



T.c.:

Dr. Palkovics László Amand
az MTA Doktora
titkár

BÍRÁLÓI VÉLEMÉNY

Csontos Csilla: *“Reverzibilis fehérje foszforiláció és fehérje-fehérje kölcsönhatások tüdő artéria endotél sejtekben”*
című MTA Doktori dolgozatáról

Csontos Csilla dolgozatot nyújtott be az MTA Doktora cím elnyerésére. Értekezésében a fehérjék foszforilációjával és defoszforilációjával foglalkozik, azokkal a folyamatokkal, amelyek talán a leggyakoribb fehérje szabályozási mechanizmusok molekuláris alapjait adják. Az értekezés alapjául 13 színvonalas nemzetközi közlemény szolgál, amelyek közül háromban a jelölt terminális szerző. A dolgozat összesen 151 oldalon mutatja be a szerző elmúlt, mintegy két évtizedben elért eredményeit, és az ezekből levont következtetéseit. Igényesen összeállított, gondosan felépített és tartalmas mű. Egyébként elenyészően kevés elütési vagy egyéb sajtóhiba lehet benne, mert én magam egyet sem találtam. Végigolvasása után megállapítottam, hogy a tudományos eredmények háttérében kiváló kutatói munka és színvonalas iskolateremtő teljesítmény húzódik meg.

Az egyoldalas, tömör bevezetőt követően mintegy húsz oldalon keresztül bevezet minket a szerző a foszforilációval szabályozható fehérjék, azon belül is a protein foszfatázok, miozin könnyű lánc kinázok, a MYPT fehérjecsald, valamint az állványfehérjék működésének a részleteibe. Azon olvasóknak – mint jómagam is – aki a területet közvetlenül nem műveli, ez egy kifejezetten hasznos fejezet. Gondosan összeállított és megírt része ez a dolgozatnak, amit a szerző bőségesen ellátott irodalmi hivatkozásokkal is, így a későbbiekben forrásmunkaként is kiválóan használható lesz. Ezt követően az „Anyagok és módszerek” fejezetben részletes betekintést kapunk az alkalmazott oldatok, fehérjék, sejtek előállításáról és kezeléséről, valamint a felhasznált



módszerek alkalmazásáról is. Impozáns, széles körű technikai ismereteket feltételező, és együttesen nagyon hatékony módszertani arzenált ismerünk itt meg a részletes bemutatás során. Ez az arzenál a számos fehérje expressziós eljárás és sejt manipulációs módszer mellett olyan vizsgálati eljárásokat is tartalmaz, mint a felületi plazmon rezonancia vagy a tömegspektrometria.

Az értekezésben leírt tudományos munka koherens, remekül vezet minket végig egy vezérfonal mentén a következtetésekig. A szerző a tüdő artéria endotél sejtjeinek viselkedését, szabályozását tanulmányozta az érfalban betöltött gát („barrier”) szerepük vonatkozásában. Azt vizsgálta meg, hogy az endotél sejtek mobilitását, alakját és kölcsönhatásait alapvetően meghatározó fehérjék működése hogyan módosul néhány vonatkozó kináz és foszfatáz aktivitásának, azaz a foszforiláció vagy a defoszforiláció bekövetkeztének hatására. Kifejezetten izgalmas, de nagyon összetett tudományos kutatás tárul az olvasó elé. Egyfelől a jelölt számos olyan modern vagy klasszikus biokémiai, sejtbiológiai és egyéb eljárást alkalmazott, amelyek eredményei egymást erősítve vezettek el a következtetésekhez. Másfelől, a munka egyik leglátványosabb és legmeggyőzőbb sajátossága az, hogy a szerveződési szintek különböző szintjeit együttesen figyelembe véve hozza meg következtetéseit. Alapos kinetikai és biokémiai kísérletekben igazolja a vonatkozó fehérjék kölcsönhatásainak a meglétét vagy hiányát. Ezt követően a kölcsönhatásokat élő vagy fixált sejtekben is megmutatja, és a fehérjék mutációval vagy molekuláris biológiai módszerekkel való aktivitás változásán keresztül a biológiai funkció, a sejtmozgás és alak meghatározásában betöltött szerepeket is sok esetben tisztázza. Átgondolt, logikus és nagyon sok munkával, kísérlettel járó megközelítés ez, ami nagymértékben segít az olvasónak abban, hogy megítélje az eredmények jelentőségét és a következtetések helytállóságát.

Az eredményeket gondosan megválasztott sorrendben és példás részletességgel ismerteti a szerző, mintegy 60 oldalon keresztül. Egy izgalmas és sok szálon futó tudományos nyomozás bontakozik ki az értekezés ezen részében, magán hordozva a legjobb krimik azon tulajdonságát is, hogy első olvasásra helyenként az olvasó elveszti a fonalat. Az eredményeket a szerző mintegy hatvan ábrával illusztrálta ebben a szakaszban. Az ábrák mind gondolatilag, mind technikailag igényes tálalásban kerülnek elénk. Az egyetlen technikai problémának azt tekintem velük kapcsolatban, hogy a fluoreszcencia mikroszkópos képek sok esetben túl kicsire sikerültek, így



az egyébként láthatóan jó kontrasztú és felbontású képeken a megfigyelések néha nehézkesen voltak követhetőek. Különösen igaz volt ez például a kolokalizációs kísérletek esetében.

Az eredmények részletes ismertetését követően a szerző 15 oldalon keresztül ezek értelmezésével, majd összefoglalóval zárja értekezése szakmai tartalmi részét. A jelölt téziseit elfogadom, új tudományos eredményeit a következőkben látom:

1. Az endotél MLCK speciális N-terminális régiója Tyr oldalláncokon keresztül foszforilálódik, és ezzel aktivitása fokozódik.
2. Igazolta a miozin foszfatáz PP1c β katalitikus és MYPT1 regulátor alegységének szerepét az endotél barrier funkcióban.
3. Igazolta a Ser/Thr-oldalláncokra specifikus foszfatáz, a PP2A részvételét a citoskeleton szabályozásában, és tau és HSP27 fehérjék defoszforilációjában.
4. A PP2A aktivitásával kapcsolatosan fehérje-fehérje kölcsönhatásokat írt le a foszfatáz B α regulátor alegysége és a VE-cadherin valamint a β -katenin között.
5. Igazolta, hogy a TIMAP fehérje a PP1c β regulátor alegysége és a TIMAP az endotél barriert védő funkciókat lát el.
6. Felismerte a RACK1 állványfehérje szerepét a TIMAP plazmamembránhoz történő transzlokációjában, valamint kimutatta a RACK1 és a TIMAP, illetve farnezil transzferáz fehérjék közötti kölcsönhatást.
7. Kimutatta az EBP50 és NHERF2 fehérjék esetében, hogy funkciójuk és fehérje kölcsönhatási partnereik, és így az általuk mediált biológiai folyamatok is különbözőek.

Az értekezés olvasása közben a következő kérdések jutottak eszembe:

1. A jelölt megmutatta, hogy az MLCK1 esetében megjelenő viszonylag nagy, 69 aminosavból álló speciális N-terminális régió több potenciális foszforilációs helyet is tartalmaz, és ezek közül egy tirozin oldallánc funkcionálisan is foszforilálódik. De miért ilyen nagy ez a régió? Ennek abban van-e szerepe, hogy a foszforiláció hatását



továbbítani tudja a szerkezeti változásokon keresztül, vagy közvetlenül is részt tud venni fehérje-fehérje kölcsönhatásokban?

2. Immunoprecipitációs kísérletek értelmezése során megállapította a jelölt, hogy az endotél sejtekben a PP1c β játszik fontos funkcionális szabályozási szerepet. Ugyanakkor azt is megfigyelte, ha jól érttem, hogy a PP1c β a miozinnal és az aktinnal együtt jelent meg a precipitátumban. Ez azt jelenti-e, hogy a PP1c β képes kötni ezeket a kontraktilis fehérjéket? Mi lehet ezeknek a kölcsönhatásoknak a biológiai szerepe? Elképzelhető, hogy a celluláris akto-miozin képletek, kontraktilis egységek szabályozásában is szerepet játszik a PP1c β ?
3. A szerző gondosan megvizsgálta, hogy mi a szerepe a TIMAP egyszeres vagy kétszeres foszforilációjának a fehérje PP1c β -val kialakított kölcsönhatásában. Megfigyelte, hogy míg egyszeres foszforiláció hatására a kölcsönhatás felerősödik, a kétszeres foszforiláció ezt a hatást megfordítja, ami nagyon érdekes. Ebben az esetben melyik foszforilációs hely foszforilálódik először? Vagy mindegy, hogy milyen sorrendben foszforilálnak?
4. Az endotél gát funkció vizsgálata során a szerző minden esetben úgy tekintett a gát funkció gyengülésére, mint funkcionális kiesésre, sérülésre. Van-e olyan élettani folyamat, ahol a gát funkció gyengülése tekinthető az optimális, szükséges vagy előnyös molekuláris folyamatnak?
5. A jelölt számos kapcsolódási pontot talált az aktin citoskeleton és az endotél gát szabályozásában résztvevő fehérjék között. Többek között azt is megfigyelte, hogy olyan sejtekben, amelyekben a vad típusú NHERF2 mennyisége megnőtt, több filopodium jelent meg. A filopodiumok növekedésének a szabályozása általános esetben forminokhoz és aktinhoz kapcsolt fehérjerendszeren keresztül valósul meg. Milyen fehérje kapcsolatok azonosíthatók a megfigyelések értelmezésére, mi lehet a molekuláris kölcsönhatási útvonal amelyen keresztül az NHERF2 hatására a filopodiumok száma megnőtt?
6. A sejtek természetes környezetükben három dimenzióban élnek. A mikroszkópiai kísérletek ebben a munkában, és egyébként nagyon sok más tanulmányban is, két dimenzióban, kikapadt sejteken folynak. Persze talán éppen itt, a tüdő artériákban is lapokba szerveződő endotél sejtek esetében ez a választás lehet célravezető. Mégis



érdekelne, hogy vannak-e esetleg olyan megfigyelések, ahol a sejtek három dimenziós vizsgálata is hasonló következtetésekre vezetett.

Végezetül megállapítom, hogy Dr. Csontos Csilla jelen értekezésében egy kifejezetten izgalmas tudományos területen, éveken keresztül következetesen és igényesen végzett tudományos vizsgálatok eredményeit mutatta be igényesen, nagy gondossággal. Tudományos munkásságát nagyra értékelem, a tézispontokban foglaltakat jelentős tudományos eredményekként ismerem el, és a nyilvános vita kitűzését mindezek alapján javasolom.

Nyitrai Miklós

Egyetemi tanár,

az MTA doktora

Pécs, 2015 szeptember 21.

