

A projekt háttere, kiindulási hipotézisek

A mezőgazdasági termelés sikerét alapvetően befolyásolják az állandóan változó környezeti körülmények. Ezért különösen fontos azoknak a folyamatoknak a megértése, amelyekkel a növények növekedésüket a környezeti hatásoknak megfelelően szabályozzák. Az állati egyedfejlődési folyamatoktól eltérően – ahol a szervek már az embriogenezis korai stádiumában kialakulnak, és további fejlődésük a környezeti körülményektől alapvetően független – a helyhez kötött növényekben az új szervek megjelenése és növekedése rugalmasan reagál a környezeti hatásokra. E folyamatos adaptáció kulcsa a környezeti hatásokat érzékelő, és a növényi növekedést szabályozó jelátviteli molekuláris mechanizmusok összehangolt működésében rejlik. Habár a különböző környezeti stresszek, mint pl. a szárazság, hideg vagy kórokozók évről évre súlyos termésveszteségeket okoznak, mégis jelenleg gyakorlatilag ismeretlenek azok a molekuláris mechanizmusok, amelyek a növény növekedést a környezeti hatásoknak megfelelően szabályozzák. A mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) foszforilációs kaszkádok valamennyi eukariótában konzervált jelátviteli modulok, amelyeknek a sejtosztódás és a sejtnövekedés szabályozásában játszott kulcsszerepe állatokban jól ismert¹. Egy tipikus MAPK kaszkád három enzimsaládból áll: egy MAP kináz kináz kinázból (MAPKKK), egy MAP kináz kinázból (MKK) és egy MAP kinázból, amelyek egymást egy sorozatos foszforilációs láncolatban aktiválják. A jelek lépcsőzetes átvitele egy kaszkádrendszeren keresztül lehetővé teszi a különböző ingerek integrálását, a válaszok finomhangolását. A növényi MAPK jelátvitel kulcsszerepe a különféle stresszek elleni védekezés szabályozásában jól ismert, és egyre több eredmény tárja fel a növényfejlődési folyamatokban betöltött szerepét is².

Jelenleg nem tudjuk, hogy hogyan képesek ugyanazok a MAP kinázok egyszerre szabályozni a stressz válaszokat és a növekedést. Ennek egyik fő akadálya, hogy alig ismerjük a célfehérjéket, amelyeken keresztül a MAP kinázok az élettani válaszokra hatnak. A legtöbb élesztő vagy állati MAP kináznak számos szubsztrátja van, pl. a humán ERK1 esetében több mint 150 szubsztrát ismert³. Ezzel szemben a növényi MAP kináz szubsztrátokra vonatkozó ismereteink minimálisak, az eddig azonosított mintegy két tucat szubsztrátot véletlenszerűen izolálták, pl. élesztő kéthibrid kísérletekkel⁴. Ezért bioinformatikai megközelítéssel potenciális MAPK kináz szubsztrátokat azonosítottunk, amelyek között számos ismert merisztéma-szabályozó faktort találtunk. A projekt során célul tűztük ki új MAPK szubsztrátok azonosításával és jellemzésével olyan molekuláris mechanizmusok feltárását, amelyeken keresztül a stressz szignálok a növekedési folyamatokat befolyásolhatják.

Kísérleti koncepció

A fehérjefoszforilációval kapcsolatos technológiai fejlesztések elsősorban a véletlenszerű (unbiased) felfedező technikák terén eredményeztek jelentős haladást. Ide sorolhatóak egyrészt a különféle foszfoproteomikai módszerek (pl. peptid/protein microarray-k), másrészt a szekvencia mintázatok analízisén alapuló *in silico* predikciós módszerek⁵. Az ilyen nagy áteresztőképességű módszerek megbízhatósága azonban nem megfelelő, ezért az azonosított szubsztrátokat (vagy azoknak legalább egy részét) célzott kísérletekkel szükséges igazolni. Erre eddig gyakorlatilag csak az *in vitro* kináz esszé állt rendelkezésre, ami egy évtizedekkel

ezelőtt kifejlesztett, és azóta lényegi továbbfejlesztések nélkül használt módszer. Az *in vitro* kináz esszének számos hátránya ismert, pl. a megbízhatósága a nagy koncentrációjú, tisztított fehérjék, sejtes szabályozó mechanizmusokon kívüli használata miatt meglehetősen problematikus^{5,6}. További problémát jelent a sugárzó foszforizotóp használata is. Mivel mi egy számítógépes motívumanalízist követően funkcionálisan szelektált, specifikus szubsztrát jelölteket kívántunk vizsgálni, különösen indokolt volt egy megbízhatóbb kísérleti rendszer kialakítása, és az általunk kidolgozott koncepció lehetővé teszi specifikus kináz-szubsztrát foszforilációs kölcsönhatások *in vivo* vizsgálatát.

Ebben a rendszerben a kiválasztott szubsztrát jelölteket kódoló cDNSeket epitóp fúziós expressziós vektorba klónozzuk, és protoplaszt transziens expressziós rendszerben aktivált MAP kinázokkal együtt, illetve azok nélkül kifejeztetjük. Amennyiben az adott fehérje a ko-expresszált kináz szubsztrátja, a két mintában a foszfoizofomák aránya eltérő lesz: a savasabb izoformák felhalmozódnak az aktív kináz jelenlétében. A kérdés tehát az, hogy milyen módszerrel tudjuk ezt a változást megbízhatóan detektálni? A pályázati anyagban benyújtott terveink szerint kis méretű protein elektroforézis készülékekkel választottuk volna el a foszfoizofomákat, Phos-Tag reagens alkalmazásával, ami a fehérjék foszfát csoportjaival komplexet képezve képes szeparálni a különböző izoformákat SDS-PAGE során⁷. Az így elválasztott foszfoizofomákat hagyományos immunoblotting (Western blot) alkalmazásával lehet kimutatni.

