

Válasz dr. Madarász Emília, az MTA Doktora bírálataira

Mindenek előtt szeretném megköszönni Madarász Emília professzor asszonynak, hogy dolgozatom bírálatát elvállalta, és azt alapos gondossággal értékelte. Köszönöm továbbgondolásra ösztönző megjegyzéseit és kérdéseit, valamint azt, hogy a munkát fontosnak, időszerűnek tartja. A dolgozatot érintő megjegyzésekre és kérdésekre az alábbiakban szeretnék válaszolni.

Örömmel tölt el, hogy a tisztelt bíráló pozitívan értékelte a munkám során alkalmazott sokoldalú megközelítést és a dolgozat tematikus tagolását. Ugyanakkor osztom a professzor asszony véleményét, hogy több téma sem tekinthető lezártnak, sajnos nem mindig adódott lehetőség egy téma folytatására. Abban is egyetértek, hogy több mint egy évtized távlatából, ma már több esetben is más megközelítés lenne alkalmazható, amelyek több információval szolgálnak, azonban mindig arra törekedtem, hogy a rendelkezésre álló legalkalmasabb módszert válasszam. A dolgozat szerkezetét illetően sokáig mérlegeltem, hogy „klasszikus” formában írjam-e meg, vagy pedig egy-egy fejezet eredményeinek bemutatását kövesse az értelmezés is, végül az előbbi mellett döntöttem.

Örömmre szolgál, hogy a professzor asszony a dolgozatot jól érthetőnek találta, és pozitívan értékelte azon törekvésemet, hogy a túlzásokat elkerülve, magyar kifejezéseket használjak. Sajnálom, hogy még ha kevés elírás is maradt benne, nem sikerült teljesen megszabadulni tőlük. Az ábrákat igyekeztem mindenütt olyan méretűre készíteni, ami lehetővé teszi azok eredeti közlemény nélküli értékelését is anélkül, hogy túlzottan nagy terjedelműek legyenek, lehet, hogy nem minden esetben sikerült az ideális kompromisszumot megtalálni. Az eredményeknél valóban csak a saját eredmények bemutatására szorítkoztam, az irodalmi környezetbe való beillesztést a klasszikus szakcikk szerkezetnek megfelelően a megbeszélés fejezetbe tettem. Ez a szerkezet kétségtelen, hogy egy ilyen hosszú mű esetén elkerülhetetlen módon sok lapozgatáshoz vezet. Remélem azonban, hogy ez nem befolyásolta nagyon a disszertáció áttekinthetőségét.

Egyetértek a tisztelt bírálóval abban, hogy a vér-agy gát és az agyi endotél közé semmi esetre sem tehető egyenlőségjel. Viszont kétségtelen, hogy az agyi endotélreteg képezi magának a barriernek az oroslánrészét. Ma már klasszikusnak számító kísérleteiben Reese és Karnowsky (1967) kimutatta, hogy a torna peroxidáz az endotélsejtek közötti szoros kapcsolatokban „akad el”. A vér-agy gát többi sejtjének elsősorban az a szerepe hogy az endotélsejteket oly módon befolyásolják, hogy azok egy jó barrier képezzenek. Természetesen még a három sejttes modell és a vér agy gát közé sem tehető egyenlőségjel, de kétségtelen, hogy ez áll a legközelebb hozzá. Bizonyos esetekben azonban egy egyszerűbb modell is jól használható vér-agy gát modellként, ez az oka annak, hogy sokszor agyi endotélsejteken kapott eredményeket vér-agy gát jellemzőként interpretáltam. Azt viszont semmiképp sem szerettem volna, hogy ez megtévesztő legyen.

Reese TS, Karnowsky MJ. Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. J Cell Biol. 1967 Jul;34(1):207-17.

1. Junkcionális fehérjék expressziójának sajátosságai a vér-agy gát sejtjeiben

-Hogyan igazolható, hogy az occludin-expresszálo „neuronok” és asztrociták preparátuma nem tartalmazott más, pl. endotél vagy meningeális sejtet?

-Mivel a disszertációm témája a vér-agy gát, ezért a neuronális tenyészetekkel kapott eredményeket és módszereket nem mutattam be részletesen. A tenyészeteket neurofilamentum festéssel jellemeztük, amint az az eredeti közleményben szerepel, és az említett okok miatt nem részleteztem disszertációmban. Elnézést, ha ez az egyértelműség rovására ment. Ezen túlmenően, agyi endotélsejtek a neuronok esetében alkalmazott tenyésztési körülmények között hosszabb távon nem élnek túl. A meningeális sejtek fibroblaszt jellegű sejtek, és fibroblasztokban kísérleteink során nem sikerült occludint kimutatni. Az asztrocita tenyészeteket GFAP festéssel jellemeztük. Az kétségtelen, hogy PCR segítségével egész kis mennyiségű szennyeződés is adhat jelet, azonban

western-blot esetén ez már jellemzően nem így van, és immunfluoreszcens vizsgálatok is alátámasztották eredményeinket.

-Hogyan érték el a „differenciált asztroglia” állapotot, és hogyan tudtak „segítő sejtektől” mentes, tiszta neuron-készítményt előállítani a Western blot vizsgálatokhoz? Vajon mennyi volt ezekben a tenyészetekben az éretlen asztroglia-progenitor sejt (amelyek sajátosságai nem azonosak az „érett” gliával, és általában uralják az in vitro osztódó asztroglia tenyészeteket)? Az ugyancsak epitél-kinézetű (!) sejtek occludin festődése, ami a kicsi és sötét 5.ábrán kizárólag felszíni membrán-festődésnek látszik, csak GFAP festéssel együtt bizonyítaná az asztrociták és/vagy asztrocita-progenitor sejtek occludin-tartalmát.

-Az alacsony passzázsszámú, epitél kinézetű, de GFAP pozitív sejteket tekintettük „differenciálatlan” asztrocitáknak. Néhány passzálás után a sejtek morfológiája megváltozott, az epitél kinézetet egy nyúlványokkal jellemzett morfológia váltotta fel, természetesen a GFAP pozitivitás megmaradt, és nestint sem sikerül kimutatni bennük, ezeket tekintettük „differenciált” asztrocitáknak. Kétségtelen, hogy további jellemzés nagymértékben pontosította volna eredményeinket, de a megfigyelés annyira újszerű volt, hogy miután megbizonyosodtunk arról, hogy nem artefaktum, igyekeztünk azt a lehető leghamarabb publikálni.

-Az I és II típusú endotél sejtek közötti különbség, a megfigyelt morfológiai és funkcionális eltérések nem adódhatnak egyszerűen a sejt-sűrűség eltéréseiből? A sejt-mozgás számára rendelkezésre álló tér minden tenyészetben megszabja a sejt-motilitást, ami viszont az ezt segítő molekuláris rendszerek (pl. ECM bontás és produkció) aktiválódásával jár. Az igen kicsi és nem túl jó minőségű (7.) ábrán jelentős különbség az I és II típusú sejtek között nem látszik, de a sejtsűrűség-eltérés feltételezhető. A fagokinetikus nyomvonal eltéréseit is csak a szövegből lehet nyomon követni, és a nyomvonal statisztikus elemzése teljes egészében hiányzik. Az ECGFokozta fehérje-termelés változások kapcsán is felvetődik a kérdés: közvetlen sejt-stabilizáló hatásról van szó, vagy a növekedési faktor hatására megnőtt sejtsűrűség okozza a motilitásban és ehhez kapcsolódó mechanizmusokban látott változásokat?

