

## Válaszok Dr. Szabó Gábor bírálatára

Köszönöm szépen Dr. Szabó Gábornak a dolgozatom értékelését, a hasznos észrevételeket és a kérdéseket!

A bírálatában feltett kérdésekre és észrevételekre az alábbiakban válaszolok.

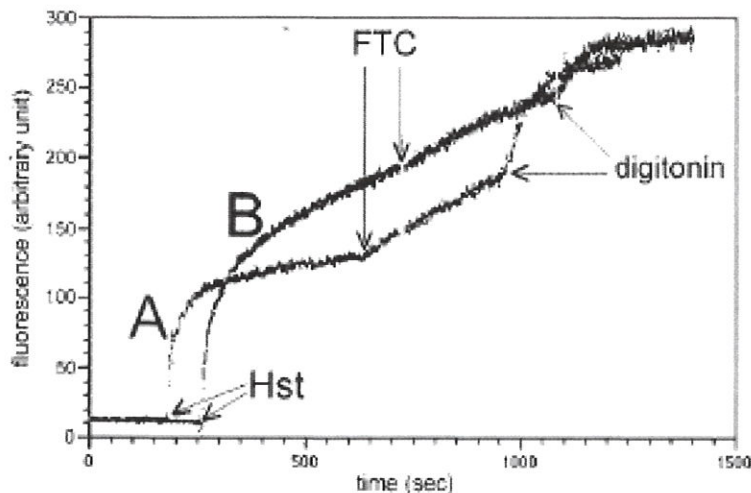
„a Módszerek rész tartalma elegendő az eredményekben mutatott kísérletek lényegének megértéséhez, de egyes részletek szükségszerűen vázlatos tézisekbeli bemutatása alkalmat ad az opponensnek, hogy az eredmények némelyikével kapcsolatosan kérdéseket vagy kételyeket fogalmazzon meg.”

**Válasz:** Köszönöm az észrevételt! Egyetértek a Bírálóval, hogy mivel a dolgozatomban csak az alkalmazott módszerek leglényegesebb elemeit ismertettem, néhány fontos, az eredmények értékeléséhez szükséges részlet kimaradhatott. Ezeket a kérdésekre adott válaszokban igyekeztem tisztázni.

1. „Gyakran alkalmazta a H342 festéket, mint ABCG2 szubsztrátot. A mérések – a vázlatos metodikai leírás alapján – a steady-state intracelluláris fluoreszcencia intenzitás regisztrációját jelentették, tehát nem szolgáltathattak kinetikai adatokat. A festék felvétele szokatlanul meredek hőmérséklet-függést és, ettől függetlenül, éppen a neutrális tartomány körül pH-függő aggregáció által meghatározott self-quenching jelenséget mutat. A módszertani fejezetből vagy az eredmények interpretációjából nem tűnt ki, hogy ezekre a tényezőkre figyelemmel voltak-e a kísérletek során. A H342 felvétel membránon keresztüli felvételében specifikus membrán lipidekkel való kölcsönhatások játszhatnak szerepet, ami az ismert, drámai transzport sebesség váltást magyarázhatja a gél-szól átmenet során. Mindezek miatt a 14. ábrán mutatott kísérletekben, a koleszterin kivonásának hatása a transzport aktivitásra a festékfelvétel membrán lipid összetétel-függő voltával is, nem csak az ABCG2 aktivitásra kifejtett koleszterin hatással magyarázható lehet. További, ezzel

**a módszerrel kapcsolatos felvetés: azt tudhatjuk, hogy a ciklodextrin esetleg nem hat-e kölcsön a festékekkel?”**

**Válasz:** A Hoechst 33442 festék fluoreszcencia intenzitása több tényezőtől is függ, például befolyásolja a pH, lipidbe oldódás és a DNS-hez kötődés. Amikor a festék lipid fázisba kerül, illetve amikor a DNS-hez kötődik, fluoreszcenciája jelentősen, nagyságrendekkel megnő. Ezekből kifolyólag a festék felvétele és kipumpálása ép sejtes rendszerben valós időben, a festék kimosása nélkül is nyomon követhető. Erre alapozva a mutánsok jellemzésénél és a koleszterin kivonás vagy töltés hatását vizsgálva a Hoechst 33342 festék felvételét valós időben követtük nyomon (1. ábra) és a transzport felvétel sebességével számoltunk. Minden esetben meghatároztuk a Ko143 (vagy FTC: fumitremorgin C), specifikus ABCG2 inhibitor jelenlétében mért festékvételt, és ez alapján számoltuk ki a transzport aktivitást. Ez a módszerek rövidített ismertetése miatt a dolgozatomban sajnos nem szerepelt, ezért itt az 1. ábrán bemutatom.

