

BÍRÁLÓI VÉLEMÉNY

Bugyi Beáta „Az aktin sejtvázs funkcionális polimorfizmusa: aktinkötő fehérjék vizsgálata” c. MTA doktori értekezéséről

Bugyi Beáta doktori értekezésének tárgya az aktinkötő fehérjék szerepének feltárása az aktin hálózatok funkcionális specializációjában, különös tekintettel az aktin sejtvázs szerveződéséért felelős fehérje kölcsönhatások azonosítására, valamint azok szerkezeti aspektusainak és funkcionális következményeinek leírására. Az aktinkötő fehérjék közül kiemelt figyelmet fordított a tropomiozin, a Flightless-I és a DAAM szerepének vizsgálatára. Tanulmányozta a kiválasztott aktinkötő fehérjék szerepét a sejtek motilis sajátosságait meghatározó protrúziós aktin hálózatok szerveződésében, valamint az aktin és mikrotubulus sejtvázs közötti funkcionális integrációban. Az intracelluláris aktin hálózatok meghatározóak a sejtek motilis sajátosságainak kialakításában és számos élettani folyamatban játszanak fontos szerepet.

Nyilvánvaló tehát, hogy a választott kutatási téma időszerű és jelentős tudományos érdeklődésre tarthat számot. Az citoszkeleton elemi folyamatait végző bonyolult szupramolekuláris rendszerek megismeréséhez csak a vizsgálati módszerek széleskörű arsenáljának bevetésével van remény. A szerző kutatásaihoz korszerű és sokrétű metodikai repertoárt alkalmazott, mint pl. a fluoreszcencia spektroszkópia, szedimentációs analízis, fáziskontraszt mikroszkópia, vagy az egyedi filamentumok megjelenítésre képes teljes belső visszaverődésen alapuló fluoreszcencia mikroszkópia, mindezeket kiegészítve biomimetikus modellrendszerek és bioinformatikai módszerek használatával.

Az értekezés 115 oldal terjedelmű, szép kivitelű, elírást csak elvétve tartalmaz. Általában gördülékeny a fogalmazás, bár olykor talán indokolatlanul sok idegen kifejezést (inzertálódik, triggerel, stb.) használ. Nem igazán hangzik szépen pl. a „humán fehérje GH1 trunkálása” (74. oldal) szófordulat sem. Az értekezés alapját 18 tudományos közlemény képezi, ezekből 8 az eredeti közlemény, a többi összefoglaló jellegű cikk, illetve két könyvfejezet is található közöttük. Az eredeti közlemények szinte mindegyikében a jelölt terminális szerző, ami jól mutatja meghatározó szerepét. Tudományos közleményei a szakterület rangos folyóirataiban jelentek meg, mint pl. a EMBO Journal, a Journal of Biological Chemistry, a Frontiers in Molecular Biosciences vagy az Annual Review of Biophysics. A disszertáció alapjául szolgáló közlemények közé nem volt szerencsés beválogatni a Barkó és mts. (2010) cikket, mert annak eredményei Mihály József MTA doktori értekezésében (2010) bemutatásra kerültek, ezért ismételtelen már nem felhasználhatók.

A 12 oldalas bevezetőben olvasmányos áttekintést találhatunk az aktinkutatás történetéről, az aktinról és az aktin magasabb rendű struktúrákba történő önszerveződéséről. Dicséretes a magyar tudósok aktinkutatásban játszott szerepének hangsúlyos bemutatása. Az aktin hálózatok funkcionális specializációjának mechanizmusait ismertető rész (11-12. oldal) kissé túl rövidre sikeredett, holott az értekezés témakörének megalapozásában ennek bővebb kifejtése hasznos lett volna.

Az „Eredmények” fejezet 4 részre tagolódik. Az első részben bemutatja a tropomiozin izoformák jelentőségét a protrúziós aktin hálózatok kialakításában. A második és harmadik rész a DAAM forminnak az aktin sejtvázdinamika szabályozásában, valamint az aktin és mikrotubulus sejtvázs funkcionális integrációjában játszott szerepét tárgyalja, míg a befejező alfejezetben a gelsolin homológ Flightless-I fehérje aktinnal kialakított kölcsönhatásával és annak sejtvázsabályozó szerepével foglalkozik.

