

dc_2005_22

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

Dóczy Róbert

Akadémiai Doktori Értekezés

Budapest, 2022

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	4
2. Irodalmi áttekintés	7
2.1. <i>Környezeti adaptáció és jelátvitel a növényvilágban</i>	7
2.1.1. <i>A növényeket érintő környezeti stresszhatások mezőgazdasági következményei</i>	7
2.1.2. <i>A biotikus stresszhatások és védekezőmechanizmusok</i>	8
2.1.3. <i>A növényfejlődés környezeti flexibilitásának szerepe a növényi stresszadaptációban</i>	12
2.1.4. <i>A sejten belüli jelátvitel alapvető mechanizmusai: receptorok, jelátviteli pályák, protein foszforiláció</i>	14
2.2. <i>A mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) jelátvitel</i>	18
2.3. <i>MAP kináz szubsztrátok</i>	25
3. A kutatások célkitűzései	32
4. Módszerek	33
4.1. <i>Növényanyagok</i>	33
4.1.1. <i>Arabidopsis növényanyagok és nevelési körülmények</i>	33
4.1.2. <i>Pseudomonas fertőzési teszt</i>	33
4.1.3. <i>Sejtkultúra, protoplasztálás, tranziens transzformáció</i>	34
4.1.4. <i>Chlamydomonas reinhardtii anyagok és nevelési körülmények</i>	34
4.2. <i>Molekuláris biológiai módszerek</i>	36
4.2.1. <i>Polimeráz láncreakció (PCR), DNS klónozás, helyirányított mutagenézis</i>	36
4.2.2. <i>RNS tisztítás, kvantitatív RT-PCR</i>	37
4.3. <i>Fehérje biokémiai módszerek</i>	37
4.3.1. <i>Kvantitatív élesztő kéthibrid teszt</i>	37
4.3.2. <i>Növényi fehérje tisztítás és immunblottolás (Western blot)</i>	37
4.3.3. <i>Rekombináns fehérjék tisztítása</i>	38
4.3.4. <i>In vitro kináz teszt</i>	39
4.3.5. <i>Ko-immunprecipitáció</i>	39
4.3.6. <i>Immunkomplex kináz teszt</i>	40
4.3.7. <i>Kapilláris izoelektromos fókuszálással kapcsolt nanofolyadék immuneszt</i>	

<i>(cIEF immunteszt)</i>	40
4.3.8. <i>Tömegspektrometria</i>	41
4.3.9. <i>GUS aktivitás meghatározása</i>	41
4.4. <i>Mikroszkópos módszerek</i>	41
4.5. <i>Bioinformatikai módszerek</i>	42
5. Eredmények	43
5.1. <i>Az MKK3 jelátviteli pálya azonosítása és szerepe a biotikus stressz válaszban</i>	43
5.1.1. <i>Új MAPK jelpályák térképezése irányított élesztő két-hibrid tesztekkel</i>	43
5.1.2. <i>Az MKK3 C csoportba tartozó MAP kinázokat aktivál és foszforilál</i>	44
5.1.3. <i>Pseudomonas syringae fertőzés specifikusan indukálja az MKK3 expressziót</i>	47
5.1.4. <i>Az MKK3 a PR gének pozitív regulátora és szerepet játszik a Pst DC3000 elleni védekezésben</i>	48
5.1.5. <i>Az MKK3-MPK7 modul egy flg22 független, ROS aktivált patogén jelátviteli jelpálya része</i>	51
5.2. <i>Az MKK7 jelátviteli pálya szerepe a merisztéma működésének szabályozásában</i>	54
5.2.1. <i>Az MKK7/9 promóterek aktivitása specifikus fejlődésszabályozó funkcionalitásra utal</i>	54
5.2.2. <i>Az MKK7 túltermelő transzgenikus vonalak súlyos fejlődési rendellenességeket mutatnak</i>	55
5.2.3. <i>Az MKK7-MPK6 modul a hajtáscsúcs merisztéma de-represszió negatív regulátora</i>	62
5.3. <i>Új, a merisztémaszabályozásban fontos szerepet játszó MAPK szubsztrátok azonosítása</i>	65
5.3.1. <i>Egy új, in vivo növényi kináz-szubsztrát foszforilációs kölcsönhatások vizsgálatára alkalmas kísérleti módszer kialakítása</i>	65
5.3.2. <i>Egy jól jellemzett MAPK szubsztrát, az ACC szintáz 6 fehérje (ACS6) foszforilációjának vizsgálata az új kísérleti módszerrel</i>	68
5.3.3. <i>A merisztémaszerveződés mesterregulátora, a WUSCHEL (WUS) transzkripciós faktor az MPK3 in vivo szubsztrátja</i>	70
5.3.4. <i>A virágfejlődés egyik mesterregulátora, az APETALA2 (AP2) transzkripciós faktor az MPK6 in vivo szubsztrátja</i>	78
5.4. <i>A MAPK jelátvitel részt vesz a PIN auxin transzporterek poszttranszlációs szabályozásában</i>	81
5.4.1. <i>A hosszú hidrofíl hurokkal rendelkező PIN fehérjékben evolúciósan nagy mértékben konzervált MAPK foszforilációs mintázatok találhatóak</i>	81

<i>5.4.2. A PIN1 fehérje T227, T248 és T286 treonin aminosavait az MPK6 és az MPK4 kinázok egyaránt foszforilálják</i>	84
<i>5.4.3. Indukált MKK7 expresszió és flagellin kezelés befolyásolja a PIN1 fehérje plazmamembrán lokalizációját</i>	85
<i>5.4.4. A T227, T248 és T286 aminosavak foszforilációs státusza befolyásolja a PIN1 lokalizációt protoplaszt rendszerben</i>	88
<i>5.4.5. PIN6 fehérje, a hosszú HL PIN csoport különleges tagja is MPK4/6 kináz szubsztrát</i>	90
<i>5.5. A MAPK jelátvitel evolúciója a növényvilágban</i>	91
<i>5.5.1. MAPK családok alga proteómokban – a MAPK géncsalád korai evolúciója a növényvilágban</i>	92
<i>5.5.2. A növényi MAPK repertoár nagyarányú expanziója és egy hiperkonnectált jelátviteli hálózat kialakulása</i>	95
<i>5.5.3. A dokkolóhely motívumok csoportspecifikus szekvenciadivergenciája a növényvilágban</i>	100
<i>5.6. A MAPK jelátvitel szerepének vizsgálata fotoszintetikus mikroalgában</i>	104
6. Diskusszió	110
<i>6.1 Az MKK3-MPK7 jelpálya</i>	110
<i>6.2. A MAPK jelátvitel szerepe a merisztémaműködés szabályozásában</i>	112
<i>6.3. Egy új módszer in vivo foszforilációs kölcsönhatások vizsgálatára növényekben</i>	117
<i>6.4 A MAPK jelátvitel evolúciója a növényvilágban</i>	120
<i>6.5. Az eredmények biotechnológiai hasznosíthatósága</i>	122
Köszönetnyilvánítás	125
Új tudományos eredmények	126
Közlemények listája	128
Irodalomjegyzék	131
Függelék	
<i>Rövidítések jegyzéke</i>	146
<i>A dolgozatban említett gének jegyzéke</i>	148

1. Bevezetés

Értekezésemben mintegy tizenöt évnyi kutatómunkát foglalok keretbe, a Vienna Biocenter-ben és a Royal Holloway, University of London-on eltöltött posztdoktorális, illetve a hazatérésem után itthon, az MTA ATK-ban végzett önálló, a növényi mitogén aktivált protein kináz (MAPK) jelátvitelt vizsgáló kutatásaim eredményei alapján. Ezt megelőzően, PhD kutatásaim során, a transzkripció szabályozással foglalkozva keltette fel érdeklődésemet a sejteken belüli jelátvitel, és az abban rejlő biotechnológiai potenciál.

A MAPK jelpályák az egyik legrégebben és legintenzívebben tanulmányozott eukarióta jelátviteli mechanizmus. Posztdoktori kutatásaim kezdetekor, egy nagyon izgalmas időszakban csatlakozhattam a terület egyik vezető kutatócsoportjához: a genomszekvenálási forradalom hőskorában, az Arabidopsis modell genomjában kódolt teljes MAPK jelátviteli génkészlet annotációjának publikálásakor. Ez a paradigmaváltás lehetővé tette a genomalapú kutatási megközelítések alkalmazását, és ezáltal addig ismeretlen interakciók és funkciók vizsgálatát. Így több új jelpályát azonosítottunk, amelyek funkcionális vizsgálatai részben a környezeti stresszválaszokban betöltött szerepüket támasztották alá, összhangban az ilyen irányú korai növényi MAPK kutatások eredményeivel. Másrészt eredményeink hozzájárultak ahhoz a kibontakozó kutatási irányvonalhoz is, amely a MAPK jelátvitel fejlődésszabályozásban betöltött szerepét tárta fel.

Ennek a kettős funkcionalitásnak különös jelentőséget ad a növényi organogenezis folyamatának környezeti plaszticitása. Szemben az állati egyedfejlődési folyamatokkal, amelyek során a szervek vagy szervkezdemények már az embriogenezis korai stádiumában kialakulnak, és további fejlődésük a környezeti körülményektől alapvetően független, a helyhez kötött életmód következtében a növényi organogenezis főleg posztembrionális és a növény élete végéig folyamatos, az új szervek megjelenése és növekedése rugalmasan reagál a környezeti hatásokra. A növényfejlődés környezeti plaszticitása a fotoszintézis mellett valószínűleg a növényi létforma egyik legjellemzőbb sajátossága, és meghatározó jelentőségű a mezőgazdasági növénytermesztés sikerességében is; mégis, az ezirányú kutatásink kezdetekor a környezeti ingereket érzékelő és a fejlődésszabályozó mechanizmusok közötti jelátviteli kapcsolatokra vonatkozó molekuláris szintű ismeretek minimálisak voltak. Munkánk során több olyan mechanizmus létét tártuk fel, amelyeken keresztül a környezeti stresszhatások által aktivált MAP kinázok a növényi egyedfejlődés szabályozását modulálhatják.

Meggyőződésem, hogy a biológiai jelenségek megértéséhez alapvető fontosságú azok evolúciós keretének megismerése, vagy ahogy ezt Theodosius Dobzhansky híres 1973-as esszéjének címében találóan megfogalmazta: „a biológiában semminek nincs értelme, csak az evolúció fényében”. A bemutatott kutatási időszakra esett a genomikát igazából forradalmasító újgenerációs szekvenálási módszerek széleskörű elterjedése, és ennek következtében a közzétett genomszekvenciák számának ugrásszerű növekedése. Így a komparatív genomika Dobzhansky korában elképzelhetetlen lehetőségeket nyitott meg a funkcionális ismeretek evolúciós keretbe foglalásához. Ez a felismerés motiválta a dolgozatban is tárgyalt géncsaládevolúciós kutatásokat, amelyekkel reményeink szerint sikerült érdemben hozzájárulni a növényi és állati MAPK jelátvitel eltérő evolúciós útjainak feltérképezéshez, és egy olyan kép kialakításához, amely jól illeszkedik a MAPK jelátvitelnek a növényfejlődés környezeti szabályozásában betöltött szerepéhez.

A komparatív genomikai kutatások másik következménye az algagenomok MAPK génkészleteinek megismerése volt, ami lehetővé tette a genom alapú MAPK jelátviteli kutatásokat a növényvilágnak ebben a szegmensében is. A zöldalgák kutatását hatalmas ökológiai jelentőségük mellett azok egyre szélesebb teret nyitó biotechnológiai alkalmazása is indokolja. Így alapanyagul szolgálnak pl. értékes másodlagos metabolitok vagy bioüzemanyagok előállításához. Továbbá a *Chlamydomonas reinhardtii* zöldalgafaj egy olyan modell organizmus, amely egysejtűként kiválóan alkalmas lehet a „növényi élesztő” szerepére, a növényi sejtek komplex biológiai folyamatainak modellezésére (pl. lipid bioszintézis, fotoszintézis-, sejtciklus paraméterek vizsgálata). Mindezek ellenére önálló kutatásom kezdetekor csak nagyon kevés eredmény volt elérhető a mikroalgák környezeti adaptációjára és az ezt szabályozó jelátviteli mechanizmusokra vonatkozóan. A dolgozat „Eredmények” fejezetének végén az ezirányban végzett kutatásaink jelenleg még publikálatlan eredményeink egy, általam különösen érdekesnek tartott, részét mutatom be.

Dolgozatom „Irodalmi Áttekintés” részében azokat az ismereteket foglalom össze, amelyek a bemutatott eredmények háttéréül szolgálnak, elsősorban a jelátviteli kutatások tükrében. Mivel kutatásaink a növénytudomány eltérő területeit érintő eredményekhez vezettek, az azokra vonatkozó irodalmat a gondolatmenet érthetőségét biztosító mélységben igyekeztem feldolgozni a dolgozat egészében. Az „Eredmények” fejezetben a legfontosabb eredményeinket igyekeztem olyan részletességgel bemutatni, mint a vonatkozó publikációkban tettük, azonban bizonyos, az összkép szempontjából alapvetően nélkülözhető információkra nem mindenhol tértem ki. Különösen igaz ez a komparatív genomikai és a géncsaládevolúciós eredményekre. Természetesen az értekezés alapjául szolgáló publikációkban a további részleteket is

dc_2005_22

megtalálhatja az érdeklődő olvasó. A bemutatott eredményeket a „Diskusszió” fejezetben értékelem, a régebbi eredményekre vonatkozóan az azóta született ismeretek fényében is. E fejezet végén az eredmények biotechnológiai alkalmazhatóságának kérdése is kitérek.

2. Irodalmi Áttekintés

2.1. Környezeti adaptáció és jelátvitel a növényvilágban

2.1.1. A növényeket érintő környezeti stresszhatások mezőgazdasági következményei

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. Az alkalmazkodóképesség genetikai határai fajonként eltérőek, egy evolúciós kompromisszum eredményeként stabilizálódnak, amely az élőhelyre jellemző ökológiai tényezők között hatékony erőforrás elosztást biztosít a növekedési, szaporodási és a védekező funkciók között. Mivel a termesztett növények nemesítése során az elsődleges szempont a termés mennyiségének és minőségének javítása, a kedvezőtlen és főleg az extrém környezeti tényezők jelentősen veszélyeztetik a mezőgazdasági növénytermesztés biztonságát. 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 lényeges mennyiségi vagy minőségi romlása nélkül fokozni.

Az irodalomban a növényeket érő környezeti stresszeket két nagy csoportra szokás osztani. A kórokozó vírusok, baktériumok és gombák, a növényevő rovarok, valamint a parazita növények által okozott károkat összefoglalóan biotikus, míg a fizikai vagy kémiai környezet (hőmérséklet, károsító sugárzás, szárazság, só stressz, nehézfém stressz, tápanyaghiány, hypoxia, szuboptimális pH) által okozott károkat abiotikus stressznek nevezzük.

Egy, az ENSZ Élelmezésügyi és Mezőgazdasági Világszervezete (FAO) által publikált jelentésben szereplő becslés szerint 2050-re a globális népesség várhatóan 34 százalékkal növekszik, ami már önmagában is komoly kihívást jelent a mezőgazdaság számára (FAO, 2009). Továbbá egy 2017-es FAO jelentés szerint 2005 és 2015 között a fejlődő világban a szárazság 29 milliárd, az áradások 19 milliárd, a hőmérsékleti extrémek 26,5 milliárd, míg a kórokozók és kártevők 9,5 milliárd dollárnyi mezőgazdasági kárt okoztak (FAO, 2017).

Ráadásul ezek a kedvezőtlen, extrém környezeti hatások a jövőben, a klímaváltozás következtében, várhatóan még inkább fokozódnak (Bailey-Serres et al., 2019). Egy, a hőmérséklet emelkedés hatását az emberi kalóriabevitel mintegy kétharmadát kitevő négy haszonnövény hozamára vizsgáló metaanalízis szerint, genetikai adaptáció nélkül a globális átlaghőmérséklet minden egyes Celsius fokkal történő emelkedése a búza globális termésátlagát 6 százalékkal, a rizsét 3,2, a kukoricáét 7,4 a szójáét pedig 3,1 százalékkal

csökkentené (Zhao et al., 2017). Ehhez hasonló következtetésekre jutottak más metaanalízisek szerzői is, pl. Challinor et al. (2014).

A változó abiotikus viszonyok hatással lesznek a növények körüli mikrobiális ökoszisztémákra is, így nagy valószínűséggel befolyással lesznek a kedvező hatású szimbiotikus mikrobákra is (pl. mikorrhiza). A klímaváltozás egyaránt hatással lesz a patogén mikrobákra és a gazdanövényiekre is, így annak drámai következményei lehetnek számos betegség súlyosságára és földrajzi elterjedésére (Elad and Pertot, 2014). A kórokozók XX. századi terjedésének vizsgálata azt mutatja, hogy bár ennek legfontosabb elősegítője a növekvő mezőgazdasági termelés és kereskedelem, bizonyos földrajzi mintázatok a klímaváltozás hatását mutatják (Bebber, 2015). A rovarkártevőkre vonatkozó előrejelzések szerint a magasabb CO₂ szint hatására a gazdanövényekben bekövetkező minőségi változások, mint pl. a C3 növények szén:nitrogén aránya, alapvetően kedvezőtlenek a növényevő rovarok számára. Viszont a bizonyos kártevő fajok esetében beszámoltak olyan jelenségekről is, mint a kompenzációs evés, vagy éppen a növekvő populáció méret és földrajzi elterjedés (Trębicki et al., 2017).

A termesztett növények stressz toleranciáját klasszikus nemesítési módszerekkel csak korlátozottan sikerül fokozni. A toleranciát meghatározó mechanizmusok megismerése azonban hatékonyabbá teheti ezt a folyamatot.

2.1.2. A biotikus stresszhatások és védekezőmechanizmusok

A növényi stressztoleranciában szerepet játszó folyamatok megismerése jelentős eredményeket hozott mind az abiotikus, mind a biotikus jellegű stresszek területén. A dolgozatban tárgyalt jelpályák szerepet játszanak az abiotikus stressz válaszok szabályozásában is, azonban a bemutatott kutatások alapvetően a biotikus stressz tolerancia mechanizmusokra irányultak. Ezért a továbbiakban elsősorban a biotikus stressz hatásokkal, illetve azok jelátvitelével kapcsolatos irodalmi háttér bemutatására törekszem.

Elsődleges tápanyagtermelőkként a növények számos élőlény számára jelentenek táplálékforrást (Lindeman, 1991), például a gyökerek által kiválasztott molekulák különféle talajlakó szervezeteknek nyújtanak tápanyagot (Lundberg et al., 2012). Ezek között vannak olyanok, amelyek a növények számára is hasznosak, mint például a rizobaktériumok (Gopal et al., 2013). Azonban nagyon sok faj kedvezőtlen hatással van a növények növekedésére, amelyekkel szemben a növények megpróbálják megvédeni erőforrásaikat (Dangl and Jones, 2001), hiszen a felhasználható energiaforrások közvetlenül befolyásolják a reprodukciós és így az evolúciós fitneszt (Janczur, 2009). A hatékony védekezési mechanizmushoz a védekezésre

fordított erőforrások mennyiségének kevesebbnek kell lennie, mint a kórokozók és növényevők miatt elveszített erőforrások mennyisége (Coley et al., 1985). A patogének hiányában indokolatlanul védekezésre fordított erőforrások szintén súlyos következményekkel járnak. Energetikai szempontból a védekezés nagyon költséges, így a annak pontos szabályozása egy fontos evolúciós kritérium. A térben és időben megfelelően hangolt szabályozás előfeltétele a patogének közvetlen vagy közvetett felismerése. A növények képesek baktériumokat közvetlenül is felismerni, például a flagellum érzékelésével (Chinchilla et al., 2006), vagy pedig közvetve a szövetkárosodáson keresztül, pl. az AtPEP1 endogén peptid termék érzékelésével (Krol et al., 2010).

Ismereteink jelentős része a növényi modell rendszerként használt *Arabidopsis thaliana* (Arabidopsis, magyar nevén lúdfű) vizsgálatából származik (Provart et al., 2016). Az Arabidopsis modellnövény írásmódja nem teljesen konzekvens a tudományos közösségben. Mint a faj a nemzetségnévből eredő közhasználatú név, mind a dőlt betűtípus, mind a nagy kezdőbetű használata indokolatlan. Ezt a nomenklátúra megközelítést azonban csak viszonylag kevesen követik, a tudományos irodalomban olyan mértékben elterjedt a nagy kezdőbetűs írásmód, hogy azt már akár elfogadott használatnak is tekinthetjük, ezért a leginkább elterjedt gyakorlatnak megfelelően dolgozatomban én is az „Arabidopsis” írásmódot használom.

Az Arabidopsis sikeres modellnövényé válását számos e célból előnyös tulajdonsága tette lehetővé. Genommérete kicsi, életciklusa rövid, helyigénye szerény, viszont nagy mennyiségű magot terem, transzformációja rendkívül egyszerű és hatékony (virágmerítés, (Clough, 2005)), önporzó és idegenporozható is. A genomikai érában további előnyei a jó minőségben annotált genom, széles körben használt tudás- és eszközforrás (<https://www.arabidopsis.org/>), amelyek közül kiemelkedő fontosságúak a nyilvánosan hozzáférhető mutáns kollekciónak. Érdekes tudománytörténeti részlet, hogy az Arabidopsis genetika egyik korai úttörője a magyar származású George P. Rédei (Rédei György) volt (Provart et al., 2016), aki mielőtt 1956-ban elhagyta az országot, a martonvásári mezőgazdasági kutatóintézet kutatója volt (Koncz, 2009). Az utóbbi bő húsz évben ez a modellrendszer különösen sikeresnek bizonyult a növényi patogénválaszok megismerésének terén.

A molekuláris folyamatok mellett fontos megemlíteni azokat a strukturális védekező elemeket, amelyek nem csak egy első védvonalként szolgáló passzív fizikai gátként működnek, hanem dinamikusan részt vesznek a molekuláris szintű folyamatokban is (Traw and Bergelson, 2003). A lipid polimerekből, oldható viaszokból és kutin polimerekből álló kutikula a növények és külvilág közötti határoló réteg, ami a különböző biotikus és abiotikus stresszektől védi a növény földfeletti részeit (Jeffree, 2006). A levélfelszínen található tüskeszerű képletek a

trichómák elsősorban a növényevő és patogénvektor rovarok elleni kémiai és fizikai elrettentést szolgálják (Traw and Bergelson, 2003). A növény-mikroba kapcsolatrendszerben kiemelt jelentősége van a gázcserenyílásoknak (Assmann and Shimazaki, 1999; Rodrigues and Shan, 2021). A sebek mellett ezek a rések a kórokozók által leginkább kihasznált belépési pontok (Underwood et al., 2007a). A gázcserenyílások résméretét a zárósejtek turgora határozza meg, amit a stresszhormonok, elsősorban az abszcizinsav (ABA) szabályoznak (Pillitteri and Dong, 2013). A kórokozó baktériumok és gombák érzékelésre reagálva a gázcserenyílások gyorsan bezáródnak (Gudesblat et al., 2009). A gázcserenyílások zárása az ún. patogén asszociált molekuláris mintázatok (pathogen associated molecular patterns (PAMP)) felismerése indítja be. Például miután a nyitott gázcserenyílásokon keresztül *Pseudomonas syringae* (Pst) baktériumok bejutottak az apoplast rendszerbe azok flagellumát a FLAGELLIN SENSING 2 (FLS2) receptor kináz érzékeli (Gómez-Gómez and Boller, 2002), ami többek között a gázcserenyílások bezáródását eredményezi (Melotto et al., 2006).

Amennyiben a kórokozók átjutnak a kutikulán vagy a gázcserenyílásokon keresztül egy következő akadállyal, a sejtfallal találják magukat szemben. A sejtfallal egyrészt egy kémiaiag nagyon komplex összetételű vázat biztosít a növényi sejteknek, másrészt viszont egy fontos védelmi réteget biztosít. E védelmi mechanizmus dinamikus természetére jó példa a gombák által képzett speciális sejtbehatoló struktúrák (Szabo and Bushnell, 2001) érzékelésére adott válasz. A behatolási kísérlet roncsoló hatásának következtében felszabaduló molekulák hatására a behatolási helyen a sejtfallal szerkezete átalakul, megerősödik, továbbá új sejtfallalstruktúrák, mint például papillák alakulnak ki (Aist, 1976). Más patogénfajták a sejtfallal enzimatikus bontásával próbálnak a sejtbeli tápanyagokhoz hozzáférni, azonban a bomlási termékek (damage associated molecular patterns (DAMPs)) megjelenése szintén beindítja a védekező, többek között a sejtfallal megerősítő válaszreakciókat (D'Ovidio et al., 2004).

A PAMP indukált immunitás (PAMP triggered immunity (PTI)) jelenti a növényi aktív védekező mechanizmusok első vonalát (Jones and Dangl, 2006; Zipfel, 2009; Silva et al., 2018; Ngou et al., 2021). A három legrészletesebben tanulmányozott PAMP felismerési mechanizmus a flagellin, a Tu bakteriális elongációs faktor (EF-Tu) és gomba eredetű kitin molekulák felismerése. A flagellum (ostor) a baktériumok aktív mozgásához szükséges organellum, aminek az egyik legfontosabb protein komponense a flagellin (FliC) (Macnab, 2004). A *Pst* a fertőzési folyamat során flagellint szekretál, amit egy plazma membrán lokalizált leucine-rich repeat (LRR) típusú receptor kináz, az FLS2 (flagellin sensing 2) érzékeli (Gómez-Gómez and Boller, 2002). A flagellin érzékelése egy 22 aminosavból álló peptid mintázat, a 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. A 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. A flg22 érzékelés következtében kialakul a PTI válasz, ami 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 védekező válaszok kialakítása alapvetően a génexpresszió újraprogramozásán keresztül történik, aminek szabályozása a jelfelismerést követően a jelátviteli pályák aktiválásán keresztül zajlik (lásd 2.1.4.). A szabályozási folyamatban fontos szerepet játszanak a másodlagos hírvivők is, mint például az aktív oxigénformák (reactive oxygen species (ROS)) képződése, illetve a citoplazmás és a sejtmagi Ca^{2+} ion koncentráció emelkedésének hullámai (Ca^{2+} signature) (Garcia-Brugger et al., 2006; Lecourieux et al., 2006).

Az EF-Tu érzékelését, az flg22-höz hasonlóan, szintén egy BAK1 függő receptor, az EF-Tu receptor (EFR) végzi (Zipfel et al., 2006; Roux et al., 2011). A kitin felismeréséért egy BAK1 független specifikus receptor, a chitin elicitor receptor kinase 1 (CERK1) felelős (Miya et al., 2007; Wan et al., 2008; Gong et al., 2020).

A növényi patogén válaszban meghatározó szerepe van három hormonnak, a szalicilsavnak (SA), a jázminsavnak (JA) és az etilénnek (ET). Habár a PAMP felismerés indukálja mind a SA, mind az ET termelését, a flg22 által kialakított lokális rezisztencia alapvetően nem függ patogén hormon jelátviteltől (Spoel and Dong, 2008; Bari and Jones, 2009).

A PTI jelentette szelekciós nyomás következtében a kórokozókban kialakultak olyan ellentámadási mechanizmusok, amelyekkel képesek a PTI-t ártalmatlanítani (Jones and Dangl, 2006; Han, 2019). Számos patogén (pl. Pst, *Xanthomonas* és *Ralstonia*) rendelkezik hármastípusú szekréciós rendszerrel (type III secretion systems (TTSS)), amivel effektor fehérjéket tudnak fecskendezni a gazdasejtbe. Ezek az effektorok különféle funkciókkal rendelkeznek és sokféle célpontot képesek megtámadni a gazdanövény védekezésének gyengítése érdekében. Erre a változatosságra példaként említhető az AvrPtoB, ami egy ubikvitin E3 ligáz szerű protein (Duplan and Rivas, 2014), a transzkripció faktor TAL effektorok (Boch et al., 2009), a foszfatáz aktivitású HopAO1 (Underwood et al., 2007b), a proteáz aktivitású AvrPphB (Qi et al., 2014), de működhetnek egyszerű PAMP lekötőként is (Dean, 2011).

Az evolúciós fegyverkezési verseny következő lépéseként a növényekben megjelentek az effektor fehérjéket felismerő mechanizmusok. Az ilyen R (rezisztencia) proteinek és az Avr (avirulencia) proteinként is ismert effektor funkcionális párjuk felismerési reakciója a növényi védekező reakciók második hullámát indítja be, ami leggyakrabban a lokális hiperszenzitív reakció (HR) kialakulásához, ami egyfajta programozott sejthalál a patogén terjedésének megállítására, és hosszú távú rezisztencia mechanizmusok (systemic acquired resistance (SAR)) indukálásához vezet (Dempsey and Klessig, 2012; Kachroo and Robin, 2013; Shah and Zeier, 2013; Gao et al., 2015; Kachroo and Kachroo, 2020).

2.1.3. A növényfejlődés környezeti flexibilitásának szerepe a növényi stresszadaptációban

A helyhez kötött életmód következményeként a növényi stresszadaptáció két alapvető stratégiára épül: az alapvetően rövidtávú fiziológiai védekező folyamatok mellett meghatározó szerepet játszanak a stressz által kiváltott megfelelő növekedési válaszok is.

Az evolúció során a többsejtűség több alkalommal, egymástól függetlenül alakult ki (Bowman et al., 2007), így a két nagy eukarióta ágba kialakult többsejtű vonalakban az egyedfejlődés és a szöveti/testi felépítés alapvetően eltérő rendezőelvek szerint működik. Az állati egyedfejlődési folyamatokra jellemző, hogy a szervek vagy szervezdemények már az embriogenezis korai stádiumában kialakulnak, és további fejlődésük a környezeti körülményektől alapvetően független. A növényi organogenezis ezzel szemben főleg posztembrionális és a növény élete végéig folyamatos, az új szervek megjelenése és növekedése rugalmasan reagál a környezeti hatásokra. A növényi merisztéma folyamatok közös vonása, hogy a kezdeti osztódások eredményeként létrejövő osztódó sejtömeg a merisztéma osztódási zónáját elhagyva kilép a sejtciklusból és differenciálódni kezd (Beemster et al., 2003; Barton, 2010). Mivel a növényi szervfejlődés rendkívül plasztikus, lehetővé válik a változó környezeti feltételekhez, mint pl. fényviszonyok, hőmérséklet, víz- és tápanyagellátás és biotikus kölcsönhatásokhoz történő adaptáció. Ennek a környezeti rugalmasságnak szélsőséges példája a bonsai kultiváció: ezek a technikák a környezet által indukált törpülés legextrémebb formáihoz vezetnek. Habár a bonsai növények levelei akár ötvenszer kisebbek, az őket alkotó sejtek mérete változatlan (Korner et al., 1989). A szervfejlődést leginkább meghatározó sejtkepződésre tehát egyaránt hatnak a belső növekedésszabályozó mechanizmusok és a külső környezeti faktorok. Mivel a szervmorfológia egyrészt fajspecifikus, másrészt változó környezetben fenntartott, nyilvánvaló, hogy a belső program és a környezeti ingerek között létezik egy kommunikációs kapcsolat, amely integrálja a sejtosztódás, sejtnövekedés és a differenciálódás folyamatait.

Arabidopsis csíranövények kezelése a bakteriális elicitor flagellinrel a védekező mechanizmusok indukálása mellett, azok növekedésének drasztikus csökkenését is okozza (Gómez-Gómez et al., 1999). Ez a reakció különösen érdekes, mivel a flagellin-kezelt növények egészségesek, tehát a növekedés gátlása egy programozott fejlődési válasz, amelyet az aktiválódott védekezési jelátvitel indukál, és nem a szuboptimális körülmények (stressz) által okozott károsodás következménye.

Míg kedvező körülmények mellett a növények teljes növekedési kapacitásukat kihasználják, változó környezeti feltételek mellett növekedési és fejlődési folyamataikat folyamatosan az adott körülményekhez igazítják. A stressz által kiváltott egyik alapvető növekedési válasz a növekedés ütemének csökkentése, vagy leállítása, sőt bizonyos esetekben akár „negatív növekedést” is megfigyelhetünk (pl. abszcisszió, szenescencia, programozott sejthalál folyamatok) (Dolferus, 2014).

A másik lehetséges növekedési válasz a stresszforrás elkerülése. Az állatvilágban a stresszfiziológia jól ismert területe a „harcolj vagy menekülj” (fight-or-flight) válasz. Helyhez kötött élőlényként a növények menekülési lehetőségei korlátozottak, azonban a posztembrionális organogenezis és a szervfejlődés plaszticitása bizonyos mértékben lehetővé teszi az elkerülési választ (Potters et al., 2007). A növényvilágban a védekezésnek ezt a módját „stressz indukált morfogénikus válasznak” (stress-induced morphogenic response) nevezik, ami valószínűleg egy különböző stressz hatások által kiváltott generikus élettani válasz (Potters et al., 2007). A jelenség szabályozásában a ROS képződés és a fejlődési hormonok, különösen az auxin transzport és metabolizmus szerepe meghatározó (Xia et al., 2015; Korver et al., 2018). A növekedésserkentő hormonnaként is ismert auxin meghatározó szerepet játszik a növekedés irányának meghatározásában is (tropizmusok) (Benjamins and Scheres, 2008; Su et al., 2017b; Nakajima et al., 2017; Iglesias et al., 2018; Han et al., 2021).

A stressz indukált morfogénikus választ többféle stressz hatással összefüggésben is részletesen leírták. Jó példa az UV-B fény hatására bekövetkező változások, mint például a szármegnyúlás gátlása, nagyobb számú laterális hajtás képzése (bokrosodás) és a levélvastagodás (Jansen, 2002). Hasonlóképpen, a nehézfémek érzékelését követően csökken a főgyökér növekedése, emellett nagyobb számú laterális gyökér keletkezik valamint a szármegnyúlás is csökken (Pasternak et al., 2005).

Egy különösen jól tanulmányozott stressz indukált fejlődési válaszjelenség a gyökérnövekedés gravitropizmusának felfüggesztése só stressz hatására (Han et al., 2017). Optimális körülmények között a gyökérnövekedés pozitív gravitropizmust mutat, a gyökér a gravitációs tengely irányába növekedik. Magas sókoncentráció érzékelésekor azonban ez a

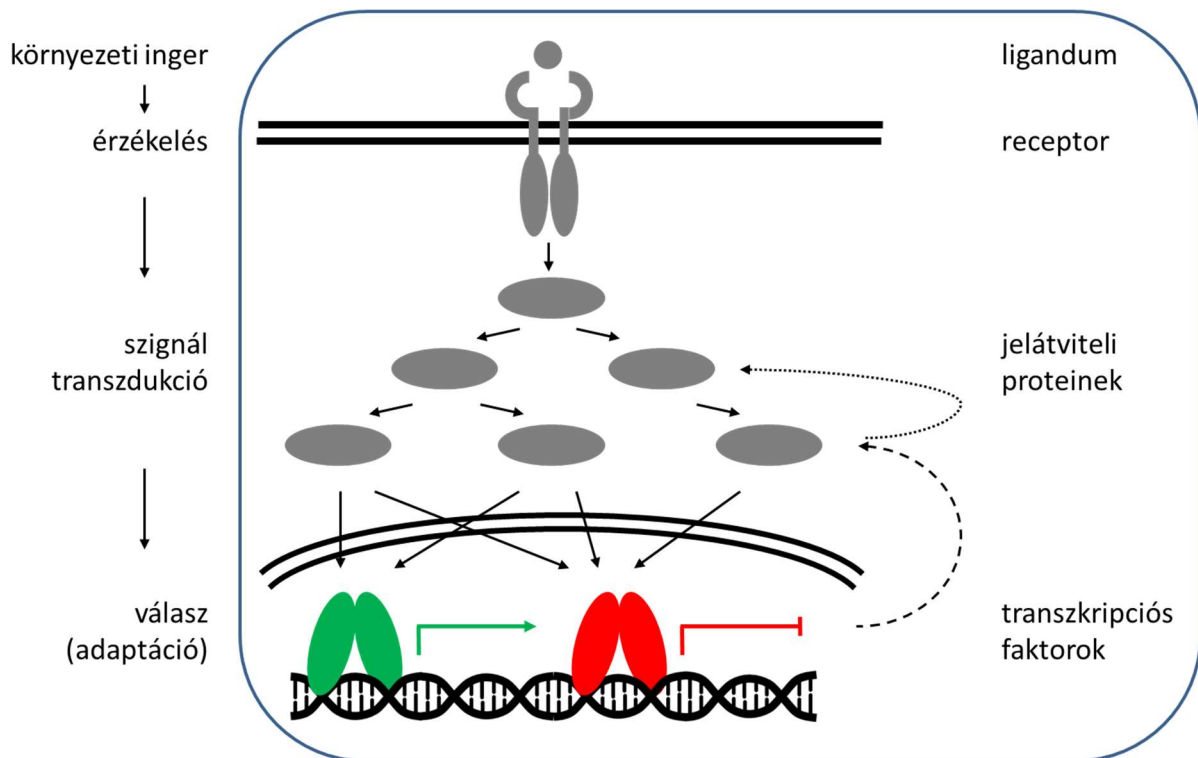
növekedési program kikapcsol, a gyökerek random módon, többszöri irányváltotással folytatják a növekedést (Sun et al., 2008; Galvan-Ampudia et al., 2013). Ez a jelenség feltehetőleg elősegíti a kedvezőbb összetételű talajrétegeket megtalálását. A gravitropizmus csökkenése arányos a sókoncentrációval. Ezt a reakciót *Arabidopsis* mellett paradicsomban és cirokban is leírták, agar táptalajon és talajban egyaránt (Han et al., 2017). A lokális auxin koncentráció mintázatok újraelosztása központi szerepet játszik a halotropizmus szabályozásában, a gyökér magasabb só koncentráció felőli oldalán a PIN2 auxin efflux pumpa endocitózisát figyelték meg (Galvan-Ampudia et al., 2013). Ezt a folyamatot szolgálja az AUX1 auxin influx pumpa auxin indukált expressziója is (van den Berg et al., 2016). E folyamatok, valamint a tranziens PIN1 expresszió szerepét a sókerülő gyökérnövekedésben a kísérleti adatok mellett matematikai modellek is alátámasztják (Galvan-Ampudia et al., 2013; van den Berg et al., 2016).

Az agravitropizmus ugyanakkor egy nagyobb léptékű növekedési mintázatváltozás része, ahol a lokális auxin koncentráció mintázat változásai különösen fontos szerepet játszanak (Koevoets et al., 2016; Wang et al., 2009). A válaszreakció részeként fokozódik az oldalgökök proliferációja (Zolla et al., 2010), illetve megváltozik a gyökér epidermisz mintázata (epidermal patterning) és a gyökérszőrök fejlődése is (Dinnyen et al., 2008). A gyökérszőrök felépítésének szerepe a stressz tolerancia kialakításában növénynemesítési szempontból is kihasználható stratégia lehet az ellenállóság növeléséhez nemesítésben (Koevoets et al., 2016).

Amint a fenti példák is demonstrálják, a környezeti stressz ingerekre adott növekedési válaszok meglehetősen jól ismertek élettanai, hormonális szinten. Ezzel szemben a folyamatot intracellulárisan szabályozó jelátviteli kapcsolatokra vonatkozó ismereteink meglehetősen korlátozottak, és a terület különösen ismeretlennek számított ezirányú kutatómunkám kezdetekor.

2.1.4. A sejten belüli jelátvitel alapvető mechanizmusai: receptorok, jelátviteli pályák, protein foszforiláció

Az intracelluláris jelátviteli pályák, az 1. ábrán látható alapvető architektúrája minden eukariótában hasonló elrendezést mutat, ami arra utal, hogy ezek egy korai eukarióta közös ősből kialakult jelátviteli séma alapján fejlődtek tovább a szeparálódó eukarióta csoportokban.



1. Ábra Az intracelluláris jelátviteli pályák sematikus architektúrája.

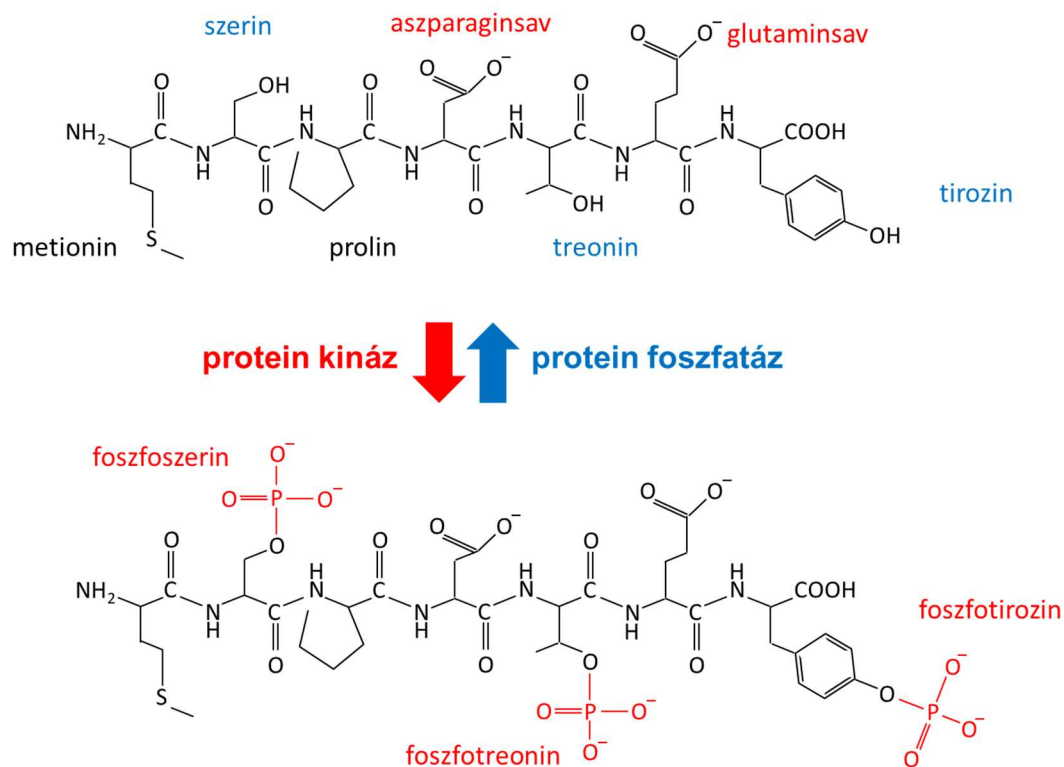
Baloldalt a jelátviteli folyamat alapvető lépései, jobboldalt ezek fő molekuláris komponensei szerepelnek. A környezeti ingereket gyakran molekuláris ligandumként specifikus receptorok érzékelik, ami azok aktivációján keresztül valamilyen molekuláris kaszkádot aktivál. A kaszkád protein tagjai egymás aktivitását posztranszlációs módosításokkal szabályozzák, a legelterjedtebb fehérjemódosítás a foszforiláció/defoszforiláció. A kaszkádok által alkotott jelpályák egyik alapvető kimeneti módja a sejtmagi transzkripciós faktorok módosítása, amelyek lehetnek aktivátorok (zöld) vagy represszorok (piros). E transzkripciós faktorok célgénjeik indukálásával (zöld) vagy repressziójával (piros) végső soron a sejt génextpressziós mintázatának megváltozásán keresztül alakítják ki a sejt válaszát (adaptáció). A jelátviteli folyamatok szabályozásában fontos szerepet játszanak a visszacsatolási mechanizmusok (ívelt nyilak: szaggatott nyíl: transzkripciós visszacsatolás, pontozott nyíl: posztranszlációs visszacsatolás).

A környezeti ingerek érzékelését specifikus receptor vagy szenzor fehérjék végzik, amelyek aktiválódva jelátviteli fehérjéket posztranszlációs módon módosítanak, amelyek így további, a jelátviteli láncolatban következő (downstream, lenti) fehérjéket láncreakciószerűen módosítva továbbítják az ingereknek megfelelő információt a sejtben belül. Bár az általánosan elterjedt jelátviteli pálya (signal transduction pathway) elnevezés azt sugallja, hogy ezek lineáris információátviteli pályák vagy „útvonalak”, a különböző állati, gomba és növény modellekből megismert jelátviteli mechanizmusok közös jellemzője, hogy ezek alapvetően komplex jelátviteli hálózatokat alkotnak. Az információáramlás hálózatos jellegének kialakulását többek között a jelátvitel finomhangolása, a jelek amplifikációja, a párhuzamosan

jelen lévő ingerekre adandó válaszok összehangolása, illetve az adaptációs válaszok időbeli modulációja tette szükségessé. Molekuláris szinten a hálózatos elrendezést elsősorban a paralóg jelátviteli gének megjelenése, a jelpályák közötti kapcsolatok kialakulása (cross-talk) és a különböző visszacsatolási mechanizmusok (pl. transzkripció, vagy a különböző hierarchia szintek közötti poszttranszlációs visszacsatolás) biztosítják. A jelátviteli mechanizmusok leggyakoribb kimeneti hatása a génexpressziós mintázat újraprogramozása, ami elsősorban transzkripció faktorok módosításain keresztül következik be. Azonban a jelátviteli fehérjék nem csak transzkripció faktorokat szabályoznak, hanem epigenetikai regulátorokat, citoplazmás vagy membrán struktúrák alkotóelemeit is, bár az ilyen típusú reguláció növényekben sokkal kevésbé ismert, mint a transzkripció szabályozás (további részletek az 2.3 fejezetben).

A jelátvitelben legáltalánosabban elterjedt, és legjobban tanulmányozott poszttranszlációs módosítás a protein foszforiláció (Hunter, 2012). A fehérjéket alkotó aminosavak közül több módosítható egy foszfátcsoport kovalens kötésével, az így keletkező foszfo-aminosavak pedig kémiaiilag jelentősen eltérnek a kiindulási aminosavaktól (2. ábra). A módosítás jelentőségét az adja, hogy a következőben megjelenő új tulajdonságú aminosav oldalláncok képesek az adott fehérje alapvető tulajdonságait megváltoztatni, pl. azok enzimaktivitását, illetve a módosult epitóp felszínek befolyásolhatják a fehérje más fehérjékkel kialakuló kölcsönhatásait, ami így végső soron a fehérje stabilitásának vagy éppen sejtbeli lokalizációjának drasztikus változásait eredményezheti. A proteinfoszforiláció biokémiai jelentőségét - és ezáltal általános elterjedését a jelátvitelben - a folyamat gyorsasága és reverzibilitása adja. A fehérjefoszforilációs reakciókat protein kináz enzimek végzik, a foszfát csoportokat azonban a protein foszfatázok képesek gyorsan el is távolítani, ezzel visszaállítva a módosítatlan fehérje tulajdonságait (2. ábra). A foszforiláció - defoszforiláció gyorsaságából fakadóan a fehérjefunkciók dinamikus változását igénylő rendszerekben, mint pl. a jelátvitel, sokkal hatékonyabbak, mint a jóval lassabb transzkripció – transzláció – protein degradáció folyamatára alapuló fehérjeállomány csere. Ezért ez a fehérjemódosítást kapcsolószerű szabályozásként is szokták említeni.

A leggyakoribb foszforilált aminosavak a hidroxil, illetve hidroximetil csoport oldallánccal rendelkező treonin, illetve szerin. Bár a tirozin foszforiláció ritka, a jelátviteli folyamatokban ennek a módosításnak nagy jelentősége van, pl. a legtöbb receptor protein kináz tirozin kináz.



2. Ábra A protein foszforiláció/defoszforiláció folyamata.

A példaként mutatott oligopeptidláncban három foszforilálható aminosav szerepel (szerin, treonin és tirozin). Ezekhez az aminosavoldalláncokhoz reverzibilis módon, negatív töltéseket hordozó foszfátcsoportok köthetők. A kovalens kötéssel kapcsolódó foszfátcsoportok jelentős mértékben megváltoztatják a módosított aminosavak fizikokémiai tulajdonságait, ami végsősoron az érintett teljes protein molekula tulajdonságait is képes befolyásolni, pl. az enzimaktivitás vagy protein kölcsönhatások megváltoztatásával. A protein kináz enzimek által hozzáadott foszfátcsoportok eltávolítását protein foszfatáz enzimek végzik, ez a reakcióciklus lehetővé teszi egy adott aminosavsorrendű fehérjemolekula gyors, „kapcsolószertű” szabályozását, ezért az evolúció során a protein foszforiláció/defoszforiláció a környezeti ingerek jelátvitelében központi szerephez jutott. A savas aminosavakat, és a hozzájuk hasonló tulajdonságot kölcsönző, kovalensen kötött foszfátcsoportokat piros szín jelzi.

A protein foszforilációt a protein kinázok szabályozásának biokémiája is különösen alkalmassá teszi a jelátvitelben előnyös kapcsolószertű rugalmasságra. Az eukarióta protein kinázok evolúciója egy szigorúan szervezett belső struktúrájú, mégis nagyon dinamikus molekulákból álló kináz család kialakulását eredményezte. A szerkezet közepén elhelyezkedő hidrofób F-hélix egy állványt képez, ehhez kapcsolódik két hidrofób „gerinc”, amelyek a katalízishez szükséges részeket az F-hélixhez kapcsolják. A struktúra így stabil, mégis rugalmas, aminek szabályozására az evolúció során kialakult egy nagy aktivációs szegmens, ami a sejtes funkciók szerint képes a térszerkezetet dinamikusán átkapcsolni (Taylor and Kornev, 2011).

Továbbá, a jelátviteli hálózatok evolúciója során a kináz fehérjék katalitikus magja többféle, fizikailag és funkcionálisan is szeparált, szabályozó vagy interakciókat biztosító doménekkel vagy motívumokkal egészült ki. Ez a magasfokú modularitás különösen alkalmas egyre komplexebb jelátviteli hálózatok kialakítására, hiszen újabb és újabb kapcsolatok, és ezáltal egyre innovatívabb szabályozási funkciók jöhetnek létre viszonylag egyszerű genetikai események, mint például rekombináció, delécio vagy inszercio, eredményeként (Bhattacharyya et al., 2006).

A genomszekvenciák annotálása eredményeképp megismerhettük a különböző fajok genomjaiban jelenlévő kináz gének nukleotid szekvenciáit, illetve azok filogenetikai kapcsolatait. Feltehetően a helyhez kötött életmód következményeként, a növényi genomokban a kináz gének előfordulása jelentősen magasabb mint az állati genomokban. Míg a humán genom mintegy 500 kináz gént tartalmaz (Manning et al., 2002), addig a virágos növények közül az egyik legkisebb genommal rendelkező Arabidopsis genomjában csaknem ezer kináz található (Zulawski et al., 2014), ami az összes fehérjekódoló gén 2 százaléka humánban, viszont 4% Arabidospisban, miközben egyébként a gének számát tekintve a két genom nagyjából hasonló méretű. Ez a jelentős különbség bizonyára a helyhez kötött életmód következménye, és egyben felhívja a figyelmünket a növényi kináz kutatás fontosságára, különösen a növények környezeti adaptációjának megértéséhez.

2.2. A mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) jelátvitel

Több, mint 30 évvel felfedezésük után (Sturgill and Ray, 1986; Ray and Sturgill, 1988; Rossomando et al., 1989) hatalmas mennyiségű irodalmi adat igazolja a mitogén-aktivált protein kinázok (MAPK) központi szerepét a jelátviteli folyamatokban. E sorok írásakor a PubMed adatbázisban a „MAP kinase” kulcsszóval végzett keresés több mint 130 ezer találatot eredményez. Ehhez képest a „MAP kinase plant” kulcsszó mintegy 6700 közleményt ad, ami jól tükrözi a növényi MAPK-okra vonatkozó ismereteink korlátait.

A szerin/treonin protein kináz típusú MAP kinázok a CMGC (CDK/MAPK/GSK3/CLK) kináz csoportba tartoznak, ezen belül filogentikailag a sejtciklus szabályozásban kulcsfontosságú CDK-khoz (cyclin-dependent kinases) állnak a legközelebb (Manning et al., 2002).

A MAPK jelátviteli utak felépítésének jellegzetessége, hogy azokban hierarchikusan rendezett protein kinázok egymást reverzibilis foszforilációval aktiválják, így alakítva ki egy

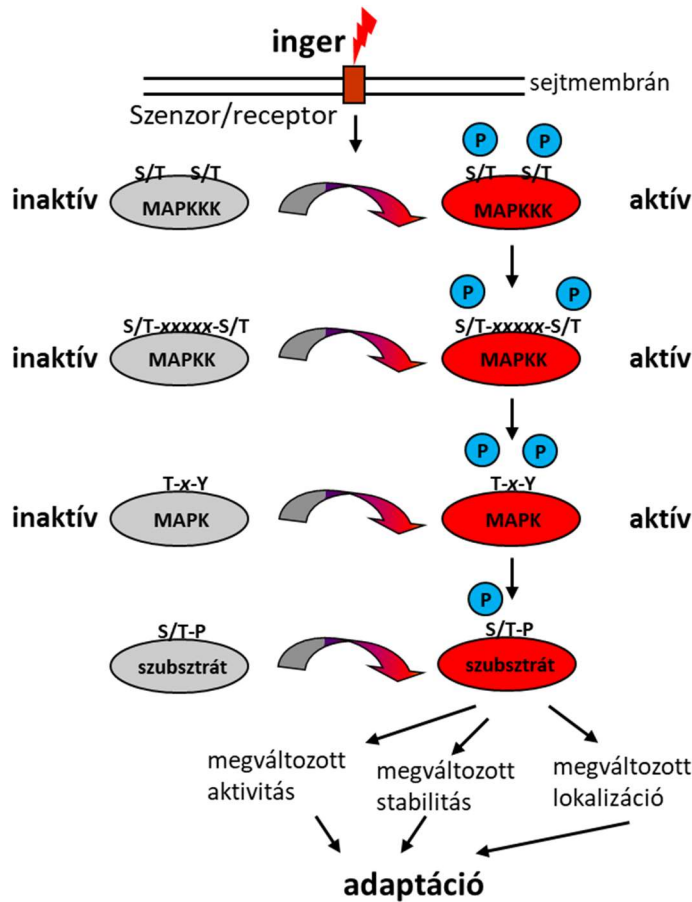
foszforilációs kaszkádot (3. ábra). A kaszkádban minimum három kináz típus szerepel, amelyek foszforilálatlan állapotban inaktívak, az aktivációs hurokban található foszforilációs helyek foszforilációja következtében veszik fel az aktív konformációt. A névadó MAPK-ok a hierarchia alsó szintjén helyezkednek el, a TxY aktivációs motívumban szereplő treonin és tirozin aminosavakat a következő hierarchikus szinten szereplő, MAP kináz kinázok (MAPK kináz, MKK) foszforilálják. Az MKK-k ún. kettős specificitású protein kinázok, amelyek egyaránt képesek szerin/treonin és tirozin foszforilációra is. Ezeket a MAP kináz kináz kináz enzimek (MAP3K) aktiválják. Filogenetikailag az MKK és MAP3K kinázok az ún. STE csoportba tartoznak, ami nevét az élesztő Sterile 7, Sterile 11, Sterile 20 kinázokról kapta. Ez a csoport filogenetikailag viszonylag távol áll a CMGC csoporttól (Manning et al., 2002).

Élesztőben és emberben jól meghatározott MAPK jelpályák alakultak ki. Sarjadzó élesztőben (*Saccharomyces cerevisiae*) az ozmotikus stressz által aktivált HOG jelpálya a Pbs2-Hog1 (MKK–MAPK) modulból áll. A párosodási/filamentumos növekedési jelpályát a Ste7 (MKK) és a Fus3/Kss1 (MAPK) alkotják, ez párosodási feromonok és nitrogénhiány hatására aktiválódik. A növekedési faktorok és stressz aktivált sejtfal integritási jelpálya tagjai az MKK1/MKK2 és Mpk1. Emlősökben négy MAPK jelpálya alakult ki, az ERK (MEK1/MEK2–ERK1/ERK2), p38 (MKK3/MKK6–p38a/b/g), JNK (MKK4/MKK7–JNK1/JNK2/JNK3) és az atipikus ERK5 (MEK5–ERK5) jelpályák (zárójelben az MKK–MAPK alkotók). Ezeket alapvetően vagy növekedési faktorok és mitogének (ERK és ERK5) vagy gyulladásos citokinek és stressz (p38 és JNK) aktiválják.

A MAP kinázok az aktivációs hurok foszforilációja által aktivált protein kinázok közé tartoznak. Az inaktív MAPK aktiválásához az aktivációs hurokban elhelyezkedő TxY motívum kettős foszforilációja szükséges, amit az MKK család tagjai végeznek el. Ez a TxY egy karakterisztikus MAPK motívum, aminek szekvenciája a különböző MAPK típusokra jellemző mintázat: TEY ERK és KSS1 esetében, TGY p38 és HOG1 esetében, valamint TPY a JNK kinázoknál.

Az első növényi MAP kinázokat többé-kevésbé párhuzamosan 1993-ban írta le több csoport is (Duerr et al., 1993; Jonak et al., 1993; Stafstrom et al., 1993). Ezt követően gyorsan, már a kilencvenes évek közepére egyértelműen kirajzolódott, hogy a növényi MAP kinázok a környezeti stresszek széles skálájának intracelluláris közvetítésében szerepet játszanak, mint pl. sebzés és mechanikai hatások (Seo et al., 1995; Bögre et al., 1996), hideg és vízhiány (Jonak et al., 1996) és patogén fertőzés (Ligterink et al., 1997; Zhang and Klessig, 1997). Mindeközben

leírták az első növényi MKK (Shibata et al., 1995) és MAP3K (Kieber et al., 1993; Banno et al., 1993) géneket is.



3. Ábra A MAP kináz kaszkád.

A kanonikus MAP kináz kaszkád minimum három, hierarchikusan elrendezett kináz enzimet alkotja, amelyek aktivitását az aktivációs hurok foszforilációs állapota határozza meg. A kinázok nem foszforilált állapotban inaktívak, a felső kinázok általi foszforiláció hatására veszik fel az aktív konformációt. A hierarchia alsó szintjén a névadó MAP kinázok (MAPK) állnak, amelyek specifikus szubsztát fehérjék foszforilálásán keresztül szabályozzák az adaptációs folyamatokat. Ezeket a felső MAPK kinázok (MAPKK, MKK) aktiválják, amelyeket pedig MAPKK kinázok (MAPKKK, MAP3K) aktiválnak. A MAP3K-k aktiválása valamilyen érzékelőfehérje által aktivált foszforilációs mechanizmuson keresztül történik.

