

SZAKMAI ZÁRÓ JELENTÉS

1. **A téma megnevezése:**
2. **A Rho GTPázok foszforilációjának szerepe a kórokozókkal szembeni védekezésben és a növényi egyedfejlődésben**
3. **A munka kezdete és befejezése: 2006.01.01-2008.12.31.**
4. **Háttér, előzmények**

A pályázat szorosan kapcsolódott a T49491 jelű OTKA pályázathoz. Célja az általunk azonosított, és a kapcsolódó OTKA pályázatban jellemzett, Rop GTPáz-kölcsönható RRK (RLCK VI) kinázok vizsgálatába a német partner (Prof. Karsten Niehaus, Bielefeldi Egyetem) bevonása. Az alábbi specifikus célok szerepeltek a pályázatban:

- A receptor kináz és Rop GTPáz jelátvitel kapcsolatának igazolása RLCK VI kinázok funkcionális jellemzésén keresztül
- A Rop GTPáz foszforilációjának szerepe a növények fejlődésében és a növény-patogén interakciókban

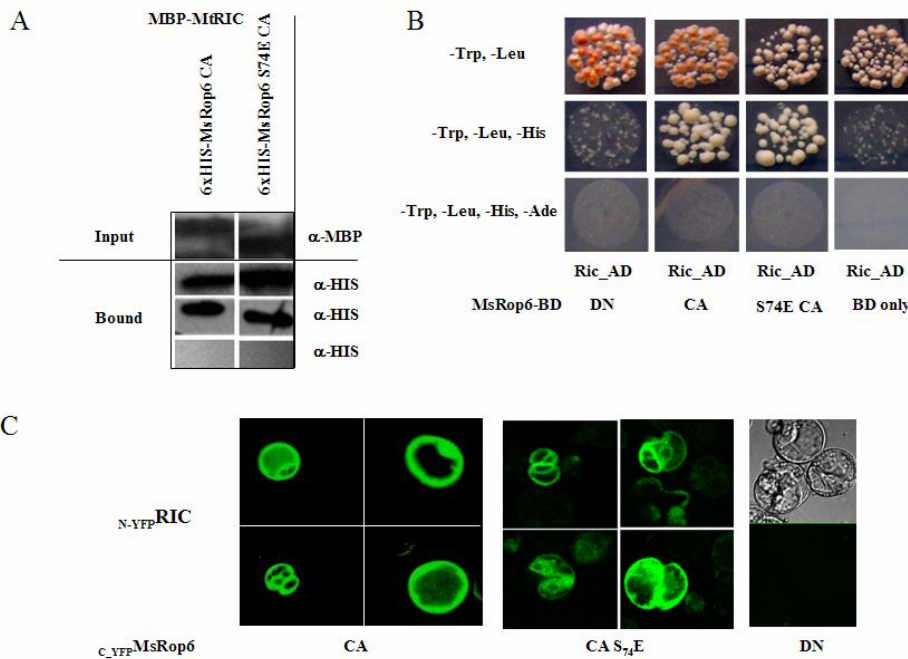
5. **Eredmények**

A pályázat eredményei, mivel kiegészítő pályázatról van szó, szorosan kapcsolódnak a T49491 pályázat eredményeihez, ezért a T49491 pályázat zárójelentésében már szereplő eredményekre részletesen nem térek ki.

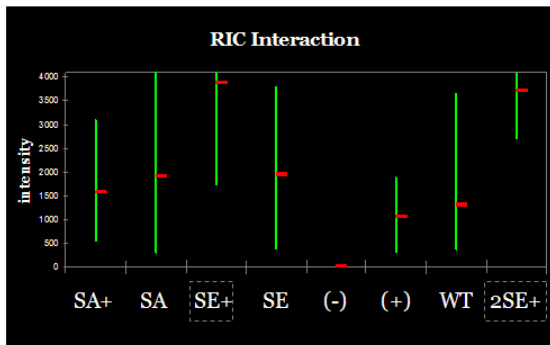
A pályázat készítésekor még úgy véltük, hogy az RLCK VI (RRK) kinázok foszforilálják az MsRop6 GTPázot. Ezért került a Rop GTPáz foszforiláció biológiai szerepének vizsgálata a célkitűzések közé. A pályázat közben végzett kísérletek eredményeként kiderült, hogy ez nem így van, hanem az RLCK kinázok a Rop GTPázok effektorai. Ez a felismerés hangsúly eltolódást okozott a kutatásokban, új megközelítéseket tett szükségessé, míg a tervezettek egy részét feleslegessé. Minderre fokozatosan, a kísérleti eredmények függvényében került sor. Ugyanakkor ez az új felismerés nem csökkentette, inkább növelte az eredmények tudományos jelentőségét, mivel növényi Rop GTPáz effektor kinázok eddig nem voltak ismertek.

