

**A növényi RHO (ROP) GTP-áz kapcsolt
receptor-szerű citoplazmatikus kinázok
aktiválását befolyásoló aminosav motívumok
azonosítása**

Ph. D. értekezés

Lajkó Dézi Bianka

Témavezető: Dr. Fehér Attila

Magyar Tudományos Akadémia
Szegedi Biológiai Központ,
Növénybiológiai Intézet
Funkcionális Sejtbiológia Csoport

Szegedi Tudományegyetem TTIK
Biológia Doktori Iskola
Szeged

2019

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	4
1. Bevezetés.....	7
2. Irodalmi áttekintés.....	9
2.1. RHO GTP-áz fehérjék	9
2.2. A RHO GTP-ázok célfehérjei	15
2.3. A ROP GTP-ázok és fehérje kinázok jelátviteli kapcsolatai	19
2.3.1. A ROP GTP-ázok közvetve szabályozzák az Snf1-rokon 2-es típusú kináz fehérjét .	19
2.3.2. A ROP GTP-ázok és a mitogén-aktivált protein kináz kaszkádok	20
2.3.3. ROP GTP-ázok és lipid kinázok.....	21
2.3.4. A ROP GTP-áz aktivált receptor-szerű citoplazmatikus kinázok	22
3. Célkitűzések	27
4. Anyagok és módszerek.....	28
4.1. Szekvencia analízis.....	28
4.2. Mutagenézis	28
4.3. Fehérje termeltetés és tisztítás baktériumból	30
4.4. <i>In vitro</i> kináz esszék	31
4.5. Fehérje-fehérje kölcsönhatások.....	31
4.6. Mikroszkópia és pollencső növekedés.....	35
4.7. Növényekkel végzett kísérletek	36
4.7.1. Növények nevelése	36
4.7.2. <i>Arabidopsis Agrobacterium</i> közvetítette genetikai transzformációja	36
4.7.3. Transzformált növények antibiotikum szelekciója	37
4.7.4. A transzformált növények utódvonalainak hasadási tesztje	38
4.7.5. A hipokotil hosszúság mérés paraméterei.....	39
4.8. Az eredmények statisztikai analízise.....	39
5. Eredmények.....	40
5.1. Az RLCK kinázok ROP GTP-áz kötő képességét potenciálisan befolyásoló aminosav szekvencia motívumok azonosítása	40
5.2. Az RLCK VI_A csoportra jellemző ROP GTP-áz kötő motívumok mutációs analízise	42
5.3. A ROP GTP-áz -kötő motívumok jelenléte befolyásolja az RLCK VI_A3 kináz szubsztrát foszforilációs aktivitását.....	43
5.4. Az azonosított aminosav motívumok közösen alakítják ki a kinázok ROP GTP-áz kötő felszínét	45

5.5. A ROP GTP-áz kötő motívumokat tartalmazó kinázok evolúciósan konzerváltak a szárazföldi növényekben	47
5.6. Az RLCK VI_A3 kináz és a ROP1 GTP-áz kölcsönhatása <i>in planta</i> és az RLCK VI_A3 kináz pollencső növekedésre gyakorolt hatása	48
5.7. Az RLCK VI_A2 kináz ROP GTP-áz kötő képességének szerepe a kináz biológiai funkciójában	51
6. Eredmények megvitatása	55
7. Összefoglalás	63
8. Summary.....	66
Köszönetnyilvánítás	68
Saját közlemények	69
Irodalomjegyzék	70
Függelék	84

Rövidítések jegyzéke

ABI1/2	abscisic acid-insensitive 1/2: abszcizinsav-inszenzitív 1/2 foszfatáz;
ABRC	<i>Arabidopsis</i> Biological Resource Center
Ade	adenin aminosav
At	<i>Arabidopsis thaliana</i> , Lúdfű
BAK1	BRI1-associated receptor kinase 1: BRI1-kapcsolt receptor kináz1
BiFC	Bimolecular fluorescence complementation: Bimolekuláris Fluoreszcencia Komplementációs tesztek
Cdc42	cell division cycle 42, Rho GTP-áz fehérje
Col	Columbia-0 vad típusú növény
CRIB	Cdc42/Rac interactive binding motif: CDC42/RAC fehérje kötő szekvencia motívum
DOCK180	Dedicator of cytokinesis; nem-növényi GEF fehérje katalitikus alegysége
Dbl	nem-növényi GEF fehérje alegysége
GAP	GTPase accelerator protein: GTP-áz gyorsító fehérje
GDI	guanine nucleotide dissociation inhibitor: guanin nukleotid disszociációs inhibitor fehérje
GDP	guanidine diphosphate: guanozin difoszfát
GEF fehérje	guanine nucleotide exchange factor: guanin nukleotid kicserélő
GFP	green fluorescent protein: zöld fluoreszcens fehérje
GPCR	G-protein-coupled receptor: G-fehérje kapcsolt receptor
GTP	guanidine triphosphate: guanozin trifoszfát
His	hisztidin aminosav
Hv	<i>Hordeum vulgare</i> , Árpa
ICR	Interactor of constitutively active ROP: ROP effektor vázfehérje
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside: Izopropil-béta-d-thiogalaktopiranozid
Leu	leucin aminosav
LiAc	lítium-acetát

MAPK	mitogen-activated protein kinase: mitogén-aktivált fehérje kináz
MS	Murashige és Skoog (1962) táptalaj
NADPH-oxidáz	nikotinamid adenin dinukleotid foszfát-oxidáz
NCBI	National Center for Biotechnology Information: Nemzeti Biotechnológiai Információs Központ
Os	<i>Oryza sativa</i> , Rizs
PAK1	p21-activated kinase1: p21-aktivált kináz
PBD	p21-binding domain: p21-kötő alegység
PHI BLAST	Pattern Hit Initiated Basic Local Alignment Search Tool
PIP2	phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate: foszfatidilinozitol 4,5-bifoszfát
PIP5K	phosphatidylinositol 4-phosphate5-kinase: foszfatidilinozitol 4-foszfát 5-kináz
PRONE	Plant ROP nucleotide exchanger: növényi GEF fehérje nukleotid kicserélő alegysége
PVDF	polivinilén-difluorid membrán
RAC	Rho GTP-áz fehérje
RBK	ROP binding kinase: ROP-kötő kináz
REM	Rho effector homology: Rho effektor homológ régió
Rho	Ras homológ, G-fehérje
RIC	ROP-interactive CRIB motif-containing protein: ROP interaktív CRIB motívumot tartalmazó adaptor fehérje
RIP	ROP-interacting protein: ROP effektor vázfehérje
RLCK	receptor-like cytoplasmic kinases: receptor-szerű citoplazmatikus kinázok
RNSi	RNS interference
ROP	Rho protein of plant: növényi Rho GTP-áz fehérje
ROS	reactive oxygen species: reaktív oxigén fajok
SCF-E3	SCF: SKP1-cullin 1-F-box, ubiquitin ligáz komplex
SDP	specificity-determining site: specificitást determináló hely
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis: SDS-poliakrilamid gélelektroforézis
SLICE	Seamless Ligation Cloning Extract

Snf1	Sucrose nonfermenting 1; adenzin monofoszfát (AMP) által aktivált szerin/treonin kináz fehérje
SPIKE1	DOCK family guanine nucleotide exchange factor; GEF fehérje
Trp	triptofán aminosav

1. Bevezetés

A növények és az állatok életmódja nagymértékben eltér egymástól, hiszen a növények életmódja helyhez kötött, míg az állatok képesek a helyváltogatásra. Ennek következtében a növények esetében nyitott egyedfejlődési programról beszélhetünk, ami azt jelenti, hogy a környezeti hatások jelentős mértékben befolyásolják a növények egyedfejlődését. A környezet kis változása is számtalan növényi gén működését befolyásolja, hiszen a növényi szervezetek így alkalmazkodnak a megváltozott környezeti feltételekhez. A növények és a környezet szoros kapcsolatára utal a növényi gének nagy száma is. A lúdfű (*Arabidopsis thaliana*) és az ember egyedfejlődését, életfolyamatait közel azonos számú (25-35000) gén szabályozza. Ez meglepő lehet, ha arra gondolunk, mekkora különbség van a növényi és emberi szervezetek bonyolultságát illetően. Egyes géncsaládok tekintetében azonban már nagy különbségeket tapasztalhatunk a két faj között, hiszen vannak olyan családok, amelyek az egyik fajban jelen vannak, a másiktól hiányoznak, vagy a családokat alkotó tagok számában, a kódolt fehérjék szerkezetében is különbözhetnek egymástól.

Ezek az eltérések könnyen azonosíthatóak, hiszen már a lúdfű és az ember teljes génállományát is sikerült feltérképezni. Az emberi génállomány húsz heterotrimerikus G-fehérje α alegységet, illetve ezernél is több, ezeket a fehérjéket szabályozó G-fehérjéhez kapcsolt receptort (GPCR) kódol. Bár ezek a gének számos alapvető sejt-folyamatot szabályoznak állatok és élesztők esetében a sejtosztódástól a programozott sejthalálig, *Arabidopsisban* egyetlen klasszikus GPCR sincs (Urano és mtsai. 2012). Az *Arabidopsis* genomban a heterotrimer G-fehérjéknek is csak egy α -, egy β -, és két γ -alegységét kódoló génjét sikerült azonosítani (Johnston és mtsai. 2007; Johnston és mtsai. 2007; Jones 2002; Jones és mtsai. 2004), valamint kísérletesen sikerült azt is igazolni, hogy a klasszikus $G\alpha$ -alegység elrontása alig észrevehető hatásokkal jár (Ullah és mtsai. 2001; Wang és mtsai. 2001). A kis molekulásúlyú GTP-ázok (RAS szupercsalád) esetében is jelentős eltérések figyelhetők meg, növényekből ugyanis a sejtosztódást szabályozó RAS GTP-ázok teljesen hiányoznak. A stresszválaszokat és a sejt-váz szerveződését szabályozó Rho GTP-ázok is csupán egyetlenegy alcsaláddal képviseltetik magukat növények esetében, míg állati sejtekben három alcsaládot (Rho, Rac, Cdc42) is megkülönböztethetünk. A növényi Rho GTP-ázok specifikus alcsaládjának neve a ROP (Rho of Plants) G-fehérje alcsalád, amelynek *Arabidopsis*-ban 11, kukoricában 9, rizsben pedig 7 génjét azonosították (Yang 2002; Winge és mtsai. 2000; Christensen és mtsai. 2003). A növények esetében hiányzó G-

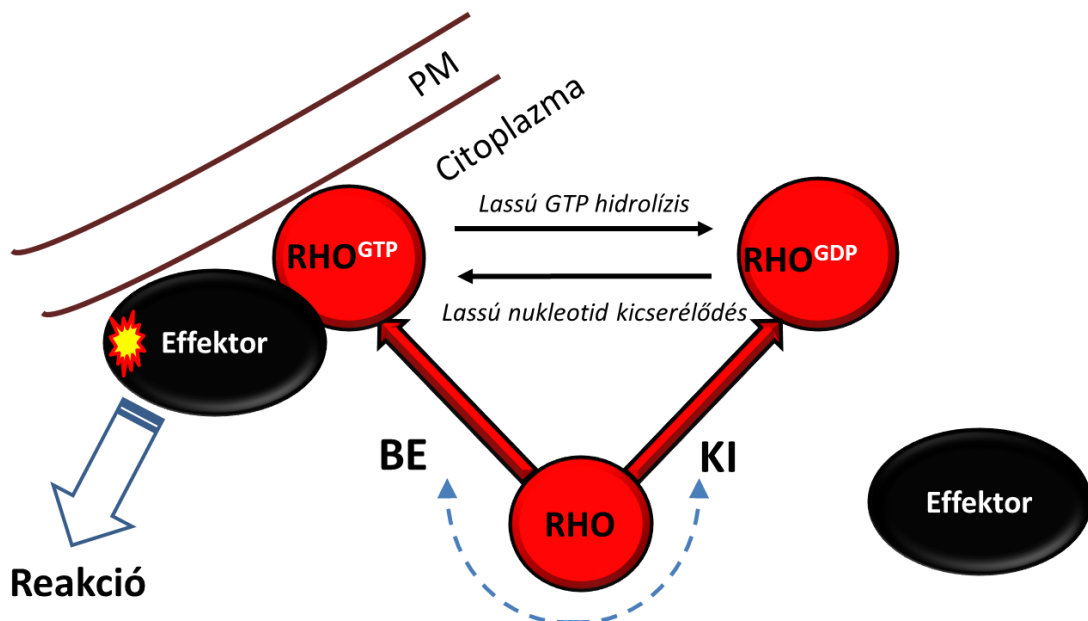
fehérje típusok sokszor a GTP-ázokhoz kapcsolódó jelátviteli fehérjék és fehérje komplexek hiányát is eredményezik, ilyen például az állati sejtekben ismert p21-aktivált kinázok (PAK: p21-activated kinase) hiánya a növényi sejtekben (Zheng és mtsai. 2000).

Az állati és növényi jelátviteli útvonalak közötti különbségek vizsgálata érdekes betekintést ad az evolúció folyamatába. A növények és állatok gyakran eltérő fehérjéket ill. fehérje doméneket használnak hasonló molekuláris mechanizmusokban, míg más esetekben ugyanaz a fehérje (domén) teljesen más folyamatban vesz részt a két organizmusban. Laboratóriumunkban az elmúlt években a növényi Rho-típusú G-fehérjékhez kapcsolódó jelátviteli útvonalakat vizsgáltuk, amely számos példát szolgáltatott a fentiek alátámasztására. Többek között megállapítottuk, hogy a növényi Rho-típusú (ROP) GTP-ázok p21-aktivált kinázok hiányában egy növény-specifikus kináz család (receptorszerű citoplazmatikus kináz VI_A; RLCK VI_A) tagjait aktiválják (Dorjgotov és mtsai. 2009). Ezek a kinázok szerkezetükben teljesen eltérnek az állati (és élesztő) PAK kinázoktól (Jurca és mtsai. 2008). Többek között, hiányzik belőlük a PAK kinázokra jellemző Rho GTP-áz-kötő motívum (Cdc42/Rac1-interactive-binding; CRIB motívum). A kutatócsoportomhoz csatlakozva az lett a feladatom, hogy azonosítsam azokat a növényi ROP GTP-áz aktivált RLCK VI_A kinázokra jellemző aminosav motívumokat, melyek részt vehetnek a kináz-GTP-áz kapcsolat és az attól függő kináz aktivitás szabályozásában.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. RHO GTP-áz fehérjék

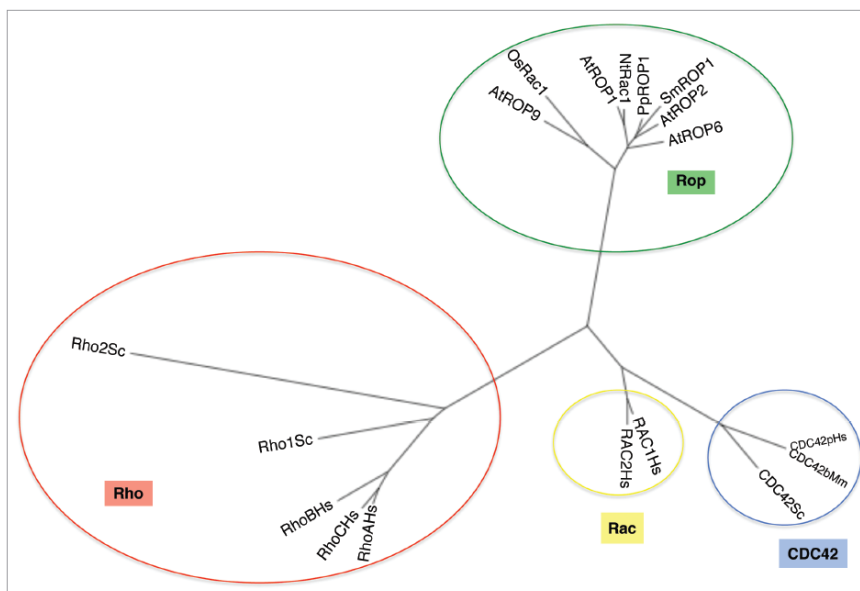
A Rho családba tartozó kis molekulású Rho-típusú GTP-kötő fehérjék vagy G-fehérjék olyan konzervált molekuláris szabályozó fehérjék, amelyek központi kapcsolóként funkcionálnak eukarióta jelátviteli hálózatokban (Bishop és mtsai. 2000). Szabályozó szerepük pedig a GTP-kötő és GTP-hidrolizáló képességükön alapszik, amely lehetővé teszi, hogy a sejtes szabályozási folyamatokban molekuláris kapcsolóként vegyenek részt. Aktív állapotuk a GTP-kötött forma, ekkor ezek a fehérjék jelátviteli folyamatokat aktiválnak, míg belső GTP-áz aktivitásuknak köszönhetően a fehérjék visszatérnek a GDP-kötött állapotba, amely az aktivitásuk és a jelátvitel befejeződését jelenti (1. ábra).



1. ábra: Rho GTP-áz fehérjék jelátviteli folyamatokban betöltött szerepe (Fehér Attila ábrája). Eukariótákban a Rho GTP-ázok kulcsfontosságú szerepet töltenek be számos celluláris folyamatban, mint pl. a sejtmozgás, sejtosztódás, sejtalak változások, intracelluláris transzport. Ezekben a folyamatokban molekuláris kapcsolóként vesznek részt: GTP-kötött formában szignalizációs útvonalakat aktiválnak Reakció fehérjéken keresztül, míg GDP-kötött formában ez az aktivitás megszűnik.

Eukarióta sejtekben a Rho-típusú GTP-áz fehérjéknek elsődlegesen a sejtvázzal kapcsolatos funkciókban van kulcsfontosságú szerepe, valamint a génátíródást és a plazmamembrán NADPH-oxidáz aktivitását is szabályozza (Bishop és mtsai. 2000, Berken és mtsai. 2008, Brembu és mtsai. 2006). Konzervált funkciójuk ellenére a Rho család tagjai három alcsaládba: Rho, Rac és Cdc42 sorolhatóak (2. ábra). Állatokban és fonalas

gombákban megtalálhatóak mindhárom alcsalád képviselői, élesztőkben viszont csak a Rho és Cdc42 alcsalád fordul elő. Emlősökben 10 különböző Rho GTP-áz-t különböztetünk meg, amelyek közül néhánynak többféle izoformája is létezik (A.J. Ridley 2000). Növényekből viszont hiányoznak a Ras családba tartozó kis GTP-áz fehérjék, amelyek élesztőkben és állati sejtekben az extracelluláris jelek továbbításáért felelnek. Tehát a Rho család egyedüli képviselői növényekben a ROP (Rho of plants) GTP-áz fehérjék, amelyekre néha növényi RAC fehérjeként is hivatkoznak, mert aminosav szekvencia szinten legnagyobb azonosságot a Rac GTP-áz fehérjékkel mutatnak (Winge és mtsai. 1997; Cheung és mtsai. 2003). Filogenetikai elemzések alapján elmondható, hogy a ROP GTP-ázok a Rho, Cdc42 és Rac fehérjék közös őstől származhatnak, viszont a növényi ROP GTP-áz fehérjék szerkezetiileg különböznek a többi eukariótában jellemzően előforduló Rho-típusú GTP-áz fehérjétől (Berken és mtsai. 2008, Brembu és mtsai. 2006; 1. táblázat; 2. ábra).



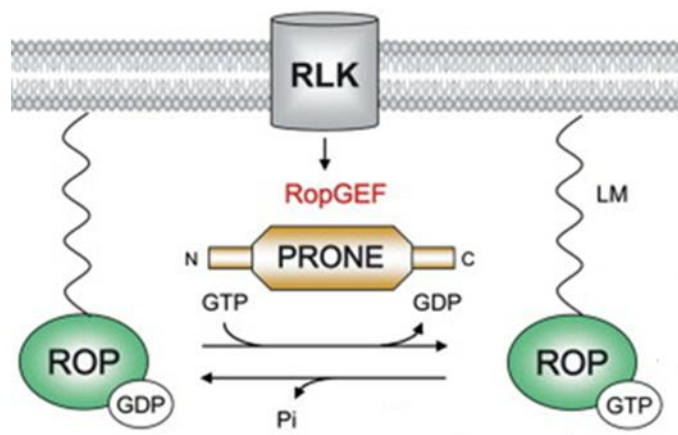
2. ábra: A Rho családba tartozó kis molekulású GTP-áz fehérjék filogenetikai kapcsolatainak ábrázolása (Nagawa és mtsai. 2010).

A ROP GTP-áz fehérjék a növényi sejtes folyamatok szabályozófehérjéi. Élesztő és állati képviselőkhöz hasonlóan a ROP-ok szintén részt vesznek a citoszkeleton szerveződésének és dinamikájának szabályozásában, a vezikuláris transzport és sejtpolarizáció irányításában, valamint a poláris növekedés és sejtalk változások szabályozásában (Kost és mtsai. 1999; Fu és mtsai. 2001; Molendijk és mtsai. 2001; Gu és mtsai. 2005). Ezen kívül a ROP GTP-áz jelátvitellel kapcsolatos ismereteink nagy része kapcsolódhat a pollencsövek csúcsi növekedésének alapjául szolgáló mechanizmusok és a

levél epidermális sejtek morfogenezisének tanulmányozásához (Gu és mtsai. 2006; Klahre és mtsai. 2006; Zhang és McCormick 2007; Yang 2008). A ROP GTP-ázokkal kapcsolatos másik intenzíven tanulmányozott terület a növényi védekező mechanizmusok szabályozásával kapcsolatos. A ROP-ok szintén szabályozzák a génexpressziós változásokat a hormonális és abiotikus stresszre adott válaszfolyamatok alatt (Tao és mtsai. 2002; Zheng és mtsai. 2002; Tao és mtsai. 2005). Továbbá a ROP GTP-áz szignalizáció szintén szerepet játszik a zárósejtek mozgásának fény közvetítette szabályozásában (Jeon és mtsai. 2008).

A Rho-típusú GTP-ázok a jelátviteli útvonalakhoz szabályozó illetve effektor fehérjéken keresztül kapcsolódnak (1. táblázat). A GTP-kötött Rho-típusú GTP-áz fehérjék célféhrjéikkel konformációs specifikus módon hatnak kölcsön (Bishop és mtsai. 2000; 1. ábra). A GTP-áz fehérjék aktív és inaktív konformációjának kialakulása teszi lehetővé, hogy ezek a fehérjék, a sejten belüli jelátviteli folyamatokban „ki-be” kapcsoló szignálként szerepelhessenek (1. ábra). Ezeket a GTP-áz fehérjéket számos szabályozási lépés kontrollálja illetve finomhangolja (Boguski és McCormick 1993; Berken és mtsai. 2008, Brembu és mtsai. 2006, Nagawa és mtsai. 2010; 4. ábra). A Rho GTP-ázok aktivációja elsősorban a guanin nukleotid kicserélő faktorok (GEF; Guanine nucleotide exchange factor) által szabályozottak, ez a fehérje felelős ugyanis a GDP molekulák GTP-re való kicserélésért (Miyawaki és mtsai. 2014, Fehér és Lajkó 2015; 3. ábra). Először állatok és élesztők esetében azonosítottak több mint 30 GEF fehérjét, amelyek elősegítik a GDP – GTP cseréjét ezekben a folyamatokban (Van Aelst és D'Souza-Schorey 1997; Kjoller és Hall 1999). Az állati GEF fehérjék szerkezetileg nem mutatnak rokonságot a növényi GEF-ekkel (1. táblázat). A nem-növényi Rho GTP-ázokat szabályozó GEF fehérjék jellemzően tartalmaznak egy Dbl homológ (DH) vagy DOCK180 katalitikus alegységet, amely a katalitikus aktivitásukat kódolja (Cherfils és Chardin 1999; Hart és mtsai. 1994), valamint egy ehhez kapcsolódó pleckstrin homológ (PH) alegységet. A PH alegységről feltételezzük, hogy lipid-kötés révén közvetíti a membrán lokalizációt (Rameh és mtsai. 1997; Zheng és mtsai. 1996), emellett strukturális és biokémiai bizonyítékokkal is alátámasztották, hogy a DH alegység aktivitását közvetlenül is befolyásolja. A növényi RopGEF fehérjék viszont egy specifikus növényi ROP nukleotid kicserélő (PRONE; Plant ROP nucleotide exchanger) alegységgel rendelkeznek (3. ábra). Annak ellenére, hogy a szignalizációban résztvevő fehérjék különböznek egymástól, a kísérleti eredmények alátámasztják, hogy növényi sejtekben (Berken és mtsai. 2008; Miyawaki és mtsai. 2014) a receptor kinázok szintén GEF fehérjéken keresztül szabályozzák a ROP GTP-áz

szignalizációt, mint ahogy az állati sejtek (Schiller 2006) esetében is ismeretes (1. táblázat). Növények esetében az egyetlen Rop GEF fehérje, amely DOCK180 alegységet tartalmaz, a SPIKE1 fehérje, amelyet *Arabidopsis*-ban írtak le (Qiu és mtsai. 2002).



3. ábra: A ROP GTP-áz fehérjék aktiválódásának sematikus ábrázolása (Berken és mtsai. 2008). Növények esetében a plazmamembránban lévő receptor-szerű szerin/treonin kináz fehérjék (RLK) felelősek a környezeti jelek érzékeléséért/fogadásáért, ezt követően a ROP GTP-áz fehérjék aktivációja pedig a specifikus PRONE alegységet tartalmazó Rop GEF fehérjék közreműködésével megy végbe, amely különböző jelátviteli utak aktiválódását eredményezi.

A Rho GTP-ázok inaktivációjáért a GTP-áz gyorsító fehérjék (GAP; GT Pase accelerator proteins) felelősek, hiszen a G-fehérjék belső, GTP-hidrolizáló aktivitását stimulálják, elősegítve ezzel a Rho GTP-ázok mihamarabbi visszatérését az inaktív, GDP-kötött állapotba (Lamarche és Hall 1994). Ez a tulajdonságuk pedig a GAP fehérjék azon képességének köszönhető, hogy a GTP-ázok alapállapota és átmeneti állapota közötti 20°-os rotációs képessége lehetővé teszi, hogy a GAP-fehérje "arginin-finger" motívuma belépjen a GTP-áz aktív helyére, ezzel stabilizálva az átmeneti állapotot. A guanin nukleotid disszociációs inhibitor (GDI; Guanine nucleotide dissociation inhibitors) fehérjék pedig stabilizálják a G-fehérjék inaktív állapotát, azzal, hogy szabályozzák a Rho GTP-áz membránhoz való kapcsolódását és blokkolják a GTP-ázok spontán aktiválódását. A Rho fehérjék további fontos biokémiai jellemzője a lipid poszttranszlációs módosítások, amely meghatározza a membránfehérjékkel való specifikus kölcsönhatásukat. Aktivált állapotban a Rho GTP-ázok kölcsönhatásba lépnek a C-terminális szakasz gerailgeranil lipid poszttranszlációs módosulásai révén a plazmamembránnal (Adamson és mtsai. 1992; Cox és mtsai. 1992), míg inaktív állapotban a Rho és Rac fehérjék a RhoGDI fehérjékkel szolubilis komplexként vannak jelen a citoplazmában. Úgy tűnik, hogy a RhoGDI fehérjék felelnek a GDP-kötött Rho GTP-ázok elkülönítéséért a citoplazmán belül valamint a

spontán GDP - GTP csere megakadályozásáért, azonban ez a szabályozási folyamat még nem teljesen tisztázott (Olofsson 1999). A GDI fehérje Rho GTP-ázhoz való kötődése valószínűleg egy immunglobulin-szerű C-terminális alegységen keresztül történik, ezen a területen található egy hidrofób zseb is, amely a geranigeranil lipid befogadásáért felel, míg a flexibilis N-terminális alegység pedig gátolja a GDP – GTP cserét (Keep és mtsai. 1997; Gosser és mtsai. 1997; Longenecker és mtsai. 1999; Hoffman és mtsai. 2000). A Rho-fehérjék expressziós mintázata, szerkezete és poszttranszlációs módosulásai szabályozzák a GTP-áz fehérjék sejten belüli elhelyezkedését, az aktivitásukért felelős regulátor fehérjékkel való kölcsönhatásaikat, továbbá az általuk szabályozott célfehérjékkel való kapcsolódásukat is. Ezek a térben és időben szabályozott jelátviteli kapcsolatok teszik lehetővé, hogy ezek a Rho GTP-ázok kifinomult modulátorai lehessenek a rendkívül bonyolult és sokrétűen összetett sejtes folyamatoknak.

Arabidopsis-ban a ROP GTP-áz alcsaládnak 14 tagja van, míg rizsben 7 fehérje jellemző (Christensen és mtsai. 2003). Számos molekuláris mechanizmus jól konzervált az élesztők, állatok és növények esetében, ezek felelősek azért, hogy a GTP-áz fehérjék felismerjék és továbbítsák a szignalizációs jeleket, míg más mechanizmusok specifikusan jellemzőek egy-egy alcsalád tagjaira (Brembu és mtsai. 2006; 1. táblázat). Növényekből például hiányoznak az állati Rho-típusú GTP-ázok működését befolyásoló receptor tirozin kináz fehérjék, illetve a GTP-áz fehérje kapcsolt receptor fehérjék (Shiu és mtsai. 2003, Urano és mtsai. 2013). Azonban a növények számos receptor-szerű szerin/treonin kináz fehérjével rendelkeznek (Shiu és mtsai. 2003; 3. ábra), amelyek receptorként érzékelik a jelátviteli utak aktiválódását kiváltó jeleket.

1. táblázat: A szövegben említett fő fehérje családok összefoglalása (Fehér és Lajkó 2015 alapján).