A kilencvenes évekre jellemző, hogy ebben az időben még nem vált domináns modellnövényé a lúdfű, így az ekkoriban született eredmények még az abban az időben leginkább elterjedt laboratóriumi növényfajokkal (pl. lucerna, dohány) végzett kutatások során születtek. 2000-ben azután jelentős változást hozott az Arabidopsis genom publikációja (Arabidopsis Genome Initiative, 2000), ami annak a fényében különösen figyelemreméltó eredmény, hogy a humán genom első előzetes változatát csak 2001-ben publikálták (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001; Venter et al., 2001). Az inszerciós mutáns kollekciónak elérhetővé válása (Alonso et al., 2003), a lúdfű laboratóriumi használatának egyéb előnyeivel együtt azonban nagyon gyors változásokat eredményezett, így a kétezres évek elejétől kezdődően a növényi MAPK kutatások legjelentősebb eredményei is elsősorban ehhez a modellrendszerhez kapcsolódnak.

E trendnek megfelelően, az első többé-kevésbé teljesen leírt növényi MAPK jelpályát 2002-ben, Asai és munkatársai közölték, amely a bakteriális flagellin elicitor jelátvitelében játszik szerepet Arabidopsisban (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 genom szekvenciák annotációjának eredményeként 2002-ben közzétették a humán genomban kódolt kináz gének kompendiumát, a humán kinómot (Manning et al., 2002), illetve a növényi MAPK gének átfogó filogenetikai analízisét (MAPK Group, 2002). Ezek az eredmények további lendületet adtak a növényi MAPK kutatásoknak. A korai annotáció nyomán a növényi, illetve a gombákat és az állatokat is magába foglaló rendszertani csoport, az Opisthokonta szuper csoport tagjaiban található MAPK-ok között két alapvető különbségre derült fény. Egyrészt a növényekben nagyobb számú MAPK gén található: az élesztő genom 4, a humán 10 kanonikus MAPK-t kódol, ezzel szemben az Arabidopsis genomban 20, a kanonikus MAPK-oknak megfelelő szekvenciát azonosítottak (MAPK Group, 2002). Ehhez hasonló számú MAPK-t azonosítottak a későbbiekben vizsgált növényi genomokban is, pl. Hamel et al., (2006). Ez a jelenség megfelel annak a korábban említett trendnek, hogy a növényi kinómok nagyobb arányúak a genomban. A MAPK gének mellett 10 MKK és 60 MAP3K gén található (MAPK Group, 2002), így a MAPK kaszkádok elemei az Arabidopsis kinóm mintegy 10 százalékát teszik ki.

A másik alapvető különbség, hogy az Opisthokonta fajokra jellemző, hogy a funkcionálisan eltérő jelpályákhoz tartozó MAPK-ok filogenetikailag is elkülönülnek, és a jellegzetes TxY MAPK aktivációs motívum is típusonként eltérő (TEY, TGY vagy TPY). Ezzel szemben, bár a növényi MAP kinázok is négy csoportra különíthetők filogenetikailag (A-D) (MAPK Group, 2002) (5. ábra), viszont a TxY motívum nem mutatja az Opisthokontákra jellemző változatosságot. Az A-B-C csoportok TxY motívuma az állati ERK típusú MAPK-okkal megegyezően TEY, a D csoportban pedig ennek egy változata, TDY motívum található, ami biokémiaiag nem igazán eltérő, hiszen a savas oldalláncú glutaminsav (E) pozíciójában itt a nagyon hasonló aszparaginsav (D) található.

A növényi és állati MKK-k közötti különbség, hogy míg az állati MKK-k aktivációs motívuma S/TxxxS/T, addig a két foszforilációs hely között 5 spacer aminosav található növényekben (S/TxxxxxS/T). Mind a MAP kinázokra, mind a MAPK kinázokra jellemző, hogy

a kináz doménon kívül más fehérjedomén nem található szekvenciájukban. Az egyetlen figyelemreméltó kivétel a növényekben azonosított B MKK csoport, amelynek a legtöbb fajban egy tagja van (Arabidopsisban az MKK3). A B csoportba tartozó MKK-kra jellemző, hogy a kináz domén mellett egy C-terminális Nuclear transport factor 2 (NTF2) domén is található bennük. Az NTF2 egy viszonylag kisméretű nukleoporin kötő fehérje, ami a cargo proteinek sejtmagi importjában játszik szerepet (Quimby et al., 2000).

A MAP3K típusú kinázok a MAPK jelátviteli fehérjék legnagyobb és legheterogénebb csoportját alkotják valamennyi eukarióta csoportban (Champion et al., 2004; Colcombet et al., 2016).

A növényi és állati MAP kináz géncsaládok evolúciójának a két filogenetikai csoport életmódbeli és egyedfejlődésbeli különbségeiből adódóan eltérő mechanizmusaira vonatkozó eredményeinket a dolgozat későbbi fejezeteiben részletesen ismertetem.

A növényi MAPK jelátvitel funkciójára vonatkozó ismereteink elsősorban az A csoportba tartozó MPK3/MPK6 paralóg párt és a B csoportba tartozó MPK4-et, illetve ezek ortológjait vizsgáló kutatásokból származnak. Ezek az eredmények egy megdöbbentő szintű funkcionális komplexitást tártak fel: ezek a kinázok számos növényi életfolyamatban játszanak központi szerepet, mint például az abiotikus és biotikus stresszekre adott védekező válaszok, valamint különböző fejlődési folyamatok szabályozása (de Zelicourt et al., 2016; Jagodzic et al., 2018; Zhang et al., 2018; Bigeard and Hirt, 2018; Komis et al., 2018; Lin et al., 2021; Chen et al., 2021; Krysan and Colcombet, 2018).

A legfontosabb funkcionális felfedezések szorosan összekapcsolódtak az első PAMP, a biotróf patogén baktérium, a *Pseudomonas syringae*, flagellumából származó flg22 elicitor peptid felfedezésével, amit a növények egy specifikus receptor által vészhelyzeti szignálként érzékelnek, MAPK aktivációt eredményezve (Felix et al., 1999; Gómez-Gómez and Boller, 2000; Droillard et al., 2004). A két alapvető flg22 aktivált funkcionális MAPK jelpálya a MAPKKK3/5-MKK4/5-MPK3/6 és a MEKK1-MKK1/2-MPK4. A PTI mellett az MKK4/5-MPK3/6 modul az ETI jelátvitel által is aktiválódik, az NBS-LRR citoplazmás receptor RPS2 által felismert *Pseudomonas* effektor, az avrRPT2 hatására (Tsuda et al., 2013). Érdekes módon a kétféle patogén felismerés által indukált MAPK aktiváció dinamikája eltérő: a PTI esetében gyors és tranzien (kevesebb mint 30 perc), míg ETI esetében lassabb és órákon át fenntartott. Az MKK4/5-MPK3/6 modul szerepét a gázcsereenyíltások patogénfelismerést követő bezáródásában is leírták (Su et al., 2017a). A két patogén aktivált jelpálya elemei abiotikus stresszek és tápanyaghiány hatására is aktiválódnak (Ichimura et al., 2000; Chardin et al., 2017).

Az MPK3/6, MPK4 fejlődésben betöltött funkciói közül két folyamatot ismerünk a legrészletesebben. A YODA-MKK4/5-MPK3/6 jelpálya a gázcsereenyílések kialakulásának mintázatában játszik meghatározó szerepet (Wang et al., 2007). A NACK-PQR jelpálya szerepét a citokinezisben alaposan tanulmányozták mind dohány, mind Arabidopsis rendszerekben (Takahashi et al., 2004; Sasabe and Machida, 2012). Ez a jelpálya az NPK1-NQK1-NRK1 kaszkádból áll dohányban, és ezek ortológjaiból (ANP1/2/3-MKK6-MPK4) Arabidopsisban.

E két jól ismert jelpálya mellett a MAPK jelátvitel szerepét leírták többek között a virágszervek fejlődésében (Bush and Krysan, 2007) abszcissziójában (Cho et al., 2008), a kék (Sethi et al., 2014) és vörös (Xin et al., 2018) fény szignalizációjában, vagy a poláris auxin traszport (PAT) gátlásában (Dai et al., 2006).

A legfontosabb növényi MAPK jelpályák architektúrájára és működésére vonatkozó ismereteinket számos összefoglaló tanulmány bemutatja (Andreasson and Ellis, 2010; Colcombet and Hirt, 2008; de Zelicourt et al., 2016; Meng and Zhang, 2013; Xu and Zhang, 2015; Zhang et al., 2018; Jagodzick 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?

Az állati rendszerekben a receptor fehérjék és a MAPK kaszkádok közötti jelátviteli kapcsolatok elmei és működésük nagyon jól ismertek, mivel az azokat érintő mutációk jelentős szerepet játszanak számos daganattípus kialakulásában, így azok megismerése jelentős erőforrásokkal rendelkező, magas prioritású kutatási terület volt az utóbbi évtizedekben. Ehhez képest a MAP3K hierarchia szint feletti jelátvitel néhány elemét növényekben 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). Például a BRASSINOSTEROID-SIGNALING KINASE1 (BSK1), az RLCK XII alcsalád egyik tagja, ami az FLS2 immunkomplex egyik fontos komponense, a MAPKKK5-öt foszforilálja (Yan et al., 2018). Továbbá a MAPKKK5-öt a patogén receptortól lefelé elhelyezkedő RLCK VII alcsalád tagjai is közvetlenül foszforilálják (Bi et al., 2018). Az RLCK VII kinázok a patogén indukált MPK4 aktiválásban szerepet játszó MEKK1-et, egy másik MAPK3K-t is foszforilálnak (Bi et al., 2018). Érdekes módon a MAPKKK5-öt az MPK6 is

foszforilálja, ami egy kiváló példa a jelátviteli szintek közötti poszttranszlációs visszacsatolásra (lásd 2.1.4.).

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 oxigénformáknak (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 fényerősség, só stressz vagy vízhiány (Torres and Dangl, 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). Az enzimatis gyökfogyók a különböző reaktív oxigénformák enzimatis átalakítását végzik, mint például a szuperoxid diszmutáz (SOD), kataláz (CAT), peroxidáz (PRX), aszkorbát peroxidáz (APX), glutation peroxidáz (GPX) és a dehidroaszkorbát reduktáz (DHAR). A nem enzimatis gyökfogyók olyan oldható molekulák, amelyeket a reaktív oxigénformák képesek oxidálni. A glutation (GSH) és az aszkorbát (ASC) említhetőek, mint a legfontosabb nem enzimatis rendszerek, amelyek a H_2O_2 -ot képesek H_2O és O_2 molekulákká redukálni.

Potenciálisan káros hatásaikkal mellett, a reaktív oxigénformák fontos szerepet játszanak a stresszválaszok és a növekedés és fejlődés szabályozásában, 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). Kétfázisú ROS hullámot abiotikus stresszhatásokkal összefüggésben is leírtak (Grant and Loake, 2000; Joo et al., 2005). A hírvivő ROS termelésének meghatározó enzime a Respiratory burst oxidase homolog D (RbohD), aminek a hosszútávú, szisztemikus jelátvitelben betöltött szerepét is leírták (Miller et al., 2009).

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.

2.3. MAP kináz szubsztrátok

Habár csak néhány MAPK jelpálya funkciója jellemzett részletesen, az eredmények alapján egyértelmű, hogy ezek nagyon sokféle biológiai folyamatban részt vesznek, gyakorlatilag a növényi élet legtöbb aspektusával kapcsolatba hozhatóak. Így értelemszerűen merül fel a kérdés, hogy vajon hogyan képesek különböző jelek ugyanazokon a jelpályákon keresztül különféle specifikus válaszmechanismokat szabályozni? A MAPK kaszkádok kapcsolatai mind a jelátviteli folyamat hierarchiájában felső (upstream) aktivátorok, mind a jelátviteli hierarchiában alsó (downstream) szubsztrátok irányában részletesen jellemzettek humánban, ahol egy olyan működési mechanizmust ismertünk meg, amelyben többféle felső receptor jele konvergál ugyanarra a MAPK jelútra, míg a kaszkád alján elhelyezkedő MAP kinázok meglepően nagyszámú szubsztrát fehérjét foszforilálnak. Mint azt az előző fejezetben bemutattuk, bár a részletek kevésbé ismertek, de különféle szignálok növényekben is az őket specifikusan felismerő receptorokon, azok pedig RLCK-okon keresztül aktiválnak MAPK kaszkádokat, illetve a környezeti ingerek igen széles skálája eredményezi közös másodlagos hírvivők megjelenését, mint pl. a MAPK aktivátorként jól ismert reaktív oxigénformák. Úgy tűnik tehát, hogy a felső jelek konvergenciája a növényi MAPK jelátvitelre is jellemző működési struktúra.

A gomba és humán MAPK jelátvitel másik jellegzetessége a MAPK kaszkádtól lefelé terjedő jeláramlás divergenciája. Ezekben a rendszerekben igen nagyszámú MAPK szubsztrát fehérje ismert, pl. mind az ERK, mind a JNK típusú humán MAP kinázoknál több mint száz szubsztrát fehérjét írtak le (Yoon and Seger, 2006; Bogoyevitch and Kobe, 2006; Ünal et al., 2017). A foszforiláció a szabályozott fehérjék enzimatisz 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 szubsztrátokra vonatkozó ismereteink azonban messze elmaradnak az Opisthokonta MAPK szubsztrátokról elért eredményekhez képest, például az első növényi MAPK szubsztrátokat (Cheong et al., 2003; Liu and Zhang, 2004; Limmongkon et al., 2004) több mint egy évtizeddel az első humán MAPK szubsztrátok után (pl. Pulverer et al., 1991) közzölték. Mindazonáltal a növényi MAPK szubsztrátok felfedezése az utóbbi években egyértelműen lendületbe jött, egyrészt számos potenciális szubsztrátot azonosítottak nagy

átesztőképességű (high-throughput) módszerekkel, másrészt nagyjából 50 szubsztrát foszforilációját jellemezték részletesen.

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 felszínnek (dokkoló helyek) biztosítják. Ez lehetővé teszi a kináz hálózatok evolúciós flexibilitását a katalízis hatékonyságának fenntartása mellett. A MAP kinázok egy ún. „közös dokkolóhellyel” (common docking (CD) site) rendelkeznek, ami a kölcsönható partnerek komplementer kötőhelyével, a D motívummal (D motif/D site) képes kötést kialakítani. A CD hely konszenzus szekvenciája [LH]-[LHY]-D-X₍₂₎-[DE]-E-P-x-[CA], míg a D motívum konszenzus [KR]₍₀₋₃₎-X₍₀₋₂₎-[KR]-X₍₂₋₄₎-[ILVM]-x-[ILVF] (x: bármilyen aminosav) (Dinkel et al., 2014). A MAPK felszínén található CD hely savas aminosavai a D motívum bázikus aminosavaival, nagyméretű hidrofób aminosavai pedig a megfelelő hidrofób aminosavakkal alakítanak ki kölcsönhatásokat, így biztosítva egy hatékony felismerési és kötési mechanizmust, nemcsak a szubsztrát, de regulátor fehérjékkel (pl. MKK-k, foszfatazok) is.

Potenciális MAPK szubsztrátok alapvetően két, koncepcionálisan ellentétes kísérleti megközelítéssel azonosíthatóak. Egyrészt nagy átesztőképességű, ún. „előfeltételezés nélküli” (unbiased) módszerekkel, másrészt megelőző ismereteken, hipotéziseken alapuló, „jelölt alapú” kísérleti megközelítésekkel. Az élesztő két-hibrid (Y2H) rendszer egy népszerű előfeltételezés nélküli stratégia protein kölcsönhatások detektálására, amit sikerrel alkalmaztak MAPK kölcsönható fehérjék azonosítására is, amelyek többsége szubsztrátnak bizonyult.

A komparatív foszfoproteomika lehetővé teszi nagy számú potenciális szubsztrát proteomikai azonosítását. Ebben a megközelítésben eltérő MAPK aktivitású mintákban eltérően foszforilált peptideket detektálnak tömegspektrometria (MS - mass spectrometry) módszerrel. Emlős kísérleti rendszerekben, a sejt kultúrák használata egy jól bevált, széles körben alkalmazott, hatékony kísérleti eszköz a protein kinázok kutatásában, csakúgy, mint a különböző kismolekulás kináz inhibitorok alkalmazása, orvosi jelentőségüknek köszönhetően. Ezt a megközelítést kvantitatív foszfoproteomikai MAPK foszforiláció detektálására is alkalmazták, pl. Pan et al., (2009). Mindazonáltal, a sejt kultúrák használata a

növénybiológiában nem nyert ilyen széles körű elfogadottságot, az intracelluláris folyamatok tanulmányozásában nyilvánvaló előnyei ellenére sem (amit egyik nemzetközi élvonalba tartozó mentorom „a növénybiológusok mazochizmusának” kétségtelen jelének látott); a kináz inhibitorok pedig rosszul jellemzettek növényi anyagokon. Így a növényi kutatásokban elsősorban a genetikai megközelítések élveznek prioritást.

Több funkcióvesztő MAPK mutánst vizsgáltak összehasonlító foszfoproteomikai módszerekkel, és így azonosítottak számos genotípus függő foszfoproteint (Liu et al., 2015; Rayapuram et al., 2018). Két tanulmányban dexametazon (DEX) indukálható promóter által szabályozott heterológ MKK-kat használtak transzgenikus Arabidopsisban, amelyek MPK3/6 aktivációt eredményeztek. Az egyik kísérletben egy konstitutív aktív dohány (*Nicotiana tabacum*) MKK expressziójával 141 putatív MAPK szubsztrátot írtak le (Hoehenwarter et al., 2013). Egy hasonló kutatás során, ahol a petrezselyem (*Petroselinum crispum*) MKK5 konstitutív változatát használták, 592 potenciális foszfoproteint azonosítottak (Lassowskat et al., 2014). További 14 putatív MPK3/6 szubsztrátot azonosítottak indukált MKK7 túlexpresszióval (Huck et al., 2017). Egy jól jellemzett MAP3K, a YODA konstitutív aktív változatának túlexpressziójával 430 specifikusan foszforilált proteint írtak le (Sopeña-Torres et al., 2018).

Ezekkel a megemelt kinázaktivitási eredményekkel kapcsolatban azonban két lényeges probléma is felmerül. Egyrészt, a közvetlenül MAP kinázok által és a közvetve foszforilált fehérjék megkülönböztethetetlenül egyaránt megjelennek bennük, másrészt mivel a kaszkádban feljebb elhelyezkedő kinázokat alkalmaznak, nem egyértelmű, hogy egy adott szubsztrátot konkrétan melyik MAP kináz(ok) foszforilálják. Ezzel együtt, ezek a tanulmányok több száz fehérjét azonosítottak, így kialakult egy értékes és folyamatosan bővülő katalógus a potenciális MAPK szubsztrátokról (elsősorban MPK3/6 targetek).

A protein microarray technológiát szintén sikerrel alkalmazták nagy áteresztőképességű *in vitro* szubsztrát azonosítás céljából. Ezzel a megközelítéssel 48 potenciális MPK3 és 39 MPK6 szubsztrátot azonosítottak (Feilner et al., 2005), illetve egy nagy jelentőségű tanulmányban 10 Arabidopsis MAPK által foszforilált 570 proteint detektáltak (Popescu et al., 2009).

Elméletileg putatív kináz szubsztrátok a proteóm *in silico* szűrésével is azonosíthatóak, jellegzetes, specifikus peptid motívumok azonosításával. MAPK szubsztrátok esetén erre legalkalmasabb motívumnak a D-site dokkoló motívum tűnik. Különböző *in silico* megoldásokon (pl. gépi tanulás) alapuló megközelítésekkel már többször azonosítottak sikerrel MAPK szubsztrát jelölt fehérjéket a humán proteómban (Gordon et al., 2013; Whisenant et al.,

2010; Zeke et al., 2015). Ehhez hasonló megközelítéseket növényekben még nem alkalmaztak, azonban Sörensson és munkatársai sikerrel azonosítottak MAPK szubsztrátokat egy eltérő koncepció alkalmazásával. Kiindulásként a prolin irányított MAPK foszforilációs hely környezetében preferált szekvencia motívumot azonosították egy random pozicionális peptid könyvtár segítségével, majd ezt a motívumot használták bioinformatikai szűrésre (Sörensson et al., 2012). A számítógépes szubsztrát azonosítás tehát egy működőképes megközelítésnek tűnik, ami minden bizonnyal nagyobb jelentőségre tesz szert a jövőben. Az ilyen módszerek fejlődésével kiaknázzhatóvá válik a megközelítés egyik fontos előnye a kísérletes nagy áteresztőképességű szűrésekkel szemben, hogy az *in silico* szűrés hatékony marad az alulreprezentált (pl. csak speciális sejttípusokban vagy specifikus körülmények között expresszált) szubsztrátok esetében is (Whisenant et al., 2010).

Egy adott fehérje, a vizsgált kináz által történő foszforilációját első lépésként általában *in vitro* kináz teszttel igazolják, ahol tisztított kináz és szubsztrát fehérjéket radioaktív jelölt ATP jelenlétében inkubálják. A szubsztrát molekulára történt foszfátranzfer mértékét, a szubsztrát SDS-PAGE szeparálását követően, a radioaktív szignál intenzitásának meghatározásával állapítják meg (pl. autoradiográfiával). A módszernek komoly hátrányai vannak, egyrészt a sejtbeli szabályozási környezetből eltávolított, magas koncentrációjú fehérjék alkalmazása (Peck, 2006; Pan et al., 2009), másrészt a sugárveszély. A sugárveszély tiofoszforiláció alkalmazásával kiküszöbölhető (Leissing et al., 2016).

In vivo szubsztrát foszforiláció detektálására egyre nagyobb teret nyerő megközelítés az eltérően foszforilált protein izoformák elválasztása növényi eredetű mintákból. Bizonyos esetekben a foszforilált protein izoformák eltérően migrálnak standard SDS-PAGE elválasztás során, ami immunoblot módszerrel alkalmas a foszforiláció vizsgálatára, pl. (Li et al., 2015; Palm-Forster et al., 2017; Pecher et al., 2014; Xu and Chua, 2012). A foszforilációt végző kinázok túlexpresszálo vagy funkcióvesztő növényanyagok használatával azonosíthatóak, habár a redundancia az utóbbi módszer esetében problémát okozhat. Az elválasztó gélt foszfátkötő komponenssel kiegészítve jelentős mértékben felerősíthető az eltérő migráció mértéke (phos-tag technológia) (Kinoshita et al., 2006). A phos-tag mobilitás váltás módszerrel igazolták például a WRKY34 MPK3/6 általi foszforilációját a hím gametogenezis folyamatában, ahol a redundancia problémáját is sikeresen kiküszöbölték a T-DNS inszerció és RNS interferencia kombinációjával (Guan et al., 2014). Az eltérően foszforilált izoformák phos-tag módszerrel történő elkülönítése tehát egyértelműen kezd teret nyerni, mint fehérjefoszforilációs kísérleti megközelítés (pl. Bethke et al., 2009; Mao et al., 2011; Meng et

al., 2013; Patharkar and Walker, 2015; Furlan et al., 2017). Habár a növényi fehérjék elleni specifikus antitestek elérhetősége jelenthet egy szűk keresztmetszetet, azonban ez a probléma epitóp-jelölt fehérjeformák használatával kiküszöbölhető.

A fehérje izoformák szeparálásának klasszikus módszere a kétdimenziós elektroforézis, ahol a fehérjéket először izoelektromos pontjuk alapján választják szét (izoelektromos fókuszálás), majd erre merőlegesen, molekulatömeg szerint is elválasztják őket. Pl. a PATL2 MPK4 általi foszforilációját 2D-Western blotolással mutatták ki, ahol három izoforma relatív arányának változását hasonlították össze (Suzuki et al., 2016). Ennek a módszernek egy újszerű technológiai továbbfejlesztése a kapilláris izoelektromos fókuszálással kapcsolt nanofolyadék immunteszt (capillary isoelectric focusing coupled nanofluidic immunoassay) (cIEF immunteszt/cIEF-immunoassay), ami lehetővé teszi a minták kapillárisban történő, automatizált, magas felbontású izoelektromos fókuszálást majd egyben a kapillárisban történő immunetekcióját (O'Neill et al., 2006).

A MAPK jelátvitel biológiai funkcióinak 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 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)). Az etilén, mint fontos növényi hormon, szerepet játszik a környezeti válaszok és a növényfejlődés különböző aspektusainak szabályozásában, a MAPK jelátvitelt összefüggésbe hozták, mind az etilén bioszintézissel, mind az etilén jelátvitellel (Hahn and Harter, 2009; Xu and Zhang, 2014). Ennek megfelelően, szubsztrát szinten is mindkét folyamatban résztvevő fehérjéket azonosítottak (pl. Liu and Zhang, 2004; Yoo et al., 2008).

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 (Dóczi and Bögre, 2018), ahol részletesen bemutatjuk az egyedileg jól jellemzett növényi MAPK szubsztrátokat (4. ábra).

dc_2005_22

foszforilációja fokozza DNS-kötő aktivitását (Park et al., 2021), a különböző fejlődési folyamatok szabályozásában résztvevő MYB75 transzkripció faktor (Kreynes et al., 2021), és a paradicsommagok csírázását és ABA jelátvitelét szabályozó SnRK fehérjék (Song et al., 2021).

3. A kutatások célkitűzései

Mivel posztdoktori kutatásaimat az Arabidopsis genom, illetve közvetlenül az abban kódolt annotált MAPK jelátviteli génkészlet publikálását követően kezdtem 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 ismereteink 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 kinázkutatás 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 ismertek evolúciós hátterének kialakításához kívántunk hozzájárulni. Az alacsonyabb rendű növények, mint pl. a zöldség génomjában 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 alapkutatói 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 zöldség MAPK jelátvitel reverz genetikai funkcionális vizsgálatát *C. reinhardtii* mutánsok felhasználásával.

4. Módszerek

4.1. Növényanyagok

4.1.1. *Arabidopsis* növényanyagok és nevelési körülmények

Lúdfű kísérletekben *Arabidopsis thaliana* Columbia (Col-0) ökotípusú növényanyagokat használtunk. A magokat $0,5 \times$ Murashige & Skoog (MS) táptalajon (Sigma-Aldrich vagy Duchefa) csíráztattuk, a csíranövényeket $21\text{--}23\text{ }^{\circ}\text{C}$, $60\text{--}70\%$ relatív páratartalom és $140 (\pm 20) \mu\text{mol/m}^2/\text{sec}$ hideg fehér fényen, hosszúnappalos (16 h fény/8h sötét) körülmények mellett neveltük. A T-DNS inszerciós vonalakat a Nottingham Arabidopsis Stock Centre-ből szereztük be, a genotipizálás során polimeráz láncreakcióval (PCR) ellenőriztük az inszert jelenlétét, a beépülési pozíciót Sanger szekvenálással igazoltuk (Dóczi et al., 2007, 2019). Transzgénikus *Arabidopsis* vonalakat virágmerítéses módszerrel állítottuk elő (Clough, 2005), *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (Koncz and Schell, 1986) törzset használva.

A merisztémaaktivitás mérésére de-etiolációs kísérleti rendszert használtunk (Dóczi et al., 2019; López-Juez et al., 2008). E célból standard módon sterilizált és hidegkezelt magokat 72 órán keresztül, teljes sötétségben csíráztattunk. Az etiolált csíranövényeket ezután standard nevelési körülmények között, folyamatos fényen neveltük tovább, majd a megfelelő mintákat különböző időpontokban begyűjtöttük. Mintánként 20-40 csíranövényt mértünk. Acetonos fixálást követően a tárgylemezre Hoyer oldatban (80 g klorálhidrát, 10 ml glicerin 30 ml vízben) rögzítettük a csíranövények merisztémarégióját. A fejlődő levélprimordiumok területét az ImageJ szoftver használatával kvantifikáltuk. A kísérleteket minimum háromszor ismételtük meg, hasonló eredményekkel.

4.1.2. *Pseudomonas* fertőzési teszt

Pseudomonas syringae pv tomato DC3000 (*Pst* DC3000) törzset King's B tápoldatban (Weigel and Glazebrook, 2002) növesztettük, majd centrifugálást követően a sejteket 10 mM MgSO_4 és $0,02\%$ SilwetL-77-ben 10^6 cfu/ml sűrűsége hígítottuk. A növényeket merítéssel fertőztük, majd a bakteriális növekedést 10 mM MgSO_4 -ban dörzsölt levélminták 25 mM/ml rifampicin tartalmú King's B lemezek szélén szétterítve hígítási sorokkal kapott telepszámok alapján határoztuk meg, Weigel és Glazebrook (2002) módszerével. A statisztikai analíziseket SPSS 10.07 programmal végeztük el. Az összes replikáció adatainak log transzformációja után az

átlagértékek többszörös összehasonlítására normális eloszlás szerint egyszempontos varianciaanalízissel Tukey HSD próbát végeztünk.

4.1.3. Sejtkultúra, protoplasztálás, tranziens transzformáció

A sejtkultúra fenntartás, protoplasztálás, tranziens transzformáció, *in vitro* kináz teszt, és riporter teszt pontos, reprodukálható protokollját egy módszertani könyvfejezetben teljes részletességgel leírtuk (Dóczi et al., 2011).

Munkánk során a Koncz Csaba csoportjában (Max-Planck-Institut für Pflanzenzüchtungsforschung, Köln, Németország) *Arabidopsis* Col-0 gyökérből indított sejtkultúrát használtuk protoplasztok előállítására (Mathur and Koncz, 1998a, 1998b). A sejtkultúrát szobahőmérsékleten, sötétben, heti 1:5 arányú hígítással, frissen készített *Arabidopsis* táptalajban (4,414 g/l MS, B5 vitaminok (Duchefa), 30 g/l szacharóz, 1 mg/l 2,4-diklórfenoxiecetsav (2,4-D), pH 5,7) tartottuk fent.

Protoplasztáláshoz 3-4 nappal a hígítás utáni sejteket használtunk. A sejtfalat B5-GM (3164 mg/l B5 por (Duchefa), 0,34 M glükóz, 0,34 M mannitol, pH 5,5) táptalajban 0,5% celluláz és 0,1% macerozim (Yakult vagy Serva) enzimmel inkubálva távolítottuk el. Tranziens expresszióhoz 6×10^6 protoplaszt/ml végső koncentrációra beállított szuszpenziót használtunk. Transzformációhoz mintánként $1-3 \times 10^5$ protoplasztot és 5 μ g DNS-t használtunk minden egyes plazmid konstrukcióból (maximum 15 μ g/minta). A transzformáció hatékonysága szempontjából a baktériumból tisztított plazmid DNS tisztasága kritikus, e célból QIAGEN Plasmid Maxi kitet (QIAGEN) használtunk. Ezt 10–15 percig inkubáltuk PEG oldattal (25% PEG 6000, 0,45 M mannitol, 0,1 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$), amit 0,275 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ oldattal mostunk el, végül a protoplasztokat B5 GM táptalajban inkubáltuk felhasználásig.

4.1.4. *Chlamydomonas reinhardtii* tenyésztésanyagok és nevelési körülmények

A *Chlamydomonas* MAPK funkcionális kísérleteink eredményeit e sorok írásakor még nem publikáltuk, így az alábbiakban ezeket a módszereket teljes részletességgel bemutatom.

A *Chlamydomonas reinhardtii* – CC-5325 törzset, és az ebben a háttérben előállított *mkk1* és *mpk8* inszerciós mutáns vonalakat (LMJ.RY0402.148994 és LMJ.RY0402.137651) a *Chlamydomonas* Resource Center-ből (University of Minnesota, USA; chlamycolection.org) szereztük be, genotipizálásukhoz a G1, G2 és I1, I2 primerpárokat használva és a PCR termékek szekvenálásával igazoltuk az inszerciók jelenlétét a várt pozíciókban (Li et al., 2016).

A folyadékkultúrákat Erlenmeyer lombikokban, Tris-acetát-foszfát (TAP) táptalajban folyamatos megvilágítás mellett rázatva inkubáltuk. A TAP táptalaj összetétele: TAP-

/Beijerinck sók (7 mM NH_4Cl , 0,34 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,4 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, foszfát oldat (1,3 mM KH_2PO_4 , 0,62 mM K_2HPO_4), 0,02 M Tris-HCl, Hutner féle nyomelem oldat (0,13 mM Na_2EDTA , 0,018 mM $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,07 mM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,18 mM H_3BO_3 , 0,031 M $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 6,5 μM $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 6,2 μM $\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 6,7 μM $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Hutner et al., 1950) és 1ml/l jégecet, pH 7,0 (KOH hozzáadásával).

10 ml starter kultúrát egy napig inkubáltuk egy asztali rázólapon (130 rpm), szobahőmérsékleten (~ 24 °C), folyamatos megvilágítás mellett (70 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$). A starter kultúrákat ötször hígítottuk, majd a kezelések előtt további három napig inkubáltuk azonos körülmények mellett. A kezelést megelőzően a kultúrákat egységesen 0,2 optikai denzitásra (OD; $\lambda=750$ nm) állítottuk be. A kezeltlen kontroll mellett a mintákat különböző végkoncentrációjú paraquat (methyl viologen dichloride, 98%, Sigma Aldrich) hozzáadásával inkubáltuk tovább. Előzetes kísérleteikben megállapítottuk, hogy a fenti nevelési körülmények mellett az OD érték a kultúrák sejtszámával egyenesen arányos, így a kísérleti kultúrák növekedését spektrofotometriával mértük a kezelés kezdetétől négy napon át (stacionárius fázisig). A kísérleteket három független biológiai ismétlésben végeztük el, hasonló eredményekkel.

A fotoszintetikus aktivitás méréséhez a három *Chlamydomonas* genotípust (vad típusú CC-5325, *mkk1* és *mpk8*) a fenti körülmények között előneveltük és ötször hígítottuk, amíg középső exponenciális fázisnak megfelelő sűrűséget értek el (~ 100 sejt/ml). Mindegyik kultúrából 3 ml-t kis Petri csészékbe helyeztünk (egy csésze kezelésként) majd a megfelelő végkoncentráció szerinti mennyiségű paraquatot adtuk a tápfolyadékhoz. A kultúrákat változatlan körülmények mellett 24 órán át inkubáltuk. A II. fotokémiai rendszer (PSII) maximum kvantum hatékonyságát mérő Fv/Fm paramétert 2, 4, 6 és 24 órával a kezelés kezdete után határoztuk meg pulzus amplitúdó modulációs fluorométerrel (Imaging-PAM M-Series fluorometer; Walz, Effeltrich). Ehhez a mintákat 30 percig sötét adaptáltuk, majd egy LED Array Illumination Unit IMAG-MAX/L ($\lambda=450$ nm) által gerjesztett, 1,0 s telítési pulzus (PPFD= $3000 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) hatására az Fv/Fm értéket a van Kooten és Snel által meghatározottak szerint határoztuk meg (van Kooten and Snel, 1990). A kísérletet három független biológiai ismétlésben végeztük el, hasonló eredményekkel.

4.2. Molekuláris biológiai módszerek

4.2.1. Polimeráz láncreakció (PCR), DNS klónozás, helyirányított mutagenézis

A kereskedelmi forgalomban beszerezhető molekuláris biológiai kiteket mindig a gyártó által biztosított protokollok szerint használtuk. Általános DNS klónozási céljokra *Escherichia coli* DH5 α törzset használtunk.

A klónozás céljából végzett PCR reakciókhoz magas másolási hűségű DNS polimerázt (Pfu (Thermo Fisher) vagy Pwo (Merck)) használtunk. Detekciós célú PCR reakcióknál Taq polimerázt (Thermo Fisher) használtunk. Klónozáshoz végzett PCR amplifikációk estében 28-32, detekciós PCR reakcióknál 35-40 ciklusszámot alkalmaztunk. A denaturáció/primercsatolás/lánchosszabbítás idejét általában 30/30/60 másodpercre állítottuk, a lánchosszabbítás idejét hosszabb (>1 kb) termék esetén a polimeráz gyári instrukcióinak megfelelően arányosan megemeltük. A primercsatolási hőmérsékletet a gyártó által megadott értékek szerint alkalmaztuk, esetlenként online eszköz használatával számoltuk (tmcalculator.neb.com).

A PCR terméket Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research) segítségével izoláltuk. A PCR fragmenteket pGEM-T Easy klónozóvektorba ligáltuk, pGEM-T Easy Vector Systems TA-klónozó kit (Promega) segítségével. Mivel a magas másolási hűségű DNS polimerázok a 3' túlnyúló adenint eltávolítják, a hatékony T/A klónozáshoz azt a reakcióelegy fagyasztásával inaktiváltuk, majd 10 perc, 72 °C-os inkubálás mellett Taq polimerázzal csatoltunk 3' túlnyúló adenint a szintetizált DNS szálakhoz.

A kompetens DH5 α *E. coli* sejteket Mix & Go kit (Zymo Research) használatával, házilag állítottuk elő. A gyártói protokoll szerint elvégzett hősokk transzformációt követően a szélesztett kultúrát 100 μ g/ml ampicillint tartalmazó szelekciós LB táptalajon (10 g/l Tryptone, 5 g/l élesztőkivonat, 5 g/l NaCl, 15 g/l agar, pH 7,0) inkubáltuk éjszakán át 37°C -on. Plazmid DNS izolálást EZ-10 Spin Column Plasmid DNA Miniprep Kittel (Bio Basic) végeztük. A klónozott fragmentek helyességét szekvenálással (Macrogen Europe) ellenőriztük. A DNS klónok különböző célvektorokba történő szubklónozását a megfelelő restrikciós helyeket felhasználva végeztük, az egyes konstrukciók előállításához használt konkrét restrikciós klónozási módszereket az értekezés alapjául szolgáló közleményekben részletesen leírtuk. A restrikciós endonukleázokat, T4 DNS-ligázt, és egyéb módosító enzimeket, dNTP nukleotidokat, valamint az enzimreakciókhoz szükséges pufferoldatokat a New England Biolabs, a Promega és a Fermentas/Thermo Fisher cégektől szereztük be.

Helyirányított mutagenézist a QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies) használatával végeztünk. A mutagén PCR után a templát (nem mutált) plazmidokat DNS metiláció függő *DpnI* restrikciós endonukleázzal emésztve távolítottuk el. A gyártói protokolltól annyiban térünk el, hogy a reakcióterméket a klónozási reakciókhoz is rutinszerűen használt kompetens *E. coli* DH5 α sejtekbe transzformáltunk (Mix & Go Kit, Zymo Research), mivel azok kompetenciája e célra is megfelelően magasnak bizonyult.

A molekuláris klónozáshoz, illetve a helyirányított mutagenézishez használt oligonukleotidok szekvenciáit az értekezés alapjául szolgáló közleményekben bemutattuk.

4.2.2. RNS tisztítás, kvantitatív RT-PCR

Teljes RNS kivonást Qiagen RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) használatával gyártói utasítások szerint végeztünk. Az opcionális DNáz kezelést Qiagen DNase away (Qiagen) használatával végeztük el. cDNS szintézist oligo(dT)₁₅ primerrel és M-MLV reverz transzkriptáz enzimmel (Promega) végeztünk. A kvantitatív RT-PCR reakciókat CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) készülékkel, KAPA SYBR FAST, Master Mix Universal qPCR Kit (Kapa Biosystems) használatával végeztük.

4.3. Fehérje biokémiai módszerek

4.3.1. Kvantitatív élesztő kéthibrid teszt

A kvantitatív élesztő kéthibrid teszteket Teige et al., (2001) módszere szerint L40 élesztőtörzsszel végeztük. Az MKK LexA-BD fúziós konstrukciókhoz pBTM116 (Vojtek et al., 1993), míg a MAPK Gal4-AD fúziós konstrukciókhoz pGAD424 (Clontech) vektorokat használtunk. A sejt kivonatokot 2 mM o-nitrofenil- β -D-galactopiranozid szubsztráttal inkubáltuk, az interakciót β -galaktozidáz aktivitás (unit) / milligramm protein értékben fejeztük ki.

4.3.2. Növényi fehérje tisztítás és immunblottolás (Western blot)

A folyékony nitrogénben lefagyasztott növény-, illetve protoplasztmintákat Lacus pufferben tártuk fel (Bögge et al., 1999); 25 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 15 mM etilén-glikol-tetra-acetát, 75 mM NaCl, 1 mM ditiotreitól, 1 mM NaF, 0,5 mM Na₃VO₄, 15 mM β -glicerofoszfát, 15 mM para-nitrofenil-foszfát, 0,1% Tween 20, 1 tabletta Complete proteinázgátló keverék (Merck), és 40 perc, 18 000 g-vel, 4 °C-on történő centrifugálással

szeparáltuk. A minták fehérjekoncentrációit Bradford-módszerrel (Bradford reagens, ready-to-use, Fermentas), 595 nm hullámhosszon, spektrofotometriával mértük.

A fehérjemintákat redukáló felvivőpufferrel (5x Lane Marker, Thermo Scientific) 95 °C-on 5 percig inkubáltuk, majd 10%-os SDS poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) elválasztottuk SE250 elektroforézis készülékben (Hofer), Tris-glicin SDS pufferben (Lonza). Az így elválasztott fehérjéket Tris-glicin pufferben (Lonza) Immobilon-P polivinilidén-difluorid membránra (Millipore) blottoltuk, TE22 Mighty Small (Hofer) elektroblottoló készülékkel.

Az 5% zsírszegény tejjel blokkolt membránt a megfelelő antitesttel éjszakán át, 4 °C-on, foszfátpufferelt fiziológiás sóoldatban (PBS) (Lonza) 0,1% Tween-20-szal, 75 rpm-en rázatva inkubáltuk. Amennyiben az elsődleges antitest nem volt tormaperoxidázzal (HRP) konjugált, akkor mosást (PBS, 0,1% Tween 20) követően HRP konjugált másodlagos antitesttel 1 óráig szobahőmérsékleten inkubáltuk. A membránkötött HRP konjugált antitestek detektálását kemilumineszcens szubsztráttal (Pierce ECL Western Blotting Substrate, Thermo Scientific) végeztük, amit röntgenfilmen (CLXposure film, Pierce) mutattunk ki. Az egyes felhasznált antitesteket az értekezés alapjául szolgáló közleményekben bemutattuk.

4.3.3. Rekombináns fehérjék tisztítása

Glutation S-transzferáz (GST) fúziós rekombináns MAPK fehérjéket pGEX4-T1 vektorban (Amersham Pharmacia Biotech), *Escherichia coli* BL-21 codon plus (Stratagene) törzsben kifejezve állítottunk elő. A baktériumkultúrák növesztését és a fúziós fehérjék tisztítását Matsuoka et al., (2002) módszere szerint végeztük. A transzformáns *E. coli* kultúrát ampicillin tartalmú LB tápoldatban, 37 °C-on növesztettük $A_{600}=0,3$ optikai denzitásig, majd további 20 órán át 21 °C-on, 0,1 mM IPTG (izopropil- β -D-tiogalaktopiranozid) indukálószer mellett. A fehérjetisztást 4 °C-on végeztük. A centrifugálással összegyűjtött sejteket PBS mosást követően 0,5% Triton X-100 és 1mM fenilmetilszulfonol fluorid (PMSF) tartalmú PBS-ben szuszpendáltuk, majd szonikálással lizáltuk. A felülúszóhoz glutation szefaróz 4B-t adtunk (Amersham Pharmacia Biotech). Keverés és PBS mosás után a gyöngyöket 50 mM Tris-HCl-ben (pH 7,5) oldott 10 mM redukált glutationnal eluáltuk.

A szubsztrát foszforilációs kísérletekhez használt rekombináns fehérjéket Nagy és Mészáros, (2014) szerint, *in vitro* transzkripció/transzláció módszerrel állítottuk elő. E célból a kódoló szekvenciákat pEU3-NII-GLICNot vektorba szubklónoztuk ligázmentes klónozással (Bardóczy et al., 2008). Az *in vitro* mRNS szintézist TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kittel (Thermo Scientific), a sejtmentes transzlációt WEPRO7240H Expression Kittel (Cell

Free Sciences, Japan) végeztük. A transzlációs elegyhez a His6-fúziós az MPK3 és MPK6 foszforilációs elegyben történő aktiválása céljából konstitutívan aktív myc:MKK4-et, míg az MPK4 mellé MKK1-et kódoló mRNS-t is adtunk.

Az *in vitro* transzlált His6-MAPK fehérjét TALON mágnese gyöngyön (Clontech), az *in vitro* transzlált GST fúziós MAPK szubsztrát fehérjét pedig Gluthation Magnetic Beads-en (Thermo Scientific), affinitáskromatográfiával tisztítottuk.

4.3.4. In vitro kináz teszt

A MAPK-ok MKK általi foszforilációjának vizsgálatához 1 mg rekombináns GST-MAPK fehérjét 15 µl kináz reakció pufferben (50 mM Tris, pH 7,5, 1 mM DTT, 10 mM MgCl₂, 0,1 mM ATP, és 3 mCi of [γ-³²P]ATP), protoplasztból immunoprecipitált myc:MKK3 (vad típus vagy konstitutívan aktív változat) fehérjével inkubáltuk.

A szubsztrát fehérjék MAPK általi foszforilációjának vizsgálatához 300, illetve 100 ng *in vitro* transzlált, affinitástisztított szubsztrát, illetve kináz proteint használtunk. Kontrollként 10 µg MBP-t (myelin basic protein), egy generikus MAPK szubsztrát szolgált. A reakcióelegy összetétele a következő volt: 20 mM N-2-hidroxietyl-piperazin-N'-2-etán-szulfonsav, pH 7,5, 100 µM ATP, 1 mM ditiotreitól, 15 mM MgCl₂, 5 mM etilén-glikoltetra-acetát, 5 µCi [γ-³²P]ATP és gyöngyözött kötött GST-szubsztrát fúziós fehérje.

Minden kináz reakciót szobahőmérsékleten 30 percig végeztünk, majd SDS felvivő puffer hozzáadását követően 2 perces 95 °C-os hőkezeléssel állítottuk le. A reakciótermékeket SDS-PAGE elválasztást követően autoradiográfiával és Coomassie Brilliant Blue R 250 festéssel értékeltük ki.

4.3.5. Ko-immunprecipitáció

Ko-immunprecipitáció céljából 50 mM Tris, pH 7,8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,1% Nonidet P-40, és proteáz inhibitor mix (Roche) összetételű fehérjekivonó puffert használtunk. 500 mg proteint tartalmazó kivonatot 50 µl protein A-szefaróz gyönggyel 2 órán át 4 °C-on előtisztítottunk, majd éjszakán át 50 µl gyönggyel a megfelelő antitest jelenlétében végeztük a ko-immunprecipitációt. A mintákat háromszor mostuk (50 mM Tris, pH 7,8, 150 mM NaCl, 5 mM EGTA, 5 mM EDTA, és 0,1% Tween 20), majd immunblot detekciót végeztünk.

Az anti-MPK7 antitestet az Eurogentec állította elő, nyúl immunizációval, egy szintetikus C-terminális H2N-LYYHPEAEISNA-COOH peptid ellen.

4.3.6. Immunkomplex kináz teszt

Az immunkomplex kináz teszteket Cardinale et al. (2002) szerint végeztük. Azonos fehérjemennyiséget tartalmazó fehérjekivonatokat immonprecipitáltunk 30 µl protein A-szefaróz gyöngyökkel. A gyöngyöket először kétszer mosó pufferben (50 mM Tris, pH 7,4, 250 mM NaCl, 5 mM EGTA, 5 mM EDTA, 0,1% Tween 20), majd egyszer kináz reakció pufferben (20 mM HEPES, pH 7,4, 10 mM MgCl₂, 5 mM EGTA, 1 mM DTT) mostuk. Az immunprecipitált fehérjékkel 15 µl 5 mg MBP-t, 0,1mM ATP-t és 3 mCi [γ -³²P]ATP-t tartalmazó kináz reakció pufferben végeztük el a kináz reakciót. Az MBP foszforilációt 15% SDS-PAGE szeparációt követően autoradiográfiával vizualizáltuk.

4.3.7. Kapilláris izoelektromos fókuszálással kapcsolt nanofolyadék immuneszt (cIEF immuneszt)

A cIEF immuneszt (capillary isoelectric focusing coupled nanofluidic immunoassay (cIEF-immunoassay)) kísérleteket NanoPro100 (ProteinSimple) készülékkel végeztük. A reagenseket és a fogyóeszközöket a ProteinSimple cégtől szereztük be. A kísérletek során minden lépést 4 °C-on, egy hűtődobozban végeztünk el. A folyékony nitrogénben gyorsfagyasztott protoplastokat 100 µl végtérfogatban kioldással 10s vortexeléssel lizáltuk (94 µl Bicin/CHAPS puffer, 4 µl vízoldható inhibitor mix, 2 µl DMSO inhibitor mix). A lizátumokat centrifugálással választottuk szét (14 000 rcf, 40 perc, 4 °C), a felülúszók fehérje koncentrációját NanoDrop spektrofotométerrel (Thermo Scientific), 280 nm-en mért abszorbancia mérésével határoztuk meg. A minták végkoncentrációját 0,1 mg/ml-re állítottuk be.

146,7 µl Premix G2 pH 3–10 vagy 5–8 szeprációs grádiens 3,3 µl pI Standard Ladder pI referencia sorral voretexeléssel összekevertünk. Mintánkként 4 µl lizátumot (0,1 mg/ml) adtunk 12 µl szeprációs grádiens/pI standard keverékhez, amiből a NanoPro lemez „A” sorába mintánkként 4-4 µl-t vittünk fel. 10 µl elsődleges antitestet 1:50 arányban Antibody Diluent oldatban hígítottunk, amit a „B” sorba vittünk fel. 10 µl tormapeoxidáz (HRP) konjugált másodlagos antitestet, Antibody Diluent oldatban 1:100 arányban hígítva a „C” sorba vittünk fel. Amennyiben az elsődleges antitest közvetlenül HRP konjugált volt, a „C” sorba 10 µl Antibody Diluent oldatot vittünk fel. Az így összeállított lemezt 2 500 rcf-en, 5 percig 4 °C-on centrifugáltuk, majd a „D” sorba 500 µl 1:1 arányú Luminol – Peroxide oldatot, az „E” sorba pedig 1800 µl Wash Buffert vittünk fel. Miután a kapilláris vájakba 900 µl elektrolit oldatot vittünk fel, a lemezt a mintatartóba helyeztük, és helyreillesztettük a kapilláris patront.

A szeparálás és detektálás minden lépése a NanoPro rendszerben automatikusan, előre programozottan történt. Az izoelektromos fókuszálás 15 mW-tal, 30 percig történt. Az izoelektromos pont szerint elválasztott fehérjék rögzítése a kapillárisban 100 s UV megvilágítással, a gyári beállítások szerint történt. Az elsődleges és másodlagos antitestekkel két, illetve egy órás inkubációs időt alkalmaztunk, minden inkubálási lépés előtt a kapillárisokat kétszer 150 másodpercig mostuk. A kemilumineszcens detekciót 60, 120, 240, 480 és 600 másodperces expozíciós időkkel végeztük. Adatfeldolgozásához a Compass szoftvert (ProteinSimple) használtuk. Minden kísérletet legalább háromszor elvégeztünk, konzisztens eredményekkel.

4.3.8. Tömegspektrometria

In vitro foszforilációs reakcióból származó GST:PIN1-HL fehérjeizolatot gélben történt emésztést követően, folyadékkromatográfiával (LC-MS/MS), Orbitrap Elite tömegspektrométerrel analizáltuk. A minta 75%-át foszfopeptid dúsítást követően, a maradék 25%-ot dúsítatlanul vizsgáltuk. A Proteome Discoverer szoftverrel (Thermo Fisher Scientific) generált csúcslistát a Swissprot adatbázisban illesztettük, ProteinProspector keresőmotorral. A részletes kísérleti körülmények Dory et al. (2018) publikációjában elérhetőek.

4.3.9. GUS aktivitás meghatározása

Hisztokémiai festést Jefferson (1987) módszere nyomán, 5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -glükuronsav szubsztrátot használva Mohammed et al. (2018) szerint végeztük. Fluorimetriai méréshez a fehérjekivonatot és a GUS aktivitás mérését Jefferson (1987) szerint végeztük. A kivonatok a Bradford reakcióval meghatározott fehérjekoncentráció alapján standardizáltuk.

4.4. Mikroszkópos módszerek

A GUS festések eredményeit és az *in vitro* csíranövények fejlődését különböző típusú sztereómikroszkópokkal rögzítettük.

A de-etiolációs kísérletek során Nikon Optiphot 2 mikroszkóphoz illesztett Nikon DXM1200 digitális kamerával készítettünk fényképeket. Statisztikai analízis céljából a levélkezdemények területét ImageJ szoftverrel (National Institutes of Health, United States) határoztuk meg.

Immunfluoreszcencia vizsgálatokhoz Zeiss LSM 5 DUO pásztázó mikroszkópot, fluoreszcens fehérjék detektálásához Leica TCS SP8 konfokális mikroszkópot használtunk.

4.5. *Bioinformatikai módszerek*

A létrehozott vektorkonstrukciókat egy plazmidtérképeket kezelő szoftvercsomag, a Clone Manager (Sci-Ed) segítségével tartottuk nyilván, amit a restrikciós emésztések tervezésére, ellenőrzésére is használtunk. Homológia keresésre az NCBI BLAST felületet használtuk, szekvenciaillesztéseket és filogenetikai analíziseket részben az EBI ClustalW és MUSCLE böngészőalkalmazásaiban, részben pedig a MEGA5/6 programcsomagokkal végeztük. Szekvencia logókat a WebLogo alkalmazással állítottunk elő (Crooks et al., 2004). Szekvenálási eredmények ellenőrzésére a Clone Manager szoftver páros szekvenciaillesztő alkalmazását használtuk. Oligonukleotid primerek tervezéséhez a Clone Manager vagy a Primer3 (<http://primer3.sourceforge.net/>) szoftvereket vettük igénybe.

MAPK szekvenciák azonosítására alga proteomokban a 20 Arabidopsis MAPK kináz domén szekvenciáinak illesztésével hmmbuild-del kialakított Hidden Markov Model (HMM) profilt alkalmaztunk. Az így kapott szekvenciákat a HMMER 3.036 hmmscan csomagjával szűrtük, majd a fennmaradó szekvenciákat egyesével ellenőrizve választottuk ki a kanonikus MAPK szekvenciákat.

5. Eredmények

5.1. Az MKK3 jelátviteli pálya azonosítása és szerepe a biotikus stressz válaszban

5.1.1. Új MAPK jelpályák térképezése irányított élesztő két-hibrid tesztekkel

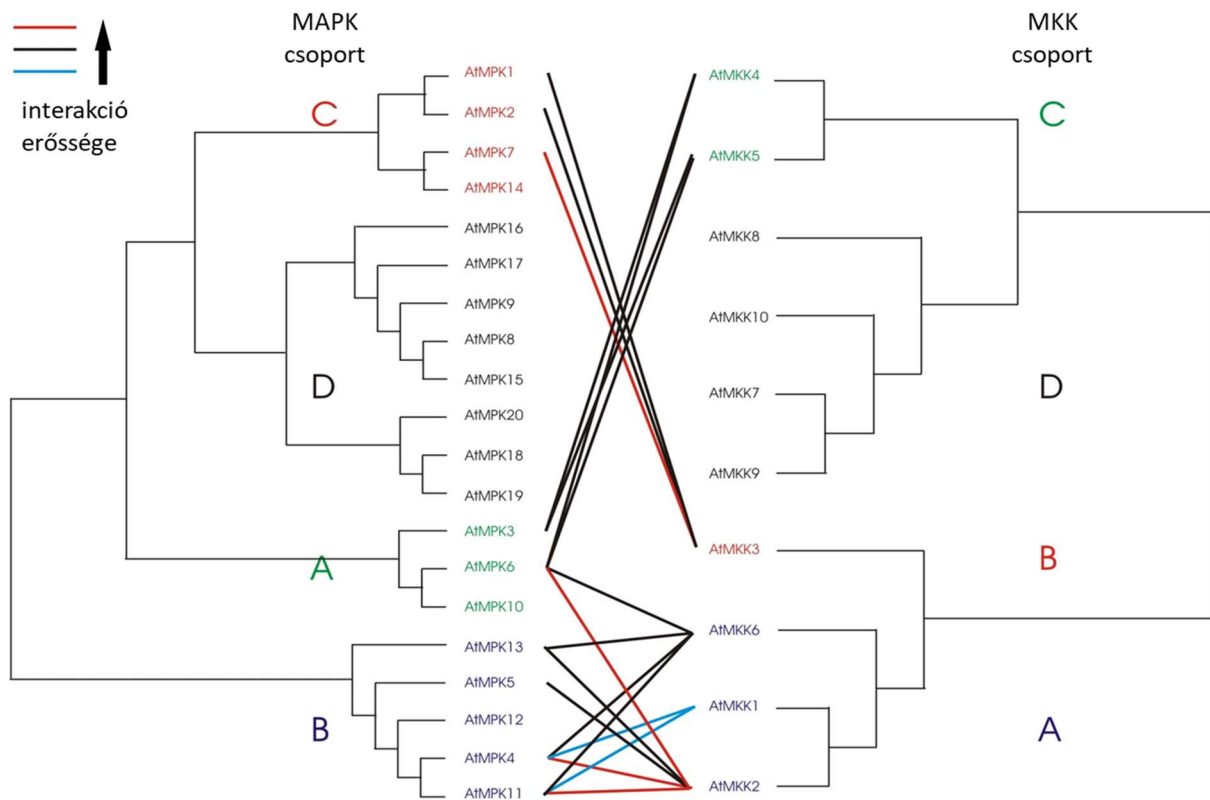
Az Arabidopsis genom publikálása, majd a MAPK gének annotációja lehetővé tette az Arabidopsis genomban kódolt valamennyi MAPK szisztematikus vizsgálatát, ami a korábbi, véletlenszerű génazonosításokhoz képest egy paradigmaváltást jelentett a növényi MAPK jelátvitel kutatásában. Ebben az izgalmas időszakban kapcsolódtam be a Vienna Biocenterben Heribert Hirt professzor csoportjában végzett Arabidopsis MAPK kutatásokba. Első lépésként előállítottuk az azonosított 20 MAPK és 10 MKK (MAPK fehérjéket foszforiláló kinázok) gén (MAPK Group, 2002) cDNS klónjait RT-PCR alapú klónozással. Szekvencia ellenőrzést követően a cDNS fragmentumokat megfelelő expressziós vektorokba szubklónoztuk. Célunk annak a kérdésnek megválaszolása volt, hogy ezek a kinázok hogyan alkotnak jelátviteli utakat és azok milyen biológiai funkcióval rendelkeznek.