Az „Eredmények és megbeszélésük” fejezet után az alkalmazott módszerek részletes leírása található, amelynek alapján elmondható, hogy az elvégzett kísérletek alaposan átgondoltak és jól megtervezettek voltak. A kísérleti technikákat kreatívan alkalmazta, szükség szerint módszertani fejlesztésekkel gazdagítva.

A disszertáció magas színvonalú kutatómunkát tükröz, amelyet a kreativitás és magabiztos szakmai tudás jellemez. A bemutatott eredmények alapján megállapítható, hogy a Jelölt munkássága jelentősen hozzájárult a tropomiozin izoformák szerepének tisztázásához a protrúziós aktin hálózatok morfológiai és dinamikai tulajdonságainak kialakításában. Kutatásai alátámasztották, hogy a formin családba tartozó DAAM fehérje fontos szerepet játszik mind az aktin sejtvázdinamika szabályozásában, mind az aktin és mikrotubulus polimer rendszerek szerveződésének és működésének összehangolásában. A Flightless-I (Fli-I) fehérje rekombináns úton előállított fragmentumainak vizsgálatával rámutatott a Fli-I alapvető aktin dinamikában játszott sokrétű szerepére és az aktinnal kialakított kölcsönhatásainak funkcionális következményeire.

Amint az előzőekből is kitűnik, a Jelölt a tudományterület szempontjából számos fontos eredményt ért el, amelyeket megfelelő alapossággal be is mutat az értekezésben. Ezeket kiválóan össze lehetett volna foglalni néhány körülmények között megfogalmazott tézispontban. Sajnos még sincs könnyű helyzetben a bíráló, amikor a tézispontok elfogadásáról kell nyilatkoznia. Az „5. Szintézis - tézispontok, tudományos szempontból új eredmények” fejezetben megadott tézispontok túlságosan általánosan, a szükséges konkrétumok mellőzésével, nehezen védhetően lettek megfogalmazva, ezért ebben a formában általában nem tartom őket megfelelőnek és elfogadhatónak.

Vegyük sorra az egyes tézispontokat. A végéről kezdve:

4. Kiépítésre került egy kétcsatornás teljes belső visszaverődésen alapuló fluoreszcencia mikroszkópiai rendszer. Illetve kidolgozásra került több más, fluoreszcencia spektroszkópián és szedimentáción alapuló módszertani fejlesztés is az aktin és az aktin:mikrotubulus polimer rendszerek vizsgálatára.

Ezek az értekezés „Módszerek” fejezetében az alkalmazott metodikák között valóban említésre kerülnek, de újdonságtartalmuk – a szedimentációs analízis kivételével – a disszertációban egyáltalán nem lett bemutatva. Az értekezésből az sem derül ki, hogy mennyire köthető ezen módszerek kidolgozása, illetve az említett FRET mérőrendszer kiépítése a Jelölt személyéhez.

3. A Flightless-I nagy affinitású filamentumvég kötése révén az aktin sejtvázdinamika negatív szabályozója. Ugyanakkor a DAAM C-terminálisával (DAD-CT) kialakított direkt kölcsönhatása révén a sejtvázs DAAM közvetített szabályozásában is szerepet játszhat.

Az első általános állítás igaz, de már korábban is ismert volt (Mohammad et al., 2012), és nem köthető egyértelműen a Jelölt munkásságához. A második mondat ebben a formában csupán egy hipotézis.

2. A DAAM C-terminálisa (DAD-CT) az aktinnal kialakított direkt kölcsönhatásával a formin homológia domének aktivitásainak pozitív szabályozója, valamint citolinker funkciót tölt be az aktin és a mikrotubulus sejtvázs működésének összehangolásában.

Ez a tömör megállapítás tézispontként elfogadható, ugyanakkor a Jelölt eredményei ezen a tématerületen jóval szerteágzóbbak és jelentősebbek.

