

Válasz Dr. Nyitrai 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:

1. *...van-e létjogosultsága különböző R_0 -al rendelkező fluorofórpárokkal végzett mérések összehasonlításának a homo-FRET mérések esetében?*

A fluorofórpárok R_0 értékei tipikusan 4-7 nm távolságtartományba esnek. Bár ezen tartomány szélessége nem túl nagy, ez elvileg lehetőséget teremt arra, hogy a különböző R_0 -al rendelkező festékpárokat összehasonlítsuk: a nagyobb R_0 -al rendelkezők esetében egymástól távolabb levő molekulák is egy klaszterben levőnek számíthatnak. Így várható, hogy a nagyobb R_0 -al rendelkező festékpárok esetén nagyobb lesz a kimutatott klaszterek mérete vagy kisebb a monomer hányad. Azonban a mérés praktikus kivitelezhetőségével, ill. az eredmények kvantitatív interpretálásával kapcsolatban számtalan probléma merülne fel. Úgy gondolom, hogy a plusz információ, amit egy ilyen megközelítés nyújtana, a klaszterek nm-ben kifejezett nagysága, ill. a klaszterben levő fehérjék nm-ben kifejezett távolsága lenne. Az $N > 3$ méretű klasztereknél már a klaszterek geometriája is jelentős szerepet játszik a homo-FRET folyamatokban, gondoljunk pl. arra, hogy egy $N=4$ elemű klaszternél a molekulákat egy rombusz vagy négyzet csúcsaira helyezzük, az átlósan elhelyezkedő molekulák távolsága jelentősen különböző. Ezért az 1990-es években Runnels és Scarlata által levezetett képletek használható formájában a klaszter minden molekulapárja esetében ugyanolyan erősségű FRET-et tételeztek fel. Bár ez kétségkívül jelentős és talán túlzott mértékű egyszerűsítés, ez teszi lehetővé a kísérleti paraméterek olyan szintre csökkentését, ami kísérletes szempontból elfogadható. A különböző R_0 -al rendelkező festékpárok esetében ezeket az egyszerűsítéseket felül kellene vizsgálni, ami a kísérletesen meghatározandó paraméterek számát jelentősen növelné. Ezért bár a módszer új információt adna a klaszterekre vonatkozóan, rendkívül nehéz lenne megvalósítani.

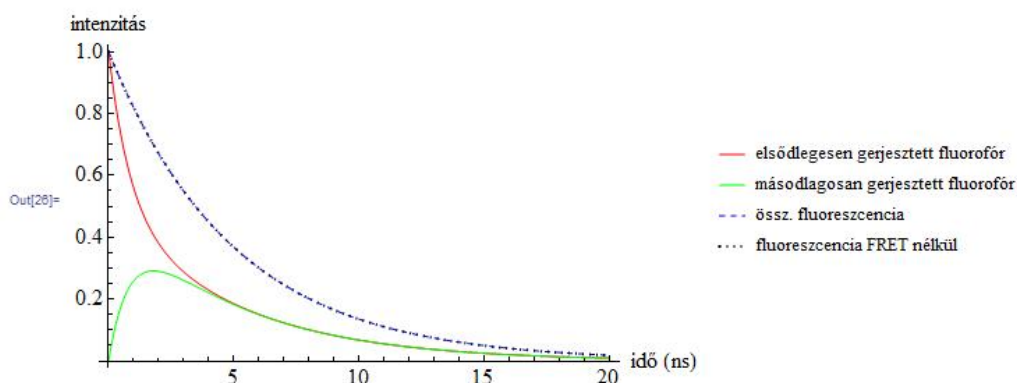
2. *...miért nem lehet a homo-FRET-et a fluoreszcencia élettartam mérésével mérni?*

