

Hivatalos Bíráló

Dr. Dóczi Róbert:

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

című

akadémia doktori értekezéséről

Dóczi Róbert akadémiai doktori értekezésében mintegy 15 évnyi a Mitogén-aktivált Protein Kinázok (MAPK-k) evolúciójához és jelátviteli szerepéhez kapcsolódó kutatómunkája eredményeit foglalja össze. Ezeket a kutatásokat posztdokorként neves külföldi laboratóriumokban kezdte meg, majd hazatérve önálló kutatócsoport-vezetőként folytatta az MTA Agrártudományi Kutatóintézetében. Kísérletei kezdetkor a növényi MAP kinázokkal kapcsolatban elérhető tudományos ismeretek meglehetősen korlátozottak voltak, így elmondható, hogy a legjobbkor kapcsolódott be ezekbe a kutatásokba és kísérletei néhány vonatkozásban úttörő jellegűnek tekinthetők. Eredményei a kezdetektől fogva a terület nemzetközi élvonalába tartoznak, színvonalas nemzetközi tudományos folyóiratokban kerültek közlésre és több mint 1156-szor hivatkoztak rájuk. Azaz, már megmérettek a tudományos közvélemény által. Így a bírálónak viszonylag könnyű a feladata a pályázó tudományos teljesítményének a megítélésében. A doktori szabályzat alapján azonban a bíráló feladata elsősorban a doktori mű, és az abban foglaltak értékelése kitérve az érdemekre csakúgy, mint a hiányosságokra. Én ez utóbbiakkal kezdeném. Az értekezés nagyon sok elírást, nyelvtani és szakmai pontatlanságot, felületes vagy éppen túl bonyolult megfogalmazást tartalmaz. A bírálóban olyan érzést kelt, mintha a dolgozat az utolsó pillanatban készült volna el és már nem lett volt idő az alaposabb átgondolásra, átnézésre. Az elírásokat, stilisztikai problémákat és egyéb hibákat egy 10 oldalas mellékeltben foglaltam össze, itt ezeknek a részletes ismertetésére nem térnék ki, csak néhány általános formai hibát, illetve szakmailag vitatható megfogalmazásra hívnám fel a figyelmet.

A pályázó érezhetően törekedett a tömörségre, ami nem feltétlenül lenne probléma, ha ez nem menne gyakran az érthetőség kárára. Egy jellegzetes hiba a dolgozatban a hibás szóösszevonás. Az olyan többször előforduló kifejezések pl., mint „patogénválasz”, „patogén hormon”, „patogén jelátviteli pálya”, „patogénvédekezés” arra utalnak, mintha a patogén válaszáról, hormonjáról, jelátviteléről, védekezéséről lenne szó, pedig valójában a kórokozó által kiváltott növényi védekezésről, védekezési válaszról, védekezési hormonnáról, illetve jelátvitelről van szó. Általános hiba az is, hogy a szövegben az ábrarészekre kisbetűvel hivatkozik, de az ábrákon nagy betűvel jelöli az egyes részeket. Az irodalmi áttekintés egyes részeit kissé felületesnek találtam, pl. a kórokozó védekezés kapcsán az effektor-indukált immunitás (ETI) leírását. Meglehetősen részletes ugyanakkor a gravitropikus válasz bemutatása. Ezt hozza fel a jelölt példának a növényi stresszválasz és egyedfejlődés szoros kapcsolatának bemutatására, holott a gravitropikus szabályozás semmilyen módon nem kapcsolódik a dolgozat többi részéhez. Mivel „a bemutatott kutatások alapvetően a biotikus stressz tolerancia mechanizmusokra irányultak”, ahogy a pályázó maga írja a 8. oldalon,

célszerű lett volna ehhez kapcsolódó példákat hozni az irodalmi áttekintésben is, hivatkozva akár pl. Kazan és Manners „Linking development to defense: auxin in plant–pathogen interactions” áttekintésére (Trends in Plant Science 2009. 14, 373–382). Az anyagok és módszerek leírása helyenként szintén elnagyolt, számos részletet (pl. oligonukleotid szekvenciák, antitestek) csak a disszertáció alapjául szolgáló közleményekben találhatunk meg, jobb lett volna ezeket akár függeléként csatolni.

