

Bírálati vélemény Vellai Tibor **Jelátviteli kapcsolatok feltárása Caenorhabditis elegans-**
ban című MTA Doktori cím elnyeréséhez benyújtott pályázatáról

Vella Tibor Akadémiai Doktori cím elnyerésére készített téziseiben összefoglalt munkájának az alaptémája: **jelátviteli utak** (tengelyek) **közötti** szabályozó **kapcsolatok** (signalling crosstalk) **vizsgálata** és meghatározása. A jelátviteli utakban szereplő makromolekulák működését és kölcsönhatásaik eredményeit a szerző a biológiai jelenségek széles spektrumát érintően vizsgálja. A kutatási irány és a *C. elegans* fonalféreg, mint az alkalmazott kísérleti rendszer modell organizmusa a dolgozatban tárgyalt valamennyi kísérletet és eredményt egy sorba fűzi. A két fő témakör, az autofágiát és a vulva képződést befolyásoló jelátviteli utak működésének vizsgálata. Az ezekben résztvevő jelátviteli utak kapcsolatai a sejtnövekedés, differenciálódás, sejtosztódás, sejtpusztulás, sejtsors meghatározás, öregedés és több más, általános és alapvető biológiai folyamat meghatározásában szereplő molekulákhoz vezetnek.

A dolgozat témája kétséget kizáróan korszerű és érdeklődésre számot tartó. Az autofágia, különösen annak összefüggése az öregedéssel, élettartam meghatározással az utóbbi néhány évben jelentős figyelmet kapott, amihez a szerző munkássága is számottevően hozzájárult. A sejtsors meghatározást és szöveti differenciálódást érintő kérdések pedig értelemszerűen, egy alapvető biológiai folyamat megértésének igénye és a daganatképződéssel összefüggő vonatkozásaik miatt is számot tarthatnak érdeklődésre.

A dolgozatban a szerző 19 db, 2003-2009 között készült közleményében leírt eredményeit összegezi. Hét közleményben Vellai Tibor első szerző, 8-ban levelező szerző. 4 közlemény könyvfejezetként, a többi szakfolyóiratban jelent meg. Ezek impakt faktor értéke 4 és 31 közötti, összesítve 125. A tudományos eredményesség mutatószámokban kifejezett értékeit tekintve tehát, a szerző munkája messzemenően meghaladja az Akadémia Doktora cím eléréséhez támasztott követelményeket.

A dolgozatban ismertetett eredmények első része az autofágiával, és annak az öregedéssel fennálló kapcsolatával foglalkozik. A sejtek élete és működése során a makromolekulák és sejt organellek sérülnek és elhasználódnak. A funkciót veszített molekulák és komplexek jelenléte normál folyamatokat zavarhat. Eltávolításuk ezért fontos a sejt számára. A folyamatban chaperon fehérjék, a proteaszóma rendszer és autofágia játszik szerepet. Az autofágia ugyanakkor a sejt túlélését is biztosítja éhezés során. Érthető módon, a sejt anyagainak elhasználódása és sérülése szoros összefüggésben van az öregedési folyamattal. A mértékletesség - kalória restrikció – pozitív hatása az élettartamra ismert. A két jelenség összefüggése jelenik meg a tápanyag ellátottságot érzékelő TOR kináz – ami egy élethossz szabályozó faktor –autofágiát gátló hatásában.

A szerző a szakirodalomban először mutatta ki, hogy a TOR kináz – az eukarióta sejtek fő tápanyag és energia ellátottság érzékelő faktora - *C. elegans*-ban egy élethossz szabályozásban szerepet játszó jelátviteli útnak vesz részt. A TOR kináz hasonló szerepét később más munkacsoportok is kimutatták, élesztő, *Drosophila* és egér kísérleti modellben is. A pályázó erre vonatkozó közleménye nagyszámú hivatkozást kapott. A felismerés szélesebb körű jelentősége, hogy a TOR kináz felismert szerepe és kapcsolata az inzulin/IGF-1 jelátviteli úthoz molekuláris magyarázatot szolgáltat a redukált táplálék felvétel már korábban megfigyelt élettartam növekedést okozó hatására. Megítélésem szerint ez a dolgozatban közölt legfontosabb eredmény. A szerző megállapításai tehát: hogy az autofág génfunkciók hiánya gyorsítja az öregedési folyamat sebességét, az autofág gének közvetítik a kalorikus restrikció élethossz növelő hatását, a TOR pedig gátolja az autofág géneket e funkcióban.

