

Lakatos Lóránt

„Virális RNS silencing szupresszorok működési mechanizmusai” c.
akadémiai doktori értekezésének bírálata

TÉMAVÉLASZTÁS

Az RNS csendesítés, más néven RNS interferencia, mechanizmusának felfedezése az elmúlt évszázad utolsó éveire datálható, amit a jelöltnek a területen megjelent első közleményei csak néhány évvel követnek. Így elmondható, hogy Lakatos Lóránt egy éppen akkor robbanásszerű fejlődésnek indult kutatási területbe kapcsolódott be külföldi posztdoktorális tanulmányútjáról hazatérve. Már annál is inkább elmondható ez, mivel éppen akkor számoltak be a Burgyán József által vezetett laboratóriumban, amelynek tagjává vált, a virális RNS silencing szupresszorok felfedezéséről. Kutatási területe ezeknek a fehérjéknek a funkcionális vizsgálata lett, amit kitartó alaposággal folytatott munkatársával mintegy 15 évig. Értekezése az ennek során elért, sok tekintetben úttörő jellegűnek tekinthető, eredményeket foglalja össze, melyeket egyebek mellett a jelölt számos metodikai fejlesztése, módosítása tett lehetővé. Témaválasztása tehát rendkívül időszerű volt és az még ma is.

FORMAI KÖVETELMÉNYEK ÉRVÉNYESÜLÉSE ÉS FORMAI ÉSZREVÉTELEK

A dolgozat az elvárt alapvető formai követelményeknek megfelel. Az értekezés elején egy egyoldalas rövidítés jegyzék található, ami azonban nem teljes, számos rövidítés található a szövegben, ami nem került be ide és a szövegben sincs definiálva. A tényleges dolgozat egy **rövid bevezetővel** kezdődik, ami jól összefoglalja a tág kutatási területet. Egy megjegyzésem van ezzel a résszel kapcsolatban: a 6. oldalon azt írja, hogy „Az állati szervezetekben kialakult adaptív immunitásnak a növényekben az ún. RNS silencing (csendesítés) felel meg.” Ez így nem igaz. Az RNS csendesítés a növényekben egyfajta adaptív immunitásnak tekinthető ugyan, de közel sem feleltethető meg az állati szervezetek mobilis immunsejteken alapuló adaptív védekezési rendszerének.

Az **Irodalmi áttekintés** fejezetben a jelölt áttekintést kívánt adni az RNS csendesítés általános mechanizmusáról, néhány fontosabb fehérje komponens ill. komplex szerepéről, az egyes organizmusokban feltárt sajátosságokról és végül az antivirális RNS csendesítésről. A fejezet

alaposnak mondható, sok irodalmat dolgoz fel és számos részletet bemutat. Azonban a fejezet felépítése nem logikus, ami megnehezíti a megértést. Az első alfejezet az RNS csendesítés általános mechanizmusát mutatja be, majd következik egy fejezet az ARGONAUTE fehérjéről, ezt néhány jelentősebb élőlénycsoport (fonálféreg, ecetmuslica, ember, lúdfü) RNS csendesítési komplexeinek, mechanizmusainak ismertetése követi (nem tudom az élesztő miért maradt ki?), melyek nyilvánvalóan sok tekintetben ismétlik az általános modellt és egymást, majd az ARGONAUTE fehérjével kölcsönható WG/GW fehérjék ismertetésére kerül sor (az csak a dolgozatot végig olvasva derül ki, hogy miért kellett ezeket a fehérjéket külön tárgyalni), amit az antivirális silencinggel kapcsolatos részek követnek. Célszerűbb lett volna a silencing mechanizmust a részeire felbontva és az egyes élőlényeket ezeken belül összehasonlítva tárgyalni.

A 2.9. alfejezet címe egyszerűen „Vírusok”, ami meglehetősen túlzás, hiszen mindössze a dolgozatban tárgyalt néhány növényi vírus családot ismertet röviden. Hasonlóan a 2.10. „Az antivirális silencing” és a 2.11. „A virális silencing szupresszorok” alfejezetek címében jelezni kellett volna, hogy csak a növényi vonatkozásokról szólnak.

Egy a témában kevésbé járatos olvasó számára rendkívül megnehezíti a megértést, hogy egyes rövidítések, fogalmak azelőtt kerülnek elő a szövegben, mielőtt kiderülne, hogy mit takarna. Ilyen pl. a DICER/DCL1 rövidítés (9. oldal) a WG/GW fehérje (13. oldal). Az élesztő RITS komplex tárgyalása során elő kerül egy sor definiálatlan funkciójú fehérje nevének rövidítése (nincsenek meg a rövidítés jegyzékben sem) majd váratlanul átvált a jelölt a RISC komplex RNS-vel való feltöltődésének tárgyalására, de ennek a komplexnek összetételét már nem írja le (13. oldal). Egy hozzá nem értőnek talán furcsának tűnhet az inkább informatikainak tűnő „mikroprocesszor komplex” kifejezés, amit szintén nem ártott volna definiálni (10 oldal).

A 12. oldalon azt írja, hogy „az AGO fehérjék közé tartozó PIWI”, a 17-en pedig, hogy a négy humán AGO a PIWI szupercsaládba tartozik, a 18. oldalon, hogy „Az eddig azonosított növényi AGO-k közül egyik sem tartozik a PIWI alcsaládba”. Akkor most melyik a szupercsalád, a család ill. alcsalád?

A 18. oldalon a növények törzséről beszél. A növények taxonómiaiilag nem törzs, hanem ország.

A 25. oldalon azt írja, hogy „A VSR-ek elengedhetetlenek az Agrobacterium-mediált tranziens expressziós kísérletekben”, ami kis túlzás. A VSR-ek felfedezése előtt is használtuk ezt a technikát, csak kevésbé volt megbízható.

A 26. oldalon megfogalmazott **Célkitűzések** rendkívül általánosan vannak megfogalmazva, gyakorlatilag a vizsgált silencing szupresszorok vannak felsorolva, mint jellemzendő fehérjék. Ennél a „jellemezzük, aztán majd csak találunk valamit” jelentésű megfogalmazásnál elegánsabb lett volna azokat a tudományos kérdéseket felvetni itt, amiket a jelölt meg kívánt válaszolni ezeknek a fehérjéknek a jellemzése révén.

Szintén nem túl elegáns, hogy az **Anyagok és módszerek** fejezetben a „Molekuláris biológiai módszereket” egyetlen mondattal elintézi a jelölt, mondván standard módszereket használt. Legalább az ezeket a módszereket leíró kézikönyvre, vagy néhány alap vagy akár saját közleményre hivatkozhatott volna.

A felhasznált génkonstrukciók száma (39) impozáns. Az immunprecipitációhoz használt anti-testek ismertetése hiányzik. A Gélkromatográfia módszerének leírása szerint mind az RNS mind a fehérje izolálása a páros frakciókból történt, ami gondolom elírás. Az MBP fúziós fehérje nincs definiálva, nincs a rövidítések között sem (33. oldal). A qRT-PCR leírásánál a $2^{-\Delta\Delta CT}$ kitevőjéből hiányzik a negatív előjel.

Az **Eredmények** fejezet jól áttekinthetően, logikusan mutatja be azokat az egymásra épülő kísérleteket, amelyek az egyes silencing szupresszorok hatásmechanizmusának megértéséhez vezettek. Ugyanakkor a leírás egy-két ponton tartalmaz pontatlanságokat, hiányosságokat.

Számomra érthetetlen, hogy a RHBV NS3 szupresszorral kapcsolatos eredmények ábrái, és csak azok, miért kerültek a függelékbe?

A 37. oldalon a p19 protoplaszt rendszert említi, de nem írja le mit kell ezen érteni.

A 40. oldalon azt írja, hogy „rendelkeztünk olyan információval, amely szerint a CymRSV p19 siRNS kötő fehérje” majd ezt követően a 41. oldalon „Ezután célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk, rendelkezik-e a p19 siRNS kötő tulajdonsággal”.

Az 51. oldalon a let-7 siRNS, a 81. oldalon az UPF1 fehérje nincs definiálva. A 85. oldalon hibásan szerepel a szövegben, hogy a P1 triplamutáns esetében immunprecipitációval kimutatták az AGO1 fehérjét és a siRNS-t. Ez valójában a vadtypus P1 esetében sikerült és a triplamutáns esetében nem

(vö. E33. ábra 6. oszlop illetve a következő mondat „Sem a dupla, sem a tripla mutánsok nem mutattak AGO1-kötő képességet”).

Az **Eredmények megvitatása** fejezet szintén jól felépített és megírt, részletesen ismerteti a kutatási területen a jelölt és munkatársai, illetve más laboratóriumok által eddig elért eredményeket. Így lehetőség nyílik a jelölt munkásságának egy szélesebb nézőpontból való értékelésére. Az esetenként egymásnak ellentmondó irodalmi, illetve saját eredményeket megfelelő kritikával és alaposággal elemzi. Ez a fejezet egyetlen összefoglaló ábrát tartalmaz (D1), ami egyrészt igen kisméretűre sikeredett, az ábra aláírás nem azon az oldalon van, mint az ábra és az ábra a szövegben való első említésétől 20 (!) oldalra található.

