

Papp István:

A génkifejeződés, szárazságtűrés és vízvesztés egyes mechanizmusai és összefüggései modell és haszonnövényekben.

Akadémiai Doktori Értekezés bírálata.

Általános megjegyzések

Papp István a MTA doktori értekezésében 20 év kutatásainak eredményeit foglalja össze. A doktori értekezés tematikailag több részre osztható, ami tükrözi a szerző széleskörű érdeklődését, illetve a munkásságának egyes állomásait. Ennek megfelelően az értekezés eléggé heterogén, több kutatási területet ismertet, ezek sokszor csak közvetve kapcsolódnak egymáshoz.

Az értekezés jó stílusban íródott, hibát, elírást keveset találtam benne. Néhány stilisztikai, formai megjegyzés a bírálat végén található. Az értekezés 83 oldalt tesz ki, amit 23 oldalas hivatkozási lista egészít ki. Az egy oldalas Bevezetés után az Irodalmi áttekintés 18 oldalon írja le a kutatások háttérét, amit 8 ábra egészít ki. A Kutatások célkitűzései (1 ábra) után az Anyagok és Módszerek 8 oldalon keresztül ismerteti a legfontosabb felhasznált módszereket. Az Eredmények és megvitatásuk a dolgozat leghosszabb fejezete (52 oldal) ami részletesen, 42 ábra segítségével ismerteti a jelölt legfontosabb kutatásait, eredményeit. Ezek után az Új tudományos eredményeket 10 pontban foglalja össze (2 oldal), majd a Köszönetnyilvánítással zárja a dolgozatot (1 oldal). Az értekezés alapjául szolgáló közlemények listája 17 tudományos publikációt sorol fel, amelyek közül több neves tudományos folyóiratban jelent meg (pl. Plant J., Plant Physiology, Plant Mol. Biol.), illetve egy szabadalmi bejelentést tartalmaz.

A dolgozatot olvasva és a hivatkozásokat átnézve megállapítható, hogy a jelölt legeredményesebb kutatói korszaka az 1990-es évek második és a 2000-es évek első felére esik, amikor a legfontosabb, legtöbbet idézett publikációk láttak napvilágot. Számomra a transzkripciós géncsendesítés illetve az ABA jelátvitel és a mRNS metabolizmus, a “Cap Binding Complex” kapcsolatának kutatása volt a jelölt munkásságának legizgalmasabb része.

Az értekezés részletes bírálata

A transzkripciós géncsendesítés (TGS) vizsgálatába a szerző az ausztriai Matzke laborban kapcsolódott be, ami a TGS tanulmányozásának viszonylag korai szakaszát jelentette. A 1990-es években a jelenség molekuláris háttere még nem volt ismert, a géncsendesítés felfedezése, a promoter metiláció legfontosabb tulajdonságainak, következményeinek leírása erre az időszakra esik. A jelölt így egy izgalmas időszakban járult hozzá a géncsendesítés kutatásához, több fontos felfedezésben vett részt, ami több, jeles folyóiratban megjelent, magasan idézett publikációt eredményezett. Az Eredmények és megvitatásuk fejezet első részében ezen kutatási korszak legfontosabb eredményeinek összefoglaló leírását olvashatjuk. Az epigenetikai szabályozás ma is egy nagyon divatos, gyorsan fejlődő tudomány terület. Ezért, az eredmények értékelésénél talán hasznos lett volna, ha a korai eredményeket a mostani tudásnak, az újabb információk szerint, a mai modelleknek a tükrében is értelmezi, magyarázza. Erre van némi szándék, de egy korszerűbb elemzéssel, esetleg újabb modell(ek) kidolgozásával jobban aktualizálni lehetett volna a korábbi eredményeket, felfedezéseket.

- *Melyek azok a területek, ahol a géncsendesítés mechanizmusának, szabályozásának korábbi és mostani modellje eltér illetve egyezik. Vannak-e olyan területek, ahol az újabb ismeretek fényében alapvetően újra kellett gondolni az korábbi adatok értelmezését?*

A dolgozat második része az RNS kötő Cap Binding Complex (CBC) és az ABA jelátvitel illetve a szárazságtűrés szabályozásának kapcsolatáról szól. Az Arabidopsis *cbp20* inszerciós mutáns izolálása és jellemzése vezetett ahhoz a felismeréshez, hogy RNS kötő fehérjéknek, benne a CBC alegység CBP20 fehérjének is szerepe lehet az abszcizinsav (ABA) jelátvitel közvetítésében, módosításában. A mutáns fokozott ABA érzékenysége meggátolta a gyors vízvesztést, és ez bizonyos mértékű szárazságtűréshez vezetett. Hasonló fenotípust mutatott az *abh1/cbp80* mutáns, amiben a CBC nagyobb alegységét (CBP80) inaktíválta a mutáció. A CBC complex és az ABA szabályozás illetve szárazság tűrés közötti kapcsolat még ma sem teljesen ismert, többféle módon is magyarázható. A dolgozatban megemlít néhány elképzelést, ilyen például a CBC complex lehetséges ABA kötő szerepe, a foszforiláció/defoszforiláció módosítása, a splicing mechanizmusának szabályozása, a miRNS (vagy siRNS?) képződés befolyásolása révén a géncsendesítés lehetséges szabályozása, illetve a hosszú nem kódoló RNS fajták szintézisének befolyásolása, a kutikula szerkezetének, vastagságának, és ezáltal a párologtatás módosítása.

