

Válasz Dr. Fehér Attila Sándor, az MTA doktora bírálataira

Először is nagyon köszönöm Dr. Fehér Attilának dolgozatom értékelésére fordított idejét és fáradtságát, gondos bírálatát, az elismerő véleményét és a hiányosságokra vonatkozó kritikákat is.

A nyelvtani, fogalmazási problémákkal kapcsolatban tapasztalt hiányosságokért elnézést kérek. A „patogénválasz”, „patogén jelátviteli pálya”, stb. kifejezések önmagukban ugyan valóban félreérthetőek, a kontextus viszont véleményem szerint egyértelművé teszi, hogy a patogenezishez kapcsolódó növényi folyamatokról esik szó. Az angol nyelvű növénykörtani szakirodalomban elterjedt az ezeknek megfelelő kifejezések használata. Példaként, a Mundy és kollégái által jegyzett egyik kulcsfontosságú áttekintő tanulmányban (Annu Rev Plant Biol. 2010;61:621-49) a „pathogen responses” hat, a „pathogen defence(s)” két, míg a „pathogen signaling” egy helyen szerepel a növényi MAPK jelátviteli folyamatokkal kapcsolatban.

A kis- és nagybetűk használata az ábrarészek hivatkozásaiban és az ábrákon valóban inkonzisztens.

Az irodalmi áttekintés strukturálása nehéz kihívást jelentett abból a szempontból, hogy míg a MAPK jelátvitel bemutatása tartalmi és terjedelmi szempontból is egyértelmű volt, addig azoknak a szerteágazó folyamatoknak az ismertetése amelyekben a MAPK jelátvitelnek szerepe van, messze meghaladja ezen fejezet korlátait, hiszen ez mára gyakorlatilag a növénytudomány szinte minden területét felöleli. Ennek feloldásaként természetesen egyrészt törekedtem az eredményekben szereplő folyamatokra fókuszálni, másrészt, ahol a gondolatmenet folyamatossága inkább úgy indokolta, bizonyos jelenségek irodalmi háttérét a dolgozat más fejezeteiben ismertettem tömören. Minderre a Bevezetés fejezetben, az 5. oldalon konkrétan fel is hívtam az Olvasó figyelmét: „Dolgozatom „Irodalmi Áttekintés” részében azokat az ismereteket foglalom össze, amelyek a bemutatott eredmények háttéréül szolgálnak, elsősorban a jelátviteli kutatások tükrében. Mivel kutatásaink a növénytudomány eltérő területeit érintő eredményekhez vezettek, az azokra vonatkozó irodalmat a gondolatmenet érthetőségét biztosító mélységben igyekeztem feldolgozni a dolgozat egészében.”

A dolgozat tematikáját alapvetően átszövi a növényfejlődés környezeti plaszticitása. A gravitropikus szabályozás egy meglehetősen jól tanulmányozott modellrendszer a környezeti-növekedési kapcsolat kutatására, amelyben a PIN auxin transzporterek meghatározó szerepet játszanak. Mivel eredményeink jelentős része a PIN fehérjék MAPK általi foszforilációjához kapcsolódik, úgy ítélem meg, hogy míg a poláris auxin transzport és a PIN fehérjék működésére vonatkozó terjedelmes szakirodalom részletes bemutatása az adott keretek között nem reális, addig az agravitropizmus, mint jelenség nagyon jól illusztrálja a környezeti plaszticitást és egyben a poláris auxin transzport ebben betöltött szerepét is. Ezzel együtt, Kazan és Manners 2009-es összefoglaló cikke egy fontos forrás, az MKK7 jelpálya merisztémaszabályozó funkcióját bemutató publikációmban (Front Plant Sci. 2019;10:202) idéztük is, de természetesen a dolgozat megírásakor valóban hasznos lett volna megemlíteni az auxin szerepét a biotikus interakciókban is. Ezzel szemben a növényi védekezési rendszerek bemutatásánál az általunk is vizsgált PTI folyamatok részletesebb leírása mellett az ETI és az R proteinek egy-egy pár mondatos bemutatását azért tartottam indokoltnak, annak ellenére, hogy saját eredményeink ezeket a jelenségeket nem érintik, mert a PTI mellett kialakult figyelemreméltó evolúciós fegyverkezési verseny véleményem szerint alapvetően hozzátartozik a teljes képhez.

