökér hosszúságát mértük a megadott időpontokban.

Amint az a 12. Ábrán látható, a *crk5-1* mutáns esetében a gyökérmegnyúlás a vadtypushoz képest körülbelül 30% csökkenést mutatott, ugyanakkor a komplementált vonal esetében nem figyelhető meg számottevő különbség. Azaz, ebben a kísérleti rendszerben a

komplementáció sikeresnek bizonyult, a gCRK5:GFP konstrukció kijavította a *crk5-1* mutáns gyökérmegnyúlási defektjét.

#### 4.4. A *crk5-1* mutáció késlelteti a gravitopikus választ gyökérben és hajtásban

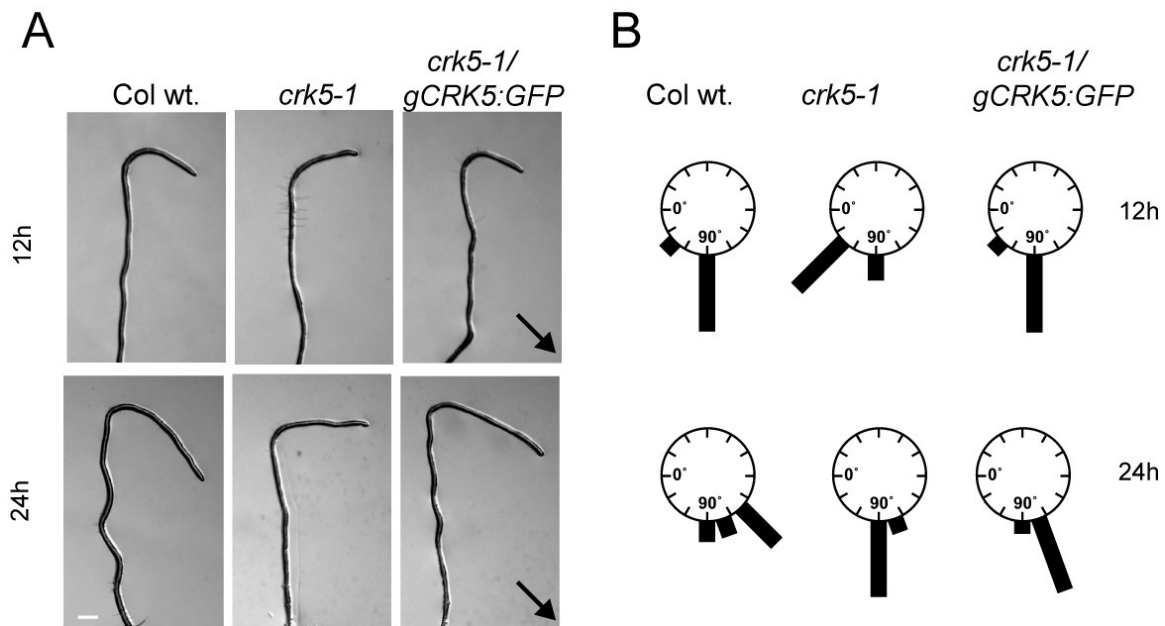
További kísérleteink során megvizsgáltuk a gyökérfejlődés további jellemzőit is. A standard körülmények között nevelt 10 napos, *crk5-1* mutáns a vadtypushoz hasonlítva fokozottabb oldalgyökér képződést mutatott (13. Ábra), 25-30%-al több oldalgyökeret fejlesztett. A genetikailag komplementált *crk5-1::gCRK:GFP* vonal a vadtypushoz hasonló oldalgyökérszámot mutatott, továbbá igazolva a genetikai komplementáció sikerét.



**13. Ábra.** Az oldalgyökérszám összehasonlítása a 10 napos vadtypusú (Col wt.), *crk5-1* mutáns és genetikailag komplementált *crk5-1::gCRK:GFP* vonalakban. SE, az átlag hibája, három biológiai ismétlésben, amelyekben egyenként legalább 50 növény volt megvizsgálva. Az „a”,  $P < 0,005$  szignifikancia szint Col wt.-hoz hasonlítva, amíg a „b”, a  $P < 0,005$  szignifikancia szint *crk5-1*-hez hasonlítva.

A fokozott oldalgyökér képződés és a gyökér megnyúlásának a gátlása azt jelezte, hogy valószínűleg az auxin eloszlás a gyökérben eltolódott a megnyúlási zóna felé (Benkova és mtsai., 2003). Mivel az auxin eloszlás zavara a gyökérben megváltoztathatja a gyökér gravitropikus válaszát, a következő kísérletekben összehasonlító gravitropikus tesztek végeztünk el a vadtypusú, *crk5-1* mutáns és genetikailag komplementált *crk5-1::gCRK:GFP* vonalakkal a 3.1.9. szekcióban leírtak szerint. Folyamatos fényen függőlegesen növesztett

növényeket egyhetes korukban elforgattuk 135°-al, majd különböző időpontokban megmértük a gyökércsúcs elfordulásának szögét.



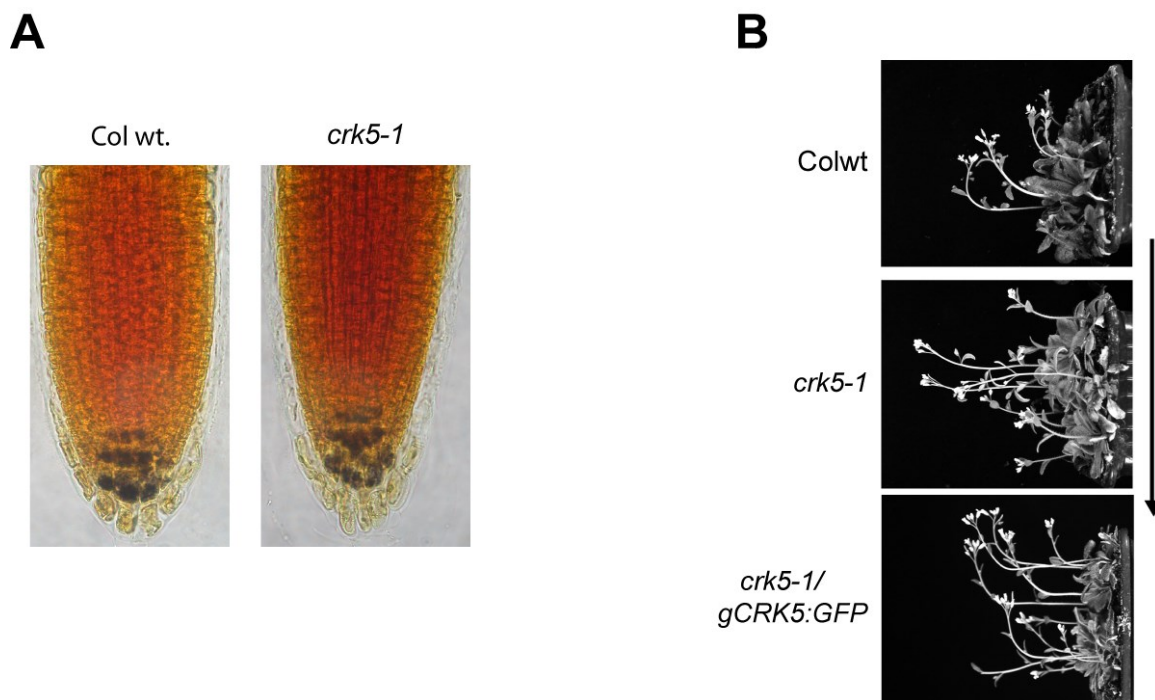
**14. Ábra. Gravitropizmus tesztek vad típusú (Col wt.), *crk5-1* mutáns és genetikailag komplementált *crk5-1::gCRK5:GFP* vonalakkal. A) A gyökércsúcs elfordulása vad típusú, *crk5-1* ill. *crk5-1::gCRK5:GFP* növényekben 12, ill. 24 órával a 135° elforgatással létrehozott gravistimulus után. Méretskála: 500µm. Fekete nyíl jelöli a gravistimuláció megváltozott irányát. B) Az elfordulások mértékének számszerűsített adatai láthatók, a megvizsgált növények száma arányos a fekete oszlopok magasságával. Minden kísérletben legalább 70 egyed lett megvizsgálva, három biológiai replikával.**

A gravitációs jel irányának változására, a növények főgyökerei egy pozitív geotrópos választ adva elfordulnak a megváltozott gravitációs vektor irányába. A 14. Ábra A paneljében látható, hogy mind a vad típus (Col wt.), mind a komplementált (*crk5-1/gCRK5:GFP*) vonal normális gravitropikus válasszal rendelkezik, a gyökércsúcsok már 12 óra elteltével beállnak a gravitáció új irányába, és a gyökércsúcs ennek megfelelő elhajlása 24 óra után közelíti a gravitációs vektor megváltoztatott irányát. A *crk5-1* mutáns gravitropikus válasza feltűnően késik, még 24 órával az új irányú gravistimuláció után sem közelít a vad típusban észlelt értékhez. A 14. ábra B panelje a gravistimulussal indukált gyökérelfordulás szögét mutatja nagyszámú megvizsgált növény esetén. A kördiagram reprezentálja a különböző elfordulási fokokhoz tartozó növények számát két időpontban, a fordulást követő 12. valamint 24. órában. A fekete oszlopok magassága/hossza arányos a növények számával. 12 órával a gravistimulációt követően a vad típusú növények 83%, amíg a *crk5-1* mutáns növények mindössze 28% mutat 90°-os elfordulást. 24 órával a kísérlet kezdete után a vad típusú

növények 55%-a 135°-ban elfordult, míg a *crk5-1* gyökerek csak 90°-os elfordulást mutatnak. Ezek az adatok alátámasztják, hogy a *crk5-1* mutáns gravitropikus válasza késik. A komplementált vonallal hasonló eredményt kaptunk, mint a Col wt. esetében, ezért a genetikai komplementáció ebben az esetben is működik.

A gravitációs jelérzékelés helye az elsődleges gyökérben a kolumella sejtek 3-4 rétegű csoportja, ahol a sejtek keményített tartalmazó amiloplasztiszai a gravitációs vektor megváltozásának hatására elmozdulnak. Ha a keményítőszemcsék hiányoznak, megtörténik ugyan a jelérzékelés, de a kialakuló válasz időben nagyfokú késést mutat. Mivel a *crk5-1* mutáns esetében a gravitropikus válasz késést mutatott, de a mutáns nem volt tökéletesen agravitrop, Lugol festéssel (lásd 3.1.8.) megvizsgáltuk a kolumella sejtek keményítőtartalmát 15A Ábra. A vadtypushoz hasonlítva (15A. Ábra), a gyökér kolumella sejsorában Lugol festéssel kimutatott keményítőtartalom nem mutatott változást a *crk5-1* mutánsban.

A keményítő tartalom hiánya nem csak a gyökér, hanem a szár/virágzati tengely gravitropus válaszára is hatással van. Mind a keményítő hiánya, mind a keményítőtartalmú sejtréteg hiánya gátolja a hajtás negatív gravitropikus válaszát. Annak ellenére, hogy a gyökérvizsgálatok alapján a *crk5-1* mutáció nyilvánvalóan nem okozott hibát a keményítő felhalmozódásban a sztatocitákban, a *crk5-1* mutáns virágzati tengelyének negatív gravitropikus válasza jelentős késést mutatott sötétben. A 15B Ábra mutatja, hogy amíg a vadtypus, ill. genetikailag komplementált mutáns vonal kb. 90°-os fölhajlást mutat, addig a *crk5-1* mutáns esetében ez csak körülbelül 45°. Mivel a hajtás gravitropizmus tesztet fény hiányában végeztük, a *crk5-1* mutánsban észlelt hajtás elhajlási defekt független a szár pozitív fototropizmusának szabályozásától. Ugyanakkor a hajtás gravitropikus tesztje is igazolta, hogy a gCRK5:GFP konstrukció képes a hajtás negatív gravitropikus válaszának hibáját is korrigálni a *crk5-1* mutáns háttérben.

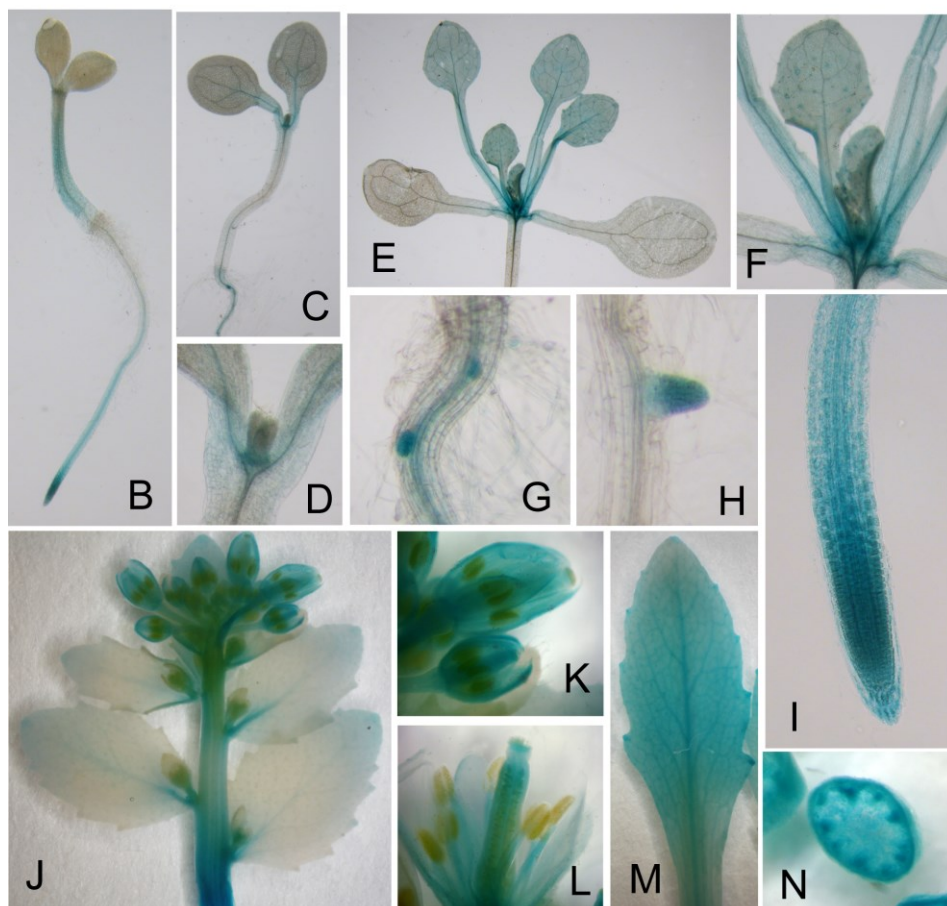
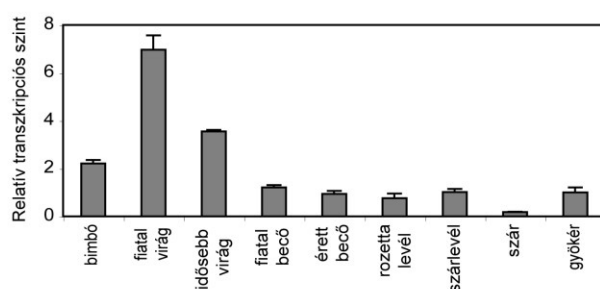


**15. Ábra. Keményítő kimutatása vadtípusú és *crk5-1* gyökerek kolumella sejtjeiben és négyhetes vadtípusú (Col wt.), *crk5-1* mutáns és genetikailag komplementált *crk5-1::gCRK5:GFP* vonalak virágzati tengelyének gravitropus válasza sötétben.** A kékesszürkére festődő sejtek keményítő tartalma hasonló a Col wt és *crk5-1* gyökerekben. Hasonlítva a vadtípusú (Col wt) és *crk5-1::gCRK5:GFP* növényekhez, a *crk5-1* mutáns hajtásának negatív gravitropikus válasza késik. A fekete nyíl a gravitáció irányát jelöli.

#### 4.5. A CRK5 gén és fehérje expressziójának vizsgálata

A *CRK5* gén transzkripciójának jellemzésére a fejlődés során, a növényi szervekben valós idejű kvantitatív PCR-rel (qRT-PCR-rel) meghatároztuk a *CRK5* mRNS szinteket (16A. Ábra). *CRK5* mRNS detektálható volt a legtöbb szervben, a legalacsonyabb szinten a szárban expresszált, amíg legmagasabb mennyiségben a fejlődő virágokban halmozódott fel. A qRT-PCR eredmények ellenőrzésére, hasonló vizsgálatokat végeztünk a gCRK5-GUS konstrukció aktivitásának követésével, amikor is a CRK5 fehérje C-terminális végéhez fuzionált GUS riporter fehérje aktivitását vizualizáltuk hisztokémiai festéssel a növények különböző szerveiben a fejlődés folyamán. A GUS enzim hisztokémia kimutatása során egy kék színű oldhatatlan csapadék keletkezik, ami a növényi pigmentek eltávolítása után mikroszkóp alatt vizsgálható.

A



**16. Ábra. A *CRK5* gén, ill. fehérje szervspecifikus expressziójának vizsgálata. A)** *CRK5* mRNS szintek összehasonlítása a különböző szervekben valós idejű kvantitatív PCR-al. Három biológiai ismételtesben a *CRK5* mRNS szinteket a *GAPC2* (At1g13440) belső standardhoz normalizáltuk. Az oszlopok fölötti deviációk az az átlag hibáját (SE) mutatják. **B-N)** A *CRK5*-GUS fúziós fehérje  $\beta$ -glükuronidáz aktivitásának detektálása hisztokémiai festéssel különböző szervekben.

A *CRK5*-GUS fehérje  $\beta$ -glükuronidáz aktivitása kimutatható volt a fiatal csíranövények hipokotiljában és gyökérében, a gyökércsúcsban a csúcsi merisztémában, ill. 7 napos (16. Ábra, B-D) és 14 napos (16. Ábra, E-F) fényen nőtt növények különböző szerveiben, mint pl. a gyökér bél részében, az oldalgyökerekben (16. Ábra, G-H) és a

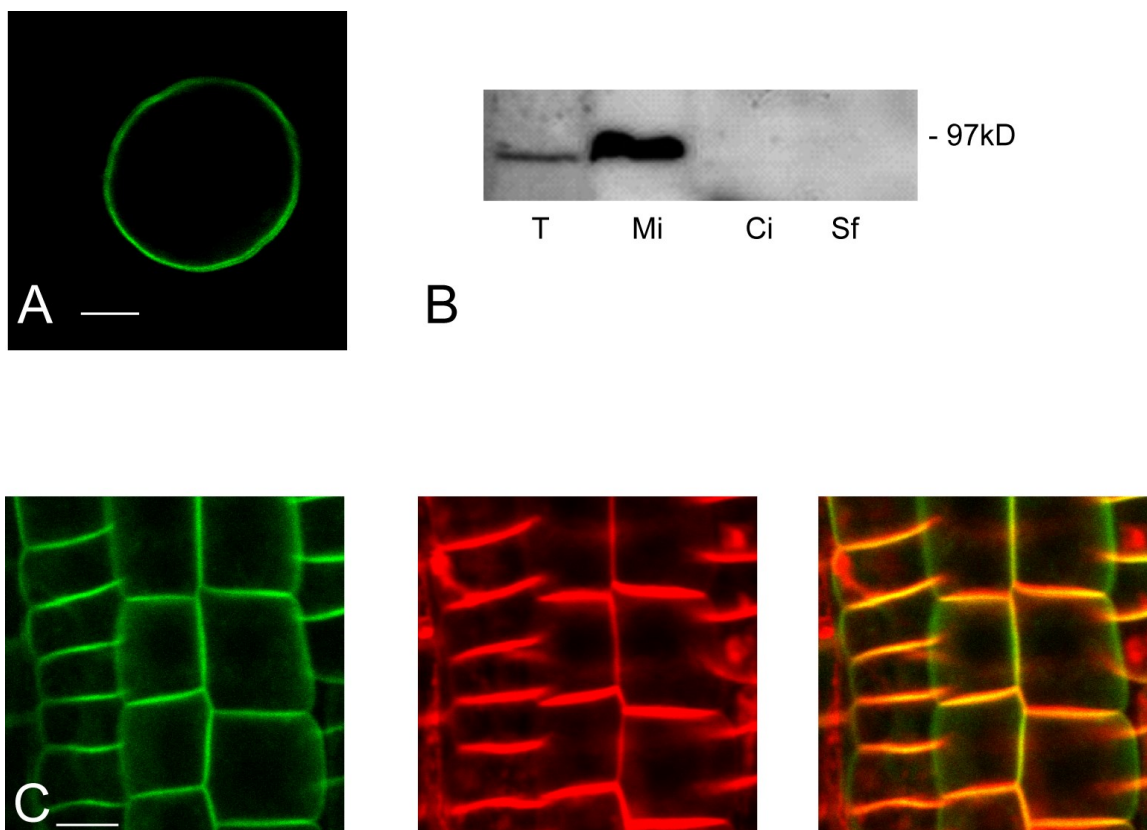
gyökércsúcsi régiókban (16. Ábra, I). Üvegházban nevelt növényekben, a CRK5-GUS fehérje a szállítónyalábok mentén a szárlevélben, a csésze- és szíromlevelekben, a porzószárbán, ill. a termőben is észlelhető volt (16. Ábra, J-M). A CRK5-GUS fehérje lokalizációját a szállítónyalábok mentén a 16. Ábra N szekciója mutatja.

#### **4.6. A CRK5 kináz lokalizációja a plazmamembránban**

Hasonlóan a paradicsom CRK1 kinázához (Leclercq és mtsai., 2005), az *Arabidopsis* CRK5 fehérje is hordoz egy tipikus N-terminális mirisztilációs motívumot, amely membrán lokalizációt jelez. A CRK5 sejtbeli lokalizációjának meghatározásához felhasználtuk a genetikai komplementációs tesztekben funkcionálisan jellemzett *gCRK5-GFP* konstrukciót, amelyről először fehérjét szintetizáltunk tranziens protoplaszt expressziós tesztekben. A CRK5-GFP sejtbeli lokalizációját ezek után nagyfelbontású konfokális pásztázó mikroszkóppal vizsgáltuk (17A Ábra). A CRK5-GFP szignált a kerek protoplasztok periferiáján, kizárólag a plazmamembránhoz asszociálva észleltük.

A CRK5-GFP plazmamembránlokalizációját a következő lépésben egy biokémiai sejtfrakcionálási kísérletben ellenőriztük (17B Ábra). A 3.2.9. szekcióban leírtak szerint plazmamembránt tartalmazó mikroszóma, ill. citoplazmatikus és sejtfalfrakciókat izoláltunk egy *gCRK5:GFP* konstrukciót expresszáló gyökérkultúrából, majd anti-GFP ellenanyag segítségével Western blott technikát használva vizsgáltuk a CRK-GFP fehérje (97kD) mennyiségét ezekben a sejtfrakciókban. A CRK5-GFP jel a mikroszóma frakcióban dúsult fel, ami annak sejtmembrán lokalizációjára utalt. Ezzel szemben, nem kaptunk jelet a szolubilis citoplazmatikus és sejtfal frakciókban.





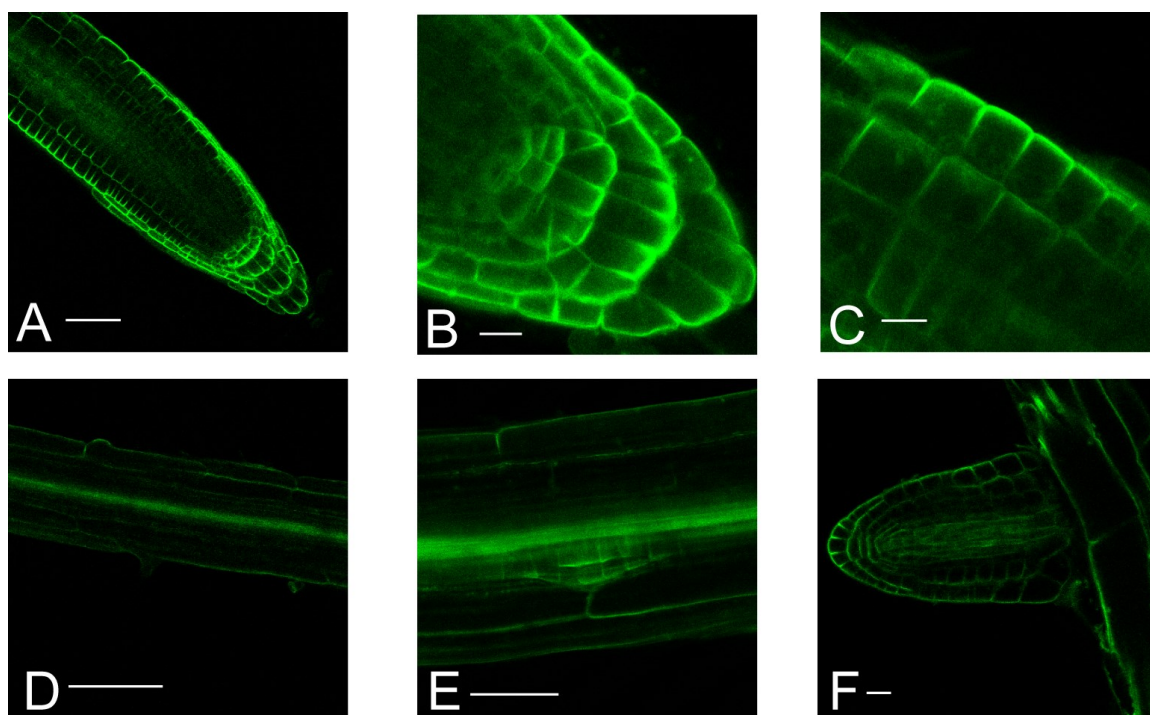
**17. Ábra. A CRK5 fehérje szubcelluláris lokalizációjának vizsgálata. A)** Transziens expressziót követően, a CRK5-GFP jel a protoplasztok plazmamembránjában észlelhető. Méretskála: 10µm **B)** gCRK5:GFP konstrukciót expresszáló gyökérkultúrából preparált sejtfrakciók immunoblott analízise anti-GFP ellenanyaggal. T: teljes minta, Mi: mikroszóma frakció, Ci: citoplazmatikus szolubilis frakció, és Sf: sejtfa frakció. **C)** gCRK5:GFP konstrukciót expresszáló vad típusú *Arabidopsis* növények gyökerének bőrszöveti képe FM4-64 (piros) membránfestéssel kombinálva. Baloldal: CRK5-GFP jel, középen: FM4-64 lokalizációja a plazmamembránban, és jobboldalt: átfedés a CRK5-GFP zöld és FM4-64 piros jelek között narancsszínű plazmamembrán festést eredményez. Méretskála: 25µm.

Végül, a CRK5-GFP fehérje plazmamembrán lokalizációjának további egyértelmű igazolásának céljából, a gCRK5:GFP konstrukciót *Agrobaktérium* közvetítette transzformációval bejutattuk vad típusú (Col wt.) növényi háttérbe, majd több független transzformáns antibiotikum szelekcióját követően CRK5-GFP-t expresszáló homozigóta vonalakat állítottunk elő. Ezek után megvizsgáltuk a transzformált növények gyökér bőrszövetében konfokális pásztázó mikroszkópot használva a CRK5-GFP-re jellemező zöld GFP jel lokalizációját a plazmamembrán specifikus FM 4-64 festék piros jeléhez hasonlítva (17C Ábra). A CRK5-GFP és FM-64 jelek tökéletes átfedése egyértelműen igazolta a CRK5 kináz kötődését a plazmamembránhoz.



#### 4.7. A CRK5-GFP poláris membránlokalizációja gyökér bőrszöveti, kortex és kolumella sejteiben

A CRK5-GFP fehérje lokalizációjának további részletes vizsgálatai egy fontos észleléshez vezettek. A CRK5-GFP elsősorban a gyökér epidermisz, kortex, kolumella és gyökérsüveg sejteiben volt észlelhető. A CRK5-GFP magasszintű expressziója az epidermális és kortex rétegekben kiterjedt a gyökér megnyúlási zónáig és detektálható volt az e fölötti differenciálódó zónában és az ebből kifejlődő fiatal laterális gyökérprimordiumokban (18. Ábra).



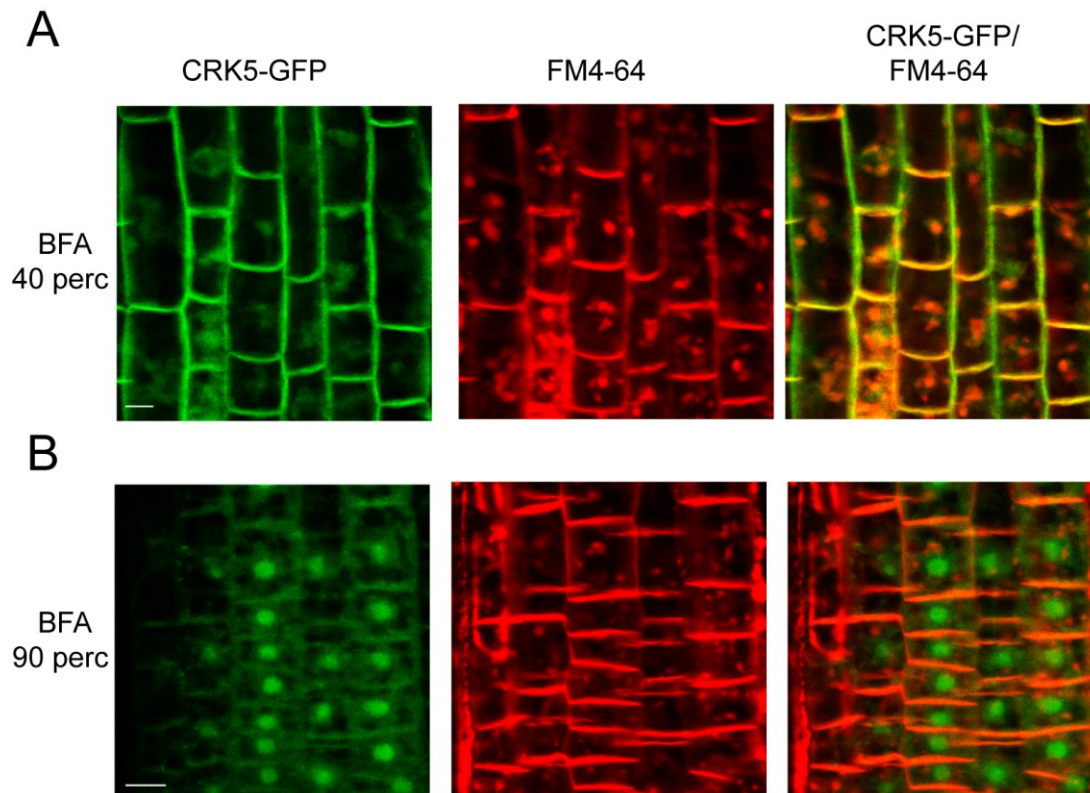
**18. ábra.** A CRK5-GFP fehérje poláris membránlokalizációja az elsődleges gyökér és oldalgökörek különböző sejtípusaiban. **A-B)** CRK5-GFP lokalizációja a bőrszövet, kortex, kolumella és gyökér csúcsi sejteiben. Gyökér keresztmetszet. Méretskála: A: 50 $\mu$ m; B: 25 $\mu$ m. **C)** A gyökér felszine felé irányuló U-formájú poláris CRK5-GFP lokalizáció az epidermisz sejtekben. Méretskála: 25 $\mu$ m. **D)** A stele-ben lokalizált CRK5-GFP szignál az elongációs zónában. Méretskála: 100 $\mu$ m. **E)** A CRK5-GFP fehérje detektálható a differenciálódási zóna legelső, a stele rétegből a periferia felé osztódó sejteiben, ahol az epidermisz sejtekhez hasonlóan a laterális külső sejt felé mutató poláris U-formájú mintázatot mutat. Méretskála 50 $\mu$ m. **F)** A CRK5-GFP fehérje poláris membránlokalizációja a főgyökérhez hasonló fiatal oldalgökörekben, azonban a CRK5-GFP jel még magasszintű az osztódó vaszkuláris (stele) sejtekben is. Méretskála 25 $\mu$ m.

Figyelemre méltóan, a CRK5-GFP fehérje egy U alakú poláris mintázatot mutatott, amely minden esetben a sejtek gyökérfelszíni oldala felé nézett. A gyökér bórszöveti és kortex rétegeiben a CRK5-GFP a sejtek bazális, apikális és kifelé néző laterális membránjaiban dúsult fel (18. Ábra A és C). A kolumella és gyökérsüveg sejtjeiben, a CRK5-GFP jel a két párhuzamos laterális membrán mellett a gyökércsúcs felé néző alsó membránban lokalizálódott (18. Ábra B). Amíg az elongációs zóna szállítószövet (stele) sejtjeiben a CRK5-GFP csak alacsony diffúz jelként volt detektálható, a differenciálódási zóna vaszkuláris/periciklus rétege körül osztódó oldalgyökér primordium sejtjeiben a CRK5-GFP szignál az epidermisz sejtjeihez megfigyelt laterális polaritást mutatott az oldalgyökér kialakulási folyamat korai fázisától kezdve (I-II fázis; 18D és E Ábra). A kialakult oldalgyökérben a CRK5-GFP lokalizációja mind helyzetében, mind mintázatában megegyezett az elsődleges gyökérben tapasztaltakkal, kivéve, hogy a periciklusban detektált expressziója magasabb volt.

#### **4.8. BFA exocitózis inhibitor gátolja a CRK5 fehérje membránlokalizációját**

Az előző fejezetben láthattuk, hogy a CRK5 fehérje a plazmamembránban található, amit többféle módon, többek között az FM4-64 festék alkalmazásával is kimutattunk. Annak kiderítésére, hogy a CRK5 membránlokalizációja hogyan szabályozódik, további kísérleteket végeztünk a GNOM fehérjét gátló Brefeldin-A (BFA) inhibitorral. A BFA egy gombatoxin, mely gátolja a fehérjék transzportját az endoszómák felől a plazmamembrán irányába, ugyanakkor fokozza a visszafele irányuló transzportot. Ezért ha az FM4-64 festéket BFA-val kombináljuk, akkor a plazmamembrán fehérjék transzportja nyomon követhető.

