

Válasz Prof. Varga Zoltán opponensi véleményére

Tisztelettel köszönöm Varga Zoltán professzor úr véleményét, melyben a bemutatott eredmények alapján dolgozatomat nyilvános vitára alkalmasnak tarja. Köszönöm az elismerő szavakat, a kritikai megjegyzéseket, valamint a felvetődött kérdéseket egyaránt.

Bírálóm megjegyzi, hogy a dolgozatban és a tézisekben sok figyelmetlenségből adódó formai hiba maradt, melyek közül az alábbiakat bírálatban fel is sorolja:

„...a dolgozatban rendkívül sok az elütés, a betű-és írásjel hiány, amely a megfelelő szövegellenőrzés hiányára vall.”

*„Kiváló ábrán és alapos magyarázó szöveggel mutatja meg, miért translációtól független az **oskar** RNS szerepe az ivarsejtfejlődésben, bár zavaró, hogy az egész bekezdés, egy az Oskar fehérjével kapcsolatos csonkán maradt mondatral kezdődik.”*

*„ További mutáns-izolálási rendszert is sikerült létrehozni hármás heterozigóta mutánsok (**staufen** , **oskar**, **TmII**) előállításával, amellyel nagy számú P elem által indukált letális mutáció interakciós fenotípus penetranciáját is sikerült meghatározni. Nem világos számomra, hogy ez az utóbbi eredmény a tézisekben miért nem szerepel.....”*

A bírálatot elfogadom. Valóban, egy kimerítő szöveggondozás, illetve a tézisek szerkesztésének ellenőrzése a dolgozat javára vált volna. A hibákért bírálóim és a leendő olvasóim szíves elnézését kérem.

Varga professzor úr bírálatában megfogalmazott kérdéseket a következőképpen válaszolom meg:

*„Mivel az **oskar** ribonukleo-partikulumok (**RNP**) összeszerelődésével és szállításával kapcsolatos megállapítások itt még csak hipotetikusak (22.o), meg kell kérdeznem, milyen újabb eredmények erősítik meg azt a feltételezést, illetve mi annak a mechanizmusa, hogy az **oskar** RNS oligomerizációja képezi azt a kapcsolóerőt, ami az RNP-eket kialakítja és összetartja.”*

A hipotézis a mai napig nem nyert bizonyítást. Egy fontos előrelépés az ügyben azonban történt. Anne Ephrussi és munkatársai az RNA című folyóirat 2011. decemberi számában (17(12) 2049) az *oskar* RNS 3' nem translálódó régiójában leírtak egy stem-loop típusú másodlagos szerkezetet, melyen keresztül az *oskar* RNS *in vitro* kísérletekben dimerizálódni tud. *In vivo* kísérletekkel megmutatták azt is, hogy ez a stem-loop struktúra képes jelzett RNS-eket, feltehetően RNS-RNS interakció alapján az *oskar* RNP partikulumba integrálni. Eredményeik, ha nem is bizonyítják teljes körűen, de valószínűsítik, hogy az *oskar* RNS molekulák közötti kapcsolat az RNP szervező ereje lehet.

*„úgy vélem, szintén további magyarázatot igényel, hogy a celluláris tropomiozin (**cTM**) milyen mechanizmus szerint horgonyozza ki a pete posterior pólusán az **oskar** RNS tartalmú RNP-partikulumokat. „*

Dolgozatomban (25. oldal) idézem Trucco és munkatársainak a Cell című folyóirat 2009 novemberi számában (139:5 983-998) megjelent közleményét. A közlemény cryo-immuno-elektron mikroszkópos vizsgálatokra hivatkozva állítja, hogy a cTm fehérje már a mikrotubulusok mentén szállítódó *oskar* RNP komplexnek is tagja. Ennek alapján egyszerűen magyarázhatnánk a celluláris Tropomiozin szerepét az *oskar* RNS tartalmú RNP partikulumok lokalizációjában. Eszerint a transzport komplex már eleve tartalmaz egy aktin kötő fehérjét, így a szubkortikális aktin hálózatot elérve az *oskar* RNP komplex a megérkezés helyén az aktin vázon fogva maradna, ahol az *oskar* RNS helyspecifikus translációja megtörténhetne. A fent említett közleményt 2010 októberében éppen a kritikus cryo-immuno-elektron mikroszkópos vizsgálatok eredményének manipulálása miatt visszavonták, így a fenti modellt a tudományos megismerés szabályai szerint nem tekinthetjük megalapozottnak.