Néhány a dolgozatban megfogalmazott szakmai állítását az alábbiak alapján vitatom:

A 10-11. oldalon ezt írja: “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.” Ebből a leírásból nem érthető meg a helyes mechanizmus. Ugyanaz a receptor nem dimerizálódhat két különböző fehérjével, mert egy dimer csak két tagból állhat. A hivatkozott publikáció szerzői is az asszociáció kifejezést használják a címben, mert nem ismert, hogy a receptor komplex valójában hány partnerből áll és hogy az FLS2 fehérjék közvetlenül kapcsolódnak-e egymáshoz. Továbbá nem a foszforilált BAK1, ami egy membránba ágyazott receptor kináz, hanem a BIK1 citoplazmatikus kináz válik le a komplexről és továbbítja a jelet.

Az első ábra a címe és aláírása szerint az intracelluláris jelátviteli pályák általános sematikus architektúráját hivatott bemutatni, de kizárólag transzkripciós faktorok szabályozását jelöli meg a jelátvitel lehetséges kimeneteként, ami egy jelentős szűkítés, hiszen számos más célfehérje létezik. Ha már általános sémáról van szó, ezt valahogyan jelezni kellett volna.

Ugyanehhez kapcsolódik az az állítása, hogy “A jelátviteli mechanizmusok leggyakoribb kimeneti hatása a génextpressziós mintázat újraprogramozása” – a tudományos irodalomban óvakodni kell az ilyen kijelentésektől. Mivel senki nem mérte meg az összes jelátviteli pálya lehetséges kimeneteleinek gyakoriságát, nem tudhatjuk, hogy melyik a leggyakoribb. A “legtöbbet tanulmányozott” jelátviteli kimenet valóban ez lehet.

A 16. oldalon azt írja, hogy a foszforilált aminosavak “képesek az adott fehérje alapvető tulajdonságait megváltoztatni” – és példaként az enzim aktivitást, fehérje-fehérje interakciókat említi, amik viszont már következmények, az aminosav megváltozott töltésének köszönhetően alapvetően a fehérje szerkezete (konformációja) az, ami megváltozik.

Még ugyanezen az oldalon azt állítja, hogy “Bár a tirozin foszforiláció ritka, a jelátviteli folyamatokban ennek a módosításnak nagy jelentősége van, pl. a legtöbb receptor protein kináz tirozin kináz.” – Ezek az állítások így nem állják meg a helyüket. Többsejtű állatokban a protein kinázok 10-15%-a tirozin kináz (Hunter T. 2009. Tyrosine phosphorylation: thirty years and counting. Current Opinion in Cell Biology 21, 140–146.), és foszforilált aminosavak kb. 1-4 %-a tirozin, ami nem sok, de nem mondható “ritkának” egyrészt mivel a foszfo-treonin aminosav is csak 12 %, másrészt mivel a tirozin foszforilációt a foszfopeptid azonosítási módszerek alul becsülik instabilitása illetve a foszfo-tirozin tartalmú jelátviteli fehérjék alacsony abundanciája miatt Olsen JV, Blagoev B, Gnäd F, Macek B, Kumar C, Mortensen P, Mann M. 2006. Global, In Vivo, and Site-Specific Phosphorylation Dynamics in Signaling Networks. Cell 127, 635–648. Érdekes módon, bár növényekben nincs vagy

nagyon kevés az ismert illetve prediktált tirozin kináz aktivitású enzim, a foszfo-tirozin aminosav előfordulás összevethető a többsejtű állatok esetében mérttel (pl. de la Fuente van Bentem S, Hirt H. 2009. Protein tyrosine phosphorylation in plants: more abundant than expected? Trends in Plant Science 14, 71–76.). Az az állítás pedig, hogy a “legtöbb receptor protein kináz tirozin kináz” csak a többsejtű állatokra igaz, a növényi receptor kinázok nem Tyr, hanem Ser/Thr kinázok.

