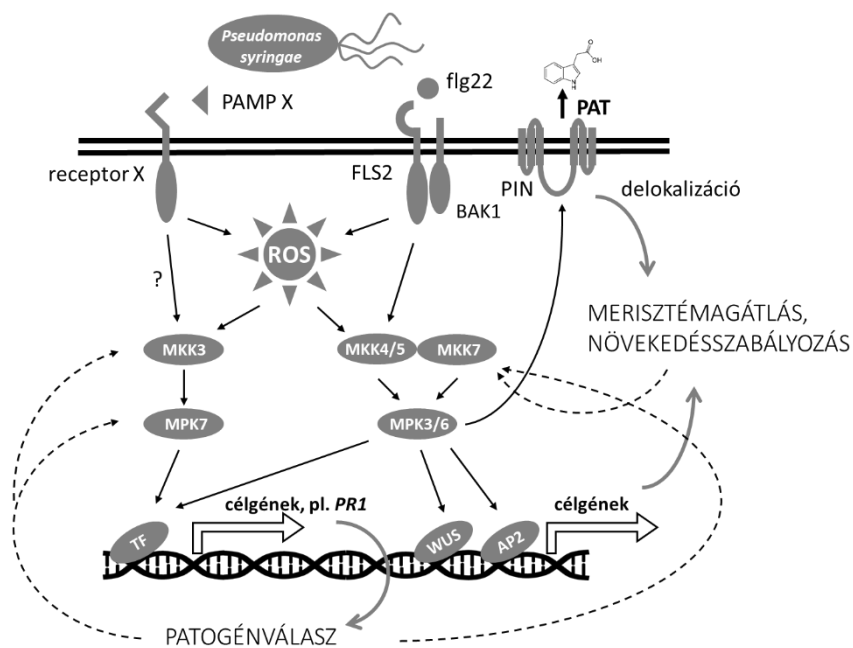


A mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) jelátvitel szerepe a növények környezeti adaptációs folyamataiban



Dóczy Róbert

Akadémiai Doktori Értekezés Tézisei

Budapest, 2022

1. Bevezetés

A kedvezőtlen és főleg az extrém környezeti tényezők jelentősen veszélyeztetik a mezőgazdasági növénytermesztés biztonságát. Ráadásul ezek a kedvezőtlen, extrém környezeti hatások a klímaváltozás következtében a jövőben várhatóan még inkább fokozódnak (Challinor et al., 2014). Mint minden élőlényt, a növényeket is folyamatosan változó környezeti hatások érik, amelyek érzékelésére és a megfelelő válaszok kialakítására a növényvilágban is számos mechanizmus alakult ki. Így az agrárbiológia egyik legfontosabb kihívása a növényi védekező mechanizmusok részletes megismerése, és ezen keresztül annak a kérdésnek a megválaszolása, hogy miként lehet a stressztűrést a termés mennyiségi vagy minőségi romlása nélkül fokozni.

A kórokozók által kiváltott abiotikus stresszválaszok indukálásának első lépése a patogénfertőzés felismerése. Ez általában ligandum-receptor kölcsönhatásokon keresztül következik be, ahol a patogén eredetű molekuláris komponenseket specifikus növényi receptorfehérjék ismerik fel (Jones and Dangl, 2006; Zipfel, 2009; Silva et al., 2018; Ngou et al., 2021). Az eukarióta jelátviteli mechanizmusok alapvető sémájának megfelelően a patogenezis eredetű ligandumokat megkötő receptorok az intracelluláris jelátviteli mechanizmusok aktiválásán keresztül indukálják a megfelelő védekezési válaszokat. Az egyik legrészletesebben tanulmányozott mintázat felismerési mechanizmus a flagellin érzékelése. A flagellum (ostor) a baktériumok aktív mozgásához szükséges organellum, aminek az egyik legfontosabb protein komponense a flagellin (FliC) (Macnab, 2004). A *Pseudomonas syringae* kórokozó baktérium a fertőzési folyamat során flagellint szekretál, amit egy plazma membrán lokalizált leucine-rich repeat (LRR) típusú receptor kináz, az FLS2 (flagellin sensing 2) érzékel (Gómez-Gómez and Boller, 2002). A flagellin érzékelése egy 22 aminosavból álló peptid mintázat, az flg22 felismerésével kezdődik. Ennek hatására az FLS2 egyrészt egy másik FLS2 receptorral homodimerizálódik (Sun et al., 2012), másrészt a BAK1 (BRI1-associated kinase 1) koreceptorral heterodimert képez. Az flg22 érzékeléséhez a BAK1 is szükséges, ami szintén egy plazma membrán receptor kináz (Chinchilla et al., 2007). Az aktív BAK1 foszforilálja az FLS2-t és a BIK1-et (Botrytis-induced kinase 1) (Lu et al., 2010), a foszforilált BAK1 pedig a receptor komplexet elhagyva a további jelátviteli fehérjéket képes foszforilációval aktiválni. Az flg22 érzékelés következtében kialakuló immunválasz többek között apoplaszt lúgosodást, kallóz lerakódást, a másodlagos anyagcsere változásait eredményezi (Gómez-Gómez et al., 1999; Asai et al., 2002; Nicaise et al., 2009). A védekezőmechanizmusok indukálásában alapvető szerepet játszik a mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) jelátviteli flagellin indukált aktivációja (Felix et al., 1999; Gómez-Gómez and Boller, 2000; Droillard et al., 2004).

A MAPK jelpályák az egyik legrégebben és legintenzívebben tanulmányozott eukarióta jelátviteli mechanizmust képezik (Avruch, 2007). A MAPK jelátviteli utak felépítésének jellegzetessége, hogy azokban hierarchikusan rendezett protein kinázok egymást reverzibilis foszforilációval aktiválják, így alakítva ki egy foszforilációs kaszkádot (MAP Kinase Group, 2002). A kaszkádban minimum három kináz típus szerepel, amelyek foszforilálatlan állapotban inaktívak, az aktivációs hurokban található foszforilációs helyek foszforilációja következtében veszik fel az aktív konformációt. A névadó MAPK-ok a hierarchia alsó szintjén helyezkednek el, a TxY aktivációs motívumban szereplő treonin és tirozin aminosavakat a következő hierarchikus szinten szereplő, MAP kináz kinázok (MAPK kináz, MKK) foszforilálják. Ezeket a MAP kináz kináz kináz enzimek (MAP3K) általi foszforiláció aktiválja.

Az első teljesen leírt növényi MAPK kaszkádot 2002-ben közölték, amely a bakteriális flagellin elicitor jelátvitelében játszik szerepet *Arabidopsis* modellnövényben (Asai et al., 2002). Ez a jelpálya a flagellin FLS2 transzmembrán receptor általi érzékelésének következtében aktiválódik, a MAPK kaszkád pedig a MEKK1-MKK4/5-MPK3/6 (MAP3K-MKK-MAPK) komponensekből áll, ami végül is WRKY típusú transzkripciós faktorok aktiválását eredményezi. Ennek megfelelően az aktív MEKK1-t, MKK4-et, MKK5-öt, illetve WRKY29-et expresszáló levelek ellenállóbbak voltak a *Pseudomonas syringae* fertőzéssel szemben.

A növényi MAPK jelátvitel funkciójára vonatkozó kutatások középpontjában elsősorban az A filogenetikai csoportba tartozó MPK3/MPK6 paralóg pár és a B csoportba tartozó MPK4 álltak. Ezek az eredmények egy magasszintű funkcionális komplexitást tártak fel. A korai eredmények alapvetően az abiotikus és biotikus stresszekre adott védekező válaszok szabályozásában betöltött szerepüket tárták fel., a későbbiekben született eredmények szerint különböző fejlődési folyamatokban is részt vesznek (Colcombet and Hirt, 2008; Rodriguez et al., 2010; Andreasson and Ellis, 2010; Meng and Zhang, 2013; Xu and Zhang, 2015; Zhang et al., 2018; Jagodzic et al., 2018; Lin et al., 2021; Chen et al., 2021).

E széles körű funkcionális palettát látva felmerül a kérdés, hogyan képes ennyiféle eltérő forrású jel ugyanarra a néhány MAPK jelpályára konvergálni, illetve lefelé hogyan képesek ezek a jelpályák ennyiféle eltérő folyamat szabályozására hatni? A gomba és humán MAPK jelátvitel jellegzetessége egyrészt, hogy többféle felső receptor jele konvergál ugyanarra a MAPK jelútra, másrészt a MAPK kaszkádtól lefelé terjedő jeláramlás divergenciája, ahol MAP kinázok meglepően nagyszámú szubsztrát fehérjét foszforilálnak.

Növényekben a MAP3K hierarchia szint feletti jelátvitel néhány elemét csak az utóbbi években azonosították. A növényi transzmembrán patogén receptorokat a MAPK kaszkádokkal az RLCK (receptor-like cytoplasmic kinases) kinázcsoport tagjai kapcsolják össze (Cui et al., 2018), így a más eukariótákhoz hasonló jelkonvergációs mechanizmus a növényvilágban is megfigyelhető. Az ingerek érzékelése és a MAPK jelpályák aktiválása közötti kapcsolatban a jelátviteli fehérjéken kívül azonban meghatározó szerepe van egy univerzális másodlagos hírvivő csoportnak is, a reaktív oxigén formáknak (reactive oxygen species (ROS)). A ROS széles körű biológiai szerepe, és a MAPK-ok szinte univerzális ROS indukált aktivációja jól illeszkedik a MAPK jelátvitel funkcionális sokszínűségéről kialakult képbe (Liu and He, 2017; Waszczak et al., 2018). Habár a ROS képződés normál élettani körülmények között is előfordul, jelentősen megnövekedhet különböző biotikus és abiotikus stresszhatások következtében, mint például patogén fertőzés, magas fényintenzitás, só stressz vagy vízhiány (Torres and Dangel, 2005; Suzuki et al., 2012). Mivel a túl magas ROS koncentráció károsító hatású, kontrolálására ROS gyökfogyó rendszerek alakultak ki, amelyek alapvetően két fő csoportra oszthatóak: enzimatis és nem enzimatis gyökfogyók (Foyer and Noctor, 2009). Potenciálisan káros hatásaik mellett, a reaktív oxigénformák fontos szerepet játszanak a stresszválaszok és a növekedés és fejlődés szabályozásában is, mint másodlagos hírvivők. Régóta megfigyelt jelenség, hogy az R proteinek által sikeresen felismert patogének egy kétfázisú ROS képződést indukálnak, egy kisebb amplitúdójú tranzien első fázist (ROS burst), amit egy hosszan fenntartott, sokkal magasabb amplitúdójú második fázis követ (Lamb and Dixon, 1997; Grant and Loake, 2000).

Külső H_2O_2 vagy ózon kezelés számos MAPK jelátviteli komponens aktiválását eredményezi, ugyanakkor a MAPK kaszkádok genetikai manipulációja a ROS védekezésben betöltött funkciójukat (gyökfogyó enzimek génexpressziós szabályozását) is igazolta (Pitzschke and Hirt, 2009, 2006).

