



Biological Research Center
Hungarian Academy of Sciences
Center of Excellence of the
European Union
INSTITUTE OF BIOCHEMISTRY

H-6726 Szeged, Temesvári krt. 62.
H-6701 Szeged, P.O.Box 521.
Tel.: +36-62-599-654
Fax: +36-62-433-506
e-mail: bkttik@brc.hu
www.brc.hu/sysbiol/

Szeged, 2018 02.12

MTA doktori dolgozat

Dr. Pál Csaba

Válaszok Dr. Meszéna Géza kérdéseire

Mindenek előtt szeretném megköszönni az értő, és gondolatébresztő észrevételeket. Alant a részletes válaszok:

Az evo-devo, azaz az evolúciós (egyed)fejlődésbiológia ügye – távolról nézve – elég hasonló az evolúció és a rendszerbiológia javasolt egyesítéséhez: a magasabbrendű állatok esetében az egyedfejlődés az egyik alapvető közvetítés a genomtól a fenotípusig. Első kérdésem ezzel kapcsolatos, és nagyon elvi jellegű: lát-e a Szerző mélyebb kapcsolatot e két irányzat között, és reális esélyt valamilyen szintézisükre? Vagy ami talán ugyanaz: képes lehet-e a rendszerbiológiai kultúra érdemben befogadni a sejt-nél magasabb szerveződési szintet?

Létezik egy új tudományág, amelyet a képviselői System Developmental Biology névvel illetnek (pl. Perrimon és Barkai 2011, Current Opinion in Genetics and Developmental Biology). Egyik célkitűzése az, hogy a genomika és egyéb rokon tudományterületek adatait összegezve rekonstruálja magasabb rendű élőlények genetikai szabályozó hálózatait, és ezek alapján modellezze az egyedfejlődés kulcseseményeit.

Ami viszont (szerintem) sokkal közvetlenebbül kapcsolódik a bemutatott munkákhoz, az az evolúciós ökológiai probléma, amely azt egysejtű szinten is fellép, de amely – tudomásom szerint – nem kap elegendő figyelmet. Ha egy adott környezetben a gének jó részére nincs igazán szükség, akkor arra gondolhatnánk, hogy a sok gént tartalmazó szervezeteket kiszoríthatják a sokkal specializáltabb, de jóval kisebb genommal rendelkező, s ezért gyorsabban reprodukálódó változatok. Miért ilyen bonyolult akkor egy baktérium? Nyilván egy lehetséges magyarázat az, ha a szervezet nem számíthat egy állandó környezetre, hanem képesnek kell lennie megélni sokféle körülmény mellett. Akkor viszont a hosszútávú fitnesszt nem az egyes környezetekben külön-külön kellene meghatározni – tehát ismerni kellene a szervezet ökológiáját.

Egyetértek. A genetikai bonyolultság sok esetben csak látszólagos. Az élőlény életmódjának és ökológiájának a pontos ismerete szükséges ahhoz, hogy megértsük miért vannak jelen látszólag eldobható gének. Papp Balázs kollégámmal azt a nézetet képviseljük évek óta, hogy egysejtűekben a gének jelentős része csak nagyon speciális környezeti körülmények között kulcsfontosságú (Papp és kollégái Nature 2004). Sajnos számos egysejtű esetén - az evolúció szempontjából kulcsfontosságú - környezeteket csak hiányosan ismerjük.

A teljes ökológiai megértéséhez persze nyilván nehéz eljutni. A konkrét flux-balance elemzés kapcsán szeretnék rákérdezni arra, milyen jellegű különbség volt a 282 vizsgált tápközeg között? (A Nature cikk ábrái néhány

kombinációt mutatnak be.) Adódott valami olyasfajta tanulság, hogy minden esetben azok a gének esszenciálisak, amelyek az éppen jelenlévő tápanyag feldolgozásához szükségesek? Minden génhez meg lehet találni azt a környezetet, amelyben ő az esszenciális?

Ebben a munkában (Papp és kollégái Nature 2004) arra a kérdésre próbáltunk választ adni, hogy miért vannak eldobható gének, amelyek "kikapcsolása" látszólag semmilyen káros következménnyel jár. Sokan úgy vélték, hogy ezek a gének biztonsági tartalékok, amelyek a szervezet mutációkkal szembeni robusztusságát (ellenállókéességét) növelik. Egy másik – nem kizárólagos - lehetőség, hogy ezek a gének csak specifikus környezetben fontosak.

Munkánkban meglévő biokémiai és genomikai adatok alapján rekonstruáltuk a sörélesztő szinte teljes anyagcserehálózatát. A hálózat működését számítógépes eszközökkel modelleztük. Valós adatokkal összevetve azt találtuk, hogy a kulcsfontosságú géneket 84% biztonsággal tudtuk megjósolni.

