

**Válaszok Dr. Gallyas Ferenc bírálata,
az abban megfogalmazott tudományos kérdésekre**

Mindenekelőtt szeretném megköszönni Dr. Gallyas Ferenc munkáját, hogy elvállalta az opponensi felkérést, és az MTA doktori értekezésem alapos átolvasása után azt minden szempontból pozitívan értékelte. Köszönöm dícsérő szavait és örömeimre szolgál, hogy ezek alapján a dolgozatot nyilvános vitára alkalmasnak találta, és sikeres védelem esetén támogatja részemre a MTA doktora cím odaítélését.

Az alábbiakban válaszolnék a bírálóban megfogalmazott tudományos kérdésekre.

Kérdés 1: *Az alkalmazott sejtvonalak mind humán eredetűek. Nem lett volna értelme egy egérsejtvonal használatának is, tekintve, hogy az egérben a kódoló gének száma jelentősen nagyobb, mint az emberben.*

Válasz 1: Köszönöm a kérdést, egér eredetű sejtvonallal valóban nem dolgoztunk. A kísérleteink nagy többségét humán eredetű sejtvonalakon végeztük, ugyanakkor az siRNS rendszer vizsgálatokhoz rengeteget dolgoztam *Drosophila* sejtekkel, és valamennyit növényi eredetű sejtekkel is. Nem maradt ki ugyanakkor a rágcslómodell sem: transzgenikus kísérleteink egy részét patkány sejtekben, illetve patkány eredetű szövetekből nyert mintákon végeztük. A genomjában található fehérjekódoló gének számát tekintve a patkány (23113) felülmúlja mind az egér (22395), mind az ember (19983) ilyen típusú génjeit (<https://rgd.mcw.edu/rgdweb/report/genomeInformation/genomeInformation.html>), és a transzpozon integrációs helyek vizsgálatánál és annotálásánál figyelembe kellett venni ennek a genomnak a sajátosságait. Egyetértek a bírálóval, hogy lehetőség szerint érdemes minél többféle modellrendszeren vizsgálni, hiszen ez segíti mind az általános érvényű, mind az esetleges fajspecifikus folyamatok feltárását és jobb megértését.

Kérdés 2: *Továbbra is a sejtvonalaknál maradva, a HEK-293 embrionális eredetű normál, míg a másik kettő felnőtt nőkből származó rákos eredetű sejt. Az ennyire eltérő tulajdonságú sejtekkel végzett vizsgálatok alapján mennyire tűnt univerzálisnak az siRNS útvonal által kijelölt mRNS molekulák degradációs mechanizmusa?*

Válasz 2: Az siRNS útvonal vizsgálatát a legalaposabban *Drosophila melanogaster* eredetű sejtekben végeztem, de a későbbi munkánk során a bíráló által is említett humán sejtvonalakon, illetve növényi eredetű sejteken (*Nicotiana benthamiana* dohánynövényen) is voltak vizsgálatok. Mindezek mellett a *Drosophila* sejtekben leírt modellünkkel párhuzamosan

megjelent egy közlemény, amely *Arabidopsis thaliana* (lúdfű modell) sejtekben írta le az siRNS (illetve a növényi sejtekben a teljesen komplementer módon kitapadó miRNS) által kiváltott endonukleázos hasítás után a 3' fragmentum 5'→3' irányú degradációját (Souret és mtsai, *Mol Cell*, 2004, PMID: 15260969). Mindegyik esetben azonos volt a mechanizmus logikája és effektor enzimei: az Ago fehérje tartalmú RISC kiváltotta hasítást követően a 3' intermediert az Xrn1 fehérje (ill. annak megfelelő homológja, *Arabidopsis*-ban például az AtXrn4) bontja le 5'→3' irányban, míg az 5' intermediert a Ski-complex segítségével 3'→5' irányban az exoszóma bontja le. Ezen eredmények alapján úgy tűnik, hogy az RNS interferencia ezen ága által kiváltott RNS degradáció útvonala univerzálisnak tekinthető.

