

Dóczy Róbert: „A mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) jelátvitel szerepe a növények környezeti adaptációs folyamataiban”

Című Akadémiai doktori értekezésének bírálata.

Dr. Szabados László

MTA doktora

A dolgozat szerkezete, felépítése.

Az értekezés a növényi MAP kináz rendszer jellemzésének több fontos és érdekes aspektusát írja le illetve foglalja össze. A kísérletes munka döntő részét a szerző két neves külföldi intézetben posztdoktor kutatóként végezte, utána a MTA Mezőgazdasági Intézetében folytatta kutatásait.

Az értekezés a klasszikus beosztást követi. Az Irodalmi áttekintésben lényegretörően ismerteti a növények stresszhatásokkal szembeni védekező mechanizmusait, a fejlődés és stresszválasz szabályozásának fontosabb mechanizmusait, a szabályozó mechanizmusok fontosabb jellemzőit és a MAP kináz jelátvitel fontosabb aspektusait.

A Módszerek fejezet az alkalmazott technikák összefoglaló ismertetését jelenti, benne a kapilláris izoelektromos fókuszálással kapcsolt nanofolyadék immunesztet, aminek fejlesztésében, növényi rendszerekre való adaptálásában a szerző is résztvett.

Az Eredmények fejezet a leghosszabb (66 oldal), amiben ismerteti a legfontosabb kísérleti eredményeket, adatokat. A bemutatott kísérleti eredmények meggyőzően bizonyítják a kísérletes munka igényességét, az adatok megbízhatóságát.

A Diskusszió az elvégzett kutatói munka eredményeinek összegzése, magyarázata, beillesztése a növénybiológiai kutatások legújabb eredményeinek világába. A kutatások összefoglalását, szintézisét két vizuális modell is kiegészíti ami tömören és emellett érthetően illusztrálja a munka szintézisét. Ez a szekció talán lehetett volna

kicsit hosszabb, részletesebb, hisz a diszkusszió több mint egy évtizedes munka szintézisét jelenti.

A munka kezdetekor a MAP kináz rendszert a növényekben még csak felszínesen ismerték. A genom szekvenciák meghatározásának köszönhetően vált ismertté a MAPK rendszer komplexitása, a mutáns gyűjtemények valamint a biokémiai, sejtbioológiai módszerek fejlődése tette lehetővé a komplex funkcionális analízist, amit a Jelölt is elvégzett.

Néhány megjegyzés, kérdés

Az 5. Ábrán a MPK és MKK élesztő kéthibrid rendszerben kimutatott kölcsönhatásait mutatja. Mind a MPK mind a MKK csoportban (D csoport) több kináznak nincs kölcsönható partnere, legalábbis az ábrán hiányzik. Miért? Speciális körülmények kellene a kölcsönhatáshoz? Vagy az élesztő 2H rendszer nem alkalmas ezen kinázok kölcsönhatásainak kimutatására? Amennyiben vannak más, újabb eredmények, jó lenne (lett volna) a kölcsönhatásokat bemutató hálózatot kiegészíteni.

Milyen ezeknek a kinázoknak a sejten belüli lokalizációja? Feltételezem hogy *in vivo* kölcsönhatás akkor jöhet létre, ha a partner fehérjék a növényi sejten belüli elhelyezkedése ezt tényleg lehetővé teszi, a fehérjék tényleg találkozhatnak. Például a MPK6 foszforilálja a MYC2 transzkripciós faktort ami sejtmagi fehérje, de a PIN1 auxin transzporteret is ami membránhoz kötött. Van-e információ a MAPK lokalizációról, transzportról, kísérletes adat az *in vivo* kölcsönhatások lokalizációjára (pl. BiFC)? Milyen kölcsönhatásokat sikerült *in vivo* megerősíteni és ezek hol játszódnak le?

Mennyire stabilak a MKK – MPK kölcsönhatások? Egy-egy pillanatra, rövid időre jönnek létre, vagy stabil komplexet alkotnak? Hogy lehet a kölcsönhatások kinetikáját, dinamikáját jellemezni?

A komplex növényi MKKK-MKK-MPK hálózatoknak mi adja a specificitását? Van-e, illetve milyen mértékű a redundancia a MAP kinázok illetve az általuk ellenőrzött

jelpályák között? Több MPK szabályoz fejlődési folyamatokat és stressz reakciókat is. Mi adja ezek specificitását? Van-e, illetve milyen mértékű a redundancia a MAP kinázok között?

A dolgozatban nem sok szó esik a MAP3K enzimekről, amik a MKK kinázok aktivitását szabályozzák. Mivel egy nagy géncsaládról van szó, fontos szerepük lehet a sokféle impulzus integrálásában, továbbításában. Ismertek-e a Szerző által is tanulmányozott jelpályák szabályozásában résztvevő MAP3K enzimek, gének? Mik ezeknek a kinázoknak a funkciója?