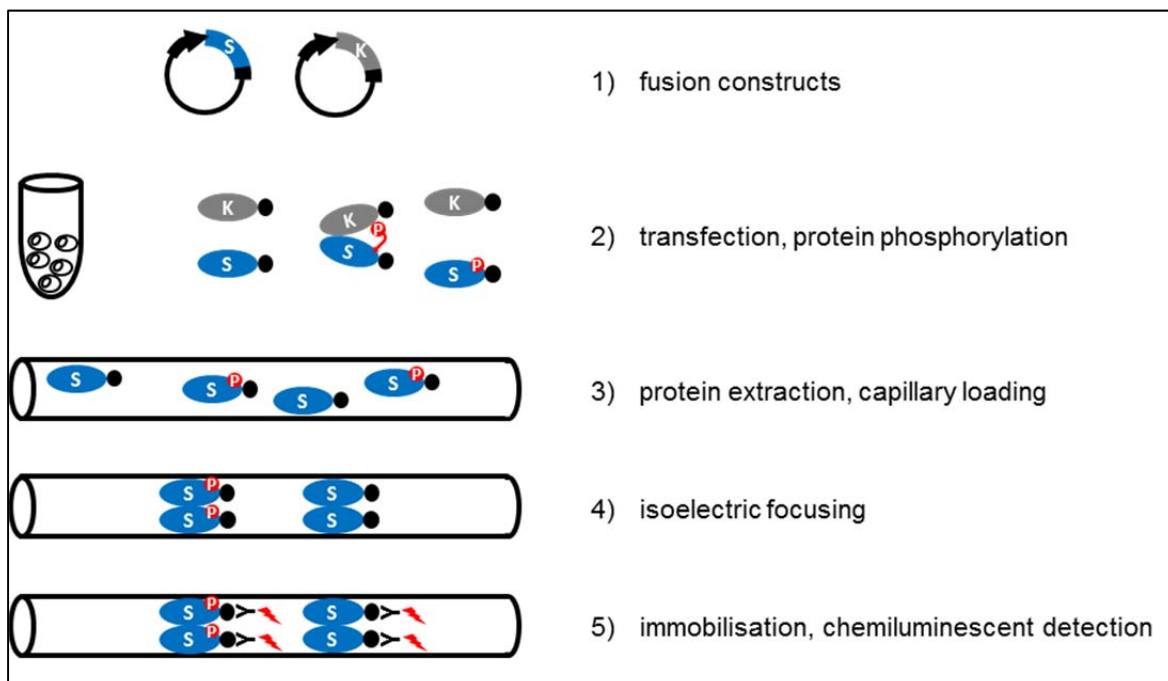
Eredmények

Első lépésként optimalizáltuk a sejt kultúra fenntartás és protoplasztálás körülményeit. Egy gyöker eredetű *Arabidopsis* sejt szuszpenziót tartunk fent, amelyből rendszeresen izolálunk transzformálható protoplasztokat. A protoplaszt izolálás sejt kultúrából a körülmények módszeres finomhangolását igényli, és bár kezdetben a kinyert fehérje mennyisége bizonyos esetekben túl kevés volt immunoblot detektáláshoz, sikerült a protoplaszt transzfekciót rutinszerű eljárásá tenni, ismételve 30% körüli transzformációs hatékonysággal. A kifejeztetett fehérjék elsődleges vizsgálatához sikeresen beállítottuk az immunoblot detekciós módszert is.

A projekt során az eredetileg javasolt kísérleti megközelítés alapkoncepciójának jelentős technikai továbbfejlesztését sikerült elérnünk. Habár bizonyos fehérjék esetében a foszforilált és a nem foszforilált izoformák SDS-PAGE alapú szeparálása valóban működik, munkánk során megismertünk egy újszerű fehérjeanalitikai eljárást, a kapilláris izoelektromos fókuszálást (cIEF) követő nanofolyadék immunoesszé (capillary isoelectric focusing coupled nanofluidic immunoassay). Ebben a rendszerben az eltérő izoelektromos pontú (pI) izoformákat egy kapillárisban történő izoelektromos fókuszálással választják szét, majd azokat UV fényel immobilizálják. A kötött fehérjéket végül a kapillárisban végrehajtott antitestreakcióval mutatják ki, ahol az antitesthez kötött enzim által generált kemilumineszcens jelet egy érzékeny CCD kamera detektálja. A rendszer legfontosabb előnye kiváló felbontóképessége: 0,02 – 0,03 körüli pI érték változásokat megbízhatóan képes detektálni, ami kisebb különbség mint egy átlagos fehérjén egy hozzáadott foszfát csoport által okozott pI változás (~0,05). Ez a felbontóképesség messze meghaladja a poliakrylamid

elektroforézis rendszerek felbontóképességét, praktikusan egy átlagos méretű és aminosav összetételű fehérje valamennyi foszfoizomermérete elválasztható. Továbbá a kemilumineszcens jel digitális rögzítése révén a rendszer kvantitatív mérésekre is alkalmas. Ezek az előnyök különösen fontosak olyan dinamikus foszforilált fehérjék esetében, ahol párhuzamosan többféle foszforilált izoforma van jelen. További fontos előny a rendkívüli érzékenység, akár 25 sejtnyi mintából is reprodukálhatóan kimutathatóak a vizsgált fehérjeformák⁸, tehát lehetőség nyílik a felhasznált anyagok (protoplaszt, plazmidok) gazdaságos felhasználására.

Az Országos Onkológiai Intézet Pathogenetikai Osztályán használatban van egy cIEF-immunoesszé berendezés (NanoPro 100, ProteinSimple, USA), így a projekt során kialakítottunk egy kutatási együttműködést Doleschall Zoltánnal, hogy ezt az eljárást transzfektált protoplaszt mintákból történő izoforma vizsgálatokra optimalizálva létrehozunk egy csúcstechnikai módszert *in vivo* foszforilációs köcsönhatások vizsgálatára növényekben (1. ábra).