Név	Rövidítés	Molekuláris funkció	Növények	Élesztők és/ vagy Állatok
<u>Kis molekulású G-fehérjék:</u>				
RHO OF PLANTS	ROP	GTP-áz aktivitással rendelkező, kis GTP-kötő fehérje, RHO-típusú	IGEN	NEM
CELL DIVISION CYCLE 42	CDC42	GTP-áz aktivitással rendelkező, kis GTP-kötő fehérje, RHO-típusú	NEM	IGEN
RAS-RELATED C3 BOTULINUM TOXIN SUBSTRATE 1	RAC1	GTP-áz aktivitással rendelkező, kis GTP-kötő fehérje, RHO-típusú	NEM	IGEN
RAS-HOMOLOG	RHO	GTP-áz aktivitással rendelkező, kis GTP-kötő fehérje, RHO-típusú	NEM	IGEN
RAT SARCOMA	RAS	GTP-áz aktivitással rendelkező, kis GTP-kötő fehérje, RAS-típusú	NEM	IGEN
<u>Kis G-fehérjék szabályzófehérjéi:</u>				
GUANINE NUCLEOTIDE EXCHANGE FACTOR	GEF	elősegíti a GDP-GTP cserét, ezáltal aktiválja a RHO-típusú kis G-fehérjéket, az egyes fehérjék különböző katalitikus alegységekkel rendelkezhetnek (alább felsorolva)	NEM IGEN	IGEN IGEN
-DBL-homológ alegységgel	-DH			
-Dedicator of cytokinesis 180 alegységgel	-DOCK180			
-Plant ROP nucleotide exchanger alegységgel	-PRONE		IGEN	NEM
GTPASE ACCELERATOR PROTEIN	GAP	elősegíti a GTP-hidrolízisét, amely a G-fehérje jelátviteli funkcióját inaktíválja	IGEN	IGEN
GUANINE NUCLEOTIDE DISSOCIATION INHIBITOR	GDI	szabályozza a G-fehérjék membránhoz való kötődését és blokkolja azok spontán aktiválódását	IGEN	IGEN
<u>Kis G-fehérjék célfehérjéi:</u>				
PLASMA MEMBRANE NICOTINAMIDE ADENINE DINUCLEOTIDE PHOSPHATE-OXIDASE	plasma membrane NADPH oxidase	szuperoxidot előállító membrán kötött enzimkomplex (gyorsan H ₂ O ₂ -dá alakul)	IGEN	IGEN
P21-ACTIVATED KINASE	PAK	CDC42/RAC1-aktivált fehérje kináz, CDC42/RAC1 fehérje kötő (CRIB) alegységgel	NEM	IGEN
RECEPTOR-LIKE CYTOPLASMIC KINASE CLASS VI GROUP A	RLCK VI_A	ROP-aktivált citoplazmatikus kináz fehérje	IGEN	NEM
ROP-INTERACTIVE CRIB MOTIF-CONTAINING PROTEINS	RIC	ROP ^{GTP} -kölsönható scaffold fehérjék, CDC42/RAC1 fehérje kötő (CRIB) motívummal	IGEN	NEM

A táblázatban szereplő RHO-típusú GTP-ázok szabályzófehérjéinek és célfehérjéinek felsorolása nem teljes, csak a szövegben előforduló fehérjéket tartalmazza (Bishop és mtsai. 2000; Berken és mtsai. 2008; Brembu és mtsai. 2006; Nagawa és mtsai. 2010). IGEN; NEM – jelölik, hogy az adott fehérjék, illetve azok szerkezeti homológjai jelen vannak-e növényekben, élesztőkben és/vagy állatokban; ? – ellentmondásos információkat jelöl.

2.2. A RHO GTP-ázok célfehérjéi

Mivel a Rho-típusú GTP-ázok által szabályozott sejtes folyamatok köre meglehetősen nagy, nem meglepő, hogy nagyszámú célmolekulához, ún. effektor fehérjéhez képesek kapcsolódni (2. táblázat). Az effektor fehérjék nagyon specifikus kölcsönhatást alakítanak ki a GTP-kötött Rho GTP-ázokkal. A GTP- és GDP-kötött GTP-áz fehérjék konformációs különbségeit elsősorban két flexibilis hurok szabályozza, amelyeket kapcsoló régió I és II-nek neveztek el (Ihara és mtsai. 1998; Wei és mtsai. 1997). GTP-kötés hatására a kapcsoló régiók konformációja megváltozik, aminek következtében olyan aminosavak kerülnek a fehérje felszínére, amelyek lehetővé teszik és elősegítik az effektor fehérjék kapcsolódását. Az effektor fehérjék a GTP-ázok több területével is kölcsönhatásba lépnek. A Rho, Rac és Cdc42 GTP-ázok effektor régióiban, azaz az I-es kapcsoló régióin belül, számtalan pontmutációt hoztak létre kísérletesen, aminek következtében azt tapasztalták, hogy egyes célfehérjék nem voltak képesek kötődni a GTP-áz fehérjékhez, míg más fehérjék kötődését nem akadályozta a mutáció. Például a PAK kinázok kölcsönhatását a Cdc42 illetve Rac GTP-ázokkal megakadályozta a Tyr⁴⁰ → Cys mutáció, míg a Phe³⁷ → Ala aminosav csere nem gátolta a fehérjék kölcsönhatását (Lamarche és mtsai. 1996). A Rho-típusú GTP-ázok egyik legjellemzőbb effektor fehérje családja, a CRIB (Cdc42/Rac interactive binding) motívumot tartalmazó kináz család. Ilyen kinázok például élesztőkben a Ste20 kinázok illetve állatokban (Hofmann és mtsai. 2004) a P21-aktivált (PAK) kinázok (2. táblázat). A konzervált GTP-áz kötő konszenzus hely, azaz a CRIB motívum jellemzően megjelenik a Rac- illetve Cdc42-kötő fehérjék egy részénél, de nem mindegyiknél. Ez a motívum szükséges, de nem elégséges, hogy a GTP-ázok és az effektor fehérjék között létrejöjjön egy erős kölcsönhatás. A CRIB motívumot tartalmazó kinázok aktiválásának legáltalánosabb és leggyakoribb mechanizmusa élesztők és állatok esetében mikor a Cdc42/Rac GTP-ázok a specifikus CRIB motívumon keresztül kapcsolódnak a p21-aktivált kinázokhoz. A kináz rendelkezik egy autoinhibitor doménnel, ami alapállapotban elfedi a kináz aktív centrumát, gátolva ezzel az aktivitását. Ezen az autoinhibíciós doménen található a specifikus CRIB motívum, amely specifikusan köti a GTP-kötött, aktív Rho GTP-ázokat. A kötődés konformáció változást okoz, felszabadítva a kináz domént a gátlás alól (Bagrodia és Cerione 1999; Tu és Wigler 1999).

Bár a Metazoák csoportjában jellemzően több száz Rho GTP-áz effektor fehérje található, ebből körülbelül 30 az olyan kináz, amely rendelkezik Cdc42-Rac interaktív kötőhelyet tartalmazó (CRIB) motívummal (Bishop és mtsai. 2000, Hofmann és mtsai.

2004). A CRIB motívumot tartalmazó fehérjékről korábban bebizonyították, hogy a Cdc42 GTP-áz fehérjékhez úgy kötődnek, hogy az I-es kapcsolódó régió 38-as pozíciójában található Asp aminosav kölcsönhat a CRIB motívumon lévő kettő His aminosavval. A 38-as pozíció kivételével az I. és II. kapcsolódási régió általában azonos a Rho, Rac és Cdc42 fehérjék esetén. Rac és Cdc42 esetén a 38-as pozícióban Asp található, míg a Rho fehérjéknél ugyanebben a pozícióban Glu jellemző. A Cdc42 GTP-áz Asp³⁸ elmutáltatása Glu-ra nagymértékben csökkentette a PAK3 kináz affinitását (Leonard és mtsai. 1997). Ez alapján úgy tűnik, hogy minden CRIB motívummal rendelkező fehérje az Asp³⁸ alapján különbözteti meg a Rac/Cdc42 fehérjéket a Rho GTP-ázoktól. A PAK1 kinázok, más kináz fehérjékkel szemben hasonló aktivitással kötődnek a Rac és Cdc42 GTP-ázokhoz is (Manser és mtsai. 1994).

Általánosságban jellemző, hogy a CRIB motívumot tartalmazó fehérjék konformációs szerkezete megváltozik a Cdc42/Rac fehérjékhez való kapcsolódáskor. Ekkor a GTP-ázok kapcsolódási régiói közt egy szoros, intermolekuláris β -redő alakul ki; a kinázok C-terminális szekvenciája és a CRIB motívumot tartalmazó régió között pedig egy β -hajtókanyar és egy rövid α -hélix konformációs változás jön létre. A Rho fehérjék effektorokkal pedig a kinázok N-terminális régióján levő Rho effektor homológ régión (REM: Rho effector homology) keresztül kapcsolódnak, amely három ismétlésben tartalmaz leucin-zipzár-szerű, HR1 motívumokat. Ezek a motívumok egymástól függetlenül kötődhetnek a Rho GTP-ázokhoz, de csak az elsőre jellemző, a GTP-függő kötődés (Flynn és mtsai. 1998). Mikor az első HR1 motívum kapcsolódik a Rho fehérjével, hasonló másodlagos szerkezeti változások mennek végbe, mint ahogy azt a Cdc42/Rac GTP-ázok és effektoraik esetében is tapasztalták.

A növényi ROP GTP-ázok az állati Rho-típusú GTP-ázoktól függetlenül fejlődtek és alakultak ki, és az eukariótákra jellemző Rho családon belül egy szerkezetileg különálló csoportot alakítottak ki (Berken és mtsai. 2008, Brembu és mtsai. 2006, Nagawa és mtsai. 2010; 2. ábra). A ROP GTP-ázoknak csak néhány effektor fehérjéje egyezik meg a többi eukarióta szervezetre jellemző effektor fehérjékkel (2. táblázat), ilyen például a plazmamembrán NADPH-oxidáz vagy egyes aktin-nukleációs komplex fehérjék (Brembu és mtsai. 2006). Számos olyan növény-specifikus ROP GTP-áz célfehérjét (2. táblázat) ismerünk, amelyeknek szerepe is növény-specifikus folyamatokhoz kapcsolható, mint például a sejtfal szintézis, az auxin jelátvitel és a növény-patogén kölcsönhatások szabályozása, illetve több kisméretű scaffold fehérje is ismert (Berken és mtsai. 2008, Brembu és mtsai. 2006, Nagawa és mtsai. 2010; Wu és mtsai. 2001; Li és mtsai. 2008).

Más fehérjék, illetve fehérje komplexek ROP GTP-ázokhoz való kapcsolódását ezek az adaptorfehérjék teszik lehetővé. Az egyik ilyen csoport: a CRIB motívumot tartalmazó kis adaptor fehérje család, amelyet ennek megfelelően „ROP interaktív CRIB motívumot tartalmazó fehérjének” (RIC; ROP-interactive CRIB motif-containing protein) nevezték el (Wu és mtsai. 2001). A RIC fehérjék mellett más típusú ROP GTP-áz effektor vázfehérjék is vannak (Berken és mtsai. 2008, Brembu és mtsai. 2006, Nagawa és mtsai. 2010), amelyeket RIP illetve ICR fehérjeként ismerünk (RIP: ROP-interacting protein; ICR: Interactor of constitutively active ROP). Ezek a fehérjék egy rájuk jellemző ROP-kötő motívummal rendelkeznek (Bloch és mtsai. 2008). Ezekről a fehérjékről bebizonyították, hogy specifikus szerepet töltenek be a ROP GTP-áz közvetítette jelátviteli folyamatokban, viszont további kölcsönható fehérjéikről még meglehetősen szűkös a tudásunk (Craddock és mtsai. 2012).

Felmerülhet a kérdés, hogy ha a CRIB motívumot tartalmazó kinázok hiányoznak növényekből, akkor a CRIB motívumot tartalmazó kisméretű RIC scaffold fehérjék közvetíthetik-e a ROP GTP-ázok általi kináz aktivációt? Kérdésünkre pontos választ még nem tudunk adni.

2. táblázat: A különböző RHO GTP-áz effektor fehérjék jelenléte (+) élesztők, állatok és növények esetében (Fehér és Lajkó 2015 alapján).

	Név	RHO-kötő motívum	Növény	Élesztő	Állat
<u>Nem enzim fehérjék:</u>					
	Formin		?	+	+
	Par6	CRIB			+
	SPEC	CRIB			+
	CIP4				+
	IQGAP			+	+
	WASP/WAVE	CRIB	+	+	+
	P140 ^{Sra1}				+
	POR1				+
	POSH				+
	Borg	CRIB			+
	RIC	CRIB	+		
	ICR/RIP	RIP	+		
	RACK1A		+		
<u>Enzim fehérjék:</u>					
<i>Kinázok:</i>	PAK	CRIB		+	+
	ACK	CRIB			+
	MRCK	CRIB			+
	MLK	CRIB			+
	MEKK	CRIB		?	+
	p70 ^{S6K}		?		+
	RLCK VI_A		+		
Lipid módosítók:	PI5K		?	?	+
	PI3K		?	?	+
	Synaptojanin-2			?	+
	DAG kináz		?	?	+
	PLD		?	?	+
Egyéb enzimek:	NADPH oxidáz		+	?	+
	CCR1		+		
	UGT		+		

CRIB: Cdc42/Rac-kötő motívum; RIP: ROP-kötő motívum.

2.3. A ROP GTP-ázok és fehérje kinázok jelátviteli kapcsolatai

Növényekben, mivel a genomjuk RAS GTP-ázokat nem kódol, a ROP GTP-áz család az egyetlen képviselője a jelátviteli szerepű kis molekulatömegű G-fehérjéknek (Berken 2006). A ROP GTP-ázok-hoz kapcsolódó jelátviteli útvonalak azonban még jelentős mértékben feltáratlanok. Ennek egyik oka, hogy a ROP GTP-ázok és az állati illetve élesztő Rho GTP-ázok effektor fehérjéi lényegesen eltérnek (lásd fentebb). Az egyik legjellegzetesebb különbség a CRIB motívumot tartalmazó kinázok hiánya növényekben (Fehér és Lajkó 2015). Ennek ellenére, számos megfigyelés utal arra, hogy a ROP GTP-ázok növényekben is kapcsolódnak, közvetve vagy közvetlenül, a fehérje kináz jelátvitelhez. Az ezzel kapcsolatos eddigi eredményeket az alábbiakban foglalhatjuk össze.

2.3.1. A ROP GTP-ázok közvetve szabályozzák az Snf1-rokon 2-es típusú kináz fehérjéket

Az aktív ROP11 GTP-áz kölcsönhatásba léphet az abszcizinsav-inszenzitív 1 és 2 (ABI1/2: abscisicacid-insensitive 1/2) PP2C-típusú foszfatázokkal, melyek az abszcizinsav jelátvitel negatív szabályozó fehérjéi (Yu és mtsai. 2012). Abszcizinsav hiányában az ABI 1/2 fehérjék tartják inaktív, defoszforilált állapotban az Snf1-rokon 2-es típusú kináz fehérjét (SnRK2), így ezen keresztül a szignalizációban távolabb elhelyezkedő célfehérjék is blokkolt állapotban lesznek. Ilyen távolabbi célfehérjék lehetnek például az abszcizinsav által szabályozott transzkripciós fehérjék, ioncsatornák és ROS-termelő enzimek is (Nakashima és mtsai. 2013). Aktív, GTP-kötött AtROP11 GTP-áz jelenlétében az ABI2 fehérje foszfatáz aktivitása megemelkedett (Yu és mtsai. 2012). Ez a kölcsönhatás megakadályozta az ABI2 fehérje saját inhibitoraihoz, az abszcizinsav receptor pyrabactin/pyrabactin-szerű fehérjékhez való kötődését (Li és mtsai. 2012). Ezért az aktív ROP11 GTP-áz negatívan szabályozza az abszcizinsav jelátvitelt. Bár az SnRK2-es típusú kináz nem tekinthető ROP GTP-áz effektor fehérjének, az AtROP11 GTP-áz közvetve mégis szabályozza aktivitását.

Az AtROP10 GTP-áz és AtROP6 GTP-áz szerepéről az abszcizinsav jelátvitel negatív szabályozásával kapcsolatban szintén beszámoltak már *Arabidopsis*-ban, azonban az AtROP10 GTP-áz nem lép közvetlen kölcsönhatásba az ABI2 fehérjével, hanem valószínűleg az abszcizinsav jelátvitel más elemeit szabályozhatja (Yu és mtsai. 2012; Fehér és Lajkó 2015).

2.3.2. A ROP GTP-ázok és a mitogén-aktivált protein kináz kaszkádok

Állati sejtekben a kis Ras/Rho-típusú GTP-kötő fehérjék gyakran befolyásolják a mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) kaszkádok receptor-függő aktivitását (Vojtek és mtsai. 1995). Jelenlegi tudásunk a ROP GTP-áz fehérjék MAPK kaszkádok szabályozásában betöltött szerepéről meglehetősen szűkös (Samajová és mtsai. 2013). Bár a MAPK fehérjék valószínűleg nem közvetlen effektorai a ROP GTP-ázoknak, ennek ellenére a ROP GTP-ázok és a MAPK-ok ugyanannak a szignalizációs fehérje komplexnek is a tagjai lehetnek. Például megemlíthető, hogy bár az OsMAPK6 (rizs MAPK) és az OsRAC1 (rizs ROP GTP-áz) közvetlenül nem lépnek kölcsönhatásba élesztő két-hibrid rendszerben, a konstitutívan aktív OsRAC1 és az OsMAPK6 fehérjék koimmunoprecipitálhatóak rizs sejtekből (Lieberherr és mtsai. 2005). Ezen kívül az OsMAPK3 szintén tagja az OsRAC1-et is tartalmazó fehérje komplexnek, amely foszforiláció révén szabályozza a RAC immunitás 1 transzkripció faktor (Kim és mtsai. 2012). Az OsMAPK6 fehérjével nem képes komplexet képezni az OsRAC1 fehérje domináns negatív mutáns formája, valamint a nem-izoprenilált mutáns formája sem. Ezen kívül az OsRAC1 inaktív, vagy hibásan lokalizált mutáns formáinak túlermelgetése megakadályozta a kinázok szfingolipid elicitor által közvetített aktiválódását (Lieberherr és mtsai. 2005). Az OsRAC1 RNSi általi csendesítése csökkentette az OsMAPK6 fehérje szintjét és aktivitását (Lieberherr és mtsai. 2005). Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy az OsMAPK6 aktivációja egy plazmamembrán-lokalizált fehérjekomplexben, GTP-kötött és izoprenilált RAC1 GTP-áz fehérje által történik. Ez a fehérje komplex nem alakulhat ki OsRAC1 hiányában, a szabad MAPK pedig valószínűleg kevésbé stabil, ezzel magyarázható a csökkent OsMAPK6 fehérje szint az OsRAC1 RNSi mutáns növényekben. Az aktív GTP-áz fehérje fontos szerepet tölt be az OsMAPK3/6 fehérjéhez kapcsolódó jelátviteli út elemeinek plazmamembránhoz való kapcsolásában, pontosabban a lokalizáció pontos helyének meghatározásában van szerepe (Samajová és mtsai. 2013, Fujiwara és mtsai. 2009; Fehér és Lajkó 2015). Tehát az OsRAC1 fehérje elősegíti a fehérje komplex kialakulását a plazmamembrán egy meghatározott régióján, így közvetett módon pozitívan képes szabályozni a MAPK-függő jelátvitelt.

Jelenleg azonban még kevés ismeret áll rendelkezésünkre arról, hogy a ROP GTP-áz fehérjék hogyan szabályozhatják a MAPK jelátviteli utakat. A ROP GTP-ázok aktiválhatnak MAPK kaszkádokat akár a NADPH-oxidáz által közvetített H₂O₂ termelődésén keresztül is. Számos MAPK aktiválódik H₂O₂ hatására (Hung és mtsai. 2005;

2. táblázat). Például a FERONIA receptor szignalizációs útvonal közvetett módon, ROP GTP-ázok aktiválásán keresztül kapcsolódhat a MAPK kaszkádokhoz, hiszen a MAPK kaszkádok aktivációjához szükséges H_2O_2 termelődés a NADPH-oxidáz ROP GTP-áz mediált aktiválásának hatására alakul ki (Duan és mtsai. 2010; Fehér és Lajkó 2015).

Számos fejlődési útvonal, valamint a kórokozók hatására kialakuló védekező mechanizmusok fontos résztvevői a MAPK szignalizációs kaszkádok, ezek közül az útvonalak közül néhány szintén ROP GTP-áz fehérjék által szabályozott. Ezért nagyon valószínű az áthallás ezek között a szignalizációs útvonalak között. De nem csak a ROP GTP-ázok aktiválhatnak MAPK útvonalakat, hanem ez megtörténhet fordítva is. A MAPK fehérjék a RopGAP vagy RopGEF fehérjék foszforilálásán keresztül képesek lehetnek a ROP GTP-áz szignalizáció szabályzására (Fehér és Lajkó 2015).

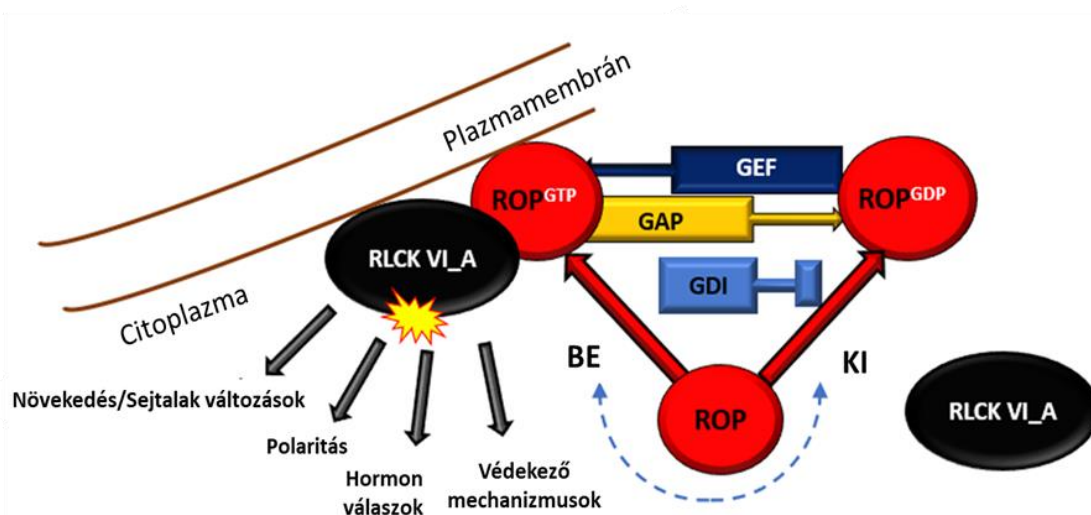
2.3.3. ROP GTP-ázok és lipid kinázok

A foszfatidilinozitol 4,5-bifoszfátot (PIP2) szintetizáló foszfatidilinozitol monofoszfát kinázok a Rho-típusú GTP-ázok jól ismert effektorai (Bishop és mtsai. 2000; 2. táblázat). Növekvő pollencsövek esetében a PIP2 felhalmozódik a plazmamembrán szubapikális területén. Ebben a régióban halmozódik fel a foszfatidilinozitol 4-foszfát 5-kináz (PIP5K) is (Kost és mtsai. 1999). A PIP2 degradációjának gátlása a pollencsövek polaritásának elvesztését valamint a csúcsi régió megduzzadását eredményezte (Helling és mtsai. 2006), utalva ezzel a polaritás kialakításában betöltött fontos szerepére. A foszfatidilinozitol 4-foszfát kináz aktivitása fizikailag is köthető volt, a dohány pollencsövekből kitisztított GTP-kötött ROP GTP-áz (NtRAC5) fehérjék jelenlétéhez, ezzel alátámasztva a nézetet, miszerint a PIP5K aktivitását a ROP GTP-ázok befolyásolják (Kost és mtsai. 1999). A poláris növekedés alatt a ROP GTP-ázok szabályozzák a célzott szekréció folyamatát: a PIP2 szintézis stimulálásán keresztül szabályozzák az aktin összeszerelődést és az exocitotikus membrán transzportot (Kost és mtsai. 1999). A PIP5K nemcsak a ROP GTP-áz által szabályozott szignalizációs útvonalnak lehet fontos eleme, hanem a ROP GTP-ázok szabályozó fehérjéjeként is részt vehet a jelátvitelben (Kost és mtsai. 2008, Ischebeck és mtsai. 2011; Fehér és Lajkó 2015). Dohány pollencsövek vizsgálata esetében a PIP5K11 túltermeltetése, az NtRAC5 esetében is tapasztalt, duzzadt pollencsöcsűcs fenotípust eredményezett. Ez a fenotípus ellensúlyozható az NtRAC5 negatív regulátorának, azaz a RhoGDI2 fehérjének a koexpressziójával. Feltételezhető,

hogy a PIP5K inaktíválja a GDI fehérjét, amelynek eredményeként a GTP-kötött NtRAC5 lokálisan felhalmozódik, így képes szabályozni a polaritást (Ischebeck és mtsai. 2011).

2.3.4. A ROP GTP-áz aktivált receptor-szerű citoplazmatikus kinázok

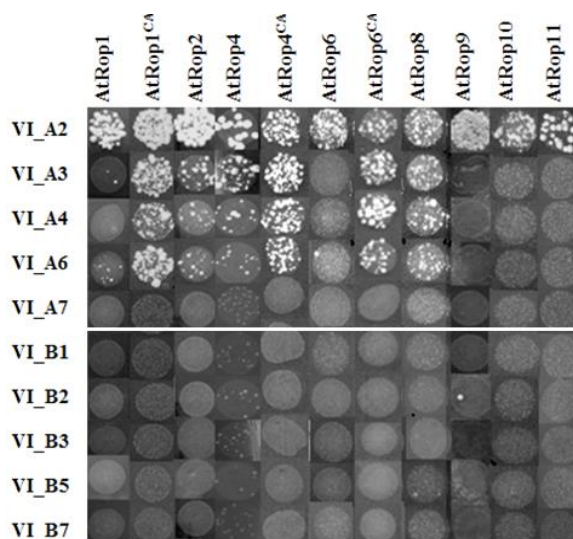
A receptorszerű citoplazmatikus kinázok (RLCK) jellemzője, hogy nem rendelkeznek sem extracelluláris, sem transzmembrán doménnel de kináz doménjük rokon a receptor kinázokéval (Lin és mtsai. 2013). Az *Arabidopsis*-ban található 147, valamint a rizsben előforduló 379 fehérjét magába foglaló RLCK-k nagy családja további különböző csoportokba sorolhatóak. Nagy számuk ellenére azonban igen korlátozott információ áll rendelkezésünkre a kinázok biológiai funkciójával kapcsolatban. Az eddig megvizsgált kinázok a hormonális, fejlődésbeli és a különböző kórokozókra adott válaszreakciók szabályozásában vesznek részt (Lin és mtsai. 2013; 4. ábra).



4. ábra: A ROP GTP-áz aktivált RLCK VI_A kinázok hipotetikus szerepe a növényi szignalizációs folyamatokban (Fehér Attila ábrája). Laboratóriumunkban korábban kimutattuk, hogy az RLCK VI_A csoportba tartozó növény-specifikus kinázok potenciális ROP GTP-áz effektorok, melyeknek *in vitro* aktivitása függ a GTP-kötött ROP GTP-ázok jelenlététől. Három fő szabályozó fehérje befolyásolja a ROP GTP-áz aktív és inaktív állapotát: a guanin nukleotid kicserélő faktor (GEF) felelős a GDP molekulák GTP molekulákra való lecserélésében, ezzel aktiválva a G-fehérjét. A GTP-áz gyorsító fehérje (GAP) a GTP molekulák hidrolízisét segíti elő, amely az inaktív állapot kialakulásához szükséges, míg a guanin nukleotid disszociációs inhibitor fehérje (GDI) az inaktív állapot stabilizálásáért felel.

A mai napig számos ROP GTP-áz kölcsönható kinázt sikerült azonosítani, olyan élesztő két-hibrid technikát alkalmazva, amelyben konstitúvan aktív ROP/RAC GTP-

ázokat használtak csaliként. Ezek a kinázok *Medicago truncatula*-ból (Dorjgotov és mtsai. 2009), *Arabidopsis thaliana*-ból (Molendijk és mtsai. 2008, Dorjgotov és mtsai. 2009, Reiner és mtsai. 2014) és *Hordeum vulgare*-ból (Huesmann és mtsai. 2012) kerültek azonosításra. Szekvencia analízis alapján ezek a kináz fehérjék mind a receptor-szerű citoplazmatikus kinázok (RLCK; Receptor-like cytoplasmic kinase) nagy családjába, azon belül pedig a VI. család A alcsaládjába tartoznak.



5. ábra: Az RLCK VI_A kinázok ROP GTP-áz fehérjékkel való specifikus kölcsönhatási mintázatát az RLCK VI_B kinázokkal (Dorjgotov és mtsai. 2009). Az RLCK VI_A- illetve B-típusú kinázokról korábban élesztő kéthibrid kölcsönhatási mátrix segítségével kimutattuk, hogy míg az A alcsalád tagjai rendelkeznek ROP GTP-áz kötő képességgel, addig a B alcsalád tagjai nem. Ennek megfelelően a B-típusú RLCK VI kinázok aktivitása ROP GTP-áz független.

