

Válasz Dr. Szabados László, az MTA doktora bírálatára

Először is nagyon köszönöm Dr. Szabados Lászlónak dolgozatom értékelésére fordított idejét és fáradságát, gondos bírálatát, az elismerő véleményét és a gondolatébresztő kérdéseket is.

A bírálatban megfogalmazott kérdéseire az alábbiakban válaszolok.

Az 5. Ábrán a MPK és MKK élesztő kéthibrid rendszerben kimutatott kölcsönhatásait mutatja. Mind a MPK mind a MKK csoportban (D csoport) több kínáznak 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.

Az élesztő kéthibrid rendszer, mint kísérleti módszer előnyei és hátrányai is jól ismertek (Plant Physiol. 2016;171(2):727-58). A fals negatív eredmények oka lehet, többek között, az interakcióhoz szükséges állványfehérjék, poszttranszlációs módosítások hiánya, a kiméra fehérjék szerkezete (sztérikus gátlás), nem megfelelő folding, vagy az interakció tranziens természete.

A MAPK – MKK kölcsönhatásokat számos módszerrel vizsgálták, ezek az eredmények publikus protein hálózati adatbázisokban is elérhetőek, mint pl. IntAct, BioGrid vagy PSICQUIC. A MAPK hálózatok komparatív evolúciós vizsgálata céljából mi is ezen adatbázisok használatával, valamint egyéni publikációkból gyűjtöttük egybe a fizikai protein-protein kölcsönhatásokat és biokémiai aktivációkat élesztő, humán és Arabidopsis rendszerekben. Valamennyi kölcsönhatást leíró referencia elérhető online (Trends Plant Sci. 2012;17:518-25; Függelék S3 Táblázat). Ezeket a kapcsolatokat az 30. ábrán vizualizáltuk. Ezen eredmények alapján nemcsak, hogy a legtöbb kínáznak van legalább egy partnere, hanem az is egyértelmű, hogy a virágos növények MAPK hálózata amellet, hogy több elemből áll, sokkal nagyobb mértékben konnektált, mint az élesztő vagy állati hálózatok. A jelpályák szeparációjának hiányát jól indokolhatja a növényekre jellemző dinamikus kapcsolat a környezeti ingerek és fejlődési válaszok között.

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?

Az ismert MAPK lokalizációk megfelelnek a szignál transzdukcióban betöltött funkcióknak: alapvetően a citoplazmában és a sejtmagban lokalizálhatók (lásd pl. www.uniprot.org). A MAPK interakciók vizsgálatára használt eszköztárban a mikroszkópos fragmentum komplementációs módszerek egyértelműen alulreprezentáltak. A PSICQUIC adatbázisban jelenleg (2023 augusztus) 587, 431 és 482 bináris interakció adatpont található az MPK3, MPK6 és MPK4 proteinekhez. Bár ezen adatpontok redundanciája magas az adatbázisban, mégis mindegyik protein esetében kevesebb mint tíz adatpont alapul fragmentum komplementációs módszeren.

Az AP2C1 foszfatáz MPK4-gyel a nukleuszban, MPK6-tal a nukleuszban és a citoplazmában képzett detektálható komplexet (Plant Cell. 2007;19(7):2213-24). A HSFA4A hőszokk faktor elsősorban a nukleuszban, de alkalmanként a citoplazmában is detektálható volt MPK3/MPK6 komplexben (Plant Physiol. 2014;165(1):319-34). Az MPK6 az ERF104 transzkripciós faktorról a nukleuszban, az MKK4 aktivátor kinázzal a nukleuszban és a citoplazmában hoz létre komplexet (Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106(19):8067-72). A DRB1/HYL1 kettősszalú RNS kötő fehérje az MPK3-mal nukleáris komplexet képez, csakúgy mint ezek rizs homológjai (FEBS J. 2015;282(3):521-36). Az MPK4 az MKK1/MKK2 aktivátor kinázokkal a nukleuszban és a plazma membránon is kimutatható volt komplexben (Cell Res. 2008;18(12):1190-8). Érdekes módon, az MPK6-AGB1 (G protein alegység) interakció csak a nukleuszban volt detektálható, míg mindkét fehérje GFP fúziós változata egyaránt jelen volt a nukleuszban és citoplazmában is, vagyis a ko-lokalizáció szükséges de nem elégséges feltétele az interakciónak, ami logikus is, hiszen mindkét kompartmentben nagy számú potenciális interakciós partner lokalizálódik (PLoS One. 2015;10(1):e0116385). Mindezek alapján a lokalizáció nem tűnik az interakciók kritikus determinánsának, de természetesen a kompartmentalizáció szerepet játszhat a szabályozásban. A fehérjelokalizáció egy dinamikus folyamat, pl. osztódó gyökérsejtekben az MPK4 a sejtlemezen található (Plant Cell. 2010;22(11):3778-90), az MPK6 pedig a preprofázisos köteghez, a fragmoplaszthoz, a transz-Golgi hálózathoz és a plazmamembránhoz is asszociál (Plant J. 2010;61(2):234-48). Ez a fajta dinamizmus szerepet játszhat bizonyos specifikus körülmények között létrejövő interakciók kialakításában.

