

Bírálat Orbán Tamás István „Nem-kódoló” és invazív elemek az eukarióta genomokban: szerepük és orvosi biológiai hasznosításuk” című MTA Doktori értekezéséről

Készítette: Boros Imre Miklós DSc

Orbán Tamás István MTA doktori értekezése a szerző 2005-től 2022-ig terjedő időszakban megjelent közleményiben leírt eredményeit foglalja össze. A dolgozatban tárgyalt két témakörben elért, azaz a mikro RNS-ekre és a transzpozonokra vonatkozó eredményeiről, Orbán Tamás az említett időszakban 15 (14 primer adatot közlő és 1 összefoglaló) közleményt készített meghatározó szerzői hozzájárulással (ezekben 3 alkalommal első és 12 alkalommal levelező szerző). A közlemények két ötöde miRNS-ekkel, három ötöde transzpozonokkal foglalkozik. A dolgozat témájához kapcsolódóként említ a szerző továbbá 13 további közleményt és helyenként ezekből eredményeket idéz munkájában. E közlemények téma szerinti megoszlása az előbbiekhöz hasonló. Transzpozonokra vonatkozó munkája eredményeinek gyakorlati alkalmazására pedig munkatársaival három szabadalmi bejelentést tett az említett időszakban.

Orbán Tamás dolgozatában összefoglalt munkáját nemzetközi vonatkozásban korszerű és izgalmas témakörökben végezte. A molekuláris biológia ezredfordulón és azt követően elért eredményei között számos adott okot egyidejűleg öröme és megdöbbenésre tudásunk bővülése, illetve korlátozott voltának felismerése miatt. Az ugrásszerű ismeretgazdagodás az organizmusok genomjáról, együtt járt a megdöbbentő felismeréssel, hogy mennyire kevésbé értjük e genomok működését. Ma sincs magyarázatunk arra, hogy hogyan biztosítják hasonló számú gén együttesek rendkívül eltérő életformák működését. Az alig néhány százaléknyi genom részt kitevő fehérje kódoló exonok és velük kapcsolt intron szekvenciák mellett a genomok nagyobb részét alkotó ismétlődő részek – a nagyrésztben transzpozon és transzpozon-eredetű szekvenciák felismerése viszonylag egyszerű volt – jelentőségükről és szerepükről azonban ma is csak részleges ismereteink vannak. Azt követően is, hogy az ENCODE projektek feltárták: a genomok e részei se csendesek - jelentős részük átírásra kerül és transzkripciójuk termékei a nem-kódoló RNS-ek változatos és rendkívül komplex világát alkotják.

Orbán Tamás kutatásai pontosan ezekre a nagyon korszerű és kompetitív területekre esnek. Kutatási kérdései mikro RNS-ek és transzpozonok képződésére és szerepére vonatkoznak. Kérdéseire adott válaszai e két, az ismereteinket tekintve még a genomok feltáratlan világába tartozó molekulacsoportról adnak értékes, új adatokat és járulnak hozzá tudásunk bővüléséhez. Dolgozatában ismertetett munkája első része a 20-24 nukleotid hosszú, szabályozó RNS molekulák képződésének és működésének megértésére irányult. A megismerés lépései miatt ezek, mint siRNS-ek és miRNS-ek és számos más jelöléssel jelentek meg a tudományban, míg egyre világosabbá vált, hogy valójában több ponton összekapcsolódó és átfedő, bonyolult szabályozó rendszerek közreműködői.

Orbán Tamás munkái négy vonatkozásban: (1.) kis RNS-et tartalmazó komplex által elindított mRNS bontásban résztvevő sejt komponensek azonosításával, (2.) egy sajátos, intron-eredetű miRNS csoport képződésének kimutatásával emlős sejtekben, (3.) a miRNS-ek sokféleségéhez hozzájáruló képződési sajátosságok és a heterogén miRNS formák kimutatásának problémáira történő rámutatással, valamint (4.) egy komplex, nagyszámú miRNS szintézisét biztosító transzkripció egységen érvényesülő szabályozásról alkotott modellel, járulnak hozzá a tudományos ismeretek bővüléséhez a nem kódoló

