

Bírálati vélemény

Csortos Csilla: „Reverzibilis fehérje foszforiláció és fehérje-fehérje kölcsönhatások tüdő artéria endotél sejtekben”

című MTA doktori értekezéséről

Csortos Csilla MTA doktori értekezésében a tüdő endotél sejtekben lezajló reverzibilis foszforilációs folyamatok mechanizmusát tárgyalja. Ezek a biokémiai folyamatok alapvető hatással vannak sejtek citoszkeleton szerkezetére valamint barrier képző funkciójára. A választott téma mind elméleti, mind pedig gyakorlati (orvosi) szempontból nagy jelentőségű. Az endotél sejtek a vérerek falán olyan réteget képeznek, amely szabályozza molekulák és sejtek átjutását a vér és a környező szövetek között, alapvetően hozzájárulva ezzel a homeosztázis fenntartásához. Számos olyan fiziológias és patológias szituáció ismert, ahol az endotél barrier tulajdonságai megváltoznak, integritása sérül, permeabilitása megnövekszik. A tüdő endotél sejtek esetében a permeabilitásban bekövetkező változásoknak fokozott jelentősége van más szövetekhez képest, hiszen a tüdő érrendszere rendkívül nagy felületen érintkezik a környező szöveti struktúrákkal. A reverzibilis fehérje foszforiláció az egyik leggyakoribb intracelluláris poszttranszlációs modifikáció, ami a fehérjék működését alapvetően befolyásolja. Csortos Csilla munkája értékes felfedezésekkel gyarapítja ismereteinket a tüdő endotél sejtekben lezajló reverzibilis fehérje foszforilációs folyamatoknak a sejtekre, illetve az endotél barrierre gyakorolt hatását illetően.

A doktori értekezésben – leszámítva az irodalmi hivatkozásokat – szerző 130 oldalon keresztül tárgyalja a tudományos eredményeit. A disszertáció alapjául 13 saját tudományos közlemény szolgál, amelyek mind tekintélyes nemzetközi folyóiratokban jelentek meg. Ezek közül jelölt háromban első, ötben pedig utolsó szerző. Ehhez járul még a kandidátusi fokozat megszerzése óta megjelent további négy publikáció. Csortos Csilla közleményeinek szcientometriai mutatói megfelelnek az MTA által támasztott követelményeknek. Az értekezéshez felhasznált közlemények létrejöttéhez jelölt alapvetően hozzájárult a tudományos koncepció kidolgozása, a kísérletek tervezése és kivitelezése, és a következtetések levonása terén. A dolgozatot alaposan áttanulmányozva nem maradt kétségem afelől, hogy jelölt a tudományterület nemzetközileg elismert szakértője, aki önálló munkája révén jelentősen hozzájárult ismereteink gyarapításához. A dolgozat ezenkívül több érdekes, további kutatásra érdemes kérdést is felelt.

A doktori értekezés nagy gondossággal megírt, szépen kivitelezett munka. Az „Irodalmi áttekintés” összefoglalja az endotél barrierről, a protein kinázokról és foszfatázokról szóló alapismereteket, valamint részletesen tárgyalja azokat a fehérjéket, amelyek foszforilációja hatással lehet az endotél barrier szabályozására. A célkitűzésekben röviden megfogalmazásra kerülnek azok a kérdések, amelyeket a kísérletes munka során jelölt részletesen tanulmányozott. Az „Anyagok és módszerek” fejezet kellő részletességgel, jól áttekinthetően ismerteti a laboratóriumi munka során alkalmazott módszereket,

