

Opponensi vélemény Erdélyi Miklós „Az embrionális ivarsejtfejlődés genetikai vizsgálata *Drosophila melanogaster*ben” c. MTA doktori értekezéséről

¹A dolgozat a soksejtűség ill. az ivari-testi sejtek elkülönültsége evolúciós kútmélységeinek tárgyalásával izgalmasan indul. Az olvasót a differenciációra való képesség megszerzésének evolúciós lépéseit illetően kissé magára hagyva tér át a *Drosophila* ivarszövet képződése fejlődésbiológiai lépéseinek igen szemléletes leírására, melynek során arról is áttekintést nyerünk, hogy mely fejlődésbiológiai történések-lépések, rejtélyek várnak még magyarázatra. A Célkitűzés MTA doktori értekezéshez illően általánosan, de világosan fogalmazza meg a címre pályázó ambícióját: „Az elmúlt években az ivarsejtek egyedfejlődés során való differenciálódásával foglalkoztam, különös tekintettel az ivarsejt-testi sejt elválás folyamatára. Munkámat az ivarsejtkutatás egyik legfontosabb modellorganizmusában, a *Drosophila melanogaster*ben, ecetmuslicán végeztem. Dolgozatom az ebben a témakörben végzett tevékenységemet foglalja össze.” Ez az objektív, a biológiai folyamatok irányában alázatot, mértéktartást, saját szerepét illetően makulátlan korrektséget tükröző attitűd és tónus jellemzi az egész dolgozatot.

Ezt a bevezető részt követik az Eredmények és megvitatásuk alfejezetei. Az elsőben („Az ivarsejtdifferenciáció klasszikus genetikai vizsgálata”) megtudjuk, hogy az Oskar anyai sejtben átírt mRNS 3' nem kódoló farkának is szerepe van a korrekt ivarfejlődés biztosításában. Vajon ezen nagyon izgalmas kísérletek óta történt-e további vizsgálat arra vonatkozóan, hogy ezen 3' szekvencia milyen elemei, szekvenciái ill. milyen ezek által meghatározott harmadlagos szerkezet fontosak a pete túléléséhez ill. ezen 3' szekvencia strukturális sajátosságai és a (Mhlanga és mtsaitól) idézett mRNS oligomerizációs jelenség között mi a kapcsolat?

A P-elem mutagenézissel azonosított legerősebb ivarsejthiányos fenotípust mutató tropomiozin allél vizsgálata során kiderült, hogy a fehérje az oskar mRNS aktin-kortexhez való rögzítésében játszik meghatározó szerepet. A 14. ábrán bemutatott kísérletek szerint az RNS lokalizációs szignál manipulálásával mesterségesen anterior pólusra kényszerített Oskar mRNS azonban transzlációképes maradt ektopikus környezetében is. Utóbbi jelenségnek mi lehet a magyarázata? A tropomiozin aktin kötése kalcium érzékeny. Az intracelluláris kalcium szint változik-e a *Drosophila* petesejtben, időben és térben?

A hobo-mutagenézises kísérletsorozatban azonosított életképes, anyai hatású ivarsejthiányos Poirót nullmutáció vizsgálata során az előbbi génnek az Oskar fehérje poszterior pólusú lokalizációja biztosításában állapították meg a szerepét. Vajon a Poirót gén mRNS vagy fehérje terméke rendelkezik ilyen szereppel, és vajon ez a szerep közvetlenül érvényesül-e vagy további közvetítő molekulák révén? Az *in situ* transzlálódó rövidebb és hosszabb Oskar fehérje differenciális helybentartásában fogalmazza meg a Poirót szerepét – a 19. ábrán viszont a teljes Oskar fehérje mennyiség eltűnni látszik a poszterior pólusról. A Poirót

¹ A bírálatot olyan módon készítettem el, hogy a disszertációt magát nem ismerő (a védés aktusán jelen lévő) kollégák a dolgozat gondolatmenetéről képet kaphassanak. Ennek megfelelően a kérdéseimet, felvetéseimet, megjegyzéseimet olvasónaplószerűen említem. Ezek aránylag nagy számát a disszertációban leírt kutatások izgalmas volta, az opponensben felkeltett őszinte érdeklődés magyarázza.

mutáció rövid Oskar fehérje kifejeződésre kifejtett szelektív hatása inkább transláció-szintű, a kisebb fehérje translációját biztosító hatásra utalna - a jelenséget kívülről és először szemlélő, más területeken jártas bíráló számára.

Az általuk módosított géncsapdázó transzpozon rendszer segítségével azonosították a moesin gént, mely a *Drosophila*-ban jelen lévő egyetlen ERM fehérjét kódolja. Utóbbi tény az állatot a fehérje család funkcióinak vizsgálatára egyedülállóan alkalmassá teszi, mint azt a 25. ábrán bemutatott szubkortikális aktin váz moesin mutáns állatban kimutatható morfológiai változásai mutatják. Az ábrán szereplő képek értelmezése, leírása a bíráló számára nem magától értetődőek: a kortextről való aktin leválást kevésbé, a kadherin festéssel megfigyelt szerkezeti elemek durvább rostozottságát sokkal inkább diagnosztizálnám. Irodalmi adatot is találtam, mely kapcsolható ehhez az alternatívához: a *Genes & Dev.* 2007. 21: 483-496 közleményben a microtubulusok kadherin-klaszterizációt indukáló szerepére utaltak szerzői *Drosophila* epiteliumban. Továbbá: nem lehetséges, hogy a moesin kadherint tartalmazó sejtkapcsoló szerkezetekben is fontos szerepet játszhat? A *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11, 276–287 (1 April 2010) közleményben szereplő 3c ábra megfelelhetne egy ilyen interpretációnak is.

A moesin mutáció hatására bekövetkező Oskar mRNS és fehérje lokalizációs eltérések morfológiai többféleségének – egy szigorúan ellenőrzött rendszerben - mi lehet a magyarázata? Mivel az aktin filamentumokkal így is kolokalizáció mutatkozik, mindez nem arra utal, hogy az aktin helyett-mellett valami más molekuláris szereplő közreműködése révén idéz elő Oskar lokalizációs zavart a moesin mutáció? Az aktin közvetlen Oskar kötő képességét biokémiai eszközökkel is vizsgálták-e már? A kolokalizációk kvantitatív és objektív, korrelációs analízise scatter-plot-okon megtörtént-e?

A továbbiakban a moesin szerepkörének vizsgálatára létrehozott moesin-GFP kiméra *Drosophila* S2 sejtekben és embriókban megfigyelhető lokalizációját tanulmányozták és azt a meglepő megfigyelést tették, hogy a moesin a sejtmagokban is jelen van, az osztódó sejtekben orsószzerű elrendezésben. Az interfázisban kevés moesin volt kimutatható, ill. az citokinézis során eltűnik; mindez és a magi aktinnal kimuttott kolokalizáció eloszlátja az opponensben felmerülő kételyt, hogy esetleg a fehérje a sejtmembrán ill. a citoplazma felől deponálódna prometáfázist követően az osztódási orsóra. Rendelkeznek-e a citoplazmában és a magban lokalizált moesin mennyiség sejtciklus függéséről kvantitatív adatokkal is?

Fentieknek az orsómátrix modell keretében történő értelmezése mellett szóba jön olyan modell is, mely a magi aktint tartalmazó molekuláris komplexek szerepét nem - a Szerző megfogalmazása szerinti - passzív „kaptafaként”, hanem éppen az aktív kromoszóma mozgások kivitelezésében tételezik fel: *Cell Motil Cytoskeleton.* 2008 Nov;65(11):876-89. Beilleszthetők-e a disszertációban tárgyalt adatok ezen utóbbi modell kereteibe is?

A moesin elhallgattatásnak látványos, de sejtenként változó hatása volt a mitotikus orsó szerkezetére. Talán érdemes lenne az elhallgattatás (ill. megmaradó moesin kifejeződés) sejtenkénti mértékével korrelációban megvizsgálni a morfológiai változásokat, kiderítendő, hogy a különböző típusú rendellenességek nem az intracelluláris moesin mennyiség aktuálisan elért küszöbértékétől függenek-e? A tripoláris orsók és rendellenes kromoszóma szegregáció más, pl. centrioláris diszfunkció esetén is létrejön. Checkpoint útvonalak vajon aktiválódtak-e ezekben a sejtekben? Utóbbi mozzanat esetleg a dolgozatban ezután érintett, érzékenyített genetikai hátterek kialakításával kapcsolatosan vethet fel új kísérleti és értelmezési lehetőségeket.

Tekintettel a transzpozonos mutagenézis inszerciós preferenciáira és az erős funkcióvesztéses fenotípusok kizárólagosságára, az ivarsejtek fejlődésének további tanulmányozása céljából a mozaik analízis és a genetikai interakciós rendszerek által biztosított eszközök alkalmazására tért át. Előbbi kudarc nyomán – melyről tanulságos összefoglaló olvasható a dolgozatban -, az egyes gének által okozott fenotípusok kölcsönhatásának vizsgálatába fogott. Ehhez ismert ivarhiányos mutációkból érzékenyített genetikai háttereket hoztak létre. Az ezt a projektet bevezető elvi áttekintésben idézett Oskar koncentráció függés és a dolgozat kezdetén idézett Oskar-null allélek által előidézett petefejlődési zavar nélküli fenotípus létezése közti ellentmondás a nem *Drosophila*-szakember nem-genetikus bírálót zavarba ejtette. Vagy az egyébként sajnos nagyszámú elírás egyike okozhatott a bírálónak fejtörést. A transzpozonok inszerciós preferenciája esetleg interpretálható-e a *Drosophila* ma már behatóan ismert epigenetikai térképe alapján?

A következőkben leírtak szerint Oskar-tropomiozin duplamutáns érzékenyített háttereken ivarhiányos fenotípust erősítő mutációkat találtak, melyek egyetlen komplementációs csoportba voltak sorolhatók és a Rab 11 gént identifikálták. A Rab 11 mutánskezdemények sajátos Oskar lokalizációs zavara a petesejt mikrotubulus rendszerének polaritását befolyásoló egyéb mutációk fenotípusára emlékeztet és a mikrotubulus rendszer polaritási viszonyainak megváltozását ki is tudták mutatni a Rab 11 mutáns petekezdeményekben. A zavart elrendeződésű mikrotubulusokon a kinezin motorfehérje általi, mikrotubulus menti Oskar mRNS szállítás hiúsul meg, meggyőző modelljük szerint. Vajon a kétféle Oskar fehérje lokalizációja mindeközben hogyan változik meg?

A transzheterozigóta érzékenyítő hátterek alkalmazási korlátait túllépve, hármass heterozigóta kombinációt állítottak elő. Az enhanszer fenotípusok penetrancia értékeit a normál eloszláshoz viszonyítva állapították meg azt a küszöb penetrancia értéket, mely már a tesztelt gén hozzájárulását tükrözheti. Vajon matematikailag a normál eloszláshoz való viszonyítás a küszöbérték pontos megállapítása szempontjából optimális eljárás-e? A normál eloszlás változója végtelen számú valószínűségi változó összegzéseket áll elő – ami itt néhányra zsugorodik. Mindenesetre a megalkotott SOT szűrési rendszer nem csak ivarsejthiányos fenotípusok megjelenését előidéző újabb gének azonosítására látszik kiválóan alkalmasnak, hanem rendszerbiológiai megfigyelésekre is. Utóbbival valóban nagy gyakorlati jelentőségű távlatok nyílhatnak, a bakteriális anyagcsere hálózatok viselkedéséről idézett több hatáspontú gyógyszerek kifejlesztését javasoló-támogató adatok fényében.

További ivarsejt specifikus gének azonosítása céljából - a szakterületen viszonylag kevés új megfigyelést eredményező reverz genetikai megközelítések tanulságait felhasználva - az ivarplazma RNS-einek ivarplazma mennyiségtől függő stabilitását mérve, számos ilyen - és in situ hibridizációs kísérleteik és irodalmi adatok szerint a pete megfelelő helyén lokalizálódó - mRNS-t találtak.

Az összes eddig azonosított, a gonádfórmálódásban szerepet játszó RNS-t magában foglaló értékes gyűjteményükre géncsendesítésre épülő funkcionális vizsgálatokat terveztek, melynek során GFP-t kifejező ivarsejtek megjelenését követték videomikroszkópia segítségével a dsRNS-ek preblasztoderma embrióba való injektálását követően, meggyőző negatív és pozitív kontrollokhoz képest. A nagy körültekintéssel azonosított RNS-eket hierarchikus klaszterezéssel fenotípus-kategóriákba sorolták, rejtett összefüggésekre bukkanva és az ivarsejtfejlődési részfolyamatokban szerepet játszó gének együttműködő és kölcsönható csoportjait megismerve. Vajon az emberi patológiában előforduló fejlődési zavarok

tekintetében milyen tanulságok vonhatók le az így nyert általános képből? Nemi hormonok előállításáért, szekréciójáért, hatásáért felelős géntermékek pl. vannak-e a gyűjteményben?

A nagyívű, óriási tudáskincset hosszú évek szisztematikus és következetes munkájával felhalmozó kutatási program 70 oldalon történő leírását kb. 20 oldalas, szokatlanul részletes Anyagok és Módszerek rész, majd a kb. 100 referencia jegyzéke követi. A saját közlemények listája egy 1995-ös elsőszerzős Nature cikkel indul, melyet 7 másik, általában igen rangos lapokban megjelent és Erdélyi Miklós kolléga a disszertációban vázolt kutatásokat meghatározó szerepét alátámasztó szerzői névsorú közlemény listája következik, majd számos nem ide sorolt, izgalmas közleményé. Az össz impakt faktor (137) és a független citációk száma (majdnem 700) bőven megfelel az MTA írásban rögzített elvárásainak. Mindezek és a dolgozatban összefoglalt munka alapján semmi kétségem nincs afelől, hogy az MTA doktori fokozat a pályázót – sikeres védelem nyomán - megilleti és a hazai biológiai kutatások egyik legfontosabb pillérét adó szegedi genetikai iskola tanári karának a Köszönetnyilvánításban meleg szavakkal elismert névsora újabb kanonizált taggal bővíthet.

Szabó Gábor

az MTA doktora

DEOEC, Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet

Debrecen, 2011. szeptember 5.