

Válasz

Dr. Szöllősi János opponensi véleményére

Mindenekelőtt szeretném megköszönni Dr. Szöllősi Jánosnak, hogy elvégezte disszertációm bírálatát, és hogy felhívta a figyelmemet a dolgozatban lévő hibákra. Köszönöm a munka pozitív értékelését, valamint kérdéseit, amelyek előremutatóak, így sokszor segítenek a felvetett problémák továbbgondolásában.

A metodikai rész rövidegével kapcsolatban adott kritikai megjegyzést elfogadom. A disszertáció módszertani részének megírásakor az az elv vezérelt, hogy a dolgozat célja nem a kísérletek reprodukálása, ezért választottam a vázlatos formát. Valóban jó lett volna hivatkozásokat megadni a cikkekben szereplő részletesebb metodikai leírásokra. A bíráló felhívta a figyelmemet egy elírásra is: a propidium-jodid koncentrációja valójában 25 µg/ml volt.

Kérdés: minden sejtfelszíni jelölés esetén 1% PFA-val fixálták a sejteket? Élő sejtek immunfluoreszcens jelzését soha nem próbálták?

Válasz: a kérdéses kísérletsorozatban csak fixált sejteket festettünk, mivel mindenképpen el akartuk kerülni, hogy a fehérje esetleges internalizációja befolyásolja mérési eredményeinket. Más kísérleti összeállításban ugyan előfordult, hogy élő sejteket festettünk, de ez volt a ritkaság, mivel a legtöbb ABC fehérjét felismerő ellenanyag belső epitópot ismer fel, a sejtfelszínen használható, konformáció-szenzitív ellenanyagok jelölését pedig gyakran befolyásolják a fixálási körülmények.

Kérdés: meg lehet-e állapítani, hogy az MRP1 pumpa-aktivitása milyen arányban oszlik meg a calcein acetoxi-metilészter és szabad sav formák között? Az MRP1-et gátló anyagok esetén változik-e ez az arány? Vannak-e szelektív inhibitorok?

Válasz: kísérleti rendszerünkben, az adott mérési körülmények között gyakorlatilag csak az észter forma transzportját mérjük, ugyanis nagyságrendi különbség van a két transzportfolyamat kinetikája között. Míg az észter eltávolítása percekben mérhető, addig a szabad sav órákban. Ráadásul a sejtek festékekkel való feltöltésének kezdetén az intracelluláris, szabad sav formájú festék koncentrációja alacsony, emiatt az efflux is csekély. Számos tanulmány méri a szabad sav formájú calcein kiáramlását a

sejtekből, de ekkor a sejteket előre feltöltik a festékkel, vagy polarizált sejteket használva vektoriális (MRP1 esetében apikálisból bazolaterális irányba történő) transzportot mérnek.

Kérdés: az MDR pozitív és negatív betegek túlélési görbáját összehasonlítva szignifikáns-e a különbség? Használják-e ezt a tesztet rutinszerűen a klinikai gyakorlatban? Hogyan lehetne növelni a teszt predikciós erejét?

Válasz: a bíráló a kérdés első felében ismételten egy elírásra hívta fel a figyelmemet. Szignifikáns különbséget nem a túlélési görbénél találtunk, hanem a terápiás kezelésre adott válasz vonatkozásában. Valóban ez a disszertációban hibásan szerepel. Sajnos a módszer - a kezdeti lelkesedés ellenére sem terjedt el a klinikai gyakorlatban, aminek legfőbb oka az, hogy a teszthez élő sejtek, sőt jó állapotban lévő élő sejtek kellene. Így a minták nem eltárolhatóak, a tesztet a mintavételt követő rövid időn belül kell elvégezni. Ez a tény korlátozta a módszer klinikumban való széleskörű elterjedését, a kutatásban azonban a mai napig nagyon gyakran alkalmazott módszer az MDR fehérjék funkcionális detektálására és működésük vizsgálatára. Azt is érdemes megjegyezni, hogy Franciaországban egy ideig rutinszerűen használták a calceines MDR meghatározást leukémiás betegeknek. Készült is két tanulmány az ottani vizsgálatok alapján, ami a mienkhez hasonló eredménnyel zárult. A módszer predikciós erejét többféleképpen lehet növelni. Egyrészt nagyobb betegcsoporton végzett, többcentrumos standardizált vizsgálattal, a nem specifikus tényezők szigorúbb kiszűrésével, illetve a betegek (pl. kor, nem, AML altípusok szerinti) alcsoportokra való bontásával.

Kérdés: milyen kölcsönhatás képzelhető el a koleszterin és az ABCG2 transzporter között? A koleszterin gazdag lipid tutajokban lokalizálódik-e az ABCG2? Változik-e ez a lokalizáció a koleszterin túltöltés és elvonás hatására?

