

Válasz Dr Sümegi Balázs egyetemi tanár bírálatára

Válaszomban a bírálatból idézett szöveget dőlt betűvel jelöltem. A dolgozatomból idézett szöveget idézőjelek közé tettem.

Köszönöm, Sümegi professzornak hogy értekezésemet átnézte és fontos, inspiráló kérdéseket vetett föl.

Válasz a kérdésekre:

Az ABCB11, illetve ABCG2, transzportereket aktiválja a koleszterin mikro-doménokban való elhelyezkedésük, mit gondol, hogy itt a lipid környezet, vagy az esetleges interakciójuk más lipid raft-ban dúsuló fehérjével aktiválhatja a transzportereket. Önnek, vagy másoknak, vannak-e ilyen adataik?

Transzporterek és kismolekula avagy makromolekula kölcsönhatás specificitás vizsgálatára általánosságban 3-féle kísérleti megközelítést / rendszert szoktak használni: i) rekonstituált rendszereket, ii) knockout/knockdown vagy éppen túlexpresszázó rendszereket illetve iii) mutagenézis vizsgálatokat.

Az ABCG2 esetében megmutatták, hogy MDCKII-BCRP sejtvonalban caveolin-1-et is tartalmazó detergens rezisztens membrán frakcióban lokalizálódik, és ko-immunprecipitálódik caveolin-1-el (Storch 2007 JPET 323:257). Ugyanezen rendszerben a caveolin-1 expressziójának RNS interferencia általi 85-95%-os csökkentése az ABCG2 aktivitásának mintegy 35%-os csökkenéséhez vezetett (Herzog 2011 Naunyn Schmid Arch Pharmacol 383:1). Mivel a caveolin-1 knock-down-ja nem vezetett az ABCG2 lokalizációjának jelentős változásához, a szerzők kijelentették, hogy a caveolin-1-el való kölcsönhatás pozitívan modulálja az ABCG2 fehérje aktivitását. Az ABCG2 fehérje – koleszterin kölcsönhatás vizsgálatában magyar kutatók, Sarkadi Balázs valamint Váradi András és munkacsoportjaik végezték el a legfontosabb vizsgálatokat. Megmutatták, hogy egy rekonstituált rendszerben, proteoliposzámában szterolok, többek között a koleszterin megőrzi potencírozó hatását (Telbisz 2013 Biochem J 450:387). Kijelenthető tehát, hogy a szteroloknak önállóan is van potencírozó hatásuk a transzporter aktivitására. Egy további kísérletsorozatban a két labor mutagenézis vizsgálatok során két olyan fehérje motívumot a 482-es aminosavat és az 555-558 peptidszakaszt azonosított, utóbbi megfelel a szteroid-kötő elem (LXXL) konszenzus szekvenciának, és amelyek módosítása befolyásolja a fehérje aktivitás koleszterin érzékenységet. A mutagenézis eredményei megerősítik, hogy a koleszterin közvetlenül is hatással van az ABCG2 aktivitására.

Az ABCB11 caveoláris/raft fehérjékkel illetve koleszterinnel való kölcsönhatására kevesebb adatot publikáltak. Stieger és munkatársai megmutatták, hogy több kanalikuláris ABC transzporter, többek között az ABCB11 is ko-lokalizálódik a caveolin-1 fehérjével, valamint májspecifikus túlexpressziója a caveolin-1 fehérjének a biliáris epesó kiválasztás mintegy mintegy 40%-os emelkedésével járt az ABCB11 expressziójának és

lokalizációjának megváltozása nélkül (Moreno 2013 Hepatology 38:1477). Hozzá kell tenni, hogy itt a lokalizáció változatlanlansága nem a mikrodoménekhez való asszociáció változatlanlanságát, hanem a kanalikuláris membránban való expressziót jelenti. Közvetlen ABCB11 – caveolin-1 kölcsönhatást megmutató közleményről nincs tudomásom. Továbbá, a publikus doménéből nem hozzáférhetők rekonstitúciós illetve mutagenézis vizsgálatok.

A Jelölt kimutatja ' hogy a kávéssav, ferulinsav és ezek dihidro származékai valamint konjugátumai renális szekréciójában fontos szerepet játszanak azSLC22A6/A8 és egyéb transzporterek. Ezek transzportjára számos fontos megállapítást tett. A fenti anyagok virágkorukat élik, mint antioxidáns és gyulladás gátló természetes molekulák ' Ezért érdekes lenni tudni, hogy a jelölt által sejtekenvégzett transzport vizsgálatok, illetve a fenti molekulák állatokból, vagy emberből történő ürülési paraméterei között milyen összefüggés van.

