

Válasz Prof. Dr. Búzás Edit szakmai bírálatára

Mindenekelőtt hálásan köszönöm Professzor Asszonynak, hogy elvállalta értekezésem bírálatát. Köszönöm dicsérő szavait, megjegyzéseit, észrevételeit. Arra a megjegyzésre, hogy az irodalmi bevezetőben található hivatkozások jelentős része igen korai publikáció (10-15 éves) az alábbiakban szeretnék reagálni:

A disszertációmban bemutatott eredmények pályafutásom 2009-ig terjedő időszakának munkásságát foglalják össze és mutatják be. Való igaz, hogy ezen eredmények jó része mára már evidenciaként vannak számon tartva, abban az időben azonban, amikor ezeket a kísérleteket végeztem teljesen újnak számítottak. Az azóta eltelt időben már én is egy új fejezettel foglalkozom, a caveolák hám-mesenchyma, mesenchyma-hám átalakulásban betöltött szabályozó szerepének vizsgálatát végzem. A disszertációm témájának összeállításánál mérlegelnem kellett, hogy a 2009-ig terjedő időszak koherens, egy nagyobb fejezetet lezáró eredményeit mutassam-e be, amelyek egy általános, alapvető biológiai folyamattal az endocitózissal, annak szabályozásával, és a caveolák endocitózisban betöltött szerepével foglalkoznak, avagy belemenjek a legújabb kutatási eredményeim bemutatásába, amelyek még közel sem befejezettek. Én az első megoldást választottam.

Köszönöm opponensem kérdéseit, amelyekre az alábbiakban válaszolok:

Az **Irodalmi bevezetés** fejezettel kapcsolatosan feltett kérdések:

„Milyen újabb adatok állnak rendelkezésre ezekre a caveolákban található szteroid receptorokra vonatkozóan?”

Hans Selye 1950-ben a Brain Medical Journalban megjelent első meglepő publikációja után, egyre több közlemény jelent meg (Szegő 1967; Pietras és Szegő 1975; Pietras és Szegő Nature) arra vonatkozóan, hogy a szteroid hormonok olyan válaszokat is képesek indukálni, amelyek túlságosan is gyorsak ahhoz, hogy a transzkripció szabályozásán keresztül valósuljanak meg. Az egyik ilyen első megfigyelés volt, hogy az ösztrogén cAMP termelődést és calcium áramlást indukál uterus hámsejtekben, egy olyan választ, amely csak membránban található receptorok közreműködésével mehet végbe (Szegő, 1967). Azóta számos klasszikus szteroid receptort, pl. ER α -t és ER β -t, progeszteron receptort, glükokortikoid és mineralokortikoid receptorokat (Grossmann és mtsai 2008) és nem-klasszikus értelemben vett szteroid receptorokat, pl. D vitamin receptort (Huhtakangas és mtsai 2004) sikerült kimutatni a plazmamembránban. (Hammes 2007). A sex szteroid receptorokról ismert, hogy a plazmamembránhoz való transzportjukhoz E doménjüknek palmitoilálódni kell, a palmitoilálás növeli a fehérje hidrofób tulajdonságát, és elősegíti a membránnal való kapcsolódását. Az E domén a szteroid receptorokban (ER, progeszteron receptor, androgén receptor) erőteljesen konzervált, 9 ciszteint tartalmaz, ahova a palmitoil sav kötődhet (Acconia és mtsai 2005, Haynes és mtsai 2003), Razandi és mtsai 2003). Ez a palmitoilált cisztein motívum segíti elő a szteroid receptor kapcsolódását a caveolin-1 scaffolding doménjéhez. A szteroid receptorok a

caveolákban számos jelátviteli molekulával kerülnek kapcsolatba, amelynek eredményeként számos jelátviteli útvonal (pl. ERK/MAPK, Akt/PKB útvonal, cAMP, cGMP, PKC, PI-3kináz útvonal) aktiválódhat, gyors jelátviteli folyamat indulhat el másodperceken belül. A caveolákban jelenlévő ösztrogén receptor például ösztradiol indukáló hatására szelektíven aktiválja a G fehérje α és β alegységeit, így módon közvetít gyors szignált (Razandi és mtsai 1999; Kumer és mtsai 2007). A progeszteron receptor aktiválni képes az ERK/MAPK útvonalat emlő daganat sejtekben (Boonyatanokomi és mtsai 2001). Az androgén receptor pedig fokozhatja az eNOS aktivitását (Watson 2012)..

