

Válasz Dr. Vellai Tibor Professzor Úr bírálatára

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

Kritikai megjegyzéseire és kérdéseire az alábbiakban válaszolok.

Az értekezés megjegyzéseire a válaszaim:

A formai kritikákat jogosaknak tartom, sajnálom, hogy a dolgozatban benne maradtak.

A tudományos kérdésekre a válaszaim.

1. A genomszűrések során feltárt új fehérjék egyedi analízisét miért nem valósította meg szisztematikusan? Számos potenciális analízis maradt ki így az eddigi életműből.

A genomszűrések esetében mindig egy vagy több érdekesnek tűnő, reprezentatív jelölt esetében végeztük el a részletes analízist. A CRISPR technológia felfedezését és széles körű elterjedését megelőzően először a klasszikus mutánsok és később az RNS interferencia segítségével tudtuk a géntermékek hiányában fellépő fenotípust jellemezni, így a részletes analíziseket először a törzsközpontokból elérhető mutánsokon végeztük el. A fejlett genomszerkesztési technológiák elterjedésével ma már lehetőségünk van a direkt reverz genetikai megközelítésekre is, így a további jelöltek részletesebb vizsgálatára is.

2. Kis GTP-ázok és GRIP-domén fehérjék kölcsönhatásait élesztő két-hibrid rendszerrel vizsgálta. A pozitív találatok mennyire (milyen %-ban) voltak megerősíthetők más módszerekkel?

A kis GTP-ázok és GRIP-domén fehérjék közötti, élesztő két-hibrid rendszerben tapasztalt kölcsönhatásokat minden esetben GST pull-down kísérletekkel is megerősítettük. A GST jelölt Rab GTP-áz fehérjét baktériumban termeltettük. A tisztított fehérjék és a *Drosophila* S2 sejtvonalában kifejeződő GRIP-domén tartalmú fehérjék közötti direkt kölcsönhatást az egyes fehérjékre specifikus ellenanyagok segítségével vizsgáltuk. (10.1083/jcb.200808018)

3. A foszfatisav hogyan okozhat (mitokondriális) membrán görbületet?

A különböző lipid acil-láncok vagy fejcsoportok kémiai tulajdonságai eltérő membrángörbületeknek kedvezhetnek. A foszfatidil-kolinnal összehasonlítva a foszfatisavból hiányzik a fejcsoporton lévő kolin rész, így a foszfatisav fejcsoport része kisebb lesz mint a foszfatidil-koliné. A foszfatisav nettó negatív töltéssel rendelkezik. A foszfatidil-kolin hengeres geometriájával ellentétben a foszfatisav a két zsírsavvéghez viszonyított kis fejcsoportjával negatívan görbült membránok kialakítását támogatja. Ezt a típusú membrángörbületet gyakran figyelték meg a mitokondriumok esetében, így feltételezzük, hogy a *CdsA* mutánsban is ez állhat a mitokondriális fenotípusok hátterében. (10.3390/biom12111707, 10.1016/j.tcb.2017.08.011)

4. A Jelölt egy transzkriptoma analízissel ubikvitin-proteaszóma-specifikus E2/3 enzimek felhalmozódását sugallja a tesztisz bazális régiójában. Sikerült-e más módszerrel is igazolni ezeknek az enzimeknek a megnövekedett aktivitását ebben a régióban, és mi lehet a funkciója ennek a változásnak (mit bontanak)?

A spermatogenezis poszt-meiotikus stádiumaiban a spermatidák megnyúlását követően intenzív lebontó folyamatok eredménye a citoplazma eltávolítása az egyedi spermatidák lefűződése során. Ebben a nem apoptotikus kaszpáz útvonal és a proteasomális lebontó folyamatok egyaránt szerepet játszanak. Bár számos E2/E3 enzimet azonosítottunk a poszt-meiotikus stádiumokban történő géntermék-felhalmozódással, viszont csak egy részüknek ismert a spermatogenezisben betöltött funkciója. Az E3 ligázok ideális jelöltek egy hierarchikus szabályozási útvonal létrehozásához, amely a poszt-meiotikus fejlődési stádiumok (sejtorganelum differenciálódás, ciszta megnyúlás, individualizáció, feltekeredés) egymásutánosságát biztosítja. A génátírás leállításának következményeképpen, nagyobb szerep jut a transzlációs és poszttranszlációs szabályozásnak, illetve az irányított protein lebontásnak. Két E3 ligáz komplex, a Khlh10/Cul3/Roc1b és az Ntc/Cul1/SkpA E3 komplexekről ismert, hogy szükségesek a spermiumok individualizációjához a nem-apoptotikus kaszpáz kaskád aktiválásához, illetve a proteasomális lebontás serkentéséhez. (10.1242/dev.050088, 10.1371/journal.pbio.0050251, 10.1016/j.cell.2011.03.021). Munkánkból kiderült, hogy az evolúciósan konzervált, pleiotróp Ago fehérje, amely egy E3 ligáz komplex (SCF típusú) tagja, hozzájárul a *Drosophila* spermatogenezis poszt-meiotikus szakaszaiban a spermatidák individualizációjához és a mitokondriális morfológia szabályozásához.

Vizsgáltuk és jellemeztük a konzervált tesztisz-specifikus proteasóma alegységeit is, és kimutattuk azok szerepét a tesztisz-specifikus sejtmagi átrendeződésben és sejtmagmegnyúlásban. Kimutattuk, hogy a Pros β 5R2, Rpn12R és Rpt3R homozigóta mutánsai hímsterilek, ami arra utal, hogy a proteasóma katalitikus és szabályozó alegységeinek egyaránt lényeges funkciója van a gametogenezisben. Transzgének segítségével követtük a spermatogenezis különböző szakaszaiban a proteasómák lokalizációját. Kimutattuk, hogy a spermatoproteasóma a poszt-meiotikus sejtmagokban és az individualizációs komplexekben egyaránt jelen van. A citoplazma jelentős részének lebontása mellett a sejtmag megnyúlásával és a kromatin átrendeződésével a magi fehérjék egy jelentős része is lebontásra kerül. Ezen fehérjék pontos meghatározása a jövőbeni kutatásaink egyik kiemelt témája. Eredményeink arra utalnak, hogy a konzervált spermatoproteasóma a poszt-meiotikus fehérje lebontások egyik központi eleme.

5. Mi lehet a Jelölt által intenzíven vizsgált parakristályos anyag funkciója a tesztiszben?

Számos hipotézis létezik a parakristályos anyag rovar spermiumokban betöltött funkciójáról. Tokuyasu szerint a parakristályos anyag rugalmas tulajdonságot kölcsönöz a spermium farkának, és a mozgási energia tárolása vagy felszabadítása révén hozzájárul a spermiumok megfelelő hullámvázához. Feltételezhetően a parakristályos anyag a spermiumok nőstényekben történő tárolásánál, illetve magánál a megtermékenyítésnél is szerepet játszhat. (Exptl Cell Res 84 (1974)) Meg kell említeni, hogy a megtermékenyítésnél a teljes, 1,8 mm-es spermium bejut a petesejtbe és a farki rész lebontása a korai embióogenezis idején történik meg. A lebontás során felszabadult molekulák a zigotikus expresszió beindulásáig nyersanyagot szolgáltathatnak a felépítő folyamatokhoz. Természetesen ezen feltételezéseket a jövőben kísérletesen is igazolni kellene.

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

Szeged, 2025. 06. 12.

Tisztelettel,



Dr. Sinka Rita