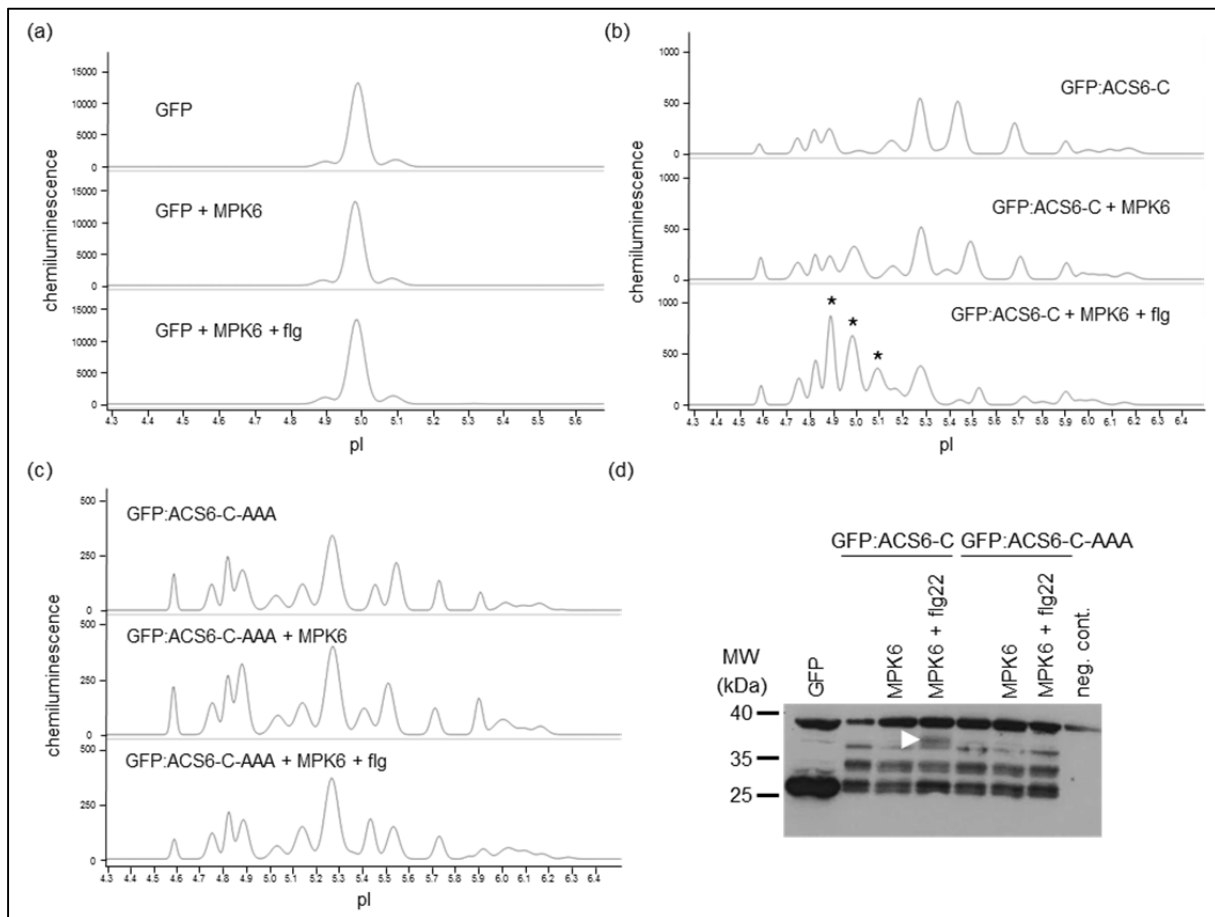


1. ábra. A kísérleti koncepció

A módszer a differenciáltan foszforilált fehérje izoformák elválasztásán alapul. A specifikus antitestek hiányát gyakran használt epitópokkal fuzionált fehérjék transzfekciójával oldjuk meg. A kiválasztott szubsztrát jelölteket és kinázokat kódoló teljes hosszúságú cDNS-eket növényi expressziós vektorba klónozzuk translációs fúziós konstrukcióként. A szubsztrátokat aktivált kinázokkal együtt, illetve azok nélkül kifejeztetjük protoplasztokban, ahol az intracelluláris foszforiláció megtörténhet, így a két mintában a foszfoizomermérek eloszlása eltérő lesz. Megfelelő inkubációs időt követően a protoplasztokat lízáljuk, és a fehérjekivonatot kapillárisokba töltjük. Az izoelektromos fókuszálás egy pH gradiensben a kapillárisokban történik meg. Végül az elválasztott fehérjéket a kapilláris falára rögzítjük, és a használt epitópra specifikus antitesthez kapcsolt enzim által gerjesztett kemilumineszcens jel alapján detektáljuk.

Első lépésként igazoltuk, hogy a cIEF-immunoesszé alkalmas protoplasztban expresszált fehérjék kimutatására. Legjobb tudomásunk szerint ez az első alkalom, hogy ezt a módszert

növényi kutatásban használták, és megállapítottuk, hogy Bicine/Chaps kivonó puffer alkalmazásával nyert növényi fehérjeminták nem tartalmaznak olyan komponenseket amelyek gátolnák e bonyolult elválasztási-detektálási folyamatot. Kereskedelmi forgalomból beszerzett anti-GFP antitesttel kimutattuk az expresszált GFP fehérjét, ami alapvetően egy izoformában fordul elő (2. ábra, A). A GFP fehérje egyben nem-szubsztrát negatív kontrollként is szerepelt kísérleti rendszerünkben, annak izoforma eloszlására semmilyen hatással nem volt az aktivált MAPK ko-expressziója (2. ábra, A).



2. ábra. Transziensen kifejeztetett GFP változatok foszfoizoformáinak detekciója cIEF-immunoesszével

(a-c) Különböző GFP fúziós fehérjék cIEF-immunoesszével detektált izoforma eloszlásainak elektroferogramjai. A transzfektált fehérjéket és a kezeléseket minden mintánál jelöltük. (a) Módosítatlan GFP egy meghatározó izoformaként van jelen és az MPK6 nem foszforilálja. (b) A GFP:ACS-C fúziós fehérje (az ACS6 C-terminális doménje a GFP C-terminálisához fuzionálva) izoforma eloszlása. Az aktivált MPK6 jelenlétében specifikusan akumulálódó savas izoformákat csillagok jelzik. (c) A MAPK által nem foszforilálható GFP:ACS-C mutáns (GFP:ACS-C-AAA) izoforma eloszlása, a vad típusú fehérjével azonos kísérleti elrendezésben. (d) A transziensen kifejezett GFP variánsok detekciója hagyományos SDS-PAGE immunoblottal. A nyíl egy, az aktivált MPK6 jelenlétében specifikusan megjelenő csíkot jelez. A negatív kontroll (neg. cont.) egy GFP-vel nem transzformált protoplaszt minta.

Ezzel szemben pozitív kontrollként előállítottunk egy olyan fúziós konstrukciót, amelyben a GFP fehérjét egy ismert MAPK szubsztráttal fuzionáltuk. E célból az ACS6 (ACC szintáz 6) fehérje C-terminális doménjét választottuk, ahol három, az irodalomban jól jellemzett MAPK foszforilációs hely található⁹. A fúziós konstrukciót GFP:ACSC-C-nek neveztük el. A kontroll GFP-hez képest a GFP:ACSC-C fúziós fehérje számos izoformáját detektáltuk, vagyis különféle, eltérően foszforilált változatok párhuzamosan vannak jelen a sejt közegben (2. ábra, B). Ez a megfigyelés összhangban van azzal, hogy az ACS6 C-terminális doménjén számos kináz típus putatív foszforilációs helye megtalálható (pl. a Eukaryotic Linear Motif (ELM) resource (<http://elm.eu.org/>) adatbázis használatával).