A tropomiozin fehérje *oskar* RNP kihorgonyzásában betöltött szerepéről a legújabb kutatások fényében új munkahipotézis alakítható ki, melyhez nem szükséges a celluláris tropomiozinnal kapcsolatos visszavont eredményeket feltételezni. Takana és Nakamura a BioArchitecture című folyóiratban 2011-ben közölt cikkében (1:3, 122-126) az *oskar* RNP komplex, valamint az Oskar fehérjék kihorgonyzársról összegző modellt közölnek. E modell szerint a mikrotubulusokon a petesejt poszterior csúcsába érkező *oskar* RNS két fehérje izoformává transzlálódik. A hosszú Oskar izoforma endoszómák felületén aktin nukleáló faktorokkal együtt megtapad és a szubkortikális aktin vázból a petesejt belseje felé mutató F aktin benövéseket indít. A modell szerint az újonnan létrejött F aktin benövések alkotják azt az aktin formát, amely az Oskar rövid izoformát megköti. Az így kihorgonyozott Oskar rövid izoforma köti meg a többi ivarplazma komponenst, ami a poszterior póluson ivarsejtek lefűződéséhez vezet. Ebben a modellben a Tropomiozin szerepe az újonnan keletkező aktin benövések stabilizálása lehetne. Tropomiozin hiányában az aktin benövések instabilak lennének, melyek csökkent rövid Oskar izoforma kötő kapacitásban végső soron ivarsejthiányos fenotípusban nyilvánulna meg.

*„ szintén rendkívül izgalmas kérdés az Erdélyi-munkacsoport által felismert **Poirot (prt)** génnek az emberi **Sab** génnel való homológiája. Érdekelne, hogy az összefüggés bizonyításán túlmenően, milyen konkrét mechanizmus szerint valósul meg a **poirot** gén hatására a rövid **Oskar** fehérje izoforma megtartása, ill. hogyan szűnik meg ez a hatás a prt gén mutációi esetében. ”*

A Poirot fehérje hatásmechanizmusának felderítésénél abból indultunk ki, hogy az emberi *Sab* fehérje (SH3 domain-binding protein that preferentially associates with BTK) a Bruton tirozin kináz (*Btk*) fehérje negatív regulátora. A *poirot* génnek az emberi *Sab* génnel való homológiája alapján feltételeztük, hogy ez a negatív reguláló szerep is konzervált. Genetikai kísérletekkel beláttuk, hogy a Poirot valóban a *Drosophila* Btk homológ, a Btk29A negatív regulátora (Btk funkcióvesztéses allélek szuppresszálták a *poirot* funkcióvesztéses fenotípust). A Btk29A fehérje ismerten az aktin polimerizáció egyik szabályozó fehérjéje. Ezek alapján feltehető, hogy a Btk29A illetve az őt szabályozó Poirot az Oskar rövid izoforma megkötéséért felelős aktin filamentum típus kialakításában vagy stabilitásának fenntartásában vesz részt. Ezután a Btk29A fehérje szerepét kívántuk tisztázni az Oskar fehérje helyben tartásában. Btk29A hiányos petekezdeményeket állítottunk elő mozaik technika segítségével.

A Btk29A hiány jellegzetes petesejt fejlődési hibát okozott, de rövid Oskar izoforma hiányára utaló fenotípust nem eredményezett. Mindezek alapján úgy gondoljuk, hogy a Poirot fehérje feladata a Btk29A aktin reguláló faktor gátlása. A Poirot fehérje e gátlás révén járul hozzá a rövid Oskar fehérje helyben tartására specializálódott poszterior aktin benövések kialakításához. A Poirot fehérje hiánya ektopikus Btk29A fehérje aktivitást, ennek következtében rosszul koordinált poszterior aktin hálózatot, delokaizált rövid izoformát, végső soron ivarsejthiányos fenotípust eredményez.