A kezdeti vizsgálatokat irodalmi adatokra illetve in silico predikcióra alapoztuk. Ezek alapján az S74A aminosav foszforilációját valószínűsítettük. Ezért elvégeztük az S74 aminosav kicserélését alaninra (S74A) illetve glutaminsavra (S74E). Az előbbi a potenciális foszforilációt gátolni, az utóbbi azt mimikálni hivatott. Az S74E mutációról kimutattuk, hogy gátolja a GTP-hidrolízist illetve differenciálisan befolyásolja a GTPáz kapcsolódását más fehérjékhez szemben az S74A

mutációval. Ebből arra következtettünk, hogy az S74 foszforilációnak lehet biológiai szerepe. Ezekhez a vizsgálatokhoz a bielefeldi egyetem munkatársai rendelkezésünkre bocsátották a lucerna RopGDI (Rop „guanine nukleotide dissociation inhibitor”) illetve RIC (Rop-interactive CRIB-containing protein) fehérje cDNS-ét. In vivo fehérje-fehérje kölcsönhatás vizsgálatokat a bimolekuláris fluoreszcencia komplementáció módszerével (BiFC) végeztünk el (1. ábra). További részleteket a mutáns GTPáz fehérjék egyéb fehérjékkel való kölcsönhatásáról a T49491 pályázat zárójelentése tartalmaz.



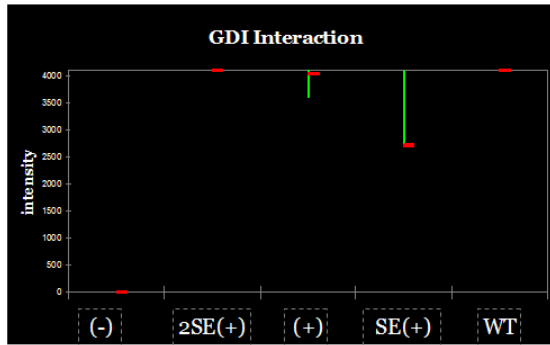
1. ábra A RIC fehérje és a RopGTPáz kölcsönhatását nem befolyásolja az S74E foszfomimetikus mutáció. A) in vitro, B) in yeast, C) in planta kölcsönhatás.



Fluorescence Complementation Intensity Measurement Results

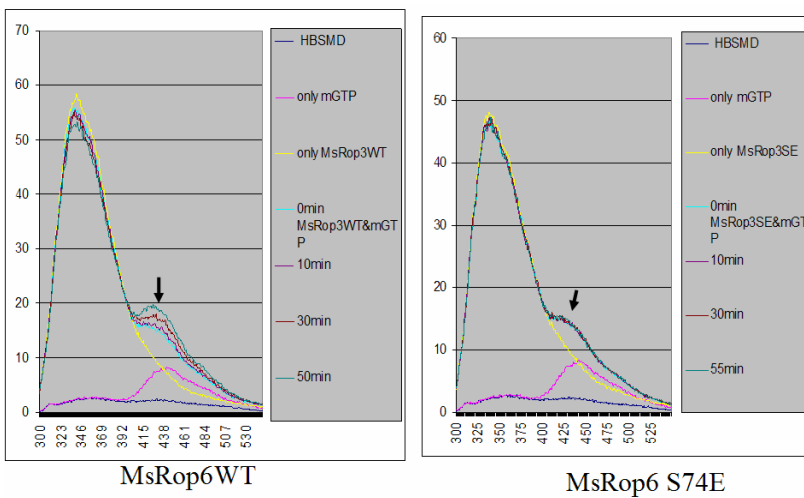
Red bar: Cumulative average intensity of 10-20 cells. (3 different parts of each cell measured)

Green bar: Max and min intensity recorded. Longer bars indicate higher variation of intensity for a given transformation experiment.