Több *in vivo* vizsgálat is foglalkozott a kávéssav, ferulinsav és származékaik ürülésével.

Patkányban a ¹⁴C-jelölt transz kávéssavval történt per os kezelés után a radioaktivitás 4,6%-a ürül a széklettel, míg 68%-a a vizelettel (Omar és mtsai 2012 J Agricult Food Chem 60:5205 Absorption). A vizeletben található metabolitok jelentős része szulfát.

Egy korábbi tanulmány jelöletlen ferulinsav patkányban történt orális (po) illetve intravénás (iv) alkalmazásakor a dózsinak mindössze 10,5 illetve 11,5%-át találta a vizeletben, konklúziójuk az volt, hogy a renális exkréció a ferulinsav illetve a kiválasztott mennyiség mintegy felét (po) harmadát (iv) kitevő glükuronid ürülésének nem a legfontosabb útvonala (Choudhury 1999 Free Rad Biology & Med 60:5205). A látszólagos ellentmondás valószínűleg onnan származik, hogy a Choudhury tanulmány nem vizsgálta a ferulinsav-szulfát szinteket, amik az Omar tanulmány szerint több mint 10-szeresei a kiválasztott glükuronid mennyiségének.

Az elvégzett klinikai vizsgálatok is azt mutatták, hogy a vizeletbe történő kiválasztás a fő útvonal (Wong et al. 2010 J Nutr Biochem 21:1060). Megállapítható tehát, hogy a kávéssav, ferulinsav és származékaik ürülése elsősorban renálisan történik. Mindez igazolja *in vitro* eredményeink relevanciáját.

A publikált specificitás vizsgálatok is korrelálnak a mi adatainkkal abban, hogy a vizeletben a plazma szintekhez mérten sokszor nagyon jelentősen megnövekszik a szulfát illetve glukuronid metabolitok mennyisége (Stalmach et al. 2009 Drug Metab Disp 37:1749).

Az *in vitro* adatok *in vivo* adatokkal való korrelációjára további adatokon (szekréciós komponens a renális ürülésben, transzporter expresszió IVIVC, fehérjekötés, stb.) alapuló modellezési vizsgálatok adhatnának választ, ahogy az általunk megfigyelt regioszelektivitásra vonatkozóan is. Ilyen vizsgálatokat a szakirodalom publikus szektorában nem találtam.

Mitokondriumban is vannak ABC transzporterek mint pl. ABCG2, sőt bizonyítható, hogy mitokondriálisan lokalizált P-glikoprotein (ABCB1/MDR1) is azonosítható (Exp Eye Res. 2013 Jan;106 47-54. Mitochondrial localization of P-glycoprotein and peptide transporters in corneal epithelial cells--novel strategies for intracellular drug targeting. Barot M1, Gokulgandhi MR, Pal D, Mitra AK.). Az is ismert, hogy a transzport esszéekben használt Calcein-AM is bejut a mitokondriumba és ott fluoreszcens calceinné alakul' mely többnyire csak a mitokondriális permeabilizáció során tud onnét kijönni. Ismert továbbá, hogy a gyógyszer molekulák jelentős részében található pozitív delokalizált töltés, amely miatt mitokondriális membránpotenciál függően bekerülhet a mitokondriumba' és ez afolyamat befolyásolhatja a sejtből történő eltávolításukat. Így felvetődik a kérdés, hogy a transzporterek mitokondrium membrán/plazma membrán megoszlása milyen hatással lehet a különböző gyógyszer molekulák sejtbe történő eltávolítására? Illetve a transzporterek két membrán rendszer közti megoszlása (mitokondrium membrán/plazmamembrán), és ennek anomáliái okozhatna-e egészségügyi problémát? Vannak-e Önnek adatai, vagy ismer-e ide vonatkozó irodalmi adatokat?

A mitokondriális membrán potenciál (Modica-Napolitano és mtsai 2001 Adv Drug Deliv Rev 49:63) illetve a citoplazmatikustól különböző intrakompartmentális pH (Duvvuni és Krise 2005 Front Biosci 10:1499) valóban vezethet gyógyszerek sejtben belüli kompartmentalizációjához.

