

VÁLASZ

Dr. Nyitrai Miklós, az MTA doktora bírálatára

Hálasan köszönöm dr. Nyitrai Miklós MTA doktori értekezésemről készített bírálatát, kritikai és dicsérő észrevételeit.

A Bíráló szóvá tette az immunfluoreszcenciás mikroszkópos felvételek méretét. Egy-egy ábrán a kontrollok és a különböző kezelések utáni minták felvételeit együtt mutatom be és az áttekinthetőség kedvéért igyekeztem a több oldalra kiterjedő ábrákat elkerülni. Ez viszont néhány esetben valóban azt eredményezte, hogy az egyébként határozott eltérések vagy hasonlóságok az egyes felvételek között kevésbé szembetűnőek.

A Bíráló kérdéseire az alábbiakkal szeretnék válaszolni.

1. Tüdő endotél sejtek vizsgálatai azt igazolják, hogy a sejtek bioaktív ágensekre vagy mechanikai stresszre adott válaszában kiemelkedően fontos szerepe van az aktin citoszkeleton térben irányított, dinamikus átrendeződésének. Ezekben a folyamatokban az MLCK az MLC foszforilációjának katalizálásával az aktin-miozin kötődéseket befolyásolja, mégis multifunkciós enzimnek tekintik. Az MLCK egyrészt kritikus szerepet játszik az ödémához vezető ágensek hatásában, amikor az MLC foszforilációja stressz kábelek kialakulását, ezzel sejtkontrakciót eredményez, ami barrier diszfunkcióhoz vezethet. Ugyanakkor a barriert erősítő, vagy annak helyreállítását elősegítő agonisták, mint például a szfingozin-1-foszfát (S1P), hatására is jelentős aktin polimerizáció és MLC foszforiláció játszódik le, de a sejt más részein, ami lamellopódiumok és kortikális aktinyűrű kialakulását segíti elő. Ezért az MLCK sejten belüli lokalizációjának, regulátor, szubsztrát vagy adaptor fehérjékkel való kölcsönhatásainak megismerése egy izgalmas feladat. Az endotél/nem-izom MLCK variánsai az egyedi N-terminális szakaszon térnek el egymástól. Az ismert splice variánsokon túl a fehérje N-terminálisához köthető SNP (single nucleotide polymorphism) variánsokat is leírtak, melyek korrelálnak a tüdő gyulladásos elváltozásaira való hajlammal (Flores et al., Genetic Epid., 2007, 31, 296-305; Gao et al., Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 2006, 34, 487-495). Egy nemrég megjelent közleményben NMR és *in silico* molekuláris modellezéssel végeztek szerkezeti vizsgálatokat, elsősorban a különböző MLCK variánsok egyedi N-terminális részét célozva (Shen et al., PLoS One, 2015, 10(6):e0130515). A vizsgálatok a splice és SNP variánsok eltérő kötődését mutatták a vizsgált adaptor fehérjéhez (14-3-3), illetve a molekula modellekben talált eltérések az N-terminális SH3-kötő motívumainak eltérő elérhetőségére utalnak. A variánsok N-terminálisában található szekvencia eltérések tehát nem csak a lehetséges foszforilációs helyeket, de az N-terminális régió harmadlagos szerkezetét is módosítják. Mindezek alapján az endotél MLCK N-terminális része a Tyr-foszforilációval történő szabályozás mellett további fehérje-fehérje kölcsönhatásokat is befolyásolhat, mégpedig nagy valószínűséggel variáns-specifikus módon.

2. A protein foszfatáz 1 (PP1) katalitikus alegysége (PP1c) egy 38 kDa-os fehérje, melynek négy izoformáját ismerjük, ezek szekvenciája erősen konzervált. A PP1c *in vitro* nagyszámú foszfoszubsztrát defoszforilációjára képes. Ezért a sejten a PP1c irányító, targeting fehérjékhez kapcsolódik, melyek meghatározzák a sejten belüli lokalizációt és a szubsztrát specificitást. Az endogén szubsztrát irányában a célirányító/targeting alegységhez kapcsolódó PP1c aktivitása gyakran többszöröse a regulátor nélküli PP1c aktivitásának. A PP1 holoenzim kötődése a foszfoszubsztráthoz elsődlegesen a targeting alegységen keresztül valósul meg. A miozin foszfatáz

