

Válaszok Dr. Bay Péter opponensi kérdéseire

Köszönettel tartozom Dr. Bay Péternek, hogy időt áldozott értekezésem olvasására és minden szempontból alapos értékelésére. Sajnálatos, hogy hasznos megjegyzései és javaslatai alapján már nem módosítható az értekezés, melyek minden bizonnyal emelték volna annak értékét.

A Bíráló értekezéssel kapcsolatos kérdéseire az alábbiakban válaszolok:

A Jelölt az in vitro kölcsönhatási assay-k in vivo megerősítését javasolja (61. oldal). Mit jelent ebben az esetben az in vivo?

Az in vivo kifejezés itt teljes növényben, nem tenyésztett növényi sejtekben végzett vizsgálatokra utalt. Talán szerencsésebb lett volna az in planta kifejezést használni a félreértések elkerülése végett.

1. Kérem a Jelöltet, hogy szedje össze és listázza a legfontosabb eredményeit.

Sajnálom, hogy a legfontosabb eredményeink feltüntetésének hiányával plusz feladatot adtam az Opponensek. Az alábbiakban összegezném a legfontosabb eredményeinket:

1. A búzacsíra alapú, sejtmentes transzláció rendszer alkalmazhatóságát növeltük egy vektorcsalád létrehozásával. A család tagjai lehetővé teszik a fehérjéket kódoló vektorkonstrukciók rutinszerű, gyors létrehozását, illetve a termelt fehérjék változatos affinitáscímkekkel történő tisztítását. A rendszerrel elsőként igazoltuk, hogy a GLUT10 fehérje a dehidroaszorbát transzportjárt felelős.

2. Az aptamerjelöltek szűréséhez szükséges nagyszámú, megfelelő mennyiségű és minőségű egyszálú DNS előállítására kifejlesztettük a primerblokkolt aszimmetrikus PCR-t (PBA-PCR).

3. Igazoltuk, hogy AlphaScreen jól alkalmazható az aptamer-fehérje kölcsönhatások tanulmányozására. Bemutattuk, hogy a módszer a PBA-PCR-rel ötvözve alkalmazható az aptamerjelöltek szűrésére.

4. Azonosítottuk a módosított nukleotidokat tartalmazó aptamerkönyvtár amplifikációjára alkalmas termofil DNS polimerázokat.

5. Olyan Ochratoxin A szelektív aptamereket izoláltunk, amelyek képesek a célmolekula és attól egy metilcsoportban különböző Ochratoxin B közötti differenciálásra.

6. Az alma törzsgödörösödés vírusra (ASPV) és a légúti óriássejtes vírusra (RSV) aptamereket szelektáltunk. Az ASPV aptamereinkkel kifejlesztettünk a DOS-ELONA eljárást. Az RSV aptamereinkkel igazoltuk, hogy alkalmas a vírus klinikailag releváns koncentrációban történő kimutatására.

7. Kardiovaszkuláris biomarker fehérjékre aptamereket és spiegelmereket szelektáltunk. Kidolgoztunk egy, a kardiális troponin I mérésére alkalmas spiegelmer szendvics ELONA eljárást.

2. A 13. oldalon a zárványtestből történő fehérjetisztításról ír a Jelölt. Ellentmondást érzek a fejezetben. Egyrészt leírja, hogy rekombináns fehérjetermelés esetében a szolubilis frakcióban való dúsulás a szerencsésebb, a zárványtestekben történő dúsulással szemben.

Majd ennek az ellenkezőjét is leírja. A legjobb tudásom (és tapasztalatom) szerint tisztítási szempontból a zárványtestek előnyösebbek, mert könnyen tiszta formában nyerhető ki a célfehérje. Tulajdonképpen a denaturálás inkább járulékos rosszként fogadjuk el.

Annyiban egyetértek a Bíráló megjegyzésével, hogy valóban ellentmondásos a kérdéses bekezdés. Ez az ellentmondás azonban zárványtestekkel kapcsolatos véleményemet tükrözi. Meglátásom szerint a zárványtestek képződés nem egyértelműen előnyös vagy hátrányos jelenség, bizonyos esetekben szerencsésnek, míg más esetekben hátrányosnak tekinthető. A megfigyelések alapján az immunizálásra használandó fehérjék termelése során a zárványtest-képződés üdvözlendő, és még csak a fehérje-renaturációra sincs szükség, mivel a kicsapódott fehérjék időben elnyújtva szívódnak fel, így erősebb immunválaszt eredményezhetnek. Kutatásaim során ezzel a megközelítéssel állítottunk elő az AtMPK9 fehérjére szelektív ellenanyagot. A zárványtestek keletkezése akkor is előnyös lehet, ha nagy mennyiségben és rendszeresen kell előállítani egy adott fehérjét, mivel a zárványtestek kialakulása nagymértékben csökkentheti a fehérjetisztítás folyamatát és költségét. Ezekben az esetekben az optimális fehérje-renaturálási folyamat próba-szerencse alapú kidolgozása egy megtérülő „befektetés”.

