

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

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Lajkó Dézi Bianka

Témavezető:

Dr. Fehér Attila



SZTE - Biológia Doktori Iskola

MTA – SZBK Növénybiológia Intézet

Szeged

2019

Bevezető

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 alcsaládba sorolhatóak, míg növényekben egyetlen specifikus csoport, a „Rho of plants” (ROP) alakult ki. Ezek a fehérjék molekuláris kapcsolóként 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 sejtvíz dinamikus változásaival kapcsolatos celluláris folyamatokban (sejtmozgás, sejtosztódás, sejtalak változások, intracelluláris transzport) vesznek részt. Ezen kívül szerepük van a plazmamembrán NADPH-oxidáz enzim aktiválásában illetve génexpressziós 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 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 szabályozó fehérjéken keresztül érkező jelek az aktív Rho GTP-ázokról változatos jeltovábbító (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-okhoz (Rho-of-plants) kapcsolódó jelátviteli hálózatokról is hiányosak ismereteink. Korábban laboratóriumunkban mutatták ki, hogy az RLCK VI_A (receptor-like cytoplasmic kinases class VI) csoportba tartozó növény-specifikus kinázok potenciális ROP 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 effektor kinázok, szerepet játszanak a polaritás kialakulásában is. Az irányított sejtmegnyúlás (pl. levélszőrök, trichómák) és csúcsi növekedés (pl. pollencső) két alapvető folyamat, melyek nélkülözhetetlenek a növények poláris sejttypusainak morfogeneziséhez.

Célkitűzések

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?

Anyagok és módszerek

Mutagenézis

Az RLCK VI_A2 és a VI_A3 kinázok, valamint az AtROP1 cDNS klónok az ABRC-ből származnak. A kinázok és a ROP1 szekvenciáinak megváltoztatása átfedő polimeráz láncreakció (PCR) alkalmazásával történt. Az RLCK VI_A kinázokban a csoportspecifikus aminosavakat egyenként kicseréltük olyanokra, melyek a B-típusú kinázokra jellemzőek. Az elmutáltatott kináz cDNS-eket Gateway LR rekombinációs technikával klónoztuk éslesztő két-hidrid vektorba. A mutáns kinázokat bakteriális rendszerben is megtermeltettük és kifejeztettük. Az *Arabidopsis* ROP1 GTP-áz hasonlóan készült konstitutívan aktív (G15V) mutáns formáját éslesztő illetve bakteriális vektorokba építettük be. Az

elkészített mutáns konstrukciókat a következő kísérletes munkáinkhoz használtuk fel:

- Élesztő két-hibridizációs technika
- Fehérje termeltetés és tisztítás baktériumból
- Tisztított fehérjéken végzett Western blot analízis, illetve
- *In vitro* kináz esszé

In planta fehérje-fehérje kölcsönhatások:

A fehérje-fehérje kölcsönhatások *in planta* kimutatására Bimolekuláris Fluoreszcencia Komplementációs (BiFC: Bimolecular fluorescence complementation) tesztek alkalmaztunk. A BiFC tesztek alapját a pDOE vektor rendszer szolgáltatta. Ez a rendszer lehetővé teszi két vizsgált fehérje ubiquitin10 promóterrel szabályozott párhuzamos expresszióját az mVenus sárga fluoreszcens fehérje N- és C-terminális régióihoz kapcsolva. Esetünkben a vizsgált fehérjék a konstitutívan aktív ROP1 és a vad típusú illetve mutáns RLCK VI_A3 kinázok voltak. A konstitutívan aktív ROP1 mutáns formát kódoló cDNS-t felamplifikáltuk és a vektor megfelelő helyére klónoztuk, míg a vad típusú és mutáns kináz cDNS-ek SLICE (Seamless Ligation Cloning Extract) módszer felhasználásával lettek beillesztve vektorunkba. Az eredeti vektor szintén tartalmaz egy különálló fluoreszcens fehérjét, amelynek segítségével a fehérje-fehérje kölcsönhatások könnyebben azonosíthatóak lesznek. Konstrukcióink génagyú segítségével lettek bejuttatva *Nicotiana tabacum* pollenekbe, majd a polleneket *in vitro* körülmények között csíráztattuk. BiFC kísérleteink során a Lat52:mCherry fehérjét

expresszáló pollencsöveket spinning disc konfokális mikroszkóp segítségével követtük nyomon. 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, majd kiértékelésük ImageJ software segítségével történt.