1. Azonosításra kerültek a protrúziós aktin hálózatok létrehozásában alapvető fehérje:fehérje kölcsönhatások és rekonstruáltuk a vonatkozó fehérjerendszereket.

- *Az eltérő szerkezeti és dinamikai sajátosságokkal rendelkező kompartmentek, a lamellipodium és lamella egy aktin hálózattól, a rendszer önszerveződése révén alakulhat ki. Ebben meghatározóak a tropomiozin fehérjecsalád izoforma specifikus kölcsönhatásai.*
- *A DAAM formin homológia domének, az aktin és a profilin tripartit kölcsönhatása meghatározó a filopodiumszerű aktin hálózat létrehozásában.*

Az utolsó alpontban megfogalmazott állítás már Mihály József 2010-ben megvédett MTA doktori értekezésében is szerepelt, ezért itt új eredményként nem elfogadható. A tézispont első feléből éppen csak a jelölt kutatásai által feltárt konkrétumok hiányoznak.

Összességében tehát a disszertációban szereplő tézispontok - a második kivételével - nem, vagy csak részlegesen elfogadhatóak. Ugyanakkor az értekezésben az eredményeket bemutató alfejezetek végén megtalálható azok rövid, pontokba szedett összefoglalása, amelyek alapján nyilatkozni lehet az elvégzett munka újdonságtartalmáról.

A munka új tudományos eredményeként elfogadható megállapítások:

3.1. A tropomiozin izoformák a protrúziós aktin hálózatok, a lamellipodium és a lamella koordinációjában alfejezetben részletezett kutatásokkal kapcsolatban új tudományos eredményként elfogadom a 34-35. oldalon az 1-6. pontokban összefoglalt eredményeket.

3.2. – 3.3. „A DAAM formin az aktin sejtvázdinamika szabályozásában” és „A DAAM formin az aktin és a mikrotubulus sejtváz funkcionális integrációjában” alfejezetekben bemutatott kutatásokat illetően új tudományos eredményként elismerem a 62. oldalon a „Tudományos szempontból új eredmények” részben „A DAAM C-terminális szakaszának új szerepe az aktin dinamika szabályozásában” és „A DAAM az aktin és a mikrotubulus sejtváz működésének összehangolásában” témakörökben felsorolt (1-3. ill. 1-2.) eredményeket. Sajnos „A DAAM formin homológia domének fiziko-kémiai sajátosságai” témakörben az 1-6. pontokban leírt megállapításokat a Jelölt új tudományos eredményeként nem tartom elfogadhatónak, mert azok Mihály József MTA doktori értekezésében (2010) gyakorlatilag azonos tartalommal már bemutatásra kerültek.

3.4. „A Flightless-I gelsolin homológ fehérje az aktin sejtvázdinamika szabályozásában” alfejezet 76. oldalán az 1-6. pontokban összefoglalt megállapításait is új eredményként elfogadom.

A dolgozattal kapcsolatban felmerült néhány olyan kérdés, amelyek tisztázását fontosnak tartom:

(1) A vizsgálatok során egyes magasabbrendű fajok (*Drosophila melanogaster*, *Homo sapiens*, *Mus musculus*) különféle aktinkötő fehérjéit (ADF, DAAM, Flightless-I, gelsolin, N-WASP, profilin, SALS, tropomiozin TpmBr3/Tpm5NM1) *E. coli* (BL21) expressziós rendszerben termeltették. Általános tapasztalat, hogy a nagyméretű eukarióta fehérjék funkcionális formában történő előállítása baktériumokban komoly nehézségekbe ütközik, különösen, ha cisztein oldalláncokat is tartalmaznak. Pl. a Jelölt által vizsgált *drosophila* Flightless-I fehérje GH16 fragmentuma kifejezetten nagyméretű, 795 aminosavból áll, amelyek között nagyszámú (összesen 17 db) cisztein található. (De pl. a DAAM, profilin vagy cofilin fehérjék is több ciszteint tartalmaznak). Milyen módon bizonyosodtak meg arról, hogy az előállított rekombináns fehérjék minden részletükben megfelelően feltekeredettek-e, kialakult-e a natív szerkezetre jellemző diszulfidhíd mintázat, vagy nem jöttek-e létre hibás S-S keresztkötések?

