

## Dr Szekeres Miklós Akadémiai Doktori Értekezésének Szakmai Bírálata

A doktori értekezés tárgya a brasszinoszteroidok bioszintézisében résztvevő gének funkciójának és szabályozásának vizsgálata.

A brasszinoszteroidok csak az 1970-es években váltak ismertté. Mivel felfedezésüket gyorsan követte a molekuláris genetikai módszerek térhódítása, a bioszintézisükkel és hatásmechanizmusukkal kapcsolatos ismeretek rendkívül dinamikusán bővültek az elmúlt évtizedek alatt. Ezeknek az ismereteknek köszönhetően ma már a brasszinoszteroidokat a legfontosabb növényi hormonok között tartjuk számon, amihez a jelölt munkássága is hozzájárult. Szekeres Miklós egy törpe növekedésű *Arabidopsis* mutáns jellemzésén keresztül a 90-es első felében kapcsolódott be a brasszinoszteroidok kutatásába és úttörő szerepet játszott a brasszinoszteroid bioszintézis molekuláris hátterének és egyedfejlődési szerepének feltárásában az egyik kulcs enzimnek, jelenlegi elnevezése szerint a CYP90A1-nek, az azonosításával és jellemzésével. Az azóta eltelt évek alatt tovább folytatta a brasszinoszteroidok bioszintézisét szabályozó rendkívül komplex és szerteágazó enzimátikus útvonalak molekuláris genetikai vizsgálatát és a terület egyik nemzetközileg elismert szakértőjévé vált. Dolgozata az ezen a területen az elmúlt közel húsz évben végzett vizsgálatait foglalja össze az időközben megjelent, egymásra épülő, tudományos publikációi alapján.

A dolgozat formai szempontból egyfajta átmenet a hagyományos felépítésű és a tézis szerűen szerkesztett dolgozatok között. A jelölt közös Irodalmi áttekintés és Anyag és módszer fejezeteket követően az Eredmények és megvitatásuk fejezetet az egyes tudományos közleményei alapján tagolja. Mivel ezek a közlemények egymásra épülnek és egy egységes, a brasszinoszteroid bioszintézist átfogó, nagyobb témává olvadnak össze, ez a megközelítés jól alkalmazhatónak bizonyult és nagyon jó áttekintést ad a jelölt tudományos munkásságáról éppúgy, mint a brasszinoszteroidokkal kapcsolatos jelenlegi ismeretekről. A dolgozat, bár nem mentes a hibáktól, jól megírt, olvasmányos, az eredmények ábrákkal és táblázatokkal jól alátámasztottak. A formai hibákat okulásul egy mellékletben összegyűjtöttem, de mivel ezek a dolgozat érdemi részét nem érintik, részleteiben nem térek ki rájuk.

A továbbiakban a dolgozat tematikája szerint haladva teszem meg megjegyzéseimet és fogalmazom meg kérdéseimet.

Az Irodalmi áttekintés viszonylag rövid, de így is alapos, és a dolgozat további részeinek megértéséhez elegendő áttekintést ad a brasszinoszteroidokkal kapcsolatos ismeretekről.

*Kérdések, megjegyzések:*

- A harmadik oldalon a jelölt szembeállítja a „növekedés szabályozó” és a „hormon” kifejezéseket, miszerint a brasszinoszteroidokat sokáig növekedés szabályozónak tartották és csak később ismerték el növényi hormonnak. Mivel ezt a két kifejezést gyakran szinonimaként használja a tudományos irodalom, szeretném a jelölt, mint szakértő, véleményét hallani ebben a kérdésben.*
- Az 5. oldalon említi, hogy egyszikűekben (és sok kétszikű fajban is) a legerősebb élettani hatású brasszinolid nem kimutatható és feltehetően ezekben a fajokban a kasztaszeron a biológiailag aktív végtermék. Kérdésem, hogy ismert-e ennek a különbségnek az evolúciós háttere: egy bioszintetikus enzim hiányára vezethető-e vissza ezekben a fajokban, vagy mutáció következménye? Együttjár-e ez a különbség esetleg a brasszinoszteroid receptor szerkezetének megváltozásával?*