Válasz: az ABCG2 koleszterinnel való kölcsönhatásának mechanizmusa a mai napig nem tisztázott. Az MRP1 esetében a redukált glutation (GSH) számos vegyület transzportját fokozza. Kimutatták, hogy ezekben az esetekben a transzportált vegyülettel együtt GSH-t is pumpál az MRP1. Ennek analógiájára elképzelhető, hogy a koleszterin ABCG2-re gyakorolt stimuláló hatása háttérében is ko-transzport húzódik meg, ennek a hipotézisnek az igazolása azonban várat még magára. Mivel az ABCG2 szekvenciája számos feltételezett szterol-kötő motívumot is tartalmaz, az is lehetséges, hogy a koleszterin egyszerűen allosztérikus aktivátor. Sőt, az is elképzelhető, hogy a koleszterin

csak közvetetten, a megfelelő lipidkörnyezet biztosítása által segíti elő a transzporter működését. Ez a feltevés átvezet a kérdés második feléhez, hogy a lipid tutajokban lokalizálódik-e a transzporter. A GFP-vel címkézett ABCG2-t expresszáló MDCK sejtekben konfokális mikroszkópiával látjuk a fehérje szigetszerű elhelyezkedését. 2007-ben megjelent egy közlemény (Storch és mtsai, J. Pharmacol. Exp. Ther. 2007.), amiben arról számolnak be, hogy az ABCG2 detergens rezisztens membrán frakcióban lokalizálódik a caveolin-1 fehérjével együtt, és hogy erőteljes koleszterin-depléció hatására a két fehérje kölcsönhatása megszűnik. A kísérleteinkben alkalmazott enyhe koleszterin-eltávolítás, illetve a túltöltés érzékelhető módon nem befolyásolta a transzporter plazmamembrán lokalizációját, azonban vizsgálataink nem terjedtek ki a lipid tutajok méretének és összetételének vizsgálatára.

Kérdés: milyen sikertelen próbálkozások voltak az ABCG2 fluoreszcens fehérjével történő megjelölésére?

Válasz: két kritikus pont volt az ABCG2 címkézésében, amint az sikertelen próbálkozásainkból kiderült. Egyrészt a GFP N-terminális elhelyezkedése, másrészt a GFP és az ABCG2 közötti linker megfelelő hossza. Az ABCG2 C-terminális címkézése, illetve rövidebb linker alkalmazása esetén a fehérje nem processzáldott emlőssejtekben, és nem jutott ki a plazmamembránba. Ezeket a változatokat rovarsejtes heterológ expressziós rendszerben kifejezve nem kaptunk működőképes fehérjét, azaz sem ATPáz-, sem transzportaktivitást nem mutattak ezek a variánsok.

Kérdés: az ABCG2 fehérje transzportmechanizmusával kapcsolatosan végeztünk-e kevésbé hidrofób szubsztátokra vonatkozó vizsgálatokat, mint a mitoxantron? Ha nem, található-e az irodalomban ilyen jellegű átfogó kísérleti adat?

Válasz: bár az ABCG2 szubsztátjai között nagyon sok hidrofób karakterű anyag szerepel, az irodalomból ismeretes, hogy vannak kevésbé hidrofób szubsztátjai is (pl. topotecan, húgysav). Természetesen meg akartuk vizsgálni az általunk kidolgozott módszer segítségével, hogy vajon ezekben az esetekben hasonló transzportmechanizmust találunk-e, azaz hogy a transzporter ekkor is közvetlenül a membránból pumpálja-e a transzportált anyagot. Különösképpen érdekessé tette ezt a kérdést az a tény, hogy korábban az MRP1 esetében többféle transzportmechanizmust írtak le a különböző szubsztátmolekulákra. Sajnos azonban azzal kellett szembesülnünk, hogy módszerünk

lényegénél fogva csak hidrofób anyagok vizsgálatára alkalmas, hiszen annak alapja, hogy a szubsztrátmolekula dúsuljon fel a plazmamembránban, így kevésbé hidrofób szubsztrátokra vonatkozóan nem tudunk ilyen jellegű vizsgálatokat végezni. Az utóbbi időben nem közöltek az ABCG2 transzportmechanizmusára vonatkozó átfogó kísérleti elemzést, azonban egy nemrégiben tett megfigyelés, miszerint az ABCG2 transzmembrán doménjében bizonyos prolinok mutációja szelektíven képes befolyásolni a kevésbé hidrofób BODIPY-prazozin transzportját, míg a mitoxantronét nem változtatja meg (Ni Z. és mtsai., Biochemistry 2011.), ez megerősítheti azt a feltételezést, hogy a hidrofób és kevésbé hidrofób molekulákat más transzportmechanizmussal szállítja az ABCG2.

