

**Válaszok Dr. Székvölgyi Lóránt bírálataira,
az abban megfogalmazott tudományos kérdésekre**

Mindenekelőtt szeretném megköszönni Dr. Székvölgyi Lóránt munkáját, hogy elvállalta az opponensi felkérést, és az MTA doktori értekezésem alaposan átolvasása után azt minden szempontból pozitívan értékelte. Öröömre szolgál, hogy ezek alapján sikeres védelem esetén támogatja részemre a MTA doktora cím odaítélését.

Az alábbiakban válaszolnék a bírálóban megfogalmazott tudományos kérdésekre.

Kérdés 1: Az RNSi és a NSD (*nonstop mediated decay*) RNS lebontási rendszerek kapcsolata rendkívül erős növényekben, amelyet viszont nem tudtak kimutatni *Drosophila*-ban és emlősökben. A Jelölt feltételezi, hogy *C. elegans*-ban esetleg ki lehet mutatni a növényekhez hasonló szoros összefüggést a két útvonal között. Mire alapozza ezt a feltételezést? Esetleg *C. elegans*-ban (illetve más fajokban) létezik a növényekre jellemző két speciális RNS függő RNS polimeráz (Pol IV, Pol V), vagy ezek funkcionális homológja, amely szerepet játszhat a fenti folyamatokban?

Válasz 1: A növényekben az RNS interferencia (RNSi) nagyon fontos szerepet játszik az invazív elemek, legfőképpen a vírusok elleni sejtes védekezésben, egyfajta „immunitásban”. A mechanizmus kihasználja az RNS-függő RNS Polimerázok (RDRP) működését, így a csendesítési komplexek által végrehajtott endokuleolitikus hasítást követően a virális célpont-RNS 5'-fragmentumát templátként használva további duplaszálú RNS molekulák keletkeznek, amelyek a Dicer szubsztrátjaként további siRNS-ek forrásai lesznek. Ez a hatékony mechanizmus azonban a növényi miRNS-ek esetében problémát jelenthet, hiszen az endogén mRNS-ek hasítása esetén a képződő másodlagos siRNS-ek (növényekben transz-aktivált, azaz *tasi*-RNS-ek) okán hosszútávon kiktathatná számos gén működését. A kísérletes eredményeink alapján azt gondoljuk, hogy ennek a kivédésére szolgál a *non-stop decay* (NSD) mechanizmus: az aktív mRNS-ek transzlációja miatt a hasítást követően az 5' fragmentumon még jelen lévő, de megakadt riboszómák kiváltják annak gyors eliminálását, még az RDRP-ék hatása előtt. Ilyen szoros kapcsolatot az RNSi és az NSD között humán és *Drosophila* sejtekben nem láttunk, mivel ezekben nincsenek jelen RDRP-k. A *C. elegans* genomban ugyanakkor legalább 4 ilyen enzimet kódoló gén ismert (RRF-1/-2/-3 és EGO-1, lásd pl. Almeida és mtsai, *EMBO J*, 2018; PMID: 29769402), így feltételezhető, ott is szoros kapcsolat áll fenn az RNSi és az NSD között. Ezzel a modellorganizmussal azonban nem dolgoztunk, így ennek a megerősítése további kísérleteket igényel.

Kérdés 2: Jelölt vizsgálta a miRNS rendszer nem-kanonikus ún. mirtron útvonalát, ahol emberi sejtekben igazolták, hogy a pre-miRNS a fehérje kódoló gén intronjába ágyazott mirtronnál a DROSHA komplex helyett a mRNS splicing hozza létre a pre-miRNS-t, amely ezután bekapcsolódik a kanonikus útvonalba. Nem minden mirtron processzálódik ezen az alternatív útvonalon. Mi lehet ennek az oka és hogyan lehetne ezt megvizsgálni?

