

Dr Havelda Zoltán MTA Doktori Értekezésének Szakmai Bírálata

Dr Havelda Zoltán több mint másfél évtizede kutatja a kompatibilis vírus-gazdanövény kapcsolatok molekuláris hátterét. Jelen akadémiai doktori értekezésében a PhD fokozat megszerzését követően elért tudományos eredményeit foglalja össze, melyek négy fő területet érintenek. Az első terület egy technikai fejlesztés, amely lehetővé teszi az ún. kis RNS-ek specifikus és hatékony kimutatását növényi szövetekben. A másik három terület, a vírusfertőzésnek a növényi gének működésére gyakorolt hatásának („shut off” jelenség), a defektív interferáló (DI) RNS-ek és a miR168 mikroRNS hatásmechanizmusának a vizsgálata, nagymértékben támaszkodik erre a technikai fejlesztésre, amelyet azóta is elterjedten használnak szerte a világon.

Havelda Zoltán a fenti területeken számos eredeti felfedezést tett, melyeket rangos nemzetközi szakfolyóiratokban tett közkinccsé. Az értekezéshez közvetlenül felhasznált 13 bírált közleményének átlagosan 5,7-es impakt faktora rendkívül imponáló, különösen, ha hozzáteszük, hogy ezekben a közleményekben kettő kivételével a jelölt első vagy utolsó szerző. Ezek az adatok önmagukban is jelzik, hogy Havelda Zoltán nemzetközi mércével mérve is elismert, kiváló kutató, aki jelentős eredményekkel járult hozzá a tudományterület fejlődéséhez.

Ez azt is jelenti, hogy szakmai szempontból a benyújtott értekezés is igen magas színvonalú és a logikusan felépített, gondosan kivitelezett kísérletek valamint a belőlük levont következtetések nem sok teret adnak a kritikának.

Sajnos ez nem mondható el a dolgozat formai kivitelezéséről. A dolgozatban nagyon sok az elírás, a pontatlanság. Ezeket természetesen itt nem részletezem de véleményemet alátámasztandó néhányat egy mellékletben összegyűjtöttem a jelölt számára. A sok elírást látva az embernek az az érzése támad, hogy a dolgozat rendkívül kapkodva az utolsó pillanatban készült el. Erre utalhat az is, hogy „A Felhasznált anyagok és módszerek” fejezet a jelölt teljesen kihagyta és e tekintetben egyszerűen a megjelent publikációkhoz irányítja az olvasót. Véleményem szerint ez nem szerencsés megoldás. Mind a bírálatot, mind az egyszerű szakmai tájékozódást rendkívül megnehezíti, ha a kísérletek egyes részleteinek nem lehet közvetlenül utánnanézni. Javaslom a jelölt számára, hogy, ha még megteheti, csatoljon egy, a legfontosabb specifikus módszereket leíró kiegészítést legalább az akadémiai könyvtárban megőrzendő értekezéséhez.

Bár ahogy korábban már említettem, az értekezés színvonalas nemzetközi publikációkon alapul, a dolgozatban bemutatott eredmények kapcsán merültek fel bennem kérdések, megjegyzések. Ezeket az alábbiakban ismertetem:

1. A 13. oldalon tett sommás állítás, miszerint „A természetben nem fordul elő DI RNS” természetesen nem igaz. Gondolom arra szertett volna utalni a jelölt, hogy önmagukban, helper vírus nélkül, nem fordulnak elő, nem replikálódnak ezek az RNS-ek az élőlényekben.
2. Az 5., 6., és 7. ábrákon más-és-más az LNA oligók hibridizációs hőmérséklete (37, 42, illetve 45 °C) miatt, és mi az elfogadott, általánosan alkalmazható hőmérséklet, ha van ilyen?
3. Szintén ehhez, illetve az Anyag és módszer fejezet hiányához kapcsolódva: a 8. ábra címében koncentráció függést említ, de az ábrán próba mennyiségek (pmol) szerepelnek. Mik voltak az aktuális illetve optimális koncentrációk?
4. A 34. oldalon az miRNS-ek kifejeződésének tér- és időbeli szabályozásával kapcsolatban jelzi, hogy ezt más csoportok is kimutatták párhuzamosan az általa végzett