Általánosságban is elmondható, hogy az ábrákkal sok kisebb probléma van, elsősorban az aláírásokkal, a rájuk való hivatkozásokkal. Egy tudományos mű esetében elvárt, hogy az ábrák önmagukban értelmezhetőek, érthetőek legyenek. Ez itt nem valósul meg, az ábráknak szinte csak címe van, vagy nagyon rövid általános leírása annak, hogy mit ábrázolnak. Néhány példa: Az I1 ábrán levő rövidítések nincsenek az aláírásban megmagyarázva. Az I2 ábrára rossz helyen hivatkozik. Az I3 ábra kicsi, pedig a fél oldal alatta üres, és nincs megmagyarázva miért más színűek egyes fajnevek. Az I4 ábrára 4. ábraként hivatkozik. Az E1 ábra azt sugallja, hogy a target RNS-ből a dsRNS-vel komplementer rész egyben vágódik ki. Az E8 ábrán P19 szerepel a GST-P19 helyett. Az E12 ábra részeire nem sorrendben hivatkozik. Az E16 ábra B részére hivatkozik a szövegben a C rész helyett. E39 ábra aláírása másik oldalra került, az 1-7 oszlopaire nincs hivatkozás. Az E40 ábrán a transzkripciót igazoló PCR eredmények alig láthatók. Sok ábra aláírás tartalmaz elírást.

Sajnos a dolgozat egészére elmondható, hogy a precíz és pontos kísérleti tervezéssel és kivitelezéssel élesen szemben áll a rengeteg elírást, pontatlanságot, szerkesztési hibát, tartalmazó értekezés. Ezek olyan számosak, hogy ezekre a bírálatban konkrétan nem térek ki.

SZAKMAI ÉSZREVÉTELEK, KÉRDÉSEK

A dolgozat szakmai szempontból rendkívül színvonalas. A jelölt sikeresen adaptált, illetve fejlesztett ki néhány olyan in vitro, illetve in vivo kísérleti rendszert, amelyeket azután kiválóan tudott használni több vírus silencing szupresszor funkcionális jellemzésére. A kísérletek körültekintően lettek megtervezve, logikusan épültek egymásra, ami lehetővé tette megalapozott következtetések levonását. Ezek a következtetések gyakran a tudományra nézve újak voltak és jelentősen

hozzájárultak a silencing szupresszorok kutatásának előmozdításához, azok hatásmechanizmusának megértéséhez.

Lakatos Lóránt legfontosabb eredményeiként értékelem, hogy

- számos virális silencing szupresszorról bebizonyította, hogy a ds siRNS kötésén alapul a hatásmechanizmusuk és az aktív RISC komplexre nem hatnak.

Továbbá,

- azonosította a SPMMV vírusnak egy új típusú silencing szupresszor fehérjét és részleteiben feltárta annak az AGO1/kis RNS komplexhez való kapcsolódáson alapuló egyedi hatásmechanizmusát.

Konkrét észrevételeim, kérdéseim:

A 23. oldalon azt írja, hogy a DCL-ek szükségesek lehetnek a vírus replikáció fenntartásához, de nem fejt ki, hogy hogyan.

Az E8 ábrán bemutatottak szerint a P19, p21 és Hc-Pro szupresszorok között nagyságrendi különbségek vannak az in vitro target RNS vágásra gyakorolt hatásban. Ismert-e ennek a magyarázata, meglehet-e ez a különbség in planta is és ha igen, van-e összefüggése a vírusok fertőzőképességével?

A E8 I ábra alapján kijelenthető-e egyértelműen, hogy a Hc-Pro fehérje nem gátolja az indirekt kísérleti beállításban a target RNS vágást? A hasítási termék 17%-ról kb. 12%-ra csökken és a szórások nem tűnnek átfedőnek. Történt-e statisztikai analízis, ami ezt alátámasztja? Lehet-e ekkora eltérésnek jelentősége?

Az E9 ábra alapján kijelenti, hogy a DICER-R2D2 komplexhez nem kötődik a jelölt target RNS analóg. De az autoradiogrammon (3. oszlop) látszik abban a tartományban egy viszonylag erős jel. Mi lehet ez?

Az 53. oldalon tárgyalja a Hc-Pro szupresszor siRNS-kötő képességét. Nem egyértelmű számomra a heparin hatása ebben a kísérletben. Miért jelenti ez azt, hogy a Hc-Pro fehérjekivonatban megváltozott siRNS-kötő tulajdonsága nem lehet kapcsolatban az RNS silencinggel? A Hc-Pro fehérje kivonatokban megfigyelt nagyobb komplexe multimerizációt jelent (vö. 105. oldal)? A

fehérjegyazdag környezet lehet bármilyen fehérje pl. BSA által is biztosított? Milyen módon befolyásolhatja ez a Hc-Pro aktív frakciójának arányát?

Hogyan magyarázza a Hc-Pro és a p19 eltérő hatását a siRNS metilációra (E18 ábra)? Mi lehet a magyarázata és jelentősége annak, hogy a TEV eredetű siRNS-ek 100%-ban metilálatlanok, a CIRV siRNS-ek 80%-ban metiláltak a fertőzött növényben?

A Hc-Pro egy proteináz. Van-e ilyen aktivitása és egyéb szerepe a silencing mellett? A SPMNV P1 fehérjéjének is proteináz doménje van. Ez véletlen, vagy van valamilyen jelentősége annak, hogy proteinázok váltak silencing szuppresszorokká?

Mi indokolta az E29 ábrán bemutatott kromatográfiás kísérletet, amikor az E30 ábrán bemutatott kísérlettel a közvetlen kölcsönhatást is kilehetett mutatni a fehérjék között?

Az in planta kísérletekben 35S promóterrel tranziensen kifejeztetett virális géneket használt. Ez feltehetően igen magas fehérjeszinteket jelentett a növényi sejtekben. Mennyire lehet az így kapott eredményeket a valós vírusfertőzés körülményeire extrapolálni?

Az E 36. ábrán az AGO1 DAH és a P1 fehérje együttes csendesítő hatásának magas szintjére adott magyarázat nem egyértelmű. Nem az, vagy az is, lenne várható, hogy az AGO1 DAH fehérje kivonja (kitirálja) a P1-et az endogén AGO1-vel való kölcsönhatásból?

Szintén ezen az ábrán mutatja be, hogy a P1 AGO1-aktivitást gátló hatása mellett az AGO2 transzkripciója és aktivitása megnövekszik. Elképzelhető magyarázat lehet-e, hogy a növény a gátolt AGO1 aktivitás kompenzálásaként emeli meg az AGO2 transzkripciót és aktivitást? Hogyan tudott az endogén és a bevitt AGO2 gének expressziója között különbséget tenni?

Még szintén az E36 ábrával kapcsolatban azt írja, hogy az AGO2 és P1 együttes expresszáltatása megnöveli az AGO2 aktivitást, ami az ábra alapján (B rész 9,10,11 oszlopok) kétséges, hogy szignifikáns különbség-e.

Az E40 ábra kapcsán: ha az AGO1 DAH fehérje stabilizálja a target RNS-t, akkor nem kellene a 14 oszlopban transzkriptet látni?

A 96. oldalon azt írja, hogy „a P1-C88A/C130A mutáns megköti az AGO1 DAH fehérjét, azonban ez a komplex nem tartalmazza a target RNS-t” ... De az E40 ábra 16. oszlop és az ezt megelőző mondat alapján tartalmazza. Ez tehát csak elírás?

Van arra elképzelés, hogy mi a SPMMV vírus P1 fehérje N-terminális extenziójának az eredete? A 86. oldalon említ egy 383 aminosavas fehérjét, ami a P1 N-terminális részét tartalmazza. Ez lehet az eredeti szupresszor, ami a nagyobb 759 aminosavas fehérjére került rekombinációval vagy éppen fordítva, arról vált le? Vannak ezzel az N-terminális szakasszal homológ fehérjék bármilyen organizmusban az említett SPFMV P1 fehérjén kívül?

Végezetül, az eredmények lehetséges biotechnológiai alkalmazásaként a transzgén expresszió stabilizálását említi növényekben. A vírus kórokozókkal szembeni védekezéshez hozzájárulhat-e a silencing szupresszorok kutatása?

Összefoglalásként megállapítom, hogy Lakatos Lórántnak az értekezésben bemutatott, gondosan megtervezett és kivitelezett kísérleti munkán alapuló tudományos eredményei nemzetközi mércével mérve is igen magas színvonalúak. Az eredmények jelentősen hozzájárultak a virális silencing szupresszorokkal kapcsolatos kutatási terület fejlődéséhez. A dolgozat a formai követelményeknek megfelel, bár sok formai hibával, de kellő tudományos alapossággal készült. Az értekezés alapján Lakatos Lóránt méltó az MTA doktora cím viselésére, így javaslom a nyilvános vita lefolytatását.

Prof. Dr. Fehér Attila
egyetemi tanár, az MTA doktora

Szeged, 2018. 10. 07.