

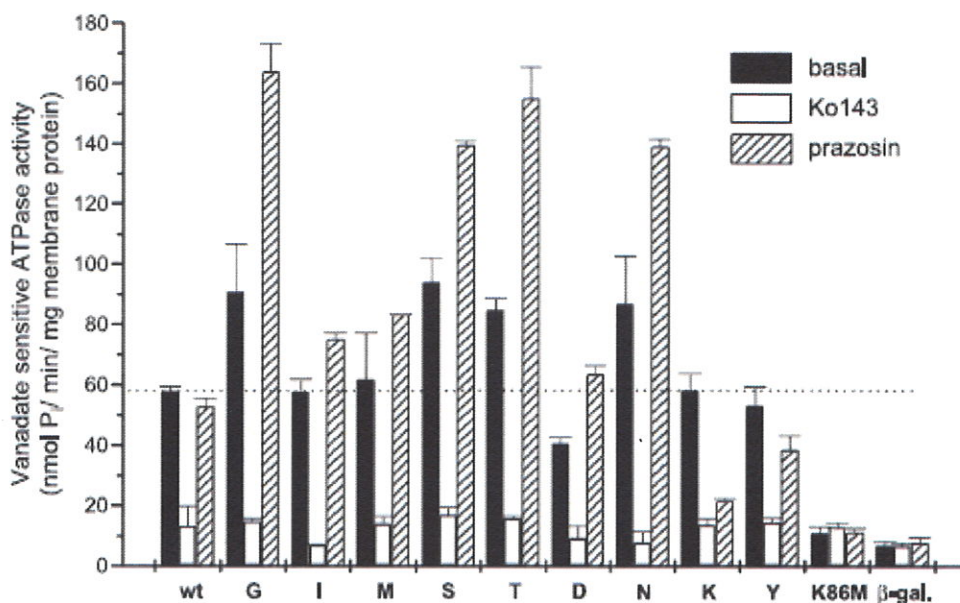
Válaszok Dr. Krajcsi Péter bírálatára

Először is nagyon szépen köszönöm Dr. Krajcsi Péternek az MTA doktori dolgozatom pozitív és támogató bírálatát!

A felvetett főbb kritikai észrevételekre és kérdésekre az alábbiakban szeretnék válaszolni.

Válaszaim a kritikai észrevételekre:

- A két ABC fehérjénél, MRP2 (ABCC2) és ABCG2 következetlenül használtam a tradicionális és hivatalos nomenklatúrát. Ez abból ered, hogy a laboratóriumunkban ezek az elnevezések honosodtak meg. Egytértek azonban a Bírálóval, hogy egységesen vagy az egyik, vagy a másik elnevezést kellett volna használnom.
- A dolgozatomban igyekeztem a már publikált adatokból válogatva a főbb tudományos eredményeket kiemelni, így több esetben készítettem új, összefoglaló ábrákat vagy táblázatot. Némely esetben azonban az egyszerűsítés a lényegi információk kihagyását eredményezte. Az említett, 3. táblázatban a vanadát-szenzitív és ABCG2-specifikus inhibitorral (Ko143) gátolható aktivitást jeleztem, amit sajnos nem tüntettem fel a táblázathoz fűzött magyarázatban. Az eredeti ábrát, ami alapján a 3. táblázat készült, alább bemutatom. Ez alapján mindegyik 482-es változat rendelkezik vanadát- és Ko143-szenzitív aktivitással. A prazosin azonban nem mindegyik változat aktivitását fokozta. Ezek a mérések nem koleszterin-töltött Sf9 rovarsejt membránokon készültek.



1. **ábra: ABCG2 fehérje változatok ATP-áz aktivitása Sf9 rovarsejt membránpreparátumban.** Az ABCG2 fehérje változatok valamelyikét tartalmazó rovarsejt membránpreparátumokban 3,3 mM MgATP jelenlétében 100 μ M prazosin (csíkozott oszlop) vagy 1 μ M Ko143 (üres oszlop) hozzáadásával vagy a nélkül (fekete oszlop, "basal") mért vanadát-szenzitív aktivitás. wt: R482, vad-típus. R482 mutánsok: G-Y. K86M: katalitikus domén mutáns, negatív kontroll. β -gal: β -galaktozidáz kifejező negatív kontroll. Az adatokat a fehérje expresszióra normalizáltuk, négy mérés átlaga \pm SD érték látható.

