

## Válasz Dr. Mészéna Géza bírálataira

Először is szeretném megköszönni az értekezésem bírálatát és az elgondolkodtató kérdéseket. A feltett kérdésekre az alábbiakban válaszolok.

**Az egyik legnagyobb kérdés: mi a fitness, és mekkora hányadban múlik a metabolizmuson? A vizsgálat alapja az 1. táblázatban ismertetett „flux balance analysis”, amely a metabolikus hálózat fluxusait optimalizálja a természetszerűen fennálló kényszerek – sztochiometriák és fluxus korlátok – figyelembevételével. A munkában tehát ennek az optimalizációnak a célfüggvénye a fitness proxija. A leírás azonban nagyon szűkszavú abban, hogy hogyan is határozódik meg ez a célfüggvény.**

**Annyi kiderül, hogy a növekedést egy pseudo-reakció reprezentálja, amely megszívja a növekedéshez szükséges metabolitokat. Jól értem, hogy ennek a pseudoreakciónak a maximálisan elviselhető értéke – azaz az elérhető biomassza-növekedési ráta – célfüggvény? Akkor ehhez kellenek adatok arról, milyen arányban terheli a növekedés az egyes metabolitokat? Vagy ez a terhelés egyszerűen arányos a metabolit koncentrációjával a biomasszában?**

Így van, a célfüggvény egy pseudoreakció amelyben az egyes megtermelendő biomassza-alkotók meghatározott arányban szerepelnek. Ez az arány empirikus adatokból jön, lényegében a sejt összetételét tükrözi és megadja, hogy 1 gramm új sejt felépítéséhez melyik makromolekuláris építőközből és kofaktorból mekkora mennyiségre van szükség és mennyi energia kell a makromolekulák szintéziséhez. Ez alapján válik számíthatóvá a sejtnövekedés.

**A kérdés különösen izgalmas a genom redukció III. fejezetben tárgyalt evolúciója esetében. Itt ugyanis intracelluláris endoszimbionta baktériumoknak szabadon élőkből való kialakulásáról beszélünk. A szimbionta evolúciója viszont egészen biztosan nem a saját biomassza-növekedésre optimalizál: szaporodási lehetősége jórészt a gazda szaporodásán**

**múlik. A saját létfenntartás mellett a szimbiontának kell valami előnyt nyújtani a gazdának. A szimbionta túlzott szaporodása pedig kimondottan káros lenne a gazdának. Ha a dolgozat nem is, a témáról szóló Nature cikk röviden említi, hogy a gazdának juttatandó metabolitok (riboflavin és esszenciális aminosavak a Buchnera-nál, kofaktorok és vitaminok a Wigglesworthia-nál) figyelembe lettek véve. Hogy kell ezt akkor érteni? Ezek a metabolitok is bekerültek a produkálendő biomassza-mixbe? És milyen súllyal? Vagy eleve a gazdának járó termékek termelésére optimalizálunk?**

Ezek a metabolitok is bekerültek a baktériumsejt biomassza-egyenletbe, tehát a saját építőköcka metabolitok mellett kívántuk meg a termelésüket. A súlyukat önkényesen állítottuk be, de a pontos értékre érzéketlen volt a szimuláció. Például kétszeresére növelve az esszenciális aminosavak súlyát lényegében változtatlan maradt a predikciós siker.

**De lehet, hogy ezek a kérdéseim mégsem olyan fontosak: akkor nem, ha a vizsgált mutációk egy jelentős részétől nyilvánvalóan letális, mert összeomlik tőle a metabolizmus nagy része. Ilyenkor teljesen mindegy, hogy ezt hogyan is mérjük pontosan. A további kérdésem tehát az, hogy mekkorák voltak azok a küszöbök, amelyek eldöntötték, hogy egy gén eldobható-e? Mennyire függ az eredmény ennek a küszöbértéknek a megválasztásától? És a többi vizsgálatnál?**

Valóban ez a helyzet: ezekben a típusú modellekben a mutációk egy része egyáltalán nem befolyásolja a fitnesszt, más része pedig letális és csak nagyon kevés mutáció esik e két szélsőség közé. A genomredukciós szimulációkban kétféle küszöbértéket alkalmaztunk a gének eldobhatóságára: 1% illetve 10% fitnesszcsökkenés. A végeredményt ez szinte alig befolyásolta. Megjegyzem, az 1% fitnesszcsökkenésnél károsabb mutációk már nem valószínű, hogy elterjednek genetikai sodródással, mert a Buchnera effektív populációméretét  $10^2$  -  $10^3$  körüli értékre becsülik.