A potenciális MAPK jelátviteli pályák azonosítása céljából az összes MAPK és MKK génpárral irányított élesztő két-hibrid tesztet végeztünk (5. ábra). Ennek eredményként egyrészt igazoltunk az irodalomban már közölt kináz kapcsolatokat (pl. MKK4/5-MPK3/6 (Asai et al., 2002)), másrészt azonosítottunk számos új kapcsolatot, amelyek közül a továbbiakban az MKK2 és MKK3 jelpályáinak részletes funkcionális jellemzését végeztük el (Teige et al., 2004; Dóczi et al., 2007), több más kapcsolatot pedig később más csoportok közöltek, pl. Takahashi et al. (2010).

Az azonosított MKK2-MPK4/6 jelátviteli pálya a hideg és só stressz válasz szabályozásában játszik szerepet (Teige et al., 2004). Különösen érdekes eredménynek tűnt az MKK3-MPK1/2/14 interakciók azonosítása, mert ez két olyan kináz csoport közötti jelpálya létét tárta fel, amelyekről korábban semmilyen publikált adat nem állt rendelkezésre.

Az MKK3 a növényi MKK-k B csoportjához tartozik, ami egy több szempontból is egyedülálló, növény-specifikus MKK csoport (MAPK Group, 2002; Hamel et al., 2006). A B csoport egyik jellegzetessége, hogy minden növénygenomban csak egy gén tartozik ide, másrészt ezek a gének 3' irányban egy NTF (nuclear transfer factor) domént kódoló szakaszt is tartalmaznak. Habár önálló NTF proteineket más eukarióta genomok, így növények is, kódolnak, ez a fajta fúziós MKK-NTF kombináció egy génben, csak növényekben jött létre. Az

MPK1/2/7 pedig a növényi MAP kinázok C csoportjához tartoznak, ami a mai napig egy viszonylag kevésse jellemzett kináz csoport.



5. Ábra Irányított kéthibrid tesztekkel kimutatott MAPK-MKK kölcsönhatások.

Az Arabidopsis MAPK és MKK kódoló cDNS-eket élesztő kéthibrid vektorokba klónoztuk, majd azokkal az összes MAPK-MKK párosítás szerint kvantitatív galaktozidáz tesztek végeztünk. A kináz típusok az ábra bal és jobb oldalán, az Arabidopsis MAPK és MKK proteinszekvenciák alapján létrehozott filogenetikai fák szerint szerepelnek, az egyes filogenetikai csoportok (A-D) feltüntetésével. A detektált kölcsönhatásokat erősségük alapján, színes összekötő vonalak jelzik. A két legfontosabb újonnan felfedezett modul az MKK2-MPK4/6 (Teige et al., 2004) és a az addig nem jellemzett B csoport MKK és C csoport MAPK-ok közötti kapcsolatok (Dóczi et al., 2007).

5.1.2. Az MKK3 C csoportba tartozó MAP kinázokat aktivál és foszforilál

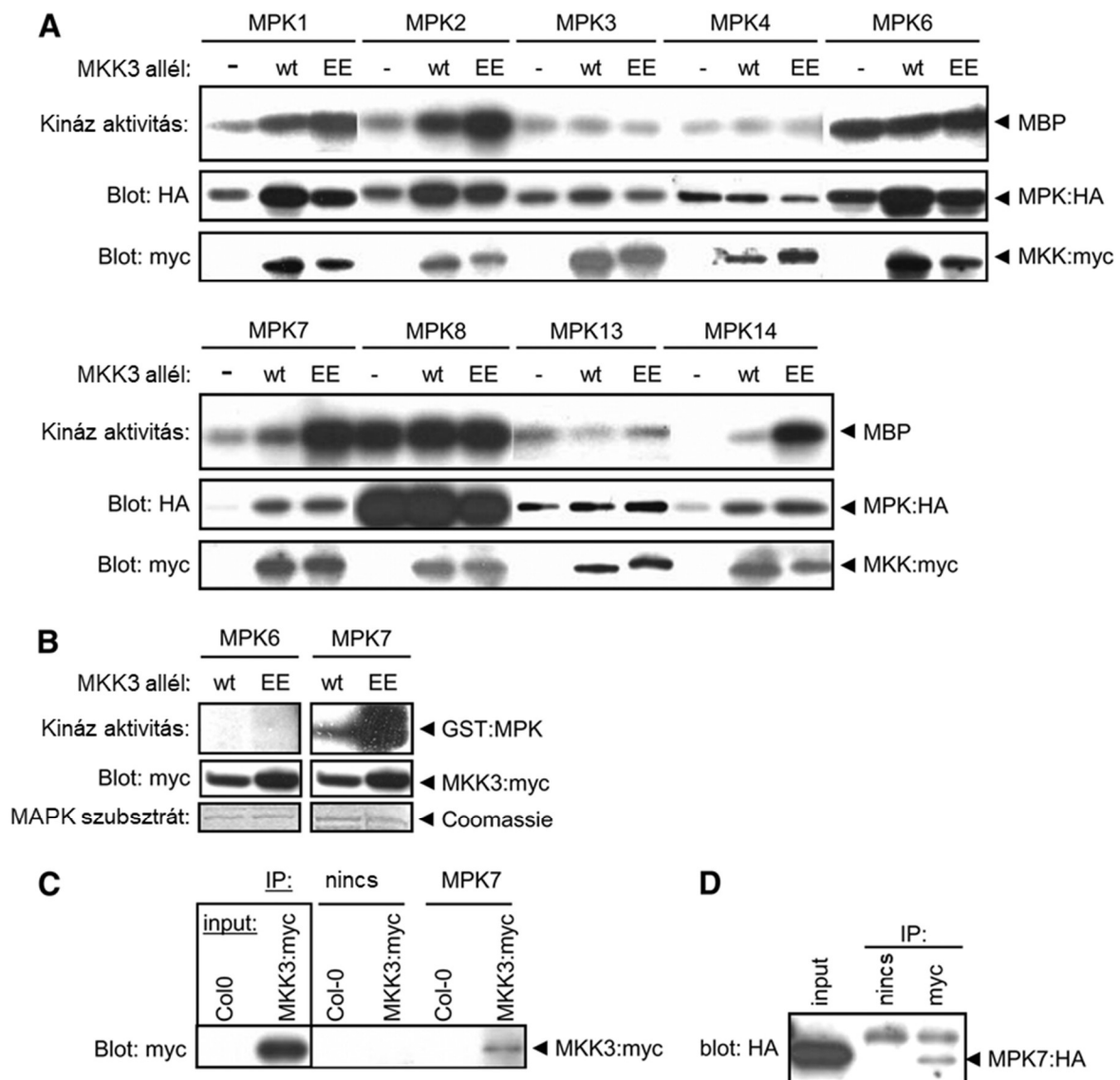
Annak igazolására, hogy az MKK3 képes MAP kinázt aktiválni Arabidopsisban, sejt kultúrából izolált protoplasztokat transzformáltunk kilenc hemagglutinin (HA) epitóp fúziós MAPK konstrukcióval, amelyek mind a négy MAPK csoportot reprezentálják. Ugyanezt a kináz sorozatot ko-transzformáltuk vad típusú és konstitutív aktív myc epitóp fúziós MKK3 konstrukciókkal. A konstitutív aktív változatot helyirányított mutagenézissel állítottuk elő,

az MKK3 mindkét foszforilációs helyét a foszfomimetikus glutaminsavra cserélve (S235E és T241E: MKK3-EE).

Immunprecipitációt követően a MAPK aktivitást *in vitro* kináz teszttel vizsgáltuk, myelin basic proteint (MBP) használva mesterséges szubsztrátként. A konstitutív aktív MKK3-EE kizárólag a C csoportba tartozó MAP kinázok aktiválását eredményezte (MPK1/2/7/14) (6.a ábra), míg más csoportba tartozó MAP kinázok alapaktivitását nem befolyásolta az MKK3 koexpresszió, ami azt sugallja, hogy ezeknek a kinázoknak az MKK3 nem aktivátora. Ahogy azt az immunoblot eredmények mutatják, az MKK3-EE koexpresszió során tapasztalt magasabb C csoport MAPK aktivitás nem a vad típusú MKK3-mal koexpresszáltathoz képest magasabb MAPK protein szintnek köszönhető, hiszen ezen minták között nincs jelentős MAPK protein mennyiség különbség (5.a ábra, középső panelek). Azonban a C csoport MAPK-k jellegzetessége, hogy az MKK3 koexpresszió (vad típus vagy mutáns) következtében, az önálló expresszióhoz képest, protein akkumuláció figyelhető meg. Elképzelhető, hogy ezek a kinázok az MKK3-mal komplexet képezve védettebbek egy degradációs folyamattól, ami egy további szabályozási réteget jelenthet.

Mivel az MPK7 a legerősebb MKK3 interaktor, további munkánk során elsősorban erre a szabályozási kapcsolatra fókuszáltunk. Annak érdekében, hogy igazoljuk, hogy az MKK3 közvetlenül foszforilálja az MPK7-et, rekombináns, kináz inaktív glutation S-transzferáz (GST) fúziós MPK7-et, illetve kontrollként MPK6-ot tisztítottunk (MPK7: K61M/K62R, MPK6 K92M/K93R). Vad típusú és konstitutív aktív MKK3 formákat tranziensen transzformált protoplastokból immunprecipitáltuk, majd megvizsgáltuk képesek-e *in vitro* foszforilálni a tisztított GST:MPK7 és GST:MPK6 fehérjemintákat. Habár a vad típusú MKK3 csak kis mértékben foszforilálta a GST:MPK7-et, a konstitutív aktív MKK3-EE esetében jelentős foszforilációt detektáltunk (6.b ábra). A protoplastból immunprecipitált MKK3 viszont sem vad típusú, sem konstitutív aktív formában nem foszforilálta a GST:MPK6-ot (6.b ábra).

Annak igazolására, hogy az MPK7 és az MKK3 *in planta* komplexet alkotnak, növényanyagokból végeztünk ko-immunprecipitációt (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. Negatív kontrollként a reakciókat antitest hozzáadása nélkül is elvégeztük. Ezt követően a mintákkal anti-myc antitesttel végeztünk immunoblot analízist. Ahogy az a 6.c ábrán látható, az



6. Ábra MAP kinázok MKK3 általi aktivációja és az MKK3-MPK7 *in planta* komplex.

(A) Különböző MAPK-ok MKK3 általi aktivációja. Mintánként kinázokat protoplasztokban tranziensen kifejezve, a MAPK aktivitást vad típusú MKK3 vagy konstitutívan aktív MKK3-EE variáns ko-expressziója mellett teszteltük. Az immunoprecipitált MAPK-ok kinázaktivitását MBP szubsztrát alkalmazásával, SDS-PAGE elválasztást követően autoradiográfiával határoztuk meg. A tranziensen kifejeztetett kinázokat immunoblot tesztel mutatni ki, anti-HA (MAPK-ok) vagy anti-myc (MKK3) antitestekkel. (B) Az MKK3 *in vitro* foszforilálja az MPK7-et. Vad típusú vagy konstitutívan aktív MKK3-EE, myc epitóp fűziós MKK3 variánst Arabidopsis protoplasztból immunoprecipitáltunk, majd rekombináns, kináz inaktív, GST-MPK6 és GST-MPK7 foszforilációját vizsgáltuk. A foszforilációt SDS-PAGE elválasztást követően autoradiográfiával határoztuk meg. Az MKK3 proteint anti-myc antitesttel detektáltuk, a szubsztrát MAPK-ok Coomassie festéses kimutatása pedig az alsó panelen látható. (C) Az MKK3 az MPK7-tel ko-immunoprecipitálható növényi proteinkivonatból. Vad típusú Col-0 (Col-0) vagy myc-fűziós MKK3-t expresszáló (MKK3:myc) növényekből immunoprecipitációt végeztünk anti-MPK7 antitesttel, illetve antitest hozzáadása nélkül. Az MKK3:myc protein jelenlétét immunoblot mutatja a kiindulási fehérjekivonatban (input), illetve az immunoprecipitált reakciókban. (D) Az MPK7 az MKK3-mal ko-immunoprecipitálható protoplaszt proteinkivonatból. MKK3:myc és MPK7:HA konstrukciókkal transzformált protoplasztokból készített proteinkivonatokat immunoprecipitáltunk anti-myc antitesttel, illetve antitest hozzáadása nélkül. Az MPK7:HA protein

jelenlétét immunoblot mutatja a kiindulási fehérjekivonatban (input), illetve az immunprecipitált reakciókban. Az MPK aktivációs kísérleteket öt, a ko-immunprecipitációs kísérleteket három ismétlésben végeztük el, konzekvens eredményekkel. (Dóczi et al. (2007) nyomán.)

MKK3:myc-expresszáló növényminta anti-MPK7 immunprecipitátumból kimutatható volt az MKK3. Ebből az eredményből arra következtethetünk, hogy a két fehérje *in vivo* komplexet képez. Megerősítésként, tranziensen transzformált protoplasztokkal elvégeztük az immunprecipitációt a másik irányban is. HA epitóp fúziós MPK7 és myc epitóp fúziós MKK3 kotranszformáns protein kivonatokat immunprecipitáltuk anti-myc antitesttel, illetve antitest hozzáadása nélkül. Az ezt követően anti-HA antitesttel elvégzett immunoblot analízis eredménye szerint az MKK3 lehúzta az MPK7 fehérjét (6.d ábra).

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

5.1.3. A *Pseudomonas syringae* fertőzés specifikusan indukálja az MKK3 expressziót

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 egy, az MKK3 translációs START kodontól felfelé elhelyezkedő 1997 bp promóter fragmentet klónoztunk és egybeépítettük a β -glükuronidáz (GUS) riporter génnel, majd ezzel a fúziós konstrukcióval transzgénikus növényvonalakat állítottunk elő. Hat, a szelekciós marker szegregációja alapján egy inszerciót hordozó, független transzformáns vonalat használtunk, amelyek mind ugyanolyan expressziós mintázatot mutattak. Kezeletlen, 16 napos növények hisztokémiai GUS tesztje a vaszkuláris szövetekben mutatott alapszintű promóter aktivitást (7.a ábra). Abiotikus stressz hatások, mint hideg, só, szárazság ezt az alapaktivitást nem befolyásolták (7.c ábra). Ezzel szemben a patogén *Pseudomonas syringae* pv tomato DC3000 (*Pst* DC3000) baktériumtörzsszel végzett fertőzés jelentős promóter indukciót eredményezett (7.b,c ábra). Hogy kizárjuk annak lehetőségét, hogy a megfigyelt festődést egy bakteriális enzim okozza, Col-0 növényeket is infiltráltunk ugyanezzel a törzsszel, ebben az esetben azonban nem detektáltunk festődést. Ezekkel az eredményekkel összhangban, a nyilvánosan elérhető microarray adatok szintén azt mutatták, hogy valamennyi tesztelt inger közül csak a *Pseudomonas* fertőzés indukálta az *MKK3* expressziót (Zimmermann et al., 2004).

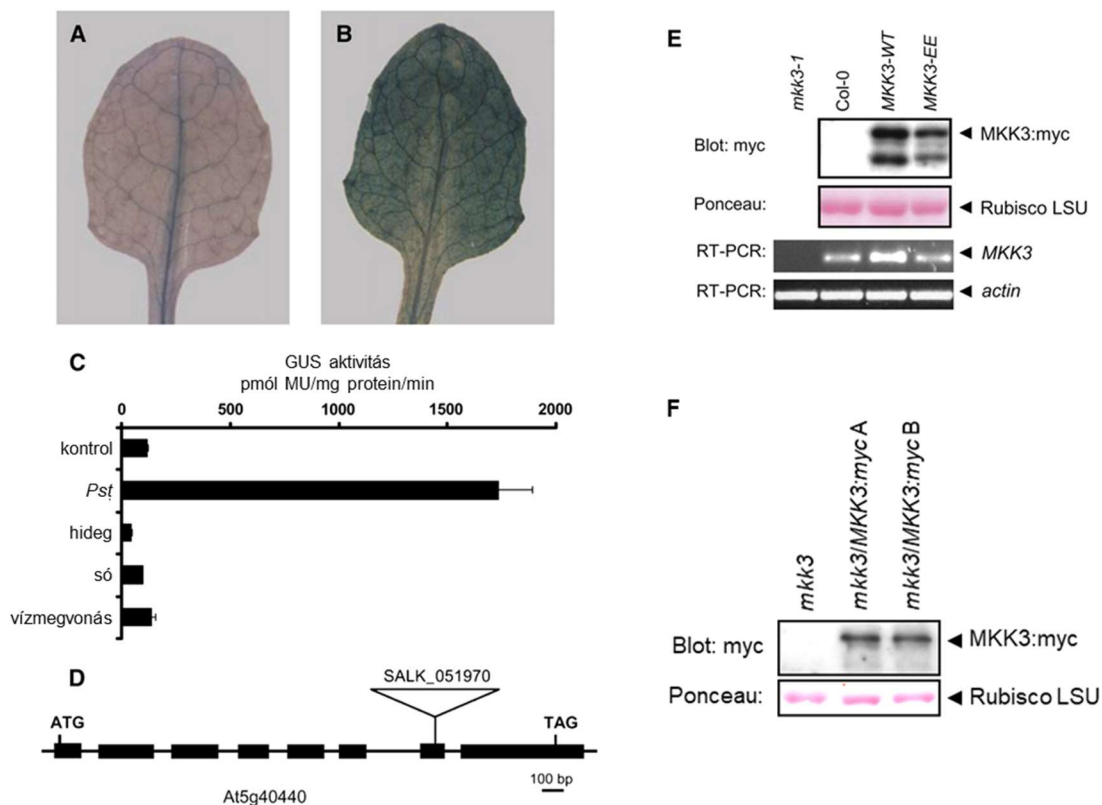
Mindezek alapján feltételezhető volt, hogy az MKK3 funkcionálisan a patogén jelátvitelben vesz részt.

5.1.4. Az MKK3 a patogénhatással kapcsolatos (PR) gének pozitív regulátora és szerepet játszik a *Pseudomonas syringae* DC3000 törzs elleni védekezésben

Funkcionális vizsgálat céljából izoláltunk az MKK3 gén homozigóta T-DNS inszerciós vonalát, Col-0 háttérben, a SALK (Salk Institute Genomic Analysis Laboratory) törzsgyűjteményből beszerzett maganyagokból. Az inszerció molekuláris jellemzése igazolta a T-DNS beépülését a START kodonhoz képest 1058 bázispárral lejjebb, az MKK3 gén hetedik exonjában (7.d ábra), ami az MKK3 génexpresszió teljes elvesztését eredményezi (7.e ábra). A nomenklatura konvenció szerint ezt a mutáns vonalat *mkk3-1*-nek neveztük el. Az inszerciós mutáns vonal mellett MKK3 overexpresszáló vonalakat is előállítottunk, mind a vad típusú, mind a konstitutív aktív változatot kódoló cDNS-t C-terminális myc epitóp fűzős konstrukcióban, a virális eredetű konstitutív 35S promóter által szabályozva fejeztettük ki (7.e ábra). Mindkét konstrukcióval három homozigóta vonalat használtunk a kísérletek során. Standard nevelési körülmények között az MKK3 túltermelő vonalak nem mutattak semmilyen morfológiai fenotípust. Az *mkk3-1* komplementációja céljából a 35S:MKK3-WT:myc expressziós kazettát ebbe a háttérbe is betranszformáltuk (7.f ábra), ezekből két homozigóta vonalat használtunk.

A patogénválasz egyik legjobban jellemzett molekuláris markere a *PR1* gén expressziója. Így első lépésként kvantitatív RT-PCR módszerrel megvizsgáltuk hogyan befolyásolja az MKK3 a *PR1* transzkripciót. A túltermelő vonalakban jelentősen megnőtt a *PR1* mRNS szintje (8.a ábra), ami azt jelzi, hogy az MKK3-nak pozitív szabályozó szerepe van a *PR1* expresszióban. Hasonlóképpen, bár kisebb mértékben, az MKK3 túltermelés további *PR* gének (*PR2*, *PR3*, és *PR4*) indukcióját is eredményezte (8.a ábra).

Az MKK3 gén transzkripció indukciója *Pst* DC3000 fertőzés hatására, valamint a *PR* gének azonosítása MKK3 transzkripció targetként, 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 hemibiotróf patogén, *Pst* DC3000 fertőzéssel szemben. E célból megmértük a bakteriális növekedés ütemét Col-0 kontroll, *mkk3-1*, valamint myc fűzős vad típusú MKK3, illetve konstitutív aktív MKK3-EE formákat expresszáló növényanyagokban. A fertőzési folyamat kvantifikációja jelentős különbséget mutatott a vizsgált növényvonalak között.



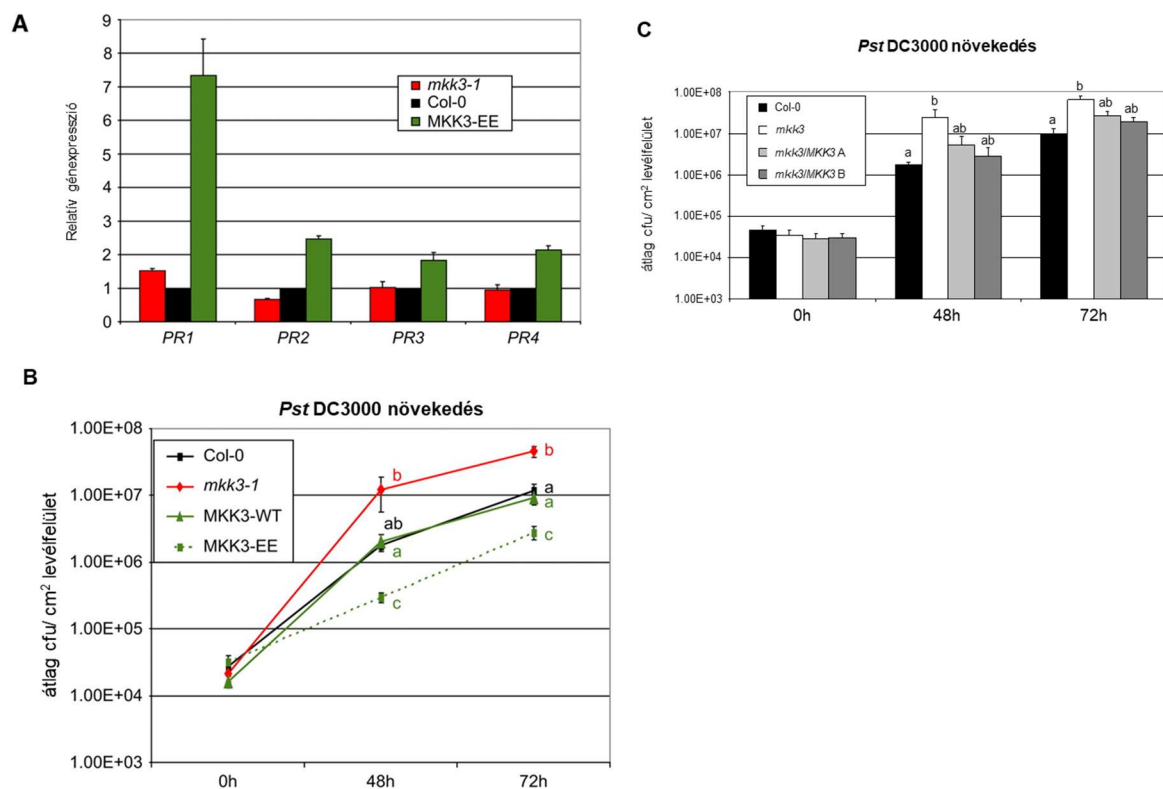
7. Ábra Az *MKK3* gén promoterének aktivációja *Pseudomonas syringae* fertőzést követően, illetve, az *mkk3-1*, és *MKK3* túltermelő vonalak azonosítása

(A) és (B) *ProMKK3:GUS* növények hisztokémiai festése *Pst* DC3000 fertőzést követően: steril (A) és 10^6 cfu/ml *Pst* DC3000-rel (B) infiltrált levelek. (C) Stresszkezelések hatása a *ProMKK3:GUS* növények GUS aktivitására: 16 napos csíranövényeket kezeltünk, 20 órán át. Kontroll: kezeletlen, *Pst*: 10^6 cfu/ml *Pst* DC3000-rel infiltrált, hideg: 4 °C sötétben, só: 400 mM NaCl, szárazság: nyitott Petri csésze. Hibasáv: standard hiba. (D) Az *MKK3* gén genomi szerveződése és a T-DNS pozíciója az *mkk3-1* mutánsban. (E) *MKK3:myc* expresszió és az *MKK3* transzkriptum mennyiség meghatározása. Az *MKK3:myc* proteint anti-myc antitesttel detektáltuk, proteinmennyiségi kontrollként a membránra blottolt Rubisco nagy alegységét (LSU) Ponceau festéssel mutattuk ki, vad típusú Col-0, és vad típusú, illetve konstitutívan aktív *MKK3-EE* variánsokat expresszálló vonalakban. Az *mkk3* mutáns vonalban (*mkk3-1*), vad típusú Col-0, és vad típusú, illetve konstitutívan aktív *MKK3-EE* variánsokat expresszálló vonalakban az *MKK3* gén expresszióját RT-PCR-rel vizsgáltuk *MKK3* specifikus primerekkel, az egyenlő cDNS mennyiség kontrolljaként az *ACT3* aktin gént használtuk. (F) Az *mkk3-1* mutáns hátérbe transzformált *MKK3:myc* konstrukció fehérjetermékét anti-myc antitesttel detektáltuk, proteinmennyiségi kontrollként a membránra blottolt Rubisco nagy alegységét (LSU) Ponceau festéssel mutattuk ki, *mkk3* kontroll minta, illetve két homozigóta transzformáns vonalban. (Dóczi et al. (2007) nyomán.)

Ahogy az a 8.b ábrán látható, az inokulációt követően 48, illetve 72 órával az *MKK3-EE* növényekben szignifikánsan kisebb mértékű bakteriális szaporodást mértünk a kontrollhoz

képest. A vad típusú MKK3 túltermelése nem okozott szignifikáns változást. Ezzel szemben, az *mkk3-1* növényekben a kontrolhoz képest szignifikánsan nagyobb mértékű bakteriális kolonizációt tapasztaltunk. Az *mkk3-1/MKK3* komplementációs vonalakban a bakteriális növekedési ütem a mutánséhoz képest lecsökkent, habár nem teljes mértékben a vad típus szintjére (8.c ábra).

Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az MKK3 részt vesz a patogén válasz szabályozásában.



8. Ábra Az MKK3 szerepe a patogénválaszban.

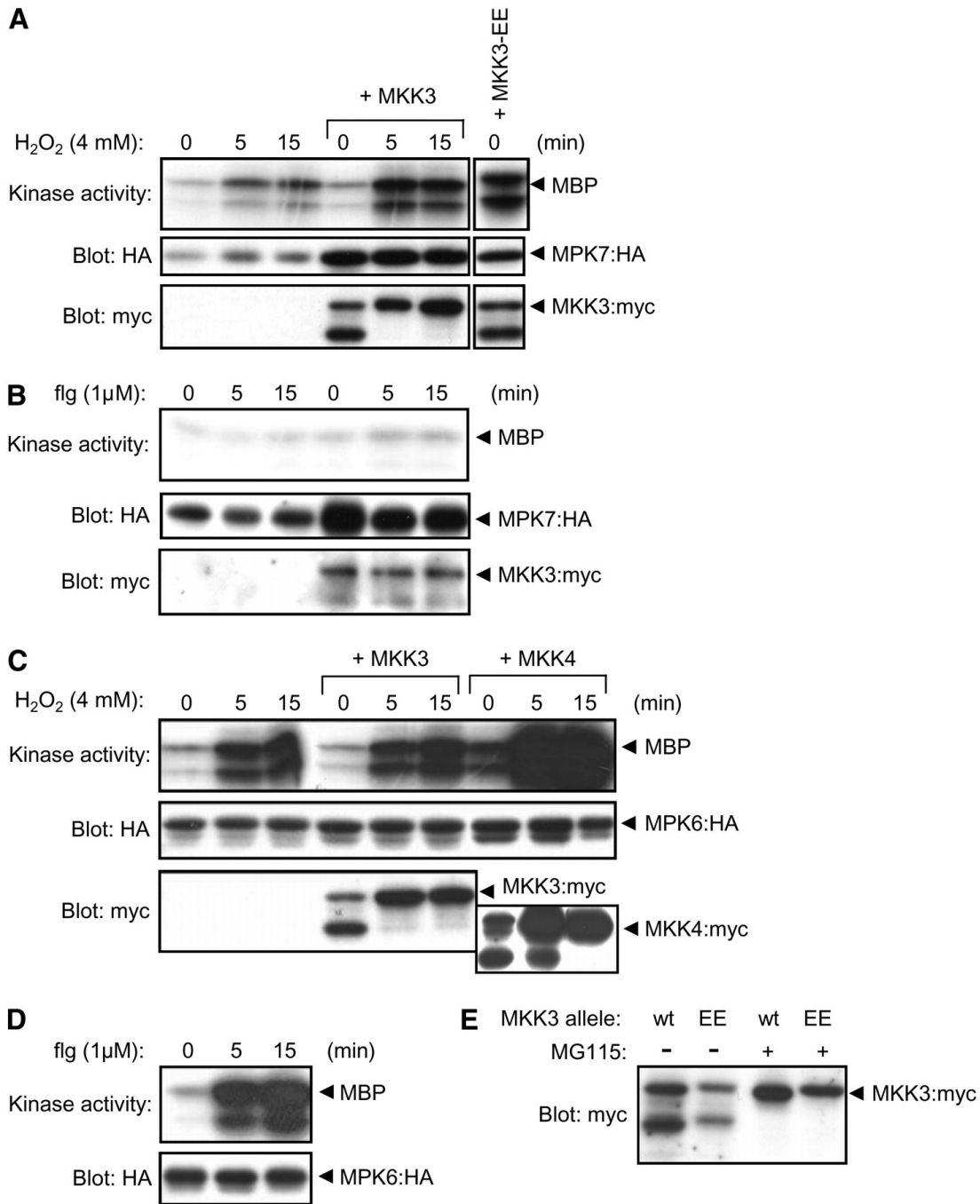
(A) *PR* gén expresszió *mkk3-1*, Col-0 és MKK3-EE növényekben. A *PR* gén amplifikációt génspecifikus primerekkel végeztük, belső kontrollként az *UBQ4* géneexpressziót használtuk. A kísérletet kétszer végeztük el, konzisztens eredményekkel, a diagramm két független biológiai ismétlés átlagait mutatja, Hibasáv: standard hiba. (B) *Pst* DC3000 bakteriális növekedés *mkk3-1* mutáns, vad típusú Col-0 és MKK3, illetve MKK3-EE túltermelő növényanyagokban, merítéses fertőzést követően. A növekedési görbék három poolozott levélkorong hat ismétlésben meghatározott baktérium titerét mutatják a megadott időpontokban, logaritmusos skálán. (C) *Pst* DC3000 bakteriális növekedés *mkk3-1* mutáns és *mkk3-1/MKK3* komplementációs vonalakban. A *Pst* DC3000 bakteriális növekedési kísérleteket háromszor végeztük el, konzisztens eredményekkel, a diagrammon a három mérés átlaga szerepel. Az adatpontok melletti betűk szignifikáns különbségeket jelölnek ($p < 0,05$), adatpontonként az összes ismétlés adatainak egyszempontos varianciaanalízissel és Tukey HSD próbával végzett elemzése szerint. Hibasáv: standard hiba. (Dóczi et al. (2007) nyomán.)

5.1.5. Az MKK3-MPK7 modul egy *flg22* független, ROS aktivált patogén jelátviteli jelpálya része

Mivel felmerült, hogy az MPK7 egy MKK3 által foszforilált MAPK a patogén jelátvitel folyamatában, megvizsgáltuk, hogy vajon két, a patogénfertőzéshez köthető kezelés hatására aktiválódik-e ez az MKK3 kináz. A flagellin egy jól ismert MAPK aktiváló PAMP, míg a H₂O₂ egy fontos, patogén fertőzés során keletkező másodlagos szignál. HA epitóp fúziós MPK6 és MPK7 MAP kinázokat tranziensen expresszáltuk az MKK3 vagy MKK4 MKK-kkal együtt vagy MKK nélkül. Immunprecipitációt követően a MAPK aktivitást MBP szubsztrátot használva, *in vitro* kináz teszttel határoztuk meg. A H₂O₂ kezelés aktiválta az MPK7-et, és ez az aktivitás erősen fokozódott az MKK3:myc konstrukciót koexpresszáló mintákban, egészen a konstitutív MKK3 koexpresszióval elért MPK7 aktivitás szintjére (9.a ábra). Ezzel szemben a *flg22* kezelés gyakorlatilag nem befolyásolta az MPK7 aktivitást, még MKK3 koexpresszió mellett sem (9.b ábra).

Az irodalmi adatoknak megfelelően, a H₂O₂ kezelés szintén aktiválta az MPK6-ot is, azonban ezt az aktivitást nem befolyásolta az MKK3 expresszió (9.c ábra). Saját felső aktivátora, az MKK4 koexpressziója azonban külső inger jelenléte nélkül is megnövelte az MPK6 aktivitását. Az MKK3-mal ellentétben, az MKK4 koexpresszió H₂O₂ kezelés hatására jelentősen megnövelte az MPK6 aktivitást (9.c ábra). 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 (9.d ábra).

A kísérletek során a tranziensen expresszált fehérjéket immunoblot tesztekkel mutattuk ki, ami több érdekes megfigyeléshez is vezetett. Egyrészt, az MKK3 koexpresszió magasabb MPK7 protein akkumulációs szintet eredményezett (6.a és 9.a/b ábrák), az MBP foszforiláció alapján viszont ez az akkumuláció önmagában nem okozott fokozott kináz aktivitást. Másrészt, az elméleti molekulatömeghez képest gyorsabban migráló MKK3:myc formákat is konzisztensen detektáltunk (6, 7 és 9. ábrák). H₂O₂ kezelés hatására ezek a formák eltűntek (9.a/c ábrák). Hogy megvizsgáljuk, vajon ez egy proteaszóma függő folyamat-e, a protoplasztokat MG115-tel, egy hatékony proteaszóma gátlóval kezeltük. Ahogy az a 9.e ábrán látható, az MG115 kezelés hatására a gyorsabban migráló MKK3:myc forma eltűnt, míg a teljes hosszúságúnak megfelelő forma felhalmozódott. Ezzel szemben az MPK6 fehérjeszint állandó volt valamennyi kísérletben (8.c/d ábra), míg a H₂O₂ kezelés hasonlóan hatott az MKK4-re, mint az MKK3 esetében (9.c ábra).

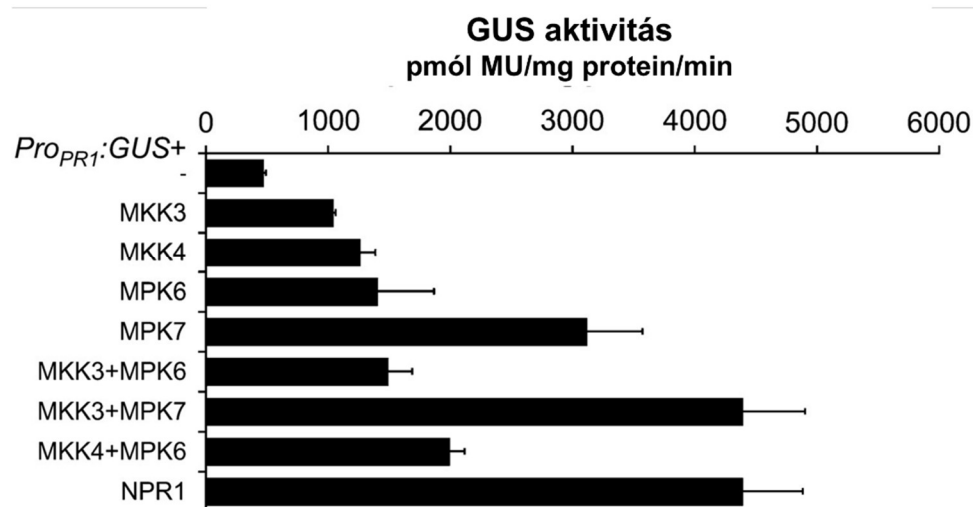


9. Ábra MKK3 közvetített MPK7 és MPK6 aktiváció H₂O₂ és flg22 kezeléseknél nyomán.

(A-D) MPK7 (A és B) vagy MPK6 (C és D) konstrukciókkal önmagukban vagy MKK3 vagy MKK4 konstrukciókkal együtt transzformált Arabidopsis protoplastokban detektált kináz aktivitások. A protoplastokat a jelzett időtartamokig H₂O₂-dal vagy flg22-vel kezeltük. Az immunprecipitált MAPK-ok kinázaktivitását MBP szubsztrát alkalmazásával, SDS-PAGE elválasztást követően autoradiográfiával határoztuk meg. A tranziensen kifejeztetett kinázokat immunoblot teszttel mutattuk ki, anti-HA (MAPK-ok) vagy anti-myc (MKK-k) antitestekkel. (E) Az MKK3 destabilizációja proteasóma függő folyamat. Vad típusú (wt) és konstitutív aktív (EE) MKK3:myc variánsokat MG115-tel kezelt és kezeletlen protoplast mintákból anti-myc antitesttel mutattuk ki. (Dóczi et al. (2007) nyomán.)

Az *MKK3* túltermelő vonalakban a *PR1* indukciót mutató qPCR eredményeink nyomán, *PR1* promóter függő riporter gént használataival is megvizsgáltuk az *MKK3*-*MPK7* szerepét a *PR1* transzkripció szabályozásában. E célból egy *ProPR1:GUS* konstrukciót transzformáltunk protoplastba, MAPK jelátviteli komponensek különböző kombinációival együtt. Az *MPK7* koexpressziója önmagában elegendő volt, hogy indukálja a *PR1* promótert, és a promóter aktivitást tovább fokozta az *MKK3*-*EE*-vel együttes koexpresszió (10. ábra). Az *MPK6* koexpresszió egy mérsékelt promóter indukciót eredményezett, amit kissé tovább fokozott az *MKK4*-*EE* koexpresszió, míg az *MKK3*-*EE* koexpresszió nem befolyásolta.

MAPK nélküli *MKK3/4* expresszió csak mérsékelt promóter indukciót eredményezett, ami feltehetőleg az alacsony endogén MAPK szint következménye, ami feltehetőleg szűk keresztmetszetet képez a rendszerben. Pozitív kontrollként a *PR1* egy jól ismert pozitív szabályozó fehérjéjét, az *NPR1*-et használtuk. Az *NPR1* koexpresszió erős, az *MPK7* + *MKK3*-*EE* koexpresszióhoz hasonló mértékű, *ProPR1* indukciót idézett elő.



10. Ábra Az *MKK3*-*MPK7* modul indukálja a *PR1* promótert.

Arabidopsis protoplastokat transzformáltunk *ProPR1:GUS* fúziós konstrukcióval önmagában, illetve különböző MAPK jelpálya komponensekkel kombinálva. Hibasáv: standard hiba. (Dóczi et al. (2007) nyomán.)

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.

5.2. Az MKK7 jelátviteli pálya szerepe a merisztéma működésének szabályozásában

5.2.1. Az MKK7/9 promóterek aktivitása specifikus fejlődésszabályozó funkcionalitásra utal

A növényi MAPK jelátviteli kutatások eleinte kizárólag a C (MKK4/5) és az A (MKK1/2) csoportba tartozó MKK-kra irányultak. A szisztematikus két-hibrid kísérleti eredményekben, a B csoport MKK és a C csoport MAPK közötti kapcsolat mellett, figyelemre méltó volt a D csoport MKK-k „árva” helyzete: ezek a kinázok semmilyen alsó MAP kinázzal nem mutattak kölcsönhatást ebben a kísérleti rendszerben (5. ábra). Ez a csoport *Arabidopsis*-ban négy tagból áll (MKK7/8/9/10). Ezek közül részletesebb vizsgálatokra az MKK7 és MKK9 kinázokat választottuk ki. Az MKK10 szekvenciában a konzervált kettős foszforilációs helyek egyike hiányzik (MAP Kinase Group, 2002), így kérdéses volt, hogy ez egy valódi MKK szekvencia. Az MKK8 esetében pedig csak proteaszóma gátló kezelést követően volt kimutatható a myc fúziós MKK8 protein, vagyis az MKK8 szabályozásában jelentős szerepet játszhat a proteindegradáció folyamata (E. Hatzimasoura, PhD disszertáció, 2007). Ezzel a technikai nehézséggel is összefügghet az a tény, hogy azóta sem jelent meg semmilyen, az MKK8 funkciójára vonatkozó közlemény (PubMed, 2022 január).

Funkcionális vizsgálatokat kétféle kísérleti megközelítéssel kezdtük meg. Egyrészt az *MKK7/9* gének 2 kb promóter régióját fuzionáltuk a GUS riportergénnel, majd ezekkel 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 (11.a,g,j ábra). Hasonlóképpen, a legerősebb *ProMKK9:GUS* aktivitást szintén a pálhákban tapasztaltuk, ami erősebb alapaktivitást mutatott mint a *ProMKK7:GUS*, itt azonban foltokban a levélszövetekben is kimutatható volt bizonyos szintű promóter aktivitás (11.d ábra). Gyökérszövetekben csak az *MKK9* promóter mutatott aktivitást, a kolumella és a nyugalmi centrum sejtjeiben erős alapaktivitással. A gyökér vaszkuláris szöveteiben szintén detektálható volt a GUS festődés (11.m ábra). Ez az expressziós mintázat fokozatosan alakul ki a fejlődő gyökérben, a kezdeti expresszió gyakran a korai laterális gyökér kezdeményeknél jelentkezik (11.n ábra). Fejlettebb gyökerekben azonban az *MKK9* expresszió csökken a laterális gyökér keletkezési helyeken (11.m ábra).

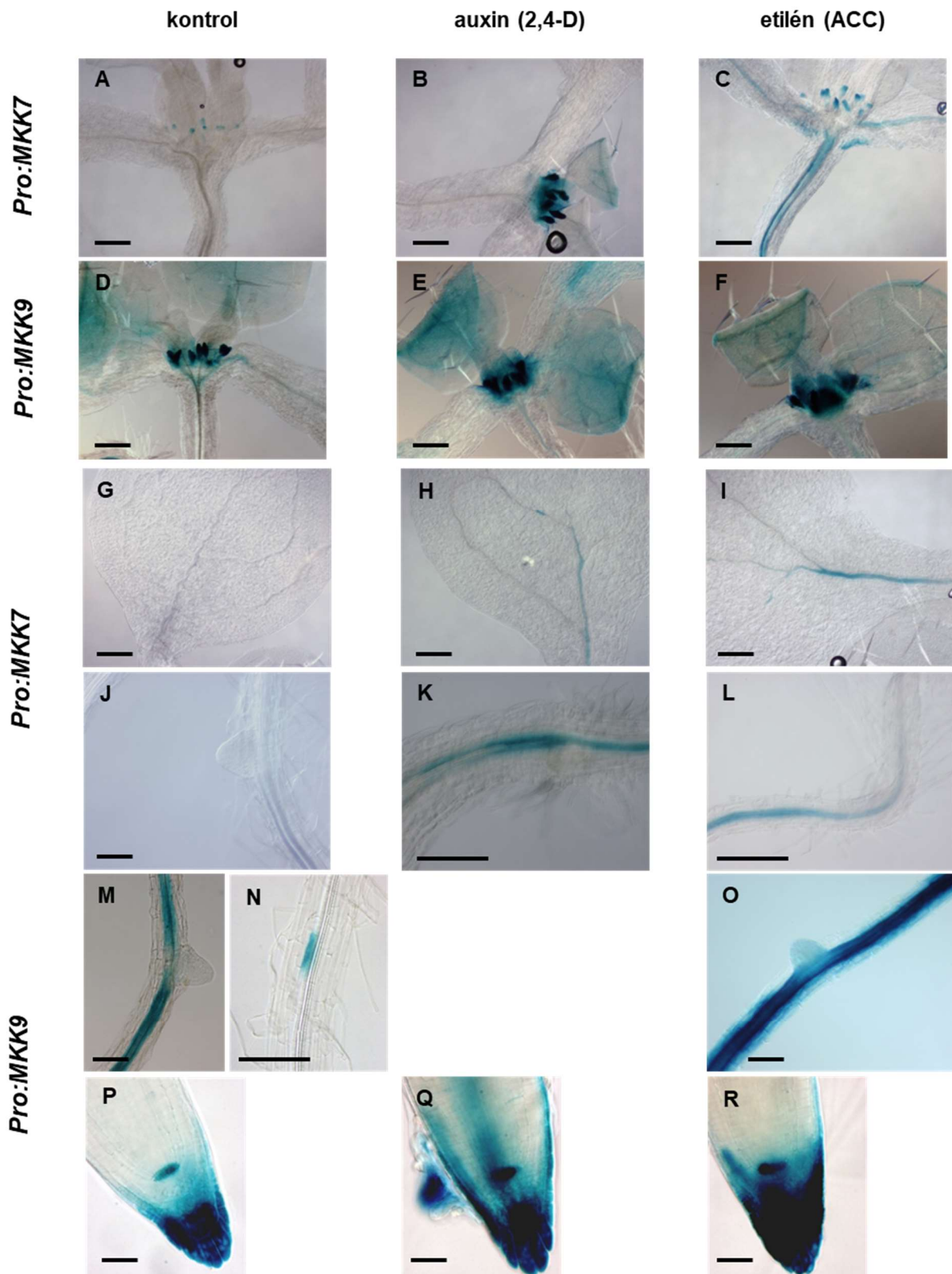
Mivel a pálha és a kolumella ún. auxin maximum helyek (auxin maxima) (Aloni et al., 2003), illetve az *MKK9* etilén bioszintézisben és jelátvitelben betöltött szerepére vonatkozó eredmények miatt (Xu et al., 2008; Yoo et al., 2008), megvizsgáltuk hogyan hat e két hormon az *MKK7/9* gének promótereire. Mind az auxin, mind az etilén kezelés egyrészt megemeli a

pálha alapaktivitás szintjét (11.b, c ábra), másrészt más szervekben indukálja a *ProMKK7:GUS* aktivitást, főleg a vaszkuláris komponensekben (11. b, c, h, i, k, l ábra). Az *MKK9* promóter aktivitást szintén fokozták ezek a kezelések az alapexpressziós doménekben (11. e, f, o, q, r ábra). Érdekes módon, a promóteraktivitás csökkenése a laterális gyökerek megjelenési helyein, akkor is megfigyelhető volt, amikor a promóteraktivitást ACC (1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid) kezeléssel egyébként fokoztuk (11.o ábra).

A promóter analízis során feltárt speciális génexpressziós mintázatok, illetve a hormonális szabályozás alapján feltételezhető hogy ez a két kináz adaptív fejlődésszabályozási funkciót lát el.

5.2.2. Az MKK7 kinázt túltermelő transzgenikus vonalak súlyos fejlődési rendellenességeket mutatnak

Funkcionális analízis céljából megpróbáltunk myc epitóp fúziós MKK7 túltermelő transzgenikus vonalakat előállítani, azonban a kanamycin rezisztens *35S:MKK7* elsődleges transzformáns növények életképtelenek voltak. Ezért a transzgén expressziót kvantitatív RT-PCR technikával igazoltuk, kevert (poolozott) növényanyagokból (12.a, b ábra). Érdekes módon, az elsődleges transzformáns növények jelentősen sérült merisztémafejlődést mutattak. Ezek a növényanyagok nem voltak képesek valódi leveleket fejleszteni (12.a ábra), a szerviniciáció hiányát pásztázó elektronmikroszkópiával is megerősítettük (12.c ábra). Az apikális-bazális tengely szerinti hosszanti mikroszkópos metszeteken a *35S:MKK7* csíranövényekben vagy teljesen hiányzott a hajtáscsúcsi merisztéma, vagy csak a hypocotyl tetején kisméretű, sűrűn elhelyezkedő sejtek képeztek atipikus, merisztéma szerű szövetet (12.d ábra). Ezekben a csíranövényekben a szabályosan szerveződött merisztéma hiánya mellett egyéb fejlődési rendellenességek is megfigyelhetők voltak, mint például a vaszkuláris mintázatok egyszerűsödése, a sziklevelekben a szokásos négy hurok helyett csak kettő alakult ki (12.e ábra).



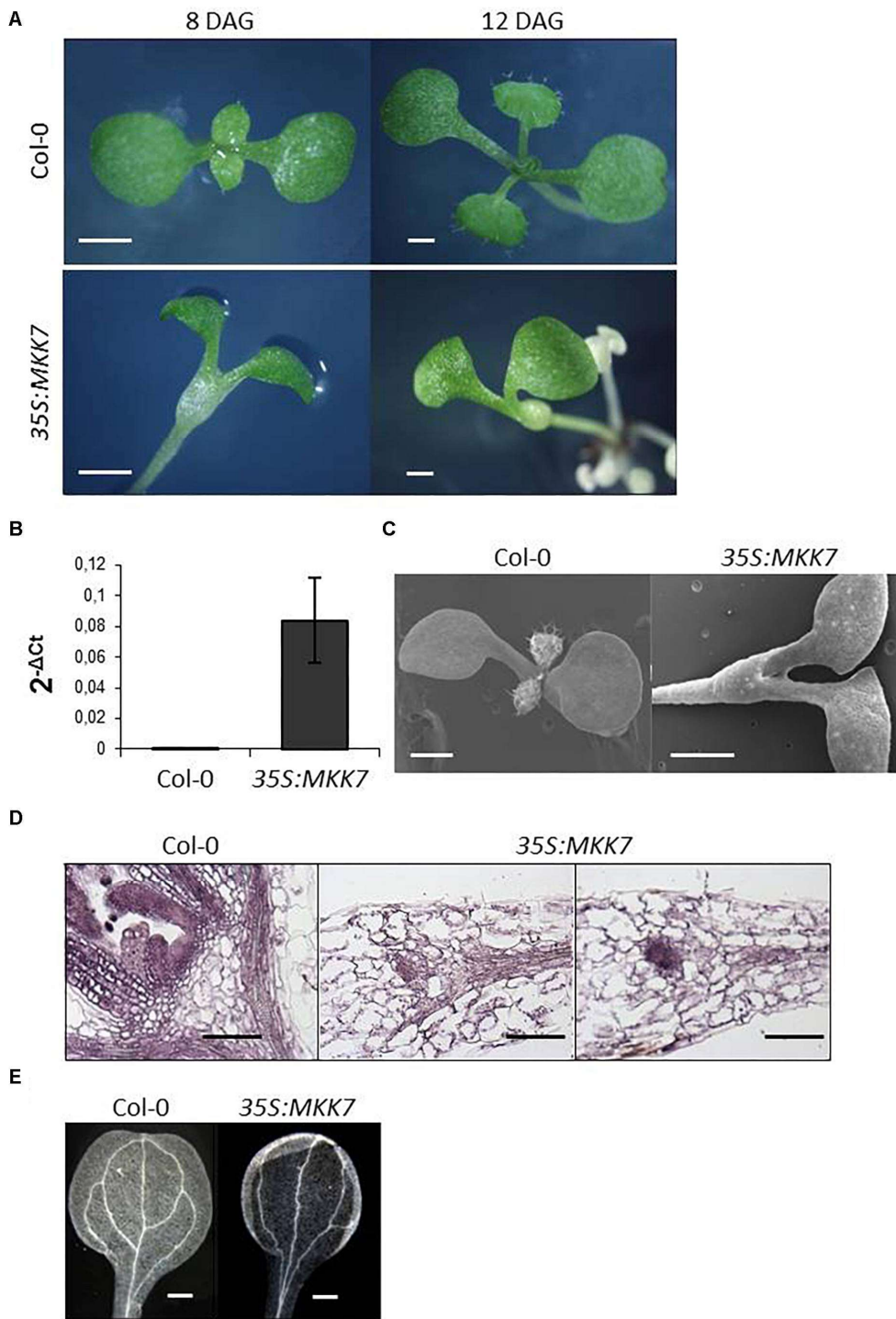
11. Ábra Az *MKK7* és *MKK9* promóteraktivitás mintázata és hormonális szabályozása.

Az *MKK7* és *MKK9* promóterek aktivitását promóter:GUS fúziós konstrukciókkal transzformált *Arabidopsis* növények előállításával vizsgáltuk. Kezeletlen növényekben az *MKK7* promóter kizárólag a pálhákban (stipula) aktív (A). 2,4-D (B) vagy ACC (C) kezelés hatására ez az alapaktivitás

megemelkedik. Hasonlóképpen, az *MKK9* promóter is aktív a pálhákban (D), ami szintén fokozható 2,4-D (E) vagy ACC (F) kezeléssel. Továbbá az *MKK9* promóter levélszövetekben is aktív (D-F). (G-L) Hormonkezelés hatására az *MKK7* promóter vaszkuláris szövetekben is indukálódik. *ProMKK7:GUS* növények GUS festése kezeletlen kontroll (G, J), 2,4-D (H, K) vagy ACC (I, L) mintákban. Az *MKK9* promóter kezeletlen növények gyökér vaszkuláris szöveteiben is aktív (M). Ez az expressziós mintázat fokozatosan alakul ki a fejlődő gyökerekben, a kezdeti expresszió általában az oldalgöyökér iniciációs helyeken jelenik meg (N). Az oldalgöyökérfejlődés későbbi fázisában azonban az *MKK9* expresszió szupresszált (M), még akkor is ha az alapaktivitást ACC kezeléssel megnöveljük (O). Az *MKK9* promóter a kezeletlen növények gyökérsúcsaiban a kolumella és a nyugalmi centrum sejtjeiben is aktív (P), ami szintén fokozható 2,4-D (Q) vagy ACC (R) kezeléssel. Méret sávok: 100 μm (A-O), 25 μm (P-R).

Mivel az erős konstitutív *35S* promóter által működtetett *MKK7* fehérje túltermelése súlyos fejlődési zavart eredményezett, előállítottunk az *MKK7*-et β -ösztradiol által indukálható promóter szabályozása alatt kifejező vonalakat is (13.a ábra). β -ösztradiol nélkül az összes elsődleges transzformáns a vad típusú növekedéssel megegyezően fejlődött és hozott magokat. A további kísérletek során két független homozigóta vonal utódjait használtuk. 0,05 vagy 0,1 μM β -ösztradiol tartalmú táptalajon csíráztatott transzgenikus magokból súlyos fejlődési rendellenességeket mutató, életképtelen növények csíráztak ki (13.b ábra).

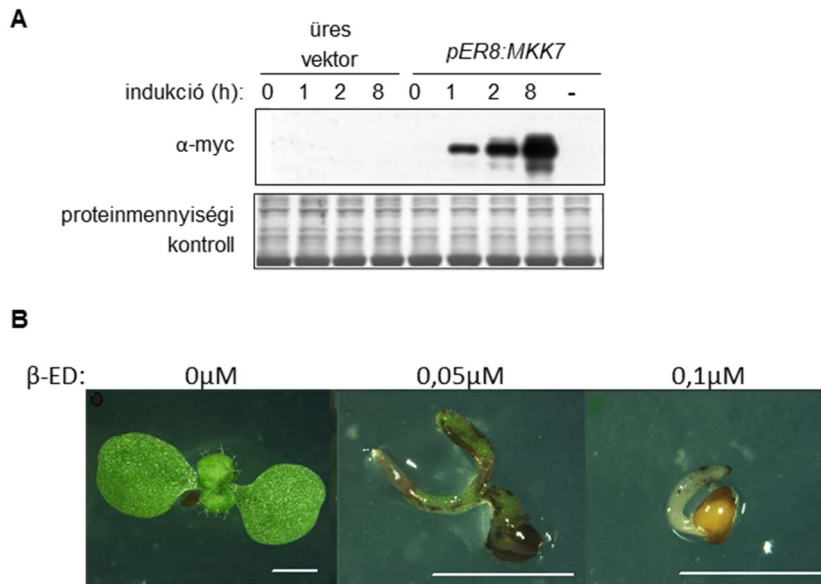
Az *MKK7* fehérje indukált túltermelése mind a hajtáscsúcs (lásd 4.2.3.), mind a gyökérsúcs merisztémák gyors leállítását, illetve összeomlását idézte elő. Hat napos, vertikális táplemezen növesztett csíranövényeket β -ösztradiol tartalmú táplemezre helyeztünk át, majd a gyökérnövekedést három napon át mértük. 0,01 μM β -ösztradiol koncentráció a gyökérnövekedés mintegy 50% gátlását eredményezte, míg 0,1 vagy 1 μM β -ösztradiol koncentráció mellett a gyökérnövekedés 24 órán belül teljes mértékben leállt (14.a-c ábra). 0,1 β -ösztradiollal indukált gyökerek merisztémája kb. 30%-kal megrövidült, miközben a merisztémasejtek száma mintegy 50%-kal csökkent (14.d ábra). Ezzel párhuzamosan a merisztémasejtek mérete enyhén megnövekedett (14. d ábra).



12. Ábra Az MKK7 kináz konstitutív expressziója gátolja a levéliniciációt és merisztémaszerveződést.

(A) 8 és 12 napos Col-0 és 35S:MKK7 csíranövények fejlődése. A bemutatott képek minimum 20 csíranövényről készült sztereómikroszkópos képekre jellemző állapotokat reprezentatíván mutatják 8 vagy 12 nappal a kicsírázást követően (DAG). Méret sáv: 2 mm. (B) A transzgénikus *MKK7* expresszió detektálása. Kvantitatív RT-PCR Col-0 és 35S:MKK7 csíranövényekből izolált RNS mintákkal. (C) Nyolc napos Col-0 és 35S:MKK7 csíranövények pásztázó elektronmikroszkópos képe. Méret sáv: 1 mm. (D) Nyolc napos Col-0 és 35S:MKK7 csíranövényekből készült hajtáscsúcs longitudinális metszetek. Méret sáv: 200 μ m. (E) Col-0 és 35S:MKK7 csíranövény sziklevelek vaszkuláris mintázata. Méret sáv: 400 μ m. (Dóczi et al. (2019) nyomán.)