Intracelluláris kompartmentek membránjaiban expresszáldó transzporterek szintén befolyásolják a gyógyszer szekvesztrációt. A mitokondriumok rendelkeznek rezidens ABC transzporterekkel mint az ABCB6, ABCB7, ABCB8 és ABCB10 (Zutz és Mtsai 2009 BBA 1787:681). A kérdés azokra a transzporterekre vonatkozik, melyeket alapvetően plazma membrán rezidens transzportereknek tekintünk, de expressziójuk megfigyelhető intracelluláris organellek membránjaiban is. Az ABCB1 és az ABCG2 ilyen transzporterek. A tény, hogy a harmadik MDR-ABC transzporter, az ABCC1 mitokondriális lokalizációja szintén leírásra került (Roundhill és Burchill 2012 Br J Cancer 106:1224) már utal arra, hogy ezen transzporterek mitokondriális lokalizációjának lehet köze a multidrog rezisztenciához. Mindhárom MDR-ABC transzporter expressziója a rezisztens sejtekben kifejezettebb volt. Ugy az ABCG2 mint az ABCB1 mitokondriális exporterek (Kobuchi és mtsai 2012 Plos ONE 7:e50082, Barot és mtsai 2013 Exp Eye Res 106:47), bár az ABCB1-et mitokondriális importerként is leírták (Munteanu és mtsai 2006 Biochem Pharmacol 71:1162). Az ABCC1 is mitokondriális exporterként került leírásra, bár egyértelmű adatok nem kerültek bemutatásra (Roundhill és Burchill és mtsai 2012 Br J Cancer 106:1224).

Egyértelmű az összefüggés a fenti efflux transzporterek mitokondriális túlexpressziója és a gyógyszerrezisztencia között a profarmakon 5-aminolevulinsav (5-ALA) alapú fotodinámias kezelés esetében, ahol az aktív ágens a protoporfirinogén IX (PpIX) szintézisének befejezésére a mitokondriumban kerül sor, és az ABCG2 funkció gátlása megnövekedett intramitokondriális PpIX szinttel jár (Kobuchi és mtsai 2012 Plos ONE 7:e50082). Továbbá, a mitokondriális PpIX lokalizáció fotodinámias kezelés

hatására megnövekedett toxicitást eredményez bizonyos sejtvonalakban (Ji és mtsai 2006 J Photochem Photobiol B 84:213).

Citoplazmás és sejtmagbeli támadáspontú citosztatikumok esetében a megnövekedett mitokondriális expresszió következtében csökkent mitokondriális szekvesztráció nem teszi magától értetődővé a megnövekedett rezisztenciát, bár a sejtől való teljes eltávolításhoz valószínűleg hozzájárul. Volt olyan feltételezés, hogy a lizoszomális szekvesztrációja a topoizomeráz 1 inhibitor gimatecannak hozzájárul egy elhúzódó expozícióhoz, és a DNS törések perzisztenciájához (Croce 2004 Biochem Pharmacol 67:1035).

A legmarkánsabb példa a transzporterek és szubsztrátjaik szubcelluláris lokalizációjának illetve szekvesztrációjának jelentőségére az SLC29A1(ENT1)/Slc29a1(Ent1), ekvilibratív nukleozid transzporter 1, egy influx transzporter kapcsán került leírásra. A fialuridin (FIAU) SLC29A1/Slc29a1 szubsztrát. A tizenöt FIAU-val kezelt, hepatitis B fertőzött betegek jelentős hányada mitokondriális hatásmechanizmusú többszervi toxicitást (hepatotoxicitás, pankreatitisz, neuropátia, miopátia) mutatott (McKenzie és mtsai 1995 N Engl J Med 333:1099). A legsúlyosabb májkárosodást mutató hét betegből öt elhunyt. A maradék kettő életét májtranszplantáció mentette meg. Kiderült, hogy emberben az SLC29A1 expresszáldik a mitokondriumban (Lai és mtsai 2004 J Biol Chem 279:4490), ahol az oda transzportálódott FIAU foszforilálódik a mitokondrium specifikus timidin-kináz 2 által. A további foszforilációk során keletkező trifoszfát a DNS polimeráz-gamma gátlása által fejti ki mitokondriális toxicitását (Colacino és mtsai Antiviral Res 29:125). A rágcáló ortológ, Slc29a1 nem expresszáldik a mitokondriumban, így a preklinikai vizsgálatok során nem tapasztaltak mitokondriális toxicitást (Lee és mtsai 2006 J Biol Chem 281:16700). A fajspecifikus transzporter profil drámai példája ez.

Újra megköszönöm a kritikai észrevételeket, a kérdéseket, amik munkám továbbgondolására inspiráltak, és természetesen azt, hogy dolgozatomat nyilvános védésre érdemesnek tartotta.

Budaörs, 2014. augusztus 8.

Tisztelettel,

Krajcsi Péter