

Válasz Dr. Kellermayer Miklós egyetemi tanár bírálataira:

Először köszönetemet szeretném kifejezni, hogy MTA doktori munkám bírálatát elvállalta és azt pozitívan értékelte. A konkrét kérdésekre, felvetésekre az alábbi válaszokat adom:

Általános megjegyzések:

1. *...modell ábra az ErbB fehérjéről:*

A dolgozat készítésekor én is terveztem, hogy egy ilyen ábrát beleverek a bevezetésbe, hiszen számtalan változat elérhető az irodalomban és saját előadásaimhoz magam is készítettem ilyeneket. Végül azért döntöttem a kihagyás mellett, mert a dolgozat, ill. a bevezetés már így is elég hosszúra sikerült, és úgy éreztem, hogy a szöveges magyarázatból a folyamatok érthetőek lesznek.

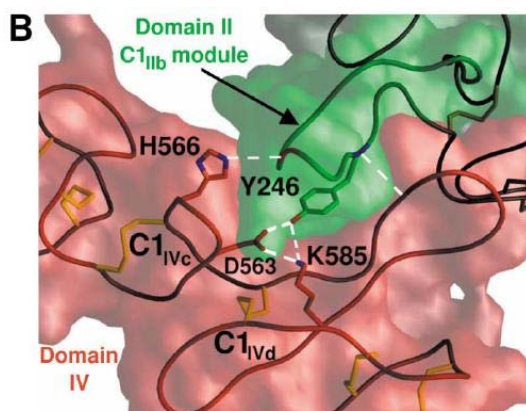
2. *...skála hiánya a konfokális mikroszkópos képek többségén:*

Sajnos a képek többségéről valóban hiányzik a skála, amiért elnézést kérek. A hiányosság magyarázata az egyes képeknél különböző. Van, ahol a dolgozat szerkesztése közben bekövetkezett technikai probléma okozta ezt, más esetben viszont egyszerűen az, hogy az eredeti közleményben sem szerepelt a skála. Ez utóbbi oka vagy az egyszerű feledékenység vagy pedig az, hogy a dolgozatba illesztett ábra az eredeti közleményben vagy egy nagyobb ábra vagy ábraszorozat részét képezte, ahol a méret, ill. skála magától értetődő volt.

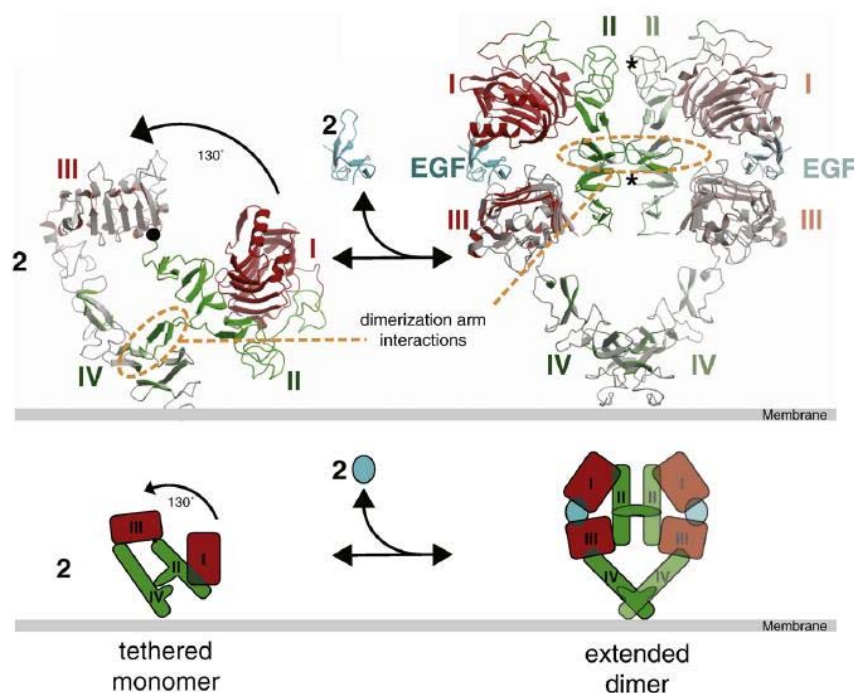
Részletes megjegyzések és kérdések:

1. *...milyen kölcsönhatás az intramolekuláris híd, a zárt-nyitott átmenet „hinge-bending” mechanizmussal valósul-e meg, ill. mennyi a nyitott átmenet élettartama?*

A II-es és IV-es domének között kialakuló intramolekuláris híd $2 \times 461 \text{ \AA}^2$ oldószer által elérhető területnek felel meg, ami az antigén-antitest interakcióhoz hasonló. A kölcsönhatás kialakításában számtalan oldallánc-gerinc és gerinc-oldallánc hidrogénkötés vesz részt, sőt, még az extracelluláris doménben előforduló oligoszacharid oldalláncok is hozzájárulnak a hidrogénhidak kialakításához. Az intramolekuláris híd röntgenkristallográfiás szerkezetét az alábbi ábra mutatja (. Mol Cell 2003;11:507-17.):



A nyitott-zárt átmenet a következő ábrán látható, mely alapján nyilvánvaló, hogy a konformációs átmenetet a II-III domének közti jelentős mértékű elfordulás eredményezi (Exp Cell Res 2009;315:638-48.):



A nyitott állapot élettartamával kapcsolatban tudomásom szerint egy cikk közölt adatokat „single particle tracking” mérések alapján. Az EGF által kialakított ErbB1 dimerek k_{off} értéke 0,27 sec volt, amiből 3,7 sec-os átlagos élettartam adódik (Nat Struct Mol Biol 2011;18(11):1244-9). Azt, hogy ennyi idő alatt mennyi tirozin foszforilálódik, nehéz megmondani, hiszen a kináz aktivitást általában oldatban, mesterséges szubsztátokkal mérik. A kinázoknál ez az érték nagyságrendileg 10-100 reakció/sec/enzim. A mérési adatok interpretálásának nehézségei ellenére valószínű, hogy a dimer élettartama alatt a kináz aktivitás elégséges ahhoz, hogy az összes foszforilálható tirozint foszforilálja, azonban szterikus okok miatt ez valószínűleg nem következik be ilyen gyorsan.

2. ...nukleáris ErbB fehérjék szerepe

Az ErbB fehérjék közül elsősorban az ErbB3-ról és ErbB4-ről mutatták ki, hogy a sejtmagban is előfordul. Eleinte immunfluoreszcens jelzések alapján, de egy magba nem várt fehérje megjelölése esetén mindig felmerül az emberben az aspecifikus jelölődés gondolata. Később azonban többféle módszerrel megerősítették, hogy az ErbB3 és ErbB4 tényleg előfordul a magban. Bár a teljes hosszúságú fehérjék magbéli előfordulását is leírták, gyakoribb az a feltételezés, hogy az ErbB3 esetében alternatív splicing révén (Cell Signal 2012;24(5):1074-85.), míg az ErbB4 esetében intramembrán proteolízis után (Exp Cell Res 2003;284(1):66-77) keletkező intracelluláris fragmentum kerül a magba, amelyben nukleáris lokalizációs szekvencia is található (Cell Signal 2012;24(5):1074-85.). A magban a transzkripciót aktiválják pl. a STAT fehérjék chaperonjaként (J Cell Biol 2004;167(3):469-78.) vagy transzkripciós koaktivátorként (Cell Signal 2012;24(5):1074-85.).

3. ...ErbB fehérjék kapcsolata a citoszkeletonnal

Az ErbB fehérjék leginkább a mikofilamentáris rendszerhez kapcsolódnak. Egyrészt az ErbB fehérjék aktivációja befolyásolja az aktin filamentumokat, pl. a PL-Cy-gelsolin útvonalon keresztül, ill. a cdc42 vagy Rac – LIM kináz – cofilin útvonalon keresztül

(Exp Cell Res 2002;272(2):93-108.). Másrészt a hatás fordított irányú is lehet, tehát az ErbB fehérjék motilitását is befolyásolja az aktinhoz való kötődésük. Így pl. kimutatták, hogy az aktin által létrehozott „confinement” zónák korlátozzák az ErbB1 laterális diffúzióját (Nat Struct Mol Biol 2011;18(11):1244-9.) és hogy a ligand által aktivált ErbB1 a filopódiumok mentén aktin és miozin függő retrográd transzportot szenved (J Cell Biol 2005;170(4):619-26.).