Az *Arabidopsis* RLCK VI családnak 14 tagja van, amely 7-7 fehérjével két alcsaládra osztható (Jurca és mtsai. 2008). A két csoport tagjai többek között abban különböznek, hogy míg az A csoport tagjai (egy kivétellel) képesek a ROP GTP-ázok kötésére, addig a B csoport tagjai nem (5. ábra). Az *Arabidopsis* RLCK VI_A alcsalád tagjai (Molendijk és mtsai. 2008, Dorjgotov és mtsai. 2009, Reiner és mtsai. 2014) mellett a *Medicago truncatula* (Dorjgotov és mtsai. 2009) és *Hordeum vulgare* (Huesmann és mtsai. 2012) homológ fehérjék is képesek kötődni a GTP-kötött, azaz aktív ROP GTP-ázokhoz *in vitro* élesztőben és növényi kísérletekben egyaránt, míg a GDP-kötött, inaktív ROP GTP-ázokhoz nem kötődnek. Ez a GTP-áz konformáció specifikus kölcsönhatás jellemző az effektor fehérjékre. Ezeknek a kinázoknak a fehérje foszforilációs aktivitása szintén függ a GTP-kötött vagy konstitutívan aktív ROP/RAC GTP-ázok jelenlététől (Dorjgotov és

mtsai. 2009, Huesmann és mtsai. 2012, Reiner és mtsai. 2014; Fehér és Lajkó 2015; 4. ábra), ezért biokémiai értelemben ROP GTP-áz effektor kinázként értelmezhetőek. Ennek ellenére az RLCK VI_A alcsaládba tartozó kinázok biológiai funkciói még nagyrészt ismeretlenek. A *Barley* ROP-kötő kináz1-nek (HvRBK1; *Hordeum vulgare* ROP binding kinase1) fontos szerepe van a lisztharmat fertőzés folyamatában (Huesmann és mtsai. 2012). A HvRBK1 csendesítéséről kimutatták, laboratóriumunkkal együttműködő német kollégák (Ralph Huckelhoven és mtsai.) hogy megváltoztatja a kortikális mikrotubulusok elrendeződését: azok rövidekké és rendezetlenné válnak (Huesmann és mtsai. 2012). A kináz hiánya a kortikális mikrotubulus hálózat felbomlásának köszönhetően elősegítette a patogén gombák bejutását a gazdasejtekbe (Huesmann és mtsai. 2012). Az ezekkel a gombákkal szembeni érzékenységet (szuszeptibilitást) az árpa Rac/Rop GTP-áz fehérjék szabályozzák (Schultheiss és mtsai. 2002, 2003; Hoefle és mtsai. 2011; Scheler és mtsai. 2016). A konstitutívan aktív HvRACB, HvRAC3 vagy HvRAC1 GTP-áz átmeneti túltermeltetésének hatására fokozódott az árpa levél sejtjeinek lisztharmattal való fertőződése (Schultheiss és mtsai. 2003). Feltételezhető, hogy a gomba kórokozó az árpa RAC GTPáz-függő jelátviteli útvonalait használja fel a hausztórium kialakítására (Schultheiss és mtsai. 2002, 2003). Mivel az árpa RBK1 gén átmeneti kiütése szintén elősegítette a parazita gombák árpa levélbe jutását, az árpa RAC-effektor kináz nem a lisztharmattal szembeni érzékenységhez, hanem az ellenállóképességhez szükséges (Huesmann és mtsai. 2012), feltehetően a mikrotubulusok szervezettségének/stabilitásának növelésén és így a kórokozók elleni barrierék kialakításán keresztül (Huesmann és mtsai. 2012). A zöld fluoreszcens fehérjével jelölt HvRBK1 kimutatható a citoplazmában és nukleoplazmában, míg a konstitutívan aktív HvRACB vagy HvRAC1 mellett vizsgált HvRBK1 fehérje már a sejtek plazmamembránjában volt detektálható (Huesmann és mtsai. 2012), tehát a gomba kórokozókkal való kölcsönhatás során az árpa HvRAC fehérjék illetve a HvRBK1 együtt szabályozhatják a mikrotubulusok felépülésének és lebomlásának dinamikáját. Az hogy a két fehérje ellentétesen szabályozza a folyamatot (a HvRAC GTP-ázok szuszeptibilitási faktorok, az RBK1 kináz pedig rezisztencia fehérje) azzal függhet össze, hogy az RBK1 kináz közvetve negatívan szabályozza a HvRAC GTP-ázok stabilitását ill. mennyiségét, ami egy negatív visszacsatolási szabályozásra utal a GTP-áz és effektor kináza között (Reiner és mtsai. 2015).

Érdekes módon, a HvRBK1 legközelebbi *Arabidopsis* homológját, az AtRLCK VI_A3 kinázt kódoló génnek a csendesítése a gomba kórokozókkal szembeni fogékonyság

fokozódásához járult hozzá (Reiner és mtsai. 2014), szemben az árpában megfigyelttel (Huesmann és mtsai. 2012). Ez arra utal, hogy a két fajban a szabályozás eltérő.

Gombás fertőződés hatására az *Arabidopsis* RLCK VI_A4, vagy más néven AtRBK1, valamint az RLCK VI_A6 (vagy AtRBK2) fehérjék génexpressziós szintje nagymértékben megemelkedik, ami arra utal, hogy ezek a fehérjék is fontos szerepet játszhatnak a patogének hatására kialakuló védekező folyamatok szabályozásában (Molendijk és mtsai. 2008).

Néhány *Arabidopsis* RLCK VI_A kináz génjéről elmondható, hogy erős pollen specifikus kifejeződés jellemzi (Jurca és mtsai. 2008), amelyből arra következtethetünk, hogy a ROP GTP-áz közvetített pollencső növekedés szabályozásában ezeknek a kinázoknak fontos szerepük lehet. Továbbá a trachea elemek differenciálódásának folyamata során ezek a fehérje kinázok szintén kulcsfontosságúak lehetnek, hiszen ez a folyamat is nagy mértékben függ a ROP GTP-áz fehérjék által szabályozott mikrotubulus összerendeződéstől (Oda és mtsai. 2012). A közelmúltban kimutatták, hogy az RLCK VI_A7 kináz gén (At5g18910) megtalálható mind a gyökérszőr, mind a pollencső génexpressziós profiljában, ahol a ROP GTP-ázok központi szerepet töltenek be a csúcsi növekedés szabályozásának folyamatában (Becker és mtsai. 2014). Ezek a megfigyelések megerősítik azt az elméletet, hogy a ROP GTP-áz és RLCK VI_A kináz közvetítette útvonalak kölcsönhatásban állnak egymással annak ellenére, hogy a kísérletek, amelyek igazolják hogy az RLCK VI_A kinázok funkciója függ az aktív ROP GTP-ázokkal való kapcsolatuktól további megerősítésre várnak. Ennek bebizonyítása, a különböző ROP GTP-áz fehérjék valamint a különböző RLCK VI_A kinázok szerteágazó és egymással átfedő funkciója miatt, meglehetősen bonyolultnak bizonyul.

Egy másik *Arabidopsis* RLCK-ről tudjuk, hogy erősen expresszálódik a trachea elemek differenciálódásának folyamata alatt, ez a kináz a VIII. számú alcsaládba tartozik és "ciszteiben gazdag kinázként" is említik, továbbá fontos megjegyezni, hogy szintén kölcsönhat a ROP GTP-ázokkal (Molendijk és mtsai. 2008). Azonban a ciszteiben gazdag kinázok ROP-függő aktivitását még nem sikerült kísérletesen igazolni. Ez a lehetséges kölcsönhatás viszont felveti annak lehetőségét, hogy az RLCK VI_A alcsaládon kívül további RLCK kinázok is szolgálhatnak potenciális ROP GTP-áz effektorként. A ROP-kötő RLCK fehérjék nem rendelkeznek ismert GTP-áz kötő motívumokkal (Dorjgotov és mtsai. 2009, Fehér és Lajkó 2015), illetve a ROP GTP-áz fehérje által közvetített kináz aktivációhoz szükséges szerkezeti feltételek sem ismertek még pontosan. Az RLCK VI_A

kinázok ROP GTP-áz kötésében szerepet játszó aminosav motívumainak azonosítása elengedhetetlen a további lehetséges ROP GTP-áz aktivált kinázok feltérképezéséhez.

Jelenlegi tudásunk a növényekben előforduló, ROP GTP-ázokkal kölcsönható fehérje kinázokról meglehetősen szűkös. A növényi genomok nem kódolnak a PAK kinázokhoz hasonló szerkezetű, autoinhibíciós domént és CRIB motívumot tartalmazó kinázokat (Dorjgotov és mtsai. 2009, Fehér és Lajkó 2015; 2. táblázat). Az RLCK VI_A típusú kinázok ROP GTP-ázokhoz való kötődésének és a kinázok aktiválásának módja tehát eltér az eddig ismert mechanizmusoktól. Munkánk folyamán elsődleges célunk a ROP GTP-áz - RLCK VI_A molekuláris jelátviteli kapcsolatnak a minél pontosabb feltérképezése volt.

3. Célkitűzések

Kutatásaink során az alábbi kérdésekre kerestük a választ.

- Az Arabidopsis receptorszerű citoplazmatikus kinázok (VI. alosalád A csoport) milyen aminosav motívumoknak köszönhetően képesek kapcsolódni a ROP GTP-ázokhoz?
- Mi a szerepe az azonosított aminosav motívumoknak a kinázok aktiválásában?
- Mennyire elterjedtek ezek a kináz motívumok a növényvilágban?
- Mi az azonosított aminosavak mutációjának hatása a kinázok *in planta* funkciójára?

Kísérleteinkhez korábbi munkáinkra alapozva az *Arabidopsis* RLCK VI_A2 és RLCK VI_A3 kinázokat illetve a ROP1 és ROP6 GTP-ázt választottuk.

4. Anyagok és módszerek

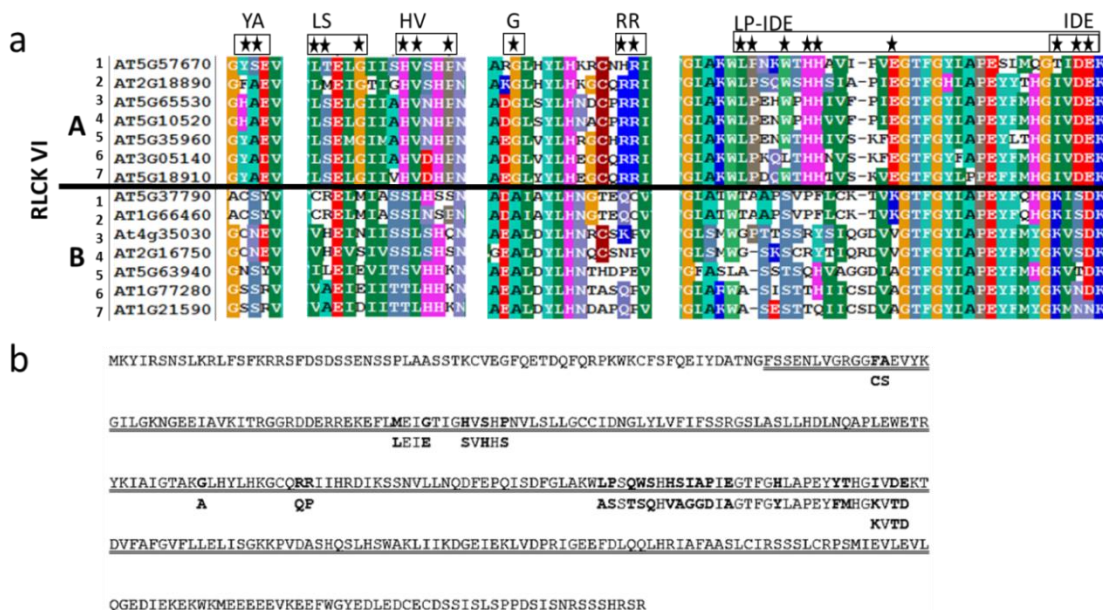
4.1. Szekvencia analízis

Az *Arabidopsis* RLCK VI kináz család A és B alcsaládra osztható, ahogy azt korábban már ismertettük (Jurca és mtsai. 2008). *In silico* analízissel kerestünk olyan *Arabidopsis* RLCK VI_A kináz szekvenciákhoz hasonló kinázokat a különböző taxonokba tartozó növényekben, amelyeknek a teljes genom szekvenciája ismert, mint például a *Chlamydomonas reinhardtii*, *Physcomitrella patens*, *Marchantia polymorpha*, *Selaginella moellendorffii* és *Oryza sativa*, ehhez az összehasonlításhoz pedig az NCBI (National Center for Biotechnology Information) PHI BLAST (Pattern Hit Initiated Basic Local Alignment Search Tool) programját használtuk, amely az alábbi oldalon érhető el: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Az összehasonlításhoz az RLCK VI_A3 (At5g65530) fehérje kináz alegységének szekvenciáját használtuk mintaként, az összes *Arabidopsis* RLCK VI_A kinázra jellemző GXXXHXXH aminosav mintázattal, ahol az X bármilyen aminosavat jelölhet, a végzett összehasonlítás várható értéke 0.01, a PHI-BLAST küszöbértéke pedig 0.005. A szekvencia összehasonlítás a ClustalW algoritmus programmal történt (Thompson és mtsai. 1994). A specificitást determináló helyek (SDP: specificity-determining site) elemzése a JDet Software-rel (Muth és mtsai. 2012) készült, amely az alábbi helyről tölthető le: <http://csbg.cnb.csic.es/JDet/> (utolsó felkeresés: 2017. 12. 14). Az RLCK VI_A2-es kináz három-dimenziós (3D) modellje a SWISS-MODEL SERVER (<http://swissmodel.expasy.org>) program segítségével lett létrehozva (Biasini és mtsai. 2014). A BRI1-kapcsolt receptor kináz1 (BAK1: BRI1-associated receptor kinase 1) kináz alegységének kristályszerkezetét (azonosító: 3ulz) használtuk templátként. A képi megjelenítéshez pedig a “DeepView” Swiss-PdbViewer software-t (<http://spdbv.vital-it.ch/>) használtuk.

4.2. Mutagenézis

Az RLCK VI_A2 (At2G18890) és a VI_A3 (At5g65530) kinázok, valamint az AtROP1 GTP-áz (AT3G51300) cDNS klónok az *Arabidopsis* Biological Resource Center-ből (ABRC; <http://www.Arabidopsis.org/>) származnak. A cDNS-eket polimeráz láncreakcióval (PCR) amplifikáltuk, amelyhez Phusion high-fidelity polymerase enzimet használtunk (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). A primerek szekvenciái a Függelékben szerepelnek. A PCR fragmenteket a pEntry2b vektor EcoRI/XhoI helyére

klónoztuk. Ezt a vektort korábban módosítottuk, a Sali helyet eltüntetve megváltozott a leolvasási keret. A kinázok és a ROP1 GTP-áz szekvenciáinak megváltoztatása átfedő polimeráz láncreakció alkalmazásával történt (Atanassov és mtsai. 2009). Az RLCKVI_A kinázokban a csoportspecifikus aminosavakat egyenként kicseréltük olyanokra, melyek a B-típusú kinázokra jellemzőek (6. ábra). Az LP-IDE motívum esetében az RLCK VI_A2/3 kinázra jellemző teljes hosszúságú régiót kicseréltük az RLCK VI_B5 kinázra jellemző régióval (6. ábra).



6. ábra: Az RLCK VI_A kinázok specifikus aminosav motívumainak azonosítása valamint helyspecifikus mutagenézisük.

a: Az RLCK VI A és B alcsoportba tartozó kinázok fehérje szekvenciáinak összehasonlítása alapján azonosítottunk négy olyan régiót, amelyek jellegzetes különbségeket mutatnak a két csoport között. Az A csoportra jellemző konzervált aminosavakat csillaggal jelölünk, a B csoportban nem fordulnak elő. Az RLCK VI_A2 és A3 kinázban ezeket az aminosavakat elmutáltattuk hogy megvizsgálhassuk a ROP GTP-áz kötésben betöltött szerepüket. Az elmutáltatott aminosavakat bekeretezve jelöljük. Ezek a motívumok a jellegzetes aminosavaik után lettek elnevezve. Az összehasonlított szekvenciákban a hasonló aminosavakat megegyező színekkel jelöljük.

b: Az RLCK VI_A2 kináz aminosav szekvenciája, amelyen dupla aláhúzással jelöltük a kináz alegységet és a mutációk pozícióit. Az A2 kinázra jellemző aminosavakat (betűjeleit vastagon szedve jelöltük) kicseréltük azokra, amelyek a B típusú kinázok azonos pozícióira jellemzőek (ezeket pedig a szekvenciák alatti sorokban jelöljük). Az LP-IDE motívum esetében az egész régiót kicseréltük az RLCK VI_B5 kináz megfelelő régiójára, amint azt az ábra is jól szemlélteti. Továbbá az IDE motívumot önmagában is módosítottuk, ahogyan azt az ábrán is jelöltük.

Az elmutáltatott kináz cDNS-eket Gateway LR rekombinációs technikával (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) klónoztuk a pGADT7 élesztő két-hidrid vektor Gateway típusú átalakított verziójába (pDest-GADT7), amelyet az ABRC-től szerztünk be.

Ezeket a mutáns kinázokat bakteriális rendszerben is megtermeltettük és kifejeztettük, mégpedig úgy, hogy a PCR-ral amplifikált mutáns cDNS klónokat a pET28 vektor EcoRI/XhoI helyére kónoztuk. Az *Arabidopsis* ROP1 GTP-áz hasonlóan készült konstitutívan aktív (G15V) mutáns formáját a pDest-GBKT7 illetve pET26b vektorokba építettük be. A mutagén primerek szekvenciái szintén a Függelékben szerepelnek.

4.3. Fehérje termeltetés és tisztítás baktériumból

Bakteriális fehérje termeltetése és tisztítása, laboratóriumunk egyik korábbi cikkjében részletezett módon történt (Dorjgotov és mtsai. 2009). Elkészített pET26b illetve pET28a alapú plazmid konstrukcióinkat *Escherichia coli* Rosetta törzsébe (BL21 30 (DE3)/(pLysS); Novagen) transzformáltuk. A transzformációt követően a szilárd táptalajon, antibiotikum szelekció mellett felnövő telepeket 20 ml LB tápoldatba (10 g/l NaCl, 10 g/l Tripton, 5 g/l élesztő kivonat) oltottuk le, amelyet 37 °C -on, állandó rázatás mellett (250 rpm) 12-14 órán keresztül növesztettük. Ezt követően a 20 ml felnőtt baktériumelegyet tízszeresére hígítottuk ki LB tápoldattal, majd további 3-4 órán keresztül növesztettük 37 °C -on, állandó rázatás mellett. A fehérjék kifejeződését 1 mM Izopropil-béta-d-thiogalaktopiranoziddal (IPTG) indukáltuk 2 órán keresztül, 37 °C -on, állandó rázatás mellett. A fehérjék kikötéséhez nikkel szefaróz oszlopot használtunk a gyártó ajánlásainak megfelelően (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA). A felhasznált pufferek az alábbiak voltak: *kötő puffer*: 20 mM Tris-HCl pH=8.0, 200 mM NaCl, 5 mM imidazol; *mosó puffer*: 20 mM Tris-HCl pH=8.0, 200 mM NaCl, 20 mM imidazol, 0,05 mM Tween20; *elúciós puffer*: 20m M Tris-HCl pH=8.0, 200 mM NaCl, 120 mM imidazol. Az eluált fehérjeoldatainkat CentriCon (10 illetve 30kD pórusátmérő a GTP-áz illetve a kináz esetében) membránszűrő oszlopon (Millipore, Burlington, MA, USA) átfolyatva tízszeres töménységűre sűrítettük, majd megmértük a fehérjék koncentrációját Bradford reagenssel (BioRad, Hercules, CA, USA), tisztaságukat pedig SDS-poliakrilamid gélen (SDS-PAGE: SDS-poliakrilamid gélelektroforézis) Coomassie Brilliant Blue festéssel ellenőriztük. Ezt követően 1:1 térfogatarányban 96% glicerint (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) adtunk mintáinkhoz és alaposan elkevertük őket. A tisztított fehérjéket -20 °C-on tároltuk.

4.4. *In vitro* kináz esszék

A fentiekben részletezett módon, *Esherichia coli* sejtekből tisztított fehérje mintákkal *in vitro* kináz aktivitási tesztekét végeztünk, amelyet pontosan a már korábban leírtak alapján végeztük (Dorjgotov és mtsai. 2009). 17 µl kináz reakció pufferbe (20 mM Tris-HCl pH=7,6; 5 mM MgCl₂; 50 mM NaCl, 1 mM DTT; 10 µM ATP; 0,2 MBq [γ-³²P] ATP és 0,25 µg/µl mielin bázikus fehérje) belemértünk 1 µl (2 pmol) tisztított kinázt és 2µl (5 pmol) tisztított kis GTP-kötő fehérjét, majd az elegyet szobahőmérsékleten 30 percig inkubáltuk. A reakciót 5 µl 5×SDS-mintafelvivő puffer hozzáadásával állítottuk le. Ezt követően fehérjemintáinkat SDS-poliakrilamid gélen választottuk el, és Coomassie Brilliant Blue festést, valamint a szárítást követően autoradiogramot készítettünk. A kiértékeléshez a Phosphorimager 445 SI berendezést (Molecular Dynamics) valamint az ImageQuant 5 (Molecular Dynamics; www.mdyn.com) kiértékelő alkalmazását használtuk.

4.5. Fehérje-fehérje kölcsönhatások

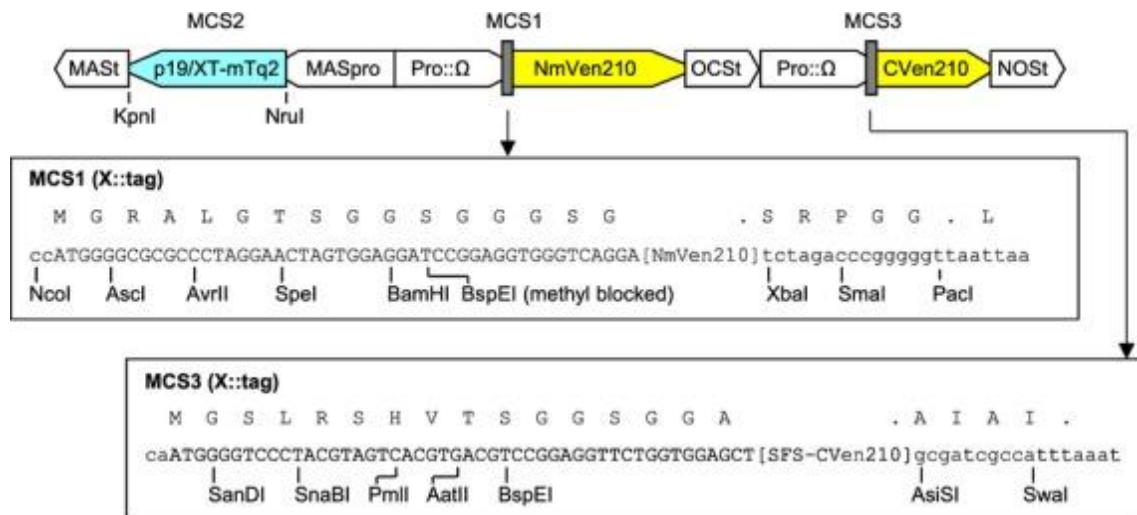
Az élesztő két-hibrid rendszeren alapuló fehérje-fehérje kölcsönhatási kísérleteket a Clontech Yeast Protocols Handbook című kézikönyvében leírt módon alkalmaztuk, amely a <http://www.takara.co.kr/file/manual/pdf/PT3024-1.pdf> oldalon online is elérhető (utolsó felkeresés 2018. 11. 04.). Kísérleteinkhez a *Saccharomyces cerevisiae* AH109 élesztőtörzset használtuk. A kinázokat tartalmazó pDest-GADT7, valamint a ROP GTP-áz tartalmazó pDest-GBKT7 konstrukciókkal végzett élesztő transzformációt, a fentiekben említett protokoll szerint, lítium-acetátot (LiAc) felhasználó módszerrel végeztük. A transzformánsokat megfelelő aminosav hiányos táptalajokon tenyésztettük, hogy a transzformációs hatékonyságot, illetve a *his3* (0-10 mM 3-amino-triazol jelenlétében) és/vagy az *ade* riporter gének aktiválódását nyomon követhethessük. A fehérje-fehérje kölcsönhatásokat kettős (-Trp, -Leu), hármas (-Trp, -Leu, -His) és négyes (-Trp, -Leu, -His, -Ade) szelekciót tartalmazó táptalajokon vizsgáltuk, amelyekben a triptofán és a leucin hiányában növekvő kolóniák a két plazmid együttes jelenlétét, míg a hisztidin és az adenin hiányában is növekvők a „csali” és a „zsákmány” fehérje kölcsönhatását jelzik. Kísérleteinkben pozitív kontrollként a RepA(C1)_pGAD424 és ZmRB_pGBT9 konstrukciót alkalmaztuk (Horváth és mtsai. 1998). Negatív kontrollként pedig az üres

aktivációs aleggységet (AD: activation domain) és kötő aleggységet (BD: binding domain) tartalmazó vektorokat használtuk.

Western blot analízissel bizonyítottuk be, hogy a transzformált élesztő sejtek a megfelelő fúziós fehérjéket termelik. Az előzőekben már ismertetett módon, a baktériumokban megtermeltetett és azokból kitisztított fehérjemintáinkat (Dorjgotov és mtsai. 2009) molekulatömegük alapján szétválasztottuk SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE), majd az elválasztott fehérjéinket polivinilén-difluorid (PVDF) membránra (Millipore, Burlington, MA, USA) transzformáltuk át. A transzformációt követően a membránokat fél órán keresztül blokkoltuk szobahőmérsékleten, 5% tejport és 0,05% Tween20-at tartalmazó TBS (25 mM Tris-HCl, pH=8.0, 150 mM NaCl) blokkoló pufferben. Elsődleges ellenanyagainkkal, amelyeket a blokkoló oldatban 1 µg/ml-es koncentrációban oldottunk fel, 1 órán keresztül, szobahőmérsékleten kezeltük a membránokat. A felhasznált elsődleges ellenanyagok a következők voltak: az élesztő GAL4 aktivációs aleggységéhez kapcsolt HA epitópot felismerő, nyúlban termeltetett Anti-HA ellenanyag, valamint a ROP GTP-áz felismerő, nyúlban termeltetett Anti-*Arabidopsis* RAC3 poliklonális ellenanyag, amelyeket a Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA) cégtől szereztünk be. A kezelés után a membránokat 0,2% Tween tartalmazó TBS oldattal mostuk. A mosást követően a membránjainkat szintén a blokkoló oldatban 5 µg/ml-es koncentrációban feloldott peroxidáz-kapcsolt, Anti-Rabbit Ig G POD (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) másodlagos ellenanyaggal kezeltük, szobahőmérsékleten 1 órán keresztül. A másodlagos ellenanyaggal való kezelést követően, a membránokat ismét 0,2% Tween tartalmazó TBS oldattal mostuk, majd a peroxidáz szubsztrátját tartalmazó Lumi-Light Western Blotting Substrate (Roche, Bazel, Svájc) hívóoldattal kezeltük, a jelet pedig röntgenfilmen (Kodak, Rochester, NY, USA) rögzítettük.

A fehérje-fehérje kölcsönhatások *in planta* kimutatására Bimolekuláris Fluoreszcencia Komplementációs (BiFC: Bimolecular fluorescence complementation) tesztek alkalmaztunk. BiFC kísérleteinket pollencsövekben végeztük, hiszen az általunk vizsgálni kívánt ROP GTP-áz fehérjéről tudjuk, hogy az egyik legfontosabb funkciója a poláris sejtnövekedés szabályozása. A pollenek rövid idő alatt képesek megfelelő körülmények között a csírázásra, ezért ideális választásnak tűntek különböző ROP GTP-áz mutánsok *in vivo* vizsgálatához. Az RLCK VI_A3 kinázról szintén irodalmi adatok alapján jól ismert tény, hogy ez a kináz nagyon erősen expresszál pollenben (Jurca és mtsai. 2008), így egyértelmű volt, hogy ez a kísérleti rendszer alkalmas lehet a ROP GTP-áz és RLCK

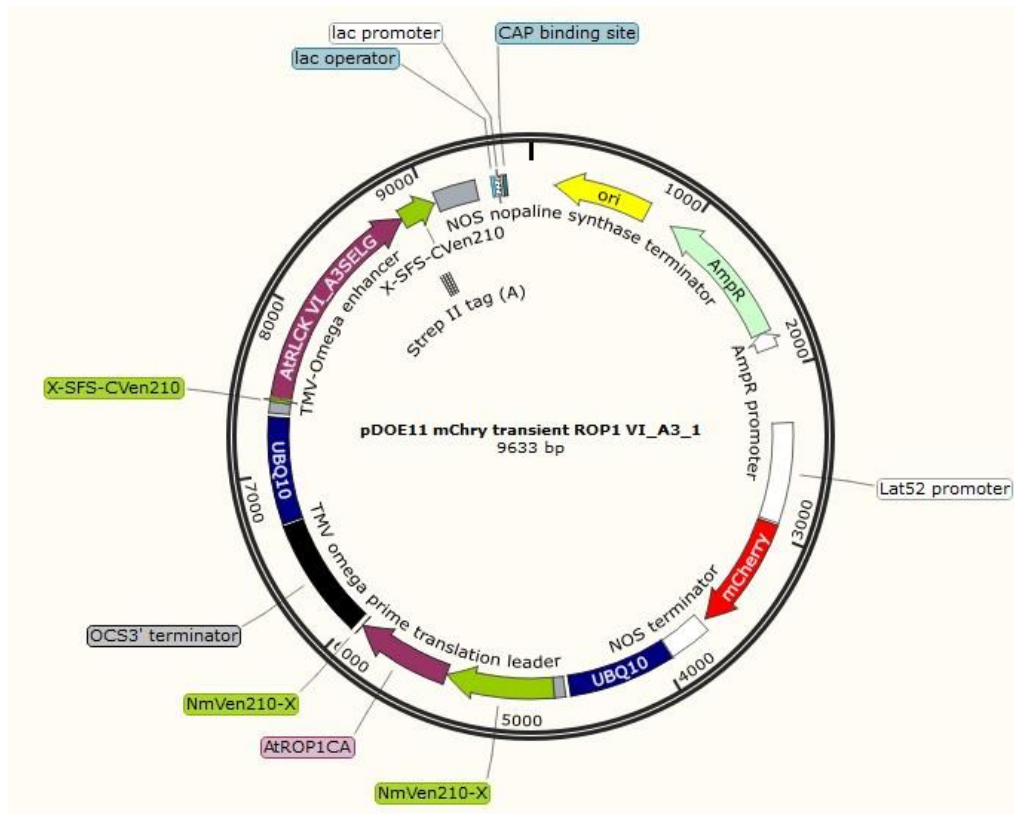
VI_A3-as kináz *in vivo* kölcsönhatásának vizsgálatára. Elméleti háttérünk mellett gyakorlati alapokat nyújtottak a kutatócsoportunkban korábban már vizsgált és sikeresen publikált ROP GTP-áz mutánsokkal végzett pollenecő kísérletek is (Fodor-Dunai és mtsai. 2011). A BiFC tesztek alapját a dupla ORF-expresszázó (pDOE) vektor rendszer szolgáltatta, amelyet Gookin és Assmann (2014) fejlesztett ki és az ABRC tette számunkra elérhetővé. Ez a rendszer lehetővé teszi két vizsgált fehérje ubiquitin10 promóterrel szabályozott párhuzamos expresszióját az mVenus sárga fluoreszcens fehérje N- és C-terminális régióihoz kapcsolva. Az eredeti vektor szintén tartalmaz egy különálló fluoreszcens fehérjét, az mTurquoise-t, amely transzformációs kontrollként működik a rendszerben, ennek segítségével a fehérje-fehérje kölcsönhatások könnyebben azonosíthatóak lesznek (7. ábra).



7. ábra: A bimolekuláris fluoreszcencia komplementációs kísérletek alapját a pDOE vektor rendszer jelenti. Ez a rendszer lehetővé teszi két vizsgált fehérje ubiquitin10 promóterrel szabályozott párhuzamos expresszióját az mVenus sárga fluoreszcens fehérje N- és C-terminális régióihoz kapcsolva. A vektor szintén tartalmaz egy különálló fluoreszcens fehérjét, az mTurquoise-t, amely transzformációs kontrollként működik a rendszerben, azonban ez a fehérje mannopine-szintáz promóter által szabályozott, amely pollenben nem aktív.