A környezet ebben a keretben rendkívül egyszerű: egy-egy meghatározott tápanyag kombináció. Az élőlény anyagcserehálózatának ezeket a tápanyagokat kell hasznosítania, azaz a sejt számára fontos molekulákat kell létrehozni. Akkor válik egy gén kulcsfontosságúvá egy adott környezetben, ha "kikapcsolása" esetén a hálózat ezen molekulák egy részét már nem tudja létrehozni. Azaz, minden környezethez tartozik egy lista a kulcsfontosságú vagy esszenciális génekről. Ez a lista nagy eltérést mutat környezetenként (Papp és kollégái Nature 2004, Supplementary Information).

És mi is az, hogy fitnessz? A fitnessz fogalmával van egy alapvető ökológiai probléma, amelyet a genetikai gondolkodás nem eléggé tart számon. Állandó környezetben egy populáció előbb-utóbb lenyomja táplálékforrásait annyira, hogy egyensúlyba kerüljön – a növekedési rátával mért fitnessze tehát nulla lesz, amin ily módon nincs mit mérni. Ha viszont nem a leterhelt, hanem a telítési tápanyag-koncentráció mellett vizsgáljuk a növekedést (és gyakran az így mért növekedési rátát tekintik fitnessznek), akkor nem abban a környezetben tanulmányozzuk az organizmust, amelyben ténylegesen él. Például az egyetlen tápanyag által limitált organizmus esetén a versengést az a változat nyeri, amelyik a legalacsonyabb tápanyag-koncentráció mellett tudja fenntartani a populációját – s ennek nem kell azonosnak lennie a magas tápanyagszint mellett leggyorsabban növekedő változattal.

Nehéz és összetett kérdés. Arra fókuszálnék, hogy a laboratóriumban hogyan lehet igazolni a bíráló felvetését. Úgy látom, ennek két kulcs eleme van:

- 1) A "relatív" rátermettséget (fitnesszt) kell mérnünk: nem egy adott populáció növekedési rátáját, hanem két azonos fajba tartozó genotípus arányának változását az idő függvényében. Erre szolgálnak az úgynevezett kompetíciós kísérletek. Általában azonos arányban helyezünk el egy adott tápoldatban vad típusú és egy adott mutációt tartalmazó populációt, majd meghatározott idő után (ami tipikusan 24-72 óra) meghatározzuk a két genotípus arányának a változását, és ebből az egymáshoz viszonyított rátermettséget (részletek Elena és Lenski Nature Reviews Genetics 2011). Ebből következtethetünk az adott mutáció előnyös vagy hátrányos voltára.
- 2) Ezeket a kísérleteket végezhetjük olyan feltételek mellett, ahol a fizikai körülmények - így a tápanyag mennyisége is - a kísérlet során végig állandó. Erre szolgál a kemosztát. A kemosztát egy további előnye, hogy a tápanyag mennyiségét könnyen tudjuk szabályozni, így nagyon alacsony és magas tápanyagkoncentráció is beállítható.

A problémát nem oldja meg, csak elbonyolítja, ha a környezet nem állandó. Nem lehet, hogy a látszólag felesleges gének problémája ezekkel az ügyekkel kapcsolatos?

Erre a problémára fentebb már reagáltam.

A pontos gondolkodás a referencia-változat egyensúlyi körülményei között (illetve a hosszútávú stationarius fluktuáció kontextusában) vizsgálja az előnyös, vagy hátrányos mutánsok pozitív, vagy negatív növekedési rátáját, nem pedig ideális körülmények közötti pozitív rátákat hasonlítja össze. Ezt a gondolatot azonban

különösen nehéz lesz implementálni akkor, ha a sejt életének, a rá ható szelekciós tényezőknek meghatározó eleme a fluktuáció. S vajon meddig terjed a metabolikus fluxusokon alapuló megközelítés érvényessége? Egy jó körülmények között gyorsan osztódó sejt számára a biotermelés alapvető, tehát könnyű elképzelni, hogy a fitness a fluxusokon múlik. Egy ilyen periódus azonban szükségképpen átmeneti. A rossz periódus túlélésével, a következő tápanyagforrás megtalálásával kapcsolatban ez már sokkal kevésbé világos.

Én is így látom. Az általunk alkalmazott metabolikus modell (flux balance analysis) nagy előnye az egyszerűség és így alkalmazhatósága genom léptékű elemzésekhez. Ám ennek nagy ára van. A modell nem válaszol arra a kérdésre, hogyan és milyen gyorsan reagál a sejt a környezet (tápanyagforrás) megváltozására.

