

Válasz Dr. Orosz Ferenc opponensi véleményére

Köszönöm Dr. Orosz Ferencnek az értekezésem gyors és pozitív elbírálását. Az idegen és a magyarosított kifejezések széleskörű használatáért, illetve az elírásokért elnézést kérek. Az angol szakkifejezések többségének nincs „hivatalos” magyar megfelelője. Az angol változat használata ugyan nehézkes, de így legalább biztosan megkeresheti az olvasó az adott kifejezés értelmét egy szakszótárban vagy az interneten. Ugyanakkor elismerem, hogy számos esetben lehetett volna a magyar megfelelőt használni. Azt hiszem, mindenki máshol húzza meg a határt, meddig alkalmazhatóak az idegen változatok. Úgy tűnik, hogy én túl sok idegen kifejezést használtam -ezt sajnálom. Bízom benne, hogy ez az érthetőséget alapvetően nem befolyásolja.

Válasz a bíráló kérdéseire, megjegyzéseire

(dőlt betűvel szerepelnek a bírálati pontok, kérdések)

A 7. ábrán, amely az Aureusvírus és a Tombusvírus MP fehérjéinek összehasonlítását mutatja, miért vannak egy másik fehérje, a P19 másodlagos szerkezeti elemei feltüntetve?

A P19 struktúrájára utaló ábrarészlet valóban elhagyható lett volna. Azért illesztettük mégis be, hogy mutassuk, a mozgásért felelős fehérjék nem csak a szupresszor által lefedett, illetve a szupresszor funkcióhoz fontos régiókban hasonlóak.

Ide kapcsolódik az a kérdés, hogy az MP fehérjékben találhatóak-e szerkezeti elemek. Az ilyen esetekben, amikor egy génszakasról két fehérje is kódolódik, az egyik, nem meglepő módon általában eredendően rendezetlen fehérje.

Az átfedő, de nem azonos leolvasási keretben kódolt génekről transzlálódó fehérjék esetén a később evolválódó fehérje számára a korábban kialakult fehérje szerkezetfüggése komoly evolúciós korlátot jelent. Karlin, illetve Kalmár munkacsoportjának közleményei (Overlapping genes produce proteins with unusual sequence properties and offer insight into de novo protein creation. Rancurel C, Khosravi M, Dunker A, Romero PR, Karlin D. *J Virol.* 2009 Oct, Dual coding in alternative reading frames correlates with intrinsic protein disorder. Kovacs E, Tompa P, Liliom K, Kalmár L. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Mar) alapján tudjuk, hogy a második fehérje általában „rendezetlen fehérjeként” alakul ki, és marad fenn. Itt azonban az a kivételes eset áll fenn, amikor mindkét fehérje, az ORF4 által kódolt „mozgást segítő, movement”, illetve az ORF4-be ékelődő ORF5 által kódolt szupresszor fehérje is határozott struktúrával rendelkezik. Ugyanakkor valószínű, hogy a P19 és a P14 szupresszorok feltételezett közös őse eredetileg jóval rendezetlenebb volt. A vírusevolúció azonban igen gyors, így a korlátok ellenére is lehetőség nyílt egy határozott szerkezetű, a dsRNS-t jobban kötő, és így hatékonyabb silencing gátlásra képes szupresszor fehérje kialakulására.

A TCV CP fehérjék dsRNS kötésének erősségét eddig mások még nem tanulmányozták. Nem gondolt-e arra, hogy maga végezzen ilyen kísérleteket?

Természetesen felmerült, de az MBK-ban működött-működik egy a mi csoportunknál sokkal gyakorlottabb szupresszor biokémiával foglalkozó csoport (Növényi virológia), így mi 2006-ban befejeztük a szupresszorokkal kapcsolatos programokat.

A 15. ábrán a 3'UTR-be beépített intron milyen hosszú? Mennyivel növeli meg a hatást a hossz alapján várható „hosszú 3'UTR alapú” NMD-hez képest?

Az Ls intron 189 nt hosszú, így 3' UTR-ba épített intron a kivágódás kudarca esetén is csak kis mértékben (~2X) növeli az NMD hatékonyságát. Ugyanakkor 3' UTR-ba épített Ls intron

sikeres splicing esetén többszörösére emeli az NMD hatékonyságát (~4-5X). Számos olyan teszt konstrukciónk van, ahol az intront fordított orientációba építettük be, így nem tud kivágódni. Ezeket a mRNS-eket az NMD jóval kevésbé hatékonyan támadta, mint azokat a teszt konstrukciókat, ahol ugyanaz az intron, azonos pozícióba, de normál orientációba került beépítésre. Azaz az intron kivágódása, feltehetően az EJC révén, jelentősen felerősíti az NMD-t.

A 16. B és C ábrán jól látható, és erre a jelölt is fölhívja a figyelmet, hogy az U1DN ko-infiltráció az 5'U2-G mRNS-szintet emeli, de a főgén transzlációját ez kevésbé módosítja. Mi lehet ennek az oka?

A pontos okot nem ismerjük, de valószínűleg arról van szó, hogy a főgén intenzív transzlációjához a mRNS szint emelkedése mellett hatékony reiniciációra is szükség van. Elképzelhető, hogy a U1DN ko-infiltráció kimenti ugyan az uORF-t hordozó mRNS-t az NMD-ből, de a transzláció terminációja ettől még lassú marad. A lassú termináció feltehetően csökkenti a reiniciáció hatékonyságát, így a megemelkedett mRNS szint nem jár a főgén által kódolt fehérje expressziójának arányos emelkedésével.

A 22. ábrán a 4A3 növényekben a G-L konstrukció expressziója nem a negatív, hanem a pozitív kontrollhoz hasonló. Mivel az RNS blott nincs mutatva, így el kell hinnünk, hogy a 4A3 a hosszú 3'UTR-alapú NMD-hez is szükséges.

Eredményeink alapján kijelenthetjük, hogy a 4A3 –hasonlóan a Mago-hoz, az Y14-hez és a Barentsz-hez- feltétlen kell az intron-alapú növényi NMD-hez. Ugyanakkor nem teljesen világos, hogy részt vesz-e a hosszú 3'UTR-alapú NMD-ben. Míg a többi feltételezett EJC faktor inaktiválása semmilyen módon nem befolyásolta a hosszú 3'UTR-alapú NMD-t, a 4A3 csendesített levelekben a GFP-alapú hosszú 3'UTR NMD riporter génről származó mRNS-ek szintje ugyan nem változott, de a zöld fluoreszcencia néhány kísérletben felerősödött. Ennek okát egyelőre nem ismerjük.

A 26.A ábra aláírása félrevezető.

Valóban, a 26.A ábra az aláírás szerint csak a Barentsz 1 és 2 gének 3'UTR szerkezetét mutatná, de az ábra valójában mutatja a teljes Barentsz transzkriptumot, és kiemeli az NMD szempontjából fontos 3'UTR elemeket.

A jelölt az NMD evolúció új, meggyőző modelljét állította fel. Az irodalmi adatok között hivatkozik a Giardia lamblia, az egyik legegyszerűbb eukarióta NMD rendszerére, azonban a modellbe ezt nem építette be. Mennyire illenek a modellbe a protozoára vonatkozó irodalmi adatok?

Néhány modell organizmus kivételével az NMD-re vonatkozóan csak a *Giardia lamblia*, illetve a *Trypanosoma brucei* esetén van adatunk. A jelenleg elfogadott eukarióta evolúciós elmélet szerint az utolsó közös eukarióta ősből, a LECA-ból, kb egy időben több leszármazási vonal vált ki, ezek egyike a növények felé (Plantae), míg egy másik a gombák-állatok irányába vezetett (Unikonts). A Giardiák és a Trypanosomák egy harmadik ághoz, az Excavata-hoz tartoznak (The origin and early evolution of eukaryotes in the light of phylogenomics. Koonin EV. *Genome Biol.* 2010). Azaz ugyanolyan távoli rokonai a növényeknek, mint az állatoknak. Modellünk szerint, melyet a modell organizmusok NMD rendszere alapján állítottunk fel, a LECA-ban igen komplex NMD rendszer működött, amely számos leszármazási vonalban leegyszerűsödött. A Giardia és a Trypanosoma is parazita, így ezekben számos ősi gén, jelpálya, génregulációs rendszer elveszett. Az NMD kulcsfaktorai közül Giardia-ban csak a UPF1, míg Trypanosoma-ban csak a UPF1 és a UPF2 található meg. Ennek ellenére az NMD Giardia-ban is működik, igaz a PTC tartalmú mRNS-ek szintje

majdnem fele a normál transzkriptumoknak. Azaz az NMD Giardia-ban igen rossz hatékonysággal működik (Incomplete nonsense-mediated mRNA decay in Giardia lamblia. Chen YH, Su LH, Sun CH. *Int J Parasitol.* 2008 Sep;). Megítélésem szerint a Giardia adatok beleillenek a modellbe, az NMD rendszer gyakori egyszerűsödésének egy extrém végállapotát jelentik, ahol csak a legfontosabb NMD faktor, a UPF1 maradt meg. Trypanosoma-ban a UPF faktorok kikapcsolása nem eredményezi a PTC tartalmú mRNS-ek stabilizálódását, azaz Trypanosoma-ban az NMD vagy nem működik, vagy a modell eukariótáktól teljesen eltérő módon működik (Is there a classical nonsense-mediated decay pathway in trypanosomes? Delhi P, Queiroz R, Inchaustegui D, Carrington M, Clayton C. *PLoS One.* 2011). Azonban ki kell emelni, hogy a Trypanosoma-ban policisztronos mRNS-ek vannak, így itt a PTC és a normál stop kodon megkülönböztetése -ha egyáltalán van ilyen- csak speciális, de egyelőre nem ismert módon történhet.

Budapest, 2012. Február. 12.

Silhavy Dániel