„Mi lehet a magyarázata annak, hogy specifikusan az izomsejtek caveolái rendelkeznek külön *cavin* típussal (*cavin 4*) és *PACSIN* típussal (*PACSIN 3*) szemben egyéb sejtekkel.”

Hosszú ideig (2008. 2009.) általános elfogadott tény volt, hogy a caveolin a caveolák egyetlen, kizárólagos struktúrális fehérjéje, mivel expressziója szükséges és elégséges feltétele a caveolák kialakulásának. Mára már egyértelmű bizonyítékok vannak arra vonatkozóan, hogy egy másik fehérje-család tagjai, a *cavinok* is fontos szerepet játszanak a caveolák kialakulásában. A *cavin* fehérje-család négy tagját ismerjük eddig: *cavin-1* (PTRF, polimeráz-1 transzkripció faktor), *cavin-2* (SDPR, szérum deprivációs protein response), *cavin-3* (más néven SRBC: sdr-related gene product that binds to c-kinase) és *cavin-4*. A *cavin-2*, -3, -4 jelentős homológiát mutat a *cavin-1*-el, és valamennyien kritikus szabályozói a caveolák dinamikájának. *Cavin-1* a plazmamembrán caveoláiban, a caveolin-1-el 1:1 arányban fordul elő, és fontos szerepet játszik a caveolák kialakulásában (Chadda és mtsai 2008; Nabi és mtsai 2009), hiányában nem alakul ki a tipikus caveola morfológia, sőt mind a három caveolin izoforma expressziója csökken. A *cavin-2* is kolokalizál a caveolákban a caveolinnal. A *cavin-2* önmagában nem növeli a caveolák számát, de befolyásolja a caveolák morfológiáját, tubulus formájú caveolák kialakulását indukálja (Hansen és mtsai 2009). *Cavin-3* hasonló a *cavin-1*hez, és bár feltételezték, hogy szolubilis formában van jelen a citoszólban, proteomikai vizsgálatok igazolták, hogy a caveola frakciókban gyűlik össze. A *cavin-3* kapcsolódása a caveolákhoz a caveolák lefűződését, a caveolákból lefűződött vezikulák kialakulását stimulálja, hiánya jelentősen befolyásolja a caveolin-1 intracelluláris szállítódását. (McMahon és mtsai 2009). A *cavin*-család utolsó, negyedik tagjaként a *cavin-4*-t (Bertani és mtsai 2009) írták le, mint tisztán citoszolikus fehérjét, amely azonban képes kapcsolódni a *cavin-2* és *cavin-3*-hoz. Bár pontos információt, adatot arra vonatkozóan nem találtam az irodalomban, hogy mi lehet az oka annak, hogy a *cavin-4*-t izom-specifikus *cavin* formának tartják, a magyarázat valahol ott keresendő, hogy a *cavin-4* a RHO/ROCK útvonal módosítása révén összefüggésbe hozható kardiális diszfunkcióval, és leírták, hogy fontos szerepet játszik az izom biogenezisében is (Tagawa és mtsai 2008). *Cavin-4* expressziója zavart szenved olyan humán izom-betegségeken, amelyek a caveolin-3 diszfunkciójával kapcsolatosak. A *miért* megválaszolásához további vizsgálatok szükségesek.

Még nehezebb megválaszolni azt a kérdést, hogy mi lehet az oka annak, hogy nem *PACSIN-1*, és nem *PACSIN-2*, hanem *PACSIN-3* van jelen az izomsejtek caveoláiban. A *PACSIN*-ok (más néven syndapinok) perifériás membrán fehérjék, N-terminálisukon BAR (Bin/Amphyphysin/Rvs) domént, a C-terminálisukon pedig Src homológ 3 (SH3) domént tartalmaznak, és a membránok görbületének kialakulását és fenntartását biztosítják, és a

