

Válaszok Prof. Boros Imre Miklós kritikai észrevételeire

Tisztelt Professzor Úr, szeretném megköszönni dolgozatom átolvasását, igényes értékelését, valamint a dolgozatra adott kritikai észrevételeit és kérdéseit, amelyeket az alábbi pontokban válaszolok meg:

Kritikai észrevételek:

1, „... egyes esetekben az ábra szerkesztés nem olvasó barát, ...”

Válasz: Ezt a jogos kritikát a másik két bíráló is felvette. Valóban, számos esetben a hosszas ábramagyarázatok helyett érdekesebb lett volna az ábrába illeszteni a képhez tartozó jelmagyarázatokat. Ilyen esetek pl. az említett 74. és 88. ábrák, amelyeken a géltardációs képek sorait magyarázó részek – nehézkesen – az ábra aláírásokba kerültek.

2, „Számomra szokatlan a paradigma szó használata.”

Válasz: Ahogy azt a bíráló jogosan felveti, „a kísérletes paradigma” helyett helyesebb lett volna a „kísérletes modell” kifejezés használata. A paradigma jelentése: egy tudományterület általánosan elfogadott nézetei egy adott korszakban (a gondolkodásoknak, vélekedéseknek, értékeknek és módszereknek egy adott tudományos közösség tagjai által elfogadott összegzése). Ebben az értelemben a vulvaszövet kifejlődése egy kiváló kísérletes modell, amelyben jól vizsgálható a jelátviteli rendszerek kapcsoltságára (koordinált működésére) vonatkozó paradigma.

3, „... talán hasznosabb lett volna egy rövid elmélkedést az élettartam és öregedés mint biológiai jelenségek genetikai meghatározottságának és szabályozásának kérdéséről:...”

Válasz: A jelátviteli rendszerek sokféle biológiai folyamatot szabályoznak. Ennek megfelelően dolgozatomban sokféle folyamattal és jelenséggel foglalkoztam. Az érthetőség megtartása céljából e folyamatok és jelenségek irodalmi háttérét valóban a minimális mértékben említettem, csupán a két fő kísérletes rendszert (az autofág folyamat és a vulvaszövet fejlődése) mutattam be részletesebben. Így néhány esetben az érthetőség áldozatul esett a célszerűség oltárán. Kétség kívül ezek közé tartozik az öregedési folyamat szabályozására vonatkozó irodalmi összefoglalás hiánya is (ezt részletesen két, a disszertáció anyagát is jelentő összefoglaló közleményben tettem meg: Vellai T. *Cell Death Diff.*16:94-102, 2009; Vellai *et al.*, *Trends Cell Biol.* 19:487-494, 2009). Érdekes lett volna továbbá az öregedési folyamatot befolyásoló közvetlen és közvetett hatásokat megkülönböztetnem, amelyet a bíráló egy elegáns hasonlattal (a gépkocsi élettartama és az „olajsűrő”) világított meg. A jelátviteli üzenetek két állapota (gátlás és aktiválás) is valóban túlzott egyszerűsítés. A kritika helytálló, okulnom kell belőle.

Kérdések:

4, „60. ábra: Az EGL-17::GFP specifikusan a 2° vulva sejtekben expresszálódik – akkor miért zöldek a ventrális idegdúc neuronjai?”

Válasz: A kérdés feltehetően egy pontatlan megfogalmazásom következménye. Az EGL-17 (Egg-laying defective; a fehérje egy fibroblaszt növekedési faktor) akkumulációja többféle sejttypusban is megfigyelhető és expressziója dinamikusan változik az egyedfejlődés során. A fejlődő vulvaszövetben az EGL-17 expressziója az L3 és korai L4 lárvastádiumokban az 1° vulvasejtekben, míg a késői L4 lárvastádiumban a 2° sejttypusban specifikus. Az 58. ábra E panelje (75. oldal) mutatja az EGL-17::GFP fúziós fehérje akkumulációját a vulvaszövetben.

A 60. ábra (76. oldal) valójában a CEH-20 fehérje (HOX kofaktor) akkumulációját mutatja az L3 lárvastádiumban (felső fluoreszcens kép). A CEH-20 az egyedfejlődés során szintén többféle sejttypusban akkumulálódik (szex-mioblaszt, neuronális blasztsejtek, fejlődő vulvasejtek, stb.), és mintázata dinamikusan változik a különböző egyedfejlődési állapotokban. Az L3 lárvastádiumban a CEH-20 minden VPC-ben (vulva elősejtben) akkumulálódik, és detektálható a hasi idegdúcra fejlődő neuroblasztokban is (apróbb zöld sejtek a nyilakkal jelölt VPC-k között – felső fluoreszcens kép). Ilyen formán a CEH-20 nem VPC-specifikus fehérje. Az L4 lárvastádiumban a CEH-20 akkumulációja már csak a 2° sejt-leszármazottakban figyelhető meg a fejlődő vulvaszövetben (alsó fluoreszcens kép). A fehérje azonban ebben az állapotban is detektálható más sejttypusokban. A vulvaszövetben viszont csak kizárólag a 2° sejttypusban figyelhető meg, ezért ebben az egyedfejlődési állapotban a CEH-20 specifikus 2° sejtmarkernek tekinthető (természetesen csak a vulvaszöveten belül). Ilyen értelemben tehát a CEH-20 nem vulva-specifikus marker. A fejlődő vulvában azonban az L4 lárvastádiumban specifikusan expresszálódik a 2° típusú vulvasejt leszármazottakban.

