

**Silhavy Dániel**

***“A növényi génexpresszió RNS-szintű minőségbiztosítási rendszereinek molekuláris biológiája”***

című Doktori Értekezésének bírálata.

**Bíráló:** Dr. Szabados László, MTA doktora

MTA Szegedi Biológiai Központ, Szeged,

**Formai észrevételek.**

A dolgozat 130 oldalon ismerteti Silhavy Dániel egy évtizedes munkásságát. A leírást három oldalas összefoglaló, egy köszönetnyilvánítás és 176 irodalmi hivatkozást felsoroló irodalomjegyzék egészíti ki. A dolgozat 10 olyan, magasrangú tudományos folyóiratokban (EMBO J., Trends Plant Sci, J. Virology, Plant Mol. Biol., stb.) megjelent publikáción alapul, amelyekben Silhavy Dániel első vagy levelező szerzőként szerepel.

A dolgozat többnyire az említett közleményekben megjelent eredményeket foglalja össze, de nem publikált adatokat is tartalmaz. Talán szerencsés lett volna, ha a szerző egyértelműbben jelöli melyik adat, eredmény, melyik publikációban volt eredetileg leközölve.

Az adatokat bemutató, általában komplikált, összetett ábrák informatívak, pontosan illusztrálják a szövegben leírt eredményeket. A szerző a bevezetésben több, más közleményben publikált ábra segítségével ismerteti a gén csendesítés témakörét, ezeket az ábrákat külön “rajz” megjelöléssel sorszámozva. Szerintem a két illusztráció közötti különbség tétel nem igazán indokolt, nyugodtan lehetett volna egy folyamatos sorszámozást alkalmazni.

A kézirat szövege könnyen érthető, stílusa tiszta, logikus. Néhány hibát, elírást találtam, ezeket a bírálat végén felsorolom. A hibák nem befolyásolják az érthetőséget.

A téziseket olvasva helyenként szembesülni kellett a szakkifejezések adaptálásának magyarra történő lefordításának problémájával. Ez természetesen nem csak a jelen dolgozat problémája, hisz ma minden, nem angol nyelvű tudományos közleményben előfordulnak angoltól származó kifejezések. Feltűnt, hogy a szerző több helyen olyan angol kifejezést, illetve az angol szavak számomra kicsit furcsa “magyarosított” formáit használja, amelyekre léteznek a szakirodalomban is általánosan használt, elfogadott magyar szavak. Ilyen például a több helyen is alkalmazott “interaktál” kifejezés, ami helyett nyugodtan lehet használni a “kölcsonhat” szót. Hasonlóan a “silencing” helyett a csendesítés vagy géncsendesítés, a “marking” helyett a jelölés, a “facilitálás” helyett pedig a segítség, elősegítés használható. Nem érdemes minden idegen eredetű szót magyarítani, de az elfogadott, egyértelmű magyar kifejezések alkalmazása indokolt lenne, és javítana a dolgozat stílusán.

Más kérdés, hogy egyáltalán érdemes-e ragaszkodni ahhoz, hogy a doktori értekezések magyarul készüljenek, mikor a szakterület tudományos nyelve angol. Egy angolul megírt, az interneten közzétett értekezés hozzáférhető, érthető lenne a nemzetközi tudományos közösség számára is. Angolul valószínűleg sokkal szélesebb körben olvasnák és idéznék a magas színvonalú, komoly erőfeszítéssel létrehozott doktori műveket, tudományos hatásuk tehát jóval nagyobb lenne.

Ennek a problémának az eldöntése nem az én feladatom, de talán érdemes lenne a z MTA doktori bizottságának egyszer végiggondolni ezeket a szempontokat.

### **Tartalmi szempontok.**

Az értekezésben bemutatott eredmények olyan eredeti kutatásokból származnak, amelyeket a jelölt önállóan illetve egy kutató csoportban munkatársainak közreműködésével valósított meg.

A dolgozat tulajdonképpen két, egymáshoz lazán kapcsolódó témakört ölel fel, amelyek a növényi RNS szintű géncsendesítés két formáját írja le. Mindkét területen a jelölt kutatásai fontos új eredményeket hoztak, hozzájárultak a géncsendesítés két fontos mechanizmusának megértéséhez.

Az RNS interferencia rendszert a növényi vírusokkal szembeni védekezés szempontjából jellemzi. Bemutatja, hogyan képesek az RNS vírusok a növény géncsendesítésen alapuló védekezési rendszerét kijátszani, milyen faktorokkal tudják a vírusok a növényi RNS interferenciát gátolni, hogy szaporodásukat biztosíthassák.

