Inleiding

**Achtergrondinformatie**

MAPK is een afkorting voor Mitogen-activated protein kinases. MAPKs fosforyleren eiwitten die betrokken zijn bij cellulaire signaleringsprocessen in eukaryoten. MPK3 en MPK6 zijn door stress geactiveerde MAPKs, het aantal geïdentificeerde MAPK substraten die de defense response van planten reguleren zijn beperkt.

Wat zijn de signalen in de plant-pathogeen interaction pathway?

De signalen die de plant-pathogeen interaction pathway activeren zijn vaak, maar niet noodzakelijk, extern: temperatuur, zuurgehalte, vochtgehalte, ioniserende straling, aminozuur deprivatie, etc. (UniProtKB - Q39023 (MPK3\_ARATH))

Wat zijn de receptoren?

MPK3 en MPK6 zijn de receptoren die deze stress signalen signaleren en daarmee de defense response van de plant reguleren.

Hoe wordt MPK geactiveerd?

MPK3 en MPK6 worden geactiveerd door middel van threonine and tyrosine fosforylering.

Hoe wordt het signaal doorgegeven in de MAPK-cascade?

Na pathogene infectie van een planten cel zal MAPKKK de infectie ‘registreren’. Hierna volgt een fosforylering van MAPKK en MAPK. MAPK fosforyleerd op zijn beurt weer VIP1 en WRKY22 om de stress-gerelateerde pathway voort te zetten.

Wat voor soort eiwitten worden door de MAPK-cascade geactiveerd? (downsteam van de MAPK-cascade)

VIP1 is een transcriptiefactor die de productei van het eiwit PR1 op gang brengt en daarmee de late defence respone voor pathogene infecties activeert. WRKY22 is een transcriptiefactor die het eiwit FRK1 produceert en daarmee de vroege defence response voor pathogene infecties activeert (MAPK signaling pathway - plant - Arabidopsis thaliana (thale cress) ).

Is bekend wat de respons is van het signaal waarmee de MAPK-cascade wordt geactiveerd? Hoe komt deze respons tot uiting?

Wat is er verder bekend over de substraten van de Arabidopsis MAPK cascade?

**Welke biologische data ga je onderzoeken?**

Dit onderzoek breidt verder op de resultaten van een eerder gedaan onderzoek van Ines lassowskat (Lassowskat Ines, 2014). De resultaten bevatten onder andere 6 excel files met in elke file de resultaten van een andere opzet. Dit onderzoek maakt gebruik van de laatste 4 files. Bijvoorbeeld file 3 bevat de eiwitten die tot expressie komen wanneer MPK3 aanstaat en MPK6 uit; file 4 bevat de resultaten wanneer MPK3 uit staat en MPK6 aan; file 5 geeft de eiwitten weer die tot expressie komen wanneer MPK3 én MPK6 aan staan. File 6 is de negatieve controle, hier staan de eiwitten in die tot expressie komen ook al staan MPK3 én MPK6 allebei uit.

**Hoe is deze data verkregen?**

*“Lassowskat et al (2014) heeft transgene Arabidopsis thaliana planten gemaakt met een induceerbaar systeem om in vivo de activatie van MPK3 en MPK6 te simuleren. Hievoor zijn wild-type Colombia (Col-0) planten getransformeerd met een constitutief actieve variant van MKK5 (MKK5DD) uit Petroselium crispum onder controle van een dexamethason(DEX)-induceerbare promotor.”*

Om de activatie van MPK3 en MPK6 te simuleren heeft Lassowskat (Lassowskat Ines, 2014) in vivo transgene planten gemaakt van de soort Arabidopsis thaliana, met een induceerbaar systeem. Een constitutief actieve variant van MKK5 (MKK5DD) uit Petroselium crispum is gebruikt om het wild-type Colombia (Col-0) te transformeren onder controle van een dexamethason(DEX)-induceerbare promotor.

*“Als controle is het Col-0 genotype ook getransformeerd met een kinase-inactieve MKK5 mutant (MKK5kr). Metaboloom analyse liet zien dat deze artificiële MPK3/6 activatie, zonder blootstelling aan pathogenen of andere stress-factoren, genoeg is om de productie van belangrijke defense-gerelateerde matebolieten te activeren.”*

Als controle groep is het Col-0 genotype met een kinase-inactieve MKK5 mutant(MKK5KR) getransformeerd. Deze artificiële MPK3 en MPK6 activatie, zonder enige stress-signalen of andere pahtogenen, is volgens metaboloom analyse genoeg om de productie van belangrijke defense gerelateerde matebolieten te activeren. Aan de hand van deze controle groep is er een 4e dataset gegenereerd.

*“Om gefosforyleerde eiwitten te identificeren die mogelijkerwijs zich downstream in de signaleringsroute van MPK3 en MPK6 bevinden is door Lassowskat een Ms proteomics experiment uitgevoerd. Hiervoor is het construct met constitutief actieve variant van MKK5 (MKK5DD) ook getransformeerd in MPK3 en MPK6 mutant planten.”*

Door Lassowskat (Lassowskat Ines, 2014) is een MS proteomics experiment uitgevoerd om gefosforyleerde eiwitten die zich mogelijkerwijs downstream in de signaleringsroute van MPK3 en MPK6 bevinden te identificeren. Hiervoor zijn de MPK3 en MPK6 mutant planten getransformeerd met de constitutief actieve variant van MKK5 (MKK5DD).

*“Met behulp van proteomics (MS-MS) zijn in elk genotype de aanwezige eiwitten geïdentificeerd en is de relatieve concentratie van deze eiwitten bepaald. De concentratie van de eiwitten is steeds vergeleken met de concentratie van eiwitten voor DEX stimulatie om te bepalen welke eiwitten up-gereguleerd zijn en weke down-gereguleerd zijn als gevolg van MKK5 activatie.”*

De relatieve concentratie van de in elk genotype aanwezige eiwitten zijn met behulp van proteomics (MS-MS) geïdentificeerd. De concentratie van de eiwitten is steeds vergelijken met de concentratie van eiwitten voor DEX stimulatie om te bepalen welke eiwitten up-gereguleerd zijn en welke down-gereguleerd zijn als gevolg van MKK5 activatie.

*“Om te bepalen of de gevonden eiwitten inderdaag MAPK substraat kunnen zijn is bekeken met een voorspellingstool of ze de typische MAPK-target fosforylerignssite bevatten. Met MS-MS is vervolgens bepaald of deze peptides inderdaad worden gefosforyleerd. Een aantal van de gevonden mogelijk MAPK gefosforyleerde eiwitten blijken geasocieerd te zijn met de biosynthese van anti-microbiële defense metabolieten (bv WRKY transcriptie factoren en eiwitten gecodeerd door de genen van de ‘PEN pathway’ nodig voor ‘penetration resistance to filamentous fungi’)”*

De MAPK-target fosforyleringssite is typerend voor MAPK substraten. Om te bepalen of de gevonden eiwitten een MAPK substraat kunnen zijn wordt er met een voorspellingstool bekeken of ze deze typerende fosforyleringssite bevatten. Met MS-MS wordt vervolgens voorspeld of de peptides gefosforyleerd worden. Een aantal van de gevonden mogelijk MAPK gefosforyleerde eiwitten blijken geassocieerd te zijn met de biosynthese van antimicrobiële defense metabolieten. Bijvoorbeeld WRKY transcriptie factoren en eiwitten gecodeerd door de genen van de ‘PEN pathway’ nodig voor ‘penetration resistance to filamentous fungi’.

**Wat is het problem?**

**Bio-informatica vraag**

Eiwitten identificeren die zich mogelijkerwijs downstream in de signaleringsroute van MPK3 en MPK6 bevinden.