A jégen történő jelölés potenciális hátrányaira mi is felfigyeltünk, így az utóbbi időben a 4 °C-on történő jelölés helyett a 10-15 fokon történőt részesítjük előnyben, amikor az endocitózis gátlása mellett fontos a sejtek „életben tartása” is.

4. ...az ErbB fehérjék polarizált eloszlása

Az ErbB fehérjék eloszlása valóban polarizált egészséges hámszövetekben. A legtöbb közlemény szerint az ErbB fehérjék a hámsejtek bazolaterális felszínén találhatók, míg a membránhoz kötött ligandumok (neuregulinok) többsége az apikális doménben, ami biztosítja a túlzott stimuláció elkerülését (Nature 2003;422(6929):322-6.). Az ErbB2 esetében a bazolaterális transzportot az Erbin, egy PDZ domént felismerő fehérje biztosítja (Nat Cell Biol 2000;2(7):407-14.). A daganatos transzformáció során ez a polarizált eloszlás megszűnik, és az ErbB2 megjelenik az apikális doménben is, amit többek között a MUC4 fokozott expressziója okoz. A daganatos progresszió során aztán a membrán domének szétválása teljesen meg is szűnik. Ezek a receptor fokozott stimulációjához vezetnek (Sci STKE 2007;2007(381):re3.). Kísérleteinket daganatos sejtkultúrákban végeztük, ezért nem tartom valószínűnek, hogy az ErbB fehérjék polarizált eloszlása szerepet játszott volna.

5. ...a Singer-Nicolson modell érvényességéről

A Singer-Nicolson modellt egy 1972-ben megjelent cikkben alkották meg (Science 1972;175(4023):720-31.), ami azóta több módosításon, finomításon ment keresztül. Érdekes, hogy az eredeti cikk a lipid kettősrétegben úszkáló fehérjék mellett a fehérjék specifikus kölcsönhatását is hangsúlyozta, sőt, még egy olyan elektronmikroszkópos kép is volt a közleményben, amelyben a membránfehérjék klaszterizációját expliciten kimondták, de ezt az utókor teljesen elfeledte, és a modelltől annyi maradt meg, hogy a lipidek tengerében véletlenszerűen elszórt fehérjék vannak. Ennek ellenére akkoriban sem a lipidekre, sem a membránfehérjékre vonatkozóan nem volt elfogadott, hogy klasztereket alkotnak, vagy ha néha láttak is ilyeneket, akkor ezek összetartó erejéről és biológiai funkciójáról nem tudtak szinte semmit. Az azóta eltelt időben kifejlesztett metodikák és a felhalmozott információ alapján vált egyértelművé, hogy a lipid-lipid, fehérje-fehérje és lipid-fehérje kölcsönhatások jelentősen módosítják a véletlenszerű eloszlást, és a klaszterek, asszociátumok, szignalizációs platformok nagyon elterjedtek. Tehát a modell alapvetően most is érvényes, csak hangsúlyozni kell a hierarchikus klaszterizáció jelenlétét.

6. ...a FRET rövidítés értelmezéséről

A FRET rövidítés történelmileg valóban a Förster típusú rezonancia energia transzfert jelenti, de az utóbbi időben a biológiában szinte kizárólag a fluoreszcencia rezonancia energia transzfer értelmezés terjedt el, ezért használtam én is ezt a kifogásolt címben. A fluoreszcenciát tartalmazó kifejezés véleményem szerint azonban akkor is

hibás, ill. félrevezető, ha az akceptor is fluoreszcens, ugyanis maga a transzfer jelensége akkor sem fluoreszcencia, azaz sugárzásos kölcsönhatás révén valósul meg.