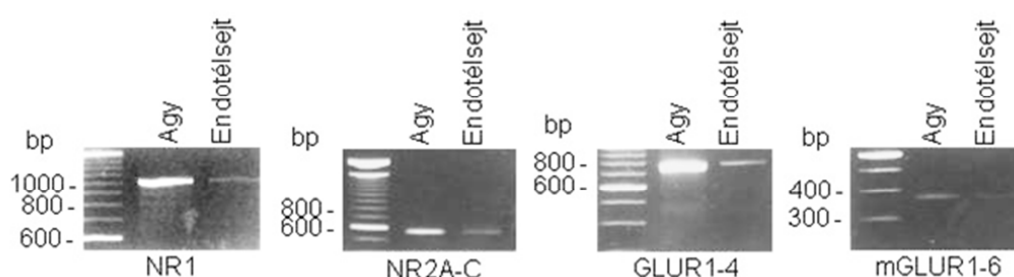
-A fagokinetikus nyomvonal vizsgálata során minden kísérletet háromszor végeztünk el, és minden tenyésztési körülmény esetén 50 nyomvonal alapján végeztük a statisztikai elemzést. Ez terjedelmi okokból maradt ki a disszertációból. Kétségtelen, hogy a sejtsűrűség jelentős módon képes befolyásolni a sejtek egyes tulajdonságait. Amellett, hogy összehasonlítható sűrűségű tenyészeteket használtunk kísérleteinkhez, néhány változás valószínűtlen, hogy az esetleges sejtsűrűségbeli különbség eredménye lenne. Így például az alfa-aktin megjelenése nem várható még abban az esetben sem, ha változik a sejtek sűrűsége, ez inkább az EMT-re jellemző. Hasonlóan, egyes junkcionális fehérjék mennyiségének ilyen erőteljes csökkenése sem jellemző eltérő sűrűségű, de konfluens tenyészetek esetében.

2. A szignáltranszdukció sajátosságainak vizsgálata agyi endotélsejtekben

i) *-Az ionotróp glutamát-recetorok mRNS-szintű expressziójának igazolása agyi endotél sejtekben a szerző fontos eredménye, amelyet munkatársaival még 1999-ben közölt. (A dolgozatban bemutatott ábrán azonban nem látszik az endotélsejtek NR1, NR2A-C és mGluR expressziója!). Ma ugyanezen eredmények megerősítésére már valós-idejű PCR bizonyítékokra lenne szükség.*

- Kimutathatók-e az NMDA és AMPA receptor alegységek fehérje szinten is?

-A disszertációban az NR1, NR2A-C és mGluR által adott jelek, bár ott vannak, valóban halványak (különösen az NR2A-C). Ennek oka az expresszió alacsony szintje, amit a nem ideális nyomdatechnika csak tovább hangsúlyozott. A mellékelt ábrán meggyőzőbben látszik az expresszió. Kísérletein során célunk az expresszió kimutatása volt, a valós idejű PCR a relatív változások kimutatása során jelentett volna nagy segítséget. Azonban a kísérletek kivitelezésekor még nem állt



Glutamát receptor alegységek expressziója agyi endotélsejtekben

rendelkezésre ez a módszer.

-NMDA és AMPA receptor alegységek fehérje szinten is kimutathatóak agyi endotélsejteken. Mi ugyan nem vizsgáltuk a glutamát receptor fehérjék expresszióját, de vizsgálataink egyértelműen azt mutatták, hogy funkcionális NMDA receptorok vannak az agyi endotélsejteken. Más kutatók vizsgáltak és mutattak ki közvetlenül is glutamát receptor fehérje expressziót agyi endotélsejteken. Így Reijerkerk és munkatársai (2010) NR1 receptorok expresszióját mutatták ki immunfluoreszcens módszerekkel, de kimutatták AMPA (GluR1) (András és mtsai., 2007), kainát receptorok (GluR5-7) (Newcomb és mtsai., 2008), illetve metabotróp glutamát receptorok jelenlétét is (Collard és mtsai., 2002).

Reijerkerk A, Kooij G, van der Pol SM, Leyen T, Lakeman K, van Het Hof B, Vivien D, de Vries HE. The NR1 subunit of NMDA receptor regulates monocyte transmigration through the brain endothelial cell barrier. J Neurochem. 2010 Apr;113(2):447-53.

András IE, Deli MA, Veszélka S, Hayashi K, Hennig B, Toborek M. The NMDA and AMPA/KA receptors are involved in glutamate-induced alterations of occludin expression and phosphorylation in brain endothelial cells. J Cereb Blood Flow Metab. 2007 Aug;27(8):1431-43.

Newcombe J, Uddin A, Dove R, Patel B, Turski L, Nishizawa Y, Smith T. Glutamate receptor expression in multiple sclerosis lesions. Brain Pathol. 2008 Jan;18(1):52-61.

Collard CD, Park KA, Montalto MC, Alapati S, Buras JA, Stahl GL, Colgan SP. Neutrophil-derived glutamate regulates vascular endothelial barrier function. J Biol Chem. 2002 Apr 26;277(17):14801-11.

- A funkcionális vizsgálatokat, amelyek közvetetten igazolhatják ezen receptorok funkcionális jelenlétét olyan magas glutaminsav-terhelés (2mM) mellett vizsgálták, amely messze meghaladja nemcsak az élettanilag releváns, de a farmakológiai kísérletekben alkalmazott dózisokat is. Van hasonló válasz ennél alacsonyabb Glu-terhelésre is?

-Az alkalmazott glutamát koncentráció valóban relatív magas, főleg akkor, ha azt az agy nyugalmi állapotában mért extracelluláris koncentrációjához viszonyítjuk (a vérben a koncentráció magasabb, elérheti a 100 mikromólos nagyságrendet (Leibowitz és mtsai., 2012)). A glutamát koncentrációja fiziológias körülmények között az extracelluláris folyadékban igen alacsony (1-3 $\mu\text{mol/l}$) (Tossman és mtsai., 1986), újabb adatok szerint akár nanomólos nagyságrendű is lehet, azonban a teljes agyszövetben mért koncentráció ennél több nagyságrenddel magasabb. Például Hawkins és Mans (1983) 12 $\mu\text{mol/g}$ koncentrációt mértek, ez jó közelítéssel 10 mM-os nagyságrendet jelent, így nem elképzelhetetlen, hogy jelentős neurális sérüléssel járó folyamatokban lokálisan a glutamát koncentráció akár a millimólos nagyságrendet is elérje. Talán ez is magyarázhatja, hogy az irodalomban gyakran használtak millimólos koncentrációt. Így például András és munkatársai (2007) 1 mM glutamát alkalmazása esetén észleltek csökkenést a funkcionális fehérjék expressziójában, ennél kisebb koncentráció hatástalannak bizonyult. Kuhlmann és munkatársai (2008) 0,25-1 mM koncentrációtartományban mutattak ki transzendenteliális ellenállás csökkenést.

