

Válasz Dr Szabó Gábor egyetemi tanár bírálatára

Válaszomban a bírálatból idézett szöveget dőlt betűvel jelöltem. A dolgozatomból idézett szöveget idézőjelek közé tettem.

Köszönöm, Szabó professzornak hogy értekezésemet nagy alaposággal átnézte, Kérdései eddigi eredményeink továbbgondolásához vezettek, ami mindenképpen tanulsággal járt.

Válaszaimat feltüntettem a bírálatban megjelölt hibát / feltett kérdést.

Válaszok a hibákkal kapcsolatos megjegyzésekre:

A 13. táblázat tartalma, a kísérő szöveg és az ábraszöveg nem teljesen fedi egymást.

Valóban. Az ábraaláírás pontatlan: az egér Abcb11 esetében a VT gátlásban TCDC volt a szubsztrát, ahogy az –helyesen- a releváns közleményünkben is szerepel (Kis és mtsai 2009 J Biomol Screening 14:10, 1. táblázat)

A 14. táblázat az eredeti közlemény nélkül nem érthető.

Valóban, az ábraaláírásból kimaradt az N és Y rövidítések jelentése.

A 12-es ábra (felcserélt paneljeinek egyike) két görbét mutat, „aktivitás” és „gátlás” felirattal megkülönböztetve – a két görbe jelentését illetően a Szerző magára hagyja az olvasót.

Ismét helyt kell adnom a kritikai észrevételnek hiszen a két ábra rosszul lett asszignálva. Továbbá, bár a metodikai fejezet leírja az ABCG2 ATPáz esszét (55. old, 56. old 6. táblázat), az olvasó dolgát megkönnyítette volna, egy részletesebb ábraaláírás.

A 19-es ábra betét ábrája tengely feliratai nem olvashatók nagyítóval sem.

Valóban a kifogásolt ábra a két szubsztrát (LTC4, CDCF) transzportra elkészített Hill ábrázolás, ami mindkét szubsztrátra 1-hez közeli meredekségű görbét adott.

Az 5. ábrán a transzportereket kétféle színű kör szimbolizálja – pl. a BBB P-gp piros, a BCRP kék. Nem derül ki, hogy ennek van-e, ill. mi a jelentősége.

Az ábra az ITC (International Transporter Consortium) úgynevezett „white paper”-éből lett kimásolva, ahogy az hivatkozva van (Giacomini és mtsai 2010 Nat Rev Drug Discov 9:215). A pirossal jelöltek a tesztelésre ajánlott transzporterek. Az ábrába a P-gp (ABCB1) illetve a BCRP (ABCG2) mindenütt piros körrel lett szimbolizálva, mivel mindkét transzporter szerepel a tesztelésre ajánlott transzporterek listáján.

A 9. ábrával kapcsolatban említi, hogy a koleszterin potenciózás mind az ATPáz esszéiben, mind a vezikuláris transzportban megfigyelhető és a két aktivitás koleszterin függése korrelál. Az ábra a szubsztrátként vizsgált öszttron-származék transzportját (A,B) és vanadát-szenzitív ATPáz aktivitását (C,D) mutatja, koleszterin-modulálás mellett és anélkül. A lineáris

(A,B) és logaritmikus (C,D) ábrázolás különbsége okozhatja, hogy ez a korreláció az ábrán nem szembeötlő.

Ez az ábra csak kvalitatíven mutatja a korrelációt, azaz a magas koleszterin tartalmú membránok (feltöltött MXR-Sf9 és natív MXR-M) az ATPáz és a VT esszéekben is nagyobb aktivitást mutattak, mint az alacsony koleszterin tartalmú membránok (natív MXR-Sf9 és depletált MXR-M). Tehát a kijelentés csak az aktivitásra, és nem a potenciára vonatkozik. Egy kvantitatívabb összefüggést is prezentáltunk a releváns cikkünkben az MXR-Sf9 rendszerre (Pál és mtsai 2007 J Pharmacol Exp Therap 321:1085, 8. ábra). Itt azt találtuk, hogy egy bizonyos membrán koleszterin tartományban az ATPáz és a VT aktivitás is lineárisan függött a koleszterin tartalomtól, bár a görbék meredeksége valamelyest különbözött. Ezek a vizsgálatok is csak az aktivitásra vonatkoztak (egy koncentracional néztük) ösztrol-3 szulfátot (VT) és szulfaszalazint (ATPáz) használva szubsztrátként. Mivel a korreláció az ATPáz esszé fontosságát validáló megfigyelés volt, ezt az ábrát szerepeltetnem kellett volna a disszertációmban.