A módszerek leírására vonatkozóan nincs egyértelmű irányelv, tapasztalataim szerint e fejezet mélysége az elfogadott dolgozatok között is szélsőségesen ingadozó. Az eredeti közleményeknél jogosan elvárható reprodukálhatósági követelménynek igencsak körülményes ebben a formátumban megfelelni, elsődleges célom az alkalmazott módszertani paletta alapos bemutatása volt.

Az FLS2 receptor komplex leírására vonatkozó kritikát elfogadom, valóban helyesebb az asszociáció kifejezés, a BIK1 helyett a „foszforilált BAK1” pedig egy sajnálatos elírás, ami a szöveggörnyezetből („ az aktív BAK1 foszforilálja az FLS2-t és a BIK1-et (Botrytis-induced kinase 1)”) talán érzékelhető is.

Az első ábra valóban nem mutatja be a jelátviteli fehérjék által szabályozott, nem transzkripciós faktor jellegű effektor fehérjéket, viszont az ábralírásban jeleztem, hogy a sejtmagi transzkripciós faktorok módosítása a kaskádok által alkotott jelpályáknak csak az egyik lehetséges kimeneti módja. Ugyanakkor teljes mértékben elfogadom a kimeneti hatással kapcsolatos óvatosságra intő tanácsot, annál is inkább hiszen saját kutatásaink egyik legfontosabb eredménye is egy membrán transzporter jelátviteli modulációjára vonatkozik.

A 16. oldalon írtakkal kapcsolatban: a foszforiláció természetesen közvetlenül az érintett aminosavak kémiai tulajdonságait változtatja meg, ennek azonban biológiai következménye a funkció megváltozása, hiszen minden fehérjefunkció alapvetően az aminosavak kémiai tulajdonságainak eredményeként jön létre. A poszttranszlációs módosítások ezen tulajdonságok gyors modulálását teszik lehetővé, és éppen ezek a funkcionális következmények képezik szelekció tárgyát is az evolúció során, ami végső soron lehetővé tette a komplex regulációs rendszerek kialakulását.

Ugyanezen az oldalon, a tirozin foszforilációval kapcsolatos pontosításokat teljes mértékben elfogadom, a „ritka” jelző valóban felületes fogalmazás, a receptor kinázokra vonatkozó kijelentés pedig hiányos, csak az alaposan tanulmányozott állati rendszerekre vonatkozik, anélkül, hogy ez egyértelműsítve lett volna.

A 19. oldalon Manning és mtsai humán kinomról szóló cikkét a MAPK proteinek filogenetikai viszonyrendszerének leírásával kapcsolatban idéztem, így úgy vélem, hogy ebben a kontextusban ez a megfelelő referencia.

78. oldal: Amit igyekeztem kihangsúlyozni, az az, hogy egy genetikailag ilyen alaposan tanulmányozott rendszer részét képező egyik gén által kódolt fehérje komplex foszforilációs módosítását igazoltuk kísérletesen, ennek fényében választottam a két referenciát is: a nagy hatású eredeti közleményt és egy, az ABC modell távlati jelentőségét bemutató összefoglalót. Mindemellet, ahogy ez a biológiában gyakori, az AP2 különböző szabályozó funkcióit írták le, ez a funkcionális diverzitás valóban szintén megemlíthető lett volna.

112. oldal: Bár a megfogalmazásból ez valóban nem egyértelmű, itt igyekeztem bemutatni, hogy más MKK csoportoktól eltérően, az ősi MKK3 variáns nem duplikálódott (vagyis a B csoportnak csak ez az egy tagja van), de természetesen az MKK közös őshöz képest neofunkcionalizálódott, a többi, a sorozatos génduplikációk eredményeként kialakult MKK-hoz hasonlóan.

Ugyanitt: Sajnálatos, hogy a CLV jelátvitel modelljét nem az aktuális eredmények tükrében mutattam be. Viszont annál érdekesebb, hogy habár ez a rendszer nem igazán analóg az állati receptor kináz komplexekhez, mégis, a korai hipotéziseknek megfelelően, MAPK jelátvitel aktivációt eredményez.

114. oldal: az összeomlás helyett valóban szerencsésebb lett volna pl. a „súlyos károsodás” kifejezés használata.