Pedig ez egy nagyon fontos kérdés. Kísérletekkel igazolták, hogy két alapvető törvényszerűség befolyásolja a metabolikus reakciók aktivitását (fluxusait) egysejtűekben (Schuetz és kollégái Science 2012). Egyrészt az optimális növekedés biztosítása, másrészt fluxusok minimális átrendeződése, ha a tápanyagforrás megváltozik. Azaz egy adott anyagcsere útvonal nem csak azért lehet aktív, mert szükség van rá egy adott környezetben, hanem azért is, hanem mert a sejt gyakran kerül egy másik B környezetbe, ahol az útvonal fontos. Az útvonal ki és be kapcsolása túl időigényes lenne.

A populációgenetika ökológiamentes hagyományának hallgatólagos feltevése az, hogy az ökológiai visszacsatolások nem-szelektívek, hanem minden változatra egyformán hatnak. Ezzel a feltevéssel lehet a szelekció gyakoriságfüggésétől eltekinteni. A feltevés lehet, hogy teljesül, lehet, hogy nem, attól függően, milyen tulajdonságot vizsgálunk. Biztosan érvénytelenné válik viszont, ha a gének összességét tesszük vizsgálat tárgyává. Azt kérdezem tehát, hogy lát-e a Szerző esélyt arra, hogy a metabolizmus modellezését ki lehessen egészíteni az ökológia realisztikusabb modellezésével?

Egy új irány a fajok közötti ökológiai kölcsönhatások vizsgálata a metabolizmuson keresztül. Ismert tény, hogy a különböző fajok gyakran egymásr utaltak és kulcs anyagcsere termékeket cserélnek egymás között. Ezen speciális együttműködés (kooperáció) kialakulását tanulmányozták kísérletek és metabolikus modellekkel egyaránt (pl. Klitgord & Segre PLoS Comput. 2010 és Wintermute & Silver Mol. Syst. Biol. 2010).

S akkor lényegesen rövidebben a dolgozat további témáiról is.

A Szerző a dolgozat elején jogos büszkeséggel említi meg egy 2001-ben publikált eredményét arról, hogy egy adott gén evolúciós sebessége negatívan korrelál expressziós szintjével – amire egy paradigmaváltás kezdeteként tekintenek mások. A dolgozat azonban később nem utal erre a kérdésre vissza semmilyen módon. Kérdezném a Szerző későbbi kutatómunkájának esetleges kapcsolatát ezzel a korai eredménnyel, illetve azt, hogy hogyan látja ezen összefüggés helyét a mai kontextusban?

Ez a munka nagyon szerencsés csillagzat alatt született, a doktori tanulmányaim során. Papp Balázs és Laurence Hurst kollégámmal nem gondoltuk, hogy ez ilyen fontos eredmény. Az adatok fényében mára a kutatók túlnyomó többsége úgy véli, hogy a gének evolúciós sebességét a legtöbb vizsgált fajban a génkifejeződés mértéke, és nem a gén fontossága határozza meg. Jelenleg számos rivális elmélet van arról, hogy mi a jelenség mozgatórugója. Ezekről a Nature Reviews Genetics egy külön összefoglaló munkát közölt (Zhang & Yang 2015). Jelenleg nem foglalkozunk aktívan ezzel a kérdéssel.

Nagyon érdekesnek találom a kompenzáló evolúcióról szóló eredményeket, különösen azt, hogy egy gén kiesése után a bekövetkezett negatív hatás jelentős mértékben, de nem teljes egészében kompenzálódik. A következőképpen vélem érteni a dolgot. Ha a metabolizmus evolúciósan jól be van optimalizálódva, akkor a hálózat minden éle körülbelül arra a fluxusra képes, amelyre szükség van az optimális növekedés fenntartásához. Ha egy reakció kiesik, akkor a többi reakció lehetőségei kihasználhatatlanná válnak. Ettől hirtelen nagyon előnyössé válhatnak azok a mutációk, amelyek valahogy kerülőúton kipótolják a kiesett reakciót. Ugyanezek a mutációk nem vezetnének fitness-előnyre az eredeti kontextusban, amikor a hálózat

egésze nem enged meg gyorsabb növekedést. Ez lehet a magyarázata annak, hogy a dolgozathoz csatolt PLOS Biology cikk sematikus 1. ábráján látható három fitness csúcs magassága nagyságrendileg hasonló, de a két „tartalék” csúcs magassága azért elmarad az eredetitől. Jól értem ezt? Lehet valahogy látni akár empirikusan, akár elméletileg, hogy valami ilyesmiről van szó? Valami hasonló történik talán, ha egy funkció nem mutáció, hanem antibiotikum hatására sérül? Lehet, hogy ilyesmi van az antibiotikum-rezisztanciák kölcsönhatásai mögött is?

