

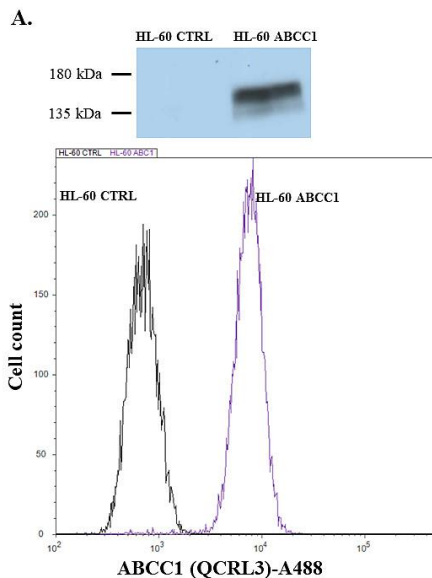
Válasz Dr. Gallyas Ferenc bírálataira

Nagyon köszönöm Gallyas Ferencnek, hogy elvállalta dolgozatom bírálatát, örülök támogató megjegyzéseinek és kritikai észrevételeit igyekszem a jövőben szem előtt tartani.

Kérdéseire a következő válaszokat adom:

1/ 46-47. oldal, 10-11. ábra: Az mRNS és fehérje szintű expresszió kérdése nagyon jól mutatja a statisztikai és a fiziológiai szignifikancia közötti különbséget. Az ABCC1 transzportert a vizsgált sejtvonalak a májjal összemérhető szinten fejezték ki mRNS szinten, míg a transzporter egyáltalán nem volt kimutatható fehérje szinten. Ebből a szempontból érdekes lenne tudni, hogy a HL60/ABCC1 leukémia sejtvonalban kimutatható-e az ABCC1 fehérje a használt markerrel.

Kutatócsoportunk rendszeresen használja ezt az ellenanyagot (R1 (Abcam)) az ABCC1 kimutatására. Az általunk kontrollként használt, overexpresszáló HL60 vonalon, fehérjeszinten is ki mutatták az ABCC1-et Western-blot és áramlási citometria segítségével is (lásd az ábra és Szabó et al. 2018.).



A szerző az ABCC1 esetében mRNS és fehérje szintű expresszió közötti eltérés okaként posztranszkripció vagy negatív translációs szabályozást valószínűsít. Van erre vonatkozó irodalmi adat?

Azt, hogy az ABCC1 esetében az mRNS és a fehérjeszintű expresszió közötti eltérésnek mi az oka, mi nem vizsgáltuk és erre humán pluripotens őssejtek esetében nem is találtam vonatkozó irodalmi adatot, így nem bocsátkoznék találgatásokba.

Ha megnézzük a „THE HUMAN PROTEIN ATLAS” adatait és összehasonlítjuk a három fő ABC transzportert, azt találjuk, hogy a single cell RNAseq adatok alapján az ABCC1 alacsony sejttípus specifitást mutat, míg a másik két transzporter esetében emelkedett sejttípus specifitást találunk. Még érdekesebb megnézni a szöveti eloszlást RNS- illetve fehérjeszinten, az ABCC1 esetében több olyan szövetet is találunk, ahol a magas RNS expresszióhoz nagyon alacsony fehérjeszint kapcsolódik (pl. endokrin szövetek, emésztőrendszer vagy az izomszövet), míg a másik két transzporter esetében ez nem jellemző. Úgy tűnik, hogy nemcsak az őssejtekre, hanem a többi sejttípusra is jellemző lehet ez a különbség az RNS- és a fehérjeszint között az ABCC1 esetében. Nem vagyok a transzkripció folyamatok szakértője, de igyekeztem áttekinteni az irodalmi adatokat és úgy tűnik, hogy ABCC1 expressziójának szabályozásáról kevés adat áll rendelkezésre.

Az ABCC1 poszttranszkripciósan miRNS-ek kötődésével szabályozható, a MiRTarBase adatbázis alapján számos (26 azonosított) miRNS köthet az ABCC1 mRNS-re. Arról azonban, hogy ezek milyen módon szabályozzák az ABCC1 expresszióját szintén keveset tudunk (azt is főleg rákos sejtvonalak esetében). Például a miR-185-5p és miR-326 esetében ovárium tumoros sejtvonalaknál megfigyelték, hogy 3'UTR alternatív poliadenilációja miatt ezek a miRNS-ek nem kötődnek és így a fehérje szintje megemelkedik (Marjamaa et al. 2023.). (A pluripotens őssejtekben a fő miRNS klaszterek a miR-17-92, miR-106a-363, miR-302-367, and miR-200 (Wilson et al. 2009.)).

Az mRNS translációjának szabályozása még több úton történhet, pl. intronok kivágása, kémiai markerezés, dajkafehérjék közreműködésével (harmadlagos szerkezetet stabilizál, vagy lefedi, ezzel gátolja a fehérjeszintézist), illetve az mRNS élettartam szabályozása különböző fehérjék segítségével. Ezek áttekintése egy nagyobb lélegzetű munka lenne, amihez sajnos elegendő szakértelmem sincs.

2/ 53. oldal, 17.B ábra: Jó példa a szöveg és az ábra inkonzisztenciájára. Az oldal tetején a szöveg: „az SSEA4 expresszió is ezt erősíti meg, mivel minden ABCG2 sejt egyben SSEA4 pozitív is, lásd 17.B ábra”. Ezzel szemben a 17.B ábrán az ABCG2, Oct4 és NANOG relatív expressziója látható az ABCG2 pozitív és negatív populációkban. A konklúzió érvényességét nem befolyásolja, de zavaró.