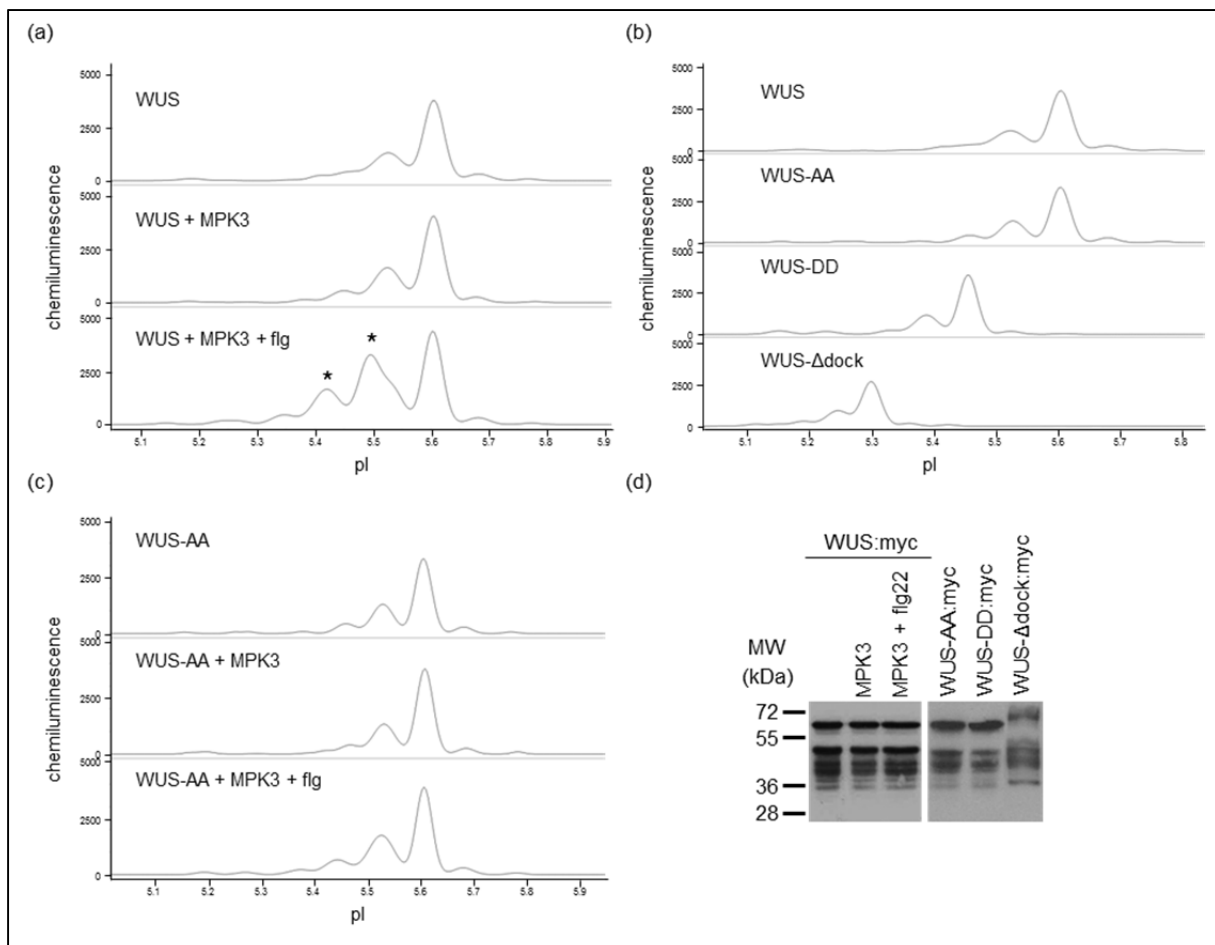
Nem aktivált MPK6 ko-expressziója csak minimális mértékben eredményezi a savas izoformák (alacsonyabb pI értékű csúcsok az elektroferogrammon) felhalmozódását. Ezzel szemben a protoplasztok kezelése a bakteriális flagellin eredetű flg22 elicitor peptiddel a savas izoformák jelentős felhalmozódását eredményezte, vagyis az aktivált MPK6 (hiper)foszforilálta a GFP:ACSC-C fehérjekonstrukciót (2. ábra, B). Habár az MPK6 többféle környezeti stressz hatására aktiválódik (pl. só, hideg, oxidatív stressz)¹⁰, kísérleti rendszerünkben azért választottuk a flagellin aktivációt, mert a flg22 peptid felismerése az FLS2 receptor által, specifikus jelátviteli mechanizmusokat aktivál, miközben a sejtet valódi károsodás nem éri¹¹.

Negatív kontrollként előállítottunk egy olyan mutáns GFP:ACSC-C variánst, amelyben a három MAPK foszforilációs helyet elrontottuk (S46A, S49A, S54A: GFP:ACSC-C-AAA). A GFP:ACSC-C-AAA fehérje izoforma eloszlására az aktivált MPK6 nem volt hatással (2. ábra, C), igazolva, hogy a vad típusú konstrukcióval megfigyelt pI változások valóban MAPK foszforiláció következményei. Összehasonlításként a transzfektált fehérjéket hagyományos SDS-PAGE immunoblot esszével is detektáltuk, ahol a GFP:ACSC-C-vel ko-expresszált aktív MPK6 mintában egy lassabban migráló csík jelent meg (2. ábra, D). Összegezve, egy ismert MAPK szubsztrátot használva igazoltuk, hogy egy növényi fehérje specifikus kináz általi (hiper)foszforilációja kimutatható transzfekción és cIEF-immunosszé kombinációjával, még akkor is ha az adott fehérje már eleve erősen foszforilált a sejt közegben.

Új, a fejlődésszabályozásban fontos MAPK szubsztrátok azonosítása céljából az azonosított MAPK dokkoló motívumot tartalmazó fehérjék közül olyan szubsztrát jelölteket választottunk, amelyeknek merisztéma-szabályozó szerepe részletesen ismert. Ezek: WUSCHEL (WUS, At2g17950), WUSCHEL-RELATED HOMEBOX 5 (WOX5, At3g11260), APETALA1 (AP1, At1g69120), APETALA2 (AP2, At4g36920), APETALA3 (AP3, At3g54340), FLOWERING LOCUS C (FLC, At5g10140). Elkészítettük e gének teljes hosszúságú cDNS-klónjait PCR alapú klónozással. A szekvenciák ellenőrzése után ezeket egy pRT100 alapú fúziós építő expressziós vektorba szubklónoztunk. A fúziós konstrukciók sikeres expresszióját immunoblot esszével igazoltuk.

A WUS transzkripciós faktor központi szerepet játszik az őssejt készlet szabályozásában hajtás és virág merisztémákban^{12,13}. Habár funkcióját genetikai módszerekkel igen nagy részletességgel tanulmányozták, a WUS poszt-transzlációs szintű szabályozásáról jelenleg semmit nem tudunk. A WUS fehérje négy potenciális MAPK foszforilációs helyet tartalmaz, valamint egy RRTLPL motívumot, ami MAPK dokkoló „D-site”-ként működhet¹⁴. Transzfekción követő cIEF-immunosszével sikerült detektálnunk a WUS:myc fehérjét, ami

több, eltérő mennyiségű izoformában van jelen, a fő izoforma detektált és számolt pI értéke egyaránt 5,6 (3. ábra, A,B). Következő lépésként igazoltuk, hogy a WUS fehérjét az MPK3 foszforilálja. E célból a WUS-t ko-expresszáltuk négy MAPK-zal, amelyek a növényi MAPK-ok három filogenetikai csoportját reprezentálják (MPK3/6 [A csop.], MPK11 [B csop.], MPK1 [C csop.]). Ezek közül az aktivált MPK3 ko-expressziója a WUS jelentős savasodását eredményezte (3. ábra, A), így feltételezhettük, hogy a WUS egy specifikus MPK3 szubsztrát. Az MPK3 által előidézett foszforilációt sem aktiválatlan MPK3 ko-expressziójával, sem ko-expresszió nélküli flg22 kezeléssel nem sikerült előidézni. További negatív kontroll céljából előállítottunk egy inaktív MPK3 mutáns változatot. Ennek ko-expressziója szintén nem vezetett WUS foszforilációhoz, flg22 kezelést követően sem. Ezen eredmények alapján már nagy valószínűséggel megállapítható, hogy a WUS egy MPK3 szubsztrát *in vivo*.