A Plos Biology –ban közölt munkánk egy teljesen empirikus munka. Azt kérdeztük meg, hogy egy gén hiányát lehet-e és ha igen, hogyan - kompenzálni más mutációk révén. A vizsgált gének jelentős része nem hat közvetlenül az vizsgált egyszélű (sörélesztő) anyagcseréjére, és így az első ábra is inkább sematikus. Ennek ellenére a felvetés jogos és fontos. Sokat gondolkoztunk azon, hogy ötvözzük az anyagcseremodelleket és a kísérleti evolúció eszköztárát (Papp és kollégái Nature Reviews Genetics 2011), de a kompenzáló evolúció kapcsán még nincsenek megbízható eredményeink.

A pORTMAGE módszerről szóló fejezet alkalmazásként egy a genoméret csökkenés okait vizsgáló kutatásról számol be. Az alapvető következtetés az, hogy nem-esszenciálisnak látszó genom-szegmensek kivágása nem vezet hatékonyság növekedésre; a negatív mellékhatások nagyobbak a kisebb genoméret energetikai előnyénél. De hát ez nem pont ugyanaz a kérdés, hogy a szóban forgó genomrészek valójában igenis esszenciálisak? Ha a genoméretnek nem lenne számottevő energetikai ára, akkor azt tapasztalnánk, hogy a baktérium-genomok tele lennének odakerült, teljesen funkció nélküli és nagyon gyorsan mutálódó szakaszokkal – ami nincs így. A lecsökkenő genoméretet nem tudnám mással magyarázni, mint a genoméret csökkentése irányába ható szelekcióval – természetesen csak akkor, ha valamiért (például nagyon stabil jó környezet) a genom egy része *tényleg* feleslegessé válik.

Teljesen egyértelmű. A bakteriális gének döntő része valóban kulcsfontosságú az élőlény számára. De egy jelentős részük csak meghatározott specifikus környezetben, és nem standard laboratóriumi körülmények között. Ezt támasztja alá, hogy azok a baktériumok, amelyek genomja másodlagosan leegyszerűsödött gyakran igen stabil környezeti körülmények között élnek: endoszimbionták vagy intracelluláris paraziták.

A pORTMAGE cikk egyébként a megjelenése óta eltelt rövid időhöz képest igen jó hivatkozottságú. Van a Szerzőnek áttekintése arról, mire kezdték el használni?

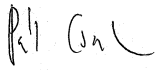
A pORTMAGE egy genom mérnöki eljárás, ami lehetővé teszi, hogy hatékonyan, precízen módosítsuk az élőlény genomját. A CRISPR alapú technológiákkal szemben számos hátránya és egy nagy előnye van. A hátránya az, hogy egyelőre csak meghatározott baktérium fajban működőképes. A nagy előnye az, hogy képes arra, hogy egyszerre nagyon sok ponton módosítani a baktérium genetikai állományát, mindezt anélkül, hogy más, nem kívánt pozíciókban mutációkat generálna. A pORTMAGE segítségével 10-20 előre meghatározott mutáció integrálása napok és nem hónapok kérdése. Mivel az eljárás igen egyszerű, 2016 óta több mint 60 labor alkalmazza (azaz ennyi labor igényelte az eljáráshoz szükséges plazmidokat).

A potenciális alkalmazások igen széles skálán mozognak az alapkutatástól, a biotechnológián keresztül a klinikai jellegű vizsgálatokig. A pORTMAGE alkalmas metabolikus útvonalak optimalizálására, irányított fehérje evolúcióra és az antibiotikum rezisztencia vizsgálatára egyaránt. Jelenleg azt teszteljük, hogy pORTMAGE – illetve továbbfejlesztett változata - segítségével találhatunk-e rezisztencia mentes antibiotikum molekulákat. A rövid válasz: nem, de vannak biztató, fejlesztés alatt álló molekulák.

Végezetül fontos megjegyezni, hogy a pORTMAGE alapötlete és kidolgozása phd hallgatóm, Nyerges Ákos munkáját dicséri.

Összefoglalva: egyértelmű, hogy a dolgozatban bemutatott eredmények, a Szerző többi munkájával egyetemben, a nemzetközi tudományos élvonalhoz tartoznak – illetve helyenként ezek a munkák maguk az

élvonal. Természetesen elfogadom a tézisfűzetben ismertetett tudományos eredményeket, és javasolom a nyilvános védés kitűzését.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Pál Csaba'.

Dr. Pál Csaba
MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont