

Válasz Dr. Lacza Zsombor bírálataira

Köszönettel tartozom Dr. Lacza Zsombornak, hogy elvállalta dolgozatom bírálatát. Külön öröm és megtiszteltetés, hogy a tartalmát érdekesnek találja egy ismeretterjesztő könyv alapjául. Bevallom ez a gondolat évek óta foglalkoztat, és Hollerbach Emillel (akinek a dolgozatban szereplő grafikákat köszönhetem) fontolgatjuk is, hogy belevágunk egy ilyen munkába.

A bevezetőhöz fűzött kiegészítő megjegyzéseket nagyon köszönöm, nagy segítségemre lesznek az elkövetkező munkáim során.

Röviden szeretnék reagálni az összejt terápiák „sikertelenségét” érintő megjegyzésére. Valóban nagy remények és elvárások szegélyezik az összejtkutatás rögös útját. A fő kérdések, amelyek minden terápiás megfontolásnál felmerülnek; a biztonság, a hatékonyság és az ár. Az összejtkutatás esetében mindhárom probléma megoldása új technológiák és szabályozási rendszer kiépülését feltételezi, ami idő- és költségigényes. Az utóbbi időben mindkét területhez kapcsolódni tudunk a laboratóriumunkkal (az univerzálisan használható összejtforrások kutatásával, illetve azzal, hogy a Humán Reprodukciós Bizottság tagjaként a szabályozási kérdésekkel is foglalkozom). Ezekről valóban nem sok szó esik a dolgozatomban, mert nem ez a szűkebben vett témája. Az érdeklődőknek ajánlom John Rasko és Carl Power 2023-ban megjelent könyvét (“Flesh Made New: The Unnatural History and Broken Promise of Stem Cells”), ami ezt a témát részletesen és olvasmányosan tárgyalja. Tanulmányuk lerombolja az összejtek körüli „felhajtást”, hogy felfedje, hogy mi lehet a reális elvárás az összejt terápia területén.

További megjegyzések és kérdések

1, Az ABC transzporterek esetén például azt találta a szerző, hogy a magas mRNS expresszió ellenére nem lát elegendően magas fehérje szintet, amelynek oka az lehet, hogy néha egy sejtben nagyon magas az ABCC1 expresszió amely eltolja az átlagot, de fehérje szinten összességében ez már nem jelentkezik mert pl. a translációs szabályozás elnyomja. Ez egy jó hipotézis, kérdés hogy a jelölt ezt pontosan hogyan is vizsgálná, milyen biológiai magyarázat lehet erre. Esetleg az is felmerülhet, hogy ez egy mérési vagy technikai hiba, amelyet szintén ki kell zárni. Ennek mi lehet a módja?

Ez a kérdés Dr. Gallyas Ferenc bírálatában is felmerült, kicsit más megfogalmazásban. Az ABC transzporterekkel kapcsolatos kísérleteink idejében a single cell RNS szekvenálási technika még nem volt ismert, amivel lehetőség lenne akár egy kisebb populáció kimutatására is. Így eldönthető lenne, hogy a magas mRNS expresszió egy kisebb alpopulációra vagy a sejtek nagy részére jellemző.

A viszonylag alacsony korreláció a gének mRNS expressziója és a transzlált fehérje között jól dokumentált, ideértve az összejtteket, ami a poszt-transzkripció szabályozásnak tulajdonítható.

Az ABC transzporterekkel kapcsolatban több szervre vonatkozóan is rendelkezésre állnak mRNS és fehérje adatok is. A „THE HUMAN PROTEIN ATLAS” single cell RNAseq adatai alapján az ABCC1 alacsony sejttípus specifitást mutat, míg a másik két transzporter (ABCB1 és ABCG2) esetében emelkedett sejttípus specifitást találunk. Az ABCC1 esetében a magas mRNS expresszióhoz több szövetben is nagyon alacsony fehérjeszint kapcsolódik (pl. endokrin szövetek, emésztőrendszer vagy az izomszövet), míg a másik két transzporter esetében ez sem jellemző. Úgy tűnik, hogy nemcsak az őssejtekre, hanem a többi sejttípusra is jellemző lehet ez a különbség az mRNS- és a fehérjeszint között az ABCC1 esetében, amit a posztranszkripció vagy transláció szabályozás okozhatnak. A jelen dolgozat esetében, ennek eldöntésére azonban további kísérletekre lenne szükség. A mérési vagy technikai hiba kizárása a megfelelő kontrollok beiktatásával és a mérések ismétlésével történhet. Az általunk használt ABCC1 ellenanyagot különböző sejttípusokon is validáltuk (pl. ABCC1 overexpresszáló sejteken vagy őssejtől differenciáltatott idegi kultúrákban), de őssejteken nem tudtuk kimutatni a fehérjét sem immunfestés, sem flow citometria segítségével. Viszont az mRNS expresszió több ismétlésben, több pluripotens őssejtvonalon és több mérési technikával is kimutatható volt (RT-PCR és Taqman array). Eredményeink tehát nagy valószínűséggel helytállóak.

2, Szintén ebben a fejezetben a szerző azt a következtetést vonja le, hogy az ABCG2 expresszió dinamikus egyensúlya populációs szinten előnyt jelent, mivel a sejtek ezúton tudnak reagálni a környezet változásaira. Feltételezi, hogy az ilyen módon fenntartott heterogenitás evolúciós szempontból kedvező lehet. Mivel ezen eredményeket *in vitro* sejttenyészetből származó adatokból vonja le, ezért felmerül a kérdés, hogy a teljes szervezetben pontosan hogyan lehet ezt elképzelni.

Az *in vitro* fenntartott pluripotens őssejtvonalak mesterségesen létrehozott sejttípusok, egy nagyon korai embrionális állapot után nincs a szervezetben megfelelőjük. A korai, peri-implantáció előtti időszakban azonban, evolúciós szempontból az ABCG2 jelenléte előnyös lehet. Az embrionális fejlődése során az embrió sejtjei különféle stressz hatásoknak vannak kitéve és a fejlődés során nagyon sok sejt elhal a preimplantáció előtt is (Jurisicova 2004). Azok a sejtek, amelyek védő mechanizmussal rendelkeznek (például transzportereket expresszálnak), jobban túlélhetnek. Humán adatot nem találtam az ABCG2 kifejeződéséről a preimplantációs időszakban. Az egér embrió fejlődése közben viszont megfigyelhető volt, hogy az ABCG2 (és mellette az ABCB1) kifejeződése dinamikusan változik. RNS szinten a kétsejtes állapottól a 9. napig (a vizsgálati végpontig) jelen van, azonban ha funkcionálisan vizsgálták az időbeli/térbeli mintázatokat rodamin 123/Hoechst 33342 efflux méréssel, akkor azt találták, hogy a 2-, 4- és 8-sejtes embriók blasztomerjei efflux-inaktív fenotípusúak voltak. Az első efflux-aktív sejtek először a morulákban jelentek meg, és számuk növekedett blasztociszta belső sejtömegeiben. A 6 és 7 napos embriókban minden embrionális sejt efflux-aktív fenotípust mutatott, majd az efflux negatív sejtek fokozatosan megjelentek (Sawicki 2006). Ezek az eredmények nem magyarázzák, de sugallják az ABC transzporterek szerepét a legalábbis a korai fejlődés során. A másik példa arra, hogy az ABCG2 jelenléte adaptív lehet, azt a tumorbiológiai adatok mutathatják. Például az ABCG2 fehérjeszintű megjelenése vastag- és végbélrák tumorokon belül heterogén és a tumor súlyosságával párhuzamosan növekszik (Cederbye 2016), aminek egyik mechanizmusa lehet, hogy az ABCG2-t magasan kifejező tumorsejtek előnyben vannak, és végül túlnővik az ABCG2-t alacsonyan vagy egyáltalán nem expresszáló sejteket.

3, A 4.3.1. fejezet végén az összefoglalásban megtudhatjuk, hogy sikerült a konfokális mikroszkópiára alkalmas fluoreszcens Ca indikátor mérést kidolgozni, amely sok más ismert Ca érzékelő festék hátrányait kiküszöböli, de a szerző adós marad azzal, hogy mindez miért fontos. Minden módszertani kísérlet és tanulmány végső indokoltsága az, hogy ennek segítségével milyen új tudományos eredményeket lehet létrehozni, illetve azok milyen új tudáshoz fognak vezetni amely a módszer révén lehetővé válik. Ennek kifejtése hasznos lett volna.

