

VÁLASZ

Dr. Homolya László, az MTA doktora bírálatára

Hálásan köszönöm dr. Homolya László MTA doktori értekezésemről készített bírálatát, kritikai és dicsérő észrevételeit.

A Bíráló kérdéseire az alábbiakkal szeretnék válaszolni.

1. Az endotél sejtek mind felépítésükben, mind funkciójukban heterogének. Egy ezzel kapcsolatos összefoglaló munka szerzője (Aird, *Circul. Res.*, 2007, 100, 158-173) a környezetükhöz folyamatosan alkalmazkodó endotél sejteket a kaméleonhoz hasonlítja. Az endotél sejtek heterogenitását a permeabilitásukban tapasztalható különbségek jól tükrözik. Ezt a sejteken kívüli és belüli eltérések egyaránt befolyásolják. Chi és mtsai (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, 100, 10623-10628) 53 mikro- és makrovaszkuláris, valamint artériás és vénás endotél sejt kultúra expressziós profilját hasonlították össze. Számos, a sejt kapcsolatok és a permeabilitást befolyásoló fehérje génjeinek kifejeződésében tapasztaltak jelentős eltérést, mint például integrinek, LIM kináz, GEF, Vav Rho GTPáz, MLCK, miozin. Ezért az egyes endotél sejt típusokra feltárt jelátviteli útvonalak, különösen az azok finom hangolásáért felelős specifikus fehérje kölcsönhatások feltétel nélküli általánosítása félrevezető lehet. Néha ellentmondónak tűnő eredmények mögött is az eltérő sejt típus eltérő viselkedése áll. Saját eredményeink szerint például az NHERF2 overexpressziója vagy csendesítése a tüdő artéria endotél sejtek proliferációját nem befolyásolta, míg HUVEC-re egy másik munkacsoport azt írta le, hogy az NHERF2 csendesítés jelentősen megemelte a proliferációt (Bhattacharya, *Blood*, 2012, 119, 4798-4806). A cGMP és az NO is kiválthat permeabilitás csökkenést is és növekedést is helytől és az aktuális körülményektől függően (van Nieuw Amerongen and van Hinsbergh, *Vascul. Pharm.*, 2003, 39, 257-272). A tumor endotél sejtek és a tumorok erei abnormálisak alakjukban és méretükben, valamint az elágazások számában is. A tumor endotél sejtek monolayerének eltérései hypoxiához vezetnek, ami az angiogenezis stimulálását okozza (Bussolati et al., *FASEB J.*, 2003, 17, 1159-1161). A tumor endotél sejtekre folyamatos magas VEGF-A expresszió jellemző, ami az új erek kialakulásánál a „tip” sejtek a normálistól eltérő viselkedéséhez vezet (Nagy et al., *Annu. Rev. Pathol.*, 2007, 2, 251-275). Humán vastagbél tumorból származó és normál endotél sejteket összehasonlítva a VEGF endogén inhibitorai, az sVEGFR-1 és -2 fehérjék alacsonyabb szintjét találták a tumor endotél sejtekben (Jayasinghe et al., *Oncol. Rep.*, 2009, 21, 933-939).

2. A trombin proteáz sérült érszakaszokon fejt ki hatását az endotél sejtekre (Grand et al., *Biochem. J.*, 1996, 313, 353-368), ahol a koaguláció mellett az endotél barrier funkciót is befolyásolja. A PAR-1 receptor aktiválásával Gi fehérjén keresztül inaktíválja az adenilát ciklázttal ezzel gátolja a PKA-t. A Gq fehérjére hatva aktiválja a foszfolipáz C-t, ez Ca^{2+} -szint emelkedést okoz, ami az MLCK-t aktiválja és ezzel nő az MLC foszforilációs szintje. Ugyancsak hat a G13 fehérjére, ami a Rho kis G-fehérjén keresztül a ROK-t aktiválja és az a miozin foszfatázt gátolja (Bogatcheva et al., *Biocemistry*, 2002, 67, 75-84; Bogatcheva et al., *Microvasc. Res.*, 2004, 67, 64-77). A trombin hatása az endotél sejtekre gyors és reverzibilis. Feltételezik, hogy az ATP trombin-indukált, sérült érszakaszokhoz köthető kiáramlása az endotél sejtekből szintén lokálisan behatárolt (Gödecke et al., *Am. J. Physiol.*, 2012, 302, C915-C923). Az ATP és az adénózín is a miozin foszfatáz aktivitásának növekedését váltja ki az endotél sejtekben. Bár a pontos jelátviteli mechanizmus még nem ismert (a következő válaszban néhány részletre kitérek), feltételezhetjük, hogy a sejtekből felszabadult ATP-nek a trombin hatás reverzibilissé tételében szerepe lehet. Erre utal az is, hogy HPAEC trombin-indukált rezisztencia

csökkenése után adva az adenzint a sejtekhez, a rezisztencia gyorsan a kontroll értékre állt vissza és azt stabilan meg is tartotta (Umapathy et al., Vascular Pharm., 2010, 52, 199-206).