További kritikai megjegyzés: az idézett állítások, adatok nem minden indokolt esetben támaszkodnak irodalmi hivatkozásokra, a nagyszámú, kb. 300 idézett referencia dacára.

A disszertáció egy sok kísérleti munkát fed le, és egy meglehetősen szerteágazó területet. Úgy a prezentálásra kerülő adatok mind a referenciák vonatkozásában korlátozó döntéseket kellett hoznom, hogy a rendelkezésemre álló információk szerint szokásosnak tekinthető mérettartományban maradjak a disszertációmmal. A döntések nem mindig sikerültek optimálisan.

Válasz a kérdésekre:

Ciklodesztrineket használtak koleszterin kivonására ill. bevitelére. Az eljárás pontos paramétereit a metodikai fejezetben leírva nem találtam. Már néhány mM-os cc.-nál lényeges lehet ezen kezelések toxicitása. Pl. a 10-es ábra hatásai esetében mérlegelendő ez a lehetőség. Továbbá: volt-e mérési tapasztalat a koleszterin feltöltés hatásosságára vonatkozóan?

A membránok koleszterinnel való feltöltése és az emlős sejtekből preparált membránokból való koleszterin kivonásnak a leírása valóban nem szerepel a disszertáció metodikai fejezetében. Elsősorban azért, mert az eredményeket sem mutatom be. A dolgozatban követem a publikációs stratégiánkat, miszerint a második publikációval kezdődően a membránokat a Solvo Biotechnológiai Zrt-től megvásárolható kész reagensként prezentáljuk.

A koleszterin töltés illetve extrakció sejteken és membránokon is elvégezhető. A kezelések rövideksége miatt a toxicitás elsősorban a membrán integritás elvesztéseként jelenik meg, amit sokan a membrán fehérjéknek a pufferben való megjelenésével jellemeznek (Yunomae 2003 FEBS Lett 536:225). Ezeket a vizsgálatokat mi is elvégeztük, és nem találtunk western blottal jelentős transzporter rilízt. Más csoportok propidium jodid festéssel kapott adatai nem árulkodnak a membrán integritás drámai elvesztéséről, de mutatnak sejtvonal

függést (Telbisz és mtsai 2007 Biochem Biophys Acta 1768:2698; Fenyvesi és mtsai Eur J Pharm Sci 34:236). A tizes ábrában humán, patkány és egér ABCB11 / Abcb11-et expresszáltunk Sf9 illetve koleszterinnel töltött Sf9 membránokban. A releváns közleményünkben publikált adatok szerint (Kis és mtsai 2009 Drug Metab Disp, 1. ábra) a koleszterin töltés egyedül a patkány Abcb11 membránban okozott western blottal detektálható csökkenést a transzporter expresszióban. Az adatok kiértékelésénél ezt azonban korrekcióba vettük.

A koleszterin feltöltés és extrakció időfüggését és koncentrációfüggését meghatároztuk (Pál és mtsai 2007 J Pharmacol Expt Therap 321:1085, 3. ábra). A feltöltési paramétereket úgy határoztuk meg, hogy azok gyártásra alkalmas eljárást eredményezzenek, és a membrán koleszterin fiziológiásan is releváns tartományban legyen. A feltöltés végén MCF7 sejtek átlagos membrán koleszterintartalmának megközelítően kétszeres koleszterintartalmú membránt kaptunk, ami nagyjából megfelel a detergens rezisztens koleszterin gazdag membránfrakciók koleszterintartalmának (Knorr és mtsai 2009 J Cell Sci 122:1584), illetve közelít ahhoz (Carrasco és mtsai 2010 Br J Pharmacol 160:355). Azt nem vizsgáltuk, hogy a ciklodextrin molekulákba csomagolt koleszterin mekkora hányada transzferálódott a membránba/sejtekbe.