Növényekkel végzett kísérletek:

A munkánk során az *rlck vi_a2* T-DNS inszerciós mutáns vonalat használtuk fel. A magvakat 5% Domestosban történő felületi sterilizálást követően egy éjszakán át 4°C-on steril vízben hideg kezeltük, és steril táptalajra szélesztettük. *In vitro* steril körülmények között rövidnappalos, vagy folyamatos fényben, 22°C állandó hőmérséklet mellett neveltük növényeinket. A táptalaj ½ MS volt 0,8% agar és 0,5% szaharóz tartalommal. Később növényeinket üvegházban rövidnappalos körülmények között neveltük tovább, majd a megfelelő méret elérése után, hosszúnappalos körülményeket alkalmaztunk, amíg az *Arabidopsis* virágzatot majd termést hozott. Ezt követően 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. A transzformált növények magjait 20 mg/l Hygromicin antibiotikum szelekció jelenlétében csíráztattuk, majd a transzformált növények utódvonalainak hasadási tesztjét szintén 20 mg/l Hygromicin antibiotikum jelenlétében végeztük. A megfelelő hasadási arányokat mutató vonalakat

kiválasztottuk és hipokotil növekedési kísérleteket végeztünk rajtuk.

Eredmények

Az RLCK kinázok ROP-kötő képességét potenciálisan befolyásoló aminosav szekvencia motívumok azonosítása:

Az RLCK VI számú családjának 14 tagja van, amelyek kináz alegységük alapján két csoportba sorolhatóak. 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 G-fehérjékkel, anélkül is aktívak. Ezeknek a kinázoknak az *in vitro* fehérje foszforilációs aktivitása függ a GTP-kötött ROP GTP-ázok jelenlététől. Az RLCK VI_A kináz elsődleges aminosav szekvenciáit összehasonlítottuk a B-típusú kináz szekvenciáival. Ennek eredményeként azonosítottunk néhány olyan aminosav motívumot, amelyek karakterisztikusan eltérnek a két csoport tagjai között. Annak érdekében, hogy bebizonyíthassuk, hogy az RLCK VI_A2 kinázban azonosított szekvencia motívumoknak szerepe van a ROP kötésben, ezeket a motívumokat egyenként vagy csoportosan elmutáltattuk. Az A csoportra jellemző aminosav motívumokat kicseréltük olyan aminosavakra, amelyek a B típusú kinázokra jellemzőek. Feltételeztük, hogy az ilyen típusú változások közvetlenül kapcsolhatóak a ROP-kötő képességhez. Élesztő két-hibrid kölcsönhatási mátrix segítségével teszteltük a fehérje-fehérje

kölcsönhatások kialakulását a mutáns kinázok és a ROP1 CA fehérje között. 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.

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. Az RLCK VI_A2 G kináz mutáns a vad típusú kinázhoz hasonlóan viselkedett. A további hat mutáns kinázból három elvesztette ROP-függő autofoszforylációs aktivitását (YA, HV, IDE), míg a fennmaradó másik három kináz mutáns (LS, RR, LP-IDE) bizonyos szintű autofoszforylációs aktivitást mutatott ROP G-fehérje jelenlétében és hiányában egyaránt. Ezek az eredmények megerősítik, hogy az általunk azonosított aminosav motívumok, egy kivétellel (YA), fontos szerepet játszanak a ROP kötésben, és néhány közülük fontos lehet a kináz aktivitás ROP-függő szabályozásában is.

Az RLCK VI_A2 kináz alacsony affinitással foszforylálja a mesterséges mielin bázikus fehérje szubsztrátot. Az RLCK VI_A3 kináz viszont hatékonyan foszforylálja ezt a szubsztrátot, 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. Az RLCK VI_A3 kináz fehérje foszforylációs aktivitása ROP1 CA

jelenlétében tovább fokozódik, a HV mutáció esetében elveszett ez az aktivitás, míg az LS és RR motívumok mutációja ROP-független kináz aktivitást eredményezett.

A kinázok 3D modelljén, a ROP kötésben részt vevő aminosavak többsége egy közös felszínt képez a kinázok szubsztrátkötő zsebe felett. Az egyetlen RLCK VI_A specifikus motívum (YA), amelyről kimutattuk, hogy befolyásolja a kináz aktivitását, ugyanakkor a ROP kötésben nem vesz részt, ezen a régió kívül helyezkedik el.

Szekvencia analízis:

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 genomszekvenciája ismert, mint például a *Chlamydomonas reinhardtii*, *Physcomitrella patens*, *Marchantia polymorpha*, *Selaginella moellendorffii* és *Oryza sativa*. A vizsgálatokhoz az *Arabidopsis* RLCK VI_A3 kináz szekvenciát használtuk mintaként. Az azonosított *Physcomitrella*, *Marchantia*, *Selaginella* és *Oryza* kinázok szekvenciái tartalmazták az *Arabidopsis* RLCK VI_A kináz csoportra jellemző ROP-kötő motívumokat is. 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.

