



## Válaszok Dr. Homolya László kérdéseire

Ezúton szeretném kifejezni hálámat Dr. Homolya Lászlónak az MTA doktora értekezéséről készített alapos, konstruktív és minden részletre kiterjedő bírálatáért. Köszönöm a támogató visszajelzéseket és az építő jellegű kritikai észrevételeket; ezek jelentős mértékben hozzájárulnak az értekezésben bemutatott eredményeinek precízebb kontextusba helyezéséhez.

1. *Mivel az SMTNL1 fehérje hasonló súlyt kap az értekezésben, mint a miozin foszfatáz, véleményem szerint az előbbit is érdemes lett volna belefoglalni a címbe. Ugyan a két fehérje kölcsönhat egymással, de a dolgozatban az SMTNL1-nek több, a miozin foszfatáztól független szabályozó mechanizmusát is megismerhettük.*

Köszönöm a megjegyzést.

2. *Bár lehet, hogy a következő észrevételem ízlés kérdése (és „az ízlésről nem lehet vitatkozni”); számomra egy kicsit szokatlan formátumot választott a jelölt az értekezéshez. Mindegyik eredmény alfejezet egy terjedelmes és részletes bevezetéssel indul, ami rendkívül könnyen követhetővé, olvasmányossá teszi az disszertációt, viszont sokszor a konkrét eredményekből csak ízelítőt kap az olvasó. Sok izgalmas és érdekes eredmény csak a szövegben kerül említésre (gyakorlatilag „data not shown”) vagy a disszertáció alapját képező saját közleményeket behivatkozva szerepel. Így az olvasónak (bíróknak) marad az a megoldás, hogy fellelője a disszertációban mellékelt publikációt, és kikeresi az adott eredmény ábrát. Sajnálatos módon az is előfordul, hogy az összegzésben felsorolt legfőbb eredmények egyike-másika sem szerepel az értekezésben bemutatott ábrán, csak a szövegben. Ezek közül a legszembetűnőbb példa, hogy a célkitűzések között és az új eredmények felsorolásában is szerepelt az SMTNL1 fehérje a miozin-foszfatáz a MYPT1 alegységen keresztüli szabályozása, valamint az SMTNL1 MYPT1-ről való leválása és magi transzlokációja a PKA/PKG foszforiláció hatására. Ha ennek a szerkesztési módnak terjedelmi korlátai voltak, véleményem szerint érdekesebb lett volna rövidebbre fogni az eredmény fejezetben lévő bevezetőket, esetleg a módszertani részt tömörebbre venni – csak meghivatkozva a publikált metodikákat. Hasonlóképpen szokatlan volt számomra a „Függelék” fejezet, ami gyakorlatilag a cikkekben mostanában szokásos „Supplementary*



## *Material” funkcióját látta el.*

A disszertáció szerkezetére nincs részletesen kifejtett követelmény. Munkámhoz az elmúlt években sikeresen fokozatot szerzett kollégák disszertációját vettem alapul. Ezt követtem mind a Függelékek, mind a részletezett ábrák számánál. A disszertációban taglalt cikkek száma minimum 10, én 13-at foglaltam össze. Elnézést kérek a Célkitűzésben megjelenített, de végül nem tárgyalt pont miatt. Ez a disszertáció terjedelme miatt végül a Bevezetésbe került, és nem került kihúzásra a Célkitűzésekből. A módszerek egy része a felhasznált cikkekben először került bevezetésre, emiatt történt a leírásuk.

3. *Az érdemi kérdéseim előtt szintén szóba kell hozni, hogy sajnálatos módon az értekezés a szokásosnál sokkal több elütést tartalmazott, ami nemcsak esztétikailag volt kifogásolható, de olykor értelemzavaró is volt.*

Ezekért elnézést kérek. Azóta javításra kerültek.