Annak igazolására, hogy az MKK7 kináz valóban negatívan szabályozza a sejtproliferációt, amint azt a merisztéma represszió mutatta, EdU (5-etinil-2'-dezoxiuridin) festést végeztünk a fent említett β -ösztadiol koncentrációk mellett 16 órával az indukció után, amely időtartam a gyökéresúcs merisztéma ismert sejtciklus hossza (Hayashi et al., 2013; Yin et al., 2014). Mivel az EdU beépülés az aktív DNS replikációt vizualizálja, ez a festési módszer a sejtciklussal jellemezhető merisztéma aktivitás markerének tekinthető (Kotogány et al., 2010). Az EdU pozitív sejteket a nyugalmi centrumtól 50 μ m-es síkokban számoltuk, hogy az egész merisztéma zónában felmérjük a sejtciklus dinamikát. 0,01 μ M β -ösztadiol mellett nem történt változás, míg egy drasztikus, ~70 és ~90 százalékos gátlás volt megfigyelhető 0,01 μ M, illetve 1 μ M β -ösztadiol hatására (14.e,f ábra). Ez azt jelenti, hogy az MKK7 túltermelés megakadályozza a DNS replikáció iniciációját (S fázis), és így a sejtciklus megindulását.



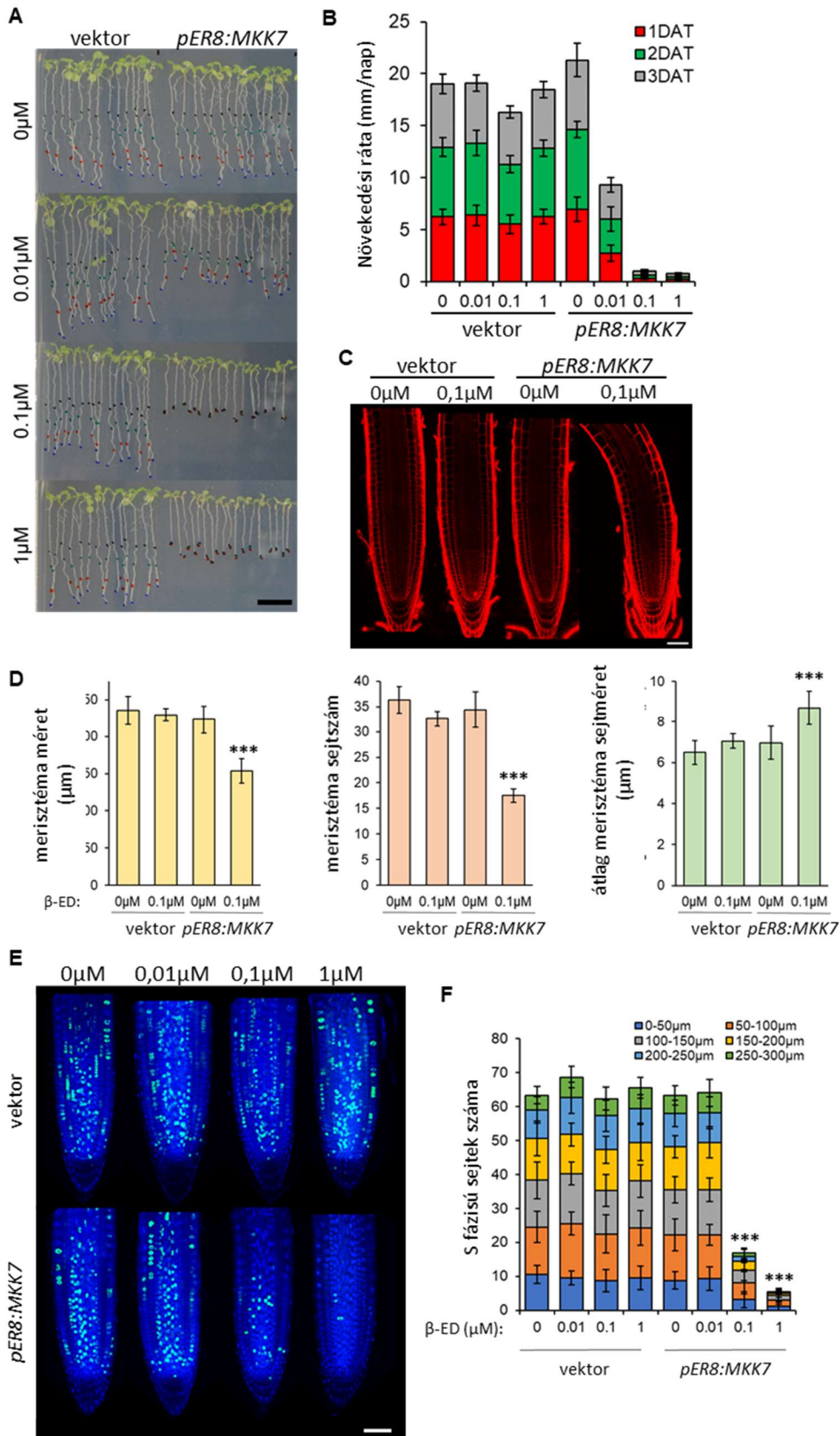
13. Ábra Indukálható MKK7 expresszió és hatása a csíranövények fejlődésére.

(A) Az indukálható transzgénikus *myc:MKK7* proteint anti-*myc* antitesttel detektáltuk, proteinmennyiségi kontrollként a membránra blottolt Rubisco nagy alegységét (LSU) Ponceau festéssel mutattuk ki, üres vektorral és *pER8:MKK7* konstrukcióval transzformált vonalakban. Az 1 μ m β -ösztadiollal végzett indukció idejét órában tüntettük fel. (B) β -ösztadiol indukálható *pER8:MKK7* konstrukcióval transzformált maganyagok indukció nélkül vagy 0,05 és 0,1 μ m β -ösztadiol jelenlétében csíráztatva. Méret sáv: 2 mm. (Döry et (2018) és Dóczi et al. (2019) nyomán.)

Hasonló, bár jóval kevésbé drasztikus eredményeket értünk el MKK9 kinázt túltermelő növényanyagokkal is (nem bemutatott eredmények). Azonban az MKK9 funkcionalitására vonatkozó képünket időközben számos közlemény gazdagította, pl. leírták a só jelátvitelben

dc_2005_22

(Alzwiy and Morris, 2007; Xu et al., 2008), vagy az etilén bioszintézisben és jelátvitelben (Xu et al., 2008; Yoo et al., 2008) betöltött szerepét. Ezért további munkánk során az MKK7 merisztémaszabályozó funkciójára fókuszáltunk, a dolgozatban is ezeket az eredményeket mutatom be részletesen.



14. Ábra Az indukált MKK7 expresszió gátolja a gyökérmersztéma szerveződést és a fejlődést.

(A, B) Indukált MKK7 expresszió következtében leálló gyökérnövekedés. Üres vektorral vagy indukálható MKK7 konstrukcióval transzformáns hat napos csíranövényeket a jelzett koncentrációkban

β -ösztadiolt tartalmazó táptalajra helyeztünk át. A gyökércsúcsok pozícióit három napon keresztül megjelöltük. Méret sáv: 10 mm. A gyökerek növekedési rátája a β -ösztadiolt tartalmazó táptalajra áthelyezés után (B). Mintánként 40 csíranövényt mértünk. Hibasávok: szórás, a csillagok a szignifikanciaszintet jelölik. (C, D) Gyökérmerisztémák ~16 órával a 0,1 μ M β -ösztadiolt tartalmazó vagy kontroll táptalajra áthelyezés után. Merisztémaregiók mikroszkópos képei (C), a gyökerek a nyugalmi centrum (QC) pozíciója szerint illetve. Méret sáv: 50 μ m. A sejthossz a nyugalmi centrumtól kezdve, a gyökerek bal oldalán longitudinálisan mértük. A gyökérmerisztéma hosszát, a merisztémasejtek számát és az átlagos merisztémasejt méretet üres vektor vagy *pER8:MKK7* transzformáns vonalakban ~16 órával mértük a 0,1 μ M β -ösztadiolt tartalmazó vagy kontroll táptalajra áthelyezés után (D). Mintánként 7-10 csíranövényt mértünk. Hibasávok: szórás, a csillagok a szignifikanciaszintet jelölik. (E) S fázisú sejtek 5-etinil-2'-deoxiuridin (EdU, zöld) festéssel detektálva ~16 órával a 0,1 μ M β -ösztadiolt tartalmazó vagy kontroll táptalajra áthelyezés után. A sejtmagokat 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, kék) festéssel jelöltük. Méret sáv: 50 μ m. (F) S fázisú sejtek kvantifikálása a gyökércsúcsban. A sejt számlálást 50 μ m-es szekciókban, a nyugalmi centrumtól felfelé eső 300 μ m-es régióban mértük, mintánként 20 gyökert vizsgálva. Az 50 μ m-es szekciók átlagaival végeztünk T próbát. Hibasávok: szórás, a csillagok a szignifikanciaszintet jelölik. (Dóczi et al. (2019) nyomán.)

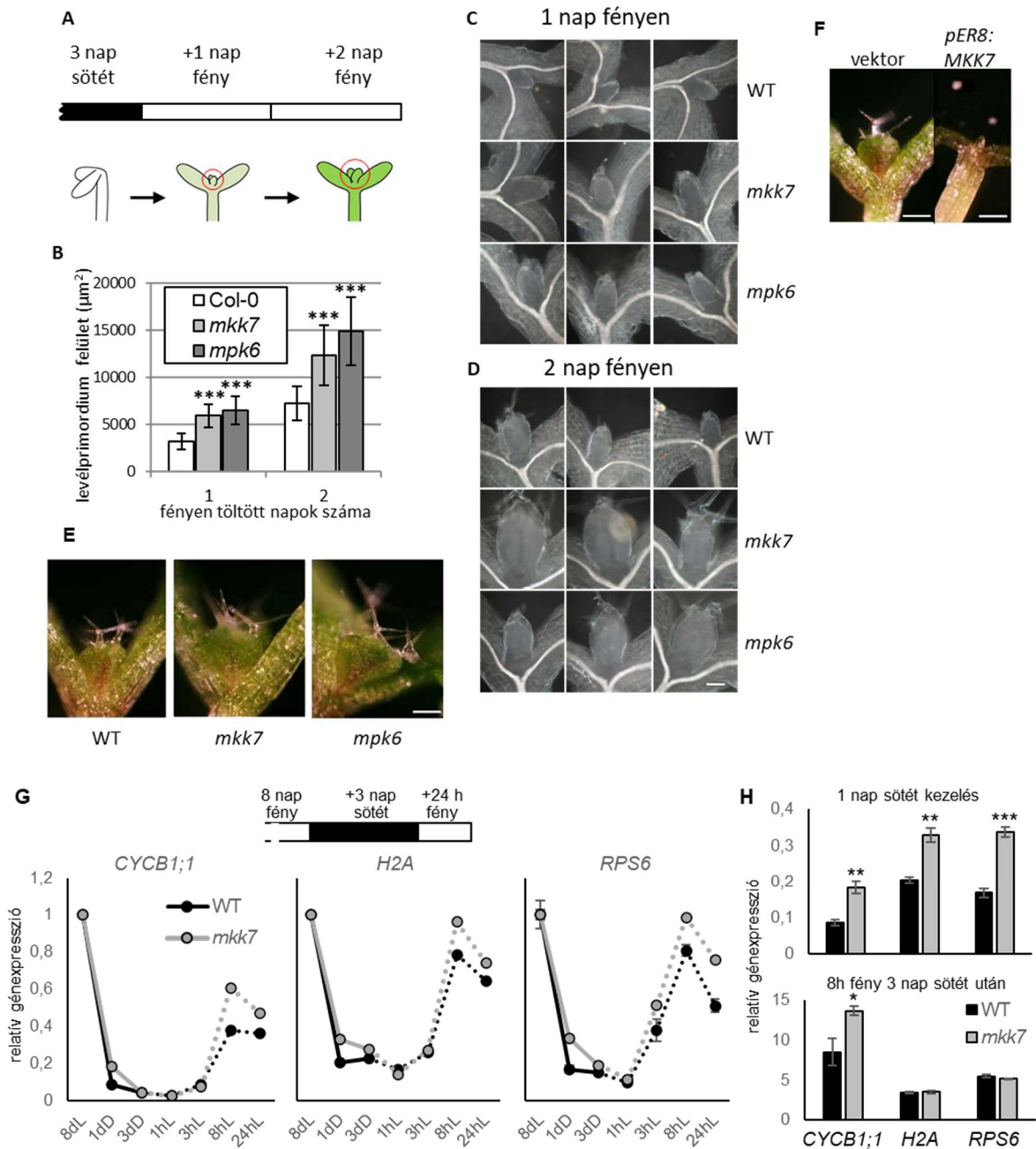
5.2.3. Az MKK7-MPK6 modul a hajtáscsúcs merisztéma de-represszió negatív regulátora

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 skotomorfogenezis 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 (fotomorfogenezis) egy praktikus szinkronizált kísérleti rendszert is nyújt a hajtáscsúcs merisztéma aktivitásának vizsgálatára. A de-etiolációt sikerrel alkalmazták merisztéma aktivációt meghatározó szabályozó mechanizmusok vizsgálatára (López-Juez et al., 2008; Yoshida et al., 2011; Pfeiffer et al., 2016; Mohammed et al., 2018). Több MAPK jelátviteli génre, pl. az *MPK6*-ra is jellemző magas expressziós szint a sötét szakaszban, majd a fényre kerülést követő gyors represszió (López-Juez et al., 2008). Ezek az eredmények különösen figyelemreméltóvá váltak az *MKK7* negatív merisztémaszabályozó funkciójára vonatkozó eredmények fényében. Bár az *MKK7* alacsony expressziója miatt a legtöbb microarray kísérletben, így a López-Juez és munkatársai által közölt génexpressziós eredményekben sem jelenik meg értékelhető adatokkal, időközben több közlemény is napvilágot látott, ami azt mutatta, hogy az *MPK6* egy *MKK7* alatti MAPK (pl. Popescu et al., 2009; Lampard et al., 2009; Huck et al., 2017). Mindezek alapján megvizsgáltuk az *MKK7*-*MPK6* modul szerepét a merisztéma aktivitás szabályozásában, a de-etiolációs kísérleti rendszerrel.

Három napos sötétben csíráztatott növényeket folyamatos megvilágításra áthelyezve nyomon követtük a kialakuló levélprimordiumok fejlődési ütemét. Két időpontban gyűjtött csíranövények levélprimordiumainak felületét mikroszkópos képek digitális analízisével határoztuk meg (15.a ábra). Ezek a mérések azt mutatták, hogy az *mpk6* mutáns csíranövények átlagos primordium felülete több mint kétszerese volt a kontroll vad típusénak, a fényre kerülést követő mindkét napon (15.b-d ábra). Hasonló eredményeket kaptunk az *mkk7* mutáns csíranövények levélprimordium fejlődésére vonatkozóan is (154.b-d ábra). Ez a trend mindkét mutánsban megfigyelhető volt a fényre kerülés utáni harmadik napon is (15.e ábra).

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 -ösztradiollal kezeltünk, a merisztéma aktiváció nagymértékű gátlását, illetve leállítását tapasztaltuk (15.f ábra).

Hogy molekuláris szinten is képet kapjunk az MKK7 szerepéről a sötét indukált represszióban, megvizsgáltuk a mitózissal (a Cyclin B1;1 fehérjét kódoló *CYCBI;1*), DNS szintézissel (S fázis) (a hiszton 2A fehérjét kódoló *H2A*) és transzlációs kapacitással (a 40S riboszómális S6-1 fehérjét kódoló *RPS6*) asszociált marker gének relatív expresszióját. Korábban igazoltuk, hogy a de-etiolációhoz nagymértékben hasonló génexpressziós mintázat jellemző a fejlődő primordiumok sötétkezelésben bekövetkező fejlődésleállásra, illetve az azt követően fényvel kiváltott reaktivációra (Mohammed et al., 2018). Mivel ez a kísérleti rendszer a nagyobb mennyiségben előállítható növényanyagok miatt praktikusabb, mint a csírázást követő de-etioláció, a génexpressziós kísérletek során a sötétben represszált, majd fény által de-represszált mintákat használtunk. Öt napos, folyamatos megvilágítás mellett nevelt csíranövényeket három napig sötétben tartottuk. Korábbi eredményeinkkel összhangban (Mohammed et al., 2018), mindegyik marker gén represszáldott a három napos sötétperiódus során, majd indukálódott a fényre visszakerülés utáni nyolc órában, mindkét genotípusban (15.g ábra). Azonban a változások kinetikájában jelentős eltérések mutatkoztak a vad típusú és az *mkk7* növények között. Az *mkk7* genotípusban mindhárom gén repressziója késleltetett volt (15.g ábra), míg a *CYCBI;1*, indukciója gyorsabb volt (15.h ábra).



15. Ábra A de-etiláció, mint kontrollált fejlődési modellrendszer.

(A) A de-etilációs kísérleti rendszer. A magokat 3 nap sötétben csíráztatást követően folyamatos megvilágításban neveltük tovább. A fejlődő levélkezdemények (primordiumok) területét egy vagy két nappal a megvilágítás kezdete után mikroszkópos képek számítógépes analizisével határoztuk meg. (B) Col-0, *mpk6* és *mkk7* levélkezdemények felülete három napnyi sötétben csírázást követő egy és két napnyi folyamatos megvilágítás után. Mintánként mintegy 30 csíranövényt mértünk. P értékek: $1,32\text{E}-09$ – $2,29\text{E}-14$, három csillaggal jelölve. Hibasávok: szórás. (C,D) Reprezentatív Col-0, *mkk7* és *mpk6* levélkezdemény képek egy (C) és két (D) nappal a fényre helyezést követően. Méret sáv: 50 μm . (E) Col-0, *mkk7* és *mpk6* levélkezdemények három nappal a fényre helyezést követően. Méret sáv: 250 μm . (F) Az indukált MKK7 expresszió hatása a levélkezdemények fejlődésére a de-etilációs folyamat során. Három napig sötétben csíráztatott üres vektorral transzformált és *pER8:MKK7* csíranövényeket 1 μM β -ösztadiol tartalmú táptalajra helyeztünk át, majd három napig folyamatos megvilágítás mellett

neveltünk. Méret sáv: 250 μm . (G, H) Relatív marker gén expresszió a levélkezdemények fejlődésének sötét indukált leállása majd az azt követő fénykezelés során. Nyolc napos vad típusú és *mkk7* mutáns csíranövényeket három napig sötétbe, majd újra folyamatos megvilágításba helyeztünk. Minden időpontban biológiai ismétlésenként 200 csíranövény levélkezdeményeit gyűjtöttük be RNS izolálás céljából. A génextpressziót kvantitatív RT-PCR módszerrel mértük a kísérleti folyamat során (G), valamint a sötét- és fénykezelések kezdetétől számított specifikus időpontokban (H). Hibasáv: a biológiai ismétlések átlagából számított standard hiba. A csillagok szignifikanciaszintet jelölnek: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. (Dóczi et al. (2019) nyomán.)

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

5.3. Új, a merisztémaszabályzásban fontos szerepet játszó MAPK szubsztrátok azonosítása

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

Az önálló kutatásom kezdetekor kevesebb, mint 10 növényi MAPK szubsztrát volt ismert (szemben a több száz humán MAPK szubsztráttal). A szubsztrát fehérjékre vonatkozó ismeretek hiánya komoly akadályt jelentett annak megértésében, hogy hogyan képesek egyes MAP kinázok számos, biológiailag jelentősen eltérő folyamatot szabályozni (pl. különböző stressz válaszok, illetve fejlődési folyamatok). Ezért célul tűztük ki a merisztémaműködés szabályozásában kulcsfontosságú MAPK szubsztrátok azonosítását. A merisztémaszabályzó proteinek foszforilációs modulációja környezeti ingerek által aktivált MAPK-ok által a növényfejlődés környezeti szabályozásának egyik fontos mechanizmusa lehet. A rendelkezésre álló kísérleti eszköztár alapvetően vagy a nagy áteresztőképességű módszerekkel (Y2H, MS) véletlenszerűen izolált, vagy az előzetes hipotézisekre alapulóan kiválasztott szubsztrát jelöltek további kísérletes igazolására és jellemzésére épült.

Mivel nagy áteresztőképességű módszerek beállítására kezdetben nem álltak megfelelő erőforrások rendelkezésünkre, ezért egy „funkcionális bioinformatikai” szűréssel kerestünk MAPK szubsztrát jelölteket, ami egyfajta hipotézisalapú megközelítésnek tekinthető. E célból ismert és jól jellemzett merisztémaszabályozó fehérjék szekvenciáit vizsgáltuk a MAPK dokkoló D-site motívum meglétére. A motívum rövidsége miatt nem igazán alkalmas homológia illesztésen alapuló keresésre (pl. BLAST), ezért a kiválasztott merisztémaszabályozó fehérjék szekvenciáit az ELM eszköz segítségével vizsgáltuk (<http://elm.eu.org>, (Dinkel et al., 2014)). Azt találtuk, hogy meglepően sok, a hajtáscsúcs merisztémát, illetve az abból kialakuló virágzati tengely merisztémáját szabályozó fehérje

szekvenciája tartalmaz D-site típusú MAPK dokkoló motívumot (pl. WUS, AP1, AP2, AP3, LFY, AG, STM, AS1, PIN1, CAL1, FLT, TFL1, CO, SOC1, AGL24, CCA1, TOC1, AGL18, AGL1).

Következő lépésként igazolni kellett a szubsztrát jelöltek MAPK általi foszforilációját. E célra eddig 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 teszt számos hátránya ismert, pl. a megbízhatósága a nagy koncentrációjú, tisztított fehérjék sejtes szabályozó mechanizmusokon kívüli használata miatt meglehetősen problematikus (Peck, 2006; Manning and Cantley, 2002). További problémát jelent a sugárzó foszforizotóp használata is. Ezért tehát időszerűvé vált olyan új alternatív módszerek kifejlesztése, amelyek lehetővé teszik az *in vivo* foszforilációs kölcsönhatások célzott vizsgálatát.

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

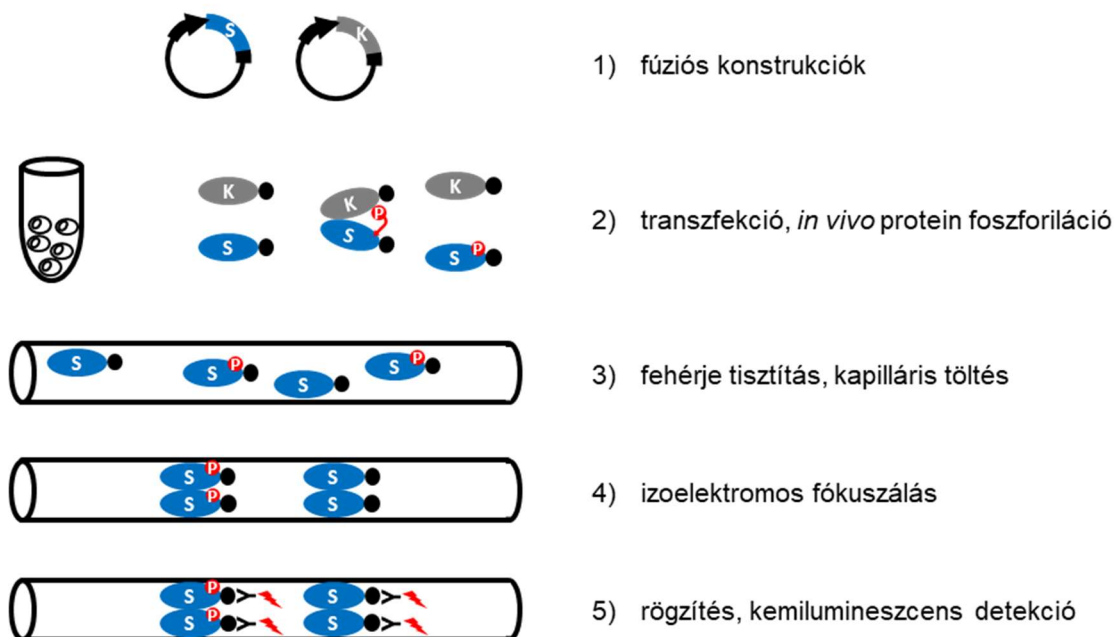
Amennyiben megfelelő analitikai módszerrel a foszforilált és a foszforilálatlan izoformákat egymástól elkülönítve tudjuk detektálni, a protoplaszt rendszer alkalmas lehet egy újszerű, *in vivo* foszforilációs teszt kialakítására, amely egy hatékony kísérleti módszer annak eldöntésére, hogy egy adott kináz képes-e egy adott fehérjét sejtes közegben foszforilálni.

Bizonyos esetekben a foszforilált izoformák eltérően migrálnak standard SDS-PAGE elválasztás során is, ami immunoblot módszerrel alkalmas lehet a foszforiláció vizsgálatára. Mivel azonban a szeparáció megjelenése fehérjefüggő, ez a megközelítés nem alkalmazható általános vizsgálati módszerként. Az eltérő migráció mértékét jelentős mértékben felerősíthető a gél kiegészítése foszfátkötő komponenssel (phos-tag technológia) (Kinoshita et al., 2006). Az eltérően foszforilált izoformák phos-tag módszerrel történő elkülönítése egyértelműen kezd teret nyerni a növényi kutatásokban is, mint fehérjefoszforilációs kísérleti megközelítés (lásd 2.3. fejezet), azonban a felbontása ennek a módszernek is korlátozott.

Hagyományosan a fehérje izoformák nagy felbontású szeparálását kétdimenziós elektroforézissel végzik, ahol a fehérjéket először izoelektromos pontjuk alapján választják szét (izoelektromos fókuszálás), majd erre merőlegesen, molekulatömeg szerint is elválasztják őket. 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).

Eredeti elképzelésünk szerint az aktív MAP kinázzal, illetve anélkül transzferált protoplaszt mintákban a szubsztrát jelöltek foszforilációját valamilyen immunoblot alapú módszerrel hasonlítottuk volna össze (Western blot, phos-tag Western, 2D elektroforézis). Azonban nagyjából azzal egyidőben, amikor a martonvásári intézetben sikerült beállítanunk és optimalizálnunk a sejtkultúra-fenntartás és protoplasztálás körülményeit, illetve az expresszált fehérjék elsődleges vizsgálatához sikeresen beállítottuk a western blot detekciós módszert is, egy kutatási együttműködés keretében lehetőségünk adódott a cIEF immunoesszé módszer alkalmazására növényi eredetű minták analízisében. Ebben a rendszerben az eltérő izoelektromos pontú (pI) izoformákat egy kapillárisban történő izoelektromos fókuszálással választják szét, majd azokat UV fényel immobilizálják. A kötött fehérjéket végül a kapillárisban végrehajtott antitestreakcióval mutatják ki, ahol az antitesthez kötött enzim által generált kemilumineszcens jelet egy érzékeny CCD kamera detektálja. A rendszer legfontosabb előnye kiváló felbontóképessége: 0,02 – 0,03 körüli pI érték változásokat megbízhatóan képes detektálni, ami kisebb különbség mint egy átlagos fehérjén egy hozzáadott foszfátcsoport által okozott pI változás (~0,05). Ez a felbontóképesség messze meghaladja a poliakrilamid elektroforézis rendszerek felbontóképességét, praktikusán egy átlagos méretű és aminosav összetételű fehérje valamennyi foszfoizoformája elválasztható így. Továbbá a kemilumineszcens jel digitális rögzítése révén a rendszer kvantitatív mérésekre is alkalmas. Ezek az előnyök különösen jelentősek olyan dinamikus foszforilált fehérjék esetében, ahol párhuzamosan többféle foszforilált izoforma van jelen. További fontos előny a rendkívüli érzékenység, akár 25 sejtnyi mintából is reprodukálhatóan kimutathatóak a vizsgált fehérjeformák, tehát lehetőség nyílik a felhasznált anyagok (protoplaszt, plazmidok) gazdaságos felhasználására.

Így kialakult egy újszerű kísérleti koncepció, ami ötvözi a protoplaszt transzferáció, mint rugalmasan alakítható *in vivo* módszer, és a cIEF immunoesszé, mint a foszfoizoformák detektálásának hatékony módszerének előnyeit (16. ábra).



16. **Ábra** A kináz-asszociált foszfoizozoma teszt kísérleti alapelve.

A koncepció a szubsztrátfehérjék foszfoizozomáinak aktivált kináz ko-expresszió következtében megváltozó arányának detektálásán alapszik. A vizsgálandó szubsztrátokat és kinázokat kódoló cDNS-eket epitóp fúziós konstrukciókként növényi expressziós vektorokba klónozzuk. A széleskörben használt epitópok használatával egyben elkerülhetőek a specifikus antitestek hiányából fakadó nehézségek is. A szubsztrát fehérjéket protoplasztokban kifejeztetve a kinázaktivitás függvényében foszforilálódnak, majd a megfelelő inkubációs periódus után a protoplaszt mintákból előállított fehérjekivonatokat kapillárisokba töltjük. Az izoelektromos fókuszálás a kapillárisokban kialakított pH grádiens mentén történik. Végül a szeparált protein mintákat a kapilláris felszínére rögzítjük, majd azokat a szubsztrát proteinekkel fuzionált epitópok elleni, kemilumineszcens enzim csatolt antitestekkel detektáljuk. (Dóry et al. (2016) nyomán.)

5.3.2. Egy jól jellemzett MAPK szubsztrát, az ACC szintáz 6 fehérje (ACS6) foszforilációjának vizsgálata az új kísérleti módszerrel

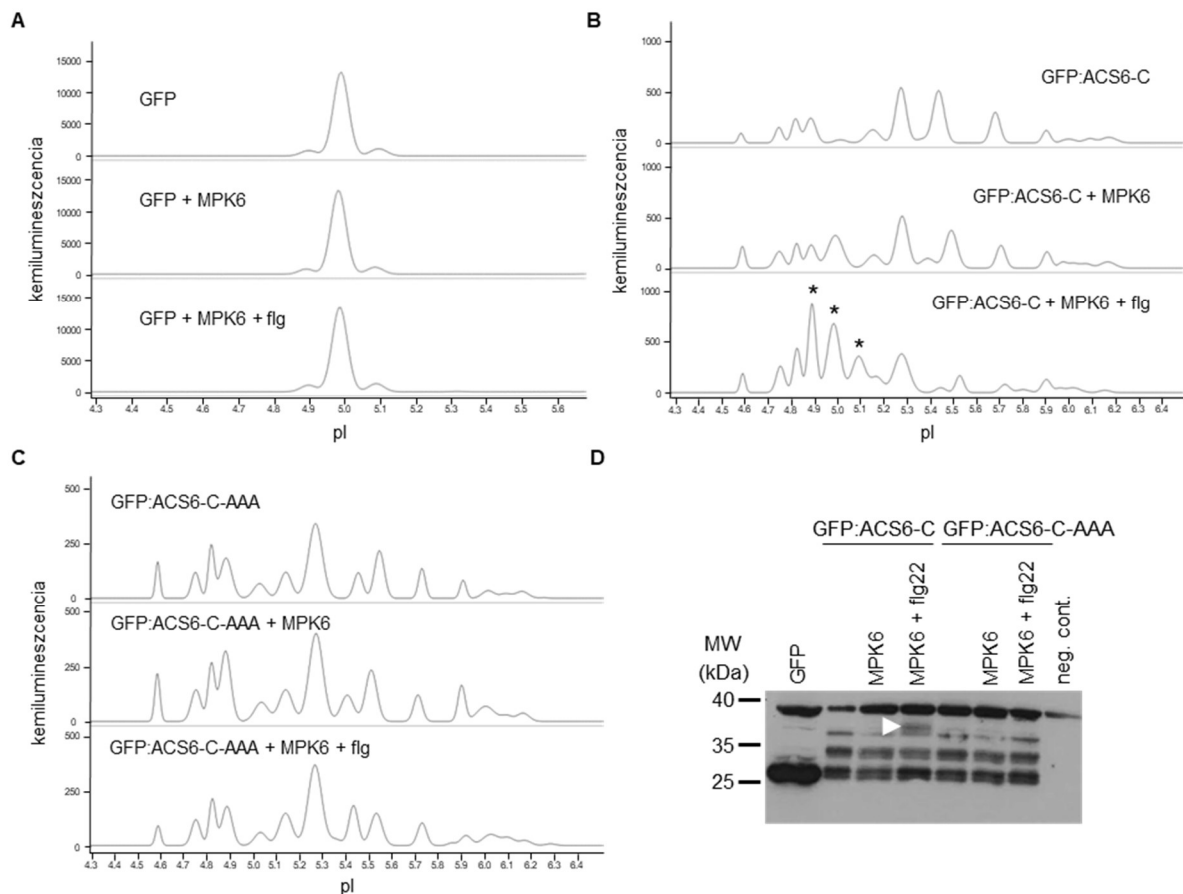
Első lépésként igazoltuk, hogy a cIEF-immunoesszé alkalmas protoplasztban expresszált fehérjék kimutatására. Legjobb tudomásunk szerint ez az első alkalom, hogy ezt a módszert növényi kutatásban használták, és megállapítottuk, hogy Bicine/Chaps kivonó puffer alkalmazásával nyert növényi fehérjeminták 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 (17.a ábra). A GFP fehérje egyben nem-szubsztrát negatív kontrollként is szerepelt kísérleti rendszerünkben, annak izoforma eloszlására semmilyen hatással nem volt az aktivált MAPK ko-expresszió (17.a ábra). Ezzel

szemben pozitív kontrollként előállítottunk egy olyan fúziós konstrukciót, amelyben a GFP fehérjét egy ismert MAPK szubsztráttal fuzionáltuk. Erre a célra az ACS6 (ACC szintáz 6) fehérje C-terminális doménjét választottuk, ahol három, az irodalomban jól jellemzett MAPK foszforilációs hely található (Liu and Zhang, 2004; Joo et al., 2008). A fúziós konstrukciót GFP:ACSC-C-nek neveztük el. A kontroll GFP-hez képest a GFP:ACSC-C fúziós fehérje számos izoformáját detektáltuk, vagyis különféle, eltérően foszforilált változatok párhuzamosan vannak jelen a sejtes közegben (17.b ábra). Ez a megfigyelés összhangban van azzal, hogy az ACS6 C-terminális doménjén számos kináz típus putatív foszforilációs helye megtalálható (pl. a Eukaryotic Linear Motif (ELM) resource (<http://elm.eu.org/>) adatbázis használatával).

Nem aktivált MPK6 ko-expressziója csak minimális mértékben eredményezi a savas izoformák (alacsonyabb pI értékű csúcsok az elektroferogrammon) felhalmozódását (17.b ábra). Ezzel szemben 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 (17.b ábra). Habár az MPK6 többféle környezeti stressz hatására aktiválódik (pl. só, hideg, oxidatív stressz), kísérleti rendszerünkben azért választottuk a flagellin aktivációt, mert a flg22 peptid az FLS2 receptor általi felismerése specifikus jelátviteli mechanizmusokat aktivál, miközben a sejteket tényleges fizikai vagy kémiai stressz hatás, károsodás nem éri.

Negatív kontrollként előállítottunk egy olyan mutáns GFP:ACSC-C variánst, amelyben a három MAPK foszforilációs helyet elrontottuk (S46A, S49A, S54A: GFP:ACSC-C-AAA). A GFP:ACSC-C-AAA fehérje izoforma eloszlására az aktivált MPK6 nem volt hatással (17.c ábra), igazolva, hogy a vad típusú konstrukcióval megfigyelt pI változások valóban MAPK foszforiláció következményei. Összehasonlításként a transzfektált fehérjéket hagyományos SDS-PAGE immunoblot esszével is detektáltuk, ahol a GFP:ACSC-C-vel ko-expresszált aktív MPK6 mintában egy lassabban migráló csík jelent meg (17.d ábra).

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.



17. Ábra Foszfoizozorma disztribúció detektálása cIEF-immunoteszttel tranziensen kifejezett GFP variánsokban.

(A-C) Különböző GFP fúziós fehérjék izoformaeloszlásainak cIEF-immunoteszttel detektált elektroferogramjai, a kifejeztetett fehérjevariánsok és kezelések mintáknént feltüntetve. (A) A módosítatlan GFP egy fő izoformában van jelen és az MPK6 nem foszforilálja. Felső panel: kontroll (önmagában kifejeztetett GFP), középső panel: MPK6-tal ko-expresszált GFP, alsó panel: flg22 aktivált MPK6-tal ko-expresszált GFP. (B) A GFP:ACS6-C konstrukció (az ACS6 C terminális doménje a GFP C terminálisához fuzionálva) izoforma eloszlása. Felső panel: kontroll (önmagában kifejeztetett GFP:ACS6-C), középső panel: MPK6-tal ko-expresszált GFP:ACS6-C, alsó panel: flg22 aktivált MPK6-tal ko-expresszált GFP:ACS6-C. A csillagok az aktív MPK6 jelenlétében specifikusan akkumulálódó savas izoformákat jelölik. (C) MAPK által nem foszforilálható GFP:ACS6-C variáns (GFP:ACS6-C-AAA) izoforma eloszlása. Felső panel: kontroll (önmagában kifejeztetett GFP:ACS6-C-AAA), középső panel: MPK6-tal ko-expresszált GFP:ACS6-C-AAA, alsó panel: flg22 aktivált MPK6-tal ko-expresszált GFP:ACS6-C-AAA. (D) Tranziensen kifejeztetett GFP variánsok detekciója hagyományos SDS-PAGE immunoblot módszerrel. A nyílhegy egy, az aktív MPK6 jelenlétében specifikusan megjelenő formát jelöl. Negatív kontroll (neg. cont.): GFP-vel nem transzformált protoplaszt minta. (Döry et al. (2016) nyomán.)

5.3.3. A merisztémaszerveződés mesterregulátora, a WUSCHEL (WUS) transzkripciós faktor az MPK3 kináz in vivo szubsztrátja

A növényi MAPK kutatás kezdeti eredményei elsősorban a stresszválaszban betöltött funkciókat tártak fel, azonban a MAPK jelátvitelnek a növényfejlődés szabályozásában

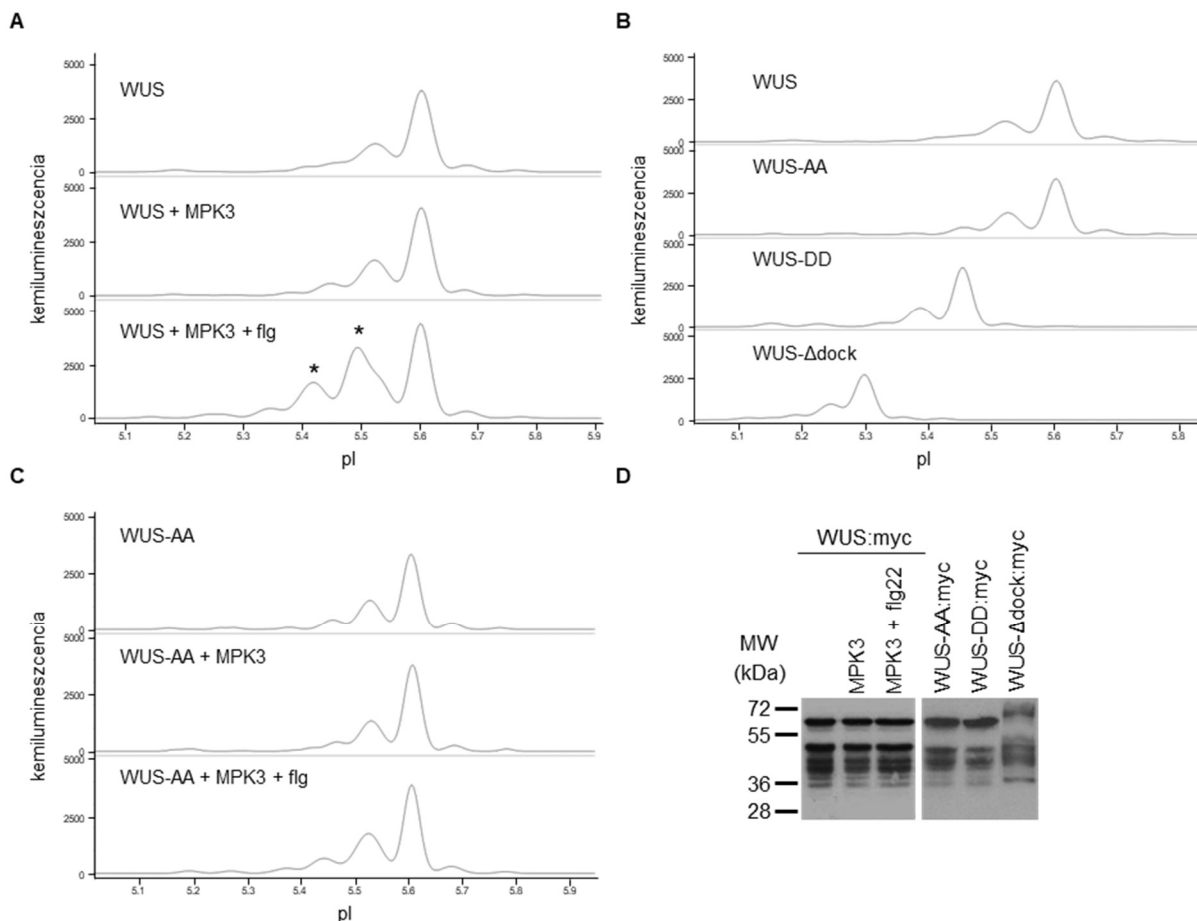
betöltött szerepe is egyre nyilvánvalóbb (Xu and Zhang, 2015; Zhang et al., 2018). Mivel a legtöbb azonosított szubsztrát is a védekezéssel függ össze (Dóczi and Bögre, 2018), célul tűztük ki a fejlődésszabályozásban kulcsszerepet játszó szubsztrátok azonosítását.

A WUS transzkripció faktor központi szerepet játszik az összejt készlet szabályozásában hajtás- és virágmeriszémákban (Laux et al., 1996; Zhou et al., 2015). Habár funkcióját genetikai módszerekkel igen nagy részletességgel tanulmányozták, a WUS poszttranszlációs szintű szabályozásáról gyakorlatilag semmilyen ismeret nem állt rendelkezésünkre.

Kihasználva a MAPK dokkoló helyek konzerváltságát (Dóczi et al., 2012), a legfontosabb merisztémaszabályozó transzkripció faktorokat megvizsgáltuk a D-site motívum jelenlétére, ami a lehetséges MAPK interakció egyik indikátorának tekinthető (Bardwell et al., 2009). A WUS fehérje négy potenciális MAPK foszforilációs helyet tartalmaz, valamint egy RRTLPL motívumot, ami MAPK dokkoló „D-site”-ként működhet.

Transzfekciót követő cIEF-immuneszttel sikerült detektálnunk a WUS fehérjét myc epitóp és GFP fehérje fúziós formában is, ami több, eltérő mennyiségű izoformában van jelen, a fő izoformák detektált és számolt pI értéke egyaránt 5,6 (:myc), illetve 6,7 (:GFP) (18.a és 19.a ábrák). Következő lépésként megvizsgáltuk, hogy vajon az aktív MAPK ko-expresszió okoz-e WUS foszforilációt. E célból a WUS fehérjét négy MAP kinázzal együtt fejeztettük ki, amelyek a növényi MAP kinázok három filogenetikai csoportját (A, B, C) reprezentálják (18.a és 19.a-c ábrák).

A savasabb WUS izoformák egyértelmű megjelenése azt mutatja, hogy a WUS fehérjét az MPK3 specifikusan foszforilálja, szemben a filogenetikailag közeli MPK6 (A csoport), és távolabbi MPK11 (B csoport) és MPK1 (C csoport) kinázokkal. Az aktiváló flg22 kezelés nélkül az MPK3 nem volt képes a WUS fehérjét foszforilálni, mint ahogy az MPK3 ko-expresszió nélküli flg22 kezelés sem. További negatív kontroll céljából előállítottunk egy inaktív MPK3 mutáns változatot. Ennek ko-expressziója szintén nem vezetett WUS foszforilációhoz, flg22 kezelést követően sem (19.c ábra). Ezen eredmények alapján már nagy valószínűséggel megállapítható, hogy a WUS egy MPK3 szubsztrát *in vivo*.



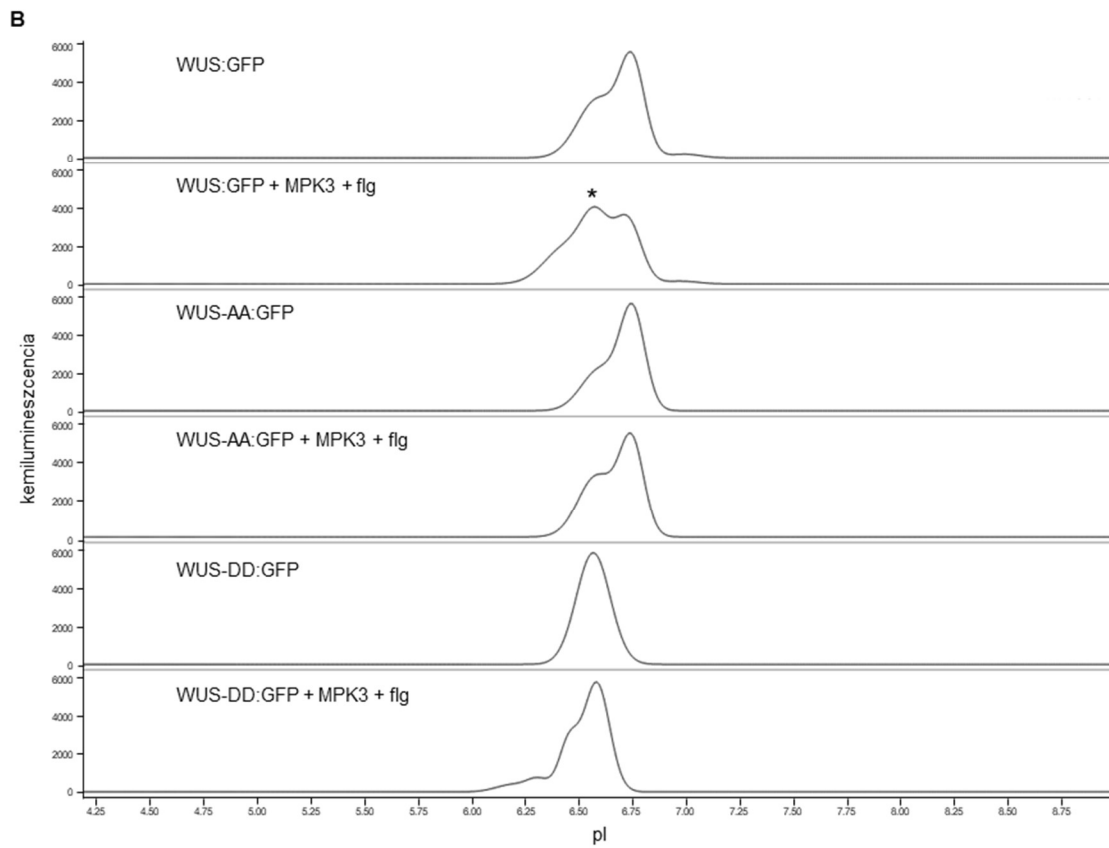
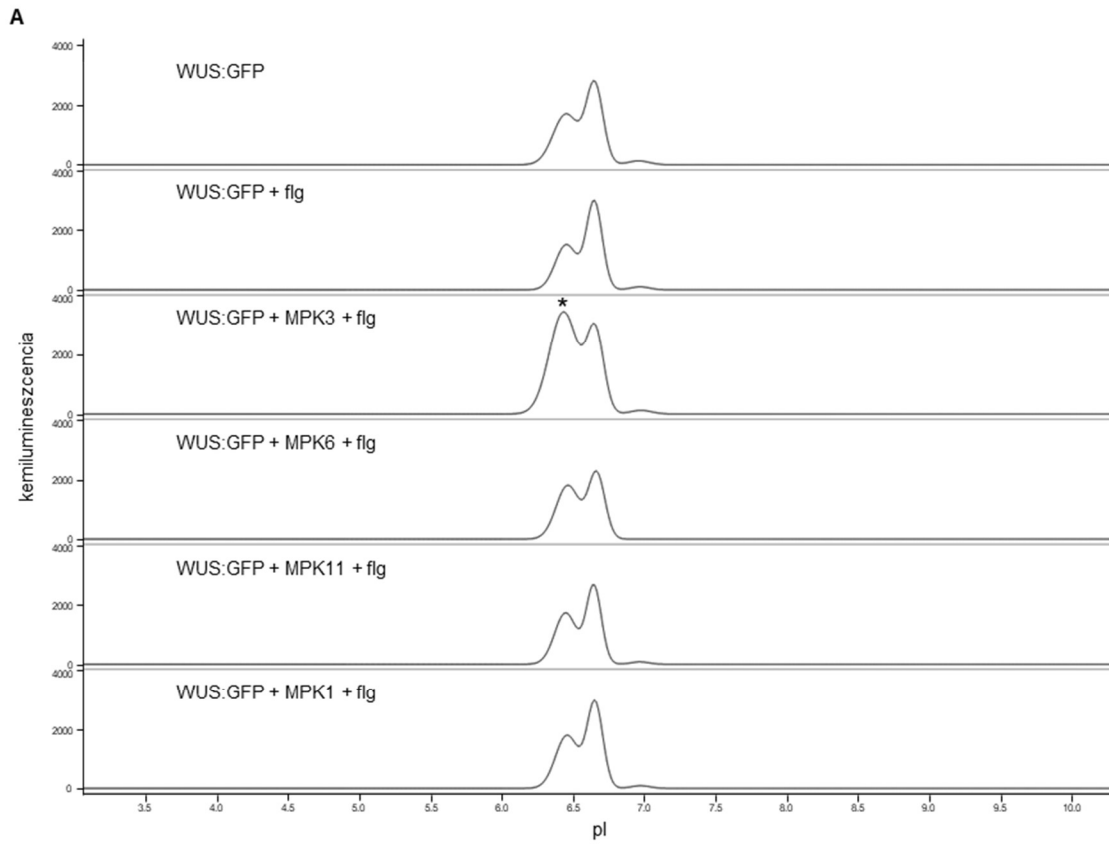
18. Ábra A WUS fehérje egy *in vivo* MPK3 szubsztrát.

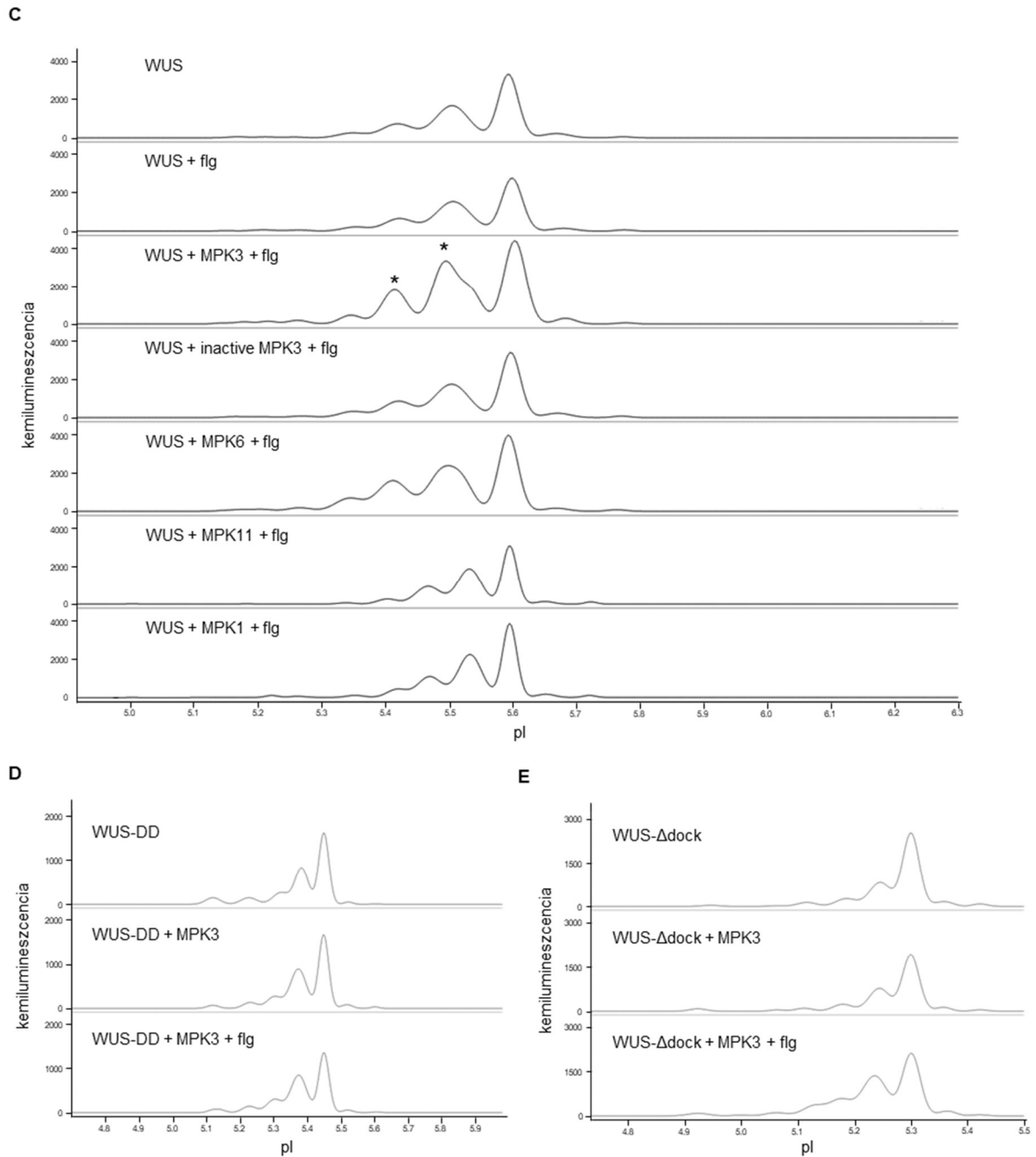
(A-C) Különböző WUS:myc fúziós fehérjék izoformaeloszlásainak cIEF-immunoteszttel detektált elektroferogramjai, a kifejeztetett fehérjevariánsok és kezelések mintákként feltüntetve. (A) Az aktivált MPK3 hatása a C terminálisan myc fuzionált WUS izoforma eloszlására cIEF-immunotesztben. Felső panel: kontroll (önmagában kifejeztetett WUS:myc), középső panel: MPK3-mal ko-expresszált WUS:myc, alsó panel: flg22 aktivált MPK3-mal ko-expresszált WUS:myc. A csillagok az aktív MPK3 jelenlétében specifikusan akkumulálódó savas izoformákat jelölik. (B) A különböző pontmutáns WUS variánsok eltérő töltésszegeinek detektálása protein pI érték változások szerint. WUSAA: nem foszforilálható mutáns, WUS-DD: foszfomimetikus mutáns, WUS-Δdock: a MAPK dokkoló D-hely motívummal nem rendelkező mutáns. (C) A T108, S112 MAPK foszforilációs helyek alanin szubsztitúciója a WUS MPK3 általi foszforilációjának elvesztését eredményezi. (D) Transziensen kifejeztetett WUS variánsok detekciója hagyományos SDS-PAGE immunoblot módszerrel. (Dóry et al. (2016) nyomán.)

A WUS MPK3 általi foszforilációjának további megerősítése céljából három, a MAPK foszforilációt érintő mutáns WUS variánst hoztunk létre, helyirányított mutagenézissel. A foszfoakceptor aminosavakat két, a homeodoménen kívül eső 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-Δdock). Fontos

megjegyezni, hogy e mutációk közül kettő a számított pI érték megváltozását eredményezte. Míg a WUS-AA mutáns pI értéke azonos a vad típusú fehérjéével, addig a bevezetett vagy megfordított töltések a WUS-DD és a WUS- Δ dock mutánsok pI értékeinek csökkenését okozták. A fő izoformákat mindegyik mutáns esetében a számított értékeknek megfelelően detektáltuk, ami jól demonstrálja, hogy a rendszer megbízhatóan képes kimutatni fehérjék töltésösszetételének kismértékű különbségeit (18.b és 19.b ábrák). Az MPK3 által kiváltott WUS savasodás teljesen megszűnt mind a nem-foszforilálható, mind a foszfomimetikus mutáns esetében (18.c és 19.d ábrák). Továbbá a funkcionális D-site hiánya a foszforiláció jelentős csökkenéséhez vezetett (19.e ábrák), ami az ezen a motívumon keresztüli közvetlen interakcióra utal.

Annak igazolására, hogy az eredmények nem a konkrét fehérjefúziós technika vagy az antitest alapú detekció által okozott műtermékek további kontrollkísérleteket is elvégeztünk. A myc fúziós konstrukciók mellett elkészítettünk a vad típusú, valamint a WUS-DD és WUS-AA mutánsok GFP-vel fuzionált változatait expresszáló konstrukciókat is, amelyekkel megismételtük az előzőekben bemutatott ko-expressziós kísérleteket. Habár a GFP szekvenciában egy S/TP hely előfordul, ez a globuláris szerkezetben helyezkedik el, és valószínűleg hozzáférhetetlen. A myc epitóp szekvenciában viszont nem található S/TP hely. Mindkét antitesttel hasonló WUS izoforma eloszlást, illetve - vad típusú WUS esetében - aktivált MPK3-mal előidézett savasodást figyeltünk meg, a kisebb méretű myc epitóp esetében még további kisebb csúcsokat is detektáltunk (18 és 19 ábrák).