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 G-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-t kódoló cDNS-eket a sárga fluoreszcens fehérje (mVenus) N- illetve C-terminális régióit kódoló cDNS szakaszaihoz fúzionáltattuk egy megfelelő génexpressziós vektorban. 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 fehérjével, míg a többi, ROP-kötésben hibás mutáns kináz (HV, RR, LS) nem volt képes erre, hiszen csak a vad típusú kináz esetében kaptunk sárga fluoreszcens jelet a transzfektált pollencsővekben.

Az *Arabidopsis* RLCK VI_A3 kináz ROP GTP-áz jelenlétében megnövekedett *in vitro* fehérje foszforilációs aktivitást mutat, valamint erős pollenspecifikus expresszió jellemzi. Ezek alapján úgy döntöttünk, hogy megvizsgáljuk a vad típusú VI_A3 kináz és ROP-kötésben hibás mutáns formáinak hatását a pollencsővek növekedésére és polaritására nézve, konstitutívan aktív ROP1 G-fehérje jelenlétében és hiányában is. *In vivo* kísérletes

eredményeink alapján elmondható, hogy a ROP1 CA fehérje tranzienis kifejeztetése az irodalmi eredményekkel összhangban nagyon rövid, a csúcsnál ballon-szerűen kiszélesedő pollencsócsúcs fenotípust, azaz polaritás vesztést eredményezett. Ezt a fenotípust pedig nem befolyásolta szignifikáns módon a ROP1 CA mellett párhuzamosan túltermeltetett A3 kináz, illetve annak egyik vizsgált mutáns formája sem. Mikor a kinázt, illetve annak mutánsait önmagukban, a ROP1 CA 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.

Az RLCK VI_A2 kináz ROP-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 μ E vörösfényben a Columbia-0 (Col) vad típusú növények hipokotil hosszához képest, és a sziklevek méretének csökkenése is megfigyelhető. 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 vonalagnál a Col növényekhez képest szignifikánsan nagyobb hipokotil hosszúságokat mértünk. Ennek megválaszolására, hogy a kináz ROP-kötő képessége szerepet játszik-e ebben a folyamatban, az RLCK VI_A2_HV, LS illetve RR mutáns kinázokat is kifejeztettük, az *rlck vi_a2*

mutáns háttérben. Magas intenzitású folyamatos vörös fényben szintén elvégeztük a hipokotilhossz mérési tesztekét. 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 sziklevelek mérete is nagyobb volt, mint a Col-0 növényeké.

Következtetések:

Szekvencia analízis alapján megállapítottuk, hogy az RLCK VI család A csoportjának minden tagjában jellemzően megjelenik több konzervált aminosav mintázat. 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 specificitás meghatározó pozícióiban (specificity determining position, SDP) konzerválódott jellegzetes aminosavak. 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 specificitása vagy az aktivitás szabályozása. Ezek az aminosavak általában a fehérje felszínén találhatóak és befolyásolják a fehérje más molekulákkal való kölcsönhatását. Bebizonyítottuk, 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. 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. Az RLCK VI_A2 kináz 3D szerkezeti modellje jól szemlélteti, hogy az általunk vizsgált motívumok, egy kivétellel, közös felszint képeznek. A kivételt éppen az a motívum jelenti (YA), amelyik a ROP GTP-áz kötésben nem vesz részt. 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. 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 növényi ROP GTP-ázok által szabályozott folyamatok közül a pollencsövek poláris növekedése az egyik legjobban tanulmányozott folyamat. A ROP1 CA GTP-áz túltermeltetése a pollencsövek polaritásának elvesztését és a pollencső csúcsainak kiszélesedését okozza. 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.

Az *rlck vi_a2* kináz mutáns növényekkel végzett komplementációs kísérletek során a mutáns csíranövények csökkent hipokotil megnyúlási fenotípusát mind a vad típusú, mind a ROP GTP-áz kötésre képtelen mutáns kináz formák képesek voltak komplementálni. 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. A kináz aktivitással nem rendelkező mutáns esetében kapott hasonló 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.

Köszönetnyilvánítás:

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Fehér Attilának; a Funkcionális Sejtbiológia Csoport korábbi és jelenlegi dolgozóinak; valamint mindenkinek, aki hozzájárult doktori dolgozatom elkészítéséhez. 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.

A dolgozat alapjául szolgáló saját közlemények:

Lajkó D.B., Valkai I., Domoki M., Ménesi D., Ferenc G., Ayaydin F., Fehér A. (2018).

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. Apr;37(4):627-639. doi: 10.1007/s00299-018-2256-y. Epub 2018 Jan 16. PMID: 29340786 IF₂₀₁₈: 2.989

Fehér A., **Lajkó D.B.** (2015).

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

MTMT azonosító: **10050679**