3. ábra. A WUS egy *in vivo* MPK3 szubsztrát

(a-c) Különböző WUS:myc fúziós fehérjék cIEF-immunoesszével detektált izoforma eloszlásainak elektroferogramjai. A transzfektált fehérjéket és a kezeléseket minden mintánál jelöltük. (a) Az aktivált MPK3 hatása C-terminális myc fúziós WUS izoforma eloszlására cIEF-immunoesszében. Az aktivált MPK3 jelenlétében specifikusan akkumulálódó savas izoformákat csillagok jelzik. (b) A cIEF-immunoesszé képes különböző töltés összetételű WUS pontmutáns változatokat eltérő pI értékekkel detektálni. WUSAA: nem-foszforilálható mutáns, WUS-DD: foszfomimetikus mutáns, WUS- Δ dock: elrontott MAPK dokkoló D-site motívum. (c) A WUS fehérje T108, S112 MAPK foszforilációs helyein létrehozott alanin cserék következtében annak MPK3 általi foszforilációja megszűnik. (d) A tranziensen kifejezett WUS variánsok detekciója hagyományos SDS-PAGE immunoblottal.

A WUS MPK3 általi foszforilációjának további megerősítése céljából három, a MAPK foszforilációt érintő mutáns WUS variánst hoztunk létre, helyirányított mutagenézissel. A foszfoakceptor aminosavakat két, a homeodoménen kívül eső S/TP helyen (T108, S112) alaninra (WUS-AA, nem-foszforilálható mutáns), illetve glutaminsavra (WUS-DD, foszfomimetikus mutáns) cseréltük. Egy harmadik mutánsban a feltételezett D-site típusú MAPK dokkoló helyet rontottuk el (R252E, R253E, L257E: WUS- Δ dock). Fontos megjegyezni, hogy e mutációk közül kettő a számított pI érték megváltozását eredményezte. Míg a WUS-AA mutáns pI értéke azonos a vad típusú fehérjével, addig a bevezetett vagy megfordított töltések a WUS-DD és a WUS- Δ dock mutánsok pI értékeinek csökkenését okozzák. A fő izoformákat mindegyik mutáns esetében a számított értékeknek megfelelően detektáltuk, ami jól demonstrálja, hogy a rendszer megbízhatóan képes kimutatni fehérjék töltésösszetételének elenyésző különbségeit (3. ábra, B). Az MPK3 által kiváltott WUS savasodás teljesen megszűnt mind a nem-foszforilálható (3. ábra, C), mind a foszfomimetikus mutáns esetében. Továbbá a funkcionális D-site hiánya a foszforiláció jelentősen csökkenéséhez vezetett. A transzfektált WUS változatokat hagyományos SDS-PAGE immunoblottal is ki tudtuk mutatni, ami megerősítette a tranziens expressziót, de ugyanakkor nem volt alkalmas a foszforizozomák megbízható elválasztására (3. ábra, D).

Az új módszerrel kapott eredmények megerősítése céljából a WUS MPK3 általi foszforilációját hagyományos *in vitro* kináz esszével is igazoltuk. Az *in vivo* eredményekkel összhangban, radioaktív foszfátbeépülés alapján a WUS, ellentétben a WUS-AA-val, egy *in vitro* MPK3 szubsztrát.

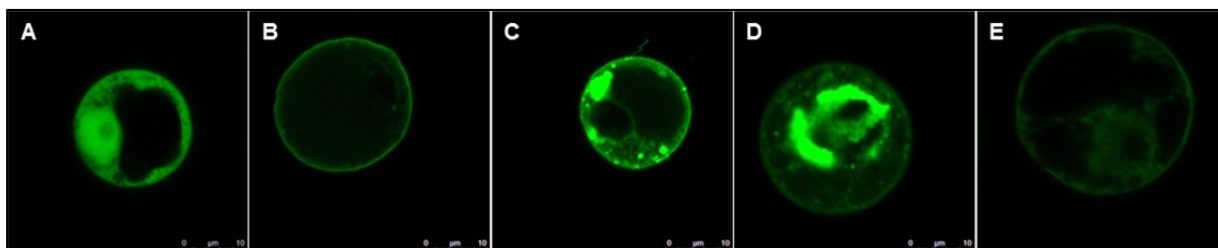
További kontrollkísérletekkel végeztünk annak igazolására, hogy az eredmények nem a fehérjefűzés technika vagy az antitest alapú detekció által okozott műtermékek. A myc fűzős konstrukciók mellett elkészítettünk a vad típusú, valamint a WUS-DD és WUS-AA mutánsok GFP-vel fuzionált változatait expresszáló konstrukciókat is, amelyekkel elvégeztük az előzőekben bemutatott ko-expressziós kísérleteket. Mindkét antitesttel hasonló WUS izoforma eloszlást, illetve - vad típusú WUS esetében - aktivált MPK3-mal előidézett savasodást figyeltünk meg. A myc epitóp alapú detekció további kontrolljaként az expresszált WUS:myc fehérjét három különböző antitesttel is konzisztensen detektáltuk. Rutinszerűen egy közvetlen HRP konjugált anti-myc antitestet használtunk (Roche), ami nem igényelt másodlagos antitest reakciót. Összehasonlításként egy független forrásból származó (Sigma) anti-myc antitestet is kipróbáltunk, azonos eredményekkel. Ezen kívül, egy specifikus anti-WUS antitest beszerezhető kereskedelmi forgalomból is (Agrisera), részben ezért is választottuk a WUS fehérjét a módszer alapos tesztelésére. Kísérleteinkben az anti-WUS ellenanyag mind cIEF-immunoesszében, mind hagyományos immunoblot esszében az anti-myc ellenanyagokkal azonos eredményeket adott.

Összességében a fenti kísérletekből megállapítható, hogy az általunk kidolgozott *in vivo* foszforilációs esszé koncepció működőképes, alaposan megtervezett és gondosan végigvitt pozitív és negatív kontrollkísérletek sorával igazoltuk, hogy a módszer alkalmas specifikus kináz-szubsztrát foszforilációs kölcsönhatások vizsgálatára.

A kialakított rendszerben további bioinformatikailag azonosított MAPK szubsztrát jelölteket is megvizsgáltunk (WOX5, AP1, AP2, DPB, FLC). A kísérletek során, egy kivételtől eltekintve, mindegyik fehérje esetében a negatív töltésű foszfátcsoport(ok) megjelenését jelző,

alacsonyabb pI értékű formák megjelenését/felhalmozódását figyeltük meg az aktív MAPK-zal ko-transzfektált mintákban. Érdekes módon az FLC esetében az aktív MAPK jelenlétében a pI érték növekedett. E jelenség háttérében egy komplex foszforilációs-defoszforilációs rendszer állhat (pl. a MAPK által foszforilált változat hozzáférhetővé válik egy foszfatáz számára, ami így más aminosavakat defoszforilálhat), ennek értelmezése további szisztematikus vizsgálatokat igényelne.