3. Köszönöm a Bíráló megjegyzését az ATP γ S-sel kapcsolatosan. Megjegyezném, hogy az ATP γ S-t az ecto-ATPáz gátlószereként írták le (Chang and Lin, Biochem. Biophys. Res. Comm., 1997, 233, 442-446), ami kompetícióra utalhat a két szubsztrát között. Az ATP/adenozin illetve P2/P1 receptor kérdésében valóban jogos a kétely, van-e egyáltalán a gátfunkció erősítésében közvetlen hatása az ATP-nek a P2 receptorokon keresztül. A P1 és P2 G-fehérjéhez kapcsolt receptorok, G-fehérje specificitásuk eltérő. Először egy korábbi munkát említenék, ami az ATP közvetlen szerepére utalhat (Noll et al., Am. J. Physiol., 1999, 276, 1891-1901). Tüdő aorta endotél sejtek albumin áteresztő képességét vizsgálták, és azt találták, hogy az ATP-hez viszonyítva az ADP és AMP az áteresztő képességet alig csökkentette. Egy, az adenzin hatásával foglalkozó munka (Umapathy et al., Vascular Pharm., 2010, 52, 199-206) a P1 receptorok közül kizárólag az A2A és A2B típus expresszióját mutatta ki HPAEC-n. Továbbá a két receptor, illetve G-fehérjék (P1 2A specifikus G α s és P2Y specifikus G α q és G α i2) csendesítésével azt is bizonyították, hogy az adenzin barriert erősítő hatásában a P1 A2A receptor játszik szerepet. Az ATP hatását ugyanez a munkacsoport korábban vizsgálta (Kolosova et al., Circ. Res., 2005, 97, 115-124), és bár közvetlenül a P2 receptorra irányuló kísérletet nem végeztek, a hozzá kapcsolható G fehérjék (G α q és G α i2) csendesítése az ATP receptorának részvételét igazolta a barrier erősödésében. Az adenzin kezelés a G α s-en keresztül a cAMP szint emelkedéséhez vezet, ami aktiválja a PKA-t. ATP kezelés után, ugyan cAMP szint emelkedést nem tapasztaltak, a PKA átmeneti aktiválódását detektálták. Ez egyrészt az általunk bemutatott TIMAP PKA/GSK3 általi foszforilációjával aktiválhatja a TIMAP-PP1c-t, ezt azonban eddig nem vizsgáltuk. Másrészt ismert az ATP/adenozin kezelés után a miozin foszfatáz aktivitásának növekedése (Kolosova et al., Circ. Res., 2005, 97, 115-124; Hartel et al., Cardiovasc. Res., 2007, 74, 487-496; Umapathy et al., Vascular Pharm., 2010, 52, 199-206). A miozin foszfatáz regulációjában nagyon fontos a MYPT1 regulátor alegység Thr-696 oldallácának ROK általi foszforilációja, ami a holoenzim aktivitását gátolja. A PKA a MYPT1 szomszédos, Ser-695 helyét foszforilálhatja és ezzel a gátló hely foszforilációját gátolhatja (Grassie et al., 2011, Arch. Biochem. Biophys., 510, 147-159). A miozin foszfatáz működését a MYPT1 számos kölcsönható fehérje partnere is befolyásolhatja, ezért a PKA hatás valamelyik kölcsönhatón keresztül is érvényesülhet. HUVEC sejteken például kimutatták, hogy a PKA-t aktiváló forskolin kezelés következtében a CPI17 fehérje trombin-indukált foszforilációja és kötődése a MYPT-hez, ezzel miozin foszfatázt gátló hatása lecsökkent (Aslam et al., Cardiovasc. Res., 2010, 87, 375-384).

4. 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.

5. *In vitro* méréseink szerint a Tyr-on foszforilált MLCK Ca²⁺ hiányában nem aktív, de ez nem indokolja az 5.1.1 ábrán a Ca²⁺/kalmodulin aktiváláshoz viszonyítva a Tyr foszforiláció downstream elhelyezését. A jelenleg rendelkezésre álló adatok alapján ez még nem ismert, ezért a két szignál up/downstream elválasztását el kellett volna kerülnöm.

6. Bár nem tartom kizártnak, hogy adott esetben egymást helyettesítsék, a MYPT1 és a TIMAP közötti PP1c β iránti „versengés” mögött véleményem szerint célként munkamegosztás állhat aszerint, hogy egy adott szignál mellett melyik holoenzim forma aktivitására van/nincs szükség a sejtben. A két fehérje a sejtmagban, 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. A két regulátor alegység szerkezeti hasonlósága miatt néhány korábbi közlés esetében még az is felmerülhet, hogy a kölcsönható partner/szubsztrát azonosításához az immunprecipitáció során alkalmazott MYPT elleni antitestek nem precipitáltak-e TIMAP-ot is. A Bíráló kérdésének megválaszolásához a két holoenzim szubsztrátjainak felhasználásával szisztematikus összehasonlító vizsgálatokat kellene végezni.

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

Debrecen, 2015. október 6.

Csortos Csilla