7. *...a pixelben levő molekulák kifejezés*

A pixel kifejezést a 2D képekkel kapcsolatban szinte kizárólagosan használják, a voxel inkább 3D képek esetében használatos még akkor is, ha tudjuk, hogy egy 2D kép is egy 3D objektumról készült. Mivel a munkában általában 2D képekkel kapcsolatban beszéltem a pixelekről, úgy érzem, furcsán hangzott volna a voxel kifejezés. Azzal teljes mértékben egyet értek, hogy a „pixelben levő molekulák” kifejezés pontatlan, hiszen valóban egy pixel intenzitását a point spread function (PSF) határozza meg akkor, ha a pixel méret a PSF-fel összemérhető vagy kisebb annál. A PSF-fel nem számoltam a képek kiértékelésekor, tehát nem történt vele dekonvolúció és a N&B méréseknél sem vettem figyelembe. Egyébként még FCS méréseknél is csak ritkán történik korrekció a PSF-re az „enigmatikus” γ faktorról. Mivel méréseim szinte kizárólag membránfehérjéken történtek, így a fluoreszcens jel szinte kizárólag a membránból származott. Ez arra utal, hogy a PSF-fel való korrekció hiánya lényegesen nem befolyásolta a méréseket.

8. *...intramolekuláris FRET mérések ErbB2-vel a 7B és 6B ábrán*

Antitestekkel történő FRET mérések esetében a FRET hatásfok nm-re való konverziója csak korlátozott mértékben végezhető el, elsősorban akkor, ha az antitest jelölési aránya ~ 1 , és minden antitest hordoz jelölést. Ezt is érdemes azonban kiegészíteni molekuláris modellezéssel (Biophys J. 2005;88(2):1354-63.). Ennek hiányában inkább csak az jelenthető ki, hogy a trastuzumab és pertuzumab kötő epitóp viszonylag közel, FRET távolságon belül található. A két ábrán bemutatott FRET értékek közötti különbség abból ered, hogy más antitestekkel voltak jelölve: egy egyik esetben donor-trastuzumab+akceptor-pertuzumab párral, míg a másik esetben fordítva. Így bár a távolság a két esetben ugyanakkora, az antitestek jelölési arányai biztosan nem, ami magyarázhatja a két mérés közötti eltérést.

9. *...homo-FRET mérések esetében fellép-e self-quenching?*

Elgondolásom szerint ennek valószínűsége viszonylag csekély ebben az esetben, mivel az antitestek jelölési aránya ~ 1 volt, így annak esélye, hogy két festék molekula között statikus vagy dinamikus kioltás következzen be, elég alacsony. Ezért erre vonatkozó méréseket mi nem végeztünk. Irodalmi adatok alapján azonban ismert, hogy az antitestek fluoreszcencia intenzitása nem nő lineárisan a jelölési aránnyal (festék molekula/antitest), aminek valószínű oka a self-quenching. De ez csak 3-as jelölési arány felett lép fel (J Histochem Cytochem 2003;51(12):1699-712.). Amit majd a módszer továbbfejlesztése során figyelembe kellene venni, az a jelöletlen antitestek jelenléte, hiszen a jelölési arány Poisson eloszlása miatt 1-es jelölési aránynál a jelöletlen antitestek aránya $e^{-1}=0,37$.

10. *...antitestek jelölése, ill. a jelölési arány*

Az antitestek jelölési arányát minden esetben meghatároztuk spektrofluorimetriás módszerrel. Ez általában 2-3 volt, kivéve a homo-FRET méréseket, ahol az antitestben belüli homo-FRET elkerülése céljából úgy választottuk meg a jelölési körülményeket,

hogy a jelölési arány ~ 1 legyen. A FRET mérések során nem vettük figyelembe az antitestek jelölési arányát, mivel

- nem kívántuk a FRET hatásfokot nm-re konvertálni (ami 1-nél nagyobb jelölési aránynál még a jelölési arány figyelembe vételével is nehézségekbe ütközik, mivel a jelölt aminosavak helyzetét ritka kivételektől eltekintve nem ismerjük)
- az egymással összehasonlítható FRET méréseknél mindig ugyanazon antitest párokat használtuk, így ugyanolyan jelölési aránynál történtek a mérések.

11. ...a tumor térfogat mérése tolómérővel

A xenograftok vizsgálatokor elterjedt és elfogadott, hogy a tumorok térfogatát tolómérővel határozzák meg a forgási ellipszoid térfogatának képletével:

$$\frac{4}{3}\pi abc = \frac{4}{3}\pi \left(\frac{w}{2}\right)^2 \frac{l}{2} \approx 0.5w^2l \text{ ha } a = b, 2a = w, 2c = l$$

ahol a, b, c az ellipszoid tengelyei, w és l pedig a szélessége és hosszúsága. A tumorok térfogatát nyilván pontosabban lehetne képalkotó eljárással meghatározni, de mivel a fenti módszer és képlet megfelelő pontosságot ad, ezért mi is ezt használtuk. A tumorok alakját a szélesség és hosszúság paramétereken kívül nem vettük figyelembe, mivel azok általában orsó vagy gömb alakúak voltak.

12. A FRET hatásfok alapján számított 6,29 nm távolság összevethető-e az ErbB molekuláról alkotott szerkezeti modellekkel?

A fenti távolság egy ErbB2 homodimerre vonatkozik, amelynek nincs kristályosított megfelelője. Azonban a 6,29 nm-es távolság jól egyezik mind az ErbB1 homodimer alapján becsült értékkel, mind az ErbB2 homodimer molekuláris modellezése alapján kapott értékkel (7,1 nm, Biophys J. 2005;88(2):1354-63.)

13. ...a 12-es ábra értelmezésével kapcsolatban

A 12-es ábra elsősorban a modell használhatóságát és kísérleti adatokra való illeszthetőségét volt hivatott demonstrálni, és nem elsősorban a biológiai válaszokat, amelyek a következő fejezetekben, a 13-as ábrán és a 4. táblázatban kerültek bemutatásra és megbeszélésre. A sejtenyésztésre használt médium hagyományosan 10% szérumot (FCS – fetal calf serum) tartalmaz, ami növekedési faktorok gazdag forrása a sejtek számára. A szérum megvonás, azaz a sejtek 0,1% FCS tartalmú médiumban való tenyésztése, a növekedési faktor receptorok és az egész sejt stimuláltságát csökkenti. A sejtek osztódása lelassul vagy megszűnik, kilapulnak és tirozin foszforiláltsági szintjük jelentősen csökken. Ezért ez jó kiindulási pont a növekedési faktorok hatásának vizsgálatához.

14. Mi az oka annak, hogy a BCF (bleaching correction factor) értéke antitestenként változott? Lehetséges, hogy ennek hátterében a fentebb is említett változó jelölési hatásfok áll?

Igen, elgondolásaink szerint az antitestek eltérő jelölési aránya, ennek megfelelően a fluorofórok eltérő molekuláris környezete állhat a BCF antitestenként eltérő értéke mögött. A fluorofórok tulajdonságainak jelölési aránytól, azaz a jelölt aminosav molekuláris környezetétől való függése ismert (Bioconjug Chem 2000;11(5):696-704.; J Histochem Cytochem 2003;51(12):1699-712.).

15. *A fluorofór pislogás (blinking) hogyan szól bele a mérési eredményekbe, különösen alacsony klaszterméret esetén?*

A blinking, azaz a reverzibilis, fény indukálta sötét állapotok jelenléte valószínűleg nem befolyásolta eredményeinket, mert a görbék alapján a folyamat egyértelműen irreverzibilis fotoelhalványítás volt, hiszen nem tapasztaltunk fluoreszcencia visszatérést.

16. *...a $\kappa^2=2/3$ közelítés érvényes-e formalin fixálást követően is?*

A fixálás minden bizonnyal csökkenti azon feltételezések érvényességét, melyek a $\kappa^2=2/3$ közelítés igaz voltához kellene. Véleményem szerint a mérések ennek ellenére alapvetően pontosak, mert

- a 1%-os formaldehides fixálás az antitest belső flexibilitását és az antitesthez kapcsolt fluorofór mozgási szabadságát nem csökkenti nullára
- az 1%-os formaldehides fixálással és fixálatlan sejtekkel kapott méréseink általában jó egyezést mutatnak.

17. *...a sejtenkénti ErbB receptorszám és a klaszterek specificitásának problémájáról*

- A sejtenkénti receptorszámot Qifikit nevű, antitest kötődés alapú aáramlási citometriás kalibrációs kit segítségével határoztuk meg. A módszer által szolgáltatott adatok metodikai hibája viszonylag kicsi, sokkal jelentősebbnek érzem a biológiai variabilitást, tehát a sejtvonal változását az egyes mérések között. Az ajánlásoknak megfelelően nem túl nagy (max. 15-20) passzázs számig fenntartott sejtvonalak esetében is előfordulhat 20-30%-os variabilitás, de ha ennél tovább tartjuk fenn a vonalakat, akkor akár nagyságrendi eltérés is lehet.
- Pontosan nem ismert egy ErbB fehérje által a membránban elfoglalt terület, mert nem ismerjük a fehérje viszonyát a membrán síkjához. Egy átlagos 10-20 μm nagyságú sejt felszíne kb. 1000 μm^2 . Egy ErbB fehérjét egy olyan hengernek elképzelve, amelynek sugara 5 nm, egy protein $7,8 \cdot 10^{-5} \mu\text{m}^2$ területet foglal el. Egy millió fehérje $\sim 78 \mu\text{m}^2$ -nek felel meg, ami a fenti hipotetikus sejt felszínének kb. 8%-a. Ismert, hogy jelentős overexpresszió esetén a membránfehérjék jelentős részét (25-50%) a fokozottan kifejezett fehérje teszi ki. Ezen nagyon egyszerű számítás összhangban van azzal, hogy a membránok területének ~ 25 -40%-át foglalják el a fehérjék (Proc Natl Acad Sci USA. 2008;105(8):2848-52).
- A véletlen asszociációk („confinement” vagy „crowding” indukálta klaszterek) és a valódi asszociátumok közötti különbségtétel régen ismert probléma. Nagyon jelentős overexpresszió esetén előfordul, hogy a FRET-tel mért asszociációk véletlen kolokalizációk eredményei, de ez véleményem szerint csak milliós expressziós szintnél várható. A véletlen és nem véletlen asszociációk közötti különbségtételre alkalmas a FRET donor és akceptor koncentrációktól való függésének mérése (J Cell Biol 1998;142(1):69-84). Ezenkívül SPT módszerrel követett molekulák segítségével valóban meg lehet becsülni a klaszterek élettartamát, ami EGF-indukálta ErbB1 homodimereknél az 1-es kérdésre adott válasz szerint $\sim 3,7$ s (Nat Struct Mol Biol 2011;18(11):1244-9), MHC-I klasztereknél ~ 30 sec (Biophys J 2012;102(7):1543-50.). Így valóban elképzelhető a véletlen és valódi asszociátumok elkülönítése, hiszen a véletlen asszociátumok várhatóan rövidebb élettartamúak. Így pl. SPT mérések alapján a nem ligand által formált ErbB1 dimerek k_{off} értéke $\sim 4\times$ nagyobb volt, mint az EGF által stabilizált dimereké

(Nat Struct Mol Biol 2011;18(11):1244-9). De megjegyzendő, hogy a véletlen (azaz nem közvetlen fehérje-fehérje interakció által létre hozott) asszociátumok sem tekinthetők biológiailag irrelevánsnak, hiszen pl. ezek teremthetik meg a specifikus asszociátumok létrejöttéhez az alapot a molekuláris proximitás segítségével. Az aspecfikus klaszterek keletkezése mögött állhat pl. azonos lipid mikrodoménben történő dúsulás, ami szintén biológiailag releváns.

18. Miért csak a sejtek szélein történtek a FRET mérések a 18. ábrán bemutatott kísérletekben?

Amikor a konfokális szelet a sejt középső síkjáról készül, akkor a membránfehérjék csak a sejt áthajló membránfelületein helyezkednek el. Így keletkezik a membránjelölés tipikus gyűrű alakú képe. Ebben az esetben a sejtek középső horizontális síkjáról történt a felvétel, és a vízfeltöltéses algoritmussal a sejtek széleit azonosítottuk, ami a membránnak felel meg. Ezért történtek csak ezekben a pixelekből a mérések. Elképzelhető, hogy a membrán ezen kívüli területeiben más FRET határfok lett volna mérhető, de erről a mérések nem adtak információt.

19. A 21. ábrán hogyan kell a klasztereket értelmezni?

Az ábrán EGF stimulált sejtek láthatók, ahol az ErbB1 egy része már a klatrin burkú gödrökben van. Ezek már a nagyméretű klaszter kategóriába esnek, és ezek felelnek meg a képen szemmel látható klasztereknek. Ezeken kívül az ErbB1 kis méretű asszociátumokat is alkot (dimertől hexamerig), de ezeket csak a N&B analízis oldotta fel.

20. ...a 22., ErbB1-eGFP-klatrin kolokalizációt bemutató ábra értelmezésével kapcsolatban

- Azért található nagy mennyiségű szabad, klatrinnal nem asszociált ErbB1-eGFP (tehát zöld pixel) a képen, mert ezek a receptorok még nem jutottak el a klatrin burkú gödrökig. Ill. lehet, hogy a későbbiek során sem fognak, mert ismert jelenség, hogy a klatrin dependens endocitózis viszonylag könnyen telíthető, tehát amikor az ErbB1-et telítjük EGF-fel, akkor az aktivált receptoroknak csak egy része fog klatrin függő endocitózist szenvedni.
- A 22B. ábrán a pixelek intenzitásait ábrázoltam. Azért eltérő a skálabeosztás, mert jelentős különbség volt a két jelölt fehérje fluoreszcencia intenzitása, ill. expressziója között.
- Az ErbB1 esetében nem a fluoreszcencia intenzitás hisztogramra, hanem a N&B módszerrel meghatározott látszólagos fényesség („apparent brightness”, 10-es egyenlet a dolgozatban) hisztogramra illesztettem három Gauss görbét, így ennek a klatrin intenzitás aszimmetrikus eloszlásával való összehasonlítása irreleváns. Egyébként a fluoreszcencia intenzitás eloszlása a legtöbb fehérje és sejt esetében inkább log-normális mint normális eloszlást követ, így az aszimmetrikus megjelenés egyáltalán nem kivételes.

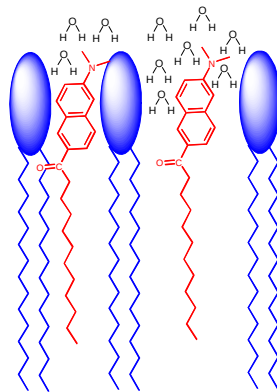
21. ...fluoreszcencia mikroszkópos mérések a nagyméretű klasztereknél kisebb asszociátumokon?

Tudomásom szerint a kis és közepes méretű klasztereken fluoreszcencia mikroszkópos méréseket csak indirekten végeztünk, tehát nem közvetlenül tettük

őket láthatóvá, hanem N&B vagy FRET mérések alapján következtettünk rájuk. Így ezek a klaszterek ténylegesen nem láthatóak hagyományos fluoreszcencia mikroszkópos vagy konfokális képeken. Félreértésre az ad okot, hogy a nagyméretű klasztereken belül kisebb klaszterek is vannak. Így pl. a N&B mérések esetén több esetben beszéltem a nagy méretű klasztereken belül elhelyezkedő dimerekről, trimerekről, stb. De ezekben az esetekben sem voltak a kis méretű klaszterek fénymikroszkóppal vizualizálhatók.

22. Mit jelent a membrán hidratáltság?

A membrán hidratáltságát az határozza meg, hogy a vízmolekulák milyen mértékben képesek a membrán hidrophil részébe, ill. azon is túl, a zsírsav oldalláncok közé hatolni. A vízmolekulák membránba hatolását az teszi lehetővé, hogy a lipid molekulák tranziensen eltávolodnak egymástól. Ez annál kisebb mértékű, minél szorosabb a lipidek pakolási sűrűsége (packing density). Az alábbi ábrán a membránba épült Laurdan molekulák fluorofórjának hidratációja látható.



23. ...a 35. ábrán bemutatott szegmentációs eljárás megbízhatóságával kapcsolatban

A képek konfokális mikroszkóppal készültek a konfokalitást optimalizáló pinhole mérettel. Ez csökkenti a fókusz sík alatti membránterületek hatását, amit úgy észlelünk, hogy a kizárólag membránfestett sejtek belseje teljesen üres, ha az alsó és felső membránfelszíntől távol történt a kép felvétele. Az analízishez ilyen képeket használtunk. Ennek ellenére nyilván a membránon belüli maszk tartalmaz némi hozzájárulást a fókusz sík alatti és feletti membránoktól, de mivel az EGF hozzáadása után azonnal felvett képeken tipikusan 0% körüli internalizált hányadot mértünk a QD-EGF-re (quantum dot-EGF), a fenti optikai, ill. geometriai artefaktumok hatása elhanyagolható.

24. A 37. ábra szerint jelentős mennyiségű MUC4 halmozódott fel egyes sejtek citoplazmájában. Mi lehet ennek a magyarázata?

A sejtek fixáltak és Triton X-100 kezelték voltak, mert a MUC4 ellenes 1G8 antitest csak ilyen körülmények között kötődik. Ez tette tehát lehetővé az intracelluláris antigének festését. A MUC4 intracelluláris funkcióiról nincsen tudomásom, de egy jelentős mennyiségben expresszált fehérje egy része mindig intracellulárisan található, hiszen a szintézis folyamán, ill. a membránrecirkuláció közben is intracellulárisan helyezkedik el. Másrészt a felvételek nem konfokálisak, így a fókusz sík alatti és feletti membránterületek is belevetülnek a képbe.

25. *Lehet-e a hialuronsav szintézist in vivo gátolni jelentős mellékhatások nélkül?*

Meglepő módon igen. Erre több bizonyíték is van. Egyrészt azok az egerek, amelyek csak 4-MU-t (4-metil umbelliferon) kaptak, a szőrzetük megjelenésének eltérésétől eltekintve nem mutattak más eltérést, igaz, itt csak viszonylag rövid ideig követtük az állatokat. Viszont a 4-MU-val klinikai kísérletek is történtek, és nincs tudomásom jelentős toxicitásról (Drug Discov Today 2008;13(3-4):161-71.; <http://clinicaltrials.gov/ct/show/NCT00225537>). Ezenkívül 4-MU tartalmú táplálékkiegészítők készítmények is kaphatók (Heparvit, Heparmed, DetoxPro). Valószínűleg a gyógyszer koncentrációja nem lesz olyan magas *in vivo*, hogy a hialuronsav szintézist teljes mértékben meggátolja, de a tumoros sejtek vagy kötőszövetes környezetük fokozott hialuronsav szintézisének kisebb mértékű gátlása is szinergisztikusan fokozhatja egyéb szerek (pl. trastuzumab) hatását.

26. *Mi a „scratch assay” lényege?*

A módszer alapja az, hogy ha a konfluens sejtkultúrába egy steril tűvel egy csíkot karcolunk, azaz innen eltávolítjuk a sejteket. Megmérjük a sejtmentes terület szélességét, majd ezt követően fél-egy nap múlva megvizsgáljuk, hogy a sejtek migrációja ezt mennyivel csökkentette. A módszer egyszerű és olcsó, és a Boyden kamrás módszerek alternatívájaként szolgál. Hátránya, hogy a sejtproliferáció és a migráció hatása keveredik, tehát az eredmények csak akkor értelmezhetőek egyértelműen, ha a sejtek osztódása a vizsgált fél-egy napos intervallumban nem jelentős (Nat Protoc 2007;2(2):329-33.). Szerencsére, a vizsgált JIMT-1 sejtek viszonylag lassan osztódnak, így a proliferáció nem eredményezett kísérleti artefaktumokat.

Végezetül még egyszer szeretném megköszönni, hogy MTA doktori disszertációm bírálatát elvállalta és azt kedvezően értékelte.

Dr. Nagy Péter