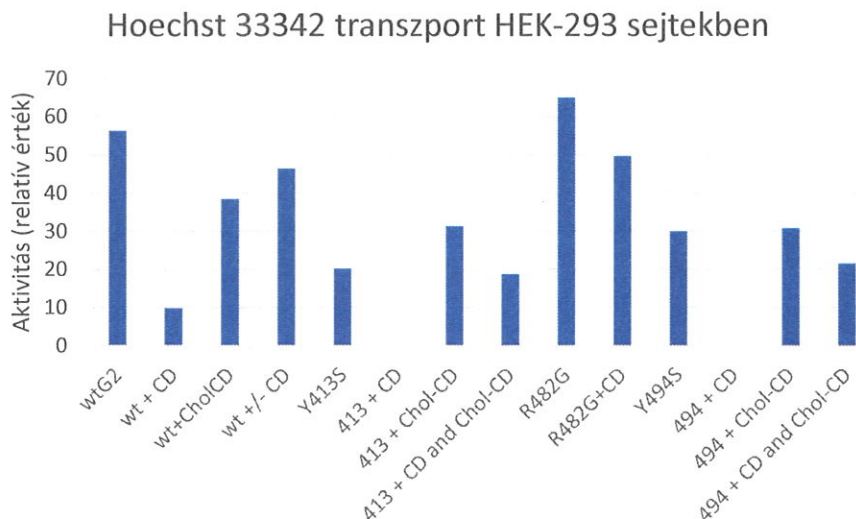


**1.ábra. Hoechst 33342 festék csökkent felvétele ABCG2 fehérjét kifejező Sf9 rovarsejtekben.**

A vad típusú (A) vagy inaktív (B, K86M) mutáns ABCG2-t tartalmazó Sf9 rovarsejtekhez előinkubálást követően 1  $\mu$ M Hoechst 33342 (Hst) festéket, majd 10  $\mu$ M Fumitremorgin C (FTC) ABCG2 inhibitor és végül 8  $\mu$ M digitonint adtunk. Ez utóbbival permeabilizáltuk a sejteket, és meghatároztuk a maximális fluoreszcenciát, ami függhet a sejtszámtól és a festék koncentrációjától. A fluoreszcenciát spektrofluoriméterben detektáltuk. A transzport aktivitás

meghatározása a következő képlet szerint történt:  $((F_{100}-F_0)/F_{100}) * 100$ .  $F_0$ : fluoreszcencia változás inhibitor nélkül,  $F_{100}$ : fluoreszcencia változás 100% gátlást biztosító mennyiségben alkalmazott inhibitor jelenlétében. Az ábra az Özvegy és mtsai, 2022 cikkből (DOI: 10.1074/jbc.M207857200) származik.

A kérdésben említett 14. ábra a feltételezett koleszterin-kötő régiók (CRAC) tirozin mutánsainak aktivitását mutatja Sf9 rovarsejt rendszerben és HEK-293 humán vesesejtekben. Előbbi modellben a hozzáadott koleszterin hatását vizsgáltuk, utóbbiban, pedig a koleszterin kivonás hatását. A H342 festék fluoreszcencia intenzitása megnő a membránba való „belépése” során. Ezen kívül a ciklodextrin kivonja a koleszterint a sejtmembránból, így, mivel a H342 fluoreszcencia intenzitása függ a lipidkörnyezettől, ez is okozhatja fluoreszcencia csökkenést. Ráadásul a ciklodextrin magát a Hst festéket is képes kötni. Azonban a kísérleteket úgy végeztük, hogy a sejteket az első lépésben „üres” ciklodextrinnel kezeltük, majd a ciklodextrint eltávolítottuk és a festékfelvételt ezután mértük. Egyidőben tehát a ciklodextrin és a festék nem volt jelen. Kontrollként szolgált továbbá, hogy a sejt rendszerben koleszterin-független (valójában fokozott koleszterin érzékenységgű R482G) változatot vizsgálva nem tapasztaltunk fluoreszcencia változást, így nem valószínű, hogy a mért H342 jel csökkenés pusztán a lipidkörnyezet megváltozása miatt következett be. Ezen kívül a sejtek többféle kezelését is elvégeztük: „üres” és koleszterinnel-töltött ciklodextrinnel illetve ezek kombinációjával kezelve azokat. Ez alapján megállapítottuk, hogy nem a ciklodextrin vonja ki a festéket a rendszerből. Ezek a kísérleti eredmények azonban nem kerültek bele a dolgozatomba és az eredeti közleménybe sem, így azok egyikét itt bemutatom (2. ábra).



**2.ábra: Hoechst 33342 transzport aktivitás HEK-293 sejtekben.** A Hoechst 33342 festék (1  $\mu$ M) Ko143 (1  $\mu$ M)-szenzitív transzportját határoztuk meg 4 mM ciklodextrinnel (CD), 2 mM koleszterin-ciklodextrinnel (Chol-CD), vagy CD kezelést követő Chol-CD inkubációt követően. wtG2: vad típusú ABCG2.