A CRK5-GFP konstrukciót tartalmazó növényvonalak FM4-64 membránfestékkel festett epidermisz sejtjeiben 50 $\mu$ M-os BFA kezelés hatására már 40 perc után megjelennek a BFA testek a növényi sejtben, amint azt a 19A ábra középső paneljén illusztráljuk. A sejtek belsejében megjelenő piros színű részecskék mutatják az FM4-64 által megfestett membrán vezikulákat, amelyek nem tudnak a membránhoz szállítódni a BFA toxin hatása miatt. A zöld CRK5-GFP és vörös FM4-64 jelek átfedéséből származó naracsvörös jel eloszlása ugyanakkor azt jelzi, hogy az FM4-64 festékkel egyidőben a plazmamembránban lokalizált CRK5-GFP fehérjének csak egy kisebb frakciója jelenik meg BFA testekben.



**19. Ábra.** A CRK5-GFP fehérje internalizálódásának indukciója BFA-val FM4-64 membránfesték jelenlétében a gyökér bőrszöveti sejt sorában. **A)** 40 perces BFA (50 $\mu$ M) kezelés. **B)** 90 perc BFA (50 $\mu$ M) kezelés. Méretskála: 25 $\mu$ m. Az A és B panelek bal oldalán látható a CRK5-GFP, a középső szekciókban az FM4-64 festése (piros jel), és a jobb oldali szekcióban a CRK5-GFP ill. FM-64 jelek pontos egymásra rétegezése.

Amíg rövid BFA kezelés a CRK5-GFP fehérje egy részét BFA testekbe (blokkolt transzportú vezikulumokba) irányítja, 90 perces BFA kezelés után a CRK5-GFP fehérje nagyrészt eltűnik a membránból, de szemben az FM4-64 festékekkel nem BFA testekben található, hanem a sejtmag régiójában halmozódik föl (20B Ábra). A brefeldin-érzékeny CRK5-GFP internalizációja alapján feltehető, hogy a CRK5 fehérje poláris elhelyezkedése, egy BFA érzékeny membrán reciklizáláson alapul. Ami azonban meglepő, hogy a CRK5-GFP fehérje egy jelentős része prolongált BFA kezelés ellenére sem degradál, hanem valószínű a sejtmagba importálódik. A CRK5 fehérjén található sejtmagi lokalizációs szignálnak szerepe lehet a CRK5 BFA indukált nukleáris lokalizációjában. Paradicsomban kimutatták, hogy ha az N-terminális mirisztilációs szekvencia megváltozik, akkor az *Arabidopsis* CRK5-tel homológ CRK1 kináz a sejtmagban akkumulálódik (Leclercq és mtsai. 2005)., Lehet, hogy ez a kísérlet arra is rávilágít, hogy a CRK5 fehérje bizonyos speciális körülmények között szerepet játszhat a sejtmagi folyamatokban is, esetleg, mint a korábban élesztő két hibrid

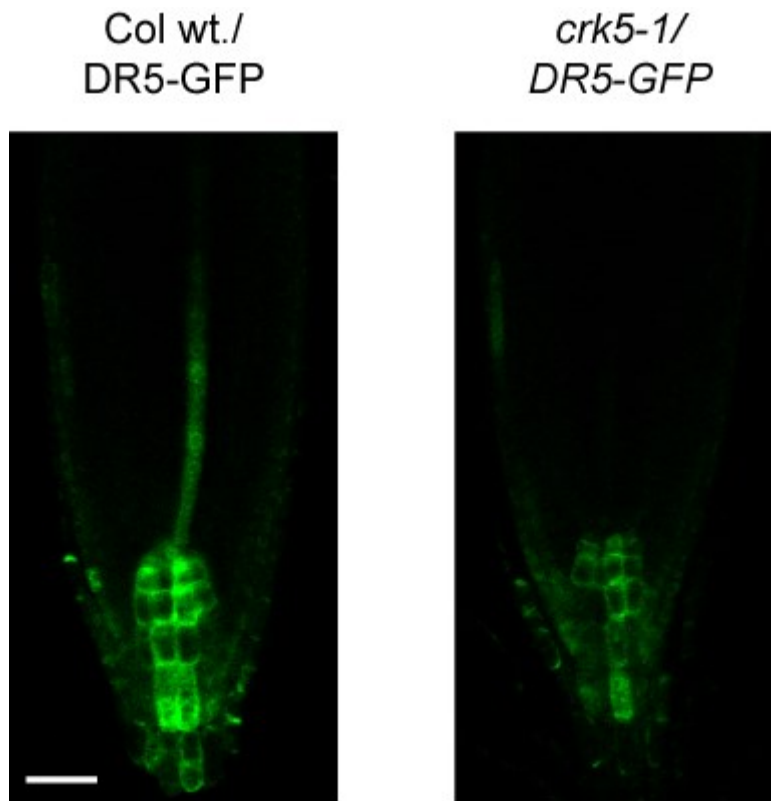
rendszerben azonosított sejtmagi NTC komplex PRL1 alegységének kölcsönható partnere (Németh és mtsai., 1998).

#### **4.9. A *crk5-1* mutáció hatása az auxin eloszlásra gyökérben**

A *crk5-1* mutánsban észlelt fokozott oldalgyökér képződés, a gyökér növekedésének gátlása és a késleltetett gravitropikus válasz jelezte, hogy a gyökér auxin eloszlási vagy újraelosztási rendszere sérülést szenvedett. Mivel az auxin központi szerepet tölt be a fent említett folyamatokban, többféle módszerrel igyekeztünk kideríteni mi változott meg a *crk5-1* mutánsban, ami a gyökérfenotípusban észlelt változásokat okozta.

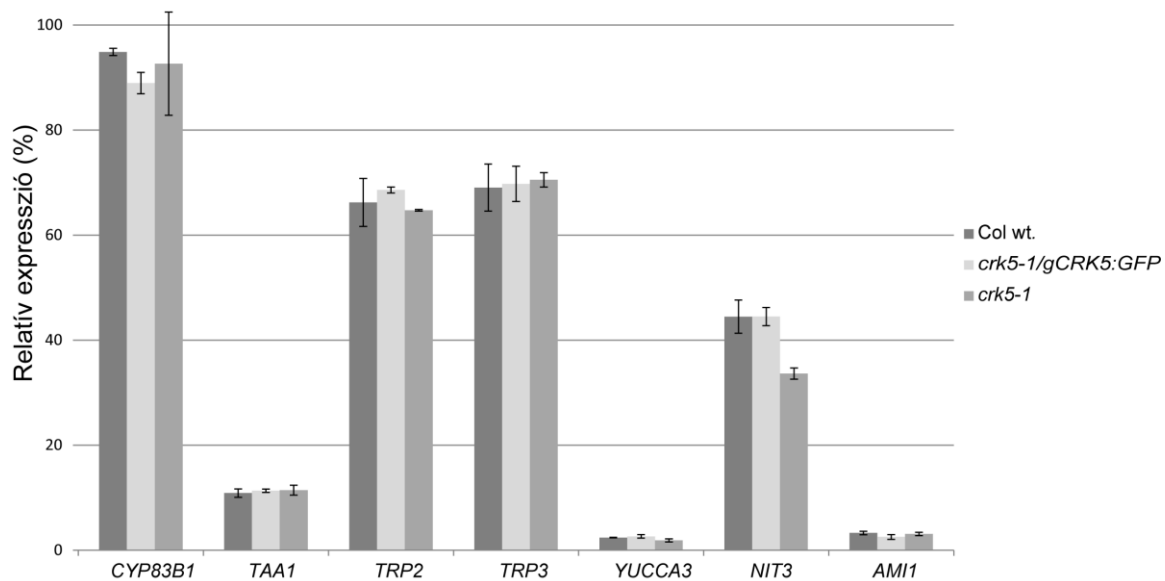
A gravitropikus válasz során az auxin újraelosztása történik a gyökérben, amelynek hatására egy egyenlőtlen megnyúlás alakul ki és ez által a gyökér a gravitációs irány felé görbül (lásd 1.11.). Az auxin eloszlás változásai elegánsan nyomon követhetők olyan riporter konstrukciókkal, amelyek aktivitása az auxinszinttel arányosan szabályzódik. Egy ilyen riporter az auxin érzékeny promóter elemet tartalmazó DR5-GFP konstrukció (Ottenschläger és mtsai., 2003), amelyet bejuttatunk *Agrobaktérium* közvetítette transzformációval vadtípusú (Col wt.) ill. *crk5-1* mutáns növényekbe. A transzformációt és szelekciót követően, több független transzformáns vonalat megvizsgáltunk konfokális pásztázó mikroszkópia segítségével. A vizsgálatokhoz egyhetes függőlegesen nőtt növényeket használtunk.

Amint azt a 20. Ábra illusztrálja, az auxin érzékeny DR5-GFP riporter fluoreszcencia intenzitásának szintje jóval alacsonyabb volt a *crk5-1* mutánsban a vadtípushoz képest azonos mikroszkóp beállítások mellett vizsgálva. Ez arra utalt, hogy a *crk5-1* mutánsban az auxin felhalmozódás a gyökér csúcsi régiójában zavart szenvedett.



**20. Ábra.** A *crk5-1* mutáció hatása az auxin indukált *DR5-GFP* riporter aktivitására gyökérben. Vadtípusú (*Col wt.*) (bal oldal) növényhez hasonlóan, a *DR5-GFP* riporter konfokális pásztázó mikroszkóppal észlelt aktivitása alacsonyabb a függőlegesen nevelt *crk5-1* mutáns gyökerében ( jobb oldal). Méretskála: 50µm.

Annak eldöntésére, hogy vajon a mutánsban az auxin bioszintézis út kulcsenzimeinek az expressziója változott-e meg, valós idejű kvantitatív PCR reakciókat hajtottunk végre (21. Ábra). A kísérlet során felhasznált primerek listája a Függelék 1. Táblázatában található. A 21. ábrán látható, hogy a *crk5-1* mutánsban nem változott meg a kiválasztott auxin bioszintézisben kulcsszerepet játszó gének transzkripciója. A megvizsgált gének termékei közül a triptofán aminoszintézis *TAA1* (At1g70560) az indol-3-ecetsav prekursor indol-3-piroszölősav szintézisét katalizálja, a *TRP2* (At5g54810) és a *TRP3* (At3g54640) a triptofán szintáz  $\alpha$  illetve  $\beta$  alegységét kódolják, a *YUCCA3* (At1g04610) gén terméke a triptofán alapú

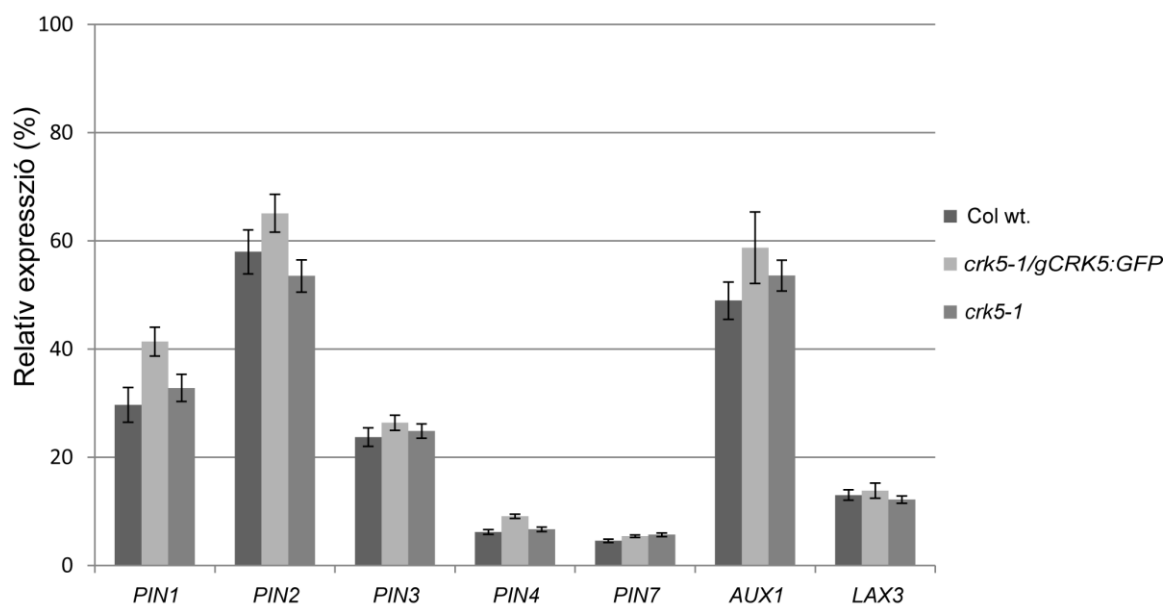


**21. Ábra.** Az auxin bioszintézisben szerepet játszó kulcs gének mRNS szintjeinek összehasonlítása valós idejű kvantitatív PCR-al vad típusú, *crk5-1* és *crk5-1:gCRK5-GFP* növények gyökereiben. A méréseket három biológiai ismétléssel végeztük és a mért transzkript szinteket a kontroll *GAPC2* (At1g13440) mRNS értékekhez normalizáltuk. SE, az átlag hibája.

auxin bioszintézisben játszik szerepet; a *NIT3* (At3g44320) egy nitriláz kódol, ami az indol-3-acenitrilt, amíg az *AMT1* (At1g08980) az indol-3-acetamidot alakítja át IES-sé. A CYP83B1 (At4g31500) enzim az aktív IES szintjét a glükoszínolátképzés révén szabályozza (Mano és Nemoto., 2012). Mivel az auxin transzportban szerepet játszó gének is mutatnak transzkripció szintű változást a megnövekedett auxintartalomra (Vieten és mtsai., 2005), összehasonlítottuk *PIN1* (At1g73590), *PIN2* (At5g57090), *PIN3* (At3g70940), *PIN4* (At2g01420), *PIN7* (At1g23080), *AUX1* (At2g38120), *LAX3* (At1g77690) auxin efflux és influx hordozókat kódoló gének expresszióját viszonyítva a control *GAPC2* (At1g13440) mRNS szintekhez.

Amint az a 22. ábrán látható, a *crk5-1* mutánsban a vizsgált gének expressziója nem változott meg a vad típusúhoz képest. Ezek az adatok azt jelezték, hogy a *crk5-1* mutáció nem okoz az auxin homeosztázis szabályozásában szerepet játszó gének expressziójában lényeges változást. Ezért a DR5-GFP jelcsökkenés a gyökércsúcsi régióban azt jelezte, hogy valószínűleg az auxin transzport a gyökércsúcsból a hajtás felé megemelkedett és ezért a gyökércsúcs sejtjeiben gyengébb DR5-GFP jel észlelhető. Hasonlóan a *crk5-1* mutánsához, a PINOID (PID) kinázt túltermelő növényvonalakban szintén csökkenést mutat a gyökércsúcsi

DR5-GFP jel, ami ott egy sokkal drasztikusabban lecsökkent auxin mennyiségét jelez (Friml és mtsai., 2004). Ennek következtében, a PID overexpresszáló növények gyökércsúcsa összeesik és elhal. Összehasonlításban, a *crk5-1* mutáns gyökércsúcsa nem mutat drasztikus szerkezeti aberrációt, bár a gyökér megnyúlása/növekedése szignifikánsan lassabb a vadtypushoz képest.

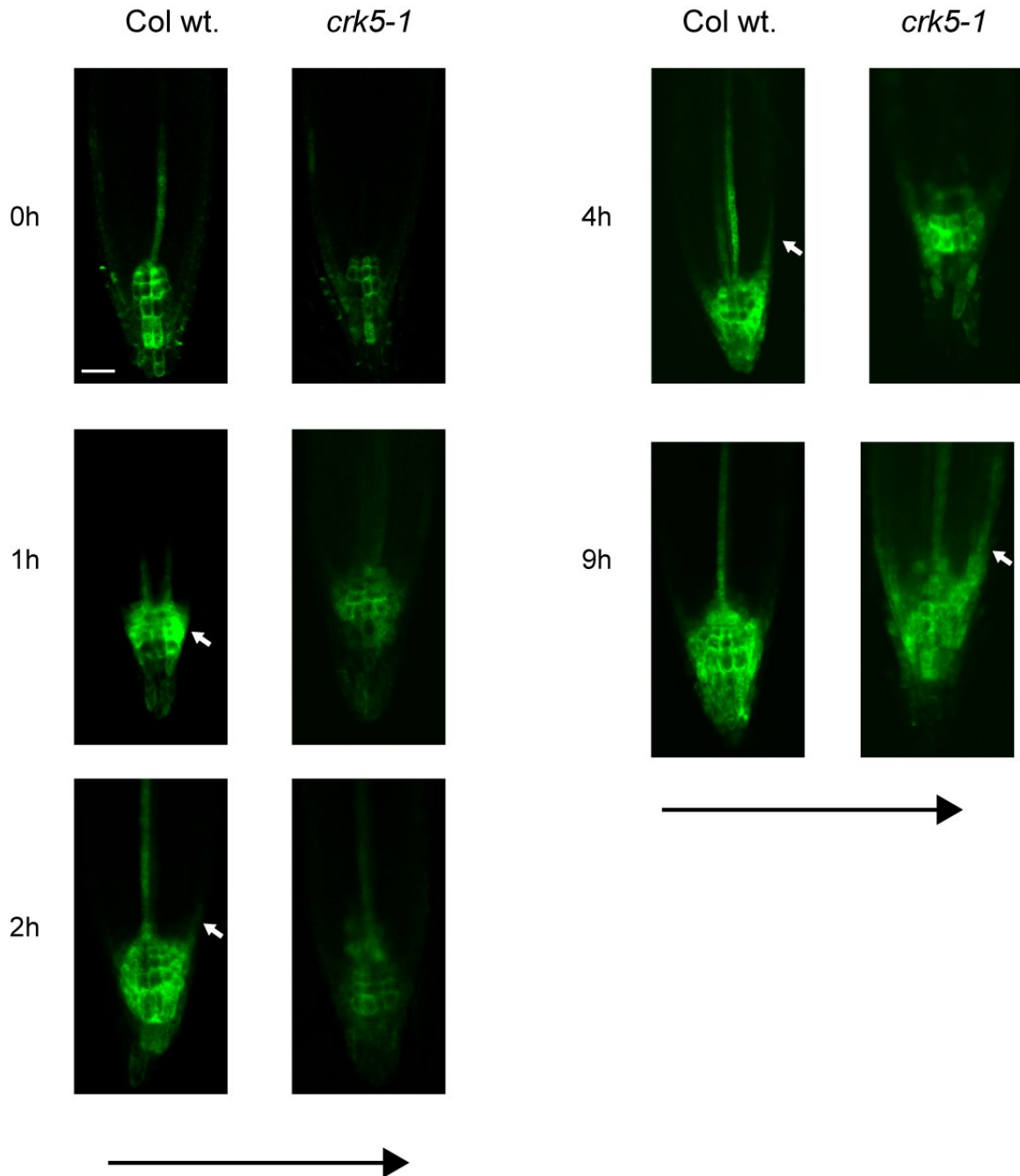


**22. Ábra.** Az auxin transzportban szerepet játszó *PIN* és *AUX/LAX* gének valós idejű kvantitatív PCR-al mért mRNS szintjeinek összehasonlítása vadtypusú, *crk5-1* és *crk5-1::gCRK5-GFP* növények gyökereiben. A méréseket három biológiai ismétléssel végeztük és a mért transzkript szinteket a kontroll *GAPC2* (At1g13440) mRNS értékekhez normalizáltuk. SE, az átlag hibája.

#### 4.10. A *crk5-1* mutáció késlelteti a gravistimulus indukálta auxin exportot

Mivel az eddigi adatok az jelezték, hogy a *crk5-1* mutáns gyökérben a gyökércsúcsból a megnyúlási és differenciációs zónák felé irányuló emelkedett auxin export (ami stimulálja megemelkedett számú oldalgyökér képződését a vadtypushoz hasonlóan) összefügghet a gyökér gravitropikus válasz lassításával, összehasonlítottuk az auxin indukált DR5-GFP riporter aktivitását gravistimulált vad ill. *crk5-1* mutáns gyökerekben. A gyökér gravitropikus válasza során, az újrapirozicionált gyökerek alsó, a gravitációs irány felé eső gyökérfelén auxin többlet alakul ki, ami a DR5 auxin érzékeny promótert tartalmazó konstrukciókkal jól

nyomon követhető. A függőlegesen nevelt DR5-GFP konstrukciót tartalmazó vad ill. *crk5-1* növényeket egyhetes korukban 135°-ban elforgattuk, majd különböző időpontokban konfokális pásztázó mikroszkóp segítségével megvizsgáltuk a gyökércsúcsi régióban a DR5-GFP aktivitását (23. Ábra).



**23. Ábra.** A DR5-GFP riporter aktivitás időbeli változásának követése gravitstimulált vad típusú (Col wt.) és *crk5-1* mutáns gyökerekben konfokális pásztázó mikroszkóppal. Az idő órákban van megadva. A gravitációs erő irányát fekete nyilak jelzik, amíg a fehér nyilak az aszimmetrikus DR5-GFP jel megjelenésének pozícióit mutatják. Méretskála: 50µm.



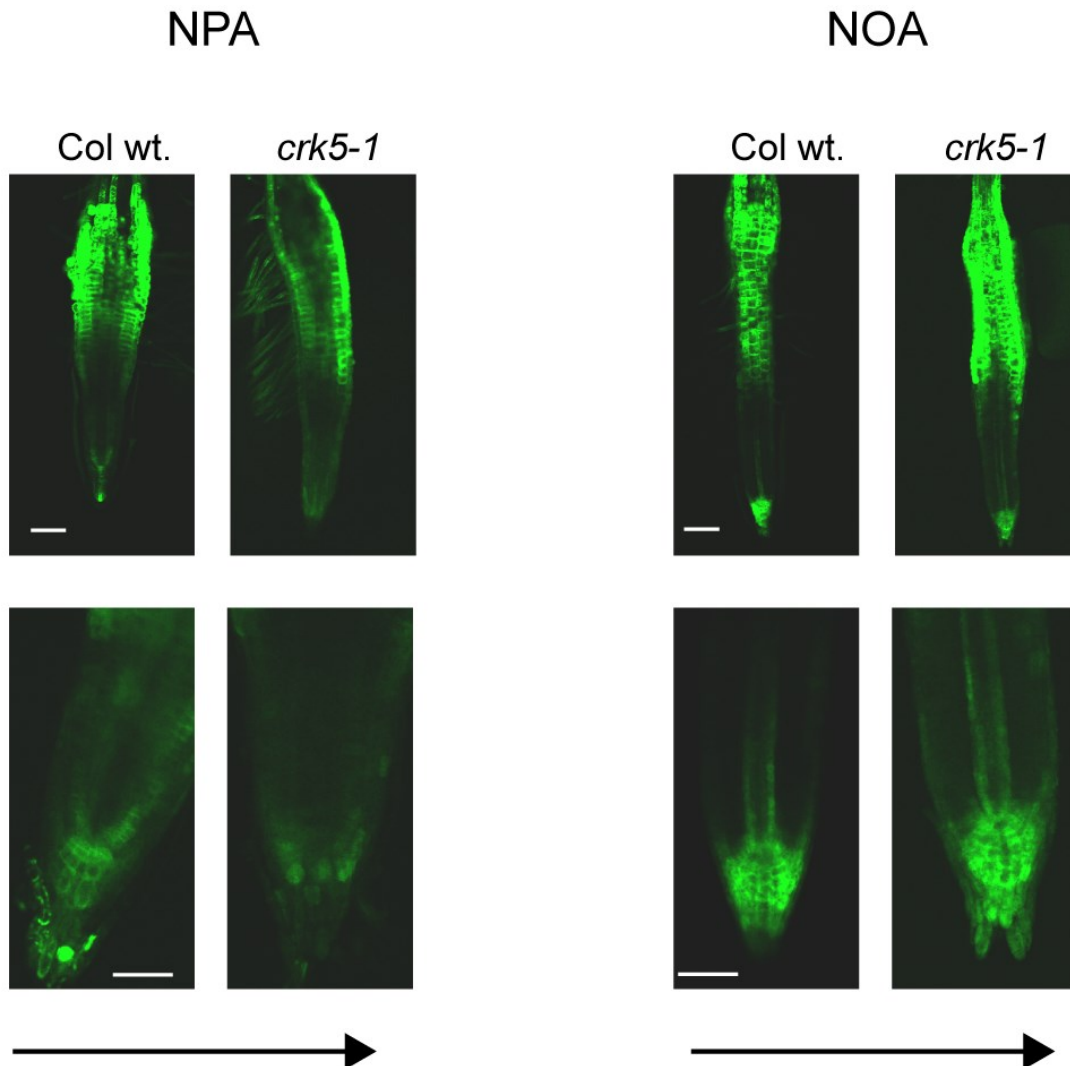
Ahogy korábban észleltük, a gravistimulációt megelőzően és annak korai fázisában, a DR5-GFP jel intenzitása a *crk5-1* mutánsvonalban jóval gyengébb volt, mint a vad típusú gyökérben. A 135°-os elforgatást követően, már az első óra után egy aszimmetrikus DR5-GFP jelfokozódás volt megfigyelhető a vad típusú gyökércsúcs alsó szekciójában, a bőrszöveti régióban. (A 24. ábrán ezt, az 1 órához tartozó képen egy fehér nyíl jelzi a vad típus esetében). A *crk5-1* mutáns esetében ilyen jelerősödés nem történt. A kísérlet második órájában ez az aszimmetrikus jelnövekedés még inkább szembetűnő volt a vad típusban, ahol a DR5-GFP riporter intenzitásának maximumát 4 óra múlva érte el. Ezzel szemben a *crk5-1* mutánsban az aszimmetrikus jelformálódás, azaz a DR5-GFP riporter aktiválódása a gyökércsúcs alsó bőrszövetében csak a kilencedik óra körül kezdődött meg.

Következésképpen, a *crk5-1* gravitropikus válasza körülbelül 5 órás késést mutatott a vad típushoz hasonlítva. A *crk5-1* mutánsban az auxin gradiens megkésett kialakulása magyarázatul szolgálhat arra, hogy az aszimmetrikus auxingrádiénstől függő folyamatok, úgymint a gravitropikus gyökérgörbülés is késést szenvedhetnek. A vad típus esetében a gravistimuláció 9. órája után a DR5-GFP eloszlása újra szimmetrikus lett a gyökér két oldala között jelezve a gravistimulus által kiváltott aszimmetrikus növekedési válasz végét.

Mivel az auxin efflux vagy influx folyamatokat befolyásoló auxin analógok alkalmazásával közelebb kerülhetünk annak megértéséhez, hogy mely auxin transzporterek funciója sérült a *crk5-1* mutánsban, a következő lépésben megvizsgáltuk különböző auxin transzport inhibitorok hatását a DR5-GFP riporter aktivitására vad típusú illetve *crk5-1* mutáns gyökerekben. Először az auxin efflux folyamatok általános gátlószerét, az NPA-t (1-naftilalaminsav) használtuk 10µM-os végkoncentrációban az alábbi kísérleti elrendezésben: 1 hetes csíranövényeket előkezeltünk 10µM NPA-val 48 órán keresztül, majd 6 óra 135°-al történt elforgatás után konfokális pásztázó mikroszkóppal dokumentáltuk a DR5-GFP fehérje szintjének és lokalizációjának változását. Hasonló kísérleti elrendezést használtunk az auxin influx gátló NOA (1-naftoxiecetsav) esetében is. Az eredményeket a 24. ábra szemlélteti.

A vad típusú háttérben az NPA auxin efflux inhibitor hatására a DR5-GFP intenzitása felfele tolódott, a nyugvó centrumon keresztül a cortex és a bőrszöveti sejtréteg felé, mint ahogy azt korábban leírták (Ottenshläger és mtsai., 2003). Azonban az NPA kezelés tovább csökkentette a *crk5-1* háttérben a DR5-GFP jel intenzitását a gyökércsúcsi régióban. Ezzel szemben hasonló kísérleti körülmények között a NOA auxin influx inhibitor teljesen gátolta a gravitropikus választ és egyforma magas DR5-GFP riporter gén aktivitást eredményezett mind a vad típus, mind a *crk5-1* mutáns kolumella, gyökérsüveg, szállítónyalábok, ill.

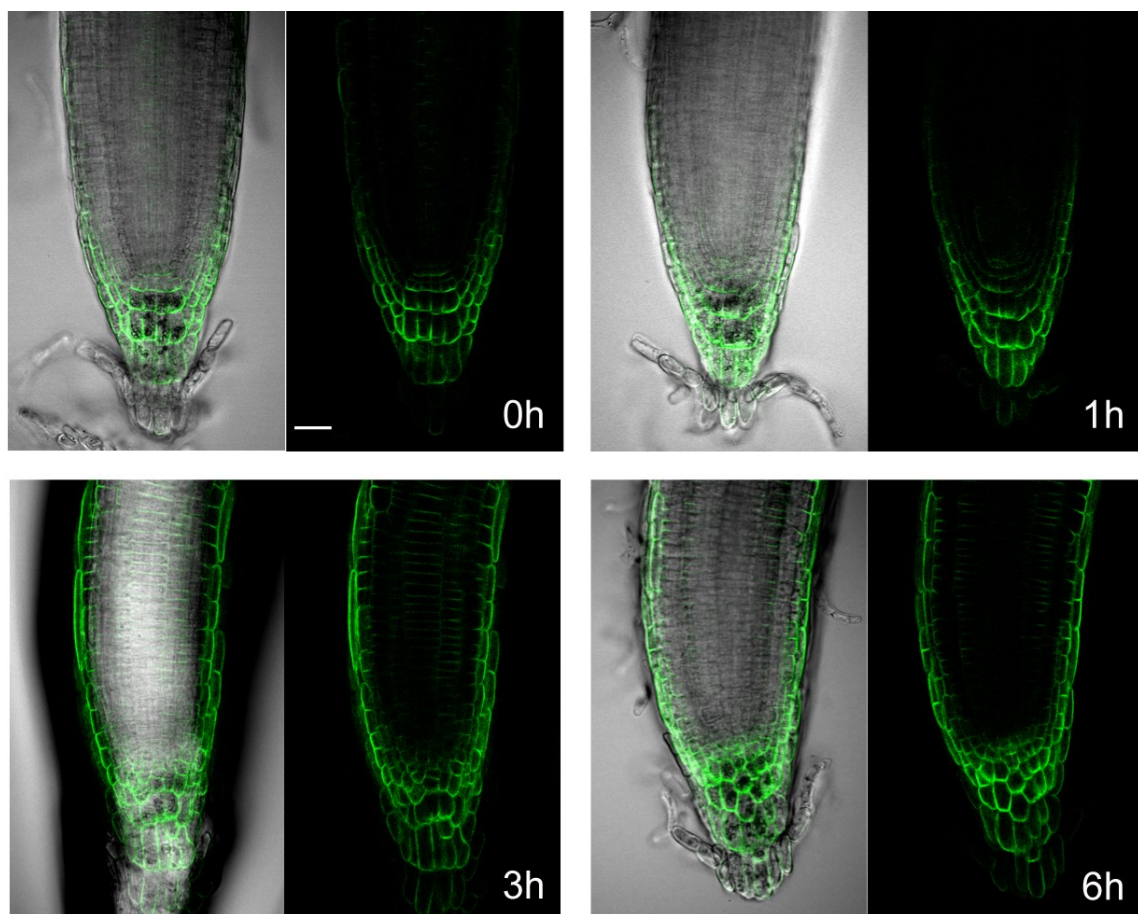
gyökérszőr zónáiban. Az, hogy a NOA kezelés helyreállította a DR5-GFP jelintenzitást a *crk5-1* mutáns gyökércsúcsi régiójában a vadtípusú szintre, az AUX1 influx csatornafehérje gátlása révén arra enged következtetni, hogy a csökkent gravitropus válasz, valamint a fokozott oldalgyökér képződés oka leginkább a *crk5-1* mutáns fokozott auxin transzportja a gyökércsúcstól a szár felé, amelyhez esszenciális az AUX1 fehérje.



**24. Ábra.** 10 $\mu$ m NPA auxin efflux és a 10 $\mu$ m NOA auxin influx inhibítorok hatása a DR5-GFP aszimmetrikus aktiválódására 48 órával a kezelés után, illetve 6 órányi gravistimulációt követően, vadtípusú és *crk5-1* mutáns gyökerekben. Gravitációs erő irányát a fekete nyilak jelzik. Méretskála: 50 $\mu$ m.

A gyökérsüveg, kolumella és bőrszövet sejteiben a CRK5-GFP fehérje polárisan helyezkedik el a plazmamembránban. A gravistimuláció által indukált aszimmetrikus

auxineloszlásban észlelt hiba szempontjából, így fontos volt, hogy megvizsgáljuk, hogyan befolyásolja a gravitációs stimulus a CRK5-GFP fehérje poláris membránlokalizációját. Hasonló kísérleti elrendezést használva, mint az eddigi gravitópikus teszteknel, teszteltük a gCRK5:GFP konstrukciót tartalmazó vad típusú növényvonalakat (25. Ábra). A növények 135°-os elforgatása után konfokális pásztázó mikroszkóppal 0, 1, 3 és 6 óra elteltével követtük a CRK5-GFP jel változásait. A 26. ábrán látható, hogy habár a gyökér már elkezdett befordulni a gravitációs erő irányába az idő előrehaladtával, a CRK5-GFP lokalizációja nem változott. Az auxináramlás változása a gyökér gravitropus válasza során nem volt hatással a CRK5-GFP plazmamembrán lokalizációjára a kolumella, gyökérsüveg, bórszövet és kortex sejtekben.