- *A mai ismereteink alapján hogyan lehet magyarázni a CBC complex (illetve az RNS kötő fehérjék) szerepét az abszcizinsav jelátvitel módosításában, és ezen túl a szárazságtűrés szabályozásában, mi lehet a legvalószínűbb mechanizmus?*
- *A szárazságtűrés mellett a CBC complex befolyásolja-e másféle környezeti stresszhatásokkal (hideg, meleg, só, fény, nehéz fém, stb.) szembeni ellenállóképességet?*

A dolgozatában megemlíti, hogy a *cbp20* mutáns fokozott szárazságtűrése a hozzáférhető vízárt való versengés során kevésbé szembetűnő, a vegyes ültetés esetén a különböző szárazságtűrést mutató növények egyforma ütemben száradnak ki. Ezt a vízárt való kompetícióval magyarázza, ami szerinte azzal járhat, hogy a szántóföldi körülmények között az ilyen mutánsok, fajták nem föltétlen előnyösek. Nem arról van szó, hogy mivel a vegyes ültetéses kísérlet cserépben történt, a rendelkezésre álló, korlátozott földmennyiséget a gyorsabban párologtató növények gyorsabban szárították ki, ezért a víztakarékos mutánsok előnye nem tudott megnyilvánulni? Ebben az esetben viszont elképzelhető, hogy szántóföldön, ahol nem szűk, korlátozott víztartalmú cserépben nevelt növényekről és ezen kívül monokultúráról van szó, egy hasonló stratégiával rendelkező mutáns, fajta felmutathat bizonyos szárazságtűrést, hisz a csökkentett párologtatás, vízfelhasználás segítheti a növények túlélését.

- *Van-e kísérletes adat a vizsgált mutánsok vagy hasonló stratégiával rendelkező növények szántóföldi eredményeiről?*

A jelölt a CBC komplexet más növényfajokban is tanulmányozta. A CBC komplex szerepének felismerése egy szabadalmi bejelentést is eredményezett, ami egy, a szárazságtűrés javítását célzó eljárást írt le. Gén csendesítéssel próbálták a paradicsom CBP20 illetve a burgonya CBP80 génjeinek működését gátolni. Az előállított vonalak szárazságtűrése azonban nem tért el lényegesen a vad típusú növényekétől. Részletes eredményeket, hivatkozásokat azonban a dolgozat nem tartalmaz.

- *Milyen mértékű volt az előállított paradicsom illetve burgonya vonalak CBP20 valamint CBP80 génjeinek csendesítése? Milyen módszerekkel mérték a kapott vonalak szárazságtűrését? Elképzelhető-e, hogy egy alacsony transzkript szint elegendő a CBC aktivitásának fenntartásához, és emiatt nem kaptak az Arabidopsis mutánsokhoz hasonló eredményt?*

- *Más laboratóriumok tudták-e bizonyítani a CBC komplexel kapcsolatos genetikai módosítások hasznosíthatóságát? A modellnövényeken kapott, a CBC-vel kapcsolatos ismeretek alapján milyen stratégiával, módszerrel lehetne a haszon növények szárazságtűrését javítani?*

A jelölt érdeklődése az utóbbi években az alkalmazott kutatások felé fordult, a haszonnövényeken végzett vizsgálatok csak közvetve kapcsolódtak a korábbi, modellnövényeken végzett kutatásokhoz. Megértem ha a munkahely elvárásai vagy a pályázati/finanszírozási rendszer sajátosságai, korlátai miatt egy ígéretes kutatási terület nem folytatható, és a gyakorlathoz közelebb álló feladatok megoldása lesz egy szakember feladata. Az is érthető, ha egy kutató érdeklődése idővel módosul, és időről időre témaváltásokhoz vezet. A tudományos szempontokat figyelembe véve úgy érzem, hogy talán szerencsésebb lett volna ha lehetséges a jelölt korábbi munkásságának folytatása, esetleg a géncsendesítés vagy ABA jelátvitel, RNS metabolizmus területén tud alkalmazott kutatási programokat megvalósítani.