Az *Agrobacterium* mannopine-szintáz (mas) promóter által szabályozott mTurquoise fehérjét, amely pollenben nem aktív, kicseréltük a vektorban egy olyan mCherry piros fluoreszcens fehérjére, amelyet a pollen-specifikus paradicsom Lat52 promóter szabályoz (Twell és mtsai. 1990). Az mCherry fluoreszcens fehérjét kódoló DNS szekvenciát, Phusion polimeráz segítségével, XhoI/SacI fragmentként amplifikáltuk, amelyet aztán a pLat52:YFP-t hordozó pWEN240 vektor (Klahre és mtsai. 2006) megfelelő helyére

klónoztunk, ami a pLat52:mCherry-t eredményezte. A pLat52:mCherry kiméra gén ezt követően EcoRI/KpnI fragmentként már átvihető a pDOE11 vektorba, ezzel helyettesítve a pmas:mTurquoise markert. Az így elkészült pDOE11-mCherry plazmidot HindIII/KpnI fragmentként a pWEN240 vektor megfelelő helyére klónoztuk hogy csökkentsük a vektor hátterét, így létrehoztuk a pDOE11mCTr vektort, amely már alkalmas pollencsövekben a transzformáció hatékonyságának ellenőrzésére is. Ezt követően a kétféle fluoreszcens fehérjét tartalmazó vektorokba klónoztuk a ROP1 CA GTP-áz és az A3 kináz valamint annak mutáns változatait. A konstitutívan aktív ROP1 GTP-áz mutáns formát kódoló cDNS-t amplifikáltuk, amelyet a pDOE11mCTr vektor NcoI/SpeI helyére klónoztunk. Ily módon a ROP1 GTP-áz fehérjét fuzionáltattuk az mVenus sárga fluoreszcens fehérje N-terminális régiójához. A mutáns kináz cDNS-ek pedig SLICE (Seamless Ligation Cloning Extract) módszer felhasználásával lettek beillesztve a ROP1 CA GTP-áz már tartalmazó vektor PmlI helyére (Zhang és mtsai. 2012; 8. ábra). A primerek a Függelékben megtalálhatóak. A ligációs extraktot *Esherichia coli* JM109 törzsből állítottuk elő (Motohashi és mtsai. 2015). A fehérjék megfelelő fúziójának kialakulásához a konstrukcióinkat szekvenáltatással teszteltük. A módosított pDOE11mCTr konstrukciók génagyú segítségével, Wang és Jiang 2011-ben közölt cikkjében szereplő génbelövési protokoll szerint lettek bejuttatva dohány (*Nicotiana tabacum*) pollenekbe, amelyhez He gáz hajtott PDS-1000/He részecske szállító rendszert (BioRad, Hercules, CA, USA) használtunk munkánk során (Kost és mtsai. 1998). A transzformációt követően a dohány polleneket 28 °C-on, 4 órán keresztül inkubáltuk pollencsírátató táptalajon (0,01% bórsav, 1µM CaCl₂, 1mM MgSO₄, 1mM Ca(NO₃)₂, 10% szacharóz, 0,25% phytigel).



8. ábra: Pollen transzformációs és pollencső növekedési kísérleteinkhez felhasznált konstrukció. A konstrukció a pDOE11 vektoron alapszik, amely lehetővé teszi két vizsgált fehérje párhuzamos expresszióját az mVenus sárga fluoreszcens fehérje N- és C-terminális régióihoz kapcsolva. Esetünkben a vizsgált fehérjék a konstitutívan aktív ROP1 GTP-áz illetve a vad típusú/mutáns kinázok voltak. A vektor szintén tartalmaz egy különálló fluoreszcens fehérjét, az mCherry-t, amely transzformációs kontrollként működik a rendszerben.

4.6. Mikroszkópia és pollencső növekedés

A Lat52:mCherry fehérjét expresszáló pollencsőveket és növekedésüket spinning disc konfokális mikroszkóp (Visitron, Puchheim, Németország) segítségével követtük nyomon BiFC kísérleteink során. Ez a rendszer egyesít egy Olympus IX-83 mikroszkóp-alapú (Olympus, Hamburg, Németország) és egy Zyla 4.2 Plus sCMOS (Andor, Nyugat-Írország) duál kamera rendszert a Yokogawa CSU-WD konfokális scan egységgel (Yokogawa, Tokyo, Japán). A felhasznált objektívek pedig a következők voltak: LUCPlan FL 20x (száraz, 0.45NA) és 40x (száraz, 0.6NA). Az mCherry fluoreszcens fehérje detektálásához 561 nm hullámhosszú lézert, LP565 nm dikroikus tükröt és 582-636 nm hullámhossztartományú emissziós filtert használtunk. Az mVenus fluoreszcens fehérje detektálásához pedig 488 nm hullámhosszú lézert, LP565 nm dikroikus tükröt és 582-636 nm hullámhossztartományú emissziós filtert alkalmaztunk. A képek készítésének folyamán

a lézerek intenzitása és a kamera expozíciós beállításai végig állandóak voltak. A pozitívan transzformált pollencsövek teljes hosszúságát, valamint átmérőjüket mértem le, a csúcs előtti 15 µm-es távolságban. Kísérleteinket két ismétlésben végeztem el, konstrukciónként pedig 15-20 db pollencsövet mértem le ImageJ software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) segítségével.

4.7. Növényekkel végzett kísérletek

4.7.1. Növények nevelése

A munkánk során az *rlckvl_a2* T-DNS inszerciós mutáns vonalat használtuk fel (435H03 GABI KAT, Bielefeld University, Bielefeld, Németország <https://www.gabi-kat.de/>; Kleinboelting és mtsai. 2012). A növényeket *in vitro* steril körülmények között 8 óra megvilágítás és 16 óra sötét, vagy folyamatos fényben, sötét szakasz nélkül 22 °C állandó hőmérséklet mellett neveltük. A táptalaj mindkét esetben ½ MS volt 0,8% agar és 0,5% szaharóz tartalommal (Koncz és mtsai. 1994). A magvakat 5% Domestosban történő felületi sterilizálást követően egy éjszakán át 4 °C-on steril vízben hideg kezeltük, és steril táptalajra szélesztettük.

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%) öntöztük. A megfelelő méret elérése után, hosszúnappalos körülményeket alkalmazva 16 óra megvilágítás és 8 óra sötét mellett, az *Arabidopsis* virágzatot majd termést hozott.

4.7.2. *Arabidopsis Agrobaktérium* közvetítette genetikai transzformációja

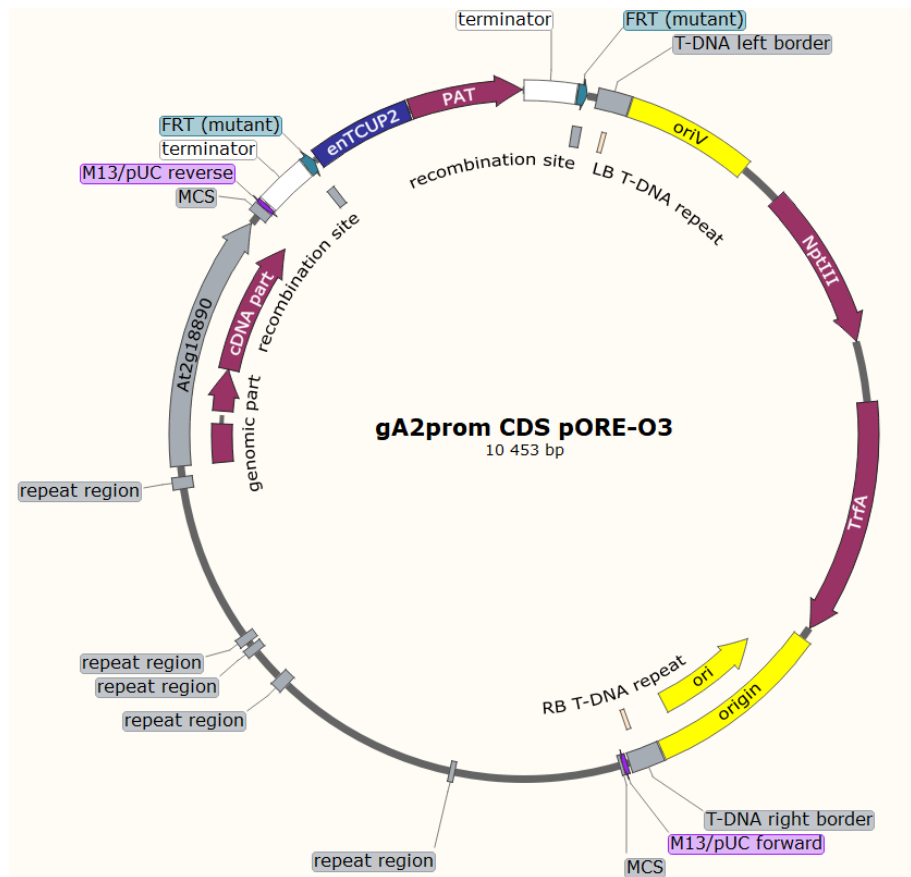
Az *RLCK VI_A2* gén promótere által szabályozott, a különböző kináz mutánsokat kódoló cDNS-eket *Agrobaktérium* közvetítette genetikai transzformációval juttattuk be az *rlck vi_a2* mutáns *Arabidopsis* vonalba. Ehhez a promóter szekvenciát az F12F24 pBleoBAC *Arabidopsis* genomi szekvenciából (forrás: *Arabidopsis* Biological Resource Center; <http://www.Arabidopsis.org/>) nyertük. Szekvencia információk alapján azonosítottuk és izoláltuk a BAC klón 10410 bp hosszúságú PstI fragmentjét, ami a teljes At2G18890 (*RLCK VI_A2*) gént tartalmazza. A pBSK vektorba (Agilent Technologies Stratagene Products Division 11011 North Torrey Pines Road La Jolla, CA 92037, USA)

klónoztuk. Innen a promótert és a kódoló régió kezdeti szakaszát az első intronnal együtt hordozó 3024 bp HindIII-XbaI szakaszt tovább klónoztuk a bináris pORE-O3 (Coutu és mtsai. 2007) *Agrobaktérium* vektorba. A kódoló régiót a pET28 vektorba klónozott különböző kináz mutáns szekvenciák XbaI-NotI (784 bp) régiójával egészítettük ki. A kináz gén promóterét, első intronját, és a teljes vad típusú illetve mutáns kináz cDNS-t hordozó vektor molekulát a 9. ábra mutatja be. A vektor molekulát elektroporációval juttattuk be az *Agrobaktérium* (GV3101; pMP90) sejtekbe (Wise és mtsai. 2006).

Maga a növény transzformáció a következő módon történt. A 4-6 hetes virágzó *Arabidopsis* növényeket 5% szaharóz, 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.

4.7.3. Transzformált növények antibiotikum szelekciója

Kísérleteink során, a felületi csíramentesített magokat $\frac{1}{2}$ MS 0.8% agar tartalmú médiumon Hygromicin (20 mg/l) jelenlétében csíráztattuk. 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.



9. ábra: Az *Agrobacterium*-közvetített transzformációhoz használt vektor molekula felépítése. A vektor a pORE-O3 plazmidon alapszik, amely a jobb és bal oldali határ szekvenciák (RB és LB T-DNA repeat) között tartalmaz egy növényi szelektiót biztosító foszfinotricin herbicid rezisztencia gént (PAT), amelyet egy konstitutív kifejeződést biztosító promóter hajt (enTCUP2; Coutu és mtsai. 2007), valamint az At2G18890 (*rlck vi_a2*) génnek promóterét és az első intront követő XbaI helyig tartó kódoló régiót tartalmazó genomikus DNS szakaszt (genomic part) valamint az ehhez kapcsolt cDNS részt (cDNA part).

4.7.4. A transzformált növények utódvonalainak hasadási tesztje

Az egyes kiszelektált transzgenikus vonalakba beépült T-DNS inszerciók számának meghatározásához a következő generáció növény egyedeit hasadási tesztnek vetettük alá. A sterilizálást követően a magokat $\frac{1}{2}$ MS, 0,8% agar, 0,5% szaharózt tartalmazó táptalajokra szélesztettük (Koncz és mtsai. 1994), amelyek 20 mg/l Hygromicin antibiotikumot is tartalmaztak. A Petri-csészékre kiszélesztett magokat növénynevelő helyiségben, 8 óra megvilágítás mellett, 22 °C-on csíráztattuk. Az antibiotikum rezisztens egyedek megjelenését követően kiválasztottuk a megfelelő hasadási arányokat mutató vonalakat (75%-a a növényeknek rezisztens és 25%-a érzékeny az antibiotikumra), amelyekkel hipokotil növekedési kísérleteket végeztünk.

4.7.5. A hipokotil hosszúság mérés paraméterei

A megfelelő hasadási arányokat mutató utódvonalak magvait $\frac{1}{2}$ MS, 0,5% szaharóz és 0,8% agart tartalmazó táptalajon, 5 napon keresztül, állandó 22 °C-os hőmérséklet mellett, 40 μ Einstein fényintenzitású folyamatos vörös fényben csíráztattuk. Ezt követően, a kicsírázott növényeket egyenként 0,8% agart tartalmazó táptalajra fektettük ki és 600dpi felbontásban szkenneltük őket. A hipokotil hosszúság mérését ImageJ szoftver (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) segítségével, a „segmented line” eszköz felhasználásával végeztük, a primer mérési eredményeket pixelben kaptuk, amelyet milliméterpapír segítségével számoltunk át milliméterbe. A pixel adatokat Excelbe exportáltuk ahol a megfelelő arányszám segítségével milliméterre transzformáltuk, átlagot számoltunk és a statisztikai analíziseket végeztük (*Student t-teszt.*)

4.8. Az eredmények statisztikai analízise

Kísérleteink mindegyikét egymástól függetlenül, legalább három ismétlésben elvégeztük, beleértve az élesztő transzformációs és szelekciós kísérleteket, a fehérje tisztításokat és a velük elvégzett kináz esszéket, továbbá a plazmid konstrukciók előállítását és ezek génagyúval történő transzformációját dohány pollencsövekbe.

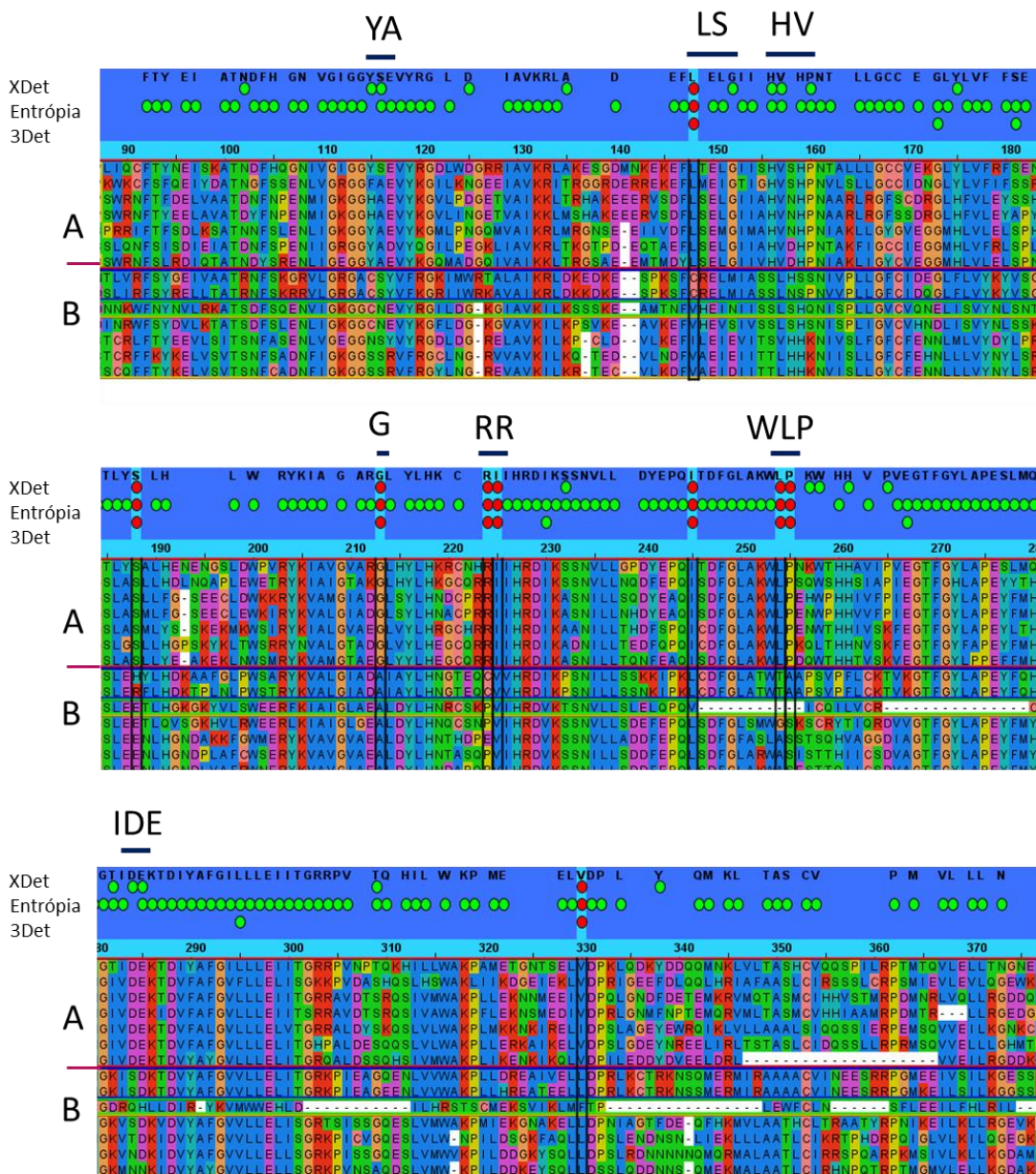
A pollencső átmérő és hosszúság vizsgálatok értékelésénél az SPSS szoftver segítségével post hoc ANOVA Duncan teszt analízist végeztünk. A hipokotil hossz mérések során a statisztikai analízishez használt módszer a Student t-teszt volt.

5. Eredmények

5.1. Az RLCK kinázok ROP GTP-áz kötő képességét potenciálisan befolyásoló aminosav szekvencia motívumok azonosítása

Az RLCK VI számú családjának 14 tagja van, amelyek kináz alegységük alapján két csoportba sorolhatóak (Jurca és mtsai. 2008). Élesztő két-hibrid kölcsönhatási mátrix segítségével korábban kimutattuk, hogy míg az A csoport tagjai kölcsönhatnak a ROP GTP-ázokkal, addig a B csoport tagjai nem hatnak kölcsön a GTP-áz fehérjékkel, anélkül is aktívak (Dorjgotov és mtsai. 2009). Több növényfaj esetében is sikerült az RLCK VI_A csoportba tartozó kinázt azonosítani, mint például a *Medicago*, *Arabidopsis* és *Hordeum* esetében is (Dorjgotov és mtsai. 2009; Huesmann és mtsai. 2012; Reiner és mtsai. 2014). Ezeknek a kinázoknak az egyébként alig detektálható *in vitro* fehérje foszforilációs aktivitása jelentősen megemelkedett GTP-kötött ROP GTP-ázok jelenlétében (Dorjgotov és mtsai. 2009; Huesmann és mtsai. 2012; Reiner és mtsai. 2014; Fehér és Lajkó 2015).

A hét ROP GTP-áz aktivált RLCK VI_A kináz elsődleges aminosav szekvenciáit összehasonlítottuk a hét ROP GTP-áz független B-típusú kináz szekvenciáival. Ennek eredményeként azonosítottunk néhány olyan aminosav motívumot, amelyek karakterisztikusan eltérnek a két csoport tagjai között (6a ábra). Ezeket a motívumokat jellegzetes aminosavaikról neveztük el. Ezek a motívumok a kináz alegységben elszórtan találhatóak meg (6b ábra). A JDet szoftver (Muth és mtsai. 2012) segítségével bebizonyítottuk, hogy a kiválasztott motívumok átfedést mutatnak az ún. potenciális specificitás meghatározó pozíciókkal (specificity-determining positions, SDP; 10. ábra). A specificitás meghatározó pozíciókban olyan aminosavak találhatóak, melyek fontos szerepet játszanak a fehérje funkciójában, beleértve a más fehérjékkel való kapcsolódást, ezért evolúciósan konzerválódtak (Chakraborty és Chakrabarti 2015).



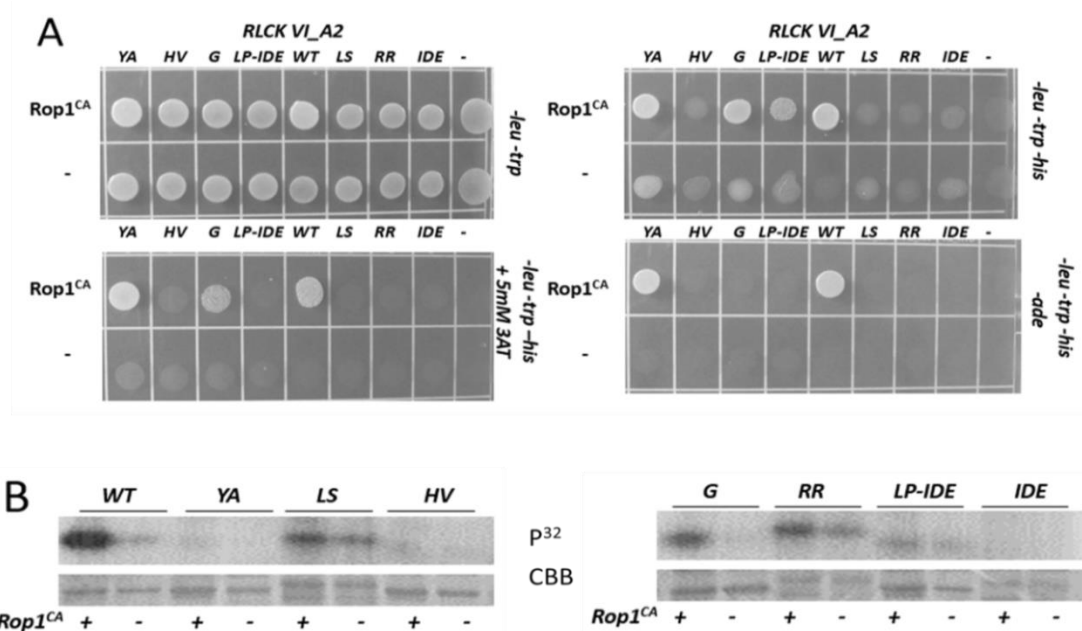
10. ábra: Az *Arabidopsis* RLCK_VI kináz család tagjainak szekvenciális összehasonlítása JDet szoftver (Muth és mtsai. 2012) segítségével. A programcsomag három különböző megközelítést alkalmaz (XDet, Entrópiya-alapú és 3Det) az SDP-k és az alszaládok meghatározására. A zöld pontok az SDP-eket jelölik, míg a piros pontok jelzik a a három különböző módszer által egybehangzóan azonosított SDP-k pozícióját. Az eredmények fölött jelölt vonalak és nevek az általunk vizsgált motívumokat jelzik. Eredményeink alapján megállapítható, hogy az RLCK VI_A csoport tagjai egyetlen alszaládba sorolhatóak be, míg az RLCK VI_B csoport képviselői három különböző alszaládot alkotnak, amelyeket egymástól vonalakkal elválasztva jelöltünk.

5.2. Az RLCK VI_A csoportra jellemző ROP GTP-áz kötő motívumok mutációs analízise

Annak érdekében, hogy bebizonyíthassuk, hogy az RLCK VI_A2 kinázban azonosított szekvencia motívumoknak szerepe van a ROP GTP-áz kötésben, ezeket a motívumokat egyenként vagy csoportosan elmutáltattuk. Az A csoportra jellemző aminosav motívumokat (6a ábra) kicseréltük olyan aminosavakra, amelyek a B típusú kinázokra jellemzőek. Mivel a B típusú kinázok konstitutívan aktív kinázok (Dorjgotov és mtsai. 2009), feltételeztük, hogy az ilyen típusú változások közvetlenül kapcsolhatóak a ROP GTP-áz kötő képességhez. A mutáns kinázokat kódoló cDNS klónokat a GAL4 aktivációs alegységéhez kapcsoltuk, míg a GAL4 DNS-kötő alegységét a konstitutívan aktív *Arabidopsis* ROP1 GTP-áz fehérjével (ROP1 CA) fuzionáltuk. Élesztő két-hibrid kölcsönhatási mátrix segítségével teszteltük a fehérje-fehérje kölcsönhatások kialakulását a mutáns kinázok és a ROP1 CA GTP-áz fehérje között (11A. ábra). A kölcsönhatások stabilitásának mértékét különböző erősségű szelekciós táptalajok (0, 1, 3, 10 mM 3-amino-1,2,4-triazol, 3-AT) felhasználásával ellenőriztük. 10 mM 3AT jelenlétében, egy mutáció kivételével (amit YA-ként jelöltünk), mindegyik mutáns megakadályozta az élesztő telepek növekedését, jelezve ezzel, hogy a mutációk nagymértékben gyengítették vagy meggátolták a kinázok ROP GTP-áz kötő képességét. 3-AT hiányában pedig a G mutáns esetében erős élesztő telepnövekedést, míg az LP-IDE mutáció esetén az élesztő telepek gyengébb növekedését tapasztaltuk. Ezért megállapítható, hogy a többi mutáns kinázzal (HV, LS, RR, IDE) ellentétben ezek a mutációk csak gyengítették, de nem szüntették meg a vizsgált fehérjék kölcsönhatását.

A fenti megfigyelések alátámasztása érdekében elvégeztünk *in vitro* kináz aktivitás esszéket is. Ehhez az RLCK VI_A2 kináz 6×HIS jelölt mutáns fehérjét *Eserichia coli* sejtekben megtermeltettük majd kitisztítottuk. A 11B ábra mutatja be az RLCK VI_A2 kináz auto-foszforilációs aktivitását, az *Arabidopsis* ROP1 CA GTP-áz fehérje jelenlétében és hiányában, amelyet szintén a kinázhoz hasonló módon állítottunk elő. Az RLCK VI_A2 G kináz mutáns a vad típusú kinázhoz hasonlóan viselkedett. A további hat mutáns kinázból három elvesztette ROP-függő auto-foszforilációs aktivitását (YA, HV, IDE), míg a fennmaradó másik három kináz mutáns (LS, RR, LP-IDE) bizonyos szintű auto-foszforilációs aktivitást mutatott ROP GTP-áz fehérje jelenlétében és hiányában egyaránt (11B ábra). Ezek az eredmények megerősítik, hogy az általunk azonosított aminosav

motívumok, egy kivétellel, fontos szerepet játszanak a ROP GTP-áz kötésben, és néhány közülük fontos lehet a kináz aktivitás ROP GTP-áz függő szabályozásában is.



11. ábra: Az RLCK VI_A2 kináz valamint mutánsainak kölcsönhatása és aktivációja a konstitutívan aktív ROP1 CA GTP-áz fehérjével.

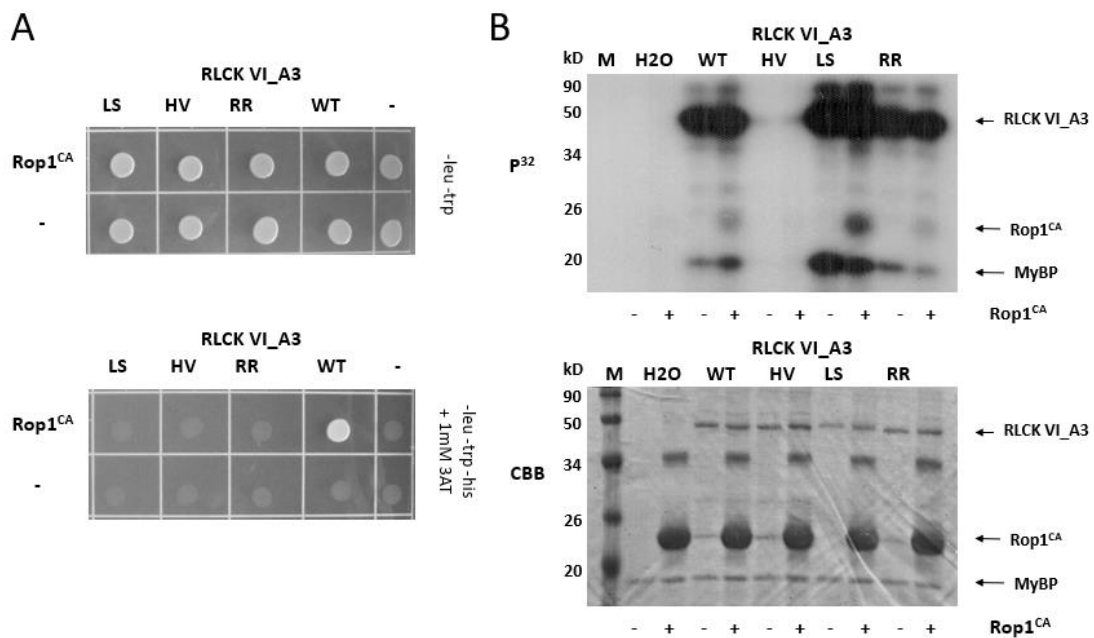
A: Élesztő két-hibrid fehérje-fehérje kölcsönhatás vizsgálata. A 6. ábrán már részletezett kináz mutánsokat és a vad típusú kinázt a GAL4 aktivációs doménjéhez fúzionáltattuk, míg a ROP1 CA GTP-áz fehérjét a GAL4 DNS-kötő alegységéhez fúzionáltattuk, majd élesztőben megtermeltettük őket. A -leu és -trp táptalajon növekvő telepek a transzformáció sikerességét igazolják, a növekvő szelekciós nyomás pedig a kölcsönhatás erősségét jelöli (-leu-trp-his; -leu-trp-his+5mM 3AT; -leu-trp-his-ade). Az üres pGADT7 és pGBKT7 vektorokat pedig kontrollként alkalmaztuk (-).

B: Az RLCK VI_A2 kináz és mutásainak autofoszforilációs aktivitása aktív ROP GTP-áz jelenlétében (+) és hiányában (-). Felső sorban a kináz aktivitás autoradiogramja (p³²), az alsó sorban pedig a Coomassie Brilliant Blue-val (CBB) megfestett és poliakrilamid gélen futtatott fehérjék láthatóak. A ROP GTP-áz kötő motívumok jelenléte befolyásolja az RLCK VI_A3 kináz szubsztrát foszforilációs aktivitását.