A 11. táblázat adatai szerinti differenciák a vizsgált három faj ABCB11 transzporterének alap K_m és v_{max}/K_m értékeiben mutatnak-e korrelációt a vizsgált sejtjeinek membránja koleszterin tartalmával? Ugyanebben a táblázatban a humán ABCB11 glikokenodeoxikolát szubsztrátra kapott K_m értéke a koleszterin dús membrán környezetben 1.7-ről 4.3 μM -ra nő, míg v_{max}/K_m értéke ugyanekkor egyáltalán nem változik. Ez mintha ellentmondana azzal a megállapítással, hogy a K_m értékekhez képest a v_{max}/K_m értékek mutatnak összefüggést a koleszterin hatással. Továbbá: ha utóbbi megállapítás a kivételek dacára a trend, ez a trend vajon milyen mechanizmusra - a koleszterin milyen szubsztrátkötési K_m -től független hatására - vezethető vissza?

Az intrinszik klírensz, a V_{max}/K_m hányadosa, fontos ADME/farmakokinetika paraméter, a katalitikus hatékonyság jellemzésére is használják. A glikokenodeoxikolát (GCDC) szubsztrát esetében –szemben a többi vizsgált szubsztráttal- a K_m értékek koleszterin feltöltés hatására történő, a V_{max} -al párhuzamos emelkedését és ennek következtében az intrinszik klírensz változatlanóságát a dolgozat alapjául szolgáló közlemény (Kis és mtsai 2009 Drug Metab Disp 37:1878) 1884. oldalán említettük, mint kivételt. Felületesség illetve az a tény, hogy ABCG2-re is a K_m érték változatlanúsága mellett a V_{max} értékek, következésképp az intrinszik klírensz membrán koleszterin tartalom növelés hatására történő emelkedését állapítottuk meg (Pál és mtsai 2007 JPET 321:1085) hozzájárulhatott a hibához. Mindenesetre, ABCB11 mediált taurokolát (TC) transzportra a következtetést (változatlan K_m és emelkedett V_{max}) Guyot és mtsai (2014 Mol Pharmacol 85:909) egy egészen a közelmúltban közölt cikkükben megerősítették. A GCDC-re általunk megfigyelt adat ugyanakkor helytálló, hiszen mindhárom fajból származó transzporter esetében megfigyeltük.

A koleszterinnek az ABC transzporterek kinetikájára kifejtett hatását több transzporterre is vizsgálták. Az intrinszik klírensz a legtöbb vizsgált esetben emelkedik koleszterin feltöltés hatására, az individuális paraméterek (K_m , V_{max}) azonban különbözőképpen, egymástól függetlenül változnak/változhatnak. Egy tanulmány szerint a proteoliposzómában mért ABCB1 ATPáz K_m értékek az 500-as molekulatömeg alatti tartományban csökkentek a V_{max} értékek változatlansága mellett, míg a 800-as molekulatömeg fölötti tartományban a K_m változatlan maradt (Kimura és mtsai 2007 Biochem J 401:597). Az elmélet, a koleszterin fill-in modell szerint kis szubsztrátok esetén a koleszterin a szubsztrátkötő régióhoz kötődve alloszterikus aktivátorként segíti a szubsztrát bekötését míg nagy móltömegű szubsztrátok esetén nem figyelhető meg ilyen hatás (Kimura és mtsai 2007 Cancer Sci 98:1303). Ezt a megfigyelést, sokszor ugyanazokra a szubsztrátokra és aktivátorokra más tanulmányok ugyanazon (Rothnie és mtsai 2001 Eur Biophys J 30:430) vagy más módszert használva (Eckford és mtsai 2008 Biochemistry 47:13686) nem mindenben támasztották alá. Az ABCC2 és az ABCB11 transzport kinetikájának koleszterin függését vizsgálva azt találták, hogy a V_{max} és az intrinszik klírensz értékek mindkét transzporter esetében emelkedtek (Guyot és mtsai 2014 Mol Pharmacol 85:909). Míg azonban az ABCC2 esetében a K_m értékek a molekulatömegtől függetlenül csökkentek a koleszterin feltöltés hatására, addig az ABCB11 esetén ez nem volt megfigyelhető. A szerzők megfigyeléseiket azzal magyarázták, hogy a széles szubsztrátspecifitást mutató ABCC2 kooperatív kinetikát mutató transzporter, míg az ABCB11 nem.