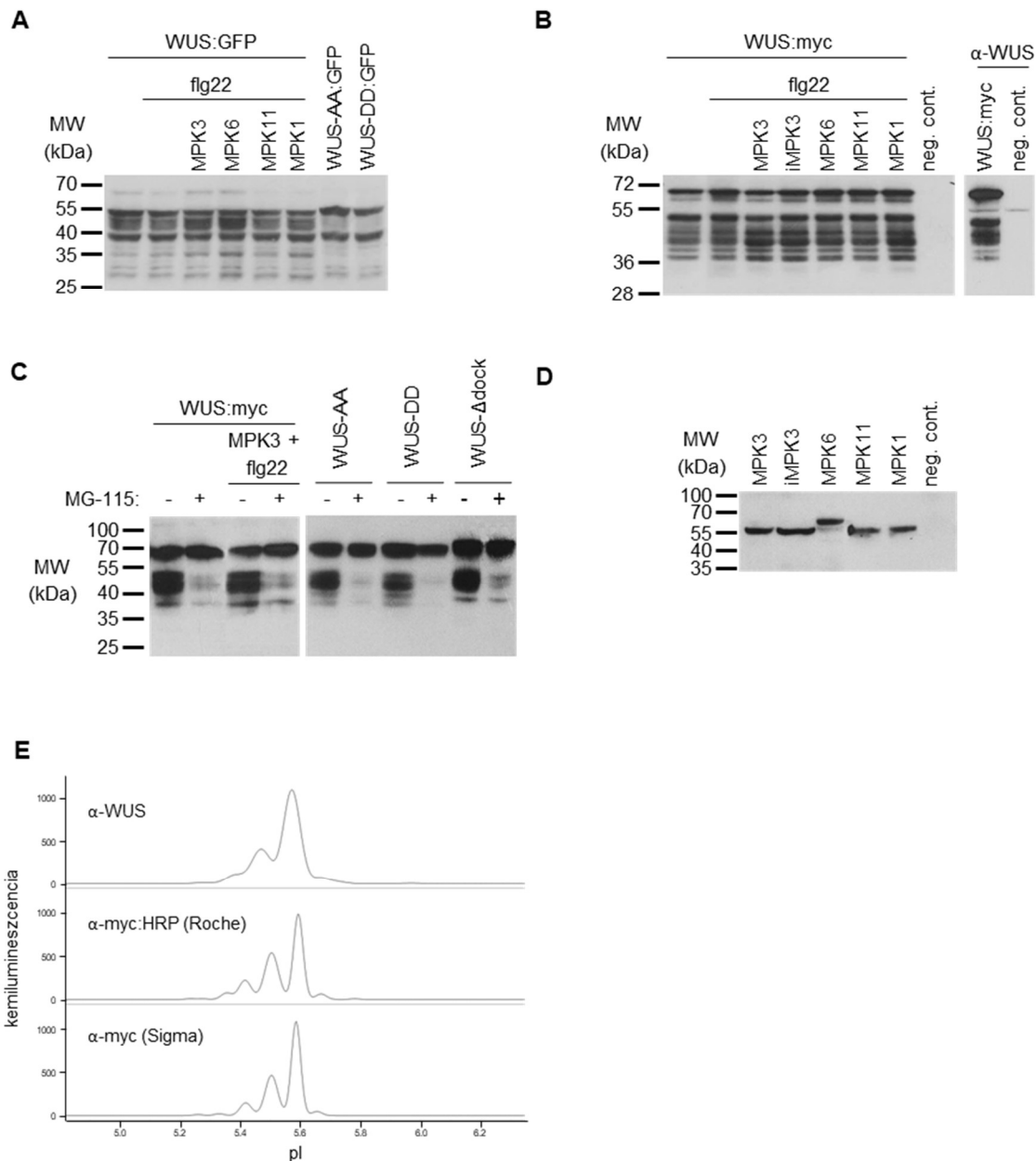
19. Ábra A WUS fehérje MPK3 általi *in vivo* foszforilációját igazoló kontrollkísérletek.

(A, B) Különböző WUS:GFP fúziós fehérjék izoformaeloszlásainak cIEF-immunoteszttel detektált elektroferogramjai, a kifejeztetett fehérjevariánsok és kezelések mintáknaként feltüntetve. (A) A MAPK ko-expresszió és flg22 kezelés hatása a WUS:GFP izoforma eloszlására cIEF-immunotesztben. A csillag egy, az aktív MPK3 jelenlétében specifikusan akumulálódó savas izoformát jelöl. (B) A T108, S112 MAPK foszforilációs helyek szubsztitúciója nem foszforilálható alaninra (WUS-AA:GFP) és foszfomimetikus aszparaginsavra (WUS-DD:GFP), a WUS MPK3 általi foszforilációjának elvesztését eredményezi. A csillag egy, az aktív MPK3 jelenlétében specifikusan akumulálódó savas izoformát jelöl. (C-E) Különböző WUS:myc fúziós fehérjék izoformaeloszlásainak cIEF-immunoteszttel detektált elektroferogramjai, a kifejeztetett fehérjevariánsok és kezelések mintáknaként feltüntetve. (C) A MAPK ko-expresszió és flg22 kezelés hatása a C terminálisan myc fuzionált WUS izoforma eloszlására cIEF-immunotesztben. A csillagok az aktív MPK3 jelenlétében specifikusan akumulálódó savas izoformákat jelölik. (D) A T108, S112 MAPK foszforilációs helyek aszparaginsav szubsztitúciója a WUS MPK3 általi foszforilációjának elvesztését eredményezi. (E) A MAPK dokkolóhely eltávolítása a WUS MPK3 általi foszforilációjának csökkenését eredményezi. (Döry et al. (2016) nyomán.)

Továbbá, a myc epitóp alapú detekció további kontrolljaként az expresszált WUS:myc fehérjét három különböző antitesttel is konzisztensen detektáltuk. Rutinszerűen egy közvetlen tormaperoxidázzal (horseradish peroxidase, HRP) konjugált anti-myc antitestet használtunk (Roche), ami nem igényelt másodlagos antitest reakciót. Összehasonlításként egy független forrásból származó (Sigma) anti-myc antitestet is kipróbáltunk, azonos eredményekkel (20.e ábra). Ezen kívül, egy specifikus anti-WUS antitest beszerezhető kereskedelmi forgalomból is (Agrisera), részben ezért is választottuk a WUS fehérjét a módszer alapos tesztelésére. Kísérleteinkben az anti-WUS ellenanyag mind cIEF-immunoesszében, mind hagyományos immunoblot esszében az anti-myc ellenanyagokkal azonos eredményeket adott (20.b,e ábrák). Ezek az eredmények igazolták, hogy az epitóp fúzió és az immundetekció nem zavarják az intracelluláris WUS foszforilációt, és annak detekcióját.

A kifejeztetett WUS fehérjét hagyományos Western blot módszerrel is ki tudtuk mutatni, ami függetlenül igazolta a tranziens expressziót, de ugyanakkor nem volt alkalmas a foszforizozomák szeprálására (18.d és 20.a,b ábrák).

Érdekes módon, a WUS fúziós variánsok SDS-PAGE-ben rendellenesen migrálnak. A WUS:myc és WUS:GFP változatok molekulatömege 48,3 kDa és 60,3 kDa, azonban a WUS:myc 68 kDa, míg a WUS:GFP 54 kDa körüli molekulatömegnek megfelelően migrál. Ahogy a foszforilációt eredményező aktivált MPK3 ko-expressziója sem okoz változást a fúziós fehérjék Western blot mintázatában, úgy a WUS-AA és WUS-DD mutánsok is a vad típusú változataiknak megfelelően migrálnak, míg a WUS- Δ dock változat kissé lassabban. Továbbá számos gyorsabban migráló forma is konzekvensen megfigyelhető volt, amelyek jelenléte jelentősen csökkent ha a protoplasztokat MG-115-tel, egy hatékony proteaszóma gátlóval kezeltük, ami azt jelzi, hogy a kisebb molekulatömegű változatok képződése a fehérjedegradáció folyamatával függhet össze (20.c ábra). A transzformált HA epitóp fúziós MAPK konstrukciók expresszióját anti-HA antitesttel, Western blottal mutattuk ki (20.d ábra).

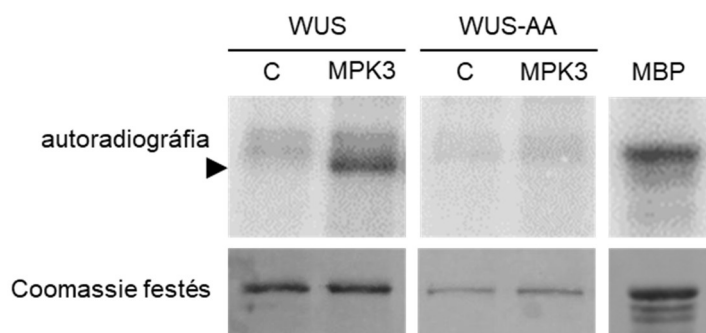


20. Ábra A WUS fehérje *in vivo* foszforilációs kísérletekben kifejeztetett fehérjék immundetekciója különböző antitestekkel.

(A) A különböző MAP kinázokkal ko-expresszált WUS:GFP variánsok detekciója SDS-PAGE immunoblot módszerrel. (B) A különböző MAP kinázokkal ko-expresszált WUS:myc variánsok detekciója SDS-PAGE immunoblot módszerrel, anti-myc antitesttel. A negatív kontroll (neg. cont.) egy myc epitóppal nem transzformált minta. A jobb oldali panel a tranziensen kifejeztetett WUS:myc detekcióját mutatja egy specifikus anti-WUS antitesttel. A negatív kontroll (neg. cont.) egy WUS:myc konstrukcióval nem transzformált minta. (C) Tranziensen expresszált WUS:myc variánsok detekciója SDS-PAGE immunoblot módszerrel. A proteindegradációnak a kisebb molekulásúlyú formák megjelenésében játszott szerepének vizsgálatára MG-115 proteaszóma inhibitorát használtunk. (D) Az *in vivo* WUS foszforilációs kísérletekben használt tranziensen kifejeztetett MAPK-ok detekciója SDS-PAGE immunoblot módszerrel. iMPK3: kináz inaktív MPK3 mutáns. A negatív kontroll (neg. cont.) egy HA epitóppal nem transzformált minta. (E) Konzekvens WUS:myc detekció CIEF-immunoteszttel. A tranziensen kifejeztetett WUS:myc konstrukciót a következő antitestekkel detektáltuk: specifikus anti-WUS (Agrisera, felső panel), HRP-konjugált anti-myc (Roche) és anti-myc (Sigma). (Döry et al. (2016) nyomán.)

A fenti eredmények igazolják, hogy a sejtés közegben eltérően foszforilált WUS izoformák hagyományos Western blot immunetekcióval nem mutathatók ki, míg a cIEF immunteszt módszerrel kismértékű izoelektromos pont változások is nagy pontossággal detektálhatóak.

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 (21. ábra).

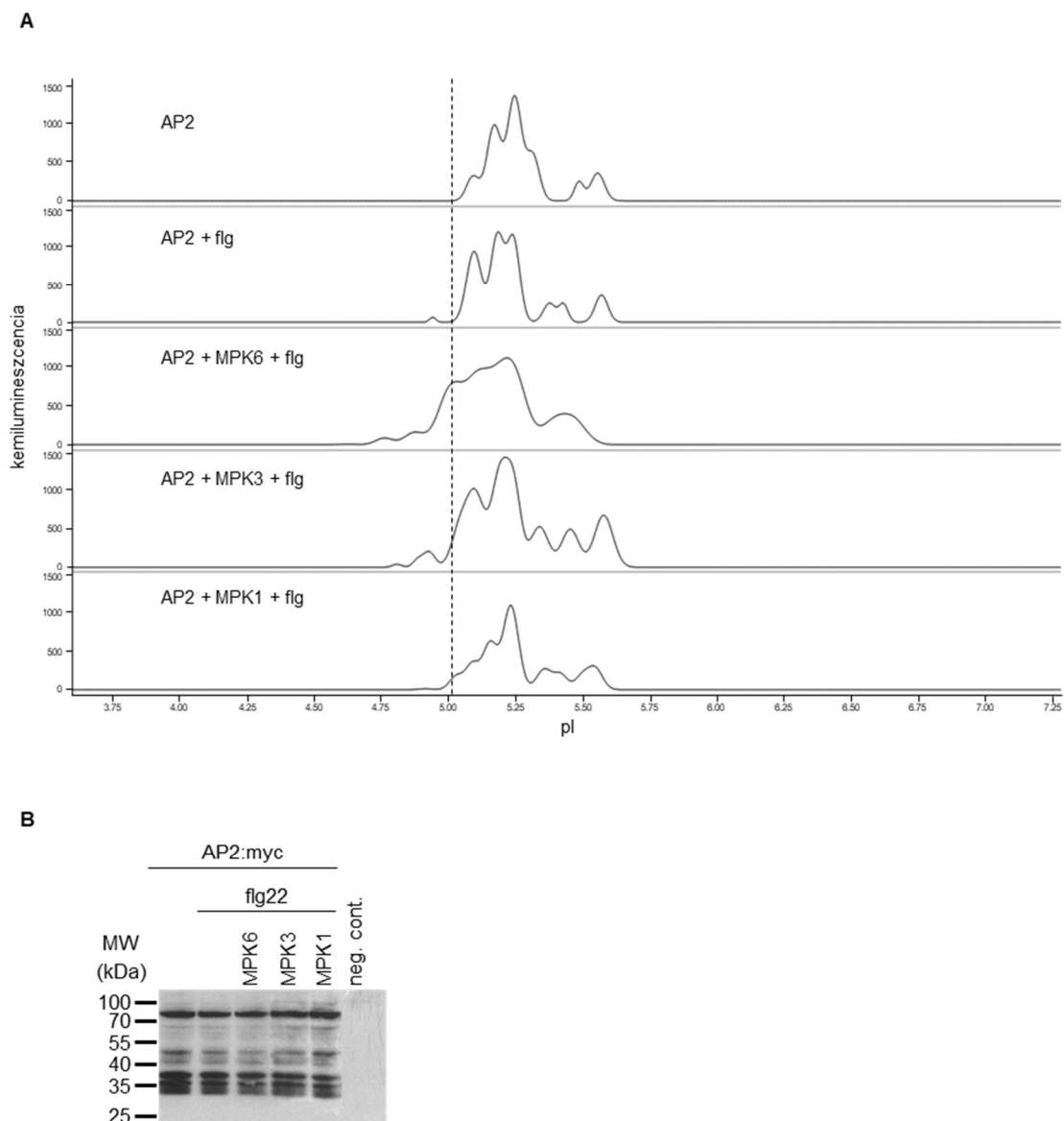


21. Ábra A WUS fehérje egy *in vitro* MPK3 szubsztrát.

In vitro transzlált és affinitástisztított vad típusú GST:WUS (WUS) és T108A, S112A mutáns GST:WUS (WUS-AA) variánsokkal végzett kináz tesztek. C: kontroll, MPK3: *in vitro* transzlált, affinitástisztított és eluált MKK4/MPK3 kombinációval inkubált WUS variánsok. Az autoradiográfián az SDS-PAGE elválasztott WUS proteint nyílhegy jelöli. A jobb oldali panel az MPK3 általi myelin bázikus protein (MBP) foszforilációt mutatja (MPK3 aktivitás kontroll). (Döry et al. (2016) nyomán.)

5.3.4. A virágfejlődés egyik mesterregulátora, az APETALA2 (AP2) transzkripció faktor az MPK6 *in vivo* szubsztrátja

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



22. Ábra Az AP2 transzkripció faktor egy *in vivo* MPK6 szubsztrát.

(A) A MAPK ko-expresszió és flg22 kezelés hatása a C terminálisan myc fuzionált AP2 izoforma eloszlására cIEF-immunoblotban, a kifejezetetett fehérjevariánsok és kezelése mintáknaként feltüntetve. A szaggatott vonal egy, az aktivált MPK6 jelenlétében megjelenő, jelentősebb savas izoformát jelöl. (B) Transziensen kifejeztetett AP2:myc variánsok detekciója hagyományos SDS-PAGE immunoblot módszerrel. A negatív kontroll (neg. cont.) egy myc epitóppal nem transzformált minta. (Döry et al. (2016) nyomán.)

Az AP2 foszforilációját aktivált MAP kinázok ko-expressziójával vizsgáltuk (22.a ábra). 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. Ezzel szemben az 5,0 pI értékű izoforma nem volt jelen azokban a mintákban, ahol az AP2-t MPK3-mal vagy MPK1-gyel együtt fejeztettük ki. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az AP2 egy *in vivo* MPK6 szubsztrát. A konvencionális immunoblot technika itt sem bizonyult alkalmasnak, hogy a foszfoizoforma eloszlás változásait feloldja (22.b ábra).

A kialakított rendszerben több további, a szekvenciamintázatok alapján azonosított MAPK szubsztrát jelöltet is megvizsgáltunk (WOX5, AP1, AP2, DPB, FLC). A kísérletek során, egy kivételtől eltekintve, mindegyik fehérje esetében a negatív töltésű foszfátcsoport(ok) megjelenését jelző, alacsonyabb pI értékű formák megjelenését/felhalmozódását figyeltük meg az aktív MAPK-zal ko-transzfektált mintákban. Érdekes módon az FLC esetében az aktív MAPK jelenlétében a pI érték növekedett. E jelenség hátterében egy komplex foszforilációs-defoszforilációs rendszer állhat (pl. a MAPK által foszforilált változat hozzáférhetővé válik egy foszfatáz számára, ami így más aminosavakat defoszforilálhat), ennek értelmezése további szisztematikus vizsgálatokat igényelne. Ezekkel a szubsztrát jelöltekkel nem végeztünk kellő számú ismétlést, így az eredményeket nem közöltük. Azonban még ha ezen eredmények egy része nem is állná ki a reprodukálhatóság próbáját, egy fontosnak tűnő trend körvonalazódik, miszerint a MAPK közvetített foszforiláció feltehetően széles körben részt vesz a merisztémaszabályozó transzkripciós faktorok szabályozásában, ami jól illeszkedik az MKK7 jelpálya merisztémaszabályozó funkcióját feltáró eredményeinkhez.

A merisztémaszerveződés és a szervkialakulás molekuláris mechanizmusait ma már igen részletesen ismerjük a több évtizednyi genetikai megközelítésű kutatások eredményeképpen. A mutáns növényvonalak használata lehetővé tette a különböző mester regulátor transzkripciós faktorok azonosítását és funkcionális jellemzését. Eredményeink két, jól jellemzett regulátor *in vivo* foszforilációját tárták fel, ami arra utal, hogy ezek celluláris funkciójuk dinamikusan modulálódik, így a továbbiakban a pontosabb funkcionális ismereteket célzó vizsgálatokban a poszttranszlációs módosításokat is figyelembe kell venni.

5.4. A MAPK jelátvitel részt vesz a PIN auxin transzporterek poszttranszlációs szabályozásában

5.4.1. A hosszú hidrofíl hurokkal rendelkező PIN fehérjékben evolúciósan nagy mértékben konzervált MAPK foszforilációs mintázatok találhatóak

Az 5.3. fejezetben ismertetett fehérjék mind transzkripciós faktorok. Azonban 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. A PIN fehérjék szerkezetileg két hidrofób domént tartalmaznak, amelyekben öt-öt transzmembrán régió található. Ezeket köti össze egy központi hidrofíl hurok (hydrophilic loop (HL)), amelynek mérete alapján a PIN család két altípusra osztható. A legtöbb PIN protein (Arabidopsisban a PIN1/2/3/4/7, illetve a legtöbb szerző szerint a PIN6 is; ezeket gyakran kanonikus PIN proteinekként említik az irodalomban) hosszú HL szekvenciával rendelkezik. Ezek alapvetően plazma membrán lokalizált PIN fehérjék, míg a rövid HL PIN proteinek (PIN5/8) jellemzően az endoplazmatikus retikulumban (ER) lokalizálódnak (Krecek et al., 2009).

Az auxin transzporterekre jellemző a poszttranszlációs 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). Továbbá, a PID és D6 protein kinázok a PIN auxin transzport aktivitását is szabályozzák (Barbosa et al., 2014; Zourelidou et al., 2014). Az azonosított foszforilációs helyek mindegyike hosszú HL szekvenciában található, ami a legkevésbé konzervált PIN régió (Krecek et al., 2009).

Az Arabidopsis PIN protein szekvenciák az ELM eszközzel (Dinkel et al., 2014) végzett *in silico* analízisével számos putatív MAPK foszforilációs helyet azonosítottunk. Azonban különösen figyelemreméltó volt 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 hosszú HL PIN szekvenciában jelen vannak (23.a ábra), ráadásul

tökéletesen konzerváltak egyszikű (rizs) és moha (*Physcomitrella*) szekvenciákban is (23.a ábra). Szintén figyelemreméltó, hogy az MPK6 preferált foszforilációs határszekvencia mintázatban (L/P-P/X-S-P-R/K) (Sörensson et al., 2012) szereplő több aminosav is hasonlóan jól konzervált ezen pozíciók környékén. Két aminosavat (T227 és T286) két, a stressz válaszokat vizsgáló kvantitatív fosztoproteomikai tanulmányban is *in planta* foszfortreoninként detektáltak (Benschop et al., 2007; Roitinger et al., 2015). Továbbá, a PIN1 197–206 pozíciójában egy MEF2A típusú MAPK dokkoló motívum (Zeke et al., 2015) található, habár a motívum első bázikus aminosava néhány PIN szekvenciában hiányzik. Valamint, egy szintén jól konzervált RKLI motívum is megtalálható (PIN1 471–474), ami a kanonikus MAPK dokkoló motívumra hasonlít (Bardwell et al., 2009), habár itt hiányzik/hiányoznak a köztes (spacer) aminosav(ak).

Érdekes módon, a három ismert PID foszforilációs hely (S231, S252 és S290) hasonlómértékben konzervált és konzisztensen a konzervált putatív MAPK foszforilációs helyek közelében helyezkednek el (négy aminosavval lefelé), mintegy mintázatot képezve a szekvenciában. A cAMP-DEPENDENT, cGMP-DEPENDENT PROTEIN KINASE C (AGC) kinázok, mint amilyen a PID is, nem igényelnek egy felelé elhelyezkedő TP motívumot (Dinkel et al., 2014), tovább erősítve a feltételezést, hogy ezek tényleges MAPK foszforilációs helyként funkcionálnak.

A PIN1 HL szekvenciában tovább lefelé két további MAPK foszforilációs hely is található (S337 és S377), amelyek mellett viszont nincsenek jelen a preferált határszekvencia mintázatra jellemző aminosavak és a szomszédos PID foszforilációs hely. Érdekes módon egy közlemény szerint az S337 egy MPK6 target (Jia et al., 2016), habár ez a hely kizárólag az *Arabidopsis* PIN1 proteinben van jelen (23.b ábra).

A

AtPIN1 G223-D295:

```

PpPIND ---GQPAVGSVA-----Q RNSFSVA-----
OsPIN5 NAVAADRPEQEVAVNIEITEMAAS---TARDGV-----
OsPIN4 -----GGG-----GGVGA-----
OsPIN5B -----
AtPIN8 -----SSNNIS-DVQVDNI-----
OsPIN6 -----
AtPIN5 -----EHTGNDQEEANIEDE
AtPIN6 SLCLTPRASNLNLS-NAEIFSVNTPNNRFFHGGGGGSLQFYNGSNEIMFCNGDLGGFGFTRPGLGASPR---RLSGYASS---DAYSLQ---PTPRASNFNEL
PpPINC SKALTPRASNLNLS-NAEIIYSMNSSVNLTPRDSST-----FDRGED--CSTMAHRDPN-----RKSNFDTSS---DIYSLQ--SSRGPTRPSNFNEE
PpPINA SKALTPRPSNLT-GAEIYSMHSSVNLTPRDSST-----FNQGEF--HSMMSQRS PH-----RQSNFDTS---DVYSLQ--SSRGPTRPSNFNEE
PpPINB SKALTPRPSNLT-GAEIYSMHSSVNLTPRDSST-----FNQGEY--FSMMAQRS PH-----RQSNFDIS---DVYSLQ--SSRGPTRPSNFNEE
OsPIN3B --AAPRASNLNLT-GVEIYSSSRNATPRGST-----FTLADI-----PGHQPPNSALRASSFGAA---DLFLHSSSRQHTRPSNFDEH
AtPIN2 SSMITPRASNLNLT-GVEIYVQSSRETPRASS-----FNQTFD--YAMFNASKAPSRHGYTNSYGGAGAGPGDVYSLQ--SSKGVTRPSNFDEE
OsPIN2 SNAMTPRASNLNLT-GVEIYSLQTSRETPRASS-----FNQADF--YAMVSGSKMA-----S-----QMASPMAQHGGAGRAQGLDEQ
AtPIN4 SLMMTPRPSNLT-GAEIYSLSS---TPRGSN-----FNHADF--YSVMGFPGG-----RLSNFGPA---DLYSVQ--SSRGPTRPSNFEE
AtPIN7 GTNMTPRPSNLT-GAEIYSLNT---TPRGSN-----FNHADF--YSMMGFPGG-----RLSNFGPA---DMYSVQ--SSRGPTRPSNFEE
AtPIN3 GPNMTPRPSNLT-GAEIYSLST---TPRGSN-----FNHADF--YNNMGFPFGG-----RLSNFGPA---DMYSVQ--SSRGPTRPSNFEE
OsPIN3A SLLVTPRPSNLT-GAEIYSLSSRNTPRGSN-----FNHADF--FAMVGGPPPTPAAVRGSSFGAS---ELYSLQ--SSRGPTRPSNFDEH
OsPIN1B SQSQMPRVSNLS-GVEIYSLQSSRNTPRGSST-----FNHAEF--FNIVGNKQK---G-----DEEKGAAGGGHSPQP-----
AtPIN1 GLSATPRPSNLT-NAEIYSLQSSRNTPRGSST-----FNHTDF--YSMMASGGG-----RNSNFGPA---EAVF--GSKGTRPSNYEED
OsPIN1C FSSTTPRPSNLT-NAEIYSLQSSRNTPRGSST-----FNHTDF--YSMVG-----RNSNFAAG---DAFGVR---TGATPRPSNYEED
OsPIN1A S-STTPRPSNLT-NAEIYSLQSSRNTPRGSST-----FNHTDF--YSMVG-----RNSNFGAA---DAFGVR---TGATPRPSNYEED
                T227                T248                T286
    
```

B

AtPIN1 G319-Y394:

```

PpPIND -----
OsPIN5 -----
OsPIN4 -----VMSSSSPP-----
OsPIN5B -----
AtPIN8 -----
OsPIN6 -----
AtPIN5 -----
AtPIN6 -----IYRQSSPKM-----MWESGQRHAAK---DINGSVPE-----
PpPINC SMGPDGRTIYPGITVVTNSVAA-----VPASGVSTHINPVFSPVLSQVAKKVNDRASIPKTDDEAKELHMFVSSANPTS VSE-GELHVFVGGDISINL--
PpPINA GMGPDGRTIYPGQTA INILTLGGAANVNATAPSTAVNTQIVNPFVYSPQASQIAKKVKDPKAS-PRADEDAKELHMFVWSANA SEVSE-AGLHVFGGNDTSANL--
PpPINB GMGPDGRTIYPGQTAISLVTPGGTGNIATPL-SSSLNTQIVNPFVYSPRASQIAKKVKDRTRS-PKSDDEAKELHMFVWSANA SEVSE-AGLHVFGGNDTSANL--
OsPIN3B -----RARASATV-----APTNDLKDTHMIEWSSGASASEVTLGPLVFRSGRETRRLVP
AtPIN2 -YNNNSVPSYPPNPMTGTS GSGVKKESGGGGSGGG-----VGVGQNKEMNMFVWSSSA SEVSEANAKNAMTRGSS-----
OsPIN2 -YAPNPFGMPMPAPRKKELG-----GSNSNSKELHMFVWSSSA SEVSE---ANLRNAVNHAAST--
AtPIN4 -YAPNPEFSTGTGVSTKPKNIKPKENQQQLQEKD-----SKASHDAKELHMFVWSSSA SEVSD----VFGGAGDNVATE
AtPIN7 -YAPNPEFSTGNKTGSKAPKENHHVHG-----KSNNDAKELHMFVWGSNG SEVSDRAGLQVDNGANEQVKG--
AtPIN3 -YAPNPEFSSTTTSTANKSVNKNPKDVNTNQTTLP TGG-----KSNSHDAKELHMFVWSSNG SEVSDRAGLNVFGGAPDNDQGG-
OsPIN3A -----RPPKPPATTT-----GALNHDAKELHMFVWSSSA SEVSEVSLPVPFSGGGGGG---
OsPIN1B -----VVGKRDLMFVWSSSA SEVSER-----
AtPIN1 GSGGGGAHYAPNPGMF SENTGGGGGTAAGNAPVVG-----KRQDGNRDLHMFVWSSSA SEVSD----VFGGGGHHHADI
OsPIN1C -YAPNPAMAAPPKPKAANG-----QAKGEDGKDLHMFVWSSSA SEVSD----VFGNGAEY---
OsPIN1A -----YAPNPVAVSSAPKAKKAA-----TNGQAKGEDLHMFVWSSSA SEVSD----VFGGAPDY---
                S337                S337
    
```

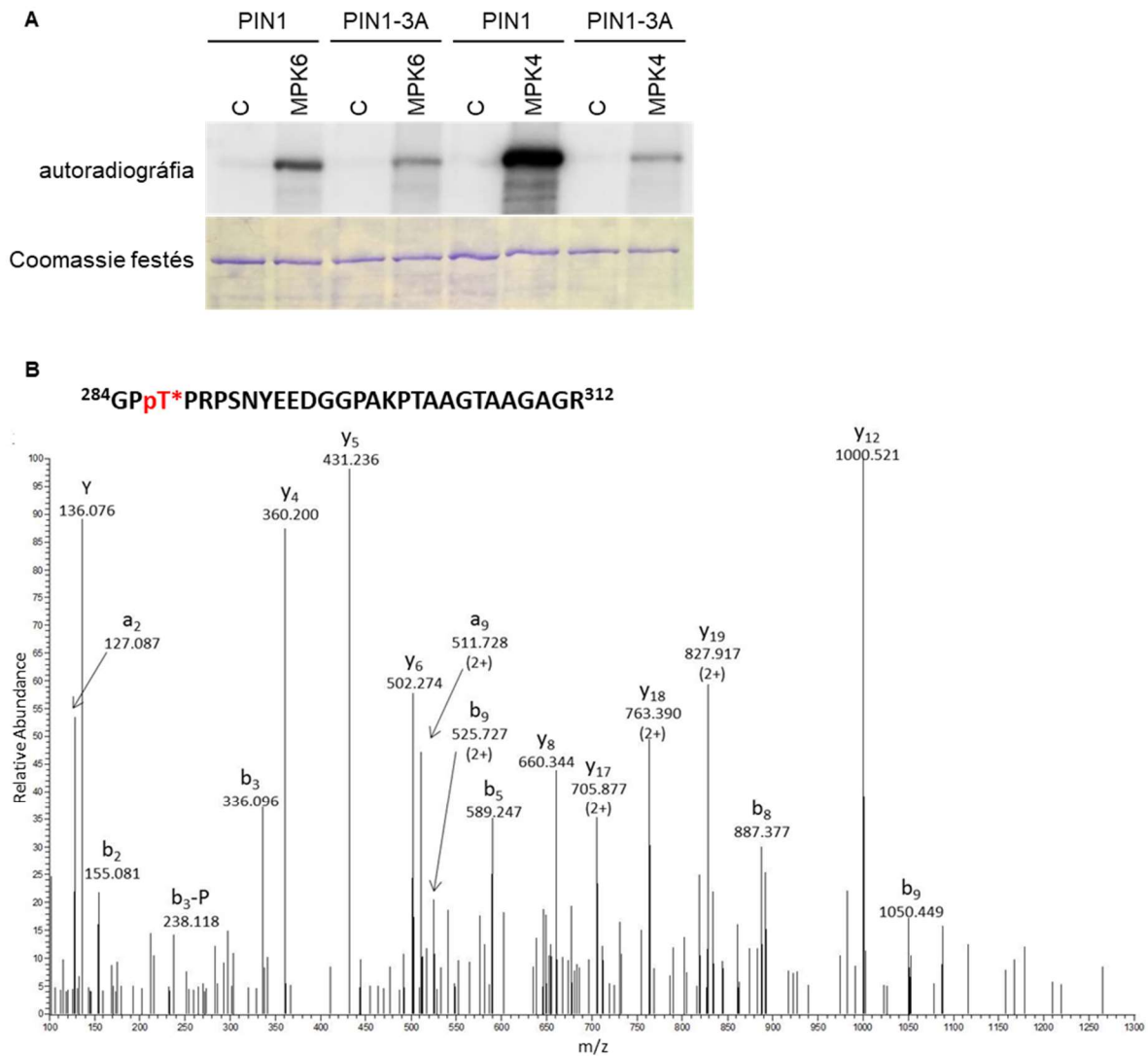
23. Ábra A MAPK foszforilációs helyek konzerváltasága és PINOID (PID) foszforilációs helyekkel közös előfordulása szárazföldi növényekben.

A UNIPROT PIN auxin efflux proteincsalád *Arabidopsis*, rizs és *Physcomitrella patens* tagjait a MUSCLE algoritmussal illesztettük. Az ábrán bemutatott régiók az *Arabidopsis* PIN1 hidrofil hurok G223-D295 (A) és G319-Y394 (B) régióinak felelnek meg. A MAPK és PID foszforilációs helyeket, valamint az MPK6 preferált foszforilációs határszekvencia mintázatnak megfelelő aminosavakat piros, fekete és szürke kiemelésekkel jelöltük. A potenciális MAPK foszforilációs helyek a teljes hosszúságú PIN1 szekvenciának megfelelő pozíciói alul feltüntetve. (Döry et al. (2018) nyomán.)

5.4.2. A PIN1 fehérje T227, T248 és T286 treonin aminosavait az MPK6 és az MPK4 kinázok egyaránt foszforilálják

A MAPK foszforilációs mintázatok széleskörű konzerváltsága, azok együttes elfordulása a PID foszforilációs helyekkel, valamint az igazolt *in planta* foszforiláltság mind a T227, T248 és T286 funkcionális jelentőségét sugallják, ezért megvizsgáltuk ezek MAPK közvetített foszforilációját. E célból elsőként *in vitro* kináz tesztekét végeztünk (24.a ábra). Amint azt a radioaktív foszfát beépülése jelzi, a tisztított *in vitro* transzlált vad típusú PIN1 hidrofíl hurok fehérjét az MPK6 foszforilálja. Ezzel szemben, a három MAPK foszforilációs hely szubsztitúciója nem foszforilálható alanin aminosavakkal (T227A/T248A/T286A) ennek a foszforilációnak a jelentős csökkenését eredményezte. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a PIN1 T227, T248 és T286 aminosavak MAPK foszforilációs helyek. Hogy ezek MPK6 által közvetített foszforilációját közvetlenül igazoljuk, MPK6 kezelt és a kontroll GST-PIN1 HL fehérjét LC-MS/MS analízissel teszteltük. Mind a T227, T248, T286, mind a korábban leírt S337 (Jia et al., 2016) foszforilációját sikerült igazolni a kináz kezelt mintában, ahol öt foszfopeptidet (köztük egy duplán foszforiláltat) azonosítottunk (24.b ábra). Azonos eredményt értünk el foszfopeptid dúsítással és dúsítás nélkül is, két ismétlésben.

A PIN1 T227, T248 és T286 helyeknek megfelelő MAPK foszforilációs helyek konzerváltsága egészen a *Physcomitrella* hosszú HL PIN szekvenciáig felveti a MAPK-PIN regulációs kapcsolat nagyon korai kialakulását a szárazföldi növények evolúciója során. A MAP kinázok A és B filogenetikai csoportjainak szétválása feltehetőleg a virágos növények és az ősi (mint pl. mohák és korpafüvek) fejlődési vonalak szétválása után következett be, valószínűsíthetően az összetett testfelépítés kialakulásával járó adaptációs folyamat eredményeként (lásd 5.5.). Így feltételezhető, hogy a PIN1-et a génduplikációk során létrejött új MAPK formák is megtarthatták, mint szubsztrátot, ami felveti annak a lehetőségét, hogy a PIN1-et B csoport MAPK-k is foszforilálják. E hipotézis tesztelésére megvizsgáltuk, hogy vajon az MPK4, a B csoport legjobban jellemzett tagja, képes-e foszforilálni a PIN1 fehérjét. Eredményeink azt mutatják, hogy az MPK4 az MPK6-hoz hasonlóan képes a PIN1 fehérjét foszforilálni, és ez a foszforiláció szintén jelentősen csökken a T227A/T248A/T286A PIN1 mutáns változat esetében (24.a ábra).



24. Ábra A PIN1 egy T227, T248 és T286 helyeken foszforilált MAPK szubsztrát.

(A) *In vitro* transzlált és affinitástisztított vad típusú GST-PIN1-HL (PIN1) és T227A, T248A, T286A mutáns GST-PIN1-HL (PIN1-3A) variánsokkal végzett kináz tesztek. C: kontroll, MPK6/MPK4: *in vitro* transzlált, affinitástisztított aktivált MPK6/MPK4 kinázokkal inkubált PIN1 variánsok. (B) Egy, az MPK6 által foszforilált PIN1 hidrofíl hurokból származó foszfopeptid (709,0780 (4+)) m/z HCD spektruma. A prekursor peptid szekvenciát lásd felül, a csillag foszfortreonint jelöl. A Thr-286 aminosavpozícióban történt foszforilációt a foszforilált b3 fragment ion igazolja. A peptid fragmentek jelölése (Biemann, 1990) nomenklatúrája szerint történt. -P a Ser/Thr foszforilációra jellemző 98 daltonos foszorsav veszteséget jelenti. (Döry et al. (2018) nyomán.)

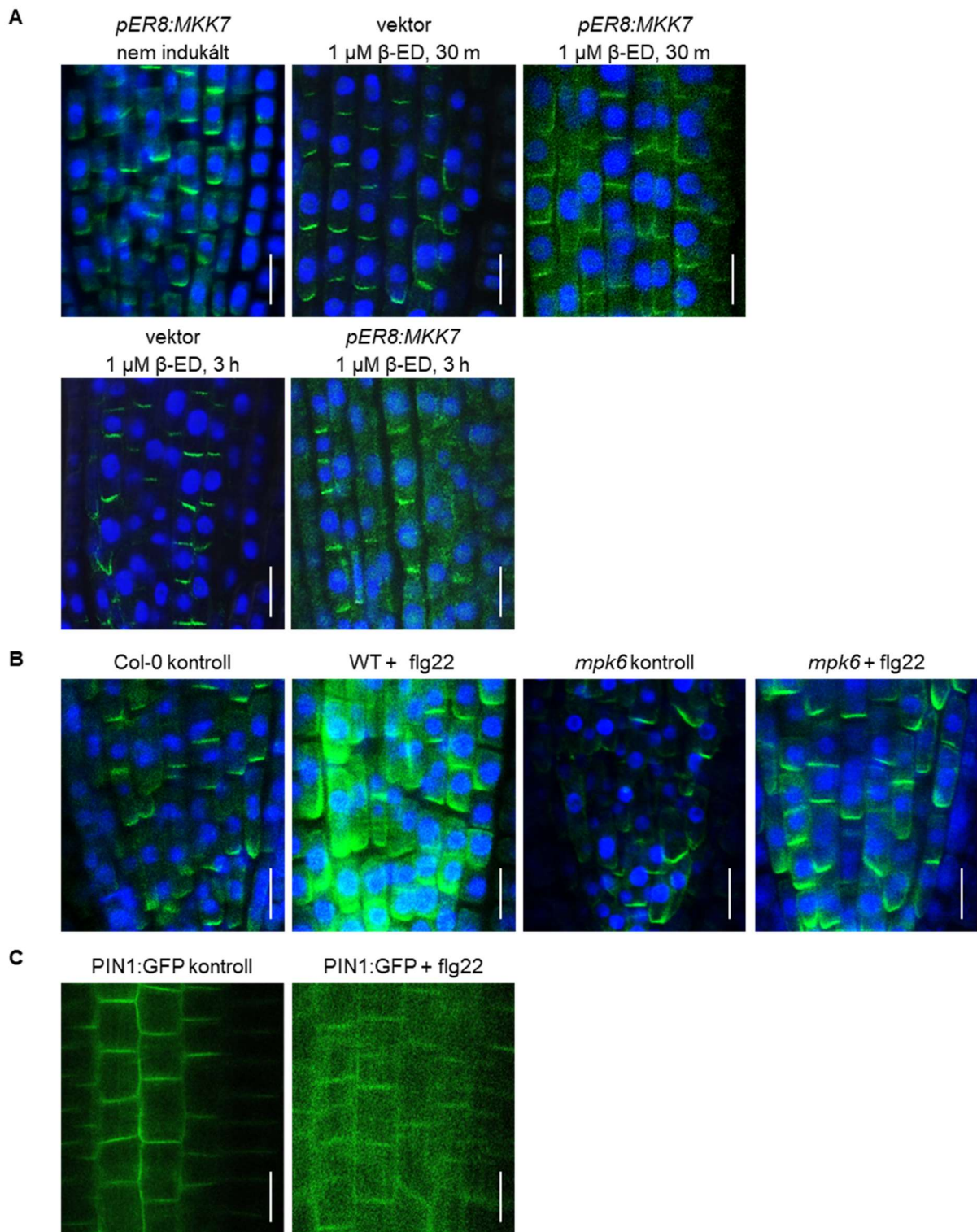
5.4.3. Indukált MKK7 expresszió és flagellin kezelés befolyásolja a PIN1 fehérje plazmamembrán lokalizációját

Az MKK7 kismértékű túlexpressziója *bud1* mutánsban a poláris auxin transzport gátlását eredményezi (Dai et al., 2006), az 5.2. fejezetben bemutatott eredményeink pedig az

indukált MKK7 túltermelés következtében széteső merisztéma szerveződést igazolták. Mivel a poláris auxin transzportnak meghatározó jelentősége van a merisztéma szerveződés kialakításában, és a PIN1 egy MAPK foszforilációs szubsztrát, megvizsgáltuk, hogy az MKK7 túlexpresszió befolyásolja-e a PIN1 lokalizációt csíranövények gyökereiben, ami egy széles körben használt, jól ismert kísérleti rendszer a PIN1 celluláris lokalizációjának tanulmányozására. A gyökércsúcsban a PIN1 a központi és a kéreg sejtekben fejeződik ki, ahol szinte kizárólag a bazális lokalizáció jellemző, néhány kéregsejt kivételével, ahol apikális lokalizáció is megfigyelhető (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 (25.a ábra). Hasonlóképpen, β -ösztadiol kezelés hiányában, az indukálható MKK7 transzgén konstrukciót hordozó növényekben is szabályos PIN1 mintázat volt megfigyelhető (25.a ábra). Ezzel szemben, β -ösztadiollal kezelt növényekben a PIN1 plazmamembrán lokalizációja részben megszűnt, a PIN1 proteinfракció egy része intracelluláris csomókban jelent meg (endocitózis) (25.a ábra). A gyorsütemű delokalizáció közvetlen MAPK által végzett poszttranszlációs szabályozásra utal.

Az indukált MKK7 expressziós rendszeren kívül azt is megvizsgáltuk, hogy vajon a flagellin kezelés, mint jól jellemzett MPK6 aktiváló inger befolyásolja-e a PIN1 lokalizációt. A kezeletlen kontroll csíranövényekben a szokásos bazális plazmamembrán PIN1 lokalizáció volt megfigyelhető, míg a flg22 kezelés hatására az MKK7 túltermelő mintákban megfigyelhető hasonló delokalizáció következett be, vagyis a PIN1 proteinfракció egy része intracelluláris csomókban jelent meg (25.b ábra). Két különböző kísérleti megközelítésben is hasonló eredményeket értünk el, a PIN1 immunhisztokémiai lokalizációjával és *ProPIN1:PIN1:GFP* transzgénikus növényanyagokkal is (25.b,c ábra). *mpk6* mutáns növényekben ezzel szemben a PIN1 flagellin indukált delokalizációja nem következett be (25.b ábra), vagyis a PIN1 lokalizációt az MPK6 általi foszforiláció képes befolyásolni.



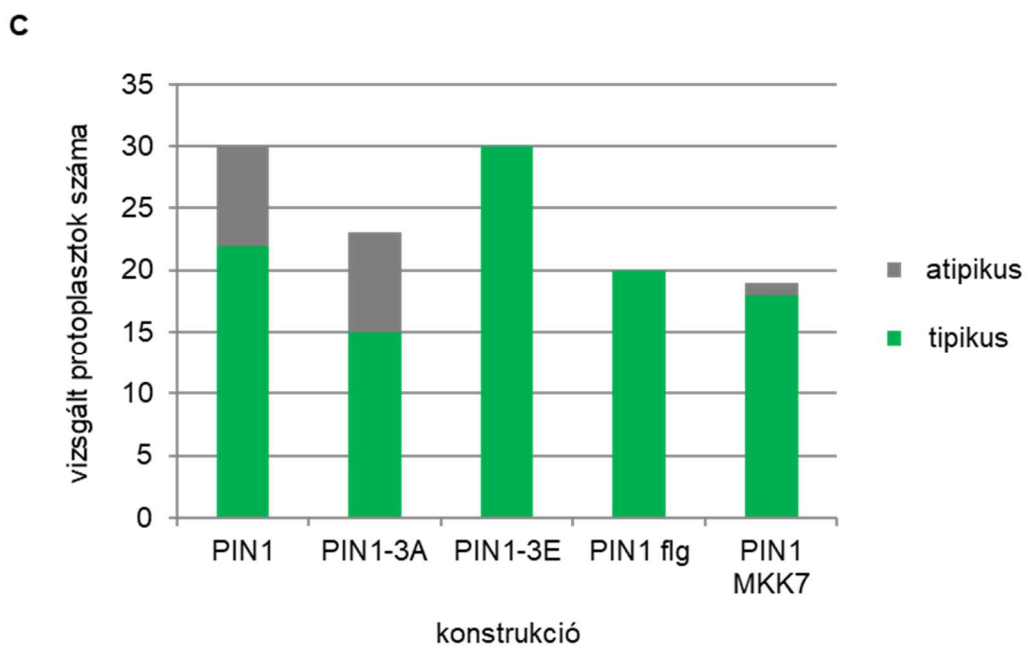
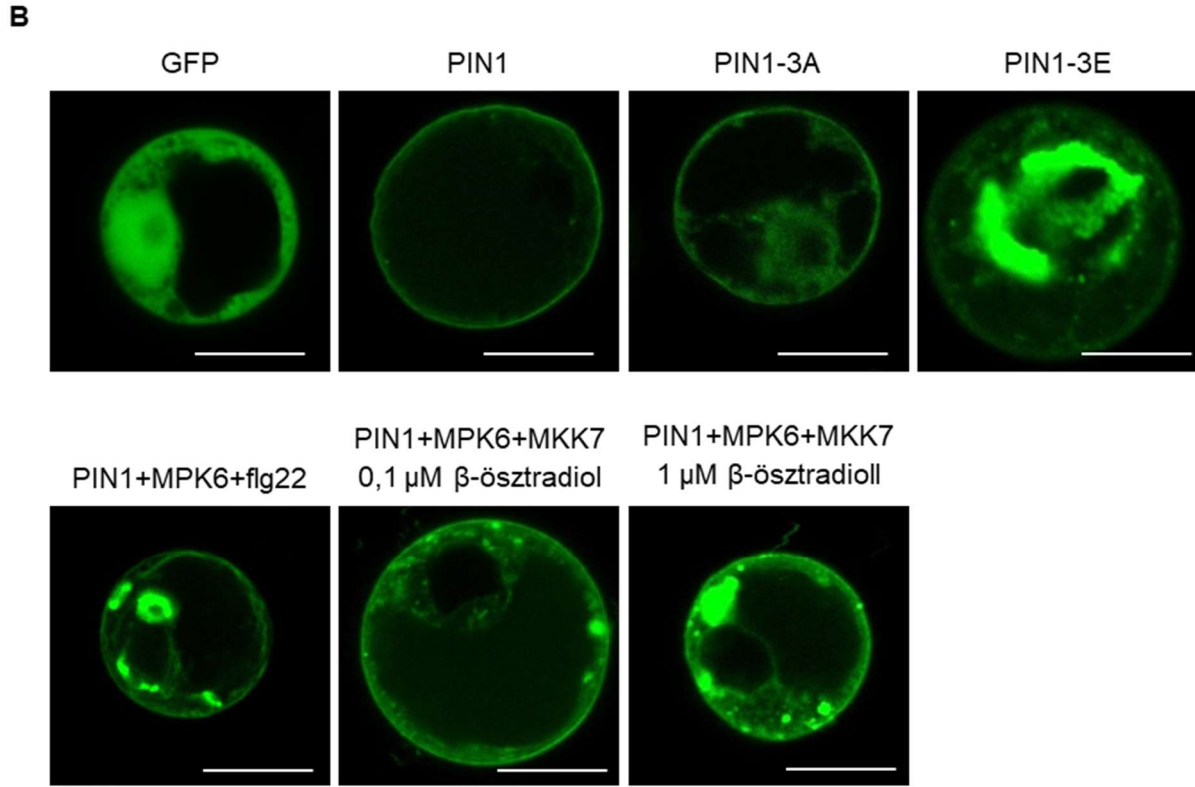
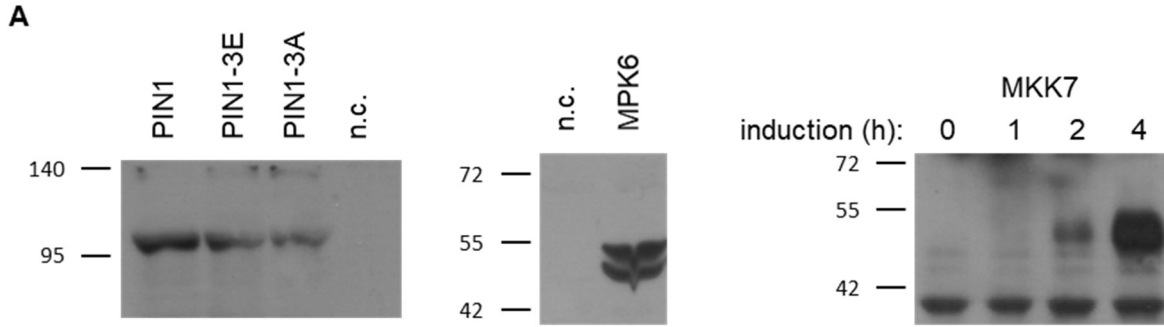
25. Ábra MKK7 expresszió és flagellin kezelés a PIN1 fehérje delokalizációját eredményezi gyökérszövetekben.

(A) PIN1 immunlokalizáció üres vektor és *pER8:MKK7* konstrukció transzgenikus csíranövényekben. Az MKK7 indukció körülmények képenként feltüntetve. (B) PIN1 immunlokalizáció kezeletlen és flg22 kezelt (10 μ m, 24 h) vad típusú és *mpk6* mutáns csíranövényekben. (C) PIN1 lokalizáció kontroll és flg22 kezelt *ProPIN1:PIN1:GFP* konstrukció transzgenikus csíranövényekben. (A-C) méret sáv: 10 μ m. (Döry et al. (2018) nyomán.)

5.4.4. *A T227, T248 és T286 aminosavak foszforilációs státusza befolyásolja a PIN1 lokalizációt protoplaszt rendszerben*

A PIN1 fehérje protoplasztokban túltermelve is megőrzi plazmamembrán lokalizációját, így ez a kísérleti rendszer alkalmas a PIN1 plazmamembrán lokalizáció szabályozásának vizsgálatára, annak ellenére, hogy a polaritás az önálló sejtekben megszűnik (Michniewicz et al., 2007; Furutani et al., 2007). Ugyanezt a megközelítést alkalmazva tranziensen expresszáltunk egy *35S:PIN1:GFP* konstrukciót, hogy a T227/T248/T286 MAPK közvetített foszforiláció PIN1 celluláris lokalizációra kifejtett hatását tanulmányozzuk. A PIN:GFP variánsok és a ko-transzformált *MPK6:HA* és *myc:MKK7* konstrukciók kifejeződését Western blot módszerrel ellenőriztük (26.a ábra). A protoplaszt kísérletek során 20-30 sejtről készítettünk konfokális mikroszkópos képeket, három független kísérletben, a 26.b ábrán ezekből mutatunk reprezentatív felvételeket. A gyökér eredetű szuszpenziós kultúrából izolált protoplasztokban a PIN:GFP a plazmamembránban lokalizálódik. MPK6-tal koexpresszálnva és flg22-vel kezelve vagy indukált MKK7-tel koexpresszálnva a PIN1 aggregátumokat képezve intracellulárisan akumulálódik, a gyökérsejtekben megfigyeltekhez hasonlóan (26.b,c ábra), tehát a protoplaszt rendszer alkalmas modell a foszforilálhatóság hatásának tanulmányozására.

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 (26.b,c ábra). A nem foszforilálható változat (T227A/T248A/T286A) szintén megjelent intracellulárisan, azonban itt nem képződtek aggregátumok (26.b,c ábra).

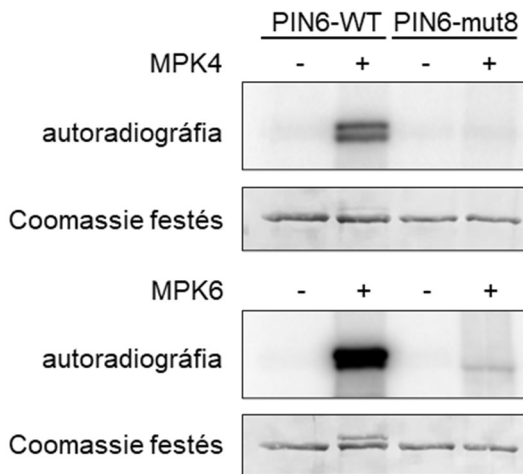


26. Ábra A T227, T248 és T286 MAPK foszforilációs státusza befolyásolja a PIN1 lokalizációt protoplaszt rendszerben.

(A) Tranziensen kifejeztetett fehérjék immundetekciója. A PIN1:GFP, MPK6:HA és myc:MKK7 variánsokat a fúziós epitópok elleni, kereskedelmi forgalomban elérhető antitestekkel mutattuk ki, negatív kontrollként (n.c.) nem transzformált protoplaszt mintát használtunk. A molekulatömeg (kDa) markereket a panelek bal szélén jelöltük. A protoplasztokat mintánként valamennyi használt konstrukcióval egyszerre transzformáltuk, majd éjszakán át pihentettük, végül a *pER8:MKK7* konstrukcióval transzformált mintákat a fehérjekivonás vagy a mikroszkópos vizsgálat előtt β -ösztradiollal kezeltük. (B) A jelzések szerinti konstrukciókkal transzformált, illetve kezelt protoplasztokról készült konfokális lézer pásztázó mikroszkópos felvételek. Minden kísérletet legalább három biológiai ismétlésben végeztünk el. Méret sáv: 10 μ m. (C) A (B) ábrán látható tipikus PIN1:GFP lokalizációs mintázatok kvantifikációja. A vad típusú PIN1 jellemzően kizárólag a plazma membránban (PM) lokalizálódik. Az internális GFP frakciókat, úgy mint, foltokat és aggregátumokat tartalmazó protoplasztokat a PIN1 esetében atipikusként kategorizáltuk. A nem foszforilálható PIN1-3A tipikusan az internális és PM frakciókban is jelen van, foltok vagy aggregátumok megjelenése nélkül. A foltok vagy aggregátumok megjelenését mutató PIN1-3A protoplasztokat atipikusnak kategorizáltuk. A PIN-3E, PIN1/MPK6 + flg22 és PIN1/MPK6/MKK7 transzformáns protoplasztokra jellemző az internális aggregátumok képződése. A vizsgált 70 ilyen protoplasztból mindössze egy esetben detektáltuk a kizárólagos PM lokalizáció fennmaradását. (Döry et al. (2018) nyomán.)

5.4.5. PIN6 fehérje, a hosszú HL PIN csoport különleges tagja is MPK4/6 kináz szubsztrát

A PIN6 a hosszú hidrofil hurokkal rendelkező, kanonikus PIN fehérjétől annyiban tér el, hogy a hurok szekvencia kissé rövidebb. Celluláris lokalizációja is némileg eltérő: alacsony PIN6 expresszió mellett, pl. gyökerekben, az endomembrán frakcióban lokalizálódik, míg magas expresszió mellett, pl. virágzati tengelyben vagy nektáriumokban, pedig plazma membrán lokációjú. A PIN6 Arabidopsisban a virágzati tengely megnyúlását szabályozza, és ebben meghatározó szerepe van a szubcelluláris lokalizációnak (Ditengou et al., 2018). Érdekes módon a PIN6 rövidebb HL régiója nyolc potenciális MAPK foszforilációs helyet tartalmaz, ami több mint a többi hosszú HL PIN MAPK helyei. A bemutatott PIN1 *in vitro* foszforilációs teszttel azonos megközelítésben vizsgáltuk a PIN6 foszforilációját is. Amint azt a radioaktív foszfát beépülése jelzi, a tisztított *in vitro* transzlált vad típusú PIN6 hidrofil hurok fehérjét az MPK6 és az MPK4 is foszforilálja (27. ábra). Negatív kontrollként mind a nyolc foszforilációs helyet nem foszforilálható alaninra cseréltük (T226A, T242A, S286A, T304A, T320A, S326A, S337A, és T393A), ami a foszforilációs képesség elvesztését eredményezte (27. ábra). Az MPK6 esetében megfigyelhető gyenge maradvány radioaktív jel valószínűleg az MPK6 erős aktivitásából eredő nem specifikus foszforiláció következménye. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy PIN6, a PIN1-hez hasonlóan MAPK szubsztrát. Mivel a PIN6 a hosszú HL PIN csoporton belül elkülönül, valószínűnek tűnik az a feltételezés, hogy a MAPK általi PIN foszforilációra vonatkozó eredmények a többi hosszú HL PIN fehérjére is általánosíthatóak.



27. Ábra A PIN6 egy MAPK szubsztrát.

In vitro transzlált és affinitástisztított vad típusú GST:PIN6 (PIN6-WT) és T226A, T242A, S286A, T304A, T320A, S326A, S337A és T393A mutáns GST:PIN6 (PIN6-mut8) variánsokkal végzett kináz tesztek. A PIN6 variánsokat *in vitro* transzlált, affinitástisztított és eluált, aktivált MPK4 (felső panel) vagy MPK6 (alsó panel) jelenlétében (+) vagy hiányában (-) inkubáltuk. A felvitt proteineket Coomassie festéssel vizualizáltuk. (Ditengou et al. (2018) nyomán.)

A 4.4-ben bemutatott 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.