Válasz 2: A mirtronok definíció szerint olyan miRNS lókuszok, amelyek érése független a Drosha aktivitásától. Ezek között valóban vannak kisebb alcsoportok, az ún. „tailed”-mirtronok (5’-, 3’- és vegyes tailed-mirtronok), amelyeknél a pre-miRNS végei és a megfelelő splice illesztési pontok nem esnek egybe, hanem azok között rövidebb-hosszabb nukleotid szekvenciák találhatók. Ezek érése a splicing folyamatán túl igényli egyéb exonukleázok aktivitását, amelyek ezeket a túlnyúló szekvenciákat eltávolítják. A 3’-tailed mirtronok esetében ilyen az exoszóma komplex (*Flynt és mtsai, Mol Cell, 2010, PMID: 20620959*), míg az 5’-tailed mirtronok esetében vélhetően az RNázP-komplex, bár ez utóbbi eredmény egyelőre még csak egy bioRxiv kéziratban szerepel (<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.10.15.464553v1>). Az persze továbbra is kérdés, hogy egy tailed-mirtron esetében mennyire lehet hosszú a túlnyúló szekvencia, és mekkora méretnél „válik” egy tailed-mirtron esetleg intronban elhelyezkedő, kanonikus miRNS-sé. Ezzel kapcsolatban nemrégiben mi is publikáltunk egy kutatási eredményt, amelyben splice hely mutációkat tartalmazó mirtron lókuszok esetében azt vizsgáltuk, hogy az esetlegesen megjelenő alternatív splice illesztési helyek vajon menekítik-e a mirtron útvonalat, vagy a hosszabb intron kialakulásával a Drosha esetleg felismeri-e a lókuszt, és a kanonikus útvonalon érik belőle a miRNS. Az eredmény azonban az volt, hogy az alternatív splicinggal létrejövő mRNS izoformák ellenére ezek a mutánsok továbbra is eredeti mirtronként, még csak nem is tailed-mirtronként viselkedtek (*Gál L és mtsai, Int J Mol Sci, 2024, PMID: 39062888*). Úgy tűnik, hogy a Drosha általi felismeréshez a mirtronok pre-miRNS szekvenciái túl rövidek (*Han és mtsai, Cell, 2006, PMID: 16751099*), illetve a mechanizmus pontosabb megértéséhez figyelembe kell venni a splicing apparátus és a Drosha-t tartalmazó Mikroprocesszor-komplex közötti lehetséges kölcsönhatásokat is (*Mattioli és mtsai, WIREs RNA, 2014, PMID: 24788135*). Mindezek mellett pedig minden további kísérlet esetén fontos vizsgálni a Drosha és a Dicer enzimektől való függőséget, illetve a tailed-mirtronok esetén a különféle exonukleázok szerepét az érési folyamatokban.

Kérdés 3: Kísérletes eredményeik elsőik között mutatták be a miRNS lókuszt alternatív karhasználatát. Milyen cisz és transz faktorok, esetleg epitranszkriptomikai változások (RNS modifikációk) játszhatnak szerepet az alternatív karhasználatban?

Válasz 3: Az siRNS útvonal molekuláris részleteinek vizsgálatából kiindulva a pre-miRNS karválasztás egyik kritériuma az egyszálú RNS 5' végének termodinamikai stabilitása: ez minél alacsonyabb (vagyis magasabb az uracil és/vagy adenin tartalma), annál **nagyobb** a valószínűsége, hogy az a szál épül be az Argonaute (Ago) fehérjébe (*Hutvagner, FEBS Lett, 2005, PMID: 16199039*). A későbbi kutatások során kiderült, hogy a folyamatban a „termodinamikai aszimmetria” mint cisz-elem mellett például a különböző Ago fehérjék az RNS másodlagos szerkezetével szembeni eltérő érzékenysége is szerepet játszik. *Drosophila*-ban például az Ago2 kevésbé tolerálja a duplaszálú prekursorok esetleges centrális „kidudorodásait” (*bulge*-okat, ahol nincs bázispárosodás; *Okamura és mtsai, Mol Cell, 2009, PMID: 19917251*), vagy az emberi sejtekben a 4 Ago fehérje közül az Ago3 bizonyos esetekben a kiválasztásban szekvenciális preferenciát mutat (*Winter és Diederichs, RNA Biol, 2013, PMID: 24100239*). Mindemellett kiderült, hogy a karválasztásban sok transz-faktor, jellemzően RNS kötő fehérjék, vagy akár ezek szövetspecifikusan kifejeződő izoformái játszhatnak fontos szerepet. Közülük mindenképp kiemelendő a Dicer két partnerfehérjéje, a TRBP és a PACT, amelyek a kísérletek alapján szekvencia preferencia kialakításán keresztül komolyan befolyásolhatják a pre-miRNS karválasztását (*Noland és Doudna, RNA, 2013, PMID: 23531496*). A bíráló által felvetett RNS modifikációk pedig szintén nagyon izgalmasak, ezek jelenléte a pri-miRNS vagy a pre-miRNS szintjén feltehetően szintén befolyásolhatják a miRNS érési folyamatokat, közöttük a karválasztást is, ezzel kapcsolatban azonban még nem találtam megbízható, publikált eredményeket.

Kérdés 4: A hiperaktív piggyBac transzpozáz (hyPB) variáns 7 aminosavban tér el az alap PB-től. Vajon miért mutat sejttypus függő varianciát a hyPB hiperaktivitása?

Válasz 4: Nagyon jó a kérdés, egyelőre nem tudjuk rá a választ. Feltételezzük, hogy a transzpozázhoz kapcsolódó fehérjék (vagy azok izoformái) szövetspecifikus mintázatot mutatnak, amely jelenség önmagában is befolyásolhatja a transzpozíció hatékonyságát a különféle sejtvonalakban (ez már az mPB transzpozáz esetében is látszik, vö. például a disszertáció 21. és 22. ábráját). Elképzelhető, hogy a hiperaktív variáns mutációi komolyan befolyásolják a transzpozáz affinitását ezekhez a faktorokhoz, amelyek így szerepet játszhatnak a kérdéses varianciában. Ez azonban jelenleg csak spekuláció, amelyet további kísérletekkel kívánunk tesztelni. Tervezzük például a transzpozázal interakcióba lépő fehérjék azonosítását és ezek sejt- és szövetspecifikus eloszlásának a vizsgálatát, amely eredmények hozzásegíthetnek a vázolt hipotézisünk igazolásához.

Kérdés 5: A PB N-terminális rendezetlen szakasza az adataik alapján a transzpozíció excíziós lépését befolyásolják és nincs lényeges szerepe az integrációs lépésben. Milyen kísérlettel lehetne bizonyítani magát a mechanizmust?

Válasz 5: Erre kérdésre többféle kísérlet együttes eredménye adhat választ, hiszen itt külön kell vizsgálni az excíziós és az integrációs lépést. Az excízió vizsgálatánál folyamatban van egy *real-time* PCR alapú módszer kidolgozása, amelynek segítségével kvantitatívan lehet jellemezni a transzpozíció első folyamatát, a kivágódást. Ilyen eljárást korábban a *Sleeping Beauty* (SB) transzpozonos rendszerre már kidolgoztunk (Kolacsek és mtsai, *Hum Gene Ther Methods*, 2014, PMID: 25045962), és jó eséllyel ez egy másik repetitív szekvencia, a PB esetében is működni fog. Így egy esszében, kvantitatív módon lehet majd összehasonlítani a vad típusú transzpozáz a deléciós variánsal. Az integrációs lépés jellemzésénél fontos lesz szisztematikusan megvizsgálni a beépült transzpozon kópiák mennyiségét és integrációs profilját, vagyis az integrációs helyek szekvenciális környezetét. Erre Ivics Zoltán laboratóriumával közösen terveztünk egy nagy áteresztőképességű vizsgálatot, amely komoly mintaszámú integrációs pozíció meghatározását jelenti új generációs szekvenálási módszerrel. Ez a kísérletsorozat folyamatban van, és az eredményétől várható az integrációs lépés szisztematikus összehasonlítása a különféle transzpozáz fehérjevariánsok esetében. A felvázolt kísérletek eredményei reményeink szerint jó támpontokkal szolgálhatnak majd a vad típusú és a deléciós PB variáns közötti működési különbségekre. Ugyanakkor mechanizmus részleteinek a feltárásához minden bizonnyal további kísérletekre is szükség lesz, amelyben fontos szerep jut majd a PB N-terminális rendezetlen régiójával kölcsönhatásba lépő fehérjepartnerek vizsgálatának, illetve minden bizonnyal szerkezeti vizsgálatoknak is.

Kérdés 6: Miért előnyös a SB rendszer random integrációs profilja a többi - célzott és nem célzott - génbeviteli rendszerrel szemben? Milyen kvantitatív adatok támasztják alá (saját vagy szakirodalmi), hogy a random integráció esetén kisebb a mutagenitás és a genotoxicitás?

Válasz 6: A SB transzpozonos rendszer alapos vizsgálata során genomszinten több kutatócsoport is a transzgén integrációjának random eloszlását tapasztalta, szemben a gyakran alkalmazott virális vektorokkal, amelyek előnyben részesítik az aktív transzkripciót mutató régiókat, és általában a géneket (lásd például Wu és mtsai, *Science*, 2003, PMID: 12805549; Izsvák és mtsai, *Bioessays*, 2010, PMID: 20652893; Huang és mtsai, *Hum Gene Ther*, 2010, PMID: 20528476). Az is figyelemre méltó, hogy az integrációs profilt tekintve a SB rendszer más transzpozonos rendszerekhez, így például a PB vagy a Tol2 rendszerekhez képest is jobban közelíti a genomon belüli véletlenszerű eloszlást (Grabundzija és mtsai, *Mol Ther*, 2010, PMID: 20372108; Huang és mtsai, *Mol Ther*, 2010, PMID: 20606646; Li és mtsai, *PNAS*,

2012, PMID: 23091042). Ennek nyilvánvaló előnye, hogy sokkal kisebb annak a valószínűsége, hogy az integráció során egy gén mutációt szenved, amely a génterápiák estében például jelentősen csökkenti a tumorsuppresszor gének inaktivációjának valószínűségét, így a nem kívánt karcinogenezist. Fontos azonban megjegyezni, hogy természetesen ez nem jelenti azt, hogy a SB rendszer egyáltalán nem okoz mutagenézist, de a többi génbeviteli rendszerrel szemben jelentősen csökkenti annak előfordulási valószínűségét. Fontos azonban azt is kiemelni, hogy mutagenézist és genotoxicitást okozhat maga a cargo, vagyis a bevitt transzgenikus konstrukció is, amely ebben a kontextusban így független az alkalmazott vektorrendszertől. A génterápiával foglalkozó szakirodalomban gyakran hangsúlyozott szempont, hogy a random integrációhoz való közelítés egy rendszer előnyös tulajdonsága (virális vagy nem-virális beviteli rendszerek esetében egyaránt), hiszen csökkenti génekben előforduló inszerciós mutagenézis valószínűségét. Ezt számtalan szakirodalmi adat támasztja alá (lásd például *Biasco és mtsai, Mol Ther Methods Clin Dev, 2017, PMID: 29159200; Elsner és Bohne, Virus Genes, 2017, PMID: 28762206; Sabatino és mtsai, Mol Ther, 2022, PMID: 35690906*), illetve sajnos már több olyan példát is ismerünk, ahol génterápiás eljárások klinikai kipróbálása során az inszerciós mutagenézishez köthető komoly mellékhatások a terápia leállításához is vezettek (*David és Doherty, Toxicol Sci, 2017, PMID: 27803388*).

Kérdés 7: Általánosságban, egy transzgén bevitelénél és stabil expressziójánál milyen sejtszintű mechanizmusok okozhatják a transzgén csendesítését? Tud erre vonatkozó konkrét példákat?

Válasz 7: A transzgenezis tervezésénél máig nagyon fontos szempont a fogadó sejt általi csendesítés csökkentése/kikerülése, bizonyos sejtípusok (leginkább a különféle őssejtek) esetében azonban ez egy kifejezetten komoly probléma lehet, főleg génterápiás alkalmazások kapcsán. Itt most eltekintenek a integrációs helytől függő pozícióhatástól, például ha a transzgén eleve egy heterokromatinban gazdag régió közelébe integrálódik, hiszen ilyen esetekben már a kezdeteknél sincs stabil expresszió. Retrovírus-, illetve retrotranszpozon-alapú vektoroknál azonban megfigyelhető, hogy bizonyos vektorszekvenciákat, főleg az ún. *Long Terminal Repeat* (LTR) szekvenciák bizonyos elemeit a sejtek idegenként ismerik fel, és a CpG metiláción és/vagy hiszton módosításokon keresztül kiváltott csendesítés gyakran áttérjed a bevitt transzgén szekvenciára is (*Yoder és mtsai, Trends Genet, 1997, PMID: 9260521; Pannell és mtsai, EMBO J, 2000, PMID: 11060039*). A felismerés sokszor az evolúció során az emlős genomokban erre adaptálódott KRAB-típusú Cink-ujj fehérjéken (KRAB-ZBP) keresztül történik, amelyek a vírus eredetű promóter szekvenciákat is felismerhetik (*Pannell és Ellis, Rev Med Virol, 2001, PMID: ; Cosby és mtsai, Genes Dev, 2019, PMID: 31481535*) – ezt a jelenséget korábban a citomegalovírus (CMV) promóter példáján, humán embrionális őssejtek transzgenezise során mi is tapasztaltuk (*Orbán és mtsai, Stem Cells, 2009, PMID:*

19415778). Más modellrendszerek esetében ugyanakkor az RNS interferencia különféle mechanizmusai okozhatnak csendesítést: *Drosophila* sejtekben például a piRNA útvonal játszhat ilyen szerepet, amely a piRNA klasztereken keresztül különösen erős „genomiális memóriával” rendelkezik az evolúció során a faj genomjával kapcsolatba lépett transzpozon szekvenciákról (Ho és mtsai, *Viruses*, 2024, PMID: 38793595). Hasonló jelenség figyelhető meg növények esetében, ahol a korábban fertőzött vírusok válhatnak ki csendesítést az siRNA útvonalon keresztül (Venu és mtsai, *Viruses*, 2024, PMID: 39861836; Kumar és Dasgupta, *Virology*, 2025, PMID: 39961261). Összefoglalva elmondható, hogy a génbeviteli kísérletek tervezésénél nagyon fontos szerepe van a transzgén kazetta körültekintő összeállításának mind a vektorszekvenciák, mind az expressziós modul megválasztásánál, és ennek során természetesen figyelembe kell venni az adott organizmus és azon belül is a célzott sejttípus sajátosságait egyaránt.

Kérdés 8: A transzpozáz túltermeléses gátlás vizsgálata kapcsán miért csak az mPB esetén és kizárólag HeLa sejtekben detektálták a jelenséget az excíziós hatékonyság csökkenése kapcsán? Az integráció hatékonyságát mennyire befolyásolja a transzpozáz dózis a különféle transzpozon rendszerekben?

Válasz 8: Egy picit pontosítanom kell a kérdést: az értekezésbe ez terjedelmi okok miatt nem került bele, de a 2014-ben megjelent egyik közleményünkben (Kolacsek és mtsai, *Hum Gene Ther Methods*, 2014, PMID: 25045962) bemutatott szisztematikus vizsgálatból kiderül, hogy nukleofekció (az elektroporáció egyik típusa) alkalmazásakor az mPB esetén HEK-293 sejtvonalban is látjuk a túltermeléses gátlás jelenségét. Itt valószínűleg arról van szó, hogy ebben az esetben a sejtbe juttatott transzpozáz nagyobb mennyisége már eléri azt a küszöbértéket, amikor a koncentráció növekedése már gátolja a reakciót. Ennek az lehet az oka, hogy a mesterségesen szelektált SB rendszerrel szemben az mPB egy természetes transzpozon (a vándor aranybagoly lepkefajból izolált szekvencia), amely a gazda-parazita ko-evolúció kapcsán, a genomstabilitással összefüggésben valószínűleg nem a lehetséges leghatékonyabb szekvenciát képviseli. Ugyanakkor látható, hogy a jelenség erősen függ a sejttípustól is, ami mögött a transzpozázzal interakcióba lépő partnerfehérjék sejtspecifikus koncentrációja állhat, ennek a részleteit azonban nem vizsgáltuk. A SB100X variáns esetében ugyanakkor azt lehet tapasztalni, hogy a kimondottan nagy hatékonyságra szelektált hiperaktív variáns az általunk vizsgált rendszerekben az excízió szintjén nem mutatta a túltermeléses gátlás jelenségét, ugyanakkor a transzgenikus ráta (excízió + stabil integráció) szintjén HeLa sejtekben ez már detektálható volt (Kolacsek és mtsai, *Hum Gene Ther Methods*, 2014, PMID: 25045962). Fontos megjegyezni, hogy a SB és a PB fehérjék transzpozíciós mechanizmusa is eltérő, és a jelenség teljes megértéséhez nyilván ezt is figyelembe kell venni – ilyen részletes vizsgálatokat azonban nem végeztünk.

A transzpozáz dózis ugyanakkor komolyan befolyásolja az integráció hatékonyságát is, beleértve a transzgén kópiaszámát és a transzgenikus rátát is. Ennélfogva minden transzpozonos rendszer esetében érdemes előzetes vizsgálatokkal beállítani az adott sejttípusban elérhető legoptimálisabb körülményeket, amelyek génterápiás alkalmazásokban kiemelten fontos tényezői lehetnek a hatékony és biztonságos transzgenézisnek.

Végezetül még egyszer szeretném megköszönni Dr. Székvölgyi Lórántnak, 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