

Válasz opponenseim doktori értekezésemről készült bírálatára

Először is nagyon szeretném megköszönni opponenseimnek, hogy elvállalták doktori értekezésem bírálatát és köszönöm elismerő szavaikat szakmai teljesítményemről. Igen resteltem, hogy az elkészült értekezés minősége elmaradt az elvárttól.

Az értekezést igyekeztem a lehető legkörültekintőbben elkészíteni, ami úgy látszik nem sikerült maradéktalanul. Sajnálom, hogy ilyen sok, jogosan kifogásolt hiba (túlzó, sokszor nem megfelelő mozaikszo használat, helytelenül leírt, rosszul toldalékolt vírusnév, az angol kifejezések nem megfelelően használt magyar megfelelő használata, a tézisek és a dolgozat eltérő címe, az ékezetes betűk nem konzekvens használata, rossz szimbólumokkal írt irodalmi hivatkozás) benne maradt a végső változatban.

Köszönöm, hogy ezen hibák ellenére opponenseim elismerik új tudományos eredményeimet és ezek alapján javasolják számomra az MTA doktori cím odaítélését.

Lukács Noémi és Putnoky Péter is megkérdezte, hogy vajon milyen mechanizmus alapján lehetne magyarázni a különböző típusú VSR fehérjék azonos hatását a miR168 indukcióra? Született-e a kísérletek lezárása óta olyan irodalmi adat, amely a megfigyelésekre magyarázatot ad?

Ez egy nagyon izgalma és jó kérdés!

A miR168-on keresztül történő AGO1 szabályozás egy alternatív útvonal, mely a VSR-ek elsődleges géncsendesítést gátló funkcióján kívül is képes a gazdanövény válaszüreakcióját blokkolni. Rendkívül érdekes nemcsak az, hogy mennyire elterjedt ez a „másodlagos” funkció, de az is, hogy vajon mi ennek a mechanizmusa.

A miR168 indukciója a prekursor transzkripció aktivitásának eredménye. Az *Arabidopsis thaliana* miR168a prekursorának promóterében négy abszcizinsav válasz elem (abscisic acid-responsive element - ABRE) található. Ezen ABRE motívumoknak, melyek a miR168 promóterében különböző növényfajok esetében is megtalálhatóak, szerepe van az abszcizinsav sav kezelés és abiotikus stresszek során szintén indukálódó miR168 expresszió kifejeződésében (doi: 10.1104/pp.111.188789). Ezen szabályozóelemek jelenléte felveti annak lehetőségét, hogy a VSR-ek is ezeken keresztül fejtik ki indukáló hatásukat.

A vizsgált VSR-ek mindegyike indukálta a miR168 expresszióját tranziens kísérletekben, és a vizsgált vírusok szintén elérték ezt a hatást különböző növényi gazdáiban. A vizsgált VSR-ek, mint fehérjék, azonban nagyon különbözőek, nem találtunk bennük semmi közös vonást, olyat, ami a miR168 prekursor transzkripcióját esetleg indukálhatná. Ugyan azt nem tudjuk, hogy a miR168-on keresztül történő AGO1 gátlás hogyan valósul meg, az biztos, hogy ennek kulcsfontosságú jelentősége van a vírusfertőzés során az antivirális géncsendesítés gátlásában. A mi munkánkon kívül nem talákoztunk olyan kutatással, melyben a VSR-ek miR168 indukciós képességét vizsgálták volna. Ismert azonban, hogy a VSR-ek más, több különböző mechanizmussal képesek az AGO funkcióját gátlani. Az uborkamozai vírus Fny törzsének 2b fehérje az AGO PAZ doménjével lép kölcsönhatásba, a BYV P0 fehérjéje a még nem töltött AGO1 degradációját iniciálja. A VSR-ek egy másik nagy csoportja (ide tartozik a TCV CP-(p38) fehérjéje is), pedig a GW motívumaikon keresztül képesek mimikálni a nem vírusfertőzött sejt endogén, AGO-hoz kötődő fehérjéit, és ennek segítségével kötődnek az AGO-hoz gátolva annak aktivitását.

A kísérleteink óta eltelt időben számos vírus VSR-ét jellemezték. Az irodalmat átböngészve azonban nem találtuk nyomát annak, hogy akár a mechanizmust, akár az újonnan jellemzett VSR-ek miR168 indukáló tulajdonságát vizsgálták volna. Ahhoz, hogy a mechanizmusra bármilyen hipotézist állítsunk fel, amely meglétét kísérletesen vizsgálni lehet, jó lenne minél több, eltérő funkcióval rendelkező VSR miR168 indukáló képességét vizsgálni. Terveink szerint a jövőben vizsgálunk majd fásszárúakat fertőző vírusokban jelenlevő VSR-eket olyan szempontból, hogy vajon mennyire hasonlítanak, vagy különböznek eltérő gazdanövényekben. Ezen VSR-ek miR168 indukáló képességét vizsgálva azt is meg lehet majd állapítani, hogy ez az indukáló képesség függ-e, vagy független a különböző gazdanövényeken található variánsok esetében. Az esetleg található eltérések segíthetnek olyan kísérletek tervezésében, melyek közelebb visznek minket a mechanizmus felderítéséhez.

Az tehát, hogy a miR168 indukció végül is mennyire elterjedt a VSR-ek között és milyen mechanizmuson keresztül történik nagyon érdekes lenne vizsgálni a jövőben.

Egy másik, többször előforduló kérdés, hogy: *„Milyen standardizálásokat ill. bioinformatikai változtatásokat javasolna az sRNS HTS rutin diagnosztikai bevezetésének elősegítésére? A sRNS HTS technika nem túl munkaigényes és költséges ahhoz, hogy elfogadott diagnosztikai rutin eljárás legyen?”*

Egy adott gazdanövényben az adott földrajzi területen jelenlevő vírusok kimutatására az sRNS HTS és a nagy-áteresztőképességű RNS szekvenálás kombinációja ad majd megoldást. Utóbbi esetben a jelenlevő kórokozó (vírus, viroid) RNS genomjának szekvenciáját, illetve DNS vírusok esetében a transzkriptálódott mRNS szekvenciáját állapítjuk meg. E módszerek esetében azonban a probléma sokszor az, hogy a szekvenált RNS-ek csak nagyon kis %-a keletkezik a jelenlevő vírusokról Szerencsére egyre több fásszárú növényi gazda genomja ismert, így a bioinformatikai módszerekkel viszonylag egyszerűen lehet majd szűrni a nem gazda specifikus RNS-ekre, melyek között a vírus RNS-eket is keresni lehet majd. További segítség lehet egy speciális, ún. „ribodepleció” RNS szekvenálási eljárás használata. Ebben az esetben egy növényi riboszómális RNS-ekre speciális ellenanyaggal a szekvenáló könyvtár készítése előtt eltávolítják az igen nagy mennyiségben jelenlevő rRNS-eket, így a „leolvasott” szekvenciák nagyobb része lesz számunkra hasznos információ. Ebben az esetben azonban a könyvtárkészítés válik bonyolultabbá, ami jelentősen megemeli a szekvenálás költségét. A módszerek további, eddig még nem megoldott problémája, hogy egyelőre nem sikerült minden vírusra és gazdanövényre egyaránt megbízhatóan működő bioinformatikai munkafolyamatot „pipeline”-t optimalizálni. Ugyan vannak próbálkozások a pipeline-ok standardizálására, de egyelőre még nem született optimális megoldás. Egy nemzetközi felmérés, melyben mi is részt vettünk során 21 csoport kapott 10 sRNS HTS adatszettet, amiben növényi vírusokat kellett előrejelezni. Az eredmény azt mutatta, hogy a különböző pipeline-ok használata még ugyanazonon minták esetében is nagyon eltérő eredményt eredményezhet (doi: 10.1094/PHYTO-02-18-0067-R).

Mai véleményem szerint az sRNS HTS valóban túl munkaigényes és költséges ahhoz, hogy rutin diagnosztikai vizsgálat legyen.

Rutin diagnosztikai célokra azt gondolom, hogy a jövőben továbbra is inkább az RT-PCR-ek, vagy az izotermális amplifikáción alapuló, akár a terepen is használható LAMP módszer terjed majd el.

A következőkben opponenseim további kérdéseire adok választ. A követhetőség kedvéért pontokba szedtem válaszaimat és az adott pontnál idézem az opponensem által felvetett problémát és ez után adok rá választ.

Válasz Dr. Putnoky Péter doktori értekezésemről készült opponensi véleményére

Nagyon köszönöm Putnoky Péter figyelmes és érdeklődő bírálatát. Kérdéseire a következő válaszokat adom.

1/” Mi lehet a tünetek közötti drasztikus különbség oka? Ahogy a bevezetőben láttam, például az akut fertőzést mutató CymRSV és crTMV, valamint a perzisztens TCV vírusnak is van VSR fehérjéje. Esetleg ez utóbbinál a represszor nem elég hatékony?

A további, p19 VSR hiányos tombusvírusokkal végzett vizsgálatok is azt mutatják, hogy a háztartási gének tömeges lekapcsolása a nekrosis elmaradásakor is bekövetkezik.”

Az általunk akut és perzisztensnek nevezett vírusfertőzések közötti drasztikus eltérés okát pontosan nem ismerjük. Pont a VSR hiányos p19-cel kapott eredményeink azok, ami miatt azt gondoljuk, hogy az RNSi-nek elsősorban a vírus elterjedésében és nem a kialakuló tünetek súlyosságának meghatározásában van szerepe. A TCV VSR-e, az előző pontban citált p38 ami hatékony szupresszor. A TCV fertőzött növények klorofil fluoreszcenciát jellemző mutatói a kontrollhoz képest kicsit emelkedtek, ami arra utal, hogy a vírus jelenléte akár kedvező is lehet a gazdanövényre nézve. A nagyfokú eltérések kialakulásának oka esetleg összefügghet azzal, hogy az akut fertőzésekben a metilációs folyamatokat szabályozó AGO4 és a metiltranszferázok expressziós szintje is megváltozik. Ezek a sejtmagban zajló szabályozó folyamatok befolyásolhatják a háztartási gének expresszióját már transzkripció szinten, de a konkrét okok feltárása további szisztematikus kísérletet és vizsgálatot igényel.

2/” Az eddigiek alapján lehet-e olyan további fejlesztéseket javasolni, melyek hatékonyabbá teszik az SHMV VIGS vektorokat? A szimbiotikus génekkel kapcsolatban történt-e próbálkozás a vektorok használatára?”

Az SHMV VIGS vektorok hatékonyságának növelésével nem foglalkoztunk. Ennek főként az volt az oka, hogy az SHMV alapú VIGS vektor molekuláris módosítása különösen nehéz. Ugyan egy helikális tobamovírus, de mindhárom ORF-je átfed – egyes vírusszakaszok kódoló fehérje darabok és szubgenomikus RNS promóterek, vagy transzlációs iniciációs pontok is egyidejűleg. A vírus a TMV-hez képest különösen nehezen viselte egy-egy új szakasz, klónozóhely, vagy riporter géndarab beépítését. A pillangósok funkcionális genomikai vizsgálatára készült egy másik: Pea early brown virus (PEBV) alapú vektor is (doi: 10.1094/MPMI-21-6-0720). Nodulációs kísérletekben a nodulációban fontos gének térképezésére ezt az utóbbi PEBV vektort használták, de legjobb tudomásom szerint csupán az előbb citált közlemény az egyetlen, ami megjelent róla. VIGS vektorok szimbiotikus gének térképezésére való használatáról nem találtam közleményt a szakirodalomban. Ennek lehet az az oka, hogy a VIGS vektorként használt vírus versenghet a baktériummal, mint patogén, így nem ideális ilyen biotikus válaszok térképezésére. Egy másik lehetőség, hogy a genomszerkesztési technológiák kiszorították a viszonylag nehezen használható, és talán nem is egyértelműen értelmezhető VIGS-et, mint eszközt a funkcionális genomikai vizsgálatok eszközei közül.

3/” A szövegből nem egyértelmű, hogy valóban a TaMlo1B szekvencia 3’ végét használták a kísérletekben. Van-e folytatása a sikeres kísérleteknek? Esetleg alkalmazható-e ebben a

bonyolult genomban a CRISPR génszerkesztés? (Ez utóbbi kérdésemre a „8. Következtetések, javaslatok” fejezetből már megkaptam a választ.) ”

Igen, valóban a TaMlo 3' vége volt a legsikeresebben használt szakasz az RNSi kísérleteinkben. Azóta valóban sikeres genomeditálást hajtottak végre búzán több esetben és ebben talán volt egy kis szerepe a „proof of concept” kísérleteinknek, hiszen ezt a cikket 31-szer hivatkozták.

4/” Kell-e tudnunk rutin szinten (nem alapkutatás szinten), hogy az adott növényben milyen vírusszerű szekvenciák fordulnak elő?”

A virális sRNS-ek kimutatása véleményem szerint nemcsak alapkutatás szinten fontos. Alapkutatásként ez a módszer felhasználható metagenomikai vizsgálatokra. Segítségével, ahogy azt már többször bizonyítottuk, olyan vírusokat találhatunk, melyek előfordulása az adott növényen, vagy földrajzi régióban eddig nem volt ismert. A szőlő és kajszi eredményeink óta kölesen <https://doi.org/10.3390/plants9080954> és őszibarackon (Baráth Dániel PhD dolgozat) azonosítottunk 2-2 hazánkban eddig nem leírt vírust. Ezen ismeretek fontosak a rutin diagnosztika számára is, hiszen ezen felmérésekre alapozva lehet az aktualizálni az adott növény, szaporítóanyag vizsgálatokor kötelezően tesztelendő vírusok körét.

A virális sRNS-ek előfordulásának ismerete azért is fontos lehet, mert meglétük jelzi, ha egy vírus aktívan jelen van a növényben. Ha a növény védekező rendszere hatékonyan működik, akkor kevés lesz a genomi RNS és a köpenyfehérje, és akár az RT-PCR, vagy ELISA detektálási határa alá csökkenhet, ami álnegatív állapotot mutat. A virális sRNS-ek azonban ekkor is kimutathatóak, így egy-egy törzsűltetvény telepítésekor, vagy anyafa kiválasztásakor való használata megtérülhet.

5/” Az, hogy az azonos helyről származó egyes vírus variánsok jelentősen eltérnek egymástól, jelentheti azt, hogy a szaporítóanyaggal kerülhettek be a területre. Kérdés, hogy a variánsok egy fajta különböző egyedeiről származnak, vagy különböző fajtákban azonosították azokat? Ez utóbbi talán jobban magyarázza, hogy a fertőzés forrása a különböző földrajzi eredetű szaporítóanyag volt.”

A különböző vírusok filogenetikai elemzésekor általában az ország különböző régióiban, különböző fajtákon található variánsok szekvenciáit hasonlítottuk össze. Mivel a legtöbb esetben ezek a variánsok különböző földrajzi eredetű variánsokkal klasztereződtek, ezért következtettünk arra, hogy a fertőzés a szaporítóanyaggal történhetett. Ennek egy extrém példája a szőlő termő ültetvények felmérésénél tárgyalt 14-18-as MK jelzésű könyvtárak. Ezek esetében egy ültetvény különböző sorainak, különböző fajtájú egyedeiből készültek a könyvtárak. GLRaV3 vírust az MK1-ben és az MK3-ban azonosítottunk, és ezek a variánsok a filogenetikai fa különböző ágain helyezkedtek el (73.ábra), ami egyértelműen bizonyítja különböző, és így a fertőzött szaporítóanyagból származó eredetüket.

6/” Elemezték-e utólag a GLPV szekvenciák meglétére az ültetvényekről származó HTS adatokat?”

Igen, elemeztük, de nem találtunk GLPV eredetű kis RNS-t egyik szőlőből származó könyvtárunk adataiban sem. A GLPV szekvenciájának ismeretében olasz kollegáink RT-PCR-rel tesztelték a Bariban található mediterrán szőlő gyűjteményt, de abban sem találtak GLPV pozitív egyedet.

A meglévő szekvenálási adatok újra elemzése azonban nagyon fontos, és érdekes kérdés, hiszen az adatbázisban folyamatosan jelennek meg újabb vírusok. Éppen ezzel a technikával

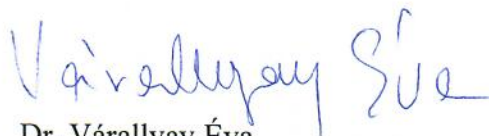
vizsgáltuk újra a szőlőültetvények adatait és írtuk le a szőlő vírus T (GVT) előfordulását hazai szőlőültetvényeken (<https://doi.org/10.3390/v13061119>).

7/” A GLPV esetében hogyan lehetne igazolni, hogy a felfedezett cirkuláris RNS valóban egy silencing represszor molekula? Esetleg az egyik ismétlődő szekvenciát meg lehet változtatni alternatív kodonokat alkalmazva?”

A cirkuláris RNS VSR-ként való működését legegyszerűbb módon tranziens rendszerben, a VSR-eknél szokásos protokoll alapján lehetne vizsgálni. Amennyiben a cirkuláris RNS-t expresszáltatva az arról keletkező nagy mennyiségű sRNS telítené a gazda RISC komplexeit, csökkenne az ugyancsak tranziensen expresszált GFP-re ható represszió, és a GFP expresszó erősödne. Az ismétlődő szakaszoknak a cRNS érésében lehet szerepe. Ennek vizsgálatára első lépésben az ALiMMV vírus RNS-ét szeretném megvizsgálni, hogy vajon abban az anulavírusban keletkezik-e az általunk prediktált cRNS? Amennyiben ez sikerül, akkor tovább lehetne vizsgálni a keletkezés mechanizmusát, aminek egyik módja éppen az opponensem által javasolt mutációs módszer lehetne.

Végül szeretném újra megköszönni Putnoky Péternek, hogy elvállalta és elkészítette dolgozatom bírálatát. Remélem a válaszaira adott kérdéseimet elfogadja és továbbra is támogatja számomra az MTA doktori címének odaítélését.

Gödöllő, 2021. július. 21.


Dr. Várallyay Éva