



BİTKİLERDE PROTEİN KİNAZLARIN ROLÜ

Esra KOÇ* ve A. Sülün ÜSTÜN

Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, 06100 Tandoğan, ANKARA

Alındığı Tarih: 16 Ekim 2008

Kabul Tarihi: 01 Aralık 2008

Özet: Bitkiler abiyotik (tuzluluk, sıcaklık, kuraklık vs.) ve biyotik (bakteri, virus, böcek gibi) stres koşullarına çeşitli metabolik cevaplar vermektedir. Bu metabolik cevaplarda denetimi sağlayabilmek strese karşı toleransın artırılmasında etkin bir yol olmaktadır. Bu nedenle son yıllarda moleküler düzeyde yapılan birçok araştırmada olayların kilit noktaları araştırılmaya çalışılmaktadır. Bu proseslerden en etkin olanı hiç şüphesiz ki bitkilerdeki sinyal iletiminin tam olarak anlaşılabilmesidir. Stres koşullarında osmotik potansiyeldeki değişimleri ile bitkilerde meydana gelen sinyal uyarımları plazma membranına etki ederek gerekli değişikliğe neden olduktan sonra stresin uyardığı genin okunmasını sağlamakta ve bunun sonucunda da yeni sentezlenen proteinler bitkilerin strese karşı toleransını etkilemektedir. Kısaca özetlenen bu mekanizmada bir kilit gibi rol alan protein kinazlar, son yıllarda bu özellikleriyle çalışılmaya değer konulardandır.

Anahtar Kelimeler: Bitki, Protein kinaz, Sinyal, Stres

* E-posta: ekoc@science.ankara.edu.tr ve Faks: +90 (312) 223 23 95

THE ROLE OF PROTEIN KINASES IN PLANTS

Summary: Plants react with various metabolic responses to abiotic (salinity, heat, aridity, etc.) and biotic (bacteria, virus, insect) stress conditions. Managing control in such metabolic responses constitutes an efficient method to increase the tolerance toward stress conditions. Therefore, recent studies conducted at the molecular level have focused on investigating the key points of the related phenomena. The most efficient process among these is, without doubt, to develop a thorough understanding of signal transmission. Signal impulses in plants, along with osmotic potential changes under stress conditions, have impact upon plasma membranes and they cause the necessary changes to ensure the expression of the gene stimulated by stress, which in turn leads the newly synthesized proteins to affect the tolerance of plants toward stress. Acting as a “lock” in the mechanism briefly summarized here, protein kinases have recently been one of the research areas widely studied.

Keywords: Plant, Protein kinase, Signal, Stress

GİRİŞ

Bitkide büyümenin uyarılması bitki hormonlarının aktivasyonunu, strese karşı oluşturulan cevabı, gelişimin kontrolünü ve hücre devri gibi farklı mekanizmaları kapsamaktadır. Bu düzenleyici yolların çoğu proteinin fosforilasyon ve defosforilasyonu ile kontrol edilmektedir.

Birçok enzim kovalent modifikasyonlarla, özellikle de enzimlerin serin, tireonin, tirozin veya residin gibi belirli birimlerine fosfatın eklenmesi veya ayrılmasıyla düzenlenmektedir. Protein fosforilasyonu hücresel işlevlerin kontrolündeki belli başlı yollardan biri olarak bilinmektedir. Fosforilasyon reaksiyonları fosfat vericisi olarak ATP kullanan, protein kinaz adı verilen bir enzim grubu tarafından katalizlenmektedir. Fosforlanan enzimlerden fosfat grupları, fosfoprotein fosfatazların etkisi ile koparılmaktadır. Enzimin türüne göre fosforlanmış şekil enzimin fosforlanmamış şekline göre daha fazla veya daha az aktif olabilmektedir. Örneğin glikojen fosforilazın (glikojeni yıkan enzim) fosforlanması aktivitesini arttırırken, glikojen sintaza (glikojen sentezleyen bir enzim) fosfat eklenmesi aktivitesini azaltmaktadır.

