

## Válaszok Dr Enyedi Ágnes bírálataira:

Köszönöm Enyedi Ágnes dolgozatomra vonatkozó elismerő véleményét, biztató szavait. A bírálóban megfogalmazott kérdésekre az alábbiakban válaszolok:

1) *A MAPK alapú fehérje-fehérje komplexek tanulmányozása során azt tapasztalták, hogy az ERK2 MAPK dokkoló árka egy másik ERK2 molekulából származó hidrofób aminosav töltötte ki. Nem képzelhető-e el, hogy ennek a szimmetriaekvivalens ún. „káros” parkolódásnak fiziológias jelentősége is van? Elképzelhető-e pl. dimerizáció ami akár hatással lehet az ERK aktivációra vagy más fehérjékkel való kölcsönhatások kialakulására?*

A MAPK-ok dokkoló árka azért tud „sikeres” fehérje-fehérje kölcsönható felszínként működni, mert egy kiterjedtebb hidrofób felszín is tartalmaz a dokkoló motívumban lévő hidrofób horgonyzópontok számára. Ez a felszín az evolúció során egyébként valószínűleg úgy jött létre, hogy egy ősi ciklin-dependens kináz (CDK) elvesztette a C-terminális régióját (pl. korai STOP codon révén) - ami egyébként a MAPK dokkoló peptidek hidrofób részeivel mutat szerkezeti analógiát - és így az oldat felől védett hidrofób magot alkotó aminosavak egy része a felszínre került. A fehérjék felszínén lévő hidrofób felszínek azonban hajlamosak az irányítatlan „tapadásra” bármilyen más hidrofób jellegű felszínnel. A kristályosítás során látott „káros” pakolódás tehát véleményem szerint nem fiziológias oligomerizációt tükröz, hanem egyszerűen a MAPK-dokkoló peptid kölcsönhatás természetének az egyik következménye. Szerkezeti biológiai tapasztalatom alapján a fiziológiailag releváns komplexek általában a teljes aszimmetrikus egység elemi alkotói. Továbbá, a fehérje-kristályokban látható, a pakolódásban résztvevő felszínek oldatbeli jelentőségének tisztázása mindig külön kísérletes validálást igényel. Inaktív MAPK-okon végzett biofizikai karakterizációs kísérleteink azonban nem utaltak arra, hogy az ERK dimerként is létezne oldatban, nemhogy ebben a dokkoló árok bármilyen szerepet is játszana. Az irodalomban azonban már régóta ismert, hogy aktivált állapotban az ERK2 dimerizációra hajlamos, de ebben a kinázban a dokkoló ároktól teljesen különböző részei vesznek részt; ahol ugyanis a foszforiláció hatására konformációs állapotot váltó ún. aktivációs hurok és a körülötte lévő régiók játszanak központi szerepet (Wisbacher et al, 2006).

Wisbacher JL, Juang YC, Khokhlatchev AV, Gallagher E, Binns D, Goldsmith EJ, Cobb MH. Characterization of mitogen-activated protein kinase (MAPK) dimers. *Biochemistry* 45:13175-82 (2006).

2) *Az egyensúlyi állandók alapján a MAPK komplexekben a fehérjék gyenge kölcsönhatásban vannak egymással, kivéve az Mkk5-ERK5 komplexet, amely az egyensúlyi konstansok alapján sokkal stabilabbnak tűnik. A jelpálya hatásossága érdekében lehet-e ezt úgy elképzelni, hogy egy gyors és specifikus szubsztrát felismerést, gyors disszociáció követ? Vannak-e olyan vizsgálatok, amelyek a kötődés illetve disszociáció kinetikáját mérik, illetve terveznek-e ilyeneket? Érdekes kérdés lehet, hogyan befolyásolja illetve befolyásolja-e a szubsztrát foszforiláltsági állapota az egyes kinetikai paramétereket?*