2. „Az Sf9, stb. sejteken mért transzport aktivitási adatok interpretációját *általában is* kicsit leegyszerűsítettnek vélem minden olyan esetben, ahol a sejteket valamilyen kezelésnek teszik ki, hiszen az nem csak a transzportert érintheti, hanem a transzport passzív folyamatának celluláris szereplőit ill. az egész sejtet, pl. az összfluoreszcenciát befolyásoló savas kompartmentumaival.”

**Válasz:** Köszönöm szépen a megjegyzést! Igen, egyetértek a Bírálóval, a vizsgált szubsztrátok transzportjában egyéb tényezők is részt vehetnek. Az ezeknek betudható hatásokat minden esetben igyekeztünk kiküszöbölni a megfelelő kontroll körülménnyel, például koleszterinnel töltött és „üres” ciklodextrin kezeléssel, illetve ezek kombinációjával (lásd. 1. kérdésre adott válaszom). Kontrollként szolgált továbbá a transzporter specifikus inhibitorával történt mérés. Az ABCG2 fehérjénél minden esetben az inhibitor szenzitív komponenssel számoltunk.

Kontrollként használtuk továbbá az inaktív, katalitikus domén mutáns (K86M) verziót. Az OATP fehérjéknél ismert inhibitor nem minden fehérjére áll rendelkezésre. Itt a kontroll, OATP-t nem termelő vírussal fertőzött sejteken határoztuk meg a passzív, nem OATP-függő komponenst.

**3. „15. ábra (54. o.). A bal oldali ábrarész Sf9 membránvezikulákon mért ATPáz aktivitási mérésekben alkalmazott drog koncentrációk 5-50  $\mu\text{M}$ -osak voltak, míg a jobb oldalon mutatott HEK-293-sejtes mérésekben 50-500 nM-os koncentrációk szerepelnek. Mennyire hozhatók ezek a nagyságrendileg eltérő koncentrációk mellett észlelt hatások közös interpretációs nevezőre?”**

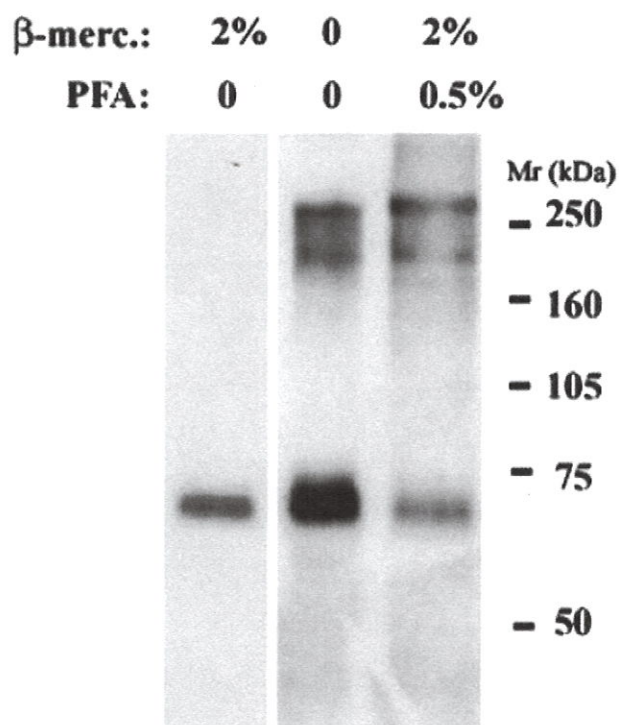
**Válasz:** A 15. ábrán bemutatott ATP-áz aktivitás mérés és a sejtülélés vizsgálat a transzporter két különböző funkcióját tükrözi, tehát az effektív koncentrációk nem feltétlenül vethetők össze. Ennek több oka lehet. 1.) A két módszer a fehérje más-más aktivitását méri. Az ATP-áz aktivitás mérésben a szubsztrát közvetett hatását látjuk. A citotoxicitási mérésben pedig több faktor, akár más efflux vagy uptake transzporter is befolyásolhatja az adott sejtvonal adott citosztatikumra mutatott érzékenységét. 2) A kétféle, rovar- és emlős sejt expressziós rendszerben az ABCG2 fehérje mennyisége jelentősen különbözik. Előbbiben mintegy tízszer több ABCG2-t tudunk előállítani egységnyi membránfehérjére vonatkoztatva. Az emlős sejtes citotoxicitási mérésekben pedig a sejtek ABCG2 általi védelme ( $\text{IC}_{50}$  érték) függ a transzporter expressziójától. 3) Az ATP-áz mérés magas membránkoncentrációnál történik, így a lipidkörnyezet „kivonhatja” a citosztatikumot a rendszerből, ami miatt magasabb koncentráció lehet szükséges az aktiválás eléréséhez. 4.) A gyógyszer kipumpálása során az ABCG2 működése által elhasznált ATP depletálhatja a sejteket. Az ATP-át mérésben viszont az ATP mennyisége nem limitáló.

Tehát, az ATP-áz mérést a szubsztrát azonosítására lehet használni. Amennyiben egy anyag aktiválja az ATP-áz aktivitást, akkor az szubsztrátja az ABCG2 fehérjének. Az effektív, tehát például citotoxicitás vizsgálatban vagy direkt transzport mérésben használandó koncentrációkra azonban az ATP-áz aktivitás mérés alapján nem feltétlenül lehet következtetni vagy azt előre jelezni.

**4. „A 20. ábrán (60 o.) bemutatott kísérletben a formaldehid ABCG2 dimerizációt okozó hatását tételezte fel és ennek alapján vizsgálta azt a kérdést, hogy a dimerizáció szükséges-e az 5D3 antitest kötődéséhez. A Western blot viszont 250 kDa körüli**

tömegű 5D3-reaktív molekula asszociátumot mutat, nem dimereket. A 21. ábrán is a különböző keresztkötő ágensek által létrehozott asszociátumok nagyobbak a dimernél és egymáshoz képest is kissé különböznek.”

**Válasz:** Az ABCG2 homodimerként működik, amit egy diszulfid híd stabilizál (Kage és mtsai., 2002, Özvegy és mtsai., 2001). A Western blot alapján a formaldehiddel keresztkötött ABCG2 mobilitása több mint kétszerese a molekulatömeg alapján vártnak, illetve több, magasabb molekulatömegű ABCG2 komplex is megjelenik. Ezek lehetnek különböző ABCG2 oligomerek. Ezért a formaldehiddel kezelt mintát összehasonlítottuk az eredeti, diszulfid híddal kovalensen kötött ABCG2 homodimer mobilitásával és azt tapasztaltuk, hogy azok megegyeznek. Ez alapján feltételeztük, hogy a Western blot-on a dimert detektáltuk. Ez az ábra (itt 3. ábra) szerepelt az eredeti közleményben, de a dolgozatomba sajnos nem kerül bele.



**3. ábra: ABCG2 aggregációjának vizsgálata.** A HEK-ABCG2 sejteket formaldehiddel (PFA) és/vagy β-merkaptóetanollal kezeltük (kovalens dimert rögzítő diszulfid híd megszüntetése). Kép forrása Özvegy-Laczka és mtsai, JBC, 2008.

A különböző keresztköti ágensekkel is kissé eltérő mobilitású ABCG2 asszociátumokat kaptunk. Ez a keresztköti ABCG2 eltérő konformációjából adódhat. Az alkalmazott keresztköti ágensek ugyanis különböző távolságra lévő és eltérő aminosav oldalláncokkal reagálnak.

**5. „25. ábra (68. o.). Az Y skálák pH 5.5. és 7.4-nél a fluoreszcein esetén nagyon különböznek. Ennek mi az oka?”**

**Válasz:** A fluoreszcein festék fluoreszcenciája pH-függő, savas tartományban csökken. A rovarsejteken történő mérésekben viszont a savas tartományban mértünk magasabb fluoreszcenciát. Ez egyrészt adódhat abból, hogy az OATP-k működését fokozhatja a savas extracelluláris pH. Másrészt, a rovarsejteken a kontroll sejt fluoreszcenciája is megnőtt a savas pufferben, ami endogén transzporterek aktiválódásából vagy a membrán permeabilitásának változásából is adódhat. Az áramlási citométerben végzett vizsgálatoknál kalibrációt nem tudtunk felvenni, így a kétféle pH-n mért transzport nem kvantitálható és nem vethető össze. Később, áttérve más fluoreszcens festékekre és OATP-eket stabilan kifejező sejt vonalakra a lemezolvasóban végzett mérések során a kalibrációs görbét is fel tudtunk venni, ami alapján a transzport aktivitást kvantitálni tudtuk.

**6. „32. ábra. (79. o.) Milyen következtetés vonható le a koleszterinnek az ABCG2 transzportra kifejtett hatásaiból a transzporter raft-lokalizációjának szerepére vonatkozóan?”**

**Válasz:** A koleszterin közvetlen vagy közvetett szerepe az ABCG2 működésében még nem tisztázott. Többben is vizsgálták például, ellentmondó eredménnyel, hogy a koleszterin befolyásolja-e az ABCG2 raftbeli lokalizációját, és milyen módon. Elsőként Storch és mtsai. mutatták ki, hogy az ABCG2 a koleszterinben és szfingolipidben gazdag lipid raftokban található, és a sejtmembrán koleszterin szintjének csökkentése csökkent ABCG2 aktivitást eredményez (Storch et al. 2007). Vizsgálataikban a sejtek (MDCKII) ciklodextrinnel való kezeléssel történt koleszterin szintjének csökkentése nem befolyásolta az ABCG2 apikális lokalizációját. Ezzel megegyezően saját kísérleteinkben nem találtunk változást az ABCG2 lokalizációjában a koleszterin depléciót követően (Telbisz és mtsai, 2007, a dolgozatban nem közvetlenül felhasznált publikáció). Ugyanakkor Szilágyi és mtsai 2017-ben kimutatták, hogy a koleszterin depléció megszünteti az ABCG2 raftbeli lokalizációját.

Storch és mtsai. eredményei alapján a koleszterin kivonás megszünteti az ABCG2 caveolin-1-vel való kölcsönhatását (koimmunprecipitációs kísérlet során). A koleszterinnek (vagy koleszterin kivonásnak) tehát ilyen módon is lehet hatása az ABCG2 működésére. Herzog és mtsai., munkája alapján a caveolin-1 leszabályozása (RNAi) csökkenti az ABCG2 működését (Herzog és mtsai, 2010, DOI 10.1007/s00210-010-0568-8). Ennek azonban ellentmond, hogy az ABCG2 rekonstituált proteoliposzómákban, caveolin-1 nélkül is működik. Ennek ellenére a raft koleszterinben gazdag lipidösszetétele fontos lehet az ABCG2 működésében, így ez is lehet egy finomszabályozása a működésének.

**7. „Az 5D3 epitópját a 3. extracelluláris hurokban lokalizálta. Léteznek-e peptid-arrayken alapuló kísérletek, melyek alátámasztják vagy kiegészítik ezt a képet?”**

**Válasz:** Tudomásom szerint ilyen peptid array-t nem csináltak az ABCG2 5D3 epitópja kapcsán. A kísérleteink alapján az 5D3 epitópjának elhelyezkedését megerősíti azonban, hogy az ABCG2 térszerkezetének meghatározásakor az 5D3 Fab-t a 3. extracelluláris hurokhoz kötötten „találták”. Célzott mutagenézissel lehetne még további megerősítést szerezni az epitópról.

**8. „Az R482X pl. T, S, Y szubsztitúciók, a transzporter-szubsztrát kapcsolat befolyásolásán túl rendellenes foszforilációra teremthettek lehetőséget, ami az élő sejtes vizsgálatok eredményét elvileg befolyásolhatta.”**

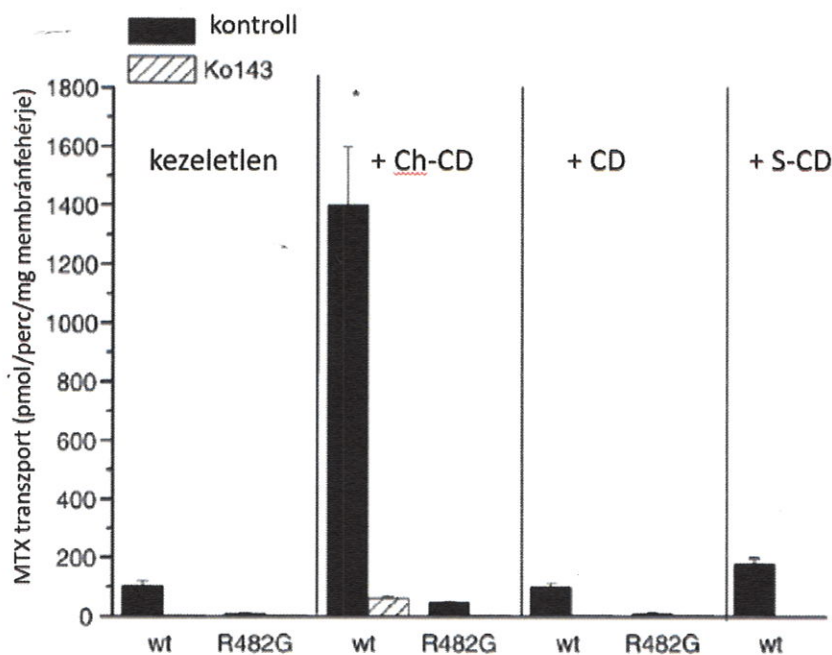
**Válasz:** Köszönöm a felvetést! Az ABCG2 a 362. treoninon és a 353. szerinen (Sharma, 2014, és Mózner-Homolya, 2019, doi: 10.1016/j.celrep.2014.07.036) foszforilálódik. A T362 foszforilációja fokozza az ABCG2 működését (Xie és mtsai, JBC, 2008), a S353-ról nincs adat. A 482-es Tyr, Ser és Thr mutációk valóban létrehozhattak extra foszforilációs helyeket, erre sem a mi, sem más kutatócsoportok, akik az R482 mutációkkal foglalkoztak (Miwa és mtsai, Int J cancer, 2003, Honjo és mtsai, Can Res, 2001, stb.) nem tért ki. Tömegspektrometriával például el lehetne dönteni, extra foszforilációs hely keletkezik-e ezekben a mutánsokban. Amennyiben a foszforiláció fokozza az ABCG2 működését, ezeknél a mutánsoknál várhatunk magasabb aktivitást. Érdekes módon a foszfoszerinhez és foszfortreoninhoz hasonló Asp vagy Glu mutánsok bizonyos működése is fokozott. Saját méréseink alapján az R482D mutáns ATP-áz aktivitása a vad típusával összevethető és képes rhodamine 123 transzportra, viszont metotrexátot nem szállít. Miwa és mtsai., mérései alapján az R482D és R482E fokozott doxorubicin rezisztenciát okoz, ami



fokozott transzport funkcióra utal. Ugyanakkor ez a fokozott aktivitás a biztosan nem, legalábbis nem a 482-es pozícióban foszforilálódó, Gly és Ala, mutánsoknál is megfigyelhető (Özvegy-Laczka és mtsai., 2005, és Miwa és mtsai, 2003).

**9. „8. ábra. (47. o.) Csak a koleszterin töltés hatására vonatkozó adatokat látjuk, nem mutat olyan méréseket, ahol töltetlen ciklodextrin lett volna jelen.”**

**Válasz:** Köszönöm az észrevételt! Korábban teszteltük, hogy az „üres” ciklodextrinnel történt inkubálás nem befolyásolja az ABCG2 aktivitását a membrán vezikulumokban (lásd 4. ábra, és Telbisz és mtsai, 2007), így a 8. ábrán, ahol az LxxL Leu mutánsokat vizsgáltam ezt a kontrollt nem tüntettem fel. De egyetérték a Bírálóval, hogy ez fontos lett volna.



**4.ábra: Ciklodextrin komplexek hatása az ABCG2 fehérje működésére.** MTX (metotrexát, 100  $\mu$ M) felvétel (5 perc, 37 °C) vad típusú (wt) ABCG2 vagy R482G–ABCG2 mutánsot tartalmazó Sf9 membránvezikulumokban. Kezeletlen: kontroll vezikula (8  $\mu$ g koleszterin/mg membránfehérje), Ch-CD: koleszterin-ciklodextrinnel előkezelt vezikula (56  $\mu$ g koleszterin/membránfehérje), CD: “üres” ciklodextrinnel kezelt vezikula (5  $\mu$ g koleszterin/mg membránfehérje). S-CD: szitoszterin tartalmú ciklodextrin. Az ábrán a Ko-143 (1  $\mu$ M) - szenzitív komponenst ábrázoltuk. Három mérés átlaga  $\pm$ SD látható. (Az ábra eredetije a Telbisz és mtsai, 2007 cikkben található meg).

10. „Általában a fogalmazás egyszerű, jól érthető. Az 5D3 kötődés és az ATP hidrolízis lépései közti kapcsolatot leíró paragrafus az 59. oldalon kivételt képez, a szöveg és az ábra nem tűnik teljesen kongruensnek egymással, többszöri nekifutással sem.”

Válasz: Köszönöm az észrevételt! Igen, lehetséges, hogy erre a fejezetre több időt kellett volna szánnom.

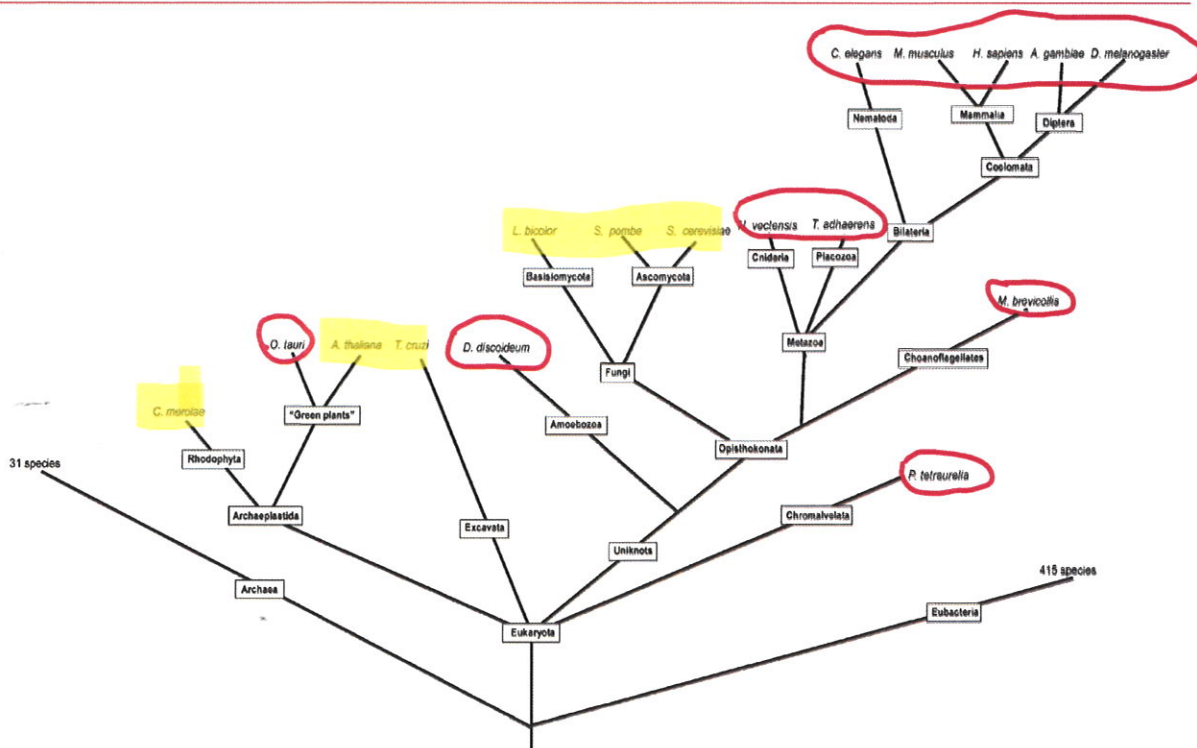
11. „A bevezetőben említi, hogy az OATP-k csak az állatvilágban találhatók meg. Ennek az oka, hogy az evolúcióban a kloroplasztiszok akvizíciója után jelent meg ez a gén család, vagy a növényi létforma valamilyen sejtbioológiai sajátosságával (sejtfal?) ezen transzporterek működés inkompatibilis? Hasonló szubsztrátok transzportját növényekben vajon mi bonyolítja? Bár látszólag elméletieskedő a kérdés, a válasz elősegítheti a nem teljesen feltárt transzport mechanizmus megértését ill. fényében az OATP-k helye a teljes ADME-Tox szereposztásban érdekes megvilágítást nyerhet.”

Válasz: Köszönöm ezt a fogós kérdést! Az OATP-k evolúciójával kevés cikk foglalkozik. Általánosan elfogadott, hogy az OATP-k csak az állatvilágban fordulnak elő. Én is ezt írtam a dolgozatomban. Azonban a kérdésnek utánajárva találtam egy publikációt (Höglund és mtsai., 2011 doi: 10.1093/molbev/msq350), amelyben a humán SLC-k megfelelőit keresték az élővilág különböző képviselőiben. Ez alapján az OATP fehérjéket kódoló gének megtalálhatók az egysejtű zöldalgában (*Ostreococcus tauri*) is. Azonban magasabbrendű növényekben nincs OATP. Ezeket az 1. táblázatban és az 5. ábrán mutatom.

1. *táblázat: SLC kódoló gének a különböző fajokban* (forrás, Höglund és mtsai., 2011, , doi: 10.1093/molbev/msq350). SLC21: Az OATP-ket kódoló gén család régi elnevezése. Sárgával jelöltem a fajokat, amelyekben nincs OATP-t kódoló gén.

