

VÁLASZ

Dr. Gál Péter, az MTA doktora bírálatára

Hálásan köszönöm dr. Gál Péter MTA doktori értekezésemről készített bírálatát, kritikai és dicsérő észrevételeit.

A Bíráló két formai megjegyzést tett, melyeket vitatni nincs okom, mindössze a hiányosságok okára szeretnék magyarázatot adni. A disszertációban az ábrákat a hozzájuk tartozó szöveggel együtt szövegdobozokban helyeztem el a szerkesztést könnyítendő. Viszont a szövegdobozon belüli hivatkozásokat az EndNote a törzsszöveg hivatkozásaitól külön kezelte, a kettő egyesítését nem tudtam megoldani. A szándékom az volt, hogy az érintett ábrák esetében a magam számára lejegyzett első szerző-évszám alapján az értekezés elkészülésekor a hivatkozásokat manuálisan igazítom helyre a szövegdobozokban. Erről sajnos megfejtkeztem, amiért Bírálóim elnézését kérem, ahogy azért is, hogy a disszertációt megalapozó közleményeket az egyes fejezeteknél nem azonosítottam és nem helyeztem el a dolgozat végén. Ez utóbbi döntéssel az értekezés nyomtatott változatának méretét szándékoztam csökkenteni.

A Bíráló kérdéseire és megjegyzéseire az alábbiakkal szeretnék válaszolni.

1. A miozin foszfatáz M20 alegységének jelenlétét tüdő artéria endotél sejtekben egyetlen munkában vizsgálták (Verin et al., J Cell. Biochem., 2000, 76, 489-498). Az egyféle endotél sejtípuson (BPAEC) végzett immunprecipitációs kísérletekkel az M20 fehérjét nem tudták detektálni. Humán mikro- vagy makrovaszkuláris endotél sejteken az M20 jelenlétét nem vizsgáltuk, tudomásom szerint más munkacsoportok sem. Figyelembe véve az endotél és a simaizom MYPT1 közötti hasonlóságot is, az M20 létezését az endotél sejtekben nem tartom teljes mértékben kizárhatónak. Korábban az M20-at szívizomban sem tudták kimutatni (Nishi et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1997, 236, 570-575) és feltételezték, hogy az M20 csak a simaizomra specifikus miozin foszfatáz alegység. A Kimura munkacsoport munkái viszont éppen egy szívspecifikus M20 alegységet írnak le és jellemeznek (Arimura et al., J. Biol. Chem., 2001, 276, 6073-6082; Shichi et al., J. Biol. Chem., 2010, 285, 33680-33690). Ezek az újabb munkák az M20 funkciójára is javaslatot tesznek. Kimutatták, hogy az M20, aktiválva a Rho kinázt, szabályozza a MYPT1 gátló foszforilációját és ezzel befolyásolja a Ca^{2+} -érzékenyítést.

Az M20 és a MYPT család további tagjai közötti kölcsönhatásról nem áll rendelkezésre adat. Az M20 a MYPT1 C-terminális részén található Leu-cipzár motívumhoz kötődik. A MYPT1, -2 és MBS85 fehérjék ezen része nagyon hasonló. A MYPT3 és a TIMAP viszont egyrészt kisebb fehérjék, másrészt C-terminális részük nem hasonlít az előző háromra. Ezért az M20 kötődését a MYPT3 vagy a TIMAP fehérjékhez kevésbé tartom valószínűnek, de kísérleti megerősítés nélkül kizárni nem tudom.

2. Az MLC elsődleges Ser-19 és másodlagos Thr-18 foszforilációs helyeinek prioritási sorrendje az MLCK foszforiláció során ismert volt, ezt nem volt célunk vizsgálni. Korábbi *in vitro* mérések azt bizonyították, hogy a Thr-18 foszforilációja sokkal lassabb, mint a Ser-19 oldalláncé, az értekezésben erre utaltam félreérthető módon. Az endotél MLCK vizsgálatával elsősorban a különleges N-terminális rész funkciójáról szerettünk volna információhoz jutni. A foszforilációs helyeken mutált MLC szubsztrát alkalmazásával mindössze a bakulovírus expressziós rendszer felhasználásával előállított simaizom és endotél MLCK preparátumok enzimaktivitását és kinetikai paramétereit ellenőriztük, ami megnyugtató eredményt adott.