*„Számtalan lényeges új fejlemény, a **Moesin** fehérje sejtciklus-függő sejtmagbéli lokalizációjának és magorsó képződésében való szerepének tisztázása. Mivel a közölt eredmények kifejezetten a mitotikus orsók kialakulására illetve a mitózis során bekövetkező szegregációs hibák létrejöttére vonatkoznak, és miután a szerző is nyitott kérdésként veti fel a **Moesin** gén szerepét az ivarsejtek kialakulásának korai fázisában, jogosnak tűnik számomra a talán kissé naiv kérdés: lehetséges-e hogy e tekintetben különbségek adódjanak a mitotikus és meiotikus osztódás mechanizmusában?”*

Mindeztáig a *Moesin* fehérjének a meiozisban betöltött szerepét nem vizsgáltuk. A vizsgálat eredménye pedig igen fontos lenne a *Moesin* orsó mátrix funkciójának bizonyítása szempontjából. Az East (enhanced adult sensory threshold) orsómátrix fehérje meiotikus funkcióját ugyanis már kimutatták. Az *east* funkcióvesztéses allélja meiotikus nondiszjunkciós tesztkben emelkedett mértékű kromoszómavesztést mutatott. Amennyiben a *Moesin* és az *east* mutációk hasonlóképpen viselkednének nondiszjunkciós tesztkben, az megerősíthetné a *Moesin* orsó mátrix fehérje voltát. A vizsgálat egyetlen nehézsége az lehet, hogy az *east* erős mutációkkal ellentétben a *Moesin* erős allélek letális fenotípusúak. Megfelelően érzékeny nondiszjunkciós tesztket kellene használni, olyanokat, melyek hipomorf allélek vélhetően alacsony penetranciájú nondiszjunkciós fenotípusának kimutatására is alkalmasak.

A dolgozat bevezető részét, mely az ivarsejt-testi sejt funkciók elválásának szerepét taglalja a soksejtűek evolúciójában bírálok nem tarja sikeresnek. Kifogás érte a 4. Oldalon tett kijelentést, ekképpen: „*a bakteriális biofilmeken a fitnesszt mint a „túlélés és a szaporodás” képességének egyensúlyát kísérli definiálni*”.

A bírálatot elfogadom. A fitnesszt az evolúciobiológiában egyértelműen definiálják: pl. egy típushoz tartozó egyedek átlagos, felnőtt utódszáma. Dolgozatomban a fitnessz kifejezést nem a definíciónak megfelelően használtam. A fejezetben, melyben a kifogásolt kijelentést leírtam azt kívántam bemutatni, hogy az olyan soksejtű egyedekben, amelyekben minden sejt megtartja szaporodó képességét azok a sejtek melyek az egyed fenntartáshoz szükséges feladatokból többet vállalnak, alul maradhatnak az önreprodukció sikerességében. Az egyed fenntartását jól szolgáló genotípusok gyakorisága tehát csak addig növekszik a populációban, amíg az az egyedi sejtek fitnesszét nem rontja. Mindennek következménye, hogy a többféle genotípusú sejtől aggregáció útján szerveződő soksejtű élőlény szerkezete, komplexitása, működési módja a szaporodás és a testépítés konfliktusa miatt viszonylag egyszerű marad az evolúció során. A bakteriális filmek véleményem szerint szokatlan, de jó példát szolgáltatnak

erre az esetre. Wolpert és Szathmári talán elfogadhatóbb példaként a Nature című folyóirat 2002-ben megjelent (420 6917:745) közleményében a Dictyostelium discoideum sejtjes nyálkagombát említi.

„A bakteriális filemek, mint analógia értékű képződmények tárgyalása nem helyettesítheti annak bemutatását, hogyan alakult ki a szexualitás, és ezzel szoros összefüggésben a diploid-haploid életsiklusok az eukarióta protiszták filogenetikai ágain.”