**Mellékkérdés. Az *E. coli* genomjának mekkora hányada a metabolikus genom?**

A legfrissebb metabolikus rekonstrukció az *E. coli* génjeinek 1/3-át tartalmazza (1515 gén).

**A flux balance analysis egy nagyon logikus leegyszerűsítése a sokkal több paraméteres reakciókinetikai leírásnak. Érdekelne, hogy mi a megértésünk e módszer korlátaitól? Ismerünk olyan eseteket, amelyben a flux balance kimondottan rossz eredményhez vezet?**

Itt most két olyan korlátra szeretnék összpontosítani, amelyek a genotípus – fitness leképezés szempontjából leginkább hűsbavágóak. Az egyik korlát az egyszerűes génkiütések hatásának előrejelzésével kapcsolatos. A modell remekül jósolja meg, hogy melyik gén kiütése okoz letalitást. Viszont az életképes génkiütések közötti mennyiségi fitnesskülönbségeket meglehetősen pontatlanul jósolja és általában erősen felülbecsüli a fitnesszt.

A másik korlát a génkölcönhatások előrejelzésével kapcsolatos. A modell által előrejelzett génkölcönhatások jelentős része helyes, viszont a modellezési keret csak az empirikusan megfigyelt génkölcönhatások kis részét látja. Alapvetően itt is az történik, hogy a modell felülbecsüli a mutánsok fitnesszét.

Mindkét problémára igaz, hogy nem az anyagcserehálózat szerkezetéből vagy hiányos ismeretéből fakadó hibák okozzák. Az előrejelzések valószínűleg javíthatók a génexpressziós és metabolit-szintű szabályozás részleteinek figyelembevételével. Ez elvileg megtehető részletesebb enzimkinetikai modellek használatával vagy a génszabályozási ismeretek beépítésével, bár ezirányban meglepően kevés vizsgálat történt az irodalomban. Emellett a modell sikerét egy egészen más jelenség is korlátozhatja: a kísérletesen mérhető fitnesszközelítések, pl. a növekedési sebesség vagy a telepméret, csak lazán kapcsolódnak az anyagcsere működési hatékonyságához. Számos mutáció csökkentheti úgy a fitnesszt, hogy közben nem változtatja meg az útvonal hozamát, pl. toxikus köztitermék felhalmozódását okozza vagy az anyagcserén kívüli alrendszer működését befolyásolja. Mindez a mutáns fitnessz felülbecsüléséhez vezethet.

**A második fejezet egy izgalmas része az, hogy a gének kölcsönhatásainak jóslata javítható a hálózat módosításával. Érdekelne, hogy ezek a javítások mennyire meggyőzőek? Laikusként el tudom képzelni, hogy a hibákat meg lehet érteni, és érteni lehet, hogy a javítás után már rendben van. De azt is, hogy a gének kölcsönhatásainak jóslata semmiképp sem tökéletes, és pusztán véletlen, hogy a modell egy módosítása az elvárt eredményt adja. Általánosabban, mi a hibás jóslatok eredete? A hálózat nem elég pontos felderítése, vagy az, hogy a FBA csak egy közelítés?**

A jóslat javítások helyességéről két módon győződünk meg. Egyrészt keresztvalidálást is alkalmaztunk, tehát a jósláshoz fel nem használt adatokon is ellenőriztük a módszer helyességét. Másrészt a javított modell olyan tesztelhető új predikciókat adott amelyek merőben eltérőek voltak az eredeti modellétől (bizonyos mutánsok máshogy nőttek nikotinsav-hiányos táptalajon). Ezeket kísérletesen is igazoltuk.