3. A simaizom MLCK autofoszforilációját és lehetséges autofoszforilációs helyeit Tokui és mtsai valamint Abe és mtsai vizsgálták (Biochemistry, 1995, 34, 5173-5179; Cell Struct. Funct. 1996, 21, 183-188). A radioaktív ATP szubsztráttal autofoszforilált MLCK-t tripszinnel emésztették, a peptideket oszlopkromatográfiával szeparálták, a radioaktív, foszforilált peptideket szekvenálták. Az MLCK preparátumban esetlegesen jelen lévő egyéb kinázokat specifikusan gátolták. A Tokui féle munka két foszfopeptidet azonosított a kináz katalitikus doménjét követő regulátor doménben: ⁷⁸³akklskdrmkkmarrkwqktghavraigr~~l~~ssmamisgmsgr⁸²⁵. (Az aláhúzott rész a két azonosított peptidet, a vastagított betű a potenciális foszforilációs helyeket jelöli. Dőlt betűvel a másik munkacsoport által azonosított peptidet jelöltem.) Az endotél MLCK ezzel homológ régiója ettől alig tér el és tartalmazza a simaizom MLCK-ra megadott potenciális foszforilációs helyeket: ¹⁷²⁸akklskdrmkkmarrkwqktgnavraigr~~l~~ssmamisglsgr¹⁷⁷⁰ (a jelölések az előzővel megegyeznek). Ezért feltételezhetjük, hogy az általunk detektált, autofoszforilációnak tartott foszfát beépülés az endotél MLCK ezen régiójában történik, de ezt a feltételezést kísérletesen nem ellenőriztük.

4. A TIMAP fehérjét klónozó Ballermann munkacsoport SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) tag szűréssel ellenőrizte a TIMAP gén kifejeződését. Az endotél SAGE könyvtárakban több mint harmincszor nagyobb frekvenciával találtak TIMAP tag-et az összes vizsgált nem endotél könyvtárhoz hasonlítva. Erre alapozva írták le azt, hogy a TIMAP expressziós szintje endotél sejtekben jóval magasabb, mint más sejtípusokban. Ezt Northern- és Western blot eredményeik is alátámasztották, epitél sejtekben például a TIMAP nincs jelen. (Cao et al., Am. J. Phys. Cell Physiol., 2002, 283, 327-337)

A TIMAP és a MYPT1 fehérjék moláris arányáról nem tudok adatot szolgáltatni. A Bíráló által felvetett versengés a két regulátor között igen valószínű, már önmagában a foszfatáz katalitikus és regulátor alegységek számában mutatkozó nagy különbség is erre utal. A PP1c β izoformája számos foszfofehérjét defoszforilál a sejtekben és különböző holoenzim formáinak is több szubsztrátja ismert. A PP1c katalitikus alegységről *in vitro* vizsgálatok alapján megállapítható, hogy önmagában, regulátor alegység(ek) nélkül olyan foszfoszubsztrátot is defoszforilálhat, ami egyébként nem természetes szubsztrátja, vagy éppen a megfelelő targeting, a célirányító alegység hiányában inaktív az egyébként endogén szubsztráttal szemben. Ezért regulátor nélküli, „szabad” protein foszfatáz katalitikus alegység feltehetően jellemzően nincs jelen a sejtekben. Egy 2013-as összefoglaló munka foglalkozik ezzel a témával. Molekuláris szintű lego-hoz hasonlítja a foszfatáz holoenzimek specifitásához vezető PP1c - megfelelő regulátor kapcsolódásokat (Heroes et al., FEBS J., 2013, 280, 584-595), és bár konkrét számadatokat a közlemény nem tartalmaz, a regulátorok moláris feleslegét állapították meg.

A MYPT1 és a TIMAP között véleményem szerint az efféle versengés mögött célként munkamegosztás állhat aszerint, hogy egy adott szignál mellett melyik holoenzim forma aktivitására van/nincs szükség a sejtben. A két fehérje a sejtben, a citoplazmában és a plazmamembrán régióban egyaránt előfordul. Annak ellenére, hogy a PP1c-MYPT1 elsődlegesnek tartott és leginkább vizsgált szubsztrátja a foszfo-MLC, több más fehérje defoszforilációjában is részt vesz, a PP1c-TIMAP szubsztrátjait pedig még most kezdjük megismerni. Érdekes téma lehet a későbbiekben a két holoenzim szubsztrátjainak felhasználásával összehasonlító vizsgálatokat végezni.