5.3. A ROP GTP-áz -kötő motívumok jelenléte befolyásolja az RLCK VI_A3 kináz szubsztrát foszforilációs aktivitását.

Az RLCK VI_A2 kináz alacsony affinitással foszforilálja a mesterséges mielin bázikus fehérje szubsztrátot. Az RLCK VI_A3 kináz viszont hatékonyan foszforilálja ezt a szubsztrátot (Reiner és mtsai. 2014), ezért ebben a kinázban is létrehoztuk néhány fentebb leírt mutációt. Ezek a mutációk az A2 mutánsokhoz hasonlóan, a konzervált HV, LS és RR aminosav motívumokat változtatták meg (6. ábra). Ezeket a mutációkat azért választottuk

ki, mert az A2 kináz esetében a ROP GTP-áz kötő képesség elvesztését eredményezték, viszont a kináz aktivitásra nézve különböző hatásaik voltak (11B ábra). Mindhárom mutáció megakadályozta az RLCK VI_A3 kináz kötődését az aktív ROP GTP-áz fehérjéhez (12A ábra). Az RLCK VI_A3 kináz rendelkezik mielin bázikus fehérje foszforilációs aktivitással, amely ROP1 CA GTP-áz jelenlétében tovább fokozódik (12B ábra). A HV mutáció esetében elveszett az A3 kináz mielin bázikus fehérje foszforilációs aktivitása, míg az LS és RR motívumok mutációja ROP GTP-áz független kináz aktivitást eredményezett (12B ábra). Ezek az eredmények összecsengnek az RLCK VI_A2 kináz mutánsok auto-foszforilációs aktivitásának mintázatával. Az összes RLCK VI_A3 mutáns forma erős auto-foszforilációs aktivitást mutatott, amely elfedte a feltételezhető ROP GTP-áz függő auto-foszforilációs különbségeket.



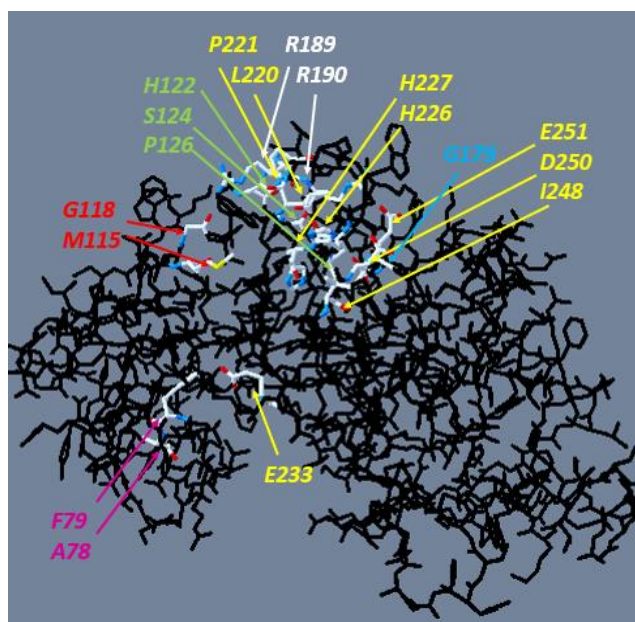
12. ábra: Az RLCK VI_A3 kináz valamint mutánsainak kölcsönhatása és aktivációja a konstitutívan aktív ROP1 CA GTP-áz fehérjével.

A: Élesztő két-hibrid fehérje-fehérje kölcsönhatás vizsgálata. A kináz mutánsokat (HV, LS, RR) és a vad típusú kinázt (WT) a GAL4 aktivációs doménjéhez fúzionáltattuk, míg a ROP1 CA GTP-áz fehérjét a GAL4 DNS-kötő alegységéhez fúzionáltattuk, majd élesztőben megtermeltettük őket. A -leu és -trp táptalajon növekvő telepek a transzformáció sikerességét igazolják, a -leu-trp-his+1mM 3AT szelektív táptalajon növekvő telepek pedig az aktív ROP GTP-áz fehérjével való kölcsönhatást jelölik. Az üres pGADT7 és pGBKT7 vektorokat pedig kontrollként alkalmaztuk (-).

B: Az RLCK VI_A3 kináz és mutánsainak mielin bázikus fehérje (MyBP) foszforilációs aktivitása aktív ROP GTP-áz jelenlétében (+) és hiányában (-). Felső sorban a kináz aktivitás autoradiogramja (p³²), az alsó sorban pedig a Coomassie Brilliant Blue-val (CBB) megfestett és poliakrilamid gélen futtatott fehérjék láthatóak. M: molekulatömeg marker, H₂O: kinázt nem tartalmazó kontroll.

5.4. Az azonosított aminosav motívumok közösen alakítják ki a kinázok ROP GTP-áz kötő felszínét

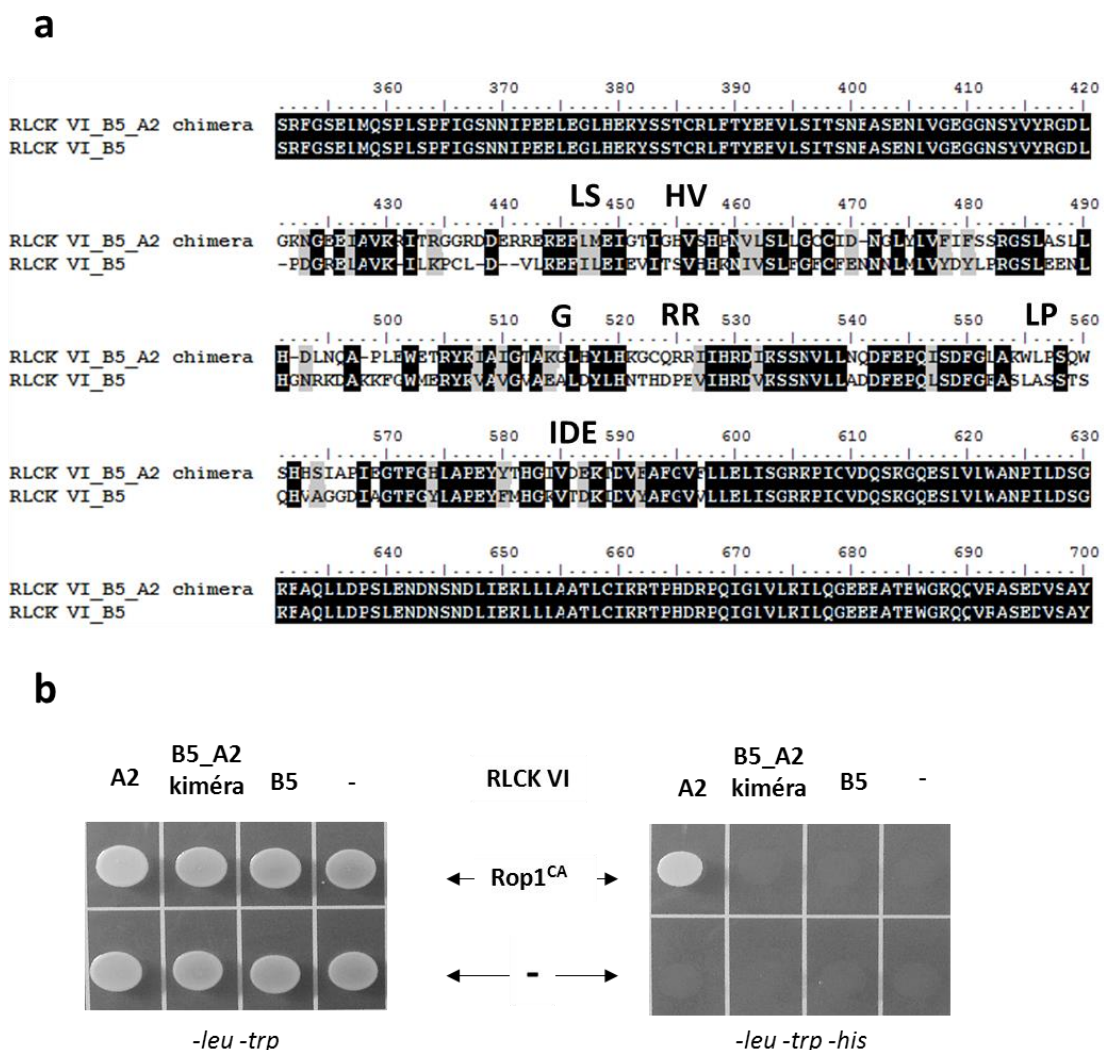
Bár az RLCK VI kinázok 3D térszerkezete jelenleg még ismeretlen, létre hoztunk egy elméleti modellt a Brasszinoszteroid Inszenzitív1-asszociált Receptor Kináz1 fehérje (BAK1, amelynek a fehérje adatbank azonosítója: 3ulz) kináz alegységének kristályszerkezete alapján. A 13. ábra az RLCK VI_A2 kináz 3D modelljén az elmutált aminosav eloszlását ábrázolja. A ROP GTP-áz kötésben részt vevő aminosavak többsége egy közös felszín képez a kinázok szubsztrátkötő zsebe felett. Az egyetlen RLCK VI_A specifikus motívum (YA), amelyről kimutattuk, hogy befolyásolja a kináz aktivitását, ugyanakkor a ROP GTP-áz kötésben nem vesz részt (11. ábra), ezen a régió kívül helyezkedik el.



13. ábra: Az RLCK VI_A2 kináz 3D prediktált szerkezeti modellje. Az RLCK VI_A és B kináz csoportok között jellegzetesen eltérő aminosavakat (6. ábra) nyilakkal jelöltük. A különböző motívumokat különböző színekkel jelöltük: YA: magenta, LS: piros, HV: zöld, RR: fehér, G: kék, LP-IDE: sárga.

Az RLCK VI_B5 kináz doménjének egy részét, amely a ROP GTP-áz kötéshez szükséges motívumokat is tartalmazza, PCR technikával kicseréltük az RLCK VI_A2 kináz megfelelő régiójára (14a ábra). Ezt követően a kiméra kináz ROP GTP-áz kölcsönható képességét teszteltük élesztő két-hibrid rendszerben, ahol azt tapasztaltuk, hogy a mutációt követően a kináz nem volt képes kötni a ROP1 CA GTP-áz fehérjét (14b ábra). Ennek magyarázata az lehet, hogy a kiméra kináz vagy nem tudja felvenni a ROP

GTP-áz kötéséhez szükséges térszerkezetet, vagy pedig az általunk vizsgált motívumok megléte szükséges, de nem elégséges a ROP GTP-áz kötés kialakításához.



14. ábra: Az RLCK VI_A2 kináz ROP GTP-áz kötő motívumot hordozó régiójának jelenléte az RLCK VI_B5 kinázban nem elégséges a ROP1 CA GTP-áz kötő képesség kialakulásához. A már korábban vizsgált VI_A2-es kináz ROP GTP-áz kötő motívumot is tartalmazó részét behelyettesítettük a VI_B5 kináz megfelelő régiójába.

a: Az ábrán a teljes hosszúságú RLCK VI_B5 kináz és az RLCK VI_B5_A2 chimera fehérje szekvencia összehasonlítása látható. Az általunk vizsgált ROP GTP-áz kötő motívumok helyét a karakterisztikus aminosavakra jellemző betűkódokkal jelöltük a szekvencia fölött.

b: Az RLCK VI_B5_A2 chimera fehérje kölcsönható képességét a ROP1 CA GTP-áz fehérjével élesztő két-hibrid kísérlettel teszteltük le. Pozitív és negatív kontrollként a teljes hosszúságú vad típusú RLCK VI_A2 és VI_B5 kinázokat használtuk. A kinázokat a GAL4 aktivációs doménjéhez fuzionáltattuk, míg a ROP1 CA GTP-áz fehérjét a GAL4 DNS-kötő alegységéhez fuzionáltattuk. A -leu-trp táptalajon növekvő élesztő telepek igazolják a két konstrukció sikeres transzformációját az élesztő sejtekbe. A -leu-trp-his táptalajon növekvő telepek pedig a fehérje-fehérje kölcsönhatást bizonyítják. Negatív kontrollként az üres pGADT7 és pGBKT7 vektorokat használtuk.

5.5. A ROP GTP-áz kötő motívumokat tartalmazó kinázok evolúciósan konzerváltak a szárazföldi növényekben

Medicago (Dorjgotov és mtsai. 2009), *Arabidopsis* (Molendijk és mtsai. 2008; Dorjgotov és mtsai. 2009; Reiner és mtsai. 2014) és *Hordeum* (Hoefle és mtsai. 2011) fajokban is sikerült kísérletesen bebizonyítani a ROP GTP-áz aktivált RLCK VI_A kinázok jelenlétét. *In silico* analízissel kerestük a választ arra, hogy az általunk vizsgált ROP GTP-áz kötő motívumok mennyire konzerváltak ebben a kináz családban. Pattern Hit Initiated BLAST technikával kerestünk olyan *Arabidopsis* RLCK VI_A3 kináz szekvenciákhoz hasonló kinázokat a különböző taxonokba tartozó növényekben, melyeknek a teljes genom szekvenciája ismert, mint például a *Chlamydomonas reinhardtii*, *Physcomitrella patens*, *Marchantia polymorpha*, *Selaginella moellendorffii* és *Oryza sativa*. A vizsgálatokhoz az *Arabidopsis* RLCK VI_A3 kináz HV jelű ROP GTP-áz kötésben szerepet játszó aminosav motívumát használtuk mintaként. Bár kísérleteinkhez csak a HV motívumot használtuk fel mintaként, az azonosított *Physcomitrella*, *Marchantia*, *Selaginella* és *Oryza* kinázok szekvenciái tartalmazták a többi *Arabidopsis* RLCK VI_A kináz csoportra jellemző ROP GTP-áz kötő motívumot is (15. ábra). A *Chlamydomonas* genomban azonban nem találtunk hasonló kináz szekvenciákat. Ez alapján elmondhatjuk, hogy ez a kináz család a szárazföldi növények (*Embryophyta*) korai evolúciója során jelenhetett meg.

		*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	
<i>Chlamydomonas</i>	none								
<i>Marchantia</i>	MPgi157101256	GYAEV	FLTELG	GIVSHVSHPN	ARGL	CPERRI	GLAKWLP	ELWTHHTVTPVEG	GYVDEK
	PPgi168004812	GYAKV	FLIELG	GIVSHVSHTN	ARGL	CQERRI	GLSKWLP	DRWTHHTVSPIEG	GIVDEK
<i>Physcomitrella</i>	PPgi168001575	GFAKV	FLIELG	GIVSHVSHIN	ARGL	CQERRI	GLSKWLP	DRCSHHTVLPVEG	GRVDEK
	PPgi168033866	GYAKV	FLTELG	GIVSHVAHTN	ARGL	CQERRI	GLSKWLP	ERWTHHTVAPIEG	GIVDEK
	SMgi302780083	GYAVV	FLTELG	GIIGHVTHPN	ARGL	CPERRI	GLAKWLP	EQWTHHTVTFPIEG	GIVDEK
	SMgi302781124	GYAVV	FLTELG	GIIGHVTHPN	ARGL	CPERRI	GLAKWLP	EQWTHHTVTFPIEG	GIVDEK
<i>Selaginella</i>	SMgi302762138	GYADV	FLTELG	GVLGHVSHPN	ARGL	CPERRI	GLAKWLP	SEWTHHTV-PVEG	GIVDEK
	SMgi302820734	GYADV	FLTELG	GVLGHVSHPN	ARGL	CPERRI	GLAKWLP	SEWTHHTV-PVEG	GIVDEK
	OSgi218195731	GYGEV	FLTELG	GTVGHVRHNP	ARGL	CARRI	GLARWLP	SEWTHHAIAPIEG	GIVDEK
	OSgi115461022	GYGEV	FLTELG	GTVGHVRHNP	ARGL	CARRI	GLARWLP	SEWTHHAIAPIEG	GIVDEK
	OSgi115469666	GSSEV	FLAELG	GTVGHARHNP	ARGL	CQERRI	GLAKWLP	SEWTHHAIAPIEG	GIVDEK
	OSgi125556587	GSSEV	FLAELG	GTVGHARHNP	ARGL	CQERRI	GLAKWLP	SEWTHHAIAPIEG	GIVDEK
	OSgi125598337	GSSEV	FLAELG	GTVGHARHNP	ARGL	CQERRI	GLAKWLP	SEWTHHAIAPIEG	GIVDEK
	OSgi116309649	GYGEV	FLTELG	GTVGHVRHNP	ARGL	CARRI	GLARWLP	SEWTHHAIAPIEG	GIVDEK
<i>Oryza</i>	OSgi38343967	GYGEV	FLTELG	GTVGHVRHNP	ARGL	CARRI	GLARWLP	SEWTHHAIAPIEG	GIVDEK
	OSgi115475547	GYAEV	FLTELG	GIQGHVCHPN	ARGL	CPERRI	GLAKWLP	KQWTHHVIPIEG	GIVDEK
	OSgi218200767	GYAEV	FLTELG	GIQGHVCHPN	ARGL	CPERRI	GLAKWLP	KQWTHHVIPIEG	GIVDEK
	OSgi115469392	GHAEV	FLSELG	GIIAHVNHPN	AEGL	CHHRI	GLAKWLP	DKWTHHVVFPPIEG	GIINEK
	OSgi218198701	GHAEV	FLSELG	GIIAHVNHPN	AEGL	CHHRI	GLAKWLP	DKWTHHVVFPPIEG	GIINEK
	OSgi215767116	GHAEV	FLSELG	GIIAHVNHPN	AEGL	CHHRI	GLAKWLP	DKWTHHVVFPPIEG	GIINEK
	AT5g57670	GYSEV	FLTELG	GIISHVSHPN	ARGL	CNERRI	GLAKWLP	PNKWTTHHAVIPVEG	GTIDEK
	AT2g18890	GFAEV	FLMELG	GTIGHVSHPN	ARGL	CQERRI	GLAKWLP	SCWSSHAIAPIEG	GIVDEK
<i>Arabidopsis</i>	AT5g65530	GHAEV	FLSELG	GIIAHVNHPN	ADGL	CPERRI	GLAKWLP	EHWHHIVFPPIEG	GIVDEK
	AT5g10520	GHAEV	FLSELG	GIIAHVNHPN	ADGL	CPERRI	GLAKWLP	ENWPHHVVFPPIEG	GIVDEK
	AT5g35960	GYAEV	FLSEMG	GIMAHVNHPN	AEGL	CHHRI	GLAKWLP	ENWTHHIVSKFEG	GIVDEK

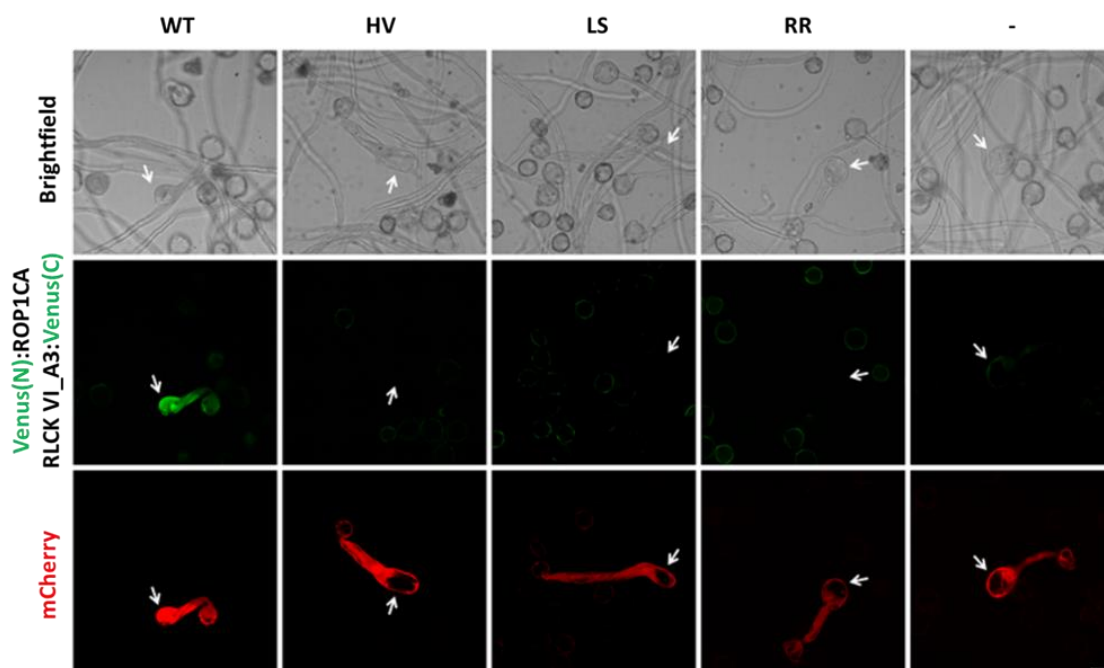
YA LS HV G RR LP IDE

15. ábra: Az általunk vizsgált kináz motívumok összehasonlítása a különböző taxonokba tartozó olyan növényfajokban, amelyeknek a teljes genomszekvenciáját ismerjük. Pattern Hit Initiated BLAST technika segítségével kerestünk olyan *Arabidopsis thaliana* RLCK VI_A3 (At5g65530) kinázhoz hasonló homológokat, amelyek szintén rendelkeznek a GXXXHXXH aminosav mintázattal (az x bármilyen aminosavat jelölhet). A várható értéket 0.01-re, a PHI-BLAST küszöbértékét pedig 0.005-re állítottuk be. A szekvencia összehasonlítások ClustalW algoritmus alapján készültek (Thompson és mtsai. 1994). Kizárólag a jelenlegi kísérleteinkhez szükséges régiókat mutatjuk be ábránkon.

5.6. Az RLCK VI_A3 kináz és a ROP1 GTP-áz kölcsönhatása *in planta* és az RLCK VI_A3 kináz pollencső növekedésre gyakorolt hatása

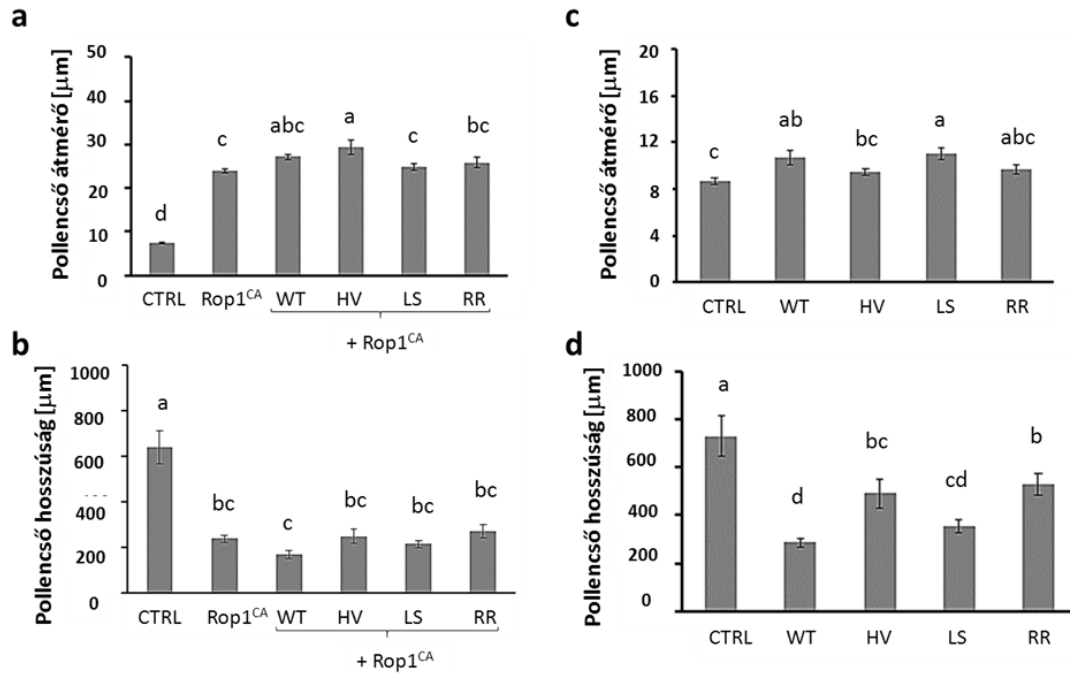
Az RLCK VI_A3 kináz illetve annak mutáns fehérjéi és a konstitutívan aktív ROP1 GTP-áz fehérje közötti *in vivo* kölcsönhatások meghatározására a bimolekuláris fluoreszcencia komplementációs (BiFC) esszét alkalmaztuk. A kinázokat (vad típus, HV, RR és LS mutánsok), valamint a ROP1 CA GTP-áz kódoló cDNS-eket a sárga fluoreszcens fehérje (mVenus) N- illetve C-terminális régióit kódoló cDNS szakaszaihoz fúzionáltattuk egy megfelelő génexpressziós vektorban (lásd: Anyagok és módszerek). Mindkét fehérje szintjét az *Arabidopsis* ubiquitin10 promóter szabályozza a vektorban, biztosítva ezzel a hasonló koexpressziós szintet. A vektor szintén hordozza az mCherry vörös fluoreszcens fehérje génjét, hogy a pozitívan transzformált pollencsövek könnyen azonosíthatóak legyenek. Ez a marker fehérje a Lat52 pollenspecifikus promóter irányítása alatt áll (8. ábra). Konstrukcióinkat génagyú segítségével jutattuk be dohány pollenekbe. *In vitro* csíráztatást követően a transzfektált pollencsöveket az mCherry fluoreszcens fehérje expressziója alapján fluoreszcencia mikroszkóppal azonosítottuk és megvizsgáltuk, hogy mutatnak-e a helyreállt mVenus fehérjére jellemző sárga fluoreszcencia jelet is. A kináz

aktivitási tesztek, valamint az *in vivo* és élesztő két-hibrid kísérleti adatok eredményeivel összhangban elmondható, hogy pollencsőben is csak a vad típusú RLCK VI_A3 kináz volt képes kölcsönhatni az aktív ROP1 GTP-áz fehérjével, míg a többi, ROP GTP-áz kötésben hibás mutáns kináz (HV, RR, LS) nem volt képes erre, hiszen csak a vad típusú kináz esetében kaptunk sárga fluoreszcens jelet a transzfektált pollen csövekben (16. ábra).



16. ábra: Az RLCK VI_A3 kináz variánsok és a konstitutívan aktív ROP1 CA GTP-áz fehérje kölcsönhatás *in vivo* tesztje *Nicotiana tabacum* pollencsővekben. A transzformált dohány pollencsővek konfokális mikroszkroszkópos képeit mutatjuk be fenti ábránkon. A transzformációhoz felhasznált konstrukcióink mindegyike tartalmazta a Lat52:mCherry kiméra gént, így vörös fluoreszcenciájuknak köszönhetően a pozitívan transzformált pollencsővek könnyebben azonosíthatóak voltak. A ROP1 CA GTP-áz fehérjét az mVenus fluoreszcens fehérje N-terminális részéhez, míg a vad típusú (WT) és mutáns (HV, LS, RR) RLCK VI_A3 kinázokat az mVenus C-terminális szekvenciájához fuzionáltattuk. A bimolekuláris fluoreszcencia komplementációval bebizonyítottuk, hogy csak a vad típusú VI_A3-as kináz képes kölcsönhatni a ROP GTP-ázzal, míg a HV, LS és RR mutáns formák nem képesek erre, ugyanis csak a vad típus esetében tapasztaltunk sárga mVENUS fluoreszcencia jelet, amely a kölcsönhatást igazolja. Negatív kontrollként (-) a kináz gént nem tartalmazó vektort használtuk. A fehér nyilak a pollencsővek csúcsait jelölik. Mércé: 30 μ m.

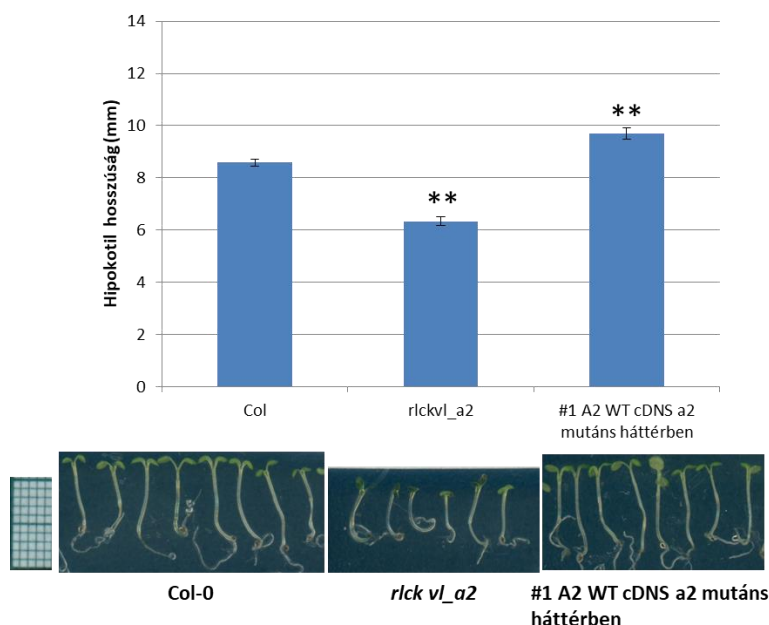
Az *Arabidopsis* RLCK VI_A3 kináz ROP GTP-áz jelenlétében megnövekedett *in vitro* fehérje foszforilációs aktivitást mutat (Reiner és mtsai. 2014), valamint erős pollenspecifikus expresszió jellemzi (Jurca és mtsai. 2008). Ezek alapján úgy döntöttünk, hogy megvizsgáljuk a vad típusú VI_A3 kináz és ROP GTP-áz kötésben hibás mutáns formáinak hatását a pollencsövek növekedésére és polarítására nézve, konstitutívan aktív ROP1 GTP-áz fehérje jelenlétében és hiányában is (16. ábra). Konstrukcióinkat génagyú segítségével jutattuk be dohány pollenekbe, majd az *in vitro* csíráztatást követően a pollencsövek szubapikális régiójának átmérőjét és a pollen csövek teljes hosszúságát mértük az mCherry vörös marker fehérjét szintén expresszáló, pozitívan transzformált pollencsövekben. *In vivo* kísérletes eredményeink alapján elmondható, hogy a ROP1 CA GTP-áz fehérje tranziens kifejeztetése az irodalmi eredményekkel összhangban nagyon rövid, a csúcsnál ballon-szerűen kiszélesedő pollencsőcsúcs fenotípust, azaz polaritás veszteséget eredményezett. Ezt a rövid, ballon-szerűen kiszélesedő pollencső fenotípust pedig nem befolyásolta szignifikáns módon a ROP1 CA GTP-áz mellett párhuzamosan túltermeltetett A3 kináz, illetve annak egyik vizsgált mutáns formája sem (16. ábra; 17/a,b,c. ábra). Mikor a kinázt, illetve annak mutánsait önmagukban, a ROP1 CA GTP-áz nélkül termeltettük túl, a pollencsövek hosszúságának tekintetében tapasztaltunk nagymértékű rövidülést, míg a ballon-szerű kiszélesedés, vagyis a polaritás elvesztés nem volt megfigyelhető ezeknél a pollencsöveknél (17/d. ábra). A konstitutívan aktív kináz (LS, RR) mutánsok túltermeltetése, a vad típusú A3 kinázhoz képest szignifikánsan kisebb hatást gyakoroltak a pollencsövek hosszúságának lerövidülésére. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a kinázok hatása a pollencső növekedésére részben függ, a ROP GTP-ázokkal való kölcsönhatási képességüktől.