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

Mivel bizonyos kölcsönhatások detektálhatók kéthibrid rendszerben, így azok bizonyára nem tranzienst jellegű interakciók.

A tranzienst kölcsönhatások azonosítása technikailag kihívást jelent, mivel nem képeznek elegendő mennyiségű komplexet, és hagyományos megközelítésekkel sem *in vitro*, sem *in vivo* nem detektálhatóak könnyen (Protein Eng Des Sel. 2011;24(9):635-48). Gyenge kölcsönhatások kimutatására a megengedőbb reakciókörülményekkel és gyorsabb kivonással járó technikák lehetnek alkalmasak. A kölcsönhatás kinetikáját a disszociációs egyensúlyi állandó meghatározásával jellemzik. Gyenge és tranzienst kölcsönhatások esetében pl. a mágneses magrezonancia spektroszkópia (NMR), a Förster-féle rezonáns energiaátadás (Förster resonance energy transfer) (FRET), vagy a felületi plazmon rezonancia (surface plasmon resonance) (SPR) alkalmazása lehet járható.

Kináz interakciók esetében a tranzienst jellegű kölcsönhatások vizsgálatára a széles körben használt *in vitro* kináz tesztek is alkalmasak, hiszen a foszfatáz gátlókkal kiegészített reakcióelegyben az átmeneti kölcsönhatások eredményeként megjelenő foszforilált fehérjeformák is akumulálódnak és egyszerűen detektálhatóak, pl. autográfiával.

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?

Ennek a kérdésnek a megválaszolásához szerintem abból érdemes kiindulni, hogy mit ismerünk és mit nem, az Opisthokonta és a növényi MAPK jelátvitel szerveződésével kapcsolatban. A kétféle rendszer konnektivitása eltérő, az Opisthokonta MAPK jelpályák jobban szeparáltak, a növényi hálózat sokkal magasabb konnektivitású. A jelpályák működése és funkciói az Opisthokonta rendszerekben nagyon jól

jellemzettek, ezzel szemben a növényeknél a legtöbb ismeretünk néhány jobban jellemzett kinázra és kapcsolataikra koncentrálódik.

Amit azonban ezen kinázok működéséről megismertünk, azok szinte kivétel nélkül nagyfokú multifunkcionalitást igazolnak, valamennyi jól jellemzett kináz a biológiai folyamatok széles skálájában részt vesz, már az eddigi ismereteink alapján is. Talán a specializálódott jelpályák hiányának tudható be az is, hogy a növényes szakirodalomban az egyes MAPK-MKK kapcsolatokat leíró „modul” kifejezés egyre inkább elterjedni látszik.

A stressz reakciók és a fejlődés összekapcsolása a helyhez kötött növényi életforma egyik alapvető tulajdonsága, véleményem szerint a növényi MAPK hálózat evolúciósan a növekedés környezeti plaszticitásának szabályozó mechanizmusaként alakulhatott ki, a folyamat egyik kulcsfontosságú molekuláris mechanizmusaként. Így elképzelhetőnek tartom, hogy igazából ugyanannak az alapvető funkcionalitásnak két arcát látjuk a különböző kísérleti rendszerekben.

Mindazonáltal, egyértelműen léteznek a specificitást biztosító mechanizmusok növényekben is, és feltételezhető továbbiak felfedezése is a jövőben. Az Opisthokonta rendszerekben megismert alapvető specificitási mechanizmusokra, mint a szelektív aktiválás állványfehérjék által, a kompartmentalizáció, a kombinatorikus jelátvitel és a jelpályák keresztgátlása, a növényvilágban is vannak ismert példák (FEBS Open Bio. 2023;13(7):1177-1192).