membránok átszerveződésében játszanak szerepet (Forst és mtsai, 2008, 2009, Suetsugu és mtsai 2010), elengedhetetlenül szükségesek a membránok remodellezéséhez. A PACSIN-ok szerepet játszanak a dinamin-dependens endocitotikus, folyamatokban, így a caveolák közreműködésével végbemenő endocitózisban is. Emlősökben háromféle PACSIN-t írtak le: PACSIN-1 idegsejtekben (Plomann és mtsai 1998; Qualmann és mtsai 1999), PACSIN-2 minden sejtben, PACSIN-3 izomszövetben (Modregger és mtsai 2000). A PACSIN-3 abban különbözik a többi PACSIN izoformától, hogy a prolinban gazdag régiója rövidebb és hiányzik az aszparagin-prolin-fenilalanin motívum. Valamennyi izoforma képes oligomerizációra és SH3 doménje révén kötődik a dinaminhoz. A legtöbb adat az irodalomban a PACSIN-2 funkciójával kapcsolatosan olvasható, feltehetően azért, mert minden sejtben előfordul. A PACSIN-3 mRNS viszont nagy mennyiségben volt kimutatható vázizomban és szívizomsejtekben (Modregger és mtsai 2000). Bár számos munka foglalkozik a PACSIN-3 szerkezetével, különböző molekulákkal pl. mikrotubulusokkal, aktin filamentumokkal való lehetséges kölcsönhatásával, jelenleg nem találtam magyarázatot arra, hogy miért van jelen PACSIN-3 az izomsejtek caveoláiban. Az irodalomban általánosan megfogalmazott válasz: valószínűleg a szövet-specifikus válaszok közvetítésében játszik szerepet. A kérdés megválaszolásához további vizsgálatok szükségesek.

„Mi lehet az oka, hogy – mint a jelölt is említi – az utóbbi időben az irodalomban egyetlen publikációban sem említik a potocitózis fogalmát?”

A caveolák történetileg elsőként leírt, ma már erősen vitatott, lassan feledésbe merülő funkciója a potocitózis néven leírt felvételi folyamat. A caveolák működésével kapcsolatosan a 90-es évek második felében két táborra oszlottak a kutatók. Az egyik tábor a caveolákat a plazmamembrán merev, rigid doménjének tartotta, amely soha, semmilyen körülmények között nem fűződik le a plazmamembránról. A másik táborhoz azok a kutatók tartoztak (beleértve magamat is), akik meg voltak győződve az ellenkezőjéről, nevezetesen, hogy a caveolák is dinamikus membrán invaginációk. Morfológiájuk alapján evidensnek tűnt, hogy lefűződnek a plazmamembránról, és részt vesznek a sejtek felvételi folyamataiban. A caveolák rigid voltában hívők táborában a problémát az jelentette, hogy a caveolákban receptorokat lehetett kimutatni, amelyhez a ligandja kötődik, és be is kerül a citoplazmába, a kérdés csak az volt, hogy hogyan, ha a caveolák nem fűződnek le a plazmamembránról. Anderson és mtsai 1998-ban leírt elképzelése, a potocitózis fogalmának bevezetése próbálta magyarázni a mechanizmust. Ezen elképzelése szerint potocitózis során a sejt több egymást követő lépésből álló folyamattal kisméretű molekulákat, ionokat vesz fel környezetéből, anélkül, hogy a caveolák lefűződnének. A folyamat kezdeti szakaszában a felvételre szánt molekula bekerül egy, az extracelluláris tér irányába nyitott caveola üregébe (pl. 5-metil-folát), majd ott receptorához vagy ioncsatornához (pl. kalcium) kötődik. A nyitott caveola ezután záródik, de nem fűződik le. A zárt vezikula belsejében megváltozik a mikrokörnyezet, elsősorban a pH, amely következtében a felvételre szánt molekula disszociál receptoráról és/vagy ioncsatorna nyílik, majd a molekula vagy ion a citoplazmába áramlik. Az így kiürült caveola újra kinyílik, és újabb molekulák felvételére készen áll. A modell jól magyarázza egyes molekulák felvételét, pl: az 5-metil-folát vagy a kalcium transzportját, azonban a folyamat egyes részletei (például a nyitás-zárás ciklusa, vagy a felvett molekula membránon keresztüli transzportja) nem ismertek. Mára már egyértelmű bizonyítékok szólnak amellett, hogy a caveolák lefűződnek a plazmamembránról, lefűződésük szabályozása is jól ismert, a felvételi útvonal állomásai

tisztáztak. (2009-ig terjedő időszakban vizsgálataim középpontjában a caveolák lefűződésnek és a folyamat szabályozásának tanulmányozása állt). Feltehetően ez lehet a magyarázata annak, hogy a potocitózis fogalma lassan feledésbe merül.