## **A disszertációval kapcsolatos szakmai jellegű kérdéseim:**

4. *A hepatocelluláris karcinómák vizsgálatakor a Grade 2 és Stage I-II esetekben nem látni miozin foszfatáz gátlást, viszont fokozódik a PRMT5 aktivitás, ami nem jár a H2AR3 hiszton szimmetrikus dimetilációjával (16. ábra). Milyen mechanizmussal magyarázható ez a jelenség?*

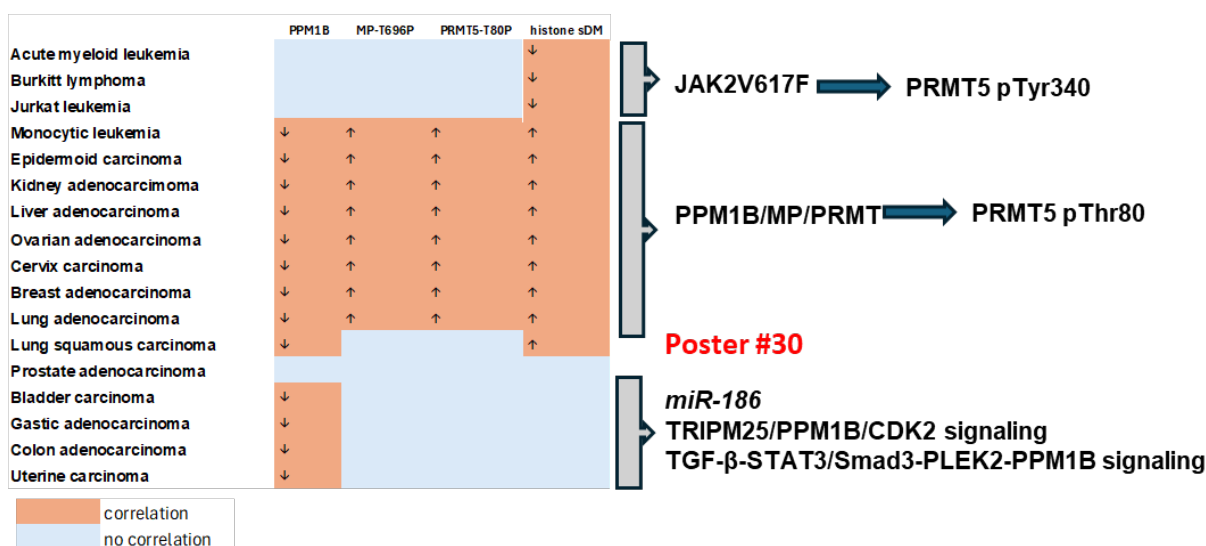
A hepatocelluláris carcinóma grádusa a daganatsejtek szövettani differenciáltságát mutatja, ahol a 2-es fokozat közepesen érett, míg a 3-as fokozat éretlenebb, gyorsabban osztódó és agresszívabb sejteket jelent. A betegség stádiuma vagy státusza ezzel szemben a kiterjedést jelzi: a 2-es stádium általában egy nagyobb vagy több kisebb gócot jelent erek érintettsége nélkül, míg a 3-as stádiumban a daganat már betör a nagy erekbe, vagy ráterjed a környező szövetekre. Összességében a grádus a daganatsejtek biológiai jellegét, míg a stádium a tumor fizikai méretét és a szervezetben való elterjedtségének súlyosságát határozza meg.

A miozin foszfatáz (MP) gátlásának mechanizmusa a 3-as grádusban a RhoA/Rho A aktivált kináz (ROCK) útvonal felerősödésének következménye lehet. Leírták már, hogy a RhoA és a ROCK fokozott túlműködése jellemző 3-as grádusú hepatocelluláris karcinómában [1, 2]. Ez a folyamat a 2-es grádusban még kevésbé domináns, így ott elméletileg a MP aktívabb maradhatott. A másik magyarázat a MP specifikus CPI-17 inhibitor fehérjéjének grádusfüggő expressziója, amely a daganatos transzformáció során a emelkedett expressziós szintet mutatott [3]. Ha a CPI-17 aktiválódik (foszforilálódik), rendkívül erősen gátolja a MP [4]. Ez a gátlás kulcsfontosságú a daganatsejtek mozgékonyságához és áttétképző képességéhez, ami a 3-as



grádusú, rosszul differenciált sejtekre jellemző. Szintén magyarázatul szolgálhat a MP-t defoszforiláló PPM1B enzim expressziós szintjének jelentős csökkenése, ami vizsgálataink szerint szintén a grádustól és státusztól függ [5].