17. ábra: Az RLCK_VI_A3 kináz illetve mutánsainak hatása a pollencső átmérőjére és polaritására ROP1 CA GTP-áz jelenlétében (a, b) és hiányában (c, d). Konstrukciónként 20 transzformált pollencső csúcsi átmérőjét (a, c), valamint teljes hosszúságukat mértük le (b, d). Az átmérőket azonos ponton, a pollencső végétől, 15 μm -es távolságban mértük minden pollencső esetében. Ábránkon átlagot és szórás értékeket jelöltünk. Az egyváltozós variancia-analízis (ANOVA) és Duncan többszörös rang tesztje alapján a különböző betűk a statisztikailag szignifikáns ($p < 0,05$) különbségeket jelölik.

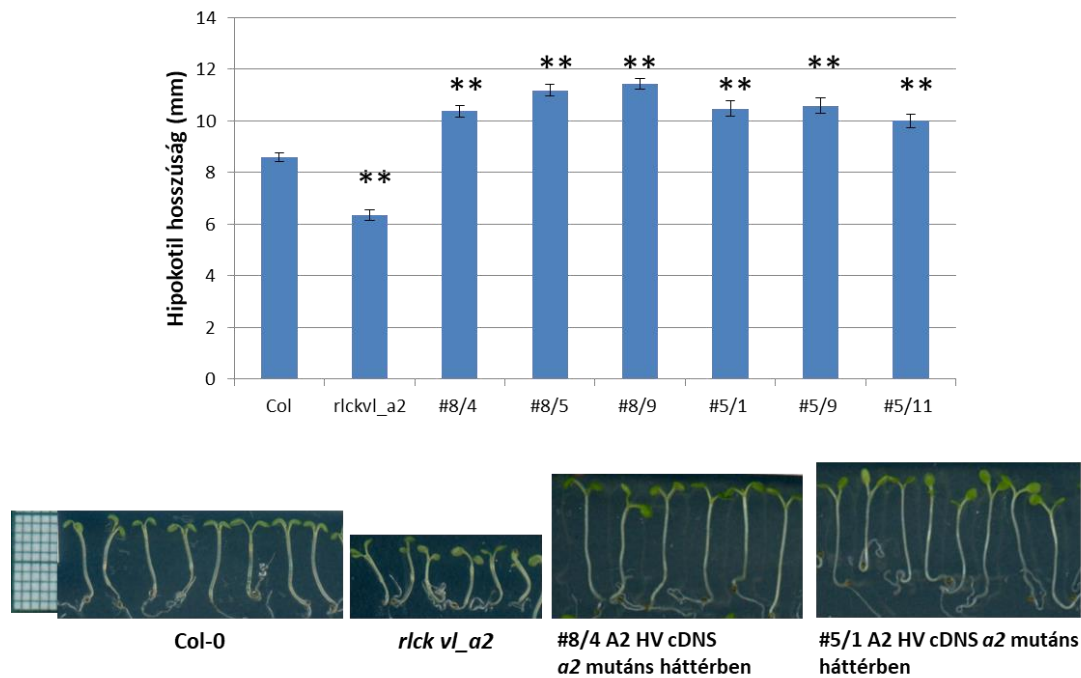
5.7. Az RLCK VI_A2 kináz ROP GTP-áz kötő képességének szerepe a kináz biológiai funkciójában

Az *rlck vi_a2* T-DNS inszerciós mutáns jellemzése során megállapítottuk, hogy a mutáns csíranövények hipokotilja 25%-kal rövidebb 40 μE vörösfényben a Columbia-0 (Col) vad típusú növények hipokotil hosszához képest, és a sziklevek méretének csökkenése is megfigyelhető (18. ábra). A vad típusú (WT) RLCK_VI_A2-es cDNS kifejeztetésével helyre tudtuk állítani az *rlck vi_a2* mutáns növények csökkent hipokotil hosszát és sziklevel méretét, sőt ezeknél a vonalaknál a Col növényekhez képest szignifikánsan nagyobb hipokotil hosszúságokat mértünk (18. ábra).

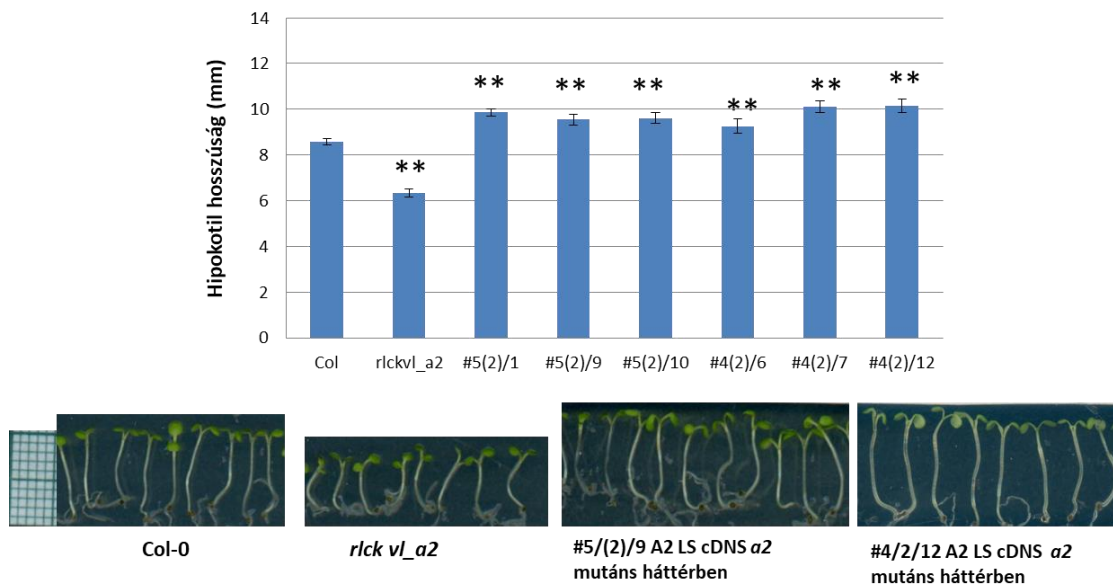


18. ábra: RLCK VI_A2 WT cDNS-t kifejező *rlck vi_a2*-es mutáns vonalak hipokotil hossza. A növényeket 5 napig állandó 40 μ E intenzitású vörös fényben, 0,5% szacharóz tartalmú ½ MS táptalajon neveltük. Az oszlopdiagramokon a hibásávok az átlagtól való eltéréseket, standard error (SE) jelölik. A * ($p < 0,05$) és ** ($p < 0,005$) jelölik, ha a kontrolltól való eltérések statisztikailag szignifikánsak voltak (*Student t-teszt*). Mércse: 1 cm.

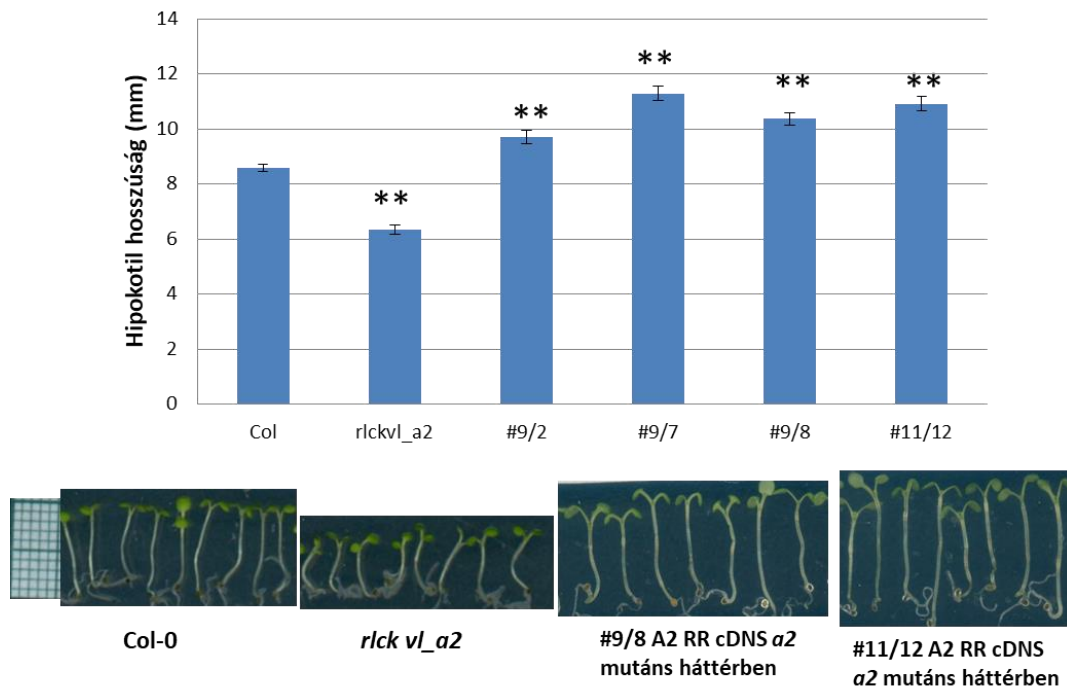
Annak megválaszolására, hogy a kináz ROP GTP-áz kötő képessége szerepet játszik-e ebben a folyamatban, az RLCK VI_A2_HV (19. ábra), LS (20. ábra) illetve RR (21. ábra) mutáns kinázokat is kifejeztettük az A2-es kináz saját promóterének szabályozása alatt, az *rlck vi_a2* mutáns háttérben. Minden mutáció esetében két megfelelő arányban hasadó vonal 3-3 utódvonalát vizsgáltuk. Magas intenzitású folyamatos vörös fényben elvégeztük a hipokotil hosszmerési tesztek. A kísérleti paraméterek megegyeztek a vad típusú kináz esetében már ismertetett feltételekkel. Eredményeink hasonlóságot mutattak a vad típusú A2-es kinázzal végzett kísérletekben kapott eredményekkel. Minden mutáns kináz változat helyreállította az RLCK VI_A2 hiányában megfigyelt fenotípusos változásokat a hipokotil hosszúság tekintetében, valamint a szikevelek mérete is nagyobb volt, mint a Col-0 növényeké.



19. ábra: RLCK VI_A2 HV allélt kifejező *rlck vi_a2*-es mutáns vonalak hipokotil hosszának mérése. A növényeket 5 napig állandó 40 μ E intenzitású vörös fényben, 0,5% szaharóz tartalmú ½ MS táptalajon neveltük. Az oszlopdiagramokon a hibaszávok az átlagtól való eltéréseket, standard error (SE) jelölik. A * ($p < 0,05$) és ** ($p < 0,005$) jelölik, ha a kontrolltól való eltérések szignifikánsak voltak (*Student t-teszt*). Mércse: 1 cm.



20. ábra: RLCK VI_A2 LS allélt kifejező *rlck vi_a2*-es mutáns vonalak hipokotil hosszának mérése. A növényeket 5 napig állandó 40 μ E intenzitású vörös fényben, 0,5% szaharóz tartalmú ½ MS táptalajon neveltük. Az oszlopdiagramokon a hibaszávok az átlagtól való eltéréseket, standard error (SE) jelölik. A * ($p < 0,05$) és ** ($p < 0,005$) jelölik, ha az eltérések szignifikánsak voltak (*Student t-teszt*). Mércse: 1 cm.



21. ábra: RLCK VI_A2 RR allélt kifejező *rlck vi_a2*-es mutáns vonalak hipokotil hosszának mérése. A növényeket 5 napig állandó 40 μ E intenzitású vörös fényben, 0,5% szaharóz tartalmú $\frac{1}{2}$ MS táptalajon neveltük. Az oszlopdiagramokon a hibaszávok az átlagtól való eltéréseket, standard error (SE) jelölik. A * ($p < 0,05$) és ** ($p < 0,005$) jelölik, ha az eltérések szignifikánsak voltak (*Student t-teszt*). Mércse: 1 cm.

6. Eredmények megvitatása

Eukarióta sejtekben a Rho-típusú kis GTP-kötő fehérjék számos jelátviteli útvonalhoz képesek kapcsolódni, de elsősorban a citoskeleton (újra)szerveződésével kapcsolatos sejt folyamatokban vesznek részt (Schwartz 2004). Effektor fehérjék között fontos szerepet töltenek be protein kinázok az élesztő és állati sejtekben egyaránt. A Rho-típusú GTP-ázok (Rho, Rac, Cdc42) effektor kinázai különböző osztályokba sorolhatóak, mint például a p21-aktivált kinázok (PAK), a Rho-kinázok (ROK), az összetett származású kinázok (MLK), a miotoninhez köthető Cdc42-kötő kinázok (MRCK) vagy az új típusú fehérje kinázok (PKN) (Zhao és Manser 2005). A fent felsorolt kinázok mindegyike képes a GTP-t kötött Rho GTP-áz fehérjék egy vagy több típusához kapcsolódni annak ellenére, hogy szerkezeti alegységeikben lényegesen különböznek egymástól. A kináz alegységen kívül elhelyezkedő meghatározott szerkezeti elemek, aminosav motívumok jelenléte eredményezi a kinázok specifikus GTP-áz kötő tulajdonságát (Zhao és Manser 2005). Az állati Rho-típusú GTP-ázok és az asszociált kinázok nagy száma hangsúlyozza a Rho GTP-áz függő foszforilációs kaszkádok komplexitását és fontosságát ezekben az élőlényekben.

A Rho GTP-áz fehérje által közvetített kináz aktiváció mechanizmusa egy jól ismert folyamat az úgynevezett p21-aktivált vagy PAK kinázok esetében (Bokoch 2003; Rane és Minden 2014). A PAK kinázok képesek kölcsönhatásba lépni a GTP-t kötött Cdc42 vagy Rac GTP-áz fehérjékkel, amelynek hatására a kinázok *in vitro* aktivitása fokozódni fog (Manser és mtsai. 1994). Az emberi PAK1 fehérje kristályszerkezete alapján bebizonyosodott, hogy ezek a kinázok oldatban homodimerként vannak jelen. A kináz N-terminális inhibitor alegységének köszönhetően a kináz fehérje képes saját aktivitását gátolni (Parrini és mtsai. 2002). Ez a kináz inhibitor alegység átfed a Cdc42/Rac-kötő hellyel, az úgynevezett p21-kötő alegységgel (PBD: p21-binding domain) (Rane és Minden 2014). Ennek az alegységnek a központját a 16 aminosav hosszú CRIB (Cdc42/Rac interactive binding) motívum adja (Burbelo és mtsai. 1995). A PAK1 kináz konformációjában a GTP-t kötött GTP-áz fehérjék PBD-hez való kötődése jelentős változást eredményez. Ez a konformáció változás felszabadítja a katalitikus alegységet az autoinhibíciós gátlás alól (Rane és Minden 2014). A PAK kinázok már az evolúció korai szakaszában megjelenhettek, hiszen például a *Saccharomyces cerevisiae* fajban megtalálható, Cdc42 által szabályozott Ste20 és Cla4 fehérje kinázok is ennek a kináz csoportnak a tagjai (Zhao és Manser 2005). Azonban a növényi genomban nem sikerült azonosítani sem a PAK kinázokhoz hasonló domén felépítésű fehérjéket kódoló géneket,

amelyek a CRIB motívumot hordozzák, sem pedig egyéb az állatokra jellemző Rho-típusú GTP-áz fehérjével kölcsönható kinázokat kódoló gént. Ez a tény azért figyelemre méltó, mert az ilyen típusú kinázok központi szerepet töltenek be számos alapvető sejtes folyamat szabályozásában élesztők és állati sejtek esetében: ilyen folyamatok például a sejtnövekedés vagy a sejtosztódás.

A CRIB motívumhoz hasonló motívumok azonban számos növényi Rho (ROP) GTP-áz asszociált fehérjében jelen vannak, mint pl. a ROP GTP-áz aktivátor fehérje esetében, amely a GTP-áz fehérjék szabályozásáért felel (Wu és mtsai. 2000), vagy a ROP GTP-áz kölcsönható CRIB motívumot tartalmazó (RIC: ROP-interacting CRIB motif containing) scaffold fehérjék esetében is (Wu és mtsai. 2001). Feltételezhető, hogy a ROP GTP-ázok vagy közvetett módon, a CRIB motívumot tartalmazó RIC scaffold fehérjéken keresztül kapcsolódnak a kináz jelátvitelhez, vagy CRIB független módon növény-specifikus ROP GTP-áz kötő motívumokon keresztül. Az utóbbi elméletet támasztja alá a ROP GTP-áz kötésre képes növényi receptor-szerű citoplazmatikus kinázok felfedezése (Molendijk és mtsai. 2008; Dorjgotov és mtsai. 2009; Huesmann és mtsai. 2012; Reiner és mtsai. 2014). Ezek a kinázok a katalitikus régióikon kívül nem rendelkeznek sem p21-kötő PBD, sem autoinhibíciós, sem egyéb konzervált alegységgel (Jurca és mtsai. 2008). Ezért az állatok esetében már jól ismert Rho-asszociált kinázok (Zhao és Manser 2005) szabályozására vonatkozó modellek nem alkalmazhatóak növényi megfelelőik esetében.

Arabidopsis-ban egyetlen kivétellel (NRCK; Molendijk és mtsai. 2008) a ROP GTP-áz kötő kinázok az RLCK VI. jelű családba sorolhatóak (Fehér és Lajkó 2015). Ez a család növényekben két csoportra osztható (Jurca és mtsai. 2008), amelyek ROP GTP-áz kötő képességükben különböznek egymástól (Dorjgotov és mtsai. 2009). Szekvenciaanalízis alapján megállapítottuk, hogy az RLCK VI család A csoportjának minden tagjában jellemzően megjelenik több konzervált aminosav mintázat (6. ábra). Ezek közül a konzervált régiók közül hetet részletesen megvizsgáltunk.

Az egyes fehérje családokra jellemző globális funkciók mellett, a család egyes tagjaiban megjelenhetnek specifikus funkciók is az evolúció során. Erre utalnak a fehérjék szerkezetének specifitása meghatározó pozícióiban (SDP) konzerválódott jellegzetes aminosavak (Chakraborty és Chakrabarti 2015; 10. ábra). Míg a fehérje család konzervált aminosavainak elmutáltatásával funkcióképtelen fehérjék jönnek létre, addig az SDP-k mutációja csak bizonyos funkciókat érint, mint pl. a kinázok esetében a szubsztrát specifitása vagy az aktivitás szabályozása. Ezek az aminosavak általában a fehérje

felszínén találhatóak és befolyásolják a fehérje más molekulákkal való kölcsönhatását. Az SDP-k azonosítása elengedhetetlen a specifikus fehérje funkciók jellemzéséhez illetve azok manipulálásához. Ezért kifejlesztettek néhány *in silico* SDP detektálásra alkalmas módszert (Chagoyen és mtsai. 2016). Feltételezhető, hogy az *Arabidopsis* RLCK VI kináz család két csoportja közötti jellegzetes aminosav eltérések is SDP-ként funkcionálnak és összhangban vannak a kinázok eltérő ROP GTP-áz kötő képességével illetve szabályozásával. Ezt a feltevést alátámasztandó a JDet Szoftver (Muth és mtsai. 2012) segítségével ellenőriztük, hogy az általunk kiválasztott motívumok egybeesnek-e potenciális SDP régiókkal (10. ábra). Az analízis megerősítette a feltételezésünket. Ezen kívül kísérletesen is sikerült bebizonyítanunk, hogy az SDP-k funkcionális jelentőségével összhangban, a motívumok többsége szerepet játszik a ROP GTP-áz kötés folyamatában, valamint a kináz aktivitás szabályozásában (11., 14., 17. ábra) is. Az RLCK VI_A2 kináz esetében a motívumokban előidézett helyspecifikus mutációk egy kivétellel (YA) megváltoztatták a vizsgált kináz ROP GTP-áz kötő képességét és a kináz *in vitro* aktivitásának a szabályozását. Hasonló eredményre vezettek a három mutáns RLCK VI_A3 kinázzal végzett kísérletek.

Minden általunk vizsgált aminosav motívum a kináz alegységen belül helyezkedik el. Az RLCK VI_A2 kináz 3D szerkezeti modellje jól szemlélteti, hogy az általunk vizsgált motívumok, egy kivétellel, közös felszín képeznek (13. ábra). A kivételt éppen az a motívum jelenti (YA), amelyik a ROP GTP-áz kötésben nem vesz részt. Ezért feltételezhető, hogy ez a mutációk által kijelölt közös felület a GTP-kötött GTP-áz fehérjék dokkolásához szükséges. Ez a felszín a kinázok ATP- és szubsztrát kötésre szolgáló régiója felett helyezkedik el (13. ábra). Feltételezhető, hogy a ROP GTP-áz fehérje kötődése közvetlenül befolyásolhatja a katalitikus alegység konformációjának kialakulását, ezzel lehetővé téve a szubsztrát fehérjék kötődését illetve foszforilálódását.

A fehérjék egymással kölcsönható felületei argininben gazdagok, mert ennek az aminosavnak az oldalláncai könnyen alakítanak ki intermolekuláris kapcsolatokat (Crowley és Golovin 2005). Az RLCK VI_A kinázok esetében pl. az aktivációs hurokban található erősen konzervált HRD motívum előtt két arginin, az R₁₈₉ és az R₁₉₀ helyezkedik el (a számozás az 6. ábrán jelölt RLCK VI_A2 szekvencia alapján történt). Úgy tűnik, ezek az aminosav maradványok felelnek azért, hogy a kinázok aktivitása egy ROP GTP-áz indukálható folyamat legyen, hiszen ha ezeket az aminosavakat kicseréltük olyanokra, amelyek a konstitutívan aktív B típusú kinázokra jellemzőek, azt tapasztaltuk hogy az RLCK VI_A2 és A3 kinázok aktivitása ROP GTP-áz függetlenné változott (11., 12. ábra).

Ezeknek az aminosavaknak tehát az inaktív konformáció fenntartásában lehet szerepük, amely konformáció a ROP GTP-ázok kötődésével változik meg.

AtGAP1	I G W P T N V R H V A H V T
AtGAP2	I G W P T N V R H I T H V T
AtGAP3	I G W P T E V K H V S H V T
AtGAP4	I S R P T N I S H V A H V T
AtGAP5	I G G P T N I R H V A H V T
AtGAP6	I S R P T N I S H V A H V T
AtRIC1	I G F P T D V K H V A H I G
AtRIC2	I G F P T D V K H L S H I G
AtRIC3	I G F P T D V K H V A H I G
AtRIC4	I G V P T N V K H V S H I G
AtRIC5	I G V P T D V K H V A H I G
AtRIC6	I G N P T D V K H V A H I G
AtRIC7	I G N P T D V K H V A H I G
AtRIC8	I G T P T D V K H V A H I G
AtRIC9	I G Y P T D V R H V S H I G
AtRIC10	I G F P T D V K H V A H I G
AtRIC11	I G H P T E V K H V A H I G
AtRLCK VI_A1	L T E L G I I S H V S H P N
AtRLCK VI_A2	L M E I G T I G H V S H P N
AtRLCK VI_A3	L S E L G I I A H V A H P N
AtRLCK VI_A4	L S E L G I I A H V A H P N
AtRLCK VI_A5	L S E M G I M A H V A H P N
AtRLCK VI_A6	L S E L G I I A H V A H P N
AtRLCK VI_A7	L S E L G I I V H V A H P N
HsPAK1	I S I P S D F E H T I H V G
ScSTE20	I S T P Y N A K H I H V G
CRIB consensus	I S X P K K F X H Q Q H V G

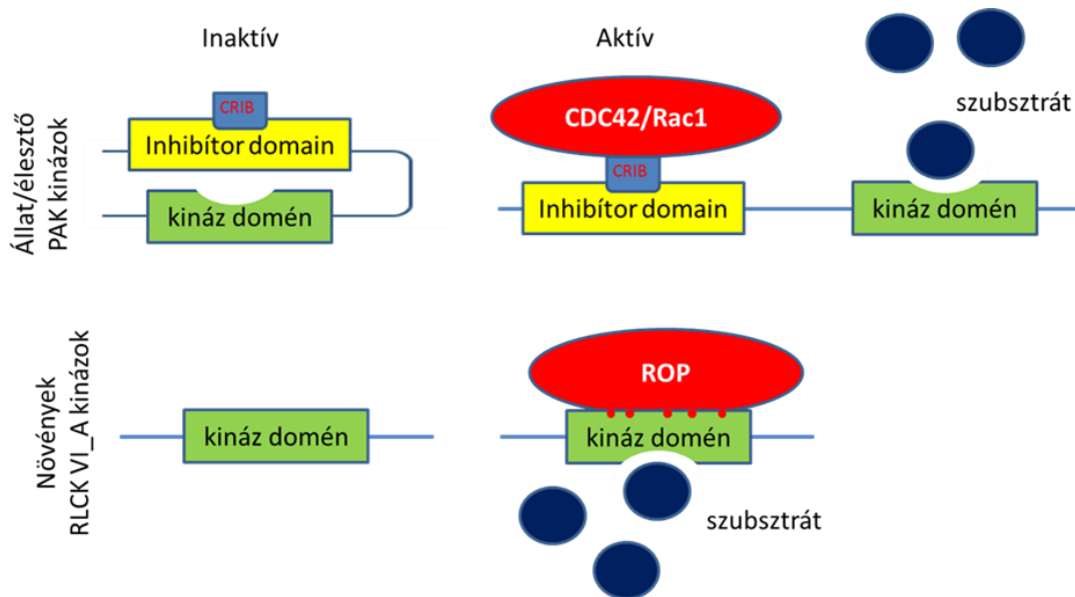
22. ábra: Az állati, élesztő és növényi Cdc42/Rac1-interaktív kötő (CRIB) motívumok valamint az RLCK VI_A kinázok HV-LS ROP GTP-áz kötő motívumainak összehasonlítása. AtGAP: *Arabidopsis thaliana* GTP-áz gyorsító fehérje; AtRIC: *Arabidopsis thaliana* ROP interaktív CRIB motívumot tartalmazó fehérje; AtRLCK VI_A, *Arabidopsis thaliana* receptor-szerű citoplazmatikus kinázok VI-os családjának A csoportja; HsPAK1: *Homo sapiens* P21-aktivált kináz 1; ScSte20: *Saccharomyces cerevisiae* 'Sterile 20' kináz fehérje. A CRIB konszenzus szekvencia élesztő és állati fehérje szekvenciákon alapszik (Burbelo és mtsai. 1995).

A ROP GTP-áz kötésre alkalmas RLCK VI_A kinázok másik erősen konzervált régiója az általunk szintén vizsgált HV és LS motívumokat hordozza (6. ábra). Ez a rövid aminosav szekvencia hasonlít az állati és növényi Rho-típusú GTP-áz kötő fehérjék CRIB motívumára (22. ábra). Ennek a régióknak az elmutáltatása megakadályozta, hogy a kináz kölcsönhasson a ROP GTP-áz fehérjével megerősítve, hogy ez a régió a CRIB motívumhoz hasonlóan egy funkcionális ROP GTP-áz kötő motívum lehet (11., 12. ábra). Míg a HV mutáció estében a kináz szubsztrát-foszforilációs aktivitása megszűnt, addig az LS motívum mutációja erős ROP GTP-áz független kináz aktivitást eredményezett (11.,

12. ábra). Ez a CRIB-szerű HV-LS motívum szintén az aktivációs hurok közelében helyezkedik el a kinázok 3D modelljén, és feltételezhetően szintén szerepet játszik a ROP GTP-áz kötés mellett a kinázok ROP GTP-áz függő aktiválásában is (13. ábra).

Domén kicserélési kísérlettel bizonyítottuk, hogy az általunk vizsgált motívumok nem elegendőek a ROP GTP-ázokkal való kölcsönhatás kialakulásához (14. ábra). Ez az eredmény összhangban van korábbi megfigyelésünkkel, miszerint az RLCK VI_A kinázok kináz doménjén kívül elhelyezkedő, N- illetve C-terminális végek csonkolása szintén megakadályozta a ROP GTP-áz kötetést (Molendijk és mtsai. 2008; Dorjgotov és mtsai. 2009). Feltételezhető, hogy a fehérje szekvencia egésze hozzájárul a kináz megfelelő konformációjának kialakulásához, amely a kináz felszínén, a ROP GTP-áz kötő motívum helyes pozícionálásáért felel. A ROP GTP-áz függő kináz aktiváció növény-specifikus mechanizmusára a GTP – ROP – RLCK VI_A komplex kristályszerkezeti modelljének meghatározása adhatna végső választ.

Az RLCK VI_A típusú kinázok, az egysejtű algák (*Chlamydomonas*) kivételével az összes szárazföldi növényben jelen vannak (15. ábra). A növények az evolúció korai szakaszában elváltak az *Ophistokonta* (állatok és gombák) rendszertani csoportjától, és az evolúció során a növények és állatok egymástól független módon váltak többsejtű szervezetekké. Ez tükröződik a Rho-típusú GTP-áz fehérjék független evolúciójában, ami szembeötlő különbségeket eredményezett az ezekhez a fehérjékhez kapcsolódó jelátviteli kaszkádokban is (Brembu és mtsai. 2006). Az eukarióta Rho-típusú GTP-áz fehérjékben belül, a növényi ROP GTP-ázok elkülönülő strukturális csoportot alkotnak (Berken és Wittinghofer 2008). Szerkezeti adottságaik lehetővé teszik, hogy felismerjék és kölcsönhatásba lépjenek növény-specifikus szabályozó és effektor fehérjékkel (Berken és Wittinghofer 2008; Fricke és Berken 2009; Nagawa és mtsai. 2010; Schaefer és mtsai. 2011; Fehér és Lajkó 2015). A növényi kis GTP-áz mediált jelátvitel egyedi jellegére jó példaként szolgál a növény-specifikus RLCK VI_A kinázok aktivációjának az élesztő és állati p21-aktivált kinázokétól eltérő folyamata (23. ábra).



