

Vélemény

Dr. Lontay Beáta

„A miozin foszfatáz szerepe és szabályozása fiziológias és patológias sejtfolyamatokban”
című

MTA Doktori értekezéséről

Lontay Beáta MTA doktori dolgozata egy régóta ismert enzim, a miozin foszfatáz (MP), újabban felfedezett funkcióinak és szabályozásának jobb megértése érdekében végzett kutatómunkáját foglalja össze. A fehérjék foszforilációja a leggyakrabban előforduló poszttranszlációs módosítás, ami jelentős mértékben emeli az eukarióta sejtek proteomjának változatosságát és szabályozhatóságát. Ez a módosítás két enzim csoport, a kinázok és a foszfatázok ellentétes hatású működésének köszönhetően egy reverzibilis módosítás, ami az összes alapvető sejt folyamat szabályozásában részt vesz. A legfontosabb sejt folyamatokon túl, az eukarióták genomjában kódolt több száz kináz és a regulátor alegységekkel együtt szintén nagyszámú foszfatáz számos specifikusabb folyamat szabályozásában is kitüntetett szerepet játszik az egyedfejlődés és a normál homeosztatikus működés során egyaránt. Mindezek alapján nem meglepő, hogy a foszforiláció és defoszforiláció hibás működése nagyszámú betegséggel hozható összefüggésbe, tehát megállapíthatjuk, hogy az értekezés egy orvosbiológiai szempontból is fontos kutatási területet érint.

A pályázó a Debreceni Egyetem Orvosi Vegytani Intézet több évtizedes hagyományaira támaszkodva a miozin foszfatáz, és egy fontos regulátor fehérje, a Smoothelin-like 1 (a továbbiakban SMTNL1), vizsgálatával foglalkozott, a klasszikus enzimkinetikai és biokémiai megközelítések világától messze eltávolodva a molekuláris biológia és a sejtbiológia modern megközelítéseire. A dolgozatban bemutatott kísérletek egy rendkívül komplex eszköztár használatára épültek, ami a biológiai modellek szintjén magában foglalt különböző sejt modelleket, egér modelleket és humán szöveti minták analízisét, használtak számos biokémiai mérési módszert, számos egyéb fehérje vizsgálati módszert, microarray analízist, sejtbiológiai teszteket, végeztek sejtanyagcsere vizsgálatokat és proteomikai elemzéseket. Erre az igen impresszív eszköztárra támaszkodva a legtöbb projektben sikerült megvalósítani, hogy az alacsonyabb komplexitású (*in vitro* vagy egyszerűbb sejt) rendszerekben nyert eredmények *in vivo* vagy az *in vivo* helyzetet sokkal jobban megközelítő modellekben is megerősítést nyerjenek. Úgy gondolom a pályázónak (is) kitüntetett szerepe volt abban, hogy ez a szemlélet váltással is járó metodikai fejlődés megvalósuljon az intézetben, és azt is kiemelnédnek tartom, hogy hasonló bátorsággal kezdte el tanulmányozni a miozin foszfatáz „nem-kanonikus”, tehát nem az MLC20 defoszforilálásához köthető funkcióit. Ez egy új neuronális funkció és a bőrszöveti szabályozó szerepek felismerését eredményezte. A miozin foszfatáz egyik targetáló alegységét, a MYPT1 fehérjét is jellemezték, és ezek a vizsgálatok vezettek el az SMTNL1 fehérjéhez, ami szerepet játszik a MYPT1 szabályozásában a vázizomban a terhesség során. Mindezek mellett az SMTNL1 részletesebb vizsgálatát is elvégezték, és leírták a fertilitásban betöltött szerepét, az inzulinérzékenyítő hatását, és a pajzsmirigy hormontól függő folyamatokban játszott szerepét. Ezzel jelentős mértékben hozzájárultak a szakterület fejlődéséhez, és olyan új összefüggéseket tártak fel a miozin foszfatáz és a tumorképződés, az inzulinérzékenység és a progeszteron, illetve a pajzsmirigy hormon által szabályozott anyagcsere utak között, amelyek specifikus, új terápiás fejlesztések alapjául szolgálhatnak.

A doktori értekezés 13 eredeti tudományos közleményre alapul és közel 15 év kutatómunkáját foglalja össze. A jelölt a fenti 13 publikáció mindegyikében meghatározó szerző, 3-nak első, 10-nek utolsó szerzője, ami jelzi a kutatómunka végrehajtásában játszott

döntő szerepét. Ezeken a publikációkon kívül a pályázó 22 további közleménynek is szerzője (több esetben meghatározó szerzője). A közleményekre kapott független idézetek száma 511, ami a cikkek jó nemzetközi visszhangját tükrözi, és egyben megmutatja, hogy a jelölt túlteljesítette az osztály által meghatározott minimum követelményeket.