Kérdésekre adott válaszaim:

1. „A 3. táblázat (disszertáció 45. oldal) szerint R>K mutáns szignifikánsan különböző aktivitási profilt mutatott mint a vad típus. Mi lehet ennek az oka?”

Válasz: Az „eredeti” Arg és a hozzá leginkább hasonlító Lys változatok működése jelentősen eltér egymástól. A Lys változat képes ATP hidrolízisre, de sem metotrexátot, sem az általunk vizsgált egyéb szubsztrátot, Hoechst 33342, mitoxantron vagy rhodamine 123 nem képes transzportálni. Eredményeink alapján a 482-es Arg fontos a szubsztrát felismerésben, olyannyira, hogy a folsav antagonistá metotrexát transzportjára egyedülként képes. A térszerkezet alapján érdekes módon a 482-es Arg nem közvetlenül a szubsztrátkötő zseb kialakításában vesz részt, mégis ez a pozíció annyira érzékeny, hogy a nagyobb méretű Lys már

jelentősen kevésbé működik. Mivel a Lys 482 mutáns expressziójában (legalábbis Sf9 rovarsejtekben) nem tapasztaltunk különbséget, és a konformáció szenzitív antitest kötődése is megmaradt, a Lys változat szerkezete nem sérült olyan mértékben, hogy a fehérje expresszió elromlott volna és az 5D3 epitóp is ép. Ezt később Ejendal és mtsai. is megerősítették (<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1110/ps.051998406>). Az ismert térszerkezetek alapján az 482-es arginin oldallánc nem a szubsztrátkötő zseb felé, hanem egy oldalsó üreg felé nyúlik be. Molekuláris szimuláció során a kisebb Gly nagyobb mozgásteret és nagyobb konformációs változást biztosít, ezzel lehet magyarázható a fokozott működése (László és mtsai, 2016, DOI: 10.1371/journal.pone.0164426). A 482-es Lys változatról térszerkezet vagy molekuláris szimuláció nem készült, de az Arg Gly közötti különbség alapján a nagyobb Lys oldallánc kisebb konformációs szabadságot eredményezve ronthatja a fehérje működését.

2. „A disszertáció 15. ábrájának a címében feltehetően elírás az Y431S, hiszen a fejezetben a Y413S került tárgyalásra?”

„A bírálóban felmerült, hogy szerencsés volt-e a Y>F mutánsok eredményeinek a Y>S mutánsokkal való egy ábrában történő prezentálása. Illetve. Nem Kellott-e volna minden vizsgált tirozinra Y>F mutánst is elkészíteni?”

Válasz: Igen, az ábra felirata elütés miatt tévesen 431 a 413 helyett.

Igen, lehet, hogy áttekinthetőbb lett volna ezeknek az eredményeknek a bemutatása, ha a Ser és Phe mutánsokkal kapott eredményeket külön ábrázolom.

A feltételezett CRAC (cholesterol recognition amino acid consensus) régióban a korábban a koleszterin kötésben igazoltan részt vevő Tyr-kat mutáltattuk. Több tanulmány alapján a Tyr benzol és hidroxil csoportja is szükséges a koleszterin kötéséhez, ezért az más aminosavval nem helyettesíthető (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3584320/>). A célunk ebben a vizsgálatban az volt, hogy a fehérje működését ne rontsuk el, csupán a koleszterin érzékenységet. Hasonlót Slo1 ioncsatorna és a benzodiazepin receptor mutánsokat készítettek már. Mind a Ser mind a Phe mutánsoktól azt vártuk tehát, hogy a koleszterin érzékelésük elromlik, amennyiben ők valóban egy koleszterin szenzor régió részei. A Phe mutánsokat csak a 469 és 645 pozíciókra készítettük el, mivel ezek Ser változatai inaktív fehérjét eredményeztek. A 459-es Tyr Ser cseréje pedig döntően befolyásolta a fehérje expresszióját. Még rovarsejtekben sem tudtuk ezt a változatot letermeltetni. Ebben az esetben célszerű lett volna a 459F mutánst is elkészíteni. Különösen azért, mert nem tudjuk, hogy a koleszterin érzékelés

mennyire befolyásolja a fehérje stabilitását, és nem ezért volt-e sikertelen el a 459S mutáns expressziója. A később meghatározott térszerkezet alapján azonban a 459-es Tyr a fontos stabilizáló „coupling” hélix része és a koleszterin érzékelésben közvetlenül nem vesz részt.

