

Bírálat Bajusz Izabella „Az Enhancer of Zeste fehérje szerepe az epigenetikus represszió létrehozásában *Drosophila melanogaster*ben” című doktori (Ph.D.) értekezéséről

Bajusz Izabella disszertációs témája a molekuláris genetikának egyik központi, mindmáig megoldatlan kérdését feszegeti: hogyan stabilizálódik az egyes szövetek sejtjeiben a terminális szöveti differenciálódás során kialakult génexpressziós mintázat? Ez az epigenetikai mechanizmus egy életre „konzerválja” a megfelelő gén-promóterek „nyitott” vagy „zárt” állapotát; ettől függ a génexpresszió indukálhatósága és ezen alapszik a magasabbrendűek testének szerveződése és működőképessége. A genom-programok sikere ezt a kérdéskört mintegy új dimenzióba helyezte, és fontosságát csak tovább hangsúlyozta az a felismerés, hogy a gátlás és aktiválás „félrecsúszásának” szerepe van a rákos transzformáció kialakulásában is. Jelölt az epigenetikai represszió problémáját a *Drosophila Bithorax*-komplexének (*BX-C*) példáján tanulmányozta.

A dolgozat a hagyományos Bevezetés, Irodalmi áttekintés, Eredmények, Diskusszió szerkezetet követi, az egyes részek logikusan kapcsolódnak egymáshoz és terjedelmük egymáshoz viszonyítva arányos. Meg kell viszont jegyezni, hogy a dolgozat szokatlanul terjedelmes, az Irodalomjegyzék nélkül is 177 oldal.

A mintegy 320 idézett irodalom megfelelően kapcsolódik a tárgyhoz, tükrözi a szakterület legújabb eredményeit is, és bizonyítja a Jelölt magas szintű szakmai felkészültségét. Ezt tükrözi a dolgozat logikai menete, az egyes kérdések felvetése és kísérleti megközelítése is. A munka a magasfokú genetikai analízis szép példáját adja, a klasszikus genetikai megközelítés és molekuláris módszerek kombinálásával ér el új eredményeket ezen a kompetitív szakterületen.

A dolgozat a következő, tudományos szempontból új és értékes eredményeket tartalmazza:

- 1.) Egy új típusú funkcionyerő mutánst izoláltak az *Enhancer of Zeste*, *E(z)* génben, amely a *BX-C* ektopikus represszióját okozza. Ennek oka a SET domain-ben történt 741. Arg Lys csere.
- 2.) Genetikai és molekuláris módszerekkel bizonyították, hogy az *E(z)* fehérjék multimereket képeznek, egymáshoz, valamint a TRX csoport fehérjeihez a SAC-SET domain-jükön keresztül kötődnek.
- 3.) Kimutatták, hogy a hisztonok kovalens módosításai (acetiláció, foszforiláció, metiláció) és az ezeket okozó gének megváltoztatják az *E(z)^{TRM}* mutáns fenotípusát, és a módosítások befolyásolják a H3 hiszton N-terminális peptidjének *in vitro* kötődését az *E(z)* fehérjéhez.
- 4.) A vad-típusú *E(z)* és *E(z)^{TRM}* mutáns fehérjéknek hiszton-metil-transzferáz aktivitása van, amely a H3 9.Lys aminosav-maradékán mérhető. A H3 10.Ser foszforilálása viszont gátolja a 9.Lys metilálását.
- 5.) Eredményeik alapján feltételezik, hogy a H3 hiszton 10.Ser foszforiláltsága az a molekuláris jelzés, ami meggátolja az *E(z)*-függő epigenetikus repressziót.

Az eddigi eredményeket egy közleményben adták közre, amely rangos nemzetközi folyóiratban jelent meg, és amelyben Jelölt az első szerző. További három közlemény van előkészületben.

Az eredményekkel kapcsolatos kérdéseim a következők:

- a.) A fenti kísérletek egyértelműen bizonyítják, hogy a hisztonok foszforilálása, acetilálása és metilálása befolyásolhatja az *E(z)* fehérje működését és az *E(z)^{TRM}* mutáns fenotípusát. Kérdésem az, hogy mit tudunk magának az *E(z)* fehérjének a lehetséges módosításáról, és hogyan befolyásolná ez az *E(z)* működését?

- b.) Az $E(z)$ fehérje nem kötődik a DNS-hez, hatását minden valószínűség szerint más fehérjékhez kapcsolódva fejt ki. Ugyanakkor az $E(z)^{TRM}$ „Tritorax-mimic” hatását a 741. pozícióban bekövetkezett Arg Lys csere okozza, ami a SET domain a Trx SET-hez teszi hasonlónvá. Kérdés, hogy az $E(z)^{TRM}$ fehérjeterméke kötődhet-e Trx -kötő fehérjékhez, és magyarázható-e ezzel a mutáns fenotípus?