A dolgozat második része két kutatási terület eredményeit foglalja össze, ami az alma kutikula fejlődésének jellemzése illetve a búza szárazságtűrésének vizsgálata, különös tekintettel a kutikula fejlődés szerepére. Ez a viszonylag kevésbé ismert terület mind fejlődés biológiai szempontból, mind a dehidratáció és ezáltal a szárazságtűrés szempontjából is érdekes. Az almán végzett munkát segítette, hogy az alma genom ismertté válásával lehetőség nyílt a kutikula képződéséért, a viasz képződéséért felelős gének bioinformatikai eszközökkel történő azonosítása. Az Arabidopsis modellen kapott információ segítségével több mint tíz olyan alma gént sikerült azonosítani, amelyek valamilyen módon a kutikula fejlődéshez kapcsolhatók. A gének vizsgálata elsősorban szekvencia és expressziós analízisre terjedt ki, ami során igazolták több gén gyümölcs héj specifikus transzkripcióját. A gének funkcionális analízisét az alma specifikus cDNS-ek Arabidopsis-ban való túltermeltetésével kívánják vizsgálni, az eredmények egyelőre nem ismertek.

- *A dolgozat megírása, beadása óta eltelt időszakban születtek-e olyan előzetes eredmények, amelyek alapján valószínűsíthető, hogy az Arabidopsis rendszer alkalmas lesz az alma kutikula gének funkcionális analízisére?*

A dolgozat utolsó fejezete a búza szárazságtűrésének vizsgálatával kapcsolatos. Ez a kutatási program annyiban kapcsolódik az előző munkákhoz, hogy elsősorban a kutikula szerepét vizsgálta. Érdekes megfigyelés, hogy az Arabidopsis-szal ellentétben, a búza

kutikula mátrix vastagsága nem változott a szárítási stressz során, és nem föltétlen függött össze az adott fajta szárazságtűrésével. A szárazságtűrés szempontjából a kutikula vastagsága, szerkezete tehát egy fontos, de nem föltétlen minden növényfajban egyformán meghatározó jelentőségű morfológiai sajátosság. Az ABA érzékenység különbségei a búzában is fontosak a szárazságtűrés szempontjából, ami hasonló más növények, pl. az Arabidopsis vizsgálata során kapott adatokhoz.

- *Az irodalmi adatok, esetleg saját megfigyelések alapján meg lehet-e határozni, el lehet-e különíteni olyan növény rendszertani csoportokat, amelyeknél a kutikula szerepe meghatározó a stressztűrés szempontjából?*

A vizsgálatok során klónozták és jellemezték a búza TaeSHN1 génjét, ami nagyfokú hasonlóságot mutat az Arabidopsis kutikulájának kialakulását szabályozó WIN/SHN transzkripciós faktorokhoz. A gén expressziójának vizsgálatokor kiemelik, hogy csak a virágzatban találtak transzkriptet (81. oldal), ugyanakkor a 44. ábra arról tanúskodik, hogy a 3. levél hüvely által takart régióban is van gén kifejeződés. Ez az ellentmondás némi magyarázatra szorul.

A TaeSHN1 génnek funkcionális analíziséhez Arabidopsis-ba jutattak és expresszáltattak egy teljes hosszúságú cDNS-t. A transzgenikus növények vizsgálatokor az Arabidopsis SHN1 túltermeltetésénél nem tapasztalt morfológiai változásokat (pl. kutikula dezorganizáció) is megfigyeltek, ami a heterológ expressziós rendszer korlátaira, vagy a TaeSHN1 illetve AtSHN1 eltérő funkciójára utal. A TaeSHN1 túltermelő transzgenikus növények vízvesztése nagyobb volt mint a vad típusú Arabidopsis vonalaké, ami pont ellentétes az Arabidopsis saját WIN/SHN1 génjének túltermeltetése során kapott eredményekkel.

- *Az Arabidopsis WIN/SHN1 illetve a búza TaeSHN1 túltermelő vonalakat egy kísérletben hasonlították össze, vagy ezek független irodalmi adatok? Változott-e az Arabidopsis saját WIN/SHN1 génjének transzkript szintje a TaeSHN1 gént túltermelő vonalakban? Elképzelhető-e hogy a tapasztalt fenotípus valamilyen géncsendesítés, interferencia következménye?*
- *A kapott eredmények alapján úgy tűnik, hogy a búza TaeSHN1 génnek funkcióját búzában, vagy legalábbis egyszikű fűfélékben (pl. rizs, brachipodium) célszerű vizsgálni. Van-e ilyen kutatási programjuk esetleg eredményük? A rizs vagy Brachipodium mutáns gyűjteményekben hozzáférhető-e SHN1 mutáns? Ha igen, van-e a mutációhoz kapcsolható funkcionális adat?*

A dolgozat legvégén az eredmények lehetséges hasznosíthatóságáról találhatunk egy másfél oldalas leírást. Ez a rész természetesen kicsit spekulatív, ami a jövőbe mutató terveknél természetes. A felvázolt lehetőségek ugyanakkor az ismertetett eredmények illetve a hozzáférhető irodalmi adatok alapján reálisak. A jelölt felkészültsége, tudományos háttere, tapasztalata lehetővé teszi a tervezett programok megvalósítását.