A MAPK jelpályák által lefelé kifejtett szabályozó mechanizmusok sokféleségét az általuk foszforilált szubsztrát fehérjék sokszínűsége biztosíthatja. A foszforiláció a szabályozott fehérjék enzimatis vagy kötési aktivitásának, stabilitásának vagy intracelluláris lokalizációjának megváltoztatásán keresztül azok funkcionális változásához vezet. A különböző felső jelek konvergenciája és az alsó szubsztrátok divergenciája jól illeszkedik a MAPK jelátvitel funkcionális sokoldalúságáról megismert képbe. A növényi MAPK szubsztrátok felfedezése az utóbbi években egyértelműen lendületbe jött, egyrészt számos potenciális szubsztrátot azonosítottak nagy átteresztőképességű (high-throughput)

módszerekkel, másrészt több mint 40 szubsztrát foszforilációját jellemezték részletesen (Dóczy and Bögre, 2018). Mivel a MAPK jelpályák funkcionális kimenetét a szubsztrát fehérjék határozzák meg, a kináz-szubsztrát kölcsönhatások specificitásának biztosítására specifikus biokémiai mechanizmusok fejlődtek ki. A MAP kinázok ún. prolin-irányított protein kinázok, ahol a szubsztrát kötést általában rövid dokkoló motívumok biztosítják. A prolin-irányított protein kinázok olyan szerin vagy treonin aminosavakat foszforilálnak, amelyeket a polipeptidláncban C terminális irányban egy szomszédos prolin aminosav követ (S/TP hely). A kináz-szubsztrát felismerést az aktív centrum helyett gyakran dedikált interakciós felszín (dokkoló helyek) biztosítják. Ez lehetővé teszi a kináz hálózatok evolúciós flexibilitását a katalízis hatékonyságának fenntartása mellett (Bhattacharyya et al., 2006).

A MAPK jelátvitel funkcionális változatosságát jól reprezentálja az azonosított szubsztrátok funkcionális sokfélesége. Az egyedileg jellemzett szubsztrátok száma is fokozatosan növekszik, számos esetben a foszforiláció funkcióját is leírták, pl. foszfomimetikus és/vagy nem foszforilálható mutáns proteinformák használatával. Legtöbbjük a stressz válaszokban játszik szerepet, mind abiotikus (pl. ICE1 (Li et al., 2017), MYB41 (Hoang et al., 2012), HSFA4A (Pérez-Salamó et al., 2014)), mind biotikus (pl. MKS1 (Andreasson et al., 2005), VIP1 (Djamei et al., 2007), WRKY33 (Mao et al., 2011)) stresszek esetében, és egyre több, fejlődési folyamatokkal asszociált fehérjét is azonosítanak MAPK szubsztrátként (pl. SPCH (Lampard et al., 2008), MYC2 (Sethi et al., 2014), PIF3 (Xin et al., 2018)). A MAPK-szubsztrát interakciók mechanizmusait az MPK3 által foszforilált fehérjék példáján keresztül részletesen összefoglalja Pitzschke (2015). A MAPK szubsztrátokra vonatkozó eredményeket egy összefoglaló tanulmányban dolgoztuk fel (Dóczy and Bögre, 2018), ahol, többek között, részletesen bemutatjuk az egyedileg jól jellemzett növényi MAPK szubsztrátokat.

3. A kutatások célkitűzései

Mivel a bemutatott kutatások az Arabidopsis genom, illetve közvetlenül az abban kódolt annotált MAPK jelátviteli génkészlet publikálását követően kezdődtek meg, első célkitűzésünk új jelátviteli pályák azonosítása és azok funkcionális jellemzése volt, az immár elérhetővé vált inszerciós mutáns növényanyagokat is bevonva a posztgenomi kísérleti eszköztárba. A funkcionális ismeretek bővülésével fokozatosan vált egyértelművé a növényi MAPK szubsztrátokra vonatkozó ismeretink nagymértékű hiánya, ami egyben jelentős szűk keresztmetszetet jelentett a részletes funkcionális vizsgálatok terén is. Ezért választottam önálló kutatásaim egyik fő célkitűzéséül új MAPK szubsztrátok azonosítását. Mivel időközben a funkcionális kutatásink fókusza a stresszrezisztencia mechanizmusokról a fejlődésszabályozásra helyeződött át, így célunk specifikusan a fejlődésszabályozásban szerepet játszó szubsztrátok azonosítása lett. A kináz-szubsztrát interakciók kutatási módszertana azonban még ekkor is alapvetően az évtizedekkel korábban kialakított *in vitro* kináz tesztre alapozott, annak minden hátrányával együtt, így célul tűztük ki a kináz kutatás kísérleti eszköztárának bővítését egy *in vivo* foszforilációs események detektálására alkalmas módszer kialakításával.

A publikált növényi genomok számának fokozatos bővülése lehetővé tette a komparatív genomikai megközelítések alkalmazását a növényvilágban, így célul tűztük ki a növényi MAPK jelátvitel evolúciójának tanulmányozását is, amivel a funkcionális ismeretek evolúciós hátterének kialakításához kívántunk hozzájárulni. Az alacsonyabb rendű növények, mint pl. a zöldségfélék genomjában kódolt MAPK génkészletek megismerése egyben lehetővé tette az azok funkcióját célzó kutatások megkezdését is. Erre a célra különösen alkalmas a *Chlamydomonas reinhardtii* egysejtű fotoszintetikus modell organizmus, amelynek alapvető felhasználása (pl. fotoszintézis vagy lipid bioszintézis kutatásban) és biotechnológiai potenciálja (pl. értékes metabolitok vagy bioüzemanyag előállítás) ellenére is igen korlátozottak a stressztoleranciára és annak molekuláris szabályozására vonatkozó ismereteink. Így célként határoztuk meg a zöldalga MAPK jelátvitel reverz genetikai funkcionális vizsgálatát *C. reinhardtii* mutánsok felhasználásával.

4. Eredmények

4.1. Az MKK3-MPK7 jelátviteli pálya azonosítása

Irányított élesztő MAPK – MAPK kináz két-hibrid tesztek eredményeként azonosítottuk az MKK3-MPK1/2/7 interakciókat, ami két olyan kináz csoport közötti jelpálya létét tárta fel, amelyekről korábban semmilyen publikált adat nem állt rendelkezésre. Az MKK3 a növényi MAPK kinázok B filogenetikai csoportjához tartozik, ami egy több szempontból is egyedülálló, növény-specifikus MKK csoport (MAPK Group, 2002; Hamel et al., 2006). Az MPK1/2/7 pedig a növényi MAP kinázok C csoportjához tartoznak, ami a mai napig egy viszonylag kevésbé jellemzett kináz csoport.

Annak igazolására, hogy az MKK3 képes MAP kinázt aktiválni Arabidopsisban, sejtkultúrából izolált protoplasztokat transzformáltunk kilenc hemagglutinin (HA) epitóp fúziós MAPK konstrukcióval, amelyek mind a négy MAPK csoportot reprezentálják. Ezeket kotranszformáltuk vad típusú és konstitutív aktív myc epitóp fúziós MKK3 konstrukciókkal, és *in vitro* kináz teszttel igazoltuk, hogy a konstitutív aktív MKK3-EE forma a C csoportba tartozó MAP kinázok aktiválását eredményezte.

Mivel az MPK7 a legerősebb MKK3 interaktor, további munkánk során elsősorban erre a szabályozási kapcsolatra fókuszáltunk. Annak érdekében, hogy igazoljuk, miszerint az MKK3 közvetlenül foszforilálja az MPK7-et, rekombináns, kináz inaktív glutation S-transzferáz (GST) fúziós MPK7-et, illetve kontrollként MPK6-ot tisztítottunk. Vad típusú és konstitutív aktív MKK3 formákat tranziensen transzformált protoplasztokból immunprecipitáltuk, majd megvizsgáltuk, hogy képesek-e *in vitro* foszforilálni a tisztított GST:MPK7 és GST:MPK6 fehérjemintákat. Habár a vad típusú MKK3 csak kis mértékben foszforilálta az MPK7-et, a konstitutív aktív MKK3-EE esetében jelentős foszforilációt detektáltunk. Ezzel ellentétben, a protoplasztból immunprecipitált MKK3 egyik formája sem foszforilálta az MPK6-ot.

Annak igazolására, hogy az MPK7 és az MKK3 *in planta* komplexet alkotnak, növényanyagokból végeztünk koimmunprecipitációt (Co-IP). Col-0 és myc epitóp fúziós MKK3 túltermelő transzgenikus növényekből származó kivonatokat immunprecipitáltunk egy, az MPK7 C-terminális oligopeptid ellen termeltetett nyúl anti-MPK7 antitesttel, majd a precipitátumokon anti-myc antitesttel végeztünk immunoblot analízist. Az MKK3:myc-expresszázó növény minta anti-MPK7 immunprecipitátumból kimutatható volt az MKK3, ami

igazolja, hogy a két fehérje *in vivo* komplexet képez. Megerősítésként, tranziensen transzformált protoplastokkal sikerrel végeztük el az immunprecipitációt a másik irányban is.

Összesítve, a fizikai interakciót, aktivációt és foszforilációt kimutató kísérleti eredmények meggyőzően igazolták, hogy az MKK3 a C csoport MAP kinázok felső aktivátora.

4.2. Az MKK3-MPK7 jelátviteli pálya szerepe a biotikus stressz válaszban

Az MKK3 jelátviteli pálya azonosítása után a következő fontos kérdés ennek az új szabályozási mechanizmusnak a funkcionális jellemzése volt. A génexpresszió gyakran informatív a gén funkciójára vonatkozóan. Mivel a MAPK jelátvitelt különböző stresszekkel korábban már több eredmény is összefüggésbe hozta, megvizsgáltuk, hogy vajon az *MKK3* gént indukálja-e valamilyen stressz hatás. E célból az *MKK3* promóter fragmentet a β -glükuronidáz (GUS) riportter génnel egybeépített fúziós konstrukcióval transzgenikus növényvonalakat állítottunk elő. Kezeletlen növények hisztokémiai GUS tesztje a vaszkuláris szövetekben mutatott alapszintű promóter aktivitást, amit abiotikus stressz hatások (hideg, só, szárazság) nem befolyásoltak. Ezzel szemben a patogén *Pseudomonas syringae* pv tomato DC3000 (*Pst* DC3000) baktériumtörzsszel végzett fertőzés jelentős promóter indukciót eredményezett, így feltételezhető volt, hogy az MKK3 funkcionálisan a patogén jelátvitelben vesz részt.

Funkcionális genetikai vizsgálat céljából a SALK törzsgyűjteményből beszerzett maganyagokból izoláltuk az *MKK3* gén homozigóta T-DNS inszerciós vonalát, Col-0 háttérben (*mkk3-1*). Az inszerció molekuláris jellemzése igazolta a T-DNS beépülését, és az *MKK3* génexpresszió teljes elvesztését. Az inszerciós mutáns vonal mellett *MKK3* overexpresszáló vonalakat is előállítottunk, amelyekben mind a vad típusú, mind a konstitutív aktív változatot kódoló cDNS-t C-terminális myc epitóp fúziós konstrukcióban, a virális eredetű konstitutív 35S promóter által szabályozva fejeztettük ki. A patogénválasz egyik legjobban jellemzett molekuláris markere a *PR* (pathogenesis-related) gének expressziója. Kvantitatív RT-PCR módszerrel kimutattuk, hogy a túltermelő vonalakban jelentősen megnőtt a *PR1* mRNS szintje, valamint, bár kisebb mértékben, a *PR2*, *PR3*, és *PR4* gének expressziója is, ami azt jelzi, hogy az MKK3-nak pozitív szabályozó szerepe van a *PR* gének expressziójában.

Az *MKK3* gén transzkripciós indukciója *Pst* DC3000 fertőzés hatására, valamint a *PR* gének azonosítása MKK3 transzkripciós tagretként, mind arra utaltak, hogy az MKK3 szerepet játszik a patogén válasz szabályozásában. Ezért összehasonlítottuk, mennyire ellenállóak az *mkk3-1* és MKK3 túltermelő vonalak a vad típusú Col-0-hoz képest a *Pst* DC3000 hemibiotróf

patogén fertőzéssel szemben. E célból megmértük a bakteriális szaporodás ütemét Col-0 kontroll, *mkk3-1*, valamint *myc* fúziós vad típusú MKK3, illetve konstitutív aktív MKK3-EE formákat expresszáló növényanyagokban. A fertőzési folyamat kvantifikációja jelentős különbséget mutatott a vizsgált növényvonalak között: az inokulációt követően 48, illetve 72 órával az MKK3-EE növényekben szignifikánsan kisebb mértékű bakteriális kolonizációt mértünk a kontrollhoz képest. A vad típusú MKK3 túltermelése nem okozott szignifikáns változást. Ezzel szemben, az *mkk3-1* növényekben a kontrollhoz képest szignifikánsan nagyobb mértékű bakteriális szaporodást tapasztaltunk.

Ezt követően megvizsgáltuk, hogy vajon két, a patogénfertőzéshez köthető kezelés hatására aktiválódik-e ez az MKK3 kináz. A flagellin egy jól ismert MAPK aktiváló elicitor, míg a H₂O₂ egy fontos, patogén fertőzés során keletkező másodlagos szignál. HA epitóp fúziós MPK6 és MPK7 MAP kinázokat tranziensen expresszáltuk MKK3-mal vagy MKK4-gyel együtt vagy MKK nélkül. Immunprecipitációt követően a MAPK aktivitást *in vitro* kináz teszttel határoztuk meg. A H₂O₂ kezelés aktiválta az MPK7-et, és ez az aktivitás erősen fokozódott az MKK3:*myc* konstrukciót ko-expresszáló mintákban, elérve a konstitutív MKK3 ko-expresszióval kiváltott MPK7 aktivitás szintjét. Ezzel szemben a *flg22* kezelés gyakorlatilag nem befolyásolta az MPK7 aktivitást, még MKK3 ko-expresszió mellett sem. Az irodalmi adatoknak megfelelően, a H₂O₂ kezelés szintén aktiválta az MPK6-ot is, azonban ezt az aktivitást nem befolyásolta az MKK3 expresszió. Saját felső aktivátora, az MKK4 ko-expressziója azonban külső inger jelenléte nélkül is megnövelte az MPK6 aktivitását. Az MKK3-mal ellentétben, az MKK4 ko-expresszió H₂O₂ kezelés hatására jelentősen megnövelte az MPK6 aktivitást. Annak a lehetőségnek a kizárására, hogy az MPK7 aktivitás hiánya *flg22* kezelésre nem kísérleti műtermék (pl. a flagellin receptor elvesztése a protoplasztálás során), a *flg22* kezelést elvégeztük MPK6-ot expresszáló protoplasztokon is, ami az előzetes ismereteknek megfelelően, erős MPK6 aktivitást eredményezett.

Az MKK3 túltermelő vonalakban a *PR1* indukciót mutató RT-PCR eredményeink nyomán, *PR1* promóter függő riportergén használatával is megvizsgáltuk az MKK3-MPK7 szerepét a *PR1* transzkripció szabályozásában. E célból egy *ProPR1:GUS* konstrukciót transzformáltunk protoplasztba, MAPK jelátviteli komponensek különböző kombinációival együtt. Az MPK7 ko-expressziója önmagában elegendő volt, hogy indukálja a *PR1* promótert. Az aktív MKK3-EE-vel együttes MPK7 ko-expresszió a promóter aktivitást jelentősen tovább fokozta, a pozitív kontrollként használt NPR1-gyel elért expressziós szinthez hasonló indukciót eredményezve.

Összességében tehát a fenti eredmények azt mutatják, hogy az MKK3 az MPK7 felső aktivátora egy ROS képződés (H_2O_2) által aktivált *PR* indukáló patogén jelpályában, ami valószínűsíthetően a flagellin jelátviteltől függetlenül működik.

4.3. Az MKK7 jelátviteli pálya szerepe a merisztéma működésének szabályozásában

A növényi MAPK jelátviteli kutatások eleinte kizárólag a C (MKK4/5) és az A (MKK1/2) csoportba tartozó MAPK kinázokra irányultak. Célul tűztük ki a D csoport két reprezentatív tagjának az MKK7 és MKK9 funkcionális vizsgálatát. Az időközben az MKK9 funkcionalitásáról megjelent publikációk miatt a dolgozatban alapvetően csak az MKK7-tel kapcsolatos eredményeinket mutatom be. A funkcionális vizsgálatokat kétféle kísérleti megközelítéssel kezdtük meg. Egyrészt az *MKK7* promóter régióját fuzionáltuk a GUS riportergénnel, majd ezzel transzgenikus vonalakat állítottunk elő, másrészt inszerciós, illetve túltermelő transzgenikus vonalakat szereztünk be, illetve állítottunk elő.

Kezeletlen *ProMKK7:GUS* növényekben promóter aktivitást kizárólag a pálhákban (vagy melléklevelekben (stipula)) detektáltunk. Mind az auxin, mind az etilén kezelés egyrészt megemeli a pálha alapaktivitás szintjét, másrészt más szervekben is indukálja a *ProMKK7:GUS* aktivitást, főleg a vaszkuláris komponensekben. A speciális expressziós mintázat alapján feltételezhető volt, hogy az MKK7 valamilyen adaptív fejlődésszabályozási funkciót lát el.

Funkcionális analízis céljából megpróbáltunk myc epitóp fúziós MKK7 túltermelő transzgenikus vonalakat előállítani, azonban a kanamycin rezisztens *35S:MKK7* elsődleges transzformáns csíranövények életképtelenek voltak, jelentősen sérült merisztémafejlődést mutattak, és végül nem voltak képesek valódi leveleket fejleszteni. Ezért előállítottunk az MKK7-et β -ösztadiol által indukálható promóter szabályozása alatt kifejező vonalakat is. β -ösztadiol nélkül az összes elsődleges transzformáns a vad típusú növekedéssel megegyezően fejlődött és hozott magokat. 0,05 vagy 0,1 μ M β -ösztadiol tartalmú táptalajon csíráztatott transzgenikus magokból súlyos fejlődési rendellenességeket mutató, életképtelen növények csíráztak ki. Az MKK7 fehérje indukált túltermelése mind a hajtáscsúcs, mind a gyökércsúcs merisztémák gyors leállítását, illetve összeomlását idézte elő. Hat napos, vertikális táplemezen növesztett csíranövényeket β -ösztadiol tartalmú táplemezre helyeztünk át, majd a gyökernövekedést három napon át mértük. 0,01 μ M β -ösztadiol koncentráció a gyökernövekedés mintegy 50% gátlását eredményezte, míg 0,1 vagy 1 μ M β -ösztadiol koncentráció mellett a gyökernövekedés 24 órán belül teljes mértékben leállt. 0,1 β -

ösztadiollal indukált gyökerek merisztémája kb. 30%-kal megrövidült, miközben a merisztémasejtek száma mintegy 50%-kal csökkent. Az említett β -ösztadiol koncentrációk mellett EdU festéssel kimutattuk, hogy az MKK7 túltermelés megakadályozza a DNS replikáció iniciációját (S fázis), és így a sejtciklus megindulását.

A fény egy kiválóan manipulálható környezeti kísérleti rendszert kínál a hajtáscsúcs merisztéma aktivitásának vizsgálatára (López-Juez et al., 2008; Mohammed et al., 2018). A sötétben csírázó etiolált növények fejlődésére egy speciális növekedési program, a skotomorfoгенезis jellemző, amelynek során az embrionális szár megnyúlik, de a hajtáscsúcsi merisztémából történő levélképződés gátolt, vagyis a merisztéma „nyugalmi” állapotban van. A de-etioláció a föld alatt kialakult csíranövények életében a felszín elérésekor egy kritikus átmeneti folyamat, ugyanakkor a gyors és egyidejű növekedésindukció a sötétben csíráztatott majd fénynek kitett növények hajtáscsúcsában (fotomorfoгенезis) egy praktikus szinkronizált kísérleti rendszert is nyújt a hajtáscsúcs merisztéma aktivitásának vizsgálatára (López-Juez et al., 2008; Yoshida et al., 2011; Pfeiffer et al., 2016; Mohammed et al., 2018).

Három napos, sötétben csíráztatott etiolált csíranövényeket folyamatos megvilágításra áthelyezve nyomon követtük a kialakuló levélprimordiumok fejlődési ütemét, a csíranövények levélprimordiumainak felületét mikroszkópos képek digitális analízisével meghatározva. Ezek a mérések azt mutatták, hogy az *mpk6* és *mkk7* mutáns csíranövények átlagos primordium területe több mint kétszerese volt a kontroll vad típusénak, a fényre kerülést követő mindkét napon. A de-etiolált *mkk7* csíranövények gyorsabb ütemű primordiumképzésével ellentétben, és az MKK7 túltermelés hatására bekövetkező merisztémakárosodásokkal összhangban, amikor indukálható MKK7 etiolált csíranövényeket a fényre helyezéssel egyidőben β -ösztadiollal kezeltünk, a merisztéma aktiváció nagymértékű gátlását, illetve leállítását tapasztaltuk.

Összegezve, ezek az eredmények azt mutatják, hogy a MAPK jelátvitel szerepet játszik a merisztéma aktivitás kedvezőtlen környezeti körülmények közötti (fényhiány) gátlásában.

4.4. Egy új, in vivo növényi kináz-szubsztrát foszforilációs kölcsönhatások vizsgálatára alkalmas kísérleti módszer kialakítása

Szemben a több száz jól jellemzett humán MAPK szubsztráttal, a növényi MAPK szubsztrátokra vonatkozó ismereteink sokkal korlátozottabbak, ami komoly akadályt jelent

annak megértésében, hogy hogyan képesek egyes MAP kinázok számos, biológiailag jelentősen eltérő folyamatot szabályozni. Ezért célul tűztük ki a merisztémaműködés szabályozásában kulcsfontosságú MAPK szubsztrátok azonosítását. A merisztémaszabályzó proteinek foszforilációs modulációja környezeti ingerek hatására aktivált MAPK-ok által a növényfejlődés környezeti szabályozásának egyik fontos mechanizmusa lehet. *In silico* végzett szekvencia analízis eredményeként azt találtuk, hogy meglepően sok csúcsmerisztémát szabályozó fehérje szekvenciája tartalmaz D-site típusú MAPK dokkoló motívumot.

