

Válasz Dr. Szűcs Dávid Professzor Úr bírálatára

Először is szeretném megköszönni Szűcs Dávid Professzor Úrnak, hogy elvállalta értekezésem bírálatát. Köszönöm véleményét és támogatását.

A feltett kérdésekre az alábbiakban válaszolok.

- 1. Az összes 23 *Drosophila* Rab GTPáz GTP- és GDP-kötött formáival végzett pulldown tömegspektrometriás kísérletek új kötőpartnereket és más eddig nem ismert interakciókat azonosítottak. Végeztek-e azóta mások hasonló átfogó kísérleteket a humán Rab fehérjékkel? Vannak-e, várhatók-e lényeges eltérések a *Drosophila* interaktómhoz képest?**

Tudomásom szerint teljesen azonos kísérleti elrendezésben nem vizsgálták a humán Rab fehérjéket. Az általunk azonosított, de a cikk elkészültekor még nem vizsgált kötőpartnerek közül az elmúlt években több is megerősítést nyert.

Az összes emberi és *Drosophila* Rab evolúciós kapcsolatából kiderült, hogy a 27 általunk vizsgált Rab fehérjének 66 humán megfelelője van. Vannak olyan *Drosophila* Rab fehérjék, amelyeknek csak egy humán megfelelője van, (Rab18, Rab23, Rab 30, Rab10, Rab14, Rab26, Rab35) és vannak, amelyek több paralóggal is rendelkeznek.

Az általunk alkalmazott Rab fehérje kötőpartnereinek azonosításban *Drosophila* S2 sejteket használtunk, amelyek 24 órás embriókból származnak és a sejt vonalat alkotó sejtek hemocita morfológiájúak. Ez kiválóan alkalmas az endomembrán rendszer általános komponenseinek azonosítására, de a specializált kötőpartnerek nem feltétlenül deríthetők fel ebben a kísérleti elrendezésben. Öt olyan Rab gén ismert (Rab1, Rab5, Rab6, Rab7 és Rab11), amely megtalálható az összes eukarióta genomban, ezek mind esszenciálisak. Ezeknek a fehérjéknek a már előzőleg ismert kötőpartnerei közül többet azonosítottunk, amely egyben validálta az általunk alkalmazott módszert.

A szövet-, sejttípus-specifikus RNS szekvenálásoknak köszönhetően tudjuk, hogy az általánosan expresszálandó Rab fehérjék mellett ismertek szövetspecifikusan kifejeződő Rab GTP-ázok is (10.1038/nature12962). Példaként említhető a Rab3 fehérje, ami a *Drosophila* S2 sejtekben nagyon alacsony expressziót mutat, és *Drosophilában* valamint emlősökben is az idegsejtekben írták le a feladatát. (10.1016/j.neuron.2009.11.002, 10.1016/j.brainresrev.2008.04.006) Az ilyen szövetspecifikusan kifejeződő fehérjék esetében várunk lényeges eltéréseket.

- 2. A *Drosophila* szövetek lipidomikai elemzése mennyire végezhető szövetspecifikusan? Mi lehet a magyarázata annak, hogy a CDS enzim hiányában a foszfatidsav főként a testiszben halmozódik fel?**

A testisz lipidomikai, transzkriptomikai és proteomikai vizsgálatánál is teljes testisszel dolgoztunk, amelyek jelentős hányadát az ősvarsejtekből differenciálódó különböző fejlődési stádiumú ivarsejtkezdemények (ősvarsejtek, spermatociták, spermatidák, spermiumok) töltik ki. A testisz teljesen jól izolálható, egyéb szövet sejtjeinek kontaminációja szinte kizárható. Bár a testiszt körülvevő izomsejtek, terminális epitélium és cisztasejtek is részét képezték a lipidomikai analízisnek, azok száma és morfológiája a vad típussal megegyező a CdsA mutánsban. A CdsA mutáció az ivarvonal sejtekben, a spermatidák fejlődésében okoz fejlődési abnormalitást, a testisz szomatikus sejtjei normálisnak mutatkoztak. A lipidomikai analízisnél azonos számú és korú testisz minta összehasonlítására került sort, így a szövetre jellemző lipidomikai profilt kaptunk. A pontos

számszerűsítés helyett az egyes lipidosztályok egymáshoz viszonyított arányait állapítottuk meg az azonos számú tesztisz minta összehasonlításával. A CdsA enzim csökkent mennyisége általánosan jellemző a mutáns vonalra. A spermatogenezis során a meiózist követően megfigyelhető transzkripcionális leállás miatt a csökkent mennyiségű géntermékek kompenzálása vagy alternatív szintézis utak aktiválására nincs lehetőség. A CdsA enzim megfelelő mennyiségének hiányában a foszfatisav nem tud átalakulni CDP-DAG-á, amely a foszfatisav megemelkedése mellett csökkent foszfatidil-inozitol szintet eredményez. Ez a tulajdonsága teszi a poszt-meiotikus stádiumokat különösen érzékennyé a géntermékek mennyiségének megváltozására, különösen azon gének esetében, amelyek nem rendelkeznek tesztisz-specifikus paralóggal.

- 3. A tesztisz különböző régiói összehasonlító transzkriptomikai elemzésében milyen statisztikai módszert használt? A 10. ábrán szereplő n értékek a felhasznált minták számát jelölik, de ha jól értem, ezek egyesítve voltak. Összesen hány minta került szekvenálásra régióként, és hogyan lettek statisztikailag elemezve a BenjaminiHochberg FDR korrekciót megelőzően?**

Egy-egy RNS szekvenáláshoz a 10. ábrán feltüntetett n értékeknek megfelelő tesztisz régiók ($n=150-200$) lettek felhasználva. Két biológia ismétlés volt minden régió esetében és technikai ismétlések is készültek. A transzkriptomikai adatok elsődleges elemzését kollaborációs partnerünk végezte. A szekvenciaelemzést a BaseSpace felhőalapú számítástechnikai rendszer segítségével végezték. A FastQ fájlokat a Dmr6.05 *Drosophila melanogaster* referencia genomhoz igazították a TopHat v2.0.9. segítségével, majd a génexpressziós elemzést a Cuffdiff v2.1.1. segítségével végezték el. A különbözően felhalmozódott transzkriptek kiválasztása a tesztisz három vizsgált régiójának páros összehasonlításával történt.

- 4. A bazális tesztisz-régióból izolált mRNS-ek transzkripcionálisan inaktív sejtekből származnak, tehát ezeknek még a meiózist megelőzően, az apikális vagy középső régióban kellett kifejeződniük. Mivel magyarázza ennek fényében a csak a bazális régióban azonosított transzkriptek nagy számát (302, 10B ábra)?**

A bazális régióban felhalmozódó RNS-ek valóban a meiózis előtt expresszálódnak és sokszor stabil és transzlációs inaktív formában vannak jelen a poszt-meiotikus stádiumokig.

Mivel az apikális és a középső régió is tartalmazza a korai stádiumok RNS-eit, ezért a késői stádiumokra specifikus RNS bár jelen vannak, de azok nem feltétlenül mutatnak transzkriptfelhalmozódást a korai stádiumokban. A későbbi stádiumokban viszont a korai stádiumokra specifikus RNS-ek szintje lecsökken, így a bazális régióra specifikus RNS-ek is jobban mérhetők. Megemlítendő az is, hogy míg a korai stádiumokban az őssejtek mellett a különböző fejlődési típusú ciszták változatosabb transzkriptumú sejteket tartalmazhatnak (primer és szekunder spermatociták), a bazális régió viszont a poszt-meiotikus ciszták mellett tartalmaz specializált sejteket, mint a feji ciszta sejt, a terminális epitélium sejtjei, amelyek transzkripcionálisan aktívak, így hozzájárulhatnak az erre a régióra specifikus transzkriptekhez.

- 5. Megközelítőleg hány génnek van tesztisz-specifikus homológja, és ebből mennyi retrogén? A reverz transzkripcióval keletkezett gének különösen jellemzőek a tesztiszspecifikus génkészletre?**

A FlyBase adatbázis 2025-ös frissített adatai alapján a 17872 génből 10773 génnek van paralógja. A 10773 paralóg génpár közül 3273 olyan van, ami nagyobb mértékű hasonlósággal rendelkezik (8-asnál magasabb DIOPT score-ú paralóggal (<https://fgr.hms.harvard.edu/diopt>). Ezek közül 1154 mutat jelentősebb tesztisz-specifitást. Ezek közül 397 gén van, aminek az expressziója tesztiszben jelentősen feldúsult. A tesztisz-specifikus paralógok közül 280-nak van egyetlen transzkriptje, és 153 rendelkezik egyetlen exonnal és 139-nek van egy exonja és egy transzkriptje. Ezek alapján feltételezhetjük, hogy ezek a gének retrogének, hiszen jelentősen kisebb a transzkriptjeik és exonjaik száma. Ugyanakkor a paralógok páronkénti összehasonlítása jelente csak bizonyosságot.

A retrogének jellemzőek a tesztisz-specifikus génkészletre. Ez némileg *Drosophila* specifikus, feltehetően a sok retrotranszpozon jelenlétnek köszönhetően, amelyek a *Drosophila* telomert alkotják. Ez fokozottan esélyt ad a retrogének keletkezésére, amik aztán a permisszív expresszió, és az egyszerű tesztisz-specifikus promóterek miatt ki tudnak fejeződni a primer spermaticitákban. Ha a korai stádiumokban negatív hatást fejtenek ki, akkor gyorsan szelektálódhatnak, viszont ha semlegesnek vagy előnyösnek bizonyulnak, akkor jó alpanyagot szolgáltatnak az evolúciós folyamatokhoz.

6. Az S-Lap aminosavak milyen sztöchiometriával vannak jelen a spermiumokban? Valóban bármelyiknek a hiánya megzavarja a parakristályos anyag kialakulását? Van szerkezeti modelljük a nyolcféle fehérje interakciójára?

Az S-Lap fehérjék pontos sztöchiometriája nem ismert. Genetikai vizsgálataink azt mutatták, hogy az S-Lap fehérjék bármelyikének hiánya megzavarja a spermiumképződést. Megállapítottuk, hogy az S-Lap1 kulcsfontosságú, annak hiánya már heterozigóta formában is befolyásolja a fertilitást, haploelégtelenséget okoz, míg az S-Lap4 hiánya homozigóta formában szemsterilitást eredményez. Az elektronmikroszkópos felvételeken jól látszik, hogy a mutánsokban a parakristályos anyag szerkezete sérült, az rendezetlen módon helyezkedik el a mitokondrium származékokban. Egyelőre még nincs megbízható szerkezeti modellünk az S-Lap fehérjék interakciójára, sem a pontos partnerfehérjéikre, de a jövőbeni kutatások erre is fényt deríthetnek.

7. Milyen evolúciós útvonalon alakulhatott ki az S-Lap fehérjék strukturális szerepe a spermiumokban?

Az összehasonlító genomika fejlődésével nyilvánvalóvá vált, hogy az evolúció során az új gének létrehozása széles körben elterjedt folyamat, és hogy a szaporodással összefüggő géncsaládok összetétele drámaian eltérhet az egyes fajok között. Az S-Lap fehérjék filogenetikai analízise megmutatta, hogy az S-Lap fehérjék a Granny-smith leucin-aminopeptidázból alakulhattak ki. 8 fehérje van, ami a Granny-smith leucin-aminopeptidázzal átlagosan 17,4%-os aminosav azonosságot mutat, melyek mindegyike kizárólag a tesztiszben kifejeződik ki. Az S-Lap fehérjék 2 klaszterbe csoportosulnak. Az evolúciós távolság azt mutatja, hogy a géncsalád a *Drosophila* evolúció során már régen elkülönült, de más rovarfajokban is jelen vannak (10.1186/1471-2164-12-177).

