

OPPONENSI VÉLEMÉNY

**Lakatos Lóránt: „Virális RNS silencing szupresszorok működési mechanizmusai” című
akadémiai doktori értekezéséről**

Az idegen vírus DNS/RNS felismerésére és hatástalanítására szolgáló rendszerek már a baktériumokban megtalálhatók. A restrikciós-modifikációs rendszerek felfedezésének köszönhetően alakulhatott ki a génszélesztés, és vehette kezdetét a gének szerkezetének megismerése. Napjaink ígéretes és izgalmas új lehetősége a génszerkesztés, amely szintén az idegen DNS azonosítására és hatástalanítására szolgáló védekezési rendszerek megismeréséből fejlődött ki, és ad további új genetikai eszközöket a kezünkbe. A harmadik, idegen és saját gének expresszióját megakadályozó rendszer RNS molekulák szekvencia specifikus felismerésén alapul, amit géncsendesítésnek nevezünk. E felismerési mechanizmus szerepet játszhat a szervezetet megtámadó egyes vírusok szaporodásának gátlásában. A géncsendesítés molekuláris hátteréről már sok minden ismert, de bőven vannak még megválaszolandó kérdések is, ezért napjaink izgalmas és fontos kutatási témái közé tartozik a folyamat megértése.

Lakatos Lóránt dolgozata egy, a géncsendesítés molekuláris történéseinek megértése érdekében végzett kutatómunkát mutat be. Elsősorban egyes növényi vírusoknál a géncsendesítés hatástalanítására kialakult védekezési mechanizmusok működési elveit tárta fel sikeresen. A jelölt a gödöllői Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézet hosszú ideje kiváló munkákat publikáló közösségében tanulta a szakmát, és végezte el a dolgozatban összegzett munkát. Főbb eredményei a következők:

1) Kimutatták *Drosophila* embrió *in vitro* RNS silencing rendszer segítségével, hogy a *Cymbidium ringspot virus* (CymRSV) géncsendesítést gátló (silencing szupresszor) p19 fehérjéje megköti a virális eredetű siRNS-eket, így akadályozva a siRNS-RISC komplexek kialakulását, és a vírus elleni védekezés felépülését.

2) A gátló fehérjék hatásmechanizmusának vizsgálatára egy *in vitro* és *in vivo* vizsgálati rendszert is kifejlesztettek, mely segítségével igazolták négy, különböző vírusok által kódolt géncsendesítést gátló fehérje (p19, p21, NS3 és HC-Pro) esetében is, hogy azok hatékonyan kötik a kis RNS molekulákat, ezzel akadályozva meg a RISC komplexek felépülését. Tehát, a

kis RNS molekulák lekötése sok vírusnál egy bevett védekezési mechanizmus, hogy megtörjék a növények vírusokkal szembeni védekezésének hatékonyságát.

3) Sok, gondosan tervezett kísérletben bizonyították hogy, az addig vizsgált gátló fehérjéktől eltérően, a *Sweet potato mild mottle virus* (SPMMV) P1 silencing szupresszora új típusú működési mechanizmussal rendelkezik, gátolja az aktív RISC komplexek működését, és egy AGO1 kötő fehérje, melynek funkcionálisan fontos része az N-terminális helyzetű három WG/GW domén. Mutációk létrehozásával bizonyították, hogy az SPMMV P1 fehérjében az elkülöníthető géncsendesítést gátló funkció egy cink ujj doménhez köthető.

4) Az SPMMV P1 fehérjéhez hasonló felépítése van a *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV) által kódolt P1 fehérjének is, ennek ellenére a kísérletek szerint ennek nincs a géncsendesítésre gátló hatása. Feltételezték, hogy ennek oka a szokványostól eltérő, hiányos WG/GW domén elrendeződés. A feltételezetten aktív domén szerkezetet pontmutációk segítségével helyreállítva az egyik módosított P1 fehérje már kimutathatóan gátló hatással rendelkezett. Bizonyították, hogy a gátlás hasonlóan működött, mint az SPMMV P1 fehérje esetében.

A dolgozat által bemutatott munka minden kétséget kizáróan értékes. Az eredményeket ennek megfelelően rangos nemzetközi folyóiratokban közzétették, melyek között megtalálható például két EMBO Journal, két Nucleic Acids Research és egy Plos Pathogens publikáció is. A dolgozat alapjául szolgáló közlemények többségében a jelölt első vagy utolsó szerző. Ezek összesített impakt faktora 65.