BİTKİLERDE PROTEİN KİNAZLARIN ROLÜ

Görüldüğü gibi protein fosforilasyonu protein kinaz, defosforilasyonu ise protein fosfataz tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu enzimlerin düzenleme rolüne uygun olmasının üç sebebi bulunmaktadır [1]. İlk olarak, çok büyük olan hedef proteinin fosforilasyonu ve defosforilasyonu ile aktivasyonda değişmeye neden olması, ikinci olarak ileriye doğru olan reaksiyonda denge sağlaması ve üçüncü olarak da protein kinazların ve fosfatazın hareketlerinin birbirinden bağımsız olmasıdır.

Protein kinazlar yaklaşık olarak 250 aminoasit biriminin birleşmesinden meydana gelmektedir [2]. Protein kinazlarda katalitik bölgeler düzenleyici bölge ile birleşiktir. Bu sadece protein kinazlara özgü olan bir özelliktir. Protein kinazlar çoğu olayda bir veya daha fazla protein ile interaksiyona girebilen kompleks yapılardır. Bu enzimler diğer proteinlerle birlikte düzenleyici fonksiyonlara sahiptirler.

Günümüzde yüzden fazla bitki protein kinazı moleküler düzeyde karakterize edilmiş ve aminoasit dizileri dikkate alınarak çeşitli familyalarda sınıflandırılmıştır. Bu familyalar içinde kalsiyum –bağlı protein kinaz (CDPKs), kazein kinaz 1 (CK1), kazein kinaz 2 (CK2), üç kat cevap oluşturan (CTR1)/Raf-benzeri protein kinazlar, siklin-bağlı protein kinaz (CDKs); glikojen sintaz kinaz-3 (GSK3)/shaggy protein kinaz, LAMMER familyası (bu isim karakteristik bir peptid motifinden çıkarılmıştır), mitojen aktive eden protein kinaz (MAP) kinazlar (MAPK), MAPK kinazlar (MAPKK); MAPKK kinazlar (MAPKKK), reseptör benzeri protein kinazlar, S6 kinazlar, SNF1-bağlı (SnRK) protein kinazlar ve çeşitli küçük ek familyalar bulunmaktadır.

BİTKİLERDE HORMONLARIN ARACILIK ETTİĞİ SİNYAL İLETİMİNDE PROTEİN KİNAZLARIN ROLÜ

Protein kinazlar patojen enfeksiyonu sonucu oluşan bitki savunma cevabında meydana gelen reaksiyonlarda önemli rollere sahiptir. Özellikle patojen

enfeksiyonuna bağılı olarak oluşan sinyal moleküllerinin tanınmasında görev yapmaktadırlar [3].

Bitkilerde sinyal iletim yolları ise sık sık sekonder habercilerin varlığını gerektirir. Bu sekonder haberciler 3',5'-siklik AMP (cAMP); 3',5'-siklik GMP (cGMP); 1,2-diaçil gliserol (DAG); inozitol 1,4,5-trifosfat ve Ca. cAMP hücre içi sinyal aktarımında işlev gören bir ikincil habercidir. cAMP protein kinazları aktive eder ve iyon kanallarından Ca²⁺ geçişini düzenler. cAMP protein kinazın belli bölgelerine bağlanarak düzenleyici ve katalitik birimlerin ayrılmasına yol açmakta, böylece katalitik birimleri etkinleştirmekte dolayısıyla da proteinleri fosfor bağlayabilir hale getirmektedir [4].

