

## BÍRÁLAT

### **Dr. Csontos Csilla “Reverzibilis fehérje foszforiláció és fehérje-fehérje kölcsönhatások tüdő artéria endotél sejtekben” című MTA doktori értekezéséről**

Nagy örömmre szolgált, hogy felkérést kaptam Csontos Csilla MTA doktori értekezésének bírálatára, mivel munkásságát több éve figyelemmel kísérhettem konferenciákon történt találkozások alkalmával, illetve folyóiratokban megjelent publikációi nyomán. Sőt néhány évvel ezelőtt egyik Ph.D. hallgatójának, Boratkó Anitának értekezésének is opponense voltam.

A most benyújtott MTA doktori disszertáció Csontos Csilla mintegy 15 évre visszanyúló munkásságát foglalja össze, melyben a jelölt feltárja a vaszkuláris endotél sejtek barrier funkciójával összefüggésben a különböző protein kinázok és foszfatázok fontos szabályozó szerepét, valamint ezek kölcsönhatásait a folyamatban résztvevő citoskeletáris elemekkel, adhéziós és adaptor fehérjékkel. Az értekezés alapját 12 eredeti és egy összefoglaló közlemény adja, melyek összesített impakt faktora 51,8. Ezek a mutatók kétséget kizáróan bizonyítják a jelölt számottevő tudományos teljesítményét. Az értekezésben bemutatott munka kiemelendő erényének tartom, hogy egy viszonylag jól lehatárolt tématerületet számos oldalról megközelítve, a molekuláris részleteket szisztematikusan megvizsgálva, rendkívüli alapossággal tárja fel az összefüggéseket, következtetéseiben mégis mértéktartó marad.

Csontos Csilla az MTA doktori címére megszerzésére hagyományos formájú értekezést nyújtott be. A disszertáció 151 oldal terjedelmű, melyben a 24 oldalas bevezetést, a célkitűzések összefoglalását és a 12 oldal terjedelmű metodikai részt követően a jelölt 64 oldalon mutatja be részletesen a kísérleti eredményeket. Ezután a 20 oldalas „Megbeszélés” fejezet összegzi és értelmezi a megszerzett ismereteket, melyben 5 remek áttekintő ábra segíti az olvasót az összefüggések megértésében. A disszertáció a szokásos módon: összefoglalással, irodalomjegyzékkel, a közlemények felsorolásával, valamint a köszönetnyilvánítással zárul. A benyújtott dolgozat formailag megfelel az MTA doktori értekezéssel szemben támasztott követelményeknek, amelyet korábban több fórumon részletesen megvizsgáltak, és megfelelőnek találtak.

Az értekezésben bemutatott munkából a következőket tartom új eredménynek:

- 1.) Feltárták a vaszkuláris endotél sejtekben a miozin könnyű lánc foszforilációját meghatározó MLCK1 protein kináznak és a PP1 protein foszfatáz regulátor alegységének, a MYPT1-nek szerepét, valamint az őket szabályozó mechanizmusokat: az aktivitásukat meghatározó foszforilációs helyeiket és kölcsönható partnereiket. Igazolták a PP1c  $\beta$  izoformájának és a MYPT1-nek az endotél gátfunkciójában betöltött szerepét.
- 2.) Megmutatták, hogy a PP2A protein foszfatáz milyen mechanizmus révén segíti elő az endotél barrier integritásának fenntartását. A PP2A szubsztrátjaiként azonosították a citoskeletonhoz kapcsolódó tau és HSP27 fehérjéket, valamint igazolták a foszfatáz  $\beta$  regulátor alegységének ködődését a VE-kadherinhez és funkcionális kölcsönhatását a  $\beta$ -kateninnel, melyek az adherens kapcsolatok meghatározó fehérjéi.
- 3.) Kimutatták a MYPT fehérjecsaldhoz tartozó TIMAP fehérjéről, hogy a szintén a PP1c  $\beta$  regulátor alegysége, azonosították a funkcióját meghatározó foszforilációs helyeit, illetve igazolták az ERM fehérjék – elsősorban a moezin – defoszforilációjában, valamint az endotél gátfunkciójának fenntartásában betöltött szerepét.
- 4.) Azonosították a RACK1 állványfehérjét, mint a TIMAP kölcsönható partnerét, valamint megmutatták, hogy a RACK1 milyen mechanizmus révén befolyásolja a TIMAP prenilációját és sejten belüli elhelyezkedését, ezáltal az endotél sejtek gátfunkcióját.
- 5.) Két további állványfehérjét vizsgálva, megmutatták az EBP50 fehérje sejtciklustól, illetve foszforilációtól függő sejten belüli transzlokációját vaszkuláris endotél sejtekben, valamint igazolták a PP2A protein foszfatázzal való kölcsönhatását, valószínűsítve az EBP50 részvételét az endotél sejtciklus szabályozásában. Megmutatták, hogy a NHERF2 állványfehérje esszenciális az ERM fehérjék foszforilációjához, és hogy hozzájárul az endotél barrier funkciójának fenntartásához, illetve felvázolták lehetséges szerepét az angiogenezisben.