115. oldal: köszönöm a pontosítást, alapvetően arra szándékoztam utalni, hogy pl. az ER vagy Golgi rendszerekbe történő belépésnél lehet szerepe a MAPK általi foszforilációnak, és ennek zavara eredményezheti a megfigyelt intracelluláris aggregátumokat.

116. oldal: Köszönöm a lokalizációra vonatkozó pontosítást, az MPK6 természetesen valóban nem membránfehérje, a hivatkozott cikkben is az szerepel, hogy a transz-Golgi rendszerhez és a plazmamembránhoz (ban/ben helyett) lokalizálódik, a pontatlan fordítás az én figyelmetlenségem következménye.

A kérdésekre adott válaszaim:

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?

Az élesztő kéthibrid kísérleti rendszer sajátosságai az általános elfogadott nézetek szerint hozzájárulhatnak fals negatív eredményekhez. A Bíráló által a dokkoló helyekre vonatkozó felvetéseket ugyanakkor nagyon releváns elképzelésnek tartom. Például a kéthibrid rendszerben semmilyen kölcsönhatást nem mutató D csoport MAP kinázok dokkoló motívumai valóban több kulcspozícióban szisztematikusan eltérnek a kanonikus szekvenciától. Továbbá, az MKK1 csak gyenge kölcsönhatásokat mutatott. Ez a szekvencia a dolgozatban ismertett analízis szerint nem tartalmaz D motívumot. A jelenlegi ELM adatbázis szerint pedig egy atipikus D motívum található az N terminálisonál, ami csak egy darab töltéssel rendelkező aminosavat tartalmaz (DOC_MAPK_DCC_7). Ugyanakkor fontos megjegyezni, hogy vannak olyan kinázok is, amelyek annak ellenére nem mutatnak ebben a rendszerben kölcsönhatást, hogy a kanonikus motívum megtalálható bennük. Feltételezhető, hogy különböző kölcsönhatások eltérő mechanizmusok által jönnek létre, esteleg többféle mechanizmus eredőjeként. Például, egy 2023 májusában megjelent közlemény szerint az MPK4 Cys181 aminosav reaktív oxigénformáktól függő szulfenilációja befolyásolja az MKK2 interakció létrejöttét (New Phytol. 2023;239(3):1112-1126). A pozíció konzerváltsága felveti a mechanizmus széleskörű elterjedését. Mindazonáltal, a növényi MAPK kölcsönhatások fehérjebiokémiai mechanizmusaira vonatkozó ismereteink meglehetősen korlátozottak, hiszen maguk a hálózatok feltérképezése is hiányos, így nagy mértékben valószínűsíthető, hogy további kutatások eredményeként újabb, az interakciókat befolyásoló mechanizmusokra derül fény. Pl. az említett MKK1 atipikus D

motívum környezetében számos potenciális posztranszlációs motívum található (pl. GSK3, PIKK, PKA foszforilációs helyek).

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.a ábrán bemutatott MKK3 koexpresszió-hiányában mért alapaktivitása magas, míg más ábrákon alacsony. Lehet ennek az eltérő protoplaszt izolálási stressz az oka?

Saját és szakirodalmi eredmények alapján valamennyi MKK kifejezhető protoplasztban, az MKK8 kivételével. Az MKK8 szabályozásában jelentős szerepet játszhat a proteindegradáció folyamata, mivel csak proteaszóma gátló kezelést követően volt kimutatható a myc fúziós MKK8 protein. Az MKK-k aktivitását kísérletileg nehezebb igazolni, mint a MAP kinázokét, mivel egyrészt ezeknek nincs az MBP-hez hasonlóan használható általános mesterséges szubsztrátjuk, másrészt aktiválásuk is körülményesebb felső MAP3K ko-expresszióval és/vagy külső stimulussal. Mindazonáltal a jobban jellemzett MKK-k aktivitását már kimutatták protoplaszt rendszerben (pl. MKK1 (Plant J. 2006 48(4):485-98), MKK2 (Mol Cell. 2004;15(1):141-52), MKK3 (Plant Cell. 2007;19(10):3266-79, MKK4) (Nature. 2002;415(6875):977-83).