Bioinformatikai módszerekkel a szerző élesztő autofágiában szerepet játszó gének nematoda ortológjait azonosította. Az azonosított gének mutáns alléljai okozta, ill. siRNS gátlással létrehozott fenotípusok vizsgálatával megállapította, hogy a *C. elegans*-ban evolúciósan konzervált módon működik az autofágia mechanizmus. Két *C. elegans* autofág gén expressziójának mintázata alapján felveti, hogy ezek a gének - vagy az autofágia folyamat maga - szerepet játszik differenciálódási folyamatok szabályozásában. (a lokalizációra tett, az irodalmi adatokkal nem minden tekintetben egyező megfigyelések egyes autofág gének multifunkciós szerepére, vagy egyes sejt organellumok (Golgi) autofágiában eddig le nem írt szerepére utalhatnak)

A *C. elegans* autofág génjeinek funkcionális vizsgálatával a szerző arra a következtetésre jut, hogy azok inaktíválása felgyorsítja az öregedési folyamatot, ezáltal élettartam rövidülést okoz. Az autofágia tehát az öregedési folyamat egy újonnan feltárt szabályozó rendszere. Az autofág gének egy öregedést gátló útvonalat alkotnak, mutációjuk csökkenti, vad típusuk funkciója növeli az élettartamot. Következtetése szerint a különböző öregedési folyamatot szabályozó útvonalak hatásai az autofág rendszeren konvergálódnak.

A dolgozat további részben a szerző az autofágia és a sejtnövekedés, a neurodegeneráció és az apoptózis kapcsolatára vonatkozó kísérletei eredményeit összegzi. Megalapításai, hogy az *unc-51* és *bec-1* autofág gének inaktíválása kis testméretet eredményez. Következtetése, hogy ezek tehát szerepet játszanak a sejtnövekedés szabályozásában. Az autofág gének aktív szerepét írja le degenerálódó neuronokban, ami az autofágia és nekrozis kapcsolatára utal. Megállapítja továbbá, hogy a *bec-1* autofág gén inaktíválása apoptózist indukál. A *BEC-1* fizikailag is kapcsolódik a *CED-9* anti-apoptikus fehérjéhez. A logika szerint tehát a kettő együtt, egy komplexben anti-apoptotikus. Ez a két útvonal apoptózis és autofágia kapcsolatát jelzi. A két útvonal együtműködésre utal az autofágia és apoptózis kettős mutánsok életképtelensége is. Mindezek alapján felveti a két útvonal közös szabályozó rendszerét és közös evolúciós eredetét.

A dolgozat eredményeket tárgyaló részének utolsó harmada a *C. elegans* vulva fejlődés, általánosan a sejtors meghatározás mechanizmusával foglalkozik. A kísérletek a *LIN-12/Notch* jelátviteli út szerepét vizsgálják. A *lin-39* Hox gén terméke egy transzkripciós faktor, ami a *CEH-20* fehérjével egy komplexben működik. A szerző és munkatársai *ceh-20* mutánsokat izoláltak és vizsgáltak. A *lin-12* és a ligandumot kódoló *lag-2* szabályozó régiójában *LIN-39* kötőhelyet mutattak ki. ChIP kísérlettel kimutatták továbbá, hogy ehhez *in vivo* a *LIN-39* kötődik. Az eredmények alapján tett következtetés, hogy a vulva 2^o sejtors specifikációja a *LIN-39/CEH-20* HOX/EXD komplex transzkripciós kontrolja alatt áll. Megállapítása, hogy a szex-determinációs kaszkád terminális faktora *TRA-1A* kötődik a *lin-39* promoterhez. A *lin-39* szabályozó régiója fogadja tehát a Ras, Wnt, SynMuv és szex-determinációs útvonalak jeleit és ennek hatására a *LIN-39* mennyisége a Notch jelátviteli rendszeren át határozza meg a sejtorsot. Végül pedig a *TRA-1A* faktor egy eddig nem ismert szerepére utaló adatokat mutat be, nevezetesen, hogy az a *xol-1* sex kapcsoló gént transzkripcióját represszálja és ezáltal a dóziskompensációban vesz részt.

