

## Válaszok Dr. Uher Ferenc bírálataira

Először is tisztelettel megköszönöm a dolgozatom bírálatát és az elgondolkodtató kérdéseket!

A feltett kérdésekre az alábbiakban szeretnék válaszolni.

- 1. Kérdés: Említi a disszertációban, hogy a vad típusú ABCG2 fiziológiaszubsztrátja a folsav lehet. Ennek kapcsán kérdezem: elképzelhető-e – illetve ismeretes-e – olyan, látszólag a folsav hiányára visszavezethető vérszegénységnek (például a megaloblasztos anaemiának) olyan formája, aminek háttérében valójában nem az elégtelen folsav bevitel, hanem az ABCG2 transzporter valamely, a molekula fokozott aktivitását kiváltó mutációja húzódik meg?**

**Válasz:** Az ABCG2 fehérje fokozott működése valóban hozzájárulhat az emberi szervezetben a folsav vékonybélben történő csökkent felszívódásához, illetve májon át történő kiürüléséhez (az ABCG2 a folsav glükuronidjait (is) szállítja az epe felé). Azonban az általam és mások által vizsgált funkciónyeréses „gain of function” mutációkon kívül más, fokozott működést eredményező humán ABCG2 változatot nem írtak le. Az R482 mutánsok pedig csak mesterséges körülmények között, *in vitro* gyógyszer szelekció során keletkeztek. Így tudomásom szerint még nem írtak le olyan betegséget, amelynek háttérében az ABCG2 fokozott működése állna.

Viszont szarvasmarhában azonosítottak egy funkciónyeréses ABCG2 mutációt (Y581S) ([https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(14\)00739-5/pdf](https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(14)00739-5/pdf)), amely a tehének fokozott tejhozamát, és az ABCG2 szubsztrát antibiotikumok fokozott kiválasztását eredményezi a tejbe. A folsav homeosztázist vagy B-vitamin kiválasztást azonban nem vizsgálták (a tejben csak megnövekedett zsírtartalmat mértek).

Fokozott ABCG2 működés kialakulhat a transzporter fokozott expressziója miatt is. Szintén *in vitro* körülmények között az ABCG2 és (ABCC fehérjék) overexpressziója csökkent folát felvételt és az antifolát kemoterápiás szer metotrexát csökkent hatását eredményezi.

A folsav megvonása azonban ellenkező irányba hatott, az az ABCG2 fehérje csökkent expresszióját eredményezte *in vitro* körülmények között, tumoros sejtvonalakban (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15047700/>). Ugyanakkor hozzá kell tennem, hogy az

ellenkezőjét is leírták, miszerint a folát megvonás fokozott ABCG2 expressziót eredményez (DOI: 10.1002/ijc.23677).

A folsav hiány/megvonás kompenzálására többféle mechanizmus létezik, így elképzelhető, hogy a fokozott ABCG2 működést a sejt kompenzálná például a folsav uptake transzporterek megnövekedett expressziójával vagy a folát-függő enzimek szintjének szabályozásával, (<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0083672908004044?via%3Dihub>).

**2. Kérdés: Kapcsolódó, de általánosabb kérdés, hogy a köszvényen kívül ismert-e bármilyen betegség, ami az ABCG2 csökkent, vagy fokozott működésére vezethető vissza?**

