

**Válaszok Dr. Boros Imre bírálatára,
az abban megfogalmazott tudományos kérdésekre**

Mindenekelőtt szeretném megköszönni Dr. Boros Imre munkáját, hogy elvállalta az opponensi felkérést, és az MTA doktori értekezésem rendkívül alapos átolvasása után azt minden szempontból pozitívan értékelte. Megtisztelőnek tartom és örömmre szolgál, hogy ezek alapján a dolgozatot nyilvános vitára alkalmasnak találta, és a vitára bocsátást javasolta.

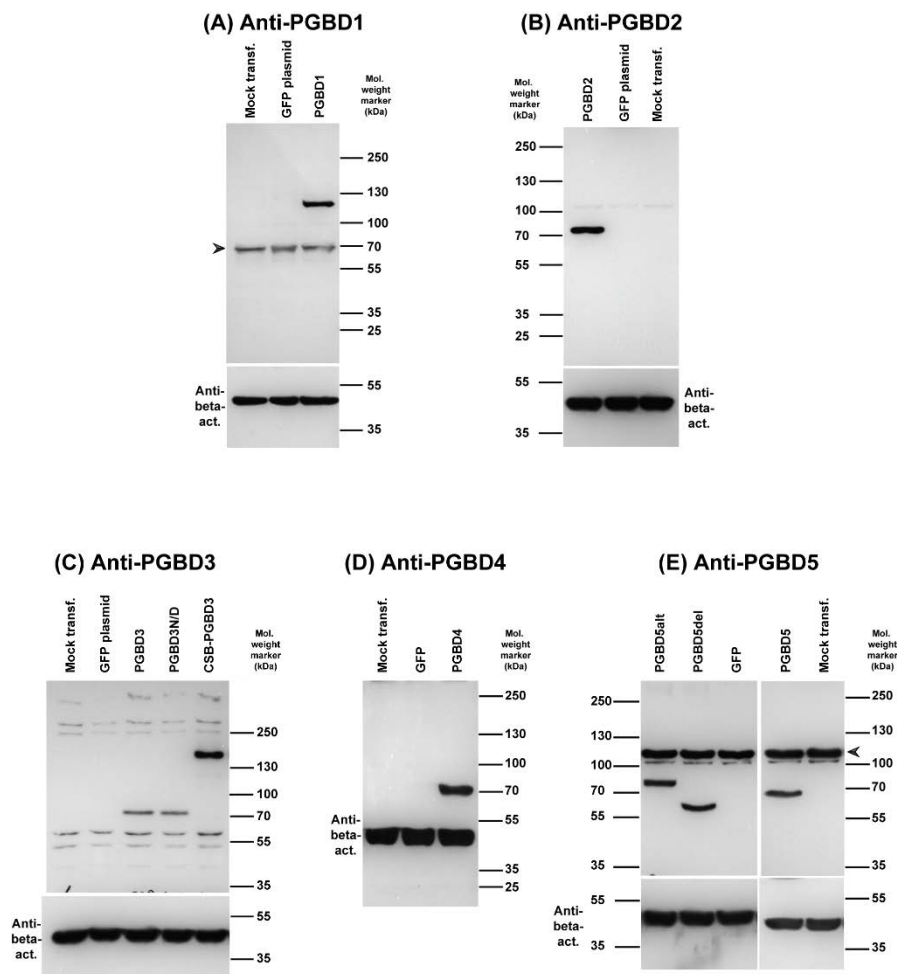
Az alábbiakban válaszolnék a bírálatban megfogalmazott tudományos kérdésekre.