A Célkitűzések fejezettel kapcsolatos kérdések:

„A kísérleteiben vizsgált, egérből izolált rezidens és elicitált makrofágok milyen tisztaságúak voltak, milyen százalékban tartalmaztak makrofágokat?”

A kezeletlen és a komplett Freund adjuvánszal kezelt patkányok hasüregéből peritoneális sejtszuspenziót foszfát pufferes mosással nyertünk. A vegyes peritoneális sejtszuspenzióból diszkontinuus Percoll grádiensen tisztítottuk a makrofágokat Hester és munkatársai (1981) módszere alapján. A centrifugálás után az 51/57%-os Percoll határfázison kiüledő sejtek 90-95%-a makrofág volt, mindössze néhány %-ban voltak jelen neutrofil granulociták.

„A ma ismert M0, M1, M2a, M2b és M2c populációk közül melyeknek feleltethetők meg a kísérletek során használt peritoneális és elicitált makrofágok?”

A makrofágok az immunfolyamatokban fontos szerepet játszó mononukleáris fagocitarendszer heterogén képviselői, amelyek különböző forrásból származhatnak (Ginsel és mtsai 1985, 1986, Ginsel 1993), és a szervezetben különböző aktivitási állapotban jelenhetnek meg. A makrofágok heterogenitását különböző aktivitási állapotuk, specializálódásuk, alkalmazkodásuk a megfelelő mikroköznyezethez magyarázza. A különböző szövetekben különböző néven leírt makrofágok (osteoklasztok, alveoláris makrofágok, Kupffer sejtek, mikroglia stb) olyan jelentősen eltérő transzkripciós profillal rendelkeznek, hogy eltérő, különleges makrofág csoportoknak tekinthetők, ugyanakkor a különböző szövetekben jelenlévő makrofágok azonos feladatot láthatnak el. A makrofágok kulcsszereplői a szövetek fejlődésének, fontos szerepet játszanak az immunválaszban, gyulladási folyamatokban, monitorozzák a szövetekben végbemenő változásokat, fenntartják a homeosztázist. A funkcionális heterogenitás mellett eredetük is meglehetősen eltérő lehet. A klasszikus van Furth féle elképzelés szerint a szöveti makrofágok a vérben keringő monocitákból származnak. Újabb adatok azonban azt mutatják, hogy embrióban a születés előtt embriológiai progenitor sejtekből (pl a szíkhólyag falából, az aorta falból, az ivarszervek és a mesohephros endotheliumából) is származhatnak. A csontvelő a forrása az LyC6+ és az LyC6-monocitáknak, amelyekből a szöveti *rezidens makrofágok* származtathatók (Geissmann és mtsai 2010). Nem ismert, hogy a szíkhólyag és a magzati máj eredetű monociták milyen mértékben járulnak hozzá a szövetekben jelenlévő makrofág poolhoz.

Gyulladási körülmények jelentősen megváltoztatják a helyzetet. A szövetekben drasztikusan megnő a makrofágok száma, amelyek különböző forrásokból származhatnak (vér, csontvelő, szöveti rezidens makrofágok önmegújító képessége, monociták vándorlása). Saját leújabb vizsgálataim azt mutatják, hogy a hashártya mesothel sejteji gyulladási stimulus hatására hám-mesenchyma átalakulás során makrofágokká differenciálódhatnak, TNF α -t, GM-CSF-t termelnek, GM-CSF receptort, a monocita/makrofág átalakuláshoz szükséges EGR1 transzkripciós faktort termelnek, fagocitotikus aktivitásuk jelentősen megnő. A makrofágok polarizációja egy aktivációs program eredménye, amelynek során a makrofágok képessé válnak