5. A MYPT család további tagjainak a RACK1 fehérjéhez való kötődését még nem vizsgáltuk, de a TIMAP és a család többi tagjának szerkezeti hasonlósága alapján nem zárható ki. Megjegyzendő

viszont, hogy a TIMAP fehérje N- és C-terminális „fele” önmagában is kötődik a RACK1-hoz és az ankirin ismétlődések utáni C-terminális fragmentumok szekvencia homológiája a család többi tagjával jelentősen kisebb. Eredményeink szerint a kötődés funkciója az, hogy biztosítja a TIMAP prenilációjához szükséges farnezil transzferáz enzim jelenlétét/közelségét. A MYPT család ismert tagjai közül a MYPT3 rendelkezik még a prenilációhoz szükséges CAAX motívummal C-terminálisán, ezért feltételezhető, hogy a MYPT3 prenilációja a TIMAP-hoz hasonlóan a RACK1-hoz kötődve játszódik le, de erre vonatkozó eredményekről nem tudok, mi a MYPT3 fehérjét nem vizsgáltuk.

6. A GST-TIMAP fehérje proteáz inhibitor koktél alkalmazása mellett is gyorsan degradálódott. A kölcsönható fehérjepartner keresése során az első LC-MS/MS elemzésre küldött néhány minta, köztük a Bíráló által említett is, TIMAP degradációs terméknek bizonyultak. Elsősorban a TIMAP C-terminális része az, ami a proteázokra érzékeny, az N-terminális fragmentumok sokkal stabilabbnak mutatkoztak. A MYPT1 preparátumok is hasonlóan érzékenyek a proteázokra.

7. Köszönöm a Bíráló észrevételét és kiegészítését a trombinnal kapcsolatos hiányos fogalmazással kapcsolatban. A proteáz-aktivált PAR-1 receptort tartják a trombin-indukált jelpályák elsődleges mediátorának az endotél sejtekben is, a PAR-3 és -4, valamint a triptáz aktivált PAR-2 jelenlétéről és funkciójáról ebben a sejttypusban kevés adat áll rendelkezésre (Coughlin, S.R., *Nature*, 2000, 407, 258-264; Mehta, D. and Malik, A.B., *Physiol. Rev.*, 2006, 86, 279-367; Sukriti, S. et al., *Pulm. Circ.*, 2014, 4, 535-551). Coughlin 1999 és 2000-es közlései szerint a trombin és a PAR-1 interakciójában jelentős aminosav oldalláncok a PAR-1 N-terminális részén elhelyezkedő trombin hasítási helyet közrefogják, annak mindkét oldalán, N- és C-terminális irányban találhatók. A PAR-1 receptor aktiválás részleteit ugyan nem tárgyalja a disszertáció, pontatlan fogalmazásom az aktiválás lényegesebb lépése, a PAR-1 trombin általi hasítása helyett a trombin és a receptor kötődésére helyezi a hangsúlyt.

8. A RACK1-hoz hasonló kísérletsorozattal azonosítottuk az eukarióta elongációs faktor 1 A1 (eEF1A1) fehérjét, melynek több un. „moonlighting” funkcióját is leírták, ilyen például fehérjék nukleáris exportjának elősegítése. Az elongációs faktor olyan fehérjék exportjában vesz részt, amelyekben jelen van egy 9 aminosavból álló motívum, amit TD-NEM-nek neveztek el (transcription-dependent nuclear export motif). A TIMAP szerkezetében találtunk egy nagyon hasonló motívumot, ezért feltételeztük, hogy az elongációs faktor a TIMAP magi exportját segíti. Eredményeink szerint a TIMAP TD-NEM szerű motívuma valóban esszenciális a két fehérje kölcsönhatásában. A nukleáris exportban az elongációs faktor kizárólagos szerepét azonban nem tudtuk bizonyítani. Viszont az eredmények arra utalnak, hogy a ROCK kináz által foszforilált elongációs faktor a PP1c-TIMAP komplex szubsztrátja és a foszfatáz az eEF1A1 membrán lokalizációját szabályozza.

9. A tézisfüzetben a módszerek leírásában valóban egy sajnálatos elírás történt, az SDS-PAGE módszerrel természetesen fehérjéket választottunk el méretük szerint 4-15 %-os gradiens, illetve az adott kísérletben vizsgált fehérje mérete alapján választott töménységű SDS-poliakrilamid gélen.

Bízom benne, hogy válaszaim kielégítőek és még egyszer köszönöm a Bíráló munkáját.

Debrecen, 2015. október 6.

Csortos Csilla