Leibowitz A, Boyko M, Shapira Y, Zlotnik A. Blood glutamate scavenging: insight into neuroprotection. Int J Mol Sci. 2012;13(8):10041-66.

Tossman U, Jonsson G, Ungerstedt U. Regional distribution and extracellular levels of amino acids in rat central nervous system. Acta Physiol Scand. 1986 Aug;127(4):533-45.

Hawkins RA, Mans AM. Intermediary metabolism of carbohydrates and other fuels. In: Handbook of Neurochemistry (Lajtha, A., ed.), pp. 259-294. Plenum Press, New York (1983).

András IE, Deli MA, Veszélka S, Hayashi K, Hennig B, Toborek M. The NMDA and AMPA/KA receptors are involved in glutamate-induced alterations of occludin expression and phosphorylation in brain endothelial cells. J Cereb Blood Flow Metab. 2007 Aug;27(8):1431-43.

Kuhlmann CR, Gerigk M, Bender B, Closhen D, Lessmann V, Luhmann HJ. Fluvastatin prevents glutamate-induced blood-brain-barrier disruption in vitro. Life Sci. 2008 Jun 20;82(25-26):1281-7.

ii) -Az RBE4 patkány agyi endotél vonalon kapott eredmények kiterjeszthetők-e az agyi endotél sejtekre, és ha igen, vajon minden agyi régió endotél sejtjeire?

-Vajon sikerült-e azóta tisztázni a nem-specifikus szerotonin transzport szerepét és jelentőségét?

-Kétségtelen, hogy a sejtvonalak és primér sejtek közé nem lehet egyenlőségjelet tenni. Azonban az agyi endotél sejtvonalak jellemzően szűkebb fehérje expressziós mintázattal

rendelkezik, mint a primér sejtek, így ha valami jelen van a sejtvonalban, akkor jó eséllyel jelen lesz a primér sejtben is. Fordítva ez már nem igaz. Az endoteliális szerotonin transzporter expressziójának esetleges regionális különbségeiről tudtommal nem áll rendelkezésre információ.

-A szerotonin transzporter mellett más SLC transzporterek is szerepet játszhatnak a szerotonin transzportjában, amelyek nem Na^+ érzékenyek, mint az SLC22a1-3 (Oct), az SLC29a4 (Pmat) és az SLC47a1 (Mate1). Ezek szerepe azonban a szerotonin transzportjában nem tekinthető tisztázottnak. Nehezíti a kérdés megítélését, hogy az egyes transzporterek expressziója nagyfokú faji különbségeket mutat. Míg patkányban egy funkcionális Pmat-ot sikerült jellemezni, aminek az agyból a vér irányába történő transzportban lehet szerepe, hozzájárulva e neurotransmitter agyból való eltávolításához (Okura és mtsai., 2011), addig egérben például nem sikerült funkcionális, szerotonint transzportáló fehérjét kimutatni a vér agy gátban, így itt a nem carrier mediálta transzport dominálhat, ami igen alacsony színű (André és mtsai., 2012). Ez védheti a központi idegrendszert a vérben levő biogén aminoktól, ugyanakkor csökkentheti az agyból való eltávolítást is. Ugyanakkor az agyi endotélium MAO aktivitása is hozzájárulhat a szerotonin szint szabályozásához.

Okura T, Kato S, Takano Y, Sato T, Yamashita A, Morimoto R, Ohtsuki S, Terasaki T, Deguchi Y. Functional characterization of rat plasma membrane monoamine transporter in the blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers. J Pharm Sci. 2011 Sep;100(9):3924-38.

André P, Saubaméa B, Cochois-Guégan V, Marie-Claire C, Cattelotte J, Smirnova M, Schinkel AH, Scherrmann JM, Cisternino S. Transport of biogenic amine neurotransmitters at the mouse blood-retina and blood-brain barriers by uptake1 and uptake2. J Cereb Blood Flow Metab. 2012 Nov;32(11):1989-2001.

iii) A Ca^{2+} -hiány esetén fellépő endotél-morfológia változásait és a Rho-kináz ebben játszott szerepét értékelhető, szép immuncitokémiai és AMF képekkel mutatja be. A Ca -hiányos sejtek alakváltozása nem váratlan (bár tudományos igazolásához az AFM mérések statisztikai elemzésére is szükség lett volna). A jelenséget kísérő sejt felszíni zonulin-1 és claudin-5 átrendeződés fontos eredmény. A dolgozatban bemutatott módszer- és kísérletár ismeretében azonban felvetődik a kérdés:

- miért nem vizsgálták a ZO-1 és Claudin-5 intracelluláris „sorsát” az átrendeződések során? Ezek a fehérjék a membránból való „kivonódás” során lebomlanak vagy intracellulárisan megőrződnek és a visszarendeződés során újra beépülnek, esetleg fontos közvetítői gyors magi reakcióknak?

- vajon a Rho-kináz szerepének vizsgálatai során miért nem mérték a transzendoteliális elektromos rezisztenciát?

-Immunfluoreszcens vizsgálataink alapján Ca^{2+} megvonás hatására a junkcionális fehérjék a membránból eltűnnek, de annak közelében maradnak, és kolokalizálnak a kialakuló perifériás aktinyúrral. Az, hogy Ca^{2+} visszaadás hatására a junkciók hamar visszaalakulnak, szintén arra utal, hogy a fehérjék nem bomlanak le. Epiteksejtekben kimutatták, hogy a Ca^{2+} megvonás a junkcionális fehérjék klatrin-mediálta endocitózisát okozza (Ivanov és mtsai., 2004), és a fiziológiás extracelluláris Ca^{2+} szint visszaállítása során a junkcionális fehérjék valószínűleg ezen intracelluláris raktárakból jutnak vissza a sejt-sejt kapcsolatokba. Endotelsejtekben feltételezhetően egy hasonló mechanizmus játszódik le, azonban – bár próbálkoztunk vele – ezt nem sikerült bizonyítanunk. Ennek technikai okai voltak, ugyanis endocitózis gátlására csupán aspecifikus módszerek álltak rendelkezésünkre (hipertóniás szukróz, pH csökkenés vagy fenilarsén oxid alkalmazása), amelyek azonban sejtjeinkben citotoxikusnak bizonyultak.

-Egyetértek a professzor asszonnyal, hogy a TEER mérések valóban szépen kiegészítették volna az elvégzett kísérleteket. Dolgozatomba ez ugyan nem került be, de számos kísérleti eredményünk azt mutatja, hogy a Rho kináz gátlása kontroll körülmények között növeli a TEER-t, és gátolja annak csökkenését különböző ágensek által kiváltott junkcionális sérülések esetén is (pl. dasatinib hatására). Ugyanakkor a mi közleményünkkel egyidőben jelent meg egy tanulmány, amely kimutatta, hogy bélepiteksejtekben is a Rho kináz mediálja a Ca^{2+} megvonás okozta junkcionális átrendeződést (Samarin és mtsai., 2007), és ebben igazolták, hogy a ROCK gátlás megakadályozza a Ca^{2+} depléción által okozott rezisztencia csökkenést.