Kérdés 3: Mandal és Kazazian, 2008 hivatkozás alapján az emberi genomon nagyjából 2000 db piggyBac-eredetű szekvencia található, amelyekről Önök bebizonyították, hogy domesztikálódtak és transzponálásra nem képesek. Ugyanakkor a génterápia szempontjából ezek a szekvenciák kockázatot jelentenek. Lehetséges olyan kísérleti rendszert összeállítani, amelyben ki lehetne váltani a transzpozon aktivitás felébredését? Elegendő bizonyítékot jelent, ha a kifejlesztett konstrukciókkal (piggyBac és feltámasztott Sleeping Beauty) végrehajtott transzfekció során nem ébrednek fel a domesztikálódott transzpozonok? Meddig kell elmenni a biztonsági vizsgálatokkal?

Válasz 3: Ez egy nagyon fontos kérdés, és egyben a génterápia egyik legfontosabb kérdése. Általánosságban elmondható, hogy a biztonsági vizsgálatokkal a lehető legvégsőig kell elmenni, hiszen a gyógyítás során nem szeretnénk semmilyen kárt okozni, illetve a lehető legkisebb mellékhatással bíró eljárást kívánjuk kifejleszteni. A *Sleeping Beauty* rendszernek az a hallatlan nagy előnye, hogy a humán genomon nem található ilyen típusú Tc1/mariner transzpozon (vagyis se transzpozáztt kódoló gén, se terminális ismétlődő szekvencia), így ez a rendszer ebből a szempontból teljesen biztonságos (Ivics és mtsai, *Cell*, 1997, PMID: 9390559; Mátés és mtsai, *Nat Genet*, 2009, PMID: 19412179). A piggyBac rendszer ebből a szempontból komolyabb kihívást jelentett, hiszen a humán genomon található kópiák potenciális veszélyforrást jelenthetnek. Sajnos az értekezésben is diszkutált, a PGBD5-tel kapcsolatos ellentmondásos eredmények, noha a szűkebb szakmai körökben mára már elfogadott azok komoly metodikai hibán alapuló volta, sokáig növelték a piggyBac rendszerrel kapcsolatos félelmeket (Henssen és mtsai, *Elife*, 2015, PMID: 26406119; Ivics, *Mol Ther*, 2016, PMID: 27198853). Ugyanakkor több erre irányú vizsgálat, köztük a mi eredményeink is azt igazolják, hogy egyik humán piggyBac homológ kópia sem képes már a mobilizációra, amit egyébként számtalan korábbi, piggyBac-alapú génbeviteli kísérlet is alátámasztani látszik (Saha és mtsai, *Nucl Acids Res*, 2015, PMID: 25605795; Beckermann és mtsai, *Nucl Acids Res*, 2021, PMID: 34232995; Kolacsek és mtsai, *Gene*, 2022, PMID: 35609796). Jelenleg az az elfogadott álláspont, hogy a genomi fosszíliák jelenléte ellenére a piggyBac alkalmazása ilyen

szempontból biztonságos, és folynak is olyan klinikai vizsgálatok, amelyekben ezt a transzpozonozis rendszert tesztelik génterápiás alkalmazásokban (a <https://clinicaltrials.gov/> adatbázisban jelenleg kettő ilyen találatot találtam, amelyekben genetikailag módosított CAR-T-sejteken alapuló terápiák alkalmazása a cél B-sejtes limfómák, illetve szisztémás Lupus Erythematosus betegség esetén).

Természetesen „hátradólni” sosem lehet, hiszen mindig van mit finomítani az eljárásokon: a *piggyBac* rendszer esetében például a transzpozon nem annyira kedvező integrációs profilja, az aktívan átíródó gének irányába mutatott integrációs preferenciája a mutagenézis és a genotoxicitás potenciális forrása. Ilyen megfontolásokból is mindenképp van létjogosultsága az új variánsok tesztelésének, és ennek kapcsán Ivics Zoltán laboratóriumával közösen jelenleg mi is vizsgáljuk például az általunk létrehozott NTDR mutáns integrációs profilját, genotoxicitását. Ha ezek az eredmények egy kedvezőbb beépülési eloszlást mutatnak, az megnyithatja az utat egy alacsonyabb genotoxicitású, biztonságosabb *piggyBac* vektorrendszer kidolgozása felé.