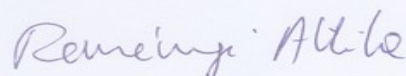
Fenti kérdés engem is foglalkoztatott és felületi plazmon rezisztencia (SPR) alapú készülék segítségével mértük is a MAPK-dokkoló peptidek kölcsönhatásának kinetikai aspektusait. Ezek alapján a kölcsönhatásnak egy nagyon gyors asszociációs ága és egy hasonlóan gyors leszálló disszociációs ága van. A két érték hányadosa adja a kölcsönhatás viszonylag gyenge, 1-10 mikromólos nagyságrendű egyensúlyi állandóját. Korábbi kísérleteink alapján azt tudom mondani, hogy a szubsztrátok foszforiláltsági állapota nem befolyásolja a kölcsönhatás egyensúlyi állandóját, ami azt valószínűsíti, hogy a kinetikai paraméterekben sem valószínű számottevő változás (bár elméletileg nem kizárt).

3) A jelátviteli pálya dinamizmusát a foszforilációs és defoszforilációs folyamatok együttesen határozzák meg. Vannak-e elképzelések arra vonatkozólag, hogy a MAPK felismerő helyekhez képest hol és mikor kapcsolódnak be a deaktiváló MAPK foszfatázok? Ismertek-e MAPK/MKP (kináz/foszfatáz) dokkoló kölcsönhatások, vannak-e erre vonatkozó szerkezeti adatok?

MAPK-foszfatáz dokkoló peptidok komplexeiről is vannak szerkezeti adatok (Garai et al, 2012). A foszfatázokból származó motívumok is egyszerűen besorolhatóak az általunk elsőként katalogizált konformációs megoldások egyikébe, amiket a partner fehérjék (pl. aktivátor kinázok, foszfatázok, szubsztrátok vagy állványfehérjék) használnak, hogy a MAPK-okhoz kötődhessenek (Zeke et al 2015). A deaktiváló foszfatázok D-motívumai egyéb partner fehérjék D-motívumaival együtt versenyeznek a szabad MAPK kötőhelyekért, ami önmagában is okozhat nem-lineáris típusú viselkedést bemeneti jelintenzitás és MAPK aktiváció viszonyában. MAPK aktivitás ezen felül azonban gyakran kapcsol be transzkripció szintű negatív visszacsatolási folyamatot is, ahol a megnövekedett MAPK aktivitás visszaszorítására D-motívummal rendelkező MAPK foszfatázok expressziója növekszik.

4) A jelölt a *Diszkusszió* fejezet végén említi, hogy patológiás esetekben a fehérje-fehérje kölcsönhatásokon keresztül a MAPK rendszer összeszerelődésének befolyásolása alternatív terápiás lehetőségeket kínál. Tekintve, hogy a jelenleg alkalmazott kináz aktivitást célzó terápiás szerek esetében, az esetek döntő többségében rezisztencia alakul ki és az immunterápiának is komoly korlátai vannak, valóban érdemes lenne ez irányban tovább gondolkodni. Kérdésem, vannak-e jelenleg ilyen jellegű erőfeszítések.

Igen, ebbe az irányban sok erőfeszítést szándékozunk tenni. A természetes megoldások feltárása után - mely során megértettük, hogy rövid „természetes” fehérje szakaszok, hogyan képesek mikromólos affinitású, MAPK specifikus kölcsönhatásokat létrehozni - olyan „mesterséges”, nem feltétlenül peptid alapú, megoldások kísérletes megvalósítását kezdtük el, mely segítségével a MAPK dokkoló árok sekély és kiterjedt felszíne is alternatívaként szolgálhat a korábban sokkal nagyobb figyelmet kapott mélyebb ATP kötőzseb mellett. Egy új fehérje-fehérje kölcsönható MAPK felszín farmakológiai célzása ugyanis nagy terápiás lehetőségekkel kecsegtet. A probléma ugyanakkor intellektuális kihívásként is nagy horderejű, mert a MAPK dokkoló árok a sekély, nehezen célozható, tranzienst fehérje-fehérje asszociációkban szerepet játszó fehérje felszínnek állatorvosi lovának is tekinthető. Az ilyen felszínnek célzása azonban a korábbi gyakorlattól eltérő kémiai megközelítéseket igényel.



Reményi Attila  
MTA TTK, Enzimológiai Intézet  
tudományos főmunkatárs

Budapest, 2017.03.06