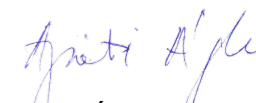
Köszönöm, hogy a Bírálóm rámutatott erre a hiányosságra, amit itt próbálok pótolni. A kalcium-indikátorok használata esetében az újdonság elsősorban a GCaMP2/6 fehérjék használatával kapcsolatban érdekes. Ezek a kísérletek megmutatták, hogy az őssejtek képesek szívizommá vagy neurális sejttypusokká differenciálódni, ha kis kópiaszámban fejeződik ki a GCaMP fehérje. A magasabb kópiaszám esetében a fehérje pufferhatása befolyásolja a differenciációt (*in vivo* rendszerekben ezért is használtak indukálható promotereket). Ezek az eredmények alapozták meg a későbbi patkány vesén (Szebényi 2015a) és szíven (Szebényi 2015b) folytatott kísérletsorozatot (amit a dolgozatom előszavában említettem), illetve a GCaMP6-ot kifejező neurális progenitorok humán *ex vivo* agysejtekké való beépülésének jelenleg folyó vizsgálatát. Ha ugyanis sikerül a progenitoroknak életben maradni, differenciálódni és beépülni a már létező hálózatba, akkor azt a Ca-szintek változása miatt a fluoreszcens jel követésével azonnal láthatjuk. Ezeket a vizsgálatokat Wittner Lucával és munkatársaival (Kognitív Idegtudományi és Pszichológiai Intézet - TTK) kezdtük el a múlt évben. Mindkét modell alkalmas toxikológiai és gyógyszerfejlesztési vizsgálatokra.

4, Érdekes megfigyelés, hogy az MSC kettes klón jelenléte dóziszfüggő módon elnyomja a limfociták mitogén választ és a következményes proliferációt. Ennek az eredménynek köze lehet ahhoz, hogy a mezenchimális őssejtek immunrendszer által ignorált sejtek, azaz különösebb immunválasz nélkül beültethetők idegen szövetbe. Kérdés, hogy ez az *in vitro* megfigyelés valóban hozzájárul-e az *in vivo* megfigyelt immunprivilegizációhoz?

A mezenchimális őssejtek (MSC) immunmoduláló hatásának részletes és mechanizmusig ható tanulmányozása intenzív kutatás tárgya (Lenn 2014). Az MSC-ről ismert, hogy alacsony immunogenitásúak, ami azt jelenti, hogy kisebb valószínűséggel váltanak ki immunválaszt a recipiensben továbbá, hogy gátolják a gyulladásos folyamatokat. Ez elsősorban a fő hisztokompatibilitási komplex (MHC) molekulák és kostimuláló molekulák alacsony szintű expressziójának, valamint számos immunszuppresszív faktor termelésének köszönhető. A mi megfigyelésünk is hozzájárult ehhez az ismerethez. Az antigén prezentáló dendritikus sejtekkel való kölcsönhatásukat is vizsgáltuk (Bacsikai 2015, Mazlo 2021), ami szintén befolyásolja az immunválaszt, de ezek a vizsgálatok nem képezik részét a dolgozatomnak. Míg az *in vitro* megfigyelések alapot adhatnak a sejt kölcsönhatások megértéséhez, az *in vivo* immunválaszt további tényezők is befolyásolják, mint például a szöveti mikrokönyezet, a szisztémás immunszabályozás és más immunsejtek jelenléte. Ezért, bár a limfocita proliferáció MSC által közvetített gátlásának *in vitro* megfigyelése érdekes, és tükrözheti az MSC-k immunmoduláló tulajdonságait, elengedhetetlen további vizsgálatok elvégzése, beleértve az *in vivo* kísérleteket is, hogy teljes mértékben megértsük ezeknek az eredményeknek az immunrendszerre gyakorolt

hatásait. Azt, hogy humán rendszerre vonatkoztatva *in vivo* kísérleteket hogyan lehet elvégezni (pl. humanizált vagy „avatar” egér kísérletek), a terület igen égető és nem teljesen megoldott kérdése. Az *in vivo* vizsgálatok segíthetnek tisztázni az MSC-k és az immunrendszer közötti összetett kölcsönhatásokat a szövetátültetés vagy a betegségmodellek összefüggésében, átfogóbb megértést nyújtva arról, hogy az MSC-k hogyan járulhatnak hozzá az immunválasz módosításához és a szövetek elfogadásához klinikai környezetben.

