

Válasz Dr. Udvardy Andor opponensi véleményére

Köszönöm Dr. Udvardy Andornak, hogy fáradtságot és időt nem kímélve igen gyorsan, ám annál figyelmesebben tanulmányozta át dolgozatomat és készítette el bírálatát. Köszönöm elismerő észrevételeit, és külön örömmre szolgál, hogy első Mesterem, akinek az irányításával készítettem életem első DNS preparátumát, szimpatizál az általam is képviselt kutatási filozófiával. Megjegyzéseire, kérdéseire az alábbiak szerint válaszolok:

1a. *„A Frizzled 1 és 2 receptorok egymástól eltérő biológiai hatásának vizsgálatakor ellenőrizték-e a transzgének expressziójának mértékét, vizsgáltak-e több különböző genomialis helyre integrálódott transzgén biológiai hatását, van-e adatotok a transzgének által kódolt Fz1 és Fz2 fehérjék féléletidejére?”*

A bíráló érdeklődése a transzgének kifejeződési szintjével kapcsolatban teljesen logikus és releváns kérdés. Mi magunk is így gondoltuk, ezért minden esetben több, de minimum négy független transzgenikus vonal biológiai hatását vizsgáltuk és a kifejeződés mértékét is ellenőriztük Western blot kísérletek során. A független vonalak hasonló biológiai aktivitást mutattak és a kifejeződési szintek is nagyon hasonlóak voltak. Ezek az információk a 18-as számú hivatkozás formájában szerepelnek a dolgozat ezen fejezetének alapjául szolgáló eredeti publikációban (Boutros et al., 2000), a disszertációmba azonban a terjedelmi korlátok miatt már nem kerültek bele. A Frizzled fehérjék féléletidejét nem vizsgáltuk, de a Western blotok alapján az nem lehetett túl alacsony, mert a Myc tag-gel ellátott fehérjék detektálása nem okozott problémát.

1b. *„A Xenopus rendszerben nyert eredmények nem összevethetők teljesen a Drosophila transzgenikus állatokban észleltekkkel. 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).”*

Egyetértek azzal a megállapítással, hogy a *Xenopus* rendszerben nyert eredmények nem teljesen vethetőek össze a *Drosophila* adatokkal és azzal is, hogy a receptor fehérjék mennyisége különbségeket mutat. Ennek megfelelően, a *Xenopus* adatokat igyekeztünk a hipotézisünket erősítő, de kiegészítő jellegű adatként kezelni és interpretálni. Lehetséges,

hogy ezt nem minden vonatkozásban sikerült megvalósítani, de ettől függetlenül osztom a bíráló véleményét, hogy ebben az esetben indokolt a visszafogott fogalmazás.

2. *„A dTAK funkcióvesztéses fenotípusának vizsgálatánál azt találtatok, 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?”*

Saját tapasztalataink alapján nem merném azt állítani, hogy általánosan fogalmazva a domináns negatív formák használata megbízhatóbb eredményt ad, mint az RNSi használata, de a kérdéses esetben a bíráló megérzése/véleménye helytálló. Ezt azért jelenthetjük ki, mert a mi dTAK-ra vonatkozó publikációnk megjelenése után néhány évvel később, klasszikus mutáns allélok vizsgálatára alapozva bebizonyosodott ugyan a JNK jelátviteli út és a dTAK közötti funkcionális kapcsolat, azonban az embrionális háti záródásban játszott szerepet ezek a vizsgálatok nem igazolták.

3a. *„Hogyan ellenőrizted, hogy a dTAK, p35 kettős transzgenikus állatban a dTAK expressziója legalább olyan magas, mint a dTAK egyszeres transzgenikus állatban? Alacsonyabb dTAK expresszió a kettős transzgenikus állatokban zavarhatja a p35 hatásának értelmezését.”*

Ebben az esetben a kifejeződési szinteket nem hasonlítottuk össze, tehát teljes bizonyossággal nem állítható, hogy közel azonos az expressziós szint. Ugyanakkor nem gondolom, hogy a bíráló által felvetett lehetőség túlságosan valószínű. A kérdéses kísérleti elrendezésben UAS/Gal4 alapú túltermeléseket hajtottunk végre, ahol Gal4 forrásként egy sevenless-Gal4 vonalat használtuk. A sevenless enhancer erős Gal4 kifejeződést biztosít a szem meghatározott sejtjeiben, a Gal4 transzkripció faktor pedig igen nagy affinitással kötődik az UAS szekvenciákhoz, ezért elméleti megfontolások alapján nem valószínű, hogy a Gal4 limitáló faktor lenne a kettős túltermelés (UAS-dTAK és UAS-p35) esetén. Emellett, laboratóriumunkban más biológiai kérdések vizsgálata során többször használták ezt a sev-Gal4 vonalat egyéb UAS transzgenek kifejeztetésére, és immunfestések alapján soha nem

láttunk arra vonatkozó indikációt, hogy a kettős túltermelések esetén észrevehetően csökkent volna a kifejeződési szint az egyes túltermelésekhez képest. Végezetül, szintén nem direkt kontroll kísérletként, de azt is megfigyeltük, hogy a sev-Gal4>UAS-dTAK rekombináns által mutatott fenotípust az UAS-lacZ transzgén jelenléte nem szupresszálja, tehát a Gal4 nem lehet olyannyira limitált mennyiségben jelen, hogy minden extra UAS beépülés képes legyen egy küszöb szint alá csökkenteni az UAS-dTAK inszert aktiválására jutó Gal4 mennyiséget.

3b. *„Nem világos számomra, hogyan értelmezhető, hogy a magas szintű dTAK túltermelés sejthalált okozó káros hatását 18 °C-on ki lehetett védeni? Alacsonyabb hőmérsékleten nyilván alacsonyabb a transzgén expressziós szintje, de alacsonyabb az összes transzkriptum expressziója is.”*

A bíráló azon megállapításával, hogy alacsonyabb hőmérsékleten alacsonyabb a transzgén kifejeződési szintje, teljes mértékben egyetértek hiszen az UAS/Gal4 rendszer hőmérséklet függő aktivitása bizonyított tény. Arról azonban nem vagyok meggyőződve, hogy alacsonyabb hőmérsékleten minden gén transzkripció szintje csökken. Úgy gondolom, mint minden környezeti változás hatására, a hőmérséklet csökkentésére is számos gén expressziós szintje változik meg a sejtekben, ezek többsége lehetséges, hogy csökkenő irányt mutat, de más gének esetében ez növekedés is lehet. Ezek a változások is hozzájárulnak ahhoz, hogy a 18 °C-on tartott muslicák sejtjeiben más fehérjék, más arányban lesznek jelen, mint a pl. 25 °C-on tartottakban. Ily módon az aktív fehérjék arányát a dTAK-hoz képest aligha tudjuk precízen megjósolni és könnyen elképzelhető, hogy limitáló szint alá esik a mennyisége a feltételezett JNKK típusú partnerhez képest. Másrészt, részben az imént említett transzkript szint változások miatt, 18 °C-on számos szabályozási rendszer (így pl. az apoptózist szabályozó rendszer is) másképp fog működni, mint magasabb hőmérsékleten, ami szintén jól magyarázhatja a 18 °C-on tapasztalt enyhébb fenotípust.

4a. *„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.”*

Ebben az esetben is egyet kell értenem opponensem megállapításával: abból a tényből, hogy a Rab23 fehérje asszociál a Pk fehérjével, valóban nem következik, hogy a Rab23 PCP funkciója a Pk fehérje vezikuláris szállításán keresztül realizálódik. Megfigyeléseink alapján a Rab23 mutánsokban megváltozik a Pk fehérje sejten belüli eloszlása, ami utalhatna egy transzport hibára, de egy citoplazmatikus fehérje esetében ez nem lehet a plazmamembrán felé irányuló direkt transzport. A Pk azonban egy membrán asszociált fehérje, ezért azt a lehetőséget nem zárhatjuk ki, hogy a Pk-Rab23 kapcsolat funkcióval bír a Pk fehérjét és egyéb PCP fehérjéket tartalmazó komplexek membránból való eltávolításában. Tehát egy ilyen tágabb értelemben a Rab23 fehérje mégiscsak hozzájárulhat a Pk sejten belüli eloszlásának a szabályozásához. A teljesség kedvéért pedig azt is hozzá kell tenni, hogy eredményeink alapján a Rab23 legfontosabb PCP funkciója az, hogy valami módon a Pk-lel együttműködve elősegíti az Inturned komplex aktiválódását. Azt azonban, hogy ez a folyamat vezikuláris transzporton alapul-e, és annak melyik típusán keresztül történik, egyelőre nem sikerült felderíteni.

4b. *„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 fehérjének, vagy nukleotida kicserélő fehérjének mutációi előidéznek-e PCP fenotípust?”*

Mindenképpen érdekes lenne a Rab23 GAP és GEF típusú szabályozó fehérjéit vizsgálni, azonban ezek a fehérjék nincsenek azonosítva, így ezeket a vizsgálatokat nem tudtuk elvégezni.

Még egyszer köszönöm opponensem alapos bírálatát, elismerő szavait és gondolatébresztő kérdéseit.

Szeged, 2011-10-07

Mihály József