A fenti példákkal szemben az általános molekuláris biológiai laboratóriumokban a zárványtestek keletkezése gyakrabban jelent hátrányt, mint előnyt. Munkám során többször szembesültem (pl. ciklinek és ciklin-függő kinázok előállításakor) ezzel a nehézséggel. Azokban az esetekben, amikor néhány tíz µg fehérje elegendő a vizsgálatokhoz, és a megfelelő kísérletek lezárultával nincs szükség a tanulmányozott fehérje nagy mennyiségű előállítására, a renaturációs folyamat optimalizálására irányuló hosszas és kétséges kimenetelű eljárás a további munka fő korlátozójává válhat, és nem összeegyeztethető a nagyáteresztő-képességű funkcionális fehérjevizsgálatokkal. Megjegyzendő, a fehérje szolubilizálása nem jár szükségszerűen együtt a natív harmadlagos szerkezet kialakulásával. Ennek következtében nem kizárható, hogy az oldatba vitt fehérje nem funkcionális, és az alkalmazásukkal kivitelezett kísérletek eredményei félrevezetőek lehetnek. Mindezek tényezőket figyelembe véve kijelenthető, hogy a zárványtestképződés hasznosságát illetően pro és kontra is vannak érvek, de egy általános molekuláris biológia laboratóriumban megjelenése gyakrabban akadályozó körülmény, mint előny.

3. 23. oldal „A WHO által javasolt enzimek döntő része napjainkra teljes mértékben kiszorult az AMI diagnosztikából”. Ez így biztosan nem igaz, ma is végeznek kémiai vizsgálatokat, ahogy a Jelölt lejjebb részletezi is. Valószínűleg az eredetileg javasoltakra céloz a Jelölt.

A Bíráló észrevétele teljes mértékben helytálló, a pontatlan megfogalmazás következtében félreérthető a jelzett mondat. A mondat helyesen úgy kezdődne: „A WHO által 1979-ben javasolt enzimek...”. A mondat abban a tekintetben is javításra szorulna, hogy a WHO 2008-as AMI definíciója a korábban ajánlott kreatin-kináz, laktát-dehidrogenáz és aszpartát-aminotranszferáz enzimek meghatározása helyett, már a napjainkban szívizomlézió markereként elfogadott szívizom specifikus troponinok mérését javasolja.

<https://doi.org/10.1093/ije/dyq165>

4. A sikeres aptamer szelekcióhoz az oligonukleotid több nagyságrendnyi feleslege szükséges (42. oldal). Miért? Számomra egy egyensúlyban gondolkozva ez gyenge kötődést sugall.

A kijelentés az aptamerszelekció első ciklusára vonatkozik, amelyben 1 nmól oligonukleotidot adunk az immobilizált célmolekulához. A random oligonukleotid szintézis

következtében ez elméletileg 10^{14} különböző, a célmolekulához történő kötődésért egymással vetélkedő oligonukleotidot jelent. Habár a nagy áteresztőképességű szekvenálással történt analízis alapján az egyedi oligonukleotidok száma mintegy két nagyságrenddel alacsonyabb az elméletinél, gyakorlatilag úgy tekinthetjük, hogy minden oligonukleotid egyetlen kópiában van jelen a kiindulási könyvtárban. Ennek megfelelően az egyensúly kialakulásánál az egyedi oligonukleotidok rendkívül alacsony koncentrációját kell figyelembe venni. Mindezek fényében a célmolekulákhoz erősen kötődő oligonukleotidok izolálása várható az első szelekciós lépésben, és a gyakorlatban nagyobb veszélyt jelent az egyes oligonukleotidok elvesztése, mint a gyengén kötődők izolálása. A további szelekciós lépésekben folyamatosan szűkül az oligonukleotid könyvtár változatossága, de még az utolsó lépéseknél is több ezer egyedi nukleinsav-szekvencia azonosítható. Ezeknél a lépéseknél a kiindulásnál nagyságrendekkel alacsonyabb oligonukleotid mennyiséget alkalmazunk, csökkentjük a célmolekula mennyiségét, és folyamatosan növeljük a szelekciós nyomást – inkubációs idő rövidítésével, mosó puffer összetételének változtatásával -, így elősegítve a célmolekulához legnagyobb affinitást mutató aptamerek szelekcióját.