A rendelkezésre álló kísérleti eszköztár alapvetően vagy a nagy áteresztőképességű módszerekkel (Y2H, MS) véletlenszerűen izolált, vagy az előzetes hipotézisekre alapulón kiválasztott szubsztrát jelöltek további kísérletes igazolására és jellemzésére épült. Erre korábban gyakorlatilag csak az *in vitro* kináz teszt állt rendelkezésre, ami egy évtizedekkel ezelőtt kifejlesztett, és azóta lényegi továbbfejlesztések nélkül használt módszer. Az *in vitro* kináz esszének számos hátránya ismert, pl. a megbízhatósága a nagy koncentrációjú, tisztított fehérjék, sejtes szabályozó mechanizmusokon kívüli használata miatt meglehetősen problematikus. További problémát jelent a sugárzó foszforizotóp használata is.

Ezen hátrányok kiküszöbölésének potenciális lehetőségként adta magát a kináz aktivitások detektálására korábban már sikerrel alkalmazott protoplaszt tranzien্স expressziós módszer felhasználása *in vivo* kísérleti rendszerként. Elképzelésünk szerint, amennyiben a szubsztrát fehérjét aktív kinázzal együtt fejeztetjük ki, akkor a foszforilált izoformák aránya megemelkedik az önmagában kifejeztetett szubsztrát mintához képest. Ebben a rendszerben a kiválasztott szubsztrát jelöltek kódoló cDNS-eket epitóp fúziós expressziós vektorba klónozzuk, és protoplaszt tranzien্স expressziós rendszerben aktivált MAP kinázokkal együtt, illetve azok nélkül kifejeztetjük, ami nagymértékű rugalmasságot biztosít, továbbá az epitóp-jelölt fehérjeformák használatával kiküszöbölhető a növényi fehérjék elleni specifikus antitestek elérhetősége miatti szűk keresztmetszet is.

Az izoelektromos fókuszáláson alapuló újszerű technológiai fejlesztés a kapilláris izoelektromos fókuszálással kapcsolt nanofolyadék immuneszt (capillary isoelectric focusing coupled nanofluidic immunoassay; cIEF immuneszt/cIEF-immunoassay), ami lehetővé teszi a minták kapillárisban történő, automatizált, magas felbontású izoelektromos fókuszálást majd egyben a kapillárisban történő immundetekcióját (O'Neill et al., 2006), ezáltal az eltérő foszforiláltságú fehérjeizoformák pontos detekcióját. Legfontosabb előnye a kiváló felbontóképesség, amivel praktikusán egy átlagos fehérje valamennyi foszfoizoformája elválasztható és kvantitatív módon detektálható. Ezek az előnyök különösen jelentősek olyan

dinamikusan foszforilált fehérjék esetében, ahol párhuzamosan többféle foszforilált izoforma van jelen.

Első lépésként igazoltuk, hogy a cIEF-immunoesszé alkalmas protoplasztban expresszált fehérjék kimutatására. Legjobb tudomásunk szerint ez volt az első alkalom, hogy ezt a módszert növényi kutatásban használták, és megállapítottuk, hogy Bicine/Chaps kivonó puffer alkalmazásával nyert növényi fehérjeminták nem tartalmaznak olyan komponenseket amelyek gátolnák a komplex elválasztási-detektálási folyamatot. E célból kereskedelmi forgalomból beszerzett anti-GFP antitesttel kimutattuk az expresszált Green Fluorescent Protein (GFP) fehérjét, ami alapvetően egy izoformában fordul elő. A GFP fehérje egyben nem-szubsztrát negatív kontrollként is szerepelt kísérleti rendszerünkben, annak izoforma eloszlására semmilyen hatással nem volt az aktivált MAPK ko-expresszió.

Pozitív kontrollként előállítottunk egy olyan fúziós konstrukciót, amelyben a GFP fehérjét egy ismert MPK6 szubsztráttal, az ACS6 (ACC szintáz 6) fehérje C-terminális doménjével (Liu and Zhang, 2004; Joo et al., 2008) fuzionáltuk (GFP:ACSC-C). Nem aktivált MPK6 ko-expressziója csak minimális mértékben eredményezi a savas izoformák felhalmozódását, míg a protoplasztok kezelése a bakteriális flagellin eredetű flg22 elicitor peptiddel a savas izoformák jelentős felhalmozódását eredményezte, vagyis az aktivált MPK6 (hiper)foszforilálta a GFP:ACSC-C fehérjekonstrukciót. Negatív kontrollként előállítottunk egy olyan mutáns GFP:ACSC-C variánst is, amelyben a három MAPK foszforilációs helyet elrontottuk (S46A, S49A, S54A). E fehérje izoforma eloszlására az aktivált MPK6 nem volt hatással, igazolva, hogy a vad típusú konstrukcióval megfigyelt pI változások valóban MAPK általi foszforiláció következményei.

Összegezve, egy ismert MAPK szubsztrátot használva igazoltuk, hogy egy növényi fehérje specifikus kináz általi (hiper)foszforilációja kimutatható transzfekció és cIEF-immunosszé kombinációjával, még akkor is ha a sejtes közegben az adott fehérje már eleve erősen foszforilált.

4.5. A merisztémaszerveződés két mesterregulátora, a WUSCHEL (WUS) és APETALA2 (AP2) transzkripciós faktorok, in vivo MAP kináz szubsztátok

A WUS transzkripciós faktor központi szerepet játszik az összejt készlet szabályozásában hajtás- és virágmerisztémákban (Laux et al., 1996; Zhou et al., 2015). Habár funkcióját genetikai módszerekkel részletesen tanulmányozták, a WUS poszt-transzlációs szintű szabályozásáról gyakorlatilag semmilyen ismeret nem állt rendelkezésre. A WUS fehérje négy potenciális MAPK foszforilációs helyet tartalmaz, valamint egy RRTLPL motívumot, ami MAPK dokkoló „D-site”-ként működhet.

Transzfekciót követő cIEF-immunesztel sikerült detektálnunk a WUS fehérjét myc epitóp és GFP fehérje fúziós formában is, ami több, eltérő mennyiségű izoformaként van jelen. A fő izoformák detektált és számolt pI értéke egyaránt 5,6 (:myc), illetve 6,7 (:GFP). Következő lépésként megvizsgáltuk, hogy vajon az aktív MAPK ko-expresszió okoz-e WUS foszforilációt. E célból a WUS fehérjét három filogenetikai csoportot (A, B, C) reprezentáló négy MAP kinázzal együtt fejeztettük ki. A savasabb WUS izoformák egyértelmű megjelenése azt mutatja, hogy a WUS fehérjét az MPK3 specifikusan foszforilálja, szemben a többi tesztelt kinázzal. Az aktiváló flg22 kezelés nélkül az MPK3 nem volt képes a WUS fehérjét foszforilálni, mint ahogy az MPK3 ko-expresszió nélküli flg22 kezelés sem. Inaktív MPK3 mutáns változat ko-expressziója szintén nem vezetett WUS foszforilációhoz, flg22 kezelést követően sem. Mindkét fúziós WUS változattal (:myc, :GFP) azonos eredményeket kaptunk.

Továbbá létrehoztunk, három, a MAPK foszforilációt érintő mutáns WUS variánst: a foszfoakceptor aminosavakat két S/TP helyen (T108, S112) alaninra (WUS-AA, nem-foszforilálható mutáns), illetve glutaminsavra (WUS-DD, foszfomimetikus mutáns) cseréltük. Egy harmadik mutánsban a feltételezett D-site típusú MAPK dokkoló helyet rontottuk el (R252E, R253E, L257E: WUS- Δ dock). E mutációk közül kettő a számított pI érték megváltozását eredményezte. A bevezetett vagy megfordított töltések a WUS-DD és a WUS- Δ dock mutánsok pI értékeinek csökkenését okozzák. A fő izoformákat mindegyik mutáns esetében a számított értékeknek megfelelően detektáltuk, ami jól demonstrálja, hogy a rendszer megbízhatóan képes kimutatni fehérjék töltésösszetételének kismértékű különbségeit. Az MPK3 által kiváltott WUS savasodás teljesen megszűnt mind a nem-foszforilálható, mind a foszfomimetikus mutáns esetében. Továbbá a funkcionális D-site hiánya a foszforiláció jelentős csökkenéséhez vezetett, ami az ezen a motívumon keresztüli közvetlen interakcióra utal.

Az új módszerrel kapott eredmények megerősítése céljából a WUS fehérje MPK3 általi foszforilációját hagyományos *in vitro* kináz teszttel is igazoltuk. Az *in vivo* eredményekkel összhangban, radioaktív foszfátbeépülés alapján a WUS, ellentétben a WUS-AA változattal, egy *in vitro* MPK3 szubsztrátnak bizonyult.

Az AP2 homeotikus gén a virágfejlődés egyik meghatározó szabályozója, a virágfejlődés ABC modellje szerint az AP2 egy "A" típusú transzkripciós faktor (Bowman et al., 1989, 2012). Habár a WUS-hoz hasonlóan az AP2 funkcióját is alaposan jellemezték genetikai megközelítésekkel, az AP2 poszt-transzlációs módosítása korábban nem volt ismert, habár az AP2 figyelemreméltóan sok feltételezett kináz interakciós motívumot és foszforilációs helyet tartalmaz. Ennek megfelelően a kezeletlen sejtekben számos AP2 izoforma párhuzamos jelenléte volt kimutatható.

Az AP2 foszforilációját is aktivált MAP kinázok ko-expressziójával vizsgáltuk. Az AP2:myc fűzős fehérje számolt pI értéke 5,24, ami megfeleltethető a valamennyi mintában detektált fő csúcshoz. A flg22 kezelt mintákban bizonyos savasodás megfigyelhető (különösen az ~5,1 pI izoformánál), ami endogén kinázok általi foszforilációt jelez. MPK6 ko-expressziójával az AP2 intenzív savasodása volt megfigyelhető, amikor is egy jelentős új, 5,0 pI értékű izoforma jelent meg, ami nem volt jelen a többi mintában. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az AP2 egy *in vivo* MPK6 szubsztrát.

A konvencionális immunoblot technika sem a WUS, sem az AP2 esetében nem bizonyult alkalmasnak, hogy a foszfoizozoma eloszlás változásait feloldja.

4.6. A MAPK jelátvitel részt vesz a PIN auxin transzporterek poszt-transzlációs szabályozásában

A megfelelő merisztéma működés szabályozásában központi fontosságú az auxin transzporter fehérjék által kialakított poláris auxin transzport (PAT) folyamat is. A PIN1 membránfehérje az egyik legjobban jellemzett auxin transzporter, a *pin1* mutáns növények súlyos fejlődési rendellenességeket mutatnak (Adamowski and Friml, 2015). A plazmamembránban lokalizálódó PIN proteinek kulcsszerepet játszanak a PAT kialakításában, aminek eredményeként a növényi szövetekben jellegzetes auxin grádiensek alakulnak ki, amelyek a szervkialakulás és -fejlődés egyik meghatározó tényezőjeként működnek. Az auxin transzporterekre jellemző a poszt-transzlációs reguláció, a jellegzetes PIN poláris membrán

lokalizációt a PINOID (PID) és a rokon WAG1/2 kinázok általi foszforilációs folyamat szabályozza (Benjamins et al., 2001; Christensen et al., 2000; Friml et al., 2004; Huang et al., 2010; Michniewicz et al., 2007).