A 413 és 570 Ser mutánsok aktivitása és koleszterin érzékelése nem sérült, így mivel a CRAC központi Tyr az irodalmi adatok alapján nem helyettesíthető, a Phe mutánsokat már nem készítettük el. A térszerkezet alapján sem a 413-as sem az 570-es tirozinok nem vesznek részt közvetlenül a koleszterin kötésében.

3. **„A bíráló feltételezi, hogy a disszertáció 59. oldalán a Na-ortovanadát (Vi) 5D3 kötődést csökkentő hatása lenne a helyes megfogalmazás az 5D3 Vi kötődést „fokozó” hatása helyett?”**

Válasz: Igen, itt sajnós elírás történt és a csökkentő hatást figyeltünk meg.

4. **„A szubsztrát-transzporter kölcsönhatás jellemzésénél összehasonlításra kerültek-e a gyógyszerkölcsönhatás releváns szubsztrátokkal kapott gátlási adatok (IC_{50}/K_i) a Na-fluoreszceinnel mint szubsztráttal kapott adatokkal?”**

„Néhány molekula, köztük a ciklosporin A fokozta az OATP1B1-mediált Na-fluoreszcein transzportot. Közelmúltbeli adatok alapján a ciklosporin A OATP1B1 gátló hatását az előinkubálás potenciózza. Van-e adat (irodalmi vagy saját) az előinkubálás hatásáról az OATP1B1-mediált Na-fluoreszcein transzportra?”

Válasz: Igen, több releváns szubsztrátot, például rifampicin, metotrexát és Imatinib is vizsgáltunk az OATP1A2, OATP1B1, OATP1B3 és OATP2B1 fehérjék fluoreszcein és fluoreszcein-metotrexát felvételének gátlásával. Azonban részletes kinetikai mérésekre nem került sor, mivel a tranziens rovarsejt rendszer, bár jó kiindulási alapja volt a fluoreszcens OATP szubsztrátok keresésének, nem ideális nagyszámú vegyület szűrésére vagy kinetikai vizsgálatok kivitelezéséhez. Ezért a próbák jóságának vizsgálatát például IC_{50}/K_i értékek összevetésével csak a mikrolemes alapú, OATP-ket stabilan expresszáló emlős sejteken az egyéb festékek, pl. SR101, Cascade Blue vagy Ace segítségével végeztük el. Egyetértek azonban a Bírálóval, hogy a rovarsejt-fluoreszcein módszer megbízhatóságának eldöntéséhez, radioaktív módszerekkel való összevetéséhez szükséges lett volna az IC_{50} értékek meghatározása.

A Ciklosporin A fokozta az OATP1B1 Na-fluoreszcein felvételét pH 5,5-ön, de gátolta pH 7,4-en. Több OATP fehérjénél kimutatták, hogy egyik vegyület fokozhatja a másik transzportját. Az OATP1B1 fehérjénél pedig az előinkubálás időtartama befolyásolhatja a gátlás hatékonyságát (hosszabb előinkubálás alacsonyabb IC₅₀ értéket eredményez). Ez utóbbinál elképzelhető, hogy a vizsgált inhibitor bejutva a sejtbe az OATP belső, intracelluláris tér felőli kötőhelyéhez köt, és azt nagyobb affinitással gátolja ($K_{i, trans} < K_{i, cis}$, Izumi és mtsai, 2022). A CsA-nál kimutatták, hogy a sejteket megfelelő ideig előinkubálva, majd a CsA-t kimosva, az még mindig gátolni fogja az OATP1B1 működését. Azonban olyan példáról nem tudok, ahol az aktivátor ugyanazon koncentrációban, de hosszabb előinkubálással alkalmazva inhibitorként viselkedett volna, de ez egy nagyon érdekes kérdés. Mi is több OATP fehérjére mértünk aktiválást a laborunkban fejlesztett módszerekkel, érdemes lenne megnézni ezek gátolhatóságának előinkubációtól való függését, esetleg a pH hatását. Végül válaszolva a kérdésre, mi rutinszerűen öt perces előinkubálást alkalmazunk, de a fentiek alapján, habár az FDA ajánlásban nem határozzák meg az előinkubálás hosszát, de mindenképpen javasolják azt, érdemes lenne hosszabb időre áttérnünk.