Összefoglalva, nincs olyan szabály, amely egyértelműen érvényes lenne minden transzporterre. Ugyanakkor, a GCDC-re általunk megfigyelt szimultán K_m és V_{max} növekedés sajátosságos. A K_m növekedést magyarázhatja a koleszterin gátló hatása a GCDC membránba történő inzerciója és / vagy a kötőhelyre való kötődés szintjén. Míg a V_{max} növekedése lehet a koleszterin transzporter aktivitáson kifejtett potenciórozó hatásának következménye. ABCB1 esetében van példa arra, hogy koleszterin töltés stimulálja a transzporter asszociációját koleszterin gazdag mikrodoménekhez (Fenyvesi és mtsai 2008 Eur J Pharm Sci 34:236). Ami jelentheti „aktiváló” fehérje – fehérje kölcsönhatások kialakítását, ezzel a transzport sebesség esetleg K_m -től független növekedését. Az ABCB11 is lokalizálódik a caveolin-1 fehérjével, valamint májspecifikus túlexpressziója a caveolin-1 fehérjének a biliáris epeső kiválasztás mintegy 40%-os emelkedésével járt az ABCB11 expressziójának megváltozása nélkül (Moreno 2013 Hepatology 38:1477).

Ami a közvetlen koleszterin – transzporter kölcsönhatást illeti, feltételezhető, hogy a transzporterek érzékelik a koleszterin jelenlétét. Közvetlen koleszterin kötést mutató megbízható adatokat nem találtam. Telbisz és munkatársai ugyanakkor mutagenézissel két olyan régiót is azonosítottak az ABCG2 fehérjén, amelyek koleszterin szenzorként funkcionálnak (Telbisz és mtsai 2014 Drug Metab Dispos 42:575).

Összefoglalva, a koleszterin feltehetően a transzporter fehérje modulátoraként növeli a transzporter az intrinszik klírensz értékét, ami a katalitikus hatékonyság

jellemzője. Mindez jelzi a fiziológiához közelebb álló lipid környezet fontosságát.

A calcein-AM intravezikuláris retenciója – melynek mechanizmusát máig nem tisztázottként jellemzi - nem magyarázható-e egyszerűen az acetoximetilészter hidrofobicitásával? Ugyanitt: a szacharózos kezelésnek mi a szerepe ezekben a kísérletekben?

A vezikuláris retenció mechanizmusa a calcein-AM vezikuláris transzport esszéiben máig nem tisztázott. Az intravezikuláris calcein-AM felhalmozódása ellen az szól, hogy a reakció leállítása után az anyag nem folyik ki a vezikulából (Szerémy és mtsai 2011 J Biomol Screening, 16:112, 2D ábra). A calcein-AM membránban való felhalmozódásának éppen a szacharózos kísérlet mond ellent, tudniillik a felvétel ozmolaritásra érzékeny (növekvő ozmolaritás mellett a vezikulák zsugorodnak), jelezve, hogy transzportról és nem csak kötődésről van szó (Wilson és mtsai 1990 J Anim Sci 68:583).

A seliciclib CDK gátlószer 20. ábrán mutatott citotoxicitása nem látszik függeni a vizsgált sejtek MDR1 státuszától – a transzport adatokkal szemben. A dolgozatban is hangsúlyozott észlelet magyarázatára a diszkusszióban felvetett alternatíva mellett a vegyület esetleges apoptogén (mellék) hatása felmerül-e? Erre a lehetőségre vonatkozó mérvadónak látszó irodalmat is találtam (pl.: Josefsberg Ben-Yehoshua et al., Characterization of cyclin E expression in multiple myeloma and its functional role in seliciclib-induced apoptotic cell death. PLoS One. 2012;7(4):e33856).

