

BÍRÁLAT

Dr. Rónai Zsolt

Genetikai polimorfizmusok vizsgálata: a génvariációk molekuláris hatásától a komplex jellegek örökletes hátteréig c. MTA Doktora értekezéséről

Dr. Rónai Zsolt, a Jelölt 145 oldalas dolgozatban foglalta össze eddigi kutatói pályájának főbb eredményeit, ezzel a munkával pályázik az MTA doktora címre.

A dolgozat formai bírálata: A dolgozat formailag, nyelvhelyességben rendkívül igényes, csupán két helyen leltem - a 99. és a 100. oldalon - egy-egy gépelési hibára. A Jelölt gondosan összeállított *Rövidítésjegyzékkel* segítette az Olvasót az igen összetett téma követésében. Magyar nyelvhelyessége kiemelkedő, a dolgozat mondandója jól követhető.

A dolgozat tartalmi bírálata:

A Jelölt közel 10 oldalas *Bevezetést* írt (5-14. oldal), amelynek nagy része (5-9. oldal, valamint 11-14. oldal) elsősorban olyan tankönyvi tudnivalókat ismertet, amely napjaink felsőfokú oktatásában a biológus- és orvosképzés alapinformációja. Megítélésem szerint a Bevezetés 10-11. oldalán leírt ismeretek kötődnek szorosabban a Jelölt kutatási témájához, adják meg annak konkrét hátterét.

Az *Irodalmi áttekintés* rész a 15. oldalon indul és az 53. oldalig tart, mindösszesen tehát 39 oldalt tesz ki. Végigolvasva ezt a részt hasonló benyomásom alakult ki, mint a *Bevezetés* rész kapcsán: itt is rendkívül nagy az aránya az ún. tankönyvi ismereteknek, meglátásom szerint a Jelölt „túl messziről” kezdte megadni a saját célkitűzéseinek, eredményeinek értelmezéséhez szükséges irodalmi ismereteket. Ez elsősorban a 28-40. oldalakon leírt módszerek túlzóan részletező leírásának olvasása kapcsán fogalmazódott meg bennem. Ráadásul olyan metodikákat is viszonylag részletesen ismertet, amelyek az NGS időszakában már teljesen elavultnak számítanak: napjainkban szinte már csak tudománytörténeti érdekességként gondolunk vissza pl. az SSCP módszerre (35. oldal). Szintén nem tartottam indokoltnak, hogy a DNS szekvenálás metodikájának fejlődését ugyancsak 5 oldalon (36-40. oldal) keresztül ismertette a Jelölt a dolgozatának *Irodalmi áttekintés* részében, akkor, amikor saját metodikai fejlesztései elsősorban PCR alapúak voltak. A 40-45. oldalig terjedő részben a genom szintű asszociációs vizsgálatokról és a hipotézis vezérelt kandidáns gén vizsgálatokról írt a Jelölt, megítélésem szerint ugyancsak tankönyvi ismereteket megosztva az olvasókkal. Saját vizsgálatainak irodalmi hátterét a kandidáns génvizsgálatok kapcsán leírt ismeretek adják meg.

A Jelölt az *Irodalmi áttekintés* rész 19-27-ig oldalán ismerteti azokat a géneket, amelyeket munkája során ő maga is vizsgált: D4 dopamin receptor gén, a wolframin gén, a SNAP-25 gén, valamint a 4-es komplement komponens fehérjét kódoló gén. Ez a rész érdemben készíti elő a Jelölt saját kutatási tevékenységével kapcsolatos ismeretek értelmezését, ugyanakkor nagyon hiányoltam, hogy az *Irodalmi áttekintés* részben a Jelölt gyakorlatilag semmit nem írt azokról a humán jellegekről, ill. kórképekről, amelyekben a fent felsorolt gének variánsait vizsgálta. Az ezzel kapcsolatos alapinformációkat a Jelölt az *Eredmények és megbeszélés* részbe helyezte, a 85. oldalon kezdődő 5.2 „Asszociációs vizsgálatok” részbe, ahol az agresszió, a cukorbetegség és az impulzivitás jellegekkel, ill. kórképpel kapcsolatos alapinformációkat írja le. Meglátásom szerint ezeknek az ismereteknek az *Irodalmi áttekintés* fejezetben lett volna a helye és részletesebben kifejtve, mint ahogyan a dolgozat *Eredmények* fejezetében olvasható. A Jelölt a 45. oldalon induló 2.3.3 alfejezetben ismerteti a genetikai variációk molekuláris hatásának elemzéséhez kapcsolódó irodalmi

hátteret. Ezzel a 9 oldalt kitevő résszel kapcsolatosan is az a meglátásom alakult ki, hogy mind a DNS-fehérje kölcsönhatásokat vizsgáló módszerek, mind a miRNS-ek hatásának vizsgálatával kapcsolatosan ismertett adatok meglehetősen tankönyvi jellegűek, valamit elsősorban metodikai ismereteket tartalmaznak.