Ezen kívül, többféle különlegesnek tekinthető specificitási mechanizmus létezik növényekben. Például, további regulációs rétegek megjelenése hozzájárulhat a specificitás biztosításához. Erre jó példa az MKK3-MPK8 kapcsolat, ami az MKK3 más típusú MAPK kapcsolataihoz képest még Ca^{2+} függő kalmodulin kötést is igényel a teljes aktivitáshoz (Mol Cell. 2011;41(6):649-60). Hasonlóan, a MAPK jelátvitel komponensek térbeli-időbeli szétválasztása génexpressziós szinten is elérhető. A paralóg MAPK génpárokra valóban jellemző, hogy differenciális szabályozás alatt állnak (New Phytol. 2008;179(3):643-662, Plant J. 2011;67(5):895-906). Ráadásul, az ACS-aktivitás MPK3/MPK6 általi szabályozása mind transzkripciós, mind fehérje stabilitási szinten, szerepet játszik az etilén indukció kinetikájának és mértékének meghatározásában (PLoS Genet. 2012;8(6):e1002767). Ezenkívül a szárazföldi növényekben a D csoportú MAP kinázok egy szokatlan, ismeretlen funkciójú C-terminális doménnel rendelkeznek, amely szintén hozzájárulhat a specificitás kialakításához is.

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 MAP3K családnak sokkal több tagja van, és filogenetikailag is sokkal heterogénebb, mint a MAPK és MKK szintek. Alapvetően két fő csoportra oszthatóak. A MEKK szerű csoport kináz doménjei jelentős hasonlóságot mutatnak a tipikus MAP3K-khoz, mint például a MEKK/STE11/BCK1 (pl. ANP, YODA). A Raf szerű csoport filogenetikailag határozottan elkülönül, tagjaira jellemző a nagyobb méretű N-terminális domén jelenléte (pl. CTR1, EDR1).

A nagyszámú MAP3K közül néhány kapcsolatát a jól jellemzett MKK-MAPK modulokhoz részletesen tanulmányozták. Pl. az első leírt növényi MAPK jelpálya a bakteriális flagellin elicitor jelátvitelében játszik szerepet Arabidopsisban, a MAPK kaszkád a MEKK1-MKK4/5-MPK3/6 komponensekből áll (Nature. 2002;415(6875):977-83). Az MKK4/5-MPK3/6 modul további MAP3K kapcsolatai is ismertek. A MEKK típusú MAP3K4 (YODA) a sztómafejlődésben (Plant Cell. 2007;19(1):63-73), a MAP3K3/5 pedig a patogén rezisztencia kialakításában (EMBO Rep. 2018;19(7):e45324) játszik szerepet. A Raf típusú EDR1 a biotikus stressz rezisztencia negatív regulátora (PLoS Genet. 2014;10(5):e1004389). Egy másik Raf típusú kináz, a MAP3Kδ-1 pedig az MKK1/5-MPK3/6 modulon

keresztül szabályozza mind a bakteriális, mind a gombás fertőzésekkel szembeni reakciókat (J Exp Bot. 2020;71(6):2085-2097).

Az MKK7-MPK6 modul felső aktivátora azonban ismeretlen. Az MKK-k aktivációja a T/SXXXXXT/S foszforilációs helyen keresztül történik, azonban az MKK7 foszforilációs helyének harmadik pozíciójában aszparaginsav található (SLDYCNS). Az ilyen MKK-k autoaktivitással is rendelkezhetnek (Plant Cell. 2002;14(3):703-11, Plant Cell. 2000;12(11):2247-58). Figyelembe véve az MKK7 rendkívül szoros transzkripciós szabályozását (pl. auxin kezelés (11. ábra) és patogén fertőzés (Plant J. 2007;52(6):1066-79)), illetve az MKK7 ektopikus expressziójával járó súlyos fejlődési rendellenességeket, az is elképzelhető, hogy ez a kináz egy elsődlegesen transzkripciós szinten szabályozott MAPK modul alkot.

Az MKK3 jelpályára vonatkozó ismereteink a patogén védekezésben játszott funkcióra vonatkozó eredményeink publikálása óta jelentősen tovább bővültek. Egyrészt kiderült, hogy a jelpályának szélesebb körű szerepe van a stressz jelátvitelben, ABA (Plant J. 2015;82(2):232-44) és sebzés hatására is aktiválódik (Plant Cell. 2020;32(6):1988-2003), a sebzés jelátvitelben pedig egy D csoport MAP kinázzal (MPK8) is együttműködik (Mol Cell. 2011;41(6):649-60). Emellett részt vesz a kék fény indukált fejlődési válasz szabályozásában is (Plant Cell. 2014;26(8):3343-57). A jelpálya felső tagjaiként azonosították a MAP3K17-et és MAP3K18-at (Plant J. 2015;82(2):232-44), ill. a MAP3K16-ot (Mol Cells. 2017;40(3):230-242) a vízhiány ABA által közvetített jelátvitelében. Továbbá, a MAP3K20 az MKK3 feletti kinázként a gyökér mikrotubulus funkció szabályozásában is részt vesz (Front Plant Sci. 2017;8:1352). Az MKK3-t patogén jelátviteli funkciójában szabályozó MAP3K(-k) továbbra is ismeretlen(ek).