Emellett érdemes megemlíteni, hogy 17 különböző daganatsejten vizsgálva a PPM1B/MP/PRMT5/hisztin jelátviteli pályát számos eltérést tapasztaltunk. Bizonyos daganatsejtekben a PRMT5 aktivációja nem annak Thr80 foszforilációján keresztül történik. 1, Az egyik daganatcsoportban csak a hisztin szimmetrikus dimetilációs változását tapasztaltuk. Ennek magyarázata abban lehet, hogy a JAK2V617F konstitutívan aktivált, mutáns onkogén tirozin-kináz mieloproliferatív neoplazmában szenvedő betegben hiperfoszforilálta a PRMT5 enzimet a Try340 oldalláncon. Ez megakadályozta a metilozóma komplex létrejöttét, a MEP50 fehérje dokkolódását, amely az enzim aktivitásának jelentős változását és a szimmetrikus dimetiláció csökkenését okozta [6]. Ez a jelenség mehet végbe bizonyos leukémiás sejtvonalak esetén. 2, Számos esetben találtunk korrelációt az általunk leírt PPM1B/MP/PRMT5 jelátviteli útvonallal (pl. tüdődaganat, petefészekdaganat). 3, Érdekes módon a gyomordaganatban vagy húgyhólyag-karcinómában egyedül a PPM1B csökkent expressziójával korrelált a daganatképződés. A PPM1B génexpresszió szintű gátlása vagy az előbb említett daganatokban leírt- PPM1B-t célzó- miR-186 emelkedett szintjével [7], vagy akár a TRIPM25 jelátviteli pályájával magyarázható. Ez utóbbi egy E3 ubiquitin ligáz, amely kötődik a PPM1B-hez, és ubiquitinálja azt, amely a PPM1B fehérje proteasomális degradációhoz vezet gyomorrák sejtekben. Mivel a PPM1B normál esetben gátolná a sejtciklust (a CDK2 defoszforilálásával), a PPM1B csökkent expressziója miatt a CDK2 aktív marad. Ez felgyorsítja a sejtosztódást (G1-S





fázisátmenet), ami a daganat növekedését eredményezi [8]. Szintén magyarázhatja a PPM1B csökkent expresszióját egy másik proteolitikus degradációs útvonal, amelyben a TGF $\beta$ -STAT3/Smad3 hatására indukált PLEK2 (pleckstrin-2) is a PPM1B-hez kötődve ubiquitin-függő degradációt okoz [9].

**5. A 38. ábrán bemutatott mechanizmus szerint a SMTNL1 stimulálja a PI3 kinázt. Milyen kísérleti adat támasztja ezt alá? Lehet-e tudni, hogy ez közvetlen vagy közvetett hatás? Vajon a MYPT-nek és a miozin foszfatáznak van-e valamilyen szerepe ebben a szabályozásban?**

Az SMTNL1 kísérleti eredményeink alapján fokozza a PI3 kináz aktivitását és az ahhoz kapcsolódó jelátviteli pályát. Az SMTNL1 kulcsszerepet játszik az inzulinérzékenység fenntartásában azáltal, hogy elősegíti az inzulinreceptor-szubsztrát 1 (IRS-1) és a PI3K közötti kapcsolatot. Ko-immunprecipitációs kísérletekkel kimutattuk, hogy az SMTNL1 overexpressziója inzulinrezisztens C2C12 sejtekben fokozza a PI3K p85 alegységének kötődését az IRS-1-hez [10]. Szintén az SMTNL1 overexpressziója szignifikánsan csökkentette az IRS-1 molekula gátló szeril-foszforilációit (nevezetesen a Ser612 és Ser307 oldalláncokon). Ezen helyek foszforilációja általában megakadályozza a PI3K kötődését; az SMTNL1 tehát a gátlás feloldásával stimulálja az útvonalat. Az SMTNL1 a PI3K downstream elemeire is hatással volt: nőtt az Akt (Protein Kináz B) foszforilációja és aktivitása is [10]. Emellett az SMTNL1-hiányos (KO) egerekben és miotubulusokban csökkent PI3K-aktivitást és inzulinrezisztenciát figyeltünk meg [2].

Vizsgálataink alapján a hatás közvetett. Az SMTNL1 nem közvetlenül a PI3K enzimhez kötődve aktiválja azt, hanem egy összetett jelátviteli hálózaton keresztül: az SMTNL1 csökkenti a PKC $\epsilon$  (protein kináz C epsilon) génexpresszióját és aktivitását. A PKC $\epsilon$  aktivitásának csökkenése miatt mérséklődik az ERK1/2 és a JNK kinázok aktivitása. Mivel ezek a kinázok felelősek az IRS-1 gátló szerin-foszforilációjáért, gátlásuk révén az IRS-1 kölcsönhatásba tud majd lépni a PI3K-zal, fokozva az inzulin jelátvitelt. A MP inzulin jelátvitelre kifejtett hatása jelen pillanatban folyó vizsgálataink tárgya. Az IRS1 két olyan Ser foszforilációs hellyel rendelkezik, amelyeket a ROCK enzim foszforilál és az előzőekben tárgyalt oldalláncokkal ellentétben inzulinérzékenyítő hatásúak (IRS-1 Ser 616 és 635)[11]. A MP feltételezésünk szerint ezeket az oldalláncokat defoszforilálja.



