

Opponensi vélemény

Dr. Reményi Attila

„Fehérje kináz alapú jelátviteli komplexek: szerkezet, funkció, evolúció”

című MTA doktori értekezéséről

Napjainkban már nem kérdéses, hogy a fehérjék poszttranszlációs módosítása a sejtfolyamatok szabályozásának alapvető történése. A poszttranszlációs módosítások közül is kiemelkedik a fehérjék szerin, teronin és tirozin oldalláncain történő reverzibilis foszforilációja, amely fehérje kinázok és foszfatázok által katalizált folyamat. Az egyes enzimek szabályozási mechanizmusainak, ill. az általuk mediált sejtfolyamatokban játszott szerepük feltárása azonban nem egyszerű feladat, hiszen a humán genom megismerését követően kiderült, hogy nagyszámú gén kódol több, mint 500 protein kinázt. A fehérje foszfatázok száma kevesebb, de mai ismeretink szerint ezen enzimek funkcióinak és specifikus szerepeinek megértése sem könnyű feladat.

Reményi Attila MTA doktori pályázatához kapcsolódó kísérleti munkájának fő célkitűzése, hogy az élesztő és humán MAP kinázok jelátviteli mechanizmusait vizsgálja és adatokat szolgáltatson e kiterjedt enzimesalád működésének molekuláris hátterére. Ez a röviden összefoglalt általános célkitűzés azonban nem tükrözi igazán a Jelölt szerkezeti-biológiai kutatásainak nagyívű és szakmailag széles spektrumú igényességét, amit végül a disszertációjában és az azt alátámasztó publikációiban megjelenít. Az általános és a specifikus célkitűzések tudományos aktualitásához kétség nem fér, habár ezek mindössze a kutatási irányokat jelölik ki. A Jelölt ugyanis a disszertációban meglehetősen gördülékeny, egyéni stílusban mutatja be az elért eredményeket és ezek tükrében a célkitűzések változásának dialektikáját. Kiinduló kérdésekként 5 megválaszolendő problémakört vázol. Ezek egyrészt a MAP-kinázokhoz kötődő vázfehérjék kináz aktivitást mediáló hatásának, valamint a MAPK-ok és partner fehérjék kölcsönhatását biztosító dokkoló motívumok azonosításának és azok proteom szintű kiterjesztésének tanulmányozását célozzák. További cél, hogy a MAPK-ok magasabb rendű jelátviteli komplexeiről szerezzen szerkezeti ismereteket, valamint a dokkoló kölcsönhatások tanulmányozását kiterjessze az AGC kinázokra is.

Reményei Attila kutatásai hazai és nemzetközi együttműködési munkán alapulnak, azonban a disszertációt megalapozó közleményei, nem utolsó sorban a szerzői sorrend alapján, a Jelölt vezető szerepét tükrözik a publikációkat megalapozó munkában. Az MTA doktori disszertáció a Jelölt 16 közleményére épül, amelyek között 2 első- és 8 utolsó szerzős publikációt találunk, jelezve a Jelölt alapvető szerepét a témák kidolgozásában. Imponáló, hogy a közlemények többsége igen magas impakt faktorú folyóiratokban (pl. Science, Molecular Cell, Science Signaling, PNAS, EMBO Journal, stb.) jelentek meg és a legalacsonyabb impaktú folyóirat is 3 feletti. Nem mellékesen ez utóbbi a FEBS Journal, amelyről azonban tudjuk, hogy alacsonyabb impaktja

ellenére is nagy elismertségű, igényes tudományos fórum. A Jelölt publikációinak egy másik imponáló ismérve, hogy a disszertációt magalapozó közleményeket közlő folyóiratok összesített impakt faktora 200 feletti. Ezek alapján nem nehéz azt az összegző értékelést adni, hogy Reményi Attila disszertációja magas szinten teljesíti a publikációs követelményeket.