A 19. oldalon a MAP kináz kaszkádok ismertetése kapcsán Manning és mtsai. 2002-es közleményére hivatkozik (Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. 2002. The Protein Kinase Complement of the Human Genome. Science 298, 1912–1934.) ami véleményem szerint hibás, mert ez a közlemény pusztán a humán genomban kódolt kináz szekvenciák katalógusa. Az ugyanebben a kötetben megjelent Johnson és mtsai által jegyzett közlemény az, amelyik a humán sejtek MAP kináz kaszkádjainak felépítését, működését tárgyalja (Johnson GL, Lapadat R. 2002. Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways Mediated by ERK, JNK, and p38 Protein Kinases. Science 298, 1911–1912).

78. oldalon írja “Az AP2 homeotikus gén a virágfejlődés egyik meghatározó a szabályozója, a virágfejlődés ABC modellje szerint az AP2 egy “A” típusú transzkripciós faktor (Bowman et al., 1989, 2012).” - Bár az AP2 valóban a virágfejlődés egyik fontos regulátoraként ismert, ezenkívül számos egyéb funkciója is van pl. a hajtásmerisztéma fenntartásban (Würshrum et al. 2006), mag (Jofuku et al. 1994) és gyümölcs (Ripoll et al. 2011) fejlődésben stb. Az ABC modellben betöltött szerepét kiragadni ezek közül félrevezetően leegyszerűsíti a jelentőségét.

A 112. oldalon azt írja, “MKK3 esetében nem következett be ... génduplikáció”, de igazolt az evolúció során a “neofunkcionalizáció” -ja. Génduplikáció hiányában a neofunkcionalizációt nem tudom értelmezni, mivel annak definíciójában szerepel a génduplikáció szükségessége és a korábbi funkció(k) elvesztése: “Neofunctionalization, one of the possible outcomes of functional divergence, occurs when one gene copy, or paralog, takes on a totally new function after a gene duplication event.” Feltehetően arra gondolt, hogy az evolúció során az MKK3 fehérje mutációk következtében új funkciókra tett szert, ami azonban nem azonos a genetikai neofunkcionalizációval.

Még ugyanezen az oldalon: “Az elfogadott modell szerint a CLV3 peptid ligandum a CLV1–CLV2 receptor heterodimerhez kapcsolódik. Ez a ligandum-receptor interakció a CLV1 kináz domén transzforszforilációjához 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 ma már nem az elfogadott, hanem egy elavult modell, mivel sem a CLV1-CLV2 heterodimer létét, sem a CLV1 ROP GTPáz kapcsolatot nem támasztották alá az újabb eredmények. A jelenleg érvényesnek tekinthető hajtásmerisztéma jelátviteli kapcsolatokat már 2016-ban áttekintették pl. Somssich és munkatársai pl. Somssich M, Je BI, Simon R, Jackson D. 2016. CLAVATA-WUSCHEL signaling in the shoot meristem. Development 143, 3238–3248.

A 114. oldalon azt írja, hogy “A PIN fehérjéknek esszenciális szerepük van a poláris auxin transzport folyamatban, melynek zavara a csúcsmerisztémák összeomlását eredményezi.” - ez így nem teljesen korrekt, nem minden esetben okoz a poláris auxin transzport zavara merisztéma “összeomlást”. A PIN1 mutáció pl. zavart okoz az auxin áramlásban, de a *pin1* mutánsok többségének van hajtásmerisztémája, van rozettája, van virágzati tengelye, de azon nem fejlődnek sem levelek, sem virágok, azaz a mutáció zavart okoz a hajtásmerisztéma

működésében, de az nem omlik össze. A *pin1* mutáns másik csúcsmerisztémája, a gyökérmerisztéma pedig normális. A poláris auxin transzportnak gyakorlatilag teljes gátlása, nem a zavara, kell ahhoz, hogy a csúcsmerisztémák embrionálisan ne alakuljanak ki (pl négyszeres *pin1 pin3 pin4 pin7* mutáció esetében).

A 115. oldalon A PIN fehérjék vezikuláris transzportjával kapcsolatos leírás elnagyolt és félreérthető. Pl. abból a megállapításából, hogy a “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.” úgy tűnik, mintha a PID foszforiláció esetében a PIN fehérje nem válna le a plazmamembránról és ez a folyamat nem a PIN fehérjék vezikuláris transzportját szabályozná. Ezzel szemben a PIN fehérjék kapcsolódása a plazmamembrán doménekhez dinamikus, folyamatos endo- illetve exocitózis zajlik (ún. endocitotikus reciklizáció) és a PID foszforiláció azt változtatja meg, hogy a PIN fehérje reciklizálódik a polaritás helyére, vagy transzcitózissal átkerül egy másik membrándoménbe. Így ez nem különbözik attól a mechanizmustól, amit a jelölt a MAPK foszforiláció esetében javasol vagyis a PID foszforiláció is a “különböző membrántranszportmechanizmusokba történő belépést szabályozhatja”.