A nagyobb kihívás, hogy a javítások ellenére sem látja a modell a valós gének kölcsönhatások többségét. Ezt a problémát a fenti kérdésnél már kifejtettem.

**A negyedik fejezet szintén egy régi – a talán a legrégebbi – általános evolúcióbíológiai kérdést elemez: hogy keletkezhetnek a komplex adaptációk természetes szelekció révén? ..... A Pál & Papp (2017) review cikk a Nature Evol Ecol-ban részletezi a problémára adott különféle válaszokat, s a kis adaptív lépésekből álló út csak az egyik ezek közül. Felmerül például, hogy a valóságban nem csak pontmutációk vannak, hanem számos okból módosulhat a genom egyszerre több ponton is, egyáltalán nem kis valószínűséggel. A másik közkeletű válasz az, hogy neutrális evolúció viheti a génszekvenciát egy olyan pontra, ahonnan már közel van a cél, a komplex adaptáció.... Kérdésem akkor az, hogy ismer-e a Szerző olyan vizsgálatokat, amelyek a komplex adaptációk ezen alternatív magyarázatának lehetőségét támasztják alá? Avagy kijelenthetjük, hogy a kis lépéses adaptív út az út?**

A neutrális változások szerepét alátámasztó legerősebb példák a fehérjék evolúciójához köthetők. Például Joseph Thornton és munkatársai egy fehérjekomplex múltbéli evolúcióját rekonstruálta laboratóriumi körülmények között (Finnigan és mtsai. Nature 2012). Ez a komplex egy

protonpumpa és legtöbb eukariótában kétféle fehérjéből épül fel. A gombákban viszont ugyanez a komplex háromféle fehérjealegységből áll. Kimutatták, hogy a kétféle alegységből néhány neutrális mutációval el lehet jutni a három alegységig anélkül, hogy közvetlen előnyt biztosítanának a mutációs lépések. Ez mindössze egy génduplikációt és néhány kötőfelszín komplementer elvesztését feltételezi. Ugyan a pumpa nem tett szert új funkcióra, de a komplexitás ilyenfajta növekedése megágyazhat új előnyös tulajdonságok kialakulásának is.

Egyes szerzők szerint a fenti példa csak a jéghegy csúcsa és valójában a fehérjék evolúciója során a neutrális változások meghatározóak a több alegységes komplexek vagy az alloszterikus szabályozás kialakulásában (lásd Thornton, Lynch, Stoltzfus). Ennek mélyebb oka, hogy empirikus megfigyelések alapján ezekhez az újításokhoz általában 1-2 mutációs lépésből álló út is elegendő, ráadásul rengeteg ilyen lehetséges neutrális út létezik. Így annak ellenére, hogy egy előnyös mutáció mindig könnyebben elterjed mint egy neutrális, mégis az elérhető neutrális útvonalak sokasága már komoly tényezőt jelent a fehérjék evolúciója során. Arról egyelőre kevés biztosat tudunk, hogy hasonló érvelés molekuláris hálózatok szintjén is alkalmazható-e.

A kérdés másik fele a nagyléptékű mutációs eseményekre vonatkozik. A horizontális génátvitelt tekintem az egyik olyan lehetséges mutációnak ami baktériumokban gyakran hozzájárul az adaptív evolúcióhoz és egyszerre több gént képes mozgatni, így képes komplex adaptációkat létrehozni. Egy korábbi munkánkban kimutattuk, hogy az *E. coli* anyagcserében szorosan együttműködő enzimek gyakran nyerődnek egyszerre a törzsfán és gyakran helyezkednek el egy operonban, ami arra utal, hogy egy komplex anyagcseremodul egyetlen mutációs eseménnyel is meg tud jelenni a befogadó sejtben (Pál, Papp és Lercher, *Nature Genetics* 2005).