

Akadémiai Doktori Értekezés bírálata.

Dr. Lakatos Lóránt:

***Virális RNS silencing szupresszorok működési
mechanizmusai.***

Bíráló:

Szabados László D.Sc.

Általános bírálat.

Dr. Lakatos Lóránt MTA doktori értekezése 15 év kutató munkáját összegzi. A Jelölt kutatásai egy témakörhöz kapcsolódnak, fő érdeklődési területe a növények vírusfertőzése során fellépő géncsendesítés gátlása, szupressziója. A növények vírusokkal szembeni immunrendszere az idegen RNS feldarabolásához, vagy a génexpresszió gátlásához vezető RNS silencing. A nagy hatékonysággal működő rendszer ellen sok vírus olyan szupresszor stratégiát fejlesztett ki, amely gátolja az RNS silencing kialakulásának kulcs lépéseit és így lehetővé teszi a vírus szaporodását. A rendszer kicsit hasonlít a több évtizedes szovjet-amerikai fegyverkezési verseny során kölcsönösen fejlesztett atomrakéta elleni rakétát támadó ellen-ellen rakéta rendszerre, ahol a vírus a támadó atomrakétának felel meg, a silencing mechanizmus az ellenrakéta analógja míg a silencing szupresszor az ellenrakéta elleni rakétának felelne meg.

Az értekezés a növényi vírusokkal szembeni rezisztenciát biztosító géncsendesítés vagy silencing hatékonyságát csökkentő molekuláris mechanizmus néhány formáját ismerteti. A dolgozat a vírusfertőzéssel szembeni immunitást biztosító RNS silencing hatékonyságának drasztikus csökkenésével járó szupresszió jelenségével foglalkozik. A silencing szupresszorok speciális vírusfehérjék, amelyek többnyire a csendesítésben kulcsszerepet játszó RISC komplex kialakulását gátolják. Az évekig tartó kutatások során több növényi vírus silencing szupresszor fehérjéjét vizsgálták, tanulmányozták a szupresszor fehérjék működését, összehasonlították a silencing-et csökkentő hatásmechanizmusokat. A szerző a dolgozatban ismerteti a Cymbidium ringspot vírus (CymRSV) p19 fehérjéjét, a Carnation ringspot virus (CIRV) p19 fehérjéjét, a Tobacco etch virus (TEV) HC-PRO, a Beet yellows virus

(BYV) p21 és a Roce hoja blanca virus NS3 fehérjéjét. Ezen kívül részletesen leírja a Sweet potato mild mottle virus (SPMMV) P1 silencing szupresszorának működését, a fehérje funkcióját, a különböző SPMMV P1 domének szerepét az AGO1 megkötésében, a mikroRNS kapcsolódás gátlásában.

A dolgozat egy jól átgondolt, versenyképes alapkutatási program megvalósítását összegzi. Az eredmények jelentősen hozzájárultak a vírus szaporodását befolyásoló csendesítés és a csendesítést gátló, de a vírusszaporodást elősegítő szupresszor rendszerek jobb megismeréséhez. A kísérletes munka során többféle korszerű molekuláris, biokémiai, sejtbiológiai módszert alkalmazott. A funkcionális in vivo vizsgálatokhoz a dohány levél infiltráláson alapuló élettani illetve fluoreszcens képalkotó módszereket alkalmazó tesztrendszert dolgozott ki, amivel jól reprodukálható eredményeket ért el.

A kutatások jelentősége, időszerűsége

A géncsendesítés, a silencing kutatása az egyik leggyorsabban fejlődő, legforróbb terület nemcsak a növénybiológiában, de az orvosi és fejlődésbiológia különböző területein is. Mára kiderült, hogy az epigenetikai szabályozás, a silencing különböző mechanizmusai szabályozzák a növény fejlődés, az abiotikus és biotikus hatásokkal szembeni tolerancia meghatározó lépéseit. Sokkal általánosabb, elterjedtebb mechanizmusról van szó mint akár pár éve is gondoltuk. Dr. Lakatos Lóránt által kutatott terület, a patogén vírusok elleni védekezés során fellépő silencing szabályozása, gátlása egy speciális terület, ami hozzásegített a géncsendesítés, a vírus rezisztencia biológiai alapjainak jobb megértéséhez, de jelentős a biotechnológiai alkalmazások kidolgozása szempontjából is. A kutatások időszerűségét, uttörő jellegét bizonyítja a (főleg régebbi) publikációkra kapott hivatkozások nagy száma.

Részleges bíráló.

A dolgozat 145 oldalon keresztül ismerteti tizenöt év fontosabb kutatási eredményeit. Formailag a hagyományos beosztást követi, Bevezetés, Irodalmi áttekintés, Célkitűzések, Anyagok és módszerek, Eredmények, Eredmények megvitatása és egy Rövid összefoglaló fejezetekből áll, amit Köszönetnyilvánítás, Irodalomjegyzék és egy rövid Függelék követ.