technikákat. A dolgozat leghosszabb fejezete, az „Eredmények” rész, ábrákkal bőségesen illusztrálva ismerteti a kísérletes munka során elért eredményeket és részben kitér az azokból levonható következtetésekre is. Az ezután következő „Megbeszélés” fejezetben szerző további következtetéseket von le, és az eredmények több oldalról is megvitatásra kerülnek. A dolgozat szép kivitelezésű, különösen igaz ez az ábrákra, amelyek szemléletes módon illusztrálják a különböző molekuláris folyamatokat, modelleket. Az irodalomjegyzék 267 referenciát tartalmaz, ami a téma irodalmának magas szintű ismeretére utal. A disszertáció minden tekintetben megfelel a formai követelményeknek. A mű hiteles adatokat tartalmaz. A dolgozattal kapcsolatban két formai megjegyzésem lenne. Az „Irodalmi áttekintés” fejezetben található ábrák egy része más szerzők publikációiból lett átvéve. Ezeknél az ábráknál az irodalmi forrás azonban olyan formátumban (első szerző, évszám) van feltüntetve, ami nem alkalmas arra, hogy a számozott irodalomjegyzékben egyszerűen és egyértelműen meg lehessen találni. A bíráló munkáját megkönnyítette volna, ha a disszertáció alapjául szolgáló közlemények a dolgozat végére bekerültek volna, illetve ha az egyes eredményeknél egyértelműen feltüntetésre került volna, hogy azok melyik publikációban szerepelnek.

A disszertáció legfontosabb új eredményei röviden összefoglalva a következők:

- 1.) Felfedezték az endotél MLCK enzim egy új szabályozási mechanizmusát, ami az egyedi N-terminális régióban található Tyr oldallánc foszforilációján keresztül valósul meg.
- 2.) Jellemezték az endotél miozin foszfatáz PP1c β katalitikus és MYPT1 regulátor alegységét és igazolták szabályozó szerepüket az endotél barrier funkcióban.
- 3.) Bizonyították a PP2A foszfatáz enzim részvételét az endotél citoszkeleton szabályozásában és a tau valamint a HSP27 fehérjék defoszforilációjában.
- 4.) Megmutatták, hogy a PP2A enzim aktivitása szükséges az endotél sejtek adherens kapcsolataihoz. Az enzim B α regulátor alegysége kölcsönhatásba lép a VE-kadherin és a β -katenin fehérjékkel.
- 5.) Igazolták, hogy a TIMAP fehérje a PP1c β enzim regulátor alegységeként az endotél barriert védő funkciót tölt be. A TIMAP/PP1c β holoenzim katalizálja az ERM fehérjék defoszforilációját, amit a TIMAP foszforilációja szabályoz.
- 6.) Felismerték a RACK1 állványfehérje szerepét a TIMAP prenilációjában és membránhoz történő transzlokációjában.
- 7.) Tanulmányozták EBP50 és az NHERF2 fehérjék szerepét az endotél sejtekben. Eredményeik arra utalnak, hogy az EBP50 a sejtciklus szabályzásában vesz részt, míg az NHERF2 az ERM fehérjék foszforilációján keresztül a barrier képzésben és az angiogenezisben játszik szerepet.

Az értekezéssel kapcsolatos megjegyzéseim illetve kérdéseim a következők:

