

Válasz Prof. Szabó Gábor opponensi véleményére

Tisztelettel köszönöm Szabó Gábor professzor úr rendkívül gondos bírálói munkáját. Igen jól esett, hogy a bíráló jobbjára a bemutatott eredmények továbbgondolásából illetve a bírálóban felvetődő kérdésekből áll. Ez Szabó Gábor professzor úrnak munkám iránti kitüntető érdeklődését mutatja melyet megtiszteltetésnek tartok csakúgy, mint a bíráló utolsó mondatát, melyben bírálom a szegedi genetikai iskola tagjának ismer el.

A bírálóban felvetett kérdéseket a következőképpen válaszolom meg.

„...az *Oskar* anyai sejtben átvitt 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?”

Mhlanga és mtsai. (PLoS One. 2009; 4(7): e6241) fluoreszcensen jelzett egyedi *oskar* RNS molekulák megfigyelése során mutatják meg, hogy egy *oskar* RNP több *oskar* RNS molekulát is tartalmaz. Mindez áttételesen arra utal, ahogyan cikkükben megfogalmazzák, hogy az *oskar* RNS oligomerizálódásra képes. Újabb eredmények alátámasztják ezt a következtetést. Anne Ephrussi és munkatársai az RNA című folyóirat 2011. decemberi számában (17(12) 2049) az *oskar* RNS 3' nem transzlálódó 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 nagyban megerősítik, hogy az *oskar* RNS molekulák közötti kapcsolat az RNP szervező ereje lehet.

„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? „

Az *oskar* RNS fehérje kódoló és a *bicoid* RNS 3' nem transzlálódó régiójából álló kiméra RNS *bicoid*-szerűen, az anterior részen lokalizálódik. Megfigyeléseink szerint a kiméra RNS transzlációja a Bicoid fehérjénél megszokott időben és mintázat szerint történik. Vagyis a kiméra esetében az *oskar* RNS kódoló része azért maradt transzláció képes, mert a *bicoid* RNS cisz transzlációs kontrol elemeinek befolyása alá került. A Bicoid fehérje transzlációjáról pedig saját kísérletek alapján tudjuk, hogy nem tropomiozin-függő módon megy végbe.

„A tropomiozin aktin kötése kalcium érzékeny. Az intracelluláris kalcium szint változik-e a *Drosophila* petesejtben, időben és térben?”

A kalcium szintjét, illetve annak esetleges változását a *Drosophila* petekezdemény fejlődése során magunk nem mértük, és ilyen mérésről nem tudok. Ismert azonban, hogy az érett petében az ún. aktiválási folyamat során emelkedett kalcium szint mérhető (Horner és Wolfner *Dev Biol.* 2008. 316(1): 100–109.) Mivel az *oskar* RNS lokalizációja és transzlációja jóval a peteaktiválás előtt elkezdődik, az aktiválás során mért kalcium szint változás nagy valószínűséggel nincs hatással az *oskar* RNS lokalizációban szerepet játszó tropomiozin aktin kötésében.

„A *hobo*-mutagenézises kísérletsorozatban azonosított életképes, anyai hatású ivarsejthiányos *Poirot* nullmutáció vizsgálata során az előbbi génnek az *Oskar* fehérje poszterior pólusú lokalizációja biztosításában állapították meg a szerepét. Vajon a *Poirot* gén mRNS vagy fehérje terméke rendelkezik ilyen szereppel, és vajon ez a szerep közvetlenül érvényesül-e vagy további közvetítő molekulák révén?”

Minden bizonnyal a *Poirot* fehérjének az emberi *Sab* fehérjéhez hasonló aktivitására van szükség az *Oskar* fehérje helyben tartásában, mégpedig közvetett módon. Minderre a következő eredményeink utalnak.

A *prt* hatásmechanizmusának felderítésénél abból indultunk ki, hogy az emberi *Sab* (SH3 domain-binding protein that preferentially associates with BTK) fehérje a Bruton tirozin kináz (*Btk*) fehérje negatív regulátora (Yamadori és mtsai *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 25;96(11):6341-6.) A *poirot* (*prt*) génnek az emberi *Sab* génnel való homológiája alapján (Matsushita és mtsai. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998 17;245(2):337-43.) feltételeztük, hogy ez a negatív reguláló szerep is konzervált. Genetikai kísérletekkel beláttuk, hogy a *poirot* valóban a *Drosophila Btk* homológjának, a *Btk29A* nak negatív regulátora (*Btk* funkcióvesztéses allélek szuppresszálták a *poirot* funkcióvesztéses fenotípust). A *Btk29A* fehérje ismert az aktin polimerizáció egyik szabályozó fehérjéje (Thomas and Wieschaus *src64 and tec29 are required for microfilament contraction during Drosophila cellularization.* *Development.* 2004 131(4): 863—871). 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 benövés kialakításához. A *Poirot* fehérje hiánya ektopikus *Btk29A* fehérje aktivitást, ennek következtében rosszul koordinált poszterior aktin hálózatot, delokalizált rövid izoformát, végső soron ivarsejthiányos fenotípust eredményez.

„Az *in situ* transzlálódó rövidebb és hosszabb *Oskar* fehérje differenciális helybentartásában fogalmazza meg a *Poirot* szerepét – a 19. ábrán viszont a teljes *Oskar*

fehérje mennyiség eltűnni látszik a poszterior pólusról. A Poirot 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.”

A 19. ábrán indirekt immunofluoreszcencia módszerrel mutatjuk meg az Oskar fehérje lokalizációját vad típusú és *poirot* mutáns petekezdeményeken. Az 19E és 19G ábrán nincs festődés a poszterior póluson. Modellünk szerint a hosszú és a rövid izoformát egyaránt felismerő ellenanyag segítségével a *poirot* mutáns petekezdeményekben a poszterior lokalizációjú hosszú Oskar izoformát mindig látnunk kellene. Úgy vélem, hogy az ellentmondás magyarázata az indirekt immunofluoreszcencia csekély érzékenységében keresendő. A rövid izoformához képest sokkal kevesebb mennyiségben jelen levő hosszú izoformát (ld. 20. ábrán az izoformák arányát bemutató western blot-ot is) ezzel a vizsgálattal nem (19E, 19G) vagy alig (19F, 19H ábrarészlet) tudjuk kimutatni. Mindazonáltal az előző kérdésre válaszként ismertetett hatásmechanizmus felismerése után sem nem zárható ki, hogy a Poirot fehérje részt vesz izofoma specifikus translációs szabályozásban is.

„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 mikrotubulusok kadherin-klaszterizációt indukáló szerepére utaltak szerzői Drosophila epiteliumban.

Az aktin-kadherin kolokalizációt hagyományos konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk. Ennek a mikroszkópiának felbontása nem teszi lehetővé, hogy membrán fehérjék elhelyezkedésének finom analízisét megtegyük. Így az E-kadherin festéssel megfigyelt szerkezeti elemek durvább rostozottságát nagyobb felbontást biztosító mikroszkópiával kellene ellenőrizni. A kérdésben említett közlemény a mikrotubulusok kadherin-klaszterizációt indukáló szerepét a Drosophila epiteliumban úgy foglalja össze, hogy a mikrotubulusok növekvő végei a Clip-170 és Rho-GEF fehérjéket a kortex közelébe juttatják, ahol ennek hatására a Rho kináz aktivitás megnő, ami egyéb fehérjékkel együtt e-cadherin-klaszterizációt eredményez. A Drosophila petekezdemény fejlődése során a mikrotubulusok növekvő végei stádiumról stádiumra változóan ugyan, de jól ismert irányokba mutatnak (Januschke J és mtsai. The centrosome-nucleus complex and microtubule organization in the Drosophila oocyte. Development 2006. 133(1):129-39.). Az általunk a *Moesin* mutánsokban megfigyelt Aktin-Kadherin kolokalizáció megszűnésének helye, ahol az E-cadherin eloszlás megváltozását látja bírálóm nem esnek egybe a mikrotubulus növekvő végek elhelyezkedésével. Ez alapján, ha nagy felbontású mikroszkóppal kadherin-klaszterizációra utaló jeleket látnánk, annak okát nem a mikrotubulusok polarizáló hatásával lehetne magyarázni.

„.....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 fehérje minden bizonnyal szerepet játszik a Kadherint tartalmazó sejtkapcsolók szerkezetének kialakításában, illetve fenntartásában. Erre a lehetőségre világosan utal a kérdésben említett összefoglaló 3C ábrája. Az *oskar* RNS lokalizációt, illetve a *moesin* mutánsokban a szubkortikális aktin-leválást azonban Kadherintől független mechanizmussal magyarázzuk. Ebben megerősít bennünket maga az idézett összefoglaló is. Az összefoglaló Richard G. Fehon-tól, az ERM fehérjék elismert szakértőjétől való, aki azon túl, hogy idézi cikkünket, abban a megtiszteltetésben is részesíti munkánkat, hogy a 3A jelű ábrán bemutatja a dolgozatomban leírt modellünket. Az ábrán az látható, hogy a membránfehérjéket kötő FERM és az aktin kötő C-ERMAD doménjével a Moesin fehérje a petekezdemény aktin vázát a kortexhez rögzíti, és az így rögzült szubkortikális aktin köti az *oskar* RNS-t. Ez a modell, mely Kadherinek szerepével nem számol gyorsan elfogadottá vált. K.G. Miller „A role for moesin in polarity” című, néhány hónappal a Moesinnek az Oskar lokalizációban betöltött szerepéről írt cikkünk megjelenése után a Trends in Cell Biology folyóiratban <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=miller%20moesin%20drosophila> között (2003 Apr;13(4):165-8) review-jában ábrával mutatja Oskar lokalizációról alkotott modellünket melyben a Moesin szerepe a szubkortikális aktin hálózat stabilizálása.

„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?

Valóban a 26. ábrán több Oskar fehérje lokalizációs hibát mutatok meg. A többféle fenotípust azzal magyarázom, hogy a vizsgálatokat hipomorf allélkombinációval kellett végezni, hiszen a *Moesin* amorf allélek letalitást okoznak. A gyenge allélek nem teljes penetranciával és expresszivitással jellemezhetőek, melyek átmeneti fenotípusokat okoznak. A fő következtetés levonását lehetővé tevő fenotípus (26C, 26D ábra), amikor a kortextről levált aktin hálózaton lokalizálódik az Oskar fehérje. Ebből a fenotípusból vontuk le a következtetést, hogy az aktin hálózat maga, és nem a kortex egyéb elemei felelősek az Oskar fehérje helyben tartásáért. Ennél enyhébb fenotípus az, amikor az Oskar fehérjét a szubkortikális aktinon, de a poszterior pólusról mintegy elcsúszva látjuk (26E ábra). Ezt a gyengébb fenotípust azzal magyarázom, hogy kisebb mértékű Moesin hiány esetén a membrán-aktin keresztkötés nem szűnik meg, csupán meglazul, ami a szubkortikális aktin hálózatnak a membrán síkjában való elmozdulását teszi lehetővé. Az ilyen elmozdulás a kezdetben helyesen a poszterior póluson lokalizált Oskar fehérje oldal irányú elmozdulását eredményezi. A 20B ábrán az aktin hálózattal nem kolokalizáló Oskar fehérjét is látunk. Úgy vélem, hogy ez a fenotípus a „kortextről leváló aktin hálózat” fenotípusból degradáció útján jön létre. A kortextről levált Aktinnal az Oskar fehérje is leválik, majd a levált aktin hálózat lebomlásával az Oskar fehérje szabaddá válik. A szabad Oskar fehérje megjelenését a levált

aktin hálózatnak az ektopikus Oskar fehérjénél gyorsabb ütemű degradálódása tenné lehetővé. A magyarázat jelen pillanatban feltételezésen alapul. Az ektopikus Oskar fehérje és az ektopikus aktinhálózat stabilitáról kísérletes adatom nincs.

„Az aktin közvetlen Oskar kötő képességét biokémiai eszközökkel is vizsgálták-e már? A kolokalizációk kvantitatív és objektív, korrelációs analízise scatter-plot-okon megtörtént-e?”

Mindezidáig az Oskar fehérje Aktin kötő képességét nem vizsgáltuk és az irodalomban sincs utalás közvetlen Oskar-Aktin kötődésre. Feltételezem, hogy az Oskar fehérje komplexben, más fehérjékkel együtt, áttételesen kötődik az aktin vázhoz. Jelenleg ennek a feltételezett komplexnek egyetlen tagja sem ismert.

Az Aktin-Oskar illetve E-kadherin-Aktin kolokalizációk kvantitatív analízisét nem végeztük el. Úgy vélem, hogy a jelenleg meglévő konfokális mikroszkópi felvételek kvantifikálásánál jobb eredményt adna, ha szuperrezolúciós fénymikroszkóppal (pl. STORM, STED vagy PALM) új megfigyeléseket végeznénk. A Szegedi Biológiai Kutatóközpontban szerencsére hamarosan módunk lesz elvégezni ezt a kísérletet egy újonnan beszerzett STED mikroszkóp segítségével. Az Oskar-Aktin kolokalizáció szuperrezolúciós mikroszkópiával való leírását tervezzük.

„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 kimutott kolokalizáció eloszlata 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? „

Kvantitatív összehasonlításokat nem végeztünk. A meglévő konfokális mikroszkópos felvételeink lehetővé teszik az adatok számszerűsítésének elvégzését. Egyet értek bírálómossal, hasznos lenne a méréseket elvégezni. Mentségünkre szolgál, hogy a Moesin fehérje magi elhelyezkedésének kvalitatív leírásával sem végeztünk még. Vilmos Péternek és Kristó Ildikónak a dolgozatban be nem mutatott új eredményei szerint a Moesin, interfázisban a kromoszómákkal, azoknak is a transzkripciósan aktív régióival asszociál. A Moesin eloszlás magosztódás során való részletes megfigyeléseivel, valamint a Moesin orsómátrix fehérjék közé sorolásával sem végeztünk még.

„Fentieknél 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? „

Az aktin alapú orsómátrix kromoszómamozgató szerepét több kísérlet is alátámasztja melyeket Forer és mtsai. a Protoplasma 2008 232: 137–141 számában kiválóan összefoglaltak. Ez irányú kísérleteket a dolgozat beadása óta magunk is folytattunk. Vilmos Péter és Szikora Szilárd Szabad János laboratóriumában mikrotubulus és aktin depolimerizáló drogokat injektáltak (kolcemid, cytochalasin D) Drosophila korai embriókba és videomikroszkópiával figyelték a sejtek osztódását. Megfigyelték, hogy a mikrotubulusok teljes lebontása után is folytatódott a kromoszómák szegregációja. Amennyiben azonban az aktin hálózatot is depolimerizálták ez a mikrotubulus független szegregáció megszűnt. Tehát saját kísérleteink szerint is a magi aktin hálózat képes a kromoszómákat mozgatni. Következő lépésként szeretnénk orsómátrix fehérjék köztük a Moesin kromoszómamozgásban való szerepét megmutatni.

„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.”

A tripoláris orsókat *Moesin* csendesített *Drosophila* S2 sejtekben mutattuk meg először. A csendesítést long hairpin RNS transzfekciójával valósítottuk meg. A rendszer sajátossága az, hogy a bejuttatott long hairpin RNS koncentrációja, és ezzel együtt a csendesítés mértéke sejtről sejtre változik. Ennek megfelelően valóban több fenotípust kaptunk. A csendesítés mértékét a fenotípussal csak úgy lehetne korreláltatni, ha minden egyes sejtben mérni tudnánk a *Moesin* fehérje szintjét. Erre a feladatra laboratóriumunkban nem vagyunk felkészülve. A dolgozat beadása óta Vilmos Péter és Kristó Ildikó *Moesin* hiányos *Drosophila* neuroblasztokban is kimutatták a tripoláris orsók megjelenését, ami arra utal, hogy nem sejtenyészetek bizonytalan kezelési módjából adódó műtermékkal van dolgunk. A *Drosophila* rendszer arra is alkalmas, hogy a *Moesin* szintet megfeleltessük a kapott fenotípusoknak. Jelenleg ezen dolgozunk. A *Moesin* mutánsokban a checkpoint útvonalak aktiválódásának mérését nem végeztük el.

*„Tekintettel a transzpozonos mutagenézis inszerció 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 kudarca 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 okozhatta a bírálónak fejtörést.”

A dolgozat általános bevezetője és az interakciós vizsgálatok bevezető mondatai nincsenek ellentmondásban egymással. Klasszikus értelemben vett elírás sincs a szövegben. Igaz azonban, hogy egyértelműbben is fogalmazhattam volna. Amennyiben a 46. oldal negyedik sorában „ivarsejthiányos fenotípus” helyett „embrionális ivarsejthiányos fenotípust” írtam volna elkerülhettem volna a félreértést. Itt megkísérlem az *oskar* fenotípusok tisztázó felsorolását:

Az *oskar* RNS null allélek a petekezdemények elhalását okozzák. Ennek megfelelően az RNS null homozigóta nőtények nem raknak petéket. Az Oskar fehérje null allélekre homozigóta nőtények alakra teljesen fejlett petéket raknak, melyekben azonban embrionális ivarsejteket nem tartalmazó embriók fejlődnek. Ezekben az embriókban egy járulékos fenotípus is megfigyelhető ez pedig az potroh hiány. Vagyis az Oskar fehérje hiánya nem okoz petefejlődési zavart. Léteznek hipomorf *oskar* allélek is, melyek csökkent mennyiségű Oskar fehérjét eredményeznek. Az Oskar fehérje mennyiségének csökkenése embrionális ivarsejthiányos, további csökkenése pedig embrionális ivarsejt és abdomenhiányos kettős fenotípushoz vezet. Azaz az Oskar fehérje az embriókban koncentrációfüggő módon hat. Interakciós rendszereink az Oskar fehérje szintjének alkalmas csökkentésén alapulnak, amikor átmeneti embrionális ivarsejthiányos és abdomenhiányos fenotípusok alakulnak ki. Az interakciós rendszerek alkalmazásával ezeknek az átmeneti fenotípusoknak penetranciáját és expresszivitását módosító alléleket kerestünk és találtunk.

„A transzpozonok inszerciók preferenciája esetleg interpretálható-e a Drosophila ma már behatóan ismert epigenetikai térképe alapján? „

Ilyen irányú vizsgálatokról nem tudok.

„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 identifkálták. A Rab 11 mutánskezdemények sajátos Oskar lokalizációs zavara a petesejt mikrotubulus rendszerének polaritását befolyásoló egyéb mutációk fenotípusára emlékeztett 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?”

Ivarsejt klónanalízissel előállított Rab11 hiányos petekezdeményekben egyáltalán nem lehet Oskar fehérjét kimutatni (Dollar G, és mtsai. Development. 2002 Jan;129(2):517-26 7F ábra). Ez a megfigyelés jól magyarázható az érvényben lévő *oskar* RNS lokalizációs modellel, amely kimondja, hogy a transláció a poszterior pólus eléréséig gátolt. A *Rab11* fehérje hiányos petekezdemény az *oskar* RNS nem érkezik meg a poszterior pólusra, így annak tanszlációja is elmarad. Hipomorf allélek kombinációjával átmeneti *Rab11*

fenotípusokat is leírtunk, amikor vannak olyan petekezedmények, melyekben az *oskar* RNS-ek egy része eljut a poszterior pólusra. Itt a transláció beindulhat, azonban a keletkező Oskar izoformák arányát izoforma specifikus ellenanyag hiányában megmondani nem tudjuk.

„A transzheterozigóta érzékenyítő hátterek alkalmazási korlátait túllépve, hármas 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? „

Az interakciós rendszerek alkalmazása során kivétel nélkül mindig folyamatos fenotípus eloszlást lehet kapni. A kísérletek eredményének értékelése során mindig felmerül mi tekinthető szignifikáns interakciónak. Legtöbbször önkényes küszöbértéket határoznak meg pl. a kontrol fenotípus érték kétszerese. A mi esetünkben ezt a küszöbértéket a kontrol négy és félszeresénél, tehát igen magasan határoztuk meg. A normál eloszláshoz való viszonyítás valóban nem szabatos eljárás.

„Az összes eddig azonosított, a gonádformálódásban 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 kontrollokhöz 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? „

Az RNS interferenciás vizsgálatsorozatunk végeredménye egy félszáz génből álló lista. Ezen gének közül háromnak van olyan emberi homológja, melyhez meddőséggel kapcsolatos kórképet társítottak már. A *Drosophila belle* gén emberi homológja a *DDX3Y* (DEAD box polypeptide 3, Y-linked), valamint a *CG9576* *Drosophila* gén *PHF7* (PHD finger protein 7) nevű humán homológjának mutációja férfi meddőséget, a *Drosophila nanos* gén *Nanos3* nevű humán homológja férfi és női meddőséget okoz. Ezen felül az *Orb*, *CycB*, *CyCA*, *ovo*, *Klp10A* és *dsx* *Drosophila* géneknek ismertek egér homológjai, melyeknek az egér ivarsejtfejlődésben, meiózis szabályozásban vagy petefészek- és herefejlődésben betölt szerepe már ismert. A legnagyobb valószínűséggel ezeknek a géneknek a humán homológjai megfelelő humángenetikai vizsgálatok után szintén meddőséggel kapcsolatos kórképekhez köthetők majd.

Végezetül újra megköszönöm Szabó Gábor professzor úr munkám iránti megtisztelő érdeklődését, valamint azt, hogy dolgozatom alapján a fokozat odaítélését javasolja.

Szeged, 2012. október 29.

Erdélyi Miklós