6. *A 35. ábra D panelén azt látjuk, hogy az inzulin kezelés hatására csökken az IRS1 expresszió; a többi panelen pedig az IRS1 különböző foszforilált formáit láthatjuk. A foszforilációs kaszkádok vonatkozásában mindig felmerül a kérdés, hogy egy adott rendszerben a foszfo-protein abszolút mennyisége a meghatározó a downstream események tekintetében vagy a relatív foszforiláltsági állapota. A legtöbb ilyen jellegű közleményben ez utóbbi, százalékos foszforiláltságot bemutató ábrákkal találkozunk. Mi a jelölt véleménye erről? Hogyan értelmezhetők az IRS1-re vonatkozó eredmények ebben a tekintetben? Nem vagyok biztos benne, de vajon hasonló kérdés felmerül-e a 46. ábrán bemutatott MYPT izoformákkal, illetve a 47. ábrán bemutatott a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPázsal kapcsolatban. Vagy ezekben az esetekben a foszfo-protein mennyisége szerepel egy relatív skálán – az üres vektor/kezeletlen mintára normalizálva?*

Kísérleteink során nem volt módunkban DICE multiplex kvantitatív Western blot analízist végezni (a technológia az intézetünkben nem állt rendelkezésre), így kvantitatív Western blot analízist végeztünk. Itt a vizsgált fehérje expresszióját legalább egy/néhol kettő belső kontrollra/háztartási géntermékre normalizáljuk. A foszforiláció esetén a foszforilált sáv denzitás értékét (csak akkor, ha nem mutat szaturációt), az adott fehérje denzitásával osztjuk. Természetesen mindezek előtt levonásra kerül a membrán háttér értéke. A relatív változást a kontroll, kezeletlen minta hányadosához viszonyítjuk. Amikor lehetőségünk van, “stripping és probing” technikát alkalmazunk: először a foszfo-jelet detektáljuk, majd a kérdéses fehérje ellen termeltetett antitesttel inkubáljuk és hívjuk elő a membránt. A foszforilált format mindig ugyanannak a fehérjének az összmennyiségéhez viszonyítjuk. Ez azért szükséges, mert a kezelések hatására nemcsak a foszforiláció mértéke változhat meg, hanem magának a fehérjének a szintézise vagy lebomlása is.

A 35. ábrán az inzulinrezisztencia egy érdekes, már más munkacsoport által leírt jelensége látszódik: az IRS1 fehérje expressziója csökkent az inzulinrezisztencia modellben proteoszómalis degradáció által [12]. Így az inzulinrezisztencia nemcsak a Ser oldalláncok foszforilációját, de egyúttal a fehérje degradációját is okozza, az előbbi SMTNL1-től független, az utóbbit attól függő módon. Itt is az IRS1-re normalizáltuk az IRS1 foszforilációját, és a relatív értékeket mutattuk. A 47. ábrán is így végeztük a normalizálást. Ezen kísérletsorozatban a MYPT1 expressziójának csökkenése, és a MYPT1 gátló foszforilációjának növekedése együttesen eredményezi a MP holoenzim gátlását.



**7. 42. ábra jobb oldali panelén láthatjuk, hogy hipertireózisos biopsziákban jelentősen csökken az SMTNL1 expressziója. Milyen mechanizmus állhat ennek hátterében?**