Ugyanezen oldalon: “Míg az MPK6 a transz-Golgi rendszerben és a plazmamembránban lokalizálódik” – nem pontos a megfogalmazás. A MPK6 nem transzmembrán fehérje így nem lokalizálódhat a “membránban”, de ahhoz indirekt módon kapcsolódhat más fehérjéken keresztül. Az idézett cikk szerint elsősorban PM ill. TGN-eredetű clathrin-függő vezikula képződésben lehet szerepe, ami valóban jól illik a PIN fehérjék endocitotikus reciklizációjában felvetett lehetséges szerepéhez. Ezt részletesebben lehetett volna diszkutálni.

Talán érzékelhető, hogy a fenti kifogásaim nem a pályázó eredményeit, hanem első sorban azok bemutatását, megvitatását érintik. A kísérletek tervezése és kivitelezése vitán felül állóan magas szakmai színvonalat képviselnek. Az eredmények jelentős részét egy a pályázó és munkatársai által kidolgozott, átmeneti génkifejeződésen és fehérjék foszfoizozomáinak kapilláris izoelektromos fókuszálással történő elválasztásán alapuló, módszer alkalmazásával érték el. A módszer bevezetése a növényi jelátviteli kutatásokba úttörő jellegűnek tekinthető. A pályázó és munkatársai az eredeti megközelítéseknek köszönhetően a tudományterület számos új eredménnyel gazdagították jelentősen hozzájárulva a növényi MAP kináz jelátviteli sajátos vonásainak és összetettségének feltárásához. Ezek közül az eredmények közül összhangban a pályázó által a 126-127. oldalakon megfogalmazottakkal az alábbiakat emelem ki:

1. Kísérletileg igazolták az Arabidopsis MKK3 és MPK7 fehérjék közvetlen jelátviteli kapcsolatát és pozitív szabályozó szerepüket a kórokozókkal szembeni védekezés elindításában.
2. Génkifejeződés vizsgálatok és genetikai megközelítések alkalmazásával megállapították, hogy az MKK7-MPK6 modul Arabidopsisban a merisztémaműködés negatív szabályozója.
3. Kialakítottak egy kísérleti rendszert növényi kináz-szubsztrát kölcsönhatások in vivo vizsgálatára és több példán keresztül igazolták annak más módszereknél nagyobb hatékonyságát és érzékenységét.

4. MAP kináz szubsztrátként azonosítottak több, a növényi egyedfejlődés szabályozásban jelentős szerepet játszó fehérjét (WUSCHEL, APETALA2, PINNOID1).
5. Szekvencia analízis és komparatív genomika alkalmazásával meghatározták a növényi MAPK géncsalád evolúciójának meghatározó és specifikus lépéseit. Ehhez kapcsolódva részletesen analizálták a növényi MAPK szekvenciák dokkoló motívumainak evolúcióját.
6. Reverz genetikai megközelítéssel elsőként jellemezték a CrMPK8 és CrMCK1 Chlamydomonas MAP kinázok negatív szabályozó szerepét az oxidatív stresszválaszban.

Az új eredmények bemutatásán túl, az értekezés érdeme, hogy követve a pályázó területen végzett kutatásainak, felfedezéseinek az időrendi sorrendjét jól szemlélteti azt a folyamatot, ahogy az eredmények egymásra épülve elvezettek egy, a növényi MAP kinázok szerkezeti és funkcionális sajátosságait összefoglaló, egységes koncepcióhoz. Pozitívum továbbá, hogy az értekezés végén a jelölt részletesen megvitatja a gyakorlati alkalmazás lehetőségeit.

