

MTA doktori pályázat értékelése

Dóczi Róbert

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

A dolgozat 150 oldalon foglalja össze Dr. Dóczi Róbert jellemzően 2004 és 2019 elért tudományos eredményeit. Az értekezés alapjául 14 tekintélyes nemzetközi folyóiratban megjelent tudományos közlemény szolgál, amelyekben Dóczi Róbert 9 esetben első vagy utolsó szerző, 6 esetben levelező szerző. A szerző kumulatív impakt faktora 133, Scopus hivatkozásainak száma 1423. A publikációk száma, minősége és a szerző meghatározó szerepe egyértelműen jelzi, hogy a disszertáció nemzetközi szinten is jelentős eredményeket tárgyal.

A dolgozat a hagyományos disszertációk megszokott tagolását követi. A dolgozat szerkezete letisztult és jól érthető. Dicséretes magyarsággal és precizitással készült a szöveg, hibákat keresve is alig lehet találni.

A doktori értekezésben tárgyalt eredmények:

Kéthibrid módszerrel feltárták MKK3 és a C csoportba tartozó MAPK-ok közötti kapcsolatokat. Az MKK3 jelátviteli pálya vizsgálatával bizonyították, hogy konstitutív aktív MKK3 variáns a C csoportba tartozó MAP kinázok aktiválását mediálja. A legerősebb integrátort, MPK7, kiválasztották és funkcióját tovább vizsgálták. A közvetlen interakciót megerősítve, MKK3 és MPK7 specifikus antitestekkel kölcsönösen ko-immunprecipitálni tudták a fehérjéket növényi kivonatból. Igazolták, hogy *Pseudomonas syringae* fertőzés specifikusan indukálja az MKK3 expressziót és bizonyították az MKK3 szerepét a növényi patogén válaszban. Ezt a megfigyelést alátámasztották azok az eredményeik, amelyek az MKK3 túltermelő vonalakat vizsgálva megmutatták, hogy a túltermelő vonalakban jelentősen megnőtt a *PR1* mRNS szintje, az aktiválódó *PR1* promóter aktivitás növekedése eredményeként. A konstitutív aktív MKK3 variáns kifejező vonalakban a baktérium szignifikánsan kisebb mértékű szaporodást mérték. Az MKK3-MPK7 modul vizsgálata megmutatta, hogy MKK3 irányított MPK7 aktiváció elsősorban reaktív oxigén fajták (ROS) által indukált.

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

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

A MAPK rendszer szerepet játszhat vírus fertőzések elleni védekezésben is?

D csoportba tartozó MKK közül a MKK7 és MKK9 kinázokat választották ki további kísérletek tárgyául, amelyek közül elsősorban a MKK7 esetén sikerült új tudományos eredményeket leírni. Promóter riporter konstrukciók használatával meghatározták a két vizsgált MKK szövet specifikus expresszióját és bizonyították, hogy auxin és az etilén kezelés is egyaránt megemeli elsősorban a MKK7 de ha korlátozottabban is az MKK9 expresszióját is. Továbbiakban elsősorban az MKK7 génre koncentráltak. Az MKK7 fehérje konstitutív túltermelése súlyos fenotípusos anomáliákhoz vezetett így indukálható rendszert használtak a vizsgálataikban. Demonstrálták, hogy a MKK7 fehérje indukált túltermelése mind a hajtáscsúcs mind a gyökércsúcs merisztémáinak leállítását eredményezte és a DNS replikáció iniciációjának megakadályozásához vezetett. Az MKK7-MPK6 modul elemeinek kiütése a csíranövények primordium felületének növekedését okozta de-etiolációs kísérleti rendszerben. Ezzel ellentétben az MKK7 túltermelése a merisztéma aktiváció nagymértékű gátlását idézte elő.

Az MPK6 fehérje túltermelésére van adat? Vélhetően ez is merisztéma aktiváció gátlását idézi elő?