A Jelölt egy oldalnyi terjedelemben fogalmazta meg a *Célkitűzéseket*. A Jelölt nyolc elkülönült, jól definiált célt fogalmazott meg. Ezek közül négy kimondottan metodikai fejlesztésekkel kapcsolatos, majd további négy a beállított módszerekkel végrehajtott vizsgálatokat tűzte ki célul. Talán itt érhető leginkább tetten az egész dolgozat erősen metodikai jellege. Meglátásom szerint egy hipotézisvezérelt, koncepciózus genetikai munkában a célokat pont fordítva kellene kitűzni: elsőként azt megfogalmazni, hogy milyen hipotézis mentén mely betegségekben/jellegekben mely gének variánsait tervezzük vizsgálni, illetve milyen funkcionális vizsgálatokat tervezett elvégezni, MAJD EZT KÖVETŐEN leírni, hogy a kitűzött célok végrehajtásához milyen metodikai fejlesztéseket kellett végrehajtani.

A *Módszerek* rész 8 oldal terjedelmű, jól követhetően, érthetően ismerteti a Jelölt a főbb alkalmazott metodikákat. Két kérdésem, ill. megjegyzésem van a fejezettel kapcsolatosan. **Az 56. oldalon, a 6. ábrán bemutatott OpenArray lemezzel kapcsolatosan a Jelöltnek volt-e saját fejlesztési tevékenysége?** Ha nem, akkor nem tartom indokoltnak a bemutatását a dolgozatban. A 4.3 rész címe „Molekuláris biológiai vizsgálatok”. Szerencsésebbnek tartottam volna a szakirodalomban elfogadott terminológia szerint „Funkcionális vizsgálatok” címet adni ennek az alfejezetnek, ugyanis a leírt módszerek mind azt célozzák, hogy az azonosított genetikai variánsok funkcionális hatásait feltárják.

Az *Eredmények és megbeszélés* fejezet 48 oldal terjedelmű, alapvetően 14 közlemény eredményeit összegzi, illetve további 12, a dolgozat témájához kapcsolódó közlemény (összesen 26 tanulmány) anyagát építette bele ebbe a fejezetbe a Jelölt. Végigolvasva a közlemények címét, a Jelölt 14 tanulmányban foglalta össze a metodikai fejlesztéseinek eredményeit, valamint 12 olyan közleménye van, amely valamely humán vagy kutya jelleg, ill. betegség hátterében álló genetikai variánsokat vizsgált. Ez a metodikai hangsúly végig nyomon követhető az *Eredmények és megbeszélés* fejezet olvasása során. Ezzel kapcsolatosan azt szeretném megkérdezni, hogy **a Jelölt által fejlesztett új módszerek más kutató laboratóriumokban (akár hazai, akár külföldi) bevezetésre, alkalmazásra kerültek-e.**

Az első alfejezet a DRD4 receptor variánsainak vizsgálatáról szól humán és kutya mintákon. Az alfejezet a kutya fajták DRD4 variánsainak leírásával végződik a 67. oldalon. Az eredmények megbeszélése néhány mondatra korlátozódik és a Jelölt nem diszkutálja, hogy az általa vizsgált polimorfizmusok a vizsgált 4 kutyafajta és a farkas temperamentumának meghatározásában, annak különbségeinek kialakításában részt vesznek-e. **Kérem a Jelöltet, hogy az ezzel kapcsolatos információval egészítse ki a dolgozatban olvashatókat!** Hasonlóan hiányérzetem maradt annak az alfejezetnek a végén, amelyben a Jelölt a glikogénszintáz-kináz 3béta gén (*GSK3B*) CNV-jének vizsgálatát ismerteti, illetve azt, hogy a genotipizálást több százas beteg és kontroll csoport bevonásával elvégezték. A kapott eredmények rövid leírása olvasható az alfejezetben, de azok diszkusszióját nem adja meg a Jelölt az alfejezet végén, genotípus-fenotípus összefüggés megállapítása, illetve annak hiánya nem került leírásra, az alfejezet utolsó megállapításai is metodikai jellegűek. **Kérem a Jelöltet, hogy ha saját eredményeiből, vagy a szakirodalomból erre vonatkozó megállapítások fellelhetők, akkor azokat ismertesse!**

A 85. oldalon kezdődő 5.2 alfejezet a Jelölt által elvégzett asszociációs vizsgálatokról szól. Módszertanában a Jelölt értelemszerűen nagymértékben támaszkodott az általa fejlesztett metodikákra. Itt is szeretném megtenni az észrevételt, hogy a Jelölt által vizsgált humán kórképekről és jellegekről, valamint az azok eddig

feltárt genetikai/genomikai háttéréről szóló alapinformációknak meglátásom szerint az *Irodalmi áttekintés* részben lett volna a megfelelő helye.

Az alfejezetben ismertetett asszociációs vizsgálatokat kiemelkedő precizitással és körültekintéssel, a statisztikai korrekciók alkalmazásával végezte el a Jelölt. Az agresszióval asszociációban azonosított egy-egy hajlamosító polimorfizmust a *HTR2A* ill. *WFS1* géneken. Jó lett volna, ha a szignifikáns genotípus eloszlást mutató polimorfizmusokat félkövér jelöléssel kiemeli a Jelölt a rendkívül adat gazdag 5. és 6. táblázatokban. Érdekes megállapítást tett a Jelölt az általa azonosított, agresszióra hajlamosító rs1046322 homozigóta ritka genotípusára vonatkozóan: a vizsgált 801 fős populációban mindössze kilencen voltak AA genotípusúak és mind a kilencen az agresszióra vonatkozó négy alkategóriában szignifikáns átlagpontoszám eltérést mutattak a többi genotípussal összevetve. Mivel a *WFS1* gén funkcióvesztéses mutációi a Wolfram szindróma kóroki genetikai variánsai, felmerül a kérdés, hogy **vajon a 9 *WFS1* rs1046322 AA genotípusú egyén mutatta-e a Wolfram szindróma egyéb tüneteit is az agresszív személyiségjegy mellett.**

Az impulzivitás genetikai meghatározottságának vizsgálatába 901 egészséges önkéntest vontak be és a SNAP-25 gén polimorfizmusait vizsgálták. A 3' UTR-ben elhelyezkedő polimorfizmusokkal kapcsolatosan voltak előzetes irodalmi eredmények, amelyekre a Jelölt és munkatársai támaszkodtak, de **a két kiválasztott promóter polimorfizmussal kapcsolatosan (rs3746544 és rs1051312) nem említ olyan háttér adatot a Jelölt, amely a kiválasztás hipotézisét alátámasztaná. Kérem, hogy ezzel kapcsolatosan információt ossza meg velünk a Jelölt!** A vizsgálatok eredményeit gondosan elemezte a Jelölt, a haplotípus elemzések egyértelmű bizonyítékot szolgáltattak arra, hogy a SNAP-25 gén variánsai hozzájárulnak az impulzivitás személyiségjelleg kialakításához. Vizsgálataikat kiterjesztették a kutyák tanulmányozására is, ebben az esetben a *DRD4* gén 3. exonjának VNTR variánsát tanulmányozták. Leírásra került, hogy vizsgált rendőrkutyák esetében szignifikáns összefüggést azonosítottak a 2/2 genotípus és az alacsonyabb impulzivitás között. **Kérem, hogy a vonatkozó adatokat mutassa be, ezt hiányoltam a dolgozatból.**

A 98. oldalon kezdődő 5.3 alfejezet a jelölt *in vitro* funkcionális vizsgálatainak eredményeit összegzi. HeLa sejtek extraktumával végzett DNS-fehérje kölcsönhatási vizsgálatokkal igazolták, hogy a *DRD4* gén promómerében lévő 120 bp-os duplikáció feltehetően az Sp1 transzkripció faktor kötődésének erősségét befolyásolja és ezzel a mechanizmussal járul hozzá a dopamin válasz egyéni variabilitásának kialakításához.

HEK293T sejtekben luciferáz riporter esszéket végeztek a SNAP-25 gén 3' UTR-ben található polimorfizmusainak miR-641 kötésére gyakorolt hatásának vizsgálatára. Eredményeik egyértelműen megmutatták a haplotípusok miR-641 kötésre gyakorolt hatását, ezek alapján a Jelölt feltételezi, hogy a variáns a képződő SNAP-25 mRNS stabilitásának módosításával járul hozzá az asszociált kórképek (ADHD és Alzheimer-betegség) pathogeneziséhez. Expressziós vizsgálatokat a 9 AA eltérést mutató két SNAP-25 fehérje izoformát kódoló mRNS molekulák tekintetében végeztek. Kimutatták, hogy a két izoforma expressziója a humán szövetekben eltér, a központi idegrendszerben a „b” izoforma dominált. **Saját eredményük megszületését követően történtek-e további vizsgálatok akár a Jelölt által, akár más kutatólaboratóriumban, amelynek során Alzheimer-betegségben, Parkinson-kórban vagy szkizofréniában szenvedő elhunyt betegek agyszövetében tanulmányozták a két izoforma expresszióját akár mRNS szinten *in situ* hibridizációval, akár fehérje szinten immunhisztokémiai vizsgálatokkal?** Értelemszerűen ez utóbbi vizsgálatok előfeltétele, hogy legyen olyan monoklonális ellenanyag, amely képes megkülönböztetni a 9 AA különbséget mutató két fehérje izoformát.