- 1.) Az irodalmi áttekintésben olvashatjuk, hogy a simaizom miozin foszfatáz egy katalitikus (PP1c β) és két regulátor alegységből (MYPT1 és M20) áll. A kisebb regulátor alegységről (M20) nem sokat tudunk és a dolgozat sem foglalkozik vele. Az M20 alegység azonban később olyan ábrán is feltüntetésre kerül (5.1.1), ahol az endotél miozin foszfatáz szerepel. Egyértelműen bizonyított-e, hogy az M20 jelen van a tüdő endotél sejtekben és kötődik a MYPT1 fehérjéhez? A MYPT fehérjecsalád mely tagjaitól várható, hogy kötnek M20-at?
- 2.) A 4.1.2. táblázatból számomra nagyon hiányzik az Ala¹⁸/Ser¹⁹ mutáns annak bizonyítására, hogy a Ser¹⁹ foszforilációja lezajlik a Thr¹⁸ foszforilációja előtt. Mi az oka annak, hogy nem vizsgálták ezt a mutánst?
- 3.) Az 50. oldalon olvashatjuk, hogy a p60^{Src} gátlása vagy hiánya esetén az MLCK mindhárom formája autofoszforilálódik. Hol lehet az autofoszforilációs hely az MLCK fehérjén?
- 4.) Jelölt több helyen (pl. 60. oldal) említi, hogy TIMAP fehérje expressziós szintje az endotél sejtekben más sejtekhez viszonyítva „igen magas”. Mekkora expressziós szintbeli különbséget jelen ez? Mi lehet a két regulátor fehérje, a MYPT1 és a TIMAP moláris aránya tüdő endotél sejtekben és vajon hogy viszonyul ez PP1c β mennyiségéhez? Elképzelhető-e, hogy a két regulátor alegység verseng a katalitikus alegységért?
- 5.) Jelölt meggyőzően bizonyította, hogy a RACK1 állványfehérje kölcsönhatásba lép a TIMAP regulátor fehérjével. Elképzelhető-e, hogy a RACK1 képes kötődni a MYPT fehérjecsalád más tagjaihoz is?
- 6.) A 4.2.1/A ábrán látható az a gélkép, amely alapján a TIMAP „új partnerét”, a RACK1 fehérjét azonosították. A piros nyíllal megjelölt sáv meglehetősen halvány és diffúz, első látásra nehéz biztosan állítani, hogy ez egy új sáv lenne a kontroll (TIMAP+LP) mintához képest. Bizonyosságot csak az LC-MS mérés után lehetett nyerni. Látható viszont a gélen több extra sáv, amelyek nincsenek meg a kontrollban. Különösen feltűnő a 43 kDa-os marker sáv felett elhelyezkedő erősen festődő, diszkrét sáv. Vizsgálták-e a többi extra sávot is LC-MS-sel? Milyen fehérje lehet az erős ~45 kDa-os sávban?
- 7.) Több helyen is olvasható a dolgozatban (pl. 111. oldal) és a tézisfüzetben, hogy „a trombin receptorához való kötődése” aktiválja az endotél sejteket (IP₃ és Ca²⁺ szint emelkedés, sejtkontrakció, stb.). Ez a megfogalmazás meglehetősen pongyola és félrevezető. A trombin receptorai az endotél sejteken a proteáz-aktivált receptorok (PAR). A trombin leghatékonyabban a PAR1 receptort hasítja, de nagyobb koncentrációban a PAR4-et is (sőt bizonyos irodalmi adatok szerint a PAR3-mal is reagál). A trombin azáltal aktiválja a PAR-okat, hogy lehasítja az N-terminális végükről egy rövid peptidszakaszt. A proteolízis hatására képződött új N-terminális a PAR liganduma (tethered ligand), aminek a kötődése a receptor extracelluláris doménjéhez kiváltja a szignál transzdukciós eseményeket. A trombin tehát

nem a kötődésével, hanem a proteolízissel aktiválja a receptort. Zimogén vagy katalitikusan inaktív mutáns trombin semmilyen hatással nincs a PAR-okra.

8.) Jelölt eredményei arra utalnak, hogy a TIMAP (és a TIMAP/PP1c β komplex) a magban is lokalizálódik. A „Megbeszélés” fejezetben (123. oldal) olvashatjuk, hogy a TIMAP nukleáris transzportját jelenleg is vizsgálják, és már találtak is olyan fehérjét, aminek ebben a folyamatban szerepe lehet. A dolgozat megírása óta történt valamilyen előrehaladás ebben a témában?

9.) A tézisfüzet 12. oldalán nyilván elírás, hogy SDS-PAGE-vel a sejteket választották szét molekulatömeg szerint. (A dolgozat szerint (41. oldal) 7-12%-os, míg a tézisfüzet szerint 10-15%-os PAGE-t használtak.) Az asszociációs konstans megadásánál (19. oldal) hiányzik a mértékegység (M^{-1}).

A fenti észrevételek a dolgozat lényegi részét nem érintik.

Összefoglalva, Csontos Csilla doktori dolgozatában bemutatott munka jelentős mértékben járult hozzá a tudományterület fejlődéséhez. Jelölt tudományos teljesítménye megfelel az MTA doktori fokozathoz elvárt követelményeknek, ezért **javaslom a nyilvános vita kitűzését és az MTA doktori cím odaítélését.**

2015. július 20.

Gál Péter
tudományos tanácsadó
az MTA doktora