

Válasz Dr. Kiss István opponensi véleményére

Először is köszönöm Dr. Kiss Istvánnak, hogy doktori dolgozatomat igen alaposan áttanulmányozta, és hogy eredményeimet pozitívan értékelte. Köszönöm érdeklődő kérdéseit és megjegyzéseit is, amelyekre az alábbiak szerint válaszolok:

Megjegyzések az ábrákkal kapcsolatban:

1. „A 48. ábra (77. old.) magyarázatában a genotípusok jelzése nem egyértelmű: pl. a $stbm^{\delta}$; $Rab23^{51/+}$ kombináció a $stbm$ allélra valószínűleg homozigóta? A következő oldal 49. ábráján (78. old.) viszont már precízen kiírja a homozigóta mutációkat.”

Egyetértek a bíráló meglátásával, úgy gondolom valóban szerencsésebb lett volna egységes jelölést használni a két ábrán, ezért az ilyen hibák a jövőben elkerülendők. Ugyanakkor, ismereteim szerint a 48. ábra magyarázatában használt jelölésmód megfelel a *Drosophila* genetikában általánosan elfogadott jelölésmódnak, ezért én azt egyértelműnek gondolom. Hozzáteszem, a Genetics című lap szerkesztője és cikkünk bírálói sem emeltek kifogást az alkalmazott jelölésmód ellen, pedig bírálatuk alapján rigorózan figyelték az apró részleteket is.

2. „Az 56. ábra azt szemlélteti, hogy a profilin és a dDAAM FHI-FH2 doménje szinergista módon gyorsítja az aktin filamentumok növekedését. Az 56.A ábra grafikonján a polimerizáció sebessége egyértelműen a profilin + aktin jelenlétében a legnagyobb. Az 56.B ábra jobb oldalán feltüntetett polimerizációs sebesség aktin + profilin jelenlétében 2,91 su/s, aktin + profilin + dDAAM FHI-FH2 jelenlétében viszont csak 2.35 su/s.”

A látszólagos ellentmondás ebben az esetben abból fakad, hogy az 56. ábra A panelje egy ún. pirén-aktin „bulk” polimerizációs kísérlet eredményét mutatja és ott valóban a teljes monomer beépülési ráta van feltüntetve $\mu\text{M/s}$ egységekben, míg a B panelen az egyedi filamentumok növekedési sebessége van megadva alegység/s egységekben, amit valós idejű TIRF mikroszkópos kísérletekkel határoztunk meg. A lényeges különbség a két kísérleti elrendezés között ott van, hogy az előbbi a totál pirén-aktin beépülést méri, ami nem tud különbséget tenni az aktin polimerizáció és a nukleáció között, míg a TIRF-es eljárás az egyedi filamentumok analízisén alapul. A „B” panelen jól látható, hogy DAAM jelenlétében

ugyan valamivel kisebb az egyedi filamentumok növekedési sebessége, mint a hiányában, de a DAAM jelenlétében sokkal több filamentum nukleálódik/indul növekedésnek, mint a hiányában, ezért ha azt mérnénk, a totál (zöld) fluoreszcencia itt is jóval magasabb lenne, mint a kontrollban.

3. „A 71. P ábra diagramján nem világos, hogy mit jelentenek az egyes oszlopok tetején feltüntetett számok?”

A számok a minta számot jelölik, ez valóban kimaradt az ábra aláírásból.

A kérdésekre adott válaszok:

1. „71-72. old.: a vad típusú báb szárny-epidermisz sejtjeiben az aktin a sejtek disztális csúcsán halmozódik fel, és a későbbiekben minden sejten egy trichoma szőr fejlődik. A Rab23^{T69A} mutánsban viszont az aktin diffúzabb formában halmozódik fel, és sejtenként több trichóma is fejlődik. Lehetséges, hogy a két mutáns jelleg nem független egymástól: a trichóma fejlődése ott indul meg, ahol az F-aktin koncentrációja meghalad egy küszöbértéket, és ez a mutáns sejtekben egyidejűleg több ponton is megtörténhet?”

Igen, ez valóban így van, legalábbis más PCP mutánsok (így pl. az *inturned* csoportba tartozó mutánsok és az *mwh*) esetében is pontosan ez történik, és ezt tekinthetjük az általánosan elfogadott modellnek a tudományterületen.

2. „79. old.: „Az elsődleges PCP gének vonatkozásában a szinergisztikus interakció arra utal, hogy a Rab23 egy azoktól független vagy (részben) redundáns jelátviteli útban vesz részt.” Ha két mutáns gén egymástól függetlenül működik, akkor fenotípusuk additíve összeadódik. A szinergizmus inkább arra utal, hogy a kétféle géntermék szorosan együttműködve, pl. egy komplexben funkcionál. A következő mondatban rögtön közli is, hogy a Rab23 és a Pk fehérje egymással komplexet képez.”

Meglepő módon, annak ellenére, hogy a gén kölcsönhatások leírása az elemi genetika fogalmi körébe tartozik, a szinergisztikus kölcsönhatások értelmezésében a mai napig sem egységes a szakirodalom. Nevezetesen, egyes genetikai iskolák a szinergizmust az egymástól független,

de azonos szabályozási csomópontra konvergáló működésmód jelének értelmezik, mások szerint, a bíráló véleményének megfelelően, a szinergizmus a szoros együttműködés jele, ismét mások viszont a redundáns vagy részlegesen redundáns működésmódra való utalásként értelmezik. Én úgy gondolom mindhárom elképzelés logikus, és gyakorlati példákkal is alátámasztható, ezért egy szinergisztikus kölcsönhatást mutató kettős mutáns fenotípus értelmezése nem feltétlenül egyértelmű. Ráadásul a fenotípusok értelmezését az is bonyolíthatja, ha hipomorf allél kombinációkat vizsgálunk amorf allélok helyett. Ilyen megfontolások alapján, mi egyrészt null mutánsokat használtunk a kísérleteink során, másrésztől viszont a *pk; Rab23* kettős mutánsok értelmezésénél, a fentieknek megfelelően, mindhárom elvi lehetőséget megemlítettem. Tekintve azonban, hogy más kísérleteink alapján a *Pk* és a *Rab23* fehérjék egy komplexben találhatóak, elfogadom a bíráló véleményét, hogy a fent említett három elvi lehetőség közül a szoros együttműködés a legvalószínűbb. Igaz ugyan, hogy ennek a feltételezett komplexnek a felépítéséről és a pontos molekuláris funkciójáról egyelőre szinte semmit sem tudunk, de ettől függetlenül helyén való lett volna, ha dolgozatomban a szinergizmus értelmezésénél határozottabban foglaltam volna állást a szoros együttműködés mellett.

3. „80. old.: *A Rab23 és a hedgehog (hh) gének gerinces ortológjai (pl. Shh egérben) jelátviteli kapcsolatban állnak egymással. A Drosophila Rab23 mutáns fenotípus azonban nem mutat hasonlóságot a hh fenotípussal, ami arra utalhat, hogy a két gén Drosophilában független egymástól. Van-e genetikai kölcsönhatás az ecetmuslica Rab23 és hh mutánsok között?*”

Nem találtunk domináns genetikai kölcsönhatásra utaló jelet sem a *hh* mutánsokkal sem a *hh* jelátviteli út két egyéb elemével.

4. „83-84. old.: *Az 52. ábrán látható, hogy a dDAAM 5' deléziós mutánsok, amelyek homozigóta letálisok, kiejtik az első három, nem-transzlált exont, de meghagyják a 4. exont, amelyben a transzlációs startpont van. Az lenne várható, hogy a mutáns génről átíródó csonkolt mRNS-ről hiánytalan fehérje szintetizálódik. Keletkezik-e mRNS ill. dDAAM fehérje a mutánsokban, és mi lehet a letalitás oka?*”

Ugyanitt a dDAAM^{Ex202} deléció, amely eltávolítja a gén 3' végét, de meghagyja a 4.-7. exonokat, szintén homozigóta letális, és Western blot-on nem tudták kimutatni a csonkolt fehérje jelenlétét. Keletkezik-e ebben a mutánsban csonkolt mRNS?"

Az ábrán bemutatott 5' deléciós allélok közül az Ex249-es jelűt vizsgáltuk és azt protein null allélnak találtuk. Ez teljes mértékben megfelel az elvárásainknak, hiszen ebben az esetben hiányzik a dDAAM gén transzkripció start helye, ezért ebben a mutánsban sem dDAAM mRNS sem fehérje nem képződhet. Kivéve természetesen, ha jelen van egy kriptikus promoter, de eredményeink alapján ilyen promoter vagy nincs a régióban vagy a képződő csonkolt transzkript nem elég stabil.

Az Ex202-es jelű 3' delécióra homozigóta L2 stádiumú lárvákból valóban nem tudunk csonkolt fehérjét kimutatni, ahogy azt az 53. ábra mutatja, azonban homozigóta embriókból származó fehérje kivonatokban kis mennyiségben detektálható volt egy méretében a prediktált csonkolt fehérjének megfelelő sáv. Az mRNS szintet nem vizsgáltuk, de ezek alapján nyilvánvalónak látszik, hogy bizonyos mennyiségben képződik csonkolt transzkript. A csonkolt fehérje jelenléte egyben azt is jelezte, hogy az Ex202-es allél nem teljesen protein null, nem amorf allél, és ez összhangban van a genetikai viselkedésével is, hiszen az alapján hipomorf allélként kategorizáltuk.

5. *„86. old.:Emlősökben a DAAM fehérje komplexet képez a Dsh fehérjével (l. 82. old.). Drosophilában azonban a dDAAM mutánsok nem mutatnak a dsh mutánsokéhoz hasonló PCP fenotípust. Van-e genetikai interakció a dDAAM és a dsh mutánsok között?"*

Örülök ennek a kérdésnek, mert a segítségével demonstrálni lehet, hogy a kutatás egy állandó fejlődésben lévő világ. Mindez úgy kapcsolódik opponensem kérdéséhez, hogy ugyan a planáris polarizáció szempontjából nem találtunk genetikai interakciót a dDAAM és a dsh mutánsok között, azonban dolgozatom beadása után azt találtuk, hogy a dsh és más „core” PCP mutánsok is kölcsönhatást mutatnak a gombatest axonok fejlődése során. Ez egy egészen friss megfigyelés a laboratóriumunkban, és arra utalhat, hogy a Dsh-DAAM kapcsolat az idegsejtekben egy ősbibb szabályozási kapcsolat lehet, mint a gerincesekben megfigyelhető kapcsolat a kovergens extenziós mozgások szabályozása során. Természetesen ez egyelőre csak egy hipotézis, ami kísérletes alátámasztásra vár.

6. „122. old., 84. ábra: Az egér *mDAAM1* transzgén menekíti a *Drosophila dDAAM^{mat/zyg}* mutáns idegrendszer-fejlődési hibáit. Képes-e az *mDAAM1* helyettesíteni a *dDAAM* gént a trachea fejlődése során is?”

Ez a kísérlet bennünk is felmerült, tekintve azonban, hogy az emlősök és a rovarok légzőszerveinek lényegesen különbözik a szöveti felépítése, így pl. a tüdő alveolusok felszínét nem borítja kitines kutikula, nem tartottuk fontos kérdésnek az *mDaam1* funkció vizsgálatát a tracheában. Ettől függetlenül a kérdéses kísérlet abszolúte logikus felvetés, amit a teljesség kedvéért a jövőben érdemes lenne elvégezni.

Még egyszer köszönöm opponensem alapos munkáját, elismerő szavait és releváns kérdéseit.

Szeged, 2011-10-07

Mihály József