**25. ábra. A CRK5-GFP poláris lokalizációjának vizsgálata konfokális pásztázó mikroszkópiával a gravitropus válasz során egyhetes vad típusú háttérben. A gravitációs erő irányát fekete nyilak jelzik Méretskála: 50µm. Az idő órákban van megadva.**

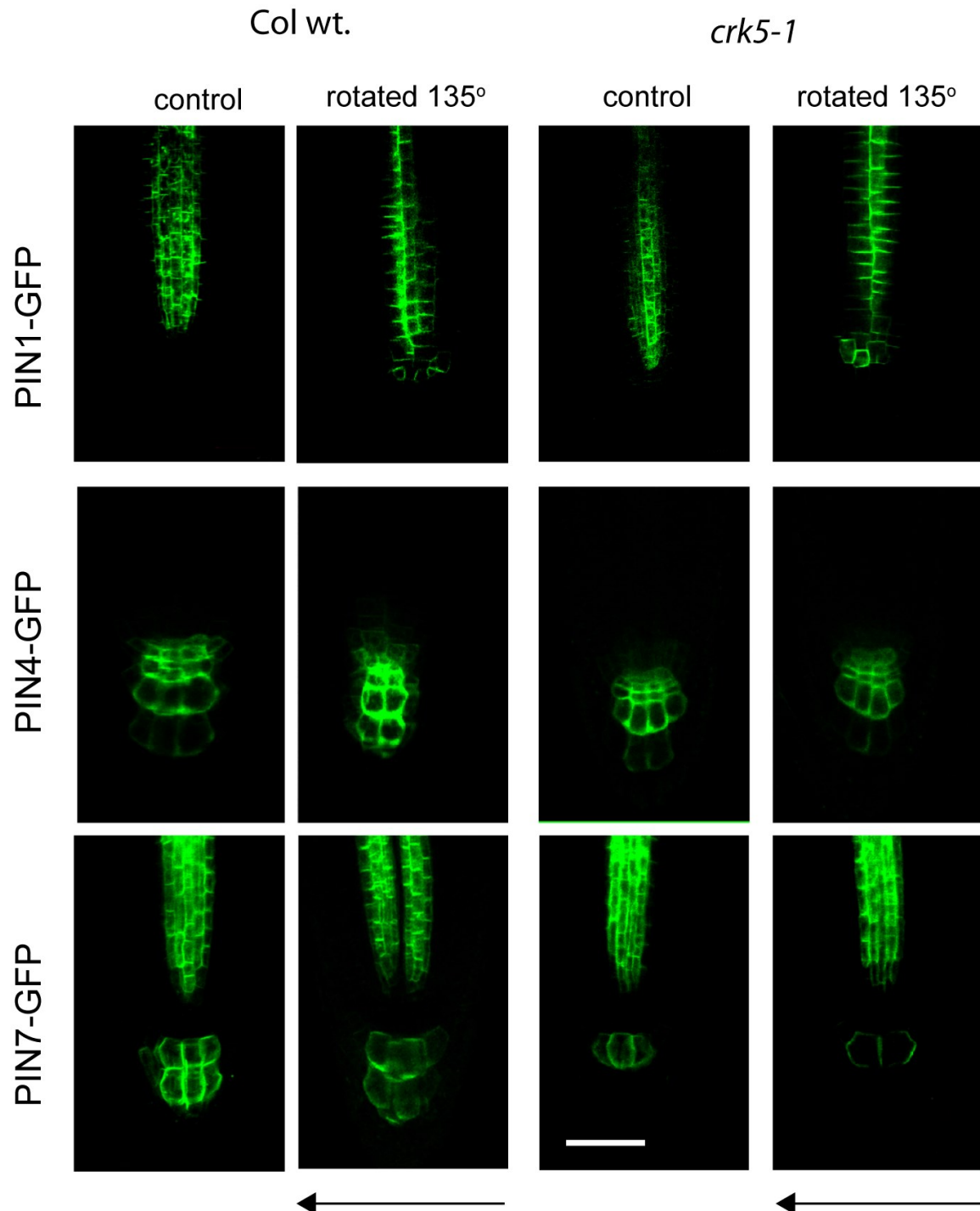
#### **4.11. A *crk5-1* mutáció nem változtatja meg az AUX1 auxin influx valamint a PIN1, PIN3, PIN4 és PIN7 auxin efflux fehérjék lokalizációját**

Amint az az eddigi kísérleti eredményekből nyilvánvalóvá vált, a *crk5-1* mutáció zavart okoz a gyökérben az auxin gravistimulációtól függő aszimmetrikus eloszlásában. Bár az auxin bioszintézisben és transzportban szerepet játszó gének expresszióját nem változtatta meg, lehetségesnek tűnt, hogy a *crk5-1* mutáció az auxin transzport fehérjék poláris lokalizációját, ill. stabilitását befolyásolja. A transzportfehérjék poláris elhelyezkedésének, szöveti és szervi speciális lokalizációjuknak döntő szerepe van a megfelelő auxin áramlás és gradiens kialakításában. Ezen kívül, a különböző transzportfehérjék lokalizációjának változása a különböző tropikus válaszokban elengedhetetlen a megfelelő auxin gradiens kiépüléséhez (lásd 1.9-1.12). Mivel ezek a folyamatok precízen szabályozottak, ezért ha valami okból megváltoznak, akkor a válaszreakció eltér a megszokottól.

Egy auxin transzport fehérje sorsának nyomon követésére többféle módszer áll rendelkezésre. Ezek közül mi kétféle módszert használtunk. Az egyik, amit már a CRK5 esetében is alkalmaztunk, fluoreszcens riporterfehérje fúziókat használtunk az auxin transzporterek lokalizációjának és stabilitásának összehasonlítására *crk5-1* mutáns és vad típusú hátterekben. A fluoreszcens riporterrel fuzionált szintjét, ill. lokalizációját valós idejű konfokális pásztázó mikroszkóppal követjük, amely során élő sejteket vizsgálunk roncsolásmentesen, és így a változásokat akár egy sejt esetében is nyomon követhetjük.

A másik módszer az immunhisztokémiai kimutatást felhasználó mikroszkópia. Itt már egy adott állapotban rögzített sejtekkel dolgoztunk, az eredményét tekintve a saját genom által kifejezett fehérjéket vizsgáltunk, és ezért a mesterséges GFP fúziók esetleges zavaró hatásától mentes, pontosabb eredményben részesülhettünk. A két módszer egyidejű használatával összetettebb képet kaphatunk a biológiai folyamatokról. Ezért, mind *crk5-1* és vad típusú növényekbe először bejuttattuk a vizsgált auxin transporterek fluoreszcens fehérje fúzióit expresszáló konstrukciókat. Ha lehetőség volt, akkor *Agrobaktérium* közvetítette virágtranszformációt alkalmaztunk, ha nem akkor keresztezés útján hoztuk létre a kívánt vonalakat. E kísérletek során az *AUX1-YFP* (YFP: sárga fluoreszcens fehérje) (Swarup és mtsai., 2001), *PIN1-GFP* (Benková és mtsai., 2003), *PIN2-GFP* (Xu és Scheres, 2005), *PIN3-GFP* (Zádníková és mtsai., 2010), *PIN4-GFP* és *PIN7-GFP* (Blilou és mtsai., 2005) génkonstrukciókat vittük be a *crk5-1* mutáns, ill. vad típusú háttérbe. A szelekciót követően

több független vonalat is izoláltunk, amelyek a bejuttatott géneket homozigóta formában hordozták és ezekkel összehasonlító vizsgálatokat végeztünk tanulmányozva az AUX1 és a különböző PIN auxin transzporterek poláris lokalizációját és stabilitását. A 26. ábra a PIN1-GFP, PIN4-GFP, és PIN7-GFP fehérjék lokalizációjának vizsgálatát mutatja gravistimulált *crk5-1* mutáns, ill. vad típusú gyökerekben.



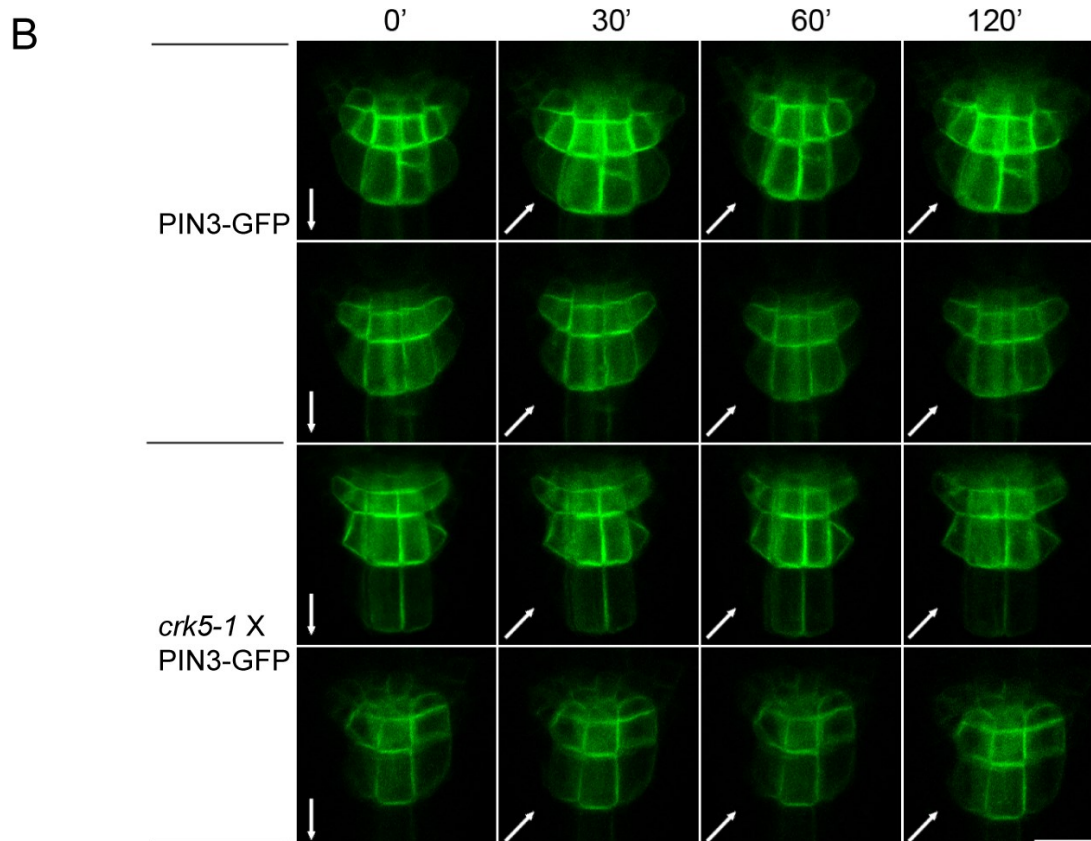
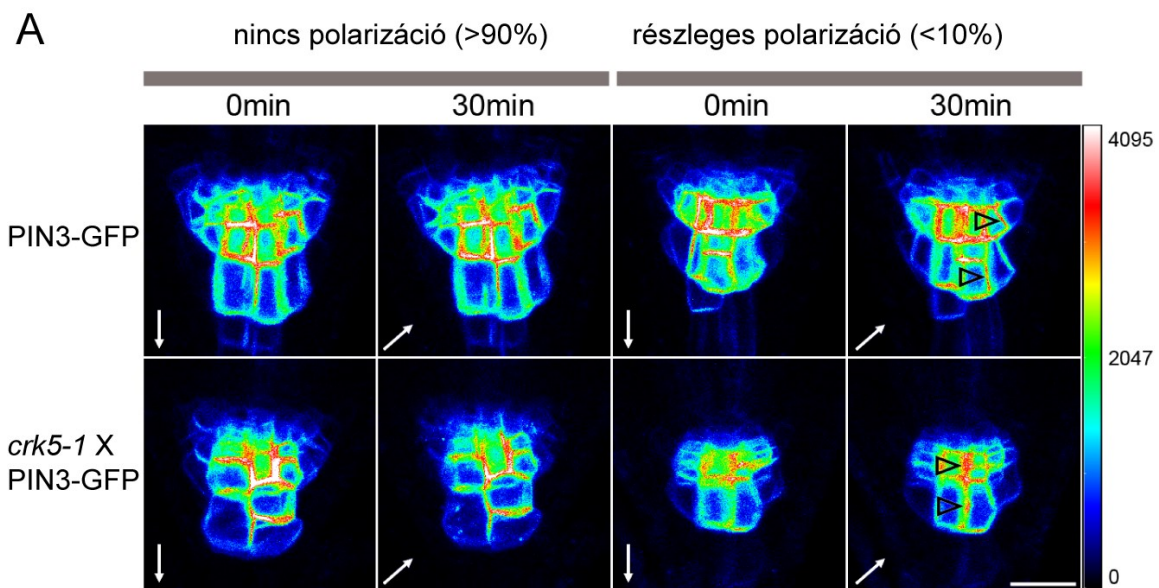
26. Ábra. A PIN1-GFP, PIN4-GFP és a PIN7-GFP auxin efflux hordozófehérjék lokalizációja vad típusú (Col wt.) és *crk5-1* mutáns gyökerek csúcsi régiójában. Egyhetes folyamatos fényen

függőlegesen nevelt, ill. 20 órán keresztül 135°-ban elforgatott csíranövények konfokális pásztázó mikroszkópos képe. A méretskála: 100  $\mu\text{m}$ . A gravitációs erő irányát fekete nyilak jelzik.

A PIN1-GFP mintázata mind függőlegesen növesztett, mind 135°-kal elforgatott gravistimulált *crk5-1* mutáns és vad típusú gyökerekben megegyezik a szállítónyalábokban. A PIN1-GFP alsó (bazális) membránlokalizációja nem változott meg egyik esetben sem. A PIN4-GFP esetében is elmondható, hogy a *crk5-1* mutáció nincs hatással a gyökércsúcsi régióban a fúziós fehérje lokalizációjára. Egyedüli különbség az, hogy a PIN4-GFP jel a gravistimulált vad típusú növényi háttérben a nyugvó zóna fölötti osztódó sejtrétegben is megfigyelhető, míg a mutáns *crk5-1* sejtekben nem. A PIN7-GFP jelintenzitás *crk5-1* mutáns szállítónyalábjaiban valamivel csökkent mértékű, azonban lokalizációja nem változik meg a gravitációs stimulus hatására.

A gravitációs jelérzékelés során a PIN3 fehérje polarizációja változik meg legelőször, az ingert követő 30 percben. A PIN3 újraelosztása lehetővé teszi, hogy az auxin áramlás iránya eltolódjon az újrapozicionált gyökér alsó része felé. Mivel a folyamat gyors, ezért a pontosabb kiértékelés céljából egy mesterséges színkód rendszert használtunk, a mennyiségi változások kimutatására. Ebben a rendszerben a kék érték az alacsonyabb jelintenzitást, míg a piros a magasabb jelintenzitást jeleníti meg. A 27. ábrán látható hőtésképes kísérlet során (Kleine-Vehn és mtsai., 2010) cikkében leírtak szerint jártunk el. Ez a módszer pontosabb képet ad a PIN3-GFP fehérje lokalizációs változásairól a gravitropikus válasz alatt. A kísérlet során mind a függőlegesen, mind a 135°-ban elforgatott minták gyökércsúcs régiójáról 6 keresztmetszeti képet készítettünk, majd ezeket a képeket a Fluoview szoftver segítségével egymásra illesztettük (Z-stack technológia). Ezt követően a szoftver segítségével a GFP zöld fluoreszencia intenzitásától függően (ami arányos a GFP mennyiségével), egy kék (kevés) *versus* piros (sok) hőtésképet készítettünk. A csíranövényeket a PIN3-GFP polarizáltsága szerint rendszereztük. Azt találtuk, hogy a PIN3-GFP lokalizációja apoláris volt a függőlegesen nevelt növények 90%-ban, mind a vad típusú, mind a *crk5-1* növényi háttér esetében. 30 percnyi 135°-os gravistimulációt követően ismét lefényképeztük a gyökereket, majd szoftveresen kiértékeljük az adatokat. Azt tapasztaltuk, hogy mind a vad típus, mind *crk5-1* háttérben a PIN3-GFP poláris lokalizációja csak a növények 10%-ban volt tapasztalható.





**27. Ábra.** A PIN3-GFP auxin efflux hordozófehérje lokalizációja vad típusú ill. *crk5-1* mutáns háttérben, a gyökércsúcs régiójában. Egyhetes függőlegesen nőtt, ill. különböző ideig 135°-kal elforgatott csíranövények konfokális pásztázó mikroszkópos képe. A) PIN3-GFP mennyiségének Fluoview szoftverrel végzett hőtésképes kiértékelése, ahol a fehér nyilak a gravitációs vektor irányát,

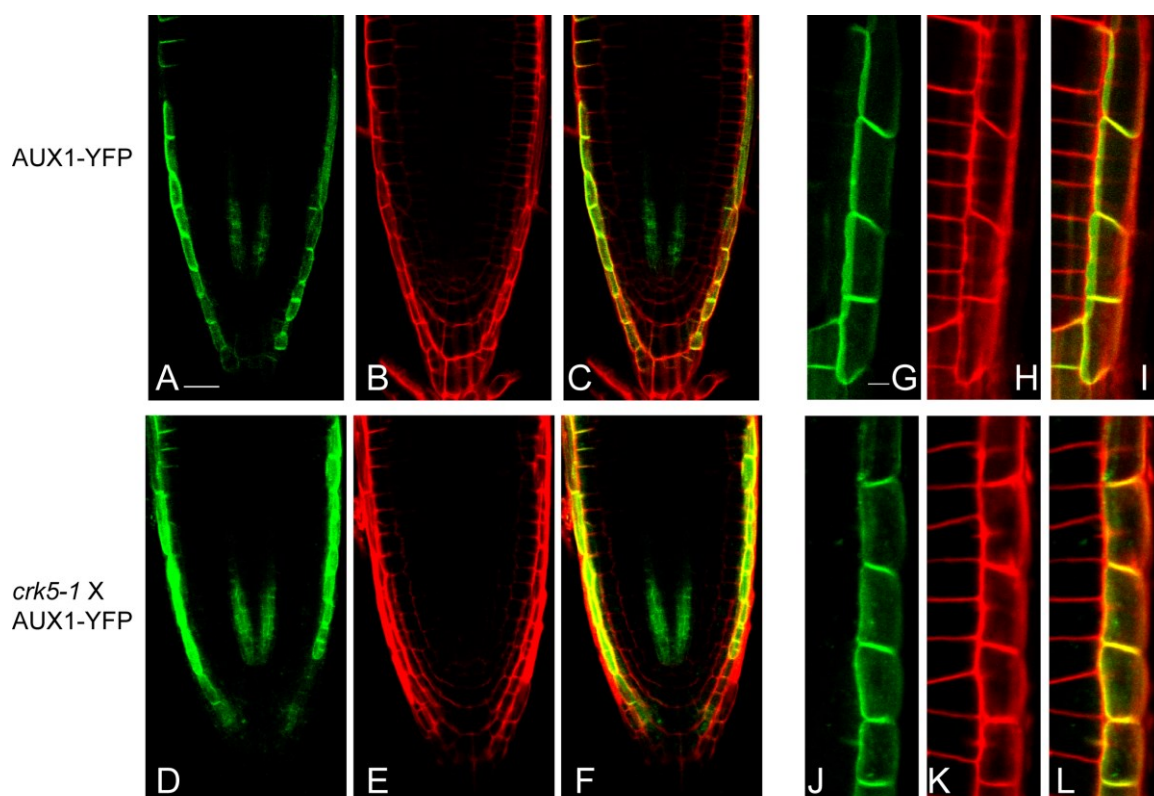
a fekete háromszögek a részlegesen polarizált PIN3-GFP fehérjét jelölik. A méretskála 20 $\mu$ m. A panel jobb oldalán a hőterkép színmélységeihez tartozó számértékek láthatók. **B)** A PIN3-GFP fehérje gyökércsúcsi konfokális pásztázó mikroszkópos képei különböző időpontokban a csíranövények 135°-os elforgatását követően. A gravitációs vektor irányát a fehér nyilak jelentik. Méretskála: 20 $\mu$ m.

A 27. ábra A paneljének jobb oldalán fekete háromszögek jelzik a polarizált PIN3-GFP fehérjét. A PIN3-GFP polarizációja nem változott a gravitációs inger hatására, maradt ugyanolyan, mint a függőlegesen nevelt növények esetében. A 27. ábra B paneljében egy hosszabb időintervallumban vizsgáltuk a PIN3-GFP polarizációs mintázatának változását és megállapíthattuk, hogy 30, 60, ill. 120 percnyi gravistimulus nem befolyásolta a PIN3-GFP lokalizációs mintázatát. A fenti kísérleti adatok tükrében megállapíthattuk, hogy a megvizsgált auxin efflux fehérjék lokalizációja gyökérben nem változik meg a *crk5-1* mutáns háttérben a vad típushoz képest, és ez igaz a gravitációs irány megváltoztatása után is.

Az influx csatornafehérjék közül az AUX1 fehérje lokalizációját vizsgáltuk részletesen. Az AUX1 fehérje egyrészt a gyökér bőrszöveti sejtsorában a szár felé irányuló, míg az elsődleges szállítónyalábokban a gyökércsúcs felé irányuló auxin transzportban vesz részt. AUX1 hiányában nem alakul ki megfelelő auxingrádiens a gyökér alsó és felső fele között gravistimulust követően, ezért az *aux1* mutáns agravitróp fenotípusú (Swarup és mtsai., 2001).

A 28. ábrán az AUX1-YFP lokalizációja látható a vad típusú ill. *crk5-1* mutáns gyökerekben. Az 5 napos függőlegesen folyamatos fényben nevelt növények gyökerét propídium-jodiddal (lásd 3.3.6) előkezeltük, majd konfokális pásztázó mikroszkóp segítségével fényképeztük. A propídium-jodid a festés során az élő sejtek sejtfalában felhalmozódik, a sejtek körvonala ezért jól kivehető piros színnel világít. A 28. ábra A szekciójában mutatott vad típusú gyökércsúcsban észlelt AUX1-YFP specifikus szignál a D szekcióban bemutatott *crk5-1* mutáns háttérben kapott AUX1-YFP jelhez hasonlítva sem jelintenzitásban, sem lokalizációban nem mutat különbséget. Ugyanez elmondható, ha a 28. Ábra B-C szekcióiban látható AUX1-YFP eloszlást összehasonlítjuk az E-F ábrán látottakkal. Nagyobb felbontású részletgazdagabb G-H-I ill. J-K-L látható felvételek összehasonlítása alapján is megállapítható, hogy az AUX1-YFP fehérje lokalizációja a gyökércsúcsi bőrszöveti sejtek alsó, és belső oldalsó felén egyforma a vad típusú és *crk5-1* mutáns gyökerekben.





**28. Ábra.** Az AUX1-YFP fehérje lokalizációja vadtípusú, illetve *crk5-1* mutáns növények elsődleges gyökerében. A folyamatos fényen függőleges pozícióban nevelt 5 napos csíranövényeket konfokális pásztázó mikroszkóp segítségével fényképeztük: **A, D, G, J**, az AUX1-YFP fúziós fehérje zöld színű jele, **B, E, H, K**, piros színű propídiumjodidos festése ugyanezen gyökereknek. **A+B=C**, **D+E=F**, **G+H=I** és **J+K=L**, a két megfelelő jelet a Fluoview szoftver illesztette egymáshoz, kiadva a zöld+piros=sárgás jelet. Méretskála: A-F: 25µm és G-L: 50µm.

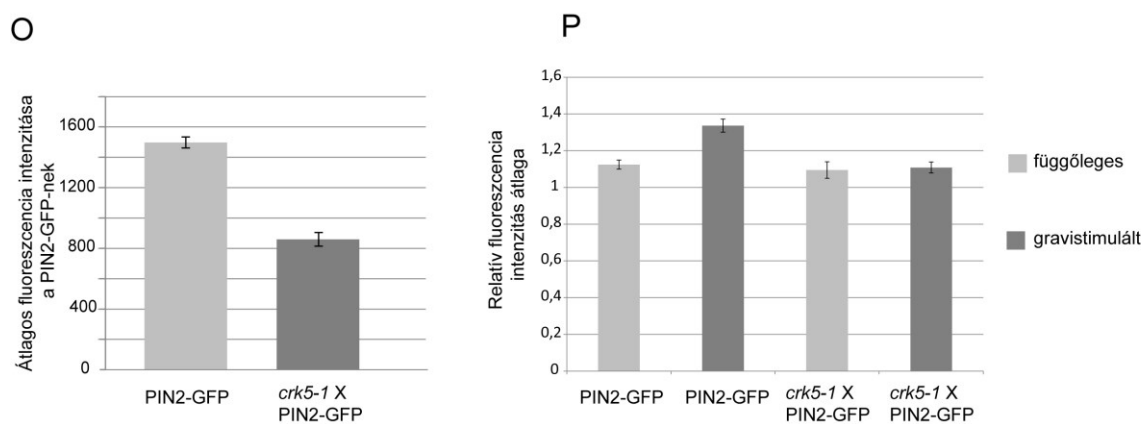
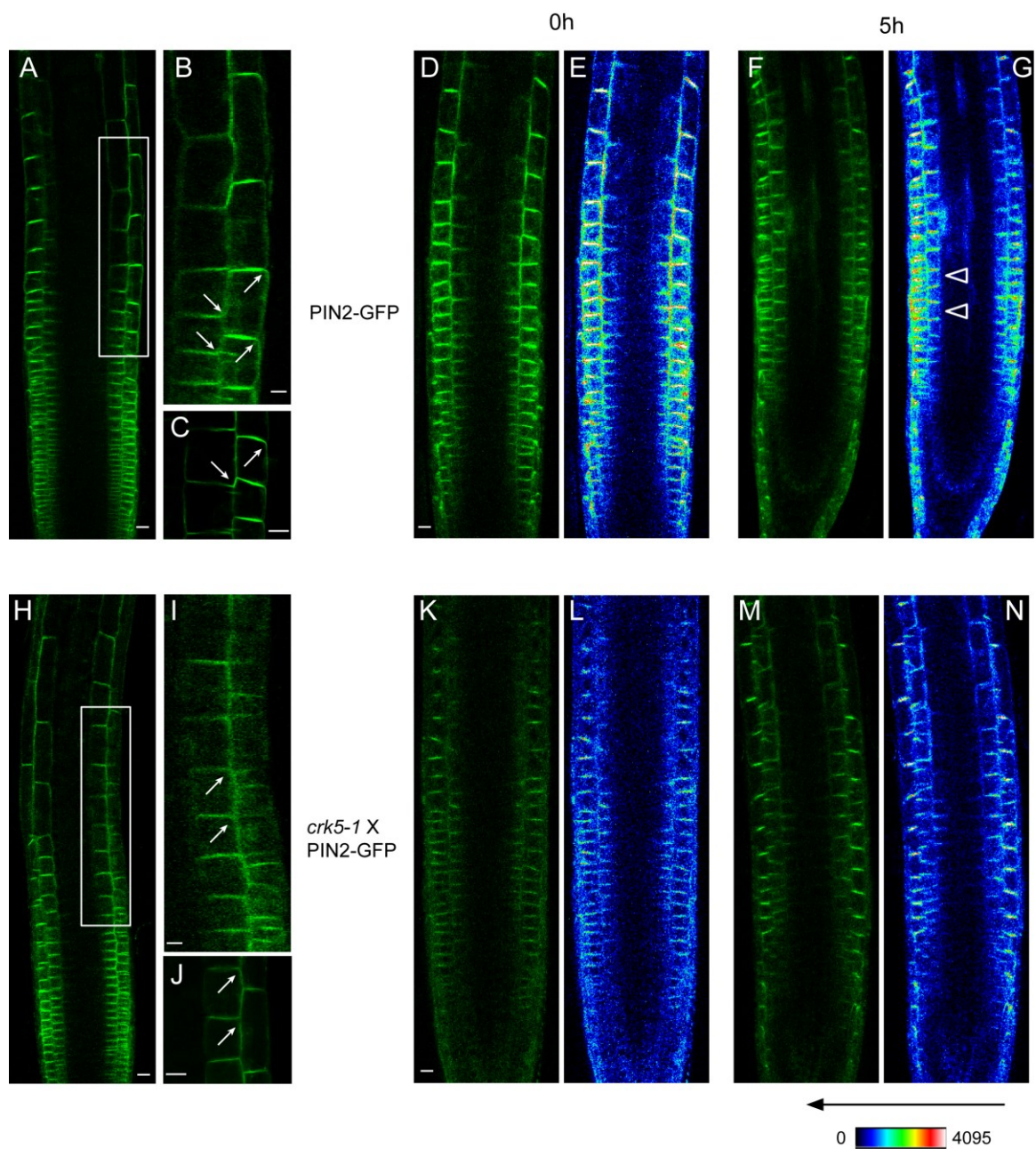
#### 4.12. A *crk5-1* mutáció megváltoztatja a PIN2 auxin export fehérje membránlokalizációját

Az eddigi kísérleti eredményekből levonhatjuk azt a következtetést, hogy a *crk5-1* mutánsban az AUX1, PIN1, PIN3, PIN4, PIN7 fehérjék lokalizációja nem változott meg. A gyökér gravitropikus válaszában az AUX1 és PIN3 fehérjek mellett döntő szerepe van a PIN2 auxin efflux hordozónak. A PIN2 fehérje egyenlőtlen megoszlása a gravistimulált gyökér alsó és felső fele között hozzájárul az auxin feldúsulásához a gyökér gravitropikus vektor irányába eső részén. A magasabb auxinszint a 90°-kal elforgatott gyökér alsó

szekciójában gátolja a sejtmegnyúlást, amíg az alacsonyabb auxin szint a felső szekcióban serkenti azt. Az egyenlőtlen megnyúlás a gyökér görbüléséhez vezet a gravitációs jel irányában. Mivel a *crk5-1* mutáns ebben a folyamatban sérült és az eddig vizsgált auxin transzport fehérjék lokalizációjában, kifejeződésében nem láttunk lényeges különbséget a vadtípushoz képest, a PIN2 fehérjére fókuszáltunk a következőkben. A kísérletekhez különböző módszereket használtunk, és ezekhez először előállítottuk keresztezéssel a PIN2-GFP konstrukciót kifejeztető *crk5-1* mutáns vonalat. A PIN3-GFP esetében használt fluoreszcencia intenzitással arányos jelképzésen alapuló hőterképes képalkotó rendszert használtunk a Fluoview szoftver segítségével a PIN2-GFP fehérje membránlokalizációjában bekövetkező változások követésére.

Az előzetes kísérleti eredmények alapján az átmeneti zóna, amely az osztódási és megnyúlási rész közötti átfedő területet jelöli, volt a vizsgálatunk célja (Verbelen és mtsai., 2006; Baster és mtsai., 2013). A PIN2-GFP fehérje szintjének változását vizsgáltuk a gravitációs stimulus hatására. A függőlegesen növekedő gyökérben a PIN2-GFP jel intenzitása a gyökér két oldalát összehasonlítva a bőrszöveti sejtek alsó, ill. a fiatal cortex sejtek felső membránjában egyenletes. Gravistimuláció hatására ez az egyensúly a gyökér két oldala között felborul, a gyökér alsó felén (gravitációs vektor felé eső oldalán) a PIN2-GFP szintje megnövekszik, amíg a gyökér felső részén a szintje lecsökken vad típusú háttérben. A 29. ábrában összehasonlítottuk, hogy a *crk5-1* mutáns háttérben ez hogyan változik meg a vad típusú háttérhez képest. Az ábrán látható, hogy a függőlegesen nevelt *crk5-1* mutáns gyökerekben a PIN2-GFP fehérje lokalizációja változást mutat a vad típusú háttérhez képest a gyökér átmeneti zónájában. A 29. ábra B és C paneljeiben a vad típusú bőrszöveti sejtek csúcsi részén, míg a cortex sejtek alsó membránjaiban lokalizálódik a PIN2-GFP jel, amelyre a fehér nyilak mutatnak, szimbolizálva a lokalizáció irányultságát is. Ezzel szemben a *crk5-1* mutáns esetében a bőrszöveti sejtek felső plazmamembrán régiójában a PIN2-GFP jel figyelemreméltó csökkenést mutat, ugyanakkor a cortex rétegben a PIN2-GFP normális alapi elhelyezkedése sérülést szenved, és a fiatal cortex sejtek csúcsi része felé tolódik el. A 29. ábra I és J szekcióiban fehér nyilak mutatnak az eltolódott PIN2-GFP jelre, egyben szimbolizálva az irányultságot is.

Baster és mtsai. (2013) által leírt eredmények alapján lehetségesnek tűnt, hogy a PIN2-GFP szintjének csökkenésében a fokozott vakuoláris felhalmozódás, ill. degradáció játszik szerepet. Azonban Baster és mtsai. (2013) által leírt módon nem sikerült kimutatnunk fokozott PIN2-GFP vakuoláris felhalmozódást se fényben, se sötétben.



**29. Ábra.** A PIN2-GFP fehérje helyzetének és mennyiségének összehasonlítása vad típusú és *crk5-1* mutáns gyökerek átmeneti zónájában. A-C) Vad típusú gyökérátmeneti zónájában

konfokális pásztázó mikroszkóppal észlelt PIN2-GFP membránlokalizáció. A C ábrarészleten egy nagyobb felbontású rész lett az A ábra keretezett részéből kiemelve. A kis fehér nyilak a PIN2-GFP lokalizációjára mutatnak. **D-E)** PIN2-GFP lokalizáció a zöld fluoreszcens jelet követve és annak hőterképes értékelése. **F-G)** PIN2-GFP lokalizációja 135°-kal elforgatott öt órán keresztül gravitstimulált vad típusú gyökérben a zöld fluoreszcens jelet követve és annak hőterképes értékelése Fluoview szoftver segítségével. A G szekcióban fehér nyitott háromszögek az aszimmetrikus PIN2-GFP jelre mutatnak. A megváltozott gravitációs vektor irányát fekete nyíl jelöli. Méretskála az összes ábrarészleten: 25µm. **H-J)** *crk5-1* mutáns gyökerének átmeneti zónájában konfokális pásztázó mikroszkóppal detektált PIN2-GFP lokalizáció. Az I és J ábrarészleteken egy nagyobb felbontású rész a H, ábra keretezett részéből lett kiemelve. A fehér nyilak a PIN2-GFP megváltozott poláris lokalizációját jelzik az epidermisz és kortex sejtekben. **K-L)** PIN2-GFP lokalizációjának fluoreszcens felbontása és annak hőterképes változata függőlegesen nevelt *crk5-1* gyökérben. **M-N)** PIN2-GFP lokalizációja és annak hőterképes kiértékelése 135°-kal elforgatott öt órán keresztül gravitstimulált *crk5-1* növény gyökerében. Méretskála az összes ábrarészleten: 25µm. **O)** függőlegesen nevelt vad típusú és *crk5-1* mutáns gyökerekben észlelt PIN2-GFP jelintenzitások összehasonlítása a hőterképes adatok alapján, amelyek két biológiai ismétléssel és kísérletenként legalább 20-20 növényvel készültek. **P)** PIN2-GFP jelintenzitások átlagának összehasonlítása a függőleges ill. gravitstimulált gyökerek két oldala közötti aránypárok felhasználásával vad típusú és *crk5-1* mutáns háttérben, két ismétléssel és kísérletenként legalább 20-20 növényvel kapott adatok alapján. Az O és P szekciókban az oszlopok fölött az átlagtól való standard eltérés értékei láthatók.