A fent felsoroltak új és jelentős tudományos eredményeknek tekinthetők, amit kétséget kizáróan alátámaszt az, hogy az ezeket bemutató cikkek jegyzett, nemzetközi tudományos folyóiratokban jelentek meg.

Az értekezéssel kapcsolatos kérdéseim:

- 1.) Mennyire általánosíthatók ezek, az elsősorban tüdő artéria sejtekben (BPAEC, HPAEC), illetve humán köldökvéna endotél sejtekben (HUVEC) megfigyelt fehérje-fehérje kölcsönhatások? Vajon hasonló szabályozó mechanizmusok uralkodnak más szervekben lévő, igen különböző tulajdonságokkal bíró endotél sejtekben, mint pl. a vér-agy gát szorosan illeszkedő endotél sejtjeiben, a vesében lévő fenesztrált endotéliumban, vagy a májban lévő szinuziodokban? Talán még izgalmasabb kérdés, hogy vajon a tumor endotél sejtekben is hasonló mechanizmusok figyelhetők-e meg.
- 2.) A trombin és az ATP ellentétesen szabályozza az endotél barrier funkciót. A trombin ráadásul ATP kiáramlást indukál bizonyos sejtípusokból, mint pl. a trombociták vagy az endotél sejtek. Hogyan érvényesül ez a két ellentétes hatás fiziológias körülmények között? Van-e kinetikai eltérés a két ágens hatása között és milyen szerepet töltenek be ennek szabályozásában a vizsgált kinázok és foszfatázok?
- 3.) Az ATP $\gamma$ S-ről ugyan általánosságban azt tartják, hogy nem hidrolizálható ATP analóg, valójában az ektonukleotidázok lassabb kinetikával, mint az ATP-t, de hasítják. Tudható-e, hogy az ATP az endotél gátfunkcióra gyakorolt hatása közvetlenül P2 receptorokon érvényesül, vagy valójában bomlásterméke, az adenzin P1 receptorokon keresztül okozza a transzendoteliális rezisztencia növekedését? Az értekezés világosan bemutatja a protein foszfatázok fontos szabályozó szerepét ebben a folyamatban a citoskeletáris elemek, az adherens kapcsolatok és az állványfehérjék szabályozásán keresztül, de milyen „upstream” szignalizációs utak vezetnek ide?
- 4.) A TIMAP fehérje kölcsönható partnereinek keresésekor a GST pull down kísérletben a kb. 30 kDa-os RACK1 fehérjét sikerült azonosítaniuk. Ebben a kísérletben (4.2.1. ábra, A) legalább két további kölcsönható fehérje sejthető – kb. 40 és 45 kDa magasságában. Miért pont a 30 kDa körüli a fehérjesávra esett a választásuk, történtek-e erőfeszítések a magasabb molekulatömegű potenciális kölcsönható partnerek azonosítására?
- 5.) Az MLC foszforilációjának szabályozását összefoglaló ábrán (5.1.1. ábra) a Ca<sup>2+</sup>/kalmodulin regulációja az MLCK1 foszforilációjától upstream van ábrázolva. Figyelembe véve, hogy a defoszfo- és foszfo-MLCK1 kináz aktivitását hasonló affinitással stimulálja a Ca<sup>2+</sup>/kalmodulin (4.1.3. C ábra), nem volna-e helyesebb a Ca<sup>2+</sup> regulációt downstream is feltüntetni, azaz egy olyan szabályozó kört felvázolni, melyben az Src foszforiláció és a Ca<sup>2+</sup>/kalmodulin együttesen éri el az MLCK1 maximális aktiválását?

6.) Mind a MYPT1, mind a TIMAP fehérjével kapcsolatban bemutatták, hogy a PP1c  $\beta$  izoforma regulátoraként szolgál, valamint hogy ERM fehérjékkel kölcsönhat, illetve hogy szerepet játszik az endotélium barrier funkciójának szabályozásában. Sőt a bemutatott ábrákból intracelluláris lokalizációjuk is hasonlónak tűnik. A MYPT1-ről megmutatták, hogy az ERM fehérjék közül elsősorban a radixinnel lép kölcsönhatásba, a TIMAP-pal összefüggésben viszont csak a moezinnel való kölcsönhatás mutatták be. Mi lehet a két MYPT fehérje egymáshoz való viszonya? Elképzelhető, hogy közös komplexben helyezkednek el? Funkciójuk vonatkozásában egymást kiegészítő, vagy inkább egymást helyettesítő regulátoroknak tekinthetők?

Véleményemet összefoglalva, Csontos Csilla elért eredményeit és tudományos teljesítményét nagyra értékelem. Ennek megfelelően a dolgozat nyilvános vitára bocsátását javaslom, és Csontos Csilla számára az MTA doktori fokozat odaítélését messzemenőig támogatom.

Budapest, 2015. október 5.



Homolya László  
az MTA doktora