RNS-ek e fontos csoportjáról. A szerző ezekben a témákban közölt és a dolgozatában összefoglalt eredményei részben általa először leírt, részben a szakterület más kutatóival egyidejűleg tett felismerések, valamint olyan módszerek és eljárások, amelyeket szakterület használ, vagy továbbfejlesztett. Munkái eredményeit a tudományos közösség elfogadta, az azokat leíró cikkek jelentős idézettségi számmal bírnak (324 citáció a témában írt négy adatközlő közleményre). A dolgozat e területre vonatkozó, négy pontban összefoglalt új tudományos eredményeit bírálóként elfogadom, azokat jelentősnek és hitelesen bemutatottnak vélem. Rövid összefoglalásukat az alábbiakban látom:

Orbán Tamás egyik legnagyobb nemzetközi visszhangot kapott munkájával géncsendesítést alkalmazva meghatározta, hogy az ecetmuslicában ismert négy Argonaute fehérje közül az Ago2 vesz részt a RISC komplex felépítésében és hogy a RISC által előidézett hasítást követően a cél RNS darabokat a sejt endogén lebontó rendszere, specifikusan az exoszóma és az Xm1 exonukleáz bontja tovább. E kísérleteket tovább kiterjesztve kimutatta azt is, hogy de-capping enzim és de-adenilázok nem vesznek részt az RNS lebontásában. Így tehát munkájával egy sajátos RNS dagradációs mechanizmust mutatott ki, amiben egy komplementer kis RNS által kijelölt részen történő hasítást 5' és 3' irányba kiterjedően, két különböző enzim közreműködésével megvalósuló bontás követ. Ez a modell több labor által más kísérleti rendszerekben is megerősítést nyert és általánosnak bizonyult.

Egy másik kísérlet sorozat az emlős miRNS-ek egy nem kanonikus érési folyamatának lépéseit és ennek eredményeként, az emlős mirtronok képződését tárja fel. A mirtronok olyan miRNSek, amelyek előmolekulái fehérje gének intron szekvenciái. Tekintettel, hogy az intronok mérete jelentősen változik az organizmusok evolúciós szintjével, nem meglepő, hogy a mirtronok érése a rovar és féreg rendszerekhez viszonyítva, emlősökben eltéréseket mutat. Orbán Tamás bioinformatikai módszerekkel azonosított mirtronokból rekombináns géneket hozott létre. Ezek splice mutáns változatait és olyan sejteket használva, amelyekben a kanonikus miRNS érésben szerepet játszó funkció hiányzott, kimutatta mirtronok képződését emlős sejtben és, hogy ezt a mRNS érés folyamata (splicing) indítja el.

A mirtronok képződését vizsgáló munkájának egy kiterjesztéseként azt vizsgálta, hogy a prekursor formában hajtúszerű, egyesszálú RNS molekula 5' és 3' része egyaránt miRNS-sé érhet-e. Ez a kérdés egyrészt a képezhető miRNS-ek számának bővülése, másrészt a szabályozás módja miatt érdekes. „Cover page” publikációban közölt eredményeivel a szakirodalomban az elsők között bizonyította, hogy a hajtú mindkét ága, azaz a prekursor RNSek 5' és a 3' része egyaránt, érett miRNS komplexek része lehet. Ez a megfigyelés, kiegészítve az azóta tett felismerésekkel, hogy sejtípusonként a két kar használata eltérhet, jelentősen növelheti a miRNS világ és az általa biztosított szabályozás eddig is nehezen belátható komplexitását. Úgy vélem, hogy ha nem is tudjuk még pontosan hogyan, de ezek az eredmények a korábban említett *közel azonos számú gén - nagyon eltérő organizmusok* probléma valamikori megoldásának irányába tett lépéseket jelentenek.

Orbán Tamás egy további munkája a miRNSek mennyiségi kimutatásának megbízható módszerére irányult és ezzel összefüggésben az 5'- és 3' végi szekvencia variabilitásra (az izomiR-ek léte). Munkatársával közölt közleményükben felhívják a figyelmet az RNS mennyiségi meghatározás ebből adódó problémáira és használható módszert ajánlanak a kiküszöbölésükre.

miRNS-ekre vonatkozó munkája negyedik részével a szerző miRNS képződés transzkripcionális és poszt-transzkripciós szabályozását vizsgálta a humán C19MC miRNS géncsoporton. Erről a 100 kb-t meghaladó kiterjedésű miRNS klaszterről egyetlen transzkriptum íródik át, szövetspecifikus expresszióval. A transzkriptumból 46 érett miRNS képződik, expressziós szintjükben polaritást mutatva. A szerző és mti.

kimutatták, hogy ennek szabályozást részben transzkripció, részben transzkripcióhoz kapcsolódó miRNS érés biztosítja és modellt ajánlottak, amiben összefoglalják a feltételezhetően más miRNS klaszterekben is érvényesülő szabályozásban résztvevő molekuláris kapcsolatokat.

miRNS-ekre vonatkozó munkája logikus folytatásaként Orbán Tamás tovább lép, e molekulák biomarkerként történő alkalmazási lehetőségeinek feltárása. A dolgozat szövegéből kitűnik, hogy van ilyen irányú próbálkozása, az azonban nem része a dolgozatban tárgyalt eredményeknek.

Véleményem szerint tehát, Orbán Tamás munkájával jelentősen hozzájárult a kis RNSek világáról alkotott ismerethalmaz bővüléséhez. Eredményei általános érvényűnek tekinthető lebontási útvonalat határoztak meg, humán intron eredetű miRNS-ek létét és képződését bizonyítják, valamint hozzájárulnak a miRNSek sokféleségét okozó okok és ez ebből adódóan szükséges mérési módszerek bővítéséhez és a szövetspecifikus, koordinált expressziót biztosító mechanizmusok feltárásához.

Dolgozata második részében Orbán Tamás transzpozonokra vonatkozó munkáit foglalja össze. Ilyen irányú kutatásának mozgatórugói a transzpozonok evolúciós szerepére és mozgásuk mechanizmusának részleteire irányuló kíváncsiság és a transzpozonok, mint génbeviteli eszközök tökéletesítési vágya volt. Ha a kis RNS-ek világa komplex és rejtélyes, akkor a transzpozonoké többszörösen az. Olyan alapvető kérdések nem megválaszoltak pl., hogy mozgásképes-e a genomunkban kb. 2000 szekvencia részletben felismerhető *piggyBac* DNS elem. A génterápiás alkalmazásokban jól használható transzpozon mozgása ugyanis nyilvánvalóan súlyos következményekkel járhat. Az ennek meghatározására végzett munkájával Orbán Tamás az öt humán *piggyBac* transzpozázt kódoló gént (PGBDs) vizsgálta annak meghatározására, hogy ezek valamelyike képes-e aktív transzpozáz enzim szintézisét biztosítani. A körütekintő és többoldalú analízis eredménye szerint egyik PGDB fehérje se rendelkezik transzpozáz aktivitással és a mobilizálás első lépését, a kivágódást sem képesek katalizálni a használt cél (TIR) szekvenciák esetén. Expressziójuk sajátosságai ugyanakkor arra utal, hogy e fehérjék „domesztikálódtak” és még fel nem tárt szereppel rendelkeznek. Ennek felderítésén – ami az evolúció egy sajátos módjának tettenérését jelenti - a szerző munkacsoportja jelenleg is dolgozik, és együttműködésben már érdekes adatokat tártak fel az egyik PGDB fehérje szerepéről, amivel az a NEAT1 lncRNS-en át, a neuronális differenciációt szabályozza.

A *piggyBac* transzpozonokra vonatkozó más munkáiban Orbán Tamás a transzpozáznak egy eddig nem azonosított funkciójú, rendezetlen doménjét (NTDR) vizsgálta. Megállapította, hogy a fehérjének ez a része sejttypustól függően befolyásolja a transzpozíció hatékonyságot, és szerepe a kivágódási lépésben számottevő. A transzpozáz fehérjének e részére vonatkozó eredményei részben ellentmondanak más laboratórium adataival. A szerző a dolgozatban kritikusan értékeli saját és mások eredményeit és a helyes következtetést vonja le, hogy a nyitott kérdések tisztázása további vizsgálatokat igényel.