Sajnos, a doktori értekezésről magáról már sokkal kevésbé tudok elismerően nyilatkozni. Kivitelezése sok kívánni valót hagy maga után, rengeteg benne a helyesírási hiba, az elírás, a labor szleng, és a pontatlanul fogalmazott mondat. Ezeket egy külön mellékletben igyekeztem felsorolni, de a teljesség igénye nélkül. Általában a típus hibáknak csak az első előfordulását jeleztem.

Ha az MTA az akadémiai doktori cím odaítéléséhez megköveteli egy önálló összefoglaló mű benyújtását, akkor – úgy gondolom – ennek a bemutatott munka tudományos értékével összhangban, igényesen, az elvárásoknak megfelelően kell elkészülnie. Ha megköveteljük, hogy egy diplomamunka vagy egy PhD dolgozat formai elvárásoknak is megfeleljen, akkor

miért szállítanánk lejjebb a színvonalat az akadémiai doktori dolgozat esetében? A jelölt ilyen készültségi fokkal kéziratot biztosan nem küldene el. Azt javaslom, hogy vonja vissza a dolgozatát, és alapos átnézés után, a szabályok engedte határidővel ismét nyújtsa be azt.

A fent említett, és a mellékletben felsorolt hibák miatt a dolgozat nyilvános vitára bocsájtását ebben a formában nem javaslom.

2018. november 22.

Dr. Putnoky Péter
az MTA doktora

HIBAJEGYZÉK

**Lakatos Lóránt: „Virális RNS silencing szupresszorok működési mechanizmusai” című
akadémiai doktori értekezéséhez**

A doktori értekezés kivitelezése sok kívánni valót hagy maga után, rengeteg benne a helyesírási hiba, az elírás, a labor szleng, és a pontatlanul fogalmazott mondat. Ezeket ebben a mellékletben igyekeztem felsorolni, de a teljesség igénye nélkül. Általában a típus hibáknak csak az első előfordulását jeleztem. A lényegesebb és a típusos hibákat aláhúzással emeltem ki.

5. old.: RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE – a végén felborul az abc sorrend, több rövidítés nem szerepel benne, ami a szövegben később előfordul (pl.: 11. old., 24. sor: RACE; 12. old., 2. sor: TAS;)

7. old., 12. sor: „Pl. a virális RNS polimerázok ...” – nem szerencsés itt rövidítést alkalmazni. Helyesebb kiírni: “Például, a virális RNS polimerázok ...”

7. old., 20. sor: „megfelelő R génnek” – helyesen: “megfelelő R génnel”

7. old., 22. sor: „evolválódtak” – az idegen nyelvű helyett, ha lehet, szerencsésebb magyar kifejezést használni. Például: „fejlődtek ki”.

9. old., 1. sor, és később: „diverzifikálják,” – „módosítják”, lásd az előző megjegyzést.

9. old., 13. sorban és utána szinte minden irodalmi hivatkozás végig a szövegben a megszokott szabványos formától több módon is eltér: „(Bernstein, Kim et al., 2003) (Garcia, 2008)” Helyesen: „(Bernstein et al., 2003; Garcia, 2008)” Szinte minden helyen szerepel a második szerző neve is a hivatkozásokban és, ha több hivatkozás van, azok külön zárójelben szerepelnek. Az egész dolgozatban csak elvétve fordul elő a szabályoknak megfelelő formában megadott hivatkozás. Ez a sorozatos hiba feltehetően a hivatkozás kezelő szoftver nem megfelelő használata, vagy az adatbázis nem megfelelő formátumban való bevitele miatt fordul elő. Kéziratot szakmai folyóirathoz ilyen hibákkal biztos nem adna be senki. Egy ilyen dolgozatban sem szabadna előfordulnia. Csak néhány további, a fentiekől is eltérő példa: „Silhavy és mtsai (2002)”, „Szittyá, Molnár et al., 2003 #69”.

11. old., 24. sor: „RACE-el történő felszaporítása után” – a rövidítések jegyzékében nem szerepel, és az első előforduláskor sincs megadva, hogy mit jelent.

12. old., 2. sor: TAS - nem szerepel a rövidítések jegyzékében.

12. old., 8. sor: PIWI – a rövidítések jegyzékében nem szerepel, és az első előforduláskor sincs megadva, hogy mit jelent.

12. old., 33. sor: „DDH motívum ” – a rövidítések jegyzékében nem szerepel, és az első előforduláskor sincs megadva, hogy mit jelent.

13. old., 1. sor: „WG/GW fehérjék” – a rövidítések jegyzékében nem szerepel, és az első előforduláskor sincs megadva, hogy mit jelent.

13. old., 26. sor: „a kis RNS-ben található *bulge*-ok segítik” – kitüremkedés, torzulás, nem komplementer kettős szálú részek.

13. old., 34. sor, és később: „szekvenciakomplementaritás” helyesen: szekvencia komplementaritás.

14. old., 3. sor, és később: „*slicer* aktivitással” – előtte már többször előfordult a „vágó aktivitás”, ami helyesebb.
14. old., 13. sor: „szekvenciahomológiát” – helyesen szekvencia homológiát.
14. old., 21. sor: „*lin-4* gén” és később „*lin-14*” – helyesen dőlt betűvel írjuk.
16. old., 8. sor: „klaszterba tartoznak” – helyesebb helyette a „csoportba tartoznak”.
16. old., 12. sor: „2 Dicer” – Szerencsésebb kiírni: „Két Dicer” vagy inkább „Kétféle Dicer enzimet”.
16. old., 16. sor: „R2D2-val” – helyesen „R2D2-vel” vagy „az R2D2 és a TAF11 fehérjével”
16. old., 27. sor: „4 izoformája pedig tovább diverzifikálja” – helyesebben: négy izoformája pedig tovább módosítja.
16. old., 30. sor: „A *Dosophila* 5 AGO fehérjéje ...” – helyesebben: A *Dosophila* ötféle AGO fehérjéje ...
18. old., 3. sor, és később: „Humánban írták le *in vitro*” – ez labor szleng. Helyesebben: „Ember esetében írták le” vagy *In vitro* humán rendszeren írták le ...” Sajnos, sok helyen szerepelnek a szövegben egy disszertációban kerülendő megoldások, lásd: ripít, transzlálnak, replikálnak, aminosavas ...
18. old., 9. sor: „elsőszámú” – helyesen „első számú”
18. old., 13. sor: „ripít régiókról” – helyesebb „ismétlődő régiókról” írni.
18. old., 21. sor: „növényekből hiányzik, de néhány speciális egyéb kis RNS útvonal csak ebben a törzsben jellemző.” – a zárvatermőkre gondolt?
19. old., 9. sor: „hosszútávú” – helyesen „hosszú távú”
20. old., 9. sor: „eltérő helyeken és mintázatban és mennyiségben helyezkedhetnek el” – helyesebben: „eltérő helyeken, mintázatban és mennyiségben helyezkedhetnek el”. Hasonló szépséghiba később is előfordul (Pl.: 24. old., 28. sor), ezeket külön már nem jelzem.
20. old., 12. sor: „melynek szak annyi a szerepe” – helyesen: „melynek csak annyi a szerepe”.
21. old., 4. sor, és később: „képes azonban mind a 4 AGO-hoz kötődni és a kötés esszenciális ...” helyesen „képes azonban mind a négyféle AGO fehérjéhez kötődni, és a kötés esszenciális ...”. A tagmondatok között nagyon sok helyen hiányzik a vessző. Ezt külön-külön már nem is jelzem.
21. old., 11. sor: „különböző - például vírus eredetű - fehérjében” – kötőjel és gondolatjel között a magyar helyesírás különbséget tesz. A nem megfelelő alkalmazásuk különösen akkor szembetűnő, ha keveredik a kettő (lásd a 18. sorban).
21. old., 26. sor: „transzlálnak” - ez inkább szakmai zsargon, ami kerülendő az írott szövegben (beszédben sem szép). Lásd még 22. old., 13. sor: „replikálnak”. A további, ilyen jellegű szépséghibákat már nem jelzem.
21. old., 29. sor: „a P3 fehérjében egy transzlációs csúszásra hajlamosító régió található” – helyesen a P3 fehérjét kódoló régióban.
22. old., 3. sor: „Egyes sgRNS-eken több leolvasási keret is található, például a p19 fehérje belül, egy másik *frame*ben (*nested*) helyezkedik el a p22 mozgási fehérjét kódoló ORF-ben. Ez a mondat több szempontból is kifogásolható. Minden mRNS esetében több (három) leolvasási keret van, és sok nyitott leolvasási keret (ORF) található

rajtuk. Ezért helyesebb, ha „fehérje kódoló” régióról vagy szekvenciáról beszélünk. A p22 mozgási fehérjét kódoló régióban, egy másik leolvasási keretben található a p19 fehérjét kódoló régió ..., ha jól értelmezem a mondatot. A magyar szövegben az angol szakkifejezések használata (mint annyi más helyen) itt sem szerencsés.

23. old., 27. sor: „Az AGO1 hipomorf mutánsok fogékonyabban a vírusfertőzésekre ...” – fogékonyabbak.

23. old., 29. sor: „Ugyanakkor bár több ...” – helyesen „Ugyanakkor, bár több ...”

24. old., 10. sor: „sikerült természetes vírusfertőzés leírni” – vírusfertőzést

27. old. Anyagok és módszerek: Sok leírásban egyáltalán nem szerepelnek irodalmi hivatkozások, még a saját publikációkban biztosan pontosabban ismertetett módszerek hivatkozásai sem. Egy akadémiai doktori munkában egyáltalán nem szükséges az összes alkalmazott módszer pontos ismertetése, ha megfelelő hivatkozásokat tartalmaz, de az általános formai elvárásoknak – a publikációkhoz hasonlóan – ebben az esetben is meg kellene felelnie.

27. old., 3. és 5. sor: „Plazmidizolálást” és „Plazmidkonstrukciók” – helyesen: plazmid izolálás és plazmid konstrukciók.

29. old., 7. sor: „3’5’ dimetoxi-hidroxiacetofenon” – helyesen 3’,5’-dimetoxi-4’-hidroxiacetofenon, de szerepelhetne helyette egyszerűen csak acetosziringon is.

29. old., 7. sor: „A riportergéneket (35S-GFP, GFP171.1, GFP171.2, GFP-IR (GFP inverted repeat) OD=0,1-gyel, míg a silencing szupresszorokat (p19, HC-Pro, p21, P1 sigma3, NS3) OD=0,3-as koncentrációban infiltráltuk.” – Nem a riportergéneket, hanem a riportergén konstrukciókat tartalmazó baktériumokat infiltrálták. Nincs megadva a mérési hullámhossz sem (590 nm?). Ez az adat a további szövegben is sok helyen hiányzik.

29. old., 21. sor és később: „pH=7.5” A magyar nyelvben tizedes vessző van, nem pont. A szövegben ez sem következetes, hol vessző, hol pont szerepel. A pH érték megadása is többféle formában szerepel: „pH=7.5” vagy „(pH 8,0)”. Szerencsésebb lett volna ez utóbbit egységesen alkalmazni.

31. old., 4. sor: „mólsúlyú” – helyesebb helyette a „molekulatömegű”

31. old., 22. sor: „eltávolítottunk. Az fehérjekivonat ...” – helyesen „eltávolítottuk. A fehérjekivonat”

33. old., 4. sor: „ α -³²P GTP-vel (CAP) megjelöltünk” – helyesebben „ $[\alpha$ -³²P] GTP-vel (CAP) megjelöltünk”. A CAP a rövidítések között és itt sincs értelmezve, a következő mondatban kisbetűs változata szerepel. A „cap-pel jelölt RNS” helyett talán jobb a „A cap-jelölt RNS”.

33. old., 20. sor: „4.9.1. GST és GST fúziós fehérjék” – a GST nem szerepel a rövidítések között, és az első előforduláskor sincs értelmezve.

33. old., 25. sor: „glutation-t tartalmazó” – helyesen „glutathiont tartalmazó”.

33. old., 27. sor: „4.9.2. Az MBP fúziós fehérjék” – nem szerepel a rövidítések között, és az első előforduláskor sincs értelmezve.