Ivanov AI, Nusrat A, Parkos CA. Endocytosis of epithelial apical junctional proteins by a clathrin-mediated pathway into a unique storage compartment. Mol Biol Cell. 2004 Jan;15(1):176-88.

Samarin SN, Ivanov AI, Flatau G, Parkos CA, Nusrat A. Rho/Rho-associated kinase-II signaling mediates disassembly of epithelial apical junctions. *Mol Biol Cell*. 2007 Sep;18(9):3429-39.

iv) A ZO-2 szerepe a jeltovábbításban. Ennek a kérdéskörnek a vizsgálata, számomra, a dolgozat legérdekesebb része.
-Kérdezném, mit lehet 2013-ban tudni a ZO-2 magi, esetleges génaktivációs hatásairól.

-Örömmel tölt el, hogy a ZO-2 szignáltranszdukcióban betöltött szerepének vizsgálata felkeltette tisztelt bírálóm érdeklődését. Amikor első kísérleteinket végeztük, igencsak meglepő volt ZO-2 festést a magban látni. Mivel addig csak egy közleményben írták le, hogy junkcionális fehérje jelen lehet a magban (ZO-1), hosszú időnek kellett eltelnie addig, amíg meggyőződünk róla, hogy a jelenség nem artefactum. Az alábbiakban foglalom össze azokat a fehérjéket, amelyekhez jelen ismereteink szerint a ZO-2 kapcsolódni képes, és amelyek szerepet játszhatnak a ZO-2 magi funkcióinak ellátásában:

- Fos, Jun és C/EBP (CCAAT/enhancer binding protein) transzkripció faktorok. A ZO-2-nek az AP1 transzkripció faktorokhoz való kötődése, az általa szabályozott gének expressziójának gátlásához vezet (Betanzos és mtsai., 2004).
- YAP2 (Yes kinase-associated protein 2). A ZO-2-vel való magi kapcsolata fokozza a proapoptotikus hatását (Oka és mtsai., 2012).
- TAZ (transcriptional coactivator with PDZ binding motif). ZO-2-vel való kapcsolata szabályozza magi lokalizációját (Remue és mtsai., 2010).
- STAT1. Vaszkuláris símaizomsejtek proliferációját szabályozza (Kusch és mtsai., 2009).
- ARVCF (armadillo-repeat protein of the p120(ctn) family). ZO-2-vel való kapcsolata szabályozza magi lokalizációját (Kausalya és mtsai., 2004).
- ZASP (ZO-2 associated speckle protein). Gátolja a ZO-2 ciklin D1-re gyakorolt gátló hatását (Lechuga és mtsai., 2010).
- LASP1 (LIM and SH3 protein 1). A LASP1 PKA általi foszforilációja a LASP1/ZO-2 komplexum magba történő vándorlását eredményezi (Mihlan és mtsai., 2012).

A ZO-2 sejtciklus szabályozásában betöltött szerepét támasztja alá az a megfigyelés, miszerint e fehérje a sejtciklus G1 fázisában képes a magba vándorolni, majd a mitózis során kivándorol onnan, és gátolja a ciklin D1 fehérje expresszióját myc-en keresztül (Gonzalez Mariscal és mtsai., 2009). A ZO-2 gátolja a GSK3béta gátló foszforilálását, és az így aktivált GSK3béta a Wnt útvonal gátlása mellett számos gén expresszióját szabályozhatja (Gonzalez-Mariscal és mtsai., 2012). A transzkripció faktorok mellett a ZO-2 a magban kapcsolódik még laminB1-hez, SC-35-höz és PtdIns4,5P2-hoz (Gonzalez-Mariscal és mtsai., 2012).

Betanzos A, Huerta M, Lopez-Bayghen E, Azuara E, Amerena J, González-Mariscal L. The tight junction protein ZO-2 associates with Jun, Fos and C/EBP transcription factors in epithelial cells. *Exp Cell Res*. 2004 Jan 1;292(1):51-66.

Oka T, Schmitt AP, Sudol M. Opposing roles of angiomotin-like-1 and zona occludens-2 on pro-apoptotic function of YAP. *Oncogene*. 2012 Jan 5;31(1):128-34.

Remue E, Meerschaert K, Oka T, Boucherie C, Vandekerckhove J, Sudol M, Gettemans J. TAZ interacts with zonula occludens-1 and -2 proteins in a PDZ-1 dependent manner. *FEBS Lett*. 2010 Oct 8;584(19):4175-80.

Kusch A, Tkachuk S, Tkachuk N, Patecki M, Park JK, Dietz R, Haller H, Dumler I. The tight junction protein ZO-2 mediates proliferation of vascular smooth muscle cells via regulation of Stat1. *Cardiovasc Res*. 2009 Jul 1;83(1):115-22.

Kausalya PJ, Phua DC, Hunziker W. Association of ARVCF with zonula occludens (ZO)-1 and ZO-2: binding to PDZ-domain proteins and cell-cell adhesion regulate plasma membrane and nuclear localization of ARVCF. *Mol Biol Cell*. 2004 Dec;15(12):5503-15.

Lechuga S, Alarcón L, Solano J, Huerta M, Lopez-Bayghen E, González-Mariscal L. Identification of ZASP, a novel protein associated to Zona occludens-2. *Exp Cell Res*. 2010 Nov 15;316(19):3124-39.

Mihlan S, Reiß C, Thalheimer P, Herterich S, Gaetzner S, Kremerskothen J, Pavenstädt HJ, Lewandrowski U, Sickmann A, Butt E. Nuclear import of LASP-1 is regulated by phosphorylation and dynamic protein-protein interactions. *Oncogene*. 2012 Jun 4. doi: 10.1038/ncr.2012.216.

Gonzalez-Mariscal L, Tapia R, Huerta M, Lopez-Bayghen E. The tight junction protein ZO-2 blocks cell cycle progression and inhibits cyclin D1 expression. *Ann N Y Acad Sci*. 2009 May;1165:121-5.

Gonzalez-Mariscal L, Bautista P, Lechuga S, Quiros M. ZO-2, a tight junction scaffold protein involved in the regulation of cell proliferation and apoptosis. *Ann N Y Acad Sci*. 2012 Jun;1257:133-41.

3. Az agyi endotélsejtek patológiás körülmények között: extracelluláris stresszfactorok hatása.

i) Hipoxia hatásainak vizsgálataival kapcsolatban felvetődik a régi kérdés: milyen eltérések várhatók az anoxia és hipoxia sejtbőlgyiai következményei között? A vizsgálatok során a sejteket (sajnos nem mindenütt egyértelmű, hogy milyen sejteket) 16 órán át tartották O₂-mentes gázkörnyezetben. Hogy ezzel anoxiás körülményeket, illetve milyen mértékű hipoxiát értek el, az a leírásból nem ítéltető meg; ehhez tudni kéne az előzetesen normoxiás folyadék és az oxigén-mentes légtér térfogatait. A hosszas O₂-elvonás, nem meglepő módon, a sejt-kapcsolatok károsodásával jár, hiszen – az ismert élettani tétel szerint – elsőként a specializált sejtfunkciók károsodnak, a sejt integritását fenntartó folyamatok hosszabban ellenállnak. A bemutatott ERK-aktiváció azonban hozzájárulhat a jelenség megértéséhez.