5.5. A MAPK jelátvitel evolúciója a növényvilágban

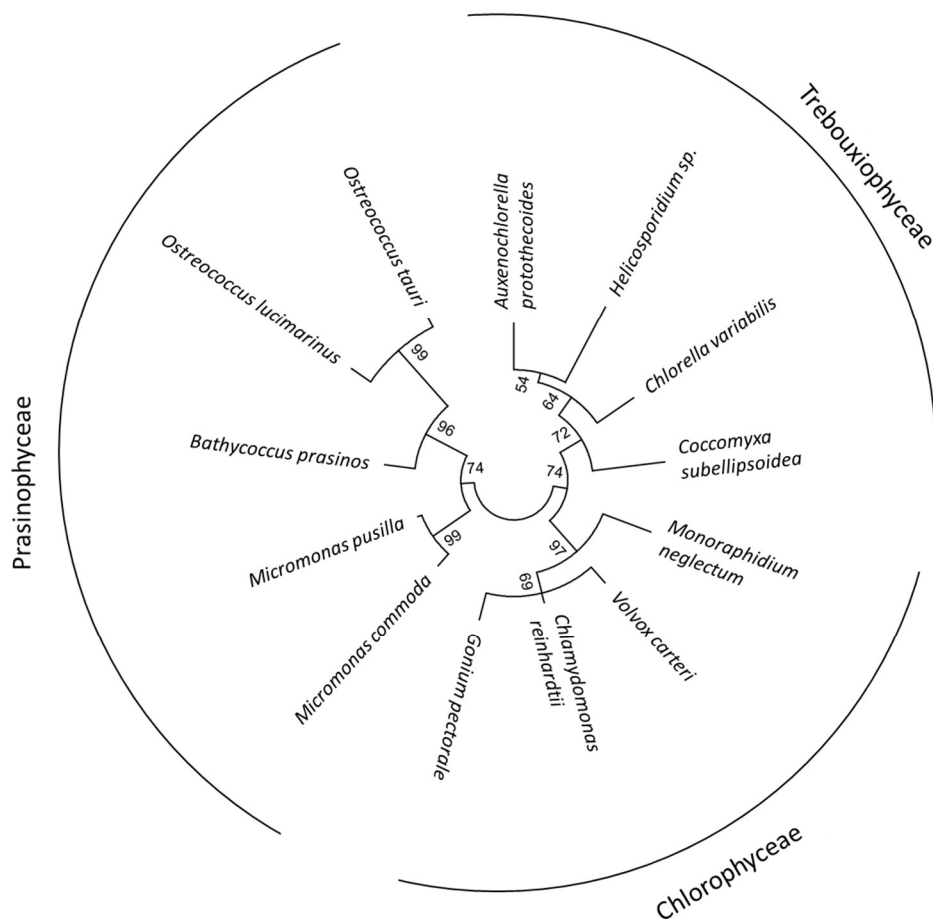
Az első genomszekvenciák megjelenése óta, az újgenerációs szekvenálási technikák fejlődésének köszönhetően, a közzétett genomszekvenciák száma gyorsuló ütemben növekszik. Mindez kiváló lehetőséget teremt a géncsaládok evolúciójának megismeréséhez. Az orosz-amerikai biológus, Theodosius Dobzhansky már 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 MAPK jelpályák evolúciós expanzióját gerinces fajokban 2011-ben írták le (Li et al., 2011). A kétezres években az *Arabidopsis* genom után több virágos növény genomját is publikálták, majd ezekben annotálták a MAP kinázokat kódoló géneket, 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. Ezért célul tűztük ki a MAPK géncsalád evolúciójának tanulmányozását a növényvilágban.

5.5.1. MAPK családok alga proteómokban – a MAPK géncsalád korai evolúciója a növényvilágban

Vizsgálatainkhoz tizenhárom szekvenált genomú zöldalgafajt (Chlorophyta) választottunk, amelyek jól reprezentálják a zöldalgák nagy és heterogén csoportját, rendszertan, életmód, földrajzi elterjedés, ökológiai vagy gazdasági jelentőség szempontjából. Képviselve van közöttük a három fő rendszertani osztály, egyaránt vannak közöttük széleskörben elterjedt kozmopolita tengeri plankton és édesvízi fajok, illetve extrém körülményekhez adaptálódott specialista fajok, vagy akár paraziták is. A fajok az algák sejtméret, genomméret és a génszám szerinti széles skáláját is jól reprezentálják. A vizsgálatba bevont fajok filogenetikai kapcsolatát a 28. ábra mutatja, részletes bemutatásukra a terjedelmi korlátok miatt e dolgozat keretén belül nincs lehetőség, azokat az érdeklődő olvasó Kalapos et al. (2019) cikkében találja meg.

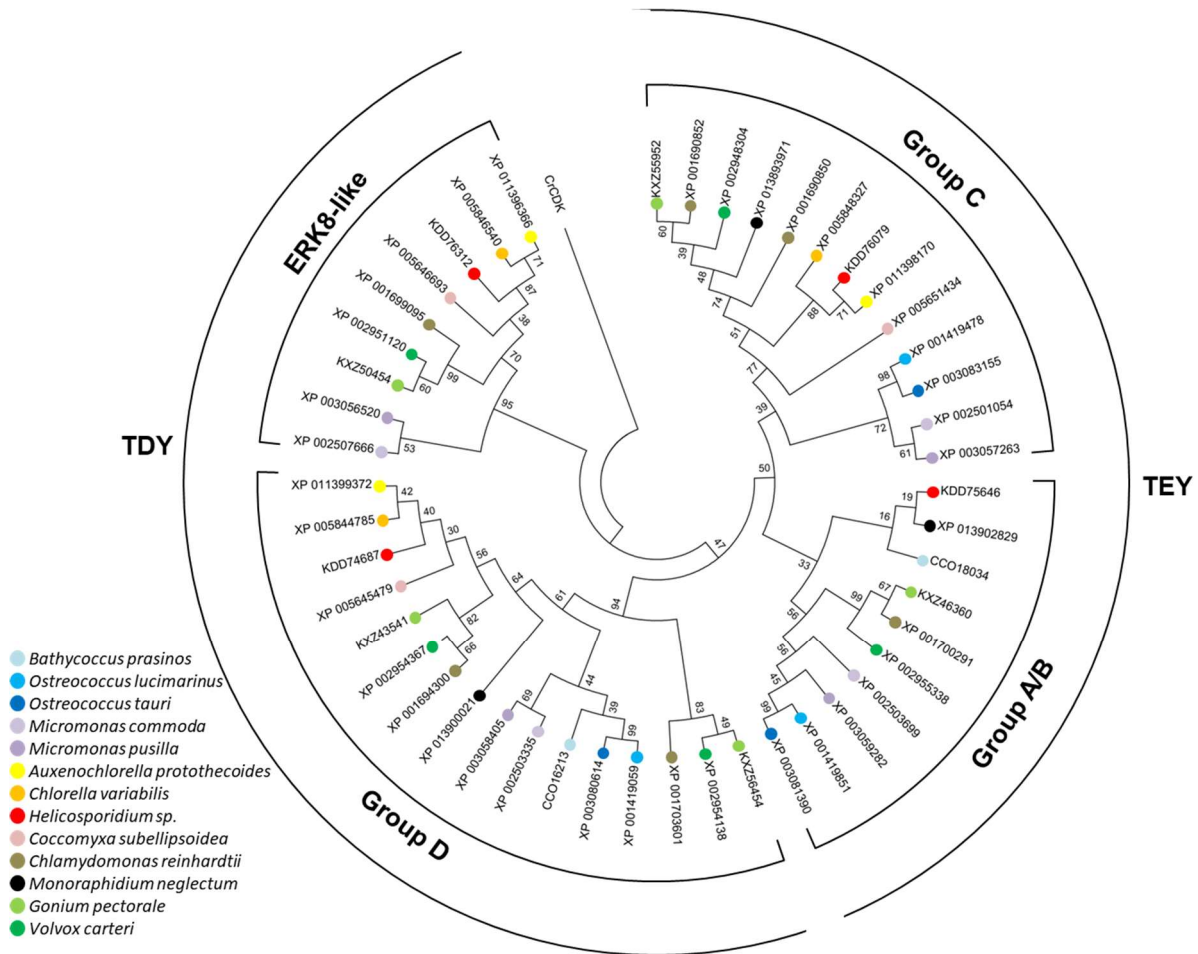
A MAPK szekvenciák azonosítására egy Hidden Markov Model (HMM) alapú szűrést végeztünk, amely 39 kanonikus MAPK proteint detektált a 13 proteómban (29. ábra; további részletek: Kalapos et al., 2019). A MAP kinázok száma algákban viszonylag állandó, a legtöbb faj (tizenháromból hat) három MAP kinázzal rendelkezik. Négy fajban két MAPK található, míg MAPK gazdagnak tekinthető két, illetve egy faj, amelyekben négy, illetve öt MAPK-t detektáltunk. Ezek az eltérések valószínűsíthetően génvesztések, illetve duplikációk következményei. A génvesztések a kompaktabb genomstruktúrák velejárói. A három MAPK típusal rendelkező fajok minden filogenetikai csoportban megtalálhatóak, ami erősen alátámasztja, hogy a néhány hiányzó MAPK génvesztés következménye. Mind a TEY, mind a TDY foszforilációs motívum megtalálható mindegyik fajban, ami a két növényi MAPK altípus nagyon korai szétválását jelenti.



28. Ábra A 13 vizsgált algafaj filogenetikai viszonyrendszere.

A feltüntetett algafajok aktin protein szekvenciáit a MUSCLE módszerrel illesztettük, majd a filogenetikai fát a MEGA6 szoftvercsomag használatával, maximum likelihood módszerrel készítettük el. A fa a kiválasztott fajok ismert filogenetikai kapcsolatainak megfelelő felépítésű, a három fő osztály (Prasinophyceae, Trebouxiophyceae és Chlorophyceae) elkülönülése egyértelműen megjelenik. (Kalapos et al. (2019) nyomán.)

A kanonikus MAPK csoportok mellett a legtöbb fajban megtalálható egy atipikus MAPK forma is, amely a legnagyobb hasonlóságot az ERK8 típusú kinázokkal mutatja, habár négy faj elvesztette ezt a kináz típust. Az ERK8 (MAPK15, ERK7) egy emlős atipikus MAPK, az ERK klasszikus TEY aktivációs mintázatával, azonban a legtöbb MAPK aktiváló extracelluláris inger az ERK8-at nem aktiválja. Továbbá az sem ismert, hogy vajon valamilyen MKK szabályozza-e az ERK8-at, valamint szubsztrátjai és effektorai is alig ismertek. A humán ERK8 egy hosszú C terminális doménnel rendelkezik, és szerepet játszik a daganatfejlődés folyamatában is. Érdekes módon algákban az ERK8-szerű kinázok foszforilációs motívuma TDY, szemben a humán ERK8 TEY motívumával.



29. **Ábra** A 13 algafajban azonosított MAPK szekvenciák filogenetikai kapcsolatai.

A 48 azonosított MAPK kináz domén aminosav szekvenciáit a MUSCLE módszerrel illesztettük, majd a filogenetikai fát a MEGA6 szoftvercsomag használatával, maximum likelihood módszerrel készítettük el. Csoporton kívüli gyökérszekvenciaként egy *C. reinhardtii* cyclin-dependent kinase (CDKG1) szekvenciát használtunk. A fajokat a proteinazonosítók mellett a baloldalon feltüntetett színek szerint jelöltük. A filogenetikai csoportokat és a konzervált foszforilációs helyeket (TxY) a belső és külső szegélyeken tüntettük fel. (Kalapos et al. (2019) nyomán.)

A virágos növényekre jellemző MAP kinázok filogenetikai osztályozása régóta egyértelmű (MAPK Group, 2002; Jonak et al., 2002; Hamel et al., 2006). A TEY típusú kinázok három csoportot alkotnak (A-C), míg a TDY ág alkotja a D csoportot. A növényi MAPK-k korai evolúciójának megbízható rekonstrukciójához az alga MAP kinázok három szekvenciatípusával végeztünk filogenetikai analízist: teljes hosszúságú és kináz domén aminosav, valamint a kódoló DNS szekvenciák. Habár a csendes mutációk vagy éppen a kináz doménra ható negatív (tisztító) szelekció miatt a három típusú szekvenciára eltérő mutációs ráta

jellemző, a kapott törzsfák struktúrája nagyon hasonló, ami az evolúciós kapcsolatok megbízható rekonstrukcióját támasztja alá (29. ábra, és Kalapos et al., 2019).

Mindegyik törzsfában három fő leágazás alakult ki. Az ERK8-szerű csoport élesen különvált a kanonikus MAP kinázoktól, ami megfelel ennek a csoportnak a nagyon korai, a növényvilág evolúciós kialakulása előtti kialakulásának. A kanonikus MAP kinázokon belül a TEY és TDY típusú szekvenciák formáznak két fő leágazást. 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. Érdekes módon, a Prasinophyceae osztályba tartozó apró plankton algák (*Bathycoccus prasinus*, *Ostreococcus lucimarinus*, *O. tauri*, *Micromonas commoda*, *M. pusilla*) C típusú szekvenciái egy külön leágazást képeznek az aminosav alapú fákban. A DNS alapú fán a Prasinophyceae TEY szekvenciák pedig teljesen elkülönülnek, ami megfelel a nukleotid szint magasabb mutációs rátájának (Kalapos et al. 2019). A Prasinophyceae TEY szekvenciák divergenciája összhangban van e csoport nagyobb evolúciós távolságával.

A szárazföldi növények megjelenése mintegy 500 millió évvel ezelőttre tehető (Pennisi, 2011). A jelenleg élő algák nagy és heterogén csoportja ez alatt az idő alatt alakult ki, így az algák és a szárazföldi növények közötti összehasonlító elemzéssel feltárható a géncsalád története a növényvilág korai evolúciója során. Azok a MAPK típusok, amelyek egyaránt megtalálhatóak algákban és szárazföldi fajokban a két fejlődési vonal szétválása előtt megjelentek, míg azok, amelyek csak bizonyos vonalokból hiányoznak a vonalak szeparációja után bekövetkezett génvesztések következményei. Az alga MAPK-ok filogenetikai távolsága minden csoporton belül jól tükrözi a megfelelő fajok filogenetikai rokonságát (28, 29. ábrák), megerősítve az egy közös őstől történt leszármazást.

5.5.2. A növényi MAPK géncsalád nagyarányú expanziója és egy hiperkonnectált jelátviteli hálózat kialakulása

Az algafajokra meghatározóan jellemző a három MAPK típus jelenléte, ami azt jelenti, hogy a növényvilág korai közös ősében három MAPK gén volt a növényi MAPK géncsalád alapító tagja. Minden növényi MAPK ennek a három altípusnak a további duplikációi eredményeként jött létre, és ez a folyamat eredményezte a virágos növényekben megtalálható, négy filogenetikai csoportot alkotó, mintegy húsz MAPK kialakulását. Szárazföldi növényekben az A és B csoportok az A/B típusú ősi kinázok szeparálódásával jöttek létre (Dóczi et al., 2012).

A jelátviteli funkciók növekvő komplexitását jól tükrözi a szárazföldi növények evolúciója során folyamatosan bővülő MAPK repertoár. A moha modellorganizmus *Physcomitrella patens* proteomban hat TEY és két TDY, valamint egy ERK8 típusú, míg a nem virágos, vaszkuláris növények modelljeként ismert *Selaginella moellendorffii* proteomban négy TEY és négy TDY, valamint kettő ERK8 típusú MAP kinázt azonosítottunk (Dóczi et al., 2012). Arabidopsisban pedig már 12 TEY és 8 TDY kináz található (MAPK Group, 2002). Érdekes módon a kanonikus MAPK-ok nagyfokú expanziója mellett az ERK8 típus a virágos növényekből eltűnt, elképzelhető, hogy funkcióját bizonyos kanonikus MAPK-ok vették át (Dóczi et al., 2012). 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.

A *Naegleria gruberi* egy nagyon 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, Opisthokonták, növények) megállapítható, hogy a MAPK jelátvitel már az utolsó eukarióta 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.

A MAPK kinázok (MKK) a MAPK jelpályák központi elemei, amelyek a konzervált aktivációs hurok két helyének MKK kinázok (MAP3K) általi foszforilációjával aktiválódnak. *Naegleria*-ban két, közeli rokonságban álló MKK-t azonosítottunk, amelyek feltehetőleg egy nemréggi génduplikáció során jöttek létre. A *Naegleria* MKK-k mind a növényi, mint az állati MKK-hoz mutatnak szekvenciarokonságot, ami közös eredetre utal.

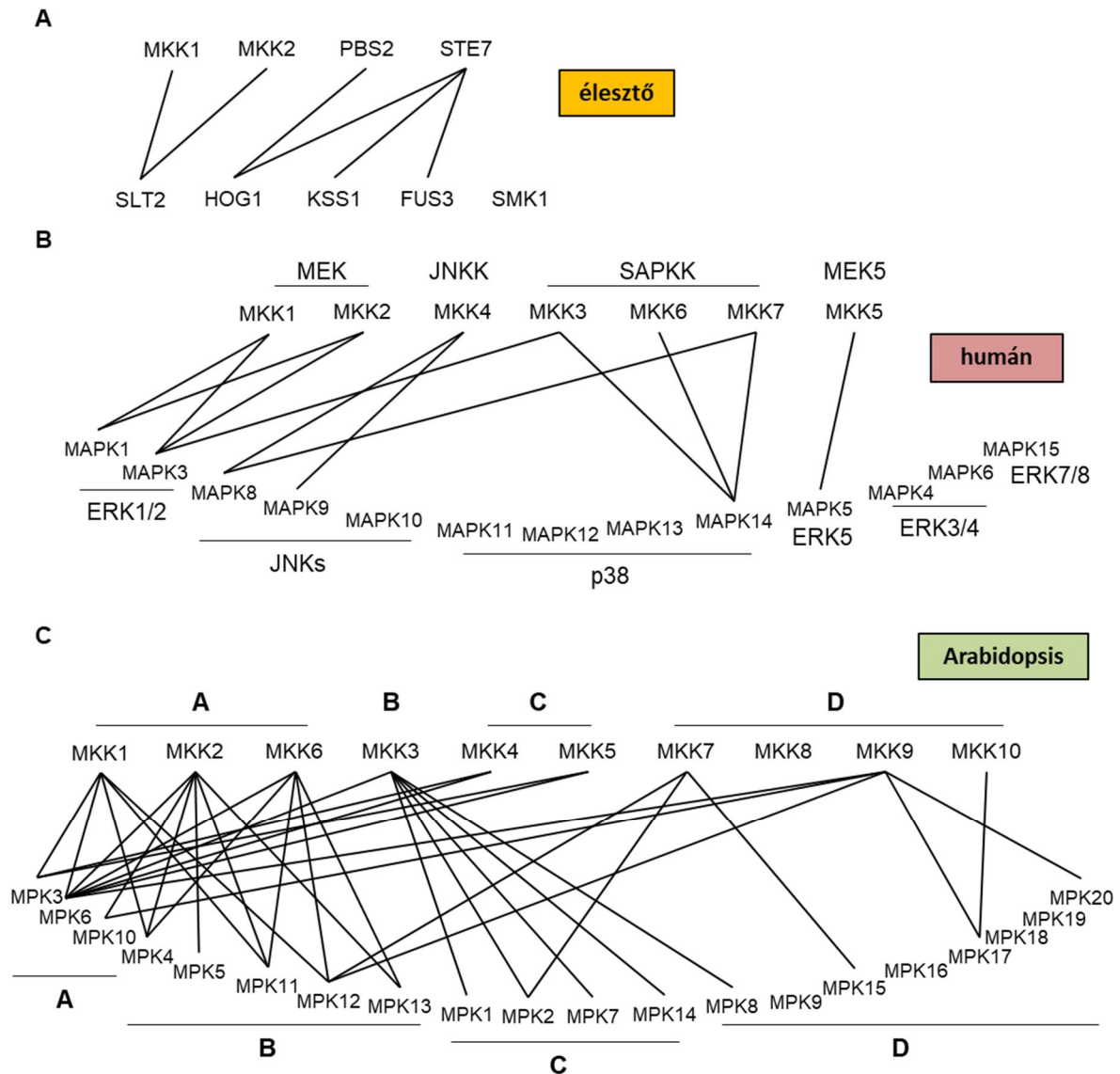
A két nemrég duplikálódott MKK és az egyetlen MAPK jelenléte *Naegleria*-ban az ősi MAPK jelpálya egyszerű felépítéséről tesz tanúbizonyosságot. A *Chlamydomonas* genomban eredetileg csak egyetlen MKK gént azonosítottak (Hamel et al., 2006). Ezt a kérdést több algagenomban is megvizsgáltuk (*Chlamydomonas reinhardtii*, *Volvox carteri*, *Micromonas spp.*, *Ostreococcus tauri* és *O. lucimarinus*) (Dóczi et al., 2012). Érdekes módon *Micromonas*-ban két különböző MKK típust azonosítottunk, az egyik a B csoportba rokonítható, a másik

pedig nem illeszthető a virágos növényekben kialakított filogenetikai csoportokba. Ezért ezt a leágazási csoportot „átmeneti” csoportnak neveztük el. Hasonlóképpen, a két MKK típust detektáltuk a *Volvox* és *Chlamydomonas* proteómokban is, azonban ezekben a fajokban potenciális szekvenálási hibákat is azonosítottak, amelyek a korábbi detektálás kudarcát eredményezhették. A *Prasinophyceae* osztályba tartozó két *Ostreococcus* fajban azonban csak egy, a köztes típushoz tartozó MKK-t azonosítottunk. Mindez az MKK gének korai divergenciáját sugallja a növényevolúció során. Érdekes módon, a B csoportnak minden virágos növény fajban csak egy tagja van (*AtMKK3* és ortológjai), míg mohában ez a gén duplikálódott. Feltehetőleg minden növényi MKK a köztes típusból divergálódott, elsőként a B típus leválásával, ami aztán egy külön kináz típusként a növényevolúció során végig fennmaradt. Ez a divergenciát és specializációt az a jellegzetesség is alátámasztja, hogy valamennyi B típusú MKK C terminálisán megtalálható egy, csak erre a növényi MKK csoportra jellemző domén, ami az NTF2 (nuclear transport factor 2) fehérjékhez mutat nagyfokú hasonlóságot (MAPK Group, 2002; Hamel et al., 2006 – lásd még 2.2. fejezet). A nukleocitoplazmás ingázás számos MAPK jelpálya fontos funkcionális jellemzője, és úgy tűnik, hogy növényi B típusú MKK fúziója egy NTF2 szekvenciával ezt a folyamatot támogatja a növényvilágban. A korábbiakban tárgyaltak szerint három MAPK őstípus kialakulása egy nagyon korai esemény volt a növényvilág evolúciója során. Arabidopsisban született eredmények alapján tudjuk, hogy az MKK3 mindhárom típusú MAP kinázzal szabályozási kapcsolatban áll (Dóczi et al., 2007; Takahashi et al., 2007, 2011), így feltételezhető, hogy ez a jelpálya struktúra a növényi MAPK jelátvitel közös öröksége. Az *Ostreococcus* fajokban viszont csak egy MKK és két (egy TEY és egy TDY) MPK található. A hiányzó kináz típusok feltehetőleg génvesztés eredményként tűntek el, viszont ez a jelpálya struktúra is azt mutatja, hogy egy MKK képes többféle MAPK-t is szabályozni növényekben. Ez a jelenség feltételezi a jelátvitel specificitását biztosító szabályozási mechanizmusok kialakulását, amelyek lehetővé teszik a komplex hálózatok kialakulását összetettebb szervezetekben. Ennek megfelelően, a virágos növényekre jellemző 2:1 MAPK:MKK arány.

A fenti eredmények nyomán betekintést nyerhettünk a folyamatba aminek eredményeként egy, a *Naegleria* MAPK jelpályához hasonló egyszerűségű ősi jelpályából kialakultak a komplex MAPK jelátviteli rendszerek. A keresztirányú kapcsolatok (crosstalk) élesztő, állati és növényi MAPK jelpályák esetében is ismert (Avruch, 2007). A korábbi funkcionális és nagyáteresztőképességű vizsgálatok eredményei egyaránt a növényi MAPK és MKK szintek közötti kapcsolatok extrém nagyfokú konnektivitását mutatják (pl. Jonak et al.,

2002; Popescu et al., 2009; Andreasson and Ellis, 2010). Hogy a 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 megtalálására más adatbázisokból is. Csak fizikai protein-protein kölcsönhatásokat és biokémiai aktivációt vettünk figyelembe. Ezeket a MAPK-MKK kapcsolatokat az 30. ábrán vizualizáltuk.

Ez alapján is egyértelmű, hogy a virágos növények MAPK hálózata nem csak több elemből áll, de sokkal nagyobb mértékben konnektált, mint az élesztő vagy állati hálózatok. Ráadásul a növényi hálózat a valóságban minden bizonnyal ennél is komplexebb, mert a nagy áteresztőképességű módszerekkel kapott eredményeket (mint pl. Popescu et al., 2009) nem vettük figyelembe, mert csak az azonos módszerekkel elért eredményeket használtunk az összehasonlítás során. Hogy egy ilyen komplex, magas konnektivitású hálózatban hogyan tartható fenn a jelspecifitás, nem nagyon ismert, feltehetőleg ez a jövőbeni növényi MAPK kutatások egyik fontos kérdése lesz. Ebben többek között szerepet kaphatnak az Opisthokonta fajokban megismert állványfehérjékhez hasonló mechanizmusok, vagy például a különböző komponensek tér- és időbeli izolációja, illetve további regulációs rétegek működése. Ez utóbbira jó példa az MKK3-MPK8 kapcsolat, ami az MKK3 más típusú MAPK kapcsolataihoz képest még Ca^{2+} függő kalmodulin kötést is igényel a teljes aktivitáshoz (Takahashi et al., 2011).



30. Ábra MAPK jelátvitel konnektivitása különböző eukarióta modellfajokban.

(A-C) A hálózatkonnektivitás vizualizációja céljából a kísérletesen igazolt MKK-MAPK kölcsönhatásokat ábrázoltuk élesztőben (A), emberben (B) és Arabidopsisban (C). A kölcsönhatásokat nyilvánosan hozzáférhető adatbázisokból, mint pl. IntAct (<http://www.ebi.ac.uk/intact/>) és BioGrid (<http://thebiogrid.org/>), valamint egyéni publikációkból gyűjtöttük. Kizárólag az összevethető módszerekkel nyert eredményeket vettük figyelembe (lásd 98. o.). Valamennyi kölcsönhatást leíró referencia elérhető online (Dóczi et al., Trends Plant Sci. 2012 17:518-25 Supplementary Table S3). Az ERK1/2, JNK, p38, ERK5, ERK3/4 és ERK7/8 általánosan használt MAPK jelpálya nevek; a MEK, JNKK, SAPKK, és MEK5 általánosan használt emberi MKK alternatív nevek. Arabidopsisban az A, B, C és D betűk az azonos nevű filogenetikai csoportokat jelölik. A kinázttípusok neveit adó rövidítések: ERK, extracellular signal-regulated kinase; FUS3, cell fusion 3; HOG1, high osmolarity glycerol response 1; JNK, c-Jun N-terminal kinase; JNKK, JNK kinase; KSS1, kinase suppressor of Sst2 mutations 1; MEK, mitogen-activated protein kinase kinase; PBS2, polymyxin B sensitivity 2; SAPK, stress-activated protein kinase; SLT2, suppression at low temperature 2; SMK1, Sporulation-specific mitogen-activated protein kinase; STE7, sterile 7. (Dóczi et al. (2012) nyomán.)

A fenti eredményeket összegezve 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 (lásd 2.2. fejezet), ami a helyhez kötött életmóddal hozható összefüggésbe. 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.

5.5.3. *A dokkolóhely motívumok csoportspecifikus szekvenciadivergenciája a növényvilágban*

A MAP kináz-szubsztrát felismerést dedikált interakciós felszínnek (dokkoló helyek) biztosítják (lásd 2.3. fejezet). A D és CD helyek koevolúciója a jelpálya specificitás kialakulásának egyik hajtóereje lehet. Ezt alátámasztják azok az eredmények, amelyek azt igazolták, hogy az igen nagyfokú szekvenciahasonlóság ellenére a különböző humán MKK típusok D helyei képesek a velük egy jelpályán működő MAP kinázok CD helyeivel specifikus kölcsönhatást biztosítani (Bardwell et al., 2009). Hasonló rejtett specificitási mintázatok biztosíthatják a MAPK-k szelektív szubsztrát felismerési mechanizmusait is. A növényi TEY és TDY aktivációs hurok motívumú MAPK altípusok azonban meglepően szembeötlő eltéréseket mutatnak. A TEY típusú kinázok CD motívumai nagymértékben hasonlítanak az élesztőben és állatokban leírt motívumhoz, habár a C csoportban a savas aminosavak fokozatos elvesztése figyelhető meg algáktól a virágos növényekig. A TDY típusú növényi MAP kinázokban azonban egyes savas aminosav pozíciókban bázikus aminosavak találhatóak (31.a ábra). Továbbá, a növényi MKK-k D-helyei csoportspecifikus eltéréseket mutatnak aminosavösszetételben (31.b ábra). Például a B csoportban a bázikus helyeken erősen domináns a lizin, míg a hidrofób helyeken a leucin. Az Opisthokonta modell szerint az egyes csoportokban megfigyelt MAPK CD, illetve a MKK D hely divergenciák a csoportspecifikus partnerszelekció fenntartását is szolgálhatják. Ebben a scenárióban a

31. Ábra Dokkolóhelyek konzervációja (101. oldal).

(A-B) Növényi MAP kinázok common docking site (CD) (A) és az MKK-k D-site típusú dokkoló motívumainak (B) aminosavmintázatai. CD hely konszenzus szekvencia: [LH][LHY]Dxx[DE]EPx[CA]; D-site konszenzus szekvencia: [KR][KR][KR]x(1-5) ΦxΦ, ahol az x bármilyen aminosavat, a Φ hidrofób aminosavat jelöl. A szekvenciákat filogenetikai csoportok szerint csoportosítva tüntettük fel, a kinázokat fehérjeazonosítókkal megadva, kivéve az *Arabidopsis* szekvenciákat, ahol referenciaként a génneveket és azok AGI azonosítóit adtuk meg. A többi fajt az azonosító utáni rövidítések jelzik: ota: *Ostreococcus tauri*, olu: *Ostreococcus lucimarinus*, mic: *Micromonas* sp. RCC299, vol: *Volvox carteri*, chl: *Chlamydomonas reinhardtii*, phy: *Physcomitrella patens*, sel: *Selaginella moellendorffii*. A humán kinázokat a standard nomenklatúra szerint adtuk meg, Hs előtaggal. A bemutatott humán D-site peptidekről Bardwell et al. (2009) szerint azt igazolták, hogy a látszólagosan hasonló dokkolóhely mintázatok képesek a megfelelő MAPK partnerek felé szelektivitást biztosítani. A konszenzusnak megfelelő aminosavakat félkövérrel, a töltéssel rendelkező aminosavakat pirossal (savas a CD helyekben és bázikus a D-site motívumokban), minden más a konszenzusnak megfelelő aminosavat kékkel jelöltünk. A csoportspecifikus szisztematikus aminosavcseréket türkiz kiemeléssel jelöltük. n/a olyan MKK szekvenciákat jelöl, amelyekben nem található N-terminális D-hely. (Dóczi et al. (2012) nyomán.)

32. Ábra A növényi MAPK CD motívumok korai evolúciójának lenyomatai alga szekvenciákban (103. oldal).

A bal oldalon 13 algafaj MAPK CD site motívum szekvenciái filogenetikai csoportok szerint csoportosítva, jobboldalt a csoportokra jellemző mintázatok szekvencia logói láthatók. Az erősen konzervált aminosavpozíciókat kék színnel, a savas aminosavakat piros színnel, a csoportspecifikus szisztematikus aminosav szubsztitúciókat zöld kiemeléssel jelöltük. Nyílhegyek jelzik azokat a pozíciókat, amelyekben magasabbrendű növényekben további csoportspecifikus szisztematikus aminosav szubsztitúciók történtek: a C csoportban E>N (7. pozíció) a D csoportban egy K megjelenése a 3. pozícióban, ami egy második töltésváltást eredményezett a 6. pozícióban már algákban is megjelenő R mellett. Az alga mintázatokból szisztematikusán hiányzó szubsztitúciókat azt jelzik, hogy a mai algafajokban a kanonikus és a magasabb rendű növényekben kialakult csoportspecifikus mintázatok közötti evolúciós köztes állapot megmaradása jellemző. (Kalapos et al. (2019) nyomán.)

dc_2005_22

Eukarióta CD hely konszenzus: [LH][LHY]Dxx[DE]EPx[CA]

KDD75646 Helicosporidium sp.	LHEPADEPEC
CCO18034 Bathycoccus prasinus	LHDTNDEPVA
XP_001419851 Ostreococcus lucimarinus	LHDEVDEPCA
XP_003081390 Ostreococcus tauri	LHDEVDEPCA
XP_013902829 Monoraphidium neglectum	LHDAADEPVA
XP_002955338 Volvox carteri	LHDVADEPVC
KXZ46360 Gonium pectorale	LHDVADEPVC
XP_001700291 Chlamydomonas reinhardtii	LHDVSDPEVC
XP_002503699 Micromonas commoda	LHDVSDPEVA
XP_003059282 Micromonas pusilla	LHDVDEPSA
XP_001419478 Ostreococcus lucimarinus	LHDASMEPTY
XP_003083155 Ostreococcus tauri	LHDVSAEPRY
XP_002501054 Micromonas commoda	LHDFMVEPAS
XP_003057263 Micromonas pusilla	LHDPSEVPAS
XP_005651434 Coccomyxa subellipsoidea	MHDPASELSA
KDD76079 Helicosporidium sp.	LHDPAAEPTA
XP_001690850 Chlamydomonas reinhardtii	LHEEAAEPAA
XP_001690852 Chlamydomonas reinhardtii	LHDEAAEPAA
XP_002948304 Volvox carteri	LHDEAAEPCA
KXZ55952 Gonium pectorale	LHDEAAEPSA
XP_011398170 Auxenochlorella protothecoides	LHDEAAEPVA
XP_005848327 Chlorella variabilis	LHDEAAEPAA
KXZ56454 Gonium pectorale	LPSAVQQDRV
XP_001703601 Chlamydomonas reinhardtii	LPSAVNQVRG
XP_002954138 partial_Volvox carteri	LPEVRQETV-
XP_001419059 Ostreococcus lucimarinus	LADVSRREPAR
XP_003080614 Ostreococcus tauri	LADVSRREPSR
CCO16213 Bathycoccus prasinus	LADPSREPTA
XP_002503335 Micromonas commoda	LSDPSREPA
XP_003058405 Micromonas pusilla	LADPAREPA
XP_013900021 Monoraphidium neglectum	LHSPAREPSA
XP_002954367 Volvox carteri	LHCLAREPVA
KXZ43541 Gonium pectorale	LHCVAREPVA
XP_001694300 Chlamydomonas reinhardtii	LHCVAREPVA
XP_005645479 Coccomyxa subellipsoidea	LSQPGREPSA
XP_011399372 Auxenochlorella protothecoides	LSQPSREPSA
KDD74687.1 Helicosporidium sp.	LSQLSREPSA
XP_005844785 Chlorella variabilis	LSQPSREPSA
KDD76312 Helicosporidium sp.	FRGAEDEPVA
XP_011396366 Auxenochlorella protothecoides	FHNLVDEPVA
XP_005846540 Chlorella variabilis	FHNPHDEPVA
XP_002507666 Micromonas commoda	FHNPADEPYC
XP_003056520 Micromonas pusilla	FHNPADEPSC
XP_005646693 Coccomyxa subellipsoidea	FHSSADEPSA
KXZ50454 Gonium pectorale	FHNPADEPVC
XP_001699095 Chlamydomonas reinhardtii	FHNLADEPVC
XP_002951120 Volvox carteri	FHNMADEPVC

A/B csoport



C csoport



D csoport



ERK8 típusú



növényi evolúció során a MAPK és MKK géncsaládok génduplikációkat követő expanzióját a ko-evolváló dokkoló helyek fokozatos változásán keresztül kialakított interakciók megjelenése követte. Ennek azonban ellentmond a korábban bemutatott nagyfokú csoportok közötti konnektivitás és kanonikus D hellyel rendelkező MKK-k interakciója módosult CD helyű (C és D csoport) MAP kinázokkal. Így a CD helyek drasztikus csoportspecifikus

módosulásai inkább 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 (32. ábra). 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 proteomban még jóval kevesebb szubsztrát kevesebb MAPK általi felismerését kell biztosítani.

5.6. A MAPK jelátvitel szerepének vizsgálata fotoszintetikus mikroalgában

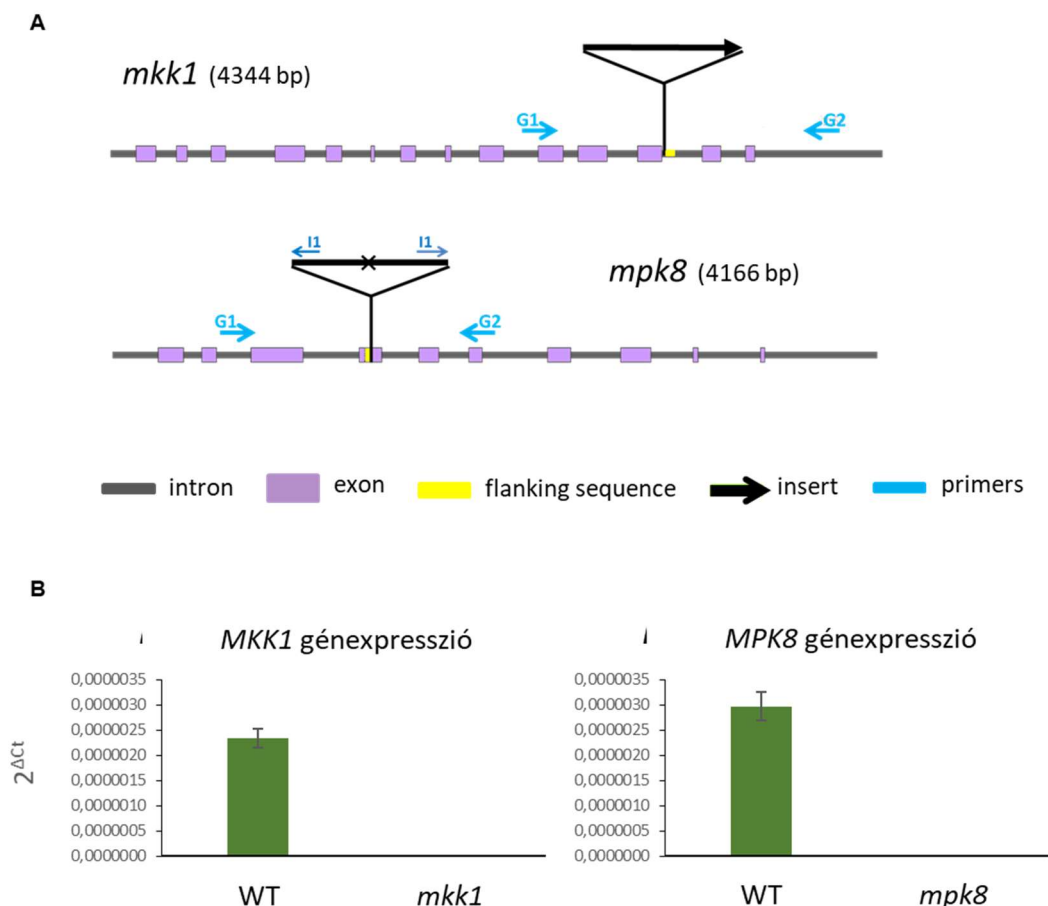
A mikroalgák óriási ökológiai és növekvő biotechnológiai jelentősége ellenére jelenleg a fiziológiai adaptációs mechanizmusaikra, de különösen az ezeket kialakító molekuláris válaszokat szabályozó jelátviteli folyamatokra vonatkozó ismereteink meglehetősen korlátozottak. Az alga MAPK-ok komparatív genomikai analízisének logikus folytatása azok funkcionális vizsgálata. Molekuláris alapú kutatásokra legalkalmasabb alga faj egyértelműen a *Chlamydomonas reinhardtii*, ami egy széleskörben használt modellorganizmus. E célból egy nagy múltú algakutató intézetben (Institute of Microbiology, Czech Academy of Sciences) dolgozó tapasztalt *Chlamydomonas* kutatóval, Katerina Bisovával együttműködve sikeresen bevezettük a *Chlamydomonas* kísérleti rendszert (tenyésztés, molekuláris technikák) az Agrártudományi Kutatóközpontban.

Eredeti elképzelésünk szerint egy-egy kiválasztott MAPK és MKK gén funkcionális vizsgálatát túltermelő vonalakkal terveztük elvégezni, azonban 2016-ban elérhetővé vált egy inszerciós mutáns kollekció, amiben az általunk vizsgált génekben is előállítottak mutáns vonalakat (Li et al., 2016). A random inszerciós mutánsgyűjtemények előállítása magas erőforrásigényű, így a *Chlamydomonas* kollekció előállításának ténye is jól mutatja az algák fokozódó biotechnológiai jelentőségét.

Két gént választottunk funkcionális jellemzésre. A *CrMPK8* (Cre01.g010000) az A/B típusú MAPK *Chlamydomonas*-ban, így a legjobban jellemzett Arabidopsis MAPK-okhoz (MPK3/4/6) leginkább homológ MAPK. *CrMKK1* (Cre06.g249150) pedig a *Chlamydomonas* B típusú MKK, az AtMKK3 ortológja. Mindkét gén a megfelelő filogenetikai csoport egyedüli tagja, így a redundanciával járó kísérleti problémák várhatóan minimálisak.

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. Az *MPK8* esetében két beépülés történt az adott genomi pozícióba, fordított tandem elrendezésben (33.a ábra). A génexpresszió elvesztését kvantitatív RT-PCR módszerrel igazoltuk (33.b ábra).

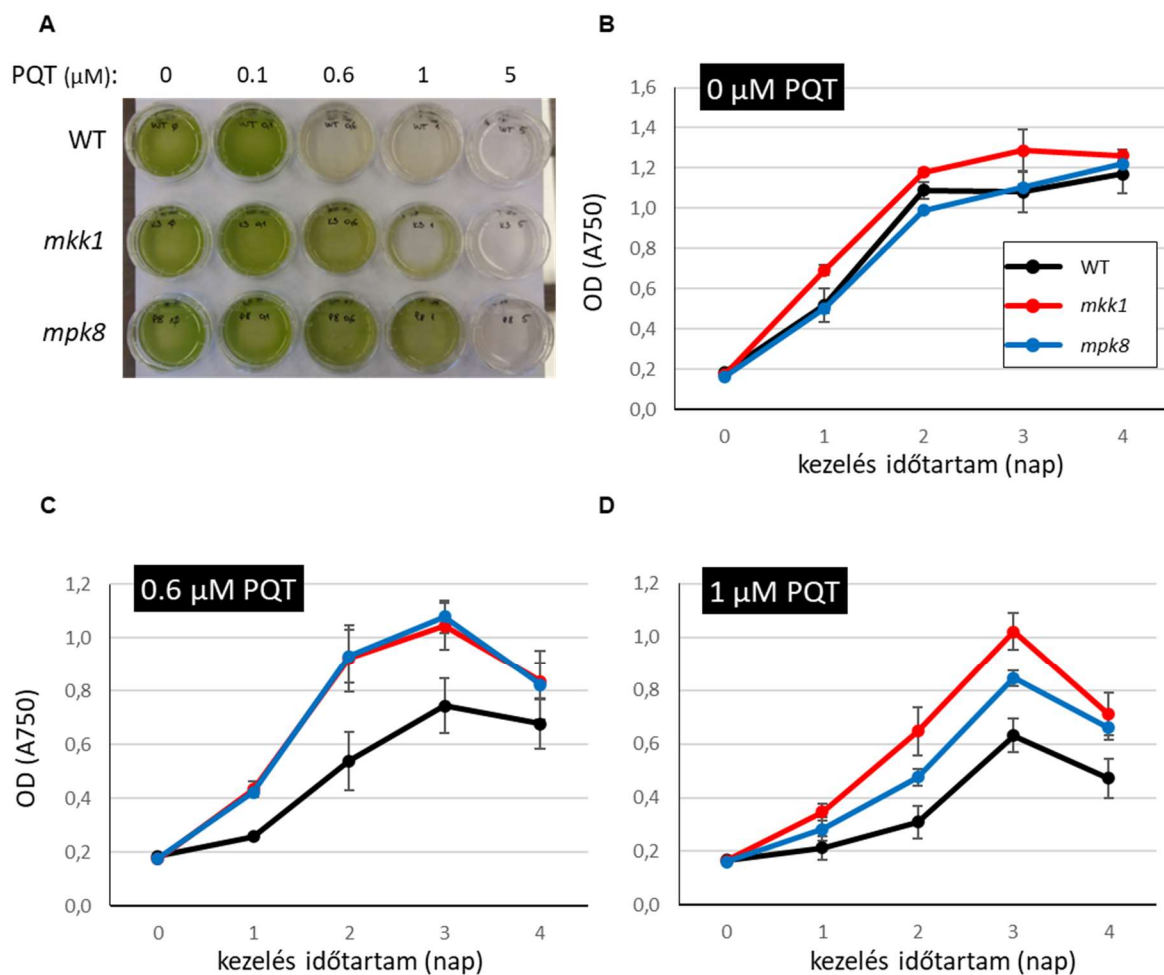
A MAPK jelátvitel mind állatokban, mind virágos növényekben fontos szerepet játszik az oxidatív stresszre adott válasz szabályozásában. Ráadásul a növényevolúció során a kezdetben csupán toxikus melléktermékként megjelenő reaktív oxigénformák számos inger másodlagos hírvivőjévé váltak (Mittler et al., 2011). Így elképzelhető, hogy a növényi MAPK hálózat ko-evolválódott az újabb ROS funkciókkal, és így alakultak ki a különböző stressz és fejlődés szabályozási funkciói. Ezért célul tűztük ki az alga MAPK ROS válaszban betöltött szerepének vizsgálatát.



33. Ábra *C. reinhardtii* MAPK jelátviteli inszerciós mutáns vonalak.

(A) Az *MKK1* és *MPK8* gének genomi szerveződése, az inszerciók pozíciója és a genotipizáláshoz használt PCR primerek. (B) Az *MKK1* és *MPK8* génexpresszió detektálása kvantitatív RT-PCR módszerrel vad típusú és inszerciós mutáns vonalakkól izolált RNS mintákból.

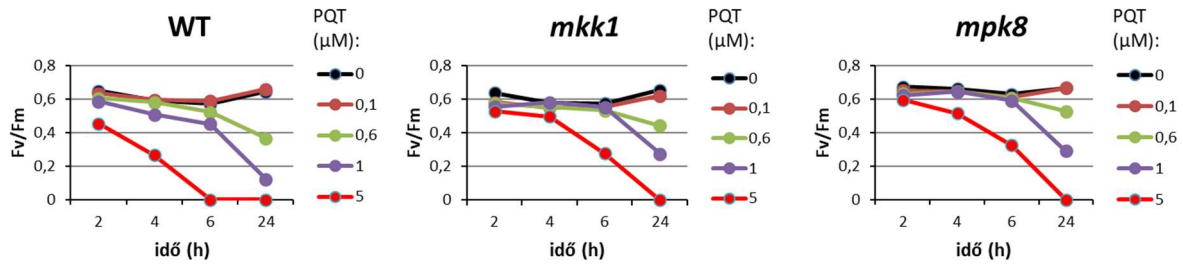
Elsőként az *mpk8* és *mkk1* mutáns vonalak érzékenységét teszteltük paraquat (PQT) oxidatív ágensre. Meglepő módon mindkét mutáns vonal ellenállóbb a PQT kezeléssel szemben, mint a vad típusú kontroll (34. ábra), ami arra utal, hogy a MAPK jelátvitel az oxidatív stressz válasz negatív regulátora a modell algafajban. Ez minden más eukarióta szervezetben megismert funkcióval ellentétes, ahol a MAPK jelátvitel az oxidatív stressz válaszban pozitív szabályozó szerepet tölt be (Pitzschke and Hirt, 2006; Kim and Choi, 2010; de la Torre-Ruiz et al., 2010). Ez az eredmény nagymértékben reprodukálható, a kísérletet hatszor ismételtük meg, konzisztens eredményekkel. Ráadásul minden kísérletben legalább két különböző PQT koncentrációt alkalmaztunk, a válasz pedig arányos volt a kezelés mértékével.



34. Ábra Az *mkk1* és *mpk8* mutáns *C. reinhardtii* vonalak ellenállóbbak a paraquat (PQT) indukált oxidatív stresszel szemben.

(A-D) A vad típusú *C. reinhardtii* CC-5325 és az ebben a háttérben *mkk1* és *mpk8* mutáns kultúrák növekedése a jelzett PQT koncentrációk mellett.

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 (35. ábra). Ezek az eredmények élettani szinten is megerősítették a MAPK mutánsok nagyobb toleranciáját a PQT indukált ROS képződéssel szemben.

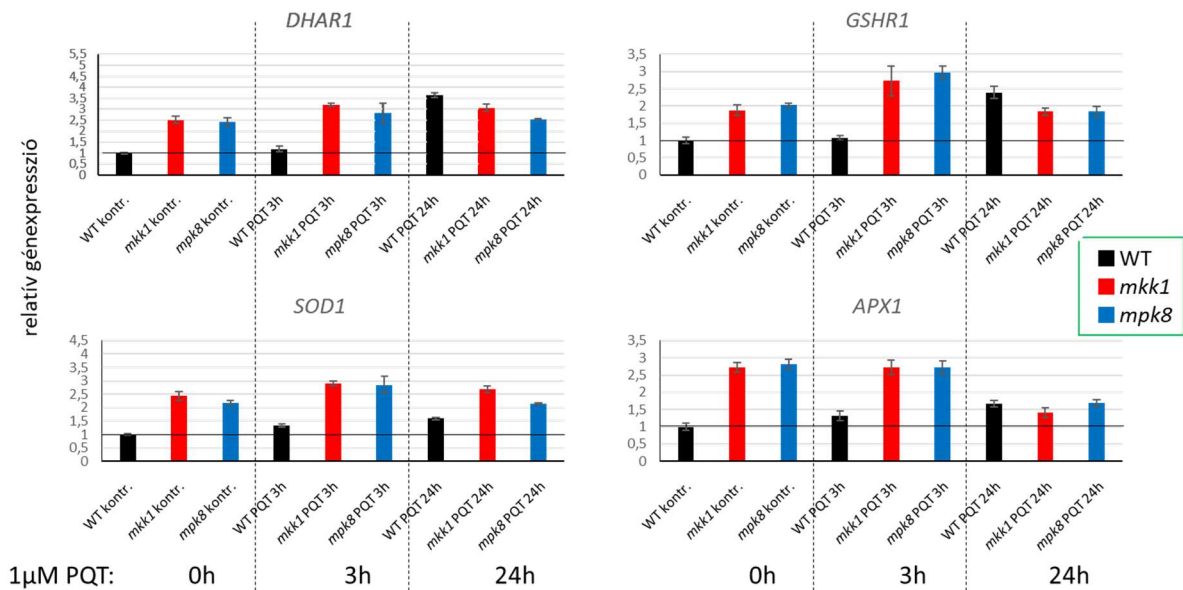


35. Ábra MAPK mutáns *Chlamydomonas* vonalakban a PQT stressz kevésbé károsítja II. fotokémiai rendszert (PSII).

Folyadékkultúrában előnevelt, középső exponenciális fázisú kultúrákból 3 ml-t kis Petri csészékben kezeltünk a jelzett PQT koncentrációkkal. A PSII maximum kvantum hatékonyságát mérő Fv/Fm paramétert 2, 4, 6 és 24 órával a kezelés kezdete után határoztuk meg pulzus amplitúdó modulációs fluorométerrel (Imaging-PAM), az ábrán feltüntetett genotípusokban. A kísérletet három független biológiai ismétlésben végeztük el, hasonló eredményekkel.

Az oxidatív stressz és a MAPK jelátvitel szabályozási kapcsolatának további tanulmányozása céljából 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, indukációjuk pedig a vad típushoz képest erősebb a mutáns vonalakban (36. ábra).

Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a ROS detoxifikációban kulcsfontosságú Foyer-Halliwell-Asada pathway *Chlamydomonas*-ban MAPK szabályozás alatt áll, és molekuláris szinten is megerősítik a MAPK jelátvitel negatív szabályozó funkcióját.

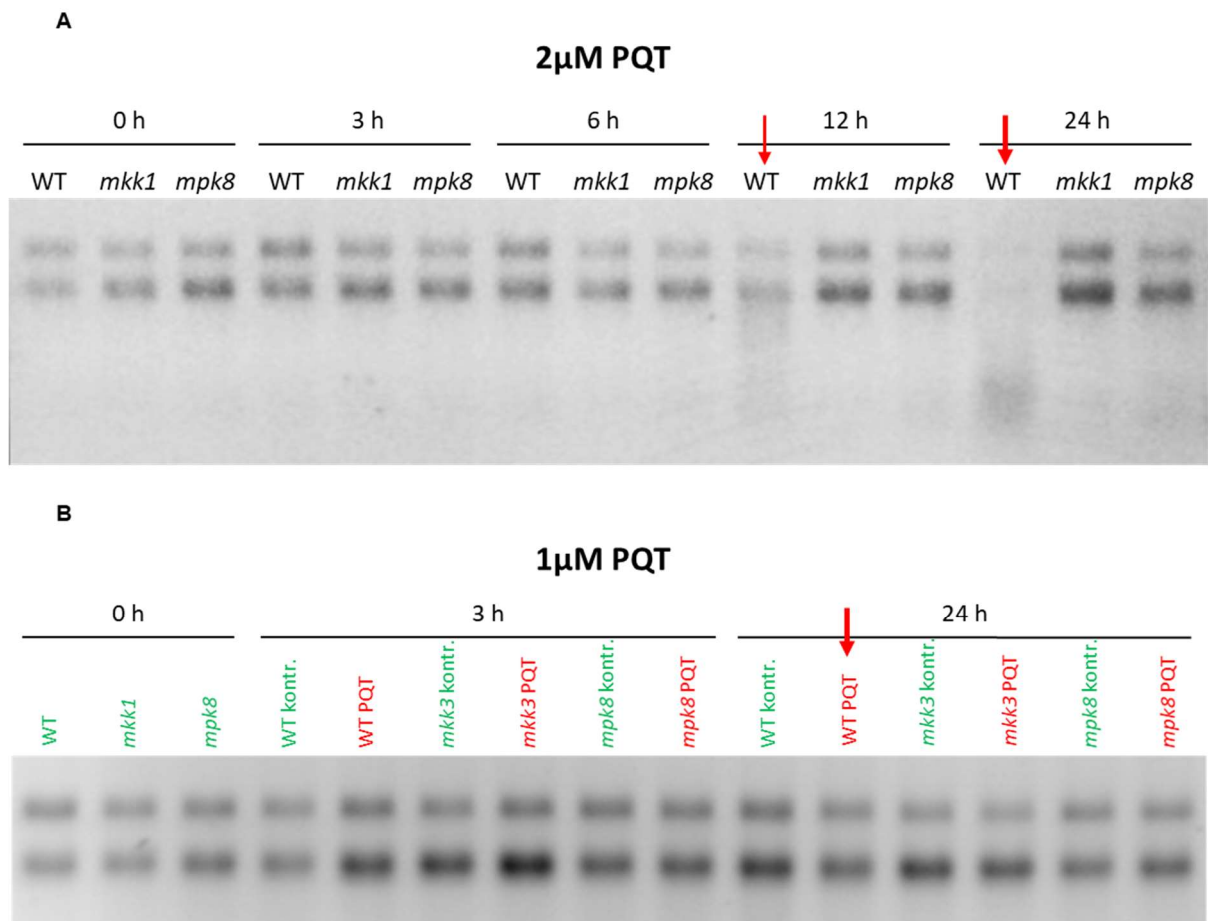


36. Ábra A MAPK jelátvitel negatív szabályozó szerepe a ROS detoxifikációban szerepet játszó gének expressziójában.

Relatív marker gén expresszió 1 μM PQT kezelés során vad típusú és MAPK mutáns *Chlamydomonas* vonalakban. Folyadék kultúrában előnevelt *Chlamydomonas* genotípusokat (vad típus (WT), *mkk1*, *mpk8*) kezeltünk 1 μM végkoncentrációjú paraquattal, 3 és 24 órán át. Kontrollként a kezelés megkezdésekor gyűjtött mintákat használtuk (kontr.). A génexpressziót kvantitatív RT-PCR módszerrel mértük, a marker gének (*DHAR1*, *GSHR1*, *SOD1*, *APX1*) expresszióját a vad típusú kontroll mintára normalizálva fejeztük ki.

A génexpressziós kísérletek céljából eleinte 2 μM PQT koncentrációt alkalmaztunk, azonban ennél a PQT koncentrációnál a vad típusú mintában az RNS degradációját tapasztaltuk a 24 órás kezelést követően, illetve kisebb mértékben már 12 óra után is. A mutáns vonalokból azonban minden esetben ép RNS mintát tudtunk gyűjteni ekkora PQT koncentráció mellett is (37.a ábra). 1 μM PQT koncentráció mellett az RNS minták nem károsodtak egyik vonalban sem (37.b ábra), így a génexpressziós kísérleteket is 1 μM PQT kezeléssel végeztük. Az RNS minták védettsége az oxidatív károsodástól szintén jól mutatja a mutáns vonalak nagyobb mértékű oxidatív stressz rezisztenciáját.

Eredményeink tehát molekuláris és élettani szinten is egyértelműen azt mutatják, hogy a MAPK jelátvitel *Chlamydomonas*-ban az oxidatív stresszválasz negatív regulátora, ami egy egyedülálló jelenségnek tűnik az ismert eukarióta MAPK rendszerekben.



37. Ábra MAPK mutáns *Chlamydomonas* vonalakban a PQT stressz kevésbé károsítja az RNS állományt.

(A, B) Folyadékkultúrában előnevelt *Chlamydomonas* genotípusokat (vad típus (WT), *mkk1*, *mpk8*) kezeltünk 2 vagy 1 μ M végkoncentrációjú paraquattal, a jelzett időtartamokig. Az izolált RNS mintákat agaróz gélelektroforézissel elválasztottuk és etídium-bromid festéssel vizualizáltuk. A 2 μ M kezelés hatására a vad típusú mintákban a szemmel jól látható riboszómális RNS frakciók 12 óra után már jelentős mértékben, 24 óra után pedig szinte teljesen degradálódtak (piros nyilak), míg a MAPK mutáns vonalakban nem érte őket szemmel látható károsodás (A). Az 1 μ M PQT kezeléssel a vad típusú *Chlamydomonas* vonalban sem eredményezett RNS degradációt, még 24h kezelés nyomán sem (piros nyíl) (B). A kísérletet három alkalommal végeztük el, az ábrán láthatóval azonos eredménnyel.