A 29. ábra O szekciójának grafikonja szemlélteti a jelintenzitás csökkenésének mértékét. A konfokális pásztázó mikroszkóp által kapott képeket a Fluoview szoftver segítségével kiértékeltek, a hőterképes eljárást alkalmazva. Ez a lehetőség pontosabb képet ad a PIN2-GFP jelintenzitásról. Az adatokat Excel programba vittük és ott grafikusán ábrázoltuk, jelölve a szórást is. Az ábrán látható, hogy a *crk5-1* mutáns háttérben a PIN2-GFP jelintenzitása körülbelül 40%-os jelcsökkenést mutat a bórszövet, ill. kortex sejtjeiben a vad típusúhoz hasonlítva.

A függőlegesen növekvő vad típusú gyökér két oldala között a PIN2 fehérje mennyisége egyforma, így a két oldal közötti mennyiségi arány 1, a PIN2 eloszlása szimmetrikus. A gyökér függőlegesen képes növekedni, a kiegyenlített auxin transzport miatt. Gravitstimuláció hatására azonban ez az arány felborul, az újrapozicionált gyökér felső oldalán a PIN2 degradáció, míg a gyökér alsó oldalán a PIN2 fehérje szintje megnő. Ennek következtében a két oldal közötti arány eltolódik az alsó oldal javára, aszimmetrikus PIN2 eloszlás alakul ki. Ez a megnövekedett PIN2 szint hozzájárul a gyökér alsó felén az auxin szint növekedéséhez,

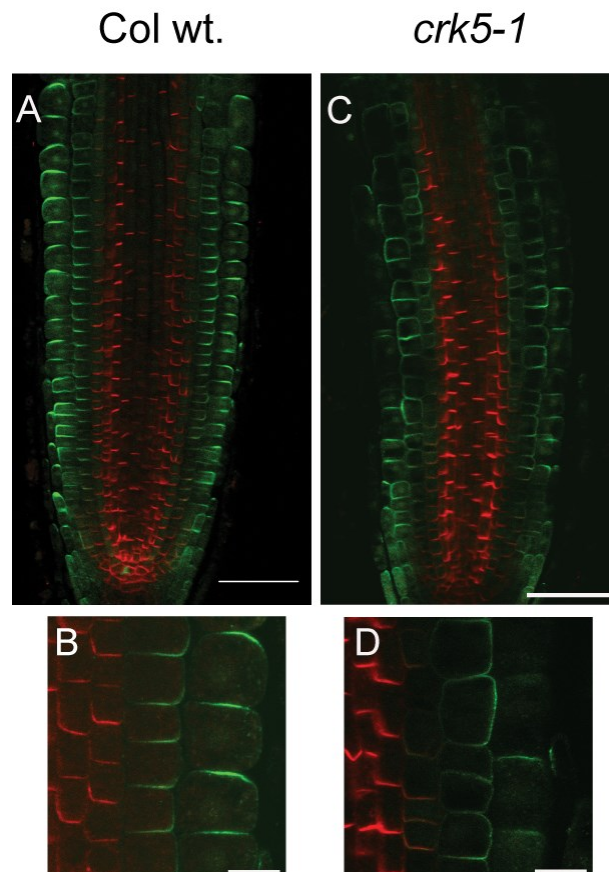
majd az ezt követő görbüléshez. Mivel a *crk5-1* mutáns esetében ez a görbülés késést mutat, a PIN2-GFP konstrukció felhasználásával megvizsgáltuk, hogy gravistimuláció hatására ez az aszimmetrikus mennyiségi eloszlás hogyan alakul ki. A függőlegesen (29. Ábra F és K) ill. 5 órás 135° elforgatással gravistimulált (29. Ábra F és M) vad típusú (29. Ábra D, E, F és G) és *crk5-1* mutáns (29. Ábra K, L, M és N) gyökerek átmeneti zónájában lokalizált PIN2-GFP lokalizációs szignálok fluoreszcencia jelintenzitásának értékeit a Fluoview szoftverrel készült hőtérképek mutatják a 29. ábra E és G (vad típus) ill. L és M (*crk5-1*) szekcióiban. A vad típusúval összehasonlítva (29. Ábra F és G), a *crk5-1* mutánsban (29. Ábra M és N) 5 óra gravistimuláció alatt nem alakult ki az aszimmetrikus PIN2-GFP eloszlás a gyökér két oldala között.

A Fluoview szoftverrel kiszámított hőtérképes intenzitásértékek felhasználásával viszonyítottuk egymáshoz a függőlegesen növekvő, ill. gravistimulált gyökerek bal és jobb oldalán, ill. alsó és felső szekcióiban mért PIN2-GFP mennyiségi értékeket. Az így nyert aránypárok, amint az várható volt, semmi eltérést nem mutattak a függőlegesen nőtt vad típusú és *crk5-1* mutáns gyökerek bal és jobboldali bórszövet és kortex sejtekben mért PIN2-GFP jelintenzitások között. Amíg a vad típusban 5 órás gravistimulációt követően egyenlőtlen PIN2-GFP eloszlás alakult ki a gyökér alsó és felső szekciói között (29. Ábra G szekciója, fehér háromszögek jelzik a PIN2-GFP fehérje felhalmozódását), a *crk5-1* mutánsban nem tapasztalunk aszimmetrikus PIN2-GFP fehérje felhalmozódást (29. Ábra N szekciója). A kapott numerikus adatokat Excel programba vittük és ott grafikusán ábrázoltuk, jelölve a szórást is (29. P Ábra). A vad típusú háttérben 5 órás gravistimulációt követően kialakult aszimmetrikus PIN2-GFP eloszlást a 1 értéktől való szignifikáns eltérés jelezte. A *crk5-1* mutáns esetében viszont a gravistimulációt követően is 1 közeli értéken maradt a gyökér két oldala között észlelt PIN2-GFP eloszlás aránya. Azaz, hasonlóan a DR5-GFP riporterrel kapott eredményekhez, a *crk5-1* mutáns gyökerében az aszimmetrikus PIN2-GFP eloszlás, és ezért a gyökér gravitációs jel irányába történő fordulása, is késett a vad típusúhoz hasonlóan.

A *crk5-1* mutánsban észlelt, a PIN2 poláris membránlokalizációját és gravistimuláció alatti aszimmetrikus felhalmozódását érintő változásokat további immunolokalizációs kísérletekkel igazoltuk. Ezekben a kísérletekben a PIN1 ill. a PIN2 fehérjék lokalizációját specifikus ellenanyagokkal mutattuk ki a plazmamembránhoz kapcsolt H<sup>+</sup>-ATP-áz proton pumpát használva belső kontrollként. A PIN1, PIN2 és H<sup>+</sup>-ATP-áz fehérjékhez kötődő elsődleges ellenanyagokat zöld, ill. piros színtartományban emittáló fluoreszcens



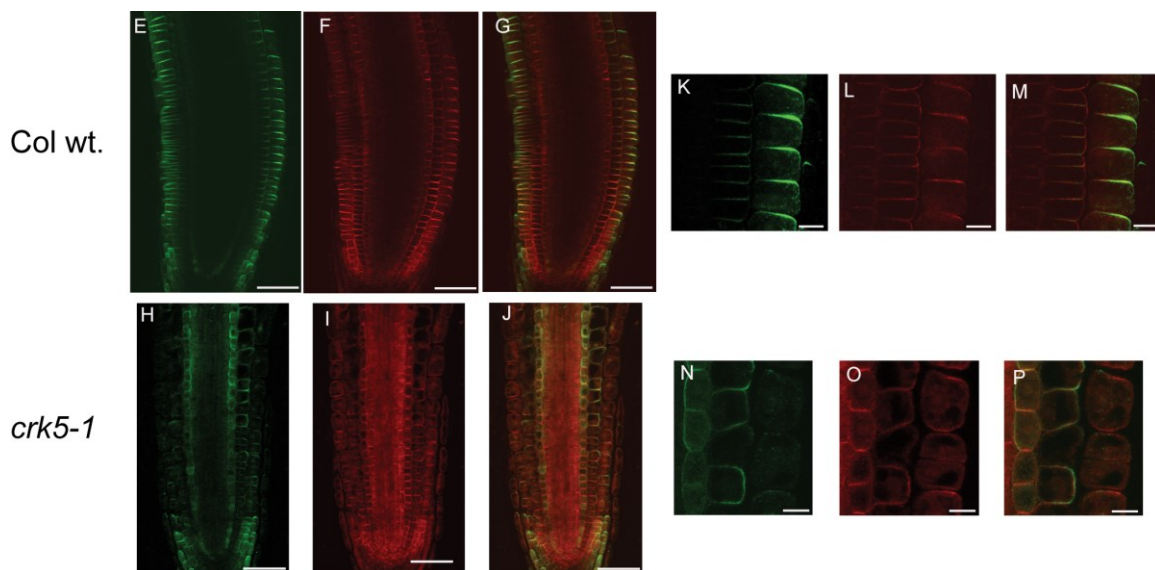
festékmolekulákhoz kapcsolt speciális másodlagos ellenanyagokkal tettük láthatóvá. A mintákat ismét konfokális pásztázó mikroszkóppal vizsgáltuk. A PIN1 ill.  $H^+$ -ATP-áz kontroll ellenanyagok egyidejű használatával próbáltuk kizárni a minta előkészítéséből adódó esetleges hibákat. A kísérletek során, fényen nevelt vad típusú és *crk5-1* mutáns növények gyökereit használtunk fel immunolokalizációhoz a 3.3.7. szekcióban leírtak szerint.



**30. ábra. A PIN1 és PIN2 fehérjék együttes immunolokalizációja vad típusú és *crk5-1* mutáns gyökerekben.** A PIN1 fehérje piros, a PIN2 fehérje jel pedig zöld színű az ábrán. Méretskála: A és C: 50 $\mu$ m, B és D: 10 $\mu$ m.

A 30. ábra a PIN1 és a PIN2 fehérjék kettős immunolokalizációjának membránmintázatait mutatja vad típusú ill. *crk5-1* gyökerekben. A PIN1 (piros) bazális plazmamembrán lokalizációja megegyezik mindkét vizsgált növényvonal szállítóyalábjában, ami összevág a korábban a PIN1-GFP fehérje lokalizációjára leírt adatokkal. A vad típusú gyökér bőrszöveti sejtjeiben a PIN2 fehérje a hajtás felé néző felső, amíg a kortex sejtekben a gyökérhez közelebbi alsó membránokban lokalizálódik (30. Ábra A és B). Ez teljes mértékben megegyezik az korábbi irodalmi, ill. előzetes kísérleti

eredményekkel. Ezzel szemben a *crk5-1* gyökér átmeneti zóna epidermisz sejtjeinek hajtás felé néző felső membránjaiban az ellenanyaggal detektált PIN2 fehérje mennyisége nagymértékben lecsökkent és, amint azt a PIN2-GFP szignál vizsgálatánál is láttuk, a kortex sejtekben apoláris vagy felső (és nem bazális) membránlokalizációt mutat. Emellett, a PIN2 fehérje detektálható ektopikusan az endodermisz sejtek gyökér középtengely felőli belső membránjaiban is, ami egy esetleges vaszkuláris sejtek felé megemelkedett auxin effluxra utal. A 31. ábrán egy hasonló PIN2 immunolokalizációs kísérlet eredményei láthatók, amelyben belső kontrollként a membránkött  $H^+$ -ATP-áz-t használtuk. Zöld színnel a PIN2, míg piros színnel a kontroll  $H^+$ -ATP-áz mitázata látható.



**31. Ábra.** PIN2 (zöld) és  $H^+$ -ATP-áz (piros) egyidejű immunolokalizációja vad típusú (Col wt.) és a *crk5-1* mutáns gyökerekben. **E-G)** PIN2 (G) és  $H^+$ -ATP-áz (F) mintázatai és azok átfedése (G) vad típusú gyökérben. **H-J)** PIN2 (H) és  $H^+$ -ATP-áz (I) mintázat és azok átfedése (J) *crk5-1* gyökérben. **K-M)** PIN2 (K),  $H^+$ -ATP-áz (L) és a két mintázatai átfedése vad típusú gyökerek felnagyított kortex és epidermisz sejtrétegeiben. **N-P)** PIN2 (N),  $H^+$ -ATP-áz (O) és a két mintázat átfedése *crk5-1* gyökerek felnagyított kortex és epidermisz sejtrétegeiben. Méretskála az E, F, G, H, I és J szekciókban: 50 $\mu$ m; a K, L, M, N, O és P szekciókban: 10 $\mu$ m.

A 31. ábrán bemutatott immunolokalizációs mintázatok hasonlóan az előző eredményekhez azt mutatják, hogy a PIN2 az epidermisz sejtek felső, míg a kortex sejtek alsó plazmamembránjaiban lokalizálódik vad típusú gyökerekben. Az epidermisz sejtek felső membránjaiban a PIN2 lokalizációja részlegesen átfed a  $H^+$ -ATP-ázzal (31. Ábra E-G és K-M). A korábbi észlelésekkel megegyezően, a *crk5-1* mutáns bőrszöveti sejtjeinek apikális membránjaiban a PIN2 alig detektálható, amíg a citoplazmában megjelenő PIN2 jel a fehérje

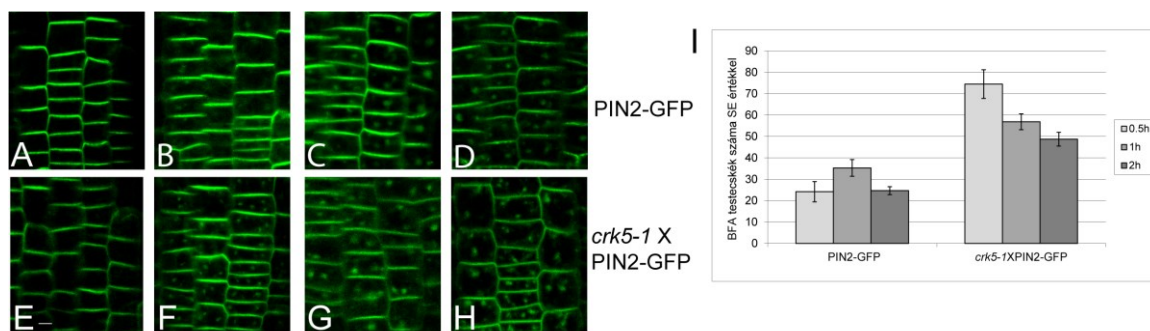
internalizációja utal. Ugyanakkor a kortex sejtekben megszűnik a PIN2 kizárólagos poláris lokalizációja az alsó membránban és egy diffúz apoláris, a sejtek laterális és felső membránjába kiterjedő PIN2 elmozdulás figyelhető meg (31. Ábra, H-J és N-P). A plazmamembránban mindenhol egyenletesen előforduló  $H^+$ -ATP-áz lokalizációját a *crk5-1* mutáció csak kismértékben befolyásolja. Ugyanakkor világosan látszik, hogy az ellenanyag minden sejtbe eljutott, vagyis a rendszer átjárható teljes mértékben az ellenanyagok számára, ami kizárja lehetséges műhibák előfordulását a PIN2-vel elvégzett immunolokalizációs kísérletekben.

Összefoglalva, a PIN2 mennyiségének lecsökkenése az epidermisz sejtek felső membránjaiban és a PIN2 ún. transzcitózisa a kortex alsó membránjaiból a hajtás felé néző felső membránokba jelzi az auxin traszport irányának megváltozását, a normális gyökércsúcs felé irányuló reciklizálás helyett a gyökér megnyúlási zónája felé a kortex sejteiben.

#### **4.13. A *crk5-1* mutáció megemeli a Brefeldin érzékenységet felgyorsítva a PIN2 fehérje internalizációját**

Alacsony koncentrációjú BFA (Brefeldin A) kezelés vad típusú növények esetében csökkent gravitropikus választ eredményez, mely azzal magyarázható, hogy a kortex sejtrétegben a PIN2 lokalizációja eltolódik a sejtek alsó membránjaiból a hajtás felé néző felső membránokba (Rahman és mtsai., 2010). BFA a PIN fehérjék exocitózisát gátolja, és ez által csökkenti azok poláris membránprezentációját. A membránreciklizálásban bekövetkező zavar a PIN2 fehérje stabilitását is csökkenti (Michniewicz és mtsai., 2007; Dhonukshe és mtsai., 2010). A *pip5k2* (foszfatidilinozitol monofoszfát 5-kináz 2) mutáns, amely a *crk5-1* mutánshoz hasonlóan megkésett gravitropikus választ mutat, azt találták, hogy a PIN2 BFA-val indukált internalizálódása gyorsabb a vad típusúhoz képest a gyökér bőrszöveti sejteiben (Mei és mtsai., 2012). Mivel a *crk5-1* mutáció hatása a PIN2 poláris lokalizációjára a kortex sejtekben is hasonlóságot mutatott az alacsony koncentrációjú BFA kezelése hatásához, összehasonítottuk a BFA-indukált PIN2 internalizáció sebességét vad típusú és *crk5-1* gyökerekben.

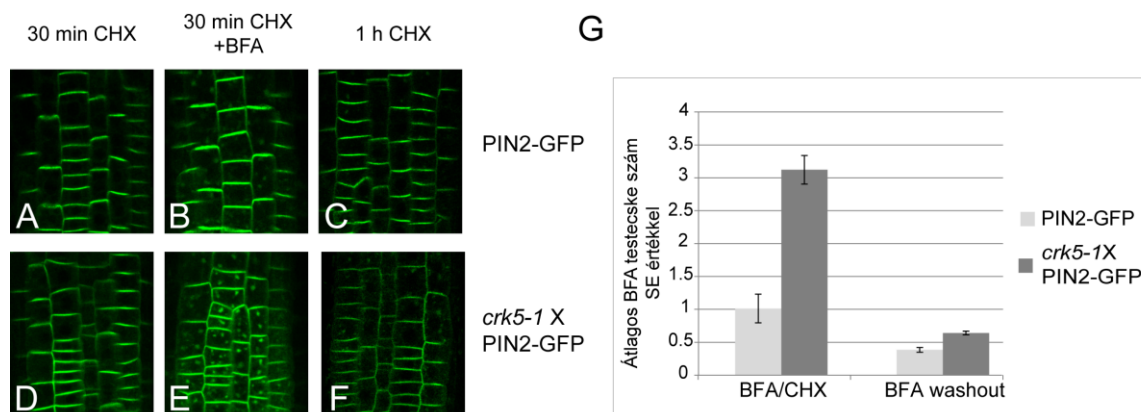




**32. Ábra. A vadtypushoz hasonlítva PIN2-GFP fehérje internalizálódása BFA kezelés hatására gyorsabb *crk5-1* mutáns gyökérsejtjeiben.** Öt napos függőlegesen nevelt csíranövényeket kezeltünk 50 $\mu$ M BFA-val 0 (A és E), 0.5 (B és F), 1 (C és G) és 2 (D és H) óra időtartamig és a mintákban konfokális pásztázó mikroszkóppal követtük a PIN2-GFP fehérje internalizálódása BFA testekbe. Vadtypusú minták A-D, *crk5-1* muták F-G. Méretskála: 25 $\mu$ m. I) A megvizsgált sejtekben a BFA testecskéket megszámoltuk, majd az adatokat Microsoft Excel program segítségével értékeltük, majd ábrázoluk, jelölve az átlag hibáját (SE). Három biológiai ismétlést alkalmazva, kísérletenként legalább tíz gyökeret vizsgáltunk.

Amint az 32. ábrán látható, *crk5-1* mutáns háttérben 50 $\mu$ M BFA kezelés a PIN2-GFP fehérje korábbi internalizációjához vezet a bőrszöveti sejtek plazmamembránjából a vadtypushoz hasonlítva. Harminc perc BFA kezelést követően, a PIN2-GFP tartalmú BFA testek száma körülbelül háromszorosa a vadtypusban észleltnek és ez a különbség a további mintavételi időpontokban is megmarad. Azaz a *crk5-1* mutáns BFA érzékenysége, legalább is a PIN2-GFP internalizációját illetően, a vadtypusnál magasabb.

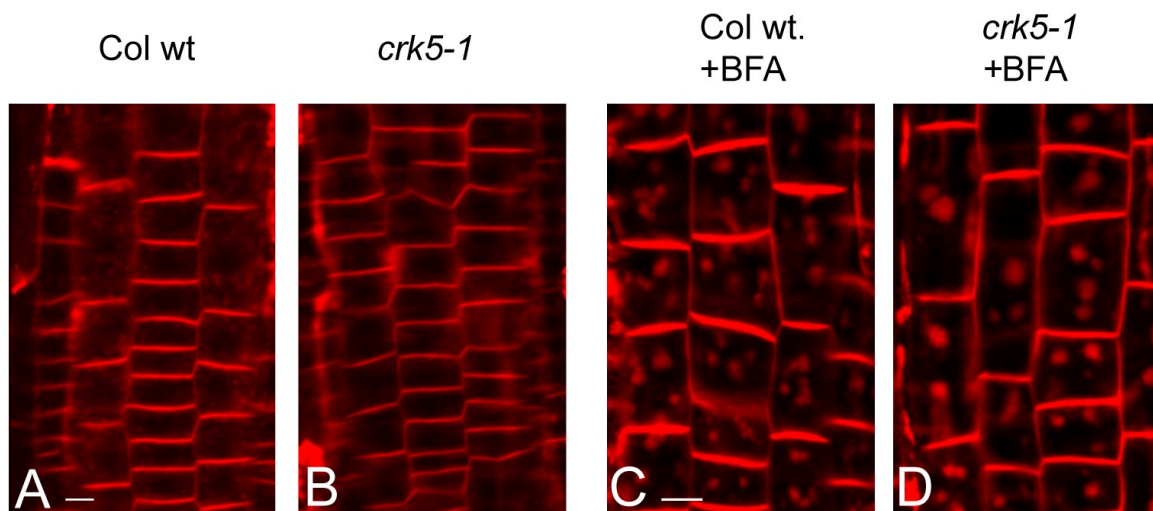
Azt kizárandó, hogy esetleg a *crk5-1* mutánsban észlelt magasabb PIN2-GFP prezentáció a BFA testekben egy megemelt *de novo* fehérjeszintézisnek köszönhető, a fenti kísérleteket megismételtük cikloheximid fehérje bioszintézis inhibitor jelenlétében. A fentiekhez hasonlóan, ötnapos csíranövényeket kezeltünk 50 $\mu$ M cikloheximiddel (CHX) 30 percig, majd 50 $\mu$ M BFA-t adtunk további 30 percig és ezek után a BFA-t eltávolítottuk, de folytattuk a CHX kezelést további 1 órán keresztül (33. Ábra).



**33. Ábra.** A PIN2-GFP fehérjét tartalmazó BFA testecskék számának változása a fehérje bioszintézis gátló CHX jelenlétében vad típusú és *crk5-1* mutáns háttérben. A-F) A PIN2-GFP fehérje internalizálódásának összehasonlítása vad típusú (A-C) és *crk5-1* (D-F) bőrszöveti sejtekben 30 perc CHX (A és D) és ezt követő CHX+BFA (B és E) kezelések, ill. a BFA megvonást követő 1 órás CHX kezelés során konfokális pásztázó mikroszkópiával. Méretskála: 25µm. G) Az A-F kísérleti lépésekben a BFA testecskéket megszámláltuk a sejtekben, az adatokat Microsoft Excel program segítségével értékeltük és ábrázoltuk, jelölve az átlag hibáját (SE). Három biológia ismétlést használva, kísérletenként legalább tíz gyökeret vizsgáltunk.

A fehérje-bioszintézis gátló cikloheximid (CHX) nélkül BFA hatására a *crk5-1* mutáns epidermisz sejtekben körülbelül háromszor annyi BFA test keletkezett, mint a vad típusú háttérben. A CHX+BFA együttes alkalmazásával is hasonló eredményt kaptunk, amint az a 33. ábra G paneljén látható. A CHX kezelés önmagában nem befolyásolta a BFA testek számát a *crk5-1* mutánsban a vad típusúhoz képest. Ez azt jelenti, hogy a *crk5-1* mutáció okozta BFA érzékeny exocitózis csökkenése (ami a fehérje BFA testekben való felhalmozódását elősegíti) a PIN2-GFP fehérje új szintézisének mértékétől független.

Teh és Moore (2007) vizsgálataiból tudjuk, hogy az FM4-64 membrán-specifikus festék felhasználható az endocitózis mértékének a vizsgálatára. Ezért, összehasonlítottuk az endocitózis mértékét a *crk5-1* mutáns és a vad típus között BFA jelenlétében és hiányában.



**34. Ábra.** Az FM4-64 membránfesték endocitózisának mértéke a *crk5-1* mutánsban a vadtípushoz hasonlóan. Négynapos vadtípusú (A és C) ill. *crk5-1* (B és D) csíranövényeket kezeltünk 5 $\mu$ M FM4-64-el 30 percig BFA hiányában (A és B) ill. 50 $\mu$ M BFA jelenlétében (C és D). Az inkubációt követően, a gyökerek bőrszöveti sejtjeiről konfokális pásztázó mikroszkópos képeket készítettünk. Méretskála: 25 $\mu$ m. A mintaszám legalább 20 volt kísérletenként.

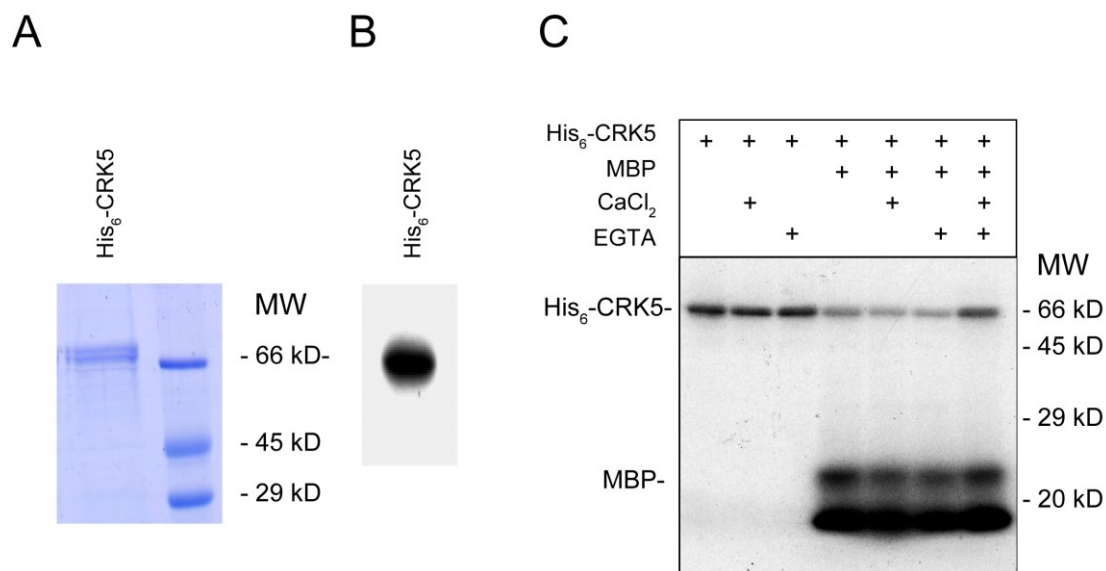
A 34. ábrán látható, hogy BFA nélkül a *crk5-1* mutáns esetében a membránspecifikus FM4-64 festék endocitózisa lassabb, ugyanis a vadtípusú háttérben több az FM4-64 festett citoplazmatikus membránvezikulumok mennyisége (34. Ábra A és B). Ezzen szemben, a *crk5-1* mutáns magasabb BFA érzékenységének megfelelően a BFA kezelt *crk5-1* mutáns sejtekben észlelt BFA testek mérete a vadtípushoz hasonlóan sokkal nagyobb, ami az FM4-64 gyorsabb internalizálódását jelzi (34. Ábra, C és D). Ez támogatja Teh és Moore (2007) megfigyelését, hogy a BFA a GNOM fehérjétől függő exocitosis út gátlása mellett, fokozza az endocitózis sebességét is, azaz mind a membrán felé irányuló vezikuláris transzportot, mind a membránfehérjék vezikulába való internalizálódását befolyásolja. A fenti eredményekkel összhangban (34. Ábra), az FM4-64 festék gyorsabb internalizálódása *crk5-1* mutánsban így igazolja, a *crk5-1* mutáns megnövekedett BFA érzékenységét.

#### 4.14. A CRK5 géntermék tisztítása és protein kináz aktivitásának jellemzése

Az His<sub>6</sub> motívummal N-terminálisan jelölt CRK5 kinázt *E. coli*-ban kifejeztettük, majd a Ni-NTA affinitás tisztítási technológia segítségével közel homogénre tisztítottuk (lásd 3.2.6.). A fehérje tisztaságának és mennyiségének ellenőrzése után, a His<sub>6</sub>-CRK5 kináz aktivitását

radioaktív ( $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ )ATP jelenlétében vizsgáltuk. A CRK típusú kinázok a CDPK családba tartoznak, melyekre közösen jellemző a szerin/treonin kináz domén, ami egy foszfor csoportot képes az ATP (adenosin trifoszfát) molekuláról a célmolekulára (esetünkben fehérje szubsztrátra) juttatni, ill. a  $\text{Ca}^{2+}$ -kötő domén degenerációja miatti kalcium független a kináz aktivitás. A foszfát csoport révén a célfehérje kémia tulajdonságai megváltozhatnak, ami kihat az aktivitására, stabilitására, és lokalizációjára is. Mivel a CRK5 kináz szerkezetét tekintve nagyon hasonlít más jellemzett CRK kinázokra, ezért a reakciókörülmények megválasztásánál ezeket a hasonlóságokat figyelembe vettük.

A 35A Ábra az *E. coli*-ból izolált His<sub>6</sub>-CRK5 kináz fehérje tisztasági fokát illusztrálja 10%-os SDS-poliakrilamid gélelektroforézist követő Coomassie festés után, amíg a 35B Ábra a His<sub>6</sub>-CRK5 fehérjének anti-His<sub>6</sub> ellenanyaggal történt immunoblot detektálását mutatja. A His<sub>6</sub>-CRK5 fúziós fehérje mérete megegyezett az elvárttal (66 kD), és a tisztított fehérje nem szenvedett degradációt izolálása során. A következő lépésben kináz aktivitás vizsgálatot hajtottunk végre a 3.2.8. pontban leírtak szerint, amelyek a más CRK kinázokra leírt irodalmi adatokhoz hasonló eredményt szolgáltatottak. Nevezetesen, mind  $\text{Ca}^{2+}$ , mind a  $\text{Ca}^{2+}$ -kelátor EGTA jelenlétében a kináz képes volt autofoszforilációra ill. foszforilálta a mesterséges Mielin Bázikus Fehérje (MBP) szubsztrátot (35C Ábra).

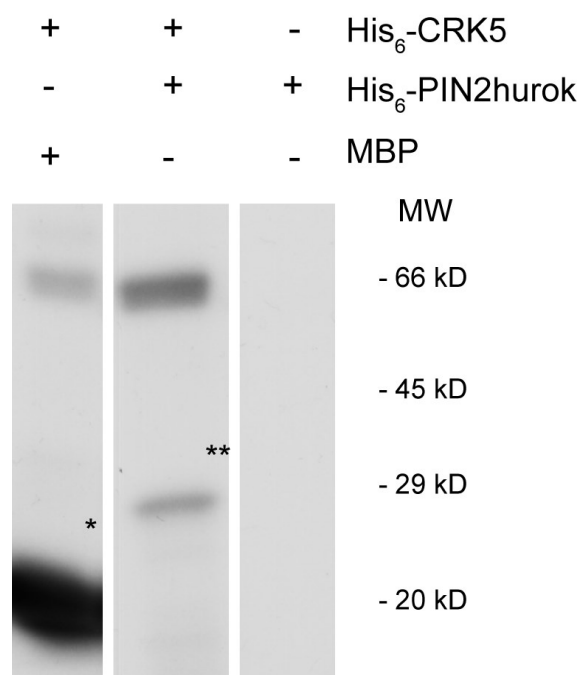


**35. Ábra. A His<sub>6</sub>-CRK5 kináz aktivitásának vizsgálata.** **A)** Tisztított His<sub>6</sub>-CRK5 kináz méret szerinti felbontása 10%-os SDS-poliakrilamid gélen és detektálása Coomassie festéssel; **B)** Az A ábrarészlet baloldali szekciójának anti-His<sub>6</sub> western blottja; **C)** A His<sub>6</sub>-CRK5 kináz

autofoszforilációjának ill. szubsztrát foszforilációs aktivitásának vizsgálata MPB-vel  $\text{Ca}^{2+}$  és  $\text{Ca}^{2+}$  kelátor jelenlétében.

#### **4.15. A CRK5 protein kináz foszforilálja *in vitro* a PIN2 auxin efflux hordozó citoplazmikus hurok doménjét**

A PIN auxin efflux hordozók poláris membrán reciklizálása a foszforilációs állapotuktól függ. Azt már korábban kimutatták, hogy az 1-es típusú PIN fehérjék (ún. PIN2, PIN3, PIN3, PIN4 és PIN7) a citoplazma felé orientált ún. hidrofil hurok doménjükben konzervált motívumok szerin vagy treonin aminosav pozíciói foszforilálódnak. Több helyet is azonosítottak és a prediktált foszforilációs helyek helyspecifikus mutagenézisével kimutatták, hogy a foszforiláció hiánya megváltoztatja a PIN fehérjék poláris lokalizációját és stabilitását (lásd 1.11 és 1.12). Mivel a *crk5-1* protein kináz mutációja a PIN2 auxin efflux hordozó fokozott internalizációjához, ill. megváltozott poláris membránlokalizációjához vezetett a gyökér epidermisz és kortex sejtjeiben, logikus kérdés volt, hogy a PIN2 fehérje vajon foszforilálódik-e a CRK5 kináz által. Ezért a PIN2 hidrofil hurkát kódoló cDNS szakaszt fehérje túltermelő vektorba klónoztuk, majd *E. coli*-ból a His<sub>6</sub> jelölt PIN2 hurokdomént tisztítottunk, a 3.2.6. fejezetben leírtak szerint. A PIN2 hurok foszforilálását hasonló módon tisztított His<sub>6</sub>-CRK5 kináz jelenlétében vizsgáltuk *in vitro* protein kináz tesztekben. A 36. ábra mutatja, hogy az általános CRK szubsztrát Mielin Bázikus Fehérjéhez hasonlóan a His<sub>6</sub>-CRK5 kináz képes foszforilálni a His<sub>6</sub>-PIN2hurok fehérjét is, melyet a felvételen a kettős csillag jelöl. A 66kD magasságban a His<sub>6</sub>-CRK5 kináz autofoszforilációs jele látható. A His<sub>6</sub>-PIN2 esetleges *E. coli*-ból származó aspecifikus kináz szennyezését az utolsó panel negatív foszforilációs tesztje zárja ki. A CRK5 foszforilálta His<sub>6</sub>-PIN2hurok fehérjét a szeparáló SDS-poliakrilamid gélből kivágtuk, majd gélben való tripszin emésztés után az SZBK tömegspektrometriai csoportjának segítségével felhasználtuk a His<sub>6</sub>-PIN2hurok *in vitro* foszforilációs helyeinek meghatározására a 3.2.9. pontban leírtak szerint.



