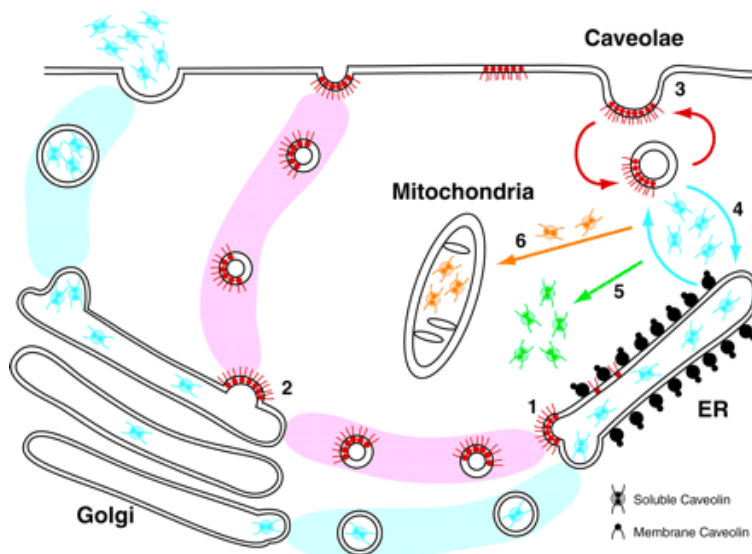


Válasz Dr. Homolya László az MTA doktora szakmai bírálatára

Mindenekelőtt köszönöm opponensemnek, hogy vállalta disszertációm bírálatát. Köszönöm elismerő szavait, megjegyzéseit, gondolatébresztő észrevételeit. Kérdéseire, megjegyzéseire, az alábbiakban szeretnék válaszolni.

Köszönöm, és teljesen jogosnak tartom opponensem caveolin citoplazmatikus lokalizációjára vonatkozó megjegyzését, kérdését. Való igaz, hogy a caveolin a szintézise során a SRP és SRP receptor közreműködésével a klasszikus, transzlációs utat követi, erősen hidrofób aminosav szekvenciája révén az endoplazmás retikulum membránjába épül be, mint integráns membránfehérje, C- és N-terminálisa a citoplazma felé néz, és még az ER membránban oligomerizálódik (Parton 2010). Az ER-ből, az onnan lefűződő vezikulák membránjának integráns fehérjéjeként a Golgi készülékbe szállítódik, további oligomerizáció után a C terminálisán palmitoilálódik, amelynek eredményeként detergens inszolubillissá válik. A Golgi készülékből a vezikuláris transzporttal plazmamembránhoz vándorol, ahol beépül a caveolákba, ezt követően internalizálódik és reciklizál. Irodalmi adatok szólnak emellett azonban, hogy a caveolin-1 a caveolákon kívül szolubilis, sőt szekretálódó formában is jelen lehet a sejtekben. A citoszolikus caveolin-1 kölcsönhatásba léphet chaperonokkal (Hsp56, cyclophilin40, cyclophilinA), koleszterinnel, és a HDL-el megegyező méretű és denzitású fehérje részecskéként viselkedik. A szolubilis caveolin-1 keletkezésére vonatkozóan az az elképzelés, hogy a caveola internalizációs ciklusának egy bizonyos stádiumában a caveolin-1 „kiléphet” a caveola membránjából, és a citoplazmába kerülhet, mint lipid részecskébe ágyazott szolubilis fehérje. Semmi sem ismert azonban arra vonatkozóan, hogy ez a folyamat hogyan megy végbe, mi szabályozza, mindössze annyit tudunk, hogy a 133, 143 és 156 pozíciójú cisztein palmitoilálása nagy mértékben befolyásolja (Uittenbogaard és Smart 2000). Ez a szolubilis caveolin-1 azután visszakerülhet az ER-ba, újonnan szintetizált koleszterint kötve visszaépül a caveolákba, vagy belép az ER lumenébe, mint egy HDL-szerű részecske, amit a sejt kiválaszt, vagy a citoszolban marad, néhány közülük a lipid cseppekhez vándorol és beépül a lipid cseppekbe, de bejuthatnak a mitochondriumba is (1. ábra: Liu és mtsai 2002).