5. A búzacsíra in vitro expressziós rendszer a Jelölt saját fejlesztése? Amennyiben igen, kérem, ismertesse a rendszert. Amennyiben nem, akkor kérem, tisztázza a rendszer származását.

Sajnálom, hogy az értekezés "Irodalmi áttekintés" vonatkozó fejezetében a módszert leíró közleményekre történő hivatkozáson túl nem nevesítettem az optimalizált búzacsíra in vitro transzlációs rendszer kifejlesztőét Yaeta Endo professzort. A rendszert az Ehime University-n a professzor vezetésével fejlesztették ki, melynek részletei az értekezésben, illetve annak 47. és 49. hivatkozásában található. 2006-ban 6 hetet töltöttem az egyetem kutatócsoportjában, és látogatásom után a hazai laboratóriumban is készítettünk búzacsíra alapú in vitro transzlációs rendszert. A rendszer általunk, kisléptékben történő összeállítása azonban nem bizonyult költséghatékonyabbnak, mint az értekezés Anyagok és módszerek fejezetében feltüntetett CellFree Sciences vállalatától történő beszerzése, így a továbbiakban nem állítottunk elő saját transzlációs elegyet. A rendszer fejlesztéséhez kutatócsoportunk az alkalmazható vektorok optimalizálásával járult hozzá, mely munkák részben Endo professzorral együttműködésben kerültek megvalósításra.

6. Szintén a búzacsíra kivonat transzlációs rendszerrel kapcsolatban szeretném megkérdezni, hogy miért jobb ez a rendszer az ismert pl. retikulocita alapú rendszereknél? Nem lehetnek gondok a poszttranszlációs módosítások esetében növény vs. emlős rendszerek különbségei miatt? Később a poszttranszlációs módosítások jelentőségéről hosszabban ír a Jelölt.

A nyúl retikulocita kivonat alkalmazása során nem szembesülünk a helytelen fehérjehajtogatás kérdésével, a rendszer legnagyobb hátulütője annak magas költsége. A retikulocita tisztításhoz ugyanis nagy mennyiség acetilfenil-hidrazin-kezeléssel anaemiássá tett nyúl vére szükséges, és az endogén mRNS eltávolításához mikrokokkális nukleázzal kell kezelni a kivonatot. A retikulocitán alapuló in vitro transzláció használata során további nehézséget jelent, hogy a retikulocita globinra optimalizált kodonhasználatát követően más fehérjék szintézise kevésbé hatékony, illetve a magas endogén hemoglobintartalom megnehezítheti a termék tisztítását.

A búzacsíra embrióban a transzlációs rendszer komponensei dehidratált, inaktív állapotban várakoznak a csírázáskor beinduló nagyléptékű fehérjésintézisre. A búzacsíra könnyen elérhető, endogén mRNS-tartalma alacsony, rugalmas kodonhasználatának köszönhetően

pedig a különböző organizmusokból származó, eltérő kodonpreferenciával rendelkező kódoló régiókról közel azonos hatékonysággal szintetizálja a fehérjét.

Az in vitro transláció heterogén fehérjék előállítására történő alkalmazásánál gyakran felmerül az kritika, hogy a nem megfelelő poszttranszlációs módosítások következtében, a termelt fehérjékkel kivitelezett vizsgálatok félrevezető eredményekhez vezethetnek. Az emlős sejtekben ismert poszttranszlációs módosításokat (foszforiláció, lipidáció, glikoziláció, metiláció stb.) jórészt növényekből származó mintákban is azonosították.

