

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

A miozin foszfatáz szerepe és szabályozása normál és patológias sejtfolyamatokban

Dr. Lontay Beáta



DEBRECENI EGYETEM
Általános Orvostudományi Kar
Orvosi Vegytani Intézet
Debrecen, 2025.

Tartalom

1. BEVEZETÉS	2
1.1 A fehérjék reverzibilis foszforilációja	3
1.2. A miozin foszfatáz szerkezete, szubsztrátjai és élettani szerepe	3
1.3. A miozin foszfatáz szabályozása	4
1.4. A smoothelin fehérjék és az SMTNL1 szerkezete és funkciója	5
2. CÉKITŰZÉS	7
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	8
3.1. Sejtvonalak és sejt kultúra modellek	8
3.2. Egér törzsek	9
3.3. Szövetminták	10
3.4. Fehérje analízisek	11
3.5. Sejtbiológiai technikák	14
3.6. Bioinformatikai elemzések	15
4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉSÜK	15
4.1. A miozin foszfatáz szerepe a neurotranszmitter-kibocsátás szabályozásában	15
4.2. A miozin foszfatáz szerepe a génexpresszió szabályozásában	18
4.3. A proteín foszfatázok szerepe a bőrszövet homeosztázisában	21
4.4. A terhesség által indukált izotípusváltozást a vázizomzatban az SMTNL1 szabályozza	23
4.5. Az SMTNL1 szerepe a vázizom inzulinérzékenyítésében	25
4.6. Az SMTNL1 a progeszteron receptor kettős hatásmechanizmusú kofaktora	26
4.7. Az SMTNL1 szerepe a reprodukzív funkciókban	27
4.8. Az SMTNL1 szerepe a pajzsmirigyhormon által indukált fiziológiás és patológias folyamatokban izomban	28
5. AZ ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA	31
6. A TÉZISEK ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK	33

1. BEVEZETÉS

A poszttranszlációs módosítások, például a fehérjék foszfát- és metilcsoporttal, lipidekkel illetve ubikvitinnel történő konjugációja, jelentősen befolyásolják a fehérjék biológiai működését. Emiatt a módosításokat katalizáló enzimek gátlása és aktiválása, és az azok expresszióját szabályozó egyéb faktorok szelektív terápiás célpontok lehetnek számos betegség kezelése során. Munkánkban a reprodukzív betegségek, az inzulinrezisztencia, a hipertireózis és a tumorképződés folyamatiban kórosan eltolódott poszttranszlációs módosítási mintázatokat és az azok által kiváltott patobiokémiai folyamatokat vizsgáltam biokémiai, molekuláris biológiai és proteomikai módszerekkel.

A fehérjék reverzibilis foszforilációja különösen fontos szerepet játszik a jelátviteli folyamatokban, és már több, a foszforilációt végző kinázokat gátló gyógyszer került az orvostudomány fegyvertárába. Ezzel szemben a fehérjék defoszforilációját katalizáló foszfatázokat célbavevő terápiák száma ma még korlátozott, annak ellenére, hogy ezen enzimek sokfélesége és számos szabályozó alegysége lehetőséget kínál a nagy specifitású beavatkozásra. Ezért munkám során elsősorban a miozin foszfatáz (MP) holoenzim szerepét vizsgáltuk, illetve annak egyik szabályozó fehérjéjét, a smoothelin-szerű 1 fehérjét (SMTNL1) helyeztük érdeklődésünk középpontjába. Az utóbbi évtizedekben született új eredmények jelentősen kiszélesítették a MP-zal kapcsolatos ismereteinket. Fény derült arra, hogy ez az enzim nemcsak a simaizomban expresszálódik, hanem a szervezet megannyi szövetében is megtalálható. Változatos szubcelluláris lokalizációja lehetővé teszi, hogy az izomösszehúzódáson kívül számos eddig még kevésbé ismert sejtelettani folyamatban vegyen részt. Munkcsoportunk vizsgálatai alapján megállapítható, hogy a MP és SMTNL1 fehérjék egymással együttműködve szerteágazó biológiai folyamatban játszanak meghatározó szerepet. Értekezésemben ezeket a jelátviteli folyamatokat szeretném bemutatni az alapvető molekuláris mechanizmusoktól az orvosi szempontból fontos patofiziológiai elváltozásokig.

