

Válasz Dr. Enyedi Ágnes tudományos tanácsadó bírálatára

Köszönöm az értekezés bírálatára fordított energiát és az elismerő szavakat. Az általános kritikai megjegyzésekre a következőt szeretném válaszolni:

Az elméleti hátteret általában az értekezéshez felhasznált folyóiratcikkek bevezetője alapján igyekeztem felvázolni. Azért nem fordítottam több figyelmet a SERCA funkció és a szerkezet kapcsolatára valamint a kalcium szignalizációban betöltött szerepükre, mert egyik sem volt a problémafelvetés és a kísérletek tárgya. Ezen felül úgy láttam, hogy az izomspecifikus SERCA-k (SERCA1a, SERCA1b és SERCA2a) jelátviteli szerepe - eltekintve a kontrakció-relaxációs ciklustól, melyre szintén nem végeztem kísérletet - kevésbé ismert, mint a SERCA2b és SERCA3 szignaling funkciója a nem-izom sejtekben. Amikor viszont a SERCA1b szerepe felmerült a SOCE-ban, azt a megbeszélés szövegében és az utolsó ábrán is összefoglaltam.

Igyekeztem általában az értekezés alapjául szolgáló cikkekben idézett szakirodalmi forrásokat használni, mert úgy láttam ezek segítségével lehet a megfelelő mértékben feltárni az adott problémakört. Nem bukkantam olyan munkára, amely a mienket érdemben vitatta volna, inkább áttekintő jelleggel és helyben hagyóan hivatkoztak a cikkeinkre.

Szintén az eredeti közlés iránti autentikusság okán vettem át a közlemények ábráit, amelyek, a közel húsz évvel korábbi cikkből származnak, a feliratok helyenként valóban apró betűvel íródtak. Azt gondoltam, hogy ilyen még neves folyóiratokban is előfordulhat, s egy kézi nagytípóval lehet rajta segíteni.

A tisztelt bíráló szakmai háttere miatt nálam bizonyára alkalmasabb arra, hogy felmérje Frank Wuytack professzor helyét az európai SERCA kutatásban. A leuveni laborban folyó többi munkához képest én inkább csak a regeneráció és adaptáció követésére használtam az izomspecifikus SERCA-kat. A kísérleti rendszert, amit hozzájuk vittem, ők soha nem vették át, még részlegesen sem. Hasonló probléma felvetési módot is csak talán egyszer alkalmaztak: az izomspecifikus SERCA-k és szabályozó fehérjék (szarkolipin, foszfolamban) szöveti kifejeződésének vizsgálatakor (Vangheluwe et al. 2005b). A szakterületeink átfedésére jellemző, hogy nem jártunk ugyanolyan témájú nemzetközi kongresszusokra és mindössze talán három cikkünk jelent meg Wuytack professzorral társszerzőségben olyan szakfolyóiratokban (1db Cell Calcium, 2db Biochem J), ahol Ő egyébként rendszeresen publikált. Együttműködésünk az érdeklődéseink határmezsgyéjén mozgott, és a kiszámíthatóság, úgy érzékelttem, e tekintetben is fontos volt.

“A munka nagy része egy a Dux László professzor közreműködésével létrejött tanulmányút illetve az azt követő hazatérés után hosszan fennmaradó együttműködés eredménye..” – írja a tisztelt bíráló. Valóban Dux László professzor, az intézet vezetője hívta fel a figyelmemet arra,

hogy Wuytack professzor Pesten tart előadást, utazzak oda, mert érdemes lenne vele kapcsolatot kialakítani. Az első két hónapos (1995) és a következő három hetes (1996) kiutazásomat a saját MKM pályázatomból fedeztem, a flamand fél szállást és laboratóriumi helyet biztosított. Szerencsére, az elképzelésem, hogy SERCA transzkripteket mutassak ki a leuveni laborban a soleus regenerálódás Szegeden izolált RNS-éből, jónak bizonyult. Az eredményt Wuytack professzor is érdekesnek találta. Ez volt az „ajánlás” a következő kiutazásokhoz. De még így sem lett volna hosszú együttműködés, évenként több hónapos kinti munka a flamand-magyar TÉT pályázatok nélkül, amelyek 2007-es megszűnésével a támogatásunk is véget ért.

