

Válasz

Dr. Sümegi Balázs opponensi véleményére

Nagyon köszönöm Dr. Sümegi Balázsnak, hogy elvállalta doktori értekezésem bírálatát, és hogy munkámat pozitívan értékelte. Köszönöm továbbá kérdéseit, amelyek gyakran túlmutatnak a bemutatott kísérleti eredményeken.

A felvetett kérdéseire a következőket tudom válaszolni.

1. kérdés: hogyan befolyásolják a koleszterin eltávolításban szerepet játszó transzporterek (pl. az ABCG1 és ABCG2) a lipid raftok kialakulását illetve a bennük lévő receptorok működését?

Válasz: az általunk vizsgált transzporterek közül az ABCG2 transzportaktivitását ugyan fokozza a membrán koleszterintartalma, azonban azt nem sikerült kimutatni eddig sem nekünk, sem másoknak, hogy az ABCG2 esetlegesen koleszterint transzportálna. A másik említett transzporterrel, az ABCG1-gyel kapcsolatban azonban nagyon is jogos a feltételezés, hogy a hozzá kapcsolódó koleszterin kiáramlás miatt a lipid raftok összetételére befolyással van, és ezzel a raftokban elhelyezkedő receptorok működését is módosítja. Mi magunk ugyan nem vizsgáltuk ezt a kérdést, azonban az irodalomból rendelkezésre állnak olyan adatok - elsősorban knockout egerekkel végzett kísérletek -, melyek szerint az ABCG1 hiánya növeli a membránok koleszterin tartalmát és a raftok méretét. Ezzel párhuzamosan megfigyelhető a ABCG1-deficiens egerek makrofágjaiban bizonyos, raftokhoz kapcsolódó szignálutak (pl. TLR2/4 és Myd88) felerősödése. Ezzel összhangban más rendszerben azt mutatták ki, hogy az ABCG1 expressziójának növekedésével párhuzamosan csökken a raftokhoz kapcsolódó AKT-túlélési szignálút, ami végül apoptózishoz vezet. A legnagyobb - és továbbra is megválaszolatlan - kérdés ezekkel a vizsgálatokkal kapcsolatban, hogy mennyire specifikusak ezek a folyamatok, hogy ténylegesen az ABCG1 transzportaktivitásához köthetők ezek a változások, vagy csak távoli következményei az ABCG1 által kiváltott sejten belüli (pl. apoptotikus) folyamatoknak.

A fentiekén kívül feltétlenül meg kell említeni ebben a tekintetben egy harmadik ABC transzportert, az ABCA1 fehérjét is, ami a HDL előállításának kezdeti lépésében, a koleszterin apoA-I-re történő exportjában játszik meghatározó szerepet. Ezen transzporter és a lipid raftok kölcsönhatásának kérdésében a rendelkezésre álló irodalmi adatok rendkívül szerteágazóak és ellentmondásosak. Ugyan a transzporter valószínűleg inkább a

rafton kívüli membránrészben helyezkedik el, mégis hatással van a raftban lévő koleszterinre. Erről a transzporterről is leírták, hogy az LPS-re adott gyulladásozó szignálat (TLR/4-Myd88) a lipid raftokon keresztül negatívan befolyásolja.

2. kérdés: szerepet játszik-e az ABCG1 a koleszterin exporton túl a foszfatidil-szerin exportjában is? A makrofágok apoptózisával kapcsolatban felvetődik a kérdés, hogy a transzporterek aktivációja szerepet játszhat-e betegség kialakulásában, vagy a tünetek súlyosbodásában.

Válasz: ugyan logikus a feltételezés, hogy az apoptotikus folyamatokban az ABCG1 esetlegesen a foszfatidil-szerin kifordulásában játszhat szerepet, de sem nekünk, sem másoknak nem sikerült eddig specifikus kölcsönhatást megmutatni az ABCG1 és a foszfatidil-szerin között. Irodalmi adatok arra utalnak, hogy az ABCG1 a koleszterin kívül szfingomielin és foszfatidil-kolin transzportjában is részt vesz, sőt számos oxidált szterin és a koleszterin anyagcsere különböző intermedierjei is szerepelnek az ABCG1 feltételezett szubsztrátjai között. Laboratóriumunkban jelenleg is folytatunk olyan funkcionális vizsgálatokat (ATPáz és transzport méréseket), amelyekkel választ szeretnénk találni az ABCG1 és a különböző lipidmolekulák közvetlen kölcsönhatásaira.

A kérdés második felére válaszolva elmondható, hogy a makrofágok apoptózisa leginkább az ateroszklerózissal és annak következményeivel, a szívinfarktussal és az agyérkatasztófával hozható összefüggésbe. Az ateroszklerotikus léziók tekintetében a makrofágok apoptózisa kettős karakterrel jellemezhető. Irodalmi adatok arra utalnak, hogy a korai léziókban az apoptotikus makrofágok kedvező hatásúak, a plakk növekedését gátolják, illetve a lézió stabilitását növelik. Ezzel szemben az előrehaladott lézióban, amikor a fagocitotikus aktivitás meghatározó tényezővé válik, a makrofágok apoptózisa előnytelenre fordul, mivel az tovább csökkenti a fagocitotikus kapacitást. Hasonló kettősséget megfigyelhetünk az ABCG1-deficiens egerekkel végzett kísérletekkel kapcsolatban. Ellentmondó eredmények születtek, amikor ateroszklerózis modell egerekbe ABCG1-deficiens csontvelőt transzplantáltak: az ABCG1-nek hol aterogén, hol ateroprotektív hatását tapasztalták. Egy szerkesztőségi levél rámutatott, hogy az eredmények attól függően mutatták a káros vagy védő hatást, hogy milyen fokú volt a modellállatokban a hiperlipidémia. Így az általunk bemutatott jelenség, hogy az ABCG1 apoptózist indukál makrofágokban, összetéve a makrofág-apoptózis kettős természetével, összhangba hozza a látszólag ellentmondó *in vivo* eredményeket.