A második témakör az eukariótákban általánosan előforduló Nonsense-mediated RNA decay (NMD) rendszerrel foglalkozik. Az NMD a poszt transzkripcionális szabályozás részeként az RNS degradáció szabályozása révén korlátozza a hibás géntermékek szintézisét. A növényi NMD rendszer jellemzésével a szerző az eukarióta gének szabályozásának eddig kevésbé ismert aspektusait is összehasonlítja.

A kutatások eredményeit gyakran hasonlítja össze a más élőlényekben (gomba, állati sejtek) megismert géncsendesítési mechanizmusokkal. Ezáltal a kutatások eredményei általánosabb, szélesebb körű jelentőséget kapnak. Egyértelművé válik, hogy a tanulmányozott géncsendesítési mechanizmusok nem csak a növényekben fontosak, de az eukarióta génműködés szabályozásának elengedhetetlen részét jelentik. Egy modell segítségével az eukarióta gén szabályozásban résztvevő NMD rendszer evolúcióját is felvázolja. A modell segítségével jobban megérthetjük a tanulmányozott géncsendesítési, szabályozási mechanizmusok kialakulását, annak jelentőségét a törzsfejlődés során.

Összegezve, a dolgozat egy magas színvonalú kutatási programot mutat be. A nemzetközileg is figyelemre méltó eredmények egy kompetitív, gyorsan fejlődő tudományág fejlődéséhez járulnak hozzá. A dolgozat megállapításai logikusak, sok tekintetben általános érvényűek.

### **Kérdések, megjegyzések.**

1. A silencing szupresszor fehérjék szelektivitása.

A szerző meggyőzően bemutatta, hogy a CymRSV vírus P19 fehérjéje és a PoLV vírus P14 fehérjéje dsRNS kötő silencing szupresszorok. A két fehérje között fontos különbség, hogy míg a P19 egy ds siRNS kötő fehérje, amely nem köti a hosszabb dsRNS molekulákat, a P14 fehérje különböző méretű dsRNS –k kötésére képes. Van-e szekvencia specifitása a szupresszor fehérjék dsRNS kötésének?

A különböző hosszúságú ds siRNS fajtákkal végrehajtott EMSA kísérletek igazolták a szupresszorok specificitásának különbségeit (pl. 11. Ábra). Ezekben a kísérletekben a ds siRNS szekvenciák megegyeztek (a mérethatárig) vagy különbözőek voltak?

Amennyiben a szupresszálás csak a dsRNS mérettől függ, akkor a szupresszorok hatása nagyon széles körű kell hogy legyen. Arabidopsis-ban több ezer olyan génpárt azonosítottak, amelyek az átfedő reverz komplementer struktúra révén siRNS-t hozhatnak létre. Egy p19 típusú szupresszor ezt a nat-siRNS szabályozási rendszert alapvetően befolyásolhatja. Van-e arra adat, bizonyíték, hogy a p19 faktor befolyásolja a nat-siRNS rendszert? Van-e a növényekben a vizsgált szupresszorokhoz hasonló regulátor gén/fehérje? Van-e és mi a P19 (esetleg más hasonló szupresszorok) hatása a gazdanövény génexpressziós mintázatára, ezáltal fejlődésére, életműködésére?

## 2. A szupresszor mutációk hatása.

A Tombus és az Aureus vírusokban a szupresszort kódoló ORF5 és a MV fehérjét kódoló ORF4 ugyanazon lókuszt reverz komplementer szálain található. A vizsgált Cym19stop illetve PoLVd14 mutációk természetesen a komplementer ORF4-en kódolt MV fehérjéket is befolyásolhatják. Van-e adat arra, hogy a mutáns MV fehérjék működése megváltozott-e. Ki lehet-e zárni, hogy a mutáns MV-k is befolyásolhatták a megfigyelt fenotípusos változásokat?

## 3. A silencing szupresszió hőmérséklet függése.

A 12D ábra fotóin a CymRSV vírussal fertőzött növények 24°C hőmérsékleten erősebb nekrotizist mutatnak mint 21°C-on vagy 15°C-on, míg 27°C-on nem látható nekrotizis. Ugyanakkor a siRNA felhalmozódás magasabb, a silencing erősebb a magasabb hőmérsékleteken. A hőmérséklettől függő géncsendesítés miatt a nekrotizis mértékének fokozatosan csökkennie kellene a magasabb hőmérsékleteken. Mi az oka annak, hogy a 12D fotókon bemutatott fenotípusos változások nem teljesen igazolják ezt a modellt?

#### 4. A NMD rendszer szabályozása.

A dolgozat bemutatja, hogy a NMD rendszer egyes elemei (SMG7, eRF1) negatív visszacsatolásos, feed-back NMD szabályozás alatt állnak. Maga a NMD rendszer egy folyamatosan működő, konstitutív szabályozó rendszernek tekinthető, vagy meghatározott stimulusok (pl. hormon, környezet) esetleg a fejlődés, differenciáció befolyásolják-e a rendszer működését? Az NMD szabályozás alatt álló gének működését folyamatosan ellenőrzi az NDM rendszer, vagy ez fejlődéstől, stimulusoktól függően változik?