A disszertáció formai szempontból szintén megfelel a követelményeknek, hagyományos fejezeteket (Bevezetés, Célkitűzés, Módszerek, Eredmények, Diskusszió, Irodalomjegyzék) tartalmaz, a „Függelék”-el együtt 100 oldal terjedelmű. Dicséretes, hogy a Jelölt nagyszerűn megtalálta az egyes fejezetek közötti arányokat és az egész disszertációra jellemző gördülékeny írásmódja. A „Módszerek” fejezetben a részleteket tekintve a közleményekhez irányítja az olvasót, ugyanakkor megemlíti olyan kísérleti problémákat és azok megoldását, szerintem helyesen, amiből a szakterületen dolgozó olvasó is profitálhat. A formai kivitelezést bizonyos szempontból azonban rendhagyónak is tartom. A „Diskusszió” ugyanis pl. új, nem közölt eredmények bemutatásával indul és egyéb háttéredmények és hipotézisek is színesítik a bemutatott eredményekről történő gondolkodás menetét. A forma mindezen, véleményem szerint pozitív sajátságai mellett, e fejezet dicséretesen rövid és fókuszált. A formát tekintve egy általános, igaz a bíráló e fázisában már nem korrigálható bíráló megjegyzésem van. Habár a disszertáció magyar nyelven íródott a Jelölt nem tudott néhány esetben elszakadni az angol írásmódtól (pl. Táblázat 1 vagy az ábrák felsorolásánál az „Ábra” szó nagybetűvel történő kezdése), valamint angolból magyarosított szavakat használ (pl. „targetálás”, stb.), amelyek talán elkerülhetők lettek volna. Mindezek ellenére úgy gondolom, hogy a disszertáció kivitelezése példás, didaktikus olvasmányként szolgálhat, pl. minősítés előtt álló hallgatóknak.

Reményi Attila legfontosabb új tudományos eredményei az alábbiakban foglalhatók össze:

1. Élesztő MAP kináz (FUS3) aktiválási mechanizmusát tanulmányozva kimutatta a kinázhoz kötődő vázfehérje (Ste5) aktív szerepét a jelpálya szabályozásában. A Ste5 nem csak kölcsönhatási platformot biztosít a jelátviteli komplexnek, hanem két eltérő kináz interakciós doménon keresztül a jelpálya aktivitását növelheti vagy csökkentheti.
2. Élesztő és humán MAPK jelátviteli hálózatokat tanulmányozva kimutatta rövid (10-15 aminosavból álló), lineáris peptidszakaszok specifikus kötődését a MAPK-okhoz, amelyek meghatározzák az enzimeknek a partnerekkel/szubsztrátokkal kialakuló funkcionális kapcsolatait. Feltárta a MAPK-partner fehérjék között kialakuló dokkoló kölcsönhatások szerkezeti alapjait, amely alapul szolgált MAPK dokkoló motívumok azonosítására a humán proteomban. A dokkoló motívumokat tartalmazó fehérjék a MAPK-ok lehetséges szubsztrátjai, ezért a MAPK-ok szabályozó szerepére irányíthatják a figyelmet eddig még e szempontból nem vizsgált sejtfolyamatokban.

3. Fehérje komplexek (pl. ERK2-RSK1, MKK5-ERK5, MEKK3-MKK5-ERK5) sokoldalú szerkezeti elemzésével bizonyította a dokkoló motívumok jelentőségét a magasabb rendű jelátviteli komplexek szerveződésében és a komplex elemeinek kölcsönhatásában.
4. Elsőként meghatározta az AGC kinázok családjába tartozó NDR/LATS kináz (élesztőben Cbk1) szerkezetét a Mob2 koaktivátor fehérjével komplexben. Kimutatta, hogy a Cbk1 a MAPK-okhoz hasonló dokkoló hasadék által, specifikus dokkoló szekvenciák megkötésére képes, növelve ezzel a szubsztát foszforilációjának hatékonyságát. Az eredmények azt valószínűsítik, hogy az AGC kinázoknál is a MAPK-okhoz hasonló szubsztrát dokkoló mechanizmus létezik, eltérő szerkezeti sajátosságokkal.

A legfontosabb eredmények tételes felsorolása mellett kiemelem a Jelölt innovatív módszertani megközelítését néhány kérdés vizsgálatában. A dokkoló motívumok proteom szintű keresésében a különböző szerkezeti megfontolásokat és ezekhez kapcsolódó módszereket olyan sikeresen egyesítette, hogy a feltárt dokkoló peptidek számát szerencsésen szűkítette és ezek csaknem 90%-a valódi szubsztrátnak bizonyult. Továbbá, e peptidek tesztelésére (megfelelő kölcsönhatási vizsgáló módszer hiányában) kifejlesztett egy új, foszforiláció alapú módszert, amellyel még a különböző kinázokra specifikus szubsztrátokat is elkülönítette.

Az eredményeknek bemutatása és értelmezése során a Jelölt segítségével „körbejárjuk” mindegyik problémakört és megfelelő háttér-információt kapunk az egyes jelenségek magyarázatára és a lehetséges mechanizmusokra. Ha az eredeti közleményeket is tanulmányozzuk, akkor választ kapunk a felmerülő részletkérdések többségére is. Ezután már kevés tér marad a bíráló megjegyzéseknek, kérdéseknek. Mégis, néhány, elsősorban az eredmények szélesebb spektrumú értelmezését segítő választ várok az alábbi felvetésekre.

1. A disszertációban általános állításként fogalmazódik meg, hogy a vázfehérjék szabályozó szerepet játszhatnak a MAPK-ok által közvetített jelátviteli folyamatokban. A diszkusszióban azonban maga a Jelölt mutat rá, hogy pl. a JIP1-JNK kapcsolatban a JIP1 vázfehérjének nincs hasonló szabályozó szerepe. Kérdezem, hogy a kísérletek óta összegyűlt adatok alapján mennyire általános a MAPK-okkal kölcsönható váz- vagy más kölcsönható fehérjék élesztő Ste5 fehérjéhez hasonló „allosztérikus” hatása?

E kérdéskörhöz van egy másik megjegyzésem/kérdésem. A Ste5 vázfehérjét a Jelölt „koenzimként” aposztrofálja a tézisekben, amely elnevezést tiszteletteljesen vitatnék és várom a Jelölt megjegyzésemre adott ellenvetését vagy egyetértését.

2. Ismételten megállapítom, hogy a jelölt mélyreható és nehezen kifogásolható szerkezeti vizsgálatokat folytatott. Ez azonban nem zárja ki, hogy a tématerületen mérsékelten jártas bírálóban nem merülhetnek fel olyan kérdések, amelyek megválaszolására készíti a Jelöltet. Értelmezésem szerint a dokkoló peptidek és a MAPK-ok röntgendiffrakciós elemzése inaktív MAPK-peptid komplexen történt. Kérdésem, hogy az aktivációs hurokban történő foszforiláció nem befolyásolja-e a MAPK-dokkoló peptid kölcsönhatást? Tudjuk, hogy e vizsgálatok foszforilált enzimekkel valószínűleg nem lehetségesek. Feloldható-e a probléma foszforilációt mimikáló mutánsok alkalmazásával és van-e saját vagy irodalmi adat ilyen kísérletekre?
3. A következő kérdésnek lehet napi aktualitása, de az is lehet, hogy „jövőbe mutató” és egy másik szabályozási lehetőségre irányítja a figyelmet. Van-e a MAPK-okat defoszforiláló foszfatázoknak a szubsztrátokhoz hasonló dokkoló motívuma, azaz a modularitás kiterjed-e a kináz defoszforilációval történő inaktiválási folyamataira is?
4. Terápiás lehetőségeket is feszeget a következő kérdés. A dokkoló motívumok feltárt kötődési sajátosságai lehetőséget teremtenek-e a különböző MAPK-ok specifikus gátlására szubsztrátanalóg peptidekkel? Fellelhetők-e az irodalomban kísérletek ilyen farmakológiai jelentőséggel bíró peptidekkel és alkalmazhatók-e ezek terápiás célokra?

A felvetett kérdések a fő tudományos eredményeket és megállapításokat nem kérdőjelezik meg. Reményi Attila MTA doktori értekezése formai és tartalmi szempontból is magas színvonalon eleget tesz az MTA doktori fokozat követelményeinek. Tudományos értekezésében a MAPK jelátviteli rendszer enzimeinek modern szerkezeti/funkció/evolúció összefüggéseire vonatkozó kutatásainak nemzetközi szinten is elismert eredményeit foglalta össze, amelyből kitűnik egyéni és eredeti tudományos hozzájárulása a vizsgált témához.

Összegezve, Reményi Attila doktori értekezésének nyilvános vitára történő kitűzését feltétlen javaslom.

Debrecen, 2017. február 20.



Dr. Erdődi Ferenc

MTA doktora