Kritikai észrevételeim elsősorban formai jellegűek:

A disszertáció szövege nyelvileg helyes és általában világos fogalmazású. Mindazonáltal az egészre jellemző a terjengősség, amin szárazabb, de rövidebb fogalmazással és egyes részek elhagyásával lehetett volna segíteni. A Függelék c. fejezetből pl. a homeotikus génkomplexek működésének leírása párhuzamos az Irodalmi áttekintés megfelelő részével, és rövidített formában ide lehetett volna beépíteni. Ugyanez vonatkozik a *Drosophila* morfológiája c. részre is. A Függelék egyéb részeit el lehetett volna hagyni.

A disszertáció kiállítása formai szempontból szép, az ábrák általában szemléletesek, a fényképfelvételek jó minőségűek, a táblázatok rendezettek. Az ördög természetesen itt is a részletekben van, aholis számos hibát találtam.

Az ábrák között több olyan van, amelyet más szerzőktől vagy könyvből vett át, és nagyon helyesen megjelöli a forrásmunkát is. Viszont több ilyen hivatkozás nincs benne az irodalomjegyzékben. Kimaradt a többször is hivatkozott Wolpert: „Principles of Development” c. könyv, és nem található a „Barges nyomán” (2.2. ábra), „Allis 2000 nyomán” (2.10. ábra), „Francis és Kingston 2001” (2.11., 2.12. ábrák) hivatkozásai sem. Miután a disszertáció nyelve magyar, kifogásolható, hogy az átvett ábrákon általában angol nyelvűek a feliratok.

Általános igény, hogy az ábrák önmagukban is érthetőek legyenek. A biokémiai kísérleteket szemléltető ábrákon egyes részletek nincsenek kellően definiálva, ezért nehezen követhetők. A 4.21. ábra gélfotóján nincs kijelölve, hogy az egyes futási csíkok milyen fehérjéket tartalmaznak. A 4.22. ábra két paneljét jó lett volna A. és B-nek jelölni, és megadni, hogy a jobb oldalon a baloldali gél autoradiogramja látható. Több magyarázatot igényelne a 4.19., 4.20. és 4.26. ábra is. Csak találgatni tudom, hogy a 4.23. és 4.24. ábrák grafikonjainak függőleges tengelyén lévő számok valószínűleg szcintillációs beütéseket jelentenek, de lehet, hogy tévedek. Mi a különbség a 4.24. ábrán jelzett „H3 full” és „wt H3” hisztonok között?

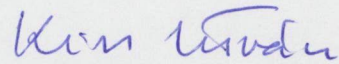
A táblázatok általában jól érthetőek, uniformizált szerkesztésüknel fogva még a bonyolultabbak is könnyen áttekinthetőek. A 4.2. táblázat azonban több ponton hiányos: nincs megadva a lábjegyzetben, hogy a felső indexben alkalmazott rombusz ill. kettős kereszt jelek mit jelentenek? A lábjegyzetben megmagyarázott, penetranciára vonatkozó „a” jelzést viszont nem találtam meg a táblázatban. Nem került be a táblázatba a 72. oldalon említett „duplikáció és plussz egy transzgén kópia” sem. A 4.9. táblázat 13. sorának A5 A4 oszlopában szereplő „83%+” esetében a „+” elírás, vagy nincs megmagyarázva a jelentése. A 4.10. ábrán szereplő HindIII-XbaI fragmentum hossza 3520-163=3357 bp, a 90. oldalon megadott 3337 bp helyett. A táblázatok lábjegyzetének „klónozása” során igencsak elszaporodott a hibásan írt „ellentés nemű” kifejezés.

Értelemzavaró hibák a szövegben is előfordulnak. A gének nevei a fejezetcímekben is kicsi dőlt betűvel írandók (pl. 2.4. fejj. címében az „*ENHANCER OF ZESTE*” helyesen *Enhancer of zeste*). A 142. old. 2. bekezdésében említett $E(z)^{TrmTG}$ mutáns allél nincs megmagyarázva. A 133. old. utolsó bekezdésében az $E(z)^{Trm}$ fenotípusát nyilvánvalóan nem a *Polycomb*-csoport génjei, hanem azok mutánsai szuppressálják.

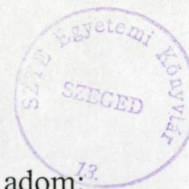
A dolgozat angol nyelvű összefoglalója mind szakmai, mind nyelvi szempontból mintaszerűen kifogástalan.

Véleményem szerint Bajusz Izabella disszertációja egy érdekes területen végzett fajsúlyos munka összefoglalója, amelynek lényegi értékeit a felsorolt formális hibák nem érintik. Javasolom a dolgozat nyilvános vitára bocsájtását és a Ph.D. fokozat odaítélését.

Szeged, 2003. november 17.



Dr.Kiss István
opponens



Bajusz Izabella Ph.D. dolgozatának bírálata:

A bírálatot a SzTE által javasolt szempontrendszer szerinti pontokba szedve adom.

1., A dolgozat témája a kromatin szerkezete-működése, az aktivációt és inaktivációt fenntartó gének vizsgálata, valamint a hiszton kód megfejtése napjainkban erősen kutatott és kompetitív területnek számít. Alapvető szakmai kifogásom az elvégzett kísérleteket és a levont következtetéseket illetően nem merült fel.. Kitűnő szakmai munka.

