

Válaszok Prof. Kiss István kritikai észrevételeire.

Tisztelt Professor Úr, szeretném megköszönni dolgozatom átolvasását, igényes értékelését, valamint a dolgozatra adott kritikai észrevételeket és kérdéseket, amelyeket az alábbi pontokban válaszolok meg:

Kritikai észrevételek:

1, „A fejezetek számozása több helyen eltér a Tartalomjegyzéktől. ... Hasonló probléma az ábrák számozásában is akad: ...”

Válasz: Ahogy arra Prof. Maróy Péter bíráló is rámutatott, bizonyos fejezetek számozása és számos ábra sorszáma hibás a dolgozatban. Konkrétan, a 3.3.1. fejezet (22. oldal) alfejezeteinek számozása helytelen: a 3.2.1.1, 3.2.1.2 és 3.2.1.3 sorszámok helyett 3.3.1.1., 3.3.1.2. és 3.3.1.3. számozásnak kellett volna szerepelnie. A Tartalomjegyzékben a 3.3.2. fejezet alfejezetei 3.4.3.1 és 3.4.3.2. Ezen alfejezetek korrekt sorszáma 3.3.2.1 és 3.3.2.2. lenne.

5 esetben az ábrák sorszáma szintén helytelenül szerepel. Valójában ez egy szerkesztési hibának az eredménye: az „első” 57. ábra után újra az 52-es sorszámmal kezdődnek az ábrák (a 86. oldaltól). Emiatt néhány ábrának a számozása duplikálódott. Ahogy a jogos kritika megfogalmazta, gondosabb szerkesztéssel ezek a formai hibák kiküszöbölhetőek lettek volna.

2, „Egyéb értelemzavaró elírások:...”

Válasz: A 82. oldalon a 67. ábra magyarázatában a szex-kromoszómák és autoszómák készletének arányát nem dupla, hanem egyszeres kettős ponttal kellett volna jelölnöm: az „XX::AA=1” és „XO::AA=0.5” helyett az XX:AA=1 és XO:AA=0.5 jelölés a korrekt. Az ábrán a kariotípusok jelölése már megfelelő.

A 77. ábrán (89. oldal) a *Drosophila Hox* gének közül az *abd-A* és *abd-B* gének neveiről az „A” és „B” kiterjesztések lemaradtak. Ez a hiba a kép importja során következett be, és elkerülte a figyelmemet.

A 2. Táblázatban az *lgg-1* gén helytelenül kétszer szerepel. Valójában a C32D5.9 ORF az *lgg-1* gén, míg a BO336.8 ORF az *lgg-3* génnek felel meg. Ezek a szerkesztési hibák egy újabb gondos átnézéssel elkerülhetőek lettek volna.

Kérdések:

3, „A 28. oldalon azt írja, hogy „A Ras fehérje a Raf Ser/Thr kinázt foszforilálja...” Ez nyilván elírás a „Ras fehérje a Raf Ser/Thr kinázt aktiválja” helyett.

Válasz: Valóban, ez egy szakmai hiba. Az aktivált Ras (kis G vagy GTPáz) fehérje konformációs változáson megy keresztül, így képes kötődni a Raf fehérjéhez (MAP kináz-kináz-kináz). Ez a kapcsolat teszi lehetővé, hogy a citoplazmatikus Raf a sejtmembránhoz kötődjön, ahol aktiválódik. A Raf aktivációja egy többlépéses folyamat. Egyrészt a PP2A (protein foszfatáz 2A) defoszforilálja a Raf gátló helyeit, másrészt a PAK (p21-aktivált kináz)

és Src kinázok foszforilálják a Raf aktivációs helyeit. További – eddig nem meghatározott – kinázok szintén részt vesznek az aktivációs helyek foszforilációjában.

4, „A *bec-1(-)* mutáns homozigóta életképtelenségét a *bec-1::gfp* transzgénnel menekítették. ... Nem világos ennek mechanizmusa.”