Az Arabidopsis PIN protein szekvenciák *in silico* analízis szerint számos putatív MAPK foszforilációs helyet tartalmaznak. Különösen figyelemreméltó a PIN szekvenciák filogenetikai analízisével kimutatott feltűnően nagymértékű konzerváltság három hely esetében, ami egy alapvető szabályozási funkcióra utalhat. Az Arabidopsis PIN1 T227, T248 és T286 pozícióinak megfelelő aminosavak valamennyi plazmamembránban lokalizálódó PIN szekvenciában jelen vannak, ráadásul tökéletesen konzerváltak egyszikű (rizs) és moha (*Physcomitrella*) szekvenciákban is. Érdekes módon, a három ismert PID foszforilációs hely (S231, S252 és S290) hasonló mértékben konzervált és konzisztensen a konzervált putatív MAPK foszforilációs helyek közelében helyezkedik el, mintegy szekvenciamintázatot képezve.

In vitro kináz tesztek alapján a PIN1 fehérjét az MPK6 és MPK4 kinázok foszforilálják. A három MAPK foszforilációs hely szubsztitúciója nem foszforilálható alanin aminosavakkal (T227A/T248A/T286A) ennek a foszforilációnak a jelentős csökkenését eredményezte. Hogy ezek MPK6 által végzett foszforilációját közvetlenül igazoljuk, MPK6 kezelt és a kontroll GST-PIN1 fehérjét LC-MS/MS analízissel teszteltük ahol a T227, T248, T286 aminosavak foszforilációját sikerült igazolni a kináz kezelt mintában.

Következő lépésként megvizsgáltuk, hogy a fokozott MAPK aktivitás befolyásolja-e a PIN1 lokalizációt csíranövények gyökereiben, ami egy széles körben használt kísérleti rendszer a PIN1 lokalizáció tanulmányozására. A gyökércsúcsban a PIN1 a központi és a kéreg sejtekben fejeződik ki, ahol szinte kizárólag a bazális lokalizáció jellemző (Blilou et al., 2005; Wisniewska et al., 2006). Negatív kontrollként üres vektorral transzformált növényanyagot használtunk, ahol a PIN1 lokalizáció szabályos volt, β -ösztadiol kezelés mellett is. Kezelés hiányában, a β -ösztadiol indukálható MKK7 konstrukciót hordozó növényekben is szabályos PIN1 mintázat volt megfigyelhető. Ezzel szemben, β -ösztadiollal kezelt növényekben a PIN1 plazmamembrán lokalizációja részben megszűnt, a PIN1 proteinfrakció egy része intracelluláris csomókban jelent meg. A gyorsütemű delokalizáció közvetlen MAPK által végzett poszttranszlációs szabályozásra utal. Hasonlóképpen, a flg22 kezelés hatására is delokalizáció következett be, vagyis a PIN1 proteinfrakció egy része intracelluláris csomókban jelent meg. Két különböző kísérleti megközelítésben is hasonló eredményeket értünk el, a PIN1 immunhisztokémiai lokalizációjával és *ProPIN1:PIN1:GFP* transzgenikus növényanyagokkal

is. *mpk6* mutáns növényekben ezzel szemben a PIN1 flagellin indukált delokalizációja nem következett be, vagyis a PIN1 lokalizációt az MPK6 általi foszforiláció képes befolyásolni.

Tranziensen expresszáltunk egy *35S:PIN1:GFP* konstrukciót, hogy a T227/T248/T286 MAPK közvetített foszforiláció PIN1 celluláris lokalizációra kifejtett hatását tanulmányozzuk. A gyökér eredetű szuszpenziós kultúrából izolált protoplasztokban a PIN:GFP a plazmamembránban lokalizálódik, így ez a kísérleti rendszer alkalmas a PIN1 plazmamembrán lokalizáció szabályozásának vizsgálatára, annak ellenére, hogy a polaritás az önálló sejtekben megszűnik. MPK6-tal ko-expresszáva és flg22-vel kezelve vagy indukált MKK7-tel ko-expresszáva, a PIN1 aggregátumokat képezve intracellulárisan akumulálódik, a gyökérsejtekben megfigyeltékhez hasonlóan. A vizsgált helyeken foszformimetikus PIN1:GFP (T227E/T248E/T286E) konstrukció expressziója a vad típusú PIN1:GFP lokalizációjában az MPK6 aktiváció következtében kialakulóhoz hasonló mintázatot mutatott, azonban a delokalizáció itt jóval nagyobb mértékű volt, extrém nagy intracelluláris aggregátumok alakultak ki. A nem foszforilálható változat (T227A/T248A/T286A) szintén megjelent intracellulárisan, azonban itt nem képződtek aggregátumok.

In vitro foszforilációs teszttel vizsgálva a PIN6 foszforilációját megállapítottuk, hogy ez a különleges PIN fehérje is MAPK szubsztrát, a putatív MAPK foszforilációs helyek alanin szubsztitúciója a foszforiláció megszűnését eredményezi.

Ezek az eredményeink azt bizonyítják, hogy a MAP kinázok és az AGC kinázok a szárazföldi növények evolúciójának egy korai stádiumában együtt jutottak szerephez a PIN plazmamembrán lokalizációjának komplex szabályozásában, a szárazföldi életmód kihívásainak megfelelően. A környezeti hatások által aktivált MAPK jelpályák a PIN szabályozás egy új mechanizmusát jelentik, amely fontos szerepet játszhat a növényfejlődés környezeti plaszticitásában.

4.7. A MAPK jelátvitel evolúciója a növényvilágban

Az orosz-amerikai biológus, Theodosius Dobzhansky már híres 1973-as esszéjének címében megfogalmazta, hogy „a biológiában semminek nincs értelme, kivéve az evolúció fényében” (Dobzhansky, 1973). Napjainkban a komparatív genomika Dobzhansky korában elképzelhetetlen lehetőségeket nyitott meg a funkcionális ismeretek evolúciós keretbe foglalásához.

A kétezres években az *Arabidopsis* genom után több virágos növény genomját is publikálták, amelyek az MPK és az MKK szekvenciák esetében is négy filogenetikai csoportot alkotnak (A-D) (Hamel et al., 2006). A teljes képhez azonban hiányzott az ősi, rendszertanilag távoli növénycsoportok (algák, mohák, harasztok) genomjaiban található MAPK jelátviteli gének azonosítása. Tizenhárom szekvenált genomú, a zöldalgák (*Chlorophyta*) nagy és heterogén csoportját jól reprezentáló zöldalgafaj proteómjában a MAPK szekvenciák azonosítására egy Hidden Markov Model (HMM) alapú szűrést végeztünk, amely 39 kanonikus MAPK proteint detektált. Mind a TEY, mind a TDY foszforilációs motívum megtalálható mindegyik fajban, ami a két növényi MAPK altípus nagyon korai szétválását jelenti. A TEY leágazáson belül jól elkülönülnek a C csoportnak megfelelő kinázok, míg a másik csoport az A és B típusú kinázokhoz hasonlít, filogenetikailag nem elkülöníthetően, így ezt a leágazást A/B csoportnak neveztük el. A jelenleg élő algák nagy és heterogén csoportja a szárazföldi növények megjelenése óta eltelt mintegy 500 millió év alatt alakult ki (Pennisi, 2011). Így megállapítható, hogy a növényvilág korai evolúciója során kialakult három ősi MAPK típus duplikációival jött létre a gerinces MAPK családnál jóval nagyobb növényi MAPK repertoár. A moha modellorganizmus *Physcomitrella patens* proteomban hat TEY és két TDY, a nem virágos, vaszkuláris növények modelljeként ismert *Selaginella moellendorffii* proteomban négy TEY és négy TDY típusú MAP kinázt azonosítottunk (*Arabidopsis*-ban 12 TEY és 8 TDY kináz található). Az újonnan megjelenő MAPK-ok bizonyára a szárazföldi életmódhoz kapcsolódó többféle környezeti ingerre való megfelelő válaszképesség miatt alakultak ki. Továbbá, a magas szinten szervezett többsejtű életformák számára elengedhetetlen az alkotó sejtek közötti kifinomult kommunikáció, és, az állatokhoz hasonló módon, a MAPK jelátvitel növényekben is szerepet kapott a komplex testfelépítés kialakításának szabályozásában. Hasonló expanziót mutattunk ki a MAPK kinázokat kódoló gének komparatív genomikai analízisével is.

A *Naegleria gruberi* egy korán divergálódó eukarióta ágat képviselő protiszta (Fritz-Laylin et al., 2010). Genomjának analízise során egy MAPK kódoló szekvenciát azonosítottunk, ennek foszforilációs motívuma TEY, ami az állati MAPK-ok közül az ERK típusú kinázokban található. Mivel az ERK típus három különböző eukarióta főcsoportban is jelen van (protiszták, opisztokonták, növények) megállapítható, hogy a MAPK jelátvitel már az utolsó eukaritóa közös ősből (Last Eukaryotic Common Ancestor (LECA)) kialakult, és az ősi MAPK egy ERK típusú kináz protein volt, majd a növény- és állatvilágban a különböző MAPK típusok egymástól függetlenül ebből a MAPK ősből alakultak ki.

Hogy a hálózati konnektivitást objektíven felmérjük, minden élesztő, humán és Arabidopsis MAPK és MKK kapcsolatot letöltöttünk az IntAct (Kerrien et al., 2012) és BioGrid (Stark et al., 2011) adatbázisokból. Emellett az EBI (European Bioinformatics Institute) PSICQUIC web szolgáltatását használtuk további kapcsolatok azonosítására más adatbázisokból is. Ez alapján egyértelmű, hogy a virágos növények MAPK hálózata nem csak több elemből áll, de sokkal nagyobb mértékben konnektált, mint az élesztő vagy állati hálózatok.

Mindezek alapján alapvetően eltérő evolúciós fejlődési út rajzolódik ki a növényi és az Opisthokonta eukarióták MAPK jelátviteli mechanizmusai között. A közös eukarióta ősből kialakult ERK-szerű MAPK jelpálya mindkét kládban számos duplikáción ment keresztül, azonban amíg az Opisthokontákban a duplikációkat újabb típusú MAPK formák kialakulása követte (p38, JNK), amelyek alapvetően funkcionálisan szeparált jelpályákat alkotnak, addig növényekben az ERK típusú aktivációs hurokkal rendelkező kinázok száma nőtt meg jelentősen, amelyek a felső MKK-kal különálló jelpályák helyett egy magas konnektivitású jelátviteli hálózatot alakítottak ki. A protein kinázok nagyobb száma és aránya jellemző a virágos növényekre, ami a helyhez kötött életmóddal hozható összefüggésbe (Zulawski et al., 2014). A helyhez kötöttség egyik meghatározó következménye, hogy a növényi organogenezis alapvetően eltér az állati folyamatoktól, mivel főleg posztembrionális és a növény élete végéig folyamatos. Így növényi szervfejlődés rendkívül plasztikus, lehetővé téve a változó környezeti való adaptációt. Ez a növényekre jellemző környezeti ingerek és fejlődési válaszok közötti dinamikus kapcsolat jól indokolhatja a jelpályák szeparációjának megfigyelt hiányát.