A seliciclib profilja –ABCB1 függő vektoriális transzport, és a transzporter-függő rezisztencia hiánya- látszólag ellentmondásos. Valóságos jelenség nemcsak azért, mert három sejtvonalon is ezt kaptuk, hanem azért is, mert egy másik forrásból származó MDCKII-MDR1/MDCKII pároson szintén ezt mérték (Cihalova és mtsai 2013 Plos ONE 8:e83467). Ráadásul egy további CDK inhibitor az ABCB1 ATPáz aktivátor olomoucine II ugyanezt a profilt mutatta (Cihalova és mtsai 2013 Plos ONE 8:e83467). Hozzá kell tennem, - ahogyan a dolgozatban jeleztem- sem mi, sem a másik csoport nem vizsgálta a sejt-asszociált seliciclib mennyiségét. Azonban feltételezhető, hogy az ABCB1 fehérjét túlexpresszáló sejtekben ez alacsonyabb, mint a kontrollokban.

A vegyület (seliciclib) valóban apoptogén. Ugyanakkor az MDCKII-MDR1 sejtvonal rezisztenciát mutatott más apoptogén kemoterápiás szerekekkel szemben (Rajnai és mtsai 2010 Drug Metab Dispos 38:2000 4. ábra). A seliciclib apoptogenitása akkor magyarázza a megfigyelt jelenséget, ha olyan pro-apoptotikus fehérje funkciók, mint például a p53 melyek kritikusak a seliciclib citotoxicitásához (Slocvackova és mtsai 2012 Neoplasma 59:606) fokozott aktivitást mutatnak ABCB1 túlexpresszáló sejtekben. Ilyenre van irodalmi adat (Lecureur és mtsai 2001 Oncogene 20:303; He és mtsai 2010 Int J Mol Sci 11:3309), de van ellenpélda is (Karwatsky és mtsai 2003 Biochemistry 42:12163). Felvetésünk, hogy az ABCB1 effluxálja a seliciclibet, de egyben érzékenyít is a seliciclib citotoxicitásra, döntően azon alapul, hogy az ABCB1-et túlexpresszáló MCF7 sejtek érzékenyebbek voltak a seliciclib citotoxicitásra

(járálekos érzékenység / collateral sensitivity) mint a vad típusú sejtek egy publikált tanulmány szerint (Cappellini és mtsai Cell Cyle 8-9:1421).

A 29 C ábrán calcein esszé adatok láthatók. Feltűnő, hogy a vizsgált anyagok nagyobb koncentrációban az ATPáz esszében megszokott relatív gátlást mutatják – vagyis a koncentráció-függés harang görbe jellegű. Ez hogyan magyarázható?

Általánosan elfogadott, hogy a calcein esszé lefelé hajló ága, ami a gátlás csökkenéseként jelentkezik a vizsgált vegyület a calcein AM-t calceinné alakító észterázokon kifejtett gátló hatásának tulajdonítható (Schwab és mtsai 2003 J Med Chem 46:1716).

Meglepett a VT esszében használt magas CsA koncentráció (100 μ M). Miért van erre szükség?

A CsA gátlás az ABCB11/Abcb11 esszében változó, és szubsztrát-függő potenciájú – patkány ABCB11 esetében GCDC-re az IC₅₀ 23,85 μ M (Kis és mtsai Drug Metab Dispos 37:1878, 2. táblázat). Tapasztalataink szerint a CsA-nak ebben a koncentrációban nem tapasztaltunk nem-specifikus (gátló, fluidizáló, membrán roncsoló) hatása, így ez lehet az oka, hogy olyan koncentrációt használunk, ami az esszék egy széles körén alkalmazható.

Végezetül megköszönöm Szabó professzornak a magam és a Solvo ADMETox területhez való hozzájárulását elismerő szavait és pályázatom támogatását.

Budaörs, 2014. augusztus 8.

Tisztelettel,

Krajcsi Péter