Bitkilerin biyotik ve abiyotik streslere cevapları, bitki büyüme düzenleyicilerinin değişen düzeyleriyle oldukça bağlantılıdır. Çoğu olayda, hormonların düzeyleri fosforilasyon ve defosforilasyon inhibitörlerinin kullanılmasıyla değiştirilebilir. Bu cevabın kontrolü sırasında meydana gelen reaksiyonlarda ise protein kinaz ve fosfotazlar görev yapmaktadır. Örneğin bir bitki büyüme hormonu olan ABA (Absisik asit) kuraklık, tuzluluk ve yüksek sıcaklık gibi birçok abiyotik stres sinyalinde önemli rol oynamaktadır. Kuraklık, yüksek tuzluluk ve ekstrem sıcaklığın sonucu olarak dokuda fazla miktarda ABA meydana gelmektedir. ABA birikimi hücrenin turgorunu kaybetmesine ve stres sinyalinin oluşmasına neden olmaktadır. Dokuda hücre turgorunun kaybı bir stres işaretini göstermektedir. Turgorun kaybı ise plazma membranının konformasyonundaki bir değişimin ve membrana bağılı protein kinaz - fosfatazların aktiviteleri sonucu olmaktadır [5]. Hemen hemen neredeyse bütün biyolojik sinyal yollarının belirli adımlarında protein fosforilasyon ve defosforilasyon reaksiyonları meydana gelmektedir.

Bitkisel gelişim ve mevsimsel olarak meyve olgunlaşması etilen hormonu ile düzenlenmektedir. Etilen patojenlere cevabın yanı sıra birçok abiyotik ve biyotik strese karşı meydana gelen cevapta merkezi bir role sahiptir. Örneğin patojen enfeksiyonuna karşı savunmada görev alan patojen- bağılantılı (PR) genler etilen muamelesi sonucu aktive olmaktadır. Tütün yapraklarında yapılan

çalışmalarda etilen muamelesinin çok hızlı ve geçici olarak protein fosforilasyonuna neden olduğu saptanmıştır [6].

STRES CEVAPLARINDA KALSİYUM BAĞLI PROTEİN KİNAZLARIN (CDPKS) ROLÜ

Strese cevapta oluşan protein kinaz gruplarından biri de kalsiyum-bağlı protein kinazlar (CDPKS)'dir. CDPKS bitkilerde ve bazı protistlerde nadir olan serin/treonin içeren protein kinaz sınıfıdır. CDPKs 40 ile 90 kDa apırlığında monomerik proteinlerdir. Yapısına bakıldığında, bir N-terminal değişken bölge, katalitik bir kinaz bölgesi ve otoinhibitör fosforilasyonda görev alan bir bağlantı bölgesi, C terminal bölgesi ve düzenleyici bölge (kalmodulin benzeri bölge) içermektedir [7-8]. Bu özellik kalmodilin olmadığında kalsiyum sinyallerine cevapta protein kinazların etkili olmasını sağlamaktadır. CDPKS kalmodiline duyarlıdır ve kalsiyum tarafından aktive edilir, fakat CDPKs 'ın aktivitesinin düzenlenmesinden sadece kalsiyum değil aynı zamanda spesifik fosfolipidler ve otofosforilasyon da gereklidir [8].

Protein kinaz ailesinin bir diğer üyesi olan MAPKs (mitojen-aktive eden (MAP) kinazlar) ozmotik stres, don, kuraklık, yaralanma, tuzluluk ve patojen enfeksiyonu ile aktive olan iletim yolunda görev yapmaktadır [9-10]. Bitkilerde hastalık etmenin (patojen) oluşturduğu sinyalin algılanması bitkinin savunma mekanizmasını aktif hale getirmektedir. Bitki tarafından ROS (reaktif oksijen türleri (serbest radikaller) üretilmektedir. Bu reaktif oksijen türleri bitkide sinyal molekülü olarak görev yapmaktadır. Çeşitli sistemlerde ve özellikle MAPKs aktivasyonu gerektiren yollarda MAPKs bu ROS'lar tarafından uyarılmaktadır. MAPKs ise transkripsiyon faktörlerinin, diğere protein kinazların ve proteinlerin dahil olduğu çeşitli substratları fosforlamaktadır [11].

