

Dr. Tombácz Dóra Doktori művének bírálata

Bíráló Dr. Lakatos Lóránt

Dr. Tombácz Dóra MTA doktori értekezése 14 év kutató munkáját összegzi. A Jelölt kutatásai egy témakörhöz kapcsolódnak, fő érdeklődési területe a DNS és RNS vírusok és a gazda szervezet transzkripció jellemzése.

A vírusok bonyolult működésű mikrobák. Életciklusuk során számos feladatot kell teljesíteniük a sikeres szaporodáshoz. Be kell jutni a sejtbe, sejtmagba, génjeik átírása után megkezdődhet a genomjuk szaporítása. Működésük során meg kell birkóznuk a gazda celluláris és humorális választ adó immunrendszerével is. Mindemellett sikeresen kell interferálni a gazda transzkripció, transláció és a poszt-transzlációs folyamataival, mint például az RNS interferencia, a nonszensz mediált decay, No-GO decay, és az un. riboszóma-asszociált kvaliti kontroll. Végül a kiben az alakul a virion, amik különböző mechanizmusokon keresztül kijutnak a sejtől hogy további sejteket fertőzzenek meg. Azonban vannak olyan vírusok is amelyek a sejt un. látencia állapotába kerülnek, transzkripció aktivitásuk lecsökken és genomja inaktív állapotba kerül. A Jelölt dolgozata a vírusok oldaláról közelíti meg a vírus-gazda interakciót a legmodernebb nagy áteresztőképességű képességű szekvenálási módszerek segítségével.

A dolgozat egy jól átgondolt, versenyképes alapkutatási program megvalósítását összegzi. Az eredmények jelentősen hozzájárultak a vírus szaporodását befolyásoló vírális gének transzkripcionális jellemzéséhez. A Doktori mű 165 oldalas, amiből 36 oldal az irodalmi áttekintés, 26 a Módszerek fejezet. A Doktori mű célkitűzéseit frappánsan és tömören 1 oldalban jelöli ki. A dolgozat eredményeit és azok megvitatását 60 oldalban foglalja össze és a dolgozatban 460 hivatkozás található. A Bevezetés részben bemutatja és összehasonlítja a különböző DNS és RNS szekvenálási technikákat, különös tekintettel az újabb technikák előnyeire. Továbbá részletesen bemutatja a dolgozatban szereplő vírusok működését is. A Módszerek fejezetben leírja a általa használt technikákat a sejtek szaporításától a szekvenálási eljárásokig, különös tekintettel az általuk kifejlesztett szoftver csomagra is. Az Eredmények és az Eredmények megvitatása fejezeteket egybevonta amiben tárgyalja a rendkívül értékes “cutting edge” kutatásainak eredményét és részletes diszkusszióját. A dolgozatban számos nagyméretű genommal rendelkező DNS vírus, mit pl. Herpeszvírusok, baculovírus vakcina vírus majomhimlő vírus szerepel. Mindemellett górcső alá vett néhány RNS vírust is, úgymint SARS-Cov-2, VSIV is.

A dolgozat legfontosabb eredményeinek a következőket fogadom el:

A vírusok annak ellenére, hogy genomjuk jóval kisebb, mint a gazdaszervezet genomja, komplex mikróbáknak bizonyulnak a genomi és transzkripciók vizsgálataik alapján.

Részletesen, nukleotid pontossággal meghatározták a transzkripció start és transzkripció végpontokat. Ezek alapján TSS iniciátor régiókat prediktáltak, valamint promóter elemeket és poliadenilációs szignálokat

Transzkripció profilozás eredményeik alapján kinetikai vizsgálatokat is végeztek, ami alapján meghatározták, hogy a vírusgénnek a fertőzés mely szakaszában íródik le.

A transzkript kezdő és végpontokat klaszterezték, találtak intakt ORF-eket, és nem kódoló RNS molekulákat is. Új long non-coding transzkriptumokat azonosítottak bizonyos herpesz vírusok esetében. A nagy DNS vírusokban kevés olyan mRNS van ami spliceolódik, ennek ellenére új splice és alternatív splice variánsokat is azonosítottak.

Egyik fő érdeklődési területük a herpeszvírusok replikációja volt. Ezeket a kísérleteket alfa herpeszvírusokon végezték. Annotáltak eddig ismert és új raRNS-eket is, amelyek hipotézisük szerint a replikáció progressziójában vesz részt.

A Pseudorabies vírus esetében azonosították a NOIR Inc transzkript családot, ami az IE180 transzkripció aktivátor mRNS molekula promóterével fed át.

A herpesz simplex vírusok vizsgálata alapján azt feltételezik, hogy az OriL-lel átfedő transzkriptek a replikáció szabályozásában vesznek részt.

A himlővírusok esetében azt találták, hogy a genom egésze aktív transzkripcionálisan.

A BoHV-1 transzkripció analízise során a gazda vírusfertőzés hatására megváltozott expressziójú géneket is azonosítottak, amelyeket génontológiai szempontból csoportokba osztották. Számos alapmetabolizmusban résztvevő gén expressziója megváltozott, valamint az RNS metabolizmusban résztvevő gének expressziója is megváltozott. Továbbá azt találták, hogy számos antivirális válaszban résztvevő gén expressziója megemelkedik.

A Sárgahasú szavannacerkóf-VACV gazda-vírus kapcsolatot is transzkripció szintén vizsgáltak. Számos olyan gén azonosítottak, amelyek a gazdában túlreprezentálódtak, valamint a vírusban is találtak új transzkript izoformákat.

A VSIV fertőzés hatását vizsgálták két különböző sejtvonalon és azt találták, hogy a gliasejtvonalon a vírus jobban szaporodik. Génontológiai vizsgálatokkal csoportosították a géneket feltételezett funkció szerint. Érdekes módon a gliasejtekben jóval több DSG találtak mint a Vero sejtvonalban.

Kifejlesztették a LoRTIA programcsomagot, amellyel a long read szekvenálás eredményeit lehet kiértékelni. A program azonosítja a transzkripteket, TSS-okat és TES-eket és intronokat is. A LoRTIA annyira robosztus, hogy képes kiszűrni az amplifikálásból és a template-switch-ből eredő artefaktokat is.

Kérdések

Mi a magyarázata annak, hogy Vero sejtvonalat használtak a HSV-1 és számos RNS vírus esetében is?

81. oldal, Northern blott

Az ábrán azonosított két PRV transzkriptumot Northern blottal. Valamint egy kb 4000 bázis nagyságú alacsony abundanciájú transzkriptet is. Az LRS technikával sikerült-e ezt igazolni?

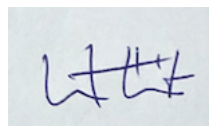
A gliasejtekben vajon miért szaporodik jobban a VSIV, annak ellenére, hogy a Vero sejtben számos citokint kódoló gén deletált?

A VSIV hatására a DEG-eket tekintve glia és Vero sejtekben nagy volt a különbség. Adódhat-e abból, hogy a citokin minusz Vero sejtvonalban nem emelkedett meg a citokin indukálható gének expressziója?

Mi lehet a szerepe a Vakcinia vírus kaotikus régiójának a vírus működésében?

A dolgozat nagyszerű és értékes eredményeket taglal, sikeres védés esetén a Doktori cím odaítélését feltétlenül támogatom.

Szeged, 2025. 01. 05.



Dr. Lakatos Lóránt