Kérdés 1: *Az siRNSeK "immunrendszer-szerű" védekező funkciót töltenek be pl. invazív RNS-sel szemben, aminek a mechanizmusa mRNS degradáció, vagy transzkripció gátlás. Egy invazív dsRNS esetében milyen mechanizmus tudja biztosítani, hogy a gátló siRNS mRNS komplementer lesz?*

Válasz 1: Ez egy érdekes kérdés: a gyakorlati tapasztalat azt mutatja, hogy a folyamat során biztos képződnek a mRNS szekvenciákkal komplementer, azaz antiszensz orientációjú siRNS molekulák, hiszen a védekezés működik. Az invazív elemek, vagyis a vírusok és a transzpozonok életciklusa során megjelenő duplaszálú RNS-ek az esetek többségében több száz nukleotid hosszúságúak (gyakran akár még hosszabbak), és ezekben a szekvenciákban nagy valószínűséggel előfordulnak az invazív elem mRNS szekvenciái is. A Dicer fehérje aktivitásának köszönhetően ezekből számtalan kisméretű (21 nukleotid hosszúságú), duplaszálú RNS képződik, amelyekből statisztikailag is nagyszámú esetben az antiszensz szál fog a RISC-be beépülni, amely hatékonyan képes degradálni a kérdéses mRNS molekulát. Tulajdonképpen mRNS-enként 1 antiszensz siRNS is elegendő lenne, a valóságban azonban valószínűleg több is képződik, növelve ezzel a csendesítés hatékonyságát. Természetesen sok „szensz” kisRNS tartalmú RISC is képződik, ugyanakkor ezek sem biztos, hogy „haszontalanok”. A vírus genomokra például sokszor jellemző a kis méret, a kompaktság, és ebből adódóan gyakoriak az átfedő gének is, amelyek gyakran egymással antiszensz orientációban helyezkednek el. Ennek megfelelően az egyik mRNS-sel megegyező szensz szekvencia az ellentétes irányban átíródó, átfedő mRNS-sel komplementer lesz, így annak a degradációja is elindul. Mindezek alapján valószínűsíthető, az siRNS útvonal ilyenformán az invazív elem nagyon sok mRNS, vagy akár más, strukturális RNS szekvenciáját lebontja, így hatékonyan gátolja a vírus vagy a transzpozon működését és szaporodását.

Kérdés 2: A PGBD expresszióra vonatkozó adatai mind RNS mérésen alapultak, vagy van mód és használt ilyet a fehérjék képződésének kimutatására és mennyiségi jellemzésére is különböző sejtvonalakban és fiziológias körülmények között?

Válasz 2: Köszönöm a kérdést; ennek az aspektusnak a részletes ismertetése terjedelmi okokból kimaradt a dolgozatból, ugyanakkor az ebben a témában írt 2022-es közleményünkben ez szerepel (Kolacsek és mtsai, *Gene*, 2022, PMID: 35609796). A PGBD génekről képződő fehérjék ellen léteznek kereskedelmi forgalomban kapható antitestek, ám ezek sok esetben nem specifikus módon más endogén fehérjéket is kimutatnak, ezért gyakran nehéz volt az ezekkel kapott eredményeket értelmezni. Az említett közleményünk 3. kiegészítő ábráján ezt be is mutattuk ezt a problémát:



Supplementary Figure 3. Western blot analysis of the transient expression of PGBDs in HEK-293 cell. Samples from mock (without DNA) and GFP plasmid transfections served as controls. (A) PGBD1 (formerly known as HUCEP-4) transfection was analyzed with an antibody specific for a short segment of the transposase domain (Abgent, cat. AP17268C). Calculated MW of HUCEP-4 is 92.5 kDa, whereas the detected species has a higher apparent MW due to posttranslational modifications. Arrowhead shows a potentially endogenously expressed

shorter protein isoform but it is not validated. (B) Western blot analysis of cells transfected with PGBD2 (Biorbyt, cat. orb519701). Calculated MW is 68 kDa. (C) Cells were transfected with the two PGBD3 variants and the catalytic mutant (PGBD3N/D), antibody used is Sigma-Aldrich, cat. HPA025825. MW of solo PGBD3 is 67.5 kDa, fusion variant CSB-PGBD3 is calculated as 119.4 kDa. This polyclonal antibody also depicts other weak bands, most likely representing unspecific labeling. (D) Result of PGBD4 transfection, MW: 66.9 kDa (antibody used is Sigma-Aldrich, cat. HPA040896). (E) Cells were transfected with PGBD5 variants and the exon 5 deleted mutant (PGBD5del); antibody used is Biorbyt, cat. orb13159. PGBD5alt contains an alternative exon 1 and an N-terminally fused GFP with MW of 79 kDa. Predicted PGBD5 is 58.5 kDa and whereas the deletion mutant is 51.1 kDa. Arrowhead depicts a strong endogenous signal at a high MW which is likely an unspecific labeling (as also detected earlier by others (Pavelitz et al., 2013)). Anti-beta-actin (Sigma-Aldrich, cat. A3854) was used as loading control. Plasmids with appropriate expression cassettes are shown on the top of the gel photos.

Ugyanakkor némelyik, például a PGBD4 fehérje esetében az antitest nagyon jól használható, és az ezzel kapott mérési eredmények az RNS mérésekkel teljesen összhangban voltak. A PGBD1 esetében pedig Izsvák Zsuzsanna laboratóriumával együttműködve több antitest is tesztelésre került, és volt olyan, amely ugyan Western analízisre nem volt megbízható, viszont immunfluoreszcens jelölésnél mikroszkópi mintákon szépen működött, például a NEAT1_2 hosszú nem-kódoló RNS-sel való kolokalizációs kísérletekben (Raskó és mtsai, *Mol Biol Evol*, 2022, PMID: 36205081). Összeségében tehát elmondható, hogy ahol sikerült technikailag megbízható módszert beállítani, ott a jelenségek fehérje szinten is vizsgálhatók voltak.

Kérdés 3: A *piggyBac* transzpozáz rendezetlen NTDR részre vonatkozó adatok mennyire megbízhatóak, tekintettel, hogy a mérés lényegében egy heterológ rendszer, rovar enzim humán sejtvonalakban? Továbbá, hogyan kell értelmezni az NTDR-től függő, egyes sejtvonalakban mérhető lényeges eltéréseket egy autonóm transzpozícióra képes elem esetében? Epigenetikai eltérések állhatnak ezek hátterében?

Válasz 3: A *piggyBac* transzpozon alapú rendszer rendkívül hatékonyan működik emlős, köztük humán sejtekben is, és ez az oka annak, hogy a *Sleeping Beauty* rendszer mellett ez a génbeviteli eljárás mára olyannyira elterjedté vált. Az emlős rendszer emellett lehetőséget is ad a kifejlesztett új variánsok tesztelésére, főleg mióta tudjuk, hogy a humán homológ elemek nem adnak keresztreakciót a rovar eredetű transzpozonnal. Természetesen érdemes lenne kísérleteket végezni rovarsejtekkel is, ott viszont a kísérletek értékelését bonyolítaná, hogy több, biztosan aktív endogén *piggyBac* paralóg is található a genomokban. Mindezek alapján mi is azt a mások által is alkalmazott stratégiát választottuk, hogy a létrehozott variánsokat humán sejtkultúrákban teszteltük.

Ugyanakkor jogos a kérdés, hogy hogyan interpretálhatjuk a transzpozíció általunk is tapasztalt sejtípus-függését, amelyet egyébként az eredeti transzpozáz esetében is látni lehet (vö. például a disszertáció 21. és 22. ábráját). Az eddigi eredményeink alapján azt feltételezzük, hogy ez a variabilitás a transzpozáz fehérje interakciós partnereitől (elsősorban

valószínűleg fehérje partnerektől), és azok szövetspecifikus expressziós mintázatától függ. Az egyik versenytárs laboratórium, a velünk közel egy időben publikáló Wilson-labor és kollaborációs partnerei szerkezeti vizsgálataik alapján például azt feltételezik, hogy az NTDR szegmensben található foszforilációs helyek gátolnák a transzpozíciót, így az NTDR deléciós mutáns transzpozíciós aktivitása szerintük megemelkedik – igaz, kísérletesen ők ezt az eredeti terminális szekvenciákat tartalmazó transzpozonos konstrukciókon nem mutatják meg (Luo és mtsai, *Nucl Acids Res*, 2022, PMID: 36537219). Ahogy az értekezés erről szóló fejezetében is bemutattam, mi ezzel nem feltétlenül értünk egyet, mert mi a deléciós mutánsok esetében transzpozíciós csökkenést látunk. A helyzetet bonyolítja, hogy a mi konstrukcióinkban nagyobb a deléció, így elképzelhető, más regulációs fehérjeszakaszok is hiányoznak, amelyek okozhatják az ellentétes eredményeket. A jelenleg is folyamatban lévő kutatásaink arra irányulnak, hogy azonosítsuk az NTDR szegmenssel interakcióba lépő fehérjéket, és azt várjuk, hogy azok expressziós mintázatai magyarázattal szolgálhatnak a transzpozíció sejttypus-függésére.

A kérdés utolsó részére válaszolva valószínűsíthető, hogy a jelenség mögött epigenetikai eltérések állnak, de ezek nem a transzpozáz, hanem az interakciós partnerek epigenetikai mintázatának, és ezáltal expressziós különbségeiknek köszönhetők. Természetesen ezeket az állításokat is további kísérletekkel lehet és kell is igazolni.

Kérdés 4: Az előbbivel összefüggő kérdés, hogy milyen mértékben módosíthatja a transzpozáz aktivitásra vonatkozó mérési eredményeket az, hogy a mérések jelentős részében nem kromoszómális környezetben, kromatinba csomagolt, hanem plazmidon bejuttatott gén kivágását, vagy más esetben egyetlen specifikus helyen integrálódott gén kivágódását mérték?

Válasz 4: Nagyon jó a kérdés, ez valóban egy érdekes új aspektust vet fel, a genomi környezetben stabilizálódott transzpozáz működését, illetve egy transzpozon onnan történő kivágódását. Sok más kutatócsoporttal együtt mi is elsősorban a génbeviteli eljárás (és a jövőbeli génterápiás eljárás) módszertanát alkalmaztuk, és elsősorban az episzómális vektorokon bevitt komponensek működését vizsgáltuk. Érdekes lenne létrehozni olyan sejt vonalakat, amelyek endogén integrálódott formában, akár az eredeti konstellációnak megfelelően – a terminális repetitív szekvenciákkal határolva – tartalmazzák a transzpozáz kifejező transzkripciós egységet. Véleményem szerint egy ilyen stabil sejt vonalban, kromoszómális környezetben elhelyezkedő kópiáról valószínűleg jóval moderáltabb expressziót és kisebb mértékű változásokat tapasztalnánk, mint a robosztus expressziót biztosító tranziens rendszerekben. Hasonló kísérleteket korábban a *Sleeping Beauty* transzpozonos rendszerrel végeztünk: ott mind az expressziós szintek mértéke, mind a genomi kópiák (egy vagy több) kivágásának a hatékonysága jóval alacsonyabb szintű volt, mint a

plazmid templát esetében. Az eredmények nyilván összefüggnek azzal, hogy a természetes kromatin környezet a sejtek számára alacsonyabb, tolerálhatóbb expressziót biztosít, illetve az ilyen környezetben történő excíziót jelentősen befolyásolják a transzpozáz és a kromatin fehérjék kölcsönhatásai is. A *piggyBac*-es rendszerrel viszont ilyen vizsgálatokat egyelőre nem végeztünk.

Végezetül még egyszer szeretném megköszönni Dr. Boros Imrének, hogy időt szakított az értekezésem alapos bírálatára, és kérem a kérdéseire adott válaszaim elfogadását.

Budapest, 2025. április 8.



Dr. Orbán Tamás
Kutatócsoport vezető
Génreguláció Kutatócsoport
HUN-REN TTK MÉI