arra, hogy a megfelelő stimulusokra válaszoljanak. E folyamat során megváltoztatják metabolikus aktivitásukat, gyógyulásban, növekedésben résztvevő M2 makrofágokból killer és gátló kapacitású M1 makrofágokká alakulnak át. Az M2 makrofágok ornitint és poliaminokat termelnek, míg az M1 sejtek NO-t és citrullint. Az M2 makrofágok által termelt ornitin segíti a sejtproliferációt és a gyógyulást a poliaminok termelése, valamint kollagén szintézis támogatása révén. Az M1 sejtek által termelt NO fontos anti-mikrobiális molekula, gátolja a sejtproliferációt. *In vitro* körülmények között a makrofágok M1 makrofágokká aktiválódnak mikroorganizmusok, toxinok, LPS, inflammatorikus citokinek (TNF- α , IFN- γ hatására, külön-külön, vagy kombinációban) hatására. Az M1 makrofágok *in vitro* IL-12, IL-13, és IL-10 termelő fenotípussal rendelkeznek, toxikus effektor molekulákat (ROS, NO) és inflammatorikus citokinek (IL-1 β , TNF, IL-6) termelnek. A makrofágok M2-típusú polarizációja *in vitro* körülmények között a T helper eredetű (Th2-related) citokinek, IL-4, vagy IL-13 hatására megy végbe. Az M2 típusú makrofágokban az Fc γ és a TOLL-like receptorok aktiválódnak, immunkomplexeket kötnek, anti-inflammatorikus citokinek (IL-10, TGF β , glükokortikoidok) termelnek. Az M2 makrofágoknak további alcsoportjait írták le: *M2a* (IL-4 és IL-13 termelés, alternatív gyulladás), *M2b* (immunkomplexek kialakulása, Fc γ és Toll-like receptor aktiválása) *M2c* IL-10, TGF β és glükokortikoid termelés).

Az opponensem által feltett kérdésre a válaszadás nagyon nehéz, tekintettel arra, hogy az M1/M2 csoportosítást, beosztást egér makrofágokra *in vitro* körülmények között írták le. Kevés adat áll rendelkezésre humán makrofágokra vonatkozóan *in vitro* rendszerekben. Kísérleteim során patkány makrofágokat használtam, amelyek közeli rokonságban vannak az egerekkel, az egér makrofágokra vonatkozó adatok ennek alapján bizonyos mértékig adaptálhatók patkány fagocita sejtekre is. A válaszadást nehezíti az is, hogy én *in vivo* rendszerben dolgoztam, patkányok hasüregéből frissen, ill. gyulladásos stimulus után közvetlenül izolált makrofágokat vizsgáltam. Az *in vivo* körülmények sokkal bonyolultabbak, tekintettel arra, hogy az immunválasz valamennyi résztvevője (és még sokan mások is) jelen van, különböző faktorok, citokinek termelődnek. Az irodalomban minden szerző egyet ért abban, hogy a makrofágok igazán közös jellemzője a plaszticitás és a flexibilitás, ami azt jelenti, hogy rendkívül gyorsan képesek alkalmazkodni a mikroköznyezethez. Paola Italiani egy 2014-ben írt összefoglaló dolgozatában (Frontier in Immunology) hangsúlyozza, hogy az M1/M2 makrofág csoportosítás valószínűleg egy folytonosan változó funkcionális állapotot ír le, az M1 és M2 aktivációs státusz nem az ontogenetikusan meghatározott alcsoportokat, hanem a szélsőségeket határozza meg. Nem tudjuk, hogy az M1 és M2 aktivitási állapot önálló, külön fenotípust jelent, avagy ugyanaz a makrofág a flexibilis és plasztikus jelleméből adódóan a mikroköznyezet hatására alakul át M1 vagy M2 makrofággá, vagy fordítva. A peritoneális üregben nagy valószínűséggel M1 és M2 makrofágok különböző keveréke lehet jelen.

„Az utóbbiak (mármint az elicitált makrofágok) aktivitációs státuszát mi jellemzi?

Tekintettel arra, hogy a hasüregben jelenlévő rezidens makrofágok is egy meglehetősen heterogén sejtpopulációt képviselnek, nagy valószínűséggel M1 és M2 aktivitási státusszal rendelkező makrofágok is jelen vannak közöttük. Bár azonosításukra vonatkozóan nem végeztem vizsgálatokat, az előző kérdésre adott válaszaim alapján úgy vélem, hogy az elicitált makrofágok egy része *M2b* aktivitási státusszal jellemezhető, tekintettel arra, hogy nagy mennyiségben vesznek fel immunkomplexeket feltehetően a fokozott Fc γ receptor aktivitásuk következtében. Miután a peritoneális makrofágok elicitálását Freund adjuváns hasüregbe történő injektálásával végeztem, a Freund adjuváns pedig egy elölt *Mycobacterium tuberculosis* tartalmazó olajos szuszpenzió, hatására feltehetően M1 aktivitási státusszal jellemezhető makrofágok is jelen vannak a hasüregben.