A wolframin gén (*WFS1*) promóterének és 3'UTR régiójának számos, a diabetes melitus-szal asszociációt mutató polimorfizmusának funkcionális vizsgálatát végezték el luciferáz esszék alkalmazásával. A kapott

eredményeket nagyon körültekintően értelmezte a Jelölt és jól tudta kötni a betegség pathomechanizmusához.

Az értekezést a Jelölt egy „Kitekintés” fejezettel zárja, amely – hasonlóan a „Bevezetés” és az „Irodalmi áttekintés” részekhez – nagyon tankönyvi, ismeretterjesztő jellegű. Ebben a részben a 113. oldalon nem találtam indokoltnak egy adott termék kiemelt megemlítését a nem-invazív prenatális tesztek közül, valamint helyesbítést szeretnék tenni azzal kapcsolatban is, hogy a preimplantációs genetikai diagnosztikai (PGD) vizsgálatok nem csupán monogénes betegségek, hanem kromoszóma rendellenességek esetén is végezhetőek. Erre számos példa van a hazánkban már engedélyezésre került több mint 200 ilyen vizsgálat köréből.

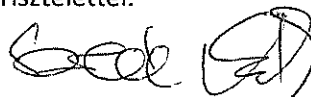
A Jelölt a Doktori Értekezés Tézisiben foglalta össze új eredményeit és megállapításait. Ezeket a teljes terjedelmű dolgozat átolvasását követően új eredményekként és megállapításokként elfogadom. A fejezet rövidített változatára a következő formában teszek javaslatot.

1. Dr. Rónai Zsolt PCR alapú (hagyományos és valós idejű) módszertani fejlesztéseket végzett humán és kutya genetikai variánsok azonosítására. Ezek közül kiemelkedő jelentőségűek az egymáshoz közeli genetikai variánsok és haplotípusok nagy érzékenységgel kimutatására szolgáló metodikák. Olyan elektroforetikus rendszereket dolgozott ki, amelyekkel a fragmentum analízis hatékonysága és felbontóképessége növelhető.
2. Asszociációt mutatott ki a *WFS1*, a *HTR2A* gének variánsai és az agresszió között, valamint az SNAP-25 gén és az impulzív személyiségjegy között humán vizsgálatokban. Kutyaiban ugyanez az endofenotípus a *DRD4* gén VNTR polimorfizmusával volt összefüggésbe hozható. A *WFS1* gén 3' UTR-ben lévő polimorfizmusai 1-es és 2-es típusú cukorbetegség hajlamosító genetikai faktorainak bizonyultak vizsgálataikban.
3. *In vitro* funkcionális vizsgálatokkal igazolták, hogy a *WFS1* gén promóterében és 3' UTR-ben azonosított variánsok szerepet játszanak a génkifejeződés szabályozásában. A SNAP-25 gén 3' UTR polimorfizmusok tekintetében igazolták a miR-641 bekötődésének megváltozását, majd az ennek következtében bekövetkező génexpresszió változást. Összegezve tehát a Jelölt a funkcionális vizsgálatokkal alátámasztotta az azonosított genetikai variánsok kóroki szerepét.

A fenti megállapításokat figyelembe véve javaslom Dr. Rónai Zsolt MTA Doktori értekezésének nyilvános vitára bocsájtását.

Szeged, 2023. május 31.

Tisztelettel:



Prof. Dr. Széll Márta
MTA Doktora, tanszékvezető egyetemi tanár

Ikt.sz.: 48/12/2022/DTT_D
Szakreferens: Szabó Krisztina

Hivatalos bírálói nyilatkozat

Rónai Zsolt

„Genetikai polimorfizmusok vizsgálata: a génvariációk molekuláris hatásától a komplex jellegek örökletes hátteréig”

című doktori munkájának kézhezvételéről és a hivatalos bírálói tevékenység elvállalásáról.

A fenti doktori művet megkaptam, és a hivatalos bírálói tisztet elvállalom.

Dátum: ~~2022~~, 2023. 02. 28.

.....
Széll Márta

Hivatalos bírálói nyilatkozat

Rónai Zsolt

„Genetikai polimorfizmusok vizsgálata: a génvariációk molekuláris hatásától a komplex jellegek örökletes hátteréig”

című doktori munkájáról.

A doktori munka tudományos eredményeit elegendőnek tartom az MTA doktora cím megszerzéséhez,
a nyilvános védés kitűzését javaslom:

igen

nem

Dátum: SZEGED, 2023. 05. 31.

.....
Széll Márta