Szekretálódó caveolin-1-t mutattak ki szerózus mirigyek szekréciós vakuolumainak lumenében (a mucinózus mirigyekében nem, Liu és mtsai 1999), és a hipofízis STH termelő sejtjeiben, ahol a caveolin-1 nem a membránhoz, hanem a lumenben lévő lipoprotein részecskékhez kapcsolódott. Caveolin-1 szekréciót írtak le prosztatata daganat sejtekben is (Yang és mtsai 1998), ill. caveolin-1-t mutattak ki prosztatata daganatos betegek szérumban HDL frakciójában is (Tahír és mtsai 2001). Ezt a cirkuláló caveolin-1-t Tahír a prosztatata rák biomarkere ill. prognózisos markereként írta le. A rákos sejtek által termelt és szekretált caveolin-1 biológiailag aktív, növeli a caveolin-1 negatív daganatsejtek viabilitását és növekedését *in vitro* (Batz és mtsai 2008). Mindezeket figyelembe véve is egyetértek opponensemvel abban, hogy nehezen elképzelhető, hogy egy erősen hidrofób integráns membránfehérje egyszerűen csak „kivándoroljon” a membránból és önálló partikulumként „úszik” a citoplazmában. Könnyen elképzelhető, hogy a biokémiai vizsgálatok során szolubilisként kimutatott caveolin az izolálási eljárások során szétesett vezikulákból kerül a citoszólba, a mikroszkópos felvételeken vezikula vagy más membrán nélkül detektálható caveolin jel a membránnal körülvevő struktúra tangenciális metszésének köszönhetően kelt citoplazmatikus vagy szolubilis benyomást.

Opponensem okadánsavval és a PP2A foszfatáz gátlásával kapcsolatos megjegyzésével teljes mértékben egyetértek. Azzal a kiegészítéssel, hogy az okadánsav a PP2A gátlása révén, két úton befolyásolhatja a caveolák internalizációs – degradációs – reciklizációs steady state állapotát, részben, ahogyan opponensem is leírja, a „kilépő” (reciklizáció és a degradáció) oldal gátlásával. PP2A ugyanis fontos szerepet játszik endoszómák éréséhez, és a késői endoszómákba való transzporthoz szükséges szortírozó szignál kialakulásában (Schapiro és mtsai 2004). A PP2A gátlása során valószínű, hogy a caveoláris transzport valahol a caveola halmazok, korai endoszómák szintjén megragad, nem következik be reciklizáció, nem alakulnak ki multivezikuláris testek, késői endoszómák, gátolt a lizoszómákkal való fúzió, nem következik be a degradáció (Kiss és Botos, 2008, Kiss és Botos 2009). Ezen folyamatok megakasztása önmagában is a caveolák citoplazmatikus felhalmozódásához vezet. Ehhez azonban még hozzájárul a plazmamembránon jelenlévő caveolák lefűződésének stimulálása is, a PP2A Src kinázt gátló hatásának gátlása (a gátlás gátlása egyenlő aktiválás, azaz az Src kináz aktivitásának fokozása) révén, amely a caveolin-1 tirozin foszforilációján keresztül a caveolák lefűződését indukálja. Természetesen a sejtekről készült pillanatfelvétel, az elektronmikroszkópos felvételek alapján nehéz, ill. gyakorlatilag lehetetlen különbséget tenni a bejövő és kimenő útvonalak között.

Opponensem kérdéseire adott válaszaim

„A HepG2 sejt vonal nem elhanyagolható mennyiségű albumint szekretál, amit az alkalmazott kezelések (pl. okadánsav, Na-ortovanadát) esetlegesen módosíthatnak. Számoltak-e ezzel a lehetőséggel, és befolyásolhatta ez a bemutatott kísérleteket?”

A hepatoma sejt vonalak jól használhatók a máj-specifikus fehérjék (pl. albumin) expressziójának vizsgálatára. A tenyésztéshez használt táptalaj összetétele azonban jelentősen megváltoztatja, megváltoztathatja a májsejtek génextpresszióját. Általános tapasztalat (amint ezt

az irodalomban számos publikáció említi), hogy tenyészetben a májspecifikus funkciók jelentősen lecsökkennek, a hepatoma sejtvonalak a májspecifikus fehérjéket, így az albumint is, jóval kisebb mennyiségben expresszálják, mint az intakt májsejtek, *in vivo* körülmények között. A májfunkciók fenntartásához speciális tenyésztői médiumok kellene, kollagén jelenlétében például fenntarthatók a májspecifikus funkciók. A HepG2 sejteket Dr. Kovalszky Ilona professzor asszonytól kaptunk, az I. Patológiai Intézetből. Mi nem vizsgáltuk a sejtek albumin termelését. Kovalszky professzor asszony kérdésekre megerősítette az irodalomban említetteket: kontrol körülmények között a z általunk is használt HepG2 sejtek csak nagyon kis mennyiségben termelnek albumint. Kísérleteink során albumin-mentes DMEM médiumban neveltük a májsejteket, az albumin hiány önmagában stimulálhatná az albumin termelést, és szekréciót, azonban az a megfigyelésünk, hogy az albumin megvonás jelentősen lecsökkentette a sejtfelszíni caveolák számát, arra utal, hogy nem valószínű, hogy az esetleges szekréció a caveolák közreműködésével menne végbe. Albumin hozzáadásra a caveolák száma megnő, az izolált plazmamembrán frakcióban a caveolin-1 jelenléte jelentősen megemelkedik. 3 órás albumin kezelés nem növelte tovább a sejtfelszínen jelenlévő caveolák számát, azonban a plazmamembrán alatti citoplazmában nagyobb mennyiségben voltak jelen zárt, lefűződött caveolák. A hosszabb idejű albumin-kezelést követően az egyedi, lefűződött vezikulák mellett caveola-aggregátumok, caveola-csoportok is nagy számban voltak megfigyelhetők a plazmamembránhoz közeli citoplazmában. Opponensem kérdésére tehát azt válaszolnám, hogy ha létezik is albumin szekréció, a rendszerhez nagy mennyiségben adott albumin a szekréciót a jól ismert kémiai elv (Le Chatelier-Braun elv) alapján valószínűleg visszaszorítja.