-A hipoxia, amint azt az elnevezése is tükrözi, egy alacsony oxigén koncentrációt jelent, ami fokozatosan mehet át teljes oxigénhiányba. Valószínűsíthető, hogy a biológiai hatásokat és azok súlyosságát illetően is egy hasonló átmenetről beszélhetünk. Kísérleteink során, amelyekben egér agyi endotélsejt vonalat használtunk, nem volt arra technikai lehetőségünk, hogy egy zárt rendszerben kb. 1 ml térfogatú tápfolyadékban megmérjük az oxigén koncentrációját. Azonban a tápfolyadékot a kísérlet megkezdése előtt alaposan átáramoltattuk egy 95% N₂-t és 5% CO₂-t tartalmazó gázeleggyel, majd a zárt kamrát is, mielőtt a sejteket behelyeztük volna. Így valószínűsíthető, hogy a sejtek igen alacsony oxigén koncentrációjú környezetben voltak.

Bár patofiziológiai, de akár laboratóriumi feltételek mellett is nehéz a hipoxiát és reoxigenációt elkülöníteni, a hosszas hipoxiának kitett sejtek fiziológiai állapotát érdemes lett volna alaposabban megvizsgálni.

- Mérték-e a vizsgált paramétereket közvetlenül a hipoxiás kezelés után?

Az LDH toxicitás teszt erre nem a megfelelő módszer: csak akkor jelez, amikor a pusztuló sejtekből már kiszabadulnak citoplazma-komponensek. Az előidézett „patológiás” sejttálat megatároázására már csak azért is szükség lett volna, mert a hipoxiát reoxigenáció követte, amelyet a Szerző egyértelműen oxidatív stresszként, a bekövetkezett változásokat oxidatív stresszre adott sejtválaszként kezeli. Ennek igazolására az előzetes hipoxia-okozta hatásokat mindenképpen figyelembe kellene venni.

– A 30. ábrán a bemutatott junkcionális fehérje csökkenés nehezen igazolható. Ebben az esetben legalább denzitometriás kiértékelés kellene a következtetés alátámasztására.

-Egyetérttek a professzor asszonnyal, hogy igen nehéz fiziológiai körülmények között a hipoxiát és reoxigenációt elkülöníteni. A kizárólag a hipoxia által kiváltott válaszokat nem vizsgáltuk. Mivel már a hipoxia is okozhat oxidatív stresszt, ezért döntöttünk úgy, hogy az agyi keringés csökkenését, esetleg leállását jobban tükröző glükózmentes állapot vizsgálatára terjesztjük ki kísérleteinket.

-A különböző toxicitási tesztek (LDH, MTT, „neutral red” ATP koncentrációmérés) változó érzékenyséűek, és függenek a toxicitás jellegétől is (Weyermann és mtsai., 2005). Bár valóban az LDH a legkevésbé „ézőkeny”, azért választottuk ezt a módszert, mert a súlyos sejtsejtülés-sejtpusztulás által okozott változásokat akartuk kiszűrni. A metabolikus aktivitáson alapuló mérések minden bizonnyal adtak volna jelet, hisz az nagy valószínűséűggyel csökken a hipoxia során.

-A 30-as ábra négy független kísérletből egy reprezentatív blottot mutat be, ennek jelzése az ábraalírásból sajnos kimaradt.

Weyermann J, Lochmann D, Zimmer A. A practical note on the use of cytotoxicity assays. Int J Pharm. 2005 Jan 20;288(2):369-76.

ii) Az *in vitro* O₂- és tápanyag-ellátottság vizsgálatait jól egészítik ki az *in vivo* vérzéses sokk kísérletek, amelyek a kismolekulájú anyagok szelektív átjutás-növekedésével tovább valószínűsítik, hogy elsőként a vér-agy gát paracelluláris ellenállása károsodik. A bemutatott 35. ábrával kapcsolatban azonban meg kell jegyezni, hogy azon jószerevel csak a magyarázó nyílak láthatók. A permeabilitás meghatározás módszerével kapcsolatban kérdezném: a kis-molekulájú flureszcens jelző anyag és az EvansBlue-Albumin komplexum feltehetően eltérő mértékben kötődik „nem-specifikus” módon az érfalakhoz. Mennyiben befolyásolhatja ez a nem-specifikus lerakódás a permeabilitás fotometrikus meghatározását, ha az teljes szövet-homogenizátumból történik?

-A 35-ös ábrán igyekeztünk kiválasztani egy olyan agyi területet, amely a legreprezentatívabb módon mutaja be a shock során észlelt változásokat. Ez magyarázza, hogy rajtuk

gyakorlatilag egy érszakasz látható, a felső sor esetében több mint 200 mikron hosszan. A permeabilitás mérés során az agyat PBS-el átmossuk, mert az erekben maradó festék valóban jelentősen befolyásolná a méréseket. Ily módon viszont, amint azt szövettani metszeten végzett fluoreszcens vizsgálataink mutatják, nem marad kitapadt festék az érfalon.

iii) A vér-agy gát gyulladásos folyamatokban : TLR2/6 szerepe

-A 36. ábrán látható, hogy a HuCMEC/D3 endotél sejt vonal expresszál TLR4-t, míg a primér patkány endotél sejtek nem. Vajon a primér human endotélre is jellemző a TLR4?

-Mi a kísérleteink során valóban nem tudtunk kimutatni TLR4-et primér patkány agyi endotélsejteken. Irodalmi adatok alapján fiziológias körülmények között a TLR4 igen alacsony szinten van jelen agyi endotélsejteken, ám expressziója indukálható pl. LPS-sel (Singh és Jiang, 2004). Primér humán agyi endotélsejteken tudtommal nem vizsgáltak TLR expressziót, és egy ilyen vizsgálatot nagymértékben megnehezítené az, hogy jó minőségű primér human agyi endotél igen nehezen hozzáférhető. Azonban azt várnám, hogy a humán sejt vonalhoz hasonlóan a primér sejtek, ha fiziológias körülmények között alacsony szinten is, de expresszálják TLR4-et.

Singh AK, Jiang Y. How does peripheral lipopolysaccharide induce gene expression in the brain of rats? Toxicology. 2004 Sep 1;201(1-3):197-207.

-A 37. ábrán látható érdekes effektus, hogy metabolikus stressz (dimetil-naftokinon) hatására az összes vizsgált TLR (2,3,4,6) expresszió megnő D3 sejtekben. Miután ezt a jelenséget a Szerző nem diszkutálja, itt teszem fel a kérdést: hogyan vezethet a metabolikus stressz a TLR expresszió növekedésére?