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

Mennyire stressz specifikusok a különböző MKK-MPK modulok?

Kidolgoztak egy új, protoplaszt transziens expressziót követő kapilláris izoelektromos fókuszálással kapcsolt nanofolyadék immuneszten alapuló módszert, amely alkalmas *in vivo* növényi kináz-szubsztrát foszforilációs kölcsönhatások nagy felbontású vizsgálatára. A módszer alkalmazása során a nem aktivált MPK ko-expressziója csak kismértékben idézte elő savasodást ezért a kísérleti rendszerben bakteriális flagellin eredetű flg22 elicitor peptiddel aktiválták MPK-okat. A technológiát felhasználva bizonyították, hogy a merisztéma szerveződés központi szabályozó eleme, a WUSCHEL (WUS) transzkripció faktor az MPK3 szubsztrátja míg az APETALA2 (AP2) transzkripció faktor, virágfejlődés egyik szabályozója, az MPK6 *in vivo* szubsztrátja. Eredményeik arra utalnak, hogy fontos fejlődésbiológiai regulátorok poszttranszlációs módosításai fontos szerepet játszhatnak azok szabályzó aktivitásában.

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

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

Feltárták, hogy MAPK jelátvitel részt vesz a PIN auxin transzporterek poszttranszlációs szabályozásában. Meghatározták a konzervált MAPK foszforilációs helyeket PIN fehérjékben és megmutatták, hogy PIN1 és PIN6 fehérjéket a MPK6 és a MPK4 kinázok képesek foszforilálni. PIN1 fehérje lokalizációját az MPK6 közvetített foszforiláció képes volt befolyásolni.

Több reprezentatív zöldség fajban vizsgálták a növényi MAPK korai evolúcióját és megállapították, hogy a növényi MAPK családok három ősi kináz típusból alakultak ki gén duplikációs események során, amelyek az eredménye virágos növényekre jellemző, négy filogenetikai csoportot alkotó, húsz MAPK kialakulása. Analizálták a növényi MAPK-ok-ra jellemző dokkoló motívumok evolúciós folyamatait.

Két *Chlamydomonas* a MAPK útvonalhoz tartozó gén mutáns verziójának vizsgálatával megmutatták, azok szerepét a ROS válaszban. Eredményeik arra mutatnak, mindkét mutáns vonal ellenállóbb a ROS-al szemben és II. fotokémiai rendszer kevésbé károsodik a stressz hatására.

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

Az általam legfontosabbnak ítélt tudományos eredmények:

MKK3 az MPK7 modul leírása és a patogén válaszban való részvételének bizonyítása. A ROS MKK3 aktivátor szerepének bizonyítása.

A MKK7-MPK6 modul jel közvetítői szerepet tölt be kedvezőtlen környezeti körülmények esetén a merisztéma aktivitásának gátlásán keresztül.

Kidolgoztak egy új technológiát, amely alkalmas növényi kináz-szubsztrát foszforilációs események nagy felbontású vizsgálatára *in vivo*.

Igazolták, a WUSCHEL és APETALA2 fehérjék MAPK-ok általi poszttranszlációs módosításait.

Feltárták, hogy MAPK jelátvitel rendszer szerepét a PIN fehérje család tagjai esetén.

Komparatív genomikai eszközökkel feltárták MAPK géncsalád evolúcióját és működési jellegzetességeit.

A ROS detoxifikáció *Chlamydomonas*-ban MAPK-ok negatív irányú szabályozása alatt áll. Ezeket a legutóbbi eredmények még nem publikáltak, remélhetően a jövőben erre sor kerül.

Összeségében Dóczi Róbert disszertációja fontos új ismereteket szolgáltató, nemzetközi szinten is figyelemre méltó munka. A dolgozat vitára bocsátását javaslom.

Gödöllő, 2023. 06. 22.



Dr. Havelda Zoltán