„Elképzelhető-e az – a talán radikálisnak tűnő – gondolat, hogy a caveolák nemcsak az endocitotikus út egy alternatíváját képezik, hanem esetleg részt vesznek a szekréciós folyamatokban is - akár reciklizáció, a de novo szintézis útvonalán.”

A caveolák nemcsak az endocitotikus útvonal alternatíváját képezik, hanem szerepet játszanak a plazmamembrán felé itányuló transzportfolyamatokban is. Jól ismert, hogy a polarizált hámsejtek apikális és bazolaterális felszíne egymástól jelentősen eltérő lipid-, és fehérje-összetételű membránokkal rendelkezik (Drubin és Nelson 1996). Az apikális membránfelszín akár háromszor nagyobb mennyiségben tartalmazhat GPI-kötött fehérjét, koleszterint, glikolipideket, glikoszfingolipidet, mint a bazolaterális felszín (Ali és Evans 1990, Wilson és mtsai 1990). Az eltérő lipidösszetétel feltételezhetően az apikális membrán számára védelmet biztosít a környezeti hatásokkal szemben. A megfelelő összetétel kialakítását, fenntartását egy elosztó mechanizmus biztosítja, melynek központja a transz-Golgi hálózat (Mostov és mtsai 1992, Matter és Mellman 1994, Le Gall 1995). Itt alakulnak ki azok a szortírozó vezikulák, melyek tartalmazzák az apikális, valamint a bazolaterális membrán fehérjeit és lipidjeit (Kurchalia és mtsai 1992). Biokémiai vizsgálatok bizonyítják, hogy a szortírozó feladat ezen transzport vezikulumok membránjában található caveolin izoformák jelenlététől függ. A Golgi készülékben oligomerizálódott caveolin-1 és caveolin-2 tartalmú heterooligomerek a transzport vezikulákat a transz-Golgi hálózatból a sejt bazolaterális felszíne felé irányítják, míg a csak caveolin-1 fehérjéből álló homooligomer tartalmú membrán mikrodomének az apikális plazmamembránba épülnek be (Scheiffele és mtsai 1998, Parolini és

mtsai 1999). Ezekben a membrán mikrodoménekben már megtalálhatóak az apikális illetve a bazolaterális membránra jellemző arányú lipid-, és fehérjekomponensek.

„A caveoszómának nevezett struktúra az extracelluláris térrel való kapcsolatát a jelölt többek között úgy mutatta ki, hogy ruténium vörös festést alkalmazott. A caveoszóma-szerű képletekben fellelhető volt a ruténium vörös. Hogyan zárható ki ebben az esetben, hogy a festék (vagy legalábbis egy része) endocitózis útján nem jut be a sejtbe, és festi az internalizálódott kompartmenteket is?”

A ruténium vörössel végzett kísérleteim során a sejteket ruténium vörös tartalmú fixálóval (0.4mg/ml ruténium vörös 2% glutáraldehid) fixáltuk, és az utófixáló, a 2% ozmium-tetroxid oldat is ugyanennyi ruténium vöröset tartalmazott. A glutáraldehid (kis molekula lévén) diffúziója jóval gyorsabb, mint a kolloidális részecskét alkotó ruténium vöröse, ezért a ruténium vörös a már fixált, és ezáltal immobilizált membránstruktúrák extracelluláris oldalához kötődik, és az internalizációja nem mehet végbe.

Végezetül még egyszer szeretném megköszönni opponensem, alapos, mindenre kiterjedő, bírálatát, gondolatébresztő megjegyzéseit, kérdéseit és köszönöm elismerő szavait. Kérem, hogy válaszaimat fogadja el.

Budapest, 2018. január

Dr L. Kiss Anna