A protoplasztálás által okozott stresszhatás kizárására a transzformációt követően a protoplasztokat éjszakán át (~16 h) pihentettük, illetve a különböző aktiváló tényezők mellett (pl. MKK ko-expresszió vagy stresszhatás) a kísérletek mindig tartalmaztak nem ko-expresszált, kezeltlen negatív kontrollokat is. Az MPK6 stabilitása és alapaktivitása a legtöbb MAPK-hoz képest valamivel magasabb, ez jól ismert jelenség, ez azonban igen nagy mértékben fokozható akár MKK4 ko-expresszióval, akár H₂O₂ vagy flg22 kezeléssel. A 6.a ábrán egy hosszabb ideig exponált autoradiogram látható, hogy a kísérletben szereplő valamennyi MAPK aktivitása látható legyen. A többi ábrán viszont aktivált MPK6 minták is szerepelnek, amelyek rövidebb expozíciós idő mellett is jelentős jelintenzitást eredményeztek.

3. A T-DNS inszerció az *mkk3-1* mutánsban a 7 exonba történt. Termel-e a mutáns rövid, turkált fehérjét es lehetnek-e ennek részlegesen megőrzött funkciói, és esetleg emiatt domináns negatív hatása? PI. köthet-e, szubsztrátot vagy szabályozó fehérjét? Kizárták-e ezt a lehetőséget?

A rendelkezésre álló kísérleti eredmények alapján nem zárható ki teljes mértékben egy csonka N terminális fehérjeváltozat jelenléte. Az *mkk3-1* mutáns ellentétes szenzitivitást mutatott az aktív pontmutáns változatot expresszálo vonalakhoz képest, ami arra utal, hogy a mutáció funkcióvesztéssel jár, így a funkcionalitás megismerésében hasznos eszköz. A vad típusú MKK3 túlexpressziója nem eredményezett fenotípus változást ebben a rendszerben, ami arra utal, hogy a fehérje kompetíció valószínűleg nem befolyásolja az MKK3 ezen funkcionalitását. A kísérletekben *mkk3-1* homozigóta növényeket használtunk, így a domináns negatív hatás nem jelentkezhett.

A TAIR adatbázisban számos további mutáns elérhető, ezek némelyike alkalmas lehet az *MKK3* gén további funkcionális jellemzésére.

4. A 17., 18., 19. Ábrákon hagyományos WESTERN blot kísérleteket is bemutat egyfajta kontrollként és megállapítja, hogy az nem alkalmas a foszfoizofomák elválasztására és detektálására. Összehasonlították a cIEF immunoassay érzékenységét a Phos-tag gélen történő elválasztást követő immundetektálással?

Amint arra a szakirodalomban is sok példa található, a Phos-tag módszer alkalmas lehet számos fehérje foszfoizoformáinak elválasztására. Valójában kezdetben magunk is ezzel a módszerrel próbálkoztunk a WUS foszforiláció kimutatására. Sajnos ezek az immunblot eredmények meglehetősen nehezen értelmezhetőek voltak, hiszen a WUS standard Western blot kísérletben is számos, MG-115 függően jelentkező, abundáns izoformában detektálható. Az AP2 esetében szintén számos abundáns izoforma detektálható. Véleményem szerint a Phos-tag módszer alapvetően olyan fehérjék esetében alkalmazható jól, ahol meghatározó egy (domináns) izoforma, illetve annak változása.

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?

A T108 és S112 aminosav pozíciók a homeodoméntól C terminális irányban, egy kevésbé konzervált, funkcionális domént nem képező szekvenciaszakaszban találhatóak (BMC Plant Biol. 2016;16(1):204; Függelék S5 ábra). Szekvenciaillesztés alapján a tandem foszforilációs hely pozíciója a Brassicaceae családban jól konzervált, más fajokban a homeodoméntól kissé távolabb található, egyes fajokban (szőlő, kukorica) pedig egy harmadik S/TP hely is megjelenik.

Legjobb tudomásom szerint a WUS foszforiláció funkcionális jelentőségét nem azonosították. Ilyen irányú kutatások céljából elkészítettük a *wus* mutáns komplementációra alkalmas *ProWUS:GFP:WUS* transzformációs konstrukciókat vad típusú, nem foszforilálható és foszfomimetikus változatokban is, azonban erőforrás hiányában ezt a kutatási irányt nem tudtuk folytatni. Protoplaszt rendszerben megállapítottuk, hogy ezek a mutációk a WUS fehérje alapvetően nukleáris lokalizációját nem befolyásolják.

