

Válaszok **Dr. Boros Imre Miklós** bírálatára.

Szeretném megköszönni Dr. Boros Imre Miklósnak a dolgozat részletes értékelésére fordított idejét és a helytálló kritikai és gondolatébresztő megjegyzéseit.

Válaszok a megjegyzésekre:

"...egy általánosabb összefoglaló és különösen az eredmények elhelyezése és összevetése a szakirodalom kapcsolódó ismeretei között, ill. azokkal, a pontokba szedett ismertetés helyett, szerencsésebb lett volna."

Jogos a bíráló kritikája. Visszatekintve, egy önálló "Eredmények értékelése és megvitatása" fejezet létrehozása bizonyosan segítette volna az olvasó számára a közölt adatok összefüggéseinek megértését és elhelyezését a szakirodalom ismeretei között. Sajnálatosan én az olvasó számára a bonyolultabb megoldás használtam az eredmények ismertetését és azok megvitatásának összekapcsolását egy fejezetben belül.

"...Kivételnek találok pl. azt a néhány esetet amikor mennyiségi megállapítást tesz hisztokémiai festés fotóján, vagy gélről készült képen alapulva, anélkül, hogy ezek kvantitálása ill. a használt módszer kvantitatív használhatóságának határai említésre kerüljenek...."

A kérdéses technikák nem lettek elég részletesen leírva a dolgozatban. Tökéletesen egyet értek a bírálóval, hogy az *in situ* hibridizálás során kapott jelek elsősorban kvalitatívak. DI RNS jelenléte a fertőzésben vagy p19 defektív vírus fertőzése esetén a vírus terjedése gátolt, ami a vírus mozaikos felhalmozódását idézi elő. Az általános mintavételi eljárás, a fertőzött levelek begyűjtése, ezért nem ad módot a sejtszintű változások nyomon követésére. Ezért néhány esetben, más lehetőség híján, valóban vontunk le közelítő mennyiségi következtetéseket az *in situ* hibridizáció során kapott jelekből. Ezekben az esetekben az *in situ* hibridizáció során a szignál kialakulás folyamatát különböző, egymást követő időpontokban, leállítottuk és a színreakció kialakulásának dinamikáját hasonlítottuk össze az azonos lemezen található különböző minták között. Ezt a bírálók elfogadták mint (durva) becslést a kvantitatív jellegre.

Azokban az esetekben, amikor számszerűen adtuk meg mennyiségi paramétereket Northern vagy Western blotok esetén, akkor az Analysis programot használtuk (version 2.0, Soft-Imaging Software GmbH) a jelek kvantitálására.

A gélek alapján tett becslések valóban pontatlanok. Azokban az esetekben éltünk csak becsléssel, ahol a különbségek olyan mértékűek voltak, hogy egyértelműnek tűntek a mennyiségi viszonyok. Elegánsabb lett volna ezekben az esetekben is kvantitálni az adatokat és számszerűen megadni a jelek relatív különbségét.

"...Több kifogásolandó hibát találtam a szöveges részben...."

A dolgozat formai kivitelezése során elkövetett elírásokra, pontatlanságokra és következetlenségekre nincs mentség csupán elismerhetem a bírálók jogos kritikáját. A dolgozat készítése során az angol nyelvű cikkek "visszafordítása" magyar nyelvre a vártnál nagyobb gondot okozott a szerzőnek. Ez azonban csak mentegetőzés és a legtöbb amit tehetek, hogy elnézést kérek a bírálóktól az elkövetett formai hibákért, amelyek megnehezítették a dolgozat olvasását, bírálatát. A megfogalmazási pontatlanságokra vonatkozó kritika is teljes mértékben jogos és elfogadom. Sajnálom, hogy a nem körültekintően megfogalmazott mondatok akár értelemzavaró módon is nehezíthették a bíráló munkáját.

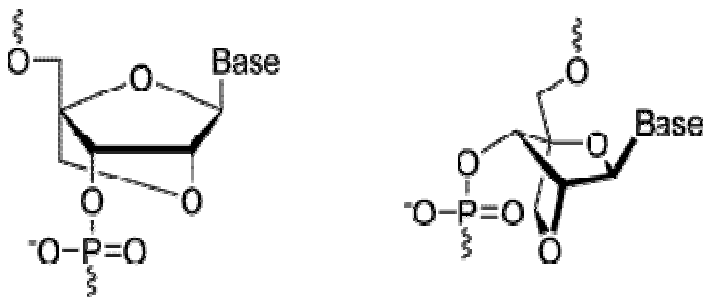
Válaszok a szakmai kérdésekre:

1. "A dolgozat első részében ismerteti a kis RNS molekulák kimutatására alkalmas hatékony módszert, aminek alapja LNA-módosított oligonukleotidok próbák használata. Az ismertetés rövid és nem tér ki arra honnan származik a próbák alkalmazásának ötlete, nincs ábra a módosított nukleotidok szerkezetének bemutatására és nem említi a módosított oligonukleotidokat tartalmazó próbák előállításának lehetőségeit."

Az Egyesült Királyságban töltött éveim során *in situ* hibridizálással vizsgáltam különböző gének expressziós szintjének változásait vírusfertőzés hatására. Hazatérésem után, Dr. Burgyán József csoportjához csatlakoztam ahol az RNS csendesítés kutatása volt a kísérletek fókuszában, amelyet többek között egy EU pályázat is támogatott. A miRNS-ek funkciójának megértése érdekében szeretnénk volna a miRNS-ek felhalmozódását is *in situ* hibridizálással vizsgálni. A DNS próbák miRNS Northern blot hibridizációhoz, korlátozottan ugyan, de felhasználhatóak, azonban *in situ* hibridizációra nem bizonyultak alkalmasnak. Felmerült,

RNS oligonukleotidok vagy 2'-O-metil RNS oligonukleotidok felhasználása azonban ezekkel dolgozni technikailag nem könnyű, az RNS oligonukleotid érzékeny a degradációra és meglehetősen drága is. A csoportot támogató EU konzorcium egyik tagja az Exiqon dán cég volt, amely birtokolta az LNA módosítás szabadalmát, amit szerettek volna hasznosítani. Ismert volt, hogy az LNA módosítás végső eredményeként bekövetkező konformáció változás fokozza a bázispárosodás erősségét, jelentősen emelve az olvadáspontot. A módosítás végső eredményeként bekövetkező konformáció változás fokozza bázispárosodás erősségét, jelentősen emelve az olvadáspontot ezért logikus volt a céggel felvenni a kapcsolatot. Az LNA-k biciklusos RNS analógok, amelyekben a cukor-foszfát gerinc furanóz gyűrűje egy extra metilén hidat tartalmaz 2'oxigén és a 4' szén között (Ábra).

LNA nukleotid



Az LNA-DNS és LNA-RNS duplexek vizsgálata azt mutatta ki, hogy az LNA szerkezete az RNS-hez hasonló, A-típusú duplex geometriát mutat [1-3]. Az LNA módosításban rejlő potenciális lehetőséget kihasználására próbákat terveztünk leírt endogén miRNS-ek kimutatására. A próbákat az Exiqon cég gyártotta le a kísérletekhez, mi pedig kipróbáltuk a próbák alkalmazhatóságát, specifikitását és optimalizáltuk a felhasználás körülményeit.

Az eredmények meglehetősen hatékony hibridizációt és specifikitást mutattak és az LNA módosított oligonukleotidok rendkívül stabilnak bizonyultak.

Az LNA próbákat előállítani csak az Exiqon cég jogosult, mert ő birtokolja a szabadalmi jogokat. Így LNA próbákat csak vásárolni lehetséges, és sajnálatosan meglehetősen magas áron. Lehetőség van, a céggel tárgyalva, különböző LNA oligonukleotidok legyártására is, különböző számú és elhelyezkedésű LNA módosítás beépítésére a kívánt szekvenciába az adott kísérlet igényeinek megfelelően.

2. "A DI RNS-ek hatása elvileg alapja lehet a vírusfertőzés károsító hatásának kivédésére szolgáló módszernek. Van ilyen próbálkozás?"

Születtek olyan kísérletek, amelyek során DI RNS-ek védőhatását próbálták kihasználni vírusfertőzések esetén. Kollár és mtsai. beépítették egy tombusvírus DI RNS szekvenciáját a 35S konstitutív promótert tartalmazó expressziós kazettába és ezzel *Nicotiana benthamiana* növényeket transzformáltak [4]. Ezek a transzgénikus növények alacsony szinten kifejezték a DI RNS-t. A transzgénikus növények tombusvírussal történő fertőzése kiváltotta az expresszált DI RNS-ek hatékony replikációját és a növények a DI RNS-ek jelenlétére jellemző enyhébb tüneteket mutattak. Azonban mivel DI RNS jelenlétében kialakuló enyhébb tünetek is meglehetősen súlyosak, ezért ez technológia nem került bele az ígéretes technológiák körébe.

3. " Shut off jelenség vizsgálatakor viszonylag kis számú gén működésváltozását vizsgálta. Miért ezeket választotta? Történt mások által, vagy saját laboratóriumában teljes transzkriptom analízisre kiterjedő vizsgálat?"

A gének egy részét (GapA, tubulin) már használták a vírusfertőzés indukálta shut-off jelenség vizsgálata során, ezért ezeket mint referencia géneket választottuk a kísérleteinkhez. A gének másik része stressz kapcsolt gének (HSP90, GST) és kíváncsiak voltunk, hogy ezeknek az általában stressz hatásokra indukciót mutató géneknek a kifejeződésére milyen hatással van a vírusfertőzés indukálta shut-off jelenség. A többi vizsgált gént önkényesen választottuk ki. A kiválasztás során több olyan gént is vizsgáltunk, amelyeket általánosan használnak qPCR kísérletekben referencia géneként (Cph, Cox, H1e, Ef2, GapA, TubA). Az eredményeink megmutatták, hogy ezeknek a referencia géneknek a többsége a shut-off hatása alá esik, ezért használatuk qPCR kísérletekben (vírusfertőzött növényben) torzító hatású lehet.

A vírusfertőzés hatására bekövetkező génexpressziós változásokat elsősorban véletlenszerűen kiválasztott gének példáján mutattuk be. A kísérletek logikus folytatása lett volna a jelenség transzkriptom szintű vizsgálata. Azonban ezek a vizsgálatok pénzügyi okok miatt késtek. Laboratóriumunkban most készültek az első microarray a vizsgálatok két shut-off jelenséget indukáló (CymRSV, crTMV) és egy nem indukáló (TCV) vírus felhasználásával. A kísérletek során *Nicotiana benthamiana* növényeket fertőztünk a vírusokkal, majd a szisztémikus tüneteket mutató levelekből és a kontroll nem fertőzött levelekből készített RNS kivonatokat használunk fel a microarray kísérletekhez. Az adatok előzetes elemzése alátámasztotta azt a megfigyelést, hogy egyes vírusok rendkívül hatékonyan indukálnak változásokat a gazda génexpressziós rendszerébe, míg mások képesek azonos szinten replikálódni a növényben anélkül, hogy erősen interferálnának a gazda génexpressziójával. Ha csak azokat a géneket vesszük alapul, amelyek legalább 10x-es változást mutatnak a vírusfertőzés hatására a kontroll növényhez képest akkor a shut-off indukáló vírusok közül a crTMV 1576 gén esetén

indukál változást (amelyből 1261 mRNS kifejeződés gátlás, 315 pedig mRNS indukció), a CymRSV 1469 gén esetén indukál változást (amelyből 1032 mRNS kifejeződés gátlás, 437 pedig mRNS indukció). Az mRNS kifejeződés gátlása meglehetősen nagy átfedést mutatott a két vírus között (879 gén esetében közös). Ezzel szemben a TCV, amely nem indukál shut-off jelenséget, csupán 40 esetben mutatott legalább 10x-es változást (amelyből 4 mRNS kifejeződés gátlás, 36 pedig mRNS indukció). Ezek az eredmények jól korrelálnak az eddigi eredményeinkkel, és alátámasztják, hogy shut-off jelenség kialakulása a vírusfertőzés során fontos komponense lehet a tünet kialakulásnak, hiszen 1000-es nagyságrendű gének esetében okoz súlyos mRNS hiányt. Továbbá, a shut-off jelenséget kísérő markáns indukciós változások is befolyásolhatják a tünet kialakulás végső eredményét. Az előzetes eredmények azt mutatják, hogy a shut-off jelenséget mutató növények esetében transzkripció faktorok is érintettek, azonban ezek biológiai szerepének tisztázása a folyamatban még várat magára.

4. "Van miR168 mutáns növény, és ha igen milyen annak a fenotípusa a vírusokkal szembeni ellenálló képesség és általában a növény fejlődése tekintetében?"

Az érett miR168 két forrásból keletkezhet a növényben (*Arabidopsis thaliana*) mivel két különböző miRNS gén (MIR168a és MIR168b) is kódolja a miR168 prekursor RNS-ét. Mindkét prekuzorról keletkező érett miR168 részt vesz az AGO1 mRNS szabályozásában, azonban a MIR168a génről nagyobb mennyiségben keletkezik érett miRNS [5]. A MIR168b géne nem lelhető fel "loss of function" mutáns. A MIR168a géne létezik egy olyan transzpozon inszerciós mutáns (mir168a-2) mutáns ahol miR168 mennyisége a normális szint 15%-ra csökkent. Ebben a mutánsban az AGO1 mRNS szintje a háromszorosára nőtt és a növények erős fejlődési defektusokat mutattak, de életképesek voltak. Azok a transzgénikus növények, amelyek olyan módosított AGO1 mRNS-t fejeztek ki ahol a miRNS felismerő hely csendes mutációkkal el lett rontva, rendkívül súlyos abnormalitásokat vagy letalitást mutattak [6]. Ez arra utal, hogy az AGO1 mRNS teljes kivonása a miR168 reguláció alól nem lehetséges. Az érett miR168 túlermeltetése transzgénikus növényekben szintén fejlődési abnormalitásokat okoz. Ezeknek a mutánsoknak a viselkedése vírusfertőzés esetén nem ismert. Jelenleg olyan transzgénikus növények vizsgálatát tervezzük a vírusfertőzések során ahol a MIR168a és b gének promóteréhez a GUS riporter gén van kapcsolva (Herve Vaucheret laboratóriumából származó növények). Ezekkel a marker konstrukciókkal ellátott növényeket fertőzve és a GUS felhalmozódást vizsgálva reményeink szerint választ kaphatunk arra, hogy a vírusok valóban a MIR168 gén(ek) transzkripcionális aktiválásával idézik elő az érett miR168 fokozott felhalmozódását. A terveink között szerepel, a mir168a-2

mutáns bevonása a vírusfertőzési kísérletekbe, továbbá egy olyan transzgénikus növény előállítására is, amelyikben egy "target mimicry" konstrukcióval szeretnénk gátolni az érett miR168 aktivitását és vizsgálni ennek hatását az AGO1 mRNS és fehérje regulációjára, a növény fejlődésére és a vírusfertőzések kimenetelére.

Hivatkozások

1. Bondensgaard, K., et al., *Structural studies of LNA:RNA duplexes by NMR: conformations and implications for RNase H activity*. Chemistry, 2000. **6**(15): p. 2687-95.
2. Petersen, M., et al., *Locked nucleic acid (LNA) recognition of RNA: NMR solution structures of LNA:RNA hybrids*. J Am Chem Soc, 2002. **124**(21): p. 5974-82.
3. Petersen, M., et al., *The conformations of locked nucleic acids (LNA)*. J Mol Recognit, 2000. **13**(1): p. 44-53.
4. Kollar, A., T. Dalmay, and J. Burgyan, *Defective interfering RNA-mediated resistance against cymbidium ringspot tomosvirus in transgenic plants*. Virology, 1993. **193**(1): p. 313-8.
5. Vaucheret, H., *AGO1 homeostasis involves differential production of 21-nt and 22-nt miR168 species by MIR168a and MIR168b*. PLoS One, 2009. **4**(7): p. e6442.
6. Vaucheret, H., A.C. Mallory, and D.P. Bartel, *AGO1 homeostasis entails coexpression of MIR168 and AGO1 and preferential stabilization of miR168 by AGO1*. Mol Cell, 2006. **22**(1): p. 129-36.

Gödöllő, 2011. Október 24.

Tisztelettel,



Havelda Zoltán