- 10. oldalon felveti a brasszinoszteroid hiányos vagy inszenzitív növények potenciális gazdasági jelentőségét. Hogyan egyeztethető ez össze az ilyen növények növekedési és morfologenetikus rendellenességeivel (pl. 42. oldal)?
- A 28. oldalon némi ellentmondást vélek felfedezni abban a mondatban, amiszert a „BR bioszintetikus gének gátlásáról szóló közlemények”-ben „vizsgált gének egyikének sincs bizonyítható szerepe a BR-ok szintézisében”. Hogyan kell ezt érteni?

Az „Anyagok és módszerek” tömören de kellő gondossággal megírt fejezet.

Az „Eredmények és megvitatásuk” fejezet a már említett módon, az egyes közleményekre épül: rövid háttérrel követően az eredmények ismertetésére került sor, amit egy záró szakaszban összefoglalt és diszkutált a jelölt. Némi zavart okozott számomra, hogy az ábrákra nem mindig sorrendben történt a szövegben a hivatkozás, illetve, hogy bizonyos eredményeket rögtön ismertetésükkor diszkutált, míg másokat csak a szakasz végi összefoglalásban.

*Kérdések megjegyzések:*

- A 42. oldalon a cpd mutáns fenotípusának leírásakor lekerekített epidermális sejtekről, duplikált gázcsere nyílásokról számol be illetve a 66. oldalon a brasszinoszteroid deficiencia pollencső növekedést gátló hatását említi. Ezek olyan a sejtvez szerveződésének zavarával is együttjáró morfológiai jegyek, amelyek tipikusan a kis molekulású ROP GTPázok által szabályozottak, ráadásul egyre több adat áll rendelkezésre arról, hogy a brasszinoszteroid receptorhoz hasonló receptor kinázok közvetlen kapcsolatban vannak a ROP GTPáz jelátvitellel a ROP-guanin-nukleotid kicserélő faktorokon keresztül. Kérdésem, hogy ismert-e bármilyen kapcsolat a brasszinoszteroid jelátvitel és a sejtvez szerveződésének szabályozása és konkrétan a ROP GTP-áz kapcsolt jelátvitel között? Ha nem, akkor elképzelhetőnek tart-e egy ilyen kapcsolatot?
- A 47. oldalon a 10. ábra kapcsán hiányoltam annak kihangsúlyozását, hogy a komplementált cpd mutáns egyben a CPD túltermelés vizsgálatára is alkalmas, amiről a 4.1.1.3 szakasz szól.
- A 4.1.1.3. szakasz, amely a CPD kifejeződésének a stressz gének kifejeződésére gyakorolt hatásáról szól megtöri a dolgozat logikáját. Célszerűbb lett volna külön ismertetni és megvitatni ezeket az eredményeket.
- Ezzel kapcsolatban azt írja, hogy a brasszinoszteroid kezelés nem indukálja a pathogenezis kapcsolt (PR) fehérjék génjeit, de azok a CPD túltermelő növényekben magasabb szinten expresszálnak mint a kontrolban. Ehhez kapcsolódó kérdésem: valóban megnövekszik a a CPD túltermelő növényekben a reaktív oxigén fajták szintje, vagy ez csak egy hipotézis? Külső brasszinoszteroid kezelésnek van-e hatása a reaktív oxigén fajták termelődésére?
- 84. oldal. A gyökérben és a hajtásban a brasszinoszteroid bioszintézisben résztvevő gének aktivitása és a brasszinoszteroid intermedierek mennyisége, aránya lényegesen eltér. Mi lehet ennek a biológiai jelentősége? Van-e, lehet-e a korai intermediereknek valamilyen biológiai funkciója a gyökérben (pl. anyagcsere), ahol magas szinten vannak jelen?
- A brasszinoszteroidokról ismert, hogy nem transzportálódnak. Mi a helyzet az intermedierekkel? Különös tekintettel arra, hogy az egyes bioszintetikus lépésekért felelős gének kifejeződési mintázata nem teljesen fed át.
- 86. oldalon írja, hogy nem ismert miért van végtermék gátlás az összes bioszintetikus gén esetében. Lehet-e az ok az, hogy a bioszintézis utak hálózatos kapcsolata miatt az

