



Válasz Dr. Tretter László egyetemi tanár bírálatára

Köszönöm Tretter László professzor úrnak, hogy elbírálta a doktori értekezésemet és köszönöm a dolgozatról alkotott elismerő véleményét. Az értekezéssel kapcsolatos megjegyzésére és kérdéseire adott válaszaim a következők:

1. Az eredmények tárgyalásánál valóban szerencsés lett volna feltüntetni, hogy az adott eredményt melyik publikáció tartalmazza.

2. Az elektron oxidázon belüli „útvonalát” a Nox2 fehérje esetében tanulmányozták a legrészletesebben. Okkal feltételezhetjük, hogy a Nox/Duox család többi tagja esetében sem különbözik lényegesen az elektrontranszfer mechanizmusa, ugyanis a család egyes tagjai nagymértékben hasonlóak egymáshoz és különösen az elektrontranszportban szerepet játszó fehérjeszakaszok között nagy a homológia. A Nox2 a mitokondriális ROS-képzésben résztvevő fehérjékhez hasonlóan szintén flavoprotein. A Nox2 C-terminális része tartalmazza a NADPH- és FAD-kötő motívumokat. A fehérje harmadik és ötödik transzmembrán régiójának konzervált helyzetű hisztidinjei koordinálják a két hem proszтетikus csoport, melyek közül valószínűleg az egyik belső (a citoszolhoz közelebbi), a másik pedig külső helyzetű. A NADPH-ról származó elektron először a FAD-ra, majd a belső hemre kerül és onnan jut a külső hem-re, majd pedig a molekuláris oxigénre (1).

3. Az emlős Duox enzimek peroxidáz-szerű doménje valóban nagyfokú homológiát mutat az állati hem-tartalmú peroxidázok családjának többi tagjával. Az emlős Duoxok peroxidáz-homológ doménjeinek azonban nincs peroxidáz aktivitása, ugyanis több olyan konzervált aminosav is hiányzik a fehérjéből, amelyeknek elengedhetetlen szerepük van a hem kötésben és a katalitikus aktivitás kialakításában (2). Érdekes módon a *C. elegans* Duox peroxidáz-homológ doménje köt hemet és van egy viszonylag alacsony peroxidáz aktivitása, azonban ez csak ezredrésze a laktoperoxidáz aktivitásának (2).

A Duoxot expresszáló sejtekre jellemző, hogy nincs mérhető szuperoxid termelésük, hanem H_2O_2 -ot állítanak elő. Felmerült annak a lehetősége, hogy a peroxidáz-homológ doménnek szerepe lehet az oxigénre történő elektrontranszfer következtében képződő a szuperoxid hidrogén peroxiddá történő átalakításában. Az izolált peroxidáz-homológ domének végzett kísérletek azonban nem igazolták ezt az elképzelést (2). Egy 2005-ös összefoglaló cikkben fogalmaztuk meg azt az elképzelést, hogy a peroxidáz-homológ doménnek szerepe lehet egy aktív peroxidáznak (pl. LPO-nak vagy TPO-nak) a ROS forrás közelébe történő

lokalizációjában (3). Egy közelmúltban megjelent közlemény szerint a peroxidáz-homológ doménje képes a dimerizációra, amit konzervált helyzetű ciszteinek hoznak létre (4).

4. A thapsigargin szuperoxid termelésre kifejtett hatását vizsgáló kísérletekben nem voltak Fura-2-vel töltve a sejtek, tehát a festék nem befolyásolhatta a Ca^{2+} koncentráció változásait. A magas koncentrációjú TG szuperoxid termelést stimuláló hatásáért valószínűleg a TG, vagy a TG preparátumban található szennyeződés protein kináz C-t aktiváló hatása lehet a felelős.

5. A különböző Nox enzimek NADPH és oxigén iránti affinitásáról nagyon hiányosak az ismereteink. Ennek az az oka, hogy a Nox2 rendszeren kívül a többi Nox/Duox enzimet még nem vizsgálták tisztított formában, ami feltétele az ilyen típusú méréseknek.

A Nox2-ről tudjuk, hogy a NADPH-ra vonatkozó K_m -je 25-35 μM , míg a NADH-ra vonatkozó ennek legalább az ötvenszerese (1). A fagocita oxidáz oxigénre vonatkozó K_m -je a legtöbb közlemény szerint 5-10 μM körül van (1). A szubsztrátok szabályozó szerepével kapcsolatban a Nox4 esetében leírták, hogy hypoxiában fokozódik az enzim expressziója, ami valószínűleg a HIF-1alfa transzkripciós faktor közvetítésével jön létre (5). Mivel a Nox4 aktivitását elsősorban az expressziós szintje határozza meg, ezért hypoxiában valószínűleg fokozódik a Nox4 mediálta ROS termelés. A közelmúltban publikált eredmények szerint endothel sejtekben a Nox2 expressziója is emelkedik hypoxiás körülmények között (6).

6. A vad típusú urothel sejtek H_2O_2 termelése 1-1.5 nmol/10⁶ sejt/óra. Az alaptermeléshez valószínűleg hozzájárul a Duox1, ugyanis az enzim hiányában kb. 10 %-al alacsonyabb H_2O_2 termelést mérünk. A stimulus hiányában megfigyelt, Duox1-függő H_2O_2 termelésnek szerintünk az a magyarázata, hogy a nem stimulált sejtekben is kialakulhatnak olyan átmeneti Ca^{2+} szignálok (pl. oszcillációk), amelyek aktiválhatják a Duoxot.

7. A vizsgált Nox enzimek közül a Nox4 mutat konstitutív ROS termelést. Ez az egyetlen olyan Nox enzim amelynél nem ismerünk gyors aktivitás fokozódást kiváltó szabályozó mechanizmust. A Nox4 aktivitását tehát elsősorban az expressziós szintje határozza meg.

Végül szeretném még egyszer megköszönni Tretter László professzor úr bírálói munkáját és kérem a válaszaim elfogadását.

Budapest, 2013. március 25.

Dr. Geiszt Miklós

HIVATKOZÁSOK

1. Cross AR, Segal AW. The NADPH oxidase of professional phagocytes--prototype of the NOX electron transport chain systems. *Biochim Biophys Acta* 2004;1657:1-22.
2. Meitzler JL, Ortiz de Montellano PR. Caenorhabditis elegans and human dual oxidase 1 (DUOX1) "peroxidase" domains: insights into heme binding and catalytic activity. *J Biol Chem* 2009;284:18634-43.
3. Donko A, Peterfi Z, Sum A, Leto T, Geiszt M. Dual oxidases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2005;360:2301-8.
4. Meitzler JL, Hinde S, Banfi B, Nauseef WM, Ortiz de Montellano PR. Conserved Cysteine Residues Provide a Protein-Protein Interaction Surface in Dual Oxidase (DUOX) Proteins. *J Biol Chem* 2013;288:7147-57.
5. Diebold I, Petry A, Hess J, Gorlach A. The NADPH oxidase subunit NOX4 is a new target gene of the hypoxia-inducible factor-1. *Mol Biol Cell* 2010;21:2087-96.
6. Diebold I, Petry A, Sabrane K, Djordjevic T, Hess J, Gorlach A. The HIF1 target gene NOX2 promotes angiogenesis through urotensin-II. *J Cell Sci* 2012;125:956-64.