Az SMTNL1, mint transzkripciós kofaktor, elsősorban a progeszteron receptorokat szabályozza [36]. T3 jelenlétében nem észleltünk fehérje-fehérje kölcsönhatást a pajzsmirigyhormon receptorok (TR $\alpha$ / $\beta$ ) és az SMTNL1 között [13]; így kizártuk annak lehetőségét, hogy az SMTNL1 a TR receptorok koregulációs komplexének tagja lenne. Humán euthyreoid és hyperthyreoid mintákon végzett adatok azt mutatták, hogy az emelkedett aktív pajzsmirigyhormon (T3) szint drasztikusan csökkentette az SMTNL1 expresszióját. Ezenkívül az SMTNL1 expressziója fordítottan arányos volt a T3-mal a C2C12 differenciálódás során, de a T3 csak a differenciált miocitákban okozott szignifikáns SMTNL1 expresszió csökkenést, ami a differenciált vázizmokkal összefüggő mechanizmusra utal. A PKA aktiválása a TR $\alpha$  expressziójának jelentős csökkenését eredményezte, különösen az SMTNL1-et overexpresszáló sejtekben, ami arra utal, hogy a SMTNL1 PKA általi foszforilációja sejtmagi transzlokációt indukált, és az SMTNL1 ezáltal módosíthatta a TR $\alpha$  expresszióját [14]. Az egyik lehetséges magyarázat az SMTNL1 hipertireózisban lévő expressziós szint csökkenésére, hogy a T3 számos olyan protein kinázra képes nem-genomi aktiváló hatással lenni, amelyek foszforilálják és aktiválják a transzkripciós faktorokat, ami így végül transzkripciós szabályozást eredményez [15]. Emellett az SMTNL1 promóterét megvizsgálva a GR, AP-1, RXR, MyoD és ER transzkripciós faktorok kötőhelyeit azonosították, de a TR-ét nem [16]. Így a másik feltételezés, hogy TR indirekt módon szabályozza az SMTNL1 génexpresszióját. Irodalmi adatok alapján a TR az AP-1 komplexhez kötődve hormonfüggő módon szabályozza a génexpressziót, anélkül, hogy a DNS-hez kötődne. Ezt támogatja megfigyelésünk, miszerint a TR $\alpha$  expressziójának csökkentését a SMTNL1 túltermelése és a T3 kezelés is kiváltja, ami arra utal, hogy a TR $\beta$  az SMTNL1 lehetséges transzkripciós szabályozója. A másik lehetőség, hogy a MyoD kölcsönhatásba léphet az SMTNL1 expresszióját befolyásoló TR-kal egy kiterjedt „szabályozó rács” (regulatory lattice) formájában, ahol különböző útvonalak kommunikálnak és befolyásolják egymást [17].



8. *A jelölt meggyőzően bemutatta, hogy az SMTL1 overexpressziója inzulinérzékenyítő és trijód tironinnal antagonistázó hatással bír, ami révén képes lehet a terhességi vagy a hipertireózis következményeként kialakuló inzulinrezisztencia mérséklésére. Milyen terápiás alkalmazás képzelhető el az SMTNL1 vonatkozásban?*

Munkacsoportunk a Richter Reprodukciós Hálózaton belül egy olyan Smoothelin-mimikáló peptidet tervezett, amely a lehető legrövidebb, még transzkripciós aktivitásra hatásos peptid. A peptid nem kötődik a MP MYPT1 alegységéhez, így nem módosítja a sejtek kontraktilis funkcióit. Előzetes kísérleteink alapján a peptid ígéretes terápiás jelölt lehet az inzulinrezisztenciával összefüggő rendellenességek kezelésére. A PR-B aktivitás szelektív modulálásával a peptid fokozza az inzulinérzékenységet. Ez a stratégia ígéretes a szövetspecifikus inzulinérzékenység fokozására és esetlegesen a hipertireózis esetén fellépő szarkopénia kezelésére is.