Minden esetben el lettek-e távolítva a tisztítást elősegítő GST vagy His6 toldalékok? Ha nem, akkor hogyan győződtek meg arról, hogy ezek jelenléte nem befolyásolta-e a vizsgált kölcsönhatásokat?

Mi a helyzet a poszttranszlációs módosításokkal, amelyek az E.coli expressziós rendszerben nem történnek meg? A UniProt adatbázis tanúsága szerint a vizsgált aktinkötő fehérjék jelentős része több poszttranszlációs módosítást is tartalmaz (rendszerint foszforiláltak és acetiláltak), amelyek befolyásolhatják szabályozó funkcióikat. Mindezek mennyiben érintik a kapott eredmények relevanciáját? Nem a poszttranszlációs módosítások hiánya okozza-e bizonyos funkciók elvesztését vagy módosulását?

A fentiek tükrében felmerül az a kérdés, hogy nem lett volna-e célszerűbb eukarióta expressziós rendszerben előállított fehérjékkel végezni a vizsgálatokat?

(2) A Jelölt az aktinkötő fehérjék szerepét az aktin sejtvázszerveződésében többféle modellrendszerben vizsgálja. Több esetben is azonban az egyes fehérje komponensek eltérő organizmusokból származnak. Pl. a Flightless I aktin sejtvázs dinamikában betöltött szerepének tanulmányozása során *ecetmuslica* Fli-I-t használt, az aktin nyúl vázizomból származott, humán gelsolinnal és egér profilinnal kiegészülve. Miért feltételezhetjük, hogy a távoli fajokból származó partnerekkel jól reprezentálhatjuk egy adott sejtben belül működő, együttes evolúció során összezsugorodott fehérje komponensek kölcsönhatásait?

Ha pl. a Flightless I aktinnal vagy aktin filamentumokkal való kölcsönhatására vagyunk kíváncsiak, akkor nem az volna a logikus, hogy ugyanazon fajból származó fehérjékkel dolgozzunk? Bár az aktin nagyon erősen konzerválódott fehérje, az aktinkötő fehérjék már korántsem annyira azok. (Pl. a *drosophila* és a nyúl/humán Fli-I már csak 57 %-os aminosav egyezést mutat.) Egy adott fehérjepár esetében bizonyos kölcsönhatások még az ortológok tekintetében is megmaradhatnak, ugyanakkor mások elveszhetnek. Ha azt találjuk, hogy a Dm Fli-I a nyúl aktinból felépülő filamentumok tekintetében nem rendelkezik fragmentáló aktivitással, abból miért következne, hogy a nyúl Fli-I sem képes szétbontani a nyúl aktinból álló filamentumokat? Nem lehet, hogy csupán arról van szó, hogy az *ecetmuslica* Fli-I fehérje fragmentáló aktivitásért felelős kötőfelszíne az evolúciós változások miatt egyszerűen már nem kompatibilis a nyúl F aktinnal, de a Dm F aktinnal az volna?

(3) Mi indokolja az elsőrendű enzimreakciók kinetikájának leírására kidolgozott Michaelis-Menten modell alkalmazhatóságát az skTpm aktin polimerizációra kifejtett hatásának leírására? Az így származtatott féltelitési koncentrációnak miért van köze az skTpm:F-aktin komplex disszociációs állandójához? Ez a disszociációs állandó egyáltalán jól definiált-e, és különösen a rövid filamentumok esetében nem függ azok (átlagos) hosszától?

A MM modellben az szubsztrát koncentráció függvényében vizsgáljuk az enzimreakció kezdeti sebességét. Az (1) és (2) egyenletekben az skTpm koncentráció jelenik meg a klasszikus formalizmus szubsztrát koncentrációjának a helyén? Még tovább bonyolítja a helyzetet, hogy az skTpm mellett az aktin filamentumok összeszerelődésében az Arp2/3 komplex is szerepet játszik, sőt az ATP jelenléte és hidrolízise további bonyolító tényező lehet.