- *A haszonnövényekben is alkalmazható módszerek közül milyen technológiák azok amelyek célszerűek lehetnek a vizsgált tulajdonságok megváltoztatása céljából? A klasszikus GMO alkalmazása nemesítési célokra politikai okokból jelenleg kizárt. Ugyanakkor több olyan újabb módszer is rendelkezésre áll, ami genetikai transzformáció nélkül is alkalmazható alkalmazott kutatások céljaira (TILLING, Eco TILLING, Genom editing, etc.). Véleménye szerint milyen stratégia, technológia alkalmazása lenne célszerű illetve reális a vizsgált, gazdasági szempontból is jelentős tulajdonságok javítása érdekében?*

További megjegyzések, kérdések.

A dolgozatban több helyen hivatkozik nem közölt vagy publikált adatokra, anélkül hogy bemutatná azokat (pl. 52., 58., 73., 81. oldalakon). Egy ilyen, összefoglaló jellegű dolgozatnál nem értem miért van szükség a nem publikált adatokra való hivatkozásra. Ha azok fontosak, a dolgozatban lehetőség van az ismertetésükre. Nem lényeges adatok, az érthetőséget alapvetően nem befolyásoló eredmények viszont nyugodtan kihagyhatók.

Több helyen talákoztam az “anellálás” kifejezéssel, ami az angol “annealing” furcsa magyarítása. Szerintem nyugodtan lehetett volna használni a már elfogadott “hibridizálás” kifejezést.

A 20. oldalon az Arabidopsis *LACERATA* gén által kódolt CYP86A8 enzim aktivitásáról ír (zsírsav hidroxiláció), és illusztrációként a 6. Ábrára hivatkozik. A 21. oldalon lévő 6. ábra a *lacerata* mutáns fenotípusát mutatja be, viszont az említett zsírsav oxidáció illusztrációja hiányzik.

A 47. oldalon a P19 fehérje citoplazmatikus illetve sejtmagi változatának hatását hasonlítja össze. A P19N (sejtmagi változat) mind a siRNS-ek, mind a MIR159 mennyiségét csökkentette, míg a P19C (citoplazmatikus változat) esetében a kontrollnál magasabb siRNS és miRNS szint látható. Mi lehet ennek a jelenségnek az oka? A szövegben csak a sejtmagi változat negatív hatásáról van szó.

Az 51. oldalon bemutatott 20. ábra szerint a DCL1 fehérje a sejtmagban lokalizálódik. Van-e arra nézve adat, hogy a többi DCL fehérje (DCL2-4) a sejten belül hol található?

A 62. oldalon a CBC komplexnek a kis RNS fajtákra (siRNS, miRNS) való hatását illetve az ABA szabályozás kapcsolatát ismerteti. A *cbp20* illetve *cbp80* mutánsokban kimutatott változások csak az ABA szabályozással kapcsolatba hozható miRNS és siRNS típusokra igazolhatóak, vagy ezen mutációk hatása nem szelektív, a CBC complex más kis RNS-ek szintjét is befolyásolja. A szövegben ezzel kapcsolatban van egy utalás a Table S1-re, ezt viszont nem találtam.

A 74-75. oldalon található 38-39. ábrákon feltüntetett génekről hiányzik egy-egy rövid összefoglaló. A jobb érthetőség kedvéért egy-két mondatban le kellett volna írni, hogy mi a tesztelt gének funkciója, milyen fehérjét kódolnak, és miért érdekesek a kutikula fejlődés szempontjából.

A 44. ábrán mi a “b” és a “m” jelölés?

A 84. oldalon található 47. ábra a viaszkristályok megjelenését mutatja be a TaSHN1 túltermelő növényeken. Mi a bizonyíték, hogy a megfigyelt struktúrák valóban viasz kristályok? Vannak erre vonatkozó biokémiai, analitikai adatok?

Összefoglalás, vélemény

Papp István doktori értekezésében tömören, magas színvonalon foglalja össze a két évtizedes, több területet felölelő kutatói munkásságát. A mű színvonala, valamint az értekezés alapjául szolgáló publikációk alapján javaslom a nyilvános vita kítűzését, valamint az MTA Doktora cím elnyerését.

Szeged, 2015.05.30.



Dr. Szabados László

Tudományos tanácsadó

MTA-Szegedi Biológiai Kutatóközpont