7. „Történt-e a bemutatott funkcionális vizsgálatokon túlmenően egyéb vizsgálat (pld. konfokális mikroszkópia) a korrekt lokalizáció megmutatására?”

Válasz: Köszönöm az észrevételt! Igen, az OATP1B1 és az MRP2, illetve az ABCG2 sejtfelszíni lokalizációját immunfestést követő konfokális mikroszkópiával meg lehetett volna erősíteni. Ez különösen az ABCG2 esetében lett volna fontos, ahol a vezikuláris transzport mérésekben szubsztrátként azonosított Cascade Blue festékre nem tudunk transzcelluláris transzportot kimérni. Alternatívaként ismert ABCG2 szubsztrát transzcelluláris transzportját lehetett volna megmérni. Ilyen közös ABCG2-OATP1B1 szubsztrát lehetett volna a radioaktívan jelzett ösztron-3-szulfát. Mindenképpen érdemes lenne tehát az általunk előállított OATP1B1-ABCG2 kettős transzfektáns MDCKII sejtvonalat tovább jellemezni, hogy eldöntsük, az ABCG2 a polarizált sejtek apikális membránjában található-e meg.

9. „szubsztrátok és nem transzportálódó inhibitorok elkülönítésére alkalmas (kompetitív ellenáramláson alapuló) módszert dolgoztak ki. Van-e arra adat nagyobb molekulaszámon, hogy milyen pontossággal lehet az inhibitorokat és a szubsztrátokat ezzel a módszerrel megkülönböztetni?”

Válasz: Igen, folyamatban van a kompetitív ellenáramlás módszerének tesztelése nagyobb számú vegyülettel. Ezen jelenleg is dolgozunk. Mindenképpen hasznos lenne a módszer megbízhatóságát jellemezni, számszerűsíteni a találati valószínűséget, és akár számítógépes modellt létrehozni a szubsztrátok és inhibitorok elkülönítésére, ami jelenleg nem megoldott. Sajnos a rendelkezésre álló kísérletes eredmények sem különítik el többnyire a kompetitív és nem kompetitív inhibitorokat. Az irodalmi adatokat böngészve nem könnyű például „igazi” inhibitorot találni, amiről bebizonyították, hogy önmaga nem transzportálódik. Így a tesztvegyület könyvtár összeállítása nem egyszerű feladat. Lehetne ugyanakkor például tömegspektrometriás detektálással igazolni a kompetitív ellenáramlás módszerrel azonosított szubsztrátok transzportálódó voltát.

10. „A célsejt szelektivitás influx transzportereken keresztül történő biztosítása/erősítése vonzó, és ez szép példa erre. Milyen megfontolásokat kell ilyenkor tenni, és mik jelenlegi tudásunk szerint a korlátai ennek a megközelítésnek?”

Válasz: A kemoterápia során fontos szempont a célzott hatás, és a lehető legkevesebb mellékhatás. A tumorokban megnövekedett uptake transzporter expresszió vagy funkció, esetleg tumorspecifikus izoforma megléte (mint például az OATP1B3 csak tumorokra jellemző ct-OATP1B3-V1 izoformája) tehát ilyen szempontból potenciálisan kiaknázzható. Egyrészt, amennyiben a terápiás szer szubsztrátja az SLC-nek akkor az dúsulhat a tumorban. Másrészt, ha a tumorban például a savas mikrokörnyezet fokozza az SLC működését, akkor ez is segítheti a terápiás szer célzott hatásának elérését. Szintén lehetőség a terápiás szer becsomagolása olyan nanopartikulumba, amely például a tumorspecifikus SLC-hez kötődik. A solute carrier-ek közül több fehérjét is megcéloztak ilyen megfontolás alapján, például a gamma-aminolevulénsav a PEPT1 fehérje működése által dúsul a tumorban, a gemcitabine pedig ENT1 szubsztrát, és még számtalan példa van. Érdekes, új módszer a PROTAC (proteolysis targeting chimera), amivel sikerrel céloztak SLC fehérjéket (DOI: 10.1016/j.chembiol.2020.04.003).