Minden FRET folyamat során a gerjesztő fény által gerjesztett molekulák élettartama csökken. Ez hetero-FRET esetében elméletileg könnyen mérhető, hiszen az akceptor fluoreszcencia más hullámhosszon történik. Homo-FRET esetében azonban a másodlagosan, homo-FRET által gerjesztett molekulák is ugyanazon hullámhosszon emittálnak, ezért fluoreszcenciájuk hozzáadódik a „donor” fluoreszcenciájához. A rendszert leíró differenciálegyenlet-rendszer a következő:

$$\begin{aligned} \frac{d\rho_j}{dt} &= -\frac{\rho_j(t)}{\tau} - \rho_j(t)k_{\text{FRET}} + \rho_k(t)k_{\text{FRET}} \\ \frac{d\rho_k}{dt} &= -\frac{\rho_k(t)}{\tau} - \rho_k(t)k_{\text{FRET}} + \rho_j(t)k_{\text{FRET}} \Rightarrow \begin{aligned} \rho_j(t) &= 0.5(1 + e^{-2k_{\text{FRET}}t})e^{-\frac{t}{\tau}} \\ \rho_k(t) &= 0.5(1 - e^{-2k_{\text{FRET}}t})e^{-\frac{t}{\tau}} \end{aligned} \end{aligned} \quad (1)$$

$\rho_j(0)=1, \rho_k(0)=0$

ahol ρ_j és ρ_k a gerjesztett állapotban levő elsődlegesen gerjesztett és homo-FRET által gerjesztett molekulákat jelenti, τ a fluoreszcencia élettartam FRET nélkül, k_{FRET} pedig a homo-FRET sebességi állandója. Az egyenletrendszer megoldásával a következő kinetikák adódnak, amiből jól látszik, hogy bár az elsődlegesen gerjesztett festék élettartama valóban csökken, ezt kompenzálja a másodlagosan gerjesztett molekula:



3. ...milyen szerepet játszanak a citoszkéletális komponensek az ErbB receptorok klaszterizációjában?

Az ErbB proteinek, és különösen az EGF receptor (EGFR) citoszkéletális asszociációival kapcsolatban sok kísérletes eredmény van. Ezekben belül a 90-es évekből származókat óvatosan kell kezelni, mert azokban a citoszkéletális elemek szerepét úgy vizsgálták, hogy összehasonlították a sejt detergens szolubilis és inszolubilis (citoszkélethonhoz kötött) EGFR frakcióinak EGF affinitását és kináz aktivitását. Azonban ma már tudjuk, hogy a membránreceptorok nemcsak citoszkéletális kihorgonyozódásuk, hanem lipid tutaj asszociációjuk miatt is lehetnek detergensben oldhatatlanok, így ezen régi eredmények interpretációja nehézkes (pl. Endocrinology 1995;136(5):2198-205). Újabb kísérletes módszerekkel is vizsgálták ezt a kérdést (pl. Nat Struct Mol Biol 2011;18(11):1244-9). Itt fluoreszcensen jelölt aktint expresszáltattak a sejtekben és így figyelték meg a fluoreszcens quantum dot-hoz kötött EGF-fel jelölt receptorok mozgását. Az eredmények arra utaltak, hogy az aktinháló bezárja a receptorokat („confinement”) és növeli a receptor dimerek stabilitását. Az aktinon kívül aktinhoz kapcsolt motorfehérjék szerepe is felmerült (J Cell Biol 2005;170(4):619-26.). Bebizonyosodott, hogy az EGF-hez kötött aktív receptor dimerek a filopódiumok mentén szállítódnak, amiben valószínűleg az aktin filamentumok negatív vége felé szállító miozin VI-nak van szerepe. Tehát a citoszkéletális komponensek közül elsősorban a mikrofilamentumoknak és a hozzájuk kapcsolt motorfehérjéknek van szerepe az EGF receptor dimerek stabilitásának növelésében és membránon történő mozgatásában.

4. ...A 41. oldalon a 21. képlet nem egy egyenlet. Hogyan történt ezzel az összefüggéssel az illesztés?

A 21. képlet az egyenlet egyik oldala, a teljes egyenlet a következő:

$$A_{\text{mért}} = A_{\text{min}} + \frac{A_{\text{max}} - A_{\text{min}}}{1 + 10^{n(\log(c) - \log(IC50))}} \quad (2)$$

Ezt az egyenletet illesztettük a mért pontokra ($A_{\text{mért}}$ a koncentráció (c) függvényében) az A_{max} , A_{min} és $IC50$ változókat használva illesztési paraméterként.

5. ... nulla lenne-e a FRET, ha YFP-t és CFP-t összekevernénk?