esetében a foszforilált miozin a MYPT ankirin ismétlődéseire kötődik, ezzel a PP1c β katalitikus alegység és a foszfo-MLC térben közel kerülnek egymáshoz, hiszen a PP1c a MYPT N-terminálisához közel található PP1c kötőmotívumán kívül annak ankirin ismétlődésével is kölcsönhat (Grassie et al., Arch. Biochem. Biophys., 2011, 510, 147-159). A miozin aktuális foszforilációs szintjét, ezzel az akto-miozin kölcsönhatásokat az MLCK és a miozin foszfatáz aktivitásának egymáshoz viszonyított aránya szabja meg. Ezért nem meglepő, hogy az akto-miozin komplexben a PP1c és a MYPT is jelen van. Az általunk vizsgált miozinban gazdag endotél sejtfrakcióban, illetve a Bíráló által említett immunprecipitátumokban is az akto-miozin komplex révén a miozin mellett a miozin foszfatáz holoenzim is jelen van, melyből a PP1c β jelenlétét detektáltuk. A PP1 holoenzim akto-miozinhoz való kötődéséért azonban a MYPT alegység miozinhoz való kapcsolódása a felelős.

3. A GSK3 β kinázra jellemző, hogy előfoszforilált szubsztátot foszforilál, az első ún. „priming” helytől néhány aminosavnyi távolságban, az N-terminális irányában. Ezért feltételezhattuk, hogy a TIMAP PKA foszforilációja (Ser337) megelőzi GSK3 β általi foszforilációját (Ser333). Ezt igazolta, hogy az endotél sejtek forskolin kezelése után, ami a cAMP szintet növelve a PKA-t aktiválja, a GSK3 β specifikus gátlószere jelenlétében nem tapasztaltunk a gátlószer nélkül kezelt mintákhoz hasonló változást a sejtek alakjában, foszfo-ERM szintjében és transzendotél ellenállásukban. Ezért a csak PKA-val foszforilált TIMAP és a PP1c 4.1.3 táblázatban közölt asszociációs állandójának mérsékelten nagyobb értékének jelentőségével nem foglalkoztunk. A TIMAP foszforilált formáinak BIACORE vizsgálatához, ahogy a disszertációban jeleztem is, a nem foszforilált TIMAP mennyiségéhez viszonyítva kevesebb foszfofehérjét, nagyjából annak harmadát tudtuk a mérőfelületen immobilizálni. A mérési eredmények ugyan így sem mutattak kiugróan eltérő, nagyobb szórást, az egyszerűen foszforilált TIMAP-PP1c kölcsönhatásra meghatározott nagyobb kötődési állandónak ezért sem tulajdonítottunk nagy jelentőséget.

4. Az erek belső falát borító endotélium szelektív gátfunkciót lát el, normál körülmények között szövet és érszakasz specifikus módon biztosítja a kis molekulák és a folyadék átjutását, valamint nagyobb molekulák transzportját és ezzel segíti az adott szövet homeosztázisának fenntartását. Normális körülmények között a 3 nm-nél nagyobb molekulák transzportja, mint például albumin, immunglobulinok, a transzcelluláris útvonalon, kaveolák révén történik. A kisebb molekulák, mint például glükóz és a víz átjutása az endotél sejtrétegen a sejtek közötti kapcsoló rendszerek, a szoros és adherens kapcsolatok dinamikus működésével, paracelluláris úton történik. Ezért a monolayer sejt-sejt interakciók meghatározóak a permeabilitásban, ami jelentősen változhat az erek szervekben történő elhelyezkedésétől. Míg a vese glomerulusok afferens arterioláinak endotéliuma minden fehérjét átenged, addig a vér-agy gát endotél rétege igen zárt. A barrier funkció tehát relatív, attól függ, hogy milyen szervben helyezkedik el az endotélium. A funkció kóros megváltozása alapvető eleme számos kóros állapotnak és a tüdő betegségei ebben a tekintetben kiemelt jelentőséggel bírnak. Patológias körülmények között, pl. gyulladásos folyamatok során az immunválaszban az endotél sejtek aktív szerepet játszanak, többek között megnő áteresztő képességük, a leukociták adhézioja és angiogenezisre való hajlamuk. Amennyiben a gyulladáskeltő ágensek (trombin, hisztamin, S1P) hatása, az endotél sejtek aktiválódása tranziens, akkor a barrier stabilitása helyreáll. A citoszkeletonhoz kötött történések, a citoszkeleton átrendeződések alapvetően részt vesznek az előbb említett folyamatokban, kiemelve példaként a sejtek migrációját, a permeabilitási viszonyokat, folyadékmozgásokat. A citoszkeletális és ahhoz asszociált fehérjék reverzibilis foszforilációja, mint a barrier funkció szabályozója ismert. A szakirodalomban döntően a barrier funkció sérüléséhez kapcsolódó munkákat találhatunk, a funkció helyreállításának részleteiről kevesebbet tudunk. A

cAMP szint emelkedése ismert az erek átértesztő képességének csökkenését okozza (Danese et al., J. Immun., 2007, 178, 6017-6022; Sukriti et al., Pulm. Circ., 2014, 4, 535-551).