**36. Ábra.** A His<sub>6</sub>-CRK5 kináz foszforilálja *in vitro* a PIN2 citoplazmatikus hurok doménjét, amely a PIN2 stabilitásának és poláris membránlokalizációjának szabályozásában játszik szerepet. A baloldali panel a His<sub>6</sub>-CRK5 kináz mielin bázikus fehérjével (MBP, egy csillaggal jelölve) végzett kontroll foszforilációs tesztjét mutatja. A kb. 66kDa méretű P<sup>32</sup>-jelölt fehérje az autofoszforilált CRK5-nek felel meg. A középső panelben \*\* jelölt kb. 28kDa méretű fehérje a CRK5 által foszforilált His<sub>6</sub>-PIN2 hurok domén protein. Végül, a jobboldali panel azt mutatja, hogy a His<sub>6</sub>-PIN2 hurokdomén protein nem szennyezett *E. coli*-ből származó protein kinázzal, azaz foszforilációja a középső panelben valóban CRK5 specifikus.

**1. Táblázat.** A His<sub>6</sub>-PIN2 szubsztrátban CRK5 foszforilálást követően azonosított foszfopeptidek listája.

	Peptide	Protein Mods	Start	End	Score
1	HGYT(Phospho)NSYGGAGAGPGGDVYSLQSSK	Phospho@281 282 284 285	279	303	50.6
2	HGYT(Phospho)NSYGGAGAGPGGDVYSLQSSK	Phospho@282 284	279	303	20.4
3	HGYTNS(Phospho)YGGAGAGPGGDVYSLQSSK	Phospho@281 282 284 285	279	303	22.6
4	HGYTNS(Phospho)YGGAGAGPGGDVYSLQSSK	Phospho@282 284	279	303	35.3
5	HGYTNSYGGAGAGPGGDVYS(Phospho)LQSSKGVTPR	Phospho@298 301 302 306	279	308	35.3
6	HGYTNSYGGAGAGPGGDVYS(Phospho)LQSSKGVTPR	Phospho@298=8	279	308	23.2
7	HGYTNSYGGAGAGPGGDVYS(Phospho)LQSSKGVTPR	Phospho@297 298	279	308	20.4
8	HGYTNSYGGAGAGPGGDVYS(Phospho)LQSSKGVTPR	Phospho@297 298	279	308	21.6
9	HGYTNSYGGAGAGPGGDVYS(Phospho)LQSSKGVTPR	Phospho@297 298 301 302 306	279	308	28.2
10	HGYTNSYGGAGAGPGGDVYSLQS(Phospho)SKGVTPR	Phospho@301 302	279	308	61.6
11	HGYTNSYGGAGAGPGGDVYSLQS(Phospho)SKGVTPR	Phospho@298 301 302	279	308	55.2
12	HGYTNSYGGAGAGPGGDVYSLQS(Phospho)SKGVTPR	Phospho@301 302	279	308	65
13	HGYTNSYGGAGAGPGGDVYSLQS(Phospho)SKGVTPR	Phospho@297 298 301 302	279	308	17.7
14	HGYTNSYGGAGAGPGGDVYSLQSSKGVTPR(Phospho)PR	Phospho@297 298 301 302 306	279	308	40.8
15	GSSTDVST(Phospho)DPKVSIPPHDNLATKAMQNLIENMSPGR	Phospho@408 409 410 413 414	407	442	16.7

PIN1: KLHVTVRRSNASRS---DIYSRRSQGLS---ATPRPSNLTNAEIIYSIQSS:244  
 PIN2: KLHVTVRRSSAASSMISFNKSHGGGLNSSMTPRASNLTVGEIISVQSS:250  
 PIN3: KLHVTVRRSNASRR---SFCG-----PN---MTPRPSNLTGAIIYSI---:236  
 PIN4: KLHVTVRRSNASRR---SL-----M---MTPRPSNLTGAIIYSI---:233  
 PIN7: KLHVTVRRSNASRR---SFYG---GGGTN---MTPRPSNLTGAIIYSI---:239

PIN1: RNPTTPRCSSEFNHTDFYSMMAS---GGCRNS---NFGPG-----E--AVF:280  
 PIN2: REPTTPRASSFNQTDIFYAMFNASKA-SPRHGYENFYGGAAGAGPGGDVYGLG:300  
 PIN3: -STTPRCSSEFNHSDFYNNMVG---PGGRLS---NFGPA-----DMYSVQ:273  
 PIN4: -SSTPRCSSEFNHSDFYSVMVG---PGGRLS---NFGPA-----DLYSVQ:270  
 PIN7: -NTTPRCSSEFNHSDFYSMMVG---PGGRLS---NFGPA-----DMYSVQ:276

PIN1: GSKGTPPRCSNYSIEDGGPAKPTAAGTAAGAGRF-HYQSGSGGGGGGAHYF:329  
 PIN2: SSKGVTPRCSSEFNDEVMKT-AKKAGRGRSMGELYNNNS-----VPSYF:344  
 PIN3: SSRGTPPRCSSEFNENCA-----MASSPREGYYPGG-----GAGSYF:309  
 PIN4: SSRGTPPRCSSEFNEN-----NAVKYGFYNNNTNSSVPAAGSYF:307  
 PIN7: SSRGTPPRCSSEFNESCA-----MASSPREGYYPGG-----APGSYF:312

PIN1: APNFGMFSPNTHGGGGTAAGNAPVV-----GCKRQDGNCRDLHMF:370  
 PIN2: PPNPMTTGSTSGASGVKKKESGGGGS-----GGCVGVGGQNKEMNMF:386  
 PIN3: APNPEFSSSTTTSTANKSVNKNPKDVNTNQTTLP TGCKNSHDAKELHMF:359  
 PIN4: APNPEFSTGT-----GVSTKPNKTPKENQQQLQEKDSKASHDAKELHMF:351  
 PIN7: APNPEF-----STGNKTGSKAPKENHHH-----VCKSNSNDAKELHMF:350

PIN1: VWSSASPVSD-----VFCGGGHHADYSTATNDHQKDVKISVFQ----:411  
 PIN2: VWSSASPVSEANAKNAMTRGSSTDVST-----DPKVSIFPH-DN:425  
 PIN3: VWSSNGSPVSDRAGLNVFCGAPDNDQG--GRSDQG-AKETRMVLPDQSHN:406  
 PIN4: VWSSASPVSD-----VFCGAGLNVA--TEQSEQGAKEIRMVVSDQPRK:394  
 PIN7: VWSSNGSPVSDRAGLQVNDCA--NEQV--GKSDQGGAKETRMVLSDHTQN:396

**37. Ábra. A PIN1 auxin efflux hordozóban azonosított AGC3 PINOID és a PIN2-ben észlelt CRK5 foszforilációs helyek összehasonlítása.** A Michniewicz és mtsai. (2007) által tömegspektrometria analízissel kimutatott foszforilációs helyeket a PIN1 fehérje Ser337 és T340 pozícióiban (amelyekről Zhang és mtsai. (2010) kimutatták, hogy a PINOID kináztól függetlenek), sárga kiemeléssel jelöltük. A Huang és mtsai. (2010) által elvégzett komputer predikciók alapján valószínűsített és *in vitro* helyspecifikus mutagenézissel vizsgált lehetséges PID foszforilációs helyek pozícióit három TPRxS(S/N) motívumban piros háttér jelöli. Végül, az általunk talált CRK5 foszforilációs helyeket a PIN2 fehérje Thr282, Ser284, Ser289, Ser301, Thr306 és Thr414 pozícióiban zöld kiemeléssel jelöltük.

Amint azt a 37. ábra illusztrálja, a citoplazmikus hurok régió szekvenciái nagyfokú homológiát mutatnak a PIN1, PIN2, PIN3, PIN4 és PIN7 fehérjék között. A Huang és mtsai. (2010) által prediktált és a PIN1 fehérjében helyspecifikus mutagenézissel vizsgált TPRxS(S/N) motívumok PID kináz szerin foszforilációs helyei megtalálhatók az összes PIN faktorban, azaz nem PIN1 specifikusak. A Zhang és mtsai. (2010) által definiált PID-független Ser337 és T340 foszforilációs helyek, amelyeket korábban Michniewicz és mtsai. (2007) ugyanabból a munkacsoportból PID specifikus helyekként publikált a PIN1 fehérjében, csak a PIN1 és PIN3 fehérjékben konzerváltak. A PIN2 citoplazmás hurokdoménben talált hat (37. Ábra: Thr282, Ser284, Ser289, Ser301, Thr306 és Thr414) CRK5 foszforilációs helyből a Thr282, Ser284 és Thr414 helyek PIN2 specifikusak és hiányoznak minden más PIN fehérjéből. Ezzel szemben a Ser289 és Ser301 CRK5 foszforilációs helyek konzerváltak a PIN3, PIN4 és PIN7 fehérjékben, amíg a Thr306 pozíció közös az összes PIN fehérje szekvenciájában. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a CRK5 kináz valószínű képes más PIN auxin efflux hordozókat is foszforilálni és nemcsak PIN2 specifikus. Észleléseink alapján, a CRK5 kináz inaktiválása a gravitropikus válasz késéhez vezet és a PIN2 internalizációját ill. poláris membránlokalizációját specifikusan megváltoztatja, amíg más PIN faktorok funkcióját nem befolyásolja. Ezért logikus az az elvárás, hogy ezekért a hatásokért a *crk5-1* mutánsban a PIN2 más PIN fehérjében nem megtalálható aminosav csoportjainak hiányzó foszforilálása felelős. Ezek a Thr282, Ser284 és Thr414 pozíciók, amelyek további kicserélése a PIN2 fehérjében alaninra vagy a foszfoszerint ill. foszfotheonint funkcionálisan utánzó aspartátra vagy glutamátra felderítheti a jövőben a CRK5 kináz PIN2 specifikus foszforilálásának pontos szerepét a gyökér gravitropikus válaszában szabályozásában.



## V. DISZKUSSZIÓ

Munkánk során a PRL1 fehérje kölcsönható partnereként azonosított CRK5 kinázt jellemeztük, amely a CDPK kináz család CRK alcsaládjába tartozó nyolc egymással közeli rokonságot mutató protein kinázok egyike. A CRK családba tartozó kinázok nevüket a CDPK Related Kinases szavakból képezték. A CRK család közös jellemzője, hogy minden egyes tagja hordoz egy N-terminális mirisztilációs helyet, amelyet követ egy szerin/treonin kinázokban konzervált katalitikus domén, majd egy autoinhibitor domén, ill. a C-terminális vég közelében elhelyezkedő néhány módosult EF-kéz motívum, melyek  $\text{Ca}^{2+}$ -kötő képessége elveszett (Harmon és mtsai., 2000). Az *Arabidopsis* CRK5 kináz génje a genom szekvenálása során az At3g50530 jelölést kapta, ami jelzi, hogy a 3-as kromoszómán lokalizálódik. E munka alapvető célja a CRK5 kináz regulátor funkcióinak jellemzése volt *Arabidopsis*-ban. E cél megvalósítása érdekében a kutatás különböző fázisaiban több német kutatócsoporttal alakítottunk ki eredményes együttműködést.

A CRK5 kináz aktivitásának jellemzése során bebizonyítottuk, hogy a család más fajokban ismert eddigi tagjaihoz hasonlóan, a CRK5 kináz aktivitásához és aktiválásához sem szükséges a  $\text{Ca}^{2+}$ -ion jelenléte. A CRK5 autofoszforylációval képes aktiválódni és  $\text{Ca}^{2+}$ -ion hiányában is foszforylálja az in vitro mesterséges MBP szubsztrátot. A CRK5 kináz funkciójának meghatározása érdekében egy fordított genetikai megközelítést alkalmaztunk. A *CRK5* gén ismert szekvenciáinak felhasználásával, polimeráz láncreakción alapuló keresési stratégiával sikerült azonosítanunk egy olyan T-DNS inszerciós mutáns vonalat, amelyben a mutáns *CRK5* génről nem képződött funkcióképes fehérje. Így a továbbiakban rendelkezésünkre állt egy *crk5-1* null mutáns, ami lehetővé tette a mutáció által indukált új fenotípusok analizálásával a *CRK5* gén funkciójának tanulmányozását. Ennek során kimutattuk, hogy a *crk5-1* mutáns gravitációs válasza a vadtypushoz hasonlítva jelentős késést szenved, amely mind a gyökér pozitív és a szár negatív geotropizmusát érintette. Ezen kívül, a vadtypushoz hasonlítva, a *crk5-1* mutáns elsődleges gyökérmegnyúlása körülbelül 30%-os csökkenést mutat. Továbbá, a *crk5-1* mutáns 30%-al több oldalgyökeret fejleszt a vadtypushoz képest, ami a gyökérben a gravitációs válasz késéséhez hasonlóan az auxin homeosztázis megváltozására utalt. Ezért, további vizsgálatainkban a gyökér gravitropikus válaszában észlelt hiba okainak felderítésére fókuszáltunk.

A *crk5-1* mutánsban a keményítőtartalom Lugol festést követően nem mutatott különbséget a vadtypushoz képest, vagyis a gravitációs válasz késése nem volt magyarázható a gyökérsüvegben található jelérzékelő sztatocita sejtek rendellenes működésével, amelyekben a keményítőt tartalmazó amiloplasztiszok szedimentációja szükséges a gravitációs stimulusok elsődleges érzékeléséhez. Annak bizonyítására, hogy a gravitropikus válaszban észlelt defektet valóban a *crk5-1* mutáció okozta, genetikai komplementációs teszteket végeztünk el. Ezekhez, többféle konstrukciót is előállítottunk, amelyekkel a CRK5-kináz C-terminális végehez fuzionált GFP és GUS riporter fehérjék segítségével megvizsgálhattuk a *CRK5* gén szövet és sejtspecifikus expresszióját az egyedfejlődés során, valamint tanulmányozhattuk a CRK5 fehérje sejten belüli lokalizációját. Ezekben a konstrukciókban egy BAC klónból izoláltuk a *CRK5* gént, annak összes természetes szabályozó szekvencia elemét megtartva, és stop kodonját helyettesítettük azonos leolvasási fázisban beépített GFP ill. GUS kódoló szekvenciákkal. A GFP (zölden fluoreszkáló fehérje) és GUS ( $\beta$ -glükuronidáz) riporterek kódoló szekvenciáihoz fuzionált géneket hordozó konstrukciók *Agrobacterium* növényi transzformációs vektorba építése után azokat vadtypusú, ill. *crk5-1* mutáns növények kromoszómáiba építettük egy kópiában, majd a nyert transzformánsokból homozigóta vonalakat állítottunk elő.

A gCRK5:GUS konstrukciót hordozó vonalak vizsgálata kimutatta, hogy a *CRK5* gén a növény minden részében kifejeződik. A gyökércsúcsi régióban, szállítónyalábok mentén, ill. a virágzatban detektáltuk a legmagasabb CRK5-GUS fehérje szinteket, amit a *CRK5* mRNS valósidejű kvantitatív PCR mérései is támogattak. A sejtszintű fehérje lokalizációs vizsgálatokhoz előállított gCRK5:GFP konstrukcióval sikeresen komplementáltuk vadtypusúra a *crk5-1* mutáns jellegzetes fenotipikus hibáit, ami gyökér megnyúlás defektjét, a megemelkedett oldalgyökérszámot, ill. a gyökér és hajtás késői gravitropus válaszait a vadtypusban észlelt szintekre állította vissza. Ez azt is bizonyította, hogy a módosított gCRK5:GFP gén képes a *crk5-1* mutánsban inaktivált gén összes funkcióját ellátni.

A CRK5 fehérje N-terminális végén talált mirisztilációs hely azt jelezte, hogy a CRK5 fehérje valószínű membránlokalizált. A tranziens protoplaszt expressziós rendszerben és transzgénis növényekkel elvégzett konfokális pásztázó mikroszkópos vizsgálatokban a CRK-GFP fúziós fehérje plazmamembrán elhelyezkedést mutatott, amit western immunoblot technológia és speciális FM4-64 plazmamembrán festési módszer segítségével is bizonyítottunk. Normál növekedési körülmények között a CRK5-GFP fúziós fehérje a gyökérsejtekben U alakú, a gyökérfelszín felé orientált polaritást mutat. A bőrszöveti

sejtrétegben, a kortex, gyökérsüveg, ill. az újonnan kialakuló oldalgyökerek sejtjeiben is kimutatható a CRK5-GFP fehérje hasonló lokalizációs tulajdonsággal. A Brefeldin gombatoxin hatására, amely a fehérjék internalizációját fokozza a plazmamembránból és ugyanakkor gátolja a fehérjék transzportját a plazmamembránhoz, megváltozik a CRK5-GFP fúziós fehérje lokalizációja. A BFA kezelést követő 40-ik perctől kezdődően a CRK5-GFP fehérje kezd eltűnni a plazmamembránból, ami 90 perc múlva teljesnek mondható. A CRK5-GFP fehérje a sejtmag körüli régióban halmozódik fel, ebben szerepe lehet a CRK5 fehérjén található sejtmagi lokalizációs jelnek is. A sejtmagi CRK5 lehetséges funkciója még nem világos, de feltételezésünk szerint összefügghet az intronkivágódást aktiváló ún. NTC (nineteen complex) komplex PRL1 alegységével észlelt kölcsönhatással.

A *crk5-1* mutánsban talált gyökér gravitropizmus defekt az auxin homeosztázis lehetséges zavarára utalt. Ennek részletesebb vizsgálatára, egy auxin érzékeny DR5-GFP riportergén konstrukciót alkalmaztunk. Azt észleltük, hogy a *crk5-1* mutáns gyökércsúcsi régiójában a DR5-GFP jel intenzitása jóval alacsonyabb, mint a vadtypusban. Ez az alacsonyabb auxinszint a gyökércsúcs régiójában magyarázatul szolgálhat arra, hogy a gyökérmegnyúlás a vadtypushoz képest körülbelül 30%-os csökkenést mutat a *crk5-1* mutáns háttérben. Ugyanakkor a *crk5-1* mutáns háttérben kvantitatív valósidejű PCR-t használva nem találtunk különbséget a főbb auxin szintézisben, ill. lebontásban szerepet játszó gének transzkripciójában a vadtypussal összehasonlítva.

A gravistimulált gyökerek esetében megfigyelhető egy aszimmetrikus auxin gradiens kialakulása, amely jól nyomon követhető a DR5-GFP jel változásával. Az újrapozícionált gyökerek gravitációs vektor felé eső alsó oldalán a kialakuló auxin többlet hatására a DR5-GFP jelintenzitás megnőtt a vadtypusú háttérben 1-2 órával a gravistimulációt követően, míg a *crk5-1* mutáns háttérben ezt csak 9 óra múlva tapasztaltuk. Az auxin efflux inhibítor (NPA) és influx gátló (NOA) alkalmazásával választ kaphattunk arra, hogy a *crk5-1* mutáns gyökérben melyik rendszer hibája miatt lehet alacsonyabb a DR5-GFP jel a *crk5-1* mutáns gyökércsúcsi régiójában. Az NPA auxin efflux gátló hatására a gyökércsúcsban tovább csökkent a DR5-GFP jelintenzitás a *crk5-1* mutáns háttérben, amíg a NOA auxin influx inhibítor helyreállította a DR5-GFP jelintenzitást a vadtypusú szintre. Ezek az eredmények azt mutatták, hogy a *crk5-1* mutáció fokozza az auxin áramlást a gyökércsúcs felől a kortexen keresztül a szár felé az AUX1 influx hordozó közreműködésével. Ez a megfigyelés választ adott arra a kérdésre is, hogy a *crk5-1* mutánsvonalban, miért lehet kb. 30%-al több auxin indukált oldalgyökér képződést megfigyelni az elongációs zóna fölötti régióban.

Mivel *crk5-1* mutáció nem volt hatással az auxin bioszintézisben résztvevő gének kifejeződésére megvizsgáltuk, hogy a transzportban résztvevő auxin hordozókat kódoló gének expressziójában bekövetkező esteleges változás magyarázatul szolgálhat-e a megváltozott auxin eloszlásra. Összehasonlítva a *PIN1* (At1g73590), *PIN2* (At5g57090), *PIN3* (At3g70940), *PIN4* (At2g01420), és *PIN7* (At1g23080) auxin efflux és *AUX1* (At2g38120) ill. *LAX3* (At1g77690) influx hordozók génjeinek kifejeződését *crk5-1* mutáns, genetikailag komplementált *crk5-1/gCRK5:GFP* és vad típusú (Col wt.) hatterekben, nem tapasztaltunk lényeges különbséget.

Az auxin transzport iránya és mértéke a plazmamembránban polárisan elhelyezkedő efflux és influx fehérjék poláris elhelyezkedésétől és mennyiségétől függ. Konfokális pásztázó mikroszkópos vizsgálatokkal a *PIN1-GFP*, *PIN3-GFP*, *PIN4-GFP* és *PIN7-GFP* auxin efflux, valamint az *AUX1-YFP* influx fúziós fehérjéket vizsgáltuk a *crk5-1* mutáns és vad típusú hatterben. A megvizsgált fehérjék mindegyike hasonló poláris membránlokalizációt mutatott függőlegesen nevelt és 135°-kal elforgatott gravistimulált vad típusú és *crk5-1* mutáns növények gyökereiben. Azaz a *crk5-1* mutáció nem változtatta meg ezen auxin hordozók sejtbeli lokalizációjának szabályozását.

Ezért a továbbiakban részletesen megvizsgáltuk, hogy a *crk5-1* mutáció megváltoztatja-e a *PIN2* auxin efflux hordozó membránlokalizációját, amely a gyökér gravitációs válaszában a *PIN3* és *AUX1* fehérjek mellett döntő szerepet játszik. A gyökér átmeneti zónáját vizsgálva, amely régióknak kitüntetett szerepe van a gravitáció kiváltotta görbülési folyamatban (Verbelen és mtsai. 2006; Muraro és mtsai. 2013), azt tapasztaltuk, hogy a *crk5-1* mutánsban a *PIN2* fehérje szintje az epidermis sejtek hajtás felé néző felső membránjaiban lényegesen csökkent a vad típusúhoz képest. A vad típusú gyökerek kortex sejtsorában a *PIN2* fehérje a gyökércsúcsához közelebbi alsó plazmamembránban lokalizálódik. Ezzel szemben a *crk5-1* mutánsban a *PIN2* auxin efflux hordozó egyes sejtekben apoláris, de a sejtek többségében a felső sejtmembránban halmozódik föl, és ezen kívül megjelenik a belső endodermisz vaszkulátúra felőli plazmamembránjaiban is. Ez arra utal, hogy a *crk5-1* mutánsban a *PIN2* efflux hordozó újrapozicionálása megváltoztatja az auxin export irányát a gyökércsúcsból az elongációs és oldalgyökér differenciációs zónák, ill. a vaszkuláris osztódó szövetek felé.

A gravitációs stimulus során kialakuló aszimmetrikus *PIN2* mennyiségi eloszlás a gyökér két az alsó és felsőoldala között, amely aszimmetrikus auxin eloszláshoz vezet, a

*crk5-1* mutáns esetében nagy késést mutat a vadtípushoz képest és ezért hasonlóan késik az ezt követő gyökér görbülési válasz is a gravitációs jel irányában. Ennek egyik oka, hogy a PIN2 megváltozott poláris membránlokalizációnak következtében a normális, kortexen keresztül a gyökércsúcs felé irányuló auxin reciklizáció folyamata hibás és az auxin transzport a gyökércsúcsból az elongációs zóna irányába megemelkedik.

A PIN2 megváltozott poláris lokalizációs patternje a *crk5-1* mutánsban hasonló ahhoz, amit alacsony koncentrációjú BFA kezelés okoz vadtípusú gyökerekben, ahol a PIN2 bazális membránlokalizációja a hajtás felé néző felső membrán felé tolódik el a kortexben és ez által gátolja a gravitropus válasz kialakulását (Rahman és mtsai., 2010). Amint azt további kísérleteinkben kimutattuk, a *crk5-1* mutáns gyökerek átmeneti zónájának epidermisz sejt sorában nemcsak lecsökken a felső plazmamembránban lokalizált PIN2 fehérje szintje, hanem felgyorsult a PIN2 brefeldin-érzékeny internalizációja is.

A PIN fehérjék membrán reciklizálását, poláris membránlokalizációját és degradációját a citoplazmás ún. hurok doménjüknek foszforilációja szabályozza (Michniewicz és mtsai., 2007; Dhonukshe és mtsai., 2010). Ennek zavara kihat konzekvensen az auxin transzportra és azzal összefüggésben lévő folyamatokra is. A CRK5 kináz a PIN2 fehérjét a központi hidrofíl hurkon foszforilálja *in vitro* hat különböző pozícióban. Az AGC3 családba tartozó PINOID kináz, amelyről bizonyított, hogy szükséges a PIN2 fehérje felhalmozódásához az epidermisz sejtek felső membránjaiban biztosítva a normális auxin transzportot, eddigi ismereteink alapján olyan motívumokat foszforilál a PIN1 fehérjében, amelyek konzerváltak a PIN auxin efflux hordozó család összes tagjában, azaz a PIN1, PIN2, PIN3, PIN4 és PIN7 fehérjékben. Ezzel szemben, a hat PIN2-ben általunk azonosított CRK5 foszforilációs hely közül három csak a PIN2 fehérjében található meg, ami föltehetően magyarázattal szolgál arra, hogy a *crk5-1* mutáció miért csak a PIN2 funkcióját változtatja meg. Ennek bizonyítása a jövőbeli kísérletek egyik fontos célja.

Összefoglalva, az elvégzett vizsgálatok eredményei arra utalnak, hogy CRK5 kináz foszforilációja specifikusan szabályozza a PIN2 fehérje brefeldin-érzékeny membrán reciklizálását a gyökér átmeneti zóna bőrszöveti és kortex sejtjeiben. A CRK kináz család tagjaira jellemző a konzervált doménszerkezet az N-terminális variábilis régiót leszámítva, akárcsak az AGC kinázcsalád (PID, WAG1, D6PK; Ganguly és mtsai., 2012) tagjaira, amelyek szerepet játszhatnak a PIN fehérjék foszforilációjában. A CRK kinázok közötti nagyfokú hasonlóság miatt elképzelhető, hogy a család egyes tagjai hasonló sejt és szövet, ill.

PIN foszforilációs specifikitást mutatnak, ami magyarázatul szolgálhat arra, hogy a *crk5-1* mutáció miért okoz szelektív gravitropikus defekteket szemben az auxin szabályozás teljes összeomlásával. A foszforilációtól függő PIN szabályozási folyamatok, úgymint a membrán reciklizálás, stabilitás és aktivitás lehet, hogy több CRK kináz által szabályozott, ezért a CRK kinázcsalád, mint lehetséges PIN kináz család mindenképpen érdemesnek tűnik arra, hogy a továbbiakban részletesen tanulmányozzuk. A CRK kinázok gravitációs jelátvitelben betöltött egyéb szerepeinek további vizsgálata hasonlóan fontos és ugyanakkor sok kihívást rejtő izgalmas feladatnak tűnik.

## VI. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

A dolgozatban szereplő kísérleteket a Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Kutatóközpontjának Növénybiológiai Intézetében, az Arabidopsis Molekuláris Genetikai Csoport tagjaként végeztem. Bizonyos kísérleteket Dr. Koncz Csaba vezette csoportban a kölni Max Planck Intézetben hajtottam végre. Szeretnék köszönetet mondani mindenkinek, aki segítségemre volt e hosszú munka során. Elsősorban köszönöm Dr. Koncz Csabának, akinek szakmai irányítása segítőkészsége és nagyfokú szakmai tudása nélkül ezen dolgozat, illetve a dolgozat alapját képező cikk nem jöhetett volna létre. Köszönettel tartozom témavezetőimnek, Dr. Cséplő Ágnesnek és Dr. Szabados Lászlónak, aki az Arabidopsis Molekuláris Genetikai Csoport vezetője is egyben, hogy hozzájárultak mind anyagilag, mind szellemileg a kísérletes munka kivitelezéséhez. Köszönöm Dr. Ormos Pál jelenlegi főigazgató és Dr. Dudits Dénes volt fő és intézet igazgató uraknak, valamint Dr. Vass Imre jelenlegi intézeti igazgatónak, hogy munkámat lehetővé tették, támogatták. Külön köszönettel tartozom Dr. Ferhan Ayaydinnek a Mikroszkópos Sejtanalízis (CI) Laboratórium vezetőjének a magas színvonalon végrehajtott konfokális mikroszkópos munkáért, hasznos szakmai tanácsokért, ötletekért. Az immunolokalizációs kísérletek magas fokú kivitelezéséért Dr. Olaf Tietz-nek, Klaus Palme vezette (Institute of Biology II/Botany, Centre of Biological Systems Analysis; Freiburg Institute of Advanced Sciences (FRIAS), Németország) csoportban. Köszönöm Dr. Koncz Zsuzsának, Dr. Páy Anikónak, Dr. Bakó Lászlónak a hasznos szakmai útmutatásokat, nélkülözhetetlen tanácsokat, valamint az Arabidopsis Molekuláris Genetikai Csoport jelenlegi és volt tagjainak is, kiemelve Dr. Ábrahám Editet, Dr. Zsigmond Laurát, Dr. Papdi Csabát, Király Anna Máriát, Dobó Mihályt, Valkai Ildikót, Boros Bogátát.

Valamint a CI laboratórium asszisztensének, Kószó Zsuzsannának. Köszönettel tartozom még a PIN2 foszforilációs helyeinek meghatározásáért Dr. Darula Zsuzsának, a Proteomikai Laboratórium munkatársának. Köszönettel tartozom még feleségemnek Dr. Domoki Mónikának szeretetért, türelméért, támogatásáért, valamint gyermekeimnek, Albertnek és Zsombornak, mindazért a sok jóért, amit tőlük kaptam. Végül, de nem utolsó sorban köszönöm szüleimnek a mindennemű támogatásukat.

## VII. IRODALOMJEGYZÉK

**Abas, L., Benjamins, R., Malenica, N., Paciorek, T., Wiśniewska, J., Wirniewska, J., Moulinier-Anzola, J.C., Sieberer, T., Friml, J., and Luschnig, C. (2006).** Intracellular trafficking and proteolysis of the Arabidopsis auxin-efflux facilitator PIN2 are involved in root gravitropism. *Nat. Cell Biol.* 8, 249–256.

**Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Leisse, T.J., Kim, C.J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D.K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadrinab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C.C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Deen, H., Geralt, M., Hazari, N., Hom, E., Karnes, M., Mulholland, C., Ndubaku, R., Schmidt, I., Guzman, P., Aguilar-Henonin, L., Schmid, M., Weigel, D., Carter, D.E., Marchand, T., Risseuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W.L., Berry, C.C. and Ecker, J.R. (2003)** Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301: 653-657.

**An YQ, McDowell JM, Huang S, McKinney EC, Chambliss S, Meagher RB (1996)** Strong, constitutive expression of the Arabidopsis ACT2/ACT8 actin subclass in vegetative tissues. *Plant J*, 10: 107-121.

**Arabidopsis Genome Initiative (2000).** Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408, 796–815.

**Baldwin, K.L., Strohm, A.K., and Masson, P.H. (2013).** Gravity sensing and signal transduction in vascular plant primary roots. *Am. J. Bot.* 100, 126–142.

**Bandyopadhyay, A., Blakeslee, J.J., Lee, O.R., Mravec, J., Sauer, M., Titapiwatanakun, B., Makam, S.N., Bouchard, R., Geisler, M., Martinoia, E., Friml J, Peer WA, Murphy AS. (2007).** Interactions of PIN and PGP auxin transport mechanisms. *Biochem. Soc. Trans.* 35, 137–141.

**Baster, P., Robert, S., Kleine-Vehn, J., Vanneste, S., Kania, U., Grunewald, W., De Rybel, B., Beeckman, T., and Friml, J. (2013).** SCF(TIR1/AFB)-auxin signalling regulates PIN vacuolar trafficking and auxin fluxes during root gravitropism. *EMBO J.* 32, 260–274.

**Bellini, T., Rippa, M., Matteuzzi, M., and Dallochio, F. (1986).** A rapid method for purification of myelin basic protein. *J. Neurochem.* 46, 1644–1646.

**Bender, R.L., Fekete, M.L., Klinkenberg, P.M., Hampton, M., Bauer, B., Malecha, M., Lindgren, K., A Maki, J., Perera, M.A.D.N., Nikolau, B.J., Carter CJ. (2013).** PIN6 is required for nectary auxin response and short stamen development. *Plant J.* 74, 893–904.

**Benjamins, R., Ampudia, C.S.G., Hooykaas, P.J.J., and Offringa, R. (2003).** PINOID-Mediated Signaling Involves Calcium-Binding Proteins. *Plant Physiol.* 132, 1623–1630.

**Benková, E., Michniewicz, M., Sauer, M., Teichmann, T., Seifertová, D., Jürgens, G. and Friml, J. (2003)** Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* 115: 591-602.

**Blakeslee, J.J., Peer, W.A., and Murphy, A.S. (2005).** Auxin transport. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8, 494–500.

