

## Válasz Dr. Havelda Zoltán, az MTA doktora bírálatára

Először is nagyon köszönöm Dr. Havelda Zoltánnak dolgozatom értékelésére fordított idejét és fáradságát, gondos bírálatát, az elismerő véleményét és a gondolatébresztő kérdéseket is.

A bírálatban megfogalmazott kérdéseire az alábbiakban válaszolok.

**A kísérletekben elsősorban a konstitutívan aktivált MKK3 formával lehetett az aktivitást határozottan megmutatni. Mennyire tükrözi a konstitutívan aktivált forma használata a természetes jelenséget, számíthatunk-e a használata során esetleges műtermék reakciók megjelenésére?**

A túltermeléssel és a konstitutívan aktivált formákkal kapcsolatban is felmerülhet a műtermék reakciók megjelenése, hiszen pl. egy sztöchiometriailag jelentős többletben megjelenő fehérje hajlamos lehet aspecifikus komplexekben is megjelenni, azok működését módosítani, a konstitutívan aktivált formák pedig pl. kikerülnek a negatív visszacsatolási folyamatok szabályozása alól. Éppen ezért ajánlatos a kísérleti eszköztár különböző elemeit használva, eltérő módszerekkel függetlenül alátámasztani egy adott biológiai, funkcionális következtetést. Az MKK3-MPK7 kölcsönhatást és aktivációt különböző kontrollok mellett négy, eltérő alapelvű módszerrel mutattuk ki (Y2H, immunokomplex kináz teszt, *in vitro* foszforiláció, *in planta* ko-immunprecipitáció). Habár az MPK7 aktivációt alapvetően igazoló két módszerben (immunokomplex kináz teszt, *in vitro* foszforiláció) valóban konstitutívan aktív MKK3-at használtunk, az immunokomplex kináz tesztben a konstitutívan aktív MKK3-hoz hasonló eredményt értünk el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelt vad típusú MKK3 ko-expresszióval is. Ebben a kísérleti rendszerben a konstitutívan aktív MKK-k jellemzően szelektíven aktiválnak MAP kinázokat, az így kapott eredmények alapvetően összhangban állnak más módszerekkel elért eredményekkel, ezért a módszer széles körben elterjedt az MKK-MAPK nexus vizsgálatára (Methods Mol Biol. 2011;779:79-92). Az MKK3 patogén rezisztenciában betöltött funkcióját is többféle kísérleti rendszerben elért eredmények támasztják alá: patogén-indukált *MKK3* promóter aktivitás, *PR* gén expresszió, bakteriális fertőzési kísérletek, *PR1* promóter aktiválás. A fertőzési kísérletekben a vad típusú MKK3 túltermeltetése nem eredményezett fenotípus változást, míg az aktív MKK3 forma és az *mkk3* mutáns növények ellentétes fenotípust mutattak ebben a rendszerben. Összességében tehát nagy valószínűséggel kizárható, hogy az MKK3-MPK7 jelpálya patogén jelátvitelben betöltött szerepe kísérleti műtermék lenne, viszont mindazonáltal nem zárható ki, hogy más folyamatokban ugyanezen módszerek nem eredményeznek műtermékeket.

Természetesen, biológiai kérdések vizsgálatára mindig jellemző, hogy minden egyes módszernek egyaránt vannak bizonyos előnyei és hátrányai is. Ezeket figyelembe kell venni a kísérlettervezéskor, az előzetes tudás, a hipotézisek és a független evidenciák fényében. A túltermeléssel és a konstitutívan aktivált formákkal ellentétes koncepció alapuló inszerciós (knock-out) mutánsok is eredményezhetnek műterméket, hiszen egy adott fehérje eltüntetése a celluláris közegből annak interakciós partnereinek „felszabadulásával” jár, ami aspecifikus interakciók megjelenését eredményezheti.

**Az eredmények alapján a MKK3 aktiváció alapvetően ROS alapú, ez arra utal, hogy számos különböző patogén fertőzésére bekapcsolhat ez az útvonal. Létezik adat arra, hogy ez az útvonal mennyire széleskörűen kapcsol be más patogének fertőzése esetén?**