(<https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01168>) Az egyéb organizmusokhoz hasonlóan, növényekben is a foszforiláció a legszéleskörűbben feltárt poszttranszlációs módosítás, és az eredmények alapján kijelenthető, hogy a foszforilációs mintázatok az olyan evolúciósan konzervált kinázokon, mint pl. a MAPK-ok, illetve azok szubsztrátjain nagyfokú homológiát mutatnak az állati megfelelőikkel. (https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6859-6_10) Hasonló következtetésre jutott az a tanulmány is, amelyben a növényi és humán N-terminális acetilációt vetették össze, ugyanis az N-terminális leggyakrabban előforduló aminosavak ebben az esetben is átfedést mutattak. (<https://doi.org/10.1074/mcp.M111.015131>) Ezekkel a módosításokkal szemben a humán és növényi glikoziláció karakteres eltérést mutat (<https://doi.org/10.2174/1381612811319310006>) Ez a legutóbbi tényező azonban nem befolyásolja az in vitro transláció eredményességét, mivel a hagyományosan alkalmazott sejt kivonatok nem tartalmaznak mikroszómát, így glikozilált fehérjék termelése nem várható. E megfigyelések alapján elméletileg a növényi sejt kivonatokban is bekövetkezhetnek az emlős fehérjékre jellegzetes poszttranszlációs módosulások, általános kijelentéseket azonban nem megfogalmazhatók. Amennyiben a kísérletek szempontjából fontos, minden fehérje esetében egyedi vizsgálatokat kell végezni a poszttranszlációs módosulások pontos feltérképezéséhez. Az erre a kérdésre fókuszáló szakirodalom rendkívül szegényes, legjobb tudomásom szerint humán fehérjére vonatkozó vizsgálatok eredményei nem kerültek közzésre. Japán kollaborációs partnerünk személyes közlése alapján tudjuk, hogy búzacsíra-kivonatban transzlált ecet muslica és humán hisztonokon az N-terminális metionin lehasítása az egyetlen megfigyelhető poszttranszlációs módosítás. A búzacsíra proteomjában 12 olyan fehérjekinázot írtak le, amelyek aktiválása nem igényel további faktorokat, a translációs elegyben is képesek a katalízisre. (<https://doi.org/10.1007/s10142-005-0018-8>) Ennek megfelelően a búzacsíra fehérjékivonatban várhatóan a foszforiláció a leggyakrabban előforduló poszttranszlációs módosítása az előállított humán fehérjéknek. Habár közvetlen eredmények nem igazolják, feltételezhető, hogy a búzacsírában azonosított kinázok humán fehérjekinázok foszforilálására is képesek, mivel a "Human Protein Factory" kísérletek során, olyan humán kinázok is rendelkeztek aktivitással, melyeknek aktivitása foszforiláció-függő. (<https://doi.org/10.1038/nmeth.1273>) Nem kizárható, hogy a heterológ rendszerben bekövetkezett foszforilációk nem várt aminosavakon is bekövetkezhetnek, ez azonban kevésbé valószínű, ugyanis a fehérjekinázok magas szubsztrátspecifitással rendelkeznek. Megfigyeléseink szerint a homológ rendszerben is csak a megfelelő fehérjekináz jelenlétében következik be foszforiláció, a translációs elegy endogén kinázai nem módosítják az AtMPK9 fehérjét. (<https://doi.org/10.1042/BJ20141176>) Mindezek figyelembevételével kijelentő, hogy a búzacsíra-fehérjékivonattal előállított fehérjék poszttranszlációs módosítása általánosságban elenyésző, és a poszttranszlációs módosításokkal kapcsolatos potenciális eltérések az eddigi tapasztalatok alapján nem korlátozzák érdemben a búzacsíra-alapú in vitro rendszer alkalmazhatóságát.

Fontos kiemelni, hogy az in vitro rendszerek alkalmazásával kapott adatokat minden esetben fenntartással kell kezelni, azokat más, lehetőleg in vivo módszerekkel is meg kell erősíteni. Ez a kitétel természetesen az in vitro transzlációval kivitelezett kísérletekre is vonatkozik.

7. A 78. oldal alján az aptamer könyvtárak és az amplifikáló PCR reakciók torzulásáról ír a Jelölt. Arra kérem, hogy magyarázza meg részletesebben, hogyan jutott arra, hogy a szekvenálási adatok alapján a PBA-PCR nincs hatással a könyvtár komplexitására. A jelenlegi leírás alapján egy önmagával magyarázott vagy hiányos magyarázatú a következtetés.

A PBA-PCR során esetlegesen kialakuló PCR-torzítás jelenségét HT szekvenálással vizsgáltuk, melynek eredményeként 203795 oligonukleotid szekvenciáját határoztuk meg. Az összes oligonukleotidból 203433, azaz több mint 99%-uk rendelkezett egyedi szekvenciával. A kémiai szintézissel létrehozott random DNS könyvtárakban csak elméletileg egyedi minden szekvencia, így ezek a könyvtárak már a kémia szintézis során torzultak. Ennek figyelembevételével, kijelenthető, hogy a PBA-PCR-rel amplifikált kiindulási könyvtár oligonukleotid szekvencia gazdagsága érdemben nem változott, az eljárás az aptamer szelekció szempontjából elhanyagolható mértékben torzítja a könyvtár összetételét.

8. A 4.45 ábrán az (a) és a (b) oszlopok mit jelentenek?

Köszönöm az észrevételt, a nevezett és az azt követő ábra feliratáról sajnálatosan lemaradt az oszlopok, illetve vonalak jelölésének értelmezése. Az a és b oszlopok rendre a B10 és A4 spiegelmereket jelölik.

Végezetül még egyszer szeretném kifejezni köszönetemet az Opponensnek az értekezés minden részletére kiterjedő alapos bírálatáért.

Budapest, 2022. június 7.



Mészáros Tamás