Köszönöm szépen bírálómnak, hogy felhívta a figyelmemet erre a sajnálatos elírásra, a szöveg a 16 B ábrára vonatkozik.

3/ 19. ábra: Az ábraalírás szerint a ko-lokalizációs kísérlet az ábra B része, de az ábrán ez nincs feltüntetve. Ugyancsak jó lenne tudni, hogy van-e és mi a különbség az alsó és a felső panelek között.

Köszönöm az észrevételt, ebben az esetben lemaradt a B panel jelzése, ami az alsó két sor immunfestést jelölné. A különbség, hogy az alsó paneleken nincs ott a magfestés, hogy jobban látsszon a kolokalizáció, de valóban talán egyértelműbb lett volna az alsó sort kihagyni.

4/ A Ko143 nem specifikus az ABCG2 transzporterre (Weidner L.D. et al. 2015;354(3):384-93), hanem gátolja az ABCB1 és ABCC1 transzportereket is. Mennyiben befolyásolja ez a 4.2.2 fejezetben bemutatott kísérletek konklúzióját?

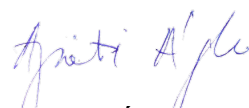
A bíráló által említett cikkben a következőt írják a Ko143-mal kapcsolatban: „being a potent inhibitor of ABCG2, at higher concentrations ($\geq 1 \mu\text{M}$) Ko143 also has an effect on the transport activity of both ABCB1 and ABCC1”.

Kutatócsoportunk évtizedek óta foglalkozik az ABCG2 transzporterrel és épp azért használtunk 1 μ M Ko143-at, mert ebben a koncentrációban a másik két transzportert még nem gátolja. Mivel az őssejteken sem az ABCB1 sem az ABCC1 nem volt kimutatható fehérje szinten, nem valószínű, hogy a következtetéseket befolyásolná az esetleges gátlásuk.

5/ 65. oldal, 23.A ábra: A csak GFP-t expresszáló HUES9 sejtekben az ABC transzporter inhibitor Ko143 jelenlétében a DCV kizárási aktivitás sokkal karcsúbb (kisebb félmaximális csúcscsúszélességű) eloszlási görbét mutatott a kezeletlen sejtekhez képest, míg a vad típusú és az R482G ABCG2 transzportert expresszáló sejtekben ez a „karcsúsodás” sokkal kevésbé következett be. Lehet ennek jelentősége a kísérletek eredményeinek diszkussziója szempontjából?

Köszönöm szépen ezt az érdekes és nem könnyen megválaszolható kérdést. Lehetséges magyarázat, hogy a GFP-t expresszáló sejtekben csak az endogén ABCG2 transzporter funkciót gátoljuk (1 μ M Ko143-mal), míg az ABCG2-GFP variánsokat overexpresszáló sejtvonalak esetében az endogén mellett az overexpresszióval kifejeződő transzportereket is gátoljuk. Az R variáns esetében ez +8 kópia, a G variáns esetében +6 kópia. Az overexpresszáló sejtekben az integrációs helyek különbözőek, így a kifejeződő ABCG2 mennyisége is különböző lehet. Populációs szinten ez okozhat különböző szintű expressziókat és így szélesebb görbét. Ezekből a kísérletekből azt a következtetést vontuk le, hogy a pluripotens őssejteken az ABCG2 overexpressziója valóban funkcionális változásokat okoz, és ezért „viszonylag kis mennyiségű funkcionális ABCG2 membránfehérje stabil termelésével lehetővé válik gyógyszer/toxin-rezisztens pluripotens emberi őssejtek és származékaik létrehozása gyógyszerfejlesztési vagy akár terápiás célokra is.” Véleményem szerint a fenti jelenség ezekre a megállapításokra nincs hatással.

Végül még egyszer köszönöm Dr. Gallyas Ferencnek, hogy időt és energiát fordított dolgozatom alapos átolvasására és remélem, válaszaimat kielégítőnek találja.



Apáti Ágota PhD

Budapest, 2024.02.15.

Irodalomjegyzék:

Szabó E, Türk D, Telbisz Á, Kucsma N, Horváth T, Szakács G, Homolya L, Sarkadi B, Várady G. A new fluorescent dye accumulation assay for parallel measurements of the ABCG2, ABCB1 and ABCC1 multidrug transporter functions. PLoS One. 2018 Jan 17;13(1):e0190629. doi: 10.1371/journal.pone.0190629. PMID: 29342177; PMCID: PMC5771559.

Marjamaa A, Gibbs B, Kotrba C, Masamha CP. The role and impact of alternative polyadenylation and miRNA regulation on the expression of the multidrug resistance-associated protein 1 (MRP-1/ABCC1) in epithelial ovarian cancer. Sci Rep. 2023 Oct 14;13(1):17476. doi: 10.1038/s41598-023-44548-y. PMID: 37838788; PMCID: PMC10576765.

Wilson KD, Venkatasubrahmanyam S, Jia F, Sun N, Butte AJ, Wu JC. MicroRNA profiling of human-induced pluripotent stem cells. Stem Cells Dev. 2009 Jun;18(5):749-58. doi: 10.1089/scd.2008.0247. PMID: 19284351; PMCID: PMC3135181.