6. Diskusszió

A mezőgazdasági termelés sikerét alapvetően befolyásolják az állandóan változó környezeti körülmények. Ezért különösen fontos azoknak a folyamatoknak a megértése, amelyek a növények e környezeti hatásoknak megfelelő alkalmazkodását szabályozzák. Meglepő módon, a bemutatott munka kezdetekor a környezeti ingereket feldolgozó és a növényi fejlődést szabályozó jelátviteli molekuláris mechanizmusok közötti kapcsolatokra vonatkozó ismereteink, a téma nyilvánvaló jelentősége ellenére is, meglehetősen korlátozottak voltak. A növényi MAP kináz kutatások korai eredményei elsősorban a stresszválaszok szabályozásában betöltött funkciókat tártak fel. A környezeti hatások által aktivált MAPK jelpályák azonban kiválóan alkalmasak lehetnek ezen ingerek közvetítésére a fejlődésszabályozó folyamatok felé is. Evolúciós szempontból ez „mindössze” új kináz-szubsztrát kapcsolatok kialakulását igényli, vagyis a fejlődésszabályozás mesterregulátorain kell kialakulnia azoknak a rövid aminosav mintázatoknak amelyek lehetővé teszik a MAP kinázok dokkolását, illetve a foszforilációt, ami végsősoron befolyásolja a célfehérje funkcióját. Ez a folyamat egy kiváló példa az evolúció moduláris természetére: alapvetően már létező elemek csekély biokémiai változtatással járó átrendezésével új funkcionális modulok alakíthatók ki.

A dolgozatban bemutatott eredmények, illetve a közölt közlemények reményeim szerint meggyőzően járulnak hozzá a MAPK jelátvitelnek a környezetfüggő fejlődésszabályozásban betöltött fontos szerepéről kialakuló képhez. Azonosítottunk egy új, stresszaktivált jelpályát, igazoltuk a MAPK jelátvitel szerepét a merisztéma szabályozásban, illetve több, fejlődésszabályozó mester regulátorról is bizonyítottuk, hogy MAPK szubsztrátok. A MAPK jelátvitel evolúciójáról szerzett ismereteink, miszerint a növényvilágban nem szeparálódtak el stresszválaszt és fejlődési folyamatokat irányító jelpályák, szintén jól illeszkednek ebbe képbe.

6.1 Az MKK3-MPK7 jelátviteli pálya

Az MKK3-MPK7 jelátviteli pálya felfedezésekor még mind a B típusú MKK-k, mind a C típusú MAPK-k funkciója ismeretlen volt (Dóczi et al., 2007). A jelpályát egy szisztematikus irányított élesztő kéthibrid teszt során fedeztük fel (5. ábra), a hideg és só jelátvitelben működő MKK2-MPK4/6 jelpálya mellett (Teige et al., 2004). Habár ezek a felfedezések a genom alapú Arabidopsis MAPK kutatás kezdetekor nagy jelentőségűek voltak, a kísérlet egyben a heterológ

módszer korlátait is jól demonstrálta, hiszen számos MAPK, illetve MKK nem mutatott egyetlen kölcsönhatást sem, köztük olyanok sem, amelyeket azóta más kísérleti módszerekkel igazoltak (lásd pl. 30. ábra). Az élesztő kéthibrid rendszer korlátai jól ismertek, így a fals negatív eredmények például az élesztő kontextusból hiányzó szükséges növényi protein komplexalkotó fehérjék (pl. állványfehérjék) hiányának tudhatóak be. Mindazonáltal, a további munkánk során vizsgált új kapcsolatokat más módszerekkel is igazoltuk, így az élesztő eredmények jelentősége alapvetően abban rejlik, hogy lehetővé tették addig ismeretlen jelpályák részletes funkcionális vizsgálatát.

Igazoltuk, hogy az Arabidopsis növények fogékonysága patogén *Pseudomonas syringae* fertőzésre arányos az MKK3 expresszió és aktivitás szintjével. Az MKK3 a C csoport MAP kinázait aktiválja, a jelpálya transzkripció targete a *PRI* (Pathogenesis-related 1) patogén indukált védekezési gén. Az *MKK3* maga is transzkripcionálisan indukált *Pseudomonas* fertőzés során, illetve egy később elvégzett génexpressziós rendszerbiológiai kutatásuk azt mutatta, hogy az *MPK7* expresszió is patogén indukált (Menges et al., 2008). Ez azt jelenti, hogy a jelpálya több szinten szabályozott, az aktiváló patogén inger általi transzkripció indukció feltehetően egy pozitív visszacsatolási hurok, ami a jelerősítést szolgálja. Ezt támasztja alá az is, hogy mindkét (*MKK3*, *MPK7*) promóterben megtalálhatóak a *PRI* promóterben azonosított GCN4 és WRKY transzkripció faktor kötőhelyek (Dóczi et al., 2007).

Magasabb rendű eukariótákban a patogéneket specifikus receptorok érzékelik, amelyek patogén eredetű molekuláris mintázatokat ismernek fel (Nürnberger et al., 2004; Boller and Felix, 2009). A ROS képződés ennek a felismerési folyamatnak egyik korai következménye. Az *MPK6*-tal ellentétben az *MPK7* nem aktiválódik flagellin peptid kezelés hatására, ami arra utalt, hogy ez egy független patogén jelátviteli modul, amit esetleg valamilyen másik felismerési reakció, illetve az azt követő ROS képződés aktivál.

Eredményeink publikálása óta az *MKK3* jelpálya funkciójára vonatkozó ismeretünk tovább bővültek. Egyrészt kiderült, hogy a jelpályának szélesebb körű szerepe van a stressz jelátvitelben, ABA (Danquah et al., 2015) és sebzés hatására is aktiválódik (Sözen et al., 2020), a sebzés jelátvitelben pedig egy D csoport MAP kinázzal (*MPK8*) is együttműködik (Takahashi et al., 2011). A jelpálya felső tagjaiként azonosították a *MAP3K17*-et és *MAP3K18*-at (Danquah et al., 2015). 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 (Takahashi et al., 2007). Továbbá igazolták az *MKK3*-*MPK6*-*MYC2* funkcióját a kék fény indukált fejlődési válaszban is (Sethi et al., 2014). Az *MKK3* és ortológjai csak szárazföldi növényekben és

zöldalgákban találhatóak meg, így ez egy növény-specifikus MKK típus, ami egy ősi MKK és egy NTF2 domén fúziójával már a növényvilág nagyon korai közös ősében kialakult (Dóczi et al., 2012). Érdekes módon az MKK3 esetében nem következett be a komplex testfelépítés evolúciója során a többi MAPK jelátviteli génre jellemző génduplikáció és felszaporodás. Ennek ellenére a funkcionális eredmények egyértelműen igazolják a komplexitás növekedésével párhuzamos neofunkcionalizációt. Az MKK3 a MAPK jelátviteli hálózat magas konnektivitású tagjaként a szárazföldi növényeket érő különböző környezeti hatások és az azokkal összefüggő védekezési és fejlődési folyamatok szabályozásában egyaránt szerepet nyert. A multifunkcionalitás kialakulásában meghatározó jelentőségű lehet az újabb proteinekkel, mint szubsztrátokkal való kapcsolatok kialakulásának, amit jól példáz a MYC2 foszforilációja (Sethi et al., 2014), ami egy több folyamatban is meghatározó transzkripciós mesterregulátor (Kazan and Manners, 2013).

6.2. A MAPK jelátvitel szerepe a merisztémaműködés szabályozásában

A növényi organogenezis egy posztembrionális folyamat, az új szervek a növény élete során a merisztéma szövetekből kiindulva képződnek. Ez lehetővé teszi a egyedfejlődés folyamatos koordinációját a környezeti körülményekkel. Mindez a környezeti ingerek érzékelő és merisztémaműködést szabályozó folyamatok közötti molekuláris szintű kapcsolatot feltételezi. Kutatásaink itt bemutatott eredményei erre a szabályozási kommunikációra szolgáltatnak bizonyítékokat, és a MAPK jelátvitel szerepét igazolják ebben a folyamatban.

A CLAVATA (CLV) jelpálya a hajtáscsúcs merisztéma (shoot apical meristem, SAM) őssejt populáció méretének szabályozásában működik (Dodsworth, 2009). Az elfogadott modell szerint a CLV3 peptid ligandum a CLV1–CLV2 receptor heterodimerhez kapcsolódik. Ez a ligandum-receptor interakció a CLV1 kináz domén transzfoszforilációjához vezet. A kináz domén foszforilált aminosavjai alsó effektor fehérjék, mint pl. KAPP (kinase-associated protein phosphatase) és ROP (Rho GTPase-related protein) kötőhelyiként funkcionálnak. Ez a modell döbbenetes analógiát mutat az állati növekedési faktor érzékeléshez, ami az ERK MAPK jelpályát aktiválja. Ennek fényében Clark már 2001-ben felvetette annak a lehetőségét, hogy a CLV jelátvitel egy MAPK kaszkádot tartalmazhat (Clark, 2001). Ezzel összhangban, az MPK3/6 aktivitást valóban befolyásolják a CLV receptorok, ahol szerepük van a hajtáscsúcs merisztéma őssejtállományának fenntartásában (Betsuyaku et al., 2011; Lee et al., 2019). Érdekes módon, a MAPK aktiváció időben szorosan korrelál a *WUS* transzkripciós repressziójával a hajtáscsúcs merisztémában. Ez a *WUS* foszforilációval együtt felveti egy, az

ACS MAPK általi szabályozásához hasonló, kettősszintű szabályozási mechanizmus lehetőségét (Li et al., 2012). Az ilyen, transzkripciós és poszttranszlációs, kettősszintű szabályozás egy robusztusabb, mégis finomabban kontrollált szabályozási mechanizmus kialakulását teszi lehetővé.

A ROOT MERISTEM GROWTH FACTOR 1 (RGF1) a gyökércsúcs merisztéma összejtállományának fenntartását szabályozó peptid, az RGF1 INSENSITIVES (RGI) receptorok liganduma. Ez a receptor-ligandum kapcsolat a YDA-MKK4/MKK5-MPK3/MPK6 kaszkádot aktiválva a PLT1/PLT2 transzkripciós szabályozásán keresztül vesz részt az összejtszabályozásban (Shao et al., 2020).

A merisztéma aktivitás vizsgálatára a de-etiolációs kísérleti rendszert alkalmaztuk (López-Juez et al., 2008; Yoshida et al., 2011; Pfeiffer et al., 2016; Mohammed et al., 2018; Dóczy et al., 2019), így kvantifikálni tudtuk a levélkezdemények fejlődését. Eredményeink megerősítik, hogy a de-etioláció egy jól használható szinkronizált fejlődésbiológiai rendszer a merisztéma aktivitás tesztelésére, ami funkcionális genetikai kísérletekben alkalmas a levél iniciáció és fejlődés vizsgálatára. Az így kapott eredményeket MKK7 túlexpresszázó növényekkel is megerősítettük. Az *mpk6* és *mkk7* mutánsok nagyobb mértékű merisztéma aktivációjával szemben az MKK7 túltermelés merisztéma összeomláshoz vezetett.

Az MKK7 az egyik legkevésbé jellemzett MAP kináz kináz. Korábban a poláris auxin transzportot gátló funkcióját közölték (Dai et al., 2006), ami összhangban van az auxin eloszlás ismert szerepével a merisztéma szerveződésben, illetve a MAPK közvetített PIN foszforilációra vonatkozó eredményeinkkel. Más MAPK kaszkád komponensekhez hasonlóan az MKK7 patogénválaszban betöltött pozitív szabályozó funkciója is igazolt (Zhang et al., 2007). A patogénvédekezésre vonatkozó funkcionális eredményeken túl egy újabb tanulmányban számos az MKK7-MPK6/3 modul által differenciáltan foszforilált fehérjét azonosítottak (Huck et al., 2017). Ezek alapvetően a patogénválaszhoz köthetőek, azonban fontos megjegyezni, hogy a merisztéma fehérjék teljes növény kivonatokban erősen alulreprezentáltak, így a nagy áteresztőképességű módszerekkel nehezen detektálhatóak, ezért azok azonosítására más (pl. hipotézis alapú) megközelítést célszerű alkalmazni. Az MKK7 funkciójára vonatkozó ismeretinket összegezve megállapítható, hogy ez a kináz is jól illeszkedik a stressz aktivált MAPK jelátvitel fejlődésszabályozó szerepére vonatkozó képbe.

Az MKK7 túltermelés súlyos fejlődési rendellenességekkel jár, a dolgozatban bemutatott saját eredményeinkkel összhangban, egy másik csoport a konstitutívan aktív MKK7 túltermelésnek letalításáról számolt be (Meng et al., 2012). Így az *MKK7* gén nagyon szoros

transzkripció reguláció alatt áll, a legtöbb növényi szövetben standard körülmények között nem fejeződik ki.

Az MKK-k aktivációja a T/SXXXXXT/S foszforilációs helyen keresztül történik azonban az MKK7 foszforilációs helyének harmadik pozíciójában aszparaginsav található (SLDYCNS). Az ilyen MKK-k autoaktivitással is rendelkezhetnek (Cardinale et al., 2002; Kiegerl et al., 2000). Figyelemreméltó, hogy az *MKK3*-hoz hasonlóan az *MKK7* expresszió is indukálódik a szabályozott folyamatokkal, mint pl. auxin kezelés (11. ábra) és patogén fertőzés (Zhang et al., 2007). A jelátviteli hálózatokra jellemző a visszacsatolási hurkok kialakulása (Kitano, 2004), így gyakori jelenség, hogy a jelpályák által koordináltan szabályozott gének között maguk a jelpályát alkotó gének vagy a jelpálya szabályozói (pl. foszfatázok) is szerepelnek. Az ilyen hálózati topológia eredményeként nagyfokú ko-reguláció jön létre a jelátviteli és a szabályozott gének között, így a génexpressziós vizsgálatok a szabályozó gének funkciójára vonatkozóan is hasznos eredményekhez vezethetnek (Menges et al., 2008). Erre további jó példa a *MAP3K18*, amelynek expressziós analízise során nagy mértékű ko-regulációt találtunk vízhiány és ABA indukált génekkel (Menges et al., 2008), és amelyről későbbi kísérletek valóban igazolták az ABA jelátvitelben betöltött szerepét (Danquah et al., 2015).

Az MKK7-MPK6 modul merisztéma szabályozó funkciója mellett igazoltuk több, a merisztéma működésben mester regulátor szerepet betöltő fehérje MAPK közvetített foszforilációját is. A WUS és az AP2 transzkripció faktorok működése intenzív genetikai megközelítésű kutatások eredményeként jól ismert, azonban poszttranszlációs módosításuk funkcionális szerepének vizsgálata egy új kutatási irányt nyithat meg a merisztéma szabályozás területén. Erre alkalmas kísérleti megközelítésnek tűnik a *wus* vagy *ap2* mutáns növényanyagok komplementálása foszforilációs mutáns konstrukciókkal. E célból elkészítettük a *wus* komplementációra alkalmas *ProWUS:GFP:WUS* konstrukciókat vad típusú, nem foszforilálható és foszfomimetikus változatokban is, azonban erőforrás hiányában ezt a kutatási irányt nem tudtuk folytatni.

A transzkripció faktorok mellett a PIN hormon transzporterek a merisztéma szabályozás egy másik szintjét képviselik. A PIN fehérjéknek esszenciális szerepük van a poláris auxin transzport folyamatban, melynek zavara a csúcsmerisztémák összeomlását eredményezi. A PAT folyamatban fontos szerepet kap a PIN fehérjék celluláris lokalizációja, ami általában poláris plazma membrán lokalizációt jelent. Ennek kialakításában az AGC kinázok által közvetített PIN foszforilációnak jelentős szerepe régóta ismert. Eredményeink a

MAPK és AGC foszforiláció ko-evolúcióját tárták fel szárazföldi növényekben. A MAPK jelátvitel többszintű, transzkripció és hormonális, kapcsolódása a merisztéma szabályozáshoz arra utal, hogy ez a jelátviteli kapcsolat fundamentális jelentőségű a növényfejlődés szempontjából.

A PID-del ellentétben az MKK7 túlexpresszió nem okoz PIN1 polarizáció váltást gyökérben, ami arra utal, hogy a MAPK közvetített foszforiláció más intracelluláris transzportmechanizmusokat szabályoz, mint az AGC3 kináz közvetített foszforiláció. A nem foszforilálható és a foszfomimetikus mutánsok eltérő típusú internalizációt mutatnak: a nem foszforilálható változathoz képest a foszfomimetikus változat stabilabb és extrém nagy intracelluláris aggregátumokat képez. Feltehetőleg a két mutáns a dinamikus foszforilációs egyensúlytól való eltérés két extrém végletét képviseli, lokalizációjuk pedig arra utal, hogy dinamikus MAPK foszforiláció szükséges a megfelelő PIN1 transzporthoz, ami a plazmamembránba jutást biztosítani képes. Az eddig vizsgált foszforilációs mechanizmusok a PIN plazmamembránon belüli polaritását befolyásolják, de nem befolyásolják a PIN plazmamembránba való kijutását. A MAPK foszforiláció feltehetőleg a különböző membrántranszportmechanizmusokba történő belépést szabályozhatja, amelyek a plazmamembránba való kijutást elősegítik vagy gátolják, míg a szomszédos foszfohelyeken történő PID foszforiláció pedig a plazmamembránon belüli apikális-bazális polaritást alakítja ki.

Az MPK6 a PIN1-et a HL C-terminális régiójában található S337 pozícióban is foszforilálja, és ennek a szerinnek a foszforilációs állapota részt vesz a PIN1 polaritás szabályozásában 35 napos virágzati tengely xilém parenchyma sejtjeiben (Jia et al., 2016). Azonban a T227/T248/T286 aminosavakkal ellentétben, az S337 gyengén konzervált a szárazföldi növények PIN fehérjecsaldójában, így ez a foszforilációs mechanizmus feltehetően egy újabb keletű evolúciós fejlemény, aminek a PIN1 funkció specifikus finomszabályozásában lehet szerepe.

A PAT által meghatározott helyeken létrejövő auxin koncentrációmaximumok alapvető fontosságúak a növényi fejlődési mintázatok kialakításában. Aszimmetrikus plazmamembrán lokalizációjukkal a PIN fehérjék irányítják az auxintranszport irányát, így a PIN lokalizációt befolyásoló jelátviteli útvonalak környezeti ingerek hatására módosíthatják a fejlődési programokat (Robert and Offringa, 2008; Sassi et al., 2012). Eredményeink alapján feltételezhető, hogy a stressz aktivált MAPK jelátvitelnek szerepe van a PIN vezikuláris transzportjának környezetfüggő szabályozásában. A flagellin (Asai et al., 2002; Mészáros et al., 2006) vagy só (Teige et al., 2004; Liu et al., 2015) jól jellemzett MAPK aktiváló ingerek. A

PIN2 intracelluláris delokalizációját korábban leírták a gyökér halotropikus válasza során (Sun et al., 2008; Galvan-Ampudia et al., 2013). Eredményeink alapján elképzelhető, hogy a só stressz MAPK foszforiláció közvetítésével okozza a PIN2 internalizálását.

Eredményeink alapján a flagellin indukált PIN1 delokalizáció egy MPK6 közvetített folyamat, ezt egyrészt protoplaszt ko-transzfecciók kísérletekkel igazoltuk, másrészt az endogén PIN1 immunlokalizációjával flg22-vel kezelt *mpk6* mutáns növények gyökereiben (Dory et al., 2018). Mivel a flg22 az MPK6-on kívül más MAP kinázokat is aktivál, pl. az MPK4-et, ez utóbbi egy nem várt eredmény. Elképzelhető, hogy a PIN1 hozzáférhetősége szerepet játszik a specificitás kialakításában (kompartmentalizációs szabályzás). Ezt az elképzelést ténylegesen alátámasztják az MPK6 és MPK4 gyökérsejteken belüli intracelluláris lokalizációjára vonatkozó eredmények. Míg az MPK6 a transz-Golgi rendszerben és a plazmamembránban lokalizálódik (Müller et al., 2010), ami nagyon jól illeszkedik a PIN1 transzport modulálásában játszott szerepéhez, addig az MPK4 elsősorban a sejtmagban lokalizálódik, de detektálható a citoplazmában is mezofill (Andreasson et al., 2005) és gyökérsejtekben (Kosetsu et al., 2010; Michniewicz et al., 2007). Így az MPK4 normál körülmények között kevésbé fér hozzá a PIN1-hez. Mindazonáltal a fehérjelokalizáció egy dinamikus folyamat, pl. osztódó gyökérsejtekben az MPK4 a sejtlemezen található (Kosetsu et al., 2010), így tehát elképzelhető, hogy speciális körülmények között az MPK4 is foszforilálja a PIN1 fehérjét *in planta*.

Több mint két évtizednyi intenzív genetikai kutatásoknak köszönhetően a merisztéma szerveződés és a szervkialakulás szabályozása mára már részletesen ismert, mutáns vonalak használatával sikerült azonosítani és jellemezni számos mesterregulátort. Több, jól ismert szabályozó fehérje foszforilációját igazoltuk, amiből megállapíthatjuk, hogy e szabályozó elemek maguk is dinamikusan szabályozottak, és a továbbiakban a poszttranszlációs szabályozást szükséges lesz figyelembe venni, hogy működésükről pontos képet kapjunk, ami egy új fejezetet nyithat a merisztéma szabályozás kutatásában.

Ezen eredmények nyomán egy olyan kép formálódik, miszerint a MAPK jelátvitel egy fontos intracelluláris molekuláris kapocs lehet a környezeti szignálok és a fejlődésszabályozás között. Az eredmények jelentőségét talán érzékelteti az a tény, hogy a fotoszintézis mellett valószínűleg a növényfejlődés környezeti plaszticitása a növényi létforma egyik legmeghatározóbb sajátossága.

6.3. Egy új módszer *in vivo* foszforilációs kölcsönhatások vizsgálatára növényekben

Kialakítottunk egy új kísérleti rendszert, ami alkalmas specifikus kináz-szubsztrát foszforilációs kölcsönhatások vizsgálatára növényi sejtekben. A jelenlegi gyakorlat szerint egy vizsgált protein foszforilációját legtöbbször *in vitro* kináz teszttel vizsgálják, habár ennek a módszernek a megbízhatósága a nagy koncentrációjú, tisztított fehérjék sejtvesztés szabályozó mechanizmusokon kívüli használata miatt meglehetősen problematikus, használatával gyakoriak a hamis pozitív vagy negatív eredmények (Peck, 2006; Manning and Cantley, 2002). Ezen kívül a sugárzó foszforizotóp használata munka- és környezetvédelmi problémákat is jelent. Az általunk kidolgozott, gyors és rugalmas kísérleti módszer számos előnnyel rendelkezik a hagyományos *in vitro* kináz teszttel szemben. A vizsgált fehérjéket kódoló cDNS-ek fúziós expressziós vektorba klónozására mindkét módszernél szükség van, az *in vitro* kináz teszt esetében általában GST-fúziós fehérjéket expresszálnak, erre alkalmas speciális *E. coli* baktériumtörzsekben. Azonban lényeges különbség, hogy a növényi fehérjék expressziója a prokarióta rendszerben sokszor problematikus (pl. inklúziós testek kialakulása miatt), illetve az expresszált fehérjék kitisztítása is munkaigényes, és csak ezek után következik a tényleges *in vitro* kináz teszt, amit SDS-PAGE elválasztás követ, végül a beépült radioaktív foszfátcsoportokat autoradiográfiával detektálják. Ezzel szemben az új módszerrel a vizsgált fehérjéket növényi sejtekben expresszáljuk, és az azokból kivont nyers fehérjekivonat rögtön felvihető a cIEF immunteszt rendszerbe, ahol az elválasztás és a detekció pár óra alatt lezajlik.

A kapilláris elektroforézis egy úttörő jelentőségű fejlesztés a biomolekulák analízise terén, és az immunteszttel összekapcsolva a nehézkes, hagyományos SDS-PAGE western blot számos hátránya kiküszöbölhető. A kapilláris elektroforézis rendkívül érzékeny, akár 25 sejtnyi mintából is reprodukálhatóan kimutathatók fehérjék ezzel a módszerrel (O'Neill et al., 2006), tehát lehetőség nyílik a felhasznált anyagok (protoplaszt, plazmidok) gazdaságos felhasználására. Legjobb tudomásunk szerint a cIEF immuntesztet a növénykutatásban korábban nem alkalmazták. A kinázkutatás kísérleti módszereinek bővítése hozzájárulhat a növényi intracelluláris jelátviteli rendszerek jobb megismeréséhez.

A transzfekció alapú kísérletek elterjedtek a jelátviteli kutatásokban, és a protoplaszt tranziens expressziót széles körben használják a növényi MAPK kutatásban (Colcombet and Hirt, 2008). Az új módszer további előnye, hogy az egyes fehérjék elleni specifikus antitestek helyett epitópok elleni, kereskedelmi forgalomban kapható antitestek használhatóak, amelyek specifikusak, megbízhatóak és olcsóbbak. Protoplasztok különböző szövettípusokból vagy mutáns növényi anyagokból is izolálhatóak, így a kísérletek különböző célokra specifikusan

tervezhetőek, így például elkerülhető olyan fehérjék kölcsönhatása, amelyek nem fordulnak elő ugyanabban a sejttípusban. A túlexpresszálasból eredő problémák csökkenthetők indukálható, génspecifikus vagy sejttípusra specifikus promóterek használatával. Azonban a protoplasztok előnye ebből a szempontból kiemelkedő jelentőségű: a transzformáció szinkronban történik egy adott időpontban, és az expresszált fehérjék a transzformáció után néhány órával már detektálhatóak, amit általában egy körülbelül 20 óráig tartó lineáris növekedési fázis követ. Ez lehetővé teszi az expressziós szintek finomhangolását az inkubációs idő változtatásával (Denecke et al., 2012). Fontos megjegyezni, hogy sok olyan növényfajra is, amelyek transzformációja nehézkes vagy hosszadalmas, kidolgoztak protoplaszt transzfelektációs módszereket (Davey et al., 2005). Ezért az új módszer pl. a gazdasági szempontból fontos gabonafajok jelátvitelének tanulmányozására közvetlenül is alkalmazható, ami biotechnológiai szempontból is nagyobb jelentőséget ad a módszernek.

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. Mint minden sejtes módszer a protein interakciós kísérleti eszköztárban (pl. ko-immunoprecipitáció vagy fragment komplementáció), sejtes természete miatt az általunk kialakított módszer sem zárja ki teljes mértékben az indirekt foszforilációs kölcsönhatás lehetőségét. Mindazonáltal, mivel a módszer olyan protoplaszt mintákat eredményez, amelyek eltérő fúziós konstrukciókat expresszálnak, kivitelezhető ezek egy részének párhuzamos felhasználása egy független interakció kísérlet elvégzésére, amelyeket eleve gyakran végeznek protoplasztokban a kináz kutatásokban. Továbbá, a független kísérleti evidenciák mellett, amennyiben speciális interakciós szekvenciamotívumok ismertek, ezek elmutáltatása igazolhatja az interakció közvetlenségét.

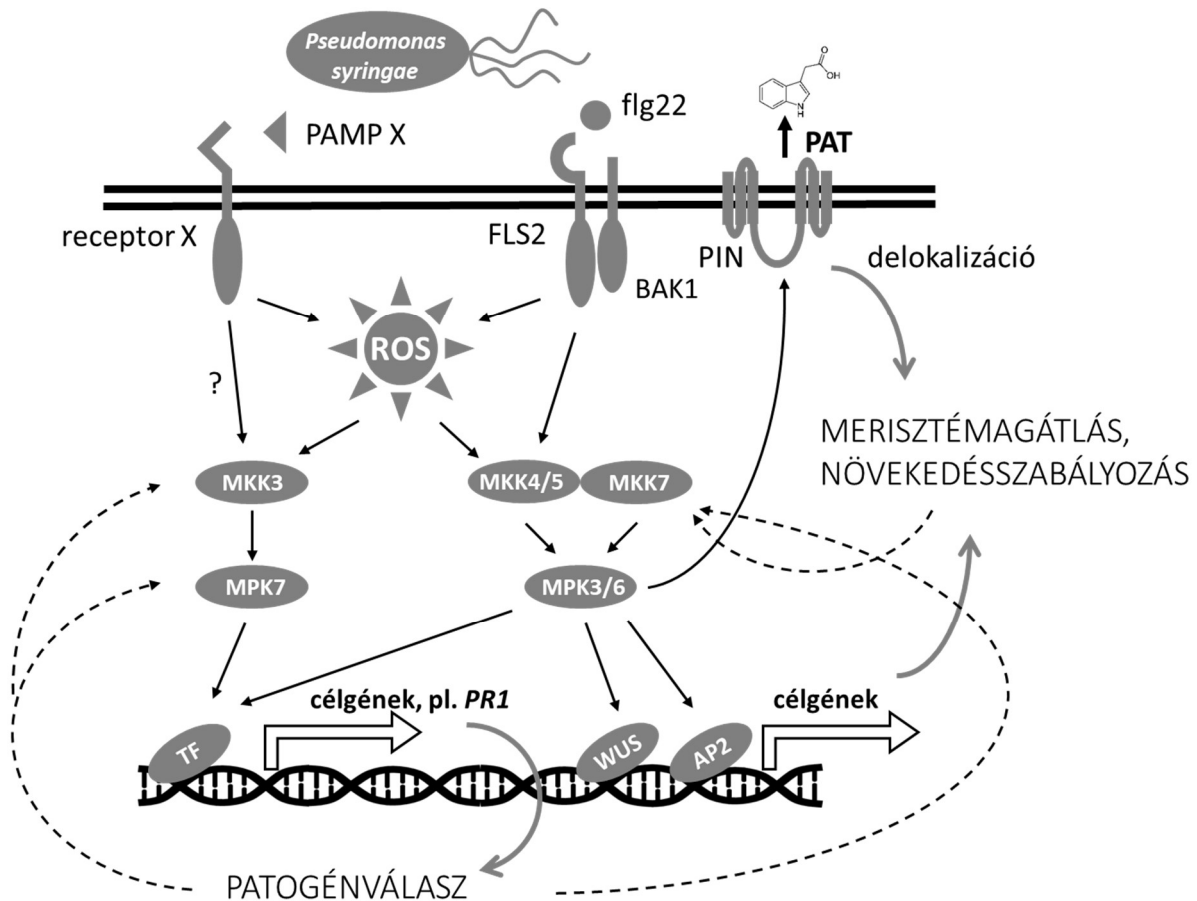
A bemutatott módszer skálázása kivitelezhetőnek tűnik nagy áteresztőképességű protoplaszt transzformáció (Wehner et al., 2011) és nyilvánosan elérhető Gateway alapú cDNS klóngyűjtemények (Gong et al., 2004) alkalmazásával. Így a különböző kísérleti vagy predikciós megközelítésekkel kapott szubsztrát jelöltek validálásán kívül, a módszer elméletileg alkalmas lehet expressziós könyvtárak szűrésére is.

A fenti előnyök mellett a módszer limitációja speciális műszerigénye, habár a cIEF imuunteszt készülék beszerzési költsége a fejlett országok proteomikai laboratóriumi műszerkiadásával összehasonlításban nem jelent irreális költségterhet.

Összegezve, kialakítottunk egy új kísérleti rendszert *in vivo* foszforilációs kölcsönhatások vizsgálatára. Ez egy rugalmas, adaptálható kísérleti platform, amely kibővíti a

növényi kináz kísérleti eszköztárat, és kiegészítheti az előfeltételezés nélküli szűrési és az *in silico* módszerek területén bekövetkezett technológiai fejlődést.

A dolgozatban bemutatott növényi MAPK jelátviteli szabályozási mechanizmusokat feltáró eredményeket sematikus formában a 38. ábrán foglatam össze.

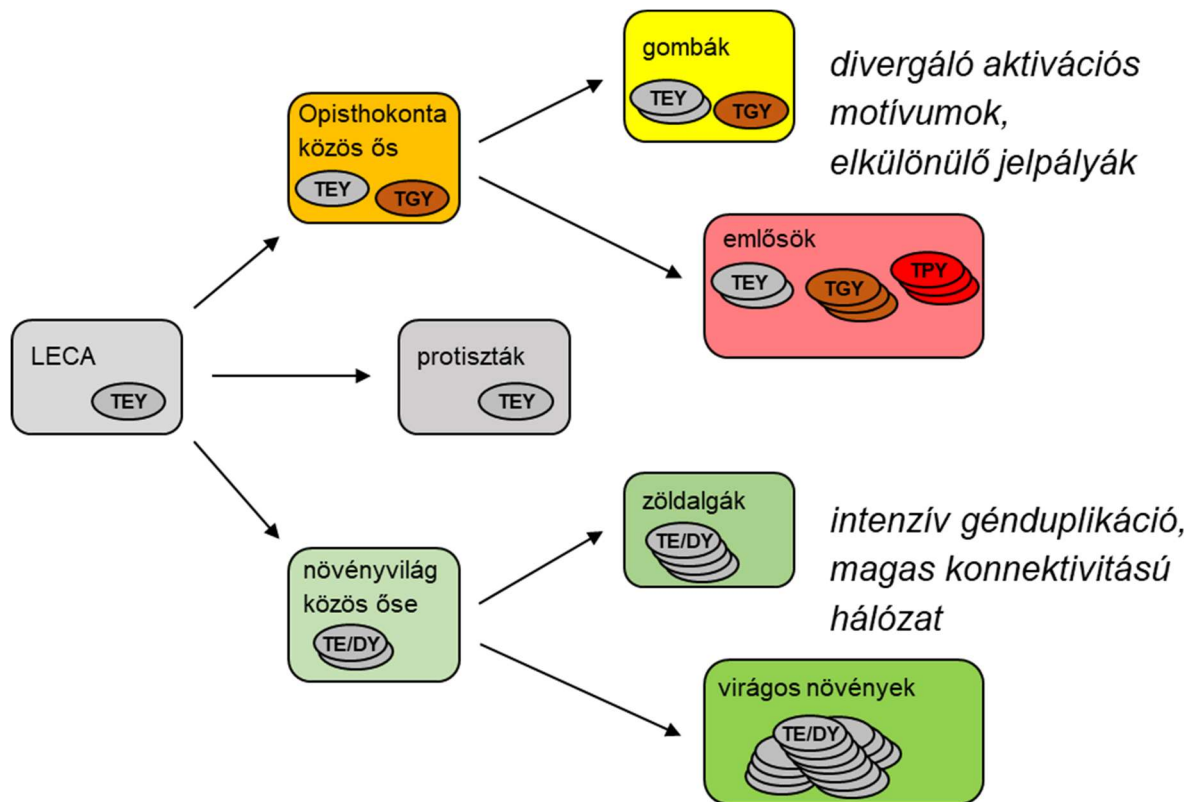


38. Ábra A dolgozatban bemutatott MAPK jelátviteli mechanizmusok sematikus összefoglalása.

A patogén baktériumok (pl. *P. syringae*) elleni védekezési válaszokat molekuláris mintázatok (PAMP) alapján elicitor-receptor felismerési reakciók által aktivált MAPK jelátviteli pályák szabályozzák. Az MKK3-MPK7 jelátviteli modul az MKK4/5-MPK3/6 modult aktiváló flagellin (fls22) – FLS2/BAK1 felismerési reakciótól függetlenül, a felismést követően másodlagos hírvivőként funkcionáló reaktív oxigénformák (ROS) által aktiválódik, és *PR* gének indukálásán keresztül hozzájárul a PAMP indukált patogénválasz kialakításához. Továbbá az MKK3 és MPK7 gének egy patogén indukált transzkripciós pozitív visszacsatolási hurok részeként a patogénválasz részeként maguk is indukálódnak. A flagellin aktivált MPK3/6 paralóg pár, és az ezek felső aktivátoraként működő MKK7 a patogénválasz indukálása mellett a szerepet játszik a merisztéma működés és a fejlődési folyamatok szabályozásában is. Ez a szabályozási kapcsolat fejlődésszabályzó funkciójú fehérjék foszforilációján keresztül jöhet létre. Ilyenek a merisztéma mesterregulátor transzkripciós faktorok (WUS, AP2) vagy a poláris auxin transzport (PAT) kialakításában meghatározó PIN auxin transzporterek. A transzkripciós visszacsatolásokat szaggatott vonalú nyilak jelzik.

6.4 A MAPK jelátvitel evolúciója a növényvilágban

Komparatív genomikai kutatásainkkal igyekeztünk hozzájárulni a MAPK jelpályák reális evolúciós modelljének kialakításához. Valamennyi MAPK egy ERK-szerű, TEY aktivációs motívumú ősi kináz típusból származik, ami már az utolsó közös eukarióta ősből (LECA) kialakult, hiszen ehhez hasonló MAPK-ok protisztákban, állatokban, gombákban és növényekben is megtalálhatóak. Az ERK2 *Dictyostelium* MAPK különböző környezeti szignálok és hatására szabályozza a sejtsors és az életciklus folyamatát ebben a protiszta modellben (Hadwiger and Nguyen, 2011), ami arra utal, hogy a MAP kináz jelátvitel szerepe a környezeti hatások és a fejlődés összekapcsolására az eukarióta evolúció korai szakaszában kialakulhatott. Az egyre komplexebb eukarióta szervezetekben az ősi ERK-szerű MAPK génből egyre nagyobb géncsaládok jöttek létre. Azonban a MAPK jelátvitel határozottan eltérő evolúciós utat járt be az Opisthokonták és a növények között. Az Opisthokontákra jellemző a biokémiai és funkcionálisan is szeparáltabb MAPK kaszkádok kialakulása, amelyekben a sejtszétválást, fejlődési folyamatokat irányító ingerek jelátvitelére viszonylag függetlenül működik a stresszhatások jelátvitelétől. Növényekben ezzel szemben nem alakultak ki szeparált jelpályák, hanem egy biokémiaiilag homogénebb, magas konnektivitású MAPK hálózat alakult ki. Ennek egyik lehetséges oka a fejlődési programok alapvető különbsége a két nagy eukarióta doménben, az organogenezis és az egyedfejlődés állatokban alapvetően egy determinált embrionális folyamat, míg növényi organogenezis alapvetően egy magas környezeti plaszticitású, posztembrionális folyamat. Mindez a növények helyhez kötött életmódjával függ össze, hiszen a növényfejlődésnek alkalmazkodnia kell a változó környezeti körülményekhez, így itt nagyobb jelentőséggel bír a kétféle szabályozás közötti hatékony információáramlás (crosstalk). A MAPK jelátvitel eltérő evolúciós fejlődési útjainak a főbb eukarióta csoportokra jellemző alapvető trendjeit a 39. ábrán foglaltam össze.



39. Ábra A MAPK jelátvitel eltérő evolúciós fejlődési útjai a főbb eukarióta csoportokban.

A TEY foszforilációs motívumú MAP kinázok mindhárom alapvető eukarióta csoportban (protiszták, Opisthokonták, növények) megtalálhatóak. Ezzel szemben más típusú foszforilációs motívumok csak bizonyos csoportokban vannak jelen: TGY Opisthokonta fajokban, TPY állatokban, illetve a biokémialig a TEY-hoz hasonló TDY növényekben. Ebből következően a MAPK jelátvitel egy TEY típusú MAPK megjelenésével már az utolsó eukarióta közös ősből (Last Eukaryotic Common Ancestor: LECA) kialakult, majd a növény- és állatvilágban a különböző MAPK típusok egymástól függetlenül ebből a MAPK ősből alakultak ki. Az Opisthokonta, és azon belül különösen az emlős jelátvitelre jellemző, hogy a géncsaládok bővülése nyomán eltérő foszforilációs motívumú MAPK típusok alakultak ki, amelyek egymástól funkcionálisan viszonylag elkülönülő jelpályákat alkotnak. Ezzel szemben a növényvilágban a géncsalád evolúciója egy alapvetően eltérő fejlődési utat járt be. Itt a géncsalád nagyobb mértékű expanziója nyomán nem alakultak ki lényegesen eltérő foszforilációs motívumú kináz típusok, és azok szeparált jelpályái, hanem a génduplikációk nyomán egy magas konnektivitású jelátviteli hálózat jött létre, amiben szerepet játszhat a helyhez kötött életmódból következően a környezeti ingerek jelátvitelére és fejlődésszabályozás közötti intenzív kommunikáció szükségessége.

Eredményink alapján fény derült arra, hogy a növények egy, a zöldalgák és a szárazföldi növények szétválása előtti korai közös ősből három ősi növényi MAPK forma jött létre. Ezek sorozatos duplikációi eredményként alakult ki a virágos növények népes és rendkívül komplex MAPK hálózata. A növényi MAPK repertoár szárazföldi életmóddal és az egyre komplexebb testfelépítéssel együtt járó kihívásokkal együtt bővült.

Érdeemes megemlíteni, hogy a CMGC kináz csoporton belül a MAP kinázokhoz filogenetikailag legközelebb a CDK-k (cyclin-dependent kinase) állnak, amelyek szerepe a

sejtciklus szabályozásában jól ismert. Így tehát elképzelhető, hogy a MAPK-CDK közös őse is egy sejtciklus szabályozó kináz volt és ennek duplikációja eredményezte az őse-CDK és őse-ERK megjelenését, majd ezek további duplikációi során jöttek létre az egyre komplexebb szervezetekben az egyre bővülő CDK és MAPK géncsaládok. Amíg a CDK-k alapvetően megtartották a sejtciklus szabályozásában betöltött funkciójukat minden eukarióta típusban, a megjelenő újabb MAP kinázok eltérő evolúciós és neofunkcionalizációs utakat jártak be a törzsfa Opisthokonta és növényi ágain.

A modularitás jelentősége az evolúcióban (Schlosser, 2002) a MAPK jelátvitel evolúciójában is megfigyelhető. A MAPK kaszkád alkotóelemei evolúciós moduloknak tekinthetők: nagymértékben konzerváltak, biokémiaiilag a negatív szelekció hatására évmilliókon keresztül változatlanok, amit alátámaszt a rendszertanilag távoli fajok között megfigyelt komplementációs képesség (pl. Blumer et al., 1994; Teige et al., 2004). Az evolúció során a kinázok, mint modulok összekapcsolásának mikéntje valamint a hozzájuk rendelt felső receptorok és alsó szubsztrát fehérjék (vagyis további modulok) variálhatósága eredményezi, hogy a különböző típusú élőlényekben különböző jelátviteli funkciókat képesek felvenni. Feltehetőleg a szubsztrát fehérje modulok lecserélése (aktivátorok helyett represszorokra) tette lehetővé a *Chlamydomonas*-ban megfigyelt pozitívból negatívba fordult szabályozás kialakulását is, oxidatív stressz esetén.

6.5. Az eredmények biotechnológiai hasznosíthatósága

Saját és más csoportok által közölt eredmények alapján egyértelmű, hogy a MAPK jelpályák központi szerepet játszanak a növényi stressztolerancia kialakításában, pl. túltermelésükkel az ellenállóképesség fokozható. Biotechnológia szakirányú diplomám háttérével fontos kérdésnek tartom a tudományos kutatás gyakorlati alkalmazását. A növénykutatások gyakorlati alkalmazását azonban nagymértékben ellehetetleníti a „GMO” növényekkel szemben a társadalom egy részében kialakult, a tudományos konszenzussal szembenálló, irracionális elutasítás. A helyzetet jól példázza, hogy posztdoktori kutatásaim eredményeként előállítottunk patogénrezisztens transzgenikus vonalakat, amelyeknek normál körülmények között nincsen fenotípusa. Azonban az eredmények gyakorlati átültetése még csak fel sem merült reális lehetőségként, annak ellenére sem, hogy a Vienna Biocenter nemcsak a világ egyik vezető élettudományi intézete, hanem egy kiemelkedő jelentőségű innovációs központ is, az intézményben számos biotechnológiai szabadalom és spin-off cég született, jelenleg 18 biotech cégnek és egy business inkubátornak ad helyet.

Mindezek ellenére, mivel a MAPK jelpályáknak alapvető szerepe van a környezeti alkalmazkodás szabályozásában, a pontos működésük megismerésében rejlő mezőgazdasági potenciál nyilvánvaló. Azonban az eredményekből az is egyértelmű, hogy a növényi MAPK jelátviteli hálózat rendkívül komplex, magas konnektivitású és multifunkcionális. A nagyfokú pleiotrópia fokozott körültekintésre figyelmeztet, hiszen okkal feltételezhető, hogy a MAPK gének módosítása egyszerű transzgenikus megoldásokkal nem megfelelően precíz ahhoz, hogy esetleges nem várt fenotípusok is megjelenjenek.

A MAPK hálózatok belső és külső funkcionális kapcsolatainak alapos megismerése azonban segíthet feltárni azokat a specifikus kapcsolatokat, amelyek célzásával kellően precíz nemesítési célú beavatkozásokat végezhetünk. A kevesebb elemből álló, és egyszerűbb architektúrájú humán MAPK jelátvitel példájából tudható, hogy az ilyen szintű tudástól még messze vagyunk, elég csak a növényi MAPK szubsztrátokra vonatkozó ismeretek lemaradására gondolni. Mindazonáltal a génszerkesztési technológiák fejlődése előidézhet egy paradigmaváltást a funkcionális ismertekre alapuló célzott nemesítés területén. Ezért hosszabb távon elképzelhető a két kutatási terület konvergenciája, ami lehetővé teszi specifikus jelátviteli kapcsolatok tervezett módosítását, például egyes MAPK szubsztrátok dokkolóhelyének módosításával. Így a jelpálya alapvető funkciói érintetlenek maradhatnak, míg specifikus válaszok, pl. a rövidtávú stressz alatti növekedésslassulás, célzottan módosíthatók lehetnek.

Érdekes módon, a koncepciót igazoló eredményt már egy korai random mutagenézis kísérlet is szolgáltatott. Az EIN3 egy etilén szignalizációban kulcsfontosságú fehérje, az *ein3-3* egy diepoxibután mutagenézissel előállított, etilén inszenzitív *Arabidopsis* pontmutáns (c.1688G>T) (Chao et al., 1997), ami az EIN3 MAPK dokkoló motívumát (244–252. aminosav pozíciók) érinti (K245N). Az EIN3 egy igazolt MPK3/6 szubsztrát, az etilén jelátvitel során az etilén aktivált MAPK általi foszforilációja stabilizálja (Yoo et al., 2008). Az EIN3 dokkolóhelyének elrontása tehát a multifunkcionális MPK3/6 kinázok EIN3 közvetítette etilén jelátviteli funkciójának specifikus elvesztéséhez vezetett. Ennek tükrében tehát valóban reálisnak tűnik a MAPK jelátvitel precíziós újrarahuzalozása, a kináz-szubsztrát kölcsönhatások megfelelő feltárását követően azok genom editálási technikákkal történő módosításával.

A szántóföldi növényekkel ellentétben, a zöldség biotechnológiai hasznosítása egy gyorsan fejlődő területté vált (Mata et al., 2010; Scranton et al., 2015). Ebben szerepet játszhat a zárt rendszerű (fermentoros) tenyésztési módszerek lehetősége. Az algákat, többek között, ideálisnak tekintik újgenerációs bioüzemanyagok előállításához. Jelenleg a bioüzemanyag célú algahasznosítást a biomassza előállításának magas költsége hátráltatja. Azonban újszerű

eljárások, mint például szennyvíz használata műtrágyák helyett, vagy a hulladék CO₂ használata az algatenyésztésben kettős haszonnal járhatnak, egyrészt csökkentik a költségeket, másrészt lehetővé teszik a környezetszennyező anyagok bioremediációját. Továbbá, az alga másodlagos anyagcseretermékek gazdag repertoárja kiválóan hasznosítható értékes molekulák forrása lehet, például táplálékkiegészítők, farmakológiai termékek vagy kozmetikumok termelése céljából.

A környezeti adaptáció mechanizmusainak megismerése nyilvánvalóan hozzájárulhat az algák biotechnológiai felhasználásának optimalizálásához. Ráadásul a környezeti körülmények alapvetően befolyásolják az anyagcserefolyamatokat, ezért a környezeti ingereket érzékelő mechanizmusokon keresztül az algák metabolitprofilja is módosítható. Ezzel összhangban, jelenleg még nem publikált eredményeink a MAPK mutáns *Chlamydomonas* vonalakban megváltozott karotinösszetételt mutatnak.

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 támogattott 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, Dőry Magdalénával és Nádai 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.

Új tudományos eredmények

1. Azonosítottunk az Arabidopsis MKK3-MPK7 jelátviteli pályát, 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, ennek nyomán igazoltuk, hogy az MKK3-MPK7 jelátviteli pálya pozitív szabályozó szerepet játszik a patogén válasz indukálásban.
3. Leírtuk 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 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 hidrofil 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.

Közlemények listája

A dolgozathoz felhasznált szakcikkek

Dóczy R.*, Hatzimasoura E., Mohammed B., Bilooei S.F., Ditengou F.A., Lopez-Juez E., Palme K. and Bögre 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.

* Levelező szerző

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.

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

* Levelező szerző

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

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.

A dolgozatban nem részletezett, de ahhoz kapcsolódó szakkikkek

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

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.

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.

A dolgozat témájától független szakkikkek

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.

*Egyenlő hozzájárulás

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.

*Egyenlő hozzájárulás

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., Vályi-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.

*Egyenlő hozzájárulás

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

Irodalomjegyzék

- Adamowski, M. and Friml, J.** (2015). PIN-dependent auxin transport: action, regulation, and evolution. *Plant Cell* **27**: 20–32.
- Aist, J.R.** (1976). Papillae and Related Wound Plugs of Plant Cells. *Annu. Rev. Phytopathol.* **14**: 145–163.
- Aloni, R., Schwalm, K., Langhans, M., and Ullrich, C.I.** (2003). Gradual shifts in sites of free-auxin production during leaf-primordium development and their role in vascular differentiation and leaf morphogenesis in *Arabidopsis*. *Planta* **216**: 841–853.
- Alonso, J.M. et al.** (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**: 653–657.
- Alzwi, I.A. and Morris, P.C.** (2007). A mutation in the *Arabidopsis* MAP kinase kinase 9 gene results in enhanced seedling stress tolerance. *Plant Sci.* **173**: 302–308.
- 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.
- Arabidopsis Genome Initiative (2000)** *Arabidopsis* Genome Initiative Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**: 796–815.
- 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.
- Assmann, S.M. and Shimazaki, K.** (1999). The multisensory guard cell. Stomatal responses to blue light and abscisic acid. *Plant Physiol.* **119**: 809–816.
- Avruch, J.** (2007). MAP kinase pathways: the first twenty years. *Biochim. Biophys. Acta* **1773**: 1150–1160.
- Bailey-Serres, J., Parker, J.E., Ainsworth, E.A., Oldroyd, G.E.D., and Schroeder, J.I.** (2019). Genetic strategies for improving crop yields. *Nature* **575**: 109–118.
- Banno, H., Hirano, K., Nakamura, T., Irie, K., Nomoto, S., Matsumoto, K., and Machida, Y.** (1993). NPK1, a tobacco gene that encodes a protein with a domain homologous to yeast BCK1, STE11, and Byr2 protein kinases. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 4745–4752.
- Barbosa, I.C.R., Zourelidou, M., Willige, B.C., Weller, B., and Schwechheimer, C.** (2014). D6 PROTEIN KINASE activates auxin transport-dependent growth and PIN-FORMED phosphorylation at the plasma membrane. *Dev. Cell* **29**: 674–685.
- Bardóczy, V., Géczi, V., Sawasaki, T., Endo, Y., and Mészáros, T.** (2008). A set of ligation-independent in vitro translation vectors for eukaryotic protein production. *BMC Biotechnol.* **8**: 32.
- Bardwell, A.J., Frankson, E., and Bardwell, L.** (2009). Selectivity of docking sites in MAPK kinases. *J. Biol. Chem.* **284**: 13165–13173.
- Bari, R. and Jones, J.D.G.** (2009). Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol. Biol.* **69**: 473–488.
- Barton, M.K.** (2010). Twenty years on: the inner workings of the shoot apical meristem, a developmental dynamo. *Dev. Biol.* **341**: 95–113.
- Bebber, D.P.** (2015). Range-expanding pests and pathogens in a warming world. *Annu. Rev. Phytopathol.* **53**: 335–356.
- Beemster, G.T.S., Fiorani, F., and Inzé, D.** (2003). Cell cycle: the key to plant growth control? *Trends Plant Sci.* **8**: 154–158.
- 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.
- Benjamins, R. and Scheres, B.** (2008). Auxin: the looping star in plant development. *Annu. Rev. Plant Biol.* **59**: 443–465.

- Benschop, J.J., Mohammed, S., O'Flaherty, M., Heck, A.J.R., Slijper, M., and Menke, F.L.H.** (2007). Quantitative phosphoproteomics of early elicitor signaling in Arabidopsis. *Mol. Cell. Proteomics* **6**: 1198–1214.
- van den Berg, T., Korver, R.A., Testerink, C., and Ten Tusscher, K.H.W.J.** (2016). Modeling halotropism: a key role for root tip architecture and reflux loop remodeling in redistributing auxin. *Development* **143**: 3350–3362.
- Bethke, G., Unthan, T., Uhrig, J.F., Pöschl, Y., Gust, A.A., Scheel, D., and Lee, J.** (2009). Flg22 regulates the release of an ethylene response factor substrate from MAP kinase 6 in Arabidopsis thaliana via ethylene signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**: 8067–8072.
- Betsuyaku, S., Takahashi, F., Kinoshita, A., Miwa, H., Shinozaki, K., Fukuda, H., and Sawa, S.** (2011). Mitogen-activated protein kinase regulated by the CLAVATA receptors contributes to shoot apical meristem homeostasis. *Plant Cell Physiol.* **52**: 14–29.
- 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.
- Bi, G., Zhou, Z., Wang, W., Li, L., Rao, S., Wu, Y., Zhang, X., Menke, F.L.H., Chen, S., and Zhou, J.-M.** (2018). Receptor-Like Cytoplasmic Kinases Directly Link Diverse Pattern Recognition Receptors to the Activation of Mitogen-Activated Protein Kinase Cascades in Arabidopsis. *Plant Cell* **30**: 1543–1561.
- Biemann, K.** (1990). Appendix 5. Nomenclature for peptide fragment ions (positive ions). *Methods Enzymol.* **193**: 886–887.
- Bigeard, J. and Hirt, H.** (2018). Nuclear Signaling of Plant MAPKs. *Front. Plant Sci.* **9**: 469.
- Blilou, I., Xu, J., Wildwater, M., Willemssen, 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.
- Blumer, K.J., Johnson, G.L., and Lange-Carter, C.A.** (1994). Mammalian mitogen-activated protein kinase kinase kinase (MEKK) can function in a yeast mitogen-activated protein kinase pathway downstream of protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**: 4925–4929.
- Boch, J., Scholze, H., Schornack, S., Landgraf, A., Hahn, S., Kay, S., Lahaye, T., Nickstadt, A., and Bonas, U.** (2009). Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science* **326**: 1509–1512.
- Bogoyevitch, M.A. and Kobe, B.** (2006). Uses for JNK: the many and varied substrates of the c-Jun N-terminal kinases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**: 1061–1095.
- Bögre, L., Calderini, O., Binarova, P., Mattauch, M., Till, S., Kiegerl, S., Jonak, C., Pollaschek, C., Barker, P., Huskisson, N.S., Hirt, H., and Heberle-Bors, E.** (1999). A MAP kinase is activated late in plant mitosis and becomes localized to the plane of cell division. *Plant Cell* **11**: 101–113.
- Bögre, L., Ligterink, W., Heberle-Bors, E., and Hirt, H.** (1996). Mechanosensors in plants. *Nature* **383**: 489–490.
- Boller, T. and Felix, G.** (2009). A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu. Rev. Plant Biol.* **60**: 379–406.
- Bowman, J.L., Floyd, S.K., and Sakakibara, K.** (2007). Green genes-comparative genomics of the green branch of life. *Cell* **129**: 229–234.
- 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.
- Bush, S.M. and Krysan, P.J.** (2007). Mutational evidence that the Arabidopsis MAP kinase MPK6 is involved in anther, inflorescence, and embryo development. *J. Exp. Bot.* **58**: 2181–2191.
- Cardinale, F., Meskiene, I., Ouaked, F., and Hirt, H.** (2002). Convergence and divergence of stress-induced mitogen-activated protein kinase signaling pathways at the level of two distinct mitogen-activated protein kinase kinases. *Plant Cell* **14**: 703–711.

