

Válaszok Dr Erdődi Ferenc bírálataira:

Köszönöm Erdődi Ferenc támogató bírálatát és a feltett kérdésekre az alábbiakban válaszolok:

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.*

A JIP1 állványfehérje túlermelletése emlős sejtekben növeli a JNK aktivációját (Whitmarsh et al. 1998), tehát fontos szabályzó szerepe lehet sejten belül, de in vitro tisztított fehérjéket használva az állványfehérjének már nincs ilyen hatása a JNK foszforilációval végződő MAPK modulra (MEKK3-MKK7-JNK) (Alex A és Reményi A, nem publikált adat). A JIP1 tehát nem egy Ste5-szerű „biokémiai” állványfehérje. A Ste5 állványfehérje ugyanis in vitro is növeli a Fus3 MAPK modul aktivitását (Ste11-Ste7-Fus3) (Good et 2009). Utóbbinak sikerült megfejtetni a mechanisztikai okait: A Ste7 a Fus3 MAPK szubsztrátját csak Ste5 jelenlétében tudja foszforilálni, mert a Fus3 csak a Ste5-hoz kötődve kerül olyan állapotba, ami által rajta a Ste7 enzimeként működhet. Ezek alapján a Ste5 - bár elismerten csak felületesen - tűnhet a Ste7 koenzimének is, mert az enzim (Ste7) csak egy másik, enzimatis aktivitás nélküli faktor (Ste5) jelenlétében tölti be a foszforilációs aktivitásán alapuló jelátviteli szerepét. A két fehérje tehát mindenképpen kooperál egy produktív jelátviteli esemény létrejöttében. Valóban szabatosabb lenne talán a kofaktor szó vagy egyszerűen az „aktivátor fehérje” szóösszetétel használata, mert a koenzimnek a klasszikus biokémiában történetileg más értelme van: Ott olyan reverzibilisen kötődő kis méretű molekulára használják, amely az enzim aktív részét képezi és valamiféle csoportot, hidrogént vagy elektront visz át a szubsztrátra.

Véleményem szerint a JIP1 típusú „sejtes” állványfehérjék, melyek valószínűleg csak a sejten belüli lokális koncentrációk modulálása révén érik el a MAPK jelpálya aktivitást növelő hatásukat, sokkal elterjedtebbek emlősökben, bár ez nem jelent azt, hogy allosztérikus módon működő modulátor fehérjék itt egyáltalán nem léteznének (Brennan et al 2011). Az élesztő Ste5-re való összehasonlítások viszont azért voltak fontosak, mert sokáig ez az élesztő fehérje élt úgy a köztudatban, mint a jelátviteli jelpályákat szervező állványfehérjék prototípusa (Choi et al, 1994). Bár szerintem a Ste5-szerű allosztérikus aktivációra is képes állványfehérjék nagyon specifikus funkcióra evolválódtak és ritkábbak, míg a JIP1 típusúak inkább vannak többségben. De ez csak egy szubjektív véleménynek tekinthető, az állványfehérjék mechanisztikai működésére vonatkozó ismereteink korlátai miatt a kérdésben egy kiegyensúlyozott kép még nem adható.

Brennan DF, Dar AC, Hertz NT, Chao WC, Burlingame AL, Shokat KM, Barford D. A Raf-induced allosteric transition of KSR stimulates phosphorylation of MEK. Nature 472:366–369 (2011)

2) *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?*

A MAPK-dokkoló peptid komplexek esetén a szerkezeti analízis valóban foszforilálatlan (azaz inaktív) MAPK-okkal történt. A laborban azonban az enzimek aktív, foszforilált formáját is elő tudjuk állítani. Utóbbiakkal is végeztünk fehérje-peptid kölcsönhatás affinitás méréseket, de nem találtunk eltérést az inaktív vagy aktív MAPK peptid kötésében. A szerkezeti analízis azonban

egyszerűbb az inaktív MAPK-dokkoló peptid komplexekkel.

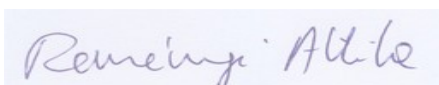
3) *Van-e a MAPK-okat defoszforiláló foszfatázoknak a szubsztrátokhoz hasonló dokkoló motívuma, azaz a modularitás kiterjed-e a kináz defoszforilációval történő inaktiválási folyamatokra is?*

A foszfatázok a MAPK-okhoz kötődő fehérjék egyik legfontosabb fajtája, és a MAPK-okat kikapcsoló foszfatázokban a legtöbb esetben található dokkoló motívum (Reményi et al, 2006; Garai et al 2012). Több ilyen már munkánk előtt is ismert volt, s mi magunk is jó pár ilyen foszfatáz rekrutációt elősegítő motívumot találtunk (Zeke et al 2015). Véleményem szerint, a MAPK aktivitás szabályzás egy érdekes dinamikus aspektusát veti fel az a tény, hogy a MAPK-okat aktiváló MAPK kinázok, szubsztrátok, állványfehérjék és foszfatázok ugyanazért a kölcsönható felszínért versenyeznek, hogy hatásukat kifejtsék. Ez egy érdekes, a sejtben a mindenkor elérhető fehérje mennyiségek szintjén zajló szabályozási mechanizmus lehetőségét veti fel, amit a jövőben a rendszerbiológia eszköztárával fogunk majd megközelíteni.

4) *A dokkoló motívumok feltárt kötődési sajátosságai lehetőséget teremtenek-e különböző MAPK-ok specifikus gátlására szubsztrátanalóg peptidekkel? Fellelhetők-e az irodalomban kísérletek ilyen farmakológiai jelentőséggel bíró peptidekkel és alkalmazhatók-e ezek terápiás célokra?*

A dokkoló motívumok kötődési sajátosságai valóban lehetőséget teremtenek alternatív fehérje kináz gátló stratégiák kidolgozására. Sejt-penetráló címkék segítségével a szintetikus peptideket sejtekbe juttatva a MAPK jelátvitel specifikus módon gátolható (Borsello et al, 2003). Ez az irodalomból már ismert, de mi magunk is kísérleteztünk már ilyen saját fejlesztésű peptidekkel. Továbbá, a JIP1-ből származó JNK kötő peptid D-aminosavakat tartalmazó verzióját a klinikumban bizonyos akut sejthalált kiváltó folyamatokból való gyorsabb felépülés miatt tervezik használni.

Borsello T, Clarke PG, Hirt L, Vercelli A, Repici M, Schorderet DF, Bogousslavsky J, Bonny C. A peptide inhibitor of c-Jun N-terminal kinase protects against excitotoxicity and cerebral ischemia. *Nat Med.* 9:1180-6 (2003)



Reményi Attila
MTA TTK, Enzimológiai Intézet
tudományos főmunkatárs

Budapest, 2017.03.06