„A megbeszélés utolsó alfejezetében eredményei alapján a jelölt felveti a génterápia lehetőségét, viszont itt is a legutolsó irodalmi hivatkozás 2007-ből származik. Mi lehet a jelen álláspont ebben a vonatkozásban?” – írja és kérdezi a tisztelt bíráló. Azért nincs későbbi hivatkozás, mert a legjobb tudomásom szerint csak az értekezéshez használt két folyóiratcikk (Zádor 2008, Zádor et al. 2011) írta le ezt a fajta regeneráció serkentést. Találtam három nem saját hivatkozást az általunk leírt regeneráció serkentésre, egyet a dnRas általira (Gupta et al. 2009) és két review cikket a SERCA1b shRNS általira (Bublitz et al 2011, J Cell Sci 2011 124: 2515-2519, Hübner and Efthymiadis 2012). Mindegyik recitáló, jóváhagyó jellegű. Azért nem említem ezeket, mert érdemben nem egészítették volna ki a kérdés taglalását. Az utolsó alfejezetben az izom eddig fel nem ismert növekedés szabályozásának lehetséges elemeit igyekeztem összefoglalni. A génterápia lehetőségét is felvetettem, de felhívtam a figyelmet arra is, hogy valószínűleg nehéz lesz más izmokban a módszer hatását igazolni. Azt is említem, hogy a jelenség eddig azért kerülhette el mások figyelmét, mert nem szinkronizált és nem egyöntetű regenerációs modelleket vizsgáltak, amelyekben nehéz mérni a fejlődő izomrostok növekedésének serkentését. Mindezen túl, talán azért sincsenek frissebb idézetek, mert magam is várakozó álláspontra helyezkedtem a téma nemzetközi terjesztését illetően mivel egy innovációs felmérés biztatására bejelentettem az SZTE-nek újjításként. A patentet évek múlva, 2008-ban bejegyezték, a tulajdonosa a szabályok szerint kezdettől fogva a Szegedi Tudományegyetem volt. Sajnos, szabadalom nem lett belőle. Úgy informáltak, hogy azért nem, mert bár évekig hirdették, mégsem jelentkezett rá vásárló és a szabadalmaztatás költségeit viszont nem állta az egyetem. Ezek után, mint feltaláló, átvehettem volna a tulajdonjogot, az ügyvivők szerint a szabadalom megadása már csak a díj befizetésén múlt volna, erre azonban nem vállalkoztam.

Válasz a kérdésekre:

(A referenciákat, ha az értekezésben is szerepelnek csak szerzővel és évszámmal említem, egyébként a forrást is feltüntettem.)

1. A patkányokon végzett regenerációs kísérletek eredményei mennyiben adaptálhatók humán vázizomra? Vannak-e szerkezeti/szabályozási eltérések a humán és a rágcsáló SERCA fehérjék között?

A patkányon végzett regenerációs kísérlete eredményei közvetlenül nem, de közvetve sokféleképpen adaptálhatóak. Részben szeretnék utalni a Nyitrai professzor úr első kérdésére adott válaszomra. A regenerálódó patkány izom elsősorban a degeneratív-regeneratív izomdisztrófiák regenerációjának modellje lehet. A vázizom regeneráció alapvető eseményei a patkány (rágcsáló) és humán vázizomban ugyanazok. Eltérések mutatkozhatnak azonban az egyes fehérje izoformák kifejeződésében. A SERCA1b kifejeződését, bár valószínűnek látszott, de nem sikerült bizonyítani a degeneratív-regeneratív Duchenne disztrófiás izommintákban (Kósa et al. 2015). További eltérés a patkányhoz képest, hogy a SERCA1b főtáls humán izommintákból kimutatható volt, de a neonatalisból alig (Zádor et al 2007, Kósa et al. 2015). Annyi biztosnak látszik, hogy a SERCA1b felnőtt humán izomban nem fejeződik ki, pl. a végtag transzplantációban sem, ha nincs izomregeneráció (Zádor et al. 2007, Fodor J., nem közölt adat). Az egyik jelentős különbség, amely a két faj izmainak regenerációját befolyásolhatja, a rosttípus összetételben rejlik: az embernek alig van MyHCIIb-t kifejező gyors izomrostja a patkányhoz képest. A kisebb emlősök izmai általában jóval több gyors rostot tartalmaznak a nagyobbakénál, s ez látszik a SERCA1a és SERCA2a arányán is, például, ha az egér, a patkány és a nyúl soleusának izomrost összetételét összehasonlítjuk.

A szerkezeti és szabályozási eltérésekre vonatkozóan azt tapasztaltam, hogy ha a humán és rágcsáló (egér, patkány) izomspecifikus SERCA izoformáit vizsgáltuk figyelembe kellett vennünk a szekvenciabeli eltéréseket, pl. a PCR primerek esetén. A humán és rágcsáló (egér, patkány, nyúl) SERCA1b 8 aminosavat kódoló 3' vége azonban például azonos. A szakirodalomban azt olvastam, hogy még a SERCA 1-3 között is kb. 70%-os homológia és a szerkezetük is hasonló. Sorrend állítható fel az ATP-áz aktivitásuk tekintetében: SERCA1-SERCA2a – SERCA2b és SERCA3. A kalcium affinitásuk nagyjából ezzel fordított irányban változik. A thapsigargin nevű gátlószerrerrel szemben, amely a Ca^{2+} mentes állapotra hat, a SERCA3 a legkevésbé érzékeny. Tudomásom szerint csak a nyúl fehér izmából kivont és kristályosított SERCA1a 3D szerkezete ismert, a reakció ciklust csaknem teljes mértékben átfedő (kilenc különböző) konformációkban (Toyoshima 2008, Arch Biochem Biophys 476: 3–11). A humán SERCA 3D szerkezetéről nem találtam kísérleti adatot. Úgy vélem, a nyúltól eltérő fajok SERCA1a szerkezetét predikcióval, a szekvencia adatok alapján ismerhetik. Az egymásnak megfelelő humán és rágcsáló izomspecifikus SERCA izoformák, úgy tudom, nem mutatnak DNS szekvenciájukból levonható alapvető szerkezeti különbséget. Természetesen kisebb szekvenciabeli eltérések előfordulnak, illetve a szabályozó fehérjék, ha együtt fejeződnek ki a pumpával, jelentős működésbeli eltéréseket okozhatnak (Vangheluwe et al. 2005b).

2. A neonatális SERCA1b mindössze nyolc aminosavban különbözik a SERCA1a variánsától a C-terminálison. Van-e ennek a C-terminális nyolc aminosavnak funkcionális vonzata

azon túl hogy a két izoforma aktivitása gyakorlatilag megegyező; eltérő szabályozás, esetleg eltérő fehérje-fehérje kölcsönhatások, szubcelluláris lokalizáció vagy egyéb?

A SERCA1a három dimenziós szerkezete nem nyújt információt a cito-/szarkoplazma felé nyúló C-terminális glicin illetve az ahelyett található nyolc aminosav lehetséges szerepéről (Bublitz et al. 2013, J Biol Chem 288: 10759–10765). A legújabb eredmény szerint a SERCA1b érzékenyebb a vezikula lumen kalcium szint növekedésére ezért kisebb kapacitású, mint a SERCA1a (Zhao et al. 2015, BBA 1852(10Pt):2042-7). Ez összevág azzal, hogy SERCA1b szint az SR kialakulásakor a legmagasabb és a kifejtett gyors izomrostok kalciummal feltöltött SR-jében már a SERCA1a dominál (Morishima and Nakanishi 2015 Channels 9:4. 173-174). További kérdés, hogy a SERCA1b citoplazmás orientációjú C-terminálisa milyen módon játszhat szerepet a lumenbeli kalciumszint érzékelésében. Fehérje kapcsolódást a C-terminálishoz még nem igazoltak, szerintem további eredmények várhatóak e tekintetben.

