

Válasz Prof. Fekete Csaba bírálataira

Dr. Ábrahám István „Az ösztrogén nem-klasszikus hatásainak mechanizmusa és szerepe a központi idegrendszerben” című MTA Doktori pályamű

Tisztelt Professzor Úr!

Nagyon köszönöm az építő jellegű kritikai megjegyzéseit és támogatását. Kérem, engedje meg, hogy ezekre reagálva további megállapításokat is tegyek.

- A genisteinnel kapcsolatos eredményeket nem csupán a saját vizsgálataink miatt tartjuk fontosnak, hanem a korábbi rágcsálókban elvégzett kísérletek miatt is, amelyek egyértelműen megmutatták azokat a felnőttkori neuromorfológiai, szaporodási és szexuális motivációs eltéréseket, melyeket a genistein neonatális expozíciója okozott. Nyilvánvalóan ezeket az állatkísérleteket humán vizsgálatokkal lehetne validálni, így a klinikum számára elérhetővé tenni.
- A BEK sejteknél a TTX vizsgálatok arra utaltak, hogy az ösztradiol közvetlenül hat a jelátvivő rendszerekre, de nem kizárható a nem akciós potenciál függő GABA ürülés hatása sem, melyet már vizsgálni kezdtünk.
- Az „neuroprotektív” jelző az ösztradiol használat időzítésével hozható összefüggésbe. Mivel az NMDA injekció beadását követő relatíve rövid időn belül alkalmaztuk az ösztradiolt (1 óra), ezért elképzelhető, hogy az NMDA tényleges sejtpusztító hatása előtt már az ösztradiol elérte a BEK neuronokat. Így ez az alkalmazás inkább protekciónak tekinthető, mint kezelésnek. Ebből kiindulva és annak ellenére, hogy a sejtek pusztulását az ösztrogén nem befolyásolta, a megmaradt sejtek védelmi rendszerét aktiválva a kéregben visszaállították az eredeti kolinerg rostdenzitást és így az ösztradiol hatás is neuroprotektívnek minősülhet.
- A pCREB „expresszió” használata egy rossz „beidegződés” eredményeként jött létre, ami az angolszász „expression”-ből ered lévén, hogy a pCREB-et immunhisztokémiával mutattuk ki, ami a protein expresszió vizsgálatára alkalmas eljárás.

A felvetett kérdéseire az alábbiakban válaszolok.

1. A transzporterek létjogosultsága az ösztradiol intracelluláris szintjének hatékony szabályozásában nélkülözhetetlen. Sajnos idáig igen keveset foglalkoztak ezzel a nyilvánvalóan nem elhanyagolható rendszerrel. Korábban in vitro kísérletek megmutatták, hogy az „ATP-binding cassette” (ABC) transzporterek közül az ABC2 szabalyozza az intracelluláris szteroid, így valószínűleg az ösztradiol koncentrációt is az idegsejtekben és a makrofágokban (Mack és mtsai., Current Drug Metabolism, 2007, 8:47-57). Érdekes, hogy az ABC2 génjében bekövetkező mutációt összefüggésbe hozták az Alzheimer kór kialakulásával is. Az ABC2 az ösztradiol gyors hatásában betöltött szerepének in vitro tanulmányozását mi is nem rég kezdtük el.