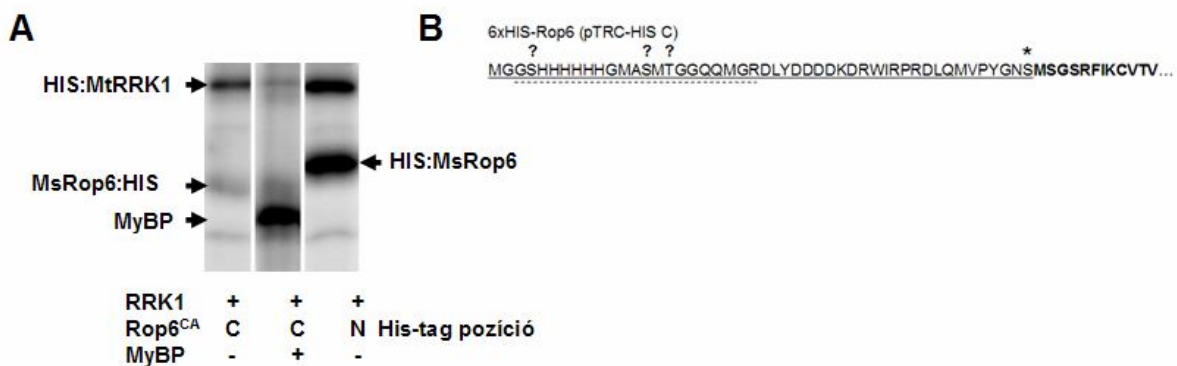
2. ábra Bimolekuláris fluoreszcencia komplementációs kísérletek kiértékelése fluoreszcencia intenzitás alapján. A S74A (SA) illetve S74E (SE) MsRop6 mutációk alapvetően nem befolyásolják a RIC illetve GDI fehérjékkel való kölcsönhatást.

Kíváncsiak voltunk arra is, hogy az MsRop6 S74 mutációk hogyan befolyásolják a GTPáz nukleotid kötését. Ezeket a kísérleteket szintén a bielefeldi egyetem munkatársai végezték el, fluoreszcens GTP/GDP analógokat használva. A 3. ábrán látható, hogy az S74E mutáció gátolja a GTP kötést.



3. ábra. Fluoreszcens energia transzfer (FRET) vizsgálat MsRop3 vad típusú (WT) és S74E mutáns és fluoreszcens GTP (Mant-GTP) között. A görbe vállákidőbeni növekedése GTP kötést jelez.

Ezekkel a kutatásokkal párhuzamosan a bielefeldi egyetem munkatársainak segítségével kíséreltük meghatározni a Rop GTPázon a foszforiláció helyét, különös tekintettel az S74 aminosavra. Ennek az aminosavnak a potenciális foszforilációjára irodalmi indikációt találtunk állati sejtek esetében, illetve *in silico* vizsgálatok is prediktálták ezt. A Bielfeldben a fehérjemintáinkon elvégzett tömegspektroszkópiás vizsgálatok azonban nem igazolták az S74 foszforiláció tényét. Később lehetővé vált modernebb módszerekkel az SZBK proteomikai laboratóriumában megismételni ezeket a vizsgálatokat, amelyek kimutatták, hogy a Rop GTPáz *in vitro* foszforilációja az RRK1 kináz által egy kísérleti artifakt: a foszforilációra a cDNS klónozás következtében a fehérje N-terminálisára került plusz aminosavak jelenléte miatt került sor (3. ábra).



3. ábra Az MsRop6 GTPáz foszforilációja az extrém N-terminálison történik, és az N-terminális HIS-taggal függ össze.