A bevezető valóban nem szól a szexualitás kialakulásáról. Különösnek tűnhet fel ez, amikor az ivarsejt-testisejt funkciók elválásáról, és ennek evolúciós következményeiről beszélünk. A bevezetésben végigvitt okfejtésem azon alapul, hogy a valódi soksejtes élőlények testfelépítése azért tud gyorsan evolválódni, mert az aggregációval létrejött soksejtű formáknál tapasztalt konfliktus megszűnik azzal, hogy a szervezet minden egyes sejtje egyetlen sejt leszármazottja, ezért azonos genotípusú. Sejtdifferenciáció segítségével két alapvető sejtípus alakul ki. A differenciált testi sejtek teljes egészében az egyed érdekeit szolgálhatják, de nem vesznek részt az átörökítésben. Az ivarsejtvonal sejtjei pedig nem vesznek részt az egyed közös funkcióinak ellátásában, de átörökítik a testi sejtekkel közös genotípust. A test differenciálódását irányító genotípus nem szenved tehát szelekciós hátrányt, mert a differenciálatlan ivarsejtvonal sejtjei átörökítik azt. Wolpert és Szathmári szerint is a komplex élőlények kialakulásának előfeltétele az egyetlen sejtből álló, szavaik szerint „propagulum”. Ők a fentebb már idézett „*Evolution and the egg*” című közleményükben az egysejtes propagulumot a petével azonosítják.

Az altruista testi sejtől és a differenciálatlan átörökítő sejtvonalból álló legegyszerűbb példának bevezetőmben a Volvoxot említem. Nagyon érdekesnek tartom, hogy a Volvox egyedfejlődésnek van aszexuális módja is. Itt a testi sejtek védelmében gonídiumok élnek. A Volvox egyed elpusztulásakor a gonídiumok kiszabadulnak és egy-egy gonídiából sejtdifferenciáció útján testi sejtek és differenciálatlan gonídiumokból álló új egyed jön létre. Vagyis a Wolpert és Szathmári féle egysejtű propagulum itt nem szexuális szaporodást szolgáló gaméta. Más szavakkal legalább egy élő példa van arra, hogy a szexszel rendelkező gaméták és a differenciálatlan átörökítő funkciójú sejtek nem azonosak. A Volvox kivételes példája arra utal, hogy a soksejtűség evolúciójának dolgában elsődleges a propagulumok egysejtű volta és másodlagos azok szexuális funkciója. Megjegyzendő azonban, hogy a ma élő soksejtűeknél az egysejtű propagulum szinte kizárólag a szexuális szaporodást is szolgáló pete és hím ivarsejt.

Ez a gondolatsor indított arra, hogy a szexualitás evolúciós taglalását elhagyjam. A szexualitás és a haploid-diploid életszakaszok evolúciós tárgyalásának elhagyását az is indokolja, hogy dolgozatom témája a testi és ivarsejt vonal szerepének szétválást irányító folyamatok vizsgálata. Ez a szétválás egy alapvető sejtdifferenciációs lépés, ami rendszerint az egyedfejlődés korai szakaszában valósul meg és jól elkülöníthető a haploid gamétaképzés folyamatától.

A bevezető okfejtésének megértését zavarhatja, hogy az ivarsejtvonalat képező összes sejtet ivarsejtként emlegetem. Helyesebb lett volna következetesen ivarsejtvonalat és ivarsejtvonal sejtet említeni, amennyiben nem a hím és női gamétákat, hanem a testi sejtektől elkülönülő, szaporodást szolgáló sejtvonalba tartozó sejtek összességét, vagy

valamelyikét kívánom megnevezni. A Volvox aszexuális életciklusának leírásakor a differenciálatlan, szaporodási funkcióval bíró gonídiumokat felületesen ivarsejtekhez hasonlítottam. Helyesebb lett volna a Wolpert Szathmári féle megoldással a „propagulum” vagy a „reproduktív sejt” kifejezést használni, és ezeknek a sejteknek az ivarsejtvonal sejtekhez való hasonlatosságát hangsúlyozni.

Még egyszer megköszönöm Varga professzor úr megtisztelő bírálatát.

Szeged, 2012. október 29.

Erdélyi Miklós