Az is jól dokumentált, hogy az új retrogének gyakran fejeződnek ki a tesztiszben. Az S-Lap gének esetében 4 génben található intron, míg 4 gén esetében intron nélküli transzkriptek ismertek, amelyek a retrogénekre jellemzőek. Ezekben a tesztiszben expresszáldó fehérjékben az is közös, hogy a leucin aminopeptidáz aktivitásukat elvesztették. Az M17 aminopeptidáz aktivitásban kulcsfontosságú illetve a kation kötésben szerepet játszó aminosavakban eltérések tapasztalhatók (10.1186/1471-2164-12-177). A leucin-aminopeptidázokról kimutatták, hogy hexamereket képeznek, ahol az enzimaktivitásban fontos aminosavak a hexamerek belsejében helyezkednek el, azok nem befolyásolják a hexamerek képződését (10.1186/1471-2091-12-46). Az *ecetmuslica* spermiumában található mitokondrium

származékok az 1.8 mm-es farki rész teljes hosszát kitöltik. Ennek a jelentős méretű mitokondriumnak a stabilitását növelheti a benne kialakuló parakristályos anyag. A parakristályos anyag jelentős részét az S-lap fehérjék alkotják, de a proteomikai analízisünkéből kiderült, hogy más mitokondriális enzimek is megtalálhatók benne, mint például az általunk is jellemzett tesztisz-specifikus glutamát-dehidrogenáz. Bizonyos enzimekről ismert, hogy dimerek, tetramerek vagy hexamerek formájában működnek, ilyenek a leucin- aminoszintetázok és a glutamát dehidrogenázok is. Azt feltételezik, hogy ez azért előnyös, mert így az enzimaktivitás szabályozásának újabb módja valósul meg, valamint az enzimek raktározhatókká válnak. Egy ilyen tulajdonságú enzim, ha elveszti az aktivitását elméletileg könnyen felvehet egy szerkezeti funkciót.

A parakristályos anyag a különböző Hexapoda-k esetében nagyon változatos mitokondriális felhalmozódást mutathat, akár mind a két mitokondrium származékban is kialakulhat.

8. Mi a valószínűbb, részt vesz a Bb8 glutamát dehidrogenáz a parakristályos anyag felépítésében, vagy csak a glutamátszinten keresztül szabályozza azt?

A parakristályos anyag proteomikai analízisének is azonosítottuk a Bb8 glutamát-dehidrogenázt, tehát fizikálisan részét képezi magának a parakristályos anyagnak. Ugyanakkor a *bb8* mutánsban a kis és nagy mitokondrium származékban is elindul a parakristályos anyag felhalmozódása, de maga a parakristályos anyag nem épül össze megfelelően. Azt gondoljuk, hogy a mitokondrium differenciáció során elsőként a megfelelő glutamát szint szükséges a mitokondrium identitás eléréséhez, amelyhez szükséges a Bb8 enzimaktivitása, majd az Bb8 beépül magába a parakristályos anyagba.

9. A spermatidák mikrotubulus szervező struktúráinak részletes elemzése megmutatta, hogy a tesztisz-specifikus és a normál gamma-TuRC fehérjék egyaránt jelen vannak ezekben, és valószínűleg egymással is képesek komplexeket alkotni. Milyen specifikus szerepe lehet a két rokon fehérjekészletnek a spermatidák sejtvázának szabályozásában?

A spermatidák megnyúlása során egy 12µm-es sejtből 1800µm-es sejt lesz. A megnyúlás kiterjed a sejtmagra, a mitokondriumokra és kialakul a bazális testből az axonéma.

Ezen változásokhoz számos új mikrotubulus szervező központra van szükség. Mivel a meiózis után már gyakorlatilag nincs transzkripció, így a szomatikus sejtekhez vagy a korai stádiumokhoz viszonyított, jelentősen megnövekedett mikrotubulus-nukleációhoz szükséges γ -TuRC a tesztisz-specifikus komplextagok expressziójával biztosított. A hasonlóság ellenére jelentős szerkezeti különbségek is vannak a paralógokról átíródó fehérjék között. A t-Grip91 bár képes kapcsolódni a kanonikus Grip84-gyel, az N-terminálisán egy jelentős hosszúságú coiled-coil régiót tartalmaz, amely tesztisz-specifikus partnerfehérjék kötését valószínűsíti.

Még egyszer nagyon köszönöm a feltett kérdéseket és a dolgozatom alapos bírálatát.

Szeged, 2025. 06. 12.

Tisztelettel,


Dr. Sinka Rita