

MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA
SZEGEDI BIOLÓGIAI KÖZPONT
BIOKÉMIAI INTÉZETE
6701 SZEGED, PF 521
Tel: 62-599-664
Fax: 62-433-506
E-mail: udvardy@brc.hu

Vélemény Dr. Mihály József „A szöveti polaritás és egy új aktin sejtvázas szabályozó fehérje vizsgálata *Drosophila melanogaster*ben” című doktori értekezéséről.

Dr. Mihály József doktori disszertációja a fejlődésbiológia egy speciális kérdéskörét érinti, a szöveti polarizáció kialakulását és szabályozását meghatározó gének azonosításával és funkcionális jellemzésével foglalkozik. A munka a *Drosophila melanogaster* több mint 100 éves kiváló genetikai és fejlődésbiológiai háttérét használja fel, és a vizsgált kérdéseket a molekuláris és sejtbiológia legmodernebb módszereivel közelíti meg. Kísérletes megközelítése „klasszikusnak” tekinthető abban az értelemben, hogy szemben napjaink divatos kutatási irányzataival eredményeit nem komputer-vezérelt robotokkal nyert több tíz-, vagy százezres mérésekből származtatja, hanem a *Drosophila* egyetlen szörszálának megfigyelésével, és a kreatív emberi ész absztrakciójával képes mélyreható következtetéseket levonni a jelenség biológiai háttérét meghatározó molekuláris- és sejtbiológiai történésekről. Személy szerint én ezt a kutatási filozófiát értékelem nagyra.

A disszertáció bevezető része kiváló összefoglalást ad a jelölt munkájának tudományos háttérét jelentő irodalmi adatokból. Az összefoglalás nemcsak világos, informatív és érthető, hanem tartalmazza Mihály József egyéni értékelését, véleményét is az adott kérdéstről (lásd 19. oldal), ami az irodalmi bevezetés színvonalát és értékét feltétlenül emeli.

Saját kísérletes munkáiban egy évtized kutatási eredményeit foglalja össze. Vizsgálataik első csoportjában a Frizzled receptorok jelátviteli specificitását vizsgálták, azt a kérdést analizálták, hogy egy receptor fehérje hogyan képes különböző szövetekben, a fejlődés különböző szakaszaiban teljesen különböző sejtválaszokat generálni. Az egymással nagyfokú homológiát mutató Frizzled 1 és Frizzled 2 receptorok molekuláris analízisével bizonyították, hogy a planáris sejtpolarításban betöltött eltérő szerepük intracelluláris doménjük különböző szerkezetének következménye, amely eltérő affinitást eredményez a receptoroknak a jelátviteli úton következő kapcsolódó effektoraihoz. Vizsgálataik ezen csoportjában megállapították továbbá, hogy a Frizzled receptorok több transzkripciós faktor (Fos, Yan és Pnt) valamint az EGFR jelátviteli rendszerrel kölcsön hatva szabályozzák az R3/R4 fotoreceptor sejt pár sorsát, ami meghatározó lépés a Drosophilák összetett szemében lejátszódó szöveti polarizálódás folyamatában.

A disszertáció kiemelkedően fontos részének tartom azt a nagyléptékű mutagenézis kísérlet sorozatot, melynek segítségével azonosítani sikerült számos új, a planáris sejtpolaritást szabályozó gént. A munka értékét az előállított mutáns gyűjtemény, szépségét az a szellemes, a jelölt munkacsoportja által kidolgozott genetikai mozaikosságon alapuló módszer adja, amely egy adott mutációra heterozygota mutáns egyedben homozygota fenotípus vizsgálatát tette lehetővé.

A mutagenézis kísérletek során azonosított planáris sejtpolaritási gének közül részletesen analizálták a Rab23 kis molekulású GTPase fehérjének szerepét az adult epidermiszt borító trichomák szöveti síkban történő polarizálódásában. Bizonyították, hogy a Rab23 az elsődleges sejtpolaritási gének egyikével, a Pk fehérjével asszociál, feltételezésük szerint a Pk fehérje vezikuláris transzportjának biztosítása révén.

A disszertáció utolsó nagy témája részletesen tárgyalja a *Drosophila* DAAM fehérjének a planáris sejtpolaritás kialakításában és fenntartásában betöltött szerepét. Konceptcionálisan ez a munka Dr. Mihály József egy újabb kutatói kvalitását mutatja be. Nem az előbb ismertetett mutáns-szelektálási módszer segítségével azonosított PCP gén vizsgálatát végezte el, hanem elméleti megfontolásokból kiindulva vizsgálták ezt a gént, és eredményeik bizonyították, hogy koncepciójuk, elgondolásuk helyes volt. Munkájuk során biokémiai és biofizikai módszerekkel részletesen jellemezték a *Drosophila* DAAM fehérje tulajdonságait, az aktin polimerizációjában betöltött szerepét. Miután bizonyították, hogy a *Drosophila* DAAM gén magas szinten expresszálódik a fejlődő embrionális légcsőrendszerben, analizálták a gén szerepét abban a planáris sejtpolaritási folyamatban, amely a légcsőrendszer fejlődését kíséri. Kimutatták, hogy a DAAM fehérje szoros kolokalizációt mutat az apikális aktinkötegekkel, és DAAM mutánsokban az apikális aktinkötegek száma, lefutása és szerkezete abnormálissá válik. Ebből azt a fontos, és teljesen újszerű következtetést vonták le, hogy a DAAM fehérjének az aktin polimerizáció irányításában betöltött szerepe kritikus a planáris sejtpolarizáció szabályozásában.

A DAAM gén mutációinak analizálásával bizonyították, hogy a fehérje meghatározó szerepet játszik az embrionális központi idegrendszeri axonok növekedésében. Elsőként vetették fel azt a fontos gondolatot, hogy az aktin összeszerelő faktorként működő DAAM fehérje számos más fehérje faktoral kooperációban egy fontos molekuláris effektor funkciót tölt be.

Összefoglalóan a jelölt tudományos munkásságának legnagyobb értékét abban a technikailag és konceptcionálisan komplex megközelítési módban látom, amellyel a molekuláris sejtbiológia egy izgalmas, és nehezen megközelíthető kérdését, a planáris sejtpolaritás mechanizmusát tanulmányozta. Vizsgálatai során messze túllépett a

klasszikus genetikai vizsgáló módszerei nyújtotta lehetőségektől, a biokémia, biofizika és sejtbioológia legmodernebb módszereit alkalmazta. A disszertációt világos, érthető stílusban prezentálta, ábrái informatívak és igényesek, különösen értékesnek tartom a gazdag irodalmi hivatkozási listát, amely a disszertációt a témakör értékes összefoglaló munkájává teszi.

A disszertáció olvasása során az alábbi kérdések merültek fel bennem:

1. A Frizzled 1 és 2 receptorok egymástól eltérő biológiai hatásának vizsgálatakor ellenőrizték-e a transzgenek expressziójának mértékét, vizsgáltak-e több különböző genomális helyre integrálódott transzgen biológiai hatását, van-e adatotok a transzgenek által kódolt Fz1 és Fz2 fehérjék féléletidejére? A transzgenek különböző szintű expressziója, vagy az általuk kódolt fehérjék különböző stabilitása magyarázhatja, hogy LOF mutánsokban a két receptor a kanonikus Wnt/ β -katenin jelátviteli útban egymást helyettesíteni tudják, de a transzgenikus állatokban biológiai hatásuk lényegesen eltérő. LOF mutáció esetében már egy kis mennyiségű fehérje is képes a mutációt menekíteni. A *Xenopus* rendszerben nyert eredmények nem összevethetők teljesen a *Drosophila* transzgenikus állatokban észleltekkel. *Xenopus* oocyták esetében kész mRNS-t injektáltak (feltehetően mindkét mRNS-ből azonos mennyiségeket), ott tehát expressziós különbség nem jöhet szóba. Még ebben a rendszerben is jelentős különbség van a transzlálódott receptor fehérjék mennyiségében (lásd az α -Myc immunoblot eredményét a 18. ábrán).
2. A dTAK funkcióvesztéses fenotípusának vizsgálatánál azt találtátok, hogy a dTAK domináns negatív formáinak embrionális kifejeződése nem befolyásolta az embrionális fejlődést. Kettős szálú csendesítő RNS korai embriókban történő injektálása után az embriók 20%-ban kutikula záródási hibákat

találtak. Ez a két adat ellentmondani látszik egymásnak, és ebben a domináns negatív mutáns hatása látszik biológiailag relevánsabbnak. Nem képzelhető el, hogy az RNSi kísérletekben a 20%-os záródási hiba artefaktum, az injektálás mechanikus károsító hatásának következménye?

3. Hogyan ellenőrizted, hogy a dTAK, p35 kettős transzgénikus állatban a dTAK expressziója legalább olyan magas, mint a dTAK egyszeres transzgénikus állatban? Alacsonyabb dTAK expresszió a kettős transzgénikus állatokban zavarhatja a p35 hatásának értelmezését. Nem világos számomra, hogyan értelmezhető, hogy a magas szintű dTAK túltermelés sejtthalt okozó káros hatását 18 °C-on ki lehetett védeni? Alacsonyabb hőmérsékleten nyilván alacsonyabb a transzgen expressziós szintje, de alacsonyabb az összes transzkriptum expressziója is.
4. Abból a tényből, hogy a Rab23 fehérje asszociál a Pk fehérjével nem következik egyértelműen, hogy a Rab23 PCP funkciója a Pk fehérje vezikuláris szállításán keresztül realizálódik. A 15. oldalon leírtak szerint a Pk fehérje citoplazmatikus, és a transzmembrán lokalizációjú elsődleges PCP fehérjék segítik elő a Pk fehérje membrán lokalizációját. Ha a Pk fehérje citoplazmatikus, akkor nem szállítódik a vezikuláris transzport úton. A Rab23 T69A mutációja kétségtelenül elrontja a fehérje GTPase aktivitását, de az egész fehérje konformációját is megváltoztathatja úgy, hogy elrontja a Pk fehérjével kialakított fehérje-fehérje kölcsönhatását. Kérdésem, hogy vizsgáltatok-e, hogy a Rab23 GTPase aktiváló fehérjéjének, vagy nukleotida kicserélő fehérjéjének mutációi előidéznék-e PCP fenotípust?

Kérdéseim természetesen nem kérdőjelezik meg a disszertáció téziseinek helyességét, a disszertáció magas tudományos értékét és a prezentált eredmények újszerűségét. A

jelölt publikációinak magas színvonala, a közlemények impakt faktora és idézettsége messze meghaladja az MTA Doktori Szabályzatában megjelölt követelményeket, ezért a doktori disszertációt nyilvános vitára alkalmasnak tartom.

Dr. Udvardy Andor

az MTA doktora