

Válasz

Dr. Szalontai Balázs opponensi véleményére

Mindenekelőtt köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Szalontai Balásznak a doktori értekezésem bírálatában végzett alapos munkájáért, valamint méltató szavaiért, amivel dolgozatomat, illetve az abban bemutatott eredményeimre illette. Köszönöm továbbá a disszertációmmal kapcsolatban tett felvetéseit és kérdéseit. A stiláris kifogásokra - gondolom - nem kell reagálnom. Ezzel kapcsolatban egyet tudok megígérni, hogy a jövőben törekedni fogok arra, hogy ne kritika nélkül vegyem át a szokásos szakzsargon, hanem a használt kifejezéseket tényleges értelmükben és a szélesebb olvasóközönség számára világosabb, érthetőbb formában használjam. A konkrét kérdésekre pedig a következőket tudom válaszolni.

Kérdés: az MDR1 és MRP1 párhuzamos detektálását bemutató közleményben nem azt kellett volna mondani, hogy "...Inhibitors of MDR proteins benzobromarone (40 μ M) and verapamil (50 μ M) (hogyan lehet?), hanem azt, hogy a benzobromaron az MRP1-et, a verapamil az MDR1-et gátolja.

Válasz: sajnálatos módon egy elírás maradt a közleményben, a „ μ M” μ M-ként jelent meg. A megfogalmazás sem volt kellően világos, így ez félreértéshez vezetett. A benzobromaron valóban az MRP1-et szelektíven gátolja, a verapamil viszont mind az MRP1, mind az MDR1 esetében kompetitív módon gátolja a festéktranszportot. Csak a benzobromaron után alkalmazva a verapamilt, a két gátlóhatás különbségéből következtethetünk az MDR1 által képviselt transzportaktivitásra.

Kérdés: a calcein módszer diagnosztikai alkalmazásánál az szerepel, hogy a vizsgált betegcsoportban az MDR fenotípuson kívül csak a beteg kora bizonyult diagnosztikai jelentőségű faktornak a kemoterápiára adott válasz tekintetében. Milyen volt ez a korreláció?

Válasz: ezekben a vizsgálatokban a korábbi irodalmi adatokból már ismert eredményt sikerült megerősítenünk, miszerint az akut mieloid leukémiában szenvedő betegeknél a magasabb kor rosszabb prognózist jelent a kemoterápiára adott válasz tekintetében. Sajnálatos tény, hogy az összefüggés iránya valóban sem a disszertációban, sem a közleményben szereplő megfogalmazásból nem derül ki.

Kérdés: az ABCG2 fehérje Irresa-val való kölcsönhatásával kapcsolatosan az a kérdés merült fel, hogy vannak-e olyan rákos sejtek, amelyek mind az EGF receptort, mind az ABCG2 transzportert tartalmazzák. Hogyan viszonyulnak a transzdukcióval elérhető ABCG2 koncentrációk az ABCG2 fiziológiás koncentrációihoz?

Válasz: elvileg bármilyen hámeredetű tumornál előfordulhat, hogy az EGF receptor mutációja és/vagy over-expressziója bekövetkezik. Ezekben a rákos sejtekben akár primer módon, akár másodlagosan - pl. a kezelés hatására - expresszálódhat az ABCG2 is. A leginkább ismert tumor fajta, ahol ez a jelenség gyakran előfordul, a nem-kissejtes-tüdőkarcinóma, de a tüdőtumorok egyéb fajtáinál is leírtak hasonló eseteket. A mellrákok 16-30 %-ban találkoznak az EGF-receptor felszaporodásával, ami gyakran együtt jár az ABCG2 over-expressziójával, de ritkábban a petefészek-tumorokban is előfordul ez a jelenség. Bár meg kell jegyezni, hogy a multidrog transzporterek klinikai mintákban történő vizsgálatára nagyon kevés adat áll rendelkezésre, a jelenség leírása leginkább *in vitro* sejt kultúrákban történt.

A kérdés második felére válaszolva, természetesen akár a transzdukált sejtekben, akár az *in vitro* szelekcióval előállított ABCG2 fehérjét expresszáló sejtekben a patofiziológiás szinteknél sokkal magasabb expressziós szinteket érünk el. Viszont pont ezek a megnövekedett expressziós szinttel rendelkező modell sejtek segítenek hozzá a jelenségek megértéséhez és leírásához. A sejtmodellrendszerek kidolgozásánál újabban törekszünk arra, hogy a transzdukált sejtekben csak néhány kópiában legyen jelen a transzgen, így a fiziológiás/patofiziológiás körülményeket jobban megközelíthetjük.

A bíráló az ABCG2 és a koleszterin kölcsönhatásával kapcsolatosan részletesen kifejt egy elképzelést arra vonatkozóan, hogy a membránban elhelyezkedő transzporter hogyan idomulhat a szubsztrát molekulák, illetve a membránlipidek által meghatározott közvetlen környezethez, és esetlegesen ez húzódhat meg a transzporter szubsztrát-promiszkuitása, illetve a koleszterin stimuláló hatása háttérében. Nagyon köszönöm, hogy a bíráló vette a fáradságot, hogy mélyebben belegondoljon az általunk vizsgált problémakörbe. Feltétlenül egyet kell értenem azzal, hogy a membrántranszporterek működése csak a megfelelő lipidkörnyezetben és a fehérje-lipid kölcsönhatások figyelembevételével értelmezhető. A bíráló általa felvázolt hipotézist az a korábbi kísérleti megfigyelés is alátámasztja, hogy a szubsztrátmolekulák fokozzák a transzporter

ATPáz aktivitását. Ez tekinthető egyfajta autokatalízisnek. Kiszélesítés szerkezeti vizsgálatok - legalábbis az MDR1 esetében - a transzmembrán hélixek nagymérvű átrendeződését írták le a szubsztrátmolekulák hozzáadásának hatására. Ez is összhangban áll a bíráló által felvetett elképzeléssel, azonban a hipotézis tényleges kísérleti igazolásához és a jelenség pontosabb megértéséhez további, részletesebb és célzottabb vizsgálatokra volna szükség.