Az elképzelés korlátja lehet az SLC egészséges szövetekben való expressziója, illetve az, hogy a terápiás szer a tumorokban expresszálódó ABC multidrog transzporterek kipumpálhatják a sejtől. A tumorspecifikus izoformánál pedig az egészséges szövetekben jelen lévő transzporterhez képest megváltozott működés vagy szubsztrát-felismerés lenne elvárt a célzott terápiában. Ezt azonban a ct-OATP1B3-V1 fehérjénél még nem igazolták.

Az OATP2B1 testszerte előfordul, például a vér-agy gát endotél sejtjeiben is, azonban a tumor savas mikrokörnyezete biztosíthatja az OATP2B1-t célzó terápia specifikusságát, mivel az

OATP2B1 működését jelentősen fokozza a savas extracelluláris milió. Azonban ennek igazolása még további vizsgálatokat igényelne.

11. „a disszertáció 6. Táblázatában a maximális plazma koncentráció mellett a májra predikált koncentrációk is leírásra kerülhettek volna”

Válasz: Egyetértek a Bírálóval, hogy a máj-specifikus OATP1B1 és OATP1B3 fehérjéknél a hepatikus koncentráció feltüntetése a 6. táblázatban releváns lett volna. Ezeket az értékeket a következő képlet $C_{max} + (ka * Dose * Fa * Fg / Qh / RB)$, ahol C_{max} : maximális plazma koncentráció, ka : 0,1, Fa : 1, Fg : 1, Qh : 1500 és RB : 1) és az Ambrus és mtsai., 2021-es cikkben használt adatok alapján kiszámoltam, és az alábbi táblázatba belefoglaltam. Javítottam továbbá a favipiravirnál a korábban hiányzó adatot.

Módosított 6. táblázat: OATP-k működésének gátolhatósága potenciális Covid-19 ellenes szerekkel és azok emberi szervezeten belüli koncentrációi

anti-COVID-19 gyógyszerek	mechanizmus	Transzporter gátlás IC ₅₀ (μM)				maximális plazma koncentráció (μM)	máj koncentráció (μM)
		OATP1A2	OATP1B1	OATP1B3	OATP2B1		
ivermectin	klorid csatorna és GABA receptor gátló (parazitellenes szer)	5,2	≥20	1,4	8,6	0,052	0,056
lopinavir	(HIV) proteáz inhibitor	1,5	1,1	2,6	1	11-20	20,02
ritonavir	(HIV) proteáz inhibitor	2,3	1,4	1,5	1,4	1-1,73	1 006
remdesivir	virális RNS-polimeráz gátló (Hepatitis C és Ebola ellen fejlesztve)	3,8	2,9	4,3	3,8	3,7	3,006
favipiravir	virális RNS-polimeráz gátló (influenza ellenes szer)	nincs hatás	nincs hatás	nincs hatás	nincs hatás	0,293	0,346

Egyéb, a Bíráló formai észrevételeivel kapcsolatos válaszaim:

A dolgozat a gondos, több személy általi átolvasás ellenére is tartalmaz elírásokat. Köszönöm szépen az észrevételt! Mindenképpen javítom majd ezeket, hogy ha már a hivatalos verzióban erre nincs is módom, legyen egy sajtóhibáktól-mentes változat.

Végezetül ismételten köszönöm a dolgozatom értékelését! Kérem a fentiekben foglalt válaszaim szíves elfogadását és az MTA doktora cím odaítélésének támogatását.

Tisztelettel,

Budapest, 2022. június 21.


Laczka Csilla