- 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.
- Champion, A., Picaud, A., and Henry, Y.** (2004). Reassessing the MAP3K and MAP4K relationships. *Trends Plant Sci.* **9**: 123–129.
- Chao, Q., Rothenberg, M., Solano, R., Roman, G., Terzaghi, W., and Ecker, J.R.** (1997). Activation of the ethylene gas response pathway in Arabidopsis by the nuclear protein ETHYLENE-INSENSITIVE3 and related proteins. *Cell* **89**: 1133–1144.
- Chardin, C., Schenk, S.T., Hirt, H., Colcombet, J., and Krapp, A.** (2017). Review: Mitogen-Activated Protein Kinases in nutritional signaling in Arabidopsis. *Plant Sci.* **260**: 101–108.
- 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.
- Cheong, Y.H. et al.** (2003). BWMK1, a rice mitogen-activated protein kinase, locates in the nucleus and mediates pathogenesis-related gene expression by activation of a transcription factor. *Plant Physiol.* **132**: 1961–1972.
- Chinchilla, D., Bauer, Z., Regenass, M., Boller, T., and Felix, G.** (2006). The Arabidopsis receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception. *Plant Cell* **18**: 465–476.
- 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.
- Cho, S.K., Larue, C.T., Chevalier, D., Wang, H., Jinn, T.-L., Zhang, S., and Walker, J.C.** (2008). Regulation of floral organ abscission in Arabidopsis thaliana. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**: 15629–15634.
- Christensen, S.K., Dagenais, N., Chory, J., and Weigel, D.** (2000). Regulation of auxin response by the protein kinase PINOID. *Cell* **100**: 469–478.
- Clark, S.E.** (2001). Meristems: start your signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**: 28–32.
- Clough, S.J.** (2005). Floral dip: agrobacterium-mediated germ line transformation. *Methods Mol. Biol.* **286**: 91–102.
- Colcombet, J. and Hirt, H.** (2008). Arabidopsis MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes. *Biochem. J.* **413**: 217–226.
- Colcombet, J., Sözen, C., and Hirt, H.** (2016). Convergence of Multiple MAP3Ks on MKK3 Identifies a Set of Novel Stress MAPK Modules. *Front. Plant Sci.* **7**: 1941.
- Coley, P.D., Bryant, J.P., and Chapin, F.S. 3rd** (1985). Resource availability and plant antiherbivore defense. *Science* **230**: 895–899.
- Crooks, G.E., Hon, G., Chandonia, J.-M., and Brenner, S.E.** (2004). WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res.* **14**: 1188–1190.
- Cui, F., Sun, W., and Kong, X.** (2018). RLCKs Bridge Plant Immune Receptors and MAPK Cascades. *Trends Plant Sci.* **23**: 1039–1041.
- D’Ovidio, R., Mattei, B., Roberti, S., and Bellincampi, D.** (2004). Polygalacturonases, polygalacturonase-inhibiting proteins and pectic oligomers in plant-pathogen interactions. *Biochim. Biophys. Acta* **1696**: 237–244.
- Dai, Y., Wang, H., Li, B., Huang, J., Liu, X., Zhou, Y., Mou, Z., and Li, J.** (2006). Increased expression of MAP KINASE KINASE7 causes deficiency in polar auxin transport and leads to plant architectural abnormality in Arabidopsis. *Plant Cell* **18**: 308–320.
- Dangl, J.L. and Jones, J.D.** (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**: 826–833.
- Danquah, A. et al.** (2015). Identification and characterization of an ABA-activated MAP kinase cascade in Arabidopsis thaliana. *Plant J.* **82**: 232–244.
- Davey, M.R., Anthony, P., Power, J.B., and Lowe, K.C.** (2005). Plant protoplasts: status and biotechnological perspectives. *Biotechnol. Adv.* **23**: 131–171.
- Dean, P.** (2011). Functional domains and motifs of bacterial type III effector proteins and their roles in infection. *FEMS Microbiol. Rev.* **35**: 1100–1125.

- Dempsey, D.A. and Klessig, D.F.** (2012). SOS - too many signals for systemic acquired resistance? *Trends Plant Sci.* **17**: 538–545.
- Denecke, J., Aniento, F., Frigerio, L., Hawes, C., Hwang, I., Mathur, J., Neuhaus, J.-M., and Robinson, D.G.** (2012). Secretory pathway research: the more experimental systems the better. *Plant Cell* **24**: 1316–1326.
- Dinkel, H. et al.** (2014). The eukaryotic linear motif resource ELM: 10 years and counting. *Nucleic Acids Res.* **42**: D259–66.
- Dinnyeny, J.R., Long, T.A., Wang, J.Y., Jung, J.W., Mace, D., Pointer, S., Barron, C., Brady, S.M., Schiefelbein, J., and Benfey, P.N.** (2008). Cell identity mediates the response of Arabidopsis roots to abiotic stress. *Science* **320**: 942–945.
- Ditengou, F.A. et al.** (2018). Characterization of auxin transporter PIN6 plasma membrane targeting reveals a function for PIN6 in plant bolting. *New Phytol.* **217**: 1610–1624.
- 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.
- Dóczy, R. and Bögre, L.** (2018). The Quest for MAP Kinase Substrates: Gaining Momentum. *Trends Plant Sci.* **23**: 918–932.
- Dóczy, R., Brader, G., Pettkó-Szandtner, A., Rajh, I., Djamei, A., Pitzschke, A., Teige, M., and 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. *Plant Cell* **19**: 3266–3279.
- Dóczy, R., Hatzimasoura, E., and Bögre, L.** (2011). Mitogen-activated protein kinase activity and reporter gene assays in plants. *Methods Mol. Biol.* **779**: 79–92.
- Dóczy, R., Hatzimasoura, E., Farahi Bilooei, S., Ahmad, Z., Ditengou, F.A., López-Juez, E., Palme, K., and Bögre, L.** (2019). The MKK7-MPK6 map kinase module is a regulator of meristem quiescence or active growth in arabidopsis. *Front. Plant Sci.* **10**: 1–11.
- Dóczy, R., Okrészl, L., Romero, A.E., Paccanaro, A., and Bögre, L.** (2012). Exploring the evolutionary path of plant MAPK networks. *Trends Plant Sci.* **17**: 518–525.
- Dodsworth, S.** (2009). A diverse and intricate signalling network regulates stem cell fate in the shoot apical meristem. *Dev. Biol.* **336**: 1–9.
- Dolferus, R.** (2014). To grow or not to grow: a stressful decision for plants. *Plant Sci.* **229**: 247–261.
- Dory, M. et al.** (2018). Coevolving MAPK and PID phosphosites indicate an ancient environmental control of PIN auxin transporters in land plants. *FEBS Lett.* **592**: 89–102.
- 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.
- Duerr, B., Gawienowski, M., Ropp, T., and Jacobs, T.** (1993). MsERK1: a mitogen-activated protein kinase from a flowering plant. *Plant Cell* **5**: 87–96.
- Duplan, V. and Rivas, S.** (2014). E3 ubiquitin-ligases and their target proteins during the regulation of plant innate immunity. *Front. Plant Sci.* **5**: 42.
- Elad, Y. and Pertot, I.** (2014). Climate Change Impacts on Plant Pathogens and Plant Diseases. *J. Crop Improv.* **28**: 99–139.
- FAO** (2009). How to Feed the World in 2050. www.fao.org/3/a-ak542e/ak542e13.pdf
- FAO** (2017). The impact of disasters and crises on agriculture and food security. <http://www.fao.org/3/I8656EN/i8656en.pdf>
- Feilner, T. et al.** (2005). High throughput identification of potential Arabidopsis mitogen-activated protein kinases substrates. *Mol. Cell. Proteomics* **4**: 1558–1568.
- 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.
- Furlan, G., Nakagami, H., Eschen-Lippold, L., Jiang, X., Majovsky, P., Kowarschik, K., Hoehenwarter, W., Lee, J., and Trujillo, M.** (2017). Changes in PUB22 Ubiquitination Modes Triggered by MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE3 Dampen the Immune Response. *Plant Cell* **29**: 726–745.
- Furutani, M., Kajiwara, T., Kato, T., Treml, B.S., Stockum, C., Torres-Ruiz, R.A., and Tasaka, M.** (2007). The gene MACCHI-BOU 4/ENHANCER OF PINOID encodes a NPH3-like protein and reveals similarities between organogenesis and phototropism at the molecular level. *Development* **134**: 3849–3859.
- Galvan-Ampudia, C.S., Julkowska, M.M., Darwish, E., Gandullo, J., Korver, R.A., Brunoud, G., Haring, M.A., Munnik, T., Vernoux, T., and Testerink, C.** (2013). Halotropism is a response of plant roots to avoid a saline environment. *Curr. Biol.* **23**: 2044–2050.
- Gao, Q.-M., Zhu, S., Kachroo, P., and Kachroo, A.** (2015). Signal regulators of systemic acquired resistance. *Front. Plant Sci.* **6**: 228.
- Garcia-Brugger, A., Lamotte, O., Vandelle, E., Bourque, S., Lecourieux, D., Poinssot, B., Wendehenne, D., and Pugin, A.** (2006). Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **19**: 711–724.
- 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.
- Gong, B.-Q., Wang, F.-Z., and Li, J.-F.** (2020). Hide-and-Seek: Chitin-Triggered Plant Immunity and Fungal Counterstrategies. *Trends Plant Sci.* **25**: 805–816.
- Gong, W. et al.** (2004). Genome-wide ORFeome cloning and analysis of *Arabidopsis* transcription factor genes. *Plant Physiol.* **135**: 773–782.
- Gopal, M., Gupta, A., and Thomas, G. V.** (2013). Bespoke microbiome therapy to manage plant diseases. *Front. Microbiol.* **4**: 355.
- Gordon, E.A., Whisenant, T.C., Zeller, M., Kaake, R.M., Gordon, W.M., Krotee, P., Patel, V., Huang, L., Baldi, P., and Bardwell, L.** (2013). Combining docking site and phosphosite predictions to find new substrates: identification of smoothelin-like-2 (SMTNL2) as a c-Jun N-terminal kinase (JNK) substrate. *Cell. Signal.* **25**: 2518–2529.
- 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.
- Guan, Y., Meng, X., Khanna, R., LaMontagne, E., Liu, Y., and Zhang, S.** (2014). Phosphorylation of a WRKY transcription factor by MAPKs is required for pollen development and function in *Arabidopsis*. *PLoS Genet.* **10**: e1004384.
- Gudesblat, G.E., Torres, P.S., and Vojnov, A.A.** (2009). Stomata and pathogens: Warfare at the gates. *Plant Signal. Behav.* **4**: 1114–1116.
- Hadwiger, J.A. and Nguyen, H.-N.** (2011). MAPKs in development: insights from *Dictyostelium* signaling pathways. *Biomol. Concepts* **2**: 39–46.
- 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.
- Han, E.H., Petrella, D.P., and Blakeslee, J.J.** (2017). “Bending” models of halotropism: incorporating protein phosphatase 2A, ABCB transporters, and auxin metabolism. *J. Exp. Bot.* **68**: 3071–3089.

- Han, G.-Z.** (2019). Origin and evolution of the plant immune system. *New Phytol.* **222**: 70–83.
- Han, H., Adamowski, M., Qi, L., Alotaibi, S.S., and Friml, J.** (2021). PIN-mediated polar auxin transport regulations in plant tropic responses. *New Phytol.* **232**: 510–522.
- Hatzimasoura, E.** (2007). A Reverse Genetics Approach Targeting The Arabidopsis MAP Kinase Kinases Reveals The Involvement of MAPKK7 and MAPKK9 in Meristem Development. PhD Thesis, Royal Holloway, University of London
- Hayashi, K., Hasegawa, J., and Matsunaga, S.** (2013). The boundary of the meristematic and elongation zones in roots: endoreduplication precedes rapid cell expansion. *Sci. Rep.* **3**: 2723.
- 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.
- Hoehenwarter, W., Thomas, M., Nukarinen, E., Egelhofer, V., Röhrig, H., Weckwerth, W., Conrath, U., and Beckers, G.J.M.** (2013). Identification of novel in vivo MAP kinase substrates in Arabidopsis thaliana through use of tandem metal oxide affinity chromatography. *Mol. Cell. Proteomics* **12**: 369–380.
- 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.
- Huck, N. V., Leissing, F., Majovsky, P., Buntru, M., Aretz, C., Flecken, M., Müller, J.P.J., Vogel, S., Schillberg, S., Hoehenwarter, W., Conrath, U., and Beckers, G.J.M.** (2017). Combined (15)N-Labeling and TandemMOAC Quantifies Phosphorylation of MAP Kinase Substrates Downstream of MKK7 in Arabidopsis. *Front. Plant Sci.* **8**: 2050.
- Hunter, T.** (2012). Why nature chose phosphate to modify proteins. *Philos. Trans. R. Soc. London. Ser. B, Biol. Sci.* **367**: 2513–2516.
- Hutner, S.H., Provasoli, L., Schatz, A., and Haskins, C.P.** (1950). Some Approaches to the Study of the Role of Metals in the Metabolism of Microorganisms. *Proc. Am. Philos. Soc.* **94**: 152–170.
- Ichimura, K., Mizoguchi, T., Yoshida, R., Yuasa, T., and Shinozaki, K.** (2000). Various abiotic stresses rapidly activate Arabidopsis MAP kinases ATMPK4 and ATMPK6. *Plant J.* **24**: 655–665.
- Iglesias, M.J., Sellaro, R., Zurbriggen, M.D., and Casal, J.J.** (2018). Multiple links between shade avoidance and auxin networks. *J. Exp. Bot.* **69**: 213–228.
- Jagodzik, 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.
- Janczur, M.K.** (2009). Optimal energy allocation to growth, reproduction, and production of defensive substances in plants: a model. *Evol. Ecol. Res.:* 447–470.
- Jansen, M.A.K.** (2002). Ultraviolet-B radiation effects on plants: induction of morphogenic responses. *Physiol. Plant.* **116**: 423–429.
- Jefferson, R.A.** (1987). Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Report.* **5**: 387–405.
- Jeffree, C.E.** (2006). The Fine Structure of the Plant Cuticle. *Annu. Plant Rev. Vol. 23 Biol. Plant Cuticle:* 11–125.
- Jia, W. et al.** (2016). Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade MKK7-MPK6 Plays Important Roles in Plant Development and Regulates Shoot Branching by Phosphorylating PIN1 in Arabidopsis. *PLoS Biol.* **14**: e1002550.
- Jiang, X., Hoehenwarter, W., Scheel, D., and Lee, J.** (2020). Phosphorylation of the CAMTA3 Transcription Factor Triggers Its Destabilization and Nuclear Export. *Plant Physiol.* **184**: 1056–1071.
- Jonak, C., Kiegerl, S., Ligterink, W., Barker, P.J., Huskisson, N.S., and Hirt, H.** (1996). Stress signaling in plants: a mitogen-activated protein kinase pathway is activated by cold and drought. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**: 11274–11279.
- Jonak, C., Okrész, L., Bögre, L., and Hirt, H.** (2002). Complexity, cross talk and integration of plant MAP kinase signalling. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**: 415–424.
- Jonak, C., Páy, A., Bögre, L., Hirt, H., and Heberle-Bors, E.** (1993). The plant homologue of MAP

- kinase is expressed in a cell cycle-dependent and organ-specific manner. *Plant J.* **3**: 611–617.
- Jones, J.D.G. and Dangl, J.L.** (2006). The plant immune system. *Nature* **444**: 323–329.
- Joo, J.H., Wang, S., Chen, J.G., Jones, A.M., and Fedoroff, N. V** (2005). Different signaling and cell death roles of heterotrimeric G protein alpha and beta subunits in the Arabidopsis oxidative stress response to ozone. *Plant Cell* **17**: 957–970.
- 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.
- Kachroo, A. and Kachroo, P.** (2020). Mobile signals in systemic acquired resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.* **58**: 41–47.
- Kachroo, A. and Robin, G.P.** (2013). Systemic signaling during plant defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* **16**: 527–533.
- Kalapos, B., Hlavová, M., Náday, T. V, Galiba, G., Bišová, K., and Dóczy, R.** (2019). Early Evolution of the Mitogen-Activated Protein Kinase Family in the Plant Kingdom. *Sci. Rep.* **9**: 4094.
- Kazan, K. and Manners, J.M.** (2013). MYC2: the master in action. *Mol. Plant* **6**: 686–703.
- Kerrien, S. et al.** (2012). The IntAct molecular interaction database in 2012. *Nucleic Acids Res.* **40**: D841-6.
- Kieber, J.J., Rothenberg, M., Roman, G., Feldmann, K.A., and Ecker, J.R.** (1993). CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in Arabidopsis, encodes a member of the raf family of protein kinases. *Cell* **72**: 427–441.
- Kiegerl, S., Cardinale, F., Siligan, C., Gross, A., Baudouin, E., Liwosz, A., Eklöf, S., Till, S., Bögre, L., Hirt, H., and Meskiene, I.** (2000). SIMKK, a mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase, is a specific activator of the salt stress-induced MAPK, SIMK. *Plant Cell* **12**: 2247–2258.
- Kim, E.K. and Choi, E.-J.** (2010). Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim. Biophys. Acta* **1802**: 396–405.
- Kinoshita, E., Kinoshita-Kikuta, E., Takiyama, K., and Koike, T.** (2006). Phosphate-binding tag, a new tool to visualize phosphorylated proteins. *Mol. Cell. Proteomics* **5**: 749–757.
- Kitano, H.** (2004). Biological robustness. *Nat. Rev. Genet.* **5**: 826–837.
- Koevoets, I.T., Venema, J.H., Elzenga, J.T.M., and Testerink, C.** (2016). Roots Withstanding their Environment: Exploiting Root System Architecture Responses to Abiotic Stress to Improve Crop Tolerance. *Front. Plant Sci.* **7**: 1335.
- Komis, G., Šamajová, O., Ovečka, M., and Šamaj, J.** (2018). Cell and Developmental Biology of Plant Mitogen-Activated Protein Kinases. *Annu. Rev. Plant Biol.* **69**: 237–265.
- Koncz, C.** (2009). George P. Rédei (1921–2008). *Cereal Res. Commun.* **37**: 143–147.
- Koncz, C. and Schell, J.** (1986). The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of Agrobacterium binary vector. *Mol. Gen. Genet.* **MGG 204**: 383–396.
- van Kooten, O. and Snel, J.F.** (1990). The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosynth. Res.* **25**: 147–150.
- Korner, C., Pelaez, M.-R.S., and John, P.C.L.** (1989). Why Are Bonsai Plants Small? A Consideration of Cell Size. *Funct. Plant Biol.* **16**: 443–448.
- Korver, R.A., Koevoets, I.T., and Testerink, C.** (2018). Out of Shape During Stress: A Key Role for Auxin. *Trends Plant Sci.* **23**: 783–793.
- Kosetsu, K., Matsunaga, S., Nakagami, H., Colcombet, J., Sasabe, M., Soyano, T., Takahashi, Y., Hirt, H., and Machida, Y.** (2010). The MAP kinase MPK4 is required for cytokinesis in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* **22**: 3778–3790.
- Kotogány, E., Dudits, D., Horváth, G. V, and Ayaydin, F.** (2010). A rapid and robust assay for detection of S-phase cell cycle progression in plant cells and tissues by using ethynyl deoxyuridine. *Plant Methods* **6**: 5.
- Krecek, P., Skupa, P., Libus, J., Naramoto, S., Tejos, R., Friml, J., and Zazimalová, E.** (2009). The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters. *Genome Biol.* **10**: 249.
- Kreynes, A.E., Yong, Z., and Ellis, B.E.** (2021). Developmental phenotypes of Arabidopsis plants

- expressing phosphovariants of AtMYB75. *Plant Signal. Behav.* **16**: 1836454.
- Krol, E., Mentzel, T., Chinchilla, D., Boller, T., Felix, G., Kemmerling, B., Postel, S., Arens, M., Jeworutzki, E., Al-Rasheid, K.A.S., Becker, D., and Hedrich, R.** (2010). Perception of the Arabidopsis danger signal peptide 1 involves the pattern recognition receptor AtPEPR1 and its close homologue AtPEPR2. *J. Biol. Chem.* **285**: 13471–13479.
- Krysan, P.J. and Colcombet, J.** (2018). Cellular Complexity in MAPK Signaling in Plants: Questions and Emerging Tools to Answer Them. *Front. Plant Sci.* **9**: 1674.
- de la Torre-Ruiz, M.A., Mozo-Villariás, 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., Lukowitz, W., Ellis, B.E., and Bergmann, D.C.** (2009). Novel and expanded roles for MAPK signaling in Arabidopsis stomatal cell fate revealed by cell type-specific manipulations. *Plant Cell* **21**: 3506–3517.
- 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.
- Lander, E.S. et al.** (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**: 860–921.
- Lassowskat, I., Böttcher, C., Eschen-Lippold, L., Scheel, D., and Lee, J.** (2014). Sustained mitogen-activated protein kinase activation reprograms defense metabolism and phosphoprotein profile in Arabidopsis thaliana. *Front. Plant Sci.* **5**: 554.
- 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.
- Lecourieux, D., Ranjeva, R., and Pugin, A.** (2006). Calcium in plant defence-signalling pathways. *New Phytol.* **171**: 249–269.
- Lee, H., Jun, Y.S., Cha, O.-K., and Sheen, J.** (2019). Mitogen-activated protein kinases MPK3 and MPK6 are required for stem cell maintenance in the Arabidopsis shoot apical meristem. *Plant Cell Rep.* **38**: 311–319.
- Leissing, F., Nomoto, M., Bocola, M., Schwaneberg, U., Tada, Y., Conrath, U., and Beckers, G.J.M.** (2016). Substrate thiophosphorylation by Arabidopsis mitogen-activated protein kinases. *BMC Plant Biol.* **16**: 48.
- Li, B., Jiang, S., Yu, X., Cheng, C., Chen, S., Cheng, Y., Yuan, J.S., Jiang, D., He, P., and Shan, L.** (2015). Phosphorylation of trihelix transcriptional repressor ASR3 by MAP KINASE4 negatively regulates Arabidopsis immunity. *Plant Cell* **27**: 839–856.
- Li, G., Meng, X., Wang, R., Mao, G., Han, L., Liu, Y., and Zhang, S.** (2012). Dual-level regulation of ACC synthase activity by MPK3/MPK6 cascade and its downstream WRKY transcription factor during ethylene induction in Arabidopsis. *PLoS Genet.* **8**: e1002767.
- 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.
- Li, M., Liu, J., and Zhang, C.** (2011). Evolutionary history of the vertebrate mitogen activated protein kinases family. *PLoS One* **6**: e26999.
- Li, X., Zhang, R., Patena, W., Gang, S.S., Blum, S.R., Ivanova, N., Yue, R., Robertson, J.M., Lefebvre, P.A., Fitz-Gibbon, S.T., Grossman, A.R., and Jonikas, M.C.** (2016). An Indexed, Mapped Mutant Library Enables Reverse Genetics Studies of Biological Processes in Chlamydomonas reinhardtii. *Plant Cell* **28**: 367–387.
- Ligterink, W., Kroj, T., zur Nieden, U., Hirt, H., and Scheel, D.** (1997). Receptor-mediated activation of a MAP kinase in pathogen defense of plants. *Science* **276**: 2054–2057.
- Limmongkon, A., Giuliani, C., Valenta, R., Mittermann, I., Heberle-Bors, E., and Wilson, C.** (2004). MAP kinase phosphorylation of plant profilin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **324**: 382–386.
- Lin, L., Wu, J., Jiang, M., and Wang, Y.** (2021). Plant Mitogen-Activated Protein Kinase Cascades in

Environmental Stresses. *Int. J. Mol. Sci.* **22**.

- Lindeman, R.L.** (1991). The trophic-dynamic aspect of ecology. *Bull. Math. Biol.* **53**: 167–191.
- 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.
- Liu, Z., Li, Y., Cao, H., and Ren, D.** (2015). Comparative phospho-proteomics analysis of salt-responsive phosphoproteins regulated by the MKK9-MPK6 cascade in *Arabidopsis*. *Plant Sci.* **241**: 138–150.
- 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.
- Lundberg, D.S. et al.** (2012). Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. *Nature* **488**: 86–90.
- Macnab, R.M.** (2004). Type III flagellar protein export and flagellar assembly. *Biochim. Biophys. Acta* **1694**: 207–217.
- Manning, B.D. and Cantley, L.C.** (2002). Hitting the target: emerging technologies in the search for kinase substrates. *Sci. STKE* **2002**: pe49.
- Manning, G., Whyte, D.B., Martinez, R., Hunter, T., and Sudarsanam, S.** (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science* **298**: 1912–1934.
- 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.
- MAP Kinase Group** (2002) Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends Plant Sci.* **7**: 301–308.
- Mata, T.M., Martins, A.A., and Caetano, N.S.** (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **14**: 217–232.
- Mathur, J. and Koncz, C.** (1998a). Establishment and maintenance of cell suspension cultures. *Methods Mol. Biol.* **82**: 27–30.
- Mathur, J. and Koncz, C.** (1998b). PEG-mediated protoplast transformation with naked DNA. *Methods Mol. Biol.* **82**: 267–276.
- Matsuoka, D., Nanmori, T., Sato, K., Fukami, Y., Kikkawa, U., and Yasuda, T.** (2002). Activation of AtMEK1, an *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase kinase, *in vitro* and *in vivo*: analysis of active mutants expressed in *E. coli* and generation of the active form in stress response in seedlings. *Plant J.* **29**: 637–647.
- Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K., and He, S.Y.** (2006). Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* **126**: 969–980.
- Meng, X., Wang, H., He, Y., Liu, Y., Walker, J.C., Torii, K.U., and Zhang, S.** (2012). A MAPK cascade downstream of ERECTA receptor-like protein kinase regulates *Arabidopsis* inflorescence architecture by promoting localized cell proliferation. *Plant Cell* **24**: 4948–4960.
- Meng, X., Xu, J., He, Y., Yang, K.-Y., Mordorski, B., Liu, Y., and Zhang, S.** (2013). Phosphorylation of an ERF transcription factor by *Arabidopsis* MPK3/MPK6 regulates plant defense gene induction and fungal resistance. *Plant Cell* **25**: 1126–1142.
- Meng, X. and Zhang, S.** (2013). MAPK cascades in plant disease resistance signaling. *Annu. Rev. Phytopathol.* **51**: 245–266.
- Menges, M., Dóczy, R., Ökrész, L., Morandini, P., Mizzi, L., Soloviev, M., Murray, J.A.H., and Bögre, L.** (2008). Comprehensive gene expression atlas for the *Arabidopsis* MAP kinase signalling

- pathways. *New Phytol.* **179**: 643–662.
- Mészáros, T., Helfer, A., Hatzimasoura, E., Magyar, Z., Serazetdinova, L., Rios, G., Bardóczy, V., Teige, M., Koncz, C., Peck, S., and Bögre, L.** (2006). The Arabidopsis MAP kinase kinase MKK1 participates in defence responses to the bacterial elicitor flagellin. *Plant J.* **48**: 485–498.
- Michniewicz, M. et al.** (2007). Antagonistic regulation of PIN phosphorylation by PP2A and PINOID directs auxin flux. *Cell* **130**: 1044–1056.
- Miller, G., Schlauch, K., Tam, R., Cortes, D., Torres, M.A., Shulaev, V., Dangl, J.L., and Mittler, R.** (2009). The plant NADPH oxidase RBOHD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli. *Sci. Signal.* **2**: ra45.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G., Tognetti, V.B., Vandepoele, K., Gollery, M., Shulaev, V., and Van Breusegem, F.** (2011). ROS signaling: the new wave? *Trends Plant Sci.* **16**: 300–309.
- Miya, A., Albert, P., Shinya, T., Desaki, Y., Ichimura, K., Shirasu, K., Narusaka, Y., Kawakami, N., Kaku, H., and Shibuya, N.** (2007). CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**: 19613–19618.
- 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.
- Müller, J., Beck, M., Mettbach, U., Komis, G., Hause, G., Menzel, D., and Samaj, J.** (2010). Arabidopsis MPK6 is involved in cell division plane control during early root development, and localizes to the pre-prophase band, phragmoplast, trans-Golgi network and plasma membrane. *Plant J.* **61**: 234–248.
- Nagy, S.K. and Mészáros, T.** (2014). In vitro translation-based protein kinase substrate identification. *Methods Mol. Biol.* **1118**: 231–243.
- Nakajima, Y., Nara, Y., Kobayashi, A., Sugita, T., Miyazawa, Y., Fujii, N., and Takahashi, H.** (2017). Auxin transport and response requirements for root hydrotropism differ between plant species. *J. Exp. Bot.* **68**: 3441–3456.
- 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.
- Nürnberg, T., Brunner, F., Kemmerling, B., and Piater, L.** (2004). Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol. Rev.* **198**: 249–266.
- 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.
- Palm-Forster, M.A.T., Eschen-Lippold, L., Uhrig, J., Scheel, D., and Lee, J.** (2017). A novel family of proline/serine-rich proteins, which are phospho-targets of stress-related mitogen-activated protein kinases, differentially regulates growth and pathogen defense in Arabidopsis thaliana. *Plant Mol. Biol.* **95**: 123–140.
- Pan, C., Olsen, J. V., Daub, H., and Mann, M.** (2009). Global effects of kinase inhibitors on signaling networks revealed by quantitative phosphoproteomics. *Mol. Cell. Proteomics* **8**: 2796–2808.
- Park, H.C., Park, B.O., Kim, H.S., Kim, S.H., Lee, S.W., and Chung, W.S.** (2021). AtMPK6-induced phosphorylation of AtERF72 enhances its DNA binding activity and interaction with TGA4/OBF4 in Arabidopsis. *Plant Biol. (Stuttg.)* **23**: 11–20.
- Pasternak, T., Rudas, V., Potters, G., and Jansen, M.A.K.** (2005). Morphogenic effects of abiotic stress: reorientation of growth in Arabidopsis thaliana seedlings. *Environ. Exp. Bot.* **53**: 299–314.
- Patharkar, O.R. and Walker, J.C.** (2015). Floral organ abscission is regulated by a positive feedback loop. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**: 2906–2911.
- Pecher, P., Eschen-Lippold, L., Herklotz, S., Kuhle, K., Naumann, K., Bethke, G., Uhrig, J., Weyhe, M., Scheel, D., and Lee, J.** (2014). The Arabidopsis thaliana mitogen-activated protein kinases MPK3 and MPK6 target a subclass of ‘VQ-motif’-containing proteins to regulate immune responses.

- New Phytol. **203**: 592–606.
- Peck, S.C.** (2006). Analysis of protein phosphorylation: methods and strategies for studying kinases and substrates. *Plant J.* **45**: 512–522.
- Pennisi, 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**.
- Pillitteri, L.J. and Dong, J.** (2013). Stomatal development in Arabidopsis. *Arab. B.* **11**: e0162.
- 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.
- Popescu, S.C., Popescu, G. V., Bachan, S., Zhang, Z., Gerstein, M., Snyder, M., and Dinesh-Kumar, S.P.** (2009). MAPK target networks in Arabidopsis thaliana revealed using functional protein microarrays. *Genes Dev.* **23**: 80–92.
- Potters, G., Pasternak, T.P., Guisez, Y., Palme, K.J., and Jansen, M.A.K.** (2007). Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble? *Trends Plant Sci.* **12**: 98–105.
- Provart, N.J. et al.** (2016). 50 years of Arabidopsis research: highlights and future directions. *New Phytol.* **209**: 921–944.
- Pulverer, B.J., Kyriakis, J.M., Avruch, J., Nikolakaki, E., and Woodgett, J.R.** (1991). Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. *Nature* **353**: 670–674.
- Qi, D., Dubiella, U., Kim, S.H., Sloss, D.I., Downen, R.H., Dixon, J.E., and Innes, R.W.** (2014). Recognition of the protein kinase AVRPPHB SUSCEPTIBLE1 by the disease resistance protein RESISTANCE TO PSEUDOMONAS SYRINGAE5 is dependent on s-acylation and an exposed loop in AVRPPHB SUSCEPTIBLE1. *Plant Physiol.* **164**: 340–351.
- Quimby, B.B., Wilson, C.A., and Corbett, A.H.** (2000). The interaction between Ran and NTF2 is required for cell cycle progression. *Mol. Biol. Cell* **11**: 2617–2629.
- Ray, L.B. and Sturgill, T.W.** (1988). Insulin-stimulated microtubule associated protein kinase is detectable by analytical gel chromatography as a 35-kDa protein in myocytes, adipocytes, and hepatocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* **262**: 307–313.
- Rayapuram, N., Bigeard, J., Alhoraibi, H., Bonhomme, L., Hesse, A.-M., Vinh, J., Hirt, H., and Pflieger, D.** (2018). Quantitative Phosphoproteomic Analysis Reveals Shared and Specific Targets of Arabidopsis Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPKs) MPK3, MPK4, and MPK6. *Mol. Cell. Proteomics* **17**: 61–80.
- Robert, H.S. and Offringa, R.** (2008). Regulation of auxin transport polarity by AGC kinases. *Curr. Opin. Plant Biol.* **11**: 495–502.
- Rodrigues, O. and Shan, L.** (2021). Stomata in a state of emergency: H₂O₂ is the target locked. *Trends Plant Sci.*
- Roitinger, E., Hofer, M., Köcher, T., Pichler, P., Novatchkova, M., Yang, J., Schlögelhofer, P., and Mechtler, K.** (2015). Quantitative phosphoproteomics of the ataxia telangiectasia-mutated (ATM) and ataxia telangiectasia-mutated and rad3-related (ATR) dependent DNA damage response in Arabidopsis thaliana. *Mol. Cell. Proteomics* **14**: 556–571.
- Rossomando, A.J., Payne, D.M., Weber, M.J., and Sturgill, T.W.** (1989). Evidence that pp42, a major tyrosine kinase target protein, is a mitogen-activated serine/threonine protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**: 6940–6943.
- Roux, M., Schwessinger, B., Albrecht, C., Chinchilla, D., Jones, A., Holton, N., Malinovsky, F.G., Tör, M., de Vries, S., and Zipfel, C.** (2011). The Arabidopsis leucine-rich repeat receptor-like kinases BAK1/SERK3 and BKK1/SERK4 are required for innate immunity to hemibiotrophic and biotrophic pathogens. *Plant Cell* **23**: 2440–2455.

- Sasabe, M. and Machida, Y.** (2012). Regulation of organization and function of microtubules by the mitogen-activated protein kinase cascade during plant cytokinesis. *Cytoskeleton* (Hoboken). **69**: 913–918.
- Sassi, M. et al.** (2012). COP1 mediates the coordination of root and shoot growth by light through modulation of PIN1- and PIN2-dependent auxin transport in Arabidopsis. *Development* **139**: 3402–3412.
- Schlosser, G.** (2002). Modularity and the units of evolution. *Theory Biosci.* **121**: 1–80.
- Scranton, M.A., Ostrand, J.T., Fields, F.J., and Mayfield, S.P.** (2015). Chlamydomonas as a model for biofuels and bio-products production. *Plant J.* **82**: 523–531.
- Seo, S., Okamoto, M., Seto, H., Ishizuka, K., Sano, H., and Ohashi, Y.** (1995). Tobacco MAP kinase: a possible mediator in wound signal transduction pathways. *Science* **270**: 1988–1992.
- 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.
- Shah, J. and Zeier, J.** (2013). Long-distance communication and signal amplification in systemic acquired resistance. *Front. Plant Sci.* **4**: 30.
- Shao, Y., Yu, X., Xu, X., Li, Y., Yuan, W., Xu, Y., Mao, C., Zhang, S., and Xu, J.** (2020). The YDA-MKK4/MKK5-MPK3/MPK6 Cascade Functions Downstream of the RGF1-RGI Ligand-Receptor Pair in Regulating Mitotic Activity in Root Apical Meristem. *Mol. Plant* **13**: 1608–1623.
- Shibata, W., Banno, H., Ito, Y., Hirano, K., Irie, K., Usami, S., Machida, C., and Machida, Y.** (1995). A tobacco protein kinase, NPK2, has a domain homologous to a domain found in activators of mitogen-activated protein kinases (MAPKKs). *Mol. Gen. Genet.* **246**: 401–410.
- 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.
- Song, J., Shang, L., Wang, X., Xing, Y., Xu, W., Zhang, Y., Wang, T., Li, H., Zhang, J., and Ye, Z.** (2021). MAPK11 regulates seed germination and ABA signaling in tomato by phosphorylating SnRKs. *J. Exp. Bot.* **72**: 1677–1690.
- Sopeña-Torres, S. et al.** (2018). YODA MAP3K kinase regulates plant immune responses conferring broad-spectrum disease resistance. *New Phytol.* **218**: 661–680.
- Sörensson, C., Lenman, M., Veide-Vilg, J., Schopper, S., Ljungdahl, T., Grøtli, M., Tamás, M.J., Peck, S.C., and Andreasson, E.** (2012). Determination of primary sequence specificity of Arabidopsis MAPKs MPK3 and MPK6 leads to identification of new substrates. *Biochem. J.* **446**: 271–278.
- Sözen, C., Schenk, S.T., Boudsocq, M., Chardin, C., Almeida-Trapp, M., Krapp, A., Hirt, H., Mithöfer, A., and Colcombet, J.** (2020). Wounding and Insect Feeding Trigger Two Independent MAPK Pathways with Distinct Regulation and Kinetics. *Plant Cell* **32**: 1988–2003.
- Spoel, S.H. and Dong, X.** (2008). Making sense of hormone crosstalk during plant immune responses. *Cell Host Microbe* **3**: 348–351.
- Stafstrom, J.P., Altschuler, M., and Anderson, D.H.** (1993). Molecular cloning and expression of a MAP kinase homologue from pea. *Plant Mol. Biol.* **22**: 83–90.
- Stark, C. et al.** (2011). The BioGRID Interaction Database: 2011 update. *Nucleic Acids Res.* **39**: D698–704.
- Sturgill, T.W. and Ray, L.B.** (1986). Muscle proteins related to microtubule associated protein-2 are substrates for an insulin-stimulatable kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **134**: 565–571.
- Su, J., Zhang, M., Zhang, L., Sun, T., Liu, Y., Lukowitz, W., Xu, J., and Zhang, S.** (2017a). Regulation of Stomatal Immunity by Interdependent Functions of a Pathogen-Responsive MPK3/MPK6 Cascade and Abscisic Acid. *Plant Cell* **29**: 526–542.
- Su, S.-H., Gibbs, N.M., Jancewicz, A.L., and Masson, P.H.** (2017b). Molecular Mechanisms of Root Gravitropism. *Curr. Biol.* **27**: R964–R972.
- Sun, F., Zhang, W., Hu, H., Li, B., Wang, Y., Zhao, Y., Li, K., Liu, M., and Li, X.** (2008). Salt modulates gravity signaling pathway to regulate growth direction of primary roots in Arabidopsis. *Plant*

- Physiol. **146**: 178–188.
- 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.
- Suzuki, T., Matsushima, C., Nishimura, S., Higashiyama, T., Sasabe, M., and Machida, Y.** (2016). Identification of Phosphoinositide-Binding Protein PATELLIN2 as a Substrate of Arabidopsis MPK4 MAP Kinase during Septum Formation in Cytokinesis. *Plant Cell Physiol.* **57**: 1744–1755.
- Szabo, L.J. and Bushnell, W.R.** (2001). Hidden robbers: the role of fungal haustoria in parasitism of plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**: 7654–7655.
- Takahashi, F., Mizoguchi, T., Yoshida, R., Ichimura, K., and Shinozaki, K.** (2011). Calmodulin-dependent activation of MAP kinase for ROS homeostasis in Arabidopsis. *Mol. Cell* **41**: 649–660.
- Takahashi, F., Yoshida, R., Ichimura, K., Mizoguchi, T., Seo, S., Yonezawa, M., Maruyama, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K.** (2007). The mitogen-activated protein kinase cascade MKK3-MPK6 is an important part of the jasmonate signal transduction pathway in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**: 805–818.
- Takahashi, Y., Soyano, T., Kosetsu, K., Sasabe, M., and Machida, Y.** (2010). HINKEL kinesin, ANP MAPKKs and MKK6/ANQ MAPKK, which phosphorylates and activates MPK4 MAPK, constitute a pathway that is required for cytokinesis in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol.* **51**: 1766–1776.
- Takahashi, Y., Soyano, T., Sasabe, M., and Machida, Y.** (2004). A MAP kinase cascade that controls plant cytokinesis. *J. Biochem.* **136**: 127–132.
- Taylor, S.S. and Kornev, A.P.** (2011). Protein kinases: evolution of dynamic regulatory proteins. *Trends Biochem. Sci.* **36**: 65–77.
- Teige, M., Scheikl, E., Eulgem, T., Dóczi, R., Ichimura, K., Shinozaki, K., Dangl, J.L., and Hirt, H.** (2004). The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in Arabidopsis. *Mol. Cell* **15**: 141–152.
- Teige, M., Scheikl, E., Reiser, V., Ruis, H., and Ammerer, G.** (2001). Rck2, a member of the calmodulin-protein kinase family, links protein synthesis to high osmolarity MAP kinase signaling in budding yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**: 5625–5630.
- 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.
- Traw, M.B. and Bergelson, J.** (2003). Interactive effects of jasmonic acid, salicylic acid, and gibberellin on induction of trichomes in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **133**: 1367–1375.
- Trębicki, P., Dáder, B., Vassiliadis, S., and Fereres, A.** (2017). Insect-plant-pathogen interactions as shaped by future climate: effects on biology, distribution, and implications for agriculture. *Insect Sci.* **24**: 975–989.
- Tsuda, K., Mine, A., Bethke, G., Igarashi, D., Botanga, C.J., Tsuda, Y., Glazebrook, J., Sato, M., and Katagiri, F.** (2013). Dual regulation of gene expression mediated by extended MAPK activation and salicylic acid contributes to robust innate immunity in Arabidopsis thaliana. *PLoS Genet.* **9**: e1004015.
- Ünal, E.B., Uhlitz, F., and Blüthgen, N.** (2017). A compendium of ERK targets. *FEBS Lett.* **591**: 2607–2615.
- Underwood, W., Melotto, M., and He, S.Y.** (2007a). Role of plant stomata in bacterial invasion. *Cell. Microbiol.* **9**: 1621–1629.
- Underwood, W., Zhang, S., and He, S.Y.** (2007b). The *Pseudomonas syringae* type III effector tyrosine phosphatase HopAO1 suppresses innate immunity in Arabidopsis thaliana. *Plant J.* **52**: 658–672.
- Venter, J.C. et al.** (2001). The sequence of the human genome. *Science* **291**: 1304–1351.
- Vojtek, A.B., Hollenberg, S.M., and Cooper, J.A.** (1993). Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell* **74**: 205–214.

- Wan, J., Zhang, X.-C., Neece, D., Ramonell, K.M., Clough, S., Kim, S.-Y., Stacey, M.G., and Stacey, G.** (2008). A LysM receptor-like kinase plays a critical role in chitin signaling and fungal resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **20**: 471–481.
- Wang, H., Ngwenyama, N., Liu, Y., Walker, J.C., and Zhang, S.** (2007). Stomatal development and patterning are regulated by environmentally responsive mitogen-activated protein kinases in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**: 63–73.
- Wang, Y., Li, K., and Li, X.** (2009). Auxin redistribution modulates plastic development of root system architecture under salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *J. Plant Physiol.* **166**: 1637–1645.
- Waszczak, C., Carmody, M., and Kangasjärvi, J.** (2018). Reactive Oxygen Species in Plant Signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* **69**: 209–236.
- Wehner, N., Hartmann, L., Ehlert, A., Böttner, S., Oñate-Sánchez, L., and Dröge-Laser, W.** (2011). High-throughput protoplast transactivation (PTA) system for the analysis of *Arabidopsis* transcription factor function. *Plant J.* **68**: 560–569.
- Weigel, D. and Glazebrook, J.** (2002). *Arabidopsis: A Laboratory Manual*. (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Whisenant, T.C., Ho, D.T., Benz, R.W., Rogers, J.S., Kaake, R.M., Gordon, E.A., Huang, L., Baldi, P., and Bardwell, L.** (2010). Computational prediction and experimental verification of new MAP kinase docking sites and substrates including Gli transcription factors. *PLoS Comput. Biol.* **6**.
- 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.
- Xia, X.-J., Zhou, Y.-H., Shi, K., Zhou, J., Foyer, C.H., and Yu, J.-Q.** (2015). Interplay between reactive oxygen species and hormones in the control of plant development and stress tolerance. *J. Exp. Bot.* **66**: 2839–2856.
- 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 Chua, N.-H.** (2012). Dehydration stress activates *Arabidopsis* MPK6 to signal DCP1 phosphorylation. *EMBO J.* **31**: 1975–1984.
- Xu, J., Li, Y., Wang, Y., Liu, H., Lei, L., Yang, H., Liu, G., and Ren, D.** (2008). Activation of MAPK kinase 9 induces ethylene and camalexin biosynthesis and enhances sensitivity to salt stress in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* **283**: 26996–27006.
- 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.*
- Xue, X., Bian, C., Guo, X., Di, R., and Dong, J.** (2020). The MAPK substrate MASS proteins regulate stomatal development in *Arabidopsis*. *PLoS Genet.* **16**: e1008706.
- Yan, H., Zhao, Y., Shi, H., Li, J., Wang, Y., and Tang, D.** (2018). BRASSINOSTEROID-SIGNALING KINASE1 Phosphorylates MAPKKK5 to Regulate Immunity in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **176**: 2991–3002.
- Yin, K., Ueda, M., Takagi, H., Kajihara, T., Sugamata Aki, S., Nobusawa, T., Umeda-Hara, C., and Umeda, M.** (2014). A dual-color marker system for in vivo visualization of cell cycle progression in *Arabidopsis*. *Plant J.* **80**: 541–552.
- 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.
- Yoon, S. and Seger, R.** (2006). The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* **24**: 21–44.
- Yoshida, S., Mandel, T., and Kuhlemeier, C.** (2011). Stem cell activation by light guides plant organogenesis. *Genes Dev.* **25**: 1439–1450.
- Zeke, A., Bastys, T., Alexa, A., Garai, Á., Mészáros, B., Kirsch, K., Dosztányi, Z., Kalinina, O. V., and Reményi, A.** (2015). Systematic discovery of linear binding motifs targeting an ancient protein

- interaction surface on MAP kinases. *Mol. Syst. Biol.* **11**: 837.
- de Zelicourt, A., Colcombet, J., and Hirt, H.** (2016). The Role of MAPK Modules and ABA during Abiotic Stress Signaling. *Trends Plant Sci.* **21**: 677–685.
- 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.
- Zhang, S. and Klessig, D.F.** (1997). Salicylic acid activates a 48-kD MAP kinase in tobacco. *Plant Cell* **9**: 809–824.
- Zhang, X., Dai, Y., Xiong, Y., DeFraia, C., Li, J., Dong, X., and Mou, Z.** (2007). Overexpression of Arabidopsis MAP kinase kinase 7 leads to activation of plant basal and systemic acquired resistance. *Plant J.* **52**: 1066–1079.
- Zhao, C. et al.** (2017). Temperature increase reduces global yields of major crops in four independent estimates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**: 9326–9331.
- 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.
- Zimmermann, P., Hirsch-Hoffmann, M., Hennig, L., and Gruissem, W.** (2004). GENEVESTIGATOR. Arabidopsis microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiol.* **136**: 2621–2632.
- Zipfel, C.** (2009). Early molecular events in PAMP-triggered immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* **12**: 414–420.
- Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, J.D.G., Boller, T., and Felix, G.** (2006). Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts Agrobacterium-mediated transformation. *Cell* **125**: 749–760.
- Zolla, G., Heimer, Y.M., and Barak, S.** (2010). Mild salinity stimulates a stress-induced morphogenic response in Arabidopsis thaliana roots. *J. Exp. Bot.* **61**: 211–224.
- Zourelidou, M. et al.** (2014). Auxin efflux by PIN-FORMED proteins is activated by two different protein kinases, D6 PROTEIN KINASE and PINOID. *Elife* **3**.
- 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.

Függelék

Rövidítések jegyzéke

35S	Cauliflower Mosaic Virus 35S Promoter
ABA	abszcizinsav
ACC	1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid (1-aminociklopropán-1-karbonsav)
AGC	cAMP-DEPENDENT, cGMP-DEPENDENT PROTEIN KINASE C (kináz csoport)
APX	aszorbát peroxidáz
ATP	Adenosine-5'-triphosphate
CAT	kataláz
CD site	common docking site - a MAP kinázok szubsztrát és regulátor fehérjékkel kialakított kölcsönhatásait biztosító dokkoló motívum
CDK	cyclin-dependent kinase (ciklin függő kináz)
cIEF	capillary isoelectric focusing (kapilláris izoelektromos fókuszálás)
CMGC	CDK/MAPK/GSK3/CLK kináz csoport
Col-0	<i>Arabidopsis thaliana</i> Columbia ökotípus
D motívum	D motif/D site - MAPK kötőhely motívum a MAPK kináz kölcsönható fehérjéken
DAMP	damage associated molecular patterns (szövetkárosodással asszociált molekuláris mintázatok)
DHAR	dehidroaszorbát reduktáz
EdU	5-etinil-2'-dezoxiuridin
EF-Tu	Tu bakteriólis elongációs faktor
ERK	extracellular signal-regulated kinase
ET	etilén
flg22	az FLS2 flagellin receptor által felismert 22 aminosavból álló flagellin peptid mintázat
Fv/Fm	változó fluoreszcencia/maximum fluoreszcencia arány (a PSII reakciócentrumok maximális kvantumhatékonyságának mutatója)
GFP	Green Fluorescent Protein (zöld fluoreszcens fehérje)
GPX	glutation peroxidáz
GSH	glutation
GST	Glutation S-transzferáz
GUS	β -glükuronidáz
HL	hydrophilic loop (hidrofil hurok), a PIN fehérjék transzmembrán régióit összekötő szekvencia
HMM	Hidden Markov Model
HR	hiperszenzitív reakció
HRP	horseradish peroxidase (torma peroxidáz)
JA	jázminsav
JNK	c-Jun N-terminal kinase

LC-MS/MS	Liquid Chromatography with tandem mass spectrometry (folyadék kromatográfia tandem tömegspektrometriával)
LECA	Last Eukaryotic Common Ancestor (utolsó eukarióta közös ős)
LRR	leucine-rich repeat (leucin gazdag ismétlődő szekvenciamotívum)
MAP3K	MAP kináz kináz kináz
MAPK	mitogén-aktivált protein kináz
MBP	Myelin Basic Protein (myelin bázikus protein)
MKK	MAP kináz kináz (MAPK kináz)
MS	mass spectrometry (tömegspektrometria)
NTF2	Nuclear transport factor 2 (egy nukleoporin kötő fehérje(domén))
p38	p38 mitogen-activated protein kinase
PAMP	pathogen associated molecular patterns (patogén asszociált molekuláris mintázatok)
PAT	Polar Auxin Transport (poláris auxin transzport)
PCR	polimeráz láncreakció
PQT	paraquat
PRX	peroxidáz
Pst	<i>Pseudomonas syringae</i>
Pst DC3000	<i>Pseudomonas syringae</i> pv tomato DC3000
PTI	PAMP triggered immunity (PAMP indukált immunitás)
R gének, proteinek	rezisztencia gének, proteinek
RLCK	receptor-like cytoplasmic kinases (receptor szerű citoplazmás kinázok)
ROS	reactive oxygen species (aktív oxigénformák)
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction (reverz transzkripció polimeráz láncreakció)
SA	szalicilsav
SAR	systemic acquired resistance (hosszú távú rezisztencia mechanizmusok)
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis (nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis)
SOD	szuperoxid diszmutáz
STE	élesztő Sterile 7, Sterile 11, Sterile 20 kinázokról elnevezett filogenetikai csoport
TTSS	type III secretion system (hármastípusú szekréciós rendszer)
WRKY	egy, a patogénválasz szabályozásában fontos szerepet játszó transzkripciósfaktor család
Y2H	Yeast Two-Hybrid System (élesztő kéthibrid rendszer)

Gének jegyzéke

A dolgozatban említett Arabidopsis gének

Gén	Név (szinonimák)	AGI azonosító
<i>ACS6</i>	1-AMINOCYCLOPROPANE-1-CARBOXYLIC ACID (ACC) SYNTHASE 6	AT4G11280
<i>AP1</i>	AGAMOUS-LIKE 7, AGL7, APETALA1	AT1G69120
<i>AP2</i>	APETALA 2	AT4G36920
<i>AUX1</i>	AUXIN RESISTANT 1, WAV5, WAVY ROOTS 5	AT2G38120
<i>BAK1</i>	BRI1-ASSOCIATED KINASE 1	AT4G33430
<i>BIK1</i>	BOTRYTIS-INDUCED KINASE 1	AT2G39660
<i>BSK1</i>	BRASSINOSTEROID-SIGNALING KINASE 1	AT4G35230
<i>CERK1</i>	CHITIN ELICITOR RECEPTOR KINASE 1	AT3G21630
<i>CLV1</i>	CLAVATA 1, FAS3, FASCIATA 3, FLO5, FLOWER DEVELOPMENT 5	AT1G75820
<i>CLV2</i>	ATRLP10, CLAVATA 2, RECEPTOR LIKE PROTEIN 10	AT1G65380
<i>CLV3</i>	CLAVATA3	AT2G27250
<i>CYCB1;1</i>	CYCLIN B1;1	AT4G37490
<i>D6</i>	AGC VIIIA KINASE 1-1, AGC1-1, D6 PROTEIN KINASE, D6PK	AT5G55910
<i>DPB</i>		AT5G03415
<i>EFR</i>	EF-Tu receptor	AT5G20480
<i>EIN3</i>	ETHYLENE-INSENSITIVE3	AT3G20770
<i>FLC</i>	AGAMOUS-LIKE 25, AGL25, FLF, FLOWERING LOCUS C, FLOWERING LOCUS F, REDUCED STEM BRANCHING 6, RSB6	AT5G10140
<i>FLS2</i>	FLAGELLIN SENSING 2	AT5G46330
<i>H2A</i>	Histone 2A	AT1G51060
<i>MAP3K17</i>	MAPKKK17, MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE KINASE KINASE 17	AT2G32510
<i>MAP3K18</i>	MAPKKK18, MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE KINASE KINASE 18	AT1G05100
<i>MAP3K3</i>	MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE KINASE KINASE 3	AT1G53570
<i>MAP3K5</i>	MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE KINASE KINASE 5	AT5G66850
<i>MEKK1</i>	MAPK/ERK KINASE KINASE 1, MAPKKK8	AT4G08500
<i>MKK1</i>	MAP KINASE/ ERK KINASE 1, MEK1	AT4G26070
<i>MKK10</i>	MAP KINASE KINASE 10	AT1G32320
<i>MKK2</i>	MAP KINASE KINASE 2	AT4G29810
<i>MKK3</i>	MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE KINASE 3	AT5G40440
<i>MKK4</i>	MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE KINASE 4	AT1G51660
<i>MKK5</i>	MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE KINASE 5	AT3G21220
<i>MKK6</i>	ANQ1, ARABIDOPSIS NQK1, MAP KINASE KINASE 6	AT5G56580
<i>MKK7</i>	BUD1, BUSHY AND DWARF 1, MAP KINASE KINASE 7	AT1G18350

<i>MKK8</i>	MAP KINASE KINASE 8	AT3G06230
<i>MKK9</i>	MAP KINASE KINASE 9	AT1G73500
<i>MPK1</i>	MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE 1	AT1G10210
<i>MPK10</i>	MAP KINASE 10	AT3G59790
<i>MPK11</i>	MAP KINASE 11	AT1G01560
<i>MPK12</i>	MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE 12	AT2G46070
<i>MPK13</i>	MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE 13	AT1G07880
<i>MPK14</i>	MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE 14	AT4G36450
<i>MPK15</i>	MAP KINASE 15	AT1G73670
<i>MPK16</i>	MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE 16	AT5G19010
<i>MPK17</i>	MAP KINASE 17	AT2G01450
<i>MPK18</i>	MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE 18	AT1G53510
<i>MPK19</i>	MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE 19	AT3G14720
<i>MPK2</i>	MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE HOMOLOG 2	AT1G59580
<i>MPK20</i>	MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE 20	AT2G42880
<i>MPK3</i>	MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE 3	AT3G45640
<i>MPK4</i>	MAP KINASE 4	AT4G01370
<i>MPK5</i>	MAP KINASE 5	AT4G11330
<i>MPK6</i>	MAP KINASE 6	AT2G43790
<i>MPK7</i>	MAP KINASE 7	AT2G18170
<i>MPK8</i>	MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE 8	AT1G18150
<i>MPK9</i>	MAP KINASE 9	AT3G18040
<i>MYC2</i>	JAI1, JASMONATE INSENSITIVE 1, JIN1	AT1G32640
<i>NPR1</i>	NONEXPRESSER OF PR GENES 1, NIM1, NON-INDUCIBLE IMMUNITY 1, SAI1, SALICYLIC ACID INSENSITIVE 1	AT1G64280
<i>PID</i>	PINOID	AT2G34650
<i>PIN1</i>	PIN-FORMED 1	AT1G73590
<i>PIN2</i>	AGRAVITROPIC ROOT 1, PIN-FORMED 2, EIR1, ETHYLENE INSENSITIVE ROOT 1	AT5G57090
<i>PIN3</i>	PIN-FORMED 3	AT1G70940
<i>PIN4</i>	PIN-FORMED 4	AT2G01420
<i>PIN5</i>	PIN-FORMED 5	AT5G16530
<i>PIN6</i>	PIN-FORMED 6	AT1G77110
<i>PIN7</i>	PIN-FORMED 7	AT1G23080
<i>PIN8</i>	PIN-FORMED 8	AT5G15100
<i>PR1</i>	PATHOGENESIS-RELATED GENE 1	AT2G14610
<i>PR2</i>	β -1,3-GLUCANASE, ATBG2, ATPR2, BETA-1,3-GLUCANASE 2, BG2, BGL2, GNS2, PATHOGENESIS-RELATED PROTEIN 2	AT3G57260
<i>PR3</i>	BASIC CHITINASE, CHI-B, HCHIB, PATHOGENESIS-RELATED 3	AT3G12500
<i>PR4</i>	HEL, HEVEIN-LIKE, PATHOGENESIS-RELATED 4	AT3G04720
<i>RbohD</i>	RESPIRATORY BURST OXIDASE HOMOLOG D	AT5G47910
<i>RPS2</i>	RESISTANT TO P. SYRINGAE 2	AT4G26090
<i>RPS6</i>	40S RIBOSOMAL PROTEIN S6-1	AT4G31700

dc_2005_22

<i>WAG1</i>	PK3AT, PROTEIN KINASE 3 ARABIDOPSIS THALIANA	AT1G53700
<i>WAG2</i>		AT3G14370
<i>WOX5</i>	WUSCHEL RELATED HOMEBOX 5	AT3G11260
<i>WRKY29</i>		AT4G23550
<i>WUS</i>	WUSCHEL, WUSCHEL 1	AT2G17950
<i>YODA</i>	EMBRYO DEFECTIVE 71, MAP KINASE KINASE KINASE 4, MAPKKK4, YDA	AT1G63700

A dolgozatban említett *Chlamydomonas reinhardtii* gének

Az egységes génazonosító rendszer hiánya miatt az adott gének által kódolt fehérjék UNIPROT azonosítóit is feltüntettem.

Gén	Név	Gén azonosító	UNIPROT azonosító
<i>MKK1</i>	Mitogen-Activated Protein Kinase 1	CHLRE_06g249150v5	A8HYY7
<i>MPK8</i>	Mitogen-Activated Protein Kinase 8	CHLRE_01g010000v5	Q9FXT7
<i>APXI</i>	ascorbate peroxidase	CHLRE_02g087700v5	O49822
<i>DHAR1</i>	dehydroascorbate reductase	CHLRE_10g456750v5	A8I0K9
<i>GSHR1</i>	glutathione reductase	CHLREDRAFT_134165	A8HXA6
<i>SOD1</i>	Mn-superoxide dismutase		Q42684