Az értekezésben bemutatott tézisek közül a következőket ismerem el új tudományos eredménynek:

1. Azonosították a miozin foszfatáz és a RhoA aktivált kináz új neuronális szubsztrátjait, köztük a SNAP-25 fehérjét, és leírták, hogy a miozin foszfatáz a SNAP25 Thr138 defoszforilációjával elősegíti a neurotranszmitter kibocsátást.
2. A miozin foszfatáz és a ROK a PRMT5 fehérje Thr80 oldalláncának módosítása révén modulálja a H2A és H4 hiszton fehérjék arginin metilációját, ami hozzájárul a tumorszupresszor génkifejeződés szabályozásához. Igazolták a miozin foszfatáz tumorgátló szerepét, valamint hogy a MP/PRMT5/hiszton jelpálya felső szabályozó eleme a PPM1B foszfatáz, ami a MP MYPT1 szabályozó alegységét defoszforilálva gátolja a tumorigenezist.
3. A miozin foszfatáz elősegíti a bőr normál homeosztázisának fenntartását és az epidermális sebgyógyulást. Hatását sejtes szinten a proliferáció és a migráció aktiválásával, és a differenciáció gátlásán keresztül fejt ki.
4. Kimutatták, hogy az SMTNL1 egy kettős hatásmechanizmusú fehérje. Egyrészt a citoszolban a miozin foszfatáz MYPT1 alegységéhez kötődve gátolja az MP holoenzim aktivitását, másrészt foszforiláció hatására a sejtmagba transzlokálódva a progeszteron receptor transzkripció kofaktoraként ligand-függő módon szabályozza bizonyos gének expresszióját.
5. Az SMTNL1 részt vesz a vázizomzat terheességhez való adaptációjában, ami képessé teszi az anyát a magzat súlyának hordozására. Ezen kívül az SMTNL1 szükséges a terhességi glükóztolerancia kialakulásához is. C2C12 sejtekben végzett kísérletek alapján az SMTNL1 progeszteron jelenlétében a PI3K-AKT-mTOR útvonal aktiválásával és a GLUT4 kifejeződés növelésével elősegíti az izomsejtek glükózfelvételét, és ezzel párhuzamosan az IR/IRS1 kapcsolat modulálásával segíti az inzulinrezisztencia kialakulását.
6. Az SMTNL1 hiányában egerekben növekszik az embrionális halálozás, ami alacsonyabb utódszámot és csökkent fertilitást okoz.
7. Megállapították, hogy az SMTNL1-nek fontos szerepe van a pajzsmirigyhormon által indukált fiziológias változásokban. Eredményeik alapján az SMTNL1 inzulinérzékenyítő és trijód-tironin (T3) antagonistikus hatása révén képes a hipertireózis és az azt kísérő inzulinrezisztencia mérséklésére az IRS kinázok aktivitásának és a hexokináz enzim expressziójának csökkentésén keresztül.
8. Feltárták, hogy a miozin foszfatáz különböző módon szabályozódik a nem differenciált mioblasztokban és a miotubulusokban, aminek legalább az egyik oka, hogy a mioblasztokban főként az MYPT1, míg a miotubulusokban az MYPT2 épül be a holoenzimbe. Az SMTNL1 elősegíti az MYPT1 kifejeződését, és ily módon a mioblaszt állapot fenntartását, a trijód-tironin viszont magas szintű MYPT2 expressziót okoz, ami a NKA pumpafehérje foszforilációs

állapotának szabályozásán keresztül befolyásolja a differenciálódott izomsejtek működését és kontraktilitási képességét.

Formai megjegyzések

A dolgozat a hagyományos szerkezeti tagolást követi 125 oldal terjedelemben, 49 ábrával és néhány táblázattal illusztrálva. A szöveg alapvetően jól szerkesztett, lényegre törő, tömör stílusban íródott, felépítése mindvégig logikus, a gondolatmenet jól követhető. Ezt annak fényében kifejezetten méltányolandónak tartom, hogy a disszertáció számos különböző témát ölel át, nagyon sokféle kísérleti elrendezést tartalmaz, és rengeteg rövidítés is van benne. Az ábrák többsége letisztult, jól átlátható illusztrációkat tartalmaz, amelyek kiválóan segítették a jobb megértést. Mindezen pozitívumok mellett apróbb nyelvtani hibák, ragozási problémák és elütések is szép számban találhatók a szövegben, ezek többsége valószínűleg kiküszöbölhető lett volna egy gondosabb átnézéssel, amire talán az időhiány miatt már nem került sor. Az ábra aláírások magyarul kerültek a szövegbe, és dicséretes módon minden esetben arra az oldalra, ahol maga az ábra található, de az ábrákon maradtak az angol feliratok is, ami viszont ilyen nagyszámú ábra esetén szintén érhető és elfogadható. Ezek a kisebb formai problémák a dolgozat érthetőségét nem befolyásolták érdemben, összességében az értekezés formailag tökéletesen megfelel a követelményeknek, és több témakörben is kifejezetten hasznos, tartalmas szakirodalmi áttekintést ad, az eredmények mértéktartó interpretációja mellett.