1.1 A fehérjék reverzibilis foszforilációja

Az eukarióta szervezetek sejtanyagcseréjének alapvető szabályozási mechanizmusa a fehérjék foszforilációja és defoszforilációja. A fehérje foszforilációt a protein kinázok a nukleozid-trifoszfátok (leggyakrabban ATP) terminális foszfátcsoportjának kovalens kapcsolásával katalizálják szerin (Ser), treonin (Thr) vagy tirozin (Tyr) oldalláncokon. A foszforiláció reverzibilitását a protein foszfatázok (PP) biztosítják a fehérjékben észterkötéssel kapcsolódó foszfátcsoportok hidrolízisével. Protein foszfatáz katalitikus alegységet kb.150 gén kódol, ezek közül mintegy 40 Ser/Thr specifikus protein foszfatáz. A protein kinázok statisztikai analízise alapján szinte kizárólagos Ser/Thr illetve Tyr specificitás állapítható meg. A protein foszfatáz katalitikus alegységek viszonylag kis számát a katalitikus alegységekkel holoenzimet alkotó és hozzájuk kapcsolódó szabályozó alegységek kompenzálják. A szabályozó alegységek a holoenzim szubsztrát-specificitását, valamint katalitikus aktivitását határozzák meg, a katalitikus alegységhez és a szubsztráthoz is kötődve az enzimeket különböző szubcelluláris kompartmentekhez irányítják.

1.2. A miozin foszfatáz szerkezete, szubsztrátjai és élettani szerepe

A miozin foszfatáz (MP) holoenzim egy Ser/Thr-specifikus protein foszfatáz-1 (PP1) enzim, amely heterotrimer szerkezetű: a defoszforilációt katalizáló PP1c δ katalitikus alegységből, egy 130/133 kDa molekulatömegű szabályozó alegységből (MYPT1) és egy ismeretlen funkciójú 20 kDa molekulatömegű alegységből épül fel. Elsőként azonosított szubsztrátja a 20 kDa molekulatömegű miozin könnyű lánc (MLC20), amelynek foszforilációját követően a miozin II kötődik az aktinhoz, és az aktomiozin komplex kontrakcióját indukálja, míg a MP által történő defoszforiláció elernyedést eredményez. Az MLC20 foszforiláltsági szintjét a Ca²⁺/kalmodulin-függő miozin könnyű lánc kináz (MLCK) és a MP aktivitása közötti egyensúly határozza meg. A MP egyéb citoskeletális szubsztrátjait is azonosították, így az ERM (ezrin, radixin, moezin),

Tau és MAP2 fehérjéket is. Az enzim azonban nemcsak a simaizomban expresszálódik, hanem a szervezet számos szövetében expresszálódik, változatos szubcelluláris lokalizációt mutat és ezzel társulva széleskörű sejtélettani folyamatokat katalizál. A klasszikus citoszkeletális szubsztrátok mellett számos más fehérjét is azonosítottak, így a sejtciklus és a proliferáció szabályozását meghatározó retinoblasztóma és a merlin fehérjéket is. A miozin foszfatáz által defoszforilált szubsztrátok foszforilációjáért az esetek többségében a RhoA-aktivált kináz (ROK) a felelős.

1.3. A miozin foszfatáz szabályozása

A miozin foszfatáz szabályozásának egyik lehetséges módja a MYPT1 szabályozó alegységének Ser és/vagy Thr oldalláncokon történő foszforilációja. Számos foszforilációs helyet azonosítottak eddig a MYPT1 szekvenciáján belül, de kiemelt jelentőségű holoenzim aktivásbeli változást a Thr696 és Thr853 oldalláncok foszforilációs szintjének változása adja. A Thr696 és Thr853 oldalláncok foszforilációja a RhoA aktivált protein kináz (ROK) által a holoenzim gátlását eredményezi. A ROK mellett számos egyéb kináz gátolja a miozin foszfatázt a MYPT1 Thr696 oldalláncán keresztül, így a ZIPK, ILK, MDPK, Raf-1 vagy PAK enzimek. Aktiváló foszforilációs szabályozásra példa a cdc2 kináz által mitózis során történő foszforiláció a Thr435 és/vagy Ser432 oldalláncokon, mely megnöveli a miozin foszfatáz miozin iránti affinitását. Azonban a MYPT1 foszforilációja a Ser445, Ser472 és Ser910 oldalláncokon a foszfatáