

Az AtMPK9 mitogén-aktivált protein kináz szabályozása autofoszforilációval

Doktori értekezés

Nagy Szilvia Krisztina

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Mészáros Tamás PhD, egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Törőcsik Beáta PhD, adjunktus
Dr. Dóczi Róbert PhD, tudományos főmunkatárs

Szigorlati bizottság elnöke:
Dr. Varga Gábor DSc, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:
Dr. Jemnitz Katalin PhD, tudományos főmunkatárs
Dr. Osváth Szabolcs PhD, egyetemi adjunktus

Budapest
2015

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	2
1. Rövidítések jegyzéke.....	4
2. Bevezetés.....	7
2.1. A fehérjeszintézis lehetséges módjai.....	7
2.1.1. Kémiai szintézis	7
2.1.2. <i>In vivo</i> expressziós rendszerek	8
2.1.3. <i>In vitro</i> transláció.....	12
2.2. A mitogén-aktivált protein kinázok.....	20
2.2.1. Az atipikus MAP kinázok szabályozása	23
2.2.2. <i>Arabidopsis thaliana</i> MAP kinázok	28
2.2.3. Az AtMPK9.....	33
2.3. AtMPK6 és feltételezett szubsztrátjai	35
2.3.1. <i>In vitro</i> transláción alapuló kináz szubsztrát azonosítás.....	37
3. Célkitűzések	39
4. Módszerek	41
4.1. Klónozás, vektorok tisztítása.....	41
4.1.1. Alkalmazott anyagok, primerek, vektorkonstrukciók	41
4.1.2. Fehérje kódoló DNS szakaszok felsokszorosítása	41
4.1.3. Agaróz gélelektroforézis	43
4.1.4. DNS izolálása agaróz gélből	43
4.1.5. Plazmid DNS tisztítása és transzformálás kompetens sejtbe	43
4.1.6. Klónozás restrikciós endonukleázokkal	44
4.1.7. Klónozás Gateway rendszerrel.....	44
4.1.8. Ligálás-független klónozás	45
4.1.9. <i>In vitro</i> mutagenézis	47
4.2. Bakteriális fehérjeexpresszió.....	49
4.2.1. Bakteriális fehérjetermelés autoindukcióval	49
4.3. Protoplaszt tranziens expresszió.....	49
4.3.1. A növényi sejtek fenntartása, protoplasztálás	49
4.4. <i>In vitro</i> transzkripció és transláció	51
4.4.1. <i>In vitro</i> transzkripció	51
4.4.2. <i>In vitro</i> transláció.....	52

4.5. Fehérje tisztítás, Western blot, kináz reakció.....	52
4.5.1. Poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE).....	52
4.5.2. Western Blot.....	53
4.5.3. Fehérje tisztítása affinitás kromatográfiával	54
4.5.4. Foszfátáz kezelés.....	55
4.5.5. TEV proteáz hasítás	55
4.5.6. <i>In vitro</i> kináz reakció.....	56
4.5.7. Foszfopeptid analízis.....	56
4.6. Bioinformatikai módszerek.....	56
5. Eredmények.....	58
5.1. Az AtMPK9 aktivációja	58
5.1.1. Az <i>in vitro</i> transzlált AtMPK9 kináz aktivitása	58
5.1.2. A TDY motívum foszforilációja	61
5.1.3. Bakteriális fehérjeexpresszió.....	63
5.1.4. Az <i>in vivo</i> expresszált AtMPK9 MAPKK-okkal való kölcsönhatása	64
5.1.5. Az AtMPK9 <i>in vitro</i> autofoszforilációja	66
5.1.6. Az AtMPK9 <i>in vivo</i> autofoszforilációja	68
5.1.7. Foszfátáz inhibitorok hatása az <i>in vivo</i> kináz aktivitásra	69
5.1.8. Az autofoszforiláció mechanizmusa	70
5.1.9. Az AtMPK9 foszfoaminosav mintázata.....	71
5.2. Az AtMPK6 feltételezett szubsztrátjainak azonosítása.....	72
6. Megbeszélés	74
7. Következtetések	78
8. Összefoglalás.....	80
9. Summary	81
10. Irodalomjegyzék.....	82
11. Saját publikációk jegyzéke.....	93
11.1. Az értekezés témájához kapcsolódó közlemények	93
11.2. Egyéb közlemények	93
12. Köszönetnyilvánítás	94
13. Függelék.....	95

1. Rövidítések jegyzéke

(d)CTP	(dezoxi)-citozin-trifoszfát
(d)GTP	(dezoxi)-guanozin-trifoszfát
2,4-D	2,4-diklórfenoxi-ecetsav
28S	a riboszóma nagy alegységének RNS molekulája
35S promóter	karfiol mozaik vírus növény-specifikus promótere
ABA	abszizinsav
ADP	adenozin-5'-difoszfát
AHQr	alaninban (A), hisztidinben (H) és glutaminban (Q) gazdag régió
APC	anafázis promotíng komplex
APS	ammónium-perszulfát
AtMPK	<i>Arabidopsis thaliana</i> MAP kináz
ATP	adenozin-5'-trifoszfát
BiFC	bimolekuláris fluoreszcencia komplementáció
bp	bázispár
BPB	brómfenol-kék
BSA	marha szérum albumin inhibitor
BY2	világossárga dohánynövény sejtvonala (bright yellow-2)
cAMP	ciklikus-adenozin-monofoszfát
CDK	ciklin dependens kináz
cDNS	komplementer DNS
CECF	folyamatos csereforgalmú sejtmentes (continuous-exchange cell-free)
CFCF	folyamatos áramlású sejtmentes (countinuous-flow cell-free)
CGMC	kináz család, ciklin-dependens kinázok, glikogén-szintáz kináz 3, MAPK-ok, kazein kináz II alapján elnevezve
c-Src	proto-onkogén tirozin fehérje kináz Src
DEPC	dietil-pirokarbonát
DNS	dezoxiribonukleinsav
dNTP	dezoxiribonukleotid-trifoszfát
DsPTP1	kettős specifitású fehérje foszfatáz 1
DTT	ditiotritol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EB1	mikrotubulus pozitív vég kötő fehérje
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
ERF6	etilén-válasz elem kötő faktor 6
ERK	extracelluláris szignál-regulált kináz
flg22	flagellin fragment
GCP4	γ -tubulin komplex protein 4
GFP	zöld fluoreszcens fehérje
GOF	konstitutívan aktív (gain-of-function)
GST	glutathion S-transzferáz
HA	hemagglutinin
Halo	haloalkán-dehalogénáz (címke)

HEPES	4-(2-hidroxietyl)-1-piperazin-etánszulfonsav
His ₆	6 db hisztidint tartalmazó címke
HIV	humán immunodeficiencia vírus
HRP	torma-peroxidáz
IPAK	I p21-aktivált kináz
IPTG	izopropil- β -tiogalaktopiranozid
JNK	c-Jun N-terminális kináz
kb	kilobázis
kDa	kilodalton
<i>lacUV5</i> promóter	az <i>E. coli</i> vad típusú lac promóterének a DE3 profágból származó variánsa
LB	Luria-Bertani táptalaj
LIC	ligálás-független klónozás
LOF	kináz inaktív mutáns (loss-of-function)
<i>lon</i> proteáz	bakteriális, ATP-függő szerin-proteáz
MAP2	mitogén-aktivált protein 2
MAPK/MPK	mitogén-aktivált protein kináz
MAPKK/MKK	mitogén-aktivált protein kináz kináz
MAPKKK	mitogén-aktivált protein kináz kináz kináz
MBP	mielin bázikus fehérje
MKP	MAP kináz foszfatáz
MP2C	növényi fehérje-foszfatáz 2 C
mRNS	hírvivő RNS
MS	Murashige & Skoog növényi tápoldat
myc	a c-myc transzkripció faktor epitópja (EQKLISEEDL)
NLK	Nemo-szerű kináz
NLS	nukleáris lokalizációs szekvencia
NMR	mágneses magrezonancia
NTP	nukleotid-trifoszfát
OA	okadánsav
OD	optikai denzitás
<i>ompT</i> proteáz	külső membrán asszociált aszpartát-proteáz
OV	nátrium-ortovanadát
PAGE	poliakrilamid gélelektroforézis
PBS	foszfát puffert tartalmazó sóoldat
PCR	polimeráz láncreakció
PEG	polietilén-glikol
p-ERK	foszforilált ERK
POD	torma-peroxidáz konjugált antitest
PP2A	szerin/treonin specifikus foszfatáz
PP2C	protein foszfatáz 2 C
PTP1B	tirozin specifikus foszfatáz
PVDF	poli(vinilidén-fluorid)
RNS	ribonukleinsav
ROS	reaktív oxigén gyökök
rpm	fordulatszám/perc

SAMK	stressz-aktivált MAPK útvonal
SDS	nátrium-dodecil-szulfát
SH3	SRC homológia domén
STIM1	sztrómális kölcsönható molekula 1
TAE	Tris-ecetsav-EDTA puffer oldat
TBS	Tris-NaCl puffer oldat
TE	Tris-EDTA puffer oldat
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil-etilén-diamin
TEV	dohány karcolatos vírus
T _m	olvadási hőmérséklet
Tris	tris-(hidroximetil)-amino-metán
tRNS	transzfer RNS
U	unit
UTP	uridin-trifoszfát
UV	ultraibolya
WT	vad típus (wild-type)

2. Bevezetés

2.1. A fehérjeszintézis lehetséges módjai

A teljes emberi DNS állomány feltárása óta, az új generációs szekvenálás megjelenésével ma már közel 4000 organizmus (304 eukarióta, 3365 baktérium és 198 ősbaktérium) genomját ismerjük [1]. A funkciót reprezentáló fehérjék szerkezetének és szerepének feltárása a modern tudomány egyik központi érdeklődési területe, az ehhez kapcsolódó kutatásokat az utóbbi évtizedekben számtalan Nobel-díjjal jutalmazták. Az élő szervezetekben a fehérje a legnagyobb mennyiségben előforduló molekulatípus a víz után, mégis az egyes célfehérjék előállítása számít a posztgenomikus kutatások szűk keresztmetszetének. A proteomikai vizsgálatoknál kulcskérdés, hogy a vizsgálni kívánt fehérje előállítható-e natív térszerkezetben és preparatív mennyiségben. A célfehérje előállítása alapvetően három módon mehet végbe: kémiai szintézissel, *in vivo* expresszióval vagy *in vitro* sejtmentes fehérjeszintézissel. A rekombináns fehérjék előállítására nincs egy általánosan elfogadott, optimális módszer, minden egyes fehérje esetében az adott fehérje tulajdonságait, tervezett felhasználását, szükséges mennyiségét és a módszerek költségeit figyelembe véve szükséges kidolgozni a legmegfelelőbb módszert.

2.1.1. Kémiai szintézis

A fehérjék kémiai szintézissel történő előállítása, azaz a polipeptidlánc felépítése aminosav építőkövekből, kémiai reakciók segítségével, egészen a XX. század elejére nyúlik vissza, amikor Emil Fischer előállította az első dipeptidet, a glicil-glicint [2]. Egy évvel később Fisher a Nobel-díj átadó beszédében előrevetítette a fehérjék, enzimek előállításának lehetőségét [3], majd 1907-ben egy 15 glicinből és 3 leucinből álló peptidláncot sikerült előállítania, amely akkor elképesztő eredménynek számított. Ötven év múlva megalkották az első szintetikus peptidhormont, az oxitocint [4]. A módszer fejlődésének történetében áttörést jelentett a szilárd fázisú peptidszintézis és ennek automatizálása, így állították elő Gutte és Merrifield az első szintetikus enzimet a ribonukleáz A-t [5,6], melyért Merrifield-et 1984-ben Nobel-díjjal jutalmazták. A folyamat során az α -amino csoporton és az oldalláncon védett aminosavat szilárd hordozóhoz rögzítve, aktivált aminosavakat hozzáadva növelték a peptidláncot. A

módszert alkalmazva előállították a 99 aminosavból álló HIV proteázt, mely lehetővé tette a proteáz-inhibitor komplex szerkezeti leírását, illetve az enzim sztereospecifitását is bizonyították: a D-aminosavakból felépített enzim a D-aminosavakból összeállított peptidet hasította [7]. A jelentős eredmények ellenére a fehérjék mérete korlátot jelentett a kémia szintézisnek; 40 aminosavnál hosszabb polipeptidlánc esetében már jelentősen romlott a kapcsolat hatékonysága, a szekvencia hűsége. A természetben előforduló átlagos fehérjeméret ezzel szemben körülbelül háromszáz aminosavnyi, azaz a legtöbb fehérje nem előállítható egyes aminosavak egymáshoz való kapcsolásával. Áttörést jelentett a ligációs eljárás, amellyel szintetikus peptidek amidkötésekkel való összekapcsolásával építették fel a teljes fehérjét [8,9,10]. Egy japán kutatócsoport ily módon 26 peptidfragmentből állította össze a teljes, 238 aminosavból álló zöld fluoreszcens fehérjét (GFP), melynek fluoreszcencia spektruma teljesen megegyezett a natív GFP-jével, bizonyítva a fehérje funkcionalitását [11]. Ma már a kémiai szintézis újabb módszereivel akár automatizálva is állítanak elő véralvadási faktorokat [12,13], glikozilált [14], foszforilált [15], fluorofórral [16] vagy izotóppal [17] jelölt fehérjéket. Tehát a határt elméletben csak a kémikusok fantáziája jelentheti, viszont ezen módszerek technológiai és műszer igénye továbbra is igen magas, így rutin alkalmazásra nem alkalmasak

2.1.2. *In vivo* expressziós rendszerek

Napjainkban az egyik legelterjedtebb és leghatékonyabb fehérjetermelési módszer az *in vivo* expressziós rendszerek alkalmazása, ahol baktérium-, élesztő-, emlős-, rovarsejtekben vagy egyéb organizmusokban történik az expresszió. A megfelelő rendszer kiválasztásánál az expressziós szintet, a poszttranszlációs módosítások (melyből már több mint 200-at azonosítottak) és a célfehérje biológiai aktivitásának meglétét, a sejtkultúra kezelhetőségét és költségét, illetve a folyamat időigényét célszerű figyelembe venni.

2.1.2.1. Bakteriális expresszió

A nagy mennyiségű célfehérje termelésére a rekombináns DNS technológia segítségével, *E. coli* alapú rendszerben egyszerűen és gazdaságosan van lehetőség. A mikroorganizmusok közül az *E. coli* genomja viszonylag régóta ismert, így közel száz féle eukarióta fehérje termelésre specializált mutáns törzs és több száz klónozó vektor

áll a tudomány szolgálatában [18]. A fehérje szintézis hatékonyságát fokozhatjuk a megfelelő gazdatörzs, plazmid kiválasztásával, továbbá az mRNS stabilitásának növelésével vagy kodon-optimalizálással [19]. A bakteriális rendszer legnagyobb hátránya, hogy nem képes az eukarióta fehérjék megfelelő poszttranszlációs módosítására, így a rekombináns eukarióta fehérjének gyakran nem sikerül felvennie a másodlagos térszerkezetét és zárványtest formában kiválik. Ez a probléma legtöbbször a citoplazmában történő fehérjetermelés során figyelhető meg, de szekretált fehérjék esetén a periplazmás térben is megjelenhetnek zárványtestek [20]. Hogy melyik fehérjéből lesz zárványtest és melyikből nem, bizonyossággal nem lehet előrejelezni, viszont azt kijelenthetjük, hogy a diszulfid hidat tartalmazó fehérjék nagyobb eséllyel alkotnak zárványtesteket. A zárványtestek és részlegesen hajtogatott fehérjék között dinamikus egyensúly alakul ki, mely olyan paraméterekkel befolyásolható, mint a hőmérséklet, az indukció mértéke, a tápoldat összetétele, oldhatóságot növelő affinitás címkék alkalmazása vagy dajkafehérjék koexpressziója. A zárványtestek a proteázokkal szemben ellenállóbbak, kinyerésük is egyszerűbb, mint az oldott fehérjéké és a kapott fehérjék minden további tisztítás nélkül több mint 90%-ban homogének. A sejtekből való kinyerésük után kaotróp vegyületekkel (guanidin-hidroklorid, karbamid) oldatba vihetők. A kaotróp vegyületek hidrogén kötések kiépítésére alkalmasak, így nagy koncentrációban állítható elő vizes oldatuk is. Ezek a vegyületek a vízmolekulák szabályos, térhálós szerkezetét megtörik, és így a fehérjemolekuláknak nagy eséllyel „kaotróp burkot” alakítanak ki a hidrátburok helyett. Ily módon vízben oldhatatlan anyagok is oldatba vihetők. A natív térszerkezet sikeres kialakítására, az ún. „refoldingra”, nincs általános módszer, sokszor nehézségekbe ütközik a folyamat optimalizálása. Az aggregátum képzés irreverzibilis folyamat, így a legkézenfekvőbb megoldás, ha a molekulákat távol tartjuk egymástól, azaz kihígítjuk az oldatot. Mérések alapján a visszahajtogatódás sebessége ezerszeres hígítás esetén ezerszeresére csökken, az aggregátumképződés viszont egymilliomod részére [20]. A natív forma kialakításának megkísérlése történhet még adszorpciós kromatográfiás eljárásokkal vagy dajkafehérjék hozzáadásával [21]. A visszahajtogatódás optimalizálása nem evidens feladat, gyakran nehézségekbe ütközik, így a fehérjetúltermelés során a zárványtestek kialakulása általában nem kívánatos.

A leggyakrabban alkalmazott fehérjeexpressziós *E. coli* törzs a BL21. A BL21(DE3) törzs pedig a BL21 egy módosított változata, mely a *lacUV5* promóter szabályozása alatt hordozza a DE3 profág T7 RNS-polimeráz génjét, így alkalmas IPTG indukálta génexpresszióra. A *lacUV5* promóter a *lac* promóter egy variánsa, mely a vad típusú promóterhez képest kevésbé érzékeny a katabolit represszióra. Emellett ebben a BL21(DE3)-ban két endogén proteáz inaktív, így ebben a törzsben várhatóan nagyobb lesz célfehérje stabilitása más törzsekhez képest. Az egyik egy ATP-függő szerinproteáz, a *lon* proteáz, melynek feladata a rosszul hajtogatott fehérjék eltávolítása az intracelluláris térben. A másik egy, a külső membránhoz asszociált aszpartát-proteáz az *ompT* proteáz, amely a fehérjetisztítás során degradálhatná a fehérjét [22].

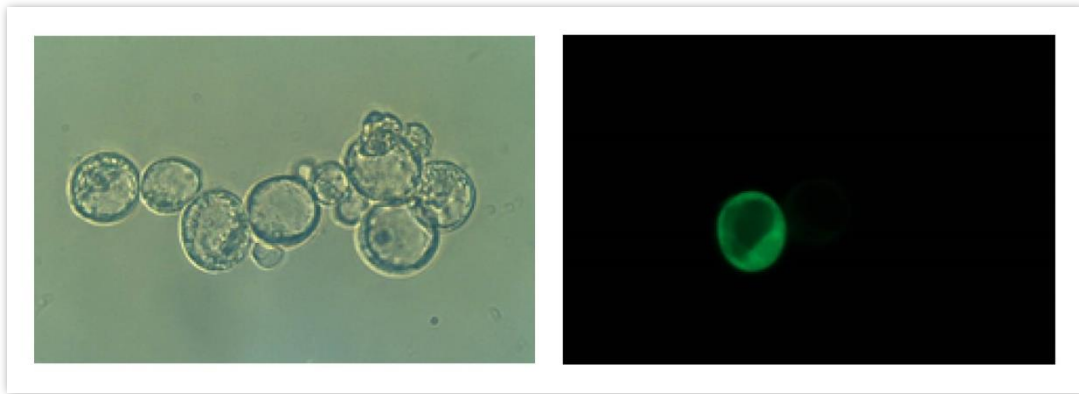
A T7 RNS polimeráz alapú pET rendszer 1986 óta a leggyakrabban használt bakteriális fehérjetúltermelő szisztéma. Lényege, hogy hibridpromóterek és a *lac* operon alkalmazásával, nagy szelektivitással indukálható a célfehérje termelése. A T7 rendszerekben a baktériumokat egy komplex tápoldatban növesztik a log fázis középső szakaszáig ($OD_{660nm}=0,4-0,6$), majd a fehérjetermelés IPTG (izopropil- β -tiogalaktopiranozid) hozzáadásával indukálják. A célfehérje mennyisége akár az összfehérje 50%-át is elérheti három óra alatt. A protokoll megköveteli a sejtnövekedés optikai denzitás mérésével történő szigorú ellenőrzését, mivel az indukciónak az exponenciális növekedési fázisban kell bekövetkeznie.

A hagyományos fehérjetermelésre nyújt vonzó alternatívát az autoindukciós eljárás, melynek lényege, hogy a baktériumok olyan médiumban nőnek, melyben számos nyomelem mellett laktóz és glükóz is található [23]. A késői log fázisban a fehérjeexpresszió automatikusan indukálódik azáltal, hogy a laktózon kívül minden más szénforrás elhasználandó, illetve a cAMP szint megemelkedik. Glükóz hiányában tehát a sejt laktózt vesz fel, átalakítja glükózzá és galaktózzá, amiből az allolaktóz keletkezik, ami indukálja a *lacUV5* promóteren a T7 RNS polimeráz termelését, amely a T7 promóterhez kötve elindítja a célfehérje expresszióját. A módszer számos előnnyel rendelkezik az IPTG-vel történő indukcióval szemben: nem szükséges kontrollálni a sejtek növekedését az induktor hozzáadása előtt, a módosított körülmények között felnövő sejtek nagyobb sejttömeget érnek el, magasabb lesz a fehérjehozam, nem szükséges beavatkozni a folyamatba, az inkubálás történhet éjszakán át is, illetve nem kell számolni az IPTG magas költségeivel.

2.1.2.2. Tranziens fehérjeexpresszió növényi sejtekben

A jelátviteli folyamatok tanulmányozása során célszerű az érdeklődés középpontjában álló fehérje viselkedését *in vivo* körülmények között, az adott organizmusban is tanulmányozni. A rekombináns fehérjéket növényekben is képesek vagyunk termeltetni, ezt metodikailag legegyszerűbben sejt kultúrákban valósíthatjuk meg. Különböző növényekből származó szuszpenziós sejt kultúrák már hosszú ideje léteznek, úgymint a dohány BY2, a kukorica, a petrezselyem, a szója, a répa vagy a paradicsom [24].

Az *Arabidopsis thaliana*, magyarul lúdfű, növényi modellorganizmus különböző részeiből is készíthetőek stabil, homogén, szuszpenziós sejt kultúrák, melyeken *in vivo* tanulmányozhatók a növényi jelátviteli folyamatok. Az így növesztett sejtek fenntartása nagy körültekintést és szakértelmet igényel, megfelelő körülmények között és megbízható protokoll birtokában korlátlan osztódásra képesek. Habár bizonyos folyamatok szövetspecifikusak, az univerzális jelátviteli útvonalak vizsgálatánál mellékes a sejtek eredete [25]. A szuszpenzióból származó sejtek celluláz, hemicelluláz és pektináz enzimek keverékével történő kezeléssel a sejt fal eltávolítható, azaz létrehozhatók a protoplasztok, melyek direkt transzformálhatóak a célfehérjét kódoló plazmid DNS-sel, és egy éjszakán át tartó inkubálást követően tranziens fehérjeexpresszió érhető el. A folyamat sikerességében döntő szerepet játszik az enzimidat tisztasága, az alkalmazott ozmotikum (mannitol, szorbit), illetve a növényi minta kora és állapota. Számos módszer van a DNS protoplasztba való bejuttatására, melyek közül a leggyakrabban alkalmazott a polietilén-glikol (PEG) mediált transzformáció. Ez a módszer egyszerű, hatékony, és lehetőséget nyújt számos minta egyidejű kezelésére, mindemellettt nincs különösebb eszköz- és műszerigénye [26]. A protoplasztok ozmotikusan stabil közegben eredeti alakjuktól függetlenül gömb alakot vesznek fel, és a megfelelő sterilitás és tápoldat esetén azonnal megindul sejt faluk visszaépítése (1. ábra). A tranziens expresszióhoz általunk alkalmazott vektor a munkacsoportunk által módosított, affinitás címkével ellátott változata az eredeti pRT100 vektornak [27]. A vektor a 35S promótert, a karfiol mozaik vírus erős, növény-specifikus promóterét tartalmazza és ampicillin antibiotikum rezisztencia gént. A protoplasztokon a transzformálás után különféle kezelések is végezhetők.



1. ábra. *Arabidopsis thaliana* protoplasztok. Gyökér sejtuszuszenzióból származó, AtMPK9-GFP-t túltermelő fénymikroszkópos (balra) és fluoreszcens mikroszkópos képe (jobbra).

2.1.3. *In vitro* transzláció

A fehérje-fehérje kölcsönhatások és az azokon alapuló sejten belüli jelátviteli folyamatok vizsgálatára számos módszert ismerünk, ezek közül – a viszonylagosan könnyű kivitelezhetőségük miatt – nagy jelentőségük van a különböző *in vitro* megközelítéseknek. Ezeknek az eljárásoknak egyik gyakori limitáló faktora a vizsgálandó fehérjékhez való hozzáférhetőség, mivel a kísérletekhez szükségünk van a natív térszerkezetű, preparatív mennyiségű, szolubilis célfehérjére. A célfehérje tisztítása sejtes túltermelő rendszerekből számos alkalommal nehézségbe ütközik, költséges és kevésbé hatékony.

Az 1950-es évek elejére tehető a sejtmentes biológiai módszerek megjelenése. Az elképzelés az volt, hogy az összetett biológiai rendszerek reprodukálása, tanulmányozása és a bennük rejlő lehetőségek kiaknázása megtörténhet élő, intakt sejt nélkül is. Ily módon a sejtmembrán hiánya miatt megszűnik a transzport limitáló szerepe és lehetővé válik a folyamat követése, a szubsztrátok hozzáadása, a termékek eltávolítása [28]. A sejtmentes *in vitro* transzlációs rendszerek megjelenése mérföldkönek számított a molekuláris biológiai kutatások szempontjából. Hiszen jelenlegi molekuláris biológiai ismereteink számottevő részét – a genetikai kódról, az mRNS-ről, a riboszóma funkciójáról, a transzláció és transzkripció kapcsolatáról, a transzláció mechanizmusáról, szabályozásáról és a hozzá szükséges kofaktorokról – az *in vitro* transzlációs rendszereknek köszönhetjük.

Valójában a translációs rendszer stabilitása nem is olyan meglepő, hiszen a sejt túlélésének egyik kulcsmomentuma lehet, hogy a fehérjék szintézise még kedvezőtlen körülmények közt is működjön. A kezdeti sejt kivonaton alapuló rendszerek csak a sejt feltáráskor épp a riboszómához kötött mRNS-ről történő fehérje translációjára voltak képesek. Nirenberg és Matthaei 1961-ben alkalmazott először exogén mRNS hozzáadásával működő, sejtmentes baktérium lizátumot. Kísérletük során *E. coli* sejt lizátumot és egy poliuracil RNS-t alkalmaztak, amiről így egy kizárólag fenilalanint tartalmazó polipeptid képződött, így az első megfejtett kodon az ő nevükhöz fűződik [29].

A jelenlegi sejtmentes rendszerek előnyei, hogy egyszerűen, gyorsan, nagy hatékonysággal képesek preparatív mennyiségű fehérje termelésére. A legtöbb translációs rendszer különféle totál sejt kivonatokon alapszik, melyek tartalmazzák az endogén riboszómákat, a translációs faktorokat (iniciációs, elongációs és terminációs), aminoacil-tRNS-szintetázokat, tRNS-eket, illetve a hozzáadott mRNS templátot, kreatin-foszfátot, kreatin-kinázt, aminosavakat. Az elegy az aminosavak aktiválásához szükséges ATP-t, a fehérjék elongációjához szükséges GTP-t is tartalmazza, míg az ATP regenerálásáról a kreatin-foszfát, kreatin-kináz rendszer gondoskodik [30]. Lehetőség van továbbá akár radioaktívan (³⁵S-metionin/cisztein, ¹⁴C-leucin NMR-hez), fluoreszcensen (Bodipy-FL lizin) jelölt vagy nem természetes aminosavak beépítésére [31,32]. A sejtmentes rendszerek számos területen bizonyították használhatóságukat, úgymint a gyógyszeripari fehérjék gyártása [33,34,35,36], a nagyléptékű mikrobiológiai fermentációs fehérjetermelő ipari technológiák felváltása [37] és fehérje könyvtárak létrehozása [38].

Kezdetben egyfázisú *in vitro* translációs rendszereket alkalmaztak – azaz egy adott térfogatú tesztcsőben végezték a reakciót – melynek korlátait a rövid életidő és az alacsony fehérjehozam jelentették. A translációhoz szükséges nagy energiájú foszfát felhasználásával anorganikus foszfát halmozódik fel, melyek a magnéziumionnal – mely ion a riboszóma alkotórészeinek összeállításához nélkülözhetetlen – komplexet képezhetnek, így gátolhatják a fehérjeszintézist. Továbbá, a reakció során az energiakomponensek elfognak vagy a termékek, illetve a melléktermékek koncentrációja elér egy kritikus határt, amely már gátolja a translációt. A későbbiekben folyamatosan táplált rendszereket (continuously fed cell-free system) kezdtek

alkalmazni, mely révén radikálisan megnőtt mind a hozam, mind a reakció időtartama. A módszer alapelve, hogy folyamatosan eltávolítják a reakciótermékeket (fehérjék, szabad szerves foszfát, nukleozid-monofoszfát) és folyamatosan pótolják a felhasznált szubsztrátokat (aminosavak, NTP-k, energia regeneráló komponensek). A megközelítés hatékonyságát jól jelzi, hogy míg az egyfázisú reakciónak 10-240 perc volt az élettideje, addig az utóbbiban a fehérjetermelés akár két hétig is fenntartható volt és 10 mg/ml fehérjehozam is elérhető volt.

A folyamatosan táplált rendszerek alapvetően három csoportra oszthatók: a folyamatos csereforgalmú (continuous-exchange cell-free, CECF), a folyamatos áramlású (continuous-flow cell-free, CFCE) és a kétrétegű rendszerek. A CECF rendszerben egy dialízis membrán választja el a reakcióelegyet a tápláló oldattól, így passzív diffúzió következtében a melléktermékek és a szubsztrátok pórusméretétől függően kicserélődhetnek a membrán két oldalán. A CFCE rendszerekben egy ultraszűrős membrán tartja vissza a transzláció nagyobb komponenseit, miközben a szubsztrátokat tartalmazó oldat áramlik át a reakció téren. A membránon a melléktermékek és a termelt fehérje is átdiffundálhat. A kétrétegű reakció a legegyszerűbben kivitelezhető folyamatosan táplált rendszer, melyben a nagyobb sűrűségű reakcióelegyet a tápláló oldat alá rétegezik. Ebben a felállásban az inkubációs idő alatt a határretegen átdiffundálnak a komponensek, majd végül homogén oldat keletkezik [39].

Az általánosan használt, kereskedelmi forgalomban kapható sejtmentes rendszereknek *E. coli* sejtek, nyúl retikulociták, búzacsíra vagy éppen rovarsejtek teljes fehérjekivonatai szolgálnak alapul. Érdekességként megemlíthető, hogy léteznek élesztősejt alapú [40], humán HeLa sejt alapú [41], *Leishmania* protozoa alapú [42] *in vitro* transzlációs rendszerek is. A leggazdaságosabb, legegyszerűbb, legjobban leírt módszer a prokarióta *E. coli* alapú fehérjeexpresszió, amely 500 µg – 1 mg/ml fehérjét képes termelni 2 óra alatt egyfázisú reakcióban. Ebben a rendszerben a transzláció és a transzkripció egymáshoz kapcsoltnak, egy pufferben, gyakorlatilag azonos időben megy végbe. Az *E. coli* alapú sejtes és sejtmentes fehérjetermelő rendszerek korlátjai megegyeznek, azaz az eukarióta fehérjék poszttranszlációs módosításai nem következnek be és gyakran hajtogatóadásuk sem megy végbe megfelelően. Ugyanakkor megemlítendő, hogy a bakteriális transzlációs rendszer reakció körülményeit módosítva

diszulfid izomeráz és chaperonok hozzáadásával diszulfid híddal rendelkező fehérjék szintézisére is lehetőség van, melyek terápiás vakcinák gyors és gazdaságos előállítását teszik lehetővé [34]. A prokarióta eredetű *in vitro* transzlációs rendszerekkel szemben az eukarióta rendszerek relatívan kevesebb fehérjét termelnek, viszont a szintetizálódott proteinek jobb eséllyel veszik fel a natív térszerkezetet, így alkalmazásuk sok esetben indokolt.

A sejtmentes módszerek fejlődésének köszönhetően búzacsíra kivonatból egy rendkívül stabil és robusztus, kétrétegű *in vitro* transzlációs rendszert hoztak létre. A búzacsíra embrióban az eukarióta transzlációs rendszer komponensei dehidratált, inaktív állapotban tárolódnak, csírázáskor viszont hatalmas mértékű fehérjeszintézis indul be. A búzacsíra alapú *in vitro* transzlációs rendszer kifejlesztésében és későbbi sikereiben kulcsfontosságú volt, hogy a fehérjekivonatban azonosították a fehérjeszintézist drasztikusan csökkentő inhibitorokat. Ezek között található a tritin, egy olyan endogén riboszóma inhibitor, amely RNS N-glikozidáz aktivitása révén egy adenint távolít el a riboszómális 28S RNS egy konzervált hurokjáról [43]. A továbbiakban azonosították a transzláció iniciációját gátló tionint is [44]. Ezek az inhibitorok az endospermiumban lokalizálódnak és funkcionálisan valószínűsíthetően a magasabb rendű növények vírusok elleni védekezésben játszhatnak szerepet [45], de az is elképzelhető, hogy a növények saját transzlációs apparátusának szabályozását szolgálják. A korábbiakban készült búzacsíra alapú *in vitro* transzlációs elegyek hatékonyságát radikálisan csökkentették ezek az inhibitorok, a jelenleg alkalmazott protokollok azonban a csíra intenzív mosásával eliminálják az endospermiumot, így fokozzák a kapott rendszer transzlációs aktivitását [46].

A fehérjék előállításánál komoly kihívást jelenthet a célfehérje tiszta formában történő kinyerése. Ebből a szempontból a sejtes rendszerekhez hasonló nehézség merül fel az *in vitro* transzláció során is, nevezetesen a magas endogén fehérje koncentráció. Megfelelő affinitás címkék használatával és nagy hatékonyságú affinitás tisztítási technikák alkalmazásával ez a probléma általában legyőzhető. Mivel a fehérjeszintézis komponensei részletesen ismertek, az endogén fehérje háttér a lehető legnagyobb mértékű minimalizálása egy újabb alternatíva a fehérjék tiszta formában való előállítására. Az ezt a logikát követő rendszer tartalmaz 32, His₆-címkével ellátott, rekombináns fehérjét: a prokarióta iniciációs, elongációs, elbocsájtó (release)

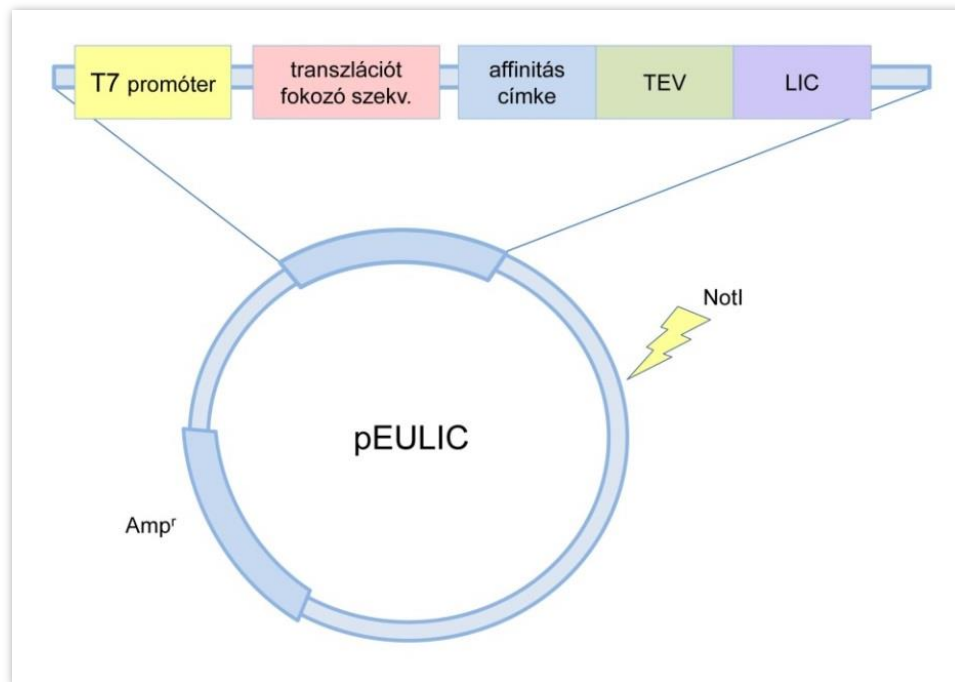
faktorokat, T7 RNS polimerázt, metionil-tRNS-transzformilázt, 20 aminoacil-tRNS-szintetázt és a baktériumból tisztított riboszómákat. Emellett található benne 46 tRNS, NTP-k, kreatin-foszfát, 10-formil-5,6,7,8-tetrahidrofólsav, 20 aminosav, kreatin-kináz, miokináz, nukleozid-foszfát-kináz, pirofoszfátáz. A translációt egy centrifugálás követi, mellyel eltávolítják a riboszómákat. A következő lépés egy „reverz” affinitás kromatográfia mivel a Ni-kelet affinitás tisztító oszlop segítségével a His₆-címkével ellátott komponenseket eltávolítjuk, így célfehérje nagy tisztasággal kinyerhető a felülúszóból [47]. A módszer hátránya, hogy hiányoznak belőle a fehérje hajtogatódását segítő dajkafehérjék, így a fehérje natív térszerkezetének kialakulása kétséges.

2.1.3.1. Kétrétegű búzacsíra alapú *in vitro* transláció

A búzacsíra alapú *in vitro* translációs rendszerhez exogén mRNA hozzáadása lehetséges és szükséges. Ennek az az oka, hogy az elegy készítése során a sejtmagot is eltávolítják, így RNS polimeráz sincs jelen. A pEU vektor a rendszerhez kifejlesztett plazmid, amely speciális szekvenciákat tartalmaz a transláció iniciáció hatékonyságának és az mRNA templát stabilitásának növelése érdekében. Az mRNA két végének módosítását az *in vivo* poszttranszkripciók modifikációktól eltérően érték el, mivel a 5'-mGpppG sapka és 3'-poli(A) farok kialakítása módszertanilag megnehezítette a translációsan aktív mRNA nagy tisztaságban történő kinyerését. A sapka helyett a dohánymozaik vírus translációt fokozó Ω szekvencia és a GAA nukleotidtriplet beépítésével elérték, hogy a transláció hatékonysága megközelítette a természetes 5' végű mRNA-ról történő fehérjeszintézisét. A plazmidot előállító kutatócsoport igazolta azt is, hogy a 3' poli(A) faroknak csupán a hossza a lényeges a transláció hatékonyságának szempontjából. Azt találták, hogy az 5' végén GAA Ω szekvenciát tartalmazó és általuk alkalmazott leghosszabb (1626 bp) 3' nem translálódó régióval rendelkező mRNA-ról translálódó fehérjeszintézis sebessége a hagyományos módon módosított mRNA-ról történő szintézissel összemérhető [48,49].

A kívánt fehérjét kódoló DNS pEU *in vitro* translációs vektorba történő klónozása a fehérjeszintézis folyamatának első lépése, az így elkészült rekombináns plazmid szolgál templátul az *in vitro* transzkripcióhoz (2. ábra). A cDNS klónozása az eredeti pEU vektorokba restrikciós enzimekkel történő klónozással zajlik. Munkacsoportunk módosította az eredeti plazmidot, így a továbbfejlesztett, pEULIC vektorokba a cDNS inszertálása ligálás independens klónozással történik, mely nagyobb

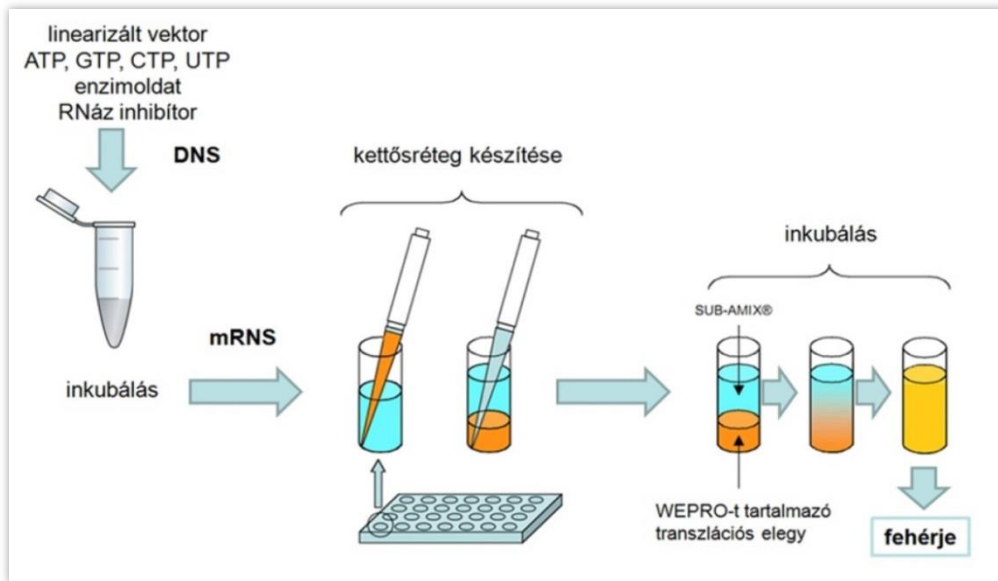
hatékonyságot biztosít, főként nagyszámú klón létrehozása esetén. A laboratóriumunkban továbbfejlesztett vektor tartalmaz egy adott, N-terminális affinitás címkét (His₆, GST, biotin vagy Halo), melyet a TEV (dohány karcolatos vírus) proteáz hasító helyének ENLYFQS aminosav szekvenciája követi, így a címke igény szerint eltávolítható az elkészült rekombináns fehérjéről [50]. Az *in vitro* transzkripció T7 RNS polimeráz alapú rendszerben zajlik, így a plazmid tartalmaz egy T7 promótert is. A módosított pEU plazmidokba *in vitro* mutagenezissel létrehoztunk egy NotI restrikciós endonukleáz hasítóhelyet, mely egy ritka hasítóhely, így több plazmidkonstrukciót lehet egységesen (ugyanazzal az enzimmel) linearizálni a transzkripció hatékonyságának növelése érdekében. Az emésztés az irodalmi adatok alapján a stop kodon után körülbelül 1600 bp távolságban történik.



2. ábra. A transzlációs pEULIC vektor sematikus képe. T7 promóter, transzlációt fokozó szekvencia, affinitás címke: GST, His₆, Halo, biotin, TEV: TEV proteáz hasítóhely, LIC: ligálás-független klónozóhely, Amp^r: ampicillin rezisztencia gén, NotI: NotI restrikciós endonukleáz hasítóhely.

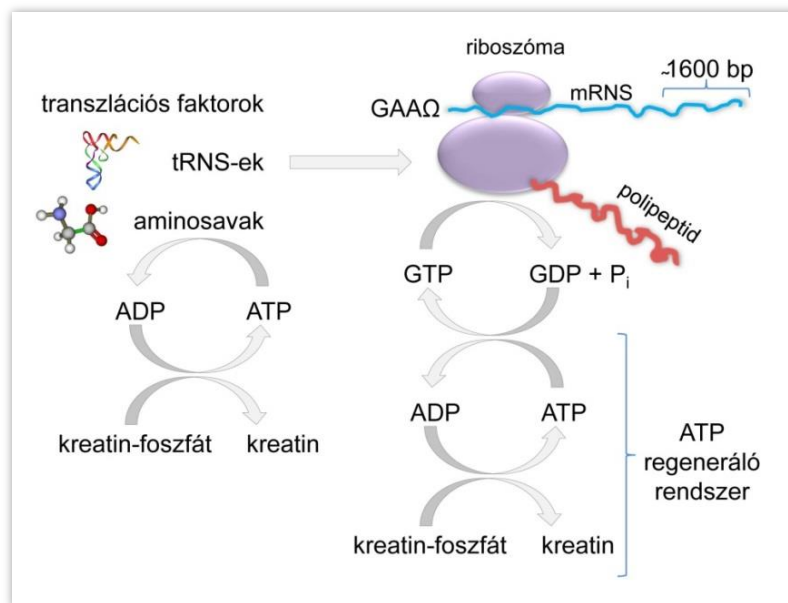
A kétrétegű transzlációs reakció összeállításakor az aminosavakat, energiakomponenseket, kofaktorokat és egyéb reagenseket tartalmazó szubsztrátoldat alá rétegezzük a transzlációs elegyet, mely tartalmazza a riboszómákat, a transzlációs

faktorokat (iniciációs, elongációs és terminációs), aminoacil tRNS szintetázokat, tRNS-eket, a hozzáadott mRNS templátot, kreatin-foszfátot és kreatin-kinázt (3.ábra).



3.ábra. Az *in vitro* transzkripció és a kétrétegű *in vitro* transzlációs rendszer. A narancssárga szín a transzlációs elegyet, a kék szín a tápláló oldatot jelöli.

Az elegy az aminosavak aktiválásához szükséges ATP-t, a fehérjék elongációjához szükséges GTP-t is tartalmazza, míg az ATP regenerálásáról a kreatin-foszfát, kreatin-kináz rendszer gondoskodik (4. ábra) [30].



4. ábra. Az *in vitro* transzláció működése és komponensei. Lila színnel látható a riboszóma, kékkel az mRNS, pirossal az újonnan szintetizált polipeptidlánc.

Az általunk alkalmazott fehérjeszintézis teljes folyamata következőképpen foglalható össze: a célgén felsokszorosítása, ligálás independens klónozás a megfelelő pEU vektorba, a vektor bakteriálisan történő felszaporítása, linearizálás, *in vitro* transzkripció, *in vitro* transláció és fehérje tisztítása affinitás-kromatográfiával. A bemutatott optimalizált módszerrel ideális körülmények között négy nap alatt eljuthatunk a cDNS-től az affinitás címkével ellátott, szolubilis, natív térszerkezetű célfehérjéig.

A búzacsíra alapú, kétrétegű *in vitro* translációs rendszer előnyei összefoglalva tehát a következők:

- alkalmazása egyszerű, költséghatékony és kereskedelmi forgalomból is beszerezhető
- minimális az endogén mRNS tartalma
- az inhibitorok eltávolítása után természetes módon stabil, -80 °C-on vagy liofilizálva évekig tárolható
- akár 1 g/100 ml fehérje termelésére is képes
- magas kodonhasználat tolerancia (más organizmusból származó fehérje esetén)
- automatizálható, így párhuzamos, nagyléptékű, genomi-szintű fehérjetermelés is vizsgálható
- a célfehérjék már a transláció során jelölhetőek fluoreszcens vagy radioaktív aminosavakkal
- nagy fehérjéket is képes termelni az *in vivo* translációval összemérhető sebességgel
- citotoxikus -, membránfehérjék is előállíthatóak
- a termelt fehérjék nagyrészt natív térszerkezetűek és szolubilisak
- etikai kérdések vagy biológiai veszélyek nem merülnek fel, mert nincs élő, rekombináns organizmus

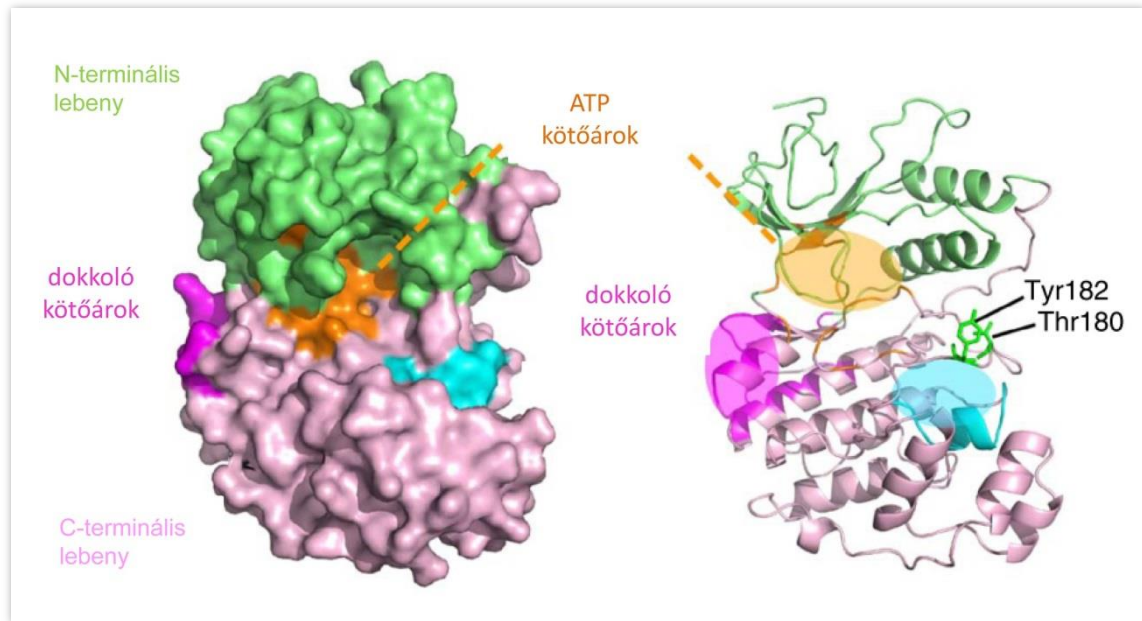
2.2. A mitogén-aktivált protein kinázok

A sejten zajló metabolikus folyamatok, stresszválaszok, sejtosztódás és differenciálódás szabályozását többnyire tranziens fehérje kölcsönhatások komplex hálózata végzi. Az intenzív kutatások ellenére még számos jelátviteli útvonal ismeretlen, illetve több jól ismert útvonal is tartalmaz felderítetlen kapcsolatokat. A folyamatok helyes működése és szabályozása különböző fehérje-fehérje kölcsönhatásokon alapul. A metabolikus folyamatokban résztvevő enzimek kapcsolataira a fehérjék közti nagy érintkezési felületen történő, általában két globuláris domén kölcsönhatásán alapuló, erős kapcsolódás a jellemző. Ezzel szemben a folyamatosan változó és sokoldaló stimulusokra választ adó jelátviteli útvonalak sajátosságai a kisebb felülethez kapcsolható, rugalmas fehérje-fehérje kölcsönhatások [51]. Az interakciók mindkét esetben nagymértékben függenek a fehérjemolekulák poszttranszlációs módosításától, melyek közül a foszforiláció a legáltalánosabb mechanizmus. A fehérje foszforilációját végző kinázok és defoszforilációját végző foszfatázok dinamikus egyensúlya meghatározza a fehérje aktivitását, sejten belüli lokalizációját, stabilitását, kölcsönhatását más fehérjékkel. Ezen mechanizmusok evolúciósan konzerváltak, prokariótában és eukariótában is fellelhetőek és a biokémiai folyamatok összetett szabályozásáért is felelősek [52].

A MAP kinázok a CGMC kinázok szupercsaládjába tartoznak, mely az azt alkotó családok angol nevének kezdőbetűiből kapta elnevezését: ciklin-dependens kinázok, glikogén-kináz 3, MAP kinázok, kazein-kináz II. A mitogén-aktivált protein kinázok (MAPK) a Ser/Thr-kinázok közé tartoznak, 11 szubdoménnel és két lebennyel rendelkeznek. A mitogén-aktivált protein kinázokat eredetileg olyan fehérjeként írták le, mely a MAP2 neuronális mikrotubulus-asszociált fehérje inzulin hatására történő foszforilációjában vesz részt [53]. A MAP kinázok az összes eukarióta szervezet evolúciósan konzervált jelátviteli útvonalaiban megtalálhatóak, úgymint a növényekben, gombákban, állatokban. Minimum három tagból álló kaszkádot alkotnak: a MAP kináz kináz (MAPKKK/MKKK) a modul első tagja. A MAPKKK extracelluláris stimulus hatására általában Ser/Thr-on történő foszforiláció révén aktiválódik, majd foszforilálja a következő MAP kináz kinázt (MAPKK/MKK) annak Ser/Thr-X-X-X-Ser/Thr (emlősök esetén), illetve Ser/Thr-X-X-X-X-X-Ser/Thr (növények esetén) motívumának szerin és treonin aminosavának hidroxilcsoportjait (az X bármilyen

aminosavat jelenthet). A MAPKK-ok foszforilálják a MAP kinázok (MAPK) aktivációs hurkának Thr-X-Tyr (TXY) motívumát. A kaszkád végső elemeit alkotó célfehérjék szerin és treonin oldalláncait a MAP kinázok foszforilálják.

Szerkezetileg minden eukarióta MAP kináz hasonló: rendelkeznek egy körülbelül 250 aminosav hosszúságú katalitikus doménnel, egy rövid, β -redőkből álló N-terminális lebenyből és egy hosszabb, α -hélixekből álló C-terminális lebenyből áll (5. ábra).



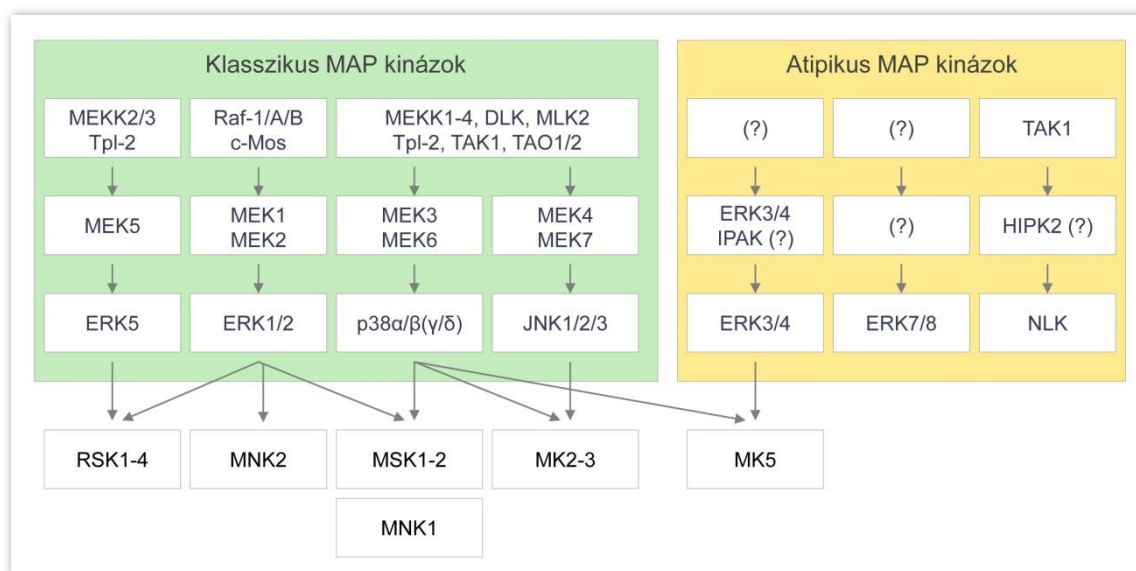
5. ábra. Az ERK2 kináz röntgenszerkezete (balra) és sematikus képe (jobbra). A zöld szín az N-terminális lebenyt, a rózsaszín a C-terminális lebenyt, a narancssárga szín az ATP kötőárat, a magenta szín a dokkoló kötőárat jelöli, az aktivációs hurok Tyr és Thr aminosava a jobb oldali ábrán került feltüntetésre [54].

Az ATP kötőhely a két lebeny között található, a szubsztrát kötésére szolgáló ún. dokkoló kötőárok pedig előbbi mentén. A kináz katalitikus doménjében egy konzervált aminosav szekvencia felelős az ATP γ -foszfát csoportjának átviteléért a szubsztrátban lévő Ser, Thr vagy Tyr aminosavra [51]. A MAP kinázokat két dolog különbözteti meg az egyéb kinázoktól. Jellemző rájuk egy körülbelül 50 aminosav hosszúságú, flexibilis régió a C-terminális lebenyben [55], emellett egyes alcsaládok esetén egy rendezetlen szerkezetű és változó hosszúságú, illetve aminosav összetételű, a C-terminális lebenyt meghosszabbító régió jelenléte. A flexibilis régió, illetve a C-terminális extenzió

funkciója még nem teljesen tisztázott, viszont tömegspektrometriával megállapították, hogy ezek fehérjekötő felszínként játszhatnak szerepet [56].

A MAPK kaszkád funkcionális tanulmányozása érdekében *in vitro* mutagenézissel létrehozhatók a kinázok különböző variánsai. A negatívan töltött aminosavak imitálhatják az oldalláncon bekövetkező foszforilációt, így konstitutívan aktív (GOF, gain-of-function) MAPKK-ok állíthatók elő a szerin/treonin foszfoakceptor aminosav glutamáttra/aszpartátra történő cseréjével [57], viszont MAPK-ok konstitutív aktivációja ily módon nem lehetséges. Foszfomimetikus aminosav beépítése számos esetben nem képes helyettesíteni a foszforilált aminosavat. Ennek oka lehet egyrészt az a tény, hogy a foszforiláció helye adapter fehérje kötőhely is egyben, így a foszfomimetikus aminosavval ellátott mutáns a térbeli viszonyok miatt képtelen lesz a kötődésre. Másrészt a negatív oldalláncú aminosav töltése -1, amely nem egyezik meg pontosan a foszforilált aminosav töltésével amely -1,5 [58]. Ugyancsak *in vitro* mutagenézis révén, az ATP kötőhely konzervált lizinének argininre/metioninra történő cseréjével megalkothatók a MAP kinázok inaktív (LOF, loss-of-function) mutáns változatai.

A MAP kinázokat aktiválódási mechanizmusuk szerint két csoportra oszthatjuk, úgymint klasszikus és atipikus MAP kinázok (6. ábra).



6. ábra. A humán MAP kináz útvonalak és a kinázok csoportosítása. A klasszikus MAP kinázok zöld, az atipikus MAP kinázok sárga alapon jelöltek [59].

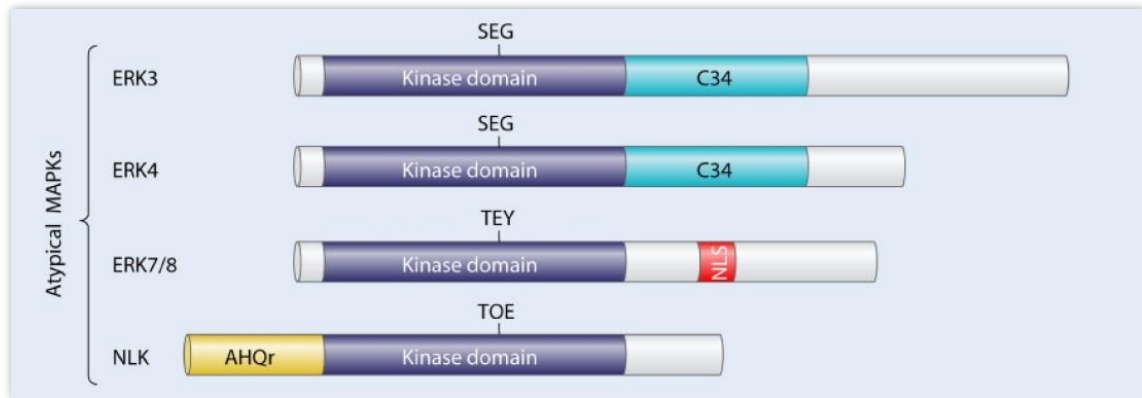
A klasszikus csoport tagjai a konzervált MAPK kaszkádon keresztül foszforilálódnak és nyerik el aktivitásukat. E csoport emlős képviselői az ERK (extracelluláris szignál-regulált kináz) 1/2, a JNK-k (c-Jun N-terminális kináz), a p38 kináz és az ERK5, melyek a feltüntetett sorrendnek megfelelően, a következő kinázok által foszforilálódnak: MKK1/MKK2, MKK4/MKK7, MKK3/MKK6 és MKK5 [59]. A klasszikus MAP kinázok közös jellemzője az aktivációs hurok TXY motívuma a katalitikus doménben, mely motívum foszfoakceptor aminosavain történő kettős, egymást követő foszforiláció a kináz teljes aktiválódásának feltétele. Az ERK1/2 és az ERK5 a TEY, az emlős p38 MAPK a TGY, a JNK MAPK-ok pedig a TPY motívumot tartalmazzák. Kimutatták, hogy az ERK1/2 kettős foszforilációval szabályozott, mely a Thr183 és Tyr185 aminosavon történik, és a kináz aktivitása így 1000-szeresére nő [60,61,62,63]. Ismert, hogy a MAPK-ok prolin irányított kinázok, mivel alapesetben szubsztrátjaikat a prolin mellett N-terminális irányban elhelyezkedő szerin és treonin aminosavak oldalláncán foszforilálják. Igazolták azt is, hogy a TPY motívummal rendelkező MAPK-ok autofoszforilációra is képesek [64].

Az atipikus kinázokra jellemző, hogy speciális, MAPKK-független úton aktiválódnak. Állati sejtekben az ERK3/4, ERK7/8 és a NLK (Nemo-szerű kináz) tartozik az atipikus MAP kinázok közé. Ezen ERK kinázok között alacsony a homológia, de szerkezetileg annyiban hasonlóak, hogy a konzervált kináz doménjükön kívül rendelkeznek egy egyedi és nagyrészt ismeretlen funkciójú C-terminális doménnel [65]. További eltérés még, hogy az ERK 3/4-ben az aktivációs hurok aminosav sorrendje eltér a klasszikus MAP kinázokétól (Ser-Glu-Gly) [66], az ERK7/8 pedig az ERK1/2-höz és az ERK5-höz hasonlóan TEY foszfoakceptor motívummal rendelkezik [67,68]. A családba tartozó kinázok mind aktivációjukban, mind szabályozásukban, mind pedig fiziológiás szerepükben eltérnek a klasszikus alcsaládba tartozó MAP kinázoktól.

2.2.1. Az atipikus MAP kinázok szabályozása

Az atipikus MAP kinázok tagjainak szabályozásáról, szubsztrátspecifitásáról, fiziológiai szerepéről lényegesen kevesebb ismeretünk van, mint a klasszikus MAP kinázokéről. A dolgozat keretein belül kizárólag ezen kinázok autofoszforilációs szabályozási mechanizmusainak részleteit mutatom be, funkcionális szerepükre nem

térek ki. A családba az ERK3/ERK4, a NLK (Nemo-szerű kináz) és a ERK7/8 kinázok tartoznak, melyek sematikus szerkezete a 7. ábra látható.



7. ábra. A humán atipikus MAP kinázok sematikus ábrázolása. Lilával a kináz domén látható, felette a betűk az aktivációs hurok karakterisztikus aminosav tripletjét mutatják, szürkével az extra N- és C-terminális régiók jelennek meg. NLS: nukleáris lokalizációs szekvencia; C34: ERK3/4-re jellemző konzervált régió (conserved region in ERK3/4); AHQr, alaninban (A), hisztidinben (H) és glutaminban (Q) gazdag régió. A feltüntetett hosszúságok méretarányosak [59].

Az ERK3 és ERK4 fehérjék közös jellemzője, hogy tartalmaznak egy kináz domént és egy C-terminális domént. A két fehérje kináz doménje egymással 73%-os homológiát mutat. A C-terminális domén első 150 aminosavja 50%-os azonosságot mutat a két fehérje között, míg a további rész teljes mértékben különböző. Ez a C-terminális domén a gerincesek evolúciója során konzervált, így feltételezhetően fontos, bár jelen pillanatban még ismeretlen funkció tulajdonítható neki. Habár e két fehérje kináz doménje 45%, illetve 42% hasonlóságot mutat az ERK1 kináz doménjével, két fő különbség is van közöttük. Egyik, hogy az ERK3 és az ERK4 az ERK1-ben található TXY aktivációs motívum helyett SEG motívummal rendelkezik, azaz csak egy foszfoakceptor helyet tartalmaznak. A másik eltérés, hogy az ERK3 és az ERK4 kináz doménjében az ERK1-ben található Ala-Pro-Glu motívum helyett Ser-Pro-Arg található [69]. Az arginin jelenléte a humán kinázok esetében egyedülálló, az esetek 93%-ban glutamát található ebben a pozícióban, amely bár nem vesz részt a katalízisben, szerkezet stabilizáló jelleggel bír. A vad típusú ERK3-ban kimutatták a SEG motívum Ser189-en történő autofoszforilációját és kapcsolatát a kináz aktivitással. A foszforiláció a transz-autofoszforilációk csoportjába sorolható, azaz az aktiváció során két molekula

keresztfoszforilálja egymást. Ezt bizonyította, hogy a kináz inaktív mutánsban detektálták a megfelelő foszfoszerint, abban az esetben mikor hozzáadták a vad típusú fehérjét [70]. A hagyományos TXY foszforilációs motívummal rendelkező kinázoknál a két foszforilált aminosav két arginin tartalmú, foszfát kötő zsebbel hat kölcsön a molekulán belül [71]. Annak ellenére, hogy az ERK3 csak egy helyen foszforilálódik, rendelkezik a második foszfát kötő zsebbel is. Ennek pontos funkciója eddig még tisztázatlan, valószínűsítik, hogy szerepe lehet foszfoszubsztrátokhoz való specifikus kötődésben [65]. Amellett, hogy az ERK3/4 autofoszforilálódik és MAPKK-ok nem aktiválják őket, az IPAK-ok (I p21-aktivált kináz) képesek foszforilálni őket, így ezek aktivátor kinázoknak tekinthetők [61]. Eddig nem azonosítottak egyetlen ERK3/4 szubsztrátot sem. Az ERK3 expressziós szabályozása nagyrészt ismeretlen, azt viszont megállapították, hogy proteaszóma inhibitor kezelés hatására szintje megnő, azaz poliubikvitináció nyomán degradálódik [72], és az ismert, hogy az ERK3 nagymértékben instabil fehérje, féléletideje mindössze 30-45 perc [73]. Ezzel szemben az ERK4 turnover-jének szabályozásáról nincs ismert adat, viszont az ismert, hogy az ERK4 stabilitása számottevően nagyobb [65].

A NLK (Nemo-szerű kináz) egy központi kináz doménnal rendelkezik, mely egy N- és egy C-terminális túlnyúló régióval határolt. Az N-terminális doménben található egy glutaminban, alaninban és hisztidinben gazdag régió, mely hasonlóságot mutat transzkripciós faktorok ismétlődő régióival. Ezen régió az NLK ortológjai közt kevésbé konzervált és jelenleg funkciója sem ismert. A C-terminális domén evolúciósan konzervált és szerepet játszhat egyéb fehérjékkel való kölcsönhatásban [74]. Habár az NLK-ban TQE aktivációs hurok motívum található, mely a CDK2 (ciklin dependens kináz 2) THE mintázatára hasonlít, viszont az NLK kináz doménje nagyobb hasonlóságot mutat a MAPK-ok kináz doménjével, mint a CDK-k kináz doménjével. Feltételezték, hogy az aktivációs hurok treoninjának foszforilációja vezet az NLK aktiválódásához, melyet végül ki is mutattak, viszont érdekes módon ezt még nem sikerült *in vivo* kísérletekkel igazolni [75]. Bizonyos sejttípusokban összefüggést találtak a Ca^{2+} /kalmodulin jelátvitel és az NLK aktivációja között [76]. Néhány kinázzal ismert, hogy szerepet játszanak az NLK aktiválásában [76,77], viszont a pontos mechanizmus még feltáratlan.

Az ERK7 kinázban a kináz doménen kívül egy 204 aminosavból álló C-terminális régió található. Kináz doménje az ERK1 kináz doménjével 45%-os hasonlóságot mutat, a C-terminális régió aminosav sorrendje viszont nem hasonlít semmilyen más fehérjére. Utóbbiban két prolinban gazdag régió található, mely SH3 domén ligandként szerepelhet, illetve egy feltételezett nukleáris lokalizációs szekvencia is azonosítottak ebben a doménben. Az ERK7-ben aktivációs hurkában TEY motívum található, melyről eddig még nem bizonyított, hogy bármely MAPKK aktiválná, ellenben autofoszforilációja széleskörűen tanulmányozott és bizonyított [67]. Az ERK7 a MAP kinázok között egyedülálló szabályozással rendelkezik. Azt találták, hogy az ERK7 fiziológiásan, mindennemű stressz nélkül is magas aktivitással rendelkezik, azaz konstitutívan aktív. *In vivo* kísérletekkel kimutatták, hogy a kináz inaktív ERK7 kináz nem foszforilálódik a TEY motívumon, mely azt sugallja, hogy az ERK7 autofoszforilációval aktiválódik. Aktivítására nem hatnak MAPKK inhibitorok és nem aktiválhatóak MAPKK-okkal. A foszforiláció természetének vizsgálata érdekében vad típusú ERK7-hez adtak kináz inaktív ERK7-et növekvő koncentrációban, majd *in vitro* kináz reakciót végeztek. A mutáns nem foszforilálódott a vad típusú aktivitása pedig nem változott, így megállapították, hogy az aktiválódás cisz-foszforilációval, azaz intramolekuláris foszforilációval megy végbe. Létrehozták az ERK7 C-terminális doménen trunkált mutánsait, és azt találták, hogy a legalacsonyabb aktivitása annak a kináznak van, mely a legkisebb C-terminális régiót tartalmazza [78]. Feltételezhetően a C-terminális kölcsönhat a kináz doménnel és indukálja aktiválódását, vagy előfordulhat, hogy valamely eddig nem azonosított más fehérje kötődik a C-terminális doménhez. TEY hurok mutánsok előállításakor megállapították, hogy azok nem rendelkeznek kináz aktivitással, azaz a TEY motívum foszforilációja nélkülözhetetlen a kináz aktivitásához. Bakteriálisan előállított ERK7 fehérje defoszforilációja esetén a treonin defoszforilációja a tirozin defoszforilációjánál sokkal nagyobb mértékben csökkenti a kináz aktivitását. Így megállapítható, hogy az ERK7 aktivitásának fő meghatározója az aktivációs hurokban bekövetkező treonin foszforiláció. Az ERK3-hoz hasonlóan az ERK7 mennyisége fiziológiásan poliubikvitinációval szabályozott és proteolízis által befolyásolt, melyért a kináz domén N-terminális részen elhelyezkedő 20 aminosavnyi régió a felelős [79].

Az ERK7 humán fehérje legközelebbi homológja a patkány ERK8, szerkezeti felépítése hasonló, viszont aminosav szekvenciájukban csupán 69%-os homológiát mutatnak. Azt találták, hogy az ERK8 C-terminálisán elhelyezkedő két SH3 domén kötő motívum révén kötődik az c-Src SH3 doménjéhez és ily módon aktiválódik [68]. A foszforilált aktivációs hurokra specifikus anti-p-ERK ellenanyaggal vizsgálva a bakteriálisan előállított ERK8 kimutatható, bár az ERK7-hez képest lényegesen alacsonyabb affinitással kötődik hozzá az ellenanyag. Mivel viszont igen kicsi az esélye, hogy egy eukarióta kináz a baktériumban aktiválódjon más kinázok által, így ebből autofoszforilációs aktiválódásra következtethetünk. Az autofoszforilációt alátámasztja, hogy a kináz inaktív mutáns anti-p-ERK ellenanyaggal nem volt detektálható. Csakúgy, mint az ERK7 esetében, az ERK8-nál is kimutatták a TEY motívum foszforilációjának szükségességét a kináz aktivitáshoz. Továbbá a foszforilációs hurok egyszeres mutánsai esetén tömegspektrometriával azonosították a másik foszfoaminosavat – a T175A esetén a foszfortreonint, az Y177F esetén pedig a foszfortirozint – viszont ezek a mutánsok nem rendelkeztek kináz aktivitással. Érdekes módon azt találták, hogy a humán HEK-293 sejtben expresszált ERK8 százszor kevésbé aktív, mint a bakteriálisan előállított fehérje [80]. Ennek az lehet a magyarázata, hogy az aktív és inaktív ERK8 mennyiségéért, azaz az autofoszforiláció és a defoszforiláció közti dinamikus egyensúlyért, a baktérium sejtekből hiányzó foszfatázok felelősek. Megvizsgálták az egyes foszfatázok hatását: a bakteriálisan expresszált ERK8 aktivitása – az ERK7-hez hasonlóan – 95%-kal csökkent a szerin/treonin specifikus foszfatáz (PP2A) által történő kezelés hatására, viszont a tirozin specifikus foszfatáz (PTP1B) csupán 15-20%-kal csökkentette az enzim aktivitását. Tehát az ERK8 aktivitásához főként a treonin foszforilációja szükséges, a tirozin foszforilációja másodlagos. Foszfátáz inhibitorokkal kezelt sejteken azt találták, hogy az okadánsav, mely a PP1 és PP2A foszfoprotein-foszfatázokat gátolja, ötszörös aktivitás emelkedést okozott, míg a foszfortirozin-foszfatázokat, illetve a kettős specifitású MKP-okat (MAP kináz foszfatázokat) gátló ortovanadát esetén változás nem volt megfigyelhető. A vad típusú kináz tömegspektrometriás analízisével azonosították az aktivációs hurok aminosavai mellett egyéb foszfoaminosavakat (Ser192, Ser331, Thr352, Ser362, Ser378 és Thr380), míg a mutáns fehérjében az aminosavak nem voltak foszforilálva. Ez az eredmény újabb bizonyítékként szolgált az autofoszforiláció mellett. A Ser362-t és a Thr380-at prolin

követte, amely megfelel az általános MAP kináz foszforilációs helynek, míg a többi foszforilált aminosav szomszédságában más aminosav helyezkedett el [80]. Tehát megállapítható, hogy az ERK8 képes a Ser-Pro/Thr-Pro mintázattól eltérő aminosavakat is foszforilálni.

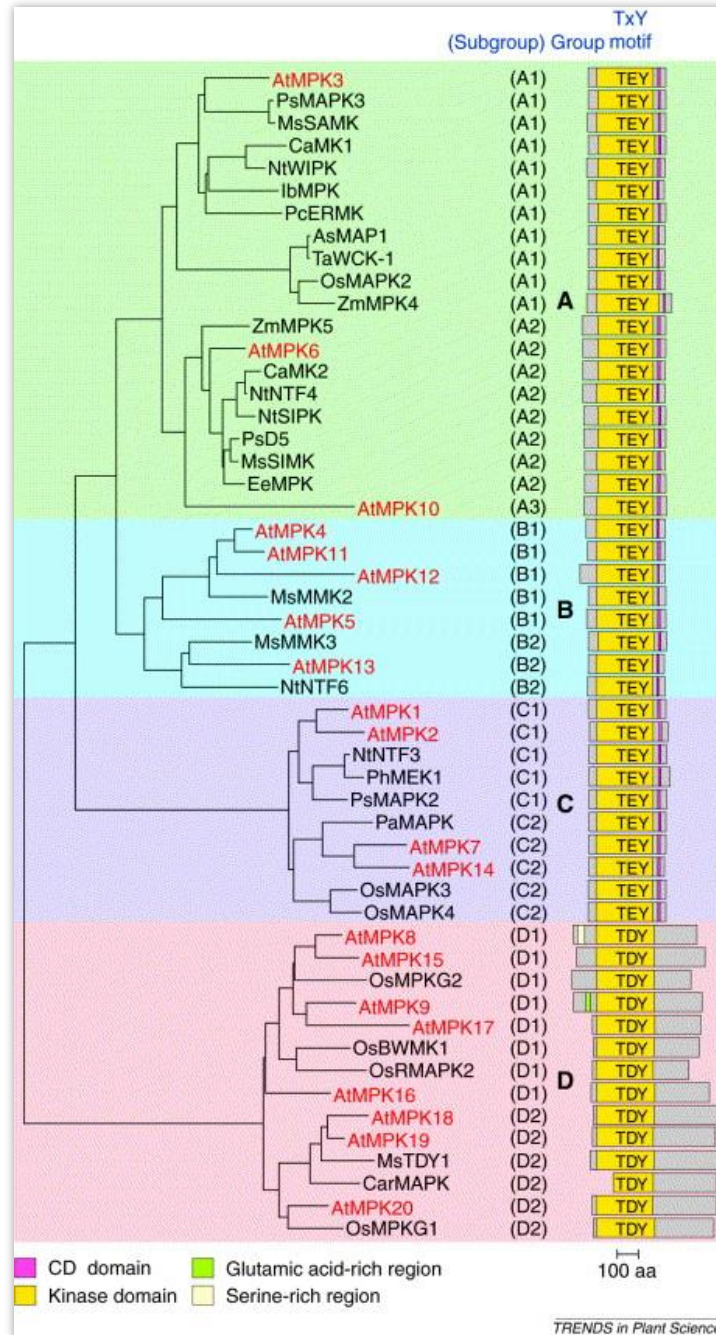
2.2.2. *Arabidopsis thaliana* MAP kinázok

A növényi növekedési jelátvitel tanulmányozása mind mezőgazdasági, mind tudományos szempontból igen fontos. A növények az élő környezetünk részei, élelmiszereink és számtalan gyógyászati hatóanyag forrásai, illetve egyre nő jelentőségük a megújuló energiaforrások szempontjából is. A magasabbrendű növényeknek folyamatosan alkalmazkodniuk kell az állandóan változó környezethez helyhez kötött életmódjuk miatt, adaptálódnak például a hőmérséklethez, a fényhez, a szárazsághoz. Ehhez az adaptációhoz gyors és dinamikus változások szükségesek az enzimaktivitásokban és a génexpressziós szintekben egyaránt. A foszforilációs-defoszforilációs módosítások központi szerepet játszanak a jelátviteli útvonalakban, így nem meglepő, hogy a zöld növények genomjának 5%-a kódol kinázt [81], melyek mintegy 10%-a az MAPK kaszkádba tartozik [82]. Az eukarióták közül a növények rendelkeznek legszerteágazóbb MAPK hálózattal, bizonyítva ezen jelátviteli rendszerek rendkívüli sokoldalúságát. Genetikai kutatások kimutatták, hogy a növényi MAPK-ok nemcsak a biotikus és az abiotikus stresszre adott válaszban, hanem a hormonális és növekedési szignalizációban is részt vesznek. Bár az emlősökben a MAPK jelátviteli folyamatok sémája és tagjai jól ismertek, e tudás sajnálatos módon nem alkalmazható a növényi szervezetekre. Számos jól karakterizált emlős kináz homológja egyszerűen nem található meg a növényekben, ráadásul a foszforilációs helyet prediktáló programok a növényi foszforilációs helyek 40%-át képtelenek kimutatni [83].

Arabidopsis-ban 20 MAPK, 10 MAPKK, 60 MAPKKK ismert, amely a növényi MAPK szignál transzdukciós hálózatok nagyfokú specializáltságára és összetettségére utal [84]. Mivel a MAPKK-ok és a MAPK-ok száma a MAPKKK-ok számánál jóval alacsonyabb, a kaszkádban jelátviteli konvergencia valósul meg.

A növényi kinázok homológiájukat tekintetbe véve négy alcsaládba, a TXY foszfoakceptor hely aminosav sorrendjét tekintve pedig két csoportra oszthatók (8. ábra). A MAP kinázok A-alcsaládjának tagjai többnyire környezeti és hormonális válaszokban, a B-alcsalád tagjainak nagyrészt a sejtciklus szabályozásában, valamint

néhányuk a környezeti stresszválaszban kap szerepet, a C- és D-alcsaládról rendelkezésünkre álló információk jelenleg korlátozottak, így fiziológias funkciójuk is jórészt ismeretlen [85].



8. ábra. A növényi MAP kinázok csoportosítása. Pirossal jelölve az *Arabidopsis thaliana* MAPK-ok, az AtMPK9 a D-alcsaládban található meg. Sárga szín jelöli a MAPK domént, sötét szín a túlnyúló régiókat, többek között a C-terminális domént, a fehér szín a szerinben, a zöld szín pedig a glutamátban gazdag régiót [84].

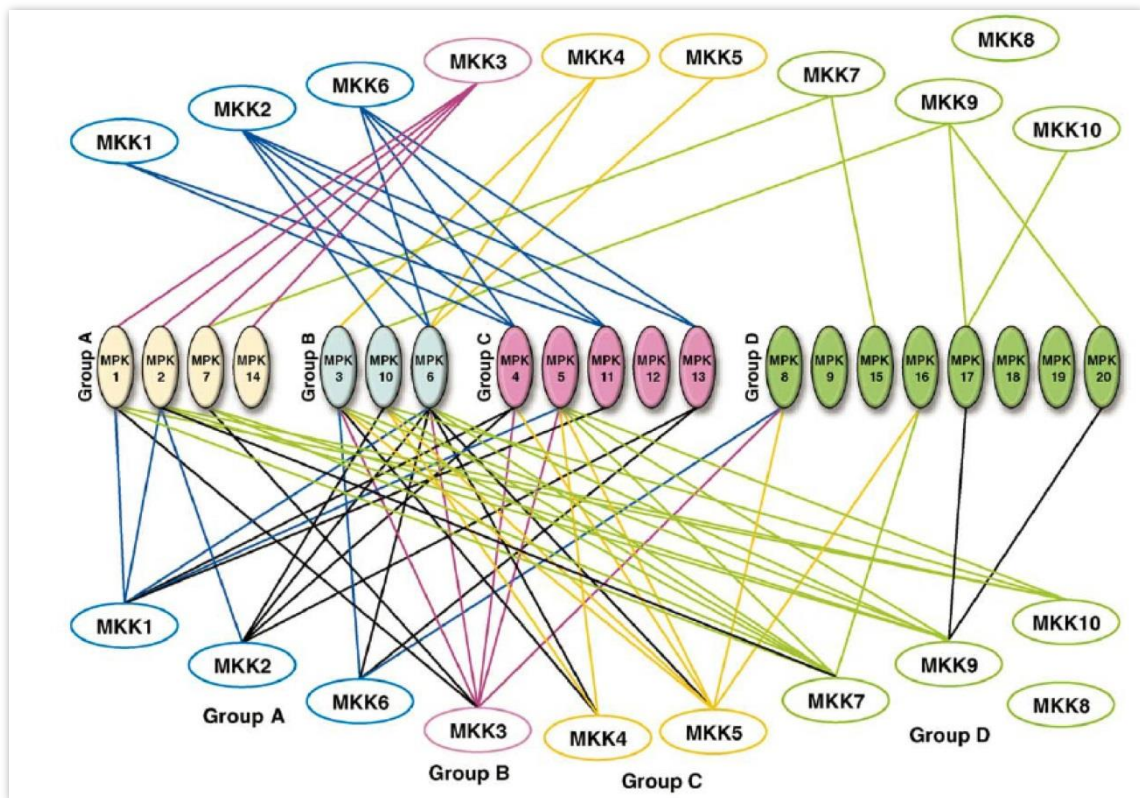
A növényi MAP kinázok első csoportjába sorolhatók azon fehérjék, melyek aktív centrumában TEY motívum található és rendelkeznek a C-terminálisukban dokkoló doménnel (CD: common docking), azaz az A-, a B- és a C-alcsalád. A CD domén megfeleltethető az emlős MAP kinázokra jellemző dokkoló kötőárokknak. A MAPK kaszkádok specificitása a kaszkád komponenseiben azonosított dokkoló domének és a hozzájuk kötődő D-motívumok jelenlétének köszönhető. Érdekes módon a D-motívum nemcsak a MAPK-ok szubsztrátjaiban található meg, hanem az aktiváló MAPKK-okban, deaktiváló foszfatázokban, illetve állványfehérjékben is [86]. A MAPK kaszkád komponensei sok esetben nem közvetlenül hatnak kölcsön egymással, hanem állványfehérjék biztosítják a térbeli közelséget és a specifikus kapcsolódást. A növényi MAPK kaszkádokban szereplő állványfehérjét viszont eddig még nem azonosítottak [87]. Az A-, B-, C-alcsalád tagjai MAPKK-ok által aktiválódva vesznek részt klasszikus MAPK kináz útvonalakban [85].

A másik csoport egyetlen D-alcsaládjára 8 *Arabidopsis* MAPK-t foglal magába és a specifikus TDY aminosav mintázat jellemző rá. A D-alcsalád további jellemzője, hogy tagjai rendelkeznek egy hosszabb C-terminális doménnel, illetve hogy a CD doménre jellemző savas aminosavakat bázikus aminosavak helyettesítik [88]. Emellett megfigyeltek egy extra, 60-80 aminosav hosszúságú szekvenciát is az AtMPK9, AtMPK8 és az AtMPK15 fehérjék N-terminálisán, ezen belül pedig az AtMPK8-ban egy szerinben, az AtMPK9-ben pedig egy glutaminsavban gazdag régiót is azonosítottak [84]. Az ide tartozó MAP kinázok a felsorolt szerkezeti jellegzetességeik alapján valószínűleg a klasszikus kinázoktól eltérő funkcióval is rendelkeznek. Megjegyzendő, hogy a TGY motívumot tartalmazó p38 kinázoknak, illetve a TPY motívumot tartalmazó JNK MAP kinázoknak nem található növényi homológja. Érdekes megfigyelés, hogy a D-alcsaládra jellemző C-terminális domén az algák D-alcsalád-beli MAP kinázainál még nem volt jelen, így feltételezhető, hogy a szárazföldi növények korai evolúciója során jelent meg ez a MAPK alcsalád [88].

Az AtMPK8-ról, mint a D-alcsalád egyetlen eddig tanulmányozott tagjáról kimutatták, hogy *in planta* az AtMKK3 és a kalmodulin aktivációja szükséges a teljes aktivitásához, a TDY hurok AtMKK3 általi foszforilációját viszont nem tudták kimutatni [89]. A kalmodulinnal való kölcsönhatást igazolták élesztő kettős hibriddel és bimolekuláris fluoreszcencia komplementációval (BiFC, bimolecular fluorescence

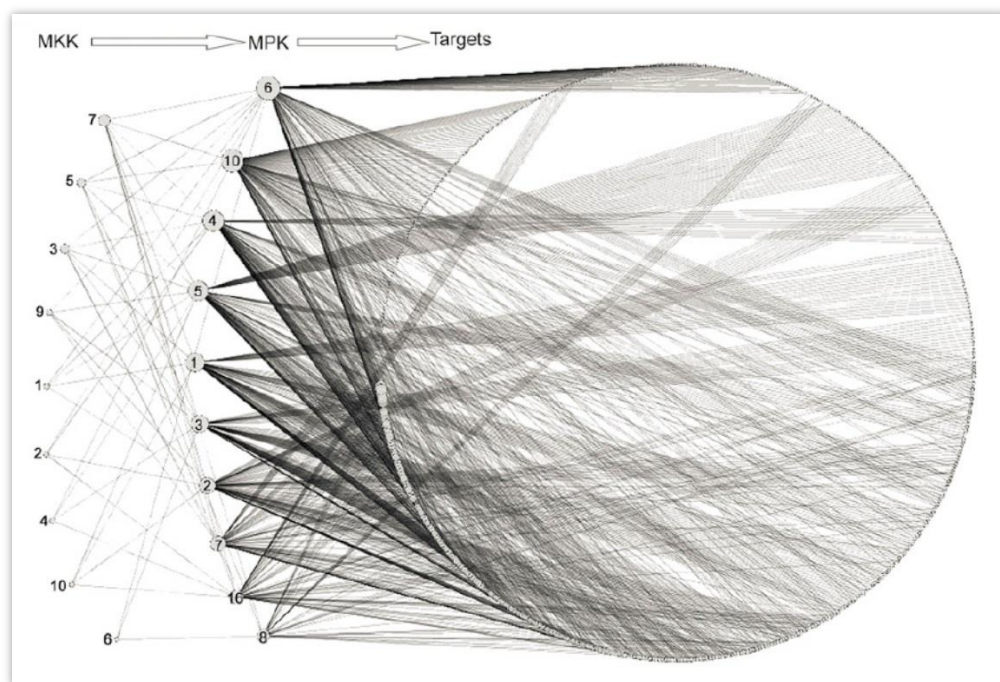
complementation) is. Azt találták, hogy a kalmodulinnal történő tranziens koexpresszió révén mind a vad típusú, mind a foszforilációs hurok egyes, illetve kettős mutáns fehérjének megnő az aktivitása.

Egy közleményben az ismert 20 MAPK és 10 MAPKK közötti élesztő kettős hibrid, *in vitro* és *in planta* kísérletek alapján bizonyított kölcsönhatások hálózatát alkották meg és ábrázolták grafikusán (9. ábra) [90]. Ezek alapján kijelenthető, hogy egy adott MAPK többféle MAPKK által képes aktiválódni, a legtöbb kölcsönhatást az AtMPK6-tal, az AtMPK3-mal és az AtMPK4-gyel kapcsolatban mutattak ki. A D-alcsoaládban található MAPK-ok esetén lényegesen alacsonyabb számú kölcsönhatás volt kimutatható, illetve az AtMPK9, AtMPK12, AtMPK18 és az AtMPK19 egyetlen MAPKK-zal sem hat kölcsön.



9. ábra. A növényi MAPKK/MAPK/subsztrát rendszer foszforilációs hálózata [90]. A színek az egyes rokon kapcsolatokat jelölik, a felső sorban az élesztő kettős hibriddel azonosított kölcsönhatások láthatók, az alsón pedig *in vitro* vagy *in planta* eredmények. A fekete vonalak azt jelentik, hogy a kölcsönhatás mellett foszforilációt is kimutattak.

A 10. ábra MAPK foszforilációs kaszkád és szubsztrátjai kapcsolatának összetettségét szemlélteti [91]. Popescu és társai egy nagyszabású kísérletben microarray segítségével vizsgáltak 2158 *Arabidopsis* fehérjét. Az analízist MAPK kinázokkal aktivált MAP kinázokkal és 2158 potenciális szubsztráttal végezték. A vizsgált szubsztrátok fele feltételezett transzkripciós faktor, 34%-a feltételezett nukleinsav kötő fehérje, 16%-a pedig fehérje kináz volt. Ezeket a szubsztrát fehérjéket felülethez rögzítették, majd hozzáadták az aktivált kinázt radioaktívan jelölt ATP jelenlétében. Végül 570 potenciális MAPK szubsztrátot találtak és megállapították, hogy közülük átlagosan 128-at foszforilálnak az egyes MAP kinázok, az AtMPK6 rendelkezik a legszélesebb szubsztrátspecifitással (184 fehérje), míg a legkevésbé aktív az AtMPK8 és az AtMPK16 (mindössze 40, illetve 69 azonosított szubsztráttal). Érdekes módon 290 kölcsönhatás specifikusnak bizonyult, azaz a fehérjék csak egy MAPK által foszforilálódtak. Tehát kijelenthetjük, hogy az egyes MAPK-k szekvenciájukat tekintve hiába mutatnak rokonságot, szubsztrátspecifitásuk – az *in vitro* adatok alapján – egyedi [91].



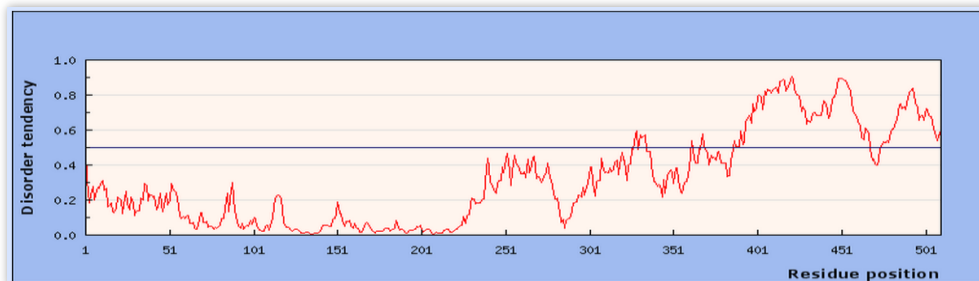
10. ábra. MAPKK/MAPK/szubsztrát foszforilációs hálózat fehérje microarray adatok alapján [91]. Az ábra 589 pontot, 9 MAPKK-t, 10 MAPK-t és 570 szubsztrátot ábrázol, a csomópontok mérete arányos a kapcsolatok mértékével. A hálózat 1331 éle az azonosított foszforilációs eseményeket mutatja.

A MAP kináz foszfatázok (MKP-ok) a MAP kináz kaszkád fontos negatív szabályozó komponensei. Az aktivációs hurok treonin és/vagy tirozin aminosaván történő defoszforiláció a kináz inaktiválásához vezet. Az *Arabidopsis thaliana* genomja mindössze 5 MKP-t kódol a 20 MAPK-zal szemben, mely azt sugallja, hogy egy foszfatáz több MAPK-t is szabályozhat, melyből eddig 5 kölcsönhatást azonosítottak [92]. Legnagyobb jelentősége a kettős specifitású foszfatázoknak van, melyek képesek a foszfoszerin/foszftreonin, illetve a foszftirozin defoszforilálására. Az első növényben azonosított MKP a szerin/treonin specifikus, PP2C (protein foszfatáz 2 C) családba tartozó foszfatáz, az MP2C (növényi fehérje foszfatáz 2 C) fehérje volt, melyről igazolták, hogy képes inaktiválni a stressz-aktivált MAPK (SAMK) jelátviteli útvonalat [93]. *Arabidopsis*-ban az első azonosított kettős specifitású foszfatáz a DsPTP1 (kettős specifitású fehérje foszfatáz 1) fehérje volt, melyről kimutatták, hogy az AtMPK4 és az AtMPK6 negatív regulátora [94]. Kísérletes eredményekből látható, hogy ezen foszfatázok szintje is függ a környezeti stressztől, így vehetnek részt a növényi jelátvitel finomhangolásában, ám ezen folyamatok részletei jelenleg kevésbé ismertek.

2.2.3. Az AtMPK9

Az érdeklődésünk középpontjában lévő AtMPK9 a növényi MAP kinázok legkevésbé ismert, D-alcsaládjába tartozik. Az AtMPK9-nek sem funkciója, sem aktivátor MAPKK-a, sem egyéb kölcsönható fehérjéje nem ismert jelenleg.

Az IUPred program segítségével igazoltuk [95], hogy az AtMPK9 fehérjének első 380 aminosavnyi része globuláris és rendezett szerkezetű (MAP kináz domén), utolsó 100-120 aminosavnyi régiója pedig rendezetlen szerkezetű (11. ábra).



11. ábra. Az AtMPK9 IUPred által jóslott szerkezeti rendezetlensége. A 0 a teljes rendezettséget, 1 teljes rendezetlenséget jelöli. 0,5 feletti érték esetén az adott régió már rendezetlennek tekinthető.

Az UbPred online predikciós szoftver segítségével az AtMPK9-ben megjósolhatók azon lizin aminosavak, melyek az ubikvitinációs helyekként játszhatnak szerepet [96]. Ezek jelenléte kapcsolatba hozható a fehérje féléletidejének szabályozásával. A program öt nagy valószínűségű helyet talált a C-terminális részén (12. ábra), ami alapján feltételezhetjük, hogy más atipikus kinázhoz hasonlóan, az AtMPK9 sejten belüli koncentrációja a fehérje proteaszomális lebomlásával regulálható.

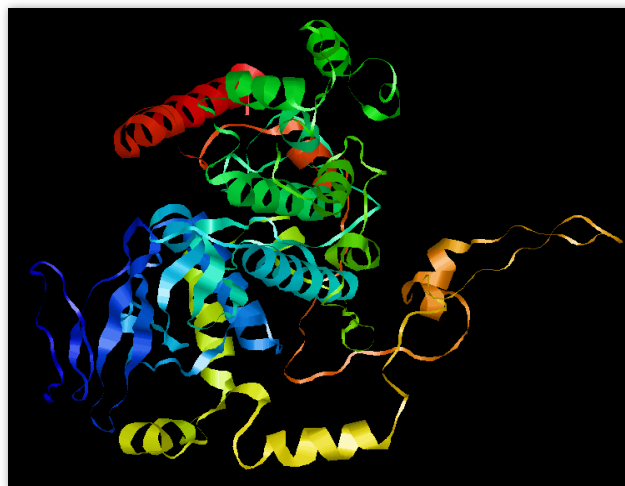
```

MDPHKVALETEFFTEYGEASRYQIQEVIGKGSYGVVASAIIDTHSGEKVAIKKINDVFEHVSDATRIILREIKLLRLLRHP
DIVEIKHVMLPPSRREFRDIYVVFELMESDLHQVIKANDDLTPEHYQFFLYQLLRGLKFIHTANVFHRDLKPKNI LANS
CRLKICDFGLARVSFNDAPSAIFWTDYVATRWYRAPELCSFFSKYTPAIDIWSIGCFIEMLTGKPLFPGKINVVHQLDI
MTDLLGTPPPEAIARIRNEKARRYLGNMRRKPPVPFTHKFPHVDPALALRLLHRLLAFFDKDRPSAEEALADPYFYGLANV
DREPSTQPIPKLEFEFERRKIKEDVRELIYREILEYHPQMLQEYLRGGEQTSFMYPSGVDRFKRQFAHLEENYCKGK
SPLQRQHASLPRERVPAKRENGSHNNDIENRSIASLVTTLTLESPPTSQHEGSDYRNGTSQTGYSARSLKKSASISASKCI
GMKPRNKSEYGESNNDTVDALSKVAALHT

```

12. ábra Az AtMPK9 feltételezett ubikvitinációs helyei. Az AtMPK9 aminosav szekvenciájában piros színnel a nagy, kék színnel a közepes, zöld színnel a kis valószínűségű ubikvitinációs helyek láthatók. A fehérjében található egyéb lizinek szürkével vannak jelölve. A predikció az UbPred szoftverrel történt.

Az AtMPK9 is tartalmaz egy D-alcsaládra jellemző, ismeretlen funkciójú C-terminális domént (13. ábra), mely az alcsaládon belül nagyfokú diverzitást mutat (Függelék I. ábra)



13. ábra. Az AtMPK9 I-TASSER program által prediktált szerkezete [97]. A kináz domén kézzel-zölddel-pirossal jelölve, a rendezetlen C-terminális régió pedig narancs-, illetve citromsárgával.

Sejten belüli lokalizációját tekintve eltérő adatokat találunk az irodalomban, kimutatták már a citoszólban és a sejtmagban [98], illetve a mitokondriumban is [99]. AtMPK9 funkciójáról mindössze annyi információnk van, hogy a sztóma zárósejtekben expresszálódik, az ABA-indukált sztómazáródásban vesz részt, a reaktív oxigéngyökök termelésének aktivátora, az ABA jelátviteli útvonalban pozitív szabályozója a citoplazmatikus kalcium oszcillációjának, illetve az AtMPK12-vel együtt kapcsolatot teremthet a két jelátviteli útvonal közt [100]. Egy publikációban megemlítik, hogy élesztőben a MPK9 kalmodulinnal kölcsönhat [89].

2.3. AtMPK6 és feltételezett szubsztrátjai

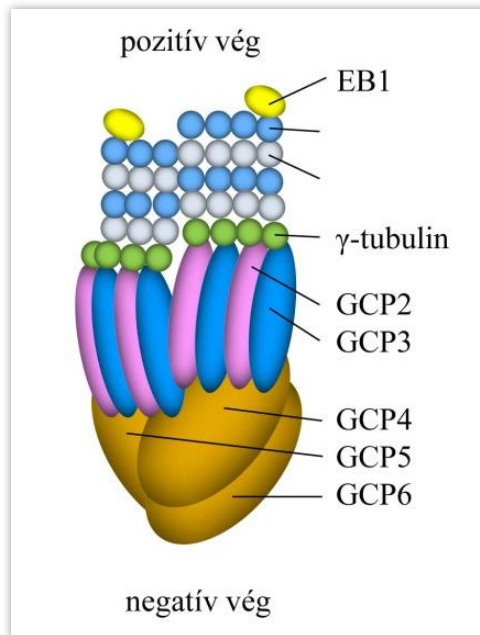
A növények növekedésére mind környezeti, mind fejlődési stimulusok is hatással vannak, szabályozzák a sejtosztódást, a differenciálódást és a citoszkeleton elrendeződését [101]. Amellett, hogy a MAPK-ok célfehérjéi főként transzkripció faktorok, szabályoznak citoszkeletonális fehérjéket is. Növényekben mindeddig csak néhány MAPK szubsztrátot azonosítottak, citoszkeletonális fehérjék foszforilációjáról pedig kevés ismeretünk van [102].

A MAPK jelátvitel és a citoszkeleton kapcsolata létrejöhet citoszkeletonális fehérjék direkt foszforilációjával, illetve a citoszkeletonális fehérjék szerepelhetnek állványfehérjeként a MAP kinázok és azok aktivátorai, szubsztrátjai között [103]. Állati és élesztő sejtekben számos példát találunk MAPK-ok és mikrotubuláris fehérjék kölcsönhatására. Élesztőben kimutatták, hogy a mikrotubulus átrendeződést MAP kinázok regulálják ozmotikus stressz esetén [104]. Megállapították továbbá, hogy sertés oocitákban a kinetochor és MAPK-ok kapcsolatban állnak [105], illetve, hogy aktív ERK-ek játszanak szerepet a mikrotubulusok elrendeződésében egér oociták érése során [106]. Habár a növényi MAPK-ok szerepe intenzíven tanulmányozott csak néhány mikrotubuláris fehérje azonosított, mint kölcsönható partner, illetve szubsztrát: *Arabidopsis*-ban a MAP65-1, MAP65-2, MAP65-3 [53], dohány növényben pedig a MAP65-1a/b [101].

A mikrotubulusok falát az α - és a β -tubulin alegységekből álló polipeptidek alkotják. A sejtekben előfordul még egy harmadik tubulin típus a γ -tubulin (14. ábra). A γ -tubulin a mikrotubulus térbeli rendezettségének kialakításában játszik fontos szerepet, oly módon, hogy a negatív végéhez kapcsolódik, így segíti a mikrotubulusok beágyazódását a centroszóma anyagába. Így egyrészt az egész mikrotubuláris apparátus

polarításra tesz szert (növekvő végek kifelé néznek), másrészt pedig a negatív végek stabilizálódnak, azaz az asszociáció/disszociáció gátlódik.

Az EB1 (pozitív vég kötő fehérje 1) egy mikrotubulus-asszociált fehérje, mely a sejtosztódás interfázisa során a mikrotubulus pozitív végéhez köt és az anafázis promótáló komplexszel (APC) is kölcsönhat [107]. Kimutatták azt is, hogy mikor az endoplazmás retikulum depletált Ca^{2+} szintjének következtében az ERK1/2 aktiválódik és foszforilálja a STIM1-et (sztrómális kölcsönható fehérje 1), minek következtében a STIM1 ledisszociál az EB1-ről [108]. Az EB1c az EB1 fehérjék növény-specifikus formája, az EB1a-val és az EB1b-vel ellentétben található benne prediktált MAPK kötő motívum és foszforilációs hely is.



14. ábra. A mikrotubulus sematikus szerkezeti képe. A γ -tubulin zöld színnel, a GCP4 fehérje barna színnel, az EB1 pedig sárgával látható.

A GCP4 (γ -tubulin komplex fehérje 4) a γ -tubulin komplex része, és valószínűleg a mikrotubulusok elágazásainak létrehozásában játszik szerepet [109]. A GCP4 fehérjében is található prediktált MAPK foszforilációs hely és kötő motívum.

Együttműködő partnereink a növényi sejtosztódás egyes szakaszait vizsgálva *in vivo* és *in vitro* kísérletekkel kimutatták, hogy az aktív AtMPK6 kölcsönhat a γ -tubulinnal és az EB1c-vel. Utóbbiban azonosítottak egy tirozin foszforilációt, mely λ -foszfataz hatására eltűnik és MAP kináz gátló MKK inhibitor hatására ezen

foszforiláció mértéke csökken. Emellett megállapították, hogy a növényi mikrotubulusokhoz a γ -tubulin, a GCP4, az EB1 fehérjék és az aktív AtMPK6 is kapcsolódhat [110]. Így felmerülhet a kérdés, hogy az AtMPK6 szubsztrátjaiként foszforilálja-e ezen fehérjéket.

2.3.1. *In vitro* transláció alapuló kináz szubsztrát azonosítás

A humán genom 500 kinázt tartalmaz [111], míg *Arabidopsis*-ban több mint ezer kináz található [112], így nem meglepő, hogy a kináz szubsztrát azonosítás egyik központi témája a biokémiai és a gyógyszerészeti kutatásoknak. Annak ellenére, hogy az azonosított kinázok száma egyre nő, a legtöbb szubsztrátjuk még nem ismert. Belátható, hogy ezen kináz-szubsztrát kölcsönhatások azonosítása elengedhetetlen a jelátviteli útvonalak pontos feltérképezéséhez. Egy kináz fiziológias szubsztrátjának felderítése különféle módszereket alkalmazó, összetett biokémiai, sejtbiológiai feladat, amely két okból is kihívást jelent. Elsősorban, a legtöbb kináz és szubsztrát fiziológiásan csak kis mennyiségben fordul elő a sejtben, a kinázok affinitása szubsztrátjukhoz pedig viszonylag gyenge. Ezen limitációk következtében a kináz-szubsztrát komplex vagy a célfehérje kivonása gyakran megvalósíthatatlan. Másodsorban, az eukarióta multidomén fehérjék gyakran nem termeltethetők hatékonyan *E. coli* alapú fehérje expressziós rendszerben, zárványtesteket alkothatnak.

Annak ellenére, hogy számos előrelépés történt a prokarióta fehérje előállítás terén és a különféle humán sejtvonalak is használhatóak rutin fehérjetermelésre, a sejtmentes *in vitro* transláció egy hiánypótló módszerként alkalmazható aktív rekombináns kinázok előállítására [113]. Az *in vitro* translációs rendszerek előnyeit részletesen a 2.1.3. fejezet mutatja be.

Hogy bebizonyítsuk egy fehérjéről, hogy valóban szubsztrátja egy adott kináznak, *in vitro* foszforilációs reakciót kell végeznünk. A kináz reakciónak két hagyományos módja ismert: egyik a radioaktív γ -foszfátot tartalmazó ATP használatával a másik pedig foszfoaminosav specifikus antitesteken alapszik. Habár mindkét módszer nagy érzékenységgű és jól leírt, az első esetében speciális laboratóriumra van szükség, illetve veszélyes anyaggal kell dolgoznunk, utóbbi módszer alkalmazhatósága pedig az időtényezőn és az antitest minőségén alapul. A kereskedelmi forgalomban kapható, foszfospecifikus festék alkalmazása egy vonzó alternatívát jelenthet a foszfoszerint,

foszfotirozint és foszfortreonint tartalmazó aminosavak PAGE gélben történő kimutatásában [114].

Laboratóriumunkban optimalizáltuk az *in vitro* transzláció és kináz reakción alapuló szubsztrát azonosítást, az AtMPK6 feltételezett szubsztrátjait ezen technikákkal kívántuk igazolni [113].

3. Célkitűzések

A sejtben belüli jelátviteli folyamatok központi eleme a fehérjék foszforilációs-defoszforilációs ciklusa, ennek módja, szabályozása és funkciója növényekben nagyrészt feltáratlan. A MAP kinázok szerepe a sejtosztódástól a sejthalálig számos jelátviteli folyamatban számottevő, aktiválódásuk történhet a klasszikus MAPK kaszkád által (tipikus MAPK-ok), illetve autofoszforiláció révén is (atipikus MAPK-ok).

Munkánk során az *Arabidopsis thaliana* modellorganizmus mindaddig ismeretlen aktivációjú és szabályozású képviselőjét, a D-alcsaládba tartozó atipikus kinázt, az AtMPK9-et kívántuk tanulmányozni. Egyetlen kivételtől eltekintve a növényi atipikus MAP kinázok aktiválódása nem ismert. Munkacsoportunk előzetes tapasztalatai alapján a sejtmentes, búzacsíra kivonaton alapuló fehérjetermelő rendszer ideális eukarióta kinázok előállítására: a transzlációval oldott állapotban lévő, natív térszerkezetű fehérje állítható elő preparatív mennyiségben. Az *in vitro* adatok egyszerűen megerősíthetőek *in vivo* körülmények közt *Arabidopsis thaliana* sejtszuspenzió végzett tranziens fehérje expresszióval. Az atipikus MAP kinázokra jellemző autofoszforilációval történő aktiváció eredményeképp foszforilálódó aminosavak azonosítását szegedi kollégáink közreműködésével, tömegspektrometriás foszfopeptid analízissel kívántuk megvalósítani. Továbbá egy közös nemzetközi pályázat keretein belül egy általunk kidolgozott kináz szubsztrát azonosítási módszerrel kívántunk hozzájárulni cseh kollégáink kutatási eredményeihez.

Kísérletes munkánk során az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

- Előállítható-e funkcionális vizsgálatokra alkalmas AtMPK9 *in vitro* transzlációs, illetve bakteriális rendszerben?
- Kimutatható-e a D-alcsaládra jellemző, TDY aktivációs hurok foszforilációja *in vivo* és *in vitro*?
- Milyen mechanizmussal aktiválódik az AtMPK9? Autofoszforiláció esetén cisz- vagy transz-autofoszforiláció történik?
- Aktiválja-e az AtMPK9-et bármely MAPK kináz az *in vivo* tranziens expressziós rendszerben?
- Mely egyéb aminosavak foszforilálódnak az aktivált AtMPK9-ben?

- Az *in vitro* transzlációval előállított AtMPK6 mely fehérjéket foszforilálja feltételezett, mikrotubulus-asszociált szubsztrátjai közül?

4. Módszerek

4.1. Klónozás, vektorok tisztítása

4.1.1. Alkalmazott anyagok, primerek, vektorkonstrukciók

A kísérleteink során alkalmazott anyagok, primerek, illetve vektorok listáját a Függelék tartalmazza.

4.1.2. Fehérje kódoló DNS szakaszok felsokszorosítása

A rekombináns vektorkonstrukciók létrehozásához az inszertet polimeráz láncreakció (PCR) segítségével állítjuk elő. Az amplifikáció DNS templátról (*Arabidopsis thaliana* cDNS könyvtár vagy plazmid konstrukció) történik. A célfehérjénket kódoló génszakasz mutációmentes amplifikációjához nagy hűségű (high fidelity), proofreading, azaz 3'-5' exonukleáz aktivitással rendelkező enzimet (iProof High Fidelity Polymerase) és CleanAmp dNTP mix-et, azaz Hot-Start nukleotidokat alkalmazunk. A ligálások eredményességének kolónia PCR-rel történő ellenőrzésére megfelelő az általánosan használt, proofreading aktivitással nem rendelkező Taq DNS polimeráz.

- ▲ iProof PCR: reakció térfogat 50 µl;
 - 10 µl 5x iProof™ HF puffer
 - 1 µl 10 mM CleanAmp dNTP mix
 - 2,5 µl 10 µM 3' primer
 - 2,5 µl 10 µM 5' primer
 - 1 µl templát (néhány pg plazmid vagy néhány ng cDNS könyvtár)
 - 0,2 µl iProof enzim
 - 50 µl végtérfogatra kiegészítve nukleázmentes vízzel.
- ▲ PCR program:
 - 95 °C, 5 perc (elsődleges denaturálás)
 - 95 °C, 10 másodperc (denaturálás)
 - 50-55 °C, (az alkalmazott primerek T_m-je+3 °C) 10 másodperc (annealing)
 - 72 °C, az inszert hosszától függően 15-30 másodperc/kb (láncszababbítás)
 - n=30 (2. és 4. közötti lépések ismétlésének száma)

72 °C, 3 perc (végső lánchosszabbítás)

inkubálás 4 °C-on

Az elkészült PCR reakcióelegyből 5 µl-t kiveszünk és megfuttatunk agaróz gélen ellenőrzés céljából, a maradék 45 µl-t PCR Clean Up pufferrel kicsapjuk.

▲ kolónia PCR: reakció térfogat 20 µl

10 µl 2x PCR MasterMix (Taq DNS polimerázt tartalmaz)

8 µl desztillált víz

1 µl 10 µM 3' primer

1 µl 10 µM 5' primer

Templátként egy éjszakán át növesztett, ligátummal transzformált baktérium kolónia szolgál, melyből pipettaheggyel kis mennyiséget a reakcióelegyet tartalmazó PCR csőbe mosunk. A kiválasztott kolóniákról master plate-et készítünk.

▲ PCR program:

95 °C, 5 perc (elsődleges denaturálás)

95 °C, 30 másodperc (denaturálás)

50-55 °C, (az alkalmazott primerek T_m-je-5 °C) 10 másodperc (annealing)

72 °C, az inszert hosszától függően 1 perc/kb (lánchosszabbítás)

n=30 (2. és 4. közötti lépések ismétlésének száma)

72 °C, 3 perc (végső lánchosszabbítás)

inkubálás 4 °C-on

Az elkészült PCR reakcióelegyből 10 µl-t megfuttatunk agaróz gélen ellenőrzés céljából. A PCR Clean Up pufferrel a PCR reakcióból az inszert kicsapható, a dezoxiribonukleotidok és primerek eltávolíthatóak. A PCR terméket 100 µl-re kiegészítjük nukleázmentes desztillált vízzel, majd azonos térfogatú PEG PCR Clean Up puffert adunk hozzá. Az oldatot vortexeljük, majd 20 percig szobahőmérsékleten inkubáljuk. Az elegyet 13000 rpm sebességen 10 percig centrifugáljuk, majd leszívjuk a felülúszót. A pelletet 1 ml abszolút etanollal mossuk, majd 13000 rpm sebességen újra 10 percig centrifugáljuk, a felülúszót eltávolítjuk. Utóbbi lépést kétszer ismételjük. A csapadékot vákuum centrifugában szárítjuk, majd 10 µl nukleázmentes desztillált vízben oldjuk fel. A DNS koncentrációját NanoDrop spektrofotométerrel határozzuk meg.

4.1.3. Agaróz gélelektroforézis

A PCR reakciók, restrikciós emésztések, *in vitro* transzkripció sikerességét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük. Kísérletek során használt gélek 0,8-1,5% agarózt tartalmaznak 1x TAE elektroforézis pufferben feloldva. A mintákhoz felvitel előtt 6x Loading Dye festéket adunk, a gélt 100 V-on 30-40 percig futatjuk, majd GelGreen DNS interkaláló festékkel festjük, UV fényben detektáljuk.

4.1.4. DNS izolálása agaróz gélből

Az agaróz gélelektroforézist követően a gél az ismertetett módon festjük, majd a DNS fragmens kivágásakor az UV fényvel működő gél dokumentációs rendszer helyett látható kék fényt emittáló, LED-es fényforrást alkalmaztunk, hogy elkerüljük az UV sugárzás esetleges DNS károsító hatását. A kívánt méretű DNS izolálását a kereskedelemben kapható, PureLink Quick Gel Extraction and Combo Kit kittel végezzük. A DNS kötő oszlopról desztillált vízzel eluáljuk a tisztítandó DNS-t, további felhasználásig -20 °C-on tároljuk.

4.1.5. Plazmid DNS tisztítása és transzformálás kompetens sejtbe

Az adott plazmiddal transzformált baktériumtörzset egy éjszakán át (16 óra), 37 °C-on, 220 rpm rázatás mellett, 5 ml (mini prep) illetve 25 ml (midi prep) LB tápoldatban tenyésztjük a baktériumsejtbe juttatott plazmidnak megfelelő antibiotikummal: 100 µg/ml karbenicillin a pET28a-t tartalmazó XL10-GOLD sejtek esetén, 35 µg/ml klóramfenikol és 100µg/ml karbenicillin a pET28a-at tartalmazó BL21 sejtek esetén, illetve 100 µg/ml karbenicillin a pRT és pEU plazmidokat tartalmazó XL10-GOLD sejteknél. A plazmid baktériumokból történő izolálását a kereskedelmi forgalomban kapható kittel valósítjuk meg (PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit, illetve QIAGEN Plasmid Midi Kit). Az izolált plazmidot végül 50 µl 65 °C-ra előmelegített nukleázmentes vízzel eluáljuk, NanoDrop spektrofotométerrel koncentrációt mérünk, majd a DNS-t -20 °C-on tároljuk a további felhasználásig.

Mind a gyári, mind laborunk által készített kompetens sejteket 50 µl-es adagokban tároljuk -80 °C-on. A transzformálás kezdete előtt 20 perc alatt jégen kiolvastjuk, majd 50 µl sejtszuszpenzióhoz maximum 5 µl ligátumot adunk, óvatosan pöcögtetjük, majd jégen inkubáljuk újabb 20 percig. A transzformálást 1 perces, 42 °C-os hősokkal

végezzük. A csövet 2 percig jégen tartjuk, majd hozzáadunk 500 µl szobahőmérsékletű SOC oldatot és 1 órán át inkubáljuk 37 °C-on, 220 rpm rázatás mellett. Ezután 4000 rpm-en 5 percig centrifugáljuk, majd a felülúszót leszívjuk, úgy hogy körülbelül 100 µl maradjon a csapadékon. Ebben felfuszpendáljuk a sejteket és antibiotikumot tartalmazó szilárd LB táptalajra szélesztjük. A lemezt légtermosztátban egy éjszakán át (16 órán át) növesztjük 37 °C-on.

4.1.6. Klónozás restrikciós endonukleázokkal

A pRTHA növényi expressziós vektorba restrikciós klónozással helyezzük a vad típusú és a kináz inaktív AtMPK9-et. A PCR reakcióhoz a már kész transzlációs vektorok szolgálnak templátként, az alkalmazott primerek pedig a pRTHA_AtMPK9WTfor és a pRTHA_AtMPK9WTrev. 500 ng pRTHA vektort és 500 ng inszertet emésztjük: 1-1 µl NcoI és NotI enzimekkel, 2 µl 10x FastDigest pufferrel, majd 20 µl-re kiegészítjük nukleázmentes vízzel és 10 percig 37 °C-on inkubáljuk. A mintákat PCR Clean Up pufferrel tisztítjuk. A ligálást az általánosan alkalmazott 1:3 vektor:inszert arányban, a leiratban megadott protokoll szerint állítjuk össze, úgy hogy 100 ng legyen a DNS összmenyisége. A ligálást 4 °C-on egy éjszakán át végezzük, majd másnap 5 µl ligátumot transzformálunk XL10-GOLD kompetens sejtekbe a korábban ismertetett módon. A pET28a bakteriális expressziós vektornál ugyanígy járunk el, a pET28a_AtMPK9for és pET28a_AtMPK9rev primereket használva. A transzformált baktérium sejteket karbenicillint (pRT), illetve kanamicint (pET28a) tartalmazó lemezre szélesztjük és 37 °C-on, 16 órán át növesztjük. Másnap pRTfor és pRTrev, illetve pET28afor és pET28arev primerekkel kolónia PCR segítségével választjuk ki a pozitív telepeket. A kiválasztott klónokat leoltjuk 5 ml LB + karbenicillin (pRT), illetve kanamicin (pET28a) tápoldatba és 37 °C-on, 220 rpm-mel rázatva növesztetjük egy éjszakán át. A plazmidot a korábban ismertetett módon tisztítjuk.

4.1.7. Klónozás Gateway rendszerrel

A Gateway klónozás az Invitrogen cég által kifejlesztett technika, melynél a λ-bakteriofág életciklusát használják ki: a gyári enzimkeverékkel egy alapvektor (entry) és egy célvektor (destination) közti rekombinációt hozunk létre, az inszertet 'átugratjuk' az alapvektorból a célvektorba. A Gateway klónozás különösen előnyös, ha az inszertünket

később nagyobb számú, különféle vektorba szeretnénk átvinni. Laborunkban a legtöbb MAPK és MAPKK megtalálható a pENTR4 alapvektorban.

A Gateway klónozási reakcióhoz a Gateway® LR Clonase™ II Enzyme Mix kit-et használjuk. A reakció összetétele az alábbi: 100 ng pENTR4_myc-AtMKK4-GOF alapvektor, 100 ng pEU-NII-CassetteA célvektor, 4 µl-re kiegészítve TE pufferrel (pH 8,0), 1 µl LR Clonase II enzimkeverék. Egy órás, 25 °C-on történő inkubáció után 1 µl Proteinase K-t adunk hozzá és 37 °C-on inkubáljuk 10 percig, hogy leállítsuk a reakciót, azaz degradáljuk az enzimkeveréket. 1 µl ligátumot végül α -select kompetens sejtekbe transzformálunk, majd karbenicillint tartalmazó lemezre szélesztjük és 37 °C-on, 16 órán át növesztjük. Másnap a pEU-NIIfor és pEUrev primerek alkalmazásával kolónia PCR-rel választjuk ki az inszert méretének megfelelő terméket adó, pozitív klónokat. A pozitív klónokat 5 ml LB + karbenicillin tápoldatba oltjuk és 37 °C-on, 220 rpm-mel rázatva növesztjük egy éjszakán át. A plazmidot gyári plazmid tisztító kittel tisztítjuk, megmérjük koncentrációját, majd további felhasználásig -20 °C-on tároljuk. A célvektorokat úgy alkották meg, hogy a két rekombinációs hely között található egy negatív szelekciós marker, a *ccdB* gén (F-plazmid eredetű DNS-giráz inhibitor), amely ha a helyén marad (azaz nem történik meg a rekombináció) akadályozni fogja az átlagos (nem *ccdB* rezisztens) *E. coli* sejtek növekedését, így a csak olyan telepek nőnek fel, amelyek a kívánt inszertet tartalmazó plazmiddal rendelkeznek. Az üres célvektorok felszaporosítására olyan kompetens sejt alkalmas, amely *ccdB* rezisztens (pl. *ccdB* survival vagy DB3.1.). Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy bár az általunk általánosan használt XL10-GOLD nem *ccdB* rezisztens sejt vonal, az F plazmidot tartalmazza, így növekedett *ccdB* rezisztenciával bír, Gateway klónozásból származó ligátum transzformálásakor nagy háttérrel ad [115]. Tehát a Gateway klónozás esetén későbbi kísérleteinkben kerültük az XL10-GOLD *E. coli* sejt vonal alkalmazását.

4.1.8. Ligálás-független klónozás

A ligálás-független klónozás egyszerűen kivitelezhető, mivel csak egy enzimreakcióra van szükség; univerzális, mert nem korlátozzák a klónozendó DNS szekvenciában található restrikciós endonukleáz helyek. Az inszerteket PCR reakcióval amplifikáljuk. A primereket úgy tervezzük, hogy 18 nukleotid hosszúságú túlnyúló véggel rendelkezzenek, melyek komplementerek a vektor megfelelő szakaszával (LIC szekvencia). A módszer a T4 DNS polimeráz 3'→5' exonukleáz aktivitásán alapszik,

amely ragadós végeket generál az inszerten és a linearizált vektoron egyaránt. A primer túlnyúló végeiből hiányzik az egyik nukleotid, esetünkben a dGTP, a vektor ezen szekvenciával komplementer régióján pedig a dCTP. A T4 DNS polimeráz az inszert esetén dCTP, a vektor esetén dGTP jelenlétében a 3'-végtől kezdve eltávolítja a nukleotidokat, amíg elér az első citozinig ill. guaninig a templáton, ahova beépítheti az hozzáadott nukleotidot (dezoxi-guanint ill. dezoxi-citozint). Az ily módon módosított, tapadós végekkel rendelkező inszert és vektor összekapcsolódásával bekövetkezik a gyűrűvé záródás. A létrejött, PCR fragmenst tartalmazó vektor közvetlenül, ligálás nélkül alkalmazható bakteriális kompetens sejtek transzformálására. Ez esetben a baktérium endogén ligáza alakítja ki a hiányzó foszfodiészter kötések. Munkacsoportunk a búzacsíra alapú transzlációs rendszerhez alkalmas, gyártó (Cell Free Sciences) által forgalmazott, pEU-MCS vektort fejlesztette tovább, melynek során affinitás címke mellett ligálás-független klónozáshoz szükséges szekvenciariész (LIC) került bele [50]. A transzkripció előtt szükséges linearizálás egységesítésére *in vitro* mutagenézissel létrehoztunk egy ritkán előforduló, NotI restriktív helyet a vektorokban, az újabb konstrukciók esetén már ezeket használtuk.

Kísérleteinkhez a vad típusú és mutáns AtMPK9, illetve az AtMPK6 pEU3-NII-HLIC vektorba, utóbbi feltételezett szubsztrátjai (γ -tubulin, EB1a, EB1c, GCP4) pedig a pEU3-NII-GLICNot vektorba kerültek. Először 3 μ g vektort 30 U FastDigest SspI enzimmel 30 percig inkubálunk 37 °C-on, mely során a LIC szekvenciát a közepén hasítjuk, tompa végeket létrehozva. A linearizált plazmidot agaróz gélen választjuk el az esetlegesen emésztetlen formában maradt vektortól, majd gélből tisztítjuk. A klónozás kritikus lépésének számít a tiszta, linearizált vektor. A T4 DNS polimeráz kezeléshez 500 ng linearizált plazmidhoz 2 μ l 10 mM dGTP, 2 μ l 10x NEB2+1% BSA, 0,2 μ l T4 DNS polimerázt adunk, a reakcióelegyet desztillált vízzel egészítjük ki 20 μ l végtérfogatra. Az inszertek kezelése esetén dCTP-t használunk. A reakcióelegyet 37 °C-on inkubáljuk 10 percen keresztül, majd további 20 percig 75 °C-on az enzim inaktiválása érdekében. A felhasznált mintákban kerültük a TE puffer jelenlétét, mivel az EDTA megköti a magnéziumot, amely a T4 DNS polimeráz kofaktora.

Megközelítőleg 50 ng T4 kezelt vektorhoz az 1:3 vektor:inszert molarány szerint szükséges T4 kezelt PCR terméket adunk. 1,25 μ l 50 mM EDTA hozzáadása után a reakcióelegyet 12,5 μ l végtérfogatra desztillált vízzel egészítjük ki. Szobahőmérsékleten

inkubáljuk 20 percig, XL10-GOLD kompetens sejtbe transzformáljuk, majd karbenicillin tartalmú lemezre szélesztjük, 37 °C-on 16 órán át inkubáljuk. A várható kolóniák száma 20-30. Mivel a ligálás independens klónozás hatékonysága közel 100%-os, a gyakorlatban 2 klón ellenőrzése leggyakrabban elegendő minden konstrukció esetében ahhoz, hogy pozitív klónokat találjunk. Másnap a pEU3-NIIfor és pEUrev primerekkel kolónia PCR segítségével választjuk ki a pozitív telepeket. A pozitív klónokat leoltjuk 5 ml LB + karbenicillin tápoldatba és 37 °C-on növesztettük a sejteket egy éjszakán át. A kiválasztott plazmidot tisztítottuk a korábban ismertetett módon.

4.1.9. *In vitro* mutagenézis

A megfelelő mutációkat kódoló primereket alkalmazó, PCR alapú *in vitro* mutagenézis egy általánosan elfogadott módszer a fehérjék szerkezete és funkciója közti kapcsolatok feltárására. A kináz inaktív (loss-of-function; LOF) AtMPK9-ben az aminosavcsere az ATP kötőhelyet érinti, egy lizin argininre történő cseréjével a kináz képtelen lesz kötni az ATP-t, így nem rendelkezik kináz aktivitással.

WT	E	K	V	A	I	K	K	I	N	D	V	F	E
LOF	E	K	V	A	I	<u>R</u>	K	I	N	D	V	F	E

A TDY hurok mutánsainál az alábbi aminosavcsereket hajtottuk végre:

WT	P	S	A	I	F	W	T	D	Y	V	A	T	R	W	Y
T185A	P	S	A	I	F	W	<u>A</u>	D	Y	V	A	T	R	W	Y
Y187W	P	S	A	I	F	W	T	D	<u>F</u>	V	A	T	R	W	Y
T185A/Y187W	P	S	A	I	F	W	<u>A</u>	D	<u>F</u>	V	A	T	R	W	Y

Az *in vitro* mutagenézis során a QuickChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit-et használtuk. Ügyelnünk kell rá, hogy a templátként használt plazmidok felszaporítását biztosan ne *dam*- (JM110 vagy SCS110), azaz DNS metiláció deficiens kompetens sejtekben végezzük. A templátok a pEU3HLIC_AtMPK9WT illetve a pRTHA_AtMPK9WT vektorok voltak.

▲ a PCR reakció:

5 µl 10x reakció puffer
10-100 ng dsDNS templát
125 ng 5' primer
125 ng 3' primer
1 µl 2 mM dNTP mix
1,5 µl QuickSolution reagens
50 µl-re desztillált vízzel kiegészítve
1 µl QuikChange Lightning Enzyme

▲ a PCR program:

95 °C, 2 perc (elsődleges denaturálás)
95 °C, 20 másodperc (denaturálás)
60-70 °C, (az alkalmazott primerek T_m-je+3 °C) 10 másodperc (annealing)
68 °C, az inszert hosszától függően 30 másodperc/kb (láncszabbítás)
n=18 (2. és 4. közötti lépések ismétlésének száma)
68 °C, 5 perc (végső láncszabbítás)
inkubálás 4 °C-on

A PCR reakció végeztével az elegyhez 1 µl DpnI enzimet adunk, mely a templátként használt, metilált DNS eliminálásáért felelős. Óvatosan összekeverjük, 5 percig 37 °C-on tartjuk, majd 2 µl elegyet transzformálunk XL10-GOLD kompetens sejtekbe, antibiotikumot tartalmazó lemezre szélesztjük, 37 °C-on 16 órán át inkubáljuk. Másnap szintén kolónia PCR-t végzünk, azonban a mutáció bekövetkeztéről csak a szekvenálás után győződhetünk meg teljes biztonsággal.

A plazmidokban, illetve az inszertek nukleinsav szekvenciájának ellenőrzését a Macrogen Europe cég végezte. A mintákat a vektornak megfelelő szekvenáló primerekkel küldtük el vizsgálatra. A szekvenálás eredményét ChromasLite és Clone Manager programok segítségével értékeltük.

4.2. Bakteriális fehérjeexpresszió

4.2.1. Bakteriális fehérjetermelés autoindukcióval

Az indító kultúra elkészítéséhez steril fülkében a pET28a_AtMPK9WT vektorkonstrukcióval transzformált, klóramfenikol és karbenicillin rezisztens *E. coli* BL21(DE3) baktérium telepekből 1-1 különálló telepet oltunk le 2 ml, 35 µg/ml klóramfenikolt és 100 µg/ml karbenicillint tartalmazó folyékony LB táptalajba, majd 16 órán át inkubáljuk 37 °C-on, 220 rpm rázatás mellett. A fenti indító kultúrából 1 ml MDG + 1 µl karbenicillin oldatába leoltunk 100 µl-t, majd hat órán át 250 rpm-en, 37 °C-on inkubáljuk. Ezután 350 µl-t átoltunk 700 ml ZYM 5052 puffer + 700 µl karbenicillin tápoldatba. 1 ml mintát kiveszünk az indukció előtti mintából, majd 2 literes, steril Erlenmeyer lombikban 37 °C-on, 250 rpm-en egy éjszakán át inkubáljuk. Az indukció után, 1 ml mintát ugyancsak félreteszünk, majd a szuszpenziót 4000 rpm-en, 4 °C-on, 10 percig centrifugáljuk. A felülúszót leöntjük, a csapadékot azonnal feltárjuk vagy -20 °C-on tároljuk. A csapadékot 3 ml feltáró pufferben hatszor 30 másodpercig szonikáljuk (a szonikálások között 20 másodpercig jégen tartjuk), majd 2 ml-es Eppendorf csövekben 13000 rpm-en 4 °C-on 20 percig centrifugáljuk a feltárt baktérium szuszpenziót. A felülúszót leszívjuk, további felhasználásig jégen tartjuk, a csapadékot pedig újra felszuszpendáljuk 3 ml feltáró pufferben. Az indukció előtti és az indukált bakteriális szuszpenziókból 1-1 ml-t Eppendorf csőben, 13000 rpm-en egy percig centrifugáljuk szobahőmérsékleten, majd a felülúszót eltávolítjuk. A visszamaradó csapadékot 100 µl, illetve 10 µl 5x Laemmli mintapufferben felszuszpendáljuk, majd 5 percig szárazblokkban inkubáljuk 95 °C-on. Az indukció sikerességének ellenőrzésére SDS-poliakrilamid géltre 5-5 µl mintát viszünk fel minden mintából.

4.3. Protoplaszt tranziens expresszió

4.3.1. A növényi sejtek fenntartása, protoplasztálás

Az alábbi kísérleteket steril fülkében, steril oldatok és műanyag áru felhasználásával végeztük. Sejtes kísérleteinket *Arabidopsis thaliana* Columbia ökotípusú, gyökérből izolált sejt kultúrán végeztük. A sejteket 100 ml MS tápoldatban

tartjuk fenn, 23 °C hőmérsékleten állandó 110 fordulat/perc sebességű vízszintes rázóinkubátorban, sötétben [116]. Hetente 5 ml 1 hetes sejteket adtunk 100 ml új tápoldathoz. Protoplaszt izoláláshoz 4-5 napos *Arabidopsis* sejtuszuspenziós kultúrát használunk. 50 ml sejtuszuspenziót 50 ml-es Falcon csőben, 1500 rpm-en 5 percig centrifugáljuk, majd leöntjük a tápfolyadékot. A sejteket 25 ml steril enzimoldatban szuszpendáljuk, majd steril nagyméretű Petri csészébe öntjük, hozzáadunk még 25 ml 0,34 M GM oldatot és vízszintes rázón 3 órán keresztül 110 rpm fordulatszámon sötétben inkubáljuk. Óránként mikroszkóp alatt ellenőriztük a protoplasztálási folyamatot: mikor teljesen végbement, tökéletesen kerek, különálló, sejtfal nélküli sejteket látunk. A protoplaszt szuszpenziót 50 ml-es Falcon csőben 1500 rpm-en centrifugáljuk 5 percig, majd 25 ml 0,34 M GM oldatban történő szuszpendálást, újabb centrifugálás követ 1000 rpm-en 5 percig. A felülúszót eltávolítjuk, majd 5 ml 0,28 M GM oldattal újra felsuszpendáljuk a protoplasztokat, majd óvatosan 10 ml-es leoltó csőbe öntjük át őket. 5 perces, alacsony sebességű (800 rpm) centrifugálást követően a jó minőségű protoplasztok felúsznak, és egy jól elkülönülő gyűrűt formálnak az oldat tetején. Ezt széles végű, 5 ml-es Pasteur pipettával óvatosan összegyűjtöttük egy 2 ml-es Eppendorf csőbe. Nyolcszoros hígítás készítése után a protoplasztok számát tripánkéék oldat hozzáadását követő Bürker kamrás számolással határozzuk meg. Transzformációnként legalább 5×10^5 sejthez adunk 5 µg nagy tisztaságú plazmid DNS-t, a protoplaszt oldatot 0,28 M GM oldattal hígítjuk, ha szükséges. 50 µl protoplaszthoz 15 µl plazmidot adtunk (desztillált vízzel kiegészítve 15 µl-re), majd azonnal 150 µl PEG oldattal keverjük össze óvatosan pöcögtetve. A pK2GW7_myc-AtMKK-GOF plazmidokkal történő kotranszfekeció esetén 5:1 arányt alkalmaztunk, tehát az 5 µg pRTHA_AtMPK9WT-hez 1 µg pK2GW7_myc-AtMKK-GOF-ot adtunk. (A PEG oldatot -20 °C-on tároljuk, 5 ml-es adagokban. Használat előtt felolvasztjuk és azonnal felhasználjuk.) A transzformált sejteket 15-30 percen keresztül sötétben tartjuk szobahőmérsékleten. Ezt követően két lépésben 500 µl 0.275 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ oldatot adunk a transzformált protoplasztokhoz. Gyengéd összerázás után 5 perces, 1500 rpm-en történő centrifugálással különítjük el a PEG-es oldatot a sejtektől. A PEG-es felülúszó eltávolítása után 0,5 ml 0,34 M GM oldatban vesszük vissza a sejteket, majd 24 kamrás lemezbe helyezük és sötétben tartjuk 22 °C állandó hőmérséklet mellett másnapig (12-24 óra), amikor a lemezből átmérjük 1,5 mm-es Eppendorf Safe-Lock csövekbe.

Kezelés esetén ezen a ponton adjuk hozzá az alábbi stresszorokat: 500 nM flagellin (flg22), 250 mM NaCl, 20 nM H₂O₂ 10, illetve 30 percig. A hideg kezelés esetén jégre helyezzük a csöveket szintén 10 és 30 percig. A foszfatáz inhibitor kezelést 100 nM illetve 1 µM okadánsav (OA) és 100 µM illetve 1 mM nátrium-ortovanadát (OV) hozzáadásával végeztük 1 órán át. Alacsony fordulatszámon (1-2 g) 30 másodpercig centrifugáljuk a csöveket, a felülúszót fecskendővel leszívjuk, a lezárt csöveket folyékony nitrogénbe dobjuk, majd azonnal feltárjuk vagy feltárásig -20 °C-on tároljuk.

4.4. *In vitro* transzkripció és transláció

4.4.1. *In vitro* transzkripció

A transzkripció hatékonysága növelhető, ha a plazmidkonstrukciót előbb linearizáljuk. Erre a célra a stop kodon után, körülbelül 1600 bp távolságra található, általunk létrehozott NotI restrikciós hasítóhely alkalmas. A korábbi vektorkonstrukciókban, melyek nem tartalmazták még a NotI hasítóhelyet, az ScaI enzimet használtuk. A reakció az alábbi összetevőkből állt: 5 µg plazmid, 5 µl (50 U) enzim, 5 µl 10x FastDigest puffer, 50 µl végtérfogatra kiegészítés desztillált vízzel, 1 óra inkubálás 37 °C-on, majd a PEG PCR Clean Up eljárás szerint kicsaptuk a linearizált plazmidot és 10 µl nukleázmentes vízben oldottuk fel.

A reakcióelegyet jégen, RNáz-mentes körülmények között, steril fülkében készítettük elő. A transzkripció keverék elkészítéséhez az alábbi anyagokra volt szükség: 1 µg linearizált plazmid, 8 µl NTP mix (egyenként 100 mM), 4 µl 5x TranscriptAid Reaction Buffer, 2 µl TranscriptAid Enzyme mix, 20 µl-re kiegészítve DEPC kezelt vízzel, mely szintén a kit (TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit) része volt. A reakcióelegyet 2 órán keresztül inkubáltuk 37 °C-on. A fehér csapadék (magnézium-pirofoszfát) megjelenése a reakció sikerességét jelzi. Az mRNS kicsapásához 55 µl 7,5 M ammónium-acetátot, 875 µl előhűtött abszolút etanolt és 330 µl nukleázmentes vizet adunk hozzá. Rövid vortexelés után jégen tartjuk 15 percig, majd 15 percig 4 °C-on 13000 rpm-en centrifugáljuk. Az mRNS az Eppendorf alján összegyűlt fehér csapadékként található, a felülúszót eltávolítjuk. 1 ml előhűtött abszolút etanolt pipetázunk a csapadékra, a csövet néhányszor átfordítjuk, majd újból 15 percig centrifugáljuk. Az etanolt eltávolítjuk, a csapadékot pedig 5 percig szárítjuk a

maradék etanol eltávolítása végett steril fulfilke alatt, majd 21 µl 1x SUB-AMIX oldatban felfuszpendáljuk. A templát mRNS minőségének ellenőrzéséhez 1 µl-t futtattunk meg 0,8%-os agaróz gélen. A felhasznált SUB-AMIX oldatot mindig frissen készítjük el 40x S1, S2, S3 és S4 oldatokból steril desztillált vízzel.

4.4.2. *In vitro* transláció

Az *in vitro* translációhoz az alábbi kitet használtuk: ENDEXT Technology Wheat Germ Cell-Free Expression System. A reakcióelegyet a gyártó által javasolt utasításokat követve raktuk össze: a komponenseket jégen olvasztottuk fel és a műveletek során RNáz-mentes, steril körülményeket biztosítottunk. Steril 96-well mikrotiter lemezbe 206 µl 1x SUB-AMIX oldatot pipettázunk, majd egy Eppendorf csőben összemérjük a translációs elegyet (20,8 µl végtérfogatban): 5 µl (15 µg) mRNS, 10 µl WEPRO oldat (búzacsíra alapú translációs keverék), 0,8 µl kreatin-kináz és 5 µl 1x SUB-AMIX oldat. A His₆-AtMPK6 aktiválásakor további 0,5 µl myc-AtMKK4-GOF mRNS-t adunk az oldathoz. Ezt óvatosan összepipettázzuk, ügyelve hogy ne keletkezzen buborék, majd a tápláló oldat alá rétegezzük. A párolgás elkerülése érdekében fóliával leragasztjuk a kamrákat. A translációs reakciót 20 órán át inkubáljuk 20 °C-on légtermosztátban. Másnap a célfehérjét tartalmazó translációs elegyet Eppendorf csőbe pipettáztuk, majd a további felhasználásig jégen tároltuk. A transláció eredményességét SDS-poliakrilamid gélelektroforézist követő Coomassie festéssel (5 µl totál translációs elegy) és Western Blottal (1 µl totál translációs elegy) is ellenőriztük.

4.5. Fehérje tisztítás, Western blot, kináz reakció

4.5.1. Poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE)

A fehérjék molekulatömege alapján történő elválasztását 10%-os poliakrilamid gélen végeztük. A Függelékben látható III. táblázat tartalmazza az összetevőket és azok pontos mennyiségét. Coomassie festéshez 0,7 mm-es, Western Blothoz 1,5 mm-es gél-t használtunk. A mintákhoz futtatás előtt 5x SDS DTT mintapuffert adunk, összekeverjük és 5 percig 95 °C-on inkubáljuk. A gélfuttatást 1x Laemmlie futtató pufferrel végezzük. Coomassie festés esetén festetlen, Western Blothoz festett fehérje markert alkalmazunk.

Az elválasztást 20 mA áramerősséggel végezzük 0,7 mm-es gél esetén, illetve 30 mA-en 1,5 mm-es gél esetén; a feszültséget 200 V-on maximalizáljuk. A futtatás után a tömörítő gélt eltávolítjuk és Coomassie Blue-val (PageBlue Protein Staining Solution) festjük, a gyártó által javasolt protokoll szerint, Western blot esetén pedig blottolással folytatjuk.

4.5.2. Western Blot

A fehérjék specifikus detektálására és mennyiségük szemikvantitatív mérésére a Western blot technikát alkalmazzuk. A poliakrilamid gélelektroforézis után a gélt félszáraz blottolással PVDF membránra visszük át. A szűrőpapírok és a PVDF membrán mérete a gél méretével megegyezik: 8,5 cm x 6 cm. Két szűrőpapírt az anód I, egy szűrőpapírt az anód II, három szűrőpapírt pedig a katód pufferbe áztatunk. A gélt a katód pufferben mossuk. A PVDF membránt metanolban megnedvesítjük, így aktiváljuk, majd leöblítjük a katód pufferben. (A p-ERK ellenanyag esetén nitrocellulóz membránt használtunk, melyet nem szükséges metanolban aktiválni.) A blottolóba az alábbi sorrendben helyezzük az összetevőket: 2 db anód I pufferbe áztatott szűrőpapír, 1 db anód II pufferbe áztatott szűrőpapír, aktivált PVDF membrán, katód pufferbe áztatott gél, 3 db katód pufferbe áztatott szűrőpapír. Az alkalmazott áramerősség: a gél területe (cm^2) x 4 mA (8,5 cm x 6 cm, azaz $51 \text{ (cm}^2\text{)} \times 4 \text{ mA} = 204 \text{ mA}$), blottolás időtartama: 20 perc. A membrán blokkolását 5%-os tejpor + 0,05% TWEEN PBS-ben végezzük 1 órán át szobahőmérsékleten billegtetve. (Az anti-P-ERK ellenanyag esetén foszfátmentes, 5% BSA + 0,05% TWEEN TBS pufferrel blokkolunk.) Ezt követően az elsődleges antitesttel 2 órát inkubáljuk a membránt rázatással, szobahőmérsékleten. Háromszor 10 perces, PBS + 0,2% TWEEN pufferben történő, intenzív rázatás után a másodlagos antitesttel inkubáljuk a membránt 1 órán át, szobahőmérsékleten billegtetve. Az elsődleges ellenanyagokat 2000x-es hígításban alkalmazzuk, kivéve az anti-P-ERK ellenanyagot, amelyet 1000x hígításban, a másodlagos ellenanyagokat pedig 5000x-es hígításban. Az alkalmazott hígításokat 2,5%-os tejpor + 0,025% TWEEN PBS-ben végezzük. (A HRP konjugált, elsődleges antitestekkel 1,5 óráig inkubáljuk a membránt.) Újabb 3x10 perces, PBS + 0,2% TWEEN pufferes mosást követően a detektálást Western Lightning Plus-ECL elnevezésű kit-et használjuk. A két összetevőből 1-1 ml-rel 5 percig inkubáljuk a membránt, majd az előhívó folyadék eltávolítását követően sötét szobában fényérzékeny röntgen filmre előhívjuk azt. Mikor

egy membránt több antitesttel is előhívunk, a membránt 2 x 10 percig mossuk PBS-ben, majd 10 perces, stripping pufferben történő, intenzív rázatással távolítjuk el a fehérjéhez kötött antitesteket. Ezután a blokkolástól folytatjuk a Western blotot az új antitesttel. Minden esetben a gyengébb jelet adó antitestet alkalmazzuk először.

4.5.3. Fehérje tisztítása affinitás kromatográfiával

Az *in vitro* transzlációval előállított His₆-, illetve GST-címkével előállított fehérjéket nagy tisztaságot adó, mágneses affinitás gyöngyökkel tisztítottuk. A tranziens expresszált, HA címkével rendelkező fehérjéket anti-HA-agaróz affinitás gyöngyökkel tisztítottuk.

4.5.3.1. His₆-címkével ellátott fehérje esetén

15 µl TALON® Metal affinitás ágyat 300 µl His mosó- és kapcsoló pufferrel ekvilibrálnak 1,5 ml-es Eppendorf csőben. Egy percig forgatjuk, majd mágneses állványra helyezük, mely lehetővé teszi, hogy könnyedén eltávolítsuk a felülúszót. A lépést még kétszer ismételjük. A transzlációs elegyet 1:1 arányban kiegészítjük 2x His mosó- és kapcsoló pufferrel és 30 percig forgatva inkubáljuk szobahőmérsékleten. Az inkubációs idő letelte után mágneses állványra helyezve leszívjuk a felülúszót. 300 µl mosópuffert adunk az ágyhoz, 5 percig forgatjuk szobahőmérsékleten, majd újból leszívjuk a felülúszót mágneses állványra helyezve. A mosási lépést még kétszer ismételjük, majd 50 µl mosópufferben, jégen vagy 4 °C-on tároljuk a későbbi felhasználásig. Szükség esetén 50 µl frissen készített elúciós pufferben, enyhe rázatással, 1 óra alatt eluáljuk az affinitás tisztított fehérjéket.

4.5.3.2. GST-címkével ellátott fehérje esetén

25 µl Glutathione Magnetic Bead ágyat 300 µl GST mosó- és kapcsoló pufferrel ekvilibrálnak 1,5 ml-es Eppendorf csőben. Egy percig forgatjuk, majd mágneses állványra helyezük, mely lehetővé teszi, hogy könnyedén eltávolítsuk a felülúszót. A lépést még kétszer ismételjük. A transzlációs elegyet 300 µl-re kiegészítjük GST mosó- és kapcsoló pufferrel és 1 óráig forgatva inkubáljuk szobahőmérsékleten. Az inkubációs idő letelte után mágneses állványra helyezve leszívjuk a felülúszót. 300 µl mosópuffert adunk az ágyhoz, 5 percig forgatjuk szobahőmérsékleten, majd újból leszívjuk a

felülúszót mágneses állványra helyezve. A mosási lépést még kétszer ismétljük, majd 50 µl mosópufferben, jégen vagy 4 °C-on tároljuk a későbbi felhasználásig.

A tisztítás ellenőrizhető az ágyhoz kapcsolt, tisztított fehérjék 1/10-ének SDS-poliakrilamid gélen történő futatásával és azt követő Coomassie festésével valamint 1/20-ának Western Blot analízisével.

4.5.3.3. HA-címkével ellátott fehérje esetén

A frissen centrifugált vagy lefagyasztott sejteket 100 µl Lacus pufferben [117] felfuszpendáljuk, majd 1 percig vízfürdős ultrasonikálóban szonikáljuk. Ezt követően 15 percig, 4 °C-on 13 000 rpm-en centrifugáljuk, majd a felülúszót új Eppendorf csőbe tesszük át. Az AtMPK9-HA-t tartalmazó sejtlyizátumot anti-HA-agaróz ágyon tisztítjuk a gyártó utasításai szerint, majd 50 µl Lacus pufferben tároljuk további felhasználásig jégen.

4.5.4. Foszfátáz kezelés

A transzlációs búzacsíra kivonat egy koncentrált fehérjeoldat, melyben kinázok is megtalálhatóak. A transzlált célfehérje így foszforilált állapotban lehet, mely a kináz reakció szempontjából fals negatív eredményt adhat. Így egyes kísérleteinkhez szükség volt az affinitás ágyhoz kapcsolt, tisztított célfehérje defoszforilálására, melyet kereskedelmi forgalomban kapható Lambda foszfátázzal végeztünk. A reakció összetétele: 44 µl 1x Lambda foszfátáz puffer, 5 µl MnCl₂ és 1 µl Lambda foszfátáz . A reakció 30 percen át 30 °C-on zajlott és 3 x 300 µl PBS-sel történő mosás követte. További felhasználásig az ágyhoz kötött, defoszforilált fehérjéket 50 µl PBS-ben tároltuk jégen vagy 4 °C-on.

4.5.5. TEV proteáz hasítás

A továbbfejlesztett transzlációs vektorok tartalmaznak egy TEV (Tobacco etch virus) proteáz hasító helyet, mellyel az affinitás kromatográfiás ágyról a címke után lehasíthatók, így végül csak a tisztított, címke nélküli célfehérjénk található az oldatban. A TEV proteázt bakteriális fehérjeexpresszióval állítottuk elő a pTH24_TEV konstrukció felhasználásával, majd Ni-affinitás ágyon tisztítottuk, eluáltuk, 50% glicerolban -80 °C-on tároltuk [118]. A reakció 50 µl végtérfogatban az alábbiak szerint állt össze: 2,5 µl of 20x TEV puffer, 0,5 µl 0.1 M DTT, 10 µl of TEV, desztillált vízzel

kiegészítve. Az elegyet a célfehérjét tartalmazó ágyra pipettáztuk, majd 4 °C-on egy éjszakán át inkubáltuk. A fehérje koncentrációt Bradford reagenssel mértük a gyártó javaslata szerint.

4.5.6. *In vitro* kináz reakció

In vitro kináz aktivitás vizsgálathoz 300 ng *in vitro* transzlált His₆-címkével ellátott kináz vagy 30 µg totál fehérjéből anti-HA-agarózzal tisztított kinázt használunk. 1 µg affinitás ágyhoz kötött fehérjét, illetve 10 µg MBP szubsztrát fehérjét foszforilálunk kináz pufferben (20 mM HEPES (pH 7,5), 100 µM ATP, 15 mM MgCl₂, 5mM EGTA, 1 mM DTT) 5 µCi [γ -³²P]ATP jelenlétében 30 percig 20 °C-on 16 µl végtérfogatban. A foszforilált szubsztrátokat méretüknek megfelelően 10-15%-os denaturáló SDS-poliakrilamid gélektroforézissel választjuk el, majd fixáljuk és Coomassie festéssel tesszük láthatóvá. A géleket szárítás után kazettába helyezzük és foszfoszenzor screen-t helyezünk rá 1-16 óra időtartamra, majd Typhoon Phosphorimager készülékben hívjuk elő. A szoftver végül egy virtuális gélképet ad ki, amelyen látható a kináz reakció eredménye. A Coomassie festett gél képét digitális fényképezőgéppel rögzítettük.

4.5.7. Foszfopeptid analízis

Az *in vitro* transzlációval előállított, affinitás tisztított kinázokat a 4.5.1. pont szerint 10%-os SDS-poliakrilamid gélen futtatjuk. A gél a vizsgálat sikeressége érdekében, nagy körültekintéssel, ultra tiszta, keratinmentes összetevőkből készítjük, majd Coomassie festést követően a célfehérjét a gélből szikével kivágjuk, majd további analízis érdekében az MTA Szegedi Biológia Központ tömegspektrometriai csoportjának küldjük. A tömegspektrometriai analízist gélben történő triptikus emésztés, illetve TiO₂-os foszfopeptid dúsítás előzi meg. Szegedi kollégáink közreműködésével meghatároztuk a WT AtMPK9 és mutánsainak foszforilációs mintázatát.

4.6. Bioinformatikai módszerek

Munkánk során az *Arabidopsis* gének CDS-eit a TAIR (<http://www.arabidopsis.org/>) adatbázisból töltöttük le. Az aminosav- és nukleinsav szekvenciák közötti homológiák vizsgálatához az NCBI BLAST

(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) szolgáltatását használtuk. A DNS szekvenálási eredmények ellenőrzését a ChromasLite (Technelysium) programmal végeztük. A primerek T_m-jének kiszámítása az Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>) online felületen történt.

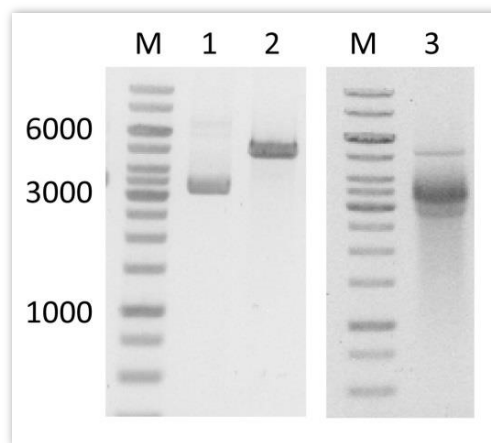
A konstrukciók virtuális létrehozásához a Clone Manager (Sci-Ed Software) szoftvert használtuk. Az AtMPK9 három dimenziós szerkezetének predikcióját az I-TASSER [97] online predikciós szoftverrel végeztük, a modell vizualizálása az UCSF Chimera [119] programmal történt.

5. Eredmények

5.1. Az AtMPK9 aktivációja

5.1.1. Az *in vitro* transzlált AtMPK9 kináz aktivitása

Az AtMPK9 szabályozásának tanulmányozását a sejtmentes, *in vitro* transzlációs rendszerben kívántuk vizsgálni. Az inszerteket His₆-, illetve GST-címkével ellátott pEU transzlációs vektorba klónoztuk. Egy konstrukció bemutatásával illusztrálom a módszer lépéseit, minden inszertnél az alábbiak szerint jártunk el. Az inszerteket meglévő plazmidról vagy cDNS könyvtárból amplifikáltuk fel iProof PCR segítségével, PEG PCR Clean Up módszerrel kicsaptuk, majd agaróz gélen történő szeparációval ellenőriztük. Ligálás independens klónozással létrehoztuk a transzlációs vektorkonstrukciókat, majd a kész vektorokat ScaI (AtMPK9 konstrukciók és AtMPK6 esetén), illetve NotI (AtMPK6 feltételezett szubsztrátjai esetén) restrikciós endonukleázokkal linearizáltuk. A lineáris plazmidot használtuk templátnak az *in vitro* transzkripció során. Az mRNS minőségét és mennyiségét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük (15. ábra).

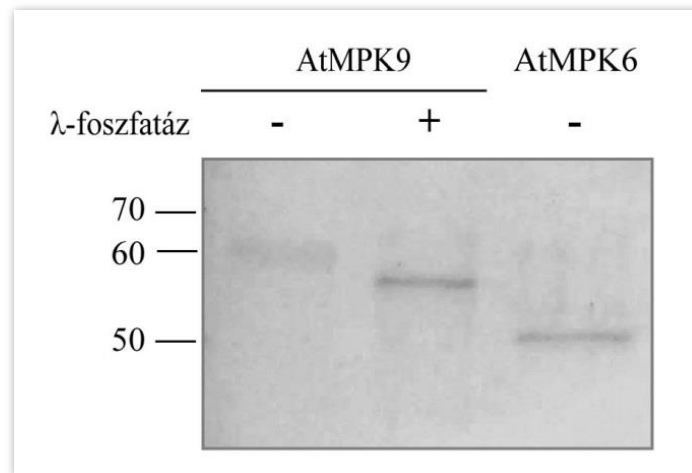


15. ábra. A vektorkonstrukció és az mRNS elektroforetikus képe. M: 1 kb DNS marker, 6000-3000-1000 bp jelölve, 1: az inszertet tartalmazó cirkuláris vektorkonstrukció, 2: az inszertet tartalmazó lineáris vektorkonstrukció, 3: a vektorkonstrukcióról készült mRNS.

Első kísérletünkben *in vitro* transzlációval szintetizáltuk a His₆-címkével ellátott WT AtMPK9-et és az A-alsó család egy reprezentatív képviselőjét, az AtMKK4 által klasszikus módon aktiválódó AtMPK6-ot. A fehérjéket affinitás kromatográfiás ágyon

tisztítottuk, ezt követően SDS-PAGE-n elválasztottuk a mintákat, majd Coomassie Blue festéssel detektáltuk a fehérjéket. A kinázok *in vitro* aktivitásának vizsgálatát mielin bázikus fehérje (MBP) mesterséges szubsztrátként történő alkalmazásával viteleztük ki.

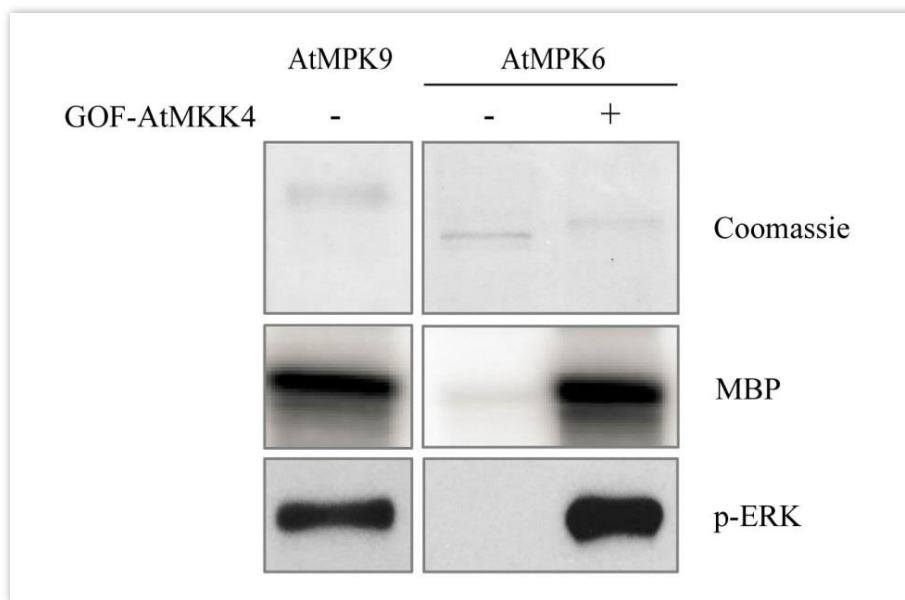
A két kináz Coomassie festett képe jelentős eltérést mutatott (16. ábra). Az AtMPK9-nél egy lassabban futó, elmosódott, míg az AtMPK6 esetében egy határozott sávot láttunk. A szokatlan mintázat háttérében a fehérje foszforilációja állhat, ugyanis a hozzáadott foszfát csoportok megváltoztatják a fehérje migrációs sebességét. Feltételezésünk igazolására az AtMPK9-t λ -foszfátázzal kezeltük, és azt tapasztaltuk, hogy ennek hatására az elmosódott sáv helyett egy alacsonyabb molekulásúlynak megfelelő, egyértelmű csík jelent meg. A mintázat megváltozása igazolta a hipotézisünket, miszerint az AtMPK9 foszforilálódik az *in vitro* transzláció során.



16. ábra. Az *in vitro* transzlált, affinitás tisztított AtMPK9 és az AtMPK6 Coomassie Blue-val festett gél fotója. Bal oldalon a fehérjék mérete jelölve (kDa), felül a λ -foszfátázzal kezelt (+) és nem kezelt (-) minták.

A MAP kinázok PAGE analízisét követő *in vitro* kináz aktivitás vizsgálat során is meglepő eredményt kaptunk. Várakozásainknak megfelelően, az AtMPK6 aktivitás csak az adekvát, konstitutívan aktív, GOF MAPKK hozzáadásával volt detektálható. Ezzel szemben az AtMPK9 mindennemű további MAPKK hozzáadása nélkül, önmagában is aktivitást mutatott. Az irodalmi adatok alapján jól ismert tény, hogy a TXY foszfoakceptor motívum biszfoszforilációja elengedhetetlen a MAPK-ok aktiválásához. Annak érdekében, hogy meghatározzuk az aktivációs hurok

foszforilációs állapotát az AtMPK9-ben és AtMPK6-ban, a poliklonális p-ERK ellenanyag alkalmazásával végeztünk Western blot analízist. Habár az anti-p-ERK ellenanyag az állati ERK1 biszfoszforilált TEY motívumának kimutatására készült, a növényi MAP kinázok megfelelő régióját is képes felismerni. A kísérletet szintén *in vitro* transzlált, affinitás kromatográfiával tisztított fehérjékkel végeztük. A kapott eredményeink alapján, az AtMPK6-ot csak abban az esetben ismerte fel a p-ERK ellenanyag, mikor a GOF-AtMKK4-gyel együtt transzláltuk, igazolva, hogy a TEY motívum foszforilációjához a GOF-AtMKK4 jelenléte elengedhetetlen. Ezzel szemben az AtMPK9-en aktiváló MAP kináz nélkül kimutatható volt a foszforiláció a TDY aktivációs hurokban (17. ábra).

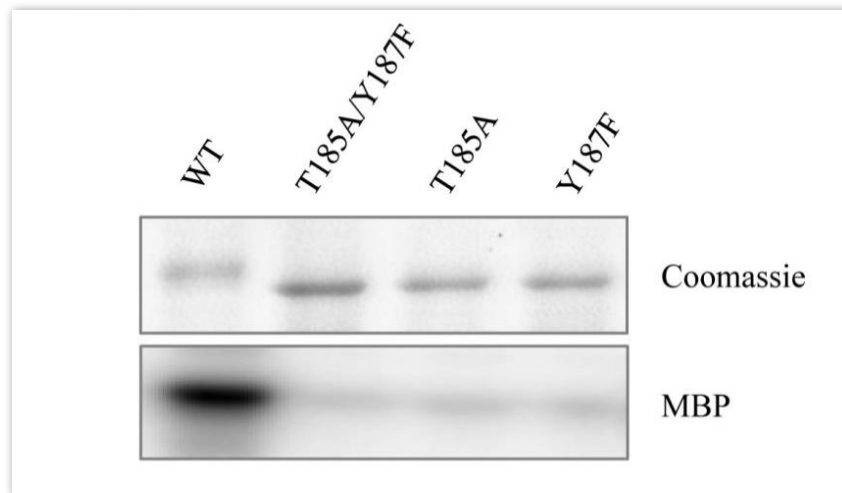


17. ábra. Az AtMPK9 és az AtMPK6 Coomassie Blue-val festett gélfotója, kináz aktivitása és Western blotja. Felül a GOF-AtMKK4 jelenléte: + szimbólummal jelölve.

Az AtMPK9-ben található, D-alcsaládra specifikus TDY motívum foszforilációját, az SZBK-MTA Proteomikai Kutatócsoportjának közreműködésével, tömegspektrometriás foszfoprotein analízissel is igazoltuk. A vad típusú AtMPK9 triptikus emésztése után a TDY aminosavtripleitet tartalmazó (173-191) peptid mind mono-, mind biszfoszforilált formában jelen volt, a monofoszforilált peptidben pedig csak a Tyr187-P volt kimutatható LC-MS/MS analízissel (Függelék II. ábra).

5.1.2. A TDY motívum foszforilációja

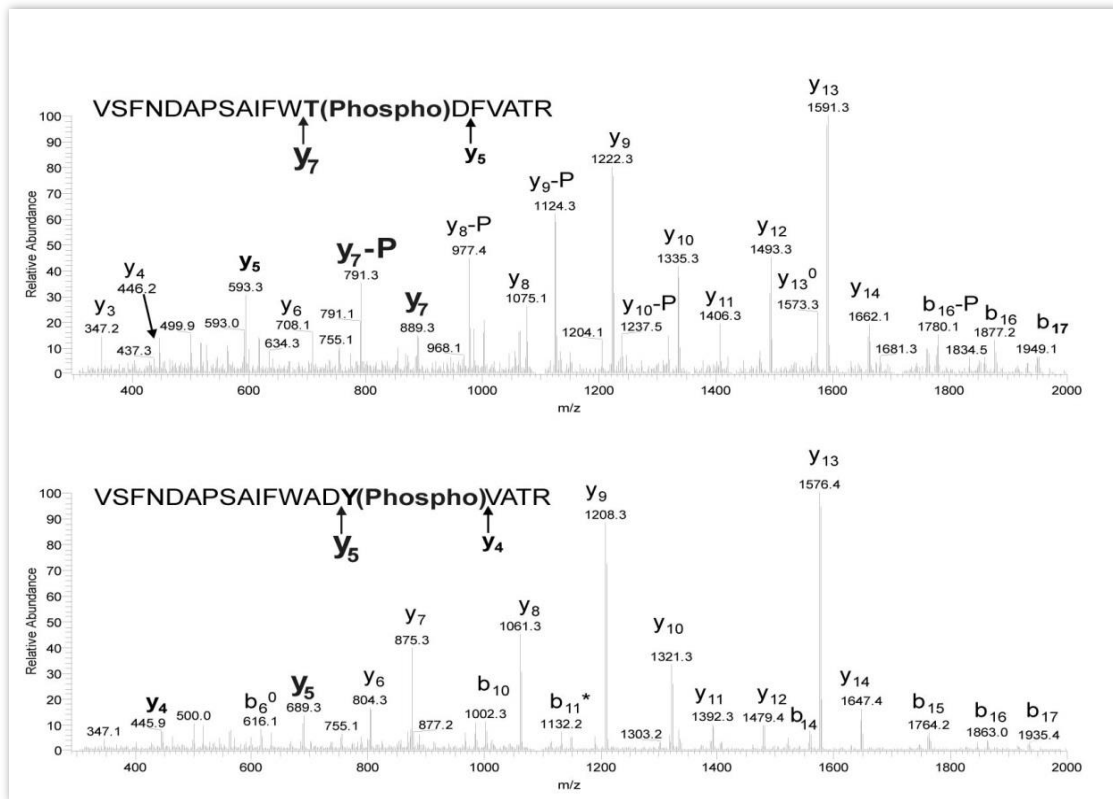
A legtöbb MAPK aktivációjához szükség van a TXY hurok kettős foszforilációjára. Ahhoz hogy eldönthessük, a jelenség fennáll-e az AtMPK9 esetében is *in vitro* mutagenezissel létrehoztuk a TDY hurok egyszeres treonin és tirozin, illetve dupla treonin/tirozin mutánsait. A His₆-címkével ellátott, vad típusú, valamint egyszeres T185A és Y187F, illetve a T185A/Y187F AtMPK9 mutánsokat *in vitro* transzlációval előállítottuk, majd Ni-kelát affinitás kromatográfiás tisztításuk után SDS-PAGE analízissel vizsgáltuk a mintákat. A Coomassie Blue-val történő festés megerősítette a korábban bemutatott, vad típusú fehérjére jellemző eredményeinket, ismét elmosódott sávként jelent meg az elválasztást követően. A mutáns változatok esetében azonban a defoszforilált AtMPK9-re jellemző mintázatot figyelhetünk meg, egy alacsonyabban futó, határozott csík jelezte a fehérje pozícióját az akrilamid gélben (18. ábra, felső panel). Ezek alapján feltételezhetjük, hogy az aktivációs hurok mutánsok foszforilációs szintje a vad típusénál alacsonyabb.



18. ábra. Az *in vitro* transzlált, tisztított vad típusú és mutáns AtMPK9 fehérje Coomassie Blue-val festett gélképe (felső panel) és kináz aktivitása (alsó panel).

Hipotézisünk megerősítésében, a szegedi kollégáink LC-MS/MS analízise volt segítségünkre. A tömegspektrometriás adatok igazolták, hogy az *in vitro* mutagenezissel valóban megtörtént az aminosavcsere. Ennél is fontosabb volt azonban, hogy a T185A mutánsban foszfortirozint, az Y187F mutánsban foszfortreonint sikerült kimutatniuk, ami arra enged következtetni, hogy a treonin és a tirozin egyszeres TDY motívumban

történő kicserélése nem befolyásolja a másik, változatlanul hagyott foszfoakceptor aminosav foszforilációját (19. ábra).



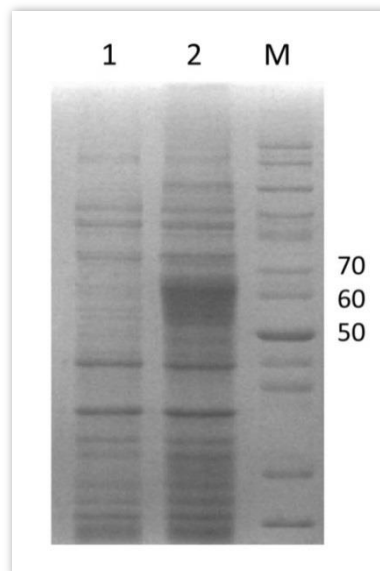
19. ábra. *In vitro* transzlált, tisztított AtMPK9 TDY mutánsok foszfoprotein analizisének tömegspektrogramja. A felső panel az Y187F mutánst mutatja és az azonosított foszforeonint, az alsó panel a T185A mutánsban talált foszfortirozint.

A mutáns fehérjék segítségével fel kívántuk deríteni a TDY motívum foszforilációs állapota és a kináz aktivitása közti összefüggést is. A tisztított AtMPK9 variánsokkal és az MBP-vel végzett *in vitro* kináz reakciók eredményei azt mutatták, hogy mindhárom mutáns katalitikusan inaktív (18. ábra, alsó panel), ugyanis ezeknél a mintáknál nem látunk MBP foszforilációt.

Ezek az adatok összességében arra engednek következtetni, hogy a TDY hurok mindkét foszfoakceptor aminosavának foszforilációja szükséges az AtMPK9 aktiválásához.

5.1.3. Bakteriális fehérjeexpresszió

Fennáll a lehetőség, hogy a búzacsíra alapú transzlációs elegy valamely endogén kináz komponense is foszforilálhatja az AtMPK9-et. A baktériumsejt döntő módon nem képes az eukarióta fehérjék poszttranszlációs módosításaira, így a baktériumban termelt foszforilált, illetve aktív kináz újabb bizonyítékkal támasztaná alá az autofoszforiláció tényét. Az AtMPK9-et így megkíséreltük bakteriális, autoindukciós rendszerben előállítani. A pET28a bakteriális expressziós vektorba inszertáltuk a WT és a LOF AtMPK9 kódoló régióit. A PCR reakcióhoz templátként már korábban elkészült, az inszerteket tartalmazó transzlációs vektorkonstrukciók szolgálták, primerként pedig a pET28a_AtMPK9for és pET28a_AtMPK9rev oligonukleotidok. A PCR terméket kicsaptuk, majd a pET28a vektorral együtt restriktív endonukleázokkal (NcoI és NotI) emésztettük. A ligálás ebben az esetben hagyományos módon, T4 DNS ligáz hozzáadásával történt. A ligátumot a plazmid felsokszorozására alkalmas XL10-GOLD kompetens sejtbe transzformáltuk, majd kolónia PCR-rel ellenőriztük, hogy sikeresen végbement-e a reakció. Az inszerttel megegyező méretű PCR terméket adó klónt kiválasztottuk, majd plazmidot izoláltunk. A kiválasztott klónokat (pET28a_AtMPK9WT és LOF) fehérjeexpresszióra optimalizált BL21 (DE3) kompetens sejtbe transzformáltuk, majd autoindukcióval termeltettük a fehérjét.



20. ábra. A pET28a_AtMPK9WT bakteriális expressziójának Coomassie gélképe. Az AtMPK9 WT expressziója látható a gél első két oszlopában: 1: indukció előtti, 2: indukció utáni minta. M: festetlen fehérje marker, 70, 60 és 50 kDa jelölve.

A 20. ábra látható, hogy a vad típusú AtMPK9 termelődött, viszont az affinitás tisztítás annak ellenére sem sikerült a feltárt sejtek felülúszójából, hogy anti-His-POD ellenanyag alkalmazásával, Western blot analízissel igazoltuk a His₆-címkével jelölt fehérje meglétét. Mindez arra enged következtetni, hogy a fehérje valószínűleg oldhatatlan zárványtest formájában vált ki, ami az irodalmi adatok alapján nem váratlan jelenség [68]. A csekély sikerrel kecsegtető fehérje refoldinggal nem kísérleteztünk, mivel az általunk végzett funkcionális vizsgálatokhoz nagy tisztaságú, natív térszerkezetű aktív enzimre volt szükségünk.

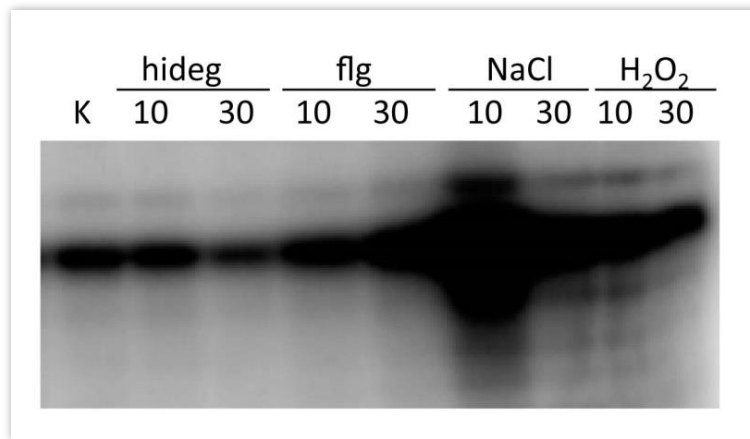
5.1.4. Az *in vivo* expresszált AtMPK9 MAPKK-okkal való kölcsönhatása

Az AtMPK9 *in vivo* szerepének, kölcsönható partnereinek tanulmányozása érdekében létrehoztuk a növényi protoplaszt tranzienst expresszióra alkalmas vektorkonstrukciókat: a pRTHA növényi expressziós vektorba inszertáltuk a vad típusú AtMPK9. A PCR reakcióhoz templátként már korábban elkészült, az inszerteket tartalmazó transzlációs vektorkonstrukciók szolgálták, primerként pedig a pRTHA_AtMPK9for és pRTHA_AtMPK9rev oligonukleotidok. A PCR reakciót agaróz gélen futtatva ellenőriztük, majd a pRT vektorral együtt restriktív endonukleázokkal (NcoI és NotI) emésztettük. A ligálás ebben az esetben is hagyományos módon, T4 DNS ligáz hozzáadásával történt. A ligátumot a plazmid felszaporítására alkalmas XL10-GOLD kompetens sejtbe transzformáltuk, majd kolónia PCR-rel ellenőriztük, hogy sikeresen végbement-e a reakció. Az inszerttel megegyező méretű PCR terméket adó klónt kiválasztottuk, majd plazmidot izoláltunk.

Munkánk kezdetekor növényekben nem volt ismert olyan MAPK, mely aktivációjához ne lenne szükség MAPKK-ra. Az irodalomban közölt élesztő kettős hibriddel és microarray-jel végzett kísérletek nem azonosítottak az AtMPK9-cel kölcsönható MAPKK-t [90,91], melyet kutatócsoportunk élesztő kettős hibrid vizsgálatai is megerősítettek (nem közölt adatok). Ezek az eredmények azonban nem zárják ki azt a forgatókönyvet, hogy az AtMPK9 egy eddig ismeretlen állványfehérje közreműködésével lép kölcsönhatásba valamelyik MAPKK-zal.

Ezen lehetőséget *in vivo*, protoplaszt tranzienst fehérjeexpresszióval kívántuk vizsgálni. Első lépésként kerestünk egy fiziológiásan releváns stimulust, amely *in vivo* aktiválni képes az AtMPK9-et. A sejteket az egy éjszakán át tartó fehérjeexpressziót követően másnap sóval (NaCl), hideggel, hidrogén-peroxiddal és egy patogén eredetű

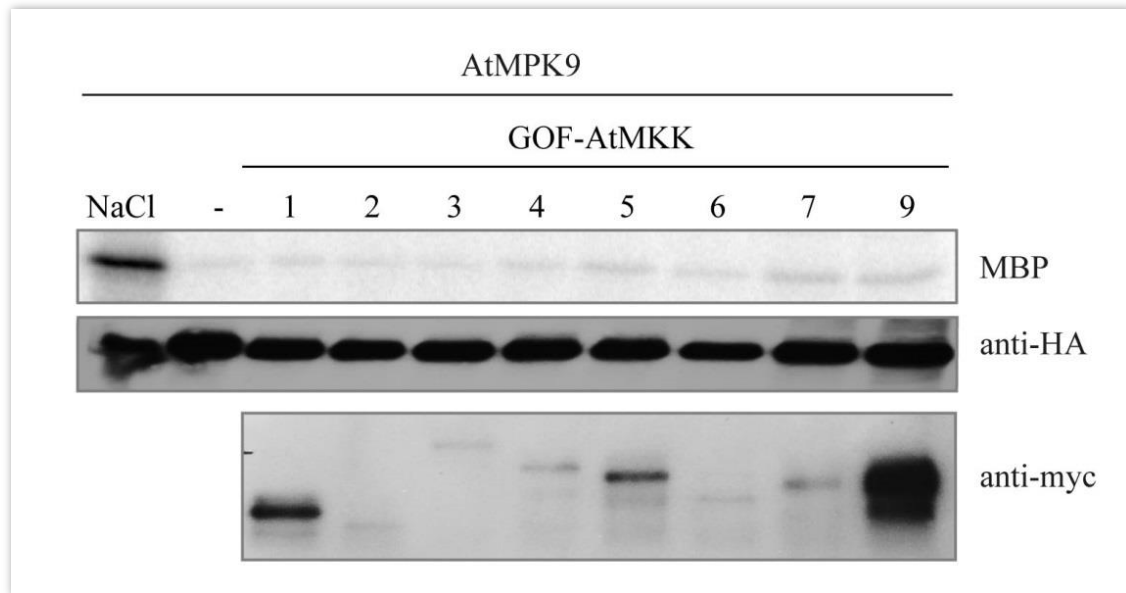
peptiddel, a flagellinnel (flg22) kezeltük 10, illetve 30 percen keresztül. A protoplasztokból származó fehérje mintákból anti-HA-agaróz segítségével immunprecipitáltuk az AtMPK9-et, és MBP modell szubsztráttal meghatároztuk *in vitro* kináz aktivitását (21. ábra). A hideg kivételével minden stressz körülmény növelte az AtMPK9 aktivitását, legerősebb stresszornak a NaCl bizonyult. Így a továbbiakban 10 perces, 250 mM NaCl-dal történő stresszt használtunk pozitív kontrollként a kináz reakciók esetében.



21. ábra. Különböző stresszorok hatása az AtMPK9 aktivitására. Az ábrán protoplaszt tranziens expresszióval termelt, tisztított AtMPK9-cel végzett kináz reakció eredménye (autoradiogram).

Ezt követően végrehajtottuk az AtMPK9-HA, konstitutívan aktív myc-AtMKK-okkal történő együttes tranziens expresszióját, minden MAPKK alcsaládból választottunk egy-egy képviselőt, majd a fentebb leírt lépéseket követve meghatároztuk az egyes minták *in vitro* kináz aktivitását. NaCl-dal kezelt sejteket használtunk pozitív kontrollként és a feltárt sejtlizátum 1/3-át használtuk a reakciókhoz. Látható, hogy a kináz aktivitás növekedése elenyészőnek bizonyult a sóaktivált AtMPK9-nél megfigyelhetővel szemben (22. ábra). Anti-HA-POD ellenanyaggal Western blot analízist végeztünk a sejtlizátum 2/3-ával, annak érdekében, hogy kimutassuk, hogy az AtMPK9-HA-t. Strippelés után a membránt anti-myc-POD ellenanyaggal jelöltük, hogy igazoljuk a konstitutívan aktív myc-AtMKK-k jelenlétét. Míg az anti-HA-POD-dal azonos mennyiségű fehérjemennyiséget mutattunk ki, addig az anti-myc-POD analízis esetén nagymértékű különbségeket láttunk a fehérjemennyiségekben. A kísérlet többszöri ismétlésre is azonos eredményt adott, a myc-címkével ellátott kinázok

mennyisége eltérő volt, ami arra utal, hogy a különböző MAPKK RNS-eknek vagy fehérjéknek különböző a stabilitása.



22. ábra. Konstitutívan aktív AtMKK-ok koexpressziója az AtMPK9-cel protoplazmában.

A felső panelen a tisztított AtMPK9-cel végzett kináz reakció autoradiogramja, alatta az anti-HA-POD, illetve az anti-myc-POD ellenanyaggal végzett Western blot.

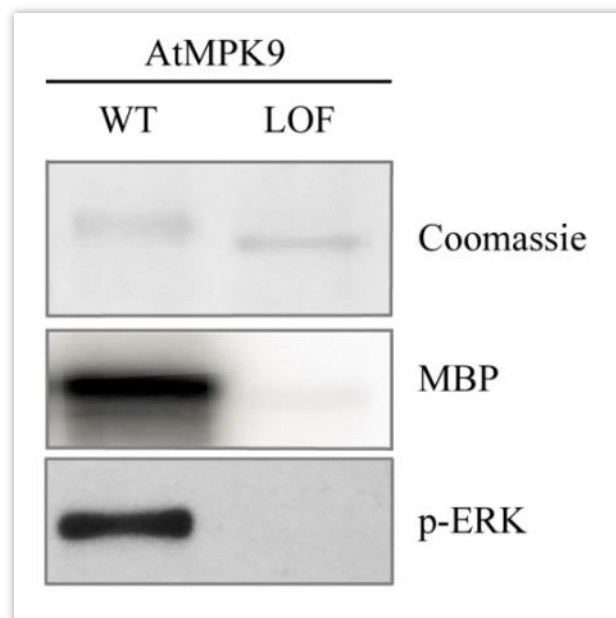
Mindezek az eredmények, úgymint, a transzlált AtMPK9 magas katalitikus aktivitása, a kölcsönhatás hiánya bármely MAPK kinázzal, illetve a GOF-AtMKK-ok általi aktiváció hiánya, azt jelzik, hogy az AtMPK9 aktivációja MAPKK-tól függetlenül, valószínűsíthetően autofoszforilációs mechanizmussal történik.

5.1.5. Az AtMPK9 *in vitro* autofoszforilációja

Annak érdekében, hogy bebizonyítsuk, hogy az AtMPK9 aktivációja valóban autofoszforiláció révén következik be, előállítottuk a kináz inaktív (LOF) mutánt, amelyben *in vitro* mutagenézissel kicseréltük az ATP kötéséért felelős lizint (K52R). A His₆-címkével ellátott LOF-ot szintén affinitás tisztítottuk, majd SDS-PAGE-n szeparáltuk. Már a Coomassie Blue-val végzett festés után egyértelmű különbség látszott a vad típusú és a kináz inaktív mutáns között, nevezetesen a LOF a defoszforilált WT és a foszforilációs hurok mutánsok által mutatott migrációs képet mutatott, azaz egy alacsonyabban futó, egyértelmű sávot (23. ábra). A Coomassie gélkép alapján feltételeztük, hogy a LOF mutáns nincs foszforilálva, így nem rendelkezik kináz aktivitással. Utóbbi hipotézisünket *in vitro* kináz reakcióval

bizonyítottuk, az AtMPK9 LOF mutáns változata az MBP-vel szemben nem mutatott kináz aktivitást (23. ábra).

Következő kísérletünkkel azt vizsgáltuk, hogy vajon az aktivációs hurok foszforilációja függ-e a kináz aktivitásától. Ennek érdekében Western blotot végeztünk a már ismertetett p-ERK ellenanyaggal: az ellenanyag csak a WT fehérjét ismerte fel a LOF-ot nem (23. ábra). Egyrészt az a tény, hogy a LOF TDY aktivációs hurka nem foszforilált, kizárja azt a lehetőséget, hogy valamely búzacsíra kivonatban lévő, ismeretlen kináz foszforilálja a WT-t, másrészt azt sugallja, hogy az AtMPK9 aktivitás szükséges a TDY foszforilációjához, azaz az aktiválódás valószínűleg autokatalitikus.



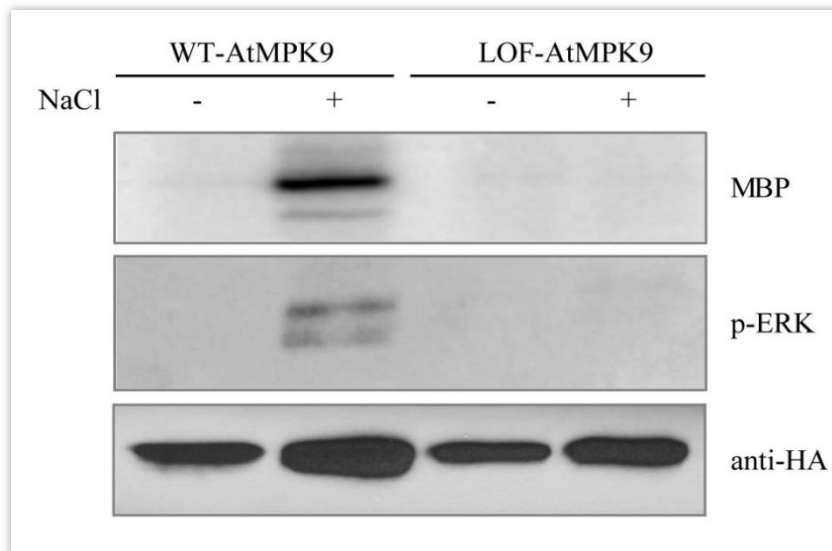
23. ábra. Az *in vitro* transzlált, affinitás tisztított WT és a LOF AtMPK9 összehasonlítása.

Felül a Coomassie gélképe, középen a kináz reakció autoradiogramja, alul az anti-p-ERK ellenanyaggal végzett Western blot eredménye.

A p-ERK antitesttel kapott eredményünket MS analízissel is alátámasztottuk: a LOF fehérjén nem azonosítottak foszforilált aminosavat a (173–191) triptikus peptidben.

5.1.6. Az AtMPK9 *in vivo* autofoszforilációja

Annak érdekében, hogy levonhassuk a következtetést, hogy az AtMPK9 valóban autofoszforilálódik, megnéztük, hogy a LOF AtMPK9 foszforilált-e a TDY hurokban *in vivo*. Protoplasztokat transzformáltunk a WT és a LOF konstrukciókkal, majd sókezelést is alkalmaztunk mindkét esetben. A p-ERK ellenanyaggal végzett Western blot igazolta, hogy a WT AtMPK9 stressz kezelés hatására, *in vivo* foszforilálódik a TDY hurkon (24. ábra). Ezzel szemben a sókezelt és a kezeletlen LOF minták egymástól megkülönböztethetetlenek voltak, egyikük sem adott jelet a p-ERK ellenanyaggal.

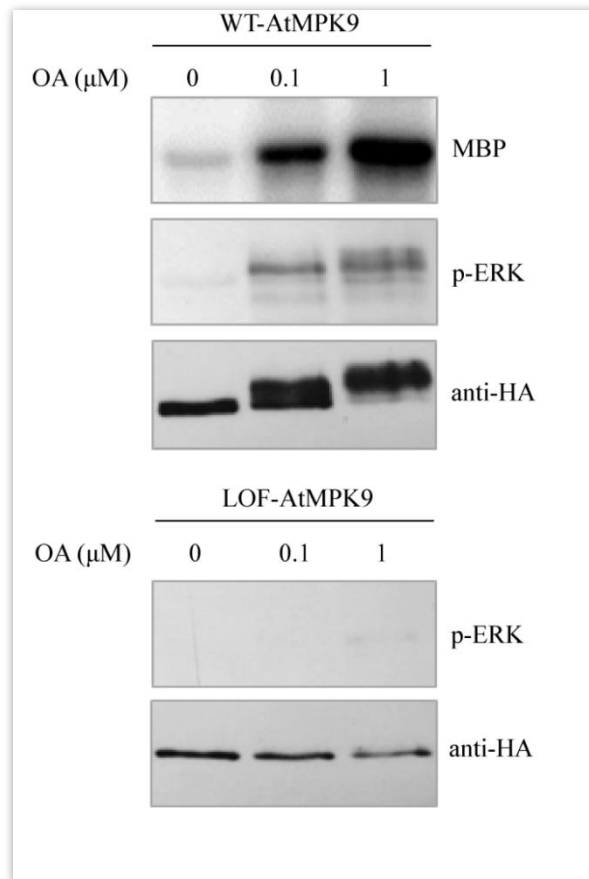


24. ábra. *In vivo* expresszált WT és LOF AtMPK9 vizsgálata sókezelés után. Felül az affinitás tisztított kinázokkal végzett kináz reakció autoradiogramja, középen az anti-p-ERK ellenanyaggal, alul pedig az anti-HA-POD antitesttel végzett Western blot képe látható. A sókezelt mintákat (+) jel mutatja.

In vitro kináz reakciót is végeztünk a sejtől izolált fehérjével, melynek eredménye összecsengett a Western blot eredményével: csak a sókezelt WT AtMPK9 rendelkezett kináz aktivitással. Megállapíthatjuk tehát, hogy sóaktiválás nélkül az AtMPK9 alapaktivitása elenyésző, aktivációs hurkának foszforilációja nem kimutatható. Sókezelés hatására viszont szignifikáns növekedés tapasztalható az aktivitásban és a TDY hurok foszforilációja is kimutatható.

5.1.7. Foszfataz inhibitorok hatása az *in vivo* kináz aktivitásra

Ismert, hogy a MAPK-okat negatívan szabályozza számos tirozin-, treonin vagy kettős specifitású foszfataz. Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk szabályozzák-e foszfatazok az AtMPK9 TDY foszforilációját, illetve a kináz aktivitását, WT és LOF kinázokat expresszáló sejteket kezeltünk foszfataz inhibitorokkal: okadánsavval, mely gátolja a protein-foszfataz 2A-t (PP2A), a PP2B-t és kissé a PP1-et is, illetve ortovanadáttal, mely a tirozin-, és a kettős specifitású foszfatazok gátlószere. Az okadánsavat 0,1 illetve 1 μM koncentrációban adtuk a sejtekhez, a kezelés egy órán át tartott. A p-ERK ellenanyaggal végzett Western bloton a TDY hurok foszforilációjának drámai mértékű növekedését láthattuk az okadánsavval kezelt WT minták esetén (25. ábra), míg az ortovanadát szinte semmi hatással nem bírt (nem bemutatott adat).



25. ábra. Foszfataz inhibitorok hatásának vizsgálata WT és LOF AtMPK9 fehérjéket túltermelő protoplasztokban. A felső panelen a WT AtMPK9 kináz aktivitásának autoradiogramja, p-ERK és anti-HA-POD antitesttel végzett Western blotja, az alsón a LOF AtMPK9, p-ERK és anti-HA-POD antitesttel végzett Western blotja látható.

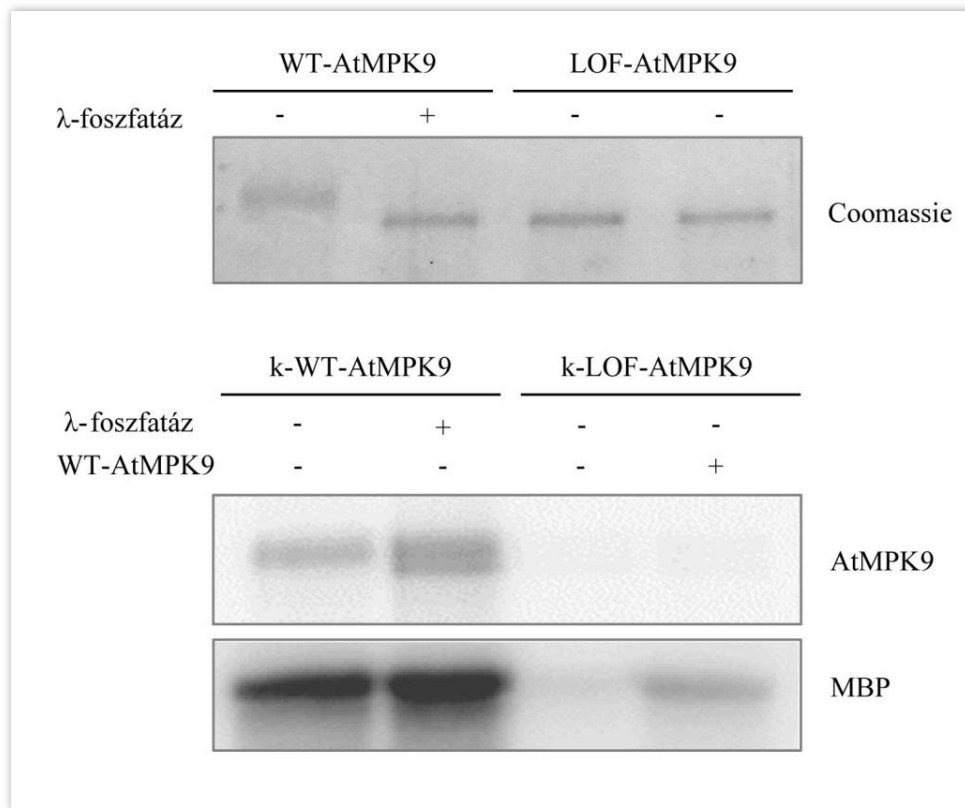
A WT AtMPK9 aktivitása láthatóan összefüggésben áll a TDY hurok foszforilációjával. Fontos megjegyeznünk, hogy egyik foszfatáz inhibitor kezelés sem idézte elő a LOF TDY hurokjának foszforilációját. Összefoglalva tehát elmondhatjuk, hogy az AtMPK9 autofoszforilálódik és a defoszforiláció – direkt vagy indirekt módon – okadánsav-érzékeny foszfatázok hatására következhet be.

5.1.8. Az autofoszforiláció mechanizmusa

A következő felmerülő kérdés az autofoszforiláció mechanizmusának mikéntje. Az autofoszforilálódó fehérjék leggyakrabban intermolekulárisan aktiválódnak, azaz az egyik kináz molekula aktiválja a másik kináz molekulát, viszont ahogy a Bevezetés fejezetben jeleztem, intramolekuláris autofoszforiláció is ismert. Kísérleteinkkel azt kívántuk tisztázni, hogy az AtMPK9 melyik mechanizmussal aktiválódik. A kísérleti felállás a következő volt: *in vitro* transzlációval előállított, Ni-kelát ágyhoz kötött WT AtMPK9-et defoszforiláltunk λ -foszfatázzal és megnéztük, hogy képes-e az autofoszforilációra. A foszfatáz kezeletlen minta Coomassie Blue-val festett gélképén egy lassabban vándorló, elmosódott sáv volt látható, megerősítve korábbi kísérleteinket (26. ábra).

Ezekkel a kezelt és kontroll mintákkal kináz reakciót is végeztünk (jelen esetben a kináz önmaga volt a szubsztrát is) és autoradiogramon detektáltuk a foszforiláció megtörténtét. Az autoradiogramon látható, hogy mindkét mintában történt autofoszforiláció, viszont a foszfatáz kezelt minta esetén erősebb jelet kaptunk, azaz a kináz nagyobb mértékben volt képes az autofoszforilációra, ha korábban defoszforiláltuk. Megvizsgáltuk, hogy rendelkezik-e kináz aktivitással az MBP-vel szemben is a foszfatáz kezelt és kontroll WT AtMPK9. A következőkben megvizsgáltuk, hogy a vad típusú AtMPK9 képes-e transzfoszforilálni a kináz inaktív AtMPK9-et. A LOF fehérjét *in vitro* transzláltuk, affinitás ággal tisztítottuk és hozzáadtuk a szintén *in vitro* transzlált, affinitás tisztított, eluált, azaz oldatban lévő WT fehérjét. Kináz reakcióban a LOF fehérje volt a szubsztrát, a WT fehérje a kináz. Közvetlenül a reakció leállítás előtt az oldatban lévő WT AtMPK9-et eltávolítottuk, az ágyhoz kapcsolt LOF mutáns fehérjét pedig PAGE-n szeparáltuk, majd autoradiogramon detektáltuk a foszforilációt. Azt találtuk, hogy a WT nem képes

transzfoszforilálni a LOF-ot, tehát kijelenthetjük, hogy az AtMPK9 intramolekuláris mechanizmussal, azaz cisz-autofoszforilációval aktiválódik.

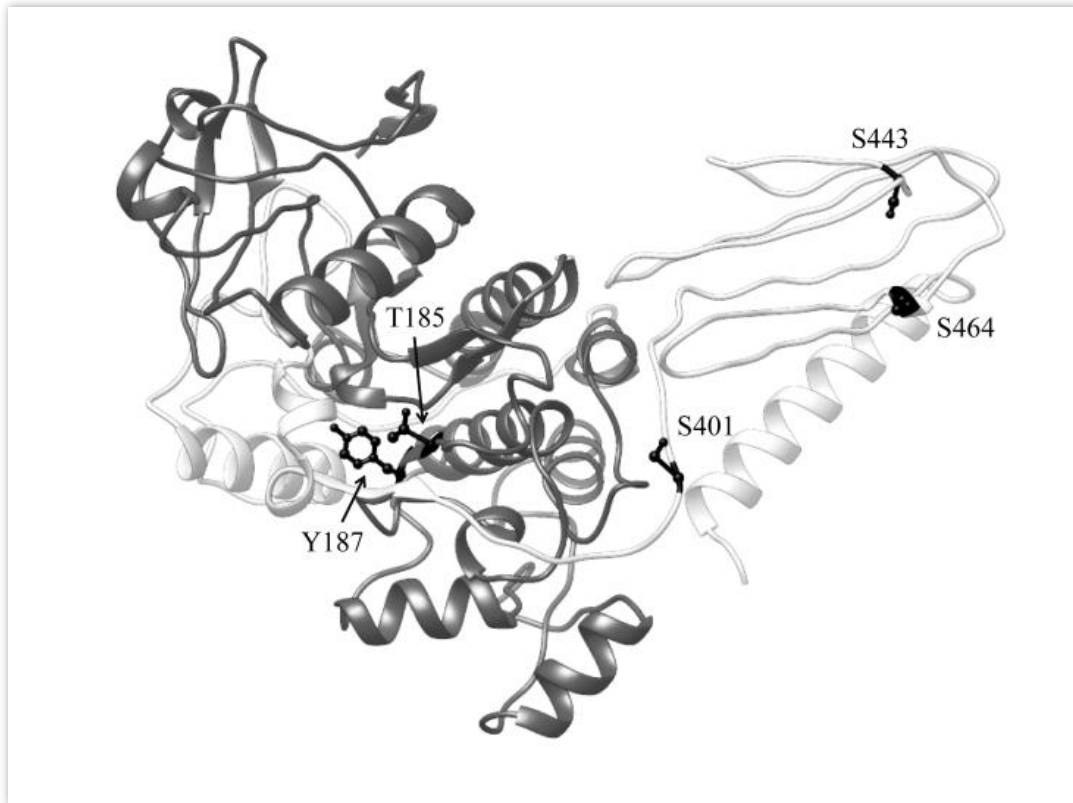


26. ábra. A foszforiláció mechanizmusának vizsgálata *in vitro* transzlált, affinitás tisztított WT és LOF AtMPK9 fehérjékkel. Felül a fehérjék Coomassie gélképe látható, középen az AtMPK9 autofoszforilációját jelző sáv a kináz reakció autoradiogramján, alul pedig az egyes minták MBP-vel szemben mutatott kináz aktivitása.

5.1.9. Az AtMPK9 foszfoaminosav mintázata

Az AtMPK9 gélen mutatott diffúz migrációs mintázata arra enged következtetni, hogy a fehérje több helyen foszforilált. LC-MS/MS analízissel kimutattuk, hogy az aktív, illetve az inaktív kináz foszforilációs mintázata eltérést mutat a C-terminális doménben: amíg a WT-ban a TDY motívumon kívül a Ser401, a Ser443 és a Ser464 ugyancsak foszforilálva volt, addig a LOF-ban nem volt kimutatható egyetlen aminosav foszforilációja sem (Függelék III. ábra). Különös módon, a Ser464-et a klasszikus MAPK foszforilációs helyekre jellemző prolin helyett alanin követi. Ez azt sugallja, hogy az AtMPK9 a tipikus MAPK foszforilációs mintázattól (S/T-P) eltérő aminosav

sorrend esetén is képes a foszforilációra, azaz a klasszikus MAPK-oknál szélesebb foszforilációs hely felismerő specifitással rendelkezik. Az azonosított foszforilációs helyeket a 27. ábra mutatja.

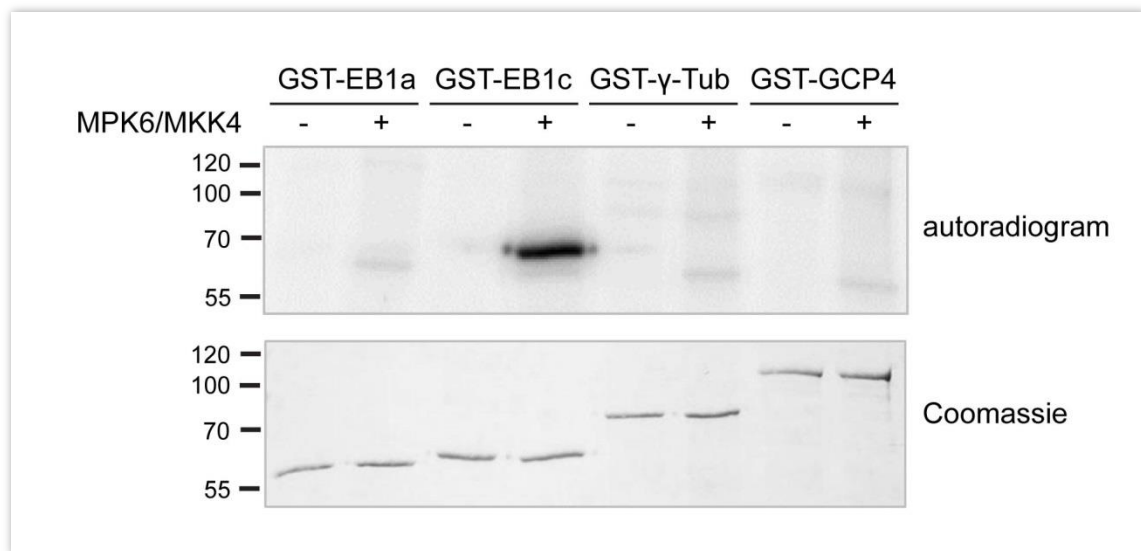


27. ábra. Az AtMPK9-ben azonosított foszforilációs helyek. Az I-TASSER predikációs program által generált 3-dimenziós szerkezet. Az ábra az UCSF Chimera program segítségével készült. A foszforilált aminosavak (Thr185, Tyr187, Ser401, Ser443 és Ser464) feketével jelöltek, a kináz domén [1–314 aminosavak] sötétszürke színnel, a C-terminális domén pedig világosszürke színnel.

5.2. Az AtMPK6 feltételezett szubsztrátjainak azonosítása

A munkacsoportunk által kifejlesztett és optimalizált *in vitro* transláción alapuló szubsztrát azonosítási módszerrel kívántuk azonosítani az AtMPK6 potenciális szubsztrátjait. Prágai kollégáink kimutatták, hogy az aktív AtMPK6 kölcsönhat a γ -tubulinnal és az EB1c-vel, emellett megállapították, hogy a növényi mikrotubulusokhoz a γ -tubulin, a GCP4, az EB1 fehérjék és az aktív AtMPK6 is kapcsolódhat. Így felmerülhet a kérdés, hogy az AtMPK6 által történő foszforiláció is kimutatható-e.

Négy feltételezett szubsztrátot vizsgáltunk, melyet GST-címkével állítottunk elő a sejtmentes transzlációs rendszerben: GST-EB1a, GST-EB1c, GST-GCP4, GST- γ -tubulin. Affinitás tisztításuk után kináz reakciót hajtottunk végre His₆-címkével előállított, myc-AtMKK4-GOF által aktivált, eluált AtMPK6-tal. Amint azt már korábban bemutattuk az AtMPK6 ismert aktivátora az AtMKK4, hiányában az AtMPK6 nem rendelkezik aktivitással (17. ábra). Az *in vitro* transzlációs rendszerben az AtMPK6-ot együtt transzláltuk az aktiváló GOF-AtMKK4-gyel. A GST-címkével ellátott szubsztrátok esetén negatív kontrollként magát a GST fehérjét is termeltettük (nem közölt adatok). Egyértelműen megállapíthatjuk, hogy a kináz reakció csak a EB1 növény-specifikus c izoformája esetén hozott pozitív eredményt, a másik három fehérje AtMPK6 általi foszforilációja nem volt kimutatható *in vitro* körülmények között (28. ábra, [110]).



28. ábra. Az AtMPK6 feltételezett szubsztrátjainak foszforilációja. Az *in vitro* transzlált, GST-címkével jelölt feltételezett szubsztrátokkal és az AtMKK4-gyel együtt *in vitro* transzlált, affinitás tisztított, eluált AtMPK6-végzett kináz reakció felül, a szubsztrátok Coomassie gélképe alul.

6. Megbeszélés

A klasszikus MAP kinázok jellemzője, hogy az aktivációs hurokban található TXY aminosav triplet foszfoakceptor aminosav oldalláncainak foszforilációja révén, az adekvát MAPK kinázok által aktiválódnak. A foszforiláció a kettős specifitású MAPK kinázok által, két lépésben valósul meg, mégpedig úgy, hogy először a tirozin, majd a treonin módosul, mely a kináz aktivitásában négy nagyságrendbeli növekedést idéz elő [120]. Az aktiváció szelektivitása a MAP kinázok C-terminális részén elhelyezkedő CD (common docking) domén által biztosított, mely a megfelelő kölcsönható fehérje komplement dokkoló doménjével hat kölcsön [121].

Számos kísérleti eredmény bizonyítja, hogy a MAP kinázok aktivációja nem kizárólag MAPK kináz általi foszforilációval jöhet létre. Némely atipikus MAP kináz aktiválódásához elég egy szerin oldalláncon foszforilálnia IPAK-ok által [61]. Más atipikus kinázok, mint az ERK7/8, a TXY motívumuk kettős, intramolekuláris autofoszforilációjával érik el maximális aktivitásukat [80,82]. Meglepő módon olyan kináz is létezik, mely klasszikus és atipikus módon is képes aktiválódni: a p38 α MAP kináz MAPKK közreműködésén kívül autokatalízissel is képes aktiválódni. Utóbbi alternatív mechanizmus a TAB1 (transforming growth factor (TGF)- β -activated kinase 1/MAP3K7-binding protein 1) fehérjével történő direkt interakcióval következik be a p38 α TGY aktivációs hurokjában [122]. Ezen eredmények azt sugallják, hogy a MAP kinázok szabályozása sokkal kifinomultabb, mint azt korábban gondoltuk, és a klasszikus aktiváció mellett létező autofoszforiláció sokkal általánosabb aktivációs mechanizmus lehet.

Az *Arabidopsis* genomja 20 MAP kinázt kódol, de közülük csak néhány – az AtMPK3, az AtMPK4 és az AtMPK6 – tanulmányozott részletesen, melyek mind a klasszikus MAP kinázok közé tartoznak és TEY motívummal rendelkeznek. Jól ismert, hogy ezek az A- és B-alcsaládba tartozó MAP kinázok kettős specifitású MAPKK-ok által aktiválódnak [82].

A TEY motívumot tartalmazó növényi MAPK-okkal összehasonlítva lényegesen kevesebb információnk van a D-alcsalád, TDY motívumot tartalmazó tagjairól [98,100]. Egyetlen képviselőjükről, az AtMPK8-ról ismert, hogy az AtMKK3 általi foszforilációval aktiválódik [89]. Azonban a másik ismertett aktivációs mechanizmus

– azaz a kalmodulinnal való direkt interakció – meglepő módon nem a treonin és a tirozin foszforilációján alapszik, mivel a kalmodulin mind a vad típusú, mind a TDY mutáns fehérjének növeli az aktivitását.

Jelen munkánk során egy újabb D-alcsalád-beli MAP kináz, az AtMPK9 szabályozását mutatjuk be, illetve ismertetünk egy *in vitro* transzláción alapuló szubsztrát azonosítási módszert.

Az AtMPK6-tal ellentétben az *in vitro* transzlált AtMPK9 meglepően magas kináz aktivitást mutatott MAPK kinázok hozzáadása nélkül. Ez az emelkedett kináz aktivitás a TDY motívum kettős foszforilációjával járt együtt, melyet anti-p-ERK ellenanyaggal történő immunoblottal igazoltunk. A TDY motívum két foszfoakceptor aminosavjának foszforilációja elengedhetetlen a kináz aktiválódásához, mivel mind a treonin, mind a tirozin *in vitro* mutagenézise drámaian lecsökkentette az aktivitást. LC-MS/MS analízissel bizonyítottuk, hogy az egyszeres mutánsok esetén a nem mutált aminosav foszforilálódik, tehát a két aminosav foszforilációja egymástól függetlenül is bekövetkezhet.

Annak érdekében, hogy azonosítsuk az AtMPK9-cel esetlegesen kölcsönható protein kinázokat a búzacsíra elegyből, az *in vitro* transzlált, affinitás kromatográfiával tisztított AtMPK9 komplexet MS analízisnek vetettük alá. A korábbi irodalmi eredményekhez hasonlóan munkacsoportunk sem azonosított kölcsönható partnereket ezzel a megközelítéssel (nem közölt adat).

Az AtMPK9 MAPKK-független aktivációját *in vivo* kísérletekkel, *Arabidopsis* protoplasztokban végzett tranziens expresszióval is vizsgáltuk. Azt tapasztaltuk, hogy az AtMPK9 sókezelésre aktiválódott, viszont egyetlen, vele együtt expresszált, konstitutívan aktív MAPKK sem tudta aktiválni. Továbbá protoplasztban túltermeltetett, sóaktivált WT AtMPK9-cel szemben a LOF nem volt detektálható az anti-p-ERK ellenanyaggal immunoblot során, újabb bizonyítékot nyújtva az autofoszforilációs mechanizmusról szóló feltételezésünknek. További bizonyítékot találtunk az autoaktivációra foszfatáz inhibitorok *in vivo* rendszerben való alkalmazásával, és kimutattuk, hogy az AtMPK9 aktivitása foszfatázokkal szabályozott. Az okadánsav kezelés hatására a vad típusú, illetve mutáns kinázt expresszáló sejtekben szignifikánsan megnövekedett foszforilációt és aktivációt tapasztaltunk WT AtMPK9 esetén, míg a LOF esetén nem történt változás.

Ezen eredmények összessége arra utal, hogy katalitikus aktivitásának elnyeréséhez az AtMPK9-nek nincs szüksége aktivátor kinázra, szabályozása autofoszforilációs mechanizmuson és fehérje foszfatázok által történő defoszforiláción alapszik.

Egy speciális kísérleti felállással ellenőriztük, hogy az autofoszforiláció intramolekuláris vagy az általánosabb, intermolekuláris módon történik-e. Ehhez az inaktív LOF AtMPK9-et affinitás kromatográfiás ágyhoz kapcsolva alkalmaztuk, mint szubsztrátot az *in vitro* kináz reakcióban, ahol a hozzáadott, eluált WT kináz nem volt képes foszforilálni azt. Mikor pedig az affinitás kromatográfiás ágyhoz kapcsolt WT kinázt használtuk szubsztrátként és kinázként egyaránt, azt láttuk, hogy önmagát képes foszforilálni. Tehát megállapíthattuk, hogy az autofoszforiláció intramolekuláris mechanizmussal történik.

LC-MS/MS analízisünk során a WT fehérje rendezetlen C-terminális doménjében is azonosítottunk három foszforilált szerin aminosavat, míg a LOF-ban egyetlen ilyen módosításon átesett aminosav sem volt kimutatható. Érdekes módon, az egyik szerin esetében nem teljesül a MAP kinázok foszforilációs helyének feltétele, azaz hogy a foszfoakceptor szerint prolinnak kell követnie. Mindezen eredmények arra utalnak, hogy az AtMPK9-nek szélesebb foszfo-hely felismerési képessége van a klasszikus MAP kinázokkal szemben, mely tulajdonsága elengedhetetlen lehet az autokatalitikus funkció szempontjából

Korábban élesztő kettős hibriddel végzett, szisztematikus kísérletek során sem találtak a növényi MAPK-ok D-alcsaládjának tagjainak kölcsönható MAPKK partnert [123]. Ezzel összhangban vannak saját, az AtMPK9-cel végzett *in vivo* eredményeink is, azaz hogy az AtMPK9 aktivitása MAPKK-független, aktiválódása autokatalitikus mechanizmussal történik és szoros összefüggésben áll a TDY hurok két foszfoakceptor aminosavának autofoszforilációjával. Az eredményeinktől eltérően, az AtMPK8-ról, az AtMPK9 egy közeli rokonáról ismert, hogy aktivációja MAPKK és kalmodulin függő is egyben [89]. A D-alcsaládba tartozó MAPK-ok közti homológiát aminosav szekvencia elemzéssel vizsgáltuk: míg a kináz doménjeik nagyfokú hasonlóságot mutatnak, addig rendezetlen C-terminális doménjeik eltérnek egymástól (Függelék I.ábra). Tehát megállapíthatjuk, hogy az ide tartozó kinázok valószínűleg különböző szabályozási mechanizmussal rendelkezhetnek, és ebben a szabályozásban a C-terminális domén

fontos szerepet játszhat. Feltételezzük, hogy a C-terminális feltételezett regulátor funkciójának és az AtMPK9 C-terminális doménjében azonosított foszforilált aminosavaknak fiziológias jelentősége is lehet a kináz aktivitás szabályozásában, viszont pontosabb következtetések levonásához további kísérletek szükségesek.

Az *in vitro* transzlációs rendszerünket kiválóan alkalmazhatjuk MAP kináz szubsztrát azonosításra is. Külföldi együttműködő partnerünk kutatásainak középpontjában a növényi mikrotubulus-asszociált fehérjék állnak. Megfigyeléseik szerint az AtMPK6 kölcsönhat az EB1c-vel valamint a γ -tubulinnal, illetve a növényi mikrotubulusokhoz a γ -tubulin, a GCP4, a pozitív vég specifikus EB1 fehérjék is kapcsolódhatnak. A jelenség felveti annak lehetőségét, hogy ezen fehérjék szubsztrátjai a komplexben azonosított kináznak. Igazolandó a feltételezést, *in vitro* transzlált fehérjékkel kináz reakciót végeztünk: az EB1a, EB1c, γ -tubulin és GCP4 fehérjékkel, mint lehetséges szubsztrátokkal és az aktivált AtMPK6-tal. Kimutattuk, hogy az AtMPK6 a vizsgált fehérjék közül kizárólag az EB1 fehérje növény-specifikus c izoformáját foszforilálja *in vitro*, ami jó összhangban van azzal, hogy az EB1c-ben található prediktált MAPK kötő- és foszforilációs hely. Ez az eredmény azt sugallja, hogy a külső jelek által stimulált AtMPK6 az EB1c foszforilációján keresztül szerepet játszik a mitotikus orsó szabályozásában.

7. Következtetések

Az *Arabidopsis thaliana* MAP kinázok D-alsócsaládjába tartozó, TDY aktivációs hurkot tartalmazó AtMPK9 aktivációja mindeddig felderítetlen volt. A búzacsíra alapú, sejtmentes *in vitro* transzlációs rendszerben előállított AtMPK9 PAGE-n a fehérje foszforilációjának következményeként más MAP kinázoktól eltérő migrációs képet mutat, és MBP modell szubsztráttal történő, radioaktív kináz reakcióban szokatlanul magas alapaktivitással rendelkezik. Anti-p-ERK ellenanyaggal végzett immunoblot bizonyította, hogy az aktivitás a TDY hurok foszforilációjához köthető, melyet tömegspektrometriai analízissel is igazoltunk.

A TXY hurok mindkét foszfoakceptor aminosavának foszforilálnia kell a kináz aktivitás elnyeréséhez. A TDY hurok, *in vitro* mutagenézissel létrehozott T185A, Y187F és kettős T185A/Y187F mutánsai, illetve a kináz inaktív mutáns a vad típustól eltérő migrációs képet mutatnak, aktivitással nem rendelkeznek. LC-MS/MS analízissel kimutattuk, hogy az egyszeres mutánsok esetén a másik foszfoakceptor aminosav foszforilált, a kettős mutánsban és a LOF-ban nem azonosítható foszforiláció. A TDY motívum foszforilációja tehát mind a treonin, mind a tirozin aminosavon megtörténik, és ez elengedhetetlen az AtMPK9 autofoszforilációs mechanizmussal történő aktiválásához.

Az AtMPK9-nek nem ismert MAPK kináz aktivátora. *In vivo*, protoplaszt tranziens expressziós kísérleteinkkel bebizonyítottuk, hogy az AtMPK9-nek nincs kimutatható aktivitás növekedése egyetlen konstitutívan aktív MAPK kinázzal történő koexpresszió esetén sem, viszont a fiziológias stimulusok közül a NaCl, a H₂O₂ és a flagellin is aktiválja. Az *in vivo* rendszerben, anti-p-ERK ellenanyaggal végzett immunoblot alapján csak a sóaktivált WT AtMPK9 rendelkezik foszforilált aktivációs hurokkal, a LOF nem. Az AtMPK9 tehát MAPKK-független módon, autofoszforilációval aktiválódik.

A foszfatázok negatívan regulálják a MAP kinázokat. Az okadánsav gátolja a PP2A, PP2B és kissé a PP1 fehérje foszfatázokat. Okadánsavval kezelt, WT AtMPK9-et túltermelt sejtek aktivitása drámaian megnövekszik, és ezzel párhuzamosan nő a TDY hurok foszforiláltsági állapota, a LOF esetén nem történik változás. Tehát az AtMPK9-et fiziológiásan okadánsav-érzékeny foszfatázok defoszforilálhatják.

Az autofoszforiláció mechanizmusa lehet intra- és intermolekuláris. *In vitro* transzlált vad típusú és kináz inaktív fehérjét szubsztrátként használva a hozzáadott WT AtMPK9 nem foszforilálta a LOF-ot, így kijelenthetjük, hogy az aktiváció intramolekulárisan történik.

A C-terminális rendezetlen domén funkciója ismeretlen, a D-alcsaládon belül minden tag esetén különböző aminosav szekvenciával rendelkezik. Tömegspektrometriás mérésekkel a WT AtMPK9 C-terminális doménjében három foszfoszerint (Ser401, Ser443 és Ser464) azonosítottunk, melyből egy nem felel meg a MAPK-okra jellemző, szerin/treonin-prolin foszforilációs helynek. Feltételezzük, hogy a C-terminális domén regulátor funkcióval rendelkezhet, viszont a pontos mechanizmus feltárásához még további kísérletek szükségesek.