-A DMNQ-t (2,3-dimetil-1,4-naftokinon) széles körben alkalmazzák oxidatív stressz kiváltására (Dooley és mtsai., 2004), és mi is e célból használtuk. Az oxidatív stressz viszont ismert, hogy különböző sejt típusokban képes aktiválni a TLR-eket (Roop és mtsai., 2010), ami részben magyarázhatja az iszkémiás folyamatokhoz társuló gyulladásos jelenségeket. A kapcsolat alapjául egy lehetséges molekuláris mechanizmus a HIF-1α-n keresztül vezethet. Az oxidatív stressz megnöveli a HIF-1α expresszióját (Pialoux és mtsai., 2009), és például a TLR4 promótere tartalmaz HIF-1α kötő motívumot (Kim és mtsai., 2010), amelyen keresztül növekedhet a gén expressziója.

Dooley CT, Dore TM, Hanson GT, Jackson WC, Remington SJ, Tsien RY. Imaging dynamic redox changes in mammalian cells with green fluorescent protein indicators. J Biol Chem. 2004 May 21;279(21):22284-93.

Roop Gill, BM, MRCS, Allan Tsung, MD, and Timothy R. Billiar, MD. Linking oxidative stress to inflammation: toll-like receptors. Free Radic Biol Med. 2010 May 1; 48(9): 1121–1132.

Pialoux V, Mounier R, Brown AD, Steinback CD, Rawling JM, Poulin MJ. Relationship between oxidative stress and HIF-1α mRNA during sustained hypoxia in humans. Free Radic Biol Med. 2009 Jan 15;46(2):321-6.

Kim SY, Choi YJ, Joung SM, Lee BH, Jung YS, Lee JY. Hypoxic stress up-regulates the expression of Toll-like receptor 4 in macrophages via hypoxia-inducible factor. Immunology. 2010 Apr;129(4):516-24.

-A 39. ábra grafikonjáról a szignifikanciát jelző csillagok lemaradtak.

-A 40. és 41. ábra immuncitokémiai képeinek értékelésekor megint csak a szöveg segít: az ábrák minősége nem engedi meg következtetések levonását.

-A 39-es ábráról a beillesztés során valóban lemaradtak a szignifikanciát jelző csillagok. Szignifikáns az 50 és 100 µg-os kezelés során észlelt csökkenés.

-A 40-es és 41-es ábrák esetében igyekeztem a közleményben megjelenő hasonló ábraméretet alkalmazni, ami nem foglal túl sok helyet, és az információk még látszanak rajta. Sajnálom, hogy nem sikerült mindig az ideális kompromisszumot megtalálnom.

iv) -A dohányfüst egyes összetevőinek hatása a vér-agy gátra fejezet fontos és hasznos vizsgálatokat mutat be. Agyi endotél sejtek tenyésztését kezelték 5 – 24 óráig 0,1 – 100 µM-os nikotin vagy 30µM-os fenantrén oldatokkal. A választott koncentráció gyakran olyan magas, hogy azt cigarettázással ugyancsak nehezen lehetne elérni (30µM-os fenantrén koncentráció eléréséhez pl. kb. 2 percnként kellene egy erős cigarettát elszívni); szerencsésebb lett volna fejezetnek a nikotin- vagy fenantrén-hatás vizsgálata címet adni.

- A nikotin- és/vagy policiklusos szénhidrogének hatására megváltozó fehérjéről nyert proteomikai eredményeket érdemes lett volna egy táblázatban bemutatni.

-Az alkalmazott koncentrációk valóban magasak. Nikotin esetében ennek egyik oka, hogy a patkány kevésbé érzékeny rá (LD50: 50 mg/kg), mint az ember (LD50: 0,5-1 mg/kg), másrészt pedig így szerettük volna részben kompenzálni azt, hogy több hónapig tartó kezelés in vitro modellen nem kivitelezhető. Alacsonyabb koncentráció alkalmazása során nem észleltünk eltérést a junkcionális fehérjék expressziójában és a transzendenteliális elektromos ellenállásban. A következtetésünk is az, hogy önmagában a nikotin és a fenantrén olyan koncentrációban, ami in vivo is elképzelhető, rövid távon nem okoz endoteliális permeabilitás változást, viszont az oxidatív stressz által kiváltott hatást potencírozhatja.

-A proteomikai vizsgálatok eredménye azért nem került teljes egészében bemutatásra, mert csak a releváns változásokat szerettem volna ismertetni.

v) Az occludin lebontásának mechanizmusa

- A claudin-1 expresszió legalábbis normál (humán) agyban rendkívül alacsony (Hewitt, BMC Cancer 2006, 6:186) Vajon endotél sejtekben a claudin-5 hasonló lebomlási sajátságokat mutathat? A claudin-20-nál több isoformájának mindegyikére igaz lehet a lassú turnover és a lebontás útvonalai biztosan azonosak fajtól és sejtípustól függetlenül?

- Az occludinhoz kapcsolódó fehérjéket „előzetes élesztő kettős hibrid vizsgálatokkal” választották ki: ki végezte ezeket a vizsgálatokat - a módszer-leírások között nem szerepel

- 48. ábra: miért nem látható a nagy móltömegű occludin-ltch komplexum an anti-occludin immunprecipitáció és immunfestés után (1.sáv)? Mit jelent a HC és LC, minek a nehéz vagy könnyű láncáról van szó?

-A junkcionális fehérjék lebontásáról agyi endotélsejtekben nem áll rendelkezésre közvetlen információ. Köldökvéna endotélsejtekben (HUVEC) a claudin-5 felezési ideje mintegy 70 perc, ami egy membránfehérje esetén rövidnek mondható. A lebontási folyamatban szerepet játszik a claudin-5 199-es lizinen történő ubiquitinációja, amit proteasomális degradáció követ, illetve szerepe van egy ubiquitinációtól független lizoszomális degradációnak is (Mandel és mtsai., 2012). Retinális endotélsejtekben egy ennél sokkal hosszabb felezési időt mértek, ami nem volt gátlható proteasóma inhibitorral (Murakami és mtsai., 2009). MDCK sejtekben egy ubiquitináció függő, de lizoszomális degradációt figyeltek meg claudin-1,-2, és -4 esetén (Takahashi és mtsai., 2009). Egy másik munkacsoport mintegy 4 óra felezési időt mért claudin-4 esetében, illetve több mint 12-öt claudin-2 esetében, és a stabilitás meghatározásában döntő szerepe volt a claudinok citoplazmatikus végeinek (Van Itallie és mtsai., 2004). Az eddigi eredmények alapján valószínűsíthető, hogy a claudinok turnover és lebontási mechanizmusa sejtfüggő.

-Az élesztő kettős hibrid kísérleteket az „Institute of Molecular Biology”-ban (Salzburg, Ausztria) kutatócsoportbeli kollégám végezte. Bár én is aktív résztvevője voltam a projektnek, ezt a konkrét kísérletet nem én végeztem el, ezért nem került a dolgozatba részletes bemutatása.

-A 48-as ábra 1-es sávja egy occludin immunprecipitációt és occludin festést mutat. A precipitálást követő elektroforézishez a mintákat az általános western-blot protokoll szerint olyan körülmények között végeztük, amelyek során a fehérje komplexumok jellemzően szétesnek. Az LC és HC a precipitálás során használt ellenanyagok könnyű és nehéz láncai.

Mandel I, Paperna T, Volkowich A, Merhav M, Glass-Marmor L, Miller A. The ubiquitin-proteasome pathway regulates claudin 5 degradation. J Cell Biochem. 2012 Jul;113(7):2415-23.