„Milyen felszíni markerek jellemzik az egér rezidens és elicitált makrofágokat?”

Tekintettel arra, hogy disszertációmban összefoglalt vizsgálataim célja *nem* a makrofágok immunológiai karakterizálása volt, ezért sem egér, sem pedig patkány makrofágokon nem vizsgáltam, hogy milyen felszíni markerek fordulnak, fordulhatnak elő. A kérdésre csak irodalmi összefoglalókból származó adatokat tudnék felsorolni. Miután kísérleteim középpontjában egy alapvető biológiai folyamat, az endocitózis, valamint a caveolák endocitózisban való részvételének, ezen folyamat citoplazmatikus kompartmentumainak vizsgálata, valamint a caveolák lefűződését befolyásoló szabályozó tényezők vizsgálata állt, a makrofág markerek azonosítása ezen munkám szempontjából irreleváns volt. A makrofágokat vizsgálataim során endocitotikus modellként használtam, tekintettel arra, hogy endocitózisra, fagocitózisra specializálódott sejtek. Azért választottam ezeket a sejteket vizsgálati modellként, mert gyorsan, könnyen és nagy számban izolálhatók a patkányok hasüregéből, ráadásul endocitotikus aktivitásuk változik fizioológias és patológias körülmények hatására. Vizsgálataim tehát elsősorban sejtbiológiai és nem immunológiai vizsgálatok voltak. Egyetlen esetben használtam makrofág markereket (ED1 pán-makrofág markert, és OX43-t) amikor azt kellett igazolnom, hogy a gyulladásos stimulus hatására a hasüregben nagy számban megjelenő, caveolákban gazdag sejtek valóban makrofágok.

Az Eredmények fejezettel kapcsolatos kérdések

„A 14.B ábrán mai szemmel minnek felel meg az anti-caveolin-2-vel jelölődő, 46 kD körüli jelölődő molekula? „

Ez a nagyobb molekulatömegű fehérje IgG-nek felel meg.

„A PCR caveolin-1, -2 vagy –specifikus PCR volt?”

A PCR kísérleteim caveolin-1 specifikus vizsgálatok voltak.

*„A 29. ábra oszlopdiagram. Mit jelent a „*SD < 0.005” Milyen statisztikai próbát alkalmazott, miért nem ábrázolta az SD vagy SEM értékeket?”*

Minthogy opponensem hasonló kérdéseket tesz fel a 38. 45. 47. és 109. ábrákkal kapcsolatosan is, válaszaim ezekre a kérdésekre is vonatkoznak. Statisztikai elemzések során minden esetben a Stat Soft Statistica 6.1 (StatSoft Inc. Tulsa, OH, USA) statisztikai programot alkalmaztuk. Az oszlopdiagramon számértékekkel is feltüntettük a kapott eredményeket és *p-vel jelöltük a szignifikancia szintet. Azt, hogy a két összehasonlított csoport között szignifikáns különbség van-e *p < 0.005 érték adja meg. A kép aláírások szövegében pontosan megadom, hogy SD és (nem SEM) értékeket tüntettem fel. Ha *p érték kicsi (jelen esetben < 0.005), az azt jelenti, hogy a kapott különbség szignifikáns.

„Hogyan tudta azonosítani a 35. ábra citoszkéletális filamentumait?”

Gyakorlott, elektronmikroszkópos vizsgálatokat rutinszerűen végző kutató számára nem jelenthet nehézséget az egyes citoszkéletális elemek (mikrotubulusok, mikrofilamentumok, intermedier filamentumok) azonosítása elektronmikroszkópos felvételeken, méretük, vastagságuk, morfológiájuk, elrendeződésük, citoplazmában elfoglalt helyük alapján. Az azonosításukat én is a morfológia, organizáció, vastagság és a citoplazmatikus lokalizáció alapján végeztem.