További növény-specifikus jelenség a MAP kinázok CD dokkoló motívumainak csoport-specifikus divergenciája. Az A és B típusú kinázok CD motívumai nagymértékben hasonlítanak az élesztőben és állatokban leírt motívumhoz, míg a C csoportban a savas aminosavak fokozatos elvesztése figyelhető meg algáktól a virágos növényekig. A TDY típusú növényi MAP kinázokban (D csoport) azonban egyes savas aminosav pozíciókban bázikus aminosavak találhatók. A CD helyek módosulásai feltételezhetően a szubsztrátkötési specificitások fokozatos szeparálódását jelezhetik. Ennek megfelelően, bizonyos, a virágos növényekre jellemző szubsztitúciók algákban nincsenek jelen, mint például a 7. pozícióban megjelenő E>N töltésvesztés a C csoportban, vagy a 3. pozícióban megjelenő D/E>K töltésváltás a D csoportban. A kanonikus motívum figyelemreméltó maradványai algákban jól illeszkednek a specificitás sodródás gondolatához, algákban feltételezhetően egy ősből

evolúciós stádiumhoz hasonló állapot van jelen, ahol a kisebb proteómban még jóval kevesebb szubsztrát kevesebb MAPK általi felismerését kell biztosítani.

4.8. A MAPK jelátvitel szerepének vizsgálata fotoszintetikus mikroalgában

A mikroalgák óriási ökológiai és növekvő biotechnológiai jelentősége ellenére jelenleg a fiziológiai adaptációs mechanizmusaikra, de különösen az ezeket kialakító molekuláris válaszokat szabályozó jelátviteli folyamatokra vonatkozó ismereteink meglehetősen korlátozottak. Molekuláris alapú kutatásokra legalkalmasabb alga faj egyértelműen a *Chlamydomonas reinhardtii*, ami egy széleskörben használt modellorganizmus. Két gént választottunk funkcionális jellemzésre. A *CrMPK8* az A/B típusú MAPK *Chlamydomonas*-ban, így a legjobban jellemzett *Arabidopsis* MAPK-okhoz (MPK3/4/6) leginkább homológ MAPK. A *CrMKK1* pedig a *Chlamydomonas* B típusú MKK, az *AtMKK3* ortológja.

Az *mpk8* és *mkk1* mutáns vonalakat és a megfelelő vad típusú háttértörzset beszereztük a törzsgyűjteményből. A PCR és szekvenálás alapú genotipizálás igazolta az inszerciók jelenlétét a várt pozíciókban. A génexpresszió elvesztését kvantitatív RT-PCR módszerrel igazoltuk. Meglepő módon mindkét mutáns vonal ellenállóbb a paraquat (PQT) oxidatív ágenssel történő kezeléssel szemben, mint a vad típusú kontroll, ami arra utal, hogy a MAPK jelátvitel az oxidatív stressz válasz negatív regulátora a modell algafajban.

Mivel a PQT kezelés a kultúrák kifehéredését eredményezte, megmértük a PQT stressz hatását a fotoszintézisre. Az Fv/Fm tesztek eredménye szerint a *Chlamydomonas* II. fotokémiai rendszer (PSII) érzékeny a PQT kezelésre, és az Fv/Fm értékek mindkét mutánsban, minden PQT koncentráció mellett magasabbak voltak, mint a vad típusú kontrollban, ami élettani szinten is megerősítette a MAPK mutánsok nagyobb toleranciáját a PQT indukált ROS képződéssel szemben.

Továbbá, ismert ROS metabolikus funkciójú gének expresszióját hasonlítottuk össze vad típusú és mutáns vonalakban. Kvantitatív RT-PCR eredmények azt mutatták, hogy *Chlamydomonas APX1* (Ascorbate peroxidase 1), *SOD1* (Superoxide dismutase), *DHAR1* (Glutathione S-transferase DHAR1) és *GSHR1* (Glutathione reductase) géneket a PQT kezelés negatívan MAPK függő módon indukálja, vagyis ezek alapexpressziója magasabb, indukciójuk pedig a vad típushoz képest erősebb a mutáns vonalakban, ami azt jelenti, hogy a ROS detoxifikációban kulcsfontosságú Foyer-Halliwell-Asada pathway *Chlamydomonas*-ban MAPK szabályozás alatt áll, és molekuláris szinten is megerősíti a MAPK jelátvitel negatív

szabályozó funkcióját. Ezenkívül megállapítottuk, hogy 2 μ M PQT kezelés a vad típusú mintában a riboszómális RNS degradációját eredményezi, míg a mutáns vonalakban nem.

Összegezve, kísérleteink alapján *Chlamydomonas* zöldalgában a MAPK jelátvitel negatív szabályozó szerepet játszik az oxidatív stresszválasz kialakításában. Ez minden más eukarióta szervezetben megismert funkcióval ellentétes, ahol a MAPK jelátvitel az oxidatív stressz válaszában pozitív szabályozó szerepet tölt be (Pitzschke and Hirt, 2006; Kim and Choi, 2010; de la Torre-Ruiz et al., 2010)

5. A tézisekben szereplő hivatkozások

- Adamowski, M. and Friml, J.** (2015). PIN-dependent auxin transport: action, regulation, and evolution. *Plant Cell* **27**: 20–32.
- Andreasson, E. et al.** (2005). The MAP kinase substrate MKS1 is a regulator of plant defense responses. *EMBO J.* **24**: 2579–2589.
- Andreasson, E. and Ellis, B.** (2010). Convergence and specificity in the Arabidopsis MAPK nexus. *Trends Plant Sci.* **15**: 106–113.
- 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.
- Avruch, J.** (2007). MAP kinase pathways: the first twenty years. *Biochim. Biophys. Acta* **1773**: 1150–1160.
- Benjamins, R., Quint, A., Weijers, D., Hooykaas, P., and Offringa, R.** (2001). The PINOID protein kinase regulates organ development in Arabidopsis by enhancing polar auxin transport. *Development* **128**: 4057–4067.
- Bhattacharyya, R.P., Reményi, A., Yeh, B.J., and Lim, W.A.** (2006). Domains, motifs, and scaffolds: the role of modular interactions in the evolution and wiring of cell signaling circuits. *Annu. Rev. Biochem.* **75**: 655–680.
- Blilou, I., Xu, J., Wildwater, M., Willemsen, V., Paponov, I., Friml, J., Heidstra, R., Aida, M., Palme, K., and Scheres, B.** (2005). The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in Arabidopsis roots. *Nature* **433**: 39–44.
- Bowman, J.L., Smyth, D.R., and Meyerowitz, E.M.** (1989). Genes directing flower development in Arabidopsis. *Plant Cell* **1**: 37–52.
- Bowman, J.L., Smyth, D.R., and Meyerowitz, E.M.** (2012). The ABC model of flower development: then and now. *Development* **139**: 4095–4098.
- Challinor, A.J., Watson, J., Lobell, D.B., Howden, S.M., Smith, D.R., and Chhetri, N.** (2014). A meta-analysis of crop yield under climate change and adaptation. *Nat. Clim. Chang.* **4**: 287–291.
- Chen, X., Ding, Y., Yang, Y., Song, C., Wang, B., Yang, S., Guo, Y., and Gong, Z.** (2021). Protein kinases in plant responses to drought, salt, and cold stress. *J. Integr. Plant Biol.* **63**: 53–78.
- Chinchilla, D., Zipfel, C., Robatzek, S., Kemmerling, B., Nürnberger, T., Jones, J.D.G., Felix, G., and Boller, T.** (2007). A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature* **448**: 497–500.
- Christensen, S.K., Dagenais, N., Chory, J., and Weigel, D.** (2000). Regulation of auxin response by the protein kinase PINOID. *Cell* **100**: 469–478.
- Colcombet, J. and Hirt, H.** (2008). Arabidopsis MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes. *Biochem. J.* **413**: 217–226.
- Cui, F., Sun, W., and Kong, X.** (2018). RLCKs Bridge Plant Immune Receptors and MAPK Cascades. *Trends Plant Sci.* **23**: 1039–1041.
- Djamei, A., Pitzschke, A., Nakagami, H., Rajh, I., and Hirt, H.** (2007). Trojan horse strategy in Agrobacterium transformation: abusing MAPK defense signaling. *Science* **318**: 453–456.
- Dobzhansky, T.** (1973). Nothing in Biology Makes Sense except in the Light of Evolution. *Am. Biol. Teach.* **35**:

125–129.

- Dóczi, R. and Bögre, L.** (2018). The Quest for MAP Kinase Substrates: Gaining Momentum. *Trends Plant Sci.* **23**: 918–932.
- Droillard, M.-J., Boudsocq, M., Barbier-Brygoo, H., and Laurière, C.** (2004). Involvement of MPK4 in osmotic stress response pathways in cell suspensions and plantlets of *Arabidopsis thaliana*: activation by hypoosmolarity and negative role in hyperosmolarity tolerance. *FEBS Lett.* **574**: 42–48.
- Felix, G., Duran, J.D., Volko, S., and Boller, T.** (1999). Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J.* **18**: 265–276.
- Foyer, C.H. and Noctor, G.** (2009). Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxid. Redox Signal.* **11**: 861–905.
- Friml, J. et al.** (2004). A PINOID-dependent binary switch in apical-basal PIN polar targeting directs auxin efflux. *Science* **306**: 862–865.
- Fritz-Laylin, L.K. et al.** (2010). The genome of *Naegleria gruberi* illuminates early eukaryotic versatility. *Cell* **140**: 631–642.
- Gómez-Gómez, L. and Boller, T.** (2002). Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Trends Plant Sci.* **7**: 251–256.
- Gómez-Gómez, L. and Boller, T.** (2000). FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Mol. Cell* **5**: 1003–1011.
- Gómez-Gómez, L., Felix, G., and Boller, T.** (1999). A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **18**: 277–284.
- Grant, J.J. and Loake, G.J.** (2000). Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. *Plant Physiol.* **124**: 21–29.
- Hahn, A. and Harter, K.** (2009). Mitogen-activated protein kinase cascades and ethylene: signaling, biosynthesis, or both? *Plant Physiol.* **149**: 1207–1210.
- Hamel, L.-P. et al.** (2006). Ancient signals: comparative genomics of plant MAPK and MAPKK gene families. *Trends Plant Sci.* **11**: 192–198.
- Hoang, M.H.T., Nguyen, X.C., Lee, K., Kwon, Y.S., Pham, H.T.T., Park, H.C., Yun, D.-J., Lim, C.O., and Chung, W.S.** (2012). Phosphorylation by AtMPK6 is required for the biological function of AtMYB41 in *Arabidopsis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **422**: 181–186.
- Huang, F., Zago, M.K., Abas, L., van Marion, A., Galván-Ampudia, C.S., and Offringa, R.** (2010). Phosphorylation of conserved PIN motifs directs *Arabidopsis* PIN1 polarity and auxin transport. *Plant Cell* **22**: 1129–1142.
- Jagodzki, P., Tajdel-Zielinska, M., Ciesla, A., Marczak, M., and Ludwikow, A.** (2018). Mitogen-Activated Protein Kinase Cascades in Plant Hormone Signaling. *Front. Plant Sci.* **9**: 1387.
- Jones, J.D.G. and Dangl, J.L.** (2006). The plant immune system. *Nature* **444**: 323–329.
- Joo, S., Liu, Y., Lueth, A., and Zhang, S.** (2008). MAPK phosphorylation-induced stabilization of ACS6 protein is mediated by the non-catalytic C-terminal domain, which also contains the cis-determinant for rapid degradation by the 26S proteasome pathway. *Plant J.* **54**: 129–140.
- Kerrien, S. et al.** (2012). The IntAct molecular interaction database in 2012. *Nucleic Acids Res.* **40**: D841–6.
- Kim, E.K. and Choi, E.-J.** (2010). Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim. Biophys. Acta* **1802**: 396–405.
- de la Torre-Ruiz, M.A., Mozo-Villarías, A., Pujol, N., and Petkova, M.I.** (2010). How budding yeast sense and transduce the oxidative stress signal and the impact in cell growth and morphogenesis. *Curr. Protein Pept. Sci.* **11**: 669–679.
- Lamb, C. and Dixon, R.A.** (1997). THE OXIDATIVE BURST IN PLANT DISEASE RESISTANCE. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**: 251–275.
- Lampard, G.R., Macalister, C.A., and Bergmann, D.C.** (2008). *Arabidopsis* stomatal initiation is controlled by MAPK-mediated regulation of the bHLH SPEECHLESS. *Science* **322**: 1113–1116.
- Laux, T., Mayer, K.F., Berger, J., and Jürgens, G.** (1996). The WUSCHEL gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*. *Development* **122**: 87–96.
- Li, H., Ding, Y., Shi, Y., Zhang, X., Zhang, S., Gong, Z., and Yang, S.** (2017). MPK3- and MPK6-Mediated ICE1 Phosphorylation Negatively Regulates ICE1 Stability and Freezing Tolerance in *Arabidopsis*. *Dev. Cell* **43**: 630–642.e4.
- Lin, L., Wu, J., Jiang, M., and Wang, Y.** (2021). Plant Mitogen-Activated Protein Kinase Cascades in Environmental Stresses. *Int. J. Mol. Sci.* **22**.
- Liu, Y. and He, C.** (2017). A review of redox signaling and the control of MAP kinase pathway in plants. *Redox Biol.* **11**: 192–204.