2., A dolgozat 200 oldalas. Aránytalanul túlméretezett, még akkor is, ha figyelembe vesszük azt, hogy legalább két Ph.D. dolgozat anyaga van beleírva. Klasszikus tagolódással íródott, de tartalmilag nem teljesen sikerült ezt a tagolást megvalósítani. A következő fő hibái vannak:

- Az irodalmi áttekintés terjengős, a megértés szempontjából nem közvetlenül szükséges irodalmi adatokat is ismertet.
- Az eredmények és értékelésük fejezet alfejezetei nem következnek egymásból. Hiányzik egy vezérfonal, ami vezetné az olvasót.
- Az eredmények és értékelésük című fejezetben az értékelések legtöbbször hiányoznak, pedig ez nagymértékben javította volna a követhetőséget.
- Az eredmények megvitatása című fejezetből jórészt szintén hiányzik a megvitatás, nagyjából eredmények ismételése és irodalmi adatok ismételése.
- Az első verzió után megmaradt függelék is fölöslegesnek tartom, a musica életciklusa szerintem nem tartozik szorosan a témához.
- Az alfejezetek számozását továbbra is fölöslegesnek tartom, (pl.3.3.7.1 alfejezet) senkit nem segít az eligazodásban.

3., A bőségesen idézett és tárgyalt irodalmi adat nem hagy kétséget afelől, hogy Izabella otthonosan mozog a téma szakirodalmában. Ezek alapján elméleti felkészültségét megfelelőnek találom.

4., Az itt leírt nagymennyiségű munka sokféle technika felhasználásával járt. Ennek nagyobbik részét a magas szintű genetikai eszköztár teszi ki, de Izabella a molekuláris munkákat is elsajátította. Ezek közül a fehérje tisztítási és kötési kísérletek kaptak legnagyobb súlyt.

5., A dolgozat tudományos értékét a Genetics publikáció elfogadásával a nemzetközi szakvélemény már megfelelőnek értékelte. A munka legfőbb erénye az, hogy az *Enhancer of zeste* gén egy szokatlan domináns allélját genetikai eszközökkel olyan szinten sikerült jellemezni, amelyből a hiszton kód működtetésében játszott molekuláris szerepére lehetett következtetni. Az ezt követő molekuláris analízis a genetikai adatokat igazolta, és újabb ismeretekkel egészítette ki. A munka tehát szakmailag kerek egész.

6., A munka alapját egy megjelent Genetics közlemény szolgáltatja, de a dolgozatban leírt eredmények legalább még egy közlemény alapjául szolgálhatnak. Izabellának ezen kívül megjelent egy cikke a British Journal of Pharmacology-ban. Ezzel az SzTE követelményeinek megfelel.

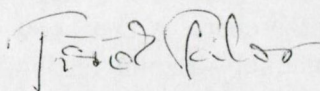
7., Első kérdés: Az *E(z)* és az *ASH1* valamint *TRX* SET-domének között kimutatott interakcióról annyit olvashatunk, hogy „felvetődik a SET domén kompetíció

lehetősége". Fejtse ki azt bővebben, hogyan képzei ezen interakciók *in vivo* működését.

Második kérdés: A mutáns $E(z)^{TRM}$ fehérje a felhasznált molekuláris tesztekben jószerével nem különbözött a vad fehérjétől. Az eredmények megvitatása fejezetben nem találtam olyan modell leírást, amely megpróbálta volna megmagyarázni a mutáns fehérje molekuláris hatásmechanizmusát. Hogyan képzei az $E(z)^{Trm}$ mutáns allél pontos molekuláris működését?

- 8., A disszertáció nyelvezete nehézkes. Legnagyobb hibája a szabatos, ugyanakkor tömör megfogalmazás hiánya. Gyakori a feleslegesen hosszú és bonyolult mondat, az ugyanazon gondolat ismétlése más megfogalmazásban. Még mindig sok magyartalanság akad a dolgozatban. Nem sikerült teljesen kiirtani az olyan tudománytalan megfogalmazásokat sem mint „elképzélést vettünk fontolóra” vagy „a feltételezést továbbgondolva” stb. A legnagyobb gond az, hogy maga a téma igen bonyolult, amit csak a leggondosabb megfogalmazással lehetett volna a kívülálló számára érthetővé tenni. Az ábraanyag megfelelő.
- 9., Ha az olvasó a szakmában valamelyest jártas, és kellő energiát szentel az olvasásnak, akkor kirajzolódik előtte az, hogy Izabella hatalmas munkával igen értékes eredményeket ért el. Figyelembe véve azt, hogy a dolgozat nagy méretét főként az okozza, hogy szerzője a teljesség szándékával írta, valamint azt, hogy az érthetősége az idők során számottevően javult, az értekezés mind tartalmát, mind kivitelét tekintve mindenképpen alkalmas a nyilvános vitára.
- 10., Az angol nyelvű összefoglaló a dolgozat legjobban megírt része, mindamellett nem örültem annak, hogy korábbi stilisztikai és helyenként nyelvtani javításaim teljesen figyelmen kívül maradtak a végső változatban.

Szeged, 2003. 11. 18.



Török Tibor
bíráló