34. old., 3. sor: „előhűtött késés darálóban” - előhűtött késes darálóban

34. old., 11. sor: „-80 °C-n tároltuk” : -80 °C-on tároltuk. Több helyen előfordul ez a hiba később is.
34. old., 12. sor: „RNS fehérje interakció kimutatása EMSA-val” helyesebben: „RNS-fehérje interakció (kölsönhatás)”, az EMSA nem szerepel a rövidítések között.
34. old., 14. sor: „háromféle-képpen végeztük el.” – háromféleképpen végeztük el
34. old., 17. sor: „N-terminális tag-et tartalmazó”, helyesebben „N-terminális jelölést tartalmazó”
34. old., 19. sor, és később: „ γ -32P ATP” – [γ -³²P] ATP
34. old., 21. sor: „loading festékkal” – talán helyesebb „mintafelviteli pufferrel”
35. old., 23. sor: „anti-Flag géllél, majd a gélt 3-szor egyenként 5’-ig” – „anti-Flag géllal” és „5 percig”
35. old., 28. sor: „Az input és az IP frakciókból” – helyesebb magyar kifejezéseket alkalmazni
35. old., 7. sor: „elongációs factor 1” – az angol és magyar elnevezés egyvelege
36. old., 9. sor: „egyutas ANOVA-val” – a rövidítés sem a jegyzékben, sem az első előfordulásakor nincs megadva.
37. old., 24. sor: „dupla szálú RNS-eket” – RNS-eket
39. old., 3. sor, és másutt: „GST tag-el ellátott” – „taggel” vagy inkább „jelöléssel”. A szövegben nagyon sok az idegen, főleg angol nyelvű szó magyar ragozással. A magyar helyesírás szabályai szerint a ragozott idegen nevek és közzszavak legtöbbször egybe írandók a raggal kivéve, amikor a szótó végén nem hangzó betű van. Ezek szerint: taggel, taget, cappel, silencinget, *E. coliban* ... stb. Mivel ezek sokszor elég furán néznek ki, ahol csak lehet, célszerű helyettük magyar szavakat használni.
42. old., 8. sor: „kb. ~35-ször” – a rövidítés és a jel is azt jelenti körülbelül vagy hozzávetőlegesen.
42. old., 27. sor: „az fehérjekivonatban” – a fehérjekivonatban
44. old.: „5.2. A CymRSV p19 a virális eredetű siRNS-eket köt *in vivo*” – 5.2. A CymRSV p19 virális eredetű siRNS-eket köt *in vivo*
45. old., 5. sor: „kis RNS is detektáltunk” – kis RNS-t is detektáltunk
45. old., 7. sor: „A p19 és a RNS-ek között” – A p19 és az RNS-ek között
59. old., 2. sor: „Ugyan ezekből az RNS preparátumokból” – Ugyanezekből ...
64. old., 5. sor: „a két riporter gén egyformán expresszált (E15 ábra A)” – az ábra (A) részén az alkalmazott riporter gén konstrukciók felépítése látható, nem az expressziós vizsgálatok eredménye.
64. old., 8. sor: „a GFPCym mRNS vágásához vezetett (E15. ábra C).”, – Ezt az ábra (D) része mutatja.
73. old., 20. sor: „ami indukálni képes az expresszáldó gének szekvenciaspecifikus degradációját.” – valóban a gének degradációja történik meg?
76. old., 8. sor: „ezért ezt a vizsgálandó fehérjéket kódoló konstrukciókat” – ezeket a ..., vagy ezért a
79. old., 6. sor: „(E28. ábra 4. és 9. oszlop),” – a 4. és 8. oszlopban látható a csökkenés

81. old., E29. ábra: „kofrakcionálódik”, „növények”, „apáratlan”
82. old., 5. sor: „N-terminális 383 aminosavas régiója” – „383 aminosav hosszú” vagy „az első 383 aminosavat tartalmazó”. Az „aminosavas” a szövegben több helyen is előfordul, ami inkább labor szleng és kerülendő.
82. old., 7. sor: „Az SPMMV P1 N-terminális régiója tartalmaz egy hosszú N-terminális részt” – „Az SPMMV P1 fehérje tartalmaz egy hosszú N-terminális részt ...”
85. old., 14. sor: „Azt tapasztaltuk, hogy mind a 6×myc-AGO1, mind a GFP siRNS csak a P1_{W15A/W101A/W131A} IP-eluátumából volt kimutatható ...” – a „P1_{W15A/W101A/W131A}” a három aminosav cserét is tartalmazó fehérje, ami az eredmények szerint nem rendelkezik AGO1-kötő képességgel.
86. old., E34. ábra: „Az SPMMV P1 WG/GW doménjeinek elhelyezkedése az környezete” – „... és környezete” vagy „és aminosav sorrendje”
89. old., E36. ábra: Az ábra magyarázata átkerült a következő oldalra. A magyarázat szövege részben vastagított, részben normál betűkkel van szedve. Más ábráknál általában az ábra címe és a magyarázó szöveg is vastagított. Van, ahol egyes a sorköz, van ahol nem. Ezeket is következetesen kellett volna alkalmazni.
89. old., 24. sor: „A katalitikus aktivitással” – katalitikus
89. old., 27. sor: „mivel AGO2-DAD is” – mivel az AGO2 ...
90. old., 14. sor: „AGO1-et detektáltuk a P1 IP eluciójában” – „elúciójában”, de helyesebben „eluátumában”. De lehetne másképpen is fogalmazni: Az AGO1 fehérjét sikerült kimutatni a kicsapott fehérjék között ...
91. old., 1. sor: „A cink finger domén” – az angol és magyar szakkifejezés keveréke. Helyesen zink finger vagy cink ujj domén.
93. old., 7. sor: „A P1 fehérjébe a silencing” – fehérjében
94. old., 4. sor: „Eredményeinkből azt is következik, hogy mivel a P1 Cys-Ala duplamutánsok” – „az is következik ... dupla mutánsok”
94. old., 7. sor: „un efektor” – „ún. effektor”
96. old., 4. sor: „a amiR173/TAS1c/AGO1” – az amiR173/TAS1c/AGO1
96. old., 8. sor: „katalitikusan” – katalitikusan
98. old., 5. sor: „WG/GW domén(ek) hiánya miatt a silencing szupresszor funkció az megszűnéséhez vezetett.” – WG/GW domén(ek) hiánya a silencing szupresszor funkció megszűnéséhez vezetett.
95. old., 6. sor: „létrehoztuk a H109W és a Y139W mutáns P1 fehérjéket, amelyek kettő-, és a H109W/Y139W P1 fehérjét, amely 3 WG/GW domént tartalmaztak” – létrehoztuk a két WG/GW domént tartalmazó H109W és Y139W mutáns P1 fehérjéket, és a három domént is tartalmazó H109W/Y139W P1 fehérjét. (Másutt alsó indexben van az aminosav cserék jelzése.)
100. old., E43. ábra: „Western blotolással, a GFP siRNS-eket Northern blotolással detektáltuk” – „blotolással”, bár ez is inkább labor szleng.

Azt gondolom, az eddig felsorolt típus hibák és egyedi elírások bemutatása bizonyítja, hogy a dolgozat a szokásosnál sokkal kisebb gondossággal lett összeállítva. A továbbiakban ezeket már nem kívánom jelezni.

109. old., 18. sor: „hogya a CIRV a mitochondrium külső membránjában replikálódik” – „a mitokondrium külső membránjához kötöten”. Gondolom, nem a membránon belül ...

117. old., 22. sor: „A növényekben az Altered Meristem Program 1 (AMP1) fehérje az endoplazmatikus retikulumban található és AGO1-kötő tulajdonsággal rendelkezik (Li et al., 2013). Az *amp1* mutáns *A. thaliana* növényben több mRNS, közöttük az AGO1 transzlációjának mértéke is megnövekszik, kizárólag az endoplazmatikus retikulumban lokalizált riboszómák” – Feltehetően az AMP1 fehérje nem az endoplazmatikus retikulumban (ER) található, mint ahogy riboszómák sincsenek ebben a sejtorganellumban. Gondolom, az AMP1 fehérje az ER membránban vagy annak citoplazmikus felszínén helyezkedik el, ahogy a riboszómák egy része is az ER citoplazmikus felszínéhez kötött.

118. old., 30. sor: „3500 aminosavas fehérje mellett egy másik fehérje is keletkezik, ami a stop (TAG) kodonnal végződik „ – fehérje nem végződik STOP kodonnal. A virális RNS-ben van TAG kodon?