Az MKK3-MPK7 modul felfedezését bemutató közleményünk óta megjelent publikációk egyértelműen igazolják, hogy az MKK3 funkcionalitása a többi, jól jellemzett MAPK komponenshez hasonlóan komplex. Egyrészt kiderült, hogy a jelpályának szélesebb körű szerepe van a stressz jelátvitelben, ABA (Plant J. 2015 82(2):232-44) és sebzés hatására is aktiválódik (Plant Cell. 2020;32(6):1988-2003), a sebzés jelátvitelben pedig egy D csoport MAP kinázzal (MPK8) is együttműködik (Mol Cell. 2011;41(6):649-60). A jelpálya felső tagjaiként azonosították a MAP3K17-et és MAP3K18-at (Plant J. 2015;82(2):232-44). Mindemellett az MKK3 fejlődésszabályozó szerepére vonatkozóan is születtek eredmények. Az MKK3-MPK6 modul szerepet játszik a jázminsav jelátvitelben, ami a fejlődési és a védekezési folyamatokban egyaránt fontos növényi hormon (Plant Cell. 2007;19(3):805-18). Továbbá igazolták az MKK3-MPK6-MYC2 funkcióját a kék fény indukált fejlődési válaszban is (Plant Cell. 2014;26(8):3343-57).

Mindazonáltal, más patogénekkal kapcsolatos publikáció legjobb tudomásom szerint nem jelent még meg. Saját, nem közölt eredményeink szerint, az *Erwinia carotovora* SCC1 fertőzésre az *mkk3-1* mutáns érzékenyebb, viszont a funkciónyerő MKK3 túltermelő növények nem mutattak szignifikánsan magasabb rezisztenciát.

### **A MAPK rendszer szerepet játszhat vírus fertőzések elleni védekezésben is?**

Az Arabidopsis modellnövényé válását követően a molekuláris növénykörtán legszéleskörűbben tanulmányozott kísérleti rendszerévé az Arabidopsis – *Pseudomonas* kapcsolat vált. Ezt tükrözi az ebben a rendszerben született igen nagyszámú közlemény, beleértve számos MAP kináz kutatási eredményt is. Ehhez képest a MAP kinázok vírus fertőzés elleni védekezésben betöltött szerepére vonatkozó tanulmányok sporadikusnak tekinthetők, legtöbbjük nem is az Arabidopsis modellel készült.

Érdekes módon, az elsőként azonosított és jellemzett növényi MAP kinázokhoz sorolható dohány SIPK és WIPK, N gén által közvetített aktivációját, dohánymozaikvírus (tobacco mosaic virus (TMV)) fertőzés hatására, már a kilencvenes években leírták (Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95(13):7433-8). Később a jelpálya működését részletesen feltárták, miszerint az NtMEK2-SIPK/WIPK modul a HSP90 alatt, a mitokondrium felett szabályozza a hiperszenzitív választ (Plant Cell Physiol. 2007;48(3):498-510). *Nicotiana benthamiana* növényben a programozott sejtthálát szabályozó MAP3K kinázokat is azonosították (BMC Plant Biol. 2012;12:103).

A gyapot GhMPK7 *Nicotiana benthamiana* növényben kifejeztetve jelentős rezisztenciát eredményezett burgonya Y vírussal szemben (potato virus Y (PVY)) (Plant Mol Biol. 2010;74(1-2):1-17). Burgonyában a burgonya Y vírus fertőzésben a burgonya MKK6 kináza játszik szerepet (PLoS One. 2014;9(8):e104553). A *Nicotiana benthamiana* MEK1/MKK1-SIPK/WIPK modul tagjainak géncsendesítése a burgonya vírus X és burgonya vírus Y fertőzés hatására kialakuló hiperszenzitív válasz mérséklődését eredményezte (Virology. 2017;509:178-184).

Paradicsomban az SIMAPK3 a szalicilsav és jázminsav jelátvitelen keresztül hozzájárul a tomató yellow leaf curl virus (TYLCV) elleni tolerancia kialakításához (PLoS One. 2017;12(2):e0172466). Hasonló szerepet játszik *Vigna mungo* VmMAPK1 Mungbean Yellow Mosaic India Virus (MYMIV) fertőzés során (Plant Sci. 2017;262:127-140).

Újabb eredmények szerint, a gazda – patogén evolúciós verseny eredményeként, a vírusgenomok a MAP kináz jelátvitel elnyomására képesek proteinek is kódolnak (New Phytol. 2021;231(2):747-762, PLoS Pathog. 2019;15(4):e1007728). A fentiekkel együtt ezek az eredmények igazolják, hogy a MAP kináz jelátvitel szerepet játszik a vírusfertőzés elleni védekezésben a növényvilágban. Az Arabidopsisban rendelkezésre álló inszerciós knock-out és dupla knock-out (Plant J. 2016;88(5):867-878.) MAPK eszköztár alkalmas kísérleti rendszernek tűnik az Arabidopsisban megismert MAPK jelátviteli hálózat vírusfertőzésben betöltött szerepének vizsgálatára is.