**Válasz:** Az ABCG2 fehérjét kódoló génben mintegy 15000 SNP és ebből 450 aminosavcserét vagy frameshiftet eredményező változat található az NCBI SNP adatbázisban (Zámbó és mtsai, 2018). Ezek közül a leggyakoribbakat, például a V12M és a Q141K változatokat már részletesen jellemezték mások és a mi kutatócsoportunk is. A köszvényen kívül egy tanulmány a Parkinson kór kisebb kockázatát (vagy legalábbis későbbi kifejlődését) mutatta ki a leggyakoribb, Q141K polimorfizmust hordozó emberekben (1015 embert vizsgáltak, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/acn3.167>). A Parkinson kór kapcsán azt feltételezik, hogy a megnövekedett húgysav szint, aminek antioxidatív hatása van, késleltetheti a Parkinson kór kialakulását. Szintén a húgysav antioxidatív hatásával magyarázzák, hogy a Q141K polimorfizmus traumás fejsérülés utáni gyorsabb felépülést valószínűsít (DOI: 10.1089/neu.2017.5000). Egyéb betegséggel kapcsolatban tudomásom szerint nem találtak összefüggést az ABCG2 mutáció és a betegség között. Az ABCG2 fehérje a vörösvértestek membránjában is kifejeződik, és hiánya a Junior<sup>+</sup> vércsoportot eredményezi. Ezek az emberek azonban egészségesek.

**3. Kérdés: A daganatterápiában alkalmazott tirozin kináz gátló gyógyszerről, az Iressáról azt írja, hogy magas koncentrációban gátolja az ABCG2-t, alacsony koncentrációban azonban fokozza a molekula ATPáz aktivitását, ami rezisztenssé teheti a daganatsejteket. Mi lehet – ha ismert - e különbség molekuláris háttere?**



**Válasz:** Az aktív transzporter ABC fehérjéknél a szubsztrát transzlokációja az ATP hidrolízishez kötött. Az ATP hidrolízis energiája szükséges a szubsztrát transzportjához, így a szubsztrát jelenléte fokozhatja az ATP hidrolízist. Ugyanakkor ismert jelenség, hogy a transzportálódó szubsztrát magasabb koncentrációban alkalmazva gátolhatja az ATP hidrolízist. Ezt transz-inhibíciónak nevezik (például Sarkadi et al., 1992; Bakos et al., 2000). Az ABC térszerkezetek ismeretében ezt azzal magyarázzák, hogy magas koncentrációban alkalmazva ugyanazon szubsztrát allosztérikusan gátolja a transzportert, azt megrekeszti, rögzíti a transzport ciklus egy köztes, inaktív állapotában (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6822692/#!po=31.8182> <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jacs.7b12409>).

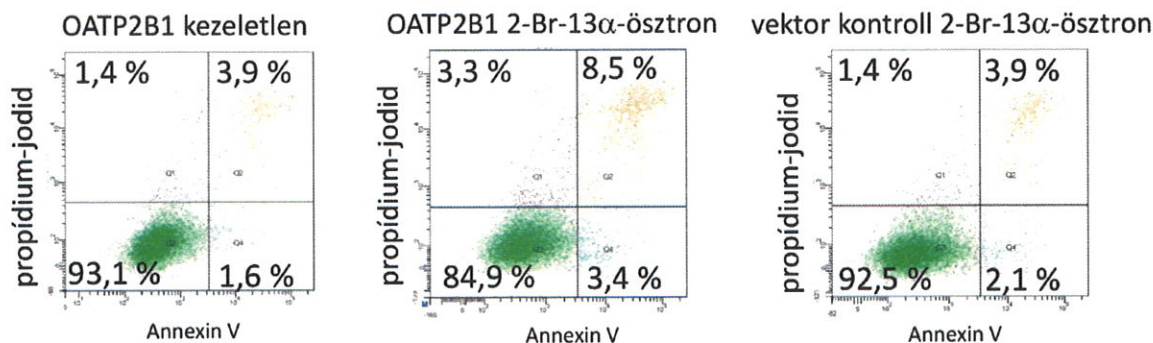
A magas “alap” ATP-áz aktivitással rendelkező ABCG2 fehérje ATP hidrolízisét több, lassan transzportálódó szubsztrát is gátolja. Ezt azzal magyarázzuk, hogy a fehérje “szétkapcsolt” állapotban van, azaz az ATP hidrolízis alapjáraton, szubsztrát nélkül is folyik (legalábbis izolált membránvezikulumokban). Ezt rekesztheti meg a transzportálódó szubsztrát.