3. kérdés: érzékenyek-e az általunk vizsgált ABC transzporterek mono-ADP-ribózra, és vajon ezek is regulálhatók-e PARP aktiváció és gátlás által, mint a P-glikoprotein?

Válasz: a tumorellenes szerek fejlesztésénél egy megkerülhetetlen kérdés, hogy a drogrezisztencia hátterében álló fehérjékkel kölcsönhatásba lép-e az illető drog, és hogy milyen a kölcsönhatás jellege: gátolja-e, szubsztrátja-e, vagy esetleg befolyásolja-e a fehérje expresszióját. Bár a PARP tématerületen több közlemény foglalkozik a PARP inhibitorok és a P-glikoprotein kölcsönhatásával, mint például a napokban a TIPS folyóiratban megjelent összefoglaló közlemény (Chiarugi A., TIPS-925, E-Pub), a legtöbb vizsgálat kizárólag erre a transzporterre szorítkozik. Az általunk vizsgált ABC transzporterekre vonatkozóan ugyanakkor rendkívül kevés adat áll rendelkezésre ilyen tekintetben. A P-glikoproteinnel kapcsolatban elmondható, hogy aktivitását a mono-ADP-ribóz gátolja - feltehetően a transzportfunkcióhoz szükséges ATP kompetitív inhibitoraként. Ennek alapján feltételezhető, hogy más ABC transzportereket is hasonló mechanizmussal gátolja az ADP-ribóz, azonban erre vonatkozó kísérleti adatokat még nem közöltek. A PARP inhibitorokkal kapcsolatban pedig leírták, hogy indukálják a P-glikoprotein expresszióját, így a drogellenes szerként alkalmazott PARP inhibitor két értelemben is elősegítheti a drogrezisztencia kialakulását. Egyrészt a PARP gátlása révén csökkenti a transzportert gátló ADP-ribóz mennyiségét, másrészt a transzporter expresszióját fokozza. Megkerülhető azonban ez a probléma, ha a PARP inhibitorot P-glikoprotein gátlószerrel (pl. Tariquidar-ral) kombinációban alkalmazzák.

A többi ABC transzporter tekintetében elmondható, hogy nemrégiben megjelent egy tanulmány, amelyben bemutatták, hogy emlőtumor modellekben egy PARP inhibitor, az olaparib (AZD2281) gyakran okozza a P-glikoprotein indukcióját, ugyanakkor nem tapasztalták az MRP1 (ABCC1) expressziójának növekedését, az ABCG2 expressziója pedig csak néhány esetben emelkedett meg (Rottenber és mtsai. 2008. PNAS). Egy újabb közlemény pedig azt írja le, hogy az ABCG2 expressziója nem járul hozzá az olaparib-rezisztenciához (Zander és mtsai 2010. Cancer Res.). Ezekből az adatokból az a következtetés vonható le, hogy a P-glikoproteinnel kapcsolatos megfigyelések nem általánosíthatóak, így érdemes volna részletesebb vizsgálatokat folytatni a többi - első-sorban a multidrog-rezisztenciában szerepet játszó ABC transzporterek vonatkozásában.

4. kérdés: az általunk vizsgált ABC transzporterek expressziója is megnő-e PARP-1 KO sejtekben, vagy ezek expressziója PARP-1 független?

Válasz: a bíráló által említett közlemény az ABC transzporterek közül szintén csak a P-glikoprotein expressziójának emelkedését mutatja be a PARP-1-deficiens egerek fibroblasztjaiban. Ez összhangban áll azokkal a megfigyelésekkel, hogy a különböző tumorokban a PARP inhibitorok a transzporter szintjének emelkedésével járnak. Elvégezték a PARP-1 knockout egérnek a teljes genomra vonatkozó expressziós mintázatának vizsgálatát embrionális őssejtekben, illetve májsejtekben. Ebben a tanulmányban viszont sem a P-glikoprotein, sem a többi ABC-transzporter expressziós szintjének változása nem haladta meg a kétszeres közöbértéket. Így felvetődik az a fontos kérdéses, hogy vajon a PARP-1-nek és a PARP inhibitoroknak az ABC transzporterek expressziós szintjére gyakorolt hatása mennyire sejttípus-függő, és melyek azok a sejttípusok, ahol ez a megfigyelés jelentőséggel bír.

Még egyszer szeretném megköszönni Dr. Sümegi Baláznak munkáját, valamint disszertációm pozitív értékelését. Kérem válaszaim elfogadását.

Budapest, 2011. november. 25.

Homolya László