**Blancaflor, E.B. (2013).** Regulation of plant gravity sensing and signaling by the actin cytoskeleton. *Am. J. Bot.* 100, 143–152.

**Blilou, I., Xu, J., Wildwater, M., Willemsen, V., Paponov, I., Friml, J., Heidstra, R., Aida, M., Palme, K., and Scheres, B. (2005).** The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature* 433, 39–44.

**Borhidi A., (1995)** A zárva-termők fejlődéstörténeti rendszertana



**Boutté, Y., Ikeda, Y., and Grebe, M.** (2007). Mechanisms of auxin-dependent cell and tissue polarity. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10, 616–623.

**Cazzonelli, C.I., Vanstraelen, M., Simon, S., Yin, K., Carron-Arthur, A., Nisar, N., Tarle, G., Cuttriss, A.J., Searle, I.R., Benkova, E., Mathesius U, Masle J, Friml J, Pogson BJ.** (2013). Role of the Arabidopsis PIN6 Auxin Transporter in Auxin Homeostasis and Auxin-Mediated Development. *PLoS ONE* 8, e70069.

**Chen, J.G., Ullah, H., Young, J.C., Sussman, M.R., and Jones, A.M.** (2001). ABP1 is required for organized cell elongation and division in Arabidopsis embryogenesis. *Genes Dev.* 15, 902–911.

**Chen, X., Naramoto, S., Robert, S., Tejos, R., Löffke, C., Lin, D., Yang, Z., and Friml, J.** (2012). ABP1 and ROP6 GTPase signaling regulate clathrin-mediated endocytosis in Arabidopsis roots. *Curr. Biol.* 22, 1326–1332.

**Czechowski T, Stitt M, Altmann T, Udvardi MK, Scheible WR** (2005) Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 139: 5-17.

**Clough SJ, Bent AF.**(1998) Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *Plant J.* 16(6):735-43..

**Dal Bosco, C., Dovzhenko, A., and Palme, K.** (2012a). Intracellular auxin transport in pollen: PIN8, PIN5 and PILS5. *Plant Signal Behav* 7, 1504–1505.

**Dal Bosco, C., Dovzhenko, A., Liu, X., Woerner, N., Rensch, T., Eismann, M., Eimer, S., Hegermann, J., Paponov, I.A., Ruperti, B., Heberle-Bors E., Touraev, A., Cohen, JD., Palme, K.** (2012b). The endoplasmic reticulum localized PIN8 is a pollen-specific auxin carrier involved in intracellular auxin homeostasis. *Plant J.* 71, 860–870.

**Dammann, C., Ichida, A., Hong, B., Romanowsky, S.M., Hrabak, E.M., Harmon, A.C., Pickard, B.G., and Harper, J.F.** (2003). Subcellular targeting of nine calcium-dependent protein kinase isoforms from Arabidopsis. *Plant Physiol.* 132, 1840–1848.

**Darwin, C.** (1880) The power of movement in plants. London: John Murray.

**Darwin, C., and Darwin, F.** (1881) The power of movement in plants. Appleton and Co., New York.;

**Dhonukshe, P., Huang, F., Galvan-Ampudia, C.S., Mähönen, A.P., Kleine-Vehn, J., Xu, J., Quint, A., Prasad, K., Friml, J., Scheres, B., Offringa, R.** (2010). Plasma membrane-bound AGC3 kinases phosphorylate PIN auxin carriers at TPRXS(N/S) motifs to direct apical PIN recycling. *Development* 137, 3245–3255.

**Dhonukshe, P., Tanaka, H., Goh, T., Ebine, K., Mähönen, A.P., Prasad, K., Blilou, I., Geldner, N., Xu, J., Uemura, T., Chory J, Ueda, T, Nakano, A, Scheres B, Friml, J.** (2008). Generation of cell polarity in plants links endocytosis, auxin distribution and cell fate decisions. *Nature* 456, 962–966.

**Ding, Z., Galván-Ampudia, C.S., Demarsy, E., Łangowski, Ł., Kleine-Vehn, J., Fan, Y., Morita, M.T., Tasaka, M., Fankhauser, C., Offringa, R., Friml, J.** (2011). Light-mediated polarization of the PIN3 auxin transporter for the phototropic response in Arabidopsis. *Nat. Cell Biol.* 13, 447–452.

**Ditta, G., Stanfield, S., Corbin, D., and Helinski, D.R.** (1980). Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 7347–7351.

**Du, W., Wang, Y., Liang, S., and Lu, Y.-T.** (2005). Biochemical and expression analysis of an Arabidopsis calcium-dependent protein kinase-related kinase. *Plant Science* 168, 1181–1192.

**Erdei, L.** (2004): Növényélettan, Növekedés és fejlődésélettan. Szerzők: Csiszár Jólán, Erdei László, Pécsváradi Attila, Szabó Margit, Tari Irma

**Fasano, J.M., Swanson, S.J., Blancaflor, E.B., Dowd, P.E., Kao, T.H., and Gilroy, S.** (2001). Changes in root cap pH are required for the gravity response of the Arabidopsis root. *Plant Cell* 13, 907–921.

**Feiz, L., Irshad, M., Pont-Lezica, R.F., Canut, H. and Jamet, E.** (2006) Evaluation of cell wall preparations for proteomics: a new procedure for purifying cell walls from Arabidopsis hypocotyls. *Plant Methods* 2: 10

**Friml, J., Wiśniewska, J., Benková, E., Mendgen, K., and Palme, K.** (2002). Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in Arabidopsis. *Nature* 415, 806–809.

**Friml, J., Benková, E., Mayer, U., Palme, K., Muster, G.** (2003a) Automated whole mount localisation techniques for plant seedlings. *Plant J.* 34, 115-124.

**Friml, J., Vieten, A., Sauer, M., Weijers, D., Schwarz, H., Hamann, T., Offringa, R., and Jürgens, G.** (2003b). Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of Arabidopsis. *Nature* 426, 147–153.

**Friml, J., Yang, X., Michniewicz, M., Weijers, D., Quint, A., Tietz, O., Benjamins, R., Ouwerkerk, P.B.F., Ljung, K., Sandberg, G., Hooykaas, P.J., Palme, K., Offringa, R.** (2004). A PINOID-dependent binary switch in apical-basal PIN polar targeting directs auxin efflux. *Science* 306, 862–865.

**Friml, J.** (2010). Subcellular trafficking of PIN auxin efflux carriers in auxin transport. *Eur. J. Cell Biol.* 89, 231–235.

**Furumoto, T., Ogawa, N., Hata, S., and Izui, K.** (1996). Plant calcium-dependent protein kinase-related kinases (CRKs) do not require calcium for their activities. *FEBS Lett.* 396, 147–151.

**Fülöp, K., Pettkó-Szandtner, A., Magyar, Z., Miskolczi, P., Kondorosi, E., Dudits, D., and Bakó, L.** (2005). The Medicago CDKC;1-CYCLINT;1 kinase complex phosphorylates the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II and promotes transcription. *Plant J.* 42, 810–820.

**Gallagher, S.R.** (1992) *GUS Protocols: Using the GUS gene as a Reporter of Gene Expression*. Academic Press, INC. London

**Galweiler, L., Guan, C., Muller, A., Wisman, E., Mendgen, K., Yephremov, A., and Palme, K.** (1998). Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in Arabidopsis vascular tissue. *Science* 282: 2226 – 2230,

**Ganguly, A., Sasayama, D., and Cho, H.-T.** (2012). Regulation of the polarity of protein trafficking by phosphorylation. *Mol. Cells* 33, 423–430.

**Geisler, M., and Murphy, A.S.** (2006). The ABC of auxin transport: the role of p-glycoproteins in plant development. *FEBS Lett.* 580, 1094–1102.

**Geldner, N., Friml, J., Stierhof, Y.D., Jürgens, G., and Palme, K.** (2001). Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature* 413, 425–428.

**Goto, N., Starke, M., and Kranz, A.** (1987). Effect of gibberellins on flower development of the pin-formed mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Arabidopsis Information Service* 23, 66–71.

**Greilhuber, J., Borsch, T., Müller, K., Worberg, A., Porembski, S. and Barthlott, W.** (2006), Smallest Angiosperm Genomes Found in Lentibulariaceae, with Chromosomes of Bacterial Size. *Plant Biology*, 8: 770-777

**Grolig, F., Döring, M., and Galland, P.** (2006). Gravisusception by buoyancy: a mechanism ubiquitous among fungi? *Protoplasma* 229, 117–123.

**Harmon, A.C., Gribskov, M., and Harper, J.F.** (2000). CDPKs - a kinase for every Ca<sup>2+</sup> signal? *Trends Plant Sci.* 5, 154–159.

**Harmon, A.C.** (2003). Calcium-regulated protein kinases of plants. *Gravit Space Biol Bull* 16, 83–90.

**Harper, J.F., Breton, G., and Harmon, A.** (2004). Decoding Ca(2+) signals through plant protein kinases. *Annu Rev Plant Biol* 55, 263–288.

**Hashiguchi, Y., Tasaka, M., and Morita, M.T.** (2013). Mechanism of higher plant gravity sensing. *Am. J. Bot.* 100, 91–100.

**Hegeman, A.D., Rodriguez, M., Han, B.W., Uno, Y., Phillips, G.N., Jr, Hrabak, E.M., Cushman, J.C., Harper, J.F., Harmon, A.C., and Sussman, M.R.** (2006). A phyloproteomic characterization of in vitro autophosphorylation in calcium-dependent protein kinases. *Proteomics* 6, 3649–3664.

**Henrichs, S., Wang, B., Fukao, Y., Zhu, J., Charrier, L., Bailly, A., Oehring, S.C., Linnert, M., Weiwad, M., Endler, A., Nanni, P., Pollmann, S., Mancuso, S., Schulz, A., and Geisler, M.** (2012). Regulation of ABCB1/PGP1-catalysed auxin transport by linker phosphorylation. *EMBO J.* 31, 2965–2980.

**Hrabak, E.M., Chan, C.W.M., Gribskov, M., Harper, J.F., Choi, J.H., Halford, N., Kudla, J., Luan, S., Nimmo, H.G., Sussman, M.R., Thomas, M., Walker-Simmons, K., Zhu, J.K., and Harmon, A.C.** (2003). The Arabidopsis CDPK-SnRK Superfamily of Protein Kinases. *Plant Physiol.* 132, 666–680.

**Huang, F., Zago, M.K., Abas, L., van Marion, A., Galván-Ampudia, C.S., and Offringa, R.** (2010). Phosphorylation of conserved PIN motifs directs Arabidopsis PIN1 polarity and auxin transport. *Plant Cell* 22, 1129–1142.

**Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H.** (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96, 23–28.

**Inoue, T., Kondo, Y., Naramoto, S., Nakano, A., and Ueda, T.** (2013). RAB5 Activation is Required for Multiple Steps in *Arabidopsis thaliana* Root Development. *Plant Cell Physiol* 54, 109–119.

**Jeong, J.C., Shin, D., Lee, J., Kang, C.H., Baek, D., Cho, M.J., Kim, M.C., and Yun, D.-J.** (2007). Isolation and characterization of a novel calcium/calmodulin-dependent protein kinase, AtCK, from *Arabidopsis*. *Mol. Cells* 24, 276–282.

**Kakar, K., Zhang, H., Scheres, B., and Dhonukshe, P.** (2013). CLASP-mediated cortical microtubule organization guides PIN polarization axis. *Nature* 495, 529–533.

**Karimi, M., Inzé, D. and Depicker, A.** (2002) GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci* 7: 193–195.

**Kerr, I.D., and Bennett, M.J.** (2007). New insight into the biochemical mechanisms regulating auxin transport in plants. *Biochem. J.* 401, 613–622.

**Kieffer, M., Neve, J., and Kepinski, S.** (2010). Defining auxin response contexts in plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13, 12–20.

**Kleine-Vehn, J., and Friml, J.** (2008). Polar targeting and endocytic recycling in auxin-dependent plant development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 24, 447–473.

**Kleine-Vehn, J., Leitner, J., Zwiewka, M., Sauer, M., Abas, L., Luschnig, C., and Friml, J.** (2008b). Differential degradation of PIN2 auxin efflux carrier by retromer-dependent vacuolar targeting. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 17812–17817.

**Kleine-Vehn, J., Langowski, L., Wisniewska, J., Dhonukshe, P., Brewer, P.B., and Friml, J.** (2008). Cellular and molecular requirements for polar PIN targeting and transcytosis in plants. *Mol Plant* 1, 1056–1066.

**Kleine-Vehn, J., Ding, Z., Jones, A.R., Tasaka, M., Morita, M.T., and Friml, J.** (2010). Gravity-induced PIN transcytosis for polarization of auxin fluxes in gravity-sensing root cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 22344–22349.

**Kleine-Vehn, J., Wabnik, K., Martinière, A., Langowski, L., Willig, K., Naramoto, S., Leitner, J., Tanaka, H., Jakobs, S., Robert, S., Luschnig, C., Govaerts, W., Hell, SW., Runions, J., Friml J.**(2011). Recycling, clustering, and endocytosis jointly maintain PIN auxin carrier polarity at the plasma membrane. *Mol. Syst. Biol.* 7, 540.

**Koncz C., Schell J.** (1986) The promoter of TI- DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol. Gen. Genet.* 204 : 383-396

**Koncz, C., Martini, N., Mayerhofer, R., Koncz-Kalman, Z., Körber, H., Redei, G.P., and Schell, J.** (1989). High-frequency T-DNA-mediated gene tagging in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 8467–8471.

**Koncz, C., Chua, N.H., and Schell, J.** (1992). *Methods in Arabidopsis research*. 482 pp.

**Koncz, C., Martini, N., Szabados, L., Hroudá, M., Bachmair, A., Schell, J.** (1994). Specialized vectors for gene tagging and expression studies. In *Plant Molecular Biology Manual*, vol. B2, pp. 1-22. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publisher.

**Koncz, C., Dejong, F., Villacorta, N., Szakonyi, D., and Koncz, Z.** (2012). The spliceosome-activating complex: molecular mechanisms underlying the function of a pleiotropic regulator. *Front Plant Sci* 3, 9.

**Krecek, P., Skupa, P., Libus, J., Naramoto, S., Tejos, R., Friml, J., and Zazimalová, E.** (2009). The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters. *Genome Biol.* 10, 249.

**Kumar, R., Agarwal, P., Tyagi, A.K., and Sharma, A.K.** (2012). Genome-wide investigation and expression analysis suggest diverse roles of auxin-responsive GH3 genes during development and response to different stimuli in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Mol Genet Genomics* 287, 221–235.

**Kurusu, T., Kuchitsu, K., Nakano, M., Nakayama, Y., and Iida, H.** (2013). Plant mechanosensing and Ca<sup>2+</sup> transport. *Trends Plant Sci.* 18, 227–233.

**Leclercq, J., Ranty, B., Sanchez-Ballesta, M.-T., Li, Z., Jones, B., Jauneau, A., Pech, J.-C., Latché, A., Ranjeva, R., and Bouzayen, M. (2005).** Molecular and biochemical characterization of LeCRK1, a ripening-associated tomato CDPK-related kinase. *J. Exp. Bot.* 56, 25–35.

**Leitner, J., Petrášek, J., Tomanov, K., Retzer, K., Pařezová, M., Korbei, B., Bachmair, A., Zažímalová, E., and Luschnig, C. (2012).** Lysine63-linked ubiquitylation of PIN2 auxin carrier protein governs hormonally controlled adaptation of Arabidopsis root growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 8322–8327.

**Liese, A., and Romeis, T. (2013).** Biochemical regulation of in vivo function of plant calcium-dependent protein kinases (CDPK). *Biochim. Biophys. Acta* 1833, 1582–1589.

**Lin, D., Nagawa, S., Chen, J., Cao, L., Chen, X., Xu, T., Li, H., Dhonukshe, P., Yamamuro, C., Friml, J., Scheres, B., Fu, Y., Yang, Z. (2012).** A ROP GTPase-dependent auxin signaling pathway regulates the subcellular distribution of PIN2 in Arabidopsis roots. *Curr. Biol.* 22, 1319–1325.

**Lindzen, E., and Choi, J.H. (1995).** A carrot cDNA encoding an atypical protein kinase homologous to plant calcium-dependent protein kinases. *Plant Mol. Biol.* 28, 785–797.

**Löfke, C., Luschnig, C., and Kleine-Vehn, J. (2013).** Posttranslational modification and trafficking of PIN auxin efflux carriers. *Mech. Dev.* 130, 82–94.

**Lu, Y.T., Hidaka, H., and Feldman, L.J. (1996).** Characterization of a calcium/calmodulin-dependent protein kinase homolog from maize roots showing light-regulated gravitropism. *Planta* 199, 18–24.

**Mano, Y., and Nemoto, K. (2012).** The pathway of auxin biosynthesis in plants. *J. Exp. Bot.* 63, 2853–2872.

**Mashiguchi, K., Tanaka, K., Sakai, T., Sugawara, S., Kawaide, H., Natsume, M., Hanada, A., Yaeno, T., Shirasu, K., Yao, H., McSteen P, Zhao, Y., Hayashi, K., Kamiya,**



**Y., Kasahara, H.** (2011). The main auxin biosynthesis pathway in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 18512–18517.

**Masson, P.H., Tasaka, M., Morita, M.T., Guan, C., Chen, R., and Boonsirichai, K.** (2002). Arabidopsis thaliana: A Model for the Study of Root and Shoot Gravitropism. *Arabidopsis Book* 1, e0043.

**Mathur, J., Koncz, C.** (1995) PEG-mediated protoplast transformation with naked DNA. *Methods Mol Biol* 82:267-276.

**Mathur, J. and Koncz, C.** (1998) Callus culture and regeneration. *Methods Mol. Biol.* 82: 31-34.

**Mei, Y., Jia, W.-J., Chu, Y.-J., and Xue, H.-W.** (2012). Arabidopsis phosphatidylinositol monophosphate 5-kinase 2 is involved in root gravitropism through regulation of polar auxin transport by affecting the cycling of PIN proteins. *Cell Res.* 22, 581–597.

**Meyerowitz, E.M.** (1992) Introduction to the Arabidopsis genome. In *Methods in Arabidopsis Research*, eds. C. Koncz, N-H. Chua and J.Schell, World Scientific, Singapore, pp. 100-118.

**Michniewicz, M., Zago, M.K., Abas, L., Weijers, D., Schweighofer, A., Meskiene, I., Heisler, M.G., Ohno, C., Zhang, J., Huang, F., Schwab, R., Weigel, D., Meyerowitz, E.M., Luschnig, C., Offringa, R., Friml, J.,** (2007). Antagonistic regulation of PIN phosphorylation by PP2A and PINOID directs auxin flux. *Cell* 130, 1044–1056.

**Morita, M.T., Tasaka, M.** (2004) Gravity sensing and signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 7, 712-718.

**Morita, M.T., Sakaguchi, K., Kiyose, S., Taira, K., Kato. T., Nakamura, T., Tasaka, M.** (2006) The C2H2-type zinc finger protein, SGR5, is involved in early events of gravitropism in Arabidopsis inflorescence stems. *Plant J.* 29, 619-628.

**Morita, M.T.** (2010). Directional gravity sensing in gravitropism. *Annu Rev Plant Biol* 61, 705–720.

**Mravec, J., Skůpa, P., Bailly, A., Hoyerová, K., Krecek, P., Bielach, A., Petrásek, J., Zhang, J., Gaykova, V., Stierhof, Y.-D., Dobrev, P.I., Schwarzerová, K., Rolcík, J., Seifertová, D., Luschnig, C., Benková, E., Zazímalová, E., Geisler, M., Friml, J.,** (2009). Subcellular homeostasis of phytohormone auxin is mediated by the ER-localized PIN5 transporter. *Nature* 459, 1136–1140.

**Müller, A., Guan, C., Gälweiler, L., Tanzler, P., Huijser, P., Marchant, A., Parry, G., Bennett, M., Wisman, E., Palme, K.** (1998) AtPIN2 defines a locus of Arabidopsis for root gravitropism control. *EMBO* 17:6903-6911.

**Nagawa, S., Xu, T., Lin, D., Dhonukshe, P., Zhang, X., Friml, J., Scheres, B., Fu, Y., and Yang, Z.** (2012). ROP GTPase-dependent actin microfilaments promote PIN1 polarization by localized inhibition of clathrin-dependent endocytosis. *PLoS Biol.* 10, e1001299.

**Németh, K., Salchert, K., Putnoky, P., Bhalerao, R., Koncz-Kálmán, Z., Stankovic-Stangeland, B., Bakó, L., Mathur, J., Ökrész, L., Stabel, S., Geigenberger, P., Stitt, M., Rédei, G.P., Schell, J., Koncz, C.** (1998). Pleiotropic control of glucose and hormone responses by PRL1, a nuclear WD protein, in Arabidopsis. *Genes Dev.* 12, 3059–3073.

**Okada, K., Ueda, J., Komaki, M.K., Bell, C.J., and Shimura, Y.** (1991). Requirement of the Auxin Polar Transport System in Early Stages of Arabidopsis Floral Bud Formation. *Plant Cell* 3, 677–684.

**Ottenshläger, I., Wolff, P., Wolverton, C., Bhalerao, R.P., Sandberg, G., Ishikawa, H., Evans, M., and Palme, K.** (2003). Gravity-regulated differential auxin transport from columella to lateral root cap cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 2987–2991.

**Pacioerek, T., and Friml, J.** (2006). Auxin signaling. *J Cell Sci* 119, 1199–1202.

Palme, K., and Gälweiler, L. (1999). PIN-pointing the molecular basis of auxin transport. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2, 375–381.

**Perrin, R.M., Young, L.S., Murthy.U.M., N., Harrison, B.R., Wang, Y., Will, J.L. Masson, P.H.** (2005) Gravity signal transduction in primary roots. *Annals of Botany*, 96, 737-743.

**Petrásek, J., and Friml, J.** (2009). Auxin transport routes in plant development. *Development* 136, 2675–2688.

**Petrásek, J., Mravec, J., Bouchard, R., Blakeslee, J.J., Abas, M., Seifertová, D., Wisniewska, J., Tadele, Z., Kubes, M., Covanová, M., Dhonukshe, P., Skupa, P., Benková, E., Perry, L., Krecek, P., Lee, O.R., Fink, G.R., Geisler, M., Murphy, A.S., Luschnig, C., Zazimalová, E., Friml, J.** (2006). PIN proteins perform a rate-limiting function in cellular auxin efflux. *Science* 312, 914–918.

**Pollmann, S., Dückting, P., and Weiler, E.W.** (2009). Tryptophan-dependent indole-3-acetic acid biosynthesis by “IAA-synthase” proceeds via indole-3-acetamide. *Phytochemistry* 70, 523–531.

**Quint, M., and Gray, W.M.** (2006). Auxin signaling. *Curr Opin Plant Biol* 9, 448–453.

**Rahman, A., Takahashi, M., Shibasaki, K., Wu, S., Inaba, T., Tsurumi, S., and Baskin, T.I.** (2010). Gravitropism of *Arabidopsis thaliana* Roots Requires the Polarization of PIN2 toward the Root Tip in Meristematic Cortical Cells. *Plant Cell* 22, 1762–1776.

**Rakusová, H., Gallego-Bartolomé, J., Vanstraelen, M., Robert, H.S., Alabadí, D., Blázquez, M.A., Benková, E., and Friml, J.** (2011). Polarization of PIN3-dependent auxin transport for hypocotyl gravitropic response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 67, 817–826.

**Reinhardt, D., Mandel, T., and Kuhlemeier, C.** (2000). Auxin regulates the initiation and radial position of plant lateral organs. *Plant Cell* 12, 507–518.

**Rigó G., Ayaydin F., Szabados L., Koncz C., Cséplő A.** (2008). Suspension protoplasts as useful experimental tool to study localization of GFP-tagged proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Acta Biol. Szeged.* 52: 59–61.

**Ríos, G., Lossow, A., Hertel, B., Breuer, F., Schaefer, S., Broich, M., Kleinow, T., Jásik, J., Winter, J., Ferrando, A., Farrás, R., Panicot, M., Henriques, R., Mariaux, J.B., Oberschall, A., Molnar, G., Berendzen, K., Shukla, V., Lafos, M., Koncz, Z., Rédei, G.P., Schell, J., Koncz, C.** (2002) Rapid identification of Arabidopsis insertion mutants by non-radioactive detection of T-DNA tagged genes. *Plant J.* 32: 243-253.

**Robert, S., Kleine-Vehn, J., Barbez, E., Sauer, M., Paciorek, T., Baster, P., Vanneste, S., Zhang, J., Simon, S., Čovanová, M., Hayashi, K., Dhonukshe, P., Yang, Z., Bednarek, S.Y., Jones, A.M., Luschnig, C., Aniento, F., Zažímalová, E., Friml, J.** (2010). ABP1 mediates auxin inhibition of clathrin-dependent endocytosis in Arabidopsis. *Cell* 143, 111–121.

**Sack, F.D.** (1997) Plastids and gravitropic sensing. *Planta*, 203, S63-S68.

**Saini, S., Sharma, I., Kaur, N., and Pati, P.K.** (2013). Auxin: a master regulator in plant root development. *Plant Cell Rep.* 32, 741–757.

**Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis T.** (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.*: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

**Santelia, D., Vincenzetti, V., Azzarello, E., Bovet, L., Fukao, Y., Düchtig, P., Mancuso, S., Martinoia, E., and Geisler, M.** (2005). MDR-like ABC transporter AtPGP4 is involved in auxin-mediated lateral root and root hair development. *FEBS Lett.* 579, 5399–5406.

**Sauer, M., Robert, S., and Kleine-Vehn, J.** (2013). Auxin: simply complicated. *J. Exp. Bot.* 64, 2565–2577.

**Schulz, P., Herde, M., and Romeis, T.** (2013). Calcium-dependent protein kinases: hubs in plant stress signaling and development. *Plant Physiol.*

**Simon, T.** (1994) *A magyarországi edényes flóra határozója (Harasztok-Virágos növények)*

**Sinclair, W., and Trewavas, A.J.** (1997). Calcium in gravitropism. A re-examination. *Planta* 203, S85–90.

**Strader, L.C., and Nemhauser, J.L.** (2013). Auxin 2012: a rich mea ho’oulu. *Development* 140, 1153–1157.

**Strader, L.C., and Bartel, B.** (2011). Transport and metabolism of the endogenous auxin precursor indole-3-butyric acid. *Mol Plant* 4, 477–486.

**Swarup, R., Friml, J., Marchant, A., Ljung, K., Sandberg, G., Palme, K., and Bennett, M.** (2001). Localization of the auxin permease AUX1 suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in the Arabidopsis root apex. *Genes Dev.* 15, 2648–2653.

**Swarup, R., Kramer, E.M., Perry, P., Knox, K., Leyser, H.M.O., Haseloff, J., Beemster, G.T.S., Bhalerao, R., and Bennett, M.J.** (2005). Root gravitropism requires lateral root cap and epidermal cells for transport and response to a mobile auxin signal. *Nat. Cell Biol.* 7, 1057–1065.

**Swarup, R., and Péret, B.** (2012). AUX/LAX family of auxin influx carriers-an overview. *Front Plant Sci* 3, 225.

**Székely, G., Abrahám, E., Cséplő, A., Rigó, G., Zsigmond, L., Csiszár, J., Ayaydin, F., Strizhov, N., Jásik, J., Schmelzer, E., Koncz, C., Szabados, L.** (2008). Duplicated P5CS genes of Arabidopsis play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis. *Plant J.* 53, 11–28.

**Taiz L., Zeiger E.,** (2010) *Plant Physiology*, Fifth Edition Publisher: Sinauer Associates

**Tasaka, M., Kato, T. and Fukaki, H.** (1999) The endodermis and shoot gravitropism. *Trends Plant Sci.* 4, 103-107.

**Teh, O., and Moore, I.** (2007). An ARF-GEF acting at the Golgi and in selective endocytosis in polarized plant cells. *Nature* 448, 493–496.

**Terasaka, K., Blakeslee, J.J., Titapiwatanakun, B., Peer, W.A., Bandyopadhyay, A., Makam, S.N., Lee, O.R., Richards, E.L., Murphy, A.S., Sato, F., Yazaki, K.. (2005).** PGP4, an ATP binding cassette P-glycoprotein, catalyzes auxin transport in *Arabidopsis thaliana* roots. *Plant Cell* 17, 2922–2939.

**The Arabidopsis Genome Initiative (2000).** "Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*". *Nature* 408 (6814): 796–815.

**Thimann, K.V. (1938). Hormones and the analysis of growth. *Plant Physiol.* 13: 437-449.**

**Titapiwatanakun, B., and Murphy, A.S. (2009).** Post-transcriptional regulation of auxin transport proteins: cellular trafficking, protein phosphorylation, protein maturation, ubiquitination, and membrane composition. *J. Exp. Bot.* 60, 1093–1107.

**Toyota, M., and Gilroy, S. (2013).** Gravitropism and mechanical signaling in plants. *Am. J. Bot.* 100, 111–125.

**Tromas, A., Paponov, I., and Perrot-Rechenmann, C. (2010).** AUXIN BINDING PROTEIN 1: functional and evolutionary aspects. *Trends Plant Sci.* 15, 436–446.

**Verbelen, J.-P., De Cnodder, T., Le, J., Vissenberg, K., and Baluska, F. (2006).** The Root Apex of *Arabidopsis thaliana* Consists of Four Distinct Zones of Growth Activities: Meristematic Zone, Transition Zone, Fast Elongation Zone and Growth Terminating Zone. *Plant Signal Behav* 1, 296–304.

**Vieten, A., Vanneste, S., Wiśniewska, J., Benková, E., Benjamins, R., Beeckman, T., Luschnig, C., and Friml, J. (2005).** Functional redundancy of PIN proteins is accompanied by auxin-dependent cross-regulation of PIN expression. *Development* 132, 4521–4531.

**Vitha, S., Yang, M., Sack, F.D., and Kiss, J.Z. (2007).** Gravitropism in the starch excess mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Am. J. Bot.* 94, 590–598.

**Wang, L., Liang, S., and Lu, Y.T.** (2001). Characterization, physical location and expression of the genes encoding calcium/calmodulin-dependent protein kinases in maize (*Zea mays* L.). *Planta* 213, 556–564.

**Wang, Y., Liang, S., Xie, Q.-G., and Lu, Y.-T.** (2004). Characterization of a calmodulin-regulated  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent-protein-kinase-related protein kinase, AtCRK1, from *Arabidopsis*. *Biochem. J.* 383, 73–81.

**Went, F.W.** (1935) Auxin, the plant growth-hormone. *Bot. Rev.* 1:162-182

**Went, F.W. and Thimann, K.V.** (1937) *Phytohormones*. The Macmillan Company, New York.

**Woodward, A.W., and Bartel, B.** (2005). A Receptor for Auxin. *Plant Cell* 17, 2425–2429.

**Zádníková, P., Petrásek, J., Marhavy, P., Raz, V., Vandenbussche, F., Ding, Z., Schwarzerová, K., Morita, M.T., Tasaka, M., Hejátko, J., Van Der Straeten, D., Friml, J., Benková, E.** (2010). Role of PIN-mediated auxin efflux in apical hook development of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 137, 607–617.

**Zegzouti, H., Anthony, R.G., Jahchan, N., Bögre, L., and Christensen, S.K.** (2006). Phosphorylation and activation of PINOID by the phospholipid signaling kinase 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1) in *Arabidopsis*. *PNAS* 103, 6404–6409.

**Zhang, J., Nodzyński, T., Pěnčík, A., Rolčík, J., and Friml, J.** (2010). PIN phosphorylation is sufficient to mediate PIN polarity and direct auxin transport. *PNAS* 107, 918–922.

**Zhang, J., Vanneste, S., Brewer, P.B., Michniewicz, M., Grones, P., Kleine-Vehn, J., Löffke, C., Teichmann, T., Bielach, A., Cannoot, B., Hoyerová, K., Chen, X., Xue, H.-W., Benková, E., Zažímalová, E., Friml, J.** (2011). Inositol trisphosphate-induced  $\text{Ca}^{2+}$  signaling modulates auxin transport and PIN polarity. *Dev. Cell* 20, 855–866.

**Zhang, L., Liu, B.-F., Liang, S., Jones, R.L., and Lu, Y.-T.** (2002). Molecular and biochemical characterization of a calcium/calmodulin-binding protein kinase from rice. *Biochem. J.* 368, 145–157.

**Zhang, L., and Lu, Y.-T.** (2003). Calmodulin-binding protein kinases in plants. *Trends Plant Sci.* 8, 123–127.

**Zhao, Y., Hull, A.K., Gupta, N.R., Goss, K.A., Alonso, J., Ecker, J.R., Normanly, J., Chory, J., and Celenza, J.L.** (2002). Trp-dependent auxin biosynthesis in Arabidopsis: involvement of cytochrome P450s CYP79B2 and CYP79B3. *Genes Dev.* 16, 3100–3112.

**Zourelidou, M., Müller, I., Willige, B.C., Nill, C., Jikumaru, Y., Li, H., and Schwechheimer, C.** (2009). The polarly localized D6 PROTEIN KINASE is required for efficient auxin transport in Arabidopsis thaliana. *Development* 136, 627–636.



## VIII. ÖSSZEFOGLALÁS

A Föld nehézségi erejét érzékelve a növények hajtásuk és gyökeik ellentétes irányú növekedését a gravitáció irányával párhuzamosan állítják be. A hajtások pozitív és a gyökök negatív gravitopikus válaszait a növényi auxin hormon aszimmetrikus eloszlása szabályozza. Az auxin sejtek közötti aktív transzportját az AUX/LAX import, ill. PIN-FORMED (PIN) export hordozók irányítják. A gravitációs szignál a keményítőtartamú gyökér kolumella és hajtás endodermisz sejtek érzékelik. A keményítősintézist, a keményítő tartalmú kloroplasztiszok ill. amiloplasztiszok biogenezisét, és szedimentációjuk során aktin filamentumokkal, endoplazmatikus retikulummal és plazmamembránnal történő kölcsönhatásait befolyásoló mutációk jellemzése földértette a mechanikai stimulusokat érzékelő ioncsatornák, valamint a calcium/kalmodulin és inozitolfoszfát szignálátviteli utak komponenseinek szerepét a gravitáció érzékelésétől az auxin transzporterek membrán-lokalizációjának szabályozásáig vezető folyamatokban. Amíg az auxin transzportekek poláris lokalizációját, aktivitását és stabilitását szabályozó faktorokról egyre több ismeret áll rendelkezésükre, sokkal kevesebbet tudunk arról, hogy a gravitációs stimulus érzékelése hogyan vezet az auxin transzport specifikus változásaihoz a  $\text{Ca}^{2+}$ /kalmodulin szignálátvitelben működő faktorok részvételével.