A növényi sejtosztódásban feltételezett szerepet játszó, mikrotubulus-asszociált fehérjék (EB1a, EB1c, γ -tubulin és GCP4) az AtMPK6 feltételezett szubsztrátjai. *In vitro* fehérjetermeléssel előállított fehérjékkel kináz reakciót végezve kimutattuk, hogy a négy vizsgált fehérje közül az AtMPK6-nak csak az EB1 növény-specifikus c izoformája a szubsztrátja. A foszforilációnak fontos szerepe lehet a mitotikus orsó szabályozásában.

8. Összefoglalás

A mitogén-aktivált protein kinázok (MAPK-ok) az eukarióta sejt legősibb jelátviteli útvonalaát alkotják, mely egy háromtagú kináz kaszkádból épül fel. A MAPK-ok aktivációja teljes mértékben az aktivációs hurokban lévő TXY motívum biszfoszforilációjától függ, melyért kettős specifitású MAPK kinázok (MAPKK-ok) felelősek. Az *Arabidopsis thaliana* mitogén-aktivált protein kináz 9 (AtMPK9) az atipikus MAP kinázok közé tartozik. Az atipikus kinázok TDY foszfoakceptor hellyel és egy hosszú C-terminális doménnel rendelkeznek, illetve hiányzik belőlük a MAPKK-kötő dokkoló motívum. Munkánk során számos *in vitro* and *in vivo* eredmény szolgáltatunk bizonyítékul arra, hogy az AtMPK9 MAPKK-októl függetlenül, autofoszforilációval aktiválódik. Tömegspektrometriás analízissel feltérképeztük az autofoszforilált aminosavakat a TDY motívumban és a rendezetlen C-terminális szabályozó doménben. A foszfoakceptor TDY motívum *in vitro* mutagenézisével megalkotott mutánsokkal végzett kísérletek bizonyították, hogy a kináz aktivitásához kettős foszforilációra van szükség. Továbbá igazoltuk, hogy az AtMPK9 kináz inaktív mutánsa nem képes transzfoszforilálódni a TDY hurokban mikor vad típusú AtMPK9-et adunk hozzá, ami arra enged következtetni, hogy intramolekuláris autokatalitikus foszforiláció történik. *In vivo* kísérletek során kimutattuk, hogy az AtMPK9 NaCl-dal aktiválható, illetve, hogy okadánsav-érzékeny foszfatázok szabályozzák aktivitását. Mindezen eredmények alapján kijelenthető, hogy a MAPKK-független aktivációs mechanizmus szempontjából a növényi AtMPK9 hasonlóságot mutat az emlős ERK7/8 (extracelluláris szignál regulált kináz 7/8), atipikus MAPK-okkal.

A stressz-aktivált MAPK útvonalak részt vesznek a környezeti változásokra adott adaptációs válaszokban, szabályozzák a citoskeletális átrendeződéseket, ily módon befolyásolják a sejtosztódást. A folyamat részletei kevésbé feltérképezettek, ahogy a legtöbb résztvevő kináz szubsztrátjai is. Tömegspektrometriával azonosítottak citoskeletális fehérjéket az AtMPK6 komplexben, melyeket *in vitro* transzlációval állítottunk elő és foszforilációs reakciót hajtottunk végre velük. Azonosítottunk egy új AtMPK6 szubsztrátot, az EB1c-t, a mikrotubulus pozitív vég kötő fehérje, növény-specifikus c izoformáját. Az AtMPK6 ezzel szemben nem foszforilálja az EB1a-t. Ezen foszforiláció központi jelentőségű lehet a leánykromoszómák szeparációjában.

9. Summary

The *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase 9 (AtMPK9) is a member of an atypical class of MAPKs. Representatives of this MAPK family have a TDY phosphoacceptor site, a long C-terminal extension and lack the common MAPKK-binding docking motif. In the present paper, we describe multiple *in vitro* and *in vivo* data showing that AtMPK9 is activated independently of any upstream MAPKKs but rather is activated through autophosphorylation. We mapped the autophosphorylation sites by MS to the TDY motif and to the C-terminal regulatory extension. We mutated the phosphoacceptor sites on the TDY, which confirmed the requirement for bisphorylation at this site for full kinase activity. Next, we demonstrated that the kinase-inactive mutant form of AtMPK9 is not transphosphorylated on the TDY site when mixed with an active AtMPK9, implying that the mechanism of the autocatalytic phosphorylation is intramolecular. Furthermore, we show that *in vivo* AtMPK9 is activated by salt and is regulated by okadaic acid-sensitive phosphatases. We conclude that the plant AtMPK9 shows similarities to the mammalian atypical MAPKs, such as extracellular-signal-regulated kinase (ERK) 7/8, in terms of an MAPKK-independent activation mechanism.

Stress-activated plant MAP kinase pathways play roles in growth adaptation to the environment by modulating cell division through cytoskeletal regulation, but the mechanisms are poorly understood. Despite the increasing number of annotated kinases, the majority of the kinase substrates have not yet been described. We performed phosphorylation experiments with *in vitro* translated cytoskeletal proteins, which were identified by mass spectrometry as components of MPK6 complexes and. We found a novel substrate for MPK6, the plant specific microtubule plus end protein, EB1c. MPK6 phosphorylates EB1c, but not EB1a, and has roles to maintain regular planes of cell division under stress conditions.

10. Irodalomjegyzék

- 1 Kanehisa, M., Goto, S., Sato, Y., Kawashima, M., Furumichi, M. and Tanabe, M. (2014) Data, information, knowledge and principle: back to metabolism in KEGG. *Nucleic Acids Res.* **42**, 199–205.
- 2 Fischer, E. and Fourneau, E. (1901) Ueber einige Derivate des Glykocolls. *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft* **34**, 2868–2877.
- 3 Fischer, E. (1902) Syntheses in the purine and sugar group. Nobel Lect., Elsevier, Amsterdam.
- 4 Du Vigneaud, V., Ressler, C., Swan, C. J. M., Roberts, C. W., Katsoyannis, P. G. and Gordon, S. (1953) The synthesis of an octapeptide amide with the hormonal activity of oxytocin. *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 4879–4880.
- 5 Merrifield, R. B. and Gutte, B. (1969) The total synthesis of an enzyme with ribonuclease A activity. *J. Am. Chem. Soc.* **91**, 501–502.
- 6 Gutte, B. and Merrifield, R. B. (1971) The synthesis of ribonuclease A. *J. Biol. Chem.* **246**, 1922–1941.
- 7 Schneider, J. and Kent, S. B. H. (1988) Enzymatic activity of a synthetic 99 residue protein corresponding to the putative HIV-1 protease. *Cell* **54**, 363–368.
- 8 Beligere, G. S. and Dawson, P. E. (1999) Conformationally assisted protein ligation using C-terminal thioester peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 6332–6333.
- 9 Saxon, E. and Bertozzi, C. R. (2000) Cell surface engineering by a modified Staudinger reaction. *Science* **287**, 2007–2010.
- 10 Nilsson, B. L., Hondal, R. J., Soellner, M. B. and Raines, R. T. (2003) Protein assembly by orthogonal chemical ligation methods protein assembly by orthogonal chemical ligation methods. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 5268–5269.
- 11 Nishiuchi, Y., Inui, T., Nishio, H., Bódi, J., Kimura, T., Tsuji, F. I. and Sakakibara, S. (1998) Chemical synthesis of the precursor molecule of the Aequorea green fluorescent protein, subsequent folding, and development of fluorescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 13549–13554.
- 12 Hackeng, T. M., Fernández, J. A., Dawson, P. E., Kent, S. B. and Griffin, J. H. (2000) Chemical synthesis and spontaneous folding of a multidomain protein: Anticoagulant microprotein S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 14074–14078.
- 13 Hackeng, T. M., Rosing, J., Spronk, H. M. and Vermeer, C. (2001) Total chemical synthesis of human matrix Gla protein. *Protein Sci.* **10**, 864–870.

- 14 Grogan, M. J., Pratt, M. R., Marcaurelle, L. and Bertozzi, C. R. (2002) Homogeneous glycopeptides and glycoproteins for biological investigation. *Annu. Rev. Biochem.* **71**, 593–634.
- 15 Cole, P. A., Courtney, A. D., Shen, K., Zhang, Z., Qiao, Y., Lu, W. and Williams, D. M. (2003) Chemical approaches to reversible protein phosphorylation. *Acc. Chem. Res.* **36**, 444–452.
- 16 Cotton, G. J. and Muir, T. W. (2000) Generation of a dual-labeled fluorescence biosensor for Crk-II phosphorylation using solid-phase expressed protein ligation. *Chem. Biol.* **7**, 253–261.
- 17 Blaschke, U. K., Cotton, G. J. and Muir, T. W. (2000) Synthesis of multi-domain proteins using expressed protein ligation: strategies for segmental isotopic labeling of internal regions. *Tetrahedron* **56**, 9461–9470.
- 18 Makrides, S. C. (1996) Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **60**, 512–538.
- 19 Sørensen, H. P. and Mortensen, K. K. (2005) Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* **115**, 113–128.
- 20 Pécs, M. Zárványtestek feldolgozása. In: Pécs, M. (szerk.), *Fermentációs feldolgozási műveletek*. Typotex, Budapest, 2011: 212-219.
- 21 Middelberg, A. P. J. (2002) Preparative protein refolding. *Trends Biotechnol.* **20**, 437–443.
- 22 Studier, F. W. and Moffatt, B. A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**, 113–130.
- 23 Studier, F. W. (2005) Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr. Purif.* **41**, 207–234.
- 24 Dissmeyer, N. and Schnittger, A. Guide to the book *Plant Kinases*. In: Dissmeyer, N., and Schnittger, A. (eds.), *Plant Kinases*. Humana Press, New York, 2011: 3.
- 25 Mathur, J. and Koncz, C. (1998) Establishment and maintenance of cell suspension cultures. *Arab. Protoc.* **82**, 27–30.
- 26 Potrykus, I. (1991) Gene transfer to plants: assessment of published approaches and results. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **42**, 205–225.
- 27 Töpfer, R., Matzeit, V., Gronenborn, B., Schell, J. and Steinbiss, H.-H. (1987) A set of plant expression vectors for transcriptional and translational fusions. *Nucleic Acids Res.* **15**, 5890.

- 28 Swartz, J. (2006) Developing cell-free biology for industrial applications. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **33**, 476–485.
- 29 Nirenberg, M. W. and Matthaei, J. H. (1961) The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **47**, 1588–1602.
- 30 Kim, T.-W., Oh, I.-S., Keum, J.-W., Kwon, Y.-C., Byun, J.-Y., Lee, K.-H., Choi, C.-Y. and Kim, D.-M. (1996) Prolonged cell-free protein synthesis using dual energy sources: combined use of creatine phosphate and glucose for the efficient supply of ATP and retarded accumulation of phosphate. *J. Anat.* **97**, 1510–1515.
- 31 Goerke, A. R. and Swartz, J. R. (2009) High-level cell-free synthesis yields of proteins containing site-specific non-natural amino acids. *Biotechnol. Bioeng.* **102**, 400–416.
- 32 Saraogi, I., Zhang, D., Chandrasekaran, S. and Shan, S. (2011) Site-specific fluorescent labeling of nascent proteins on the translating ribosome. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 14936–14939.
- 33 Ohuchi, S., Nakano, H. and Yamane, T. (1998) In vitro method for the generation of protein libraries using PCR amplification of a single DNA molecule and coupled transcription/translation. *Nucleic Acids Res.* **26**, 4339–4346.
- 34 Goerke, A. R. and Swartz, J. R. (2008) Development of cell-free protein synthesis platforms for disulfide bonded proteins. *Biotechnol. Bioeng.* **99**, 351–67.
- 35 Kanter, G., Yang, J., Voloshin, A., Levy, S., Swartz, J. R. and Levy, R. (2007) Cell-free production of scFv fusion proteins: An efficient approach for personalized lymphoma vaccines. *Blood* **109**, 3393–3399.
- 36 Zawada, J. F., Yin, G., Steiner, A. R., Yang, J., Naresh, A., Roy, S. M., Gold, D. S., Heinsohn, H. G. and Murray, C. J. (2011) Microscale to manufacturing scale-up of cell-free cytokine production - a new approach for shortening protein production development timelines. *Biotechnol. Bioeng.* **108**, 1570–1578.
- 37 Katzen, F., Chang, G. and Kudlicki, W. (2005) The past, present and future of cell-free protein synthesis. *Trends Biotechnol.* **23**, 150–156.
- 38 Goshima, N., Kawamura, Y., Fukumoto, A., Miura, A., Honma, R., Satoh, R., Wakamatsu, A., Yamamoto, J., Kimura, K., Nishikawa, T., et al. (2008) Human protein factory for converting the transcriptome into an in vitro-expressed proteome. *Nat. Methods* **5**, 1011–1017.
- 39 Spirin, A. S. Introduction: Prehistory of cell-free translation systems. In: Spirin, A. S. (ed.), *Cell-free translation systems*. Humana Press, New York, 2002: 3–16.

- 40 Wang, X., Liu, J., Zheng, Y., Li, J., Wang, H., Zhou, Y., Qi, M., Yu, H., Tang, W. and Zhao, W. M. (2008) An optimized yeast cell-free system: sufficient for translation of human papillomavirus 58 L1 mRNA and assembly of virus-like particles. *J. Biosci. Bioeng.* **106**, 8–15.
- 41 Weber, L. A., Feman, E. R. and Baglioni, C. (1975) A cell free system from HeLa cells active in initiation of protein synthesis. *Biochemistry* **14**, 5315–5321.
- 42 Mureev, S., Kovtun, O., Nguyen, U. T. T. and Alexandrov, K. (2009) Species-independent translational leaders facilitate cell-free expression. *Nat. Biotechnol.* **27**, 747–752.
- 43 Taylor, B. E. and Irvin, J. D. (1990) Depurination of plant ribosomes by pokeweed antiviral protein. *FEBS Lett.* **273**, 144–146.
- 44 Brümmer, J., Thole, H. and Kloppstech, K. (1994) Hordothionins inhibit protein synthesis at the level of initiation in the wheat-germ system. *Eur. J. Biochem.* **219**, 425–433.
- 45 Taylor, S., Massiah, A., Lomonosoff, G., Roberts, L. M., Lord, J. M. and Hartley, M. (1994) Correlation between the activities of five ribosome-inactivating proteins in depurination of tobacco ribosomes and inhibition of tobacco mosaic virus infection. *Plant J.* **5**, 827–835.
- 46 Madin, K., Sawasaki, T., Ogasawara, T. and Endo, Y. (2000) A highly efficient and robust cell-free protein synthesis system prepared from wheat embryos: plants apparently contain a suicide system directed at ribosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 559–564.
- 47 Shimizu, Y., Inoue, A., Tomari, Y., Suzuki, T., Yokogawa, T., Nishikawa, K. and Ueda, T. (2001) Cell-free translation reconstituted with purified components. *Nat. Biotechnol.* **19**, 751–755.
- 48 Sawasaki, T., Ogasawara, T., Morishita, R. and Endo, Y. (2002) A cell-free protein synthesis system for high-throughput proteomics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 14652–7.
- 49 Endo, Y. and Sawasaki, T. (2006) Cell-free expression systems for eukaryotic protein production. *Curr. Opin. Biotechnol.* **17**, 373–80.
- 50 Bardóczy, V., Géczy, V., Sawasaki, T., Endo, Y. and Mészáros, T. (2008) A set of ligation-independent in vitro translation vectors for eukaryotic protein production. *BMC Biotechnol.* **8**, 32.
- 51 Stein, A., Pache, R. A., Bernadó, P., Pons, M. and Aloy, P. (2009) Dynamic interactions of proteins in complex networks: a more structured view. *FEBS J.* **276**, 5390–5405.

- 52 Peck, S. C. (2006) Analysis of protein phosphorylation: methods and strategies for studying kinases and substrates. *Plant J.* **45**, 512–522.
- 53 Komis, G., Illés, P., Beck, M. and Šamaj, J. (2011) Microtubules and mitogen-activated protein kinase signalling. *Curr. Opin. Plant Biol.* **14**, 650–7.
- 54 Tokunaga, Y., Takeuchi, K., Takahashi, H. and Shimada, I. (2014) Allosteric enhancement of MAP kinase p38 α 's activity and substrate selectivity by docking interactions. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **21**, 704–711.
- 55 Canagarajah, B. J., Khokhlatchev, A., Cobb, M. H. and Goldsmith, E. J. (1997) Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation. *Cell* **90**, 859–869.
- 56 Lee, T., Hoofnagle, A. N., Resing, K. A. and Ahn, N. G. (2005) Hydrogen exchange solvent protection by an ATP analogue reveals conformational changes in ERK2 upon activation. *J. Mol. Biol.* **353**, 600–612.
- 57 Cowley, S., Paterson, H., Kemp, P. and Marshall, C. J. (1994) Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells. *Cell* **77**, 841–852.
- 58 Dephoure, N., Gould, K. L., Gygi, S. P. and Kellogg, D. R. (2013) Mapping and analysis of phosphorylation sites: a quick guide for cell biologists. *Mol. Biol. Cell* **24**, 535–42.
- 59 Cargnello, M. and Roux, P. P. (2011) Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **75**, 50–83.
- 60 Ahn, N. G., Seger, R., Bratlien, R. L., Diltz, C. D., Tonks, N. K. and Krebs, E. G. (1991) Multiple components in an epidermal growth factor-stimulated protein kinase cascade. *J. Biol. Chem.* **266**, 4220–4227.
- 61 Déléris, P., Trost, M., Topisirovic, I., Tanguay, P.-L., Borden, K. L. B., Thibault, P. and Meloche, S. (2011) Activation loop phosphorylation of ERK3/ERK4 by group I p21-activated kinases (PAKs) defines a novel PAK-ERK3/4-MAPK-activated protein kinase 5 signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **286**, 6470–8.
- 62 Robbins, D. J. and Cobb, M. H. (1992) Extracellular signal-regulated kinases 2 autophosphorylates on a subset of peptides phosphorylated in intact cells in response to insulin and nerve growth factor: analysis by peptide mapping. *Mol. Biol. Cell* **3**, 299–308.
- 63 Robbins, D. J., Zhen, E., Cheng, M., Xu, S., Vanderbilt, C. A., Ebert, D., Garcia, C., Dang, A. and Cobb, M. H. (1993) Regulation and properties of extracellular signal-regulated protein kinases 1,2, and 3. *Nephrology* **4**, 1104–1110.

- 64 Wu, J., Rossomando, A. J., Her, J. H., Del Vecchio, R., Weber, M. J. and Sturgill, T. W. (1991) Autophosphorylation in vitro of recombinant 42-kilodalton mitogen-activated protein kinase on tyrosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 9508–9512.
- 65 Coulombe, P. and Meloche, S. (2007) Atypical mitogen-activated protein kinases: structure, regulation and functions. *Biochim. Biophys. Acta* **1773**, 1376–87.
- 66 Déléris, P., Rousseau, J., Coulombe, P., Rodier, G., Tanguay, P.-L. and Meloche, S. (2008) Activation loop phosphorylation of the atypical MAP kinases ERK3 and ERK4 is required for binding, activation and cytoplasmic relocalization of MK5. *J. Cell. Physiol.* **217**, 778–88.
- 67 Abe, M. K., Kuo, W. L., Hershenson, M. B. and Rosner, M. R. (1999) Extracellular signal-regulated kinase 7 (ERK7), a novel ERK with a C-terminal domain that regulates its activity, its cellular localization, and cell growth. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 1301–1312.
- 68 Abe, M. K., Saelzler, M. P., Espinosa, R., Kahle, K. T., Hershenson, M. B., Le Beau, M. M. and Rosner, M. R. (2002) ERK8, a new member of the mitogen-activated protein kinase family. *J. Biol. Chem.* **277**, 16733–43.
- 69 Kostich, M., English, J., Madison, V., Gheyas, F., Wang, L., Qiu, P., Greene, J. and Laz, T. (2002) Human members of the eukaryotic protein kinase family. *Genome Biol.* **3**, research0043.1–0043.12.
- 70 Coulombe, P., Rodier, G., Bonneil, E., Thibault, P. and Meloche, S. (2004) N-terminal ubiquitination of extracellular signal-regulated kinase 3 and p21 directs their degradation by the proteasome. **24**, 6140–6150.
- 71 Nolen, B., Taylor, S. and Ghosh, G. (2004) Regulation of protein kinases; controlling activity through activation segment conformation. *Mol. Cell* **15**, 661–75.
- 72 Zimmermann, J., Lamerant, N., Grossenbacher, R. and Fürst, P. (2001) Proteasome- and p38-dependent regulation of ERK3 expression. *J. Biol. Chem.* **276**, 10759–10766.
- 73 Coulombe, P., Rodier, G., Pelletier, S., Pellerin, J. and Meloche, S. (2003) Rapid turnover of extracellular signal-regulated kinase 3 by the ubiquitin-proteasome pathway defines a novel paradigm of mitogen-activated protein kinase regulation during cellular differentiation. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 4542–4558.
- 74 Ishitani, T., Ninomiya-Tsuji, J., Nagai, S., Nishita, M., Meneghini, M., Barker, N., Waterman, M., Bowerman, B., Clevers, H., Shibuya, H. and Matsumoto, K. (1999) The TAK1-NLK-MAPK-related pathway antagonizes signalling between beta-catenin and transcription factor TCF. *Nature* **399**, 798–802.

- 75 Brott, B. K., Pinsky, B. A. and Erikson, R. L. (1998) Nlk is a murine protein kinase related to Erk/MAP kinases and localized in the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 963–968.
- 76 Ishitani, T., Kishida, S., Hyodo-Miura, J., Ueno, N., Yasuda, J., Waterman, M., Shibuya, H., Moon, R. T., Ninomiya-Tsuji, J. and Matsumoto, K. (2003) The TAK1-NLK mitogen-activated protein kinase cascade functions in the Wnt-5a/Ca(2+) pathway to antagonize Wnt/beta-catenin signaling. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 131–139.
- 77 Kanei-Ishii, C., Ninomiya-Tsuji, J., Tanikawa, J., Nomura, T., Ishitani, T., Kishida, S., Kokura, K., Kurahashi, T., Ichikawa-Iwata, E., Kim, Y., Matsumoto, K. and Ishii, S. (2004) Wnt-1 signal induces, phosphorylation and degradation of c-Myb protein via TAK1, HIPK2, and NLK. *Genes Dev.* **18**, 816–829.
- 78 Abe, M. K., Kahle, K. T., Saelzler, M. P., Orth, K., Dixon, J. E. and Rosner, M. R. (2001) ERK7 is an autoactivated member of the MAPK family. *J. Biol. Chem.* **276**, 21272–9.
- 79 Kuo, W. L., Duke, C. J., Abe, M. K., Kaplan, E. L., Gomes, S. and Rosner, M. R. (2004) ERK7 expression and kinase activity is regulated by the ubiquitin-proteasome pathway. *J. Biol. Chem.* **279**, 23073–23081.
- 80 Klevernic, I. V, Stafford, M. J., Morrice, N., Pegg, M., Morton, S. and Cohen, P. (2006) Characterization of the reversible phosphorylation and activation of ERK8. *Biochem. J.* **394**, 365–73.
- 81 Arabidopsis Genome Initiative. (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**, 796–815.
- 82 Colcombet, J. and Hirt, H. (2008) Arabidopsis MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes. *Biochem. J.* **413**, 217–226.
- 83 Nühse, T. S., Peck, S. C., Hirt, H. and Boller, T. (2000) Microbial elicitors induce activation and dual phosphorylation of the *Arabidopsis thaliana* MAPK 6. *J. Biol. Chem.* **275**, 7521–7526.
- 84 Ichimura, K., Shinozaki, K., Tena, G. and Sheen, J. (2002) Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends Plant Sci.* **7**, 301–308.
- 85 Rodriguez, M. C. S., Petersen, M. and Mundy, J. (2010) Mitogen-activated protein kinase signaling in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **61**, 621–49.
- 86 Reményi, A., Good, M. C. and Lim, W. A. (2006) Docking interactions in protein kinase and phosphatase networks. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **16**, 676–85.

- 87 Jonak, C., Okrész, L., Bögre, L. and Hirt, H. (2002) Complexity, cross talk and integration of plant MAP kinase signalling. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**, 415–424.
- 88 Dóczi, R., Okrész, L., Romero, A. E., Paccanaro, A. and Bögre, L. (2012) Exploring the evolutionary path of plant MAPK networks. *Trends Plant Sci.* **17**, 518–25.
- 89 Takahashi, F., Mizoguchi, T., Yoshida, R., Ichimura, K. and Shinozaki, K. (2011) Calmodulin-dependent activation of MAP kinase for ROS homeostasis in *Arabidopsis*. *Mol. Cell, Elsevier Inc.* **41**, 649–60.
- 90 Andreasson, E. and Ellis, B. (2010) Convergence and specificity in the *Arabidopsis* MAPK nexus. *Trends Plant Sci.* **15**, 106–13.
- 91 Popescu, S. C., Popescu, G. V, Bachan, S., Zhang, Z., Gerstein, M., Snyder, M. and Dinesh-Kumar, S. P. (2009) MAPK target networks in *Arabidopsis thaliana* revealed using functional protein microarrays. *Genes Dev.* **23**, 80–92.
- 92 Bartels, S., González Besteiro, M. A., Lang, D. and Ulm, R. (2010) Emerging functions for plant MAP kinase phosphatases. *Trends Plant Sci.* **15**, 322–9.
- 93 Meskiene, I., Bögre, L., Glaser, W., Balog, J., Brandstötter, M., Zwerger, K., Ammerer, G. and Hirt, H. (1998) MP2C, a plant protein phosphatase 2C, functions as a negative regulator of mitogen-activated protein kinase pathways in yeast and plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 1938–1943.
- 94 Yoo, J. H., Cheong, M. S., Park, C. Y., Moon, B. C., Kim, M. C., Kang, Y. H., Park, H. C., Choi, M. S., Lee, J. H., Jung, W. Y., Yoon, H. W., Chung, W. S., Lim, C. O., Lee, S. Y. and Cho, M.J. (2004) Regulation of the dual specificity protein phosphatase, DsPTP1, through interactions with calmodulin. *J. Biol. Chem.* **279**, 848–858.
- 95 Dosztányi, Z., Csizmok, V., Tompa, P. and Simon, I. (2005) IUPred: Web server for the prediction of intrinsically unstructured regions of proteins based on estimated energy content. *Bioinformatics* **21**, 3433–3434.
- 96 Radivojac, P., Vacic, V., Haynes, C., Cocklin, R. R., Mohan, A., Heyen, J. W., Goebel, M. G. and Iakoucheva, L. M. (2011) Identification, analysis and prediction of protein ubiquitination sites. *Proteins* **78**, 365–380.
- 97 Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J. and Zhang, Y. (2014) The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat. Methods, Nature Publishing Group* **12**, 7–8.
- 98 Jammes, F., Song, C., Shin, D., Munemasa, S., Takeda, K., Gu, D., Cho, D., Lee, S., Giordo, R., Sritubtim, S., Leonhardt, N., Ellis, B. E., Murata, Y. and Kwak, J. M. (2009) MAP kinases MPK9 and MPK12 are preferentially expressed in guard

- cells and positively regulate ROS-mediated ABA signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 20520–20525.
- 99 Heazlewood, J. L., Tonti-Filippini, J. S., Gout, A. M., Day, D. A., Whelan, J. and Millar, A. H. (2004) Experimental analysis of the Arabidopsis mitochondrial proteome highlights signaling and regulatory components, provides assessment of targeting prediction programs, and indicates plant-specific mitochondrial proteins. *Plant Cell* **16**, 241–256.
- 100 Salam, M. A., Jammes, F., Hossain, M. A., Ye, W., Nakamura, Y., Mori, I. C., Kwak, J. M. and Murata, Y. (2012) MAP Kinases, MPK9 and MPK12, Regulate Chitosan-Induced Stomatal Closure. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **76**, 1785–1787.
- 101 Sasabe, M., Soyano, T., Takahashi, Y., Sonobe, S., Igarashi, H., Itoh, T. J., Hidaka, M. and Machida, Y. (2006) Phosphorylation of NtMAP65-1 by a MAP kinase down-regulates its activity of microtubule bundling and stimulates progression of cytokinesis of tobacco cells. *Genes Dev.* **20**, 1004–1014.
- 102 Ellis, B. E. (2012) Postal code for a plant MAPK. *Biochem. J.* **446**, e5–e7.
- 103 Meister, M., Tomasovic, A., Banning, A. and Tikkanen, R. (2013) Mitogen-activated protein (MAP) kinase scaffolding proteins: A recount. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 4854–4884.
- 104 Hagan, I. M. (2008) The spindle pole body plays a key role in controlling mitotic commitment in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochem. Soc. Trans.* **36**, 1097–1101.
- 105 Sun, Q.-Y., Lai, L., Wu, G.-M., Park, K.-W., Day, B. N., Prather, R. S. and Schatten, H. (2001) Microtubule assembly after treatment of pig oocytes with taxol: correlation with chromosomes, γ -tubulin, and MAP kinase **490**.
- 106 Lee, S.-E., Kim, J.-H. and Kim, N.-H. (2007) Inactivation of MAPK affects centrosome assembly, but not actin filament assembly, in mouse oocytes maturing in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* **74**, 815–820.
- 107 Su, L., Burrell, M., Hill, D. E., Gyuris, J., Brent, R., Wiltshire, R., Trent, J., Vogelstein, B. and Kinzler, K. W. (1995) APC binds to the novel protein EB1. *Cancer Res.* **55**, 2972–2977.
- 108 Pozo-Guisado, E., Casas-Rua, V., Tomas-Martin, P., Lopez-Guerrero, A. M., Alvarez-Barrientos, A. and Martin-Romero, F. J. (2013) Phosphorylation of STIM1 at ERK1/2 target sites regulates interaction with the microtubule plus-end binding protein EB1. *J. Cell Sci.* **126**, 3170–80.

- 109 Kong, Z., Hotta, T., Lee, Y.-R. J., Horio, T. and Liu, B. (2010) The γ -tubulin complex protein GCP4 is required for organizing functional microtubule arrays in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **22**, 191–204.
- 110 Kohoutová, L., Kouřová, H., Nagy, S. K., Halada, P., Mészáros, T., Irute, M., Bögre, L. and Binarová, P. (2015) The *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase 6 is associated with γ -tubulin on microtubules, phosphorylates EB1c and maintains spindle orientation under nitrosative stress. *New Phytol.* in press.
- 111 Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T. and Sudarsanam, S. (2002) The protein kinase complement of the human genome. *Science* (80-.). **298**, 1912–1934.
- 112 Champion, A., Kreis, M., Mockaitis, K., Picaud, A. and Henry, Y. (2004) *Arabidopsis* kinome: after the casting. *Funct. Integr. Genomics* **4**, 163–187.
- 113 Nagy, S. K. and Mészáros, T. In vitro translation-based protein kinase substrate identification. In: Alexandrov, K., and Johnston, W. A. (eds.), *Cell-Free Protein Synthesis, Methods in Molecular Biology*. Humana Press, New York, 2014: 231–243.
- 114 Otani, M., Taniguchi, T., Sakai, A., Seta, J., Kadoyama, K., Nakamura-Hirota, T., Matsuyama, S., Sano, K. and Takano, M. (2011) Phosphoproteome profiling using a fluorescent phosphosensor dye in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **164**, 804–818.
- 115 Hartley, J. L., Temple, G. F. and Brasch, M. A. (2000) DNA cloning using in vitro site-specific recombination 1788–1795.
- 116 Mathur, J. and Koncz, C. (1998) Protoplast isolation, culture, and regeneration. *Methods Mol. Biol.* **82**, 35–42.
- 117 Bögre, L., Calderini, O., Binarova, P., Mattauch, M., Till, S., Kiegerl, S., Jonak, C., Pollaschek, C., Barker, P., Huskisson, N. S., Hirt, H. and Heberle-Bors, E. (1999) A MAP kinase is activated late in plant mitosis and becomes localized to the plane of cell division. *Plant Cell* **11**, 101–113.
- 118 Van Den Berg, S., Löfdahl, P. Å., Härd, T. and Berglund, H. (2006) Improved solubility of TEV protease by directed evolution. *J. Biotechnol.* **121**, 291–298.
- 119 Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C. and Ferrin, T. E. (2004) UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **25**, 1605–1612.
- 120 Ferrell, J. E. and Bhatt, R. R. (1997) Mechanistic studies of the dual phosphorylation of mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **272**, 19008–19016.

- 121 Tanoue, T., Adachi, M., Moriguchi, T. and Nishida, E. (2000) A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators. *Nat. Cell Biol.* **2**, 110–6.
- 122 Ge, B., Gram, H., Di Padova, F., Huang, B., New, L., Ulevitch, R. J., Luo, Y. and Han, J. (2002) MAPKK-independent activation of p38alpha mediated by TAB1-dependent autophosphorylation of p38alpha. *Science* **295**, 1291–1294.
- 123 Lee, J. S., Huh, K. W., Bhargava, A. and Ellis, B. E. (2008) Comprehensive analysis of protein-protein interactions between Arabidopsis MAPKs and MAPK kinases helps define potential MAPK signalling modules. *Plant Signal. Behav.* 1037–1041.
- 124 Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M. R., Chiu, W.-L., Gomez-Gomez, L., Boller, T., Ausubel, F. M. and Sheen, J. (2002) MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity. *Nature* **415**, 977–983.
- 125 Ren, D., Yang, H. and Zhang, S. (2002) Cell death mediated by MAPK is associated with hydrogen peroxide production in Arabidopsis. *J. Biol. Chem.* **277**, 559–565.

11.Saját publikációk jegyzéke

11.1. Az értekezés témájához kapcsolódó közlemények

Nagy, S. K., Darula, Z., Kállai, B. M., Bögre, L., Bánhegyi, G., Medzihradzsky, K. F., Horváth, G. V. and Mészáros, T. (2015) Activation of AtMPK9 through autophosphorylation that makes it independent of the canonical MAPK cascades. *Biochem. J.* **467**, 167–175.

IF: 4.396

Kohoutová, L., Kourová, H., **Nagy, S. K.**, Halada, P., Mészáros, T., Irute, M., Bögre, L. and Binarová, P. (2015) The Arabidopsis mitogen-activated protein kinase 6 is associated with γ -tubulin on microtubules, phosphorylates EB1c and maintains spindle orientation under nitrosative stress. *New Phytol.* in press.

IF: 7.672

Nagy, S. K. and Mészáros, T. (2014) In vitro translation-based protein kinase substrate identification. In *Cell-Free Protein Synthesis, Methods in Molecular Biology*, pp 231–243, Humana Press, New York.

11.2. Egyéb közlemények

Szeitner, Z., Lautner, G., **Nagy, S. K.**, Gyurcsányi, R. E. and Mészáros, T. (2014) A rational approach for generating cardiac troponin I selective Spiegelmers. *Chem. Commun. (Camb)*. **50**, 6801–4.

IF: 6.834

Kálmán, F. S., Lizák, B., **Nagy, S. K.**, Mészáros, T., Zámbó, V., Mandl, J., Csala, M. and Kereszturi, É. (2013) Natural mutations lead to enhanced proteasomal degradation of human Ncb5or, a novel flavoheme reductase. *Biochimie* **95**, 1403–1410.

IF: 3.123

12.Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Mandl József volt, illetve Prof. Dr. Bánhegyi Gábor jelenlegi intézetigazgatónak, hogy lehetőséget biztosítottak, hogy az Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Patobiokémiai Intézetben dolgozhassak, emellett köszönöm irántam érzett bizalmukat, támogatásukat.

Hálával tartozom mindazon embereknek, akiktől a természettudományok szeretetét és tiszteletét örökségül kaptam: szüleimnek, általános iskolás tanítómnak, középiskolai kémia tanáromnak, Borissza Endrének. Az egyetemi tanulmányaim során lehetőségem volt Dr. Patthy László kutatócsoportjában – Bányai László vezetésével – Wodzinszky Katalin felügyelete mellett megtanulni a csapat- és laboratóriumi munkát.

Köszönettel tartozom Balogh Zsófia és Szeitner Zsuzsanna kollégáimnak, hogy a kezdeti időkben rengeteget segítettek, illetve jelenlegi kollegáimnak, akikkel öröm együtt dolgozni.

Köszönetem szeretném kifejezni témavezetőmnek Mészáros Tamásnak, aki szakmai és emberi szempontból is tanításokon túlmenően adta át a tudást, mindig nyitott volt az új ötletekre és együttműködésekre.

Kállai Brigitta szakdolgozóm személyében kitűnő tanítványt kaptam, aki jelentős segítséget nyújtott a kísérleti munkám során.