*intermedierek felhalmozódásának gátlása csak így lehetséges? Lehetnek ezek az intermedierek esetleg károsak a növény számára?*

- *92. oldal. A 4.2.3.3. szakaszban a CYP85A1 és A2 gének differenciális kifejeződése kapcsán összehasonlítja azok elsődleges promóter szekvenciáját, ami véleményem szerint kevésbé informatív, de a feltételezett transzkripció faktor-kötő helyeket nem. Miért?*
- *94. oldalon említi, hogy Zinnia elegansban a xilém képződés folyamán a CYP85 és CYP90 gének expressziója összehangolt. Mi a helyzet a két gén család expressziójának összehangolása tekintetében az Arabidopsis növény egyedfejlődése alatt (pl. mikroarray adatok illetve promóter motívumok és szabályozó transzkripció faktorok tekintetében)?*
- *A 104. oldalon említi, hogy a paradicsom termés perikarpban nagy mennyiségben halmozódik fel a brasszinolid. Elképzelhető-e, hogy a termésben specifikusan működő CYP85A3 termelődése mentes a végtermék gátlás alól?*
- *112. oldalon említi, hogy a napszakos változások során a brasszinolid a fényperiódus közepén szaporodik fel de az intermediér poolok nem változnak. Mivel magyarázható ez?*
- *4.3. fejezetben a jelölt a CYP90C1 és D1 enzimek jellemzéséről számol be. A háttér felvázolásakor Kim és mtsai. hasonló, részben korábbi, részben párhuzamos, kutatásainak eredményeit írja le, akik más végkövetkeztetésre jutottak az enzimek szerepét illetően. Nem teljesen világos, hogy mi volt a két megközelítésben az a különbség ami az eltérő eredményekhez vezetett.*
- *A 135. oldalon bemutatja a brasszinoszteroid szintézisben feltárt ún. C-23-hidroxilációs söntök sémáját és hangsúlyozza ezek jelentőségét. A 4. ábrával összevetve nem világos számomra, hogy ezeknek a söntöknek a létezése mellett a cpd (CYP90A1) mutáció hogyan vezet brasszinoszteroid deficienciához?*
- *138. oldalon említi, hogy a DD-RT PCR technikával csak három BR-regulált gént sikerült azonosítani, de nem említi, hogy hány feltételezett transzkriptumot vizsgáltak. Mennyire volt reprezentatív a minta? Az Arabidopsis genom és a microarray adatok ismeretében ma hány BR szabályozott génről tudunk Arabidopsisban?*
- *A 145. oldalon leírja, hogy a BRH1 gén feltételezhetően védekezési reakciókban vesz részt, majd szenz és antiszenz BRH1 transzgenikus növényekről számol be. Milyen ezeknek a növényeknek a patogén válasza?*

Az dolgozatot egy rövid Összefoglalás zárja, amelyben a jelölt hét pontban foglalja össze legfontosabb eredményeit. Ezek az eredmények kivétel nélkül a tudományterület legrangosabb nemzetközi folyóirataiban jelentek meg és alapvetően járultak hozzá a brasszinoszteroidok bioszintézisének és biológiai szerepének a megértéséhez.