	SLC17	9	9	26	14	51	21	5	2	2		2	1			7	2	6
	SLC18	3	2	3	3	2	3	13								4	1	
	SLC19	3	3	3	1	3	1	1	1									
<b>α-group</b> (MFS clan)	SLC21	12	15	8	7	7	1	27	1	1						5	2	
	SLC22	23	26	30	12	27	66	27		2	2	5	1	2	29	4		6
	SLC29	5	4	2	3	7	2	10	3	1	2				1	1		
	SLC37	4	2	1	1	3	3	4		1	1					5	3	1
	SLC43	3	3					2	1	1						1		1
	SLC45	4	4	1	4													
	SLC46	3	3	5	3	2												
<b>γ-group</b> (CPA/AT clan)	SLC9	11	9	3	4	9							1	1				8
	SLC10	6	7	2	1	1	6									3	10	5
	SLC8	3	3	1	1	3												1
<b>δ-group</b> (Tim barrel clan)	SLC24	6	6	7	7	7	8	6		1		2	1	1	9	1	1	4
	SLC1	7	7	2	3	6	11											
(IT clan)	SLC3	2	2	10	10	3				1					7	2		
	SLC6	22	21	24	16	15												
	SLC11	2	3	1	1	3	1	1	2	2		1		3	1	2	3	5
	SLC13	5	5	3	2	4	2	1			2		1	2				1
	SLC14	2	2						3						1			
	SLC20	2	2	1	1	6				2	4			1		2	2	1
	SLC25	57	54	41	32	33	47	31	34	32	27	15	23	33	99	39	31	57
	SLC27	6	6	3	2	2	2	1			1			1	1			
	SLC28	3	4	2	2	2	5	3	1									
	SLC30	9	9	6	5	5	10	4	4	2	3	2	2	5	5	1	2	7
	SLC31	2	2	4	2	3								1				
	SLC33	1	1	1	1	1	3	2	3	1		1	1	1	12	2	1	
(Drug/Metabolite transporter clan)	SLC34	3	3			1	3	2										
	SLC35	10	10	7	4	11	3	27	12	14	10	4	4		5	29	16	29
	SLC39	11	9	5	7	8	19	9	5	2	6		1	1	7	5	3	1
	SLC40	1	1			1	1	2	1	2					8	2	2	2
	SLC41	3	3	1	1	3	2	1		1								
	SLC42	3	3	1	1	2	13	3	3	1	1			1	8			
	SLC44	7	5	2	3	1	7	1							1			3
	U.C	43	38	39	30	31	209	123	116	47	87	97	30	35	288	63	32	67
		<i>H. sapiens</i>	<i>M. musculus</i>	<i>D. melanogaster</i>	<i>A. gambiae</i>	<i>C. elegans</i>	<i>N. vectensis</i>	<i>T. adhaerens</i>	<i>D. discoideum</i>	<i>M. Brevicollis</i>	<i>T. cruzi</i>	<i>L. bicolor</i>	<i>S. pombe</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>P. tetraurelia</i>	<i>O. tauri</i>	<i>C. merolae</i>	<i>A. thaliana</i>

**Fig. 5.** Tabulated representation of the number of SLCs in each of the 46 families for 17 species; *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Drosophila melanogaster*, *Anopheles gambiae*, *Caenorhabditis elegans*, *Nematostella vectensis*, *Trichoplax adhaerens*, *Dictyostelium discoideum*, *Monosiga brevicollis*, *Trypanozoma cruzi*, *Laccaria bicolor*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Paramecium tetraurelia*, *Cyanidioschyzon merolae*, *Ostreococcus tauri*, and *Arabidopsis thaliana*. The main SLC groups  $\alpha$ - $\delta$  (Fredriksson et al. 2008b), as well as Pfam (Finn et al. 2007) clans not included in this classification, is noted in the left margin of the figure.



**FIG. 4.** Schematic phylogenetic tree showing the relationship of the species in our analysis. The figure is constructed using the NCBI taxonomy browser (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy>); data and references from the tree of life Web project (<http://tolweb.org/tree/phylogeny.html>) and from Hampl et al. (2009). The rectangular-shaped boxes show that the evolutionary lineages and species are denoted at the leaves. Branch lengths are not drawn to represent actual evolutionary distances.

**5.ábra: Az OATP fehérjéket kódoló gének jelenléte a különböző fajokban.** forrás, Höglund és mtsai., 2011, doi: 10.1093/molbev/msq350. Sárgával jelöltem a fajokat, amelyekben nincs OATP kódoló gén, pirossal pedig bekarikáztam azokat, amelyekben megtalálható az OATP-t kódoló gén.

Höglund és mtsai alapján OATP-ket kódoló gének megtalálhatók az egysejtű csillóban (Paramecium tetraurelia) és a Dictyostelium discoideum amőbában (1. táblázat és 5. ábra). Ezek alapján az OATP-k, hasonlóan mintegy másik 9 SLC családhoz, már a közös eukarióta ősből is megtalálhatóak lehettek, ami fontos, evolúciósan konzervált szerepre utal. A filogenetikai fa alapján az OATP-t kódoló gén elveszhetett az evolúció során (vagy divergens evolúcióval alakult ki). Mivel több SLC is megtalálható a sejtfallal rendelkező növényekben (1. táblázat), azt

gondolom, hogy nem azért nincs OATP fehérjék, mert az káros lenne, inkább valamelyik másik SLC család, például a közeli rokon, átfedő szubsztrát felismerésű, és evolúciósan konzervált SLC22 család tagjai vehetik át a szerepüket. A növényekben ismertek szerves ionokat, glükózt vagy aminosavakat transzportáló SLC fehérjék. Mivel az emberi OATP-k, legalábbis a gyógyszer transzporter OATP-k sokféle szubsztrátot felismernek, működésük átfed több transzporter családdal, SLC és ABC fehérjékkel egyaránt. Működésüket tehát többféle transzporter is kompenzálhatja. Emiatt is lehet, hogy az OATP1C1 tiroid hormon transzporterén kívül más OATP-kódoló gén mutációja nem okoz betegséget.

Végezetül ismételen köszönöm a dolgozatom bírálatát és tisztelettel kérem a válaszaim elfogadását és az MTA doktori cím odaítélésének támogatását.

Budapest, 2022. június 21.

  
Laczka Csilla