Hasonlóképpen, miért alkalmazható a klasszikus kompetitív gátlás modellje erre a bonyolult rendszerre? Klasszikusan a szubsztrátkoncentráció reciprokának függvényében ábrázoljuk a reakciósebesség reciprokát. A 8. ábrán miért az Arp2/3 koncentráció kerül a szubsztrátkoncentráció helyére?

(4) 42. ábra: Mi lehet az oka annak, hogy magas Fli-I GH13 koncentrációnál (148.4 nM) az aktin polimerizáció kezdeti sebessége lényegesen gyorsabb, mint a spontán polimerizáció esetén, mégis jelentősen kisebb mértékű filamentum-összeszerelődésnél telítésbe megy a folyamat?

(5) A 42. ábra szerint 10nM FliI GH16 vagy GH13 jelenléte kb. 1/5 részére csökkenti a polimerizációs sebességet. A 43. ábrán miért látunk ennél lényegesen nagyobb mértékű csökkenést?

(6) A 44. ábra szerint a steady-state TIRFM mérések alapján 800 nM Fli-I koncentráció hatására az aktin filamentumok átlagos hossza kb. 1/30-ad részére csökken, de a filamentumok száma csak nagyjából ötszörösére nő. Hova lett az aktin ~80%-a?

(7) Az aktinkötő fehérjék aktin monomerekkel való kölcsönhatásának fluoreszcencia anizotrópiás vizsgálata során Latrunculin A kezeléssel gátolták a G-aktin polimerizációját. A LatA kötődése az aktinhoz nem befolyásolhatja-e az aktinkötő fehérjékkel kialakított kölcsönhatásokat?

(8) A Jelölt értelmezése szerint a profilin:G-aktin kölcsönhatás molekuláris kapcsolóként működik a DAAM, illetve a Fli-I aktin aktivitásainak szabályozásában. Mit értünk itt molekuláris kapcsoló alatt? Általában a molekuláris kapcsolóként működő fehérjék esetében egy konformációváltozás áll a jelenség hátterében. A profilin:G-aktin esetében nem egyszerűen csak egy sztérikus gátlásról van szó?

Apróbb megjegyzések:

- Az értekezés végén található rövidítések jegyzékéből egyes rövidítések kimaradtak (pl. DAD-CT, cDAAM, GH13, GH16, TpmBr3, Tpm5NM1).
- Az elért eredmények tárgyalásánál a könnyebb követhetőség kedvéért hasznos lett volna direkt módon utalni az egyes eredményeket bemutató saját publikáció(k)ra, nem csak a fejezet végén felsorolni a kapcsolódó közlemények listáját.
- Feleslegesnek tűnik minden fejezet végén újra és újra teljes részletezettséggel megadni a kapcsolódó saját publikációkat. Számos saját publikáció így 3-4-szeres ismételtséggel szerepel részletes publikációs adatokkal. Elég lett volna az értekezés alapjául szolgáló közlemények listájában sorszámmal ellátni őket és hivatkozásul azokat megadni.
- 40. ábra: Az összerendezett szekvenciák legfelső blokkjában a 3 Fli-I szekvencia hibásan egy pozícióval jobbra tolódott.
- A 4. ábra leírása és szövegbeli magyarázata túlságosan szűkszavú és nehezen követhető.

Összefoglalva:

A disszertáció magas színvonalú kutatómunkát takar, az MTA doktori értekezéssel szemben támasztott követelményeknek megfelel. Eredményeivel a Jelölt jelentősen gyarapította az általa művelt tudományterületet. A doktori műben foglalt eredmények elegendőek az MTA Doktora cím elnyeréséhez. Az értekezést nyilvános vitára alkalmasnak tartom, a lényegi kérdések kielégítő megválaszolása esetén az MTA doktora cím odaítélését javaslom.

Veszprém, 2025. január 20.


Vonderviszt Ferenc
az MTA doktora