Ha a sejtek oldható (tehát más proteinhez nem kapcsolt) YFP-t és CFP-t fejeznének ki, akkor alacsony expressziós szint esetében várhatóan nulla lenne a FRET értéke, de magas expressziós szintnél már a véletlen asszociációk miatt valószínűleg nem. Az eredmények fejezetben ismertetett kísérletekben azért használtunk YFP-CFP fúziós konstrukciókat, mert a donor és az akceptor molekulák számának ugyanannyinak kellett lenni a sejtben az α faktor meghatározásához.

6. *...lenne-e értelme egy olyan CFP-YFP konstrukciónak, amelyben a két fluorofór között egy enzimátikus hasító hely is van?*

A három CFP-YFP konstrukció közül az egyik, a 25 aminosavból álló linkert tartalmazó, valójában tripszin által hasítható. Így tripszin hasítás hatására a CFP fluoreszcenciája növekszik (tripszin indukálta „dequenching”), amit a cikkben be is mutattunk, de az MTA doktori munkából kimaradt, mert ott csak az áramlási citometriás kalibráció szempontjából fontos eredményeket tárgyaltam.

7. *...mi az oka annak, hogy a FRET eloszlás széles alacsony donor intenzitás esetében és sokkal keskenyebb magas donor intenzitásoknál?*

Bár az expressziós szint növelésével általában nő a klaszterképződés is a tömeghatás törvényének megfelelően, a fenti jelenséget elsősorban mérés technikai tényezők okozzák. Alacsony donor intenzitás esetén a FRET-et megadó képletbe olyan intenzitásokat kell helyettesíteni, melyeknek nagy a hibája a fotondetektálás Poisson statisztikája miatt. Ez a hibaterjedés miatt a számított FRET értékekben is megjelenik, és elsősorban ez okozza a nagy intenzitások felé keskenyedő FRET eloszlást. Annál is inkább, mivel az ábrán intramolekuláris FRET mérési eredmények vannak, így ott nem várható expressziós szinttől függő FRET hatékonyság.

8. *...van-e arra lehetőség, hogy a klaszterméret valószínűleg folytonos eloszlását beépítsük a homo-FRET modellbe?*

A mi homo-FRET cikkünkkel majdnem egy időben megjelent egy olyan közlemény, ami pontosan ezt tételezte fel (Biophys J 2007;92(9):3098-104). A szerzők azonban a modell sok szabad paramétere miatt konkrét kísérletes eredmények illesztését nem végezték el, hanem inkább kvalitatív-szemikvantitatív következtetéseket vontak le modellük jóslata és az irodalomban már elérhető kísérleti eredmények összevetésével.

9. *...mi a jelölt elképzelése a dolgozatban ismertetett kutatások jövőjét illetően?*

Az ErbB fehérjék klaszterizációjának kvantitatív jellemzését eddig csak az ErbB1 és ErbB2 molekulákra terjesztettük ki. Szeretnénk a későbbiekben az ErbB3-t, és a távolabbi jövőben az ErbB4-et is bevonni a vizsgálatokba. Az ErbB3-ra vonatkozó vizsgálatok már folyamatban vannak. Szintén vizsgáljuk a membrán dipólpotenciáljának szerepét az ErbB fehérjék klaszterizációjában. A receptor orientált daganatterápiával kapcsolatos vizsgálatokban a dolgozat megírása óta már megjelent egy újabb közleményünk, amelyben a hialuronsav maszkírozó hatását klinikai emlőtumor mintákon is igazoltuk. Az elisidepsin hatásmechanizmusával kapcsolatos projektben jelenleg, ill. a közeljövőben a hipoxia hatását vizsgáljuk a gyógyszer hatásosságára, hiszen a hipoxia a lipid hidroxiláció csökkentésével befolyásolhatja a molekula membránhoz való kötődését. Módszertani téren tervezzük a quantum dot-ok (QD), mint fluoreszcens jelzőanyagok szélesebb körű felhasználását. Ezen téren biztató előzetes eredményeink alapján egyedi QD-okat tudunk vizualizálni, és ezáltal egyedi ErbB fehérjék vizsgálata is lehetővé válik. Szintén szeretnénk kiterjeszteni ezeket a vizsgálatokat a nagyfeloldású mikroszkópiák felé, amelyek az Abbé képlet által meghatározott határnál jobb feloldású képet szolgáltatnak.

Végezetül még egyszer szeretném köszönetemet kifejezni a bírálónak munkám pozitív értékeléséért és a bíráló megírásába fektetett munkájáért.

Dr. Nagy Péter