Kérdéseim az értekezés szakmai részével kapcsolatban

1. Tökéletes átfedést mutat-e a MP és az MYPT1 kifejeződési mintázata a központi idegrendszerben? Ki lehet-e zárni, hogy az MYPT1 a MP-től független mechanizmusok útján is képes befolyásolni a sejtes folyamatokat? Hogyan képzeljük el pontosan a MYPT1 és a foszforiláció szerepét a neurotranszmitter felszabadulás szabályozásában? Tekinthejtük ezt egy obligát lépésnek, ami feltétlenül szükséges a vezikula „priming”-hoz, vagy itt valami finomabb, komplexebb szabályozás valósul meg? Ismert-e valamilyen visszacsatoló mechanizmus a vezikula felszabadulás Ca^{2+} ion beáramlás által szabályozott utolsó lépése és a foszforiláció szintjén megvalósuló szabályozási lépések között? Vannak-e nagyfelbontású fehérje lokalizációs adatok a MP/MYPT1 komplexre a preszinaptikus térben a szinaptikus vezikulákhoz képest? Tipikus-e, hogy ez a protein foszfatáz komplex specifikus sejten belüli felhalmozódást mutat vagy jellemzőbb az egységes citoplazmás eloszlás?

2. Szabályozott-e hepatokarcinóma (HepG2) sejtekben a MP és/vagy az MYPT1 sejtmagi transzportja/lokalizációja, vagy ezek állandó magi komponensek? Az 57. oldalon annak a kérdésnek a vizsgálatát veti fel a pályázó, hogy mi lehet a MP/PRMT5 sejtmagi jelátviteli rendszer upstream szabályozója, de ennek megválaszolása érdekében a nukleáris interaktomból kerestek jelölteket. Felmerül azonban a kérdés, hogy hogyan kapcsolódhat ez a rendszer a citoplazmás és/vagy akár sejten kívüli folyamatokhoz, és hogyan lehetne azonosítani az ott található felső szabályozó elemeket?

3. A bőrszövet homeosztázisával kapcsolatos kísérletsorban összefoglalásra kerültek a PP1 és az MYPT1 gének csendesítéséhez köthető génkifejeződés beli változások. Az azonban nem világos számomra, hogy akkor itt ismét a sejtmagi foszfatáz funkciókhoz köthető az elsődleges hatás, vagy a génexpressziós változásokat indirekt változásnak tekinthetjük?

4. Az SMTLN1 fehérje a PR-B kofaktora, ami nem-terhes állapotban gátolja a PR-B aktivitását, míg terhes egerekben ez a gátlás megszűnik (a 31. ábra alapján). Mi ennek a változásnak a molekuláris mechanizmusa?

5. Az 5.5.2 fejezetben leírt eredmények alapján az SMTNL1 citoplazmás kinázok és génexpressziós változások által is elősegíti az izomsejtek inzulinérzékenyítését. Kérdésem, hogy a génexpressziós változások itt is a PR-B receptoron keresztül valósulnak meg vagy az SMTNL1 más módon is képes a génkifejeződést szabályozni?

6. Ahogy az a 45. ábrán is össze van foglalva, az SMTNL1 fontos szerepet játszik a hipertireózisos vázizom anyagcseréjének szabályozásában, és a modell szerint itt elsődlegesen sejtmagi szerepről van szó. Ismert-e, hogy ez a feltételezett transzkripciós szabályozás milyen transzkripciós faktorok és/vagy kromatin szabályozó fehérjék közreműködésével valósul meg? Egy ehhez kapcsolódó általánosabb kérdés, hogy az SMTNL1 fehérje citoplazmás és sejtmagi funkciói hogyan viszonyulnak egymáshoz? Helyes az az elképzelés, hogy a citoplazmában elsődlegesen az MP gátló faktorának tekinthetjük, míg foszforilált formában elsődleges egy sejtmagi transzkripciós kofaktorként működik? Léteznek olyan specifikus mutánsok vagy egyéb eszközök, amelyek segítségével különböző sejtípusokban szelektíven lehetne a citoplazmás és a sejtmagi funkciókat vizsgálni, tanulmányoztak már pl. NLS deléciót hordozó mutánsokat?

A pályázat egészét összefoglalva, Lontay Beáta munkáját és eddig elért eredményeit minden szempontból kitűnőnek tartom. A doktori értekezés formai és tartalmi vonatkozásokban is tökéletesen megfelel az MTA doktora fokozat megszerzéséhez szükséges feltételeknek, ezért a nyilvános vita kitűzését és sikeres nyilvános vita után az MTA doktora cím odaítélését feltétlenül javaslom.

2025. november 19.

Dr. Mihály József
tudományos tanácsadó
az MTA doktora