Végül, de nem utolsósorban köszönöm az Orvosi Vegytani Intézet minden munkatársának és a Bánhegyi labor volt és jelenlegi tagjainak a támogatást, a kiváló színvonalú és hangulatú munkakörülményeket.

Köszönettel tartozom szeretteimnek, barátaimnak, akik tanulmányaim alatt szívvel-lélekkel mellettem álltak.

13.Függelék

- **Alkalmazott anyagok**
- **Klónozás, vektorok tisztítása**
- ▲ iProof High Fidelity DNS polimeráz, 2 U/μl (5x HF puffer) (BioRad)
- ▲ 2x PCR MasterMix (Thermo Scientific)
- ▲ T4 DNS ligáz, 5 U/μl (Fermentas)
- ▲ T4 DNS ligáz puffer (Fermentas)
- ▲ 10 mM CleanAmp dNTP mix (TriLink)
- ▲ 2 mM dNTP mix (Fermentas)
- ▲ QuickChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent)
- ▲ Gateway® LR Clonase™ II Enzyme Mix (Invitrogen)
- ▲ 50x TAE puffer: 2 M Tris, 1 M ecetsav, 0,05 M EDTA
- ▲ agaróz (Amresco)
- ▲ GelGreen (Biotium)
- ▲ PCR Clean Up puffer: 26% (w/v) PEG 8000, 6,5 mM MgCl₂, 0,6 M nátrium-acetát, pH 6–7
- ▲ FastDigest NcoI (Fermentas, hasítási hely: 5'...C↓CATGG...3')
- ▲ FastDigest NotI (Fermentas, hasítási hely: 5'...GC↓GGCCGC...3')
- ▲ FastDigest SspI (Fermentas, hasítási hely: 5'...AAT↓ATT...3')
- ▲ 10x FastDigest puffer (Fermentas)
- ▲ PureLink™ Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen)
- ▲ 100 mM dGTP (Bioline)
- ▲ 100 mM dCTP (Bioline)
- ▲ 10x NEBuffer2 + 1% BSA (New England Biolabs)
- ▲ T4 DNA Polymerase (New England BioLabs)
- ▲ 50 mM EDTA oldat (Sigma)
- ▲ *Escherichia coli* XL10-Gold Ultracompetent Cells (Agilent Technologies)
 - genotípus: TetrΔ(mcrA)183 Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacq ZΔM15 Tn10 (Tetr) Amy Camr]
- ▲ *Escherichia coli* BL21 (DE3) Competent Cell (New England Biolabs)
 - genotípus: fhuA2 [lon] ompT gal [dcm] ΔhsdS

- ▲ *Escherichia coli* α -select (silver) kompetens sejt (Biocompare)
 - deoR endA1 recA1 relA1 gyrA96 hsdR17(rk -mk+) supE44 thi-1
 Δ (lacZYA-argFV169) ϕ 80dlacZ Δ M15 F-
- ▲ LB tápoldat: 1% tripton, 0,5% élesztőkivonat, 1% NaCl, desztillált víz
- ▲ LB táptalaj: 1% tripton, 0,5% élesztőkivonat, 1% NaCl, 2% agar, desztillált víz
- ▲ SOC tápoldat: 2% tripton, 0,5% élesztőkivonat, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glükóz
- ▲ Gene Ruler 1 kb DNS marker (Fermentas): 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250 bázispár (bp)
- ▲ 6x Loading Dye (Fermentas)
- ▲ abszolút etanol (Molar Chemicals Kft.)
- ▲ karbenicillin (Bioline)
- ▲ kanamicin (Fluka)
- ▲ spektinomicin (Sigma-Aldrich)
- ▲ PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen)
- ▲ QIAGEN Plasmid Midi Kit (Qiagen)
- ▲ PureLink Quick Gel Extraction and Combo Kit, gélextrakciós kit (Invitrogen)
- ▲ nukleázmentes víz (Thermo Scientific)
- ▲ steril pipettahegyek (Neptune)

- **Bakteriális fehérjeexpresszió**

- ▲ MDG: 100 ml 10x M puffer (25 mM Na₂HPO₄, 25 mM KH₂PO₄, 50 mM NH₄Cl, 5mM Na₂SO₄), 12,5 ml (40%) glükóz, 10 ml (0,25%) aszpartát, 2 ml MgSO₄, 0,2 ml 1000x fém nyomelemek 1 literre desztillált vízzel kiegészítve.
- ▲ 50x 5052 puffer: glicerol 0,5%, glükóz 0,05%, laktóz 0,2%
- ▲ 1000x fém nyomelemek (végkoncentráció 100 ml-ben)
 - 36 ml desztillált vízhez:
 - 50 ml 0,1 M FeCl₃*6 H₂O (50 μ M Fe³⁺)
 - 2 ml 1 M CaCl₂*2 H₂O (20 μ M Ca²⁺)
 - 1 ml 1 M MnCl₂*4 H₂O (10 μ M Cl⁻)
 - 1 ml 1 M ZnSO₄*7 H₂O (10 μ M Zn²⁺)
 - 1 ml 0,2 M CoCl₂*6 H₂O (0,2 μ M Co²⁺)

2 ml 0,1 M $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ ($2 \mu\text{M Cu}^{2+}$)

1 ml 0,2 M $\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ ($2 \mu\text{M Ni}^{2+}$)

2 ml 0,1 M $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ ($2 \mu\text{M Mo}^{6+}$)

2 ml 0,1 M H_3BO_3 ($2 \mu\text{M H}_3\text{BO}_3$)

- ▲ ZYM-5052 puffer: 1% Tripton, 0,5% élesztőkivonat, 100 ml 10x M puffer (25 mM Na_2HPO_4 , 25mM KH_2PO_4 , 50 mM NH_4Cl , 5 mM Na_2SO_4), 20 ml 50x 5052 puffer, 2 ml 1 M MgSO_4 , 0,2 ml 1000x fém nyomelemek 1 literre desztillált vízzel kiegészítve.
- ▲ feltáró puffer: 10 mM imidazol, 500 mM NaCl, 0,1% Triton-X 100, PBS-ben, pH 7,9

- **Protoplaszt tranziens expresszió**

- ▲ MS tápoldat: 30 g/l szacharóz, 0,24 mg/l 2,4-D (2,4-diklórfenoxi-ecetsav), 0,014 mg/l kinetin, 4,33 g/L Murashige-Skoog (Duchefa Biochimie) médium, pH 5,8 KOH-val
- ▲ 1000x Gamborg Vitamin Solution (Sigma-Aldrich)
- ▲ 0,34 M GM oldat: 3,16 g/l Murashige-Skoog Medium, Basal Salt Mixture (Duchefa Biochimie), 30,5 g/l glükóz (Reanal) és 30,5 g/l mannitol (Sigma-Aldrich), 1000x Gamborg Vitamin Solution (Sigma-Aldrich) a megfelelő hígításban, pH 5,5 KOH-val
- ▲ 0,28 M GM oldat: 3,16 g/l Murashige & Skoog Medium, Basal Salt Mixture (Duchefa Biochimie), 96 g/l szacharóz (Molar Chemicals Kft.), 1000x Gamborg Vitamin Solution (Sigma-Aldrich) a megfelelő hígításban, pH 5,5 KOH-val.
- ▲ sejtfalemészto enzimoldat: 0,34 M GM oldatban 1% cellulase (Serva), 0.2% macerozyme (Yakult)
- ▲ PEG oldat: 25% PEG6000, 0,45 M mannitol, 0,1 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$; pH 9,0 KOH-val
- ▲ flg22, Flagellin Fragment (aminosav szekvencia:
QRLSTGSRINSAKDDAAGLQIA)
- ▲ 5 M NaCl oldat (Molar Chemicals Kft.)
- ▲ H_2O_2 (Molar Chemicals Kft.)
- ▲ okadánsav (Sigma–Aldrich)
- ▲ 1,5 mm-es Eppendorf Safe-Lock csövek (Eppendorf)

- ▲ 145/20 mm Petri csésze (Greiner Bio One)
- ▲ 24 well plate (Greiner Bio One)

- ***In vitro* transzkripció és transláció**

- ▲ FastDigest NotI (Fermentas, hasítási hely: 5'...GC↓GGCCGC...3')
- ▲ FastDigest ScaI (Fermentas, hasítási hely: 5'...AGT↓ACT...3')
- ▲ TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit (Thermo Scientific): DEPC kezelt víz, 5x TranscriptAid Reaction Buffer, TranscriptAid Enzyme Mix, NTP mix (ATP, GTP, CTP, UTP 100 mM)
- ▲ ENDEXT Technology Wheat Germ Cell-Free Expression System és 40x SUB-AMIX (CellFree Sciences): WEPRO 1240, 40x SUB-AMIX S1, S2, S3, S4.
- ▲ 7,5 M ammónium-acetát (Sigma)
- ▲ 1 µg/µl kreatin-kináz törzsoldat (Roche)
- ▲ 10x Laemmli futtató puffer (Serva)
- ▲ 5x SDS mintapuffer (0,312 M Tris pH 6,8, 10% SDS, 250mM DTT, 50% glicerol, 0,01% brómfenolkék)
- ▲ 10%-os APS oldat (5 ml desztillált vízben 0,5 g ammónium-perszulfát)
- ▲ PageBlue™ totál fehérje festék (Fermentas)
- ▲ ProSieve QuadColor protein marker (Lonza): 300, 250, 170, 140, 100, 70, 55, 40, 25, 15, 10, 4,6 kilodalton (kDa) – festett marker
- ▲ ProSieve Unstained Protein Marker II (Lonza): 200, 150, 120, 100, 70, 50, 40, 30, 20, 15, 10 kilodalton (kDa) – festetlen marker
- ▲ 40%-os akrilamid (Fluka)
- ▲ 10x PBS (1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 20 mM KH₂PO₄, 100 mM Na₂HPO₄·2H₂O, pH 7,4)
- ▲ PageBlue Protein Staining Solution (Thermo Scientific)
- ▲ 1,5 mL Protein LoBind Eppendorf csövek (Eppendorf)
- ▲ steril, RN-áz mentes, 96 kamrás, lapos aljú lemez
- ▲ steril pipettahegyek (Neptune)

- **Fehérje tisztítás, Western blot, kináz reakció**

- ▲ Pierce Glutathione Magnetic Beads (Pierce)
 - GST mosó- és kapcsoló puffer: 25 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8,0
- ▲ TALON® Metal Affinity Resins (Clontech Laboratories Inc.)
 - His mosó- és kapcsoló puffer: PBS, 300 mM NaCl, 0,01 % Tween-20
 - His elúciós puffer: 500 mM imidazol, PBS-ben
- ▲ anti-HA–agaróz ágy (Sigma–Aldrich)
- ▲ TBS puffer: 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,6
- ▲ 600 ng/μL TEV proteáz 50% glycerol-ban
- ▲ 20x TEV proteáz puffer: 1 M Tris–HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0 (Invitrogen)
- ▲ 0,1 M DTT (Invitrogen)
- ▲ kináz puffer: 20 mM HEPES, 15 mM MgCl₂, 5 mM EGTA, 50 μM ATP, 10 mM Na₃VO₄, 100 mM NaF, 1 mM DTT, pH 7,5
- ▲ [γ -³²P]ATP (Izotóp Intézet Kft.)
- ▲ Lambda Protein Phosphatase, fehérje foszfatáz (New England BioLabs)
- ▲ Bradford Solution (Fermentas)
- ▲ anód I. puffer (0,3 M TRIS, 10% metanol, pH 10,4)
- ▲ anód II. puffer (25 mM TRIS, 10% metanol, pH 10,4)
- ▲ katód puffer (25 mM TRIS, 40 mM glicin, 10% metanol, pH 9,4)
- ▲ metanol (Molar Chemicals Kft.)
- ▲ elválasztó gél puffer (1, 5 M TRIS, 0, 4% SDS, pH 8,8)
- ▲ TEMED (Sigma-Aldrich)
- ▲ tömörítő gél puffer (1 M TRIS, 0, 8% SDS, pH 6,8)
- ▲ Tris (Sigma-Aldrich)
- ▲ tejpor (Tutti Élelmiszeripari Kft.)
- ▲ stripping puffer (200 mM glicin, 1% Tween-20, 0,1% SDS, pH 2,2)
- ▲ nukleázmentes víz (Thermo Scientific)
- ▲ anti-His-POD, HRP-konjugált antitest (A7058, Sigma-Aldrich)
- ▲ nyúl anti-GST elsődleges antitest (06-332, Upstate Biotechnology)
- ▲ patkány anti-egér, HRP-konjugált másodlagos antitest (7076, Cell Signaling)
- ▲ kecske anti-nyúl, HRP-konjugált másodlagos antitest (7074, Cell Signaling)

- ▲ patkány anti-HA-Peroxidase, HRP-konjugált másodlagos antitest (12013819001, Roche)
- ▲ egér anti-myc-Peroxidase, HRP-konjugált másodlagos antitest (11814150001, Roche)
- ▲ Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr201/Tyr204) (D.13.14.4E) XP (9106, Cell Signalling)
- ▲ PVDF membrán (Millipore)
- ▲ Western Lightning Plus ECL: Enhanced Luminol Reagent, Oxidizing Reagent (PerkinElmer)
- ▲ MBP mielin bázikus fehérje (Sigma-Aldrich)
- ▲ Bradford reagens (Fermentas)
- ▲ röntgen film (Agfa)

I. táblázat. Alkalmazott primerek

Elnevezés	Szekvencia
AtMPK9for	5'-TACTTCCAATCCAATGCAATGGATCCTCATAAAAAAG-3'
AtMPK9rev	5'-TTATCCACTTCCAATGTCAAGTGTGGAGAGCCGC-3'
AtMPK9LOFfor	5'-GCGAAAAGGTTGCCATTAGGAAAATCAATGATGTGTT-3'
AtMPK9LOFrev	5'-AACACATCATTGATTTTCCTAATGGCAACCTTTTCGC-3'
AtMPK9T185Afor	5'-CCTTCGGCTATATTCTGGGCTGACTATGTTGCTACAA-3'
AtMPK9T185Arev	5'-TTGTAGCAACATAGTCAGCCCAGAATATAGCCGAAGG-3'
AtMPK9Y187Ffor	5'-CTATATTCTGGACTGACTTTTGTGCTACAAGATGGTA-3'
AtMPK9Y187Frev	5'-TACCATCTTGTAGCAACAAAGTCAGTCCAGAATATAG-3'
AtMPK9T185A/ Y187Ffor	5'-CCTTCGGCTATATTCTGGGCT GACTTTGTGCTACAAGATGGTA-3'
AtMPK9T185A/ Y187Frev	5'-TACCATCTTGTAGCAACAAAGT CAGCCCAGAATATAGCCGAAGG-3'
AtMPK6for	5'-TACTTCCAATCCAATGCAATGGACGGTGGTTCAGGT-3'
AtMPK6rev	5'-TTATCCACTTCCAATGCTATTGCTGATATTCTGG-3'
pEU3-NIIfor	5'-CACTATAGGGTACACGGATTTCGC-3'
pEUrev	5'-TATAGGAAGGCCGGATAAGACG-3'
pRTHA_AtMPK9for	5'-GCATCATATGGATCCTCATAAAAAGG-3'
pRTHA_AtMPK9rev	5'-ATGCGGCCGCAAGTGAGAGCCGCGA-3'
pET28a_AtMPK9for	5'-GCATCATATGGATCCTCATAAAAAGG-3'
pET28a_AtMPK9rev	5'-ATGCGGCCGCAAGTGAGAGCCGCGA-3'
pRTfor	5'-CCACTATCCTTCGCAAGACC-3'
pRTrev	5'-CTGGTGATTTGCGGACTCTA-3'
γ-tubulinfor	5'-TACTTCCAATCCAATGCAATGCCCTCGGGAGATAATT-3'
γ-tubulinrev	5'-TTATCCACTTCCAATGTCAGAACGCCCACTTCGG-3'
EB1afor	5'-TACTTCCAATCCAATGCAATGGCGACGAACATCGGA-3'
EB1arev	5'-TTATCCACTTCCAATGTCAGGCTTGAGTCTTTCTTC-3'
EB1cfor	5'-TACTTCCAATCCAATGCAATGGCTACGAACATTGGG-3'
EB1crev	5'-TTATCCACTTCCAATGCTAGCAGGTCAAGAGAGGAGA-3'
GCP4for	5'-TACTTCCAATCCAATGCAATGTTGCACGAGCTTCTT-3'
GCP4rev	5'-TTATCCACTTCCAATGTCACAATGGAAGCGCTGGGC-3'

- Alkalmazott vektorkonstrukciók

▲ bakteriális expressziós vektorok:

pET28a: T7 promótert, C-terminális His₆-címkét és kanamicin rezisztencia gént tartalmaz (Novagen)

pET28a_MP9WT: vad típusú AtMPK9-et tartalmazó vektor

pET28a_MP9LOF: kináz inaktív mutáns AtMPK9-et tartalmazó vektor

▲ translációs vektorok:

pEU3-NII-HLIC: T7 promotert, virális, translációt fokozó régiót, N-terminális His₆-címket és ampicillin rezisztencia gént tartalmazó vektor

pEU3-NII-GLIC: T7 promotert, virális, translációt fokozó régiót, N-terminális GST-címket és ampicillin rezisztencia gént tartalmazó vektor

pEU3-NII-GLICNot: T7 promotert, virális, translációt fokozó régiót, N-terminális GST-címket és ampicillin rezisztencia gént tartalmazó vektor, NotI hasítóhely a linearizáláshoz

pEU3-NII-GLICNot_γ-tubulin: egy feltételezett AtMPK6 szubsztrátot, a γ-tubulint tartalmazó vektor

pEU3-NII-GLICNot_EB1a: egy feltételezett AtMPK6 szubsztrátot, az EB1a-t tartalmazó vektor

pEU3-NII-GLICNot_EB1c: egy feltételezett AtMPK6 szubsztrátot, az EB1c-t tartalmazó vektor

pEU3-NII-GLICNot_GCP4: egy feltételezett AtMPK6 szubsztrátot, a GCP4-et tartalmazó vektor

pEU3-NII-CassetteA: T7 promotert, virális, translációt fokozó régiót és a Gateway klónozáshoz szükséges, 'A' kazettát tartalmazó vektor

pENTR4_myc-AtMKK4-GOF: Gateway klónozáshoz használt „entry” klón

pEU3-NII-HLIC_MPK9WT: vad típusú AtMPK9-et tartalmazó vektor

pEU3-NII-HLIC_MPK9LOF: kináz inaktív mutáns AtMPK9-et tartalmazó vektor

pEU3-NII-HLIC_MPK9T185A: AtMPK9 aktivációs hurok mutáns konstrukció, 185-ös treonin alaninra cserélve

pEU3-NII-HLIC_MPK9Y187F: AtMPK9 aktivációs hurok mutáns konstrukció, 187-ös tirozin fenilalaninra cserélve

pEU3-NII-HLIC_MPK9T185A/Y187F: AtMPK9 aktivációs hurok mutáns konstrukció, 185-ös tirozin alaninra, 187-ös tirozin fenilalaninra cserélve

pEU3-NII-HLIC_MPK6: AtMPK6-ot tartalmazó vektor

pEU3-NII-myc-AtMKK4-GOF: konstitutívan aktív (GOF), aktivációs hurkában foszfomimetikus T224D S230E aminosavakat tartalmazó AtMKK4 vektor

▲ tranziens expressziós vektorok:

pRTHA: növényekben magas expressziót biztosító karfiol mozaik vírus 35S promótert, C-terminális HA címkét és ampicillin rezisztencia gént tartalmazó vektor [27], módosított változata (Dóczy Róbert, MTA-ATK)

pRTHA_MPK9WT: vad típusú AtMPK9-et tartalmazó vektor

pRTHA_MPK9LOF: kináz inaktív mutáns AtMPK9-et tartalmazó vektor

pRTHA_MPK9T185A: AtMPK9 aktivációs hurok mutáns konstrukció, 185-ös treonin alaninra cserélve

pRTHA_MPK9Y187F: AtMPK9 aktivációs hurok mutáns konstrukció, 187-ös tirozin fenilalaninra cserélve

pRTHA_MPK9T185A/Y187F: AtMPK9 aktivációs hurok mutáns konstrukció, 185-ös tirozin alaninra, 187-ös tirozin fenilalaninra cserélve

pK2GW7_myc-AtMKK1-GOF (T218E S224D)

pK2GW7_myc-AtMKK2-GOF (T220D T226E)

pK2GW7_myc-AtMKK3-GOF (S235D T241D)

pK2GW7_myc-AtMKK4-GOF (T224D S230E)

pK2GW7_myc-AtMKK5-GOF (T215E S221E)

pK2GW7_myc-AtMKK6-GOF (S221D T227E)

pK2GW7_myc-AtMKK7-GOF (S192D, S199D)

pK2GW7_myc-AtMKK9-GOF (S195D S201E) [128,129], konstitutívan aktív (GOF), aktivációs hurokban foszfomimetikus aminosavakat tartalmazó AtMKK-kat tartalmazó vektorok, N-terminális myc címkével ellátva (Bögge László, Royal Holloway University of London). Az eredeti pK2GW7 vektorok kettős szelekciós markert tartalmazó Gateway vektorok: spektinomycin rezisztencia gént a bakteriális felsokszorozáshoz, kanamicin rezisztencia gént a növényi fehérjeexpresszióhoz (Plant Systems Biology, Ghent University, Belgium).

II. táblázat. Az alkalmazott vektorok, inszertek, fehérjék mérete

vektor/inszert/fehérje	méret
pRTHA	3500 bp
pET28a	5369 bp
pEU3-NII-HLIC	3805 bp
AtMPK9 WT és mutánsai	1533 bp
AtMPK6	1593 bp
γ -tubulin	1425 bp
EB1a	831 bp
EB1c	987 bp
GCP4	2235 bp
GST	669 bp
His ₆	18 bp
HA	108 bp
myc	413 bp
AtMPK9 WT és mutánsai	58,4 kDa
AtMPK6	47,9 kDa
AtMKK1	34,1 kDa
AtMKK2	39,8 kDa
AtMKK3	57,5 kDa
AtMKK4	41,1 kDa
AtMKK5	38,3 kDa
AtMKK6	39,8 kDa
AtMKK7	34,2 kDa
AtMKK9	34,3 kDa
γ -tubulin	53,2 kDa
EB1a	30,1 kDa
EB1c	36,4 kDa
GCP4	85,9 kDa
GST	26 kDa
His ₆	0,84 kDa
HA	4 kDa
myc	15 kDa

III. táblázat. Az SDS-PAGE gél összetétele

	<i>Elválasztó gél</i>		<i>Tömörítő gél</i>	
vastagság	0,7 mm	1,5 mm	0,7 mm	1,5 mm
desztillált víz	2,45 ml	3,675 ml	1,44 ml	2,16 ml
elválasztó puffer	1,3 ml	1,95 ml	-	-
tömörítő puffer	-	-	280 µl	420 µl
40%-os akrilamid	1,3 ml	1,95 ml	260 µl	390 µl
10%-os APS	50 µl	75 µl	20 µl	30 µl
TEMED	2 µl	3 µl	2 µl	3 µl

- A kísérletek elvégzéséhez szükséges készülékek

- ▲ microcentrifuga
- ▲ NanoDrop spektrofotométer
- ▲ PCR készülék (Eppendorf)
- ▲ nukleinsav gélfuttató (BioRad)
- ▲ SDS-poliakrilamid gélfuttató (Hoefner)
- ▲ gélszáritó
- ▲ Typhoon Phosphorimager (GE Healthcare Life Sciences)
- ▲ Dark Reader DR46B Transilluminator LED fényel működő DNS vizualizációs készülék (Clear Chemical Research)
- ▲ Gel Doc XR System UV detekciós, gél dokumentációs rendszer (Bio-Rad)
- ▲ ultrahangos szonikátor
- ▲ asztali centrifuga (Eppendorf)
- ▲ asztali mikrocentrifuga (VWR)
- ▲ légtermostát
- ▲ mágneses állvány mágneses affinitás ágyakhoz

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

At1g18150.1      SGLSNSEREPTTQPISKLEFFFERKKLVKDDVRELIYREILEYHPQMLEEYLRGGDQLS- 59
At1G73670.1     NGLSSKVRPSTQPISKLEFFFERKKLTKDDIRELIYREILEYHPQMLEEYLRGGNQLS- 59
AT3G18040.1     YGLANVDRPSTQPISKLEFFFERKKITKEDVRELIYREILEYHPQMLQYELRGGGQTS- 59
AT2G01450.1     QGLANVDYEPSTRQPISKLEFFFERKKLTRDDVRELMYREILEYHPQMLQYELQGEENINS 60
AT1G53510.1     -----EREPSSQQISKMEFFEFERRRLTKDDIRELIYREILEYHPQLLKDYMSSGSGSN- 53
AT3G14720.1     KCLAKVEREPSCQPI SKMEFFEFERRRLTKDDIRELIYREILEYHPQLLKDYMN-SEGSS- 58
AT2G42880.1     KGLAKVEREPSCQPI TKMEFFEFERRRVTKEDIRELISREILEYHPQLLKDHMNGADKAS- 59
At5g19010.1     KGLAKVEREPSAQPVTKLEFFEFERRITKEDVRELIYRESLEYHPKMLKEYLDGSEPTN- 59
               *: * :*:**:*:***:~::~*:***: ** *****:~::~: : .

At1g18150.1     -FMYPSGVDVFRFRQFAHLEENQKPGAAGGRSTALHRRHHASLPRE-RVPAPNGETAEE- 116
At1G73670.1     -FMYPSGVDVFRFRQFAHLEENQG-P----GGRSNALQRQHASLPRE-RVPASKNETVEER 112
AT3G18040.1     -FMYPSGVDVFRFRQFAHLEENYG----KGEKGSPLQRQHASLPRE-RVPAPKKENGSH- 111
AT2G01450.1     HFLYPSGVDQFPKQEFARLEEHNDDE----EEHNSPPHQRYTSLPRE-RVCSSDEGSDSV 116
AT1G53510.1     -FVYPSAIGHLRQQFTYLEENSS----RNGPVIPLERKHASLPRS-TVHSTVVHSTSQP 106
AT3G14720.1     -FLYPSAIGHLRQKFAYLEENSG----KSGPVIPPDRKHASLPRS-AVHSSAVNSNAQP 111
AT2G42880.1     -FLYPSAVDQFRQFAHLEENSG----KTGPVAPLERKHASLPRSTVIHSTAVARGGQP 113
At5g19010.1     -FMYPSAVEHFKKQFAYLEEYKNG----TSHNPPERQQHASLPRACVLYSDNNHPVAQQ 114
               *:***: :~::~*: **~::~: . :~::~**** : :

At1g18150.1     SSDVERR-----AAAVASTLES-----EEDNNGG-----Y 143
At1G73670.1     SNDIERT-----TAAVASTLDSPKASQ--QAGTENGGG---GY 148
AT3G18040.1     NHDENRS-----IASLVTLESPPTS---QHEGSDYRNGTSQTGY 149
AT2G01450.1     HAQSSAS-----VVFTPPQTPNTATGL--SSQKASQVDKAATPVK 155
AT1G53510.1     NLGATDSRRVSEFPKNGASSAGHPSTSAFYTKSIGPPRVF--PSGRPRVVSSVSYE 164
AT3G14720.1     SLNASDSRRVSIIEPSRNGVV---PSTSAYSTKPLGPPRVP---SGKPRVYESSVTYE 164
AT2G42880.1     KL-MNNTNTLNPETTQN-----IPFNHATIQAQQRNL--SAAKPSTFMGPVAPFD 160
At5g19010.1     SSAEVTDGLSKCSIRDERPRGADRNAQMPMSRIPIINVPTIQGAAVARPKGVVGSVLRYN 174

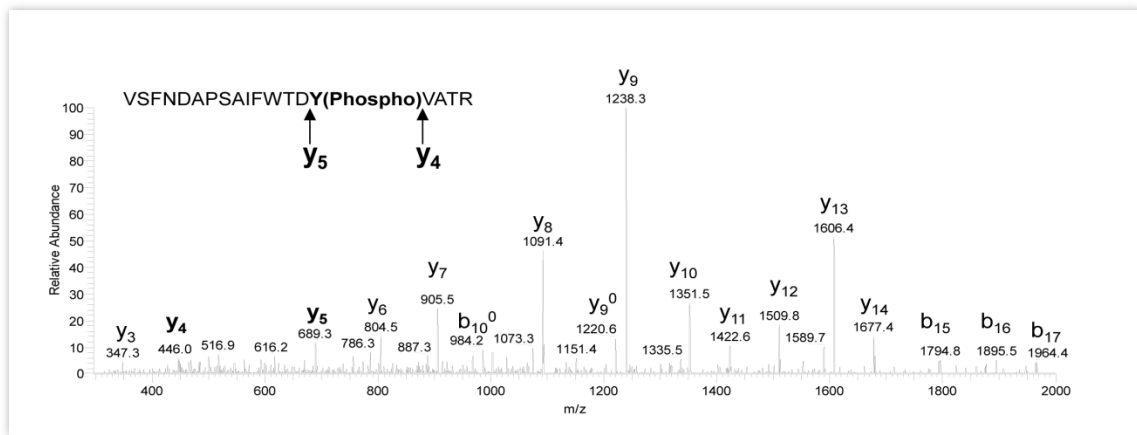
At1g18150.1     SARNLMKSAS----- 153
At1G73670.1     SARNLMKSSS----- 158
AT3G18040.1     SARSLKSAS----- 159
AT2G01450.1     PSACLMRSDS----- 165
AT1G53510.1     NGRNLKEA-----YFRSAVS----SPHCYFRPNTMTNPNERNIEASSFPPKPNPVH 212
AT3G14720.1     NDRNLKESYDARTSYRSTVLPPTVSPNCYFLPNTMNQEKRSQTEAASQP-KPQ--- 219
AT2G42880.1     NGRISRDAYD----PRSFIR----STNLPFSSQQSAATVAMGRQQERRTMEPEKQAR 209
At5g19010.1     NCGAATGVEALE-----QQQRRMVRN 195

At1g18150.1     -ISGSK-----CIGVQSKTDKEDTIAEED 177
At1G73670.1     -ISGSK-----CIGVQSKTNIEDSIVEEQD 182
AT3G18040.1     -ISASK-----CIGMKPRNKSE---YGESN 180
AT2G01450.1     -ICASR-----CVGVSSAVS----- 179
AT1G53510.1     QFSPTTEPPAATTNQADVETMHNPNFYQPQLPDKQLNNTHMADAKLLQAQSQFGPAG 272
AT3G14720.1     -FVPTQ-----CNSAKPAELN-PNPVYQSQH---KVGIDAKLLHAQSQYGPAG 262
AT2G42880.1     QISQYN----RYAPDVAINIDNPNPFIMARTGMNKAENISDRIIIDTNNLQAQTAGIGVAA 264
At5g19010.1     PAAASQYP-----KRTQPCSKSNRGEDECATAAEG 224

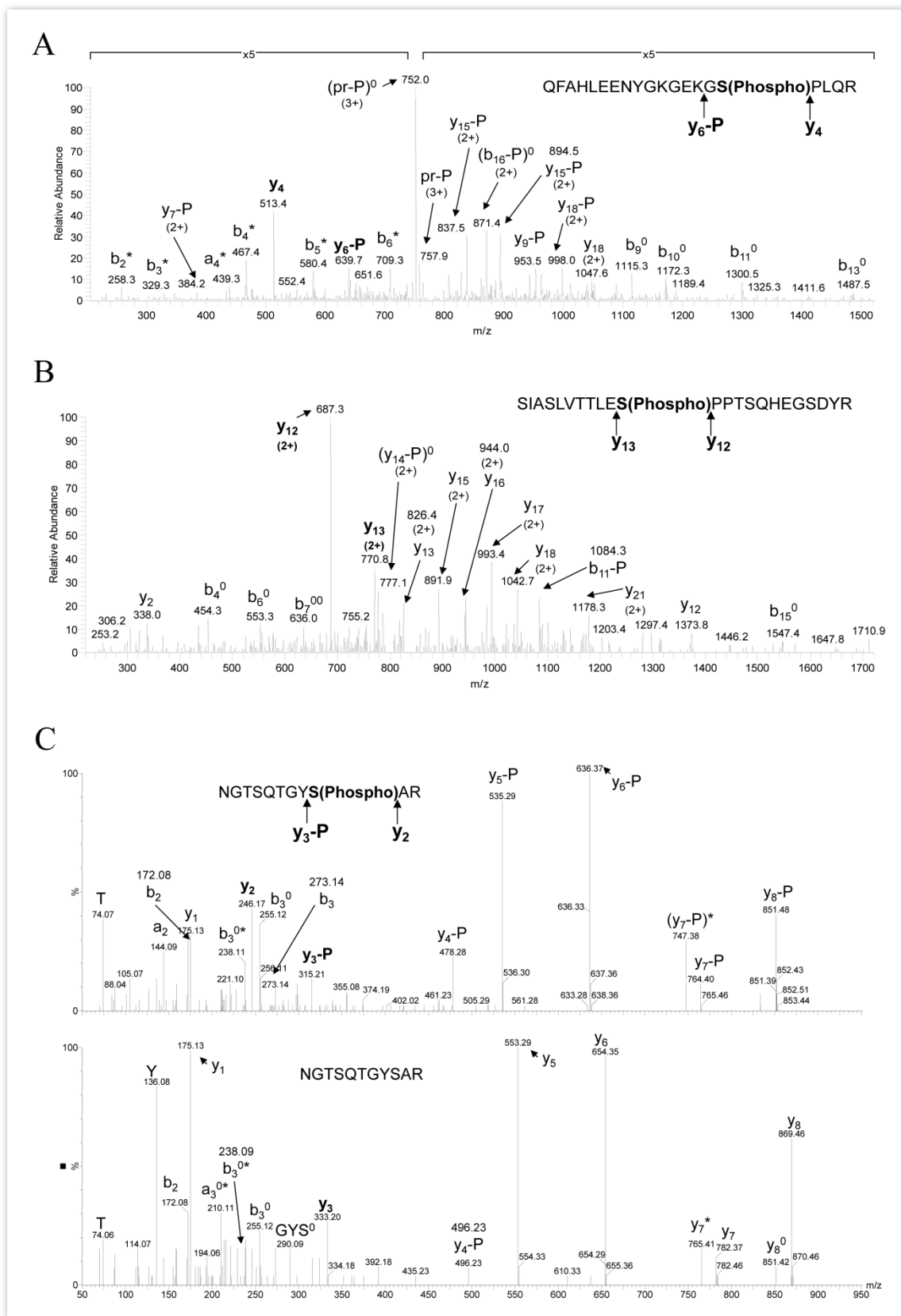
At1g18150.1     NETVAEL---TDKVASLHNS----- 194
At1G73670.1     -ETVAV-----KVASLHNS----- 195
AT3G18040.1     NDTVDALE---SQKVAALHT----- 196
AT2G01450.1     -----
AT1G53510.1     AAAVAV---AAHRNIGTISYSAAS--- 293
AT3G14720.1     AAAVAV---AAHRNIGAVGYGMS--- 282
AT2G42880.1     AAAAAAPGGSARHKVAVRYGMSKMY- 290
At5g19010.1     PSRLKPNQYIPIQKVSAAQDTAMSRWY 251

```

I. ábra. Az *Arabidopsis thaliana* D-alszaladjába tartozó MPK-ok C-terminális doménjeinek összehasonlítása. Az összehasonlítást a Clustal 2.1. nevű szoftverrel végeztük. Az egyes kinázok: MPK9 (AT3G18040.1), MPK8 (At1g18150.1), MPK15 (AT1G73670.1), MPK20 (At5g19010.1), MPK17 (AT2G01450.1), MPK16. (AT1G53510.1), MPK18 (AT3G14720.1), MPK19 (AT2G42880.1). Piros szín jelöli a kicsi, hidrofób és aromás oldalláncú aminosavakat (AVFPMILW, kivéve Y), kék szín a savas oldalláncúakat (DE), magenta szín a bázikus oldalláncúakat (KR), zöld színnel a hidroxil-, szulfhidril-, aminosoprotot tartalmazó oldalláncúakat (STYHCNQ+G), szürke színnel pedig a további aminosavakat.



II. ábra Az *in vitro* transzlált, tisztított AtMPK9 TDY hurokjának tömegspektrometriás foszfoprotein analízisével azonosított TDY motívumot tartalmazó (173-191) foszfopeptid spektrogramja.



III. ábra. Az *in vitro* transzlált, affinitás tisztított WT AtMPK9 C-terminálisának tömegspektrometriával végzett foszfoprotein analízisének spektrogramja. Az A ábra a Ser401, a B ábra a Ser443, a C ábra a Ser464 aminosavakon azonosított foszforilációt mutatja.