Mivel kutatásaink során kiderült, hogy az RRK kináz nem a Rop GTPáz szabályozója, azaz nem foszforilálja azt, hanem a Rop GTPáz az RRK kináz aktivátora (), kutatásaink hangsúlya ennek a kapcsolatnak az *in vitro* és *in vivo* igazolására terelődött (T49491 zárójeletés). A foszfo-mutáns Rop GTPázokkal (S74A, S74E) nem végeztünk növény transzformációt, mert nem éreztük az *in vitro* adatokat meggyőzőnek abból a szempontból, hogy kapnánk-e értékelhető fenotípust.

Viszont megkíséreltünk RRK1 túltermelő transzgenikus növényeket létrehozni, amelyek jellemzésében a bielefeldi egyetem munkatársaira is számítottunk. Azonban több nekifutásra sem sikerült az RRK1 kinázt expresszáló transzgenikus dohány növényeket felnevelni, bár a kontrol kísérletek pozitívak voltak. Ez a kináz egyedfejlődést gátló vagy letális hatására utalt. Ezért kísérleteinket részben tranziens expressziós rendszerben végeztük el, másrészt indukálható promóterrel működő génkonstrukciókat készítettünk (lásd T49491 zárójeletés). Ezekkel Arabidopsis növényeket transzformáltunk, az Arabidopsis rendszer gyorsasága miatt. Több RLCK VI kinázt illetve RNS-interferencia konstrukciót hordozó vonalat neveltünk fel, amelyek most a T1 generációba vannak, részlegesen jellemezve. A molekuláris jellemzést követően a bielefeldi egyetem kutatóival közösen fogjuk elvégezni a növények patogénekkal szembeni reakciójának

jellemzését. Előzetes kísérleteink arra utalnak, hogy a kinázok kifejeződése illetve annak gátlása egyéb Rop GTPáz függő folyamatokat jelentősen befolyásol, azaz az in vivo jelátviteli kapcsolatot minden valószínűség szerint igazolni tudjuk.

A bielfeldi egyetemmel közös publikáció a kísérletekből még nem született, de sor került két közös EU FrameworkVII Marie Curie ITN pályázat beadására. Mindkét pályázat tematikája lucerna Rop/Rab GTPázok szerepének feltárása a gyökérgümő képződés és elsősorban a rhizobium sejtek endocitózisának a folyamatában. Az első pályázat eljutott az értékelés végső fázisába, de nem forráshiány miatt nem kapott támogatást. A másodszor beadott javított pályázat szintén eljutott az utolsó értékelési fázisig, de végső döntés még nem áll rendelkezésünkre (FP7-PEOPLE-ITN-2008, Proposal acronym: EndoTraffic, Proposal number: 238388). Jelen IN kiegészítő pályázat alapvető jelentőségű volt ezeknek a pályázatoknak az előkészítésében és abban, hogy egyáltalán bekerülhettünk kutatási/képzési konzorciumba.

Összességében, bár a pályázat eredeti célkitűzéseit csak részben sikerült teljesíteni, a német partnerrel való kapcsolatteremtés sikeres volt, a kapcsolódó T49491 pályázatot megfelelően támogatta. Az eredetileg tervezett kutatócseréket is csak részben tudtuk teljesíteni: egy esetben a bielefeldiek egyetemi elfoglaltságai miatt hiúsult meg, egy esetben a PhD hallgatónk kiutazása előtt a lábát törte. Összességében két PhD hallgatónk járt Németországban, ahol új laboratóriumi technológiákkal ismerkedtek meg és nemzetközi tapasztalatot szereztek. Rendszeresen kutatási anyagokat és információkat cseréltünk. Jómagam nyílt szakmai előadást tarthattam a bielefeldi egyetemen és új szakmai kapcsolatokat építhettem ki. Két pályázat beadására is sor került, amik kapcsán további kutatócsoportokkal sikerült kapcsolatba kerülnünk, s amelyek lehetőséget adhatnak a kutatások folytatására és kiszélesítésére. A bielefeldi egyetem munkatársaival az együttműködést tovább folytatjuk, amely feltehetően közös publikációkhoz is el fog vezetni.