### **Az MPK6 fehérje túltermeltetésére van adat? Vélhetően ez is merisztéma aktiváció gátlását idézi elő?**

Legjobb tudomásom szerint nem közöltek eredményeket ilyen transzgenikus növényanyaggal. Az MPK6 közeli paralógja, az MPK3 funkciónyerő mutáns változatának kifejeztetése törpülést eredményez, habár a szerzők szerint ez alapvetően a patogén reakciók de-repressziójának következménye, a merisztémát nem vizsgálták (Plant Physiol. 2017;174(2):1238-1249).

A kérdéssel kapcsolatban fontosnak tartom kihangsúlyozni, hogy a de-etioláció során több MAPK jelátviteli génre, így az *MPK6*-ra is jellemző magas expressziós szint a sötét szakaszban, majd a fényre kerülést követő gyors represszió (Plant Cell. 2008;20(4):947-68).

### **A fény hiányon kívül más stressz események, mint pl. hő vagy hideg stressz szintén közvetíthető a merisztéma felé a MKK7-MPK6 modulon keresztül?**

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 (fotomorfogenezis) egy praktikus szinkronizált kísérleti rendszert is nyújt a hajtáscsúcs merisztéma aktivitásának vizsgálatára (Plant Cell. 2008;20(4):947-68, Genes Dev. 2011;25(13):1439-50, Elife. 2016;5:e17023, Plant Physiol. 2018;176(2):1365-1381).

A sötét és a normál megvilágítás állapota közötti váltás időzítése más stresszhatásokhoz képest jobban kontrollálható, tehát praktikus szempontból ez egy kedvezőbb kísérleti rendszer. Mindazonáltal, mivel az MPK6 szerepét számos más stresszhatás jelátvitelében igazolták, természetesen nagy mértékben valószínűsíthető, hogy a merisztéma működésre is hasonló hatással van más stresszhatások következtében is.

### **Mennyire stressz specifikusok a különböző MKK-MPK modulok?**

A jól jellemzett MAP kináz komponensek egyértelműen multifunkcionálisnak tekinthetők, a különböző (biotikus és abiotikus) stresszhatások jelátvitelével mellett fejlődési folyamatok szabályozásában is részt vesznek (Trends Plant Sci. 2016;21(8):677-685, Front Plant Sci. 2018;9:1387, Front Plant Sci. 2018;9:1674, Curr Opin Plant Biol. 2018;45:1-10, Annu. Rev. Plant Biol. 2018;69:237-265, Int J Mol Sci. 2021;22(4):1543, J Integr Plant Biol. 2021;63(1):53-78). Mindazonáltal a komponensek multifunkcionlitása ellenére vannak példák az egyes modulok specifitására. Egyfajta specifitásra példa, az MKK4/5-MPK3/6 modul flagellin függő, míg az MKK3-MPK7 modul flagellintól független aktivációja a bakteriális patogén felismerés és védekezés folyamatában. Modularitási specifitásra jó példaként említhető, hogy az MKK2, illetve az MPK4 és MPK6 kinázok mindegyike többféle stresszhatás jelátvitelében részt vesz, azonban mindkét érintett MAPK az MKK2-vel alkot egy, a fagy stressz által aktivált modult, míg az MPK6 alapvetően az MKK4/5 MKK-kon keresztül aktiválódik biotikus stresszhatásokra, az MKK2-MPK4 modul pedig negatívan szabályozza az abiotikus stresszválaszt. Feltehetően ezek a modulspecifitások ténylegesen hozzájárulnak a jelátviteli specifitás biztosításához a hálózaton belül. Ugyanakkor az is elképzelhető, hogy bizonyos mértékig pusztán a funkcionális kapcsolatokra vonatkozó ismereteink hiányát jelzik.

### **Fig 22 aktiváció hasonlóan hatékonysággal hat minden vizsgált MAPK esetén? Lehetséges konstitutívan aktív MAPK változatokat létrehozni?**

A cIEF-immunoesszé kísérletekben vizsgált MAP kinázok aktiválására flg22 peptid kezelést alkalmaztunk. Az MPK3/MPK6 közeli paralógok, falgellin-indukált aktiválásuk széles körben ismert, jól jellemzett jelenség (Nature. 2002;415(6875):977-83). A B és C csoport tagjait reprezentáló kinázokat szintén leírt falgellin-indukált aktiválásuk alapján választottuk ki. MPK11: Mol Plant Microbe Interact. 2012;25(4):471-80, Plant Signal Behav. 2014;9(11):e976155; MPK1: Plant Signal Behav. 2014;9(11):e976155.