„Mi a véleménye, hogyan kerülhet a Cav1 a MVB-be?”

A multivezikuláris testek (MVB) a klasszikus endocitotikus útvonal speciális kompartmentumai, a „korai” (early) és a „késői” (late) endoszóma köztes, átmeneti struktúrái. Keletkezésük egy meglehetősen bonyolult, sok komponens (ESCRT komplexek, VPS4, Alx fehérjék) részvételével végbemenő folyamat eredménye, amelynek során a korai endoszóma membránja az endoszóma belseje felé kezd „bimbózni”, majd lefűződni, végül sok apró vezikulát tartalmazó struktúra keletkezik. Ez a MVB ezután lizoszómákkal olvad össze, és bennéke a lizoszómális degradáció áldozatául esik. A MVB testek képződésével tehát lehetővé válik membrán komponensek degradációja is, amely egyébként nem mehetne végbe, mert a lizoszómákkal való fúzió után csak a késői endoszómák tartalma kerül kapcsolatba a lizoszómális enzimekkel. A disszertációmban összefoglalt kísérleteim során éppen azt igazoltam, hogy a caveola-mediált endocitózis a klasszikus endoszóma-lizoszóma útvonalra szállítja a lefűződött caveolákba zárt ligandot, a felvétel során membránja beleolvad a korai endoszóma membránjába. Ha nem keletkeznének multivezikuláris testek a caveolin mindvégig az endocitotikus kompartmentumok membránjában maradna, és nem degradálódhatna. Munkám során éppen azt bizonyítottam, hogy a caveolin-1 a felvételi folyamat eredményeként lizoszómákban degradálódik, ennek az útvonalnak pedig fontos, kikerülhetetlen állomása a MVB.

Természetesen tudom, hogy napjainkban újabb eredmények arra utalnak, hogy a bizonyos sejtekben, bizonyos körülmények között, bizonyos stimulusok hatására multivezikuláris testek exocitózissal vezikuláikat a környezetbe üríthetik. Nem állítottam, hogy a multivezikuláris testek kizárólag az endocitózisban vesznek részt, mindazonáltal a multivezikuláris testek az endocitózis útvonalán, a fent említett mechanizmussal keletkeznek, és inkább tekinthetők endocitotikus kompartmentumoknak, mint exocitotikus vezikuláknak. Elektronmikroszkópos felvételeinken mind makrofágokban, mind pedig HepG2 sejtekben a multivezikuláris testeket minden esetben mélyebben a citoplazmában, inkább a Golgi készülék közelében azonosítottunk, és nem a plazmamembrán közelében, a sejt felszín alatt. A plazmamembránnal való fúziójukra, exocitózisukra utaló jelet nem észleltünk.

„Hogyan végezte a 100. oldalon említett albumin megvonást?”

A HepG2 hepatocelluláris carcinoma sejtvonalon végzett vizsgálataim során (amint azt az Anyag és Módszer fejezetben leírtam) a kontrollként használt sejteket albumin-mentes DMEM (Dubecco's Modified Eagle Medium, Gibco) tenyésztői médiumban tartottuk 24 órán át. A 24 órás albumin megvonás hatására HepG2 sejtek plazmamembránján jelen lévő caveolák

száma erősen lecsökkent, albumin hozzáadás után pedig jelentősen megemelkedik, így a HepG2 sejtek kiváló modellnek bizonyultak a caveolák közvetítésével végbemenő endocitózis vizsgálatára.

„109. oldal Szignifikáns emelkedésről és csökkenésről beszél. Milyen statisztikai próbát végezett? Végzett-e denzitometriát?”

A Western blot eredmények kvantitatív kiértékelésére nem végeztem denzitometriát, így statisztikai vizsgálatot sem. A „szignifikáns” szó használata így valóban megtévesztő, helyette jobb lett volna a „jelentősen megnőtt”, vagy „jelentősen lecsökkent” kifejezést használni.

Az Eredmények megvitatásával kapcsolatos kérdések

„Elképzelhetőnek tartja-e, hogy limfocitákon „elicitálás” (aktiválás) hatására megjelennek caveolák?”