2. Az egymolekula detekciós mikroszkópiában az általunk használt Qdot-antitest-receptor „szendvics” komplex méret nem haladja meg a 30 nm-t. A sejt felszínén lévő adhéziós molekulák rögzítik a sejteket a tárgylemezhez, és ezek a méréseink szerint elegendő helyet biztosítanak a Qdokkal jelölt komplexeknek a diffúzióhoz a neuron membránjában a fedőlemez és a sejt között. Megjegyzendő, hogy ez a méret elegendő, ahhoz is, hogy pl. az AMPA receptor molekula szinaptikus résben való diffúzióját is láthatóvá tegyék Qdot-al (Groc és mtsai., 2007, J Neurosci., 2007, 27:12433-12437).
3. Az általunk használt TIRF mikroszkóp jelenleg a világ egyik legsokoldalúbb TIRF mikroszkópja, egy új generációs „zerus drift” kompenzációs mechanizmussal, ami egy ún. hybrid vázon helyezkedik el, amelynek az inverz részén található a TIRF rendszer és az „upright” felében egy egysejt elektrofiziológiai mérésekre alkalmas berendezés. Ez utóbbi lehetővé teszi a szimultán egymolekula detekciós és mikroelektrofiziológiai méréseket ugyanazon sejten. Továbbá a mikroszkóp felső része alkalmas egy „spinning disk” befogadására is, mellyel elérhető, hogy a TIRF elektromágneses mezején kívülre került egyedi molekula útvonala tovább követhető legyen a sejtmagig.
4. A CREB foszforilációjának ösztradiol adása utáni vizsgálata más eredményeket adott az MS-ben és az AHA-ban 8 évvel később végzett kísérletekben, melyet valószínűleg a Cell Signaling által gyártott pCREB antitest különbözőségére vezethetünk vissza. Megjegyzendő azonban, hogy mind az AHA-ban mind pedig a MS-ben a GnRH neuronszám nagyon alacsony, mely befolyásolhatja az ezen a területeken mérhető eltéréseket.
5. Tudomásom szerint nincs adat arra, hogy a gonadektómia hogyan befolyásolja a hím GnRH neuronok CREB foszforilációját. Mivel a gonadektómia a GnRH neuronokat „szabadon futóvá” teszi mind hímeiben mind nőstényekben, ezért korábban azt valószínűsítették, hogy nincs nemi különbség a GnRH neuronok között gonadektómia után. Ezt a feltevést erősíti az, hogy gonadektómia hasonló LH emelkedést indukál hímeiben és nőstényekben. Azonban a szexuális dimorfizmust mutató gonadektómia indukált CREB foszforilációs szint arra utal, hogy ezen neuronok működése mégsem teljesen egyforma gonadektómiát követően hímben és nőstényben. Ennek a különbségnek egyik lényeges eleme lehet a tesztoszteron reguláció és az agyi aromataz enzim rendszer működése hím állatokban, mely a nőstényekétől különböző GnRH neuron közeli ösztrogén koncentrációs profilt hoz létre. Elképzelhető az is, hogy a nem klasszikus ösztradiol hatásokban fontos szerepet játszó ERK1/2 koincidencia detektor és a hozzá kapcsolódó CREB-et aktiváló jelátviteli útvonal hálózat működése nemi különbséget mutat a GnRH neuronban. Ezen teóriák vizsgálata további kísérleteket igényel.
6. A CREB transzkripciós faktorként irányítja a GnRH neuronok működését, azáltal pl. hogy részt vesz antiapoptotikus molekulákat (pl. Bcl2), receptor fehérjéket (pl. GPR54) és neuropeptideket (pl. galanin, NPY) kódoló gének átírásának szabályozásában. Elképzelhető, hogy ennek a szabályozási folyamatnak a megváltozása, kimerülése hatást gyakorolhat a GnRH neuronok életképességére és funkcióira, valamint szerepet játszhat a GnRH neuronok öregedésében, ahhoz hasonló módon, amit a GnRH-CREB KO kísérleteinkben láthattunk. Fontos megemlíteni,

hogy a CREB egy, a sok transzkripciós faktor közül, mely részt vesz a GnRH neuron funkcióinak szabályozásában és ezen transzkripciós faktoroknak az interakciója alakítja ki azt a gén átírási mintázatot, amely a GnRH neuronok működésében is fontos lehet.

Végül szeretném megköszönni a Professor Úrnak a bírálat megírásába fektetett munkáját és kérem, fogadja el a kérdéseire adott válaszaimat.



Ábrahám István

Pécs, 2013. szeptember 18.