A transzpozonok hatékony génbeviteli eszközök modell rendszerekben és potenciálisan humán génterápiában is. Használatuk azonban megkívánja a nagyon pontos kvantitatív ismereteket hatékonyságukról, beépülésük gyakoriságáról, annak lehetséges módosításáról. Orbán Tamás ilyen irányú munkájával a *Sleeping Beauty* transzpozonos rendszer fejlesztésén dolgozott. Megbízható PCR alapú kópiaszám meghatározó módszert dolgozott ki a *Sleeping Beauty* transzpozonos rendszerre és modern riporter gén konstrukciókat használva a transzpozíció első lépésén alapuló módszert fejlesztett a transzpozáz hatékonyság mérésére. Összegezve: eredményei a transzpozon alapú génbevitel optimalizálásához adnak adatokat és mérési eljárásokat.

Dolgozata befejező részében Orbán Tamás olyan sejt és állat modelleket ismertet röviden, amelyeket munkacsoportjával és együttműködőkkel transzpozonok alkalmazásával hozott létre. A létrehozott modellek egyike GFP-t expresszáló összejek. A kutatói szerencse és annak felismerése eredményeként ezek kialakítása során általánosan aktív és szívizom sejtekben transzkripciósan nagyon aktív – „double feature” promotert tudott azonosítani, ami több tekintetben gyakorlati alkalmazást nyerhet és szabadalmi védettséget is érdemelt. Egy másik irány a modellek kialakításában kalcium szenzorfehérjét kifejező transzgenikus patkány sikeres előállítás volt.

Transzpozonokkal kapcsolatos kutató munkája eredményeit Orbán Tamás három tézispontban összegezi. Ezeket a téziseket, azaz (1) a *piggyBac* transzpozáz humán genomban azonosított elemeire vonatkozó adatait és a transzpozáz rendezetlen doménjére vonatkozó adatait, (2) a *Sleeping Beauty* transzpozázon alapuló génbeviteli rendszer optimalizálásában és mennyiségi jellemzésében elért eredményeit és (3) az utóbbi rendszer használatával előállított sejt és állat modelleket, bírálóként új és értékes tudományos eredményeknek vélem. Megjegyzem, hogy bár a transzpozonokra vonatkozó munkáiról a szerző több közleményt közölt, mint a miRNSekre vonatkozókról, a korábbiak idézettsége jelentősen elmarad az utóbbiakhoz képest. Ezt talán részben az idő, részben a téma sajátossága indokolhatja és remélhető, hogy a jövőben e munkák is jobban integrálódnak a tudomány e területének ismereteibe.

Ismertetett véleményemnek megfelelően, Orbán Tamás doktori cím elnyerésére benyújtott dolgozatát nyilvános vitára alkalmasnak tartom és javasolom.

Kérdéseim:

- 1, Az siRNSek “immunrendszerű” védekező funkciót töltenek be pl. invazív RNS-sel szemben, aminek a mechanizmusa mRNS degradáció, vagy transzkripció gátlás. Egy invazív dsRNS esetében milyen mechanizmus tudja biztosítani, hogy a gátló siRNS mRNS komplementer lesz?
2. A PGBD expresszióra vonatkozó adatai mind RNS mérésen alapultak, vagy van mód és használt illet a fehérjék képződésének kimutatására és mennyiségi jellemzésére is különböző sejtvonalakban és fiziológias körülmények között?
3. A *piggyBac* transzpozáz rendezetlen NTDR részre vonatkozó adatok mennyire megbízhatóak, tekintettel, hogy a mérés lényegében egy heterológ rendszer, rovar enzim humán sejtvonalakban? Továbbá, hogyan kell értelmezni az NTDR-től függő, egyes sejtvonalakban mérhető lényeges eltéréseket egy autonóm transzpozícióra képes elem esetében? Epigenetikai eltérések állhatnak ezek hátterében?
4. Az előbbivel összefüggő kérdés, hogy milyen mértékben módosíthatja a transzpozáz aktivitásra vonatkozó mérési eredményeket az, hogy a mérések jelentős részében nem kromoszómális környezetben, kromatinba csomagolt, hanem plazmidon bejuttatott gén kivágását, vagy más esetben egyetlen specifikus helyen integrálódott gén kivágódását mérték?

Szeged, 2024. december 12.

Boros Imre Miklós