Kérdés: végeztek-e arra vonatkozó kísérleteket, hogy az ABCG1 és ABCG4 féltranszporterek dimerizációját hogyan befolyásolja a membrán koleszterinszintje. Ha nem, milyen irodalmi adatok állnak rendelkezésre?

Válasz: az irodalomból jelenleg nem ismeretes, és mi sem végeztünk arra vonatkozó kísérletet, hogy a membrán koleszterin tartalma befolyásolja-e az ABCG1 illetve az ABCG4 dimerizációját. Érdekes azonban ez a felvetés, különösen annak tükrében, hogy még nem publikált eredményeinkből tudjuk, hogy a membrán koleszterinszintjének emelése az ABCG1 működését, pontosabban ATPáz aktivitását fokozza. A többi, ABCG2-vel kapcsolatosan említett mechanizmuson túl az sem kizárható, hogy a koleszterin a dimerképződést segíti elő. Ennek a hipotézisnek az ellenőrzésére esetleg ko-immunoprecipitációs, illetve FRET kísérletek adhatnának választ. Meg kell azonban említenem, hogy az ABCG1 illetve ABCG4 fehérjék fluoreszcens fehérjével (CFP-vel ill. YFP-vel) történő jelölése - az ABCG2-vel ellentétben - eddig nem járt kellő sikerrel.

Kérdés: vannak-e újabb eredmények, amelyek felderítették az ABCG1 által kiváltott apoptózis mechanizmusát.

Válasz: többféle feltételezést ellenőriztünk a megjelent közlemény publikálást követően, hogy választ kaphassunk az ABCG1 által kiváltott apoptózis mechanizmusára. Próbáltuk igazolni, hogy esetleg egy apoptózis indukáló szignál molekula kipumpálása révén, autokrin/parakrin mechanizmussal fejti ki hatását az ABCG1. Ezt a hipotézist kísérletileg sem cáfolni, sem megerősíteni nem sikerült. A makrofágok apoptózis mechanizmusából kiindulva vizsgáltuk azt is, hogy az ABCG1 működése esetleg oxidatív

stresszt és/vagy endoplazmás retikulum stresszt okoz a sejtekben. Kísérleteinkből azonban erre a kérdésre sem kaptunk kielégítő választ. A funkcióképes ABCG1 expressziója csak kismértékű oxidatív stresszhez vezetett, ER stresszt nem sikerült detektálnunk. Kizárhatjuk azonban azt a lehetőséget, hogy ATP depléción áll a jelenség hátterében, hiszen a sokkal aktívabb ABCG2 expressziója nem okoz apoptózist a vizsgált sejtekben. Így az ABCG1 által kiváltott apoptózis mechanizmusa továbbra is nyitott kérdés marad.

Kérdés: van-e jelentős különbség az eredeti ABCA1 fehérje és a hemagglutinint (HA epitópot) tartalmazó fehérje funkciója között? Milyen koleszterin-anyagcserét befolyásoló gyógyszer tesztelését tervezik a közeljövőben az így létrehozott modell rendszerben?

Válasz: az ABCA1 fontos szerepet játszik a sejtek és a szervezet koleszterin háztartásában, feladata az ApoAI koleszterinnel való feltöltése. Közleményünkben természetesen megvizsgáltuk, hogy a transzporter epitóppal való jelölése hatással van-e a funkcióra. Egyrészt mértük a nem-címkézett és HA-val jelölt ABCA1 apoAI kötését, és néhány apoAI kötést befolyásoló anyag hatását, valamint meghatároztuk az ApoAI-függő koleszterin kiáramlást két különféle sejttypusban is. Azt találtuk, hogy sem az apoAI kötését, sem a koleszterin kiáramlást nem befolyásolja az epitóp jelölés. Az ABCA1 sejt felszíni expressziójának követésére alkalmas tesztrendszer létrehozása, validálása után jó néhány koleszterinszintet befolyásoló anyag hatását vizsgáltuk. Érdekes, nem várt hatást tapasztaltunk az Ezetimib esetében, de további gyógyszer-molekulákat azóta nem teszteltünk és - a laboratórium kapacitásait figyelembe véve - egyelőre nem is tervezzük. Pedig érdekes volna az újabb fejlesztésű koleszterinszint-csökkentő gyógyszerek, valamint a különböző, gyakorlatban is alkalmazott gyógyszer-kombinációk hatását is megvizsgálni.

Még egyszer szeretném megköszönni Dr. Szöllősi Jánosnak a munkáját, pozitív értékelését, valamint kérem válaszaim elfogadását.

Budapest, 2011. november. 15.

Homolya László