5, „ChIP kísérlet (65. ábra): Készítettek más kontrollt is mint az ábrán bemutatott? ...”

Válasz: Nem használtunk más kontrollt, mint ami az ábrán látható. Ezért a kérdés (kritika) teljesen releváns, és a kísérletünkön túl az eredmények bírálóit is minősíti (ezek az adatok a *Dev. Biol.* szaklapban jelentek meg). A LIN-39 kötés/nem kötés más – „semleges” – genomi környezetben történő vizsgálata bizonyítaná egyértelműen azt, hogy a LIN-39 valóban szekvencia-specifikusan tud kötődni a *lin-12* szabályozó régióban található potenciális kötőhelyhez *in vivo*. A kötés specifikusságát egyértelműen bizonyítaná az, ha egy olyan mutánsal dolgozhattunk volna, amelyben a *lin-12*-specifikus kötőhely mutálódott.

6, „Hogyan érinti a *C. elegans* modellként alkalmazhatóságát öregedés ill. élettartam meghatározásában szerepet játszó faktorok azonosítására végzett kísérletekben a fonalféreg egyedfejlődésének az a jellegzetessége, hogy a körülményektől függően hosszú élettartamú dauer lárva útvonalat is választhat?”

Válasz: Egyértelműen segíti. A dauer lárva egy olyan alternatív egyedfejlődési állapot, amelyben az állat metabolikusan inaktív (nem eszik, nem fejlődik, általában nem mozog) és **nem öregszik** (a normálisan fejlődő állat kb. 14 napos élethosszával szemben a dauer lárva akár fél évig is életképes). Az elsőként felfedezett öregedési folyamatot szabályozó jelátviteli rendszer az *insulin/IGF-1* útvonal volt, amely alapvető szerepet játszik a dauer vs. reprodukív fejlődés szabályozásában. Az útvonal receptora a DAF-2/IGF-1 fehérje. A *daf-2(-)* mutánsok 20°C-on normálisan fejlődnek (az állatok 95%-a normális fejlődik és csak 5%-a lesz dauer

lárva), és ezen állatok élethossza kétszerese a vad típusú állatok élethosszának, míg 25°C-on 100%-ban dauer lárvaként fejlődnek. A TOR kináz deficiens állatok megnövekedett élethosszához is a *Tor(RNSi)* állatok dauer lárva fenotípusán („gyenge” RNSi kezelés hatására az állatok 15%-a dauer lárvaként fejlődik) keresztül jutottunk el. Az autofágia rendszer élethosszt szabályozó funkciójához szintén a *daf-2(-)* mutánsok dauer fenotípusának autofágia gátláson keresztüli szuppressziója vezetett el (Meléndez *et al. Science* 301:1387-1391, 2003).

7, „Az autofág gének esszenciális jellege: ...az autofág gének funkcióvesztése letalitást eredményez, ... 1, az autofágia esszenciális az egyedfejlődéshez, vagy (2) az autofág gének autofágia független funkciója szükséges az életképességhez. Milyen kísérlettel tehetne egyértelmű különbséget a két lehetséges eset közé:”

Válasz: A kérdés olyannyira releváns, hogy mai napig nem szolgáltatunk – és mások sem – egyértelmű bizonyítékot a probléma megválaszolására (annak ellenére, hogy az autofágia-kapcsolt öregedési vizsgálatok a nemzetközi figyelem központjába kerültek). Két megoldást javasolok (ezek közül az első nem szolgáltat egyértelmű evidenciát):

- (1) Autofág gének prolongált expressziója (idősebb korban az autofág rendszer expressziós aktivitása endogén módon csökken, és ennek hatását kompenzálni lehet autofág transzgének bevitelével és moderált működtetésével) 50%-os élettartam növekedést okoz *Drosophilában* (Simonsen *et al., Autophagy* 4:176-184, 2008). A hosszabb ideig élő (öreg) legyekben meg kellene vizsgálni az autofág rendszer aktivitását autofágia-specifikus markerek és elektronmikroszkópia segítségével. Ez azonban nem zárja ki annak lehetőségét, hogy az autofág gének aktivitásának fenntartása nem csak az autofágiát, hanem más – öregedési folyamatot szabályozó – folyamatokat is stimulál.
- (2) Az autofág génkaszád hiperaktiválását (amely potenciálisan élettartam növelő hatású) kapcsolnám az autofág struktúrákat felnőtt korban blokkoló (pl. az autofagoszóma-lizoszóma fúzióját gátló) farmakológiai kezelésekkel. Ebben az esetben az egyedfejlődést követően már nem lesz autofág aktivitás. Ha az állatok élettartama megnő, akkor a hiperaktív autofág gének autofágia-független funkciója szabályozza az öregedési folyamatot, ha az élettartam csökken, akkor az autofág folyamat *per se* szükséges a hosszú élettartam kifejeződéséhez.

Tisztelettel,

Budapest, 2011. április 13.

Vellai Tibor
ELTE Genetikai Tanszék