3. **Az egyes SERCA izoformák expressziója szelektíven upregulálódik az izomregeneráció során utánozva a neonatális fejlődés egyes lépéseit. Azon túl, hogy az egyes izoformák a fejlődés különböző fázisaiban jelennek meg, ismert-e az egyes SERCA variánsok transzkripció szabályozása?**

Az izom génkifejeződés transzkripció szabályozása általában soktényezős. A gyors típusú izom és így a SERCA1 transzkripció fő szabályozói a Hif-1 α , a cPKC, HDAC, MyoD és az ERK1/2-MAPK. A lassú típusú és így a SERCA2 transzkripció tipikus szabályozói a myogenin, PGC-1 α , PPAR δ , NFAT (Gundersen 2011, Biol Rev 86:564-600). Patológiai jelentősége miatt a thireoid hormon hatását ismerik legjobban a SERCA1 és a SERCA2 transzkripció szabályozása során. Az, hogy ez növeli vagy csökkenti, és hogy milyen mértékben, úgy tűnik a különböző izmok sajátosságai valamint az izomrost típusa alapján változik (Periasami and Kalyanasundaram 2007, Muscle Nerve 35:430-42). Igen lényeges, hogy mind a két transzkript alternatív splicing révén alakul tovább. A SERCA2a izoforma kifejeződése elsősorban a splicing és a 3' végi stabilitása által (Misquita et al. 2006), olykor az utána következő szinteken szabályozódhat (Vangheluwe et al. 2005a). Például, az az izoforma változás, amit a soleus regenerációban látunk az irodalmi adatok alapján a következőképpen magyarázható: először a SERCA1 transzkripció történik, mely a neonatális splicing következtében SERCA1b-vé alakul, majd az adult splicing révén a SERCA1a lesz domináns. Eközben a SERCA2 transzkript is folyamatosan jelen van a SERCA2b izoformában, de viszonylag alacsony szinten. A lassú beidegzés kialakulásával beindul a SERCA2 izomspecifikus splicingja és a SERCA2a a stabilitása révén marad magasabb szinten.

4. **A SERCA1b shRNS feltehetően a calcineurin/NFAT/IL4 útvonal szabályozásán keresztül serkenti az izomtömeg növekedését. Mérték-e NFAT transzlokációt vagy IL4 termelődést az shRNS-sel kezelt illetve a távolabbi rostokban?**

NFAT sejtmagi transzlokációt nem mértünk, de egy másik kutatócsoport igen (Tothova et al. 2006, J Cell Sci., 119:1604-11), ők írták le kalcineurin/NFAT jelút lassú izom differenciálódásban és regenerálódásban játszott szerepét is (Serrano et al. 2001, McCullagh et al. 2004, Callabria et al. 2009, PNAS 106:13335-40). siRNS transzfekcióval kimutatták, hogy az NFAT1-4 izoforma mindegyike fontos a lassú izom differenciációhoz (McCullagh et al. 2004). A riporterrel kapcsolt transzfektált NFAT1 a lassú izomspecifikus ingerlésre transzlokálódott a sejtmagba a gyors és a lassú vázizomban. Egyébként az NFAT1 a lassú típusú soleus sejtmagjaiban lokalizálódott, míg a gyors EDL-ben inkább a citoplazmában. A mi rendszerünkben egy hasonló vizsgálat aligha hozott volna konkludálható eredményt, mert a regenerációban lassú beidegzés érvényesül, s ettől eleve minden rost sejtmagjában magasnak várható az NFAT. Ezen kívül a kimutatáshoz két-foton mikroszkópia is szükséges lett volna (Tothova et al. 2006), amihez nem volt hozzáférésünk. Az IL4 termelődést, amint azt az eredmények megbeszélésében (87. o. 17-19 sor) említtem, nem mértünk, csak néhány domináns negatív Ras transzfektált rost környékén sikerült kimutatni, a távolabbi rostok körül nem (Zádor 2008). Az, hogy nem minden dnRas transzfektált rost körül sikerült kimutatni, lehetett azért is, mert az IL4 nem folyamatosan termelődött. A citokin szerepét igazolja, hogy antitestje megszüntette a regeneráció serkentést. Ugyanakkor az egész regenerálódó izom autokrin-parakrin növekedését nyilvánvalóan nem az IL4 szétterjedése okozta, hanem az általa kiváltott egyéb folyamatok.