Mivel a MAPK kaszkádban a komponensek a felső kinázok általi foszforiláció következményeként aktiválódnak, foszfomimetikus mutációkkal elvileg létrehozhatók konstitutívan aktív változatok. Az MKK-k konzervált foszforilációs helyében található két szerin vagy treonin aminosavak aszparaginsavra vagy glutaminsavra cseréjével létrehozott konstitutívan aktív MKK-k a kísérleti eszköztár régóta bevált, széles körben alkalmazott részei. Ezzel szemben a MAP kinázok TxY aktivációs motívumban szereplő treonin és tirozin aminosavak esetében, amelyeket a felső MKK-k foszforilálnak, a foszfomimetikus megoldás nem alkalmazható. Ennek oka, hogy a tirozin a szerin/treonin aminosavakhoz képest jóval nagyobb méretű oldallánccal rendelkezik, és a genetikai kód által kódolt aminosavak között nincsen hasonló méretű savas aminosav.

Ezt a limitációt állati rendszerben korábban ERK2-MEK1 fúziós konstrukció alkalmazásával hidalták át sikeresen (J Biol Chem. 1997;272(17):11426-33, Curr Biol. 1998;8(21):1141-50). Ugyanakkor több olyan pontmutációt is leírtak amelyek az ERK és ERK ortológ MAPK kinázok funkcionyerését eredményezték élesztőben (J Biol Chem. 2008;283(50):34500-10), Drosophilában (Cell. 1994;76(5):875-88), illetve humánban (Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103(48):18101-6, J Biol Chem. 2008;283(50):34500-10). Az első funkcionyerő növényi MAP kinázokat 2012-ben közölték (Plant Cell. 2012;24(10):4281-93). E célból egy random mutagenézissel előállított MPK6 ORF könyvtárat teszteltek, élesztő *pbs2Δhog1Δ* háttérben és így izoláltak két olyan mutáns változatot (MPK6 p.Y144C és MPK6 p.D218G/p.E222A) amelyek MKK független aktivitást mutattak. Az ezen mutációknak megfelelő mutációk további Arabidopsis MAP kinázoknál is funkcionyerést eredményeztek, illetve igazolták ezek *in planta* funkcionalitását is. Pl. az MPK4 p.D198G/p.E202A kettős mutáns képes komplementálni az *mpk4* mutáns fejlődési rendellenességeit (Plant Cell. 2012;24(10):4281-93), míg az MPK3 p.D193G/p.E197A konstitutív patogén védekezési válaszokat indukál (Plant Physiol. 2017;174(2):1238-1249).

### **Létezi-e a fejlődési programban szerepet játszó transzkripció faktorok (WUS, AP) MAPK általi szabályozására bizonyíték in planta?**

Legjobb tudomásom szerint ilyen funkcionális eredményeket még nem közöltek. Ilyen irányú kutatások céljából elkészítettük a *wus* mutáns komplementációra alkalmas *ProWUS:GFP:WUS* transzformációs konstrukciókat vad típusú, nem foszforilálható és foszfomimetikus változatokban is, azonban erőforrás hiányában ezt a kutatási irányt nem tudtuk folytatni. Protoplaszt rendszerben megállapítottuk, hogy ezek a mutációk a WUS fehérje alapvetően nukleáris lokalizációját nem befolyásolják.

### **A két választott mutáns nagyon hasonlóan viselkedett a ROS stressz hatására. Lehetséges, hogy azonos jelátviteli modulban levő fehérjékről van szó, vagy csak véletlen a válaszok nagyfokú hasonlósága?**

Véleményem szerint a két mutáció szinte azonos következményei valamennyi általunk vizsgált kísérleti rendszerben, a regulációs kapcsolat közvetett bizonyítékeként tekinthetők. Másrészt a két kináz virágos növényekben jelen lévő ortológjairól kimutatták, hogy egy jelátviteli modult alkotnak (Plant Cell.

2007;19(3):805-18). Továbbá, a fotoszintetikus mikroalgák MKK készlete nagyon szűk, egy vagy két kinázra szorítkozik, a *Chlamydomonas* genomban eredetileg két MKK-t kódoló gént azonosítottunk (Trends Plant Sci. 2012;17(9):518-25). Azonban az egyik feltételezett MKK gént, sem egészében, sem részleteiben sem sikerült, komoly erőfeszítések ellenére sem, amplifikálnunk. Azóta ezt a szekvenciát a genom későbbi annotációival el is távolították ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/XP\\_001693665](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/XP_001693665)). Így nagy valószínűséggel feltételezhető, hogy több más alfafajhoz hasonlóan, a *Chlamydomonas* genom is csak egy MKK-t kódol, és valamilyen módon ez az egy kináz szabályozza az öt *Chlamydomonas* MAP kinázt.

Remélem a válaszaim kielégítőek. Végül még egyszer szeretném megköszönni Dr. Havelda Zoltán érdeklődését a dolgozatomban bemutatott munka iránt, hasznos és alapos bírálatát.

Budapest, 2023. szeptember 10.

Dóczi Róbert