- kísérletekkel, de ezeket nem diszktálja. Miben rejlettek a párhuzamok illetve különbségek?
5. A 35. oldalon említi egy mikroRNS in situ hibridizációs adatbázis felállításának megkezdését. Hogyan áll ez az adatbázis ma? Elérhető-e más laboratóriumok számára is?
 6. A 39. oldalon a GapA mRNS kifejeződésének mintázatát a korai vírus fejlődési szakaszban is mutatni kellett volna, hiszen fontos következtetést von le belőle.
 7. Mi alapján kerültek kiválasztásra a „shut off” jelenséggel kapcsolatban vizsgált gének (pl. 14. ábra)?
 8. Mi adhatja a „shut off” jelenség specifitását, azaz miért pont az adott gének kapcsolódnak ki? Vizsgálták-e a jelenséget Arabidopsisban, és ha igen ki tudtak-e mutatni közös szabályozási lépést (pl. azonos transzkripciós faktor) ezeknek a géneknek a szabályozásában? Szerepet játszhat-e a „shut off” jelenségben a kromatin-mediált géncsendesítés mechanizmusa?
 9. Az 58. oldalon azt írja, hogy a DI RNS jelenléte nem szorítja vissza a p19 fehérje „mennyiségét”, ami nem egészen pontos, mert a p19 mennyiségét a vírus RNS mennyiségével együtt visszaszorítja, amit a 24. ábra B-része is mutat, a vírus RNS:p19 fehérje arány (feltehetően a p19 fehérje szintézis rátája) az ami valójában nem változik.
 10. Több helyen, így a 25. ábrán (58. oldal) is, kvantitatív következtetéseket von le in situ hibridizációs kísérletek eredményeiből pl. a vírus RNS-ek felszaporodására. Miért ez volt a legmegfelelőbb megközelítés erre a problémára?
 11. A 26. ábrán (60. oldal) a relatív siRNS/p19 arány számszerűsítése bátor vállalkozás két eltérő érzékenyséű megközelítéssel (Western blot, Northern hibridizáció) kapott jelintenzitás alapján. Pontosabb lett volna az ábrán az értékeket pusztán a detektált jelek intenzitásának az arányaként feltüntetni, ami a tényleges helyzet. Ebből természetesen lehet következtetni az siRNA/p19 arányban meglévő relatív különbségekre.
 12. A 30-31. ábrákon (64-65. oldal) 15 °C-on 7 nappal a fertőzés után a DI RNS mennyisége jóval kisebb (ellentétben a szöveggel, ahol azt állítja, hogy a DI RNS-ek minden hőmérsékleten és időpontban nagy mennyiségben halmozódtak fel), mint a magasabb hőmérsékleteken, de a genomi RNS mennyisége mégis csökken. Mi ennek a magyarázata? Nem lehet ennek a csökkent kezdeti DI RNS mennyiségnek a következménye, hogy a vírus felhalmozódása ezen a hőmérsékleten csak átmenetileg gátlódik? Annál is inkább, mert a 24. ábrán a transzfektált protoplasztok esetében szintén az látható, hogy a korai (24 órás) időpontban a DI RNS szintje alacsonyabb 15 °C-on a többi hőmérséklettel összevetve, szemben a későbbi (48 órás) időponttal, és a genomi RNS szintje is hasonlóan változik, mint a 30. ábrán a teljes növények esetében.
 13. Több bemutatott kísérleti eredmény is azt bizonyítja, hogy a DI RNS védő hatása elsősorban nem a vírus replikáció szintjén, hanem jelentős mértékben a fehérje szinten nyilvánul meg, ugyanakkor a p19 fehérjének ebben nincs közvetlen szerepe. De mi a helyzet a tünet megjelenéséért szintén felelős p33 fehérjével? A DI RNS kölcsönhat-e a p33 fehérjével, befolyásolja-e annak szintjét és/vagy a p19-vel való kölcsönhatását?
 14. A DI RNS-ek hatására elmaradó tüneteket okozhatja-e a „shut off” jelenség valamilyen szintű gátlása?
 15. A 83. oldalon nem ártott volna hivatkozni arra, hogy miért szolgálhat a virág pozitív kontrollként az miR168 RNS érése kapcsán.
 16. A 49. ábra B részén (94. oldal) a miR168 szint lényegesen magasabb a GFP-t tartalmazó, mint az üres vektorral transzformált növényekben. Mi ennek az oka?
 17. Az 50. ábrán (96. oldal) a C-panelen, a zll mutánsban, mivel a zll mutációval érintett AGO10 fehérje az AGO1 transzláció negatív regulátora, megemelkedett AGO1 fehérje

szintet várnék, viszont az ábra alapján ez inkább alacsonyabb. Kifejeződik-e nem fertőzött levélben az AGO10 fehérje és gátolja-e ott az AGO1 translációt?

18. Szintén ehhez kapcsolódva, a C panelen mutatott fertőzött és mock kezelt minták fehérje mennyiségében nagyon nagy az eltérés, amit a Ponceau festés és az aktin western is jól mutat. Az ábrából egyértelműen úgy tűnik, hogy ha egyforma lenne a fehérje mennyiség, akkor az AGO1 fehérje szintje jóval magasabb lenne a fertőzött, mint a mock mintában, ami jól tükrözné az AGO1 mRNS szintekben meglévő különbséget, azaz a translációs gátlás alól való felszabadulást. Van-e arra adat, hogy vírus fertőzés hatására levelekben az AGO10 transzkript és fehérje szintje is megnő, és így tudja a megnövekedett AGO1 transzkript mennyiség translációját gátolni?
19. Végezetül egy általános kérdés: miRNS/AGO rendszer a növényi egyedfejlődés szabályozásában is alapvető szerepet játszik. Véleménye szerint az evolúció során mi volt ennek a rendszernek az elsődleges funkciója: az élősködő RNS-ekkel, vírusokkal szembeni védekezés vagy a génkifejeződés szabályozása?

Havelda Zoltán új tudományos eredményeit az értekezés végén egy rövid összefoglalásban 13 pontban sorolja fel. Ezekkel én alapjában véve egyetértek, de praktikus szempontokból az alábbi négy pontban foglalom ezeket össze:

1. Kifejlesztett egy rendkívül hatékony és specifikus kis RNS detektálási módszert, amelyet elterjedten használnak azóta is szerte a világon a területen dolgozó laboratóriumokban. Ennek a módszernek a segítségével igazolta a növényi mikro RNS-ek kifejeződésének szigorú tér- és időbeli szabályozottságát.
2. Igazolta, hogy bizonyos vírusok képesek a gazda sejtek transzkripció aktivitását specifikusan megváltoztatni nemcsak a fertőzött, de a szisztémikus levelekben is. Eredményei alapján ez az ún. „shut off” jelenség fontos szerepet játszik a vírus okozta tünetek kialakulásában.
3. A vírus fertőzés tüneteinek elmaradását okozó DI RNS-ek hatásmechanizmusát vizsgálva megállapította, hogy a hatás összefügg a p19 fehérje siRNS-ekkel való telítésével és ezen keresztül a vírus sejtről-sejtre történő terjedésének gátlásával, de azt is kimutatta, hogy ezen kívül egyéb specifikus faktorok is szerepet kell, hogy játszanak a folyamatban. A tünetek kialakulásával kapcsolatban vizsgálta a különböző vírusok DI RNS-einek a specifitását és egyes régióiknak a szerepét is. Eredményei alapján megalkotta a DI RNS-ek tünetcsökkentő hatásának egy átfogó modelljét.
4. Igazolta, hogy a kompatibilis vírus fertőzés együttjár a növényi sejtben a miR168 RNS szint megemelkedésével, ami transláció gátláson keresztül közvetlenül felelős az AGO1 fehérje szintjének csökkenéséért. Kimutatta, hogy a folyamatban szerepet játszik a vírus által termelt géncsendesítési szupresszor fehérje (a vizsgált esetben a p19), amely így több ponton is képes a növény védekező mechanizmusainak a gátlására. Kísérletei alapján megalkotta az miR168 alapú vírus-mediált növényi védekezési reakciók modelljét.

Ezek az eredeti, nemzetközileg is elismert, jelentős kísérleti eredmények messzemenően elégségesek a MTA Doktora cím elnyeréséhez. Éppen ezért az értekezést, fentebb említett formai hiányosságai ellenére, alkalmasnak tartom a nyilvános vitára és javasolom Dr Havelda Zoltán számára az MTA Doktora cím odaítélését.

Szeged, 2011-09-06

Fehér Attila
az MTA doktora