- Liu, Y. and Zhang, S.** (2004). Phosphorylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase by MPK6, a stress-responsive mitogen-activated protein kinase, induces ethylene biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell* **16**: 3386–3399.
- López-Juez, E., Dillon, E., Magyar, Z., Khan, S., Hazeldine, S., de Jager, S.M., Murray, J.A.H., Beemster, G.T.S., Bögre, L., and Shanahan, H.** (2008). Distinct light-initiated gene expression and cell cycle programs in the shoot apex and cotyledons of Arabidopsis. *Plant Cell* **20**: 947–968.
- Lu, D., Wu, S., Gao, X., Zhang, Y., Shan, L., and He, P.** (2010). A receptor-like cytoplasmic kinase, BIK1, associates with a flagellin receptor complex to initiate plant innate immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**: 496–501.
- Macnab, R.M.** (2004). Type III flagellar protein export and flagellar assembly. *Biochim. Biophys. Acta* **1694**: 207–217.
- Mao, G., Meng, X., Liu, Y., Zheng, Z., Chen, Z., and Zhang, S.** (2011). Phosphorylation of a WRKY transcription factor by two pathogen-responsive MAPKs drives phytoalexin biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell* **23**: 1639–1653.
- Meng, X. and Zhang, S.** (2013). MAPK cascades in plant disease resistance signaling. *Annu. Rev. Phytopathol.* **51**: 245–266.
- Michniewicz, M. et al.** (2007). Antagonistic regulation of PIN phosphorylation by PP2A and PINOID directs auxin flux. *Cell* **130**: 1044–1056.
- MAP Kinase Group (2002)** Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends Plant Sci.* **7**: 301–308.
- Mohammed, B., Biloei, S.F., Dóczy, R., Grove, E., Railo, S., Palme, K., Ditengou, F.A., Bögre, L., and López-Juez, E.** (2018). Converging light, energy and hormonal signaling control meristem activity, leaf initiation, and growth. *Plant Physiol.* **176**: 1365–1381.
- Ngou, B.P.M., Jones, J.D.G., and Ding, P.** (2021). Plant immune networks. *Trends Plant Sci.*
- Nicaise, V., Roux, M., and Zipfel, C.** (2009). Recent advances in PAMP-triggered immunity against bacteria: pattern recognition receptors watch over and raise the alarm. *Plant Physiol.* **150**: 1638–1647.
- O’Neill, R.A. et al.** (2006). Isoelectric focusing technology quantifies protein signaling in 25 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**: 16153–16158.
- Pennis, E.** (2011). Plant biology. Green genomes. *Science* **332**: 1372–1375.
- Pérez-Salamó, I. et al.** (2014). The heat shock factor A4A confers salt tolerance and is regulated by oxidative stress and the mitogen-activated protein kinases MPK3 and MPK6. *Plant Physiol.* **165**: 319–334.
- Pfeiffer, A. et al.** (2016). Integration of light and metabolic signals for stem cell activation at the shoot apical meristem. *Elife* **5**.
- Pitzschke, A.** (2015). Modes of MAPK substrate recognition and control. *Trends Plant Sci.* **20**: 49–55.
- Pitzschke, A. and Hirt, H.** (2009). Disentangling the complexity of mitogen-activated protein kinases and reactive oxygen species signaling. *Plant Physiol.* **149**: 606–615.
- Pitzschke, A. and Hirt, H.** (2006). Mitogen-activated protein kinases and reactive oxygen species signaling in plants. *Plant Physiol.* **141**: 351–356.
- Rodriguez, M.C.S., Petersen, M., and Mundy, J.** (2010). Mitogen-activated protein kinase signaling in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **61**: 621–649.
- Sethi, V., Raghuram, B., Sinha, A.K., and Chattopadhyay, S.** (2014). A mitogen-activated protein kinase cascade module, MKK3-MPK6 and MYC2, is involved in blue light-mediated seedling development in Arabidopsis. *Plant Cell* **26**: 3343–3357.
- Silva, M.S., Arraes, F.B.M., Campos, M. de A., Grossi-de-Sa, M., Fernandez, D., Cândido, E. de S., Cardoso, M.H., Franco, O.L., and Grossi-de-Sa, M.F.** (2018). Review: Potential biotechnological assets related to plant immunity modulation applicable in engineering disease-resistant crops. *Plant Sci.* **270**: 72–84.
- Stark, C. et al.** (2011). The BioGRID Interaction Database: 2011 update. *Nucleic Acids Res.* **39**: D698–704.
- Sun, W., Cao, Y., Jansen Labby, K., Bittel, P., Boller, T., and Bent, A.F.** (2012). Probing the Arabidopsis flagellin receptor: FLS2-FLS2 association and the contributions of specific domains to signaling function. *Plant Cell* **24**: 1096–1113.
- Suzuki, N., Koussevitzky, S., Mittler, R., and Miller, G.** (2012). ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. *Plant. Cell Environ.* **35**: 259–270.
- Torres, M.A. and Dangl, J.L.** (2005). Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**: 397–403.
- Waszczak, C., Carmody, M., and Kangasjärvi, J.** (2018). Reactive Oxygen Species in Plant Signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* **69**: 209–236.
- Wisniewska, J., Xu, J., Seifertová, D., Brewer, P.B., Ruzicka, K., Blilou, I., Rouquié, D., Benková, E., Scheres, B.,**

- and Friml, J.** (2006). Polar PIN localization directs auxin flow in plants. *Science* **312**: 883.
- Xin, X., Chen, W., Wang, B., Zhu, F., Li, Y., Yang, H., Li, J., and Ren, D.** (2018). Arabidopsis MKK10-MPK6 mediates red-light-regulated opening of seedling cotyledons through phosphorylation of PIF3. *J. Exp. Bot.* **69**: 423–439.
- Xu, J. and Zhang, S.** (2015). Mitogen-activated protein kinase cascades in signaling plant growth and development. *Trends Plant Sci.* **20**: 56–64.
- Xu, J. and Zhang, S.** (2014). Regulation of ethylene biosynthesis and signaling by protein kinases and phosphatases. *Mol. Plant.*
- Yoo, S.-D., Cho, Y.-H., Tena, G., Xiong, Y., and Sheen, J.** (2008). Dual control of nuclear EIN3 by bifurcate MAPK cascades in C2H4 signalling. *Nature* **451**: 789–795.
- Yoshida, S., Mandel, T., and Kuhlemeier, C.** (2011). Stem cell activation by light guides plant organogenesis. *Genes Dev.* **25**: 1439–1450.
- Zhang, M., Su, J., Zhang, Y., Xu, J., and Zhang, S.** (2018). Conveying endogenous and exogenous signals: MAPK cascades in plant growth and defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* **45**: 1–10.
- Zhou, Y., Liu, X., Engstrom, E.M., Nimchuk, Z.L., Pruneda-Paz, J.L., Tarr, P.T., Yan, A., Kay, S.A., and Meyerowitz, E.M.** (2015). Control of plant stem cell function by conserved interacting transcriptional regulators. *Nature* **517**: 377–380.
- Zipfel, C.** (2009). Early molecular events in PAMP-triggered immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* **12**: 414–420.
- Zulawski, M., Schulze, G., Braginets, R., Hartmann, S., and Schulze, W.X.** (2014). The Arabidopsis Kinome: phylogeny and evolutionary insights into functional diversification. *BMC Genomics* **15**: 548.

6. A tézisek alapjául szolgáló, referált folyóiratban megjelent publikációk

(csillaggal jelölve a levelező szerzői szerep)

Dóczy R.*, Hatzimasoura E., Mohammed B., Biloei S.F., Ditengou F.A., Lopez-Juez E., Palme K. and Bogre L. (2019) The MKK7-MPK6 MAP Kinase Module is a Regulator of Meristem Quiescence or Active Growth in Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science* 10:202.

Kalapos B., Hlavová M., Nádai T.V., Galiba G., Bisova K. and **Dóczy R.*** (2019) Early Evolution of the Mitogen-Activated Protein Kinase Family in the Plant Kingdom. *Scientific Reports* 9:4094.

Mohammed B., Biloei S.F., **Dóczy R.**, Grove E., Railo S., Palme K., Ditengou F.A., Bögre L. and López-Juez E. (2018) Converging energy and hormonal signalling control meristem activity, leaf initiation and growth. *Plant Physiology* 176:1365-1381.

Dóczy R.* and Bögre L. (2018) The Quest for MAP Kinase Substrates: Gaining Momentum. *Trends in Plant Science* 23:918-932. Review

Dory M., Hatzimasoura E., Kállai B.M., Nagy S.K., Jäger K., Darula Z., Nádai T.V., Mészáros T., Lopez Juez E., Barnabás B., Palme K., Bögre L., Ditengou F.A., **Dóczy R.*** (2018) Coevolving MAPK and PID phosphosites suggest an ancient environmental control of PIN targeting. *FEBS Letters* 592:89-102.

Ditengou F.A., Gomes D., Nziengui H., Kochersperger P., Lasok H., Medeiros V., Paponov I.A., Nagy S.K., Nádai T.V., Mészáros T., Barnabás B., Rapp K., Qi L., Li X., Becker C., Li C., **Dóczy R.** and Palme K. (2018) Characterization of auxin transporter PIN6 plasma membrane targeting reveals a function for PIN6 in plant bolting. *New Phytologist* 217:1610-1624.

Dory M., Doleschall Z., Nagy S.K., Ambrus H., Mészáros T., Barnabás B., **Dóczy R.*** (2016) Kinase-Associated Phosphoisoform Assay: A Novel Candidate-Based Method to Detect Specific Kinase-Substrate Phosphorylation Interactions In Vivo. *BMC Plant Biol* 16:204

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

Dóczy, R.* (2011) Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Signalling In Plant Environmental Stress Responses. *Acta Agronomica Hungarica* 59: 285–290. Review

Dóczy R., Hatzimasoura E., Bögre L. (2011): Mitogen-Activated Protein Kinase Activity and Reporter Gene Assays in Plants. *in*: N. Dissmeyer and A. Schnittger (eds.) Plant Kinases: Methods and Protocols, *Methods in Molecular Biology*, vol. 779: 79-92.

Menges M., **Dóczy R.**, Ökrész L., Morandini P., Mizzi L., Soloviev M., Murray J.A.H., Bögre L. (2008): Comprehensive gene expression atlas for the Arabidopsis MAP kinase signalling pathways. *New Phytologist* 179, 643-662.

Schweighofer A., Kazanaviciute V., Scheikl E., Teige M., **Dóczy R.**, Hirt H., Schwanninger M., Kant M., Schuurink R., Mauch F., Buchala A., Cardinale F., Meskiene I. (2007): The PP2C-type phosphatase AP2C1, which negatively regulates MPK4 and MPK6, modulates innate immunity, jasmonic acid, and ethylene levels in Arabidopsis. *The Plant Cell* 19, 2213-2224.

Dóczy R., Brader G., Pettkó-Szandtner A., Rajh I., Djamei A., Pitzschke A., Teige M., Hirt H. (2007): The Arabidopsis mitogen-activated protein kinase kinase MKK3 is upstream of group C mitogen-activated protein kinases and participates in pathogen signaling. *The Plant Cell* 19, 3266-3279.

Teige M., Scheikl E., Eulgem T., **Dóczy R.**, Ichimura K., Shinozaki K., Dangl J.L., Hirt H. (2004): The MKK2 Pathway Mediates Cold and Salt Stress Signaling in Arabidopsis. *Molecular Cell* 15, 141-152.

7. A tézisekhez nem kapcsolódó, referált folyóiratban megjelent publikációk

(# Egyenlő hozzájárulás)

Remenár É. #, **Dóczy R.** #, Dirner A., Sipos A., Perjési A., Tihanyi D., Vodicska B., Lakatos D., Horváth K., Kajáry K., Schwáb R., Déri J., Lengyel C.G., Várkondi E., Vályi-Nagy I., Peták I. # (2022) Lasting Complete Clinical Response of a Recurring Cutaneous Squamous Cell Carcinoma With MEK Mutation and PIK3CA Amplification Achieved by Dual Trametinib and Metformin Therapy. *JCO Precision Oncology*. 6:e2100344.

Szkukalek J. #, **Dóczy R.** #, Dirner A., Boldizsár Á., Varga Á., Déri J., Lakatos D., Tihanyi D., Vodicska B., Schwáb R., Pajkos G., Várkondi E., Vályi-Nagy I., Valtinyi D., Nagy Z., Peták I. (2021) Personalized First-Line Treatment of Metastatic Pancreatic Neuroendocrine Carcinoma Facilitated by Liquid Biopsy and Computational Decision Support. *Diagnostics*.; 11(10):1850.

Peták I., Kamal M., Dirner A., Bieche I., **Dóczy R.**, Mariani O., Filotas P., Salomon A., Vodicska B., Servois V., Varkondi E., Gentien D., Tihanyi D., Tresca P., Lakatos D., Servant N., Deri J., du Rusquec P., Hegedus C, Roufai D.B., Schwab R., Dupain C., Valyi-Nagy I.T., Le Tourneau C. (2021) A computational method for prioritizing targeted therapies in precision oncology: performance analysis in the SHIVA01 trial. *npj Precision Oncology* 5:59

de Guillebon E., Jimenez M., Mazarella L., Betsou F., Stadler P., Peták I., Jeannot E., Chanas L., Servant N., Marret G., Achutti Duso B., Legrand F., Kornerup K., Stephan B., Balogh G., **Dóczy R.**, Filotás P., Curigliano G., Bieche I., Guérin J., Dirner A., Neuzillet C., Girard N., Borcoman E., Larbi Cherif L., Tresca P., Bello Roufai D., Dupain C., Scholl S., André F., Fernandez X., Filleron T., Kamal M., Le Tourneau C. (2021) Combining immunotherapy with an epidrug in squamous cell carcinomas of different locations: Rationale and design of the PEVO basket trial. *ESMO Open*. 6:100106.

Urbán L[#], **Dóczy R[#]**, Vodicska B, Tihanyi D, Horváth M, Kormos D, Takács I, Pápai-Székely Z, Póka-Farkas Z, Várkondi E, Schwáb R, Hegedüs C*, Vályi-Nagy I*, Peták I*. (2021) Major Clinical Response to Afatinib Monotherapy in Lung Adenocarcinoma Harboring EGFR Exon 20 Insertion Mutation. *Clin Lung Cancer*. 22:e112-e115.

Urbán L., **Dóczy R.**, Vodicska B., Kormos D., Tóth L., Takács I., Várkondi E., Tihanyi D., Lakatos D., Dirner A., Vályi-Nagy I., Peták I. (2020) Efficacy of Incremental Next-Generation ALK Inhibitor Treatment in Oncogene-Addicted, ALK-Positive, TP53-Mutant NSCLC. *Journal of Personalized Medicine*. 2020 10:E107.

Kumulatív impaktfaktor: 133,4

Idézetek száma:

- [MTMT](#): 1156
- [Publons](#) (Web of Science): 1301
- [Scopus](#): 1423
- [Google Scholar](#): 1975

8. Új tudományos eredmények

1. Azonosítottunk az Arabidopsis MKK3-MPK7 jelpályát, amely két, korábban ismeretlen filogenetikai MAPK, illetve MKK csoport közötti kapcsolatot jelent. Igazoltuk, hogy az MKK3 az MPK7-tel fizikailag kölcsönhat, azt foszforilálja és oxidatív stressz függően aktiválja.
2. Kimutattuk, hogy az *MKK3* expressziója patogén indukálható, igazoltuk, hogy az MKK3 pozitív szabályozó szerepet játszik a patogén válasz indukálásban.
3. Kimutattuk az *MKK7* és *MKK9* gének szövetspecifikus transzkripciós mintázatát, illetve annak hormonális szabályozását. Genetikai megközelítéseket használva feltártuk, hogy az MKK7-MPK6 modul a merisztémaműködés negatív szabályozója. A környezeti stresszhatások által aktivált jelátvitel kapcsolata a fejlődésszabályozással a növényfejlődés környezeti plaszticitásának egyik fontos molekuláris mechanizmusa lehet.
4. Kialakítottunk egy *in vivo* növényi protein foszforilációs kölcsönhatások detektálására alkalmas módszert. A módszer az aktivált kináz jelenlététől függően eltérő arányú szubsztrát foszfoizofomák detektálásán alapul. E célra kombinálja a protoplaszt transzfekció rugalmasságát és gyorsaságát a cIEF immuneszt érzékenységgel. A módszer működését egy ismert MAPK szubsztrát, az ACS6 foszforilációjának tesztelésével igazoltuk.
5. A módszer alkalmazásával először igazoltuk a WUS és az AP2, két régóta ismert és genetikailag igen részletesen jellemzett merisztémaszabályozó mesterreglátor transzkripciós faktor MAPK általi foszforilációját. Az AP2 poszttranszlációs szabályozása valószínűsíthetően nagyon komplex, mivel ennél a fehérjénél számos eltérő izoformát detektáltunk.
6. Leírtuk a hosszú hidrofíl hurokkal rendelkező PIN fehérjék PID és MAPK foszforilációs helyeinek koevolúcióját szárazföldi növényekben. Igazoltuk a PIN1 és a PIN6 transzporter fehérjék MAPK általi foszforilációját. Kimutattuk, hogy a MAPK foszforiláció szerepet játszik a PIN intracelluláris lokalizáció kialakításában.
7. Bioinformatikai módszerekkel alacsonyabb rendű növények proteómjaiban MAPK kódoló géneket azonosítottunk. Komparatív genomikai vizsgálatokkal feltártuk a növényi MAPK géncsalád evolúciójának meghatározó lépéseit, leírtuk a növényi és az Opisthokonta MAPK jelátviteli rendszerek evolúciós történetének főbb különbségeit. Leírtuk a növényi MAPK szekvenciák dokkoló motívumainak evolúciójára jellemző folyamatokat.

8. Reverz genetikai megközelítéssel funkcionálisan jellemeztük a *CrMPK8* és *CrMKK1* *Chlamydomonas* gének szerepét az oxidatív stresszválaszban. Különböző, molekuláris és élettani módszerekkel megállapítottuk, hogy mindkét komponens negatív szabályozó szerepet játszik az oxidatív stresszválasz kialakításában, ami alapvetően eltérő a MAPK jelátvitelnek más eukarióta kládokban az oxidatív stresszválaszban megismert pozitív szabályozó szerepétől.

Köszönetnyilvánítás

Posztdoktori kutatásaimat Heribert Hirt és Bögre László professzorok csoportjaiban végeztem, mindkettőjüknek különös köszönettel tartozom azért a tudományos környezetért amit számomra biztosítottak, és a szakmai fejlődésért amit tőlük tanulva érhettem el. Szintén köszönet illeti a Bögre csoporttal szorosán együttműködő Enrique Lopez-Juezt. Mindhárom kutatócsoport valamennyi tagjának hálás vagyok, különösen azoknak, akikkel a dolgozatban bemutatott programokon együtt dolgoztunk: a Hirt csoportban elsősorban Markus Teige, Iva Rajh, Armin Djamei és Andrea Pitzschke, a Bögre és Lopez-Juez csoportokban pedig Magyar Zoltán, Elizabeth Hatzimasoura és Zaki Ahmad.

Valamennyi együttműködő partnerünk hozzájárulását köszönöm, külön fontosnak tartom Alberto Paccanaro, Franck Anicet Ditengou, Klaus Palme, Mészáros Tamás, Doleschall Zoltán, Jäger Katalin, Kalapos Balázs és Darkó Éva nevét kiemelni.

Hazatérésem után önálló kutatásaim elindításában támogatott az akkori MTA MGI intézetigazgatójaként Bedő Zoltán és osztályvezetőként Barnabás Beáta akadémikusok, illetve a későbbiekben Galiba Gábor osztályvezető, akik az általam kutatott témát befogadták. Ebben az időszakban témavezetőként két doktorandusz hallgatóval, Döry Magdalénával és Náday Tímeával dolgoztam együtt, nekik rendkívül hálás vagyok a közös munkáért és eredményeinkért.

Továbbá, természetesen köszönet illeti valamennyi itt fel nem sorolt szerzőtársamat is.

Külön hálával gondolok Bánfalvi Zsófiára, aki a molekuláris biológusi pályán elindított.

Hálával és köszönettel tartozom nagybátyámnak, Dudits Dénesnek, aki csodálatos példát mutatott a tudomány iránti elhivatottságból és az újdonságra nyitott kíváncsiságból. Neki köszönhetően már egészen fiatalon a kutatói pálya és a molekuláris biológia felé fordult az érdeklődésem, szeretetével és bizalmával végig mellettem állt. És végül, de egyáltalán nem utolsósorban, szeretném megköszönni szüleim és családom támogatását.