## Hivatkozások

- [1] Y. Bai, F. Xie, F. Miao, J. Long, S. Huang, H. Huang, J. Lin, D. Wang, X. Yang, J. Bian, J. Mao, X. Wang, Y. Mao, X. Sang, H. Zhao, The diagnostic and prognostic role of RhoA in hepatocellular carcinoma, *Aging* (Albany NY), 11 (2019) 5158–5172.
- [2] B. Lontay, K. Bodoor, A. Sipos, D.H. Weitzel, D. Loiselle, R. Safi, D. Zheng, J. Devente, R.C. Hickner, D.P. McDonnell, T. Ribar, T.A. Haystead, Pregnancy and Smoothelin-like Protein 1 (SMTNL1) Deletion Promote the Switching of Skeletal Muscle to a Glycolytic Phenotype in Human and Mice, *J Biol Chem*, 290 (2015) 17985–17998.
- [3] L. Li, J. Yan, J. Xu, C.Q. Liu, Z.J. Zhen, H.W. Chen, Y. Ji, Z.P. Wu, J.Y. Hu, L. Zheng, W.Y. Lau, CXCL17 expression predicts poor prognosis and correlates with adverse immune infiltration in hepatocellular carcinoma, *PLoS One*, 9 (2014) e110064.
- [4] A. Kiss, F. Erdodi, B. Lontay, Myosin phosphatase: Unexpected functions of a long-known enzyme, *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 1866 (2019) 2–15.
- [5] A. Makai, I. Keller, F.A. Szalmas, A. Ungvari, D. Horvath, E. Major, A. Enyedi, I. Takacs, B. Lontay, Decreased PPM1B Expression Drives PRMT5-Mediated Histone Modification in Lung Cancer Progression, *Biomolecules*, 15 (2025).
- [6] F. Liu, X. Zhao, F. Perna, L. Wang, P. Koppikar, O. Abdel-Wahab, M.W. Harr, R.L. Levine, H. Xu, A. Tefferi, A. Deblasio, M. Hatlen, S. Menendez, S.D. Nimer, JAK2V617F-mediated phosphorylation of PRMT5 downregulates its methyltransferase activity and promotes myeloproliferation, *Cancer Cell*, 19 (2011) 283–294.
- [7] J. Yang, D. Yuan, J. Li, S. Zheng, B. Wang, miR-186 downregulates protein phosphatase PPM1B in bladder cancer and mediates G1-S phase transition, *Tumour Biol*, 37 (2016) 4331–4341.
- [8] G.W. Zhu, H. Chen, S.Y. Liu, P.H. Lin, C.L. Lin, J.X. Ye, PPM1B degradation mediated by TRIM25 ubiquitination modulates cell cycle and promotes gastric cancer growth, *Sci Rep*, 15 (2025) 6160.
- [9] L. Du, J. Li, Y. Tian, R. Feng, Pleckstrin-2-promoted PPM1B degradation plays an important role in transforming growth factor-beta-induced breast cancer cell invasion and metastasis, *Cancer Sci*, 114 (2023) 2429–2444.



- 
- [10] I. Tamas, E. Major, D. Horvath, I. Keller, A. Ungvari, T.A. Haystead, J.A. MacDonald, B. Lontay, Mechanisms by which smoothelin-like protein 1 reverses insulin resistance in myotubules and mice, *Mol Cell Endocrinol*, 551 (2022) 111663.
- [11] T. Kanda, S. Wakino, K. Homma, K. Yoshioka, S. Tatematsu, K. Hasegawa, I. Takamatsu, N. Sugano, K. Hayashi, T. Saruta, Rho-kinase as a molecular target for insulin resistance and hypertension, *FASEB J*, 20 (2006) 169–171.
- [12] T.M. Pederson, D.L. Kramer, C.M. Rondinone, Serine/threonine phosphorylation of IRS-1 triggers its degradation: possible regulation by tyrosine phosphorylation, *Diabetes*, 50 (2001) 24–31.
- [13] E. Major, F. Gyory, D. Horvath, I. Keller, I. Tamas, K. Uray, P. Fulop, B. Lontay, Smoothelin-Like Protein 1 Regulates Development and Metabolic Transformation of Skeletal Muscle in Hyperthyroidism, *Front Endocrinol (Lausanne)*, 12 (2021) 751488.
- [14] B. Lontay, K. Bodoor, D.H. Weitzel, D. Loiselle, C. Fortner, S. Lengyel, D. Zheng, J. Devente, R. Hickner, T.A. Haystead, Smoothelin-like 1 protein regulates myosin phosphatase-targeting subunit 1 expression during sexual development and pregnancy, *J Biol Chem*, 285 (2010) 29357–29366.
- [15] I. Irrcher, D.R. Walkinshaw, T.E. Sheehan, D.A. Hood, Thyroid hormone (T3) rapidly activates p38 and AMPK in skeletal muscle in vivo, *J Appl Physiol* (1985), 104 (2008) 178–185.
- [16] A. Ulke-Lemee, S.R. Turner, S.H. Mughal, M.A. Borman, R.J. Winkfein, J.A. MacDonald, Mapping and functional characterization of the murine smoothelin-like 1 promoter, *BMC Mol Biol*, 12 (2011) 10.
- [17] S.H. Lee, B.J. Kim, D.R. Park, U.H. Kim, Exercise induces muscle fiber type switching via transient receptor potential melastatin 2-dependent Ca(2+) signaling, *J Appl Physiol* (1985), 124 (2018) 364–373.