Ebben a munkában az *Arabidopsis thaliana*  $\text{Ca}^{2+}$ /kalmodulin-függő kinázaihoz hasonló CRK alcsaládba tartozó CRK5 protein kináz szabályozó funkcióit jellemeztük. A *CRK5* gén egy T-DNS inszerciós mutációjának felhasználásával kimutattuk, hogy a CRK5 inaktiválása gátolja a főgyökér megnyúlását és késlelteti a hajtás és gyökér gravitopikus elhajlási válaszait. A *crk5-1* mutáns genetikai komplementációs tesztjével igazoltuk, hogy egy helyspecifikus mutagenesis technikával módosított génről kifejeztetett CRK5-GFP (zöld fluoreszcens fehérje) fúziós fehérje képes kijavítani a mutáció által okozott fenotipikus változásokat: a gyökérmegnyúlás gátlását, és a hajtás irányába megemelkedett auxin transzportot, ami a stimulálja az oldalgyökök differenciálódását és késlelteti a gyökér gravitropikus válaszát. Vizsgálatainkban, részletesen jellemezzük a késleltetett gyökér gravitopikus válaszhoz vezető folyamatot a *crk5-1* mutánsban. Kimutattuk, hogy a *crk5-1* mutáció nem okoz hibát a gravitáció érzékeléséhez szükséges keményítő szintézisében. Továbbá észleltük, hogy az auxin-indukált DR5-GFP riporter fehérje mennyisége a *crk5-1* mutáns gyökércsúcsában a vad típushoz hasonlítva lényegesen kevesebb, ami arra utalt, hogy az auxinszint a gyökércsúcsban lecsökkent. Ennek ellenére, a gyökércsúcs nem mutatott

méretbeli zsugorodást és az auxin bioszintézisben résztvevő kulcsgének, valamint az AUX1/LAX (AUXIN TRANSPORTER/AUXIN TRANSPORTER-LIKE PROTEIN auxin import és PIN (PIN-FORMED) exporthordozók génjeinek transzkripciója sem mutat változást a *crk5-1* mutáció hatására. Mivel a gyökér gravitropikus válaszát szabályozó auxin transzport irányítottságát és mértékét a PIN auxin export és AUX1 import hordozók poláris membránbeli elhelyezkedése és stabilitása határozza meg, lézerpasztázó mikroszkópos technikával összehasonlítottuk e fehérjék GFP-vel jelölt formáinak mennyiségét és membránbeli helyzetét vad típusú ill. *crk5-1* mutáns gyökerek különböző sejt típusaiban. A gyökérben, az auxin a szállítóyalábokon keresztül a nyugvó központ körüli osztódó merisztéma és kolumella sejtekhez lefelé transzportálódva éri el a koncentrációs maximumát. Ezután a hajtás irányában fölfelé transzportálódik az elongációs zónába a bórszövetben és onnan reciklizál a gyökércsúcs irányában a kortex sejteken keresztül. A PIN-GFP fehérjék fluoreszcenciájának intenzitását pásztázó lézer mikroszkópiával és mennyiségi hőtérképek készítésével követve azt találtuk, hogy a PIN1, 3, and 7 fehérjék lokalizációja hasonló a vad típusú és *crk5-1* gyökérből sejtjeinek gyökércsúcs felé néző alsó membránjaiban, amíg a PIN4 fehérje azonos mintázatot mutatott az nyugvó centrumot környező őssejtek alsó membránjaiban. A gravistimulust érzékelő kolumella sejtekben a PIN3 és PIN7 apoláris lokalizációja segíti az auxin transzportot a perifériális bórszövet felé a borsejtek alsó membránjaiban elhelyezkedő AUX1 import fehérjével együttesen, ami hasonlóan irányítja az auxin exportját a hajtás felé a kolumella és külső gyökérsapka rétegeiből vad és *crk5-1* gyökerekben. Gravistimulációnak kitett gyökerekkel végzett hasonló eredményeink alapján megállapíthattuk, hogy a *crk5-1* mutáció nem módosítja az AUX1, PIN1, PIN3, PIN4 és PIN7 auxin transzporterek funkcióját.

Ezzel szemben, azt találtuk, hogy a gyökér gravitropikus válaszában szabályozásában döntő szerepet játszó PIN2 auxin export hordozó mennyisége lényegesen lecsökkent a *crk5-1* borsejtjeinek felső membránjaiban és a vad típusúval ellentétben a gyökér átmeneti zóna kortex sejtekben az alsó membrán helyett a laterális és felső membránrégiókban lokalizálódott. Együttesen az oldalgyökérkezdemények számának emelkedésével a *crk5-1* mutánsban, ez azt jelezte, hogy a mutáció következményeképpen megemelkedett az auxin export szintje a kortexen keresztül a gyökér megnyúlási zóna irányába. Ezzel szemben, a PIN2 fehérje a vad típusú gyökér borsejtek felső és a kortex sejtek alsó (gyökércsúcsához közelebbi) membránjaiban lokalizálódott, biztosítva ezzel a borsejtekben a hajtás ill. a kortex sejtekben a gyökércsúcs felé irányuló auxin körforgást. Gravistimuláció alatt a nehézségi erő irányában begömbülő vízszintesen elhelyezett vad típusú gyökerek felső szekciójának borsejtjeinek hajtás felé néző felső membránjaiban a PIN2 mennyisége időlegesen lecsökkent a PIN2 fokozott

endocitózisának és lebontásának következtében. Az alsó szekcióba irányuló auxin transzport eredményeként ott a sejtmelegnyúlás gátlódott és a PIN2 szintje növekedett a bőrsejtekben. Ezzel szemben, a PIN2-GFP és DR5-GFP riporter fehérjékkel elvégzett pásztázó lézermikroszkópos vizsgálatok és a PIN2 fehérje PIN1 és plazmamembrán  $H^+$ -ATP-ázzal együtt végrehajtott immunolokalizációja az mutatta, hogy a *crk5-1* mutánsban a gravitropikus gyökérhajlási válasz kb. 5 órát késett hasonlóan az auxin-indukált DR5-GFP riporter aszimmetrikus eloszlásához, ill. a PIN2 fehérje aszimmetrikus feldúsulásához a gravitropikus gyökerek alsó szekciójában. Ez azt mutatta, hogy a CRK5 kináz szükséges a PIN2 auxin export hordozó helyes poláris membránlokalizálásához és azáltal modulálja a gyökér gravitropikus begömbülését szabályozó aszimmetrikus auxin eloszlást.

A CRK5 sejtbeli lokalizációját vizsgálva protoplasztokban, transzgénikus növényekben és kontroll biokémiai tesztekben az találtuk, hogy a CRK5 egy plazmamembrán kötött kináz, amelynek U formájú lokalizációs mintázata a gyökérfelszín felé irányul a bőr, kortex és kolumella sejtekben, ahol részleges átfedést mutat a PIN3 és PIN2 auxin export fehérjék mintázataival. Az exocitózist gátló Brefeldin (BFA) gombatoxin hatására kezdetben a CRK5 internalizálódott a membránból vezikuláris BFA-testekbe, de végül is a sejtmagba importálódott. A BFA felgyorsította a PIN2 fehérje és az FM4-64 membránfesték internalizációját a *crk5-1* mutáns bőrsejtekben a vadtypushoz hasonlítva. A *crk5-1* mutáns megemelkedett BFA érzékenysége azt jelezte, hogy a CRK5 kináznak közvetlen szerepe van a PIN2 fehérje exocitózisának és membrán reciklizálásának szabályozásában. A PIN fehérjék reciklizálását az AGC3 családba tartozó PINOID (PID), WAG1, and WAG2 kinázok szabályozzák a PIN fehérjék hidrophil hurok doménjein található TPRxS motívumok foszforilációjával, ami a PIN2 esetében indukálja annak relokalizációját a gyökér bőrsejtek felső membránjaiból az alsókba. Hasonlóan az AGC3 kinázokhoz, a CRK5 is foszforilálja a PIN2 hurok doménjét, ami szükséges a PIN2 membránban tartásához, mivel a PIN2 felhalmozódása BFA-testekben a vadtypusnál sokkal gyorsabb a *crk5-1* mutánsban. Azaz, a CRK5 foszforiláció hiánya késlelteti a PIN2 exocitózist a Golgi vezikulákból a membránba. Tömegspektrometria vizsgálatink szerint a CRK5 kináz hat az AGC3 kinázoktól különböző helyen foszforilálja a PIN2 hidrophil hurok doménjét. A hatból, három CRK5 foszforilációs hely megtalálható a többi PIN fehérjében is, amíg három PIN2 specifikus, ami valószínű összefügg a CRK5 szerepével a gyökér gravitropikus válaszában PIN2-függő szabályozásában. Ezért a CRK5 funkciójának felfedezése a gyökér gravitropikus válaszában szabályozásában megnyitja az utat a PIN2-ben azonosított CRK5 foszforilációs helyek funkcióinak további részletes tanulmányozásához, és kiinduló pontot szolgáltat annak további

vizsgálatához, hogy a CRK protein kináz család további hét tagja a CRK5-höz hasonlóan szerepet játszik-e az auxin regulált növekedési és tropikus válaszokban ill. foszforilációval szabályozza-e a PIN fehérjék és más auxin transzporterek poláris membránlokalizációját és aktivitását.

## IX. SUMMARY

By sensing the Earth's gravity, plants adjust the growth of their shoots and roots with opposite polarity along the direction of gravity vector. Both positive and negative gravitropic responses, directing downward and upward bending of horizontally placed roots and shoots, respectively, are controlled by asymmetric distribution of the plant hormone auxin. Cellular transport of auxin is controlled by the AUX/LAX influx and PIN-FORMED (PIN) efflux carriers. Gravity is perceived by specific starch-containing statocyte cells in the root columella and stem endodermis. Mutations impairing starch biosynthesis, biogenesis, and sedimentation of starch-containing plastids (i.e., statoliths) and their interactions with actin filaments, endoplasmic reticulum, and plasma membrane highlight the importance of mechanosensitive ion channels and components of calcium/calmodulin and inositol-phosphate signaling pathways that connect gravisensing with the regulation of polar localization of PINs. Whereas regulation of polar localization, activity, and stability of auxin carriers and transporters is being deciphered in detail, it is less clear how primary sensing of gravity is linked to specific switches in polar auxin transport through regulatory factors participating in  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin signalling.

In this work, we characterize the regulatory functions of CRK5 protein kinase, a member of the *Arabidopsis thaliana*  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent kinase-related kinase family. Using a T-DNA insertion mutation in the *CRK5* gene, we show that inactivation of CRK5 inhibits primary root elongation and delays gravitropic bending of shoots and roots. By genetic complementation tests, we show that a modified CRK5-GFP fusion protein is capable to complement the phenotypic alterations caused by the *crk5-1* null mutation, including the inhibition of root elongation, stimulation of shootward auxin transport inducing enhanced lateral root formation and delayed geotropic response of roots and shoots. In subsequent studies, we provide detailed characterization of delayed root geotropic response of the *crk5-1* mutant. We show that the *crk5-1* mutant is not impaired in starch biosynthesis required for

primary sensing of the gravistimulus. Subsequently, we demonstrate that the auxin-induced DR5–GFP (green fluorescent protein) reporter shows reduced activity of in the *crk5-1* mutant indicating a depletion of auxin from the root tips. Despite this, no root tip collapse is observed and the transcription of genes for auxin biosynthesis, AUXIN TRANSPORTER/AUXIN TRANSPORTER-LIKE PROTEIN (AUX/LAX) auxin influx, and PIN-FORMED (PIN) efflux carriers is unaffected by the *crk5-1* mutation.

As the polarity and threshold of auxin transport controlling the root gravitropic response is determined by polar membrane localization and stability of the PIN auxin efflux and AUX1 influx carriers, we performed comparative confocal imaging studies of GFP-tagged versions of these proteins. In the roots, auxin moves through the stele reaching a maximum in the meristem and columella and then is transported upwards to the elongation zone through the epidermis and flows backward to the root tip in the cortex. Using confocal imaging in combination of heat mapping of PIN-GFP fluorescence intensities, we found that PIN1, 3, and 7 are similarly localized in both wild type and *crk5-1* roots toward the root tip in basal membranes of stele cells, whereas PIN4 shows basal localization in the stem cells. In the columella, apolar localization of PIN3 and 7 facilitate auxin flow toward the epidermis in synergism with AUX1, which is located in the basal membranes of epidermal cells and directs shootward auxin transport from the columella and lateral root cap similarly in both wild type and *crk5-1* roots. Based on similar examinations with gravistimulated roots, we concluded that the *crk5-1* mutation does not modify cellular localization of the AUX1, PIN1, PIN3, PIN4, and PIN7 auxin transporters.

By contrast, we found that PIN2, which plays a pivotal role in the control of root gravitropic response, is depleted from apical membranes of *crk5-1* mutant epidermal cells and shows basal to apical relocation in the cortex of the root transition zone. This, together with an increase in the number of *crk5-1* lateral root primordia indicates a facilitated auxin efflux through the cortex toward the root elongation zone. In contrast, in wild type roots PIN2 displays apical (shootward) and basal (rootward) localizations in epidermal and cortex cells, respectively, consistent with its key role in upward epidermal transport and cortex-mediated downward recycling of auxin. During gravistimulation, in the upper section of horizontally placed roots, that show bending toward the gravity vector, epidermal PIN2 localization in the apical membrane is temporarily reduced due to enhanced PIN2 endocytosis and degradation in the wild type. Along with a redirection of auxin transport toward the lower root section where elongation is inhibited, PIN2 levels are increased in the lower epidermis and cortex. By contrast, confocal imaging of PIN2-GFP and DR5-GFP reporters, as well as

immunolocalization of PIN2 along with PIN1 and a plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in the *crk5-1* mutant shows about 5 hours delay in gravitropic root bending, as well as in asymmetric distribution of auxin-induced DR5-GFP reporter activity and differential accumulation of PIN2 in the lower and upper root sections. This indicates that the CRK5 kinase is required for proper regulation of polar membrane localization of PIN2 auxin efflux carrier and thereby modulates asymmetric auxin distribution controlling the gravitropic bending response of roots.

By expression studies in protoplasts and transgenic plants, and confirmatory biochemical assays we found that CRK5 is a plasmamembrane-associated kinase that forms U-shaped patterns facing the outer lateral walls of epidermis, cortex and root columella cells, in which its localization partially overlaps with those of PIN3 and PIN2 auxin efflux carriers. Inhibition of exocytosis by the fungal toxin brefeldin (BFA) stimulates some internalization of CRK5 into brefeldin bodies, but CRK5 ultimately accumulates in the nuclei. In the *crk5-1* mutant brefeldin accelerates the internalization of both PIN2 and the membrane specific dye FM4-64 from membranes of root epidermal cells compared to wild type. Increased BFA sensitivity of *crk5-1* mutant thus indicates that CRK5 plays a direct role in the regulation of PIN2 membrane recycling and required for normal exocytosis of PIN2 from Golgi vesicles to the plasma membrane.

Membrane recycling of PINs, including PIN2, is regulated by the AGC3 class PINOID (PID), WAG1, and WAG2 kinases, which phosphorylate TPRxS motifs in the hydrophilic loops of PINs. Phosphorylation of cytoplasmic hydrophilic loop of PIN2 stimulates its relocation from basal to apical membranes of root epidermal cells. Similarly to AGC3 kinases, CRK5 phosphorylates the hydrophilic loop of PIN2 *in vitro*, which is required for its membrane retention because PIN2 shows accelerated accumulation in brefeldin bodies in the *crk5-1* mutant. Consequently, delayed gravitropic response of the *crk5-1* mutant likely reflects defective phosphorylation of PIN2 and deceleration of its brefeldin-sensitive ftnosis and membrane recycling. Mass spectrometry analysis indicates that CRK5 phosphorylates the PIN2 hydrophilic loop at six serine and threonine positions, which differ from those recognized by AGC3 kinases. Three from the six phosphorylation sites is shared by other PIN proteins, whereas three of them occurs only in PIN2, indicating that CRK5 plays a specific role in regulation of PIN2 phosphorylation and thereby PIN2-dependent root gravitropic response. Definition of the role of CRK5 in the regulation of root gravitropic response now opens the way to detailed studies of regulatory effects of mutations of CRK5-specific PIN2 phosphorylation sites, as well as stimulates further research on how CRK5 and other seven

related members the CRK kinase family control auxin regulated growth and tropic responses through modulating the function and polar membrane localization of PIN and other auxin transporter proteins by phosphorylation.

## **X. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK**

### **A dolgozat alapját képező közlemény:**

**Rigó, G.**, Ayaydin, F., Tietz, O., Zsigmond, L., Kovács, H., Páy, A., Salchert, K., Darula, Z., Medzihradszky, K.F., Szabados, L., Palme, K., Koncz, C., Cséplő, A., (2013) Inactivation of Plasma Membrane-Localized CDPK-RELATED KINASE5 Decelerates PIN2 Exocytosis and Root Gravitropic Response in Arabidopsis. *Plant Cell* 25, 1592–1608.

### **Egyéb közlemények:**

Zsigmond, L., Szepesi, A., Tari, I., **Rigó, G.**, Király, A., Szabados, L., (2012) Overexpression of the mitochondrial PPR40 gene improves salt tolerance in Arabidopsis. *Plant Sci.* 182, 87–93.

**Rigó, G.**, Papdi, C., Szabados, L., (2012) Transformation using controlled cDNA overexpression system. *Methods Mol. Biol.* 913, 277–290. Könyvfejezet

Zsigmond, L., Tomasskovics, B., Deák, V., **Rigó, G.**, Szabados, L., Bánhegyi, G., Szarka, A., (2011) Enhanced activity of galactono-1,4-lactone dehydrogenase and ascorbate-glutathione cycle in mitochondria from complex III deficient Arabidopsis. *Plant Physiol. Biochem.* 49, 809–815.

**Rigo, G.**, Ayaydin, F., Kovacs, H., Szabados, L., Cseplo, A., (2010) AtCRK5, a CDPK-related Serine/threonine Protein Kinase may Participate in Regulation of Salt Tolerance in Arabidopsis Thaliana. In: Palocz-Andresen M, Nemeth R, Szalay D (szerk.) *Proceedings of the Conference "Protection of the Environment and the Climate": TÁMOP-Humboldt Colleg for Environment and Climate Protection, Sopron, Hungary 3rd December 2009 & 1st October 2010.* Sopron: University of West Hungary, 2011. pp. 70-74. Könyvfejezet

Zsigmond, L., **Rigó, G.**, Szarka, A., Székely, G., Otvös, K., Darula, Z., Medzihradszky, K.F., Koncz, C., Koncz, Z., Szabados, L., (2008) Arabidopsis PPR40 connects abiotic stress responses to mitochondrial electron transport. *Plant Physiol.* 146, 1721–1737.

Székely, G., Abrahám, E., Cséplő, A., **Rigó, G.**, Zsigmond, L., Csiszár, J., Ayaydin, F., Strizhov, N., Jásik, J., Schmelzer, E., Koncz, C., Szabados, L., (2008) Duplicated P5CS genes of Arabidopsis play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis. *Plant J.* 53, 11–28.

**Rigó G.**, Ayaydin F., Szabados L., Koncz C., Cséplő A. (2008). Suspension protoplasts as useful experimental tool to study localization of GFP-tagged proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Acta Biol. Szeged.* 52: 59–61.

Abrahám, E., **Rigó, G.**, Székely, G., Nagy, R., Koncz, C., Szabados, L., (2003) Light-dependent induction of proline biosynthesis by abscisic acid and salt stress is inhibited by brassinosteroid in Arabidopsis. *Plant Mol. Biol.* 51, 363–372.



## XI. Függelék

### 1. Táblázat. A dolgozatban használt oligonukleotidok listája.

CRK5BamHI-F	ctaggatccaaATGGGTCTATGTACTTCG	
CRK5XhoI-R	aggtactcgagCTAATGAGCTTTGATCG	
<i>crk5-1</i> F	CCGAATTCTCCTATTTTCTAGCTTCGGC	
<i>crk5-1</i> R	GGAGAATGAGACCTTAGAGCTCAGAC	
Fish1	CTGGGAATGGCGAAATCAAGGCATC	Ríos és mtsai. (2002)
Fish2	CAGTCATAGCCGAATAGCCTCTCCA	Ríos és mtsai. (2002)
<i>crk5-2</i> F	CACCGAATTCTCCTATTTTCTAGC	
<i>crk5-2</i> R	CCTCCTCTGTGTACTTCCCACC	
LBa1	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG	Alonso és mtsai . (2003)
1: CRK5-F1	AAGCGAACGTATCGTCGTTTC	
2: CRK5-R2	ATTGAGTACTTTGTCAATGGCGAAT	
3: CRK5-F3	GATTTCGTGTGATGTTGAGAGATT	
4: CRK5-R4	GAAGTACATAGACCCATTTAAGAATCTCT C	
5: CRK5-F5	CAACGAACAATGAAGGCAAAA	
6: CRK5-R6	GATCTCGCCGGAGTCTTCTT	
8: CRK5-R8	TCATAACAAAAGTCAAAAGCCACA	
ACT2/8-F	GGTAACATTGTGCTCAGTGGTGG	At3g18780, An és mtsai. (1996)
ACT2/8-R	AACGACCTTAATCTTCATGCTGC	At3g18780, An és mtsai. (1996)
CRK5 <i>Sau</i> I	TAAACTTACCTCAGGAAGTTGGT	
CRK5 stop to <i>Apa</i> I	TTCAAAGTTTCAAAACCGGGCCCATGAGC TTTGATCGTGC	
T3 primer	ATTAACCCTCACTAAAGGGA	Stratagene
T7 primer	TAATACGACTCACTATAGGG	Stratagene
eGFP <i>Apa</i> I 5'	CATAAGGGGCCACCATGGTGAGCAAGGGC GAGGAGCTG	

eGFP ApaI 3'	AATATGGGCCCTTACTTGTACAGCTCGTCC ATGCCGAG	
GUS ApaI 5'	CATAAGGGGCCACCATGTTACGTCCTGTA GAAACCCCA	
GUS ApaI 3'	AATATGGGCCCTCATTGTTTGCCTCCCTGC TGCGGTTT	
CRK5-R1	GGGTCTATGTACTTCGAAACCGA	valós idejű PCR-hoz
CRK5-R2	TAACGGAAGAGCTCGAAGGC	valós idejű PCR-hoz
GAPC2-F	AATGGAAAATTGACCGGAATGT	At1g13440, Czechowski és mtsai. (2005) valós idejű PCR-hoz
GAPC2-R	CGGTGAGATCAACAACCTGAGACA	At1g13440, Czechowski és mtsai. (2005) for real time PCR
PIN1-F	TGGAAGACAACCTTTGGAAACT	At1g73590
PIN1-R	TGAAGCATTAGAACGACGAACA	At1g73590
PIN2-F	CCTCGCCGCACTCTTTCTTT	At5g57090
PIN2-R	CGTACATCGCCCTAAGCAAT	At5g57090
PIN3-F	CAAGTGGAGATTTTCGGAGGA	At3g70940
PIN3-R	GCGTCTTTTGGTCTCTCTGC	At3g70940
PIN4-F	GGCAACGGAACAATCTGAAC	At2g01420
PIN4-R	TCACCACCACCTCTAGCATTAC	At2g01420
PIN7-F	AAGGCGGTGCAAAAGAGATT	At1g23080
PIN7-R	CATCGGACCAGCTTTGTTTT	At1g23080
AUX1-F	CTTTCCTCCTCTGCACATTTCT	At2g38120
AUX1-R	AAGAGTGGTTTTTGTCCGTTTG	At2g38120
LAX3-F	TGCTTACCTTTGCTCCTGCT	At1g77690
LAX3-R	GTCCCATCCATCCTCCTAC	At1g77690
CYP83B1-F	ACCCTAACCGCCCTAAACAAGA	At4g31500 Mei és mtsai. 2011
CYP83B1-R	GTCAGTTCCCGGCACAACAATA	At4g31500 Mei és mtsai. 2011

TAA1-F	TAAACACTATACAAACGACCAAACC	At1g70560 Mei és mtsai. 2011
TAA1-R	TACACCTGTCACCCATCTTCCT	At1g70560 Mei és mtsai. 2011
TRP2-F	TTGAATCCGCTTTCTATGCTCT	At5g54810 Mei és mtsai. 2011
TRP2-R	CTGTAATGCTCCGTAAGCCTCT	At5g54810 Mei és mtsai. 2011
TRP3-F	ATCATCTGTAAGCGGAAAGGTTC	At3g54640 Mei és mtsai. 2011
TRP3-R	TTCAGTTGGCGACTTTGCATCAC	At3g54640 Mei és mtsai. 2011
YUCCA3-F	CGTTCGTAGCGCTGTTCATG	At1g04610 Mei és mtsai. 2011
YUCCA3-R	CTAACGGTCCAATTTTCGGC	At1g04610 Mei és mtsai. 2011
NIT3-F	AGGTTATTGGCGTTGACCCAT	At3g44320 Mei és mtsai. 2011
NIT3-R	ATCTTTCCACTTCAGGGCCAG	At3g44320 Mei és mtsai. 2011
AMI1-F	TCTACTTCCTCGTCGCCTCCT	At1g08980 Mei és mtsai. 2011
AMI1-R	GCGCATTTTCTCCGTTTATACTG	At1g08980 Mei és mtsai. 2011

```

      *           20           *           40           *
AtCRK1 : MGLCHGRP-----VEQQSKSLPVSGETNEA-----PTNSQPPAKSS- : 36
AtCRK2 : MGGCTSKPS--SSVKPNPYAPKDAVLQDDSTPAH----PGKSPVRSSPA- : 44
AtCRK3 : MGCYGRVN--QSKQN--GEEEAANTT-----TYV--VSGDGNQIQP--- : 35
AtCRK4 : MGHYSRNI--SA---VEDD-EIPT-----GNGE--VSNQPSQNHRRH-- : 34
AtCRK5 : MGLCTSKPN-----SSNSDQTPARNSPLPASESVKPSSSSVNGEDQ- : 41
AtCRK6 : MGHYSRNI--ST---VDDDDETPS-----ATAQ--LPHRSQNHQHT- : 36
AtCRK7 : MGLCHGRP-----IEQQSKNLPISEIEET-----PKNSSQKAKSS- : 36
AtCRK8 : MGGCTSKPSTSSGRPNPFAPGNDYPQIDDFAPDH----PGKSPIPTPSA- : 45
LeCRK1 : MGCCCSK-----GVSGENGGSVVA--IGDGNSA--VSTNNRPKPPP-- : 37
NtCBK1 : MGHCCSK-----GVTADNDGHVVS--VVDGNSS--VSTNNRPKPPSP-- : 37
NtCBK2 : MGHCTSKPS-----NFSVDDITVAGDGAIFP-----VKSGPSNDDDV- : 37
DcCRK1 : MGHVSKPS-P--EPDLNHHHTSLPVNDTSLP-----PDNSIPPKDI- : 40
ZmMCK1 : MGCYGRAR--GASSR-ADHDADPSGAGSVAPPSP--LPANGAPLP---- : 41
ZmMCK2 : MGCYGRAG--GASSRADHD-----DAVAPPSP--LPANGAPTTPQQP : 40
OsCBK1 : MGLCHGSA-AVLEPTVEEEEGATRVAEAAAA-----PAKPASPAPSA- : 43

```

N-terminális miriszttiláció/  
palmitoilációs motívum

```

      60           *           80           *           100
AtCRK1 : ----G-----FPPFSPSP----VP-SLFKSSSV---S : 57
AtCRK2 : ----V-----KASPPFFFTFSPARHRRN--KSRD-GG---G : 71
AtCRK3 : LTPVNYGRAKNTPARSSNPSP----WPSP----FPHGSASPLSGVSPS : 76
AtCRK4 : ----ASIPQSVASGTPEV--NSMNISP----FQ----SPLAGV--A : 66
AtCRK5 : ---CVTTTNN--GKKSPFFFTFSPAHYFFS---KKTSA---R : 75
AtCRK6 : ---SSSSIPQSPATS---EV--NPNISP----FQ----SPLAGV--A : 68
AtCRK7 : ----G-----FPPFSPSP----LP-SLFKTSFAV---S : 57
AtCRK8 : ----A-----KASPPFFFTFSPARHRRN--KSRDVGG---G : 73
LeCRK1 : -SPVR-QSVNGMSYTNNSIP-AHSFTASP----FQ----SPYAGIAPS : 76
NtCBK1 : -SPARQSVNGTSTYNNNTIP-AHSFTTSP----FQ----SPYAGIPPS : 77
NtCBK2 : ---NSHQTKNDEPFSVGKSPFFFTFSPAHYLFs---KKSEAT---N : 76
DcCRK1 : ---AIPAQDNKPP-GKKSPFFLFTFSPAHFLFS---KKSEAV---G : 78
ZmMCK1 : ATPRRHKS GSTTPVHHQAATPGAAAWFSP----YPAGGASPLAGVSPS : 87
ZmMCK2 : ATPGRKSGSATPVHHQAATT---AWFSP----YPAGGASPLAGVSPS : 82
OsCBK1 : ----AAAAKPGTPK---QHKFFFLFSP----LPASSYKGSFA----- : 76

```

```

      *           120           *           140           *
AtCRK1 : S---S-VSSSTELRI-FKRFFPPSPAKHIRALLARRHGS--VKENVSIP : 100
AtCRK2 : GE-SKSVTSTELRQ-LARASHPPSPARHIRDVRRRK----EKKAAALP : 114
AtCRK3 : P---ARTSTERRF-FRRFFPPSPAKHIKASITKRLGV---KKKGPIIP : 118
AtCRK4 : P---SPARTPGRK-FRWFFPPSPAKFIMAAIRRRRGA-PPQERDEPIIP : 110
AtCRK5 : SPATNSTNSTKRF-FKRFFPPSPAKHIRAVLARRHGS--VKENSSAIP : 122
AtCRK6 : P---SPARTPGRK-FRWFFPPSPAKFIMAAIRRRRCT-APHRRDGPIIP : 112
AtCRK7 : S---SVSSSTELRI-FKRFFPPSPAKHIRALLARRHGS--VKENASIP : 101
AtCRK8 : GE-SKSLTSTELRQ-LARASHPPSPAKHIRAAIRRRK----GKKAAALS : 116
LeCRK1 : P---SPVGTERRK-FRWFFPPSPAKFILSAIEKKQGGTSVKKEKGPIIP : 121
NtCBK1 : P---SPVGTARRK-FRWFFPPSPAKFILSAIEKKQCTTSAKEKGPIIP : 122
NtCBK2 : A---SSNSTEMRF-FKRFFPPSPAKHISLLARRHGT--VKENSAIP : 119
DcCRK1 : SPAAGSSNSTEKRL-F---FFFPPSPAKHIKAARARRHGS--VKENAAIP : 123
ZmMCK1 : P---AR-STERRF-FKRFFPPSPAKHIKATLAKRLGG--GKEKGGTIP : 129
ZmMCK2 : P---AR-STERRF-FKRFFPPSPAKHIKATLAKRLGG--GKEKGGTIP : 124
OsCBK1 : N---SSVASTEARGGFKRFFPPSPAKHIRALLARRHGS--VKENASIP : 121

```

Nukleás  
Lokalizációs  
Szignál

```

      160           *           180           *           200
AtCRK1 : EGKECE-----I--G-----LDKSFGFSK : 117
AtCRK2 : AARQQKEE---EEREV--G-----LDKRFGFSK : 138
AtCRK3 : EER-----GT-----EPEQSLDKSFGYGG : 137
AtCRK4 : EDS-----EDVVDHG--GDSGG-----GER-LDKNFGFGK : 137
AtCRK5 : EGSEAE-----GGGV--G-----LDKSFGFSK : 142
AtCRK6 : EDS-----EA---G-GSGGGI-----GER-LDKNFGFAK : 136
AtCRK7 : EGSECE-----V--G-----LDKKGFSK : 118
AtCRK8 : GVTQLTTEVPQREEEEV--G-----LDKRFGFSK : 144
LeCRK1 : EDE-----GG-----EGERQLDKSFGYPK : 140
NtCBK1 : EDE-----GG-----EGERQLDKSFGYPK : 141
NtCBK2 : EGNESEVG---DGGGA--G-----LDKSFGFSK : 142
DcCRK1 : ENNEVD-----GGA--G-----LDKSFGFSK : 142
ZmMCK1 : EEG-----GAGAGAGAGAGAAGAAADSAAEDRFLDKTFGFAK : 168
ZmMCK2 : EEG-----GAGV-----AADSAAERFLDKTFGFAN : 150
OsCBK1 : ESGEPG-----V--A-----LDKGFGFSK : 138