#### 5. A NMD rendszer molekuláris funkciója.

A dolgozatban a szerző utalt rá, hogy a NMD rendszer számos gén transcriptumának szintjét, így a gének működését ellenőrzi. A növényi gének milyen hányada, hány %-a áll(hat) NMD szabályozás alatt? Az NMD-re utaló 3'UTR struktúra előfordulása véletlenszerű, vagy vannak bizonyos (gén) kategóriák, amelyekre inkább jellemző a NMD kontroll mint másokra?

#### 6. A NMD rendszer biológiai funkciója.

Egyes gének biológiai funkciójának megértéséhez a mutánsok analízise az egyik leggyakrabban alkalmazott stratégia. Ha ismert, milyen az NMD működésében, szabályozásában résztvevő gének mutációinak fenotípusa? Van-e különbség az egyes mutánsok fenotípusa között, vagy az egyes gének mutációja hasonló fenotípushoz vezet?

#### **A dolgozat értékelése.**

A dolgozat nemzetközi színvonalú eredményeket ismertet. Javasolom az értekezés elfogadását és a nyilvános vitára bocsájtását. Az értekezés alapján alkalmasnak tartom a jelöltet az MTA Doktora cím elnyerésére.

## Hibák, elírások (a teljesség igénye nélkül)

5. oldal 5.sor: “Mennyisége kontroll alatt...”

Helyesbítve: Mennyiségi kontroll alatt...

5. oldal 8.sor: “...kontroll mehcanizmusokat értjük.”

Helyette: kontroll mechanizmusokat értjük...

9. oldal 3.sor: “a PABP-deadeniláz kötődést is facilitálja.”

Helyesbítve: a PABP-deadeniláz kötődést is elősegíti.

16. oldal 9.sor: “... a gátlás mlekuláris alapjairól...”

Helyesbítve: a gátlás molekuláris alapjairól

17. oldal 3.sor: “Ere utal, hogy...”

Helyesbítve: Erre utal, hogy

21. oldal 6.sor: “... az eRF3 inetraktál a terminációt stimuláló PABP-vel, ...”

Helyesbítve: ... az eRF3 kölcsönhat a terminációt stimuláló PABP-vel,...

22. oldal 10.sor: “...majd az rekrutálná a UPF3-at.”

Helyesbítve: ...majd az kapcsolja a UPF3-at.

24. oldal 4.sor: “...azaz itt a marking gyors, ...”

Helyesbítve: ... azaz itt a jelölés gyors, vagy ... azaz itt a jelzés gyors,...

24. oldal 11.sor: “...a CBP80 facilitálná a SURF komplex kötődését...”

helyesbítve: ...a CBP80 segíti a SURF komplex kötődését...

26. oldal 1.sor: “Az SMG7 P-bodiekban...”

Helyesbítve: Az SMG7 P-testekben...

28. oldal 24.sor: “...folyékony, szelektív táptalajon neveltük...”

Helyesbítve: ... folyékony, szelektív tápoldatban neveltük...

32. oldal utolsó sor: “...növényeket ko-inifltráltunk GFP-vel...”

Helyesbítve: ...növényeket ko-infiltráltunk GFP-vel...”

41. oldal 1.sor: “...fehérjék is képesek szupresszálni a silencinget.”

Helyette: “...fehérjék is képesek gátolni a géncsendesítést.

44. oldal 3.sor: "...hogyan evolválódhatott egy ilyen..."  
helyesbítve: "...hogyan fejlődhetett ki egy ilyen..."
83. oldal, 23.sor: "... infiltrált levelek zöld fluoreszcencia is nagyon gyenge volt..."  
Helyette: ... infiltrált levelek zöld fluoreszcenciája is nagyon gyenge volt...
84. oldal 15.sor: "... a PHAs konstrukció..."  
Helyesbítve: "... a PHAs konstrukció..."
97. oldal 34.sor: "... hogy a UF3 résztvesz-e..."  
helyette: ... hogy az UPF3 résztvesz-e..."
108. oldal 12.sor: "... a két fehérje nem direkt interaktál. "  
Helyesbítve: ...a két fehérje nem lép közvetlenül kölcsönhatásba.  
Vagy: ...a két fehérje nincs közvetlen kölcsönhatásban egymással.
120. oldal 6. Sor: "...ha ez interaktál a terminálódó riboszóma..."  
Helyette: "...ha ez kölcsönhat a terminálódó riboszóma..."  
vagy: "...ha ez kölcsönhat a lefutott riboszóma..."

Szeged, 2012.01.10.



Dr. Szabados László