Bitkilerde son yıllarda yapılan çalışmalarla hayati fizyolojik fonksiyonlara sahip olan MAPKs'ın hormonal cevapların düzenlenmesinde ve hücre döngüsünün mekanizmalarında görev aldığı da tespit edilmiştir [12]. Bu protein

kinazlar ABA'nın neden olduğu sinyal yolu ile reaksiyona girebilmektedir. MAPK'nın aktivasyonu tirozin fosforilasyonu gerektirirken tirozin fosfataz tarafından ise tamamen bloke edilir. Veriler ABA'nın tirozin fosfataz yoluyla MAP kinazı aktive ettiğini ve bazı dokularda hormon sinyallerine aracılık ettiğini göstermiştir [13]. Strese karşı meydana gelen cevapta MAPK dışında mitojen aktive eden protein kinaz kinaz (MAPKK) ve mitojen aktive eden protein kinaz kinaz kinaz MAPKKK gibi diğer protein kinazlar da görev almaktadır [14].

Ağır metallerin yüksek miktarları bitki büyümesini ve gelişimini etkilemektedir. Metal streslerinde hücrenel cevaplara yol açan sinyal iletimi protein fosforilasyonlarına neden olmaktadır. Örneğin *Medicago sativa* (Yonca) fideleri kadmiyum ve bakıra maruz kaldıklarında dört farklı MAPKs aktive olduğu tespit edilmiştir. Bu protein kinazlar SIMK, MMK2, MMK3 ve SAMK'dır. SIMK, MMK2, MMK3 ve SAMK bakır iyonları tarafından hızlı bir şekilde aktive olurken, kadmiyum iyonlarının MAPKs aktivasyonunu geciktirdiği görülmüştür [15].

Bir diğer mitojen aktive eden protein kinaz olan MPK6 *Arabidopsis thaliana*'da yapılan çalışmalarda bulunmuştur. Bu protein kinaz belirli patojenlere karşı direnç de önemli rollere sahiptir. Avirüent *Pernospora parasitica* (Mildiyö) ve Avirüent-virüent *Pseudomonas syringae* gibi patojenlere karşı gen bağlantılı direnç ve bazal direncin de etkili olduğu saptanmıştır [16].

Memelilerde ise MAPKs'ın üç ana familyası bulunmaktadır. Aktivatör, inaktivatör ve substratlar tarafından düzenlenen bu protein kinazlar hücre içi ve hücre dışı uyarımlardaki sinyal iletiminde görev yapmaktadırlar. Bu yüzden son yıllarda MAPKs'ın bağışıklık sistemi ve gelişimin düzenlenmesinde ki rolleri anlaşılmaya çalışılmaktadır [17].

RESEPTÖR BENZERİ PROTEİN KİNAZLAR

Reseptör benzeri protein kinaz, bir protein kinaz katalitik bölge, bir transmembran bölge, bir ekstraselüler ligand-bağlayıcı bölge ve lösinden zengin tekrarlı bölgeler kapsamaktadır. Bu özelliklerinden dolayı güçlü protein-protein etkileşimlerini sağlamakta ve ekstraselüler peptidlere bağlanabilmektedir. Arabidopsis thaliana'da stres olmayan koşullar altında çiçeklerde, yapraklarda ve köklerde reseptör benzeri bir protein kinaz olan RPK1'in ekspresyonu tespit edilmiştir. Bu enzimin aktivitesinde dehidrasyon, tuz, soğuk stres ile ABA uygulamalarında artış olduğu saptanmıştır.

Domatesde yapılan çalışmada domates protein kinaz1 (TPK1b) geninin plazma membranında lokalize olmuş bir reseptör benzeri sitoplazmik kinazı kodladığı ortaya çıkarılmıştır. Patojen enfeksiyonu, mekaniksel yaralanma ve oksidatif stres TPK1b genin aktifleşmesini sağlamaktadır. TPK1b otofosforilasyon aktivitesi ile fonksiyonel olan bir kinazdır [18].