```

AtCRK1 : Q<sup>\*</sup>ASHY<sup>\*</sup>ELDGEVGRGHFGYTCSAKGKKGS<sup>\*</sup>LKQ<sup>\*</sup>EVAVK<sup>\*</sup>VIFPKSKMTT<sup>\*</sup>AI<sup>\*</sup> : 167  
 AtCRK2 : ELQSR<sup>\*</sup>IELGGEVGRGHFGYTCSAKFKKGELKQ<sup>\*</sup>EVAVK<sup>\*</sup>VIFPKSKMT<sup>\*</sup>SAIS : 188  
 AtCRK3 : NFGAKYELGGEVGRGHFGHTCSGSGKKGD<sup>\*</sup>LKDHFI<sup>\*</sup>AVK<sup>\*</sup>IISKAKMTT<sup>\*</sup>AI<sup>\*</sup> : 187  
 AtCRK4 : NEEGKYELGGEVGRGHFGHTCWAKAKKGMKNQ<sup>\*</sup>TVAVK<sup>\*</sup>IISKAKMT<sup>\*</sup>STLS : 187  
 AtCRK5 : SFASKYELGGEVGRGHFGYTCAA<sup>\*</sup>FKKGD<sup>\*</sup>NKGGQ<sup>\*</sup>EVAVK<sup>\*</sup>VIFPKAKMTT<sup>\*</sup>AI<sup>\*</sup> : 192  
 AtCRK6 : NEEGKYELGGEVGRGHFGHTCWAKAKKGMKNQ<sup>\*</sup>TVAVK<sup>\*</sup>IISKAKMT<sup>\*</sup>SALS : 186  
 AtCRK7 : Q<sup>\*</sup>ASHY<sup>\*</sup>ELDGEVGRGHFGYTCSAKGKKGS<sup>\*</sup>LKQ<sup>\*</sup>EVAVK<sup>\*</sup>VIFPKSKMTT<sup>\*</sup>AI<sup>\*</sup> : 168  
 AtCRK8 : EEFHSYELGGEVGRGHFGYTCSAKFKKGELKQ<sup>\*</sup>EVAVK<sup>\*</sup>VIFPKSKMTT<sup>\*</sup>AI<sup>\*</sup> : 194  
 LeCRK1 : NLTSKYELGGEVGRGHFGHTCWAKAKKGMKNQ<sup>\*</sup>TVAVK<sup>\*</sup>IISKAKMTT<sup>\*</sup>AI<sup>\*</sup> : 190  
 NtCBK1 : NLTA<sup>\*</sup>KYELGGEVGRGHFGHTCWAKAKKGMKNQ<sup>\*</sup>TVAVK<sup>\*</sup>IISKAKMTT<sup>\*</sup>AI<sup>\*</sup> : 191  
 NtCBK2 : NFNKYEMGEVGRGHFGYTCAA<sup>\*</sup>FKKGD<sup>\*</sup>NKGGQ<sup>\*</sup>EVAVK<sup>\*</sup>VIFPKSKMTT<sup>\*</sup>AI<sup>\*</sup> : 192  
 DcCRK1 : KFGSKFEVGEVGRGHFGYTCAA<sup>\*</sup>FKKGD<sup>\*</sup>NKGGQ<sup>\*</sup>EVAVK<sup>\*</sup>VIFPKAKMTT<sup>\*</sup>AI<sup>\*</sup> : 192  
 ZmMCK1 : NFGAKYDLGGEVGRGHFGHTCSA<sup>\*</sup>VVKKGE<sup>\*</sup>HKGHT<sup>\*</sup>TVAVK<sup>\*</sup>IISKAKMTT<sup>\*</sup>AI<sup>\*</sup> : 218  
 ZmMCK2 : NFGAKYDLGGEVGRGHFGHTCSA<sup>\*</sup>LVKKGE<sup>\*</sup>YKHAV<sup>\*</sup>AVK<sup>\*</sup>IISKAKMTT<sup>\*</sup>AI<sup>\*</sup> : 200  
 OsCBK1 : HFAAKYELGGEVGRGHFGYTCAA<sup>\*</sup>TCKKGE<sup>\*</sup>LKDD<sup>\*</sup>EVAVK<sup>\*</sup>VIFPKAKMTT<sup>\*</sup>AI<sup>\*</sup> : 188

Szerin/ treonin protein  
kináz katalitikus alegység

ATP kötő motívum

AtCRK1 : IEDVSRREVKMLRALTGHKNL<sup>\*</sup>VQFYDA<sup>\*</sup>FEDDEN<sup>\*</sup>VYI<sup>\*</sup>VMELCKG<sup>\*</sup>GG<sup>\*</sup>LLDK<sup>\*</sup>II<sup>\*</sup> : 217  
 AtCRK2 : IEDVSRREVKILRALSGHQN<sup>\*</sup>L<sup>\*</sup>VQFYDA<sup>\*</sup>FEDDAN<sup>\*</sup>VYI<sup>\*</sup>VMELCGG<sup>\*</sup>GG<sup>\*</sup>LLDR<sup>\*</sup>IL : 238  
 AtCRK3 : IEDVSRREVKLLKSLSGHKY<sup>\*</sup>L<sup>\*</sup>IKYYDA<sup>\*</sup>GEDANN<sup>\*</sup>VYI<sup>\*</sup>VMELCGG<sup>\*</sup>GG<sup>\*</sup>LLDR<sup>\*</sup>IL : 237  
 AtCRK4 : IEDVSRREVKLLKSLSGHRH<sup>\*</sup>M<sup>\*</sup>VKFYDV<sup>\*</sup>VEDADN<sup>\*</sup>VFV<sup>\*</sup>VMELCEG<sup>\*</sup>GG<sup>\*</sup>LLDR<sup>\*</sup>IL : 237  
 AtCRK5 : IEDVSRREVKILRALSGHNN<sup>\*</sup>L<sup>\*</sup>PHFYDA<sup>\*</sup>YEDHDN<sup>\*</sup>VYI<sup>\*</sup>VMELCEG<sup>\*</sup>GG<sup>\*</sup>LLDR<sup>\*</sup>IL : 242  
 AtCRK6 : IEDVSRREVKLLKSLSGSHM<sup>\*</sup>V<sup>\*</sup>KFYDV<sup>\*</sup>VEDSDN<sup>\*</sup>VFV<sup>\*</sup>VMELCEG<sup>\*</sup>GG<sup>\*</sup>LLDS<sup>\*</sup>IL : 236  
 AtCRK7 : IEDVSRREVKILRALTGHKNL<sup>\*</sup>VQFYDA<sup>\*</sup>FEDDEN<sup>\*</sup>VYI<sup>\*</sup>VMELCQG<sup>\*</sup>GG<sup>\*</sup>LLDK<sup>\*</sup>II : 218  
 AtCRK8 : IEDVSRREVKILQALSGHKNL<sup>\*</sup>VQFYDA<sup>\*</sup>FEDDAN<sup>\*</sup>VYI<sup>\*</sup>VMELCEG<sup>\*</sup>GG<sup>\*</sup>LLDR<sup>\*</sup>IL : 244  
 LeCRK1 : IEDVSRREVKILKALSGHQN<sup>\*</sup>L<sup>\*</sup>VQFYDA<sup>\*</sup>FEDDAN<sup>\*</sup>VYI<sup>\*</sup>VMELCEG<sup>\*</sup>GG<sup>\*</sup>LLDR<sup>\*</sup>IL : 240  
 NtCBK1 : IEDVSRREVKILKALSGHQN<sup>\*</sup>L<sup>\*</sup>VKFYDA<sup>\*</sup>FEDDAN<sup>\*</sup>VYI<sup>\*</sup>VMELCEG<sup>\*</sup>GG<sup>\*</sup>LLDR<sup>\*</sup>IL : 241  
 NtCBK2 : IEDVSRREVKILRALTGHNN<sup>\*</sup>L<sup>\*</sup>VKFYDA<sup>\*</sup>YEDPNN<sup>\*</sup>VYI<sup>\*</sup>VMELCEG<sup>\*</sup>GG<sup>\*</sup>LLDR<sup>\*</sup>IL : 242  
 DcCRK1 : IEDVSRREVKILRALTGHNN<sup>\*</sup>L<sup>\*</sup>VQFYDA<sup>\*</sup>FEDHTN<sup>\*</sup>VYV<sup>\*</sup>VMELCEG<sup>\*</sup>GG<sup>\*</sup>LLDR<sup>\*</sup>IL : 242  
 ZmMCK1 : IEDVSRREVKILKALSGHND<sup>\*</sup>N<sup>\*</sup>L<sup>\*</sup>VRFYDA<sup>\*</sup>CEDALN<sup>\*</sup>VYI<sup>\*</sup>VMELCEG<sup>\*</sup>GG<sup>\*</sup>LLDR<sup>\*</sup>IL : 268  
 ZmMCK2 : IEDVSRREVRIKALSGHNN<sup>\*</sup>L<sup>\*</sup>VKFYDA<sup>\*</sup>CEDALN<sup>\*</sup>VYI<sup>\*</sup>VMELCEG<sup>\*</sup>GG<sup>\*</sup>LLDR<sup>\*</sup>IL : 250  
 OsCBK1 : IEDVSRREVRISSLAGHSN<sup>\*</sup>L<sup>\*</sup>VQFYDA<sup>\*</sup>YEDDEN<sup>\*</sup>VYI<sup>\*</sup>VMELCKG<sup>\*</sup>GG<sup>\*</sup>LLDR<sup>\*</sup>IL : 238

Szerin/ treonin protein  
kináz katalitikus alegység

Aktív hely

AtCRK1 : QRGGKY<sup>\*</sup>SEDDAK<sup>\*</sup>VMVQ<sup>\*</sup>ILSVVAY<sup>\*</sup>CH<sup>\*</sup>LOGVVHRDLK<sup>\*</sup>PENFL<sup>\*</sup>FSTK<sup>\*</sup>DE<sup>\*</sup>TSP : 267  
 AtCRK2 : ARGGKY<sup>\*</sup>SEDDAKAVL<sup>\*</sup>IQILNVVAF<sup>\*</sup>CH<sup>\*</sup>LOGVVHRDLK<sup>\*</sup>PENFL<sup>\*</sup>YTSKE<sup>\*</sup>ENSM : 288  
 AtCRK3 : ARGGKY<sup>\*</sup>FEDDAKAV<sup>\*</sup>IQILNVVAF<sup>\*</sup>CH<sup>\*</sup>LOGVVHRDLK<sup>\*</sup>PENFL<sup>\*</sup>YTSR<sup>\*</sup>EDSD : 287  
 AtCRK4 : ARGGRY<sup>\*</sup>FEVDAKRI<sup>\*</sup>LQILSAT<sup>\*</sup>AFH<sup>\*</sup>LOGVVHRDLK<sup>\*</sup>PENFL<sup>\*</sup>YTSR<sup>\*</sup>NEDAI : 287  
 AtCRK5 : SRGGKY<sup>\*</sup>TEEDAK<sup>\*</sup>VMVQ<sup>\*</sup>ILNVVAF<sup>\*</sup>CH<sup>\*</sup>LOGVVHRDLK<sup>\*</sup>PENFL<sup>\*</sup>YTSK<sup>\*</sup>EDTSQ : 292  
 AtCRK6 : ARGGRY<sup>\*</sup>FEADAKRI<sup>\*</sup>LQILSAT<sup>\*</sup>AFH<sup>\*</sup>LOGVVHRDLK<sup>\*</sup>PENFL<sup>\*</sup>YTSK<sup>\*</sup>NEDAV : 286  
 AtCRK7 : QRGGKY<sup>\*</sup>SEVDAKVM<sup>\*</sup>QILSVVAY<sup>\*</sup>CH<sup>\*</sup>LOGVVHRDLK<sup>\*</sup>PENFL<sup>\*</sup>YTSK<sup>\*</sup>DESSP : 268  
 AtCRK8 : ARGGKY<sup>\*</sup>SEDDAKPV<sup>\*</sup>IQILNVVAF<sup>\*</sup>CH<sup>\*</sup>LOGVVHRDLK<sup>\*</sup>PENFL<sup>\*</sup>YTSK<sup>\*</sup>ENSO : 294  
 LeCRK1 : SRGGRY<sup>\*</sup>TEEDAKS<sup>\*</sup>IVQILNVVAF<sup>\*</sup>CH<sup>\*</sup>LOGVVHRDLK<sup>\*</sup>PENFL<sup>\*</sup>YTSK<sup>\*</sup>EDDSP : 290  
 NtCBK1 : SRGGRY<sup>\*</sup>TEEDAKS<sup>\*</sup>ILVQILNVVAF<sup>\*</sup>CH<sup>\*</sup>LOGVVHRDLK<sup>\*</sup>PENFL<sup>\*</sup>YTSK<sup>\*</sup>EDDAP : 291  
 NtCBK2 : SRGGKY<sup>\*</sup>TEEDAKSV<sup>\*</sup>MQILKVVAF<sup>\*</sup>CH<sup>\*</sup>LOGVVHRDLK<sup>\*</sup>PENFL<sup>\*</sup>YTSK<sup>\*</sup>EDNAQ : 292  
 DcCRK1 : SRGGKY<sup>\*</sup>TEEDAKAV<sup>\*</sup>MQILNVVAF<sup>\*</sup>CH<sup>\*</sup>LOGVVHRDLK<sup>\*</sup>PENFL<sup>\*</sup>YTSK<sup>\*</sup>EDDSQ : 292  
 ZmMCK1 : ARGGRY<sup>\*</sup>TEEDAKA<sup>\*</sup>IIQILSVVAF<sup>\*</sup>CH<sup>\*</sup>LOGVVHRDLK<sup>\*</sup>PENFL<sup>\*</sup>YTSK<sup>\*</sup>EDSAP : 318  
 ZmMCK2 : ARGGRY<sup>\*</sup>TEEDAKA<sup>\*</sup>IVQILSVVAF<sup>\*</sup>CH<sup>\*</sup>LOGVVHRDLK<sup>\*</sup>PENFL<sup>\*</sup>YTSK<sup>\*</sup>EDSAP : 300  
 OsCBK1 : ARGGKY<sup>\*</sup>SEEDAK<sup>\*</sup>VMVQ<sup>\*</sup>ILSVVAF<sup>\*</sup>CH<sup>\*</sup>LOGVVHRDLK<sup>\*</sup>PENFL<sup>\*</sup>YTSK<sup>\*</sup>EDNSA : 288

Szerin/ treonin protein  
kináz katalitikus alegység

ATP kötő motívum

AtCRK1 : LK<sup>\*</sup>VIDFGLSDY<sup>\*</sup>VKE<sup>\*</sup>DERLNDIVGSAYYVAPE<sup>\*</sup>VLHRTY<sup>\*</sup>GTEADMWSIG<sup>\*</sup>VIA : 317  
 AtCRK2 : LK<sup>\*</sup>VIDFGLSDFV<sup>\*</sup>RE<sup>\*</sup>DERLNDIVGSAYYVAPE<sup>\*</sup>VLHRSY<sup>\*</sup>TTEADVWSIG<sup>\*</sup>VIA : 338  
 AtCRK3 : LK<sup>\*</sup>VIDFGLSDFI<sup>\*</sup>RE<sup>\*</sup>DERLNDIVGSAYYVAPE<sup>\*</sup>VLHRSYS<sup>\*</sup>TEADIWSIG<sup>\*</sup>VIT : 337  
 AtCRK4 : LK<sup>\*</sup>VIDFGLSDFIR<sup>\*</sup>YDQRLNDVVGSA<sup>\*</sup>YYVAPE<sup>\*</sup>VLHRSYS<sup>\*</sup>TEADMWSIG<sup>\*</sup>VIS : 337  
 AtCRK5 : LK<sup>\*</sup>VIDFGLSDY<sup>\*</sup>VRE<sup>\*</sup>DERLNDIVGSAYYVAPE<sup>\*</sup>VLHRSYS<sup>\*</sup>TEADIWSVG<sup>\*</sup>VIV : 342  
 AtCRK6 : LK<sup>\*</sup>VIDFGLSDY<sup>\*</sup>ARE<sup>\*</sup>DQRLNDVVGSA<sup>\*</sup>YYVAPE<sup>\*</sup>VLHRSYS<sup>\*</sup>TEADIWSIG<sup>\*</sup>VIS : 336  
 AtCRK7 : LK<sup>\*</sup>VIDFGLSDY<sup>\*</sup>VRE<sup>\*</sup>DERLNDIVGSAYYVAPE<sup>\*</sup>VLHRTY<sup>\*</sup>GTEADMWSIG<sup>\*</sup>VIA : 318  
 AtCRK8 : LK<sup>\*</sup>VIDFGLSDFV<sup>\*</sup>RE<sup>\*</sup>DERLNDIVGSAYYVAPE<sup>\*</sup>VLHRSY<sup>\*</sup>TTEADVWSIG<sup>\*</sup>VIA : 344  
 LeCRK1 : MK<sup>\*</sup>VIDFGLSDFI<sup>\*</sup>KE<sup>\*</sup>DQRLNDIVGSAYYVAPE<sup>\*</sup>VLHRSYS<sup>\*</sup>TEADMWSIG<sup>\*</sup>VIT : 340  
 NtCBK1 : MK<sup>\*</sup>VIDFGLSDFI<sup>\*</sup>RE<sup>\*</sup>DQRLNDIVGSAYYVAPE<sup>\*</sup>VLHRSYS<sup>\*</sup>TEADMWSIG<sup>\*</sup>VIT : 341  
 NtCBK2 : LK<sup>\*</sup>VIDFGLSDFV<sup>\*</sup>KE<sup>\*</sup>DERLNDIVGSAYYVAPE<sup>\*</sup>VLHRSYS<sup>\*</sup>TEADVWSIG<sup>\*</sup>VIA : 342  
 DcCRK1 : LK<sup>\*</sup>VIDFGLSDY<sup>\*</sup>VKE<sup>\*</sup>DERLNDIVGSAYYVAPE<sup>\*</sup>VLHRSYS<sup>\*</sup>TEADVWSIG<sup>\*</sup>VIS : 342  
 ZmMCK1 : MK<sup>\*</sup>VIDFGLSDFI<sup>\*</sup>RE<sup>\*</sup>DERLNDIVGSAYYVAPE<sup>\*</sup>VLHRSYS<sup>\*</sup>TEADIWSIG<sup>\*</sup>VIT : 368  
 ZmMCK2 : MK<sup>\*</sup>VIDFGLSDFI<sup>\*</sup>RE<sup>\*</sup>DERLNDIVGSAYYVAPE<sup>\*</sup>VLHRSYS<sup>\*</sup>TEADIWSIG<sup>\*</sup>VIT : 350  
 OsCBK1 : MK<sup>\*</sup>VIDFGLSDFV<sup>\*</sup>KE<sup>\*</sup>DERLNDIVGSAYYVAPE<sup>\*</sup>VLHRSY<sup>\*</sup>GTEADMWSIG<sup>\*</sup>VIV : 338

Szerin/ treonin protein  
kináz katalitikus alegység

T-hurok

\* 420 \* 440 \*  
 AtCRK1 : YILLCGSRPFWARTESGIFRAVLKADEFEEAPWPSISPEAVDFVKRLLY : 367  
 AtCRK2 : YILLCGSRPFWARTESGIFRAVLKADEFDEPPWPSISFBAKDFVKRLLY : 388  
 AtCRK3 : YILLCGSRPFWARTESGIFRVLRTENYDDVPWPSCSSEGGDFVKRLLY : 387  
 AtCRK4 : YILLCGSRPFYGTESGIFRCVLRANFNEDMPWPSISPTAKDFVKRLLY : 387  
 AtCRK5 : YILLCGSRPFWARTESGIFRAVLKADEFDDPPWPSISSEAKDFVKRLLY : 392  
 AtCRK6 : YILLCGSRPFYGTESGIFRCVLRANFNDDLWPSISPIAKDFVKRLLY : 386  
 AtCRK7 : YILLCGSRPFWARSESIGFRAVLKADEFEEAPWPSISPDVDFVKRLLY : 368  
 AtCRK8 : YILLCGSRPFWARTESGIFRAVLKADEFDEPPWPSISSEAKDFVKRLLY : 394  
 LeCRK1 : YILLCGSRPFWARTESGIFRSVLRADNFEDSPWPSISABARDFVKRLLY : 390  
 NtCBK1 : YILLCGSRPFWARTESGIFRSVLRADNFEDSPWPSISABARDFVKRLLY : 391  
 NtCBK2 : YILLCGSRPFWARTESGIFRAVLKADEFDEQWPSISSEAKDFVKRLLY : 392  
 DcCRK1 : YILLCGSRPFWARTESGIFRAVLKANLSFDEPPWPSISSEAKDFVKRLLY : 392  
 ZmMCK1 : YILLCGSRPFWARTESGIFRSVLRADNFDDSPWPSISABAKDFVKRFLN : 418  
 ZmMCK2 : YILLCGSRPFWARTESGIFRVLRADNFDDSPWPSISABAKDFVKRFLN : 400  
 OsCBK1 : YILLCGSRPFWARTESGIFRAVLKADEFEEAPWPSISABAKDFVKRLLY : 388

Szerin/ treonin protein  
kináz katalitikus alegység

460 \* 480 \* 500  
 AtCRK1 : KDRKRRLTAQAALCHPWLVGSHE-LKIPSDMIYKLVKVYIMSSSLRKSA : 416  
 AtCRK2 : KDRKRRLTAQAALCHPWLVGSHE-LKIPSDMIYKLVKVYIMSSSLRKSA : 437  
 AtCRK3 : KDRKRRLTAQAALCHPWLVGSHE-LKIPSDMIYKLVKVYIMSSSLRKSA : 435  
 AtCRK4 : KDRKRRLTAQAALCHPWLVGSHE-LKIPSDMIYKLVKVYIMSSSLRKSA : 435  
 AtCRK5 : KDRKRRLTAQAALCHPWLVGSHE-LKIPSDMIYKLVKVYIMSSSLRKSA : 441  
 AtCRK6 : KDRKRRLTAQAALCHPWLVGSHE-LKIPSDMIYKLVKVYIMSSSLRKSA : 434  
 AtCRK7 : KDRKRRLTAQAALCHPWLVGSHE-LKIPSDMIYKLVKVYIMSSSLRKSA : 417  
 AtCRK8 : KDRKRRLTAQAALCHPWLVGSHE-LKIPSDMIYKLVKVYIMSSSLRKSA : 444  
 LeCRK1 : KDRKRRLTAQAALCHPWLVGSHE-LKIPSDMIYKLVKVYIMSSSLRKSA : 438  
 NtCBK1 : KDRKRRLTAQAALCHPWLVGSHE-LKIPSDMIYKLVKVYIMSSSLRKSA : 439  
 NtCBK2 : KDRKRRLTAQAALCHPWLVGSHE-LKIPSDMIYKLVKVYIMSSSLRKSA : 441  
 DcCRK1 : KDRKRRLTAQAALCHPWLVGSHE-LKIPSDMIYKLVKVYIMSSSLRKSA : 441  
 ZmMCK1 : KDRKRRLTAQAALCHPWLVGSHE-LKIPSDMIYKLVKVYIMSSSLRKSA : 466  
 ZmMCK2 : KDRKRRLTAQAALCHPWLVGSHE-LKIPSDMIYKLVKVYIMSSSLRKSA : 448  
 OsCBK1 : KDRKRRLTAQAALCHPWLVGSHE-LKIPSDMIYKLVKVYIMSSSLRKSA : 437

Szerin/ treonin protein  
kináz katalitikus alegység

Autoinhibíciós rész

Kalmodulin kötő régió

\* 520 \* 540 \*  
 AtCRK1 : LALAKRLTIVPQIAYLREQFTLLGFSKNGYISMQNYKTAALKSSSTAMKD : 466  
 AtCRK2 : LALAKRLTIVPQIAYLREQFTLLGFSKNGYISMQNYKTAALKSSSTAMKD : 487  
 AtCRK3 : LALAKRLTIVPQIAYLREQFTLLGFSKNGYISMQNYKTAALKSSSTAMKD : 485  
 AtCRK4 : LALAKRLTIVPQIAYLREQFTLLGFSKNGYISMQNYKTAALKSSSTAMKD : 484  
 AtCRK5 : LALAKRLTIVPQIAYLREQFTLLGFSKNGYISMQNYKTAALKSSSTAMKD : 491  
 AtCRK6 : LALAKRLTIVPQIAYLREQFTLLGFSKNGYISMQNYKTAALKSSSTAMKD : 483  
 AtCRK7 : LALAKRLTIVPQIAYLREQFTLLGFSKNGYISMQNYKTAALKSSSTAMKD : 467  
 AtCRK8 : LALAKRLTIVPQIAYLREQFTLLGFSKNGYISMQNYKTAALKSSSTAMKD : 494  
 LeCRK1 : LALAKRLTIVPQIAYLREQFTLLGFSKNGYISMQNYKTAALKSSSTAMKD : 487  
 NtCBK1 : LALAKRLTIVPQIAYLREQFTLLGFSKNGYISMQNYKTAALKSSSTAMKD : 488  
 NtCBK2 : LALAKRLTIVPQIAYLREQFTLLGFSKNGYISMQNYKTAALKSSSTAMKD : 491  
 DcCRK1 : LALAKRLTIVPQIAYLREQFTLLGFSKNGYISMQNYKTAALKSSSTAMKD : 491  
 ZmMCK1 : LALAKRLTIVPQIAYLREQFTLLGFSKNGYISMQNYKTAALKSSSTAMKD : 515  
 ZmMCK2 : LALAKRLTIVPQIAYLREQFTLLGFSKNGYISMQNYKTAALKSSSTAMKD : 497  
 OsCBK1 : LALAKRLTIVPQIAYLREQFTLLGFSKNGYISMQNYKTAALKSSSTAMKD : 487

Módosult EF motívum

560 \* 580 \* 600  
 AtCRK1 : SRVDFVHMTSCQYKRLDDEEFCAAALSVOLEALDRWECHARRAYELF : 516  
 AtCRK2 : SRVDFVHMTSCQYKRLDDEEFCAAALSVOLEALDRWECHARRAYELF : 537  
 AtCRK3 : SRVDFVHMTSCQYKRLDDEEFCAAALSVOLEALDRWECHARRAYELF : 535  
 AtCRK4 : SRVDFVHMTSCQYKRLDDEEFCAAALSVOLEALDRWECHARRAYELF : 534  
 AtCRK5 : SRVDFVHMTSCQYKRLDDEEFCAAALSVOLEALDRWECHARRAYELF : 541  
 AtCRK6 : SRVDFVHMTSCQYKRLDDEEFCAAALSVOLEALDRWECHARRAYELF : 533  
 AtCRK7 : SRVDFVHMTSCQYKRLDDEEFCAAALSVOLEALDRWECHARRAYELF : 517  
 AtCRK8 : SRVDFVHMTSCQYKRLDDEEFCAAALSVOLEALDRWECHARRAYELF : 544  
 LeCRK1 : SRVDFVHMTSCQYKRLDDEEFCAAALSVOLEALDRWECHARRAYELF : 537  
 NtCBK1 : SRVDFVHMTSCQYKRLDDEEFCAAALSVOLEALDRWECHARRAYELF : 538  
 NtCBK2 : SRVDFVHMTSCQYKRLDDEEFCAAALSVOLEALDRWECHARRAYELF : 541  
 DcCRK1 : SRVDFVHMTSCQYKRLDDEEFCAAALSVOLEALDRWECHARRAYELF : 541  
 ZmMCK1 : SRVDFVHMTSCQYKRLDDEEFCAAALSVOLEALDRWECHARRAYELF : 565  
 ZmMCK2 : SRVDFVHMTSCQYKRLDDEEFCAAALSVOLEALDRWECHARRAYELF : 547  
 OsCBK1 : SRVDFVHMTSCQYKRLDDEEFCAAALSVOLEALDRWECHARRAYELF : 537

Módosult EF motívum

```

      *      620      *      640      *
AtCRK1 : EKDCGRFIMTEELASEETGLGPSVPVHVVLQDWIRHSDGKLSFLGFMKLLH : 566
AtCRK2 : EMNENRVIVTEELASEETGVGSSIPVHTLINDWIRHSDGKLSFLGFMKLLH : 587
AtCRK3 : ETBENRVITTEELAREINVCAS--AYGHLRDMVRSDDGKLSYLGFTKFLH : 583
AtCRK4 : EHEGNRIISVOELAGEEMSVGPS--AYPLLRDMVRSDDGKLSFLGYAKFLH : 582
AtCRK5 : EKDCGRFIMTEELASEETGLGPSVPVHAVLQDWLRHSDGKLSFLGFMKLLH : 591
AtCRK6 : ESEGNRAISVOELAEEMSLGPN--AYPLLRDMVRSDDGKLNFLGYAKFLH : 581
AtCRK7 : EKDCGRVIMTEELATEETGLGPSVPVHVVLQDWIRHSDGKLSFLGFMKLLH : 567
AtCRK8 : DKNENRAIVTEELASEETGVGPSIPVHSVLQDWIRHSDGKLSFLGFMKLLH : 594
LeCRK1 : EQEGNRVISVEELAQEMNLGPT--AYAFLRDCTIRPSDRKLSFLGYTKFLH : 585
NtCBK1 : EQEGNRVISVEELAQEMNLGPT--AYAFLRDCTIRPSDRKLSFLGYTKFLH : 586
NtCBK2 : EKDCGRRAIMTEELASEETGLGPSVPVHAVLQDWLRHSDGKLSFLGFMKLLH : 591
DcCRK1 : EKDCGRRAIMTEELASEETGLGPSIPVHAVLQDWIRHSDGKLSFLGYVLLH : 591
ZmMCK1 : EQEGNRVISVEELAQEMNLAPT--HYSIVQDWIRKSDGKLNFLGFTKFLH : 613
ZmMCK2 : EQEGNRVISVEELAQEMNLAPT--HYSIVQDWIRKSDGKLNFLGFTKFLH : 595
OsCBK1 : DKDCGRFIVTEELASGETGLGPSVPLHVVLQDWIRHSDGKLSFLGFMKLLH : 587

```

Módosult EF motívum

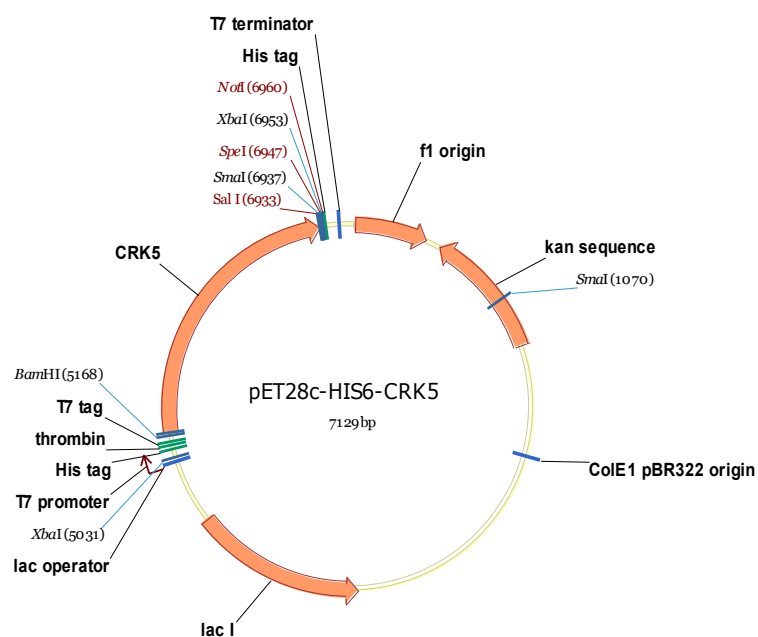
```

      660
AtCRK1 : GVSSE--LQMA-- : 576
AtCRK2 : GVSSTRQSLAATR- : 599
AtCRK3 : GVTILRAAHAAPR- : 595
AtCRK4 : GVTIVRS--SSAPR- : 594
AtCRK5 : GVSSE--I--IAH- : 601
AtCRK6 : GVTIVRS--SSAPMR : 594
AtCRK7 : GVSSE--LQMA-- : 577
AtCRK8 : GVSVRASGKTTR- : 606
LeCRK1 : GVTMRSSSTHHR : 598
NtCBK1 : GVTIRGSSSTHHR : 599
NtCBK2 : GVSSE--ITVQ- : 602
DcCRK1 : GVSSTR-AIAAAQ- : 602
ZmMCK1 : GVTIRGSENTRRH- : 625
ZmMCK2 : GVTIRGSENTRRH- : 607
OsCBK1 : GVSSE--IIPIT-- : 597

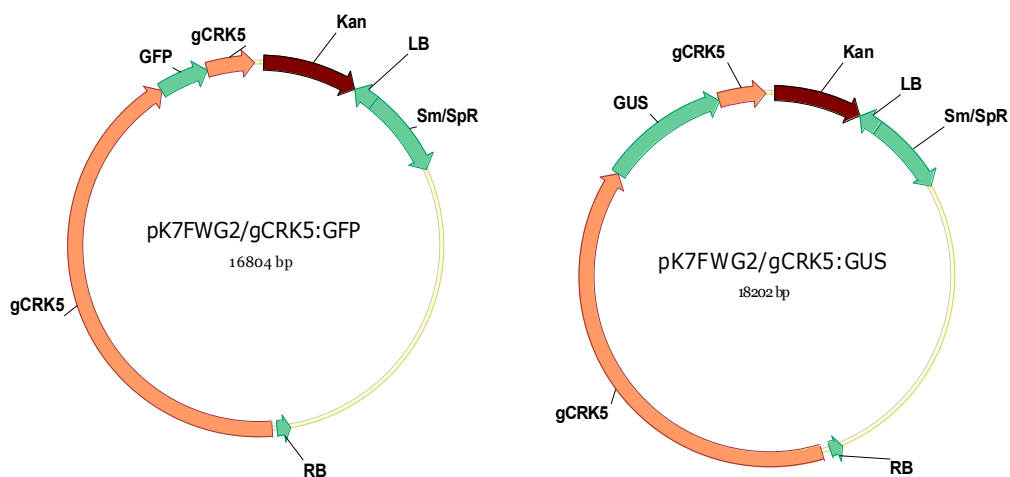
```

**Függelék 1. Ábra. Különböző növényfajokból származó CRK család tagjainak fehérjeszekvencián alapuló összehasonlítása a Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) online program segítségével. A konzervált részeket különböző jelölésekkel kiemeltük: N-terminális mirisztációs, sejtmagi lokalizációs, szerin/treonin protein kináz katalitikus alegység, autóinhibíciós, kalmodulin kötő, módosult EF motívumok.**

A GenBank (NCBI) adatbázisából választottuk ki a különböző növényfajokba tartozó CRK fehérjéket, a hozzájuk tartozó azonosító számmal: CRK1 (At2g41140), CRK2 (At3g19100), CRK3 (At2g46700), CRK4 (At5g24430), CRK5 (At3g50530), CRK6 (At3g49370), CRK7 (At3g56760) CRK8 (At1g49580), LeCRK1 (AY079049), NtCBK1 (AF435450), NtCBK2 (AF435452), DcCRK1 (CAA58750), ZmMCK1 (AAB47181), ZmMCK2 (AF289237), OsCBK1 (AF368282).



**Függelék 2. Ábra. A His<sub>6</sub>-CRK5 fehérjetisztításhoz használt pET28c-HIS<sub>6</sub>-CRK5 konstrukció szerkezeti térképe.**



**Függelék 3. Ábra. Az *Agrobacterium* közvetítette növény transzformációhoz felhasznált *gCRK5:GFP*, *gCRK5:GUS* konstrukciókat tartalmazó pK7FWG2 bináris vektor szerkezete.**