Fra és mtsai 1995-ben a Proc. Nat. Acad. Sci USA-ben publikált eredményei azt mutatták, hogy a limfocitákban nem expresszálódik caveolin-1 és nincsenek jelen caveolák. Caveolin-1 gén transzfektálása után azonban a caveolák megjelennek a limfociták plazmamembránján. 2002-ben Harris és mtsai caveolin-1 jelenlétét mutatták ki T-sejtekben és leukémia sejtvonalakon. Konfokál mikroszkópos és Western blot vizsgálatokkal igazolták a caveolin-1 jelenlétét CD4+, CD8+, CD21+ limfocitákon. Fra által publikált, és szinte dogmaként kezelt eredménytől eltérő eredményeiket azzal magyarázták, hogy a caveolin-1/caveola jelenléte vagy hiánya a limfociták aktivitási állapotának függvénye, és egyben egyik jelzője lehet. Ennek alapján nagyon is valószínűnek tűnik, hogy a limfociták aktiválása a caveolin-1 expresszióját, caveolák megjelenését eredményezheti limfocitákban.

„A 29KD fehérje kapcsán a jelölt a következőt írja: „Nem zárható ki, hogy a makrofágokban a caveolin expressziója során módosulások történnek, melyek a nagyobb molekulatömegű fehérje kialakulását eredményezik?” Van-e erre azóta bizonyíték?”

„Milyen módosulásokra gondol, és ennek a módosulásnak a jelenlétét hogy tudná igazolni?”

A kísérleteim során leírt, az irodalomból ismert molekulatömegnél kicsivel nagyobb molekulatömegű fehérjét azóta nem vizsgáltam. A 29 KD molekulatömegű fehérjéről azt gondolom, hogy egy makrofág-specifikus caveolin-2 izoforma lehet, tekintettel arra, hogy caveolin-2 ellen termeltetett ellenanyaggal reagál, és rezidens makrofágokban, ahol a caveolák száma kevés, ez az izoforma expresszálódik, Ismert, hogy a caveolin-2 (a caveolin-1-el

ellentétben) önmagában nem képes a caveolák kialakítására, a jellegzetes caveola morfológia kialakítására. Az irodalom hosszú ideig járulékos fehérjeként kezelte ezt az izofomát, amely a caveolák kialakulásában szerepet játszik ugyan, de a caveolák nélküle is jól megvannak. Az utóbbi időben jelentek meg olyan publikációk, amelyek arról számolnak be, hogy a caveolin-2-nek a „járulékos” szerepnél fontosabb funkciója is lehet. Például a STAT3 transzkripció aktivitását szabályozza (Kwon és mtsai 2009), vagy a caveolin-2 downregulációja szupresszálja az ERK inzulin-indukálta maglokalizációját (Sowa 2011). A következő években feltehetően áttörés várható ezen izoforma szerepét illetően.

A módosulások, amelyek az irodalomban leírtánál nagyobb molekulatömeg kialakulását eredményezhetik, lehetnek például foszforilációk különböző (esteleg több) szerin, threonin vagy tirozin aminosav származékon. Ennek igazolására szerin/treonin és/vagy tirozin foszfatáz kezelések utáni Western blot vizsgálatot lehetne végezni. Elképzelhető, hogy a caveolin izoformákban az aminosavak száma, szekvenciája fajoként némileg eltér. Közismert például, hogy a caveolin-1-nek α és β alformája létezik, amelyek közül a β alforma 31 aminosavval rövidebb mint az α (Fujimoto és mtsai 2000). Ennek igazolására kiváló módszer az aminosav szekvenálás, és az aminosav szekvenciák összehasonlítása. Ha bebizonyosodna, hogy a caveolin-2-nek is léteznek al-izoformái, és ha rendelkezésre állna megfelelő antitest, mint ahogyan a caveolin-1 α és $-\beta$ esetében mindkettő al-izoforma ellen létezik ellenanyag, akkor immuncitokémiával is kimutathatók lennének az izoforma módosulatok.

Végezetül még egyszer szeretnék köszönetet mondani opponensemnek azért, hogy elvállalta disszertációm bírálatát. Köszönöm alapos, szinte minden részletre kiterjedő kritikai észrevételeit, kérdéseit, amelyeknek megválaszolása nem kis „agytornát” jelentett számomra. Kérem, hogy válaszaimat fogadja el.

Budapest, 2018. január

Dr. L. Kiss Anna