6. A flg22 által kiváltot PIN1 endocitózisnak lehet-e szerepe a növényi védekezési válaszban?

A MAPK általi PIN foszforiláció funkciója alapvetően nem tisztázott, feltehetőleg része a komplex védekezési válaszok finomhangolásának. Az auxin és a patogének elleni védekező mechanizmusok kapcsolata többrétű, és alapvetően eltér biotróf és nekrotrof kórokozók esetében. Az auxin a szalicilsav függő védekezési mechanizmusokat, mint pl. a *PRI* indukció, elnyomja, az auxin jelátvitelt blokkoló *axr2* mutáció fokozott *P. syringae* rezisztenciát eredményez (pl. Curr Biol. 2007;17(20):1784-90). Ennek fényében elképzelhető, hogy az auxin transzport gátlása a növényi szövetekben (vagy azok bizonyos részében) összességében az auxin szint csökkenéséhez vezet, ezáltal csökkentve a szalicilsav jelátvitel gátlását.

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?

A rendelkezésére álló eredmények alapján a kérdés nem válaszolható meg egyértelműen. Ezek alapján arra fókuszálnék elsősorban, hogy a MAPK mutáns vonalakban a Foyer-Halliwell-Asada pathway génjei PQT kezelés nélkül is eltérő (magasabb) expressziós szintet mutatnak, ami azt mutatja, hogy ezen gének a MAPK jelátvitel negatív szabályozása alatt állnak. Természetesen ez nem zárja ki annak a lehetőségét, hogy a MAPK jelátvitel a PQT felvételben érintett géneket is szabályoz. A rezisztencia átmenetiségét én alapvetően azzal magyaráznám, hogy a negatív szabályozó mechanizmus hiánya eleinte a hardeninghez hasonló módon, magasabb toleranciát biztosít a védekezési folyamatok deregulációján keresztül, azonban idővel a pozitív szabályozó mechanizmusok a stressz érzékelésének

megfelelően indukálják a védekező mechanizmusokat. Így a vizsgált ROS metabolikus funkciójú gének PQT indukciója 24 óránál alapvetően a vad típuséhoz hasonló lesz.

A H₂O₂ toleranciát is teszteltük, azonban a korai időpontokban inkonzisztens eredményeket kaptunk, a későbbi időpontokban pedig nem mutattak különbséget az eltérő genotípusok. Feltételezésünk szerint ennek oka valószínűleg a H₂O₂ molekula instabilitása lehetett.

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?

Az indukált programozott sejthalál alapvetően többsejtű élőlények esetében kialakult stratégia, ilyen pl. a hiperszenzitív válasz (HR), ami egy fontos növényi patogén rezisztencia mechanizmus. Az, hogy mi lehet a „fordított” szabályozási funkció, vagyis az oxidatív stressz válasz negatív szabályozásának kialakulásának az evolúciós oka, valószínűleg a fotoszintetikus mikroalgák sajátos életmódjával függ össze. Pl., mivel reaktív oxigénformák a fotoszintézis vagy az oxidatív foszforiláció melléktermékeként is keletkezhetnek, és mivel a mikroalgák motilisak, elképzelhető, hogy ennek a jelátvitelnek a kemotaxis és/vagy fototaxis hangolásában lehet szerepe.

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?

Habár ezeket az eredményeket a dolgozatban nem mutattam be, az NTF2 doménnek valóban van szerepe az MKK3 MAPK interakcióinak kialakításában (Plant Cell. 2007;19(10):3266-79; Függelék, S2 ábra). Elkészítettük az MKK3 olyan csonkolt változatát tartalmazó konstrukciót is, amely nem tartalmazza az NTF2 domént (MKK3ΔNTF2). Ez a doménvesztés jelentősen csökkentette az MKK3 MAPK interakciós képességét: az MPK7 kölcsönhatás erőssége jelentősen csökkent, míg az MPK1/2-vel mutatott gyengébb kölcsönhatások teljesen megszűntek.

Ez a jelenség egyben további példa az első kérdésben felvetett, a kanonikus CD – D hely motívumokon kívüli fehérjeszekvenciák szerepére az MKK-MAPK interakciók komplex rendszerében.

Remélem a válaszaim kielégítőek. Végül még egyszer szeretném megköszönni Dr. Fehér Attila érdeklődését a dolgozatomban bemutatott munka iránt, hasznos és alapos bírálatát.

Budapest, 2023. szeptember 10.

Dóczi Róbert