Bitkilerde çeşitli çevresel sinyallerin iletim yollarında protein kinazların önemli bileşimler olduğuna dair deliller vardır. Ayrıca protein kinazlar sadece bitkiler değil mayalar ve hayvanlarda da bulunmaktadır [19]. Hayvanlarda ekstraselüler sinyallerin iletim yollarında görev alan membran ile bağlantılı beş reseptör benzeri protein kinaz olduğu anlaşılmıştır [20]. Bu kinazlar bir ekstraselüler ligand-bağlayıcı bölge, transmembran bölge ve bir sitozolik kinaz bölgesinden meydana gelmektedir. Bu ekstraselüler ligandın ekstraselüler bölgeye bağlanması sitoplazmik kinaz bölgesini aktive etmektedir. Böylece ekstraselüler bir sinyal, intraselüler hedeflere iletilmektedir.

HÜCRE DEVRİNİN KONTROLÜ

Bitki büyümesinin düzenlenmesinin temeli, hücre devrinin kontrolüdür ve bu olay protein kinazların aktivitesini gerektirir. Hücre devri mitotik genler tarafından kontrol edilir. Bunlar; cdc2+, nim1+, cdc25+, wee1+' dir. Genetik bulgular nim1+'ın mitotik inhibitör wee1+'ın negatif düzenleyicisi olduğuna

işaret etmiştir. Model organizma olan ikiye bölünerek üreyen bira mayası *Schizosaccharomyces pombe*' de mitoz giriş siklin bağlı protein kinaz, CDC2 (siklin bağlı protein kinaz) aktivitesine bağlıdır [21]. *S. pombe*'de hücre devri boyunca ilerleme iki noktada düzenlenir; Bu noktalar G1 evresinin sonuna yakın start bölgesi ve G2 evresinin sonu. Mitozun başlangıcında CDC2'nin aktive olması için CAK (siklin bağlı kinaz) ile tirozin-167'de fosforile edilmelidir [22]. CDC2 diğer protein kinazlar ile düzenlenir ve bir tirozin fosfataz olan CDC25, son G2 evresinde CDC2'i defosforile eder. CDC25 proteininin fosfataz aktivitesi N-etilmalemid uygulaması ile elimine edilir. Bu defosforilasyon CDC2'nin tekrar protein kinaz aktivitesini göstermesi için gereklidir. CDC25'e antagonist protein kinaz WEE1'dir.

SONUÇ

Bitki büyümesinin düzenlenmesinde meydana gelen farklı mekanizmalar arasındaki iletişim hücre devri kontrolü, besin sinyal iletimi ve hormonların (ABA, etilen vs.) varlığını gerektirmektedir. Bu olaylarda ise çeşitli büyük protein kinaz familyaları görev yapmaktadır. Protein kinazlar hedef proteinlerin fosforilasyonunu sağlayarak proteinlerin aktivasyonunda değişmeye neden olurlar. Bu yüzden biyolojik sistemlerde çok nadir olan bu özellikleri nedeniyle biyolojik bir anahtar olarak görev yaparlar. Bitki hücrelerinde protein kinazların işlenmesi bir bilgisayarın merkezi yönetim ünitesine eşit olarak tanımlanmaktadır.

KAYNAKLAR

- [1] Hardie, D.G.: "Plant protein serine/threonine kinases", *Ann. Rev. Physio. Plant Molec. Biol.*, 50 (1999) 97-131.
- [2] Hanks, S.K.; Hunter, T.: "The eucaryotic protein kinase superfamily", The protein kinase Factsbook. *Academic pres, London*, Vol (I) (1995) 7-47.
- [3] Rumeis, T.: "Protein kinases in the plant defence response", *Current Opinion Plant Biology*, 4 (2001) 407-414.

