



## Válasz ifj. Dr. Gallyas Ferenc egyetemi tanár bírálatára

Köszönöm ifj. Gallyas Ferenc professzor úrnak, hogy elbírálta a doktori értekezésemet. Köszönöm a dolgozat nyelvezetével, a rövidítésekkel és az ábrákkal kapcsolatos kritikai észrevételeit. Ezeket a jövőben igyekszem majd hasznosítani. A „Kísérleti megközelítés” fejezetbe valóban szerencsés lett volna a hivatkozások beépíteni és sajnálom, hogy a módszerek leírásának tömörítése helyenként az érthetőség rovására ment. Az értekezéssel kapcsolatos kérdéseire adott válaszaim a következők:

1. A gasztrointesztinális rendszerben a Nox1 és NOXA1 expresszióját nem vizsgáltuk fehérje szinten. A két gén expressziós mintázatának leírásakor nem álltak rendelkezésünkre specifikus antitestek, amelyekkel megbízhatóan ki tudtuk volna mutatni a fehérje jelenlétét. A NOXA1 fehérje ellen később előállítottunk antitestet, de az mRNA expressziót vizsgáló kísérletekhez hasonló, az egész gasztrointesztinális rendszerre kiterjedő vizsgálatot nem végeztünk.

A Nox1 fehérje ellen sajnos a mai napig nem sikerült előállítani megbízhatóan működő antitestet. A problémát jól jellemzi, hogy a Nox1 KO egér fenotípusát elemző két közlemény egyikében sem mutatták ki a Nox1 hiányát fehérje szinten. A colon epithel sejtekben, endogén módon expresszálódó Nox1 fehérje intracelluláris lokalizációja ezért jelenleg ismeretlen. Heterológ expressziós rendszerben a NOXA1 lokalizáció alapján úgy gondoljuk, hogy az enzimkomplex a plazmamembránban található (1).

Hilenski és munkatársai, humán aorta eredetű simaizom sejteken végzett kísérleteikben, a kaveolákban detektálták a Nox1-et (2), egy másik munkacsoport pedig – szintén vaszkuláris simaizomsejteket vizsgálva – az endoszómákban mutatta ki a fehérjét (3). Sajnos a kísérletekben alkalmazott antitestek specificitásának jellemzése egyik munka esetében sem volt túl alapos.

2. Több, a közelmúltban publikált megfigyelés is arra utal, hogy a Nox4-nek valóban szerepe lehet az oxigénérzékelésben. A hipoxia hatására indukálódó fehérjék közé tartozik a VEGF, amely serkenti az oxigénhiányos szövetekben az érképződést. A közelmúltban több munkacsoport is olyan eredményeket közölt, hogy a hypoxia hatására létrejövő VEGF indukcióban szerepet játszik a Nox4 (4, 5). Egy egér vese fibrózis modellben az találták, hogy a Nox4 KO egerekben alacsonyabb a HIF-1alfa szintje, ami megmagyarázhatja a csökkent VEGF indukciót (5). A Nox4 hiányában megfigyelt HIF-1alfa szint csökkenés arra utal, hogy a Nox4 által termelt H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> szerepet játszhat a HIF-1alfa stabilizációjában. Diebold és munkatársai a HIF-2alfa esetében bizonyították is, hogy a tüdő artériából származó simaizomsejtekben a Nox4 által termelt ROS stabilizálja a HIF-2alfa fehérjét, valószínűleg oly módon, hogy gátolják a fehérje

oxigén függő hidroxilációját (6). Újabb kísérleti adatok szerint a Nox4 szerepet játszhat a harántcsikolt izom oxigénérzékelésében. Jonathan Stamler munkacsoportja azt találta, hogy a Nox4 az O<sub>2</sub> tenzióval arányosan képez H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-t, amely a rianodin receptor meghatározott helyzetű ciszteinjeivel reagál és aktiválja az ionsatornát. Ennek hatására fokozódik a Ca<sup>2+</sup> felszabadulás és az izomösszehúzóerők erőssége (7).

3. A kísérletekben alkalmazott poliklonális anti-Duox antitest nem volt izoforma specifikus. A Duox izoformák elkülönítésére alkalmas antitestet nehéz előállítani, ugyanis a Duox1 és Duox2 fehérjék nagymértékben hasonlók egymáshoz. A Duox1 KO egérből származó szövetminták segítségével ugyanakkor azonosítani tudjuk a Duox szignál eredetét.

Végül még egyszer szeretném megköszönni a Professzor Úrnak, hogy elbírálta az értekezésemet és kérem fogadja el a kérdéseire adott válaszaimat.

Budapest, 2013. március 24.

Dr. Geiszt Miklós

#### HIVATKOZÁSOK

1. Ueyama T, Geiszt M, Leto TL. Involvement of Rac1 in activation of multicomponent Nox1- and Nox3-based NADPH oxidases. *Mol Cell Biol* 2006;26:2160-74.
2. Hilenski LL, Clempus RE, Quinn MT, Lambeth JD, Griending KK. Distinct subcellular localizations of Nox1 and Nox4 in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:677-83.
3. Miller FJ, Jr., Filali M, Huss GJ, Stanic B, Chamseddine A, Barna TJ, et al. Cytokine activation of nuclear factor kappa B in vascular smooth muscle cells requires signaling endosomes containing Nox1 and CIC-3. *Circ Res* 2007;101:663-71.
4. Zhang M, Brewer AC, Schroder K, Santos CX, Grieve DJ, Wang M, et al. NADPH oxidase-4 mediates protection against chronic load-induced stress in mouse hearts by enhancing angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:18121-6.
5. Nlandu KS, Dizin E, Sossauer G, Szanto I, Martin PY, Feraille E, et al. NADPH-oxidase 4 protects against kidney fibrosis during chronic renal injury. *J Am Soc Nephrol* 2012;23:1967-76
6. Diebold I, Flugel D, Becht S, Belaiba RS, Bonello S, Hess J, et al. The hypoxia-inducible factor-2alpha is stabilized by oxidative stress involving NOX4. *Antioxid Redox Signal* 2010;13:425-36.
7. Sun QA, Hess DT, Nogueira L, Yong S, Bowles DE, Eu J, et al. Oxygen-coupled redox regulation of the skeletal muscle ryanodine receptor-Ca<sup>2+</sup> release channel by NADPH oxidase 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:16098-103.