A dolgozat kísérleti adatokban nagyon gazdag. Ez elkerülhetetlenné teszi a kísérletek rövid és tömör leírását, ami pedig a szakterületet részleteiben nem ismerő bíráló számára a következtetések megalapozottságának értékelését teszi nehezzé. Ezt azonban nem érzem problémának, mert az ismertetett eredmények döntő többsége már közlésre került, és a nemzetközileg nívós folyóiratokban történt közléseket természetesen megelőzte a szakértői bírálat. Az ismertetett eredmények ill. a következtetések megértését az ábrák általában jól segítik. Bár egyes esetekben az ábra szerkesztés nem olvasó barát pl. amikor a minták leírása a kép mellé került (pl. 74. 88). Összességében a dolgozat nem könnyű olvasmány, a *C.*

elegans és az hivatkozott más modellekben használt koránt sem egységes gén és géntermék jelölések, a hasonló funkcióra is sokszor eltérő jelölésmódok követése, komoly koncentrációt igényelnek az olvasótól. Nem tudom megítélni, hogy egy egyszerűsítőbb leírási módnak áldozatul esne-e a precizitás. Csak néhány kritizálható megfogalmazást találtam: („fénymikroszkóppal közvetlenül vizualizáltuk”, egy fehérje „membrán képletekhez lokalizál”). Szokatlan számomra a paradigma szó használata. „A C. elegans vulvaszövetének kifejlődése kiváló kísérletes paradigma a jelátviteli útvonalak koordinált működésének tanulmányozásához”. Helyesebb talán a kísérletes modell, amire érvényes a jelátviteli utak összekapcsoltságára vonatkozó paradigma, vagy alkalmas annak a megerősítésére/kiterjesztésére. A paradigma inkább egy témakörre vonatkozó eredmények és ismeretek összessége, egy álláspont rendszer valamely kérdésben. Szintén nem osztom teljes mértékben a szerző véleményét az irodalmi bevezető kezdeti részében, a jelátviteli utak bemutatásánál írottak egy részével: (részletezés nélkül pl. az RTK-kapcsolt útvonal szerintem nem tekinthető tipikusan parakrinnek, vagy ha a 8. táblázat sejtfelszíni receptorokat csoportosít, mint a szövegben szerepel, akkor miért tartalmazza a nukleáris receptor útvonalat.) Ehelyett, a véleményem szerint kicsit fölösleges rész helyett, talán hasznosabb lett volna egy rövid elmélkedést az élettartam és az öregedés mint biológiai jelenségek genetikai meghatározottságának és szabályozásának kérdéséről: Különös arra való tekintettel, hogy lehetséges-e, és/vagy szükséges-e a közvetlen és közvetett hatások megkülönböztetése, és ha igen, ez milyen nehézségekkel jár. Egy profán hasonlattal megpróbálva megvilágítani a kérdésfelvetésem: mindannyian elfogadjuk, hogy a rendszeres szerviz növeli a gépkocsi élettartamát. De szabályozója az olajsűrő a gépkocsi élettartamának? Hasonló logikát alkalmazva számos további kérdés felmerül, ok-és okozati összefüggések, szabályozás és együttesen előforduló jelenségek viszonyának tisztázására. Hasonló egy kicsit annak a kérdése, hogy egy jelátviteli rendszer két állapota csak aktiváció vagy gátlás lehet? Vagy létezik a kettő közötti, mondjuk fenntartó állapot?

Kérdéseim:

60. ábra: Az EGL-17::GFP specifikusan a 2^o vulva sejtekben expresszálódik – akkor miért zöldek a ventralis idegdúc neuronjai ?

ChIP kísérlet (65. ábra): készítettek más kontrollt is mint az ábrán bemutatott? A valódi kontrol ugyanis a kötődés hiányának kimutatása lenne egy másik régióban. A bemutatott eredményt akkor is ilyen lenne, ha a LIN-39 nem szekvencia specifikusan mindenhol kötődne.

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

2. Az autofág gének esszenciális jellege: A dolgozatban szerepel, hogy az autofág gének funkcióvesztése letalitást eredményez, aminek a magyarázatára két lehetőséget említ: 1, az autofágia esszenciális a féreg fejlődéséhez, vagy (2) az autofág gének autofágia független funkciója szükséges az életképességhez. Milyen kísérleti megközelítés tehetne egyértelmű különbséget a két lehetséges eset között?

Összesített véleményem, hogy Vellai Tibor dolgozata nagyon magas színvonalú, sok nemzetközileg is jelentős eredményt szolgáltató kísérlet eredményeinek kiváló összefoglalása. A dolgozat határozottan meghaladja az Akadémia Doktori cím elnyeréséhez teljesítendő követelményeket. Megfogalmazott kritikáim és kérdéseim a dolgozat érdemi részét nem érintik. A dolgozat kitűzését nyilvános védési eljárásra feltétel nélkül javasolom.

Szeged, 2011 március 21.

Dr. Boros Imre Miklós
tanszékvezető egyetemi tanár