Murakami T, Felinski EA, Antonetti DA. Occludin phosphorylation and ubiquitination regulate tight junction trafficking and vascular endothelial growth factor-induced permeability. J Biol Chem. 2009 Jul 31;284(31):21036-46.

Takahashi S, Iwamoto N, Sasaki H, Ohashi M, Oda Y, Tsukita S, Furuse M. The E3 ubiquitin ligase LNX1p80 promotes the removal of claudins from tight junctions in MDCK cells. J Cell Sci. 2009 Apr 1;122(Pt 7):985-94.

Van Itallie CM, Colegio OR, Anderson JM. The cytoplasmic tails of claudins can influence tight junction barrier properties through effects on protein stability. J Membr Biol. 2004 May 1;199(1):29-38.

vi) -Az oxidatív stressz által okozott cito- és genotoxikus hatások vizsgálata vér-agy gát sejtekben. Ezt a fejezetet jó lett volna összevonni az 5.3.1. „A hipoxia hatása a junkcionális komplexum működésére” című fejezettel. Igazi genotoxicitási mérés – a

leírtak alapján – nem történt, az apoptotikus és nekrotikus sejt-arányok megadása pedig éppenséggel hiányzik az 5.3.1. fejezetből.

- A p53-expresszió növekedése hipoxia/reoxidáció hatására nem meglepő; de a „mikronukleozos” sejtekről jó lett volna legalább egy ábrát mutatni

- Az asztrociták nagy ellenálló képessége hipoxia/oxidatív stressz/éhezés hatásaival szemben szintén ismert. Az azonban nem világos, hogy milyen asztrocita tenyészeteken vizsgálták a hatást és hasonlították össze a sertés agyi endotél sejteken mért hatásokkal. Az Anyag és Módszer fejezet szerint asztrocita tenyészeteket csak egér és patkány agyból készítettek.

-A tisztelt bíráló felveti, hogy érdemes let volna az 5.3.6. fejezetet (Az oxidatív stressz által okozott cito- és genotoxikus hatások vizsgálata a vér-agy gát sejtjeiben) az 5.3.1. (A hipoxia hatása a junkcionális komplexum működésére) fejezettel összevonni. Azért döntöttem a külön fejezet mellett, mert az 5.3.1. fejezetet egy sor olyan fejezet követi, ami a junkcionális komplexum működéséről szól, és ezt a gondolatsort nem szerettem volna megbontani egy junkcionális komplexum működését nem érintő gondolatsorral. Bár több módszer is rendelkezésre áll, a mikronukleozos sejtek vizsgálata limitációi ellenére is egy széles körben elfogadott módszer a genotoxikus hatások vizsgálatára (Kirsch-Volders és mtsai., 2011). Az 5.3.1. fejezetben csak az oxidatív stressz által kiváltott membránsérüléssel járó toxikus hatásokat vizsgáltuk, és nem vizsgáltuk az apoptotikus és nekrotikus sejtek arányát.

-A mikronukleozos sejtek arányáról terjedelmi okokból csak a statisztikai analízist mutattam be, mert úgy gondoltam, hogy nem hordozott volna plusz információt egy ábra bemutatása.

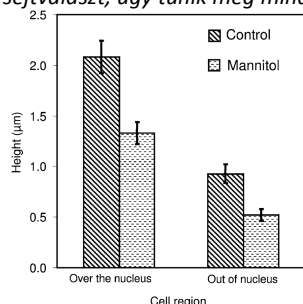
-A neuronokhoz képest valóban ismert volt az asztrociták relatív ellenállóképessége, azonban kíváncsiak voltunk, hogy ez hogyan viszonyul az endotélsejtek ellenállóképességéhez, amelyek szintén ellenállóbaknak tekinthetők a neuronokhoz képest. A kísérletsorozatban egér asztrocitákat és egy spontán sertés agyi endotélsejt vonalat használtunk. Azért döntöttünk sertés agyi endotélsejt alkalmazása mellett, mert az oxidatív stressz junkcionális komplexumra gyakorolt hatásának vizsgálata során nem tapasztaltunk különbséget az egér és sertés sejtvonalaink válaszreakciói között, de a sertés sejtvonala stabilabbnak, jobb vér-agy gát tulajdonságokkal rendelkezőnek bizonyult. Primér sertés asztrocita az adott körülmények között nem állt rendelkezésre.

Kirsch-Volders M, Decordier I, Elhajouji A, Plas G, Aardema MJ, Fenech M. In vitro genotoxicity testing using the micronucleus assay in cell lines, human lymphocytes and 3D human skin models. *Mutagenesis*. 2011 Jan;26(1):177-84.

vii) Hiperozmotikus mannitol hatása az agyi endotél sejtekre

-Az endotélsejtek morfológiai változása ozmótikus stresszre igen érdekes fejezet. Morfológiai és molekuláris biológiai módszerek ötvöztetésével igazolja, hogy a hiperozmotikus sejt-reakció nem a víz passzív újra-eloszlásáról szól. Az AFM-mel vizsgált morfológiai változások leírásánál szerepel, hogy (pp.92: „...a legnagyobb sejtmagasság 2 μm volt”. Itt a Szerző valószínűleg a sejt-szélekre gondolt; az EM képen (61.II a,b,) is látható, hogy a magot is tartalmazó régió, értelemszerűen ennél „magasabb”. Az élő sejteken AFM adatokkal való összevetésnek az a nehézsége, hogy az adatok egy adott „vonalt” mentén, adott időpontban mért értékek, amelyek nem tükrözik az élő sejtben állandóan zajló mag/citoplazma-mozgás okozta változásokat. A „vonalt” a műszer számára „rögzített” pozíciót jelent, az élő sejt vagy az állandóan helyet változtató sejtmag szempontjából azonban nem. A mérésből levont következtetés akkor lenne indokolt, ha statisztikusan igazolták volna, hogy mannitol-kezelés nélkül legalább 10 sejtben mért vonal-menti értékek változása kisebb, mint az ugyanennyi mannitol kezelt sejtben mért eltolódás. A leírásból nem derül ki, hogy hány sejtben mérték a magasság-változásokat és a Young-moduluszt (bár ez utóbbinál szórás-értékek szerepelnek).

-Erős hiperozmotikus kezelés hatására a sejt szinte teljes „gépezete” - szabályozó vagy szabályozott minőségben - reagál. Az Axl gyors foszforilációja és hasadása fontos eredmény, és a továbbiakban sokat segíthet abban, hogy eligazodhassunk a válaszreakció-szövevényben. Az azonban, hogy mi (vagy mik) indítja(k) el – molekuláris értelemben – a hiperozmozisra adott sejtválaszt, úgy tűnik még mindig nem világos. Mi erről a Szerző véleménye?