5. Az NHERF2 és a filopódiumok megjelenése közötti összefüggés részleteit még nem vizsgáltuk. A filopódiumokban lévő aktinszálak mechanikai stabilitását a szomszédos szálak illetve az aktinszálak és a plazmamembrán közötti kapcsoló fehérjék biztosítják. Az ERM család tagjai olyan fehérjék, amelyek foszforilált formájukban aktinszálak és a plazmamembrán között létesítenek kapcsolatot, a család tagjai közül leginkább a moezin fehérjét köti a szakirodalom a filopódiumokhoz (Mellor, Biochim. Biophys. Acta., 2010, 1803, 191-200). Munkánk igazolta, hogy az NHERF2 elősegíti az ERM foszforilációt, ezért feltételezhetjük, hogy a filopódiumok mechanikai stabilitásában így közvetve szerepe lehet. Ebben a tekintetben az aktinszál növekedését szabályozó forminok és az NHERF2 vagy ERM fehérjék közvetlen kapcsolatára utaló eredményről nem tudok. Érdemes lehet azonban megjegyezni, hogy a közelmúltban több közlemény is foglalkozik a formin családba tartozó FMNL3 szabályozó szerepével az angiogenezisben. Az egyik ilyen közlemény a foszfo-ERM és FMNL3 fehérjéket egy olyan közös komplexben írja le, amely a podocalyxin fehérje apikális felületéhez való irányítását végzi az ér lumen kialakulása során (Richards et al., Current Biology, 2015, 25, 2325-2331). Mi az NHERF2 csendesített sejtekben alacsony ERM foszforilációs szintet detektáltunk és angiogenezisre való hajlamuk gyakorlatilag megszűnt. Egy további összekötő láncszem lehet egy, az epitél sejtek polarizációjával kapcsolatos munka, amely szerint a podocalyxin és az NHERF2 PDZ doménon alapuló kölcsönhatásuk révén egy korai apikális fehérjekomplexet hoznak létre (Medre et al., J. Cell Biol., 2005, 168,303-313).

6. A 3D sejtkultúra technikák térhódítása valóban egyre növekszik. Egy 2010-es, a Blood folyóiratban megjelent rövid hozzászólás az endotél sejtek 2D és 3D tenyésztéssel megfigyelhető eltérő tulajdonságaira hívja fel a figyelmet (Blobe, Blood, 2010, 115, 5128-5130). Az endotél sejtek vizsgálata során a 3D tenyésztés előnyei az angiogenezis és a sejtinvázió tanulmányozása során mutatkozhatnak meg, míg az endotél sejtek migrációja, proliferációja, kitapadása jól követhető 2D kultúrákban is, például az általunk alkalmazott ECIS mérésekkel. Az angiogenezis vizsgálatokhoz alkalmazható Matrigel mátrix egy szolubilizált bazális membrán preparátum, elsősorban lamininből és kollagén IV-ből áll, de tartalmaz proteoglikánt, növekedési faktorokat és metalloproteázokat is. Vékonyabb rétegben alkalmazva ugyan nem valódi 3D kultúra, viszont az endotél sejtek tube forming/érformáló képességét jól detektálja és mikroszkópos, akár konfokális felvételek is készíthetők. Mi ezt a technikát alkalmaztuk. A Matrigel élő állatokon is alkalmazható. Egy frissen közölt munkában tumor sejtekből speciális tenyésztő edényben tumor szferoidot hoztak létre *in vitro*, amit Matrigelbe ágyazva a tesztelni kívánt drogokkal együtt szubkután injekciótak egerekbe. Ebben a modellben a tumor növekedése lassabb, mint csak a tumor sejtek injekciózása után, és a nekrosis is kisebb mértékű, így a tumor kifejlődése és vaszkularizációja jól tanulmányozható (Szade et al., Tumor Biol., 2015, Epub).

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

Debrecen, 2015. október 6.

Csortos Csilla