Válasz: A *bec-1* gén funkcióvesztéses mutáns alléljei homozigóta állapotban L4 lárva/ fiatal felnőtt életképtelenséget eredményeznek. A fejlődésben megrekedt fiatal felnőtt mutánsok nem képesek utódok létrehozására. A *bec-1* tehát egy esszenciális gén. Az ilyen *bec-1* mutációkat balanszer rendszerben vagy heterozigóta formában lehet fenntartani. *bec-1(-)/+* heterozigóta állatokat kereszteztünk egy *p^{bec-1}:BEC-1::GFP* konstrukciót tartalmazó transzgenikus törzssel. A konstrukciót úgy hoztuk létre, hogy a *bec-1* gén 5 kb *upstream* szabályozó régióját (*p^{bec-1}*) a majdnem teljes kódoló régió követi (csak az utolsó néhány aminosavnak megfelelő exoni rész hiányzik; BEC-1(+)), és ezt fuzionáltattuk (*frame*-ben) a *gfp* (*green fluorescent protein*) riportter gén szekvenciájával (GFP). A funkcionális transzgent tartalmazó plazmid nem integrálódott kromoszómába, hanem egy önálló replikációs egységként (sok kópiát tartalmazó konkatamer formájában), azaz egy extrakromoszómális elemként maradt fent. Ez az extrakromoszómális elem instabil, bizonyos sejtekből a replikációt követően **véletlenszerűen** elveszik. Az elemet elvesztő sejtek (és azok leszármazottai) *bec-1(-)* mutáns genotípusúak lesznek, míg az elemet megtartó sejtek (és leszármazottai) továbbra is tartalmazzák a transzgenben található menekítő *bec-1(+)* allélt. Ilyen kontextusban az **instabil konstrukciót tartalmazó**, egyébként *bec-1(-)* homozigóta mutáns genetikai hátterű állatok **genetikai mozaikok**, genotípusuk: *bec-1(-); Ex[bec-1(+)]*. Ezen állatok egy része képes termékeny felnőtt állapotba fejlődni (a transzgen menekítő hatása következtében), míg utódjaik pleiotróp fenotípust mutatnak. E fenotípus egyik legmarkánsabb aspektusa az embrió életképtelenség (a transzgen az egyedfejlődés egy korai szakaszában vesztett el számos sejtvonalból). Ez azt sugallja, hogy a kiindulási homozigóta *bec-1(-)* mutánsok anyai hatás következtében tudnak az L4/ fiatal felnőtt állapotig eljutni (ezek az állatok *bec-1(-)/+* heterozigótákból szegregálódtak). Ez a mozaik rendszer tette lehetővé a *bec-1* funkciójának meghatározását az embriogenezis során (pl. apoptózis gátlása), a lárvális fejlődés során (pl. vulva fejlődés, vedlés) és felnőtt állapotban (pl. endocitózis).

5, „A 39. ábrán látható, hogy az ATP-3 mitokondriális ATP-szintáz komponens RNAi géncsendesítése megnöveli az élethosszt, és az autofág LoF mutánsok élet-rövidítő hatása előlött episztatikus. ... az autofágia gének overexpressziója megnyújtaná-e az *atp-3(-)* élettartamát, azaz a kettő szinergizálna-e egymással?”

Válasz: Az episztázis eredmény azt mutatja, hogy az ATP-3 deficiens állatok megnyúlt élethossza az autofágia gének aktivitását igényli. Az autofág génkaszkád tehát egy útvonalban hat a mitokondriális légzési lánc tagjait kódoló génekkel az öregedési folyamat szabályozásában. Ebben az útvonalban az autofágia gének vannak *downstream*, amelyeket az *atp-3* gén negatívan szabályoz. Ha ezt az egyszerűsített genetikai kapcsolatot vesszük alapul, akkor nem várnék szinergizáló hatást az autofágia gének hiperaktiválásával *atp-3* deficiens genetikai háttérben (a *downstream* komponens hatása a meghatározó). A valóság feltehetően egy sokkal bonyolultabb genetikai hálózat, amelyben vannak parallel utak is. Ez esetben az autofágia hiperaktiváló mutációk megnövelnék az *atp-3(-)* mutánsok élettartamát. Egy ilyen kísérlet elvégzésének tehát – amit a kérdés is burkoltan sugall – ilyen relevanciája lenne, azaz

rávilágítana a mitokondriális légzési lánc és az autofágia masinéria közötti szabályozás természetére.

6, „Az 56. ábrán látható, hogy a *bec-1* gén inaktiválása apoptózist indukál, hasonlóan a *ced-9/bcl-2* mutánshoz. Az egyik gén overexpressziója mentheti-e a másik inaktiválásának hatását?

Válasz: Eredményeink szerint a BEC-1 fehérje fizikailag kötődik a CED-9 anti-apoptotikus fehérjéhez (ezt a fizikai kapcsolatot humán sejtekben is kimutatták), és ez a kapcsolat szükséges a CED-9 apoptózist gátló funkciójához. Az egyetlen ismert CED-9 funkciónyeréses (*gf*) mutáció egy olyan (pont)mutáns fehérjét eredményez, amely nem képes „elengedni” a Apaf-1-szerű CED-4 pro-apoptotikus fehérjét. Mivel a CED-4 egyaránt szükséges a kaszpáz-függő és kaszpáz-független apoptotikus sejthalálhoz, a *ced-9(gf)* mutáció (és feltehetően a CED-9 overexpresszió) meggátolja az apoptózist *bec-1* funkcióvesztéses mutáns genetikai háttérben is.

A *bec-1* hiperaktiválása nehezebb kérdés. Az autofágia sejtvédő funkciója csak az autofág rendszer bazális aktivitása esetén valósul meg. Az autofágia hiánya és hiperaktiválása egyaránt sejtpusztuláshoz (gyakran apoptózishoz) vezet. Az autofágiát ezért is nevezik egy alternatív – II. típusú – sejthalál folyamatnak. Az autofágia prolongált (de nem over-) expressziója idősebb korban – amikor endogén módon csökken a folyamat aktivitása – gátolja a (apoptotikus) sejtpusztulást *Drosophila* rendszerben, hiperaktiváló expressziója azonban önmagában is sejtpusztulást okoz. *ced-9(-)* mutáns háttérben még inkább ez lehet a helyzet.

Tisztelettel,

Budapest, 2011. április 13.

Vellai Tibor
ELTE Genetikai Tanszék