Kérdés: a 18.e ábra direkt bizonyíték-e arra, hogy az ABCG2 homodimert képez? Ha igen, milyen természetű az a dimerizáció, amit az SDS magában nem old fel. Vajon - S-S- hidak felszakítását jelenti az, hogy redukáló körülmények is kellenek a dimer szétválasztásához?

Válasz: az ABCG2 dimerizációját már korábban többen is vizsgálták. Irodalmi adatokból ismert volt, hogy az ABCG2 homodimert képez, amit egy intermolekuláris diszulfid híd fog össze, ezért nem redukáló körülmények között az SDS gélben a dimer megmarad. Az általunk végzett és az említett ábrán bemutatott kísérlet célja csupán az volt, hogy az ABCG2 GFP-vel való jelölése nem befolyásolja a transzporter dimerképzését. A homodimerizáció bizonyítása, és ebben a diszulfid híd szerepének bemutatása nem a mi érdekünk. Viszont sikeresen megmutattuk, hogy a GFP-ABCG2 a vad típusú fehérjéhez hasonlóan nem redukáló körülmények között dimer formában marad a gélben, azaz a fluoreszcens fehérjével való jelölés nem rontja el a dimerképzést.

Kérdés: az ABCG2 transzportmechanizmusát vizsgáló kísérletekben mi az oka annak, hogy a 23.b ábrán a transzportert expresszáló sejtek intracelluláris festékvételei (tr_{intra}) görbéje törést szenved 300 sec táján? Minek tulajdonítható a görbe szigmoid jellege, aminek nem látszik előjele a rövidebb időintervallumban?

Válasz: valóban az intracelluláris drogfelvételnek ez a jellemzője csak a hosszabb ideig tartó kísérletnél figyelhető meg. A jelenség oka pedig az, hogy a kezdeti fázisban a hidrofób karakterű mitoxantron elsősorban a membránkompartimentben halmozódik fel, ekkor még csak csekély mértékű és viszonylag egyenletes az intracelluláris drogfelvétel. Később, amikor a membránkompartiment telítődik a mitoxantronnal, megnő az intracelluláris drogfelhalmozódás sebessége is, ami a görbe említett törését okozza. Még később az intracelluláris tér is telítődik mitoxantronnal, majd az egész rendszer egyensúlyba jut, ez eredményezi az intracelluláris drogfelvételi görbe szigmoid jellegét.

Az említett kísérlet lényege pedig az volt, hogy meghatározzuk az egyensúlyi drogkoncentrációt a membránkompartimentben és az intracelluláris térben. Mivel ez a kettő azonosnak adódott, a kinetikai modellek alapján ez a megfigyelés is azt támasztja alá, hogy a transzporter a membránból pumpálja ki a drogszubsztrátot.

Kérdés: az ABCG1 és ABCG4 dimerizációját illetően a kapcsolódó közleményben a szerző úgy fogalmaz, hogy van mind ABCG1, mind ABCG4 homodimerizáció, a dolgozat ezt az ABCG4 fehérjére nem látja bizonyítottnak. Felmerült valamilyen újabb körülmény időközben?

Válasz: az ABCG4 homodimerizációjának kérdésében a bizonytalanságot az okozza, hogy a közlemény megjelenésekor csak egyetlen – és őszintén megvallva -, viszonylag gyenge lábakon álló kísérleti megfigyelésből lehetett arra következtetni, hogy ez a fehérje is homodimerként működik - közeli rokonaihoz (az ABCG1 és ABCG2 transzporterhez) hasonlóan. Ez a megfigyelés pedig a transzporter alap-, azaz hozzáadott szubsztrát nélküli ATPáz aktivitása volt, ami éppen hogy szignifikánsan magasabb értéket mutatott, mint a háttérérték. Azóta az ABCG4 GFP-vel jelölt és nem jelölt formájának felhasználásával, ko-immunoprecipitációval egyértelműen sikerült kimutatnunk a fehérje homodimerizációját. Sőt, legutóbbi kísérleteinkben azt is megmutattuk, hogy az ABCG4 az ABCG1-hez hasonlóan apoptózist indukál sejtekben. E jelenség felhasználásával pedig inaktív mutáns variánsok alkalmazásával, a domináns negatív hatás alapján sikerült bizonyítanunk mind az ABCG4 homodimerizációját, mind az ABCG1 transzporterrel történő heterodimerizációját. Ezek az eredmények még nem szerepelhettek a dolgozatban, közlésük jelenleg van folyamatban.

Végezetül még egyszer szeretném megköszönni Dr. Szalontai Balázsnak alapos munkáját, az egyes közleményekkel kapcsolatban részletesen kifejtett álláspontját, valamint disszertációm és eredményeim pozitív értékelését. Kérem a fenti válaszaim elfogadását.

Budapest, 2011. november. 21.

Homolya László