23. ábra: A Rho-típusú GTP-ázok aktivációjának molekuláris mechanizmusa növényi illetve nem-növényi sejtekben (Fehér Attila ábrája). Az RLCK VI_A kinázok ROP GTP-áz függő aktivációs mechanizmusa jelentősen eltér az állati illetve élesztő esetében leírtaktól. Ezekben az élőlényekben a RHO családba tartozó Cdc42/Rac1 GTP-ázok egy specifikus motívumon, az ún. CRIB motívumon keresztül kapcsolódnak a p21-aktivált (PAK) kinázokhoz. Ez a kapcsolódás olyan konformáció változást idéz elő, ami felszabadítja a kináz domént az autoinhibíciós domén gátló hatása alól. Növényekben nincsenek PAK-típusú kinázok, így az RLCK VI_A kinázokban nem egy jól meghatározott motívum, hanem a kináz doménnek a szubsztrát-kötő zsebbel ellentétes felszíne felel a ROP GTP-áz kötéséért és így az aktív konformáció kialakulásáért.

Specifikus szerkezeti és szignalizációs tulajdonságaik ellenére a növényi ROP GTP-áz fehérjék élesztő és állati megfelelőikhez hasonló funkciókat látnak el a citoszkeleton szerveződését befolyásoló folyamatok szabályozásában (Craddock és mtsai. 2012). Bár az RLCK VI_A kinázok funkciójáról jelenlegi ismereteink még meglehetősen szűkösek, sikerült bizonyítanunk, hogy ezek közül a kinázok közül néhány fontos szerepet játszik a ROP GTP-áz függő szabályozási folyamatokban (Fehér és Lajkó 2015). Az árpa RBK1 (ROP-binding kinase1) kinázzról kimutatták, hogy a kortikális mikrotubulus hálózat megbontása révén, elősegítette a patogén gombák bejutását a gazdasejtekbe (Huesmann és mtsai. 2012), ezeket a folyamatokat pedig az árpa Rac/Rop GTP-áz fehérjék szabályozzák (Schultheiss és mtsai. 2003; Hoefle és mtsai. 2011; Scheler és mtsai. 2016). Az *Arabidopsis* homológ, RLCK VI_A3 kinázzról kimutatták, hogy szerepet játszik a kórokozókra való érzékenység folyamatának, valamint a trichóma elágazódás folyamatának szabályozásában (Reiner és mtsai. 2014). Az RLCK VI_A kinázok közül néhány esetében erős pollenspecifikus kifejeződés figyelhető meg (Jurca és mtsai. 2008).

A növényi ROP GTP-ázok által szabályozott folyamatok közül a pollencsövek poláris növekedése az egyik legjobban tanulmányozott folyamat (Guan és mtsai. 2013).

A ROP1 CA GTP-áz túltermeltetése a pollencsövek polaritásának elvesztését és a pollencső csúcsainak kiszélesedését okozza (Gu és mtsai. 2005). Ezt a kiszélesedő fenotípust nem befolyásolták a ROP1 CA GTP-áz fehérjével együttesen kifejeztetett RLCK VI_A3 kinázok sem. Továbbá a konstitutívan aktív RLCK VI_A3 kinázok túltermeltetése sem változtatott a pollencsövek csúcsánál mért átmérő értékeken. Megfigyeléseink arra engednek következtetni, hogy az RLCK VI_A3 kináz funkciója nem feltétlenül szükséges a pollencső polaritásának kialakulásához, illetve a kináz aktivitása nem befolyásoló tényező ezekben a szabályozási folyamatokban.

Azonban az RLCK VI_A3 kináz variánsok egyedüli túltermeltetése a pollencsövek nagymértékű lerövidülését eredményezte. Tehát megállapítható, hogy ez a pollencsőben termelődő kináz negatívan szabályozza a pollencsövek növekedését. A növekedésgátló hatás pedig csak kismértékben függ a kinázok ROP GTP-áz kötő képességtől. A ROP GTP-áz kötésre képtelen konstitutívan aktív kináz mutánsok nem voltak olyan erős hatással a pollencsövek növekedésére, mint ahogy azt a vad típus esetében tapasztaltuk. Ennek egyik lehetséges magyarázata, hogy a ROP GTP-áz kötés hiányában a sejten belüli lokalizációjuk megváltozik.

Korábban a HvRBK1 (az AtRLCK VI_A3 árpa homológja) kinázzról kimutatták, hogy kölcsönhatásba lép az SCF (SKP1-cullin 1-F-box) -E3 ubiquitin ligáz komplex HvSKP1-szerű alegységével (Reiner és mtsai. 2015). Ez a kölcsönhatás pedig negatívan szabályozta a HvRacB (árpa ROP GTP-áz) fehérje felhalmozódását. Ezért megállapíthatjuk, hogy a HvRacB és a HvRBK1 fehérjék olyan visszacsatolási szabályzás alatt állnak, ahol a HvRacB aktiválja a kinázt, az aktív kináz pedig előmozdítja a HvRacB fehérje proteosómális degradációját. Feltételezhetjük hasonló szabályozási folyamatok létezését *Arabidopsis* pollencsövek esetében is. Az általunk megfigyelt rövid pollencső fenotípust tehát a vad típusú kináz túltermeltetésének hatására csökkent GTP-kötött ROP1 GTP-áz fehérje szint is eredményezheti. A konstitutívan aktív LS és RR kinázok a ROP1 GTP-áz fehérjével való kapcsolódás hiányában valószínűleg hibásan lokalizálódnak és kevésbé hatékonyak szabályozási folyamataikban. Ezt az elméletet támasztja alá, hogy a konstitutívan aktív ROP GTP-áz fehérjék a kinázokat a plazmamembrán belső felszínéhez csoportosítják (Huesmann és mtsai. 2012; Reiner és mtsai. 2014). Nehéz magyarázatot találni arra, hogy miért volt negatív hatása a pollencső növekedésre a HV kináz mutánsnak, hiszen nem kötődik a ROP1 GTP-áz fehérjéhez és *in vitro* aktivitása sincs. Lehetséges

magyarázatként szolgálhat, hogy az RLCK VI_A3 kináz kölcsönhatásba lép egy olyan ismeretlen fehérjével, amely szükséges a pollencső növekedésének folyamatához. A túltermelt kináz mutánsok ezt az ismeretlen fehérjét a vad típustól eltérő módon titrálhatják ki funkcionális kölcsönhatásaiból, ezzel előidézve a kináz aktivitástól független pollencső növekedési fenotípust. A ROP GTP-áz kötődése erősítheti ennek az ismeretlen fehérjének a kinázhoz való kapcsolódását, ami szintén magyarázhatja a ROP GTP-áz kötésre képtelen mutánsok gyengébb fenotípusát.

Az *rlck vi_a2* kináz mutáns növényekkel végzett komplementációs kísérletek alátámasztják a fenti megfontolásokat. A mutáns csíranövények csökkent hipokotil megnyúlási fenotípusát mind a vad típusú, mind a ROP GTP-áz kötésre képtelen mutáns kináz formák képesek voltak komplementálni (18., 19., 20., 21. ábra).

Az *in planta* kísérleti eredmények inkább a kinázok ROP GTP-áz független biológiai funkciójára engednek következtetni. *In vitro* kináz esszé vizsgálataink alapján egy bazális, ROP GTP-áz független RLCK VI_A kináz aktivitást figyelhettünk meg, amely folyamat GTP-kötött ROP GTP-áz jelenlétében fokozódott (Dorjgotov és mtsai. 2009; Huesmann és mtsai. 2012; Reiner és mtsai. 2014; 11., 12. ábra). Feltételezhetjük, hogy a kinázok aktivitását a ROP GTP-áz kötődés csak modulálja, de nem alapvetően szükséges ahhoz. Az sem zárható ki, hogy az RLCK VI_A kinázok ROP GTP-áz függő és független funkciókkal egyaránt rendelkeznek. Továbbá, a kináz aktivitással nem (vagy csak alig) rendelkező HV mutáns esetében kapott eredmények arra utalnak, hogy a kináz foszforilációs aktivitása sem feltétlenül szükséges biológiai funkciójához. Kinázok gyakran töltenek be aktivitásuktól független funkciókat is fehérje komplexek összetartásán/pozicionálásán keresztül (szkaffold fehérje funkció; pl. Rauch és mtsai. 2011). További partner fehérjék illetve szubsztrát fehérjék azonosítása nagy előrelépést jelentene az RLCK VI_A kinázok szignalizációs útvonalaiban betöltött ROP GTP-áz függő illetve független szerepének meghatározásában.

7. Összefoglalás

A Rho GTP-ázok a kis molekulatömegű GTP-kötő Ras fehérje szupercsalád tagjai. A RHO GTP-ázok családja több alcsaládot tartalmaz, élesztők és állatok esetében a RHO GTP-ázok három alcsaládba, Rho, Rac és Cdc42, sorolhatóak, míg növényekben egyetlen specifikus család, a „Rho of plants” (ROP) alakult ki. Ezek a fehérjék molekuláris kapcsolókként működnek számos celluláris folyamatban, hiszen GTP-kötött formában jelátviteli utakat aktiválnak effektor fehérjéken keresztül, míg GDP-kötött formában ez az aktivitásuk megszűnik. A Rho család tagjai specifikusan a sejtvezérlés dinamikusan változóival kapcsolatos celluláris folyamatokban (sejtmozgás, sejtosztódás, sejtalkalakulások, intracelluláris transzport) vesznek részt. Ezen kívül szerepük van a plazmamembrán NADPH-oxidáz enzim aktiválásában illetve génextpressziós változások elindításában MAP-kináz kaszkádok aktiválásán keresztül. Sokrétű funkciójuk megköveteli, hogy GTP/GDP-kötött állapotuk illetve fehérje-fehérje kölcsönhatásaik szoros szabályozás alatt álljanak. Ennek megfelelően a Rho fehérjék GTP-áz ciklusát, és így jelátviteli aktivitását, számos szabályozó (regulátor) fehérje befolyásolja. Növények esetében három fő szabályozó fehérjét mindenképp fontos megemlítenünk, amelyek a ROP GTP-ázok aktív és inaktív állapotát befolyásolják. A guanin nukleotid kicserélő faktor (GEF) felelős a GDP molekulák GTP molekulákra való lecserélésében, ezzel aktiválva a GTP-áz fehérjét. A GTP-áz gyorsító fehérje (GAP) a GTP molekulák hidrolízisét segíti elő, amely az inaktív állapot kialakulásához szükséges, míg a guanin nukleotid disszociációs inhibitor fehérje (GDI) az inaktív állapot stabilizálásáért felel. A szabályozó fehérjéken keresztül érkező jelek az aktív Rho GTP-ázokról változatos jelátviteli (effektor) fehérjékre kerülnek. Állatok és élesztők esetében ezek az effektor kinázok, az ún. P21-aktivált vagy PAK kinázok, rendelkeznek egy jellegzetes RHO GTP-áz kötő, ún. CRIB motívummal. Ezek a kinázok mind az élesztőben, mind az állatokban rendkívül fontos RHO GTP-áz effektorok, melyet szerteágazó funkcióik jeleznek. Az ilyen motívumot tartalmazó kinázok génjei az ismert növényi genomokból azonban hiányoznak, illetve a ROP GTP-ázokhoz kapcsolódó jelátviteli hálózatokról is hiányosak ismereteink. Korábban laboratóriumunkban mutatták ki, hogy az RLCK VI_A (receptor-like cytoplasmic kinases class VI_A) csoportba tartozó növény-specifikus kinázok potenciális ROP GTP-áz effektorok. Kutatásaink során, az RLCK VI_A osztályhoz tartozó RLCK VI_A2 illetve RLCK VI_A3 kináz szerepét vizsgáljuk. Azt gyanítjuk, hogy ezek a fehérjék mint potenciális ROP GTP-áz effektor kinázok, szerepet játszhatnak a polaritás kialakulásában is. Az irányított sejtmegegyezés (pl.

levélszőrök, trichómák) és csúcsi növekedés (pl. pollencső) két alapvető folyamat, melyek nélkülözhetetlenek a növények poláris sejt típusainak morfogeneziséhez.

Kutatásunk célkitűzéseinek megfogalmazása során kérdéseinket korábbi eredményeinkre alapozva fogalmaztuk meg, amelyben kimutattuk, hogy annak ellenére, hogy a növényi genomokból hiányoznak az állatok és élesztők esetében a jól ismert CRIB motívumot tartalmazó PAK kinázok, a növények rendelkeznek viszont olyan receptor-szerű citoplazmatikus kinázokkal, melyek potenciális ROP GTP-áz effektorok és aktivitásuk függ a GTP-kötött ROP GTP-ázok jelenlététől.

Kutatásaink során az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

1. Az *Arabidopsis* receptorszerű citoplazmatikus kinázok (VI. alcsalád A csoport) milyen aminosav motívumoknak köszönhetően képesek kapcsolódni a ROP GTP-ázokhoz?
2. Mi a szerepe az azonosított aminosav motívumoknak a kinázok aktiválásában?
3. Mennyire elterjedtek ezek a kináz motívumok a növényvilágban?
4. Mi az azonosított aminosavak mutációjának hatása a kinázok *in planta* funkciójára?

Eredményeink összefoglalása:

1. Az RLCK_VI A és B kináz csoportokra jellemző szekvenciális különbségek alapján megvizsgáltuk a két csoportot, és az RLCK_VI_A csoport tagjaiban azonosítottunk néhány olyan aminosav motívumot, amelyek nem csak a ROP GTP-áz kötésért, hanem a ROP GTP-áz függő RLCK_VI_A kináz aktivációért is felelősek.
2. Megállapítottuk az RLCK_VI_A2 kinázban azonosított szekvencia motívumok ROP GTP-áz kötésben játszott szerepét.
3. Bimolekuláris Fluoreszcencia Komplementációt (BiFC) alkalmazva igazoltuk korábbi *in vitro* és élesztő két-hibrid kísérletek során kapott eredményeinket. Ezek a kísérletek megerősítették, hogy az általunk vizsgált motívumok *in vivo* is szükségesek a ROP GTP-ázokhoz való kapcsolódáshoz.
4. A ROP GTP-ázok által aktivált RLCK kinázok a szárazföldi növényeknél jelentek meg az evolúció során, és ez a növény-specifikus kináz aktivációs mechanizmus további kísérletek kiindulási pontja lehet a Rho típusú GTP-áz közvetített szignalizáció feltérképezéséhez.

5. Megállapítottuk, hogy az RLCK VI_A3 kináz negatívan befolyásolja a pollencső növekedést, de ebben a ROP GTP-ázokkal való kapcsolatuknak úgy tűnik, hogy nincs szerepe.
6. Továbbá *in planta* kísérleti eredményeink is inkább a kinázok ROP GTP-áz független biológiai funkciójára engednek következtetni, hiszen a vad típusú A2-es kinázhoz hasonlóan minden mutáns kináz változat helyreállította az RLCK VI_A2 kináz hiányában megfigyelt fenotípusos elváltozásokat.

8. Summary

The Rho-type GTPases have central roles in cellular processes associated with cytoskeletal dynamics (e.g. cell movement, cell division, cell shape, and cell polarity). These proteins operate as molecular switches: they activate signal transduction pathways when they are in GTP-bound conformation, but their signalling activity ceases when they are GDP-bound. If the Rho GTPase is in the GTP-bound form, it can further activate a diverse set of downstream signalling effector proteins. There are some upstream regulator proteins which regulate the activity of ROPs. One of these proteins are the guanine nucleotide exchange factor or GEF proteins which catalyse the GDP to GTP exchange activating ROPs. In contrast, the GAPs (GTPase accelerator proteins) inactivate ROPs via the promotion of GTP hydrolysis, while the GDIs (guanine nucleotide dissociation inhibitors) stabilize the inactive state of ROPs.

Plants have a specific group of Rho-type GTPases, the „Rho of plants” (ROP) family. Our knowledge about the signalling pathways associated with ROPs is yet incomplete. ROPs differ from other Rho-type GTPases in the regions which are responsible for effector binding, suggesting that ROP GTPases have specific effectors. Indeed, plants lack the Rho GTPase-activated PAK kinases, which are very important mediators of Rho GTPase signalling in yeast as well as in animals. Therefore our question was: are there any ROP GTPase-activated kinases, which may have PAK-like functions in plants? Due to a yeast two-hybrid screening approach two ROP-interacting kinases could be identified. These kinases interacted with the GTP- but not with the GDP-bound ROP GTPase form what is typical for ROP GTPase effectors. Furthermore, the *in vitro* activity of these kinases was dependent on the presence of GTP-bound ROP GTPase. These ROP GTPase-activated kinases belong to the subfamily VI of receptor-like cytoplasmic kinases (RLCKs) of *Arabidopsis*. They have a receptor kinase-like catalytic domain, but they don't have extracellular or transmembrane regions and that's why they can be found in the cytoplasm. Based on their primary structure, the 14 *Arabidopsis* RLCK VI kinases can be classified into two groups (A and B). Only the members of group A have ROP GTPase-binding ability, but it was not observed in the case of group B kinases, their activity is ROP GTPase independent.

Based on the results of our laboratory, we have been looking for answers to the following questions during my phd work:

1. What kind of amino acid motifs have the *Arabidopsis* receptor-like cytoplasmic kinases (subgroup VI class A) that can bind to ROP GTPases?
2. What is the role of the identified amino acid motifs in the activation of kinases?
3. How common are these kinase motifs in plants?
4. What is the effect of mutation of identified amino acids on the *in planta* function of kinases?

Summary of our results:

1. Based on the sequence differences between the ROP GTPase-binding group A and the ROP GTPase non-binding group B kinases we identified several amino acid motifs that are required not only for ROP GTPase-binding but for ROP GTPase-dependent RLCK VI_A activation.
2. We verified the *in vitro* and yeast two-hybrid results in pollen tubes using a BiFC assay. These assays support the role of the RLCK VI_A kinases in pollen tube growth and polarity what may have ROP GTPase dependent and independent aspects.
3. The recruitment of the RLCK kinases by the Rop GTPase proteins during the evolution of Embryophyta and the plant-specific kinase-activation mechanism are further examples of the unique nature of Rho-type GTPase mediated signalling in plants.
4. RLCK VI_A3 kinase negatively affects pollen tube growth but the ROP GTPase binding ability does not affect this function.
5. Furthermore, our *in planta* experimental results suggest a ROP GTPase independent biological function of these kinases, as all mutant kinase variants, similar to wild type A2 kinase, restored phenotypic changes observed in the absence of RLCK VI_A2 kinase.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Fehér Attilának, hogy lehetővé tette számomra, hogy csoportjában dolgozhassak és elkészíthessem PhD dolgozatomat, valamint köszönettel tartozom azért a rengeteg szakmai segítségért, tanácsért, biztatásért és türelemért is, amit az évek során kaptam tőle.

Köszönöm Dr. Valkai Ildikónak a rengeteg tanítást és fáradtságos közös munkát, valamint segítségét, amit a PhD dolgozatom elkészítése során nyújtott.

Köszönettel tartozom csoportom, a Funkcionális Sejtbiológia Csoport valamennyi munkatársának és asszisztensének, áldozatos segítségükért és munkájukért, amely nélkül nem jöhetett volna létre ez a dolgozat. Szeretném külön kiemelni Dr. Domoki Mónika, Ménesi Dalma és Nagy Róza nevét.

Külön köszönöm Dr. Ferenc Györgyinek és Dr. Ayaydin Ferhannak a közös munkát és rengeteg szakmai tanácsot, amellyel segítették munkám előrehaladását.

Munkám elkészülését a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal (NKFIH; #K101112), valamint a Magyar Kormány Gazdaságfejlesztési és Innovációs Operatív Programja (GINOP-2.3.2-15-2016-00001) tette lehetővé.

Köszönettel tartozom továbbá férjemnek, szüleimnek, testvéremnek támogatásukért, szeretetükért és kitartásukért.

Saját közlemények

A dolgozat alapjául szolgáló saját közlemények:

Lajkó DB, Valkai I, Domoki M, Ménesi D, Ferenc G, Ayaydin F, Fehér A, In silico identification and experimental validation of amino acid motifs required for the Rho-of-plants GTPase-mediated activation of receptor-like cytoplasmic kinases. Plant Cell Rep. 2018 Apr;37(4):627-639. doi: 10.1007/s00299-018-2256-y. Epub 2018 Jan 16. PMID: 29340786. IF₂₀₁₈: 2.989.

Fehér A, Lajkó DB, Signals fly when kinases meet Rho-of-plants (ROP) small G-proteins. Plant Sci. 2015 Aug;237:93-107. doi: 10.1016/j.plantsci.2015.05.007. Epub 2015 May 18. PMID: 26089155. IF₂₀₁₅: 3.362.

MTMT azonosító: **10050679**

Irodalomjegyzék

- Akamatsu A, Wong HL, Fujiwara M, Okuda J, Nishide K, Uno K, Imai K, Umemura K, Kawasaki T, Kawano Y, Shimamoto K, An OsCEBiP/OsCERK1-OsRacGEF1-OsRac1 module is an essential early component of chitin-induced rice immunity, *Cell Host Microbe* 13 (2013) 465–476.
- Becker JD, Takeda S, Borges F, Dolan L, Feijó JA, Transcriptional profiling of Arabidopsis root hairs and pollen defines an apical cell growth signature, *BMC Plant Biol.* 14 (2014) 197.
- Bellucci A, Fiorentini C, Zaltieri M, Missale C, Spano P, The in situ proximity ligation assay to probe protein-protein interactions in intact tissues, *Methods Mol. Biol.* 1174 (2014) 397–405.
- Berken A, ROPs in the spotlight of plant signal transduction, *Cell. Mol. Life Sci.* 63 (2006) 2446–2459.
- Berken A, Thomas C, Wittinghofer A, A new family of RhoGEFs activates the Rop molecular switch in plants, *Nature* 436 (2005) 1176–1180.
- Berken A, Wittinghofer A, Structure and function of Rho-type molecular switches in plants, *Plant Physiol. Biochem.* 46 (2008) 380–393.
- Betsuyaku S, Takahashi F, Kinoshita A, Miwa H, Shinozaki K, Fukuda H, Sawa S, Mitogen-activated protein kinase regulated by the CLAVATA receptors contributes to shoot apical meristem homeostasis, *Plant Cell Physiol.* 52 (2011) 14–29.
- Bibikova TN, Jacob T, Dahse I, Gilroy S, Localized changes in apoplastic and cytoplasmic pH are associated with root hair development in *Arabidopsis thaliana*, *Development* 125 (1998) 2925–2934.
- Bishop AL, Hall A, Rho GTPases and their effector proteins, *Biochem. J.* 348(2000) 241–255.
- Bloch D, Hazak O, Lavy M, Yalovsky S, A novel ROP/RAC GTPase effector integrates plant cell form and pattern formation. *Plant Signal Behav* (2008) 3: 41-3.
- Boisson-Dernier A, Lituiev DS, Nestorova A, Franck CM, Thirugnanarajah S, Grossniklaus U, ANXUR receptor-like kinases coordinate cell wall integrity with growth at the pollen tube tip via NADPH oxidases, *PLoS Biol.* 11 (2013) e1001719.
- Bokoch GM, Biology of the p21-activated kinases. *Annu Rev Biochem* 72 (2003) 743–781. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161742>

- Brembu T, Winge P, Bones AM, Yang Z, A RHOse by any other name: a comparative analysis of animal and plant Rho GTPases, *Cell Res.* 16 (2006) 435–445.
- Burbelo P, Drechsel D, Hall A, A conserved binding motif defines numerous candidate target proteins for both Cdc42 and Rac GTPases. *J Biol Chem* (1995) 270: 29071–29074.
- Cartwright HN, Humphries JA, Smith LG, PAN1: a receptor-like protein that promotes polarization of an asymmetric cell division in maize, *Science* 323 (2009) 649–651.
- Chagoyen M, García-Martín JA, Pazos F, Practical analysis of specificity-determining residues in protein families. *Brief Bioinform* 17 (2016) 255–261. <https://doi.org/10.1093/bib/bbv045>
- Chakraborty A, Chakrabarti S, A survey on prediction of specificity-determining sites in proteins. *Brief Bioinform* 16 (2015) 71–88. <https://doi.org/10.1093/bib/bbt092>
- Chang F, Gu Y, Ma H, Yang Z, AtPRK2 promotes ROP1 activation via RopGEFs in the control of polarized pollen tube growth, *Mol. Plant* 6 (2013) 1187–1201.
- Chen M, Liu H, Kong J, Yang Y, Zhang N, Li R, Yue J, Huang J, Li C, Cheung AY, Tao LZ, RopGEF7 regulates PLETHORA-dependent maintenance of the root stem cell niche in Arabidopsis, *Plant Cell* 23 (2011) 2880–2894.
- Cheung AY, Chen CYH, Tao LZ, Andreyeva T, Twell D, Wu HM, Regulation of pollen tube growth by Rac-like GTPases. *J Exp Bot* (2003) 54:73-81.
- Cheung AY, Wu HM, THESEUS 1, FERONIA and relatives: a family of cellwall-sensing receptor kinases? *Curr. Opin. Plant Biol.* 14 (2011) 632–641.
- Christensen TM, Vejlupkova Z, Sharma YK, Conserved subgroups and developmental regulation in the monocot rop gene family. *Plant Physiol* 133 (2003) 1791-1808.
- Christensen TM, Vejlupkova Z, Sharma YK, Arthur KM, Spatafora JW, Albright CA, Meeley RB, Duvick JP, Quatrano RS, Fowler JE, Conserved subgroups and developmental regulation in the monocot rop gene family, *Plant Physiol.* 133 (2003) 1791–1808.
- Clough SJ, Bent AF, Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *Plant J* (1998) 6:735-43.

- Coutu C, Brandle J, Brown D, Brown K, Miki B, Simmonds J, Hegedus DD, pORE: a modular binary vector series suited for both monocot and dicot plant transformation. *Transgenic Res.* (2007) 16(6):771-81.
- Craddock C, Lavagi I, Yang Z, New insights into Rho signaling from plant ROP/Rac GTPases. *Trends Cell Biol* (2012) 22: 492-501.
- Crowley PB, Golovin A, Cation- π interactions in protein-protein interfaces. *Proteins Struct Funct Bioinforma* 59 (2005) 231–239. <https://doi.org/10.1002/prot.20417>
- Dorjgotov D, Jurca ME, Fodor-Dunai C, Szucs A, Otvös K, Klement E, Bíró J, Fehér A, Plant Rho-type (Rop) GTPase-dependent activation of receptor-like cytoplasmic kinases in vitro, *FEBS Lett.* 583 (2009)1175–1182.
- Duan Q, Kita D, Johnson EA, Aggarwal M, Gates L, Wu HM, Cheung AY, Reactive oxygen species mediate pollen tube rupture to release sperm for fertilization in *Arabidopsis*, *Nat. Commun.* 5 (2014) 3129.
- Duan Q, Kita D, Li C, Cheung AY, Wu HM, FERONIA receptor-like kinase regulates RHO GTPase signaling of root hair development, *Proc. Natl. Acad.Sci. U. S. A.* 107 (2010) 17821–17826.
- Escobar-Restrepo JM, Huck N, Kessler S, Gagliardini V, Gheyselinck J, Yang WC, Grossniklaus U, The FERONIA receptor-like kinase mediates male-female interactions during pollen tube reception, *Science* 317 (2007) 656–660.
- Fehér A, Jurca ME, Fodor-Dunai C, Dorjgotov D, Regulation of ROP GTPase signalling at the gene expression level: a review, *Open Plant Sci. J.* 2 (2008)21–30.
- Fehér A, Lajkó DB, Signals fly when kinases meet Rho-ofplants (ROP) small G-proteins. *Plant Sci* 237 (2015) 93–107. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.05.007>
- Fíla J, Matros A, Radau S, Zahedi RP, Capková V, Mock HP, Honys D, Revealing phosphoproteins playing role in tobacco pollen activated in vitro, *Proteomics* 12 (2012) 3229–3250.
- Fodor-Dunai C, Fricke I, Potocký M, Dorjgotov D, Domoki M, Jurca ME, Otvös K, Zárský V, Berken A, Fehér A, The phosphomimetic mutation of an evolutionarily conserved serine residue affects the signaling properties of Rho of plants (ROPs), *Plant J.* 66 (2011) 669–679.

- Foreman J, Demidchik V, Bothwell JH, Mylona P, Miedema H, Torres MA, Linstead P, Costa S, Brownlee C, Jones JD, Davies JM, Dolan L, Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth, *Nature* 422 (2003) 442–446.
- Fricke I, Berken A, Molecular basis for the substrate specificity of plant guanine nucleotide exchange factors for ROP, *FEBS Lett.* 583 (2009) 75–80.
- Fu Y, Wu G, Yang Z, Rop GTPase-dependent dynamics of tip-localized F-actin controls tip growth in pollen tubes. *J Cell Biol* (2001) 152:1019–32.
- Fujiwara M, Hamada S, Hiratsuka M, Fukao Y, Kawasaki T, Shimamoto K, Proteome analysis of detergent-resistant membranes (DRMs) associated with OsRac1-mediated innate immunity in rice, *Plant Cell Physiol.* 50 (2009) 1191–1200.
- Gao Y, Zhang Y, Zhang D, Dai X, Estelle M, Zhao Y, Auxin binding protein 1 (ABP1) is not required for either auxin signaling or Arabidopsis development, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112 (2015)2275–2280.
- Gu Y, Fu Y, Dowd P, Li S, Vernoud V, Gilroy S, A Rho family GTPase controls actin dynamics and tip growth via two counteracting downstream pathways in pollen tubes. *J Cell Biol* (2005) 169:127–38.
- Gu Y, Li S, Lord EM, Yang Z, Members of a novel class of Arabidopsis Rho guanine nucleotide exchange factors control Rho GTPase-dependent polar growth, *Plant Cell* 18 (2006) 366–381.
- Guan Y, Guo J, Li H, Yang Z, Signaling in pollen tube growth: crosstalk, feedback, and missing links, *Mol. Plant* 6 (2013) 1053–1064.
- Gust AA, Willmann R, Desaki Y, Grabherr HM, Nürnberger T, Plant LysM proteins: modules mediating symbiosis and immunity, *Trends Plant Sci.* 17(2012) 495–502.
- Haruta M, Sabat G, Stecker K, Minkoff BB, Sussman MR, A peptide hormone and its receptor, *Science* 343 (2014) 408–411.
- Helling D, Possart A, Cottier S, Klahre U, Kost B, Pollen tube tip growth depends on plasma membrane polarization mediated by tobacco PLC3 activity and endocytic membrane recycling, *Plant Cell* 18 (2006) 3519–3534.