Végül szeretném ismét megköszönni Dr. Lacza Zsombor idejét és energiáját, amit dolgozatom bírálatára fordított.



Apáti Ágota Ph.D.

Budapest, 2020. 02. 15.

Irodalomjegyzék:

- Juriscova A, Acton BM. Deadly decisions: the role of genes regulating programmed cell death in human preimplantation embryo development. *Reproduction*. 2004 Sep;128(3):281-91. doi: 10.1530/rep.1.00241. PMID: 15333779.
- Sawicki WT(1), Kujawa M, Jankowska-Steifer E, Mystkowska ET, Hyc A, Kowalewski C. Temporal/spatial expression and efflux activity of ABC transporter, P-glycoprotein/Abcb1 isoforms and Bcrp/Abcg2 during early murine development. *Gene Expr Patterns*. 2006 Oct;6(7):738-46. doi: 10.1016/j.modgep.2005.12.003.
- Cederbye CN, Palshof JA, Hansen TP, Duun-Henriksen AK, Linnemann D, Stenvang J, Nielsen DL, Brüner N, Viuff BM. Antibody validation and scoring guidelines for ABCG2 immunohistochemical staining in formalin-fixed paraffin-embedded colon cancer tissue. *Sci Rep*. 2016 Jun 3;6:26997. doi: 10.1038/srep26997.
- a, Szabó A, Füredi A, Kolacsek O, Csohány R, Prókai Á, Kis-Petik K, Szabó A, Bősze Z, Bender B, Tóvári J, Enyedi Á, Orbán TI, Apáti Á, Sarkadi B. Visualization of Calcium Dynamics in Kidney Proximal Tubules. *J Am Soc Nephrol*. 2015 Nov;26(11):2731-40. doi: 10.1681/ASN.2014070705. Epub 2015 Mar 18. PMID: 25788535; PMCID: PMC4625667.
- b, Szabó A, Füredi A, Kolacsek O, Pergel E, Bősze Z, Bender B, Vajdovich P, Tóvári J, Homolya L, Szakács G, Héja L, Enyedi Á, Sarkadi B, Apáti Á, Orbán TI. Generation of a Homozygous Transgenic Rat Strain Stably Expressing a Calcium Sensor Protein for Direct Examination of Calcium Signaling. *Sci Rep*. 2015 Aug 3;5:12645. doi: 10.1038/srep12645. PMID: 26234466; PMCID: PMC4522653.
- lenn JD, Whartenby KA. Mesenchymal stem cells: Emerging mechanisms of immunomodulation and therapy. *World J Stem Cells*. 2014 Nov 26;6(5):526-39. doi:10.4252/wjsc.v6.i5.526. PMID: 25426250; PMCID: PMC4178253.
- Bacsikai I, Mázló A, Kis-Tóth K, Szabó A, Panyi G, Sarkadi B, Apáti Á, Rajnavölgyi É. Mesenchymal Stromal Cell-Like Cells Set the Balance of Stimulatory and Inhibitory Signals in Monocyte-Derived Dendritic Cells. *Stem Cells Dev*. 2015 Aug 1;24(15):1805-16. doi: 10.1089/scd.2014.0509. Epub 2015 Apr 29. PMID: 25808140.
- Mázló A, Kovács R, Miltner N, Tóth M, Veréb Z, Szabó K, Bacsikai I, Pázmándi K, Apáti Á, Bíró T, Bene K, Rajnavölgyi É, Bácsi A. MSC-like cells increase ability of monocyte-derived dendritic cells to polarize IL-17-/IL-10-producing T cells via CTLA-4. *iScience*. 2021 Mar 15;24(4):102312. doi: 10.1016/j.isci.2021.102312. PMID: 33855282; PMCID: PMC8027231.