Szeretném azonban megjegyezni (és ezt részletesen kifejtem Dr. Szabó Gábornak írt 3. válaszomban), hogy az ATP-áz aktivitás mérésekben hatékony koncentrációkból nem feltétlenül tudunk következtetni a sejtes rendszerekben vagy *in vivo* hatékony koncentrációkra, a rendszerek és módszerek különbözősége miatt.

- 4. Kérdés: az OATP2B1 szelektív inhibítora a természetes ösztrom 13 $\alpha$  epimerjének vizsgálata kapcsán részletesen bemutatja a vegyület sejtosztódást gátló hatását. Mivel potenciális gyógyszerként említi az ilyen típusú vegyületeket, a proliferáció gátló hatás mellett szerencsés lett volna a sejtek életképességét is nyomon követni, vagyis eldönteni, hogy valóban csak a sejtosztódás blokkjáról, vagy az érintett sejtek pusztulásáról van-e szó? Ennek az esetleges terápiás alkalmazás szempontjából nagy jelentősége lehet, ugyanis az osztódásukban gátolt (dormant=alvó) tumorsejtek idővel esetleg visszanyerhetik proliferációs képességüket, ami a *in vivo* akár relapsushoz vezethet.**

**Válasz:** Köszönöm szépen az észrevételt! Az OATP2B1 fehérjét termelő sejtek szelektív pusztulását eredményező vegyületeket keresve a sejtszám változást a sejtek GFP vagy mcherry expressziója alapján követtük nyomon, mivel ez egy reagens-mentes, gyors módszer (Windt és mtsai, 2019, doi: 10.1007/s00204-019-02417-6). Viszont ez csak a sejtszámról ad információt, ezért PresoBlue festéssel is teszteltük a leghatékonyabb szteroidokat, azonban itt jelentős

különbséget a kontroll és OATP2B1 termelő sejtek között nem találtunk. Ez a két módszer eltérő érzékenységéből adódhat, amit több, igazoltan citotoxikus vegyülettel is megerősítettünk. Annak érdekében, hogy megfejtjük, milyen mechanizmussal pusztulnak, pusztulnak-e a sejtek, propídium-jodid és annexinV festést végeztünk (1. ábra, amely a dolgozatban nem került bemutatásra, mivel az ide vonatkozó publikációban nem szerepelt).



**1. ábra: A431 sejtek propídium-jodid és Annexin-V jelölése.** A kontroll vektorral transzfektált és OATP2B1 fehérjét kifejező A431 sejteket 24 órán át kezeltük 2-bromo-13 $\alpha$ - $\alpha$ sztronnal (50  $\mu$ M), majd jelöltük propídium-jodiddal és AnnexinV-FITC-vel (Dojindo kit, <https://www.dojindo.eu.com/store/p/833-Annexin-V-FITC-Apoptosis-Detection-Kit.aspx>). A sejtek fluoreszcenciáját ezután áramlási citométerben vizsgáltuk.

Ez alapján a 2-Br-13 $\alpha$ - $\alpha$ sztron kezelés következtében a sejtek, ha kis mértékben is, de pusztultak, mivel azonban itt a korai apoptózist szeretnénk tetten érni, ezek a kísérletek 24-48 óránál készültek. A legnagyobb hatást pedig 5 napos inkubálás után kaptuk a GFP/mcherry módszerrel. Ezért ezeket a vizsgálatokat érdemes lenne folytatni, hogy a vegyületek toxikusságát igazoljuk (vagy cáfoljuk), illetve vizsgálni, hogy hosszabb távú alacsony dózis mellett, vagy ismételt kezelést követően nem alakul-e ki egy dormant vagy rezisztens populáció.

Végezetül köszönöm szépen a dolgozatom értékelését, és tisztelettel kérem a válaszaim elfogadását.

Budapest, 2022. június 21.

*Laczk Csilla*  
Laczk Csilla