-Az agyi endotélsejtek igen lapos sejtek, és több száz sejtben végzett mérések alapján állítható, hogy magasságuk rendszerint a magot +++tartalmazó régióban sem haladja meg a 2-3 mikront. A bemutatott AFM képen a szagatott vonal mentén végzett mérés érint magi régiót, és itt a magasság kicsit több mint 2 mikron. A mellette levő EM ábrán is 2-3 mikron a sejt vastagsága a magnál, így a 2 mikron valóban kicsit alábecsült érték. A magasságmérésről is készült statisztikai analízis, ami terjedelmi

okokból csak az eredeti közleményben szerepel. Ezúton mellékelem a hiányolt információt. A magasságot és a Young moduluszt 3 független kísérletsorozatban alkalmanként több tíz sejten mértük meg.

Az AFM képalkotás során rendszerint egy 40 x 40 mikron méretű területet szkenneltünk 256 x 256 képpontos felbontásban, 50 mikron/s sebességgel, így a kép elkészítése néhány percet vett igénybe, és a teljes terület le lett szkennelve. A magasság megállapításához a kész képen lehet tetszőleges vonal mentén mérni a magasságot, a magassági kép mérés nélkül is érzékelteti szürkeárnyalatos kód alapján a magasságot. Kétségtelen, hogy az AFM nem alkalmas gyors (másodpercek alatt lezajló) folyamatok nyomon követésére.

-A hiperozmózisra adott sejtválasz molekuláris mechanizmusai nem tekinthetőek kellően tisztázottnak. Kísérleteink során az Axl foszforilációját és degradációját csak nem sejtp permeábilis ozmotikus ágensekkel sikerült előidézni, sejtp permeábilis anyagok, mint az urea, nem indukáltak változást. Mivel ez utóbbi esetben nem alakul ki ozmotikus grádiens és térfogat változás sem, feltételezzük, hogy a sejtek térfogatváltozása fontos lépés e szignalizációs utak aktiválása során. Így felvetődik a celluláris mechanoreceptorok illetve ozmoreceptorok szerepe. Ezek a receptorok nem specifikus kation csatornák, ozmoreceptorként elsősorban a TRPV1, -2, -4 ismeretes (Liedtke, 2007). Mechanoszenzitív csatorna áramokat sikerült mérni agyi endotélsejtekben (Chang és mtsai., 2011), amelyek expresszálnak TRPC1-et (Inoue és mtsai., 2009), TRPA1-et (Earley és mtsai., 2009) és TRPV1-et is (Golech és mtsai., 2004), amelyek ismeretes, hogy fontos szerepet játszhatnak az ozmotikus, illetve mechanikai ingerekre adott endoteliális reakciók mediálásában.

Liedtke W. Role of TRPV ion channels in sensory transduction of osmotic stimuli in mammals. Exp Physiol. 2007 May;92(3):507-12.

Chang X, Zeng Y, Yu H, Hu J. Mechanosensitive channel currents recorded in rat microvascular endothelial cells with whole-cell mode. Technol Health Care. 2001;9(5):427-32.

Inoue R, Jian Z, Kawarabayashi Y. Mechanosensitive TRP channels in cardiovascular pathophysiology. Pharmacol Ther. 2009;123(3):371-85.

Earley S, Gonzales AL, Crnich R. Endothelium-dependent cerebral artery dilation mediated by TRPA1 and Ca²⁺-Activated K⁺ channels. Circ Res. 2009 Apr 24;104(8):987-94. Epub 2009 Mar 19.

Golech SA, McCarron RM, Chen Y, Bembry J, Lenz F, Mechoulam R, Shohami E, Spatz M. Human brain endothelium: coexpression and function of vanilloid and endocannabinoid receptors. Brain Res Mol Brain Res. 2004;132(1):87-92.

viii) Melanóma sejtek és agyi endotél sejtek kölcsönhatása.

-A melanóma sejtek endotél rétegen való átvándorlásáról (74.ábra) és a hatásukra történő felszíni fehérje-változásokról (77.ábra) készült mikroszkópos képeket nehéz értékelni az ábrák mérete és a 77. ábra esetén a nagyítás mértéke miatt is. Az endotél réteg alá szilárd felületre becsúszó sejtek fény- vagy konfokális mikroszkópos elemzése helyett használhattak volna ún. transzmigrációs kamrákat, ahol az átvándorló sejtek egy nagy pórusú membrán másik oldalán jelennek meg. Ez egy transzpiteliális elektromos ellenállás-mérésre berendezkedett laborban nem jelenthet komoly nehézséget. Van elvi oka, hogy nem ezt módszert választották?

-Rendkívül fontos eredmény, hogy a melanóma sejtekkel való kontaktus hatására az endotél sejtek junkcionális fehérje-tartalma igen erősen csökken. Úgy tűnik, hogy ez a hatás a melanóma sejtek kondicionált médiumával nem váltható ki, és a melanóma sejtek felszínéhez asszociált proteolitikus aktivitásnak van szerepe a folyamatban. A dolgozat leadása óta eltelt időben sikerült közelebb jutni e proteáz-aktivitás természetéhez?

-A 74-es ábra valóban kisméretű képeket tartalmaz, amelynek oka, hogy az egy videóból származik, ahol jól nyomon követhető az egyes sejtek mozgása. A junkcionális fehérjék lokalizációjának vizsgálata során azért használtunk üveg fedőlemezeket, mert így sokkal szebb fluoreszcens mikroszkópos felvételeket tudtunk készíteni a sejtekről, mint ha nagy pórusméretű membránokon növesztettük volna őket. Ez utóbbiak esetében a membrán autofluoreszcenciája és "hullámossága" is rontotta volna a képek minőségét. A konfokális mikroszkópos és a time lapse videó felvételek egyértelműen igazolták, hogy a melanóma sejtek képesek voltak a szilárd felületen növesztett endotél réteg alá is bevándorolni, így nagy pórusméretű membránokat csak a transzmigrációs kísérletek esetében alkalmaztunk.

-Az endotélsejtek junkcionális fehérjéinek mennyiségi csökkenése valóban sokkal kifejezettebb volt a melanóma sejtek jelenlétében, és kevésbé volt kiváltható a melanóma sejtek kondicionált médiumával. Eredményeink alapján agyi endotélsejtek jelenlétében a melanóma sejtek

nagy mennyiségű zselatinbontó szerin proteázt expresszáltak a membránjukban és szabadítottak fel a felülúszóba is. A membrán kötött zselatinbontó szerin proteázok közül azonosítottuk a szeprázt. Ezen proteázokról azonban keveset tudunk, kevés képviselőjük ismert. A DPPIV főleg nem tumorális sejtekben expresszálódik, jelenlétét kimutattuk agyi endotélsejtekben, a melanóma sejtekben viszont nem. A közlemény megjelenése óta vizsgáltuk még az ST14/matriptase/epithin-t, amely mRNS szinten kis mértékben expresszálódik A2058 és B16/F10 sejtekben is. A matriptase2/TMPRSS6 jelenlétét csak B16/F10 sejtekben sikerült kimutatnunk. Ezen proteázok szerepének vizsgálata folyamatban van.

Végezetül szeretném még egyszer hálásan megköszönni Dr. Madarász Emília professzor asszonynak a dolgozat bírálatát és a támogató véleményét. Tisztelettel kérem, hogy észrevételeire és kérdéseire adott válaszaimat szíveskedjék elfogadni.

Tisztelettel,

Szeged, 2013. január 7.

Krizbai István