Az eredmények közül jómagam a legnagyobb jelentőségűeknek az alábbiakat tartom:

- A jelölt a törpeséget okozó *cpd* mutáció genetikai hátterének feltárásával azonosította a brasszinoszteroid bioszintézisben kulcs szerepet játszó CYP90A1 citokróm p450-típusú enzimet illetve annak génjét és igazolta a brasszinoszteroidok szerepét számos egyedfejlődési folyamatban.
- A CYP90C1 és D1 enzimek szubsztrát preferenciájának vizsgálata alapján egy új bioszintetikus sémát dolgozott ki, amely alapján a brasszinolid a korábbi modellben feltételezetténél kevesebb lépésben jöhet létre.

- Promóter-riporter gén fúziók segítségével feltérképezte a brassinoszteroid szintézisben résztvevő számos gén kifejeződési mintázatát a növényi egyedfejlődés alatt.
- Megállapította, hogy a brassinoszteroid szintézis kulcs génjei, a *CYP85A2* és *CPD* gének, fény és napszakos szabályozás alatt állnak, ami együttjár a brassinolid szint napszakos változásával.
- Kimutatta, hogy a brassinoszteroid szintézis génjei közösen végtermék gátlás alatt állnak, de ennek nincs szerepe a CDP aktivitás gátlásában a sötét periódus alatt.

Szekeres Miklósnak a dolgozatban áttekintett tudományos munkássága messzemenően eleget tesz az MTA doktori cím szakmai követelményeinek, ezért javaslom a benyújtott, formailag és számailag is magas színvonalú disszertációjának nyilvános vitára bocsájtását, egyben messzemenően támogatom az MTA doktori cím odaítélését.

Szeged, 2011-05-04

Fehér Attila  
az MTA doktora

## Melléklet

### Formai megjegyzések

Rövidítések: messze nem teljes, de a szövegben a rövidítések magyarázata megfelelő

13. oldal: disszeráció – disszertáció

30. oldal: azokat valamelyikét – azok valamelyikét

Arabidopsis Stock Center elérhetősége nincs feltüntetve

„Anyagok és módszerek” – a cégek nevei mellett csak a műszerek esetében van cím

38. oldal: az egyes méréseket megismételtünk - az egyes méréseket megismételtük  
RNáz, de DN-áz

39. oldal: cDNS-eket teljes kódoló régióit - cDNS-ek teljes kódoló régióit

41. oldal: felelős a valamennyi – felelős valamennyi

46. oldal: a 9. ábra B részére későn van hivatkozás a szövegben; külön ábra kellett volna

51. oldal: 13. ábra: CR az ábrán, CL az aláírásban

52. oldal: 14. ábra: a det2-re nincs hivatkozás a szövegben pedig van fenotípus

53. oldal: a szövegben a *cbb* mutáns említésénél nincs hivatkozás

65. oldal: a *cbb3/cpd2* Northern hibridizáció diszkutálásánál nincs hivatkozás az ábrára  
(21?, amin nem látszik a két band) vagy az eredeti publikációra

67. oldal: a szövegben a 22 és 23 ábra fordított sorrendben van hivatkozva

77. oldal: a 4.2.2. és 4.2.2.1 szakaszok első paragrafusa szószerint azonos

88 és 90. oldal: szószerinti mondat ismétlés

90. oldal: 34. ábra, itt felesleges a mikroszkóp gyártó feltüntetése

93. oldal: 37. ábra aláírásban kimaradt a „B”

98. oldal: 39. ábra B-rész: a génnek neve fel lett cserélve

109 és 111. oldal: 46. és 47. ábrán WT az aláírásban W a vadtypus jele

110. oldal: korábbi munkája – de kinek?

115. oldal: a 48. ábrán az aláírásban A és B szerepel az abszolút és normált értékeket  
bemutató B és C helyett

119. oldal: nem ismeret – nem ismert

131. oldal: nm nem a nanomol hanem a nanométer rövidítése, helyesen nmol (vagy nM, ha  
koncentráció)