- [4] http://tr.wikipedia.org/wiki/Siklik_adenozin_monofosfat (2007).
- [5] Himmelbach, A.; Iten, M.; Grill, E.: "Signalling of Absisic acid to regulate plant growth", *Physiological Transaction of the Royal Society of London Series B-Biological Series*, 353 (1998) 439-1444.
- [6] Raz, V.; Fluhr, R.: "Ethylene signal is transduced via protein phosphorylation events in plants", *Plant Cell*, 5 (1993) 523-530.
- [7] Hrabark, E.; Chan, C.W.M.; Gribskov, M.: "The Arabidopsis CDPK- SnRK superfamily of protein kinases", *Plant Physiology*, 132 (2003) 666-680.
- [8] Klimecka, M.; Muzynska, G.: "Structure and functions of plant calcium-dependent protein kinases", *Acta Biochimica Polonica*, 54 (2007) 219-233.
- [9] Hirt, H.: "Multiple role of MAP kinases in plant signal transduction", *Trends. Plant Sci.*, 2 (1997) 11-15.
- [10] Nakagami, H.; Pitzchke, A.; Hirt, H.: "Emerging MAP kinase Pathways in plants stress signalling", *Trends Plant Sci.*, 10 (2005) 339-346.
- [11] Pitzsche, A.; Hirt, H.: "Mitogen activated protein kinases and Reactif oxygen species and signalling in plants", *Plant Physiology*, 141 (2006) 351-356.
- [12] Tena, G.; Asai, T.; Chiu, W.L.; Sheentena, J.: "Plant mitogen-activated protein kinase signaling cascades", *Curr Opin Plant Biol.*, 5 (2001) 392-400.
- [13] Knetsch, M.L.W.; Wang, M.; Snaar-Jagalska, B.E.; Heimovaara- Dijkstra, S.: "Absisic acid induces mitogen activates protein kinase activation in barley aleurone protoplasts", *Plant Cell*, 8 (1996) 1061-1067.
- [14] Mizoguchi, T.; Irie, K.; Hirayama, T.; Hayashida, N.; Yamaguchi-Shinozaki, K.; Matsomoto, K.: "A gene encodig a mitogen activated protein kinase kinase kinase is induced simultanesously with genes for a mitogen activated protein kinase and S6 ribosomal protein kinase by touch, cold, and water stres in *Arabidopsis thaliana*", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA, 93 (1996) 765-769.
- [15] Jonak, C.; Nakagami, H.; Hirt, H.: "Activation of distinct mitogen-activated protein kinase pathways by copper and cadmium", *Plant Physiol.*, 136 (2) (2004) 3276-83.
- [16] Abuomar, S., Chai, M.F.; Luo, H.; Song, F.; Mengiste, T.: "Tomato Protein kinase 1b mediates signalling of plant response to necrotropic fungi and insect herbivory", *Plant Cell*, 20 (2008) 1964-1983.
- [17] Menke, F.L.H.; Pelt, J.A.V.; Pieterse, C.M.J.; Klessig, D.F.: "Silencing of the mitogen-activated protein kinase MPK6 compromises disease resistance in Arabidopsis," *Plant Cell.*, 16 (4) (2004) 897-907.

- [18] Zhang, Y.; Dong, C.: “Regulatory mechanisms of mitogen-activated kinase signalling”, *Cell Mol Life Sci.*, 64 (21) (2007) 2771-2789.
- [19] Stone, J.M.; Walker, J.C.: “Plant protein kinase families and signal transduction”, *Plant Physiol.*, 108 (1998) 451-457.
- [20] Lemmon, M.A.; Schlessinger, J.: “Regulation of signal transduction and signal diversity by receptor trends”, *Biochem. Sci.*, 19 (1994) 459-522.
- [21] Nurse, P.: “Universal control mechanism regulating onset of M-phase”, *Nature*, 344 (1990) 503-508.
- [22] Fesquet, D.; Labbe, J.C.; Derancourt, J.; Capony, J.P.; Galas, S.; Girard, F.: “The MO15 gene encodes the catalytic subunit of a protein kinase that activates CDC2 and other cyclin-dependent kinases (CDKs) through phosphorylation of threonine and its homolog”, *EMBO. J.*, 12 (1993) 3111-3121.