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

Először is visszautalnék az előző válaszra: az MKK3 szerepét többféle biológiai folyamatban, így abiotikus stresszválaszokban is leírták. Normál kísérleti körülmények között a mutáns/túltermelő vonalaknak nincs fenotípusa. Amit bécsi munkánk során megfigyeltünk, hogy a rövidnappalos nevelést követően hosszú nappalos fényviszonyoknak kitett *mkk3* növények virágzati tengelye a Col-0 kontrollhoz képest később jelent meg. Ezt a jelenséget később Martonvásáron próbáltuk meg tanulmányozni, azonban a reprodukálhatósága alacsony volt. Feltételezhető, hogy ez a fejlődési fenotípus erős környezeti befolyás alatt áll, ami magyarázhatja a laboratóriumok, illetve az egyes kísérletek közötti eltéréseket. Mindennek fényében azonban figyelemreméltóak azok az eredmények amelyek az MKK3 feletti MAP3K, a MAP3K17 virágzati tengely kialakulásában (bolting) betöltött funkcióját tárták fel (Plant Biotechnol (Tokyo). 2018;35(2):171-176). Ezek az eredmények megerősítik azt a feltételezést, hogy ennek a fejlődési folyamatnak a szabályozásában az MKK3 is szerepet játszik.

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?

Azt, hogy a szabályozás negatív, különböző kísérleti rendszerekben kapott eredmények egymástól függetlenül megerősítik (a génexpresszió mellett növekedési tesztek, fotoszintézis gátlás, RNS bomlás). Ráadásul a többi rendszerben 24 óra után is kisebb a mutáns vonalak toleranciája. A génexpresszió esetében elképzelhető, hogy a MAP kináz közvetített gátlás oxidatív stressz következtében felszabadul,

miközben pozitív szabályozó mechanizmusok aktiválódnak. Ez magyarázhatja a növekedési tesztekben a különbségek három nap után megfigyelhető csökkenését is.

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, Argentína, Kína, stb.). Milyenek az ottani lehetőségek? Van-e olyan természetesen előforduló növény fajta amit a MAPK jelrendszer módosításával hoztak létre?

Valóban, az ISAAA GM Approval Database (<https://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/>) szerint 45 Európán kívüli országban engedélyezett valamilyen „GMO” (transzgénikus) növényfajta termesztése. A felhasznált genetikai megoldások (34 genetikai tulajdonság), és a módosított fajok (32 faj) széles köre azt mutatja, hogy, legalábbis Európán kívül, a technológia jelentősége lassan, de biztosan növekszik. Mindazonáltal sajnos érzékelhető egy olyan trend, még az amerikai egészségtudatos kommunikációban is, hogy a „GMO”-t gyakran, a genetikai módosítás mibenlétére való tekintet nélkül, pl. a vegyszeres kezelésekkel vagy a processzált élelmiszerekkel együtt, az egészségre ártalmas kategóriába sorolják, bármiféle, ezt igazoló tudományos evidencia nélkül. Remélhetőleg a technológiában rejlő potenciál, kiegészülve a génszerkezeti módszerek által kínált lehetőségekkel, hosszú távon a racionalitás érvényesülését hozzák el.

Az ISAAA GM Approval Database adatbázis szerint az engedélyezett fajtákban használt gének között nem szerepel MAP kináz gén. A jelátvitelhez leginkább közelálló engedélyek bizonyos transzkripciós faktor génekre vonatkoznak (pl. a szárazság toleranciához használt Hahb-4, vagy a növekedést és reprodukciót elősegítő bbx32).

Mivel a MAPK jelutak központi szerepet játszanak a növényi stressztolerancia kialakításában, pl. túltermelésükkel az ellenállóképeség fokozható, így a pontos működésük megismerésében rejlő mezőgazdasági potenciál nyilvánvaló. A nagyfokú pleiotropizmus miatt azonban, ahogy ezt a dolgozatban bővebben is kifejtettem, véleményem szerint a T-DNS inszerciós transzgénikus technológiánál kifinomultabb megközelítések használata indokoltnak tűnik. Erre a MAPK hálózatok működésének jobb megismerése és a génszerkezeti technológiák alkalmazása nyithat lehetőséget a jövőben.

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

Budapest, 2023. szeptember 10.

Dóczi Róbert