Az értekezés rengeteg adatot, kísérletet ismertet részletesen (42 összetett ábra), bizonyítván hogy az bemutatott eredmények mögött jól megtervezett, alapos

és tudatos kísérleti munka áll. A dolgozatban bemutatott adathalmaz talán már túl sok is. Esetleg jobb lett volna a fontosabb eredmények részletes ismertetése mellett a már úgyis publikált eredmények összegzésére, megvitatására, modellek kidolgozására, a felfedezések biológiai jelentőségére koncentrálni.

Az értekezés legfontosabb eredményei.

A Cymbidium ringspot vírus p19 szupresszor jellemzése.

A jelölt részletesen leírja, ismerteti a CymRSV p19 szupresszor működését. Egy in vitro Drosophila rendszer alkalmazásával bizonyítja, hogy a p19 siRNS kötése révén gátolja a RISC komplex kialakulását és a RNS silencing-et. Nicotiana benthamiana tranziens rendszerben bizonyítja, hogy a p19 siRNS kötése révén gátolja a silencing-et in vivo. Ezen eredmények segítségével először sikerült egy silencing szupresszor működési mechanizmusát megismerni. A CymRSV p19 szupresszor tanulmányozásánál alkalmazott módszerek segítségével igazolja hogy a Carnation ringspot virus (CIRV) p19, a Tobacco etch virus (TEV) HC-PRO, és a Beet yellows virus (BYV) p21 fehérjéi is siRNS kötése révén gátolják a RISC komplex kialakulását és a RNS silencing-et.

A silencing szupresszorok és a kis RNS metiláció.

Fontos felfedezés volt a siRNS metiláció szerepének kiderítése. A dolgozat ismerteti, hogy a citoplazmában található vírus eredetű siRNS-ek metiláltak, ami meggátolja a lebomlásukat. A HC-Pro és CIRV p19 fehérjék viszont gátolják a metilációt, ami végső soron siRNS lebomlásához vezet, vagyis ezek a szupresszorok a metiláció befolyásolása révén gátolják a silencing-et. A metiláción alapuló silencing szupresszió jelensége egy érdekes, korábban kevésbé ismert stratégia, ami alternatív lehetőséget kínál a vírusfertőzés elősegítése számára.

A Sweet potato mild mottle virus (SPMMV) P1 silencing szupresszora

A SPMMV P1 fehérje tanulmányozása során egy másik új típusú silencing mechanizmust sikerült megfigyelni. A P1 szupresszor az AGO1-hez kötődve közvetlen kapcsolódik a siRNS és a miRNS-hez és RISC komplexek kialakulását gátolja. Az AGO1 kötése megakadályozza a cél RNS kapcsolódását, ezáltal gátolja a géncsendesítést. Bizonyították, hogy a P1 fehérje cink finger moívuma elengedhetetlen a silencing szupresszor aktivitáshoz. A fehérje kölcsönhatások jellemzése során azonosították az AGO1 kapcsolódásért felelős un. WG/GW domént, és bizonyították hogy a szupresszor aktivitásért egy másik régió felelős.

Ezek a felismerések vezettek az első mesterséges silencing szupresszor elkészítéséhez. A SPMMV P1 szupresszorhoz hasonló de inaktív SPFMV P1 típusú fehérjéjébe építettek WG/GW domént, ami lehetővé tette hogy a módosított fehérje AGO1 kötő silencing szupresszor aktivitást mutasson.

Technikai fejlesztések

Technikai szempontból fontos volt az in vitro Drosophila rendszer kidolgozása és adaptálása, ami lehetővé tette a silencing szupresszió mechanizmusának tanulmányozását (SiRNA kötés tulajdonságai, RISC komplex kialakulása, stb.). A N. benthamiana expressziós rendszer segítségével viszont egy jól reprodukálható növényi rendszert sikerült alkalmazni, ami lehetővé tette a silencing és a szupresszió in vivo vizsgálatát.

A gyakorlati alkalmazások lehetősége

A kutatási program felfedező jellege mellett az eredményeket, egyes kidolgozott technikákat az alkalmazott kutatások is hasznosíthatják, ahogy erre az utolsó oldalakon felhívja a figyelmet. Az eredményeket nemcsak a virológiában, növénykórtanban lehet alkalmazni, de az optimalizált expressziós rendszer alkalmas lehet az orvosi, ipari szempontból fontos fehérjék termeltetésére, az ún. “molecular farming” technológia hatékonyságának segítésére is.

Kérdéseim

1. Mi az oka, hogy Drosophila rendszerben vizsgálták a P19 funkcióját, a silencing szupressziót? Mi az előnye a heterológ rendszer alkalmazásának?
2. Mennyire általános jelenség a silencing szupresszió a növényi vírusoknál? Mindegyik vírusnak van silencing szupresszor rendszere, ez inkább kivételes mechanizmusnak mondható vagy bizonyos vírusokra jellemző?
3. Mi lehet a silencing szupresszor fehérjék eredete? Eredetileg mi lehetett a szupresszor fehérjék őseinek a funkciója? Miből differenciálódhattak?
4. Ismertek-e olyan növényi fehérjék amelyek virális szupresszorokhoz hasonlóan gátolják a kis RNS-ekhez kapcsolódó silencing-et?

5. Van-e olyan (növényi) mechanizmus, ami a silencing szupresszort gátolja? Van-e következő lépése a “fegyverkezési versenynek”? Lehetséges-e szupresszor gátlással javítani a haszonnövények vírusrezisztenciáját? Van-e erre példa?
6. Történtek-e lépések az eredmények, a kidolgozott technológiák gyakorlati alkalmazására? Milyen lehetőségeket lát a biotechnológiai célú fejlesztések területén?

Formai megjegyzések, hiányosságok

Az értekezés jól olvasható, többnyire igényesen megírt mű, habár több helyen találok hibákat, elírásokat, hibás mondszerkezettel. Ezek a hibák nem zavarják a szöveg érthetőségét, de mégis ott vannak.

A rövidítések jegyzékéből több rövidítés hiányzik, a lista nem teljesen követi az ABC sorrendet, ami zavaró. Lehet, hogy a dolgozatban mindegyik rövidítésnek valahol szerepel a teljes neve, de a témában nem jártas olvasó könnyen elveszíti a fonalat a sok vírusnév, fehérje vagy más, számára kevésbé ismert név olvasása során. Ebben segít a rövidítés jegyzék, ami sajnos nem teljes.

Az értekezésben nem tüntette fel az értekezés alapjául szolgáló közlemények listáját. Jó lett volna a szövegben egyértelműbben megjelölni, hogy egy adott eredményt eredetileg hol, melyik publikációban közölték, illetve a végén hasznos lett volna megadni a megfelelő közlemények listáját. Az értekezés alapjául szolgáló cikkek listája csak a rövid Tézisekben hozzáférhető.

A dolgozat alapját jelentő publikációk

A doktori értekezés alapját nyolc közlemény adja, ezek között három EMBO J., két Nucleic Acid Research, és egy-egy J. Virology, PLOS Pathogens, Acta Biologica Segediensis és RNA folyóirat cikk található. Elmondható, hogy a publikációk döntő többsége nagy presztizsű nemzetközi szakfolyóiratokban jelent meg. A jelölt két közleményben első és háromban utolsó szerző. Ezen kívül négy közlemény kapcsolódik a dolgozat témájához, amelyek a növény virológia és a RNS silencing témakörben jelentek meg.

A legfontosabb eredmények, felfedezések összefoglalása

A dolgozat több, nemzetközileg is figyelemreméltó kutatási eredményt ír le. Én az alábbiakat tartom a legkiemelkedőbb eredményeknek.

1. A Cymbidium ringspot vírus (CymRSV) p19 fehérjéjének vizsgálata révén először derítettek fényt a növényi vírusok silencing szupressziójának mechanizmusára, bizonyítva, hogy a szupresszor általában a siRNS kötés révén a RISC komplex kialakulását gátolja, ami csökkenti a RNS silencing hatékonyságát.
2. Az SPMMV P1 szupresszor fehérje jellemzése során felfedeztek egy új RISC gátló mechanizmust, ami az egyszálú siRNS-hez kapcsolódó RISC kialakulását veszi célba. Elsőként írták le, hogy egy AGO1 kötő WG/GW domént tartalmazó fehérje (a SPMMV P1 szupresszor) specifikusan gátolhatja az AGO1 aktivitást, ezáltal csökkenti a RNS silencing hatékonyságát.
3. Megállapították, hogy egyes RNS kötő szupresszorok megakadályozzák a vírus eredetű siRNS-ek metilációját, és ezáltal elősegítve a lebomlásukat. Ezáltal egy korábban nem ismert szupresszor mechanizmust sikerült felfedezni.
4. A silencing szupressziót nem mutató SPFMV P1 fehérje módszeres in vitro módosításával először sikerült mesterséges szupresszor fehérjét létrehozni. Bizonyították, a WG/GW motívumok fontosságát a szupresszor funkcióhoz, amivel egyes inaktív fehérjéket szupresszorrá lehet alakítani.
5. Fontos módszertani fejlesztés volt a hatékony, reprodukálható in vitro és in vivo kísérleti rendszerek kidolgozása a virális szupresszorok tanulmányozásához. Ezek segítségével több szupresszor fehérjét sikerült jellemezni.

Konklúzió

Lakatos Lóránt a doktori értekezésében tömören, magas színvonalon írja le, foglalja össze a géncsendesítés területén elért, nemzetközi mércével is figyelemreméltó eredményeit. A kutatások illetve az értekezés magas színvonala, valamint az értekezés alapjául szolgáló publikációk alapján javaslom a MTA Doktora tudományos cím elnyeréséhez szükséges nyilvános vita kitűzését.

2018.09.10.



Dr. Szabados László
MTA Szegedi Biológiai Központ