5. Vizsgálták-e illetve van-e irodalmi adat arra vonatkozóan hogyan változik az NFAT1-4 fehérjék expressziója az izom regeneráció során.

Mi nem vizsgáltuk, egyrészt azért nem, mert mások igazolták az NFAT1-4 izoformák jelentőségét a regeneráció során (McCullagh et al. 2004), másrészt azért nem, mert az NFAT1-4 izoformák korántsem specifikusak a vázizomra, az izomdegradációban szerepet játszó sejtek is kifejezhetik ezeket (Horsley and Pavlath 2002, J Cell Biol. Mar 4;156(5):771-4). Egy ezzel összefüggő paramétert viszont mértünk, a *modulatory calcineurin interacting protein*-t kódoló és promóter régiójában számos NFAT kötőhelyet tartalmazó MCIP 1.4 mRNS szintjét. Az MCIP1.4 a regeneráció ötödik napján alacsonyabb volt, mint a normál izomban és a tizedik napra pedig elérte a normál szintet (Fenyvesi et al. 2004). Mindez összhangban volt a kalcineurin aktív alegység szintjének és a kalcineurin aktivitásának változásával és függött a beidegzéstől.

6. Mi a legfrissebb álláspont az irodalomban a Ras és a calcineurin útvonalak kölcsönhatásairól? Vannak-e újabb eredmények a RAS Ca²⁺-függő szabályozásáról?

Vázizomban nem találtam ide vonatkozó munkát az értekezésben idézetten kívül (Murgia et al. 2000, Estrada et al. 2003). Izomsejt kultúrában igazolták, hogy a MAPK (a Ras effektora) a CaMKII-vel és a kalcineurin-NFAT jelutakkal párhuzamosan, de nem redundáns módon befolyásolja az izomdifferenciációhoz szükséges miogenin

kifejeződését (Xu et al. 2002 Mol Biol Cell 13, 1940–1952). A Ras Ca^{2+} -függő szabályozásáról a legutolsó teljes terjedelmű összefoglaló cikket 2006-ban találtam (Cook and Lockyer 2006 Cell Calcium 39: 101–112), ebben a két jelút párhuzamosságát és lehetséges kapcsolatait tárgyalják a sejtciklus G1 fázisában. Mindezt úgy jellemzik, hogy több tényező és az egyes jelek küszöbértékének alakulása határozza meg a hatás eredményét. Egy kicsit későbbi és jóval rövidebb összefoglaló cikk szerint (Chuderland and Seger 2008, Communicative & Integrative Biology 1:1, 4-5) a nyugalmi fázisú sejtekben a citoplazmás kalcium szint emelkedése megváltoztatja az ERK fehérje interakcióit, az általa befolyásolt proteinek eloszlását és késlelteti az ERK sejtmagi transzlokációját, s az osztódás beindulását. A szerzők szerint a kalcium Ras-ra gyakorolt hatása négyféle mediátornak tulajdonítható: 1) a PYK2A aktiváció 2) a Ras-GRF serkentése 3) a Ras-GAP gátlása 4) a CaMKI és CaMKII serkentése. A kalcineurin nem volt a felsorolt közvetítők között. Kardiomiocitákban viszont leírták, hogy a CaMKII gátolja a kalcineurint (MacDonnell 2009; *Circ Res.* 105:316-325). Szeretném megjegyezni, hogy a fentieket osztódó sejtekben írták le. Az általam megfigyelt Ras és kalcineurin kapcsolat nem osztódó sejtekben, hanem fejlődő izomrostokban megy végbe, melyek irreverzibilisen posztmitotikus állapotúak, még csak nem is G0 fázisúak. Esetükben nem lehetséges a G1/S fázis közti átmenet, amelyhez az említett kapcsolatokat kiemelik.

Végezetül köszönöm a kérdéseit, amelyek ismét elgondolkodtattak a témám kapcsán adódó összefüggésekről.

Tisztelettel:

Szeged, 2016.06.01.

Zádor Ernő