Az értekezés olvasása során néhány érdeklődő jellegű kérdés merült fel bennem, amiket feltennék a jelöltnek:

1. Az 5.1.1. pontban tárgyalt és az 5. ábrán bemutatott irányított élesztő kéthibrid tesztben számos kináz nem mutatott kölcsönhatást, míg mások igen. Erre magyarázatként a heterológ élesztő rendszer hátrányait, pl. állványfehérjék hiányát hozta fel. Ugyanakkor részletesen tárgyalja ezen fehérjék közvetlen kapcsolódását evolúciósan konzerválódott dokkoló motívumokon keresztül. Nincs-e valamilyen összefüggés az élesztőben kölcsönhatást nem mutató fehérjék ezen motívumainak módosulásai és a kölcsönhatás erőssége között? Vannak-e esetleg olyan jelek, melyek arra utalnak, hogy kovalens poszttranszlációs módosulások szükségesek e motívumok környezetében szabályozva a kölcsönhatást?
2. Ismert-e, hogy mely MKK-típusú kinázok fejeződnek ki és aktívak protoplasztokban? Közismert, hogy a protoplaszt izolálás jelentős stresszhatással, többek között oxidatív stresszhatással, jár. Miért nem indukálja ez önmagában a stressz/H₂O₂-függő MAPK (Pl. MPK6) aktivitást? Az MPK6-nak a 6. ábrán bemutatott MKK3 koexpresszió-hiányában mért alapaktivitása magas, míg más ábrákon alacsony. Lehet ennek az eltérő protoplasztizolálási stressz az oka?
3. A T-DNS inszerció az *mkk3-1* mutánsban a 7. exonba történt. Termel-e a mutáns rövid, trunkált fehérjét és lehetnek-e ennek részlegesen megőrzött funkciói, és esetleg emiatt domináns negatív hatása? Pl. köthet-e szubsztrátot vagy szabályozó fehérjét? Kizárták-e ezt a lehetőséget?
4. A 17., 18., 19. Ábrákon hagyományos WESTERN blot kísérleteket is bemutat egyfajta kontrollként és megállapítja, hogy az nem alkalmas a foszfoizoformák elválasztására és detektálására. Összehasonlították a cIEF immunoassay érzékenységét a Phos-tag gélen történő elválasztást követő immundetektálással?
5. A T108, S112 MAPK foszforilációs helyek milyen doméneket érintenek és hogyan befolyásolhatják a WUS TF működését? Azonosította-e azóta bárki a merisztémaszabályozó TF-ok működésében a MPK-függő foszforilációs módosítások szerepét?

6. A flg22 által kiváltott PIN1 endocitózisnak lehet-e szerepe a növényi védekezési válaszban?
7. A vizsgált *Chlamydomonas* MAPK jelátviteli pálya hiánya okozhat-e a PQ felvételében változást? Erre utalhat, hogy a mutánsok PQ toleranciája koncentráció és időfüggő is (átmeneti). H₂O₂-re is toleránsabbak a mutánsok?
8. Az ismert, hogy a MAPK jelátvitel fontos szerepet játszik az oxidatív-stressz indukált programozott sejthalál folyamatában (pl. a lucerna OMTK1-MMK3 útvonal). A megfigyelései (az *mmk1* és *mpk8* mutánsok nagyobb oxidatív stressz toleranciája és növekedési rátája) alapján elképzelhetőnek tartja-e, a *Chlamydomonas* MKK1-MPK8 jelátviteli modul hasonló szerepét?
9. Többször említi, hogy a növény-specifikus MKK3 NTF2-domént tartalmaz. Ismert-e a domén szerepe a kináz aktivitásának szabályozásában különös tekintettel arra, hogy ez a domén alkalmas kis molekulák vagy más fehérjék kötésére ill. dimerizációra?

Összefoglalva, az értekezés bár formai, elsősorban nyelvi, stilisztikai szempontokból kifogásolható és néhány helyen a pályázó szakmai leírásai felületesek, tudományos eredményeit tekintve az értekezés igen magas színvonalú munka, amely jól tükrözi Dóczy Róbert nemzetközi szinten is kiemelkedő módszertani felkészültségét és tudományos teljesítményét. Összességében az értekezést alkalmasnak tartom a nyilvános vitára.

Szeged, 2023. 05. 21.



Fehér Attila Sándor

az MTA doktora