A MKK3 túltermelő növényeknek illetve a mkk3 mutánsnak van-e fenotípsa, mutat-e fejlődési rendellenességet. Van-e különbség más stimulusokkal, például abiotikus stresszválasszal, reaktív oxigénekkal szembeni érzékenységben?

36. Ábra (P109). A 3 óra PQT kezelésnél minden gén expressziója magasabb a mkk1 és mpk8 mutánsokban, de a 24 h PQT kezelés után a SOD1 kivételével nincs különbség (APX1), vagy alacsonyabb (DHAR1, GSHR1). Mi lehet ennek az oka? A Clamydomonasban 3 óra után negatív, 24 óra után pozitív (vagy semleges) szabályozás?

A dolgozatban diszkutálja a MAP kináz rendszer biotechnológiai felhasználásának lehetőségeit. Európában a GMO-val szembeni előítéletek, jogszabályok miatt lehetetlen a biotechnológiai alkalmazásokban gondolkodni. Számos országban viszont ez lehetséges (USA, Argentina, Kína, stb.). Milyenek az ottani lehetőségek? Van-e olyan természetű növény fajta amit a MAPK jelrendszer módosításával hoztak létre?

A kutatások fontosabb eredményei

- Az 1990-es évek végén, 2000-es évek elején a MAP kináz rendszer a növényekben még kevésbé volt ismert. Ezért nagy jelentőségű volt a MKK-MPK hálózatok feltárása a kölcsönhatási kapcsolatok rendszerének jellemzése, amiben a Jelölt is részt vett.

- A Jelölt részletesen jellemezte a MKK3-MPK7 jelpályát, a kinázok kölcsönhatásait, szerepüket a patogén válasz szabályozásában, a ROS jelátvitel közvetítésében.
- A MKK7 (és MKK9) jellemzése során a Jelölt bizonyította, hogy ennek a kináznak elsősorban a merisztéma fejlődésben, sejtciklus szabályozásában van szerepe, túltermelése fejlődési rendellenességhez vezet. Az MKK7 szubsztrátja a MPK6 kináz, ami a fejlődésbiológiai szabályozást közvetíti.
- A jelölt résztvett az izoelektromos fókuszálással kapcsolt nanofolyadék immuneszt (CLEF immuno assay) módszerének kifejlesztésében, növényi rendszerekre való alkalmazás kidolgozásában. Először használták az in vivo MAPK foszforiláció tanulmányozására a mikro kapilláris rendszert. A módszert felhasználták több MAP kináz szubsztrát köztük az ACC szintáz 6 fehérje foszforilációjának vizsgálatában.
- Jellemezte a merisztéma szerveződést szabályozó WUS és virágfejlődést szabályozó AP2 transzkripciós faktorok foszforilációját, a MAP kinázok szerepét ezen transzkripciós faktorok szabályozásában.
- Igazolták a MAPK foszforiláció fontosságát az auxin szállítását közvetítő PIN transzporter fehérjék szabályozásában.
- A jelölt résztvett az egysejtű algák, a Chlamydomonas MAP kináz rendszerének jellemzésében. Eredményei közt szerepel a CrMPK8 és a CrMKK1 szerepének tisztázása az oxidatív stresszválasz kialakításában, szabályozásában.
- Kidolgozott egy fejlődésbiológiai evolúciós modellt a MAPK jelátvitel kialakulására, fejlődésére az eukarióta organizmusokban.

A felsorolt eredmények hozzájárultak a növényekben lévő MAP kináz rendszerek működésének, funkciójának megértéséhez. Az adatok hitelesek, meggyőzőek, a levont következtetések logikusak, helytállóak. A dolgozat felsorolt adatait új tudományos eredményeknek fogadom el.

A dolgozat értékes tudományos közlemény, a művet alkalmasnak tartom a tudományos vitára.

Szeged, 2023.04.20.



Dr. Szabados László

Hibák

A dolgozatban ritkán, de előfordulnak hibák. Ezek a megértést nem befolyásolják, ezért a bírálatomban nem említettem őket. A teljesség igénye nélkül felsorolok néhányat.

A dolgozat szépen, igényesen van megírva, de néhány hibát azért még lehetett találni.
Pár példa:

P45: "...ezen minták között nincs jelentős MAPK protein mennyiség különbség (5.a ábra, középső panelek). "

A 6a ábra mutatja a jelzett információt.

P85: "azok együttes elfordulása a PID foszforilációs helyekkel, "
—előfordulása...

P97: "...utolsó eukaritóa ..."
...eukarióta...

P97: "A keresztirányú kapcsolatok (crosstalk) élesztő, állati és növényi MAPK jelpályák esetében is ismert "
...ismertek...

P101: "...lehetővé téve a változó környezeti való adaptációt. ..."
...környezethez való...

P112: "...WRKY transzkripció faktor ..."
...transzkripció...

P113: "...a de-etiolációs kísérleti rendszert alkalmaztuk,"
Gondolom de-etiolációs rendszerről van szó.

P114: "...merszitéma szabályozás ..."
...merisztéma...