A projekt alapvető célkitűzésének megfelelően tovább bővítettük a vizsgált MAPK szubsztrát jelöltek körét. A fent ismertetett fehérjék mind transzkripciós faktorok. Azonban a megfelelő merisztéma működés szabályozásában központi fontosságú az auxin transzporter fehérjék által kialakított poláris auxin transzport (PAT) is. A PIN1 membránfehérje az egyik legjobban jellemzett auxin transzporter, a *pin1* mutáns növények súlyos fejlődési rendellenességeket mutatnak¹⁵. Sikerült igazolnunk, hogy a PIN1 fehérjét az MPK6 foszforilálja. A PIN1 fehérjeszekvencián 6 potenciális MAPK foszforilációs hely található, pontmutációk bevezetésével igazoltuk, hogy ezek közül a T226, T248 és T286 aminosavak foszforilálódnak MPK6 által. A PAT kialakításához elengedhetetlenül szükséges a transzporter fehérjék precíz sejtbeli lokalizációja. A PIN1 fehérjék helytelen lokalizációja a PAT, illetve a szabályos auxin koncentráció grádiensek csökkenésén keresztül végső soron a merisztémák összeomlását is okozhatja. Konfokális mikroszkópiával kimutattuk, hogy ezek a foszforilációs események befolyásolják a PIN1 intracelluláris lokalizációját. Transzfektált, PIN1:GFP fúziós konstrukciót expresszáló protoplasztokban a PIN1 fehérje a membránban lokalizálódik (4. ábra, B), azonban az MPK6-ot (MAP kináz) és MKK7-et (MAP kináz kináz) is ko-expresszáló sejtekben egy jelentős citoplazmás PIN1 frakció jelenik meg, ahol a PIN1 aggregátumokat képez (4. ábra, C). A PIN1 T226E/T248E/T286E (PIN1-EEE) mutáns változata az aktivált MAPK-t ko-expresszáló mintákkal konzisztens lokalizációs mintázatot mutat, azonban a folyamatos foszforilációt imitáló mutációknak megfelelően szokatlanul nagy, gyakran akár a sejtek negyedét is kitöltő aggregátumokat képezve (4. ábra, D). Ezzel szemben a PIN1 T226A/T248A/T286A (PIN1-AAA) mutáns instabil, a kis mennyiségben megfigyelhető fehérje jelentős citoplazmás frakciót képez (4. ábra, E).



4. ábra. A MAPK foszforilációs állapot befolyásolja a PIN1 auxin transzporter lokalizációját

(a-d) Protoplaszban kifejeztetett GFP variánsok lokalizációja konfokális mikroszkópiával. (a) GFP, (b) vad típusú PIN1:GFP, (c) vad típusú PIN1:GFP + MPK6 + MKK7, (d) foszfomimetikus PIN1:GFP pontmutáns (T227E, T248E, T286E), (e) nem foszforilálható PIN1:GFP pontmutáns (T227A, T248A, T286A).

A mutáns fehérjeváltozatok pontosabb sejten belüli lokalizációjának céljából lokalizációs markereket használtunk¹⁶. A túlfoszforilált (MKK7/MPK6 koexpresszált, illetve PIN1-EEE) PIN1 változatok sem az endoplazmatikus retikulum (ER) sem a Golgi markerrel nem mutatnak határozott asszociációt. Azonban a nagy aggregátumok mindkét markerrel következetesen asszociálnak. Érdekes módon a BFA indukált vezikulákra szintén jellemző, hogy egyszerre asszociálnak e két organelum markerrel¹⁷ ami azt a lehetőséget támasztja alá, hogy a MAPK foszforiláció a PIN1 intracelluláris transzportját befolyásolja. A nem foszforilálható PIN1-AAA mutáns a Golgi markerrel csak részleges, míg a az ER markerrel határozott átfedést mutat.

A WUS1 foszforilációjának biokémiai vizsgálata mellett, annak növényfejlődésben betöltött funkciójának vizsgálatához elkészítettünk egy olyan növényi transzformációs vektort, ami a *WUS1* gént tartalmazó 8 kb genomi szekvenciát tartalmaz, N-terminális GFP fúzióval. Ez a genomi szakasz képes teljes mértékben komplementálni a *wus1* mutáns súlyos fejlődési rendellenességeit¹⁸, így az ebben végrehajtott, foszforilációt befolyásoló mutációk fenotípusos hatásainak vizsgálatával megismerhetővé válik a stressz-aktivált MAPK foszforiláció szerepe a WUS funkcionális szabályozásában. E célból ugyanebből a vektorból előállítottunk a fenti, foszforilációt befolyásoló mutáns változatokat is (WUS-AA, WUS-DD és WUS- Δ dock). Mindeközben beszereztük, felszaporítottuk és genotipizáltuk a *wus1* knock-out mutáns növényvonalakat. Következő lépésként a komplementációs vektorokat hordozó *Agrobacterium* törzsekkel *wus1* háttérű növényeket transzformáltuk. Sikerült hygromycin rezisztens vonalakat előállítanunk, azonban mivel a *wus1* mutáció súlyos fejlődési rendellenességeket okoz, a transzformációt heterozigóta (*WUS1/wus1*) növényekkel végeztük el. Így a kapott T0 hyg rezisztens vonalakat további két generáción keresztül szükséges szegregáltatni, hogy a komplementációs vizsgálatokhoz szükséges, mind a *wus1* mutációra, mind a transzgén konstrukcióra homozigóta vonalakat elő tudjuk állítani. A vad típusú konstrukció esetében ezt sikerült végigvinni, a mutáns konstrukciók esetében a második szegregáltatás folyamatban van.

A munkaterv további részét képezte a Royal Holloway, University of London kutatóival együttműködésben tervezett rendszerbiológiai kutatás. A kollaboráció keretében elvégeztük a növényi MAPK hálózatok komparatív genomikai analízisét. A projekt célkitűzéseinek megfelelően azonosítottuk az általunk vizsgált fajok dokkoló szekvencia motívumait (common docking (CD) motívumok a MAPK szekvenciákon, és D-site motívumok az MKK szekvenciákon), koevolúciójuk analízise céljából. Legérdekesebb felfedezésünk a dokkoló helyekben megtalálható, filogenetikai csoportokra az egész növényvilágban jellemző, szisztematikus aminosav szubsztitúciók jelenlétének kimutatása volt. Ez azért figyelemreméltó, mert humán MAPK-k és MKK-k esetében nem nyilvánvaló mintázat különbségek is elégségesek a kötési szelektivitás biztosításához¹⁴, tehát a csoport-specifikus mintázatok a növényeknél minden bizonnyal a szelektivitás specializációját jelzik. Komparatív genomikai vizsgálataink eredményeit a *Trends in Plant Science* folyóiratban közzeltük¹⁹.

Következtetések

A projekt során elért legfontosabb eredményünk, hogy kidolgoztunk egy új biokémiai eljárást specifikus kináz-szubsztrát foszforilációs kölcsönhatások vizsgálatára növényi sejtekben, és alkalmazásával igazoltuk számos merisztéma szabályozó fehérje stressz-aktivált MAPK-ok általi foszforilációját. A korábban már említett előnyök mellett (*in vitro* vs. *in vivo*, sugárveszély) a kialakított csúcstechnológiai, gyors és rugalmas kísérleti módszer számos előnnyel rendelkezik a hagyományos *in vitro* kináz esszével szemben. A vizsgált fehérjéket kódoló cDNS-ek fúziós expressziós vektorba klónozásához mindkét módszerhez szükség van, az *in vitro* kináz esszé esetében általában GST-fúziós fehérjéket expresszálnak, erre alkalmas speciális *E. coli* törzsekben. Azonban lényeges különbség, hogy a növényi fehérjék expressziója a prokarióta rendszerben sokszor problematikus (pl. inklúziós testek kialakulása), illetve az expresszált fehérjék kitisztítása is munkaigényes, és csak ezek után következik a tényleges kináz esszé, amit SDS-PAGE elválasztás követ, végül a beépült radioaktív foszfát csoportokat autoradiográfiával detektálják. Ehhez képest a vizsgált fehérjéket az új módszerrel növényi sejtekben fejeztetjük ki, és az azokból kivont nyers fehérje kivonat egyből felvihető a cIEF-immunoesszé rendszerbe, ahol az elválasztás-detekció pár óra alatt elvégezhető.

Miután megfelelő kontrollkísérletekkel igazoltuk, hogy a koncepció működőképes, az új módszerrel sikerült kimutatnunk több, a merisztéma működés szabályozásában kulcsfontosságú fehérje foszforilációját. Több mint két évtizednyi intenzív genetikai kutatásoknak köszönhetően a merisztéma szerveződés és a szervkialakulás szabályozása mára már részletesen ismert, mutáns vonalak használatával sikerült azonosítani és jellemezni számos mester regulátor gént. A projekt során igazoltuk több, jól jellemzett mestergén által kódolt szabályozó fehérje foszforilációját, amiből megállapíthatjuk, hogy e szabályozó elemek maguk is dinamikusan szabályozottak, és annak érdekében, hogy működésükről pontosabb képet kapjunk, a továbbiakban a poszt-transzlációs szabályozást is szükséges lesz figyelembe venni, ami egy új fejezetet nyithat a merisztéma szabályozás kutatásában.

Eredményeink egyúttal azt is jelentik, hogy a dokkoló szekvencia mintázatok jelenléte egy fehérjén jól felhasználható a MAPK foszforiláció predikciójára.

A PIN1 MPK6-MKK7 általi foszforilációjára vonatkozó eredményeink jól illeszkednek az MKK7 PAT gátló funkciója vonatkozó ismeretekhez²⁰, a PIN1 lokalizációjának befolyásolása molekuláris szintű magyarázatát adja a korábbi megfigyeléseknek. A lokalizációs eredmények alapján elképzelhető, hogy a MAPK foszforiláció az ER-ban szintetizálódott PIN1 fehérjemolekulák Golgi transzport mechanizmus általi felvételéhez szükséges. Ebben a modellben a környezet függő MAPK aktivitás képes a PIN1 membrán lokalizációját modulálni, vagyis végső soron a PAT működését környezet függő módon befolyásolni. Összességében tehát ezek az eredmények felhívják a figyelmet a stressz-aktivált MAPK jelátvitel egész növény szinten betöltött növekedésszabályozó szerepére.

Eltérések a pályázati projekttervtől

A projekt legfontosabb célkitűzését, új, a merisztéma szabályozásban kulcsfontosságú MAPK szubsztrátok azonosítása, elértük. E célból kifejlesztettünk egy új kísérleti módszert, igazolva, hogy a munkatervben bemutatott kísérleti koncepció működőképes, viszont technológiai szempontból azt jelentősen továbbfejlesztettük. Ezzel a módszerrel elméletileg bármilyen növényi protein kináz - szubsztrát kapcsolat tanulmányozható. Mivel a fehérje foszforiláció a génszabályozás egyik alapvető mechanizmusa, ez a kísérleti megközelítés nagyban elősegítheti a növényi génszabályozási mechanizmusok, és ez által az adaptációs folyamatok megértését.

Az új technológiai fejlesztéssel szükségessé vált a módszer működésének minden kétséget kizáró igazolása. Ezt a célt szolgálta az „Eredmények” részben bemutatott kontroll kísérletek sora. A gondosan végigvitt kontroll kísérletek erőforrás- és időigénye miatt a genetikai feladatok csúsztak, míg az árpa ortológok klónozására, foszforilációs analízisére nem került sor a projekt futamideje alatt. Ezzel kapcsolatban szeretnénk hangsúlyozni, hogy az új módszer nem kötött a modell növényfajhoz, és ezért a későbbiekben igen hasznossá válhat kevésbé kutatott gazdasági növények jelátviteli folyamatait célzó kutatások terén. A szubsztrát-kináz fehérje kölcsönhatások minden bizonnyal megbízhatóan kialakulnak heterológ protoplastokban is, azonban számos gabonafajból rendelkezésre állnak hatékony protoplast izolálási protokollok²¹, ami különösen alkalmassá teszi ezt a protoplast alapú kísérleti megközelítést hosszabb tenyészidejű fajokban zajló jelátviteli folyamatok hatékony kutatására. Így hosszabb távon a kifejlesztett módszer talán még nagyobb jelentőséget is nyerhet gazdasági növények kutatásában, mint a lényegesen jobb eszköztárral rendelkező modellnövény esetében.

A MAPK hálózatok rendszerbiológiai kutatását kissé átfókuszáltuk, nagyobb hangsúlyt kapott a MKK-MAPK hierarchiaszintek vizsgálata. Eredményeink jelentősen hozzájárulnak a növényi MAPK hálózatok megismeréséhez, azokat egy nagy presztízsű folyóiratban közzeltük¹⁹.

Publikációk

Eredményeinket több konferencián is bemutattuk. Legtöbb eredményünk közzlése rangos tudományos folyóiratokban folyamatban van. Az új foszforilációs esszét és a merisztéma szabályozó transzkripció faktorok foszforilációját ismertető kézirat jelenleg bírálat alatt áll (The Plant Journal), a PIN1 foszforilációt és az MKK7-MPK6 modul merisztéma szabályozó funkcióját bemutató kézirat véglegesítése nemzetközi együttműködő partnereinkkel folyamatban van. A rendszerbiológiai kutatásokat a Trends in Plant Science-ben közzeltük, „Opinion” formátumban (IF: 12,929).

Dóry M, Doleschall Z, Nagy SK, Ambrus H, Mészáros T, Barnabás B, Dóczi R: Kinase-Associated Phosphoisoform Assay: a novel candidate-based method to detect specific kinase-

substrate phosphorylation interactions in vivo (under review in *The Plant Journal*, manuscript ID: TPJ-00132-2016)

Dóry M, Hatzimasoura E, Ditengou F, Nagy SK, Jäger K, Meszaros T, Palme K, Bögre L, Dóczi R: The MKK7-MPK6 MAP kinase module represses meristem outgrowth and participates in post-translational regulation of the auxin transporter PIN1 in *Arabidopsis*. (manuscript to be submitted for consideration to *The Plant Cell*)

Dóry M, Doleschall Z, Ambrus H, Dóczi R (2015): A fehérjefoszforiláció szerepe a virágfejlődés szabályozásában XXI. Növénynevelési Tudományos Napok, 2015. március 11–12. Martonvásár, ISBN: 978-963-8351-43-2, 70. o

Dóry M, Doleschall Z, Ambrus H, Dóczi R (2014): A flexible experimental system to study in vivo protein phosphorylation in plants. Presentation at the Annual Meeting of the Hungarian Biochemical Society, University of Debrecen, Debrecen 2014 August 24-27, Hungary. Published in *Biochemistry*, journal of Hungarian Biochemical Society, issue XXXVIII/3 (HU ISSN 2060 8152, HU ISSN 0133-8455) p35.

Dóry M, Doleschall Z, Ambrus H, Dóczi R (2014): Identification of mitogen-activated protein kinase substrates in *Arabidopsis* protoplast transient expression system. Pannonian Plant biotechnology Association Conference "Advances in Plant Breeding and Biotechnology Techniques", 27-29 April 2014, Mosonmagyaróvár, Hungary, ISBN: 978-963-89129-5-4 pp24-25.

Dóry M, Doleschall Z, Ambrus H, Dóczi R (2014): Mitogén-aktivált protein kináz szubsztrátok azonosítása protoplaszt transziens expressziós rendszerben. FIBOK, Fiala Biotechnológusok Országos Konferenciája, 2014. március 7. Szeged, ISBN: 978-963-315-167-9, 19. o.

Dóczi, R., Ökrész, L., Romero, A.E., Pacanaro, A., Bögre L. (2012) Exploring the evolutionary path of plant MAPK networks. *Trends in Plant Science* **17**: 518-25

Dóry M, Dóczi R (2012): Mitogén-aktivált protein kináz szubsztrátok azonosítása protoplaszt transziens expressziós rendszerben. 1. ATK Tudományos Nap, Martonvásár, 2012. november 14. ISBN: 978-963-8351-40-1, 37. o.

Dóry M, Hatzimasoura E, Bögre L, Dóczi R (2012): Egy konzervált eukarióta jelátviteli rendszer növényekben: mitogén-aktivált protein (MAP) kinázok szerepe a növények környezeti alkalmazkodásában. Pannon Tudományos Nap, 2012 október 18. Nagykanizsa

Irodalom

- 1 Avruch, J. MAP kinase pathways: the first twenty years. *Biochim Biophys Acta* **1773** (8), 1150 (2007).
- 2 Xu, J. & Zhang, S. Mitogen-activated protein kinase cascades in signaling plant growth and development. *Trends Plant Sci* **20** (1), 56 (2015).
- 3 Yoon, S. & Seger, R. The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* **24** (1), 21 (2006).
- 4 Andreasson, E. & Ellis, B. Convergence and specificity in the Arabidopsis MAPK nexus. *Trends Plant Sci* **15** (2), 106 (2010).
- 5 Peck, S. C. Analysis of protein phosphorylation: methods and strategies for studying kinases and substrates. *Plant J.* **45** (4), 512 (2006).
- 6 Manning, B. D. & Cantley, L. C. Hitting the target: emerging technologies in the search for kinase substrates. *Science STKE* **2002** (162), pe49 (2002).
- 7 Kinoshita, E., Kinoshita-Kikuta, E., Takiyama, K. & Koike, T. Phosphate-binding tag, a new tool to visualize phosphorylated proteins. *Mol Cell Proteomics* **5** (4), 749 (2006).
- 8 O'Neill, R. A. *et al.* Isoelectric focusing technology quantifies protein signaling in 25 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103** (44), 16153 (2006).
- 9 Joo, S., Liu, Y., Lueth, A. & Zhang, S. MAPK phosphorylation-induced stabilization of ACS6 protein is mediated by the non-catalytic C-terminal domain, which also contains the cis-determinant for rapid degradation by the 26S proteasome pathway. *Plant J.* **54** (1), 129 (2008).
- 10 Rodriguez, M. C., Petersen, M. & Mundy, J. Mitogen-activated protein kinase signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol* **61**, 621 (2010).
- 11 Asai, T. *et al.* MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity. *Nature* **415** (6875), 977 (2002).
- 12 Laux, T., Mayer, K. F., Berger, J. & Jurgens, G. The WUSCHEL gene is required for shoot and floral meristem integrity in Arabidopsis. *Development* **122** (1), 87 (1996).
- 13 Zhou, Y. *et al.* Control of plant stem cell function by conserved interacting transcriptional regulators. *Nature* **517** (7534), 377 (2015).
- 14 Bardwell, A. J., Frankson, E. & Bardwell, L. Selectivity of docking sites in MAPK kinases. *J Biol Chem.* **284** (19), 13165 (2009).
- 15 Adamowski, M. & Friml, J. PIN-dependent auxin transport: action, regulation, and evolution. *Plant Cell* **27** (1), 20 (2015).
- 16 Nelson, B. K., Cai, X. & Nebenfuhr, A. A multicolored set of in vivo organelle markers for co-localization studies in Arabidopsis and other plants. *Plant J* **51** (6), 1126 (2007).
- 17 Nebenfuhr, A., Ritzenthaler, C. & Robinson, D. G. Brefeldin A: deciphering an enigmatic inhibitor of secretion. *Plant Physiol* **130** (3), 1102 (2002).
- 18 Baurle, I. & Laux, T. Regulation of WUSCHEL transcription in the stem cell niche of the Arabidopsis shoot meristem. *Plant Cell* **17** (8), 2271 (2005).
- 19 Doczi, R. *et al.* Exploring the evolutionary path of plant MAPK networks. *Trends Plant Sci* **17** (9), 518 (2012).
- 20 Dai, Y. *et al.* Increased expression of MAP KINASE KINASE7 causes deficiency in polar auxin transport and leads to plant architectural abnormality in Arabidopsis. *Plant Cell* **18** (2), 308 (2006).
- 21 Davey, M. R., Anthony, P., Power, J. B. & Lowe, K. C. Plant protoplasts: status and biotechnological perspectives. *Biotechnol Adv.* **23** (2), 131 (2005).