- Himschoot E, Beeckman T, Friml J, Vanneste S, Calcium is an organizer of cell polarity in plants, *Biochim. Biophys. Acta* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.02.017>
- Hoefle C, Huesmann C, Schultheiss H, Börnke F, Hensel G, Kumlehn J, Hückelhoven R, A barley ROP GTPase ACTIVATING PROTEIN associates with microtubules and regulates entry of the barley powdery mildew fungus into Leaf epidermal cells. *Plant Cell* (2011) 23: 2422–2439.
- Hofmann C, Shepelev M, Chernoff J, The genetics of PAK, *J. Cell Sci.* 117 (2004)4343–4354.
- Horváth GV, Pettkó-Szandtner A, Nikovics K, Bilgin M, Boulton M, Davies JW, Gutiérrez C, Dudits D, Prediction of functional regions of the maize streak virus replication-associated proteins by protein-protein interaction analysis. *Plant Molecular Biology* (1998) 38(5), 699–712. doi: 10.1023/A:1006076316887.
- Hsu SW, Wang CS, Lily Cdc42/Rac-interactive binding motif-containing protein, a Rop target, involves calcium influx and phosphoproteins during pollen germination and tube growth, *Plant Signal. Behav.* 5 (2010) 1460–1463.
- Huang GQ, Li E, Ge FR, Li S, Wang Q, Zhang CQ, Zhang Y, Arabidopsis RopGEF4 and RopGEF10 are important for FERONIA-mediated developmental but not environmental regulation of root hair growth, *New Phytol.* 200 (2013) 1089–1101.
- Huang JB, Liu H, Chen M, Li X, Wang M, Yang Y, Wang C, Huang J, Liu G, Liu Y, Xu J, Cheung AY, Tao LZ, ROP3 GTPase contributes to polar auxin transport and auxin responses and is important for embryogenesis and seedling growth in Arabidopsis, *Plant Cell* 26 (2014) 3501–3518.
- Huesmann C, Reiner T, Hoefle C, Preuss J, Jurca ME, Domoki M, Fehér A, Hückelhoven R, Barley ROP binding kinase1 is involved in microtubule organization and in basal penetration resistance to the barley powdery mildew fungus, *Plant Physiol.* 159 (2012) 311–320.
- Humphries JA, Vejlupkova Z, Luo A, Meeley RB, Sylvester AW, Fowler JE, Smith LG, ROP GTPases act with the receptor-like protein PAN1 to polarize asymmetric cell division in maize, *Plant Cell* 23 (2011) 2273–2284.
- Hung S, Yu C, Lin C, Hydrogen peroxide functions as a stress signal in plants, *Bot. Bull. Acad. Sin.* 46 (2005) 1–10.

- Hwang JU, Gu Y, Lee YJ, Yang Z, Oscillatory ROP GTPase activation leads the oscillatory polarized growth of pollen tubes, *Mol. Biol. Cell* 16 (2005) 5385–5399.
- Hwang J, Vernoud V, Szumlanski A, A tip-localized RhoGAP controls cellpolarity by globally inhibiting Rho GTPase at the cell apex, *Curr. Biol.* 18 (2008) 1907–1916.
- Ischebeck T, Stenzel I, Hempel F, Jin X, Mosblech A, Heilmann I, Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate influences Nt-Rac5-mediated cell expansion in pollen tubes of *Nicotiana tabacum*, *Plant J.* 65 (2011) 453–468.
- Jamin A, Yang Z, Interactions between calcium and ROP signaling regulate pollen tube tip growth, in: S. Luan (Ed.), *Coding and Decoding Calcium Signals in Plants*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, (2011), pp. 25–39.
- Jeon BW, Hwang JU, Hwang Y, Song WY, Fu Y, Gu Y, The Arabidopsis small G protein ROP2 is activated by light in guard cells and inhibits light-induced stomatal opening. *Plant Cell* (2008) 20:75-87.
- Johnston CA, Taylor JP, Gao Y, Kimple AJ, Grigston JC, Chen JG, Siderovski DP, Jones AM, Willard FS, GTPase acceleration as the rate-limiting step in Arabidopsis G protein-coupled sugar signaling, *Proc Natl Acad Sci* 104 (2007) 17317-22.
- Johnston CA, Temple BR, Chen JG, Gao Y, Moriyama EN, Jones AM, Siderovski DP, Willard FS, Comment on "A G protein coupled receptor is a plasma membrane receptor for the plant hormone abscisic acid", *Science* 318 (2007) 914; author reply 914.
- Jones AM, G-protein-coupled signaling in Arabidopsis, *Curr Opin Plant Biol* 5 (2002) 402-7.
- Jones AM, Assmann SM, Plants: the latest model system for G-protein research, *EMBO Rep* 5 (2004) 572-8.
- Jones MA, Raymond MJ, Yang Z, Smirnov N, NADPH oxidase-dependent reactive oxygen species formation required for root hair growth depends on ROP GTPase, *J. Exp. Bot.* 58 (2007) 1261–1270.
- Jurca ME, Bottka S, Fehér A, Characterization of a family of Arabidopsis receptor-like cytoplasmic kinases (RLCK class VI), *Plant Cell Rep.* 27 (2008) 739–748.
- Kanaoka MM, Torii KU, FERONIA as an upstream receptor kinase for polar cell growth in plants, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107 (2010) 17461–17462.

- Kaothien P, Ok SH, Shuai B, Wengier D, Cotter R, Kelley D, Kiriakopolos S, Muschietti J, McCormick S, Kinase partner protein interacts with the LePRK1 and LePRK2 receptor kinases and plays a role in polarized pollen tube growth, *Plant J.* 42 (2005) 492–503.
- Kawano Y, Chen L, Shimamoto K, The function of Rac small GTPase and associated proteins in rice innate immunity, *Rice* 3 (2010) 112–121.
- Kawano Y, Shimamoto K, Early signaling network in rice PRR-mediated and R-mediated immunity, *Curr. Opin. Plant Biol.* 16 (2013) 496–504.
- Ke D, Fang Q, Chen C, Zhu H, Chen T, Chang X, Yuan S, Kang H, Ma L, Hong Z, Zhang Z, Small GTPase ROP6 interacts with NFR5 and is involved in nodule formation in *Lotus japonicus*, *Plant Physiol.* 159 (2012) 131–143.
- Kessler SA, Lindner H, Jones DS, Grossniklaus U, Functional analysis of related CrRLK1L receptor-like kinases in pollen tube reception, *EMBO Rep.*(2014) 1–9.
- Kim SH, Oikawa T, Kyojuka J, Wong HL, Umemura K, Kishi-Kaboshi M, Takahashi A, Kawano Y, Kawasaki T, Shimamoto K, The bHLH Rac Immunity1 (RAI1) is activated by OsRac1 via OsMAPK3 and OsMAPK6 in rice immunity, *Plant Cell Physiol.* 53 (2012) 740–754.
- Klahre U, Becker C, Schmitt AC, Kost B, Nt-RhoGDI2 regulates Rac/Rop signaling and polar cell growth in tobacco pollen tubes. *Plant J* (2006) 46:1018-31.
- Kleinboelting N, Hup G, Kloetgen A, Viehoveer P, Weisshaar B, GABI-Kat Simple Search: new features of the Arabidopsis thaliana T-DNA mutant database. *Nucleic Acids Res.* (2012) 40(Database issue):D1211-5. doi: [10.1093/nar/gkr1047](https://doi.org/10.1093/nar/gkr1047).
- Koncz C, Martini N, Szabados L, Hroudá M, Bachmair A, Schell J, Specialized vectors for gene tagging and expression studies. *Plant Molecular Biology Manual* vol. B2, pp. (1994) 1-22.
- Kost B, Spatial control of Rho (Rac-Rop) signaling in tip-growing plant cells, *Trends Cell Biol.* 18 (2008) 119–127.
- Kost B, Lemichez E, Spielhofer P, Hong Y, Tolia K, Carpenter C, Chua NH, Rac homologues and compartmentalized phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate act in a common pathway to regulate polar pollen tube growth, *J. Cell Biol.* 145 (1999) 317–330.

- Kwon T, Kwon DY, Chun J, Kim JH, Kang SS, Akt protein kinase inhibits Rac1-GTP binding through phosphorylation at serine 71 of Rac1, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 423–428.
- Li S, Gu Y, Yan A, Lord E, Yang ZB, RIP1 (ROP Interactive Partner 1)/ICR1 marks pollen germination sites and may act in the ROP1 pathway in the control of polarized pollen growth. *Mol Plant* (2008) 1: 1021-35.
- Li Z, Kang J, Sui N, Liu D, ROP11 GTPase is a negative regulator of multiple ABA responses in Arabidopsis, *J. Integr. Plant Biol.* 54 (2012) 169–179.
- Li Z, Li Z, Gao X, Chinnusamy V, Bressan R, Wang ZX, Zhu JK, Wu JW, Liu D, ROP11 GTPase negatively regulates ABA signaling by protecting ABI1 phosphatase activity from inhibition by the ABA receptor RCAR1/PYL9 in Arabidopsis, *J. Integr. Plant Biol.* 54 (2012) 180–188.
- Li Z, Liu D, ROPGEF1 and ROPGEF4 are functional regulators of ROP11 GTPase in ABA-mediated stomatal closure in Arabidopsis, *FEBS Lett.* 586 (2012) 1253–1258.
- Li H, Shen J, Zheng ZL, Lin Y, Yang Z, The Rop GTPase switch controls multiple developmental processes in Arabidopsis, *Plant Physiol.* 126 (2001) 670–684.
- Li J, Tax FE, Receptor-like kinases: key regulators of plant development and defense, *J. Integr. Plant Biol.* 55 (2013) 1184–1187.
- Li S, Zhang Y, To grow or not to grow: FERONIA has her say, *Mol. Plant* 7 (2014) 1261–1263.
- Lieberherr D, Thao NP, Nakashima A, Umemura K, Kawasaki T, Shimamoto K, A sphingolipid elicitor-inducible mitogen-activated protein kinase is regulated by the small GTPase OsRac1 and heterotrimeric G-protein in rice, *Plant Physiol.* 138 (2005) 1644–1652.
- Lin W, Ma X, Shan L, He P, Big roles of small kinases: the complex functions of receptor-like cytoplasmic kinases in plant immunity and development, *J. Integr. Plant Biol.* 55 (2013) 1188–1197.
- 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, A ROP GTPase-dependent auxin signaling pathway regulates the subcellular distribution of PIN2 in Arabidopsis roots, *Curr. Biol.* 22 (2012) 1319–1325.

- Loirand G, Guilluy C, Pacaud P, Regulation of Rho proteins by phosphorylation in the cardiovascular system, *Trends Cardiovasc. Med.* 16 (2006)199–204.
- Löcke S, Fricke I, Mucha E, Humpert ML, Berken A, Interactions in the pollen-specific receptor-like kinases-containing signaling network, *Eur. J. Cell Biol.* 89 (2010) 917–923.
- Manser E, Leung T, Salihuddin H, Zhao ZS, Lim L, A brain serine/threonine protein kinase activated by Cdc42 and Rac1. *Nature* 367 (1994) 40–46. <https://doi.org/10.1038/367040a0>
- Miyawaki KN, Yang Z, Extracellular signals and receptor-like kinases regulating ROP GTPases in plants, *Front. Plant Sci.* 5 (2014) 449.
- Molendijk AJ, Bischoff F, Rajendrakumar CS, Friml J, Braun M, Gilroy S, *Arabidopsis thaliana* Rop GTPases are localized to tips of root hairs and control polar growth. *EMBO J* (2001) 20:2779-88.
- Molendijk AJ, Ruperti B, Singh MK, Dovzhenko A, Ditengou FA, Milia M, Westphal L, Rosahl S, Soellick TR, Uhrig J, Weingarten L, Huber M, Palme K, A cysteine-rich receptor-like kinase NCRK and a pathogen-induced protein kinase RBK1 are Rop GTPase interactors, *Plant J.*53 (2008) 909–923.
- Muth T, García-Martín JA, Rausell A, Juan D, Valencia A, Pazos F, JDet: Interactive calculation and visualization of function-related conservation patterns in multiple sequence alignments and structures. *Bioinformatics* 28 (2012) 584–586. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr688>
- Myers C, Romanowsky SM, Barron YD, Garg S, Azuse CL, Curran A, Davis RM, Hatton J, Harmon AC, Harper JF, Calcium-dependent protein kinases regulate polarized tipgrowth in pollen tubes, *Plant J.* 59 (2009) 528–539.
- Nagawa S, Xu T, Yang Z, RHO GTPase in plants: conservation and invention of regulators and effectors, *Small GTPases* 1 (2010) 78–88.
- Nakashima K, Yamaguchi-Shinozaki K, ABA signaling in stress–response and seed development, *Plant Cell Rep.* 32 (2013) 959–970.
- Nibau C, Tao L, Levasseur K, Wu HM, Cheung AY, The *Arabidopsis* small GTPase AtRAC7/ROP9 is a modulator of auxin and abscisic acid signalling, *J. Exp. Bot.* 64 (2013) 3425–3437.
- Oda Y, Fukuda H, Initiation of cell wall pattern by a Rho- and microtubule-driven symmetry breaking, *Science* 337 (2012) 1333–1336.

- Oda Y, Fukuda H, Emerging roles of small GTPases in secondary cell wall development, *Front. Plant Sci.* 5 (2014) 428.
- Okuda S, Higashiyama T, Pollen tube guidance by attractant molecules: LUREs signaling in sporophytic guidance, *Cell Struct. Funct.* 52 (2010) 45–52.
- Ono E, Wong HL, Kawasaki T, Hasegawa M, Kodama O, Shimamoto K, Essential role of the small GTPase Rac in disease resistance of rice, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98 (2001) 759–764.
- Parrini MC, Lei M, Harrison SC, Mayer BJ, Pak1 kinase homodimers are autoinhibited in trans and dissociated upon activation by Cdc42 and Rac1. *Mol Cell* 9 (2002) 73–83. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00428-2](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00428-2)
- Potocký M, Pejchar P, Gutkowska M, Jiménez-Quesada MJ, Potocká A, Alché Jde D, Kost B, Žárský V, NADPH oxidase activity in pollen tubes is affected by calcium ions, signaling phospholipids and Rac/Rop GTPases, *J. Plant Physiol.* 169(2012) 1654–1663.
- Qian P, Hou S, Guo G, Molecular mechanisms controlling pavement cellshape in Arabidopsis leaves, *Plant Cell Rep.* 28 (2009) 1147–1157.
- Qiu J, Jilk R, Marks MD, Szymanski DB, The Arabidopsis SPIKE1 gene is required for normal cell shape control and tissue development, *Plant Cell* 14 (2002) 101–118.
- Qin Y, Yang Z, Rapid tip growth: insights from pollen tubes, *Semin. Cell Dev. Biol.* 22 (2011) 816–824.
- Rademacher EH, Offringa R, Evolutionary adaptations of plant AGC kinases: from light signaling to cell polarity regulation, *Front. Plant Sci.* 3 (2012) 250.
- Rane CK, Minden A, P21 activated kinases: structure, regulation, and functions. *Small GTPases* 5 (2014) 37–41. <https://doi.org/10.4161/sgtp.28003>
- Rauch J, Volinsky N, Romano D, Kolch W, The secret life of kinases: functions beyond catalysis. *Cell Commun Signal.* (2011) 9(1):23. doi: [10.1186/1478-811X-9-23](https://doi.org/10.1186/1478-811X-9-23).
- Reiner T, Hoefle C, Hückelhoven R, A barley SKP1-like protein controls abundance of the susceptibility factor RACB and influences the interaction of barley with the barley powdery mildew fungus. *Mol Plant Pathol* (2015) 1–12.
- Reiner T, Hoefle C, Huesmann C, Ménesi D, Fehér A, Hückelhoven R, The Arabidopsis ROP-activated receptor-like cytoplasmic kinase RLCK VI A3 is

- involved in control of basal resistance to powdery mildew and trichome branching, *Plant Cell Rep.* 34 (2014) 457–468.
- Samajová O, Komis G, Samaj J, Emerging topics in the cell biology of mitogen-activated protein kinases, *Trends Plant Sci.* 18 (2013) 140–148.
 - Schaefer A, Miertzschke M, Berken A, Wittinghofer A, Dimeric plant RhoGAPs are regulated by its CRIB effector motif to stimulate a sequential GTP hydrolysis. *J Mol Biol* 411 (2011) 808–822. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.06.033>
 - Scheler B, Schnepf V, Galgenmüller C, Ranf S, Hückelhoven R, Barley disease susceptibility factor RACB acts in epidermal cell polarity and positioning of the nucleus. *J Exp Bot* (2016) 67: 3263-3275.
 - Scherer GFE, AUXIN-BINDING-PROTEIN1, the second auxin receptor: what is the significance of a two-receptor concept in plant signal transduction? *J. Exp. Bot.* 62 (2011) 3339–3357.
 - Schiller MR, Coupling receptor tyrosine kinases to Rho GTPases–GEFs what’s the link, *Cell. Signal.* 18 (2006) 1834–1843.
 - Schultheiss H, Dechert C, Kogel K H, Hückelhoven R, A small GTP-binding host protein is required for entry of powdery mildew fungus into epidermal cells of barley, *Plant Physiol.* 128 (2002) 1447–1454.
 - Schultheiss H, Dechert C, Kogel KH, Hückelhoven R, Functional analysis of barley RAC/ROP G-protein family members in susceptibility to the powdery mildew fungus, *Plant J.* 36 (2003) 589–601.
 - Schwartz M, Rho signalling at a glance. *J Cell Sci.* 117 (2004) 5457–5458. <https://doi.org/10.1242/jcs.01582>
 - Shiu SH, Bleecker AB, Plant receptor-like kinase gene family: diversity, function, and signaling, *Sci STKE* (2001) RE22.
 - Shiu SH, Bleecker AB, Receptor-like kinases from Arabidopsis form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. *Proc Natl Acad Sci* 98 (2001) 10763-8.
 - Shiu SH, Bleecker AB, Expansion of the receptor-like kinase/Pelle gene family and receptor-like proteins in Arabidopsis, *Plant Physiol.* 132 (2003) 530–543.
 - Tao LZ, Cheung AY, Nibau C, Wu HM, RAC GTPases in tobacco and Arabidopsis mediate auxin-induced formation of proteolytically active nuclear protein bodies that contain AUX/IAA proteins. *Plant Cell* (2005) 17:2369-83.

- Tao LZ, Cheung AY, Wu HM, Plant Rac-like GTPases are activated by auxin and mediate auxin-responsive gene expression. *Plant Cell* (2002) 14:2745-60.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ, CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* (1994) 22: 4673–4680.
- Trotochaud AE, Hao T, Wu G, Yang Z, Clark SE, The CLAVATA1 receptor-like kinase requires CLAVATA3 for its assembly into a signaling complex that includes KAPP and a Rho-related protein, *Plant Cell* 11 (1999) 393–406.
- Ullah H, Chen JG, Young JC, Im KH, Sussman MR, Jones AM, Modulation of cell proliferation by heterotrimeric G protein in Arabidopsis, *Science* 292 (2001) 2066-9.
- Urano D, Jones AM, Round up the usual suspects: a comment on nonexistent plant G protein-coupled receptors, *Plant Physiol.* 161 (2013) 1097–1102.
- Urano D, Jones JC, Wang H, Matthews M, Bradford W, Bennetzen JL, Jones AM, G Protein Activation without a GEF in the Plant Kingdom. *PLoS Genet* (2012) 8(6): e1002756. doi:10.1371/journal.pgen.1002756.
- Vojtek A, Cooper J, Rho family members: activators of MAP kinase cascades, *Cell* 82 (1995) 527–529.
- Wang H, Jiang L, Transient expression and analysis of fluorescent reporter proteins in plant pollen tubes. *Nat Protoc.* (2011) 6(4):419-26. doi: 10.1038/nprot.2011.309.
- Wang XQ, Ullah H, Jones AM, Assmann SM, G protein regulation of ion channels and abscisic acid signaling in Arabidopsis guard cells. *Science* 292 (2001) 2070-2.
- Wengier D, Valsecchi I, Cabanas ML, Tang WH, McCormick S, Muschietti J, The receptor kinases LePRK1 and LePRK2 associate in pollen and when expressed in yeast, but dissociate in the presence of style extract, *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2003) 6860–6865.
- Winge P, Brembu T, Bones AM, Cloning and characterization of Rac-like cDNAs from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* (1997) 35:483-95.
- Winge P, Brembu T, Kristensen R, Bones AM, Genetic structure and evolution of RAC-GTPases in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 156 (2000) 1959-71.
- Wise AA, Liu Z, Binns AN, Three methods for the introduction of foreign DNA into *Agrobacterium*. *Methods Mol Biol.* (2006) 343:43-53.

- Wolf S, Höfte H, Growth control: a saga of cell walls, ROS, and peptide receptors, *Plant Cell* 26 (2014) 1848–1856.
- Wu G, Gu Y, Li S, Yang Z, A genome-wide analysis of Arabidopsis Rop-interactive CRIB motif-containing proteins that act as Rop GTPase targets, *Plant Cell* 13 (2001) 2841–2856.
- Wu J, Kurten EL, Monshausen G, Hummel GM, Gilroy S, Baldwin IT, NaRALF, a peptide signal essential for the regulation of root hairtip apoplastic pH in *Nicotiana attenuata*, is required for root hair development and plant growth in native soils, *Plant J.* 52 (2007) 877–890.
- Wu G, Li H, Yang Z, *Arabidopsis* RopGAPs are a novel family of Rho GTPase-activating proteins that require the Cdc42/Racinteractive binding motif for Rop-specific GTPase stimulation. *Plant Physiol* 124 (2000) 1625–1636.
- Wu Y, Zhao S, Tian H, He Y, Xiong W, Guo L, Wu Y, CPK3-phosphorylated RhoGDI1 is essential in the development of Arabidopsis seedlings and leaf epidermal cells, *J. Exp. Bot.* (2013) 1–18.
- Xu T, Dai N, Chen J, Nagawa S, Cao M, Li H, Zhou Z, Chen X, De Rycke R, Rakusová H, Wang W, Jones AM, Friml J, Patterson SE, Bleecker AB, Yang Z, Cell surface ABP1-TMK auxin-sensing complex activates ROP GTPase signaling, *Science* 343 (2014) 1025–1028.
- Xu T, Wen M, Nagawa S, Fu Y, Chen JG, Wu MJ, Perrot-Rechenmann C, Friml J, Jones AM, Yang Z, Cell surface-and Rho GTPase-based auxin signaling controls cellular interdigitation in Arabidopsis, *Cell* 143 (2010) 99–110.
- Yang Z, Small GTPases: versatile signaling switches in plants. *Plant Cell* 14 Suppl (2002) S375-88.
- Yang Z, Cell polarity signaling in Arabidopsis. *Annu Rev Cell Dev Biol* (2008) 24:551-75.
- Yu F, Li J, Huang Y, Liu L, Li D, Chen L, Luan S, FERONIA receptor kinase controls seed size in Arabidopsis thaliana, *Mol. Plant* 7 (2014) 920–922.
- Yu F, Qian L, Nibau C, Duan Q, Kita D, Levasseur K, Li X, Lu C, Li H, Hou C, Li L, Buchanan BB, Chen L, Cheung AY, Li D, Luan S, FERONIA receptor kinase pathway suppresses abscisic acid signaling in Arabidopsis by activating ABI2 phosphatase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (2012) 14693–14698.

- Zhang C, Kotchoni SO, Samuels AL, Szymanski DB, SPIKE1 signals originate from and assemble specialized domains of the endoplasmic reticulum, *Curr.Biol.* 20 (2010) 2144–2149.
- Zhang Y, McCormick S, A distinct mechanism regulating a pollen-specific guanine nucleotide exchange factor for the small GTPase Rop in *Arabidopsis thaliana*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007) 18830–18835.
- Zhang Y, McCormick S, Regulation of pollen tube polarity, *Plant Signal. Behav.* 3 (2008) 345–347.
- Zhang D, Wengier D, Shuai B, Gui CP, Muschietti J, McCormick S, Tang WH, The pollen receptor kinase LePRK2 mediates growth-promoting signals and positively regulates pollen germination and tube growth, *Plant Physiol.* 148 (2008) 1368–1379.
- Zhao Z, Manser E, PAK and other Rho-associated kinases—effectors with surprisingly diverse mechanisms of regulation. *Biochem J* 386 (2005) 201–214. <https://doi.org/10.1042/BJ20041638>
- Zheng ZL, Nafisi M, Tam A, Li H, Crowell DN, Chary SN, Schroeder JI, Shen J, Yang Z, Plasma membrane-associated ROP10 small GTPase is a specific negative regulator of abscisic acid responses in *Arabidopsis*, *Plant Cell* 14(2002) 2787–2797.
- Zheng ZL, Yang Z, The Rop GTPase: an emerging signaling switch in plants. *Plant Mol Biol* 44 (2000) 1-9.
- Zou Y, Aggarwal M, Zheng WG, Wu HM, Cheung AY, Receptor-like kinases as surface regulators for RAC/ROP-mediated pollen tube growth and interaction with the pistil, *AoB Plants* 2011 (2011) plr017.

Függelék: A receptor-szerű citoplazmatikus kinázok ROP GTP-áz közvetített aktivációjához szükséges aminosav motívumok azonosítása

RLCK VI_A2 mutagenézis

VI_A2 EcoRI Full Fw	GCAGAATTCATGAAGTACATTCGAAGCAA	5' vég, EcoRI hasítóhelyen a pEntry2b (SalI hely eltávolítva) vektorba klónozva
VI_A2 XhoI Full Rev	GCACTCGAGCTAGCGACTACGATGCGAAGAAC	3' vég, XhoI hasítóhelyen a pEntry2b (SalI hely eltávolítva) vektorba klónozva
VI_A2 IDE Fw	CTATACACATGGGAAAGTGACTGACAAGACTGATGTGTTTG	mutagén
VI_A2 IDE Rev	CAAACACATCAGTCTTGTCAGTCACTTTCCCATGTGTATAG	mutagén
VI_B5A2 chimera Fw1	TGGATTGGCAAAATGGGCTTCAAGTACCTCA	mutagén
VI_B5A2 chimera Rev1	TGAGGTACTTGAAGCCCATTTTGCCAATCCA	mutagén
VI_B5A2 chimera Fw2	GGTAAAGTAACCGACGAGAAGACTGATGTG	mutagén
VI_B5A2 chimera Rev2	CACATCAGTCTTCTCGTTCGGTTACTTTACC	mutagén
VI_A2 G Fw	GGACAGCAAAAGCGCTTCATTATTTACAC	mutagén
VI_A2 G Rev	GTGTAATAATGAAGCGCTTTTGCTGTCC	mutagén
VI_A2 RR Fw	CAAAGGTTGTCAGCAACCGATCATAACACAG	mutagén
VI_A2 RR Rev	CTGTGTATGATCGGTTGCTGACAACCTTTG	mutagén
VI_A2 YA Fw	AGGTAGAGGTGGATGTACAGAGGTGTATAA	mutagén
VI_A2 YA Rev	TTATACACCTCTGTACATCCACCTCTACCT	mutagén
VI_A2 LS Fw	AGAGTTTTTACTGGAGATTGAAACAATAGGAC	mutagén
VI_A2 LS Rev	GTCCTATTGTTTTCAATCTCCAGTAAAACTCT	mutagén
VI_A2 HV Fw	ACAATAAGATCTGTCCAACATTCTAATGTC	mutagén
VI_A2 HV Rev	GACATTAGAATGTTGGACAGATCTTATTGT	mutagén

RLCK VI_A3 mutagenézis

VI_A3 EcoRI Full Fw	GCAGAATTCATGGCTGTTGAAGAGATGGA	5' vég, EcoRI hasítóhelyen a pEntry2b (Sall hely eltávolítva) vektorba klónozva
VI_A3 XhoI Full Rev	GCACTCGAGCTCCATTAAGAGCTGTCTAT	3' vég, XhoI hasítóhelyen a pEntry2b (Sall hely eltávolítva) vektorba klónozva
VI_A3 HV Fw	GCTGCGTTTCGATGGCTAAGACTTGCGATTATCCCAAGC	mutagén
VI_A3 HV Rev	AATCGCAAGTCTTAGCCATCGAAACGCAGCTAGGCTTCGTG	mutagén
VI_A3 LS Fw	GATTTCTTAGCGGAGCTCGACATAATCGCACATGTAAACC	mutagén
VI_A3 LS Rev	GTGCGATTATGTTCGAGCTCCGCTAAGAAATCACTGAC	mutagén
VI_A3 RR Fw	CATAACGATTGCCCTCAGCCGATTATTCACCGAGAC	mutagén
VI_A3 RR Rev	GTCTCGGTGAATAATCGGCTGAGGGCAATCGTTATG	mutagén

Rop1 mutagenézis

AtRop1 EcoRI Full Fw	GCAGAATTCATGAGCGCTTCGAGGTTTCGTAA	5' vég, EcoRI hasítóhelyen a pEntry2b (Sall hely eltávolítva) vektorba klónozva
AtRop1 Sall Full Rev	TCTGTTCGACATAGAATGGAGCATGCCTTCTGCGC	3' vég, XhoI hasítóhelyen a pEntry2b (Sall hely eltávolítva) vektorba klónozva
AtRop1 CA Fw (BtgZI)	GTTGGCGATGTCGTCGTCGGAAAACTTGTTTGTGA	mutagén
AtRop1 CA Rev (BtgZI)	TCAACAAAACAAGTTTTTCCGACAGCGACATCGCCAC	mutagén

pENTRY primerek

pE2B-Seq	GCGTTTCTACAAACTCTTCC	GATEWAY technikához szükséges túlnyúló PCR fragmentek felamplifikálása
SeqLB	GTAACATCAGAGATTTTGAGACAC	GATEWAY technikához szükséges túlnyúló PCR fragmentek felamplifikálása

BIFC konstrukciók

pDOEPmIA3SLICEFw	GGGGTCCCTACGTAGTCACGCTGTTGAAGAGATGGAGAAGAAG	SLICE technikával a PCR fragmentek a pDOE11 vektor PmlI hasítóhelyére klónozva
pDOEPmIA3SLICERev	CAGAACCTCCGGACGTCACCTCCATTAAGAGCTGTCTATGTCG	SLICE technikával a PCR fragmentek a pDOE11 vektor PmlI hasítóhelyére klónozva
Rop1 NcoI Full Fw	CCATGGGGATGAGCGCTTCGAGGTTTCG	pDOE11 vektorba klónozva
Rop1 SpeI Full Rev	TGACTAGTTCATAGAATGGAGCATGCCTTC	pDOE11 vektorba klónozva