Kérdés 4: A korábban használt adeno-asszociált vírus konstrukciókkal szemben miben látja a transzpozon alapú konstrukciók előnyeit génterápiás alkalmazás szempontjából?

Válasz 4: Az adeno-asszociált vírusok (AAV) a génterápia több szempontból is nagyon ígéretes eszközei. Kevébé immunogének, mint a adenovírusok, sokféle sejttípusba képesek bejuttatni a kívánt transzgént, és a 19. kromoszóma egy kijelölt régiójába történő integrációval hosszú távon is tartós expressziót lehet velük elérni. Van azonban néhány hátrányos tulajdonságuk, amelyek problémát jelentenek ezen vektorok előállítása és alkalmazása szempontjából. A legfontosabb a limitált cargo kapacitás: a vírusba egyszálú DNS formájában egy maximum 4,8 kb hosszúságú transzgént (expressziós kazettát) lehet „becsomagolni”. Probléma lehet még, hogy a populációban a vad típusú AAV-val való előzetes fertőzés kapcsán humorális immunválasz alakulhat ki, amely komolyan csökkenti az ilyen vektorok alkalmazását például vakcinációs célokra is (lásd a Covid-pandémia idején bizonyos oltóanyagok limitált alkalmazhatóságát). Végezetül mivel mégiscsak egy embereket fertőző vírus származékáról beszélünk, a vektorok előállítása speciális felszereltségű és biztonsági szintű laboratóriumi környezetet igényel, amely nyilván növeli a költségeket.

Az előbbieken alapján azt gondolom, hogy a transzpozonozis rendszerek alkalmazása ezekben az aspektusokban lehetnek előnyösebbek az AAV-alapú vektoroknál. A cargo méretét tekintve sokkal kisebbek a korlátok, majdhogya nem elenyészőek. Mind a *Sleeping Beauty*, mind a *piggyBac* rendszer esetén rutinszerűen 4,8 kb-nál sokkal hosszabb, akár 8-10 kb hosszúságú inszerteket is nagy hatékonysággal lehet mozgatni (Izsvák és mtsai, *Bioessays*, 2010, PMID: 20652893; Woodard és Wilson, *Trend Biotechnol*, 2015, PMID: 26211958). A cargo méretét tovább lehet növelni, és vannak példák extrém nagy méretű, például 150 (!) kb hosszúságú

BAC klónok transzpozon alapú átvitelére is, bár természetesen a génbeviteli hatékonyság ezekben az esetekben azért jóval alacsonyabb (*Rostovskaya és mtsai, Nucl Acids Res, 2012, PMID: 22753106*). Az AAV alapú vektorokkal szembe további előny, hogy nem kell tartani az előzetesen kialakult humorális immunválasztól, illetve fontos szempont, hogy a transzpozonos vektorok előállításához nincs szükség speciális védettségi szintű laboratóriumokra. Mindazonáltal a transzpozon alapú vektoroknak is vannak korlátaik: ide tartozik például, hogy a génbevételhez elengedhetetlen a célzott sejttípus jó transzfektálhatósága, amely a vírus alapú transzdukciónál sokkal kevésbé limitáló tényező. Nyilvánvalóan minden vektorrendszernek megvannak a maga előnyei és hátrányai, és adott génterápiás fejlesztéseknél az összes elérhető platform tulajdonságait figyelembe veszik – az elmondottak alapján azonban azt gondolom, hogy ebben a „versenyben” a transzpozonok is egyre jobb esélyekkel indulnak (*Ivics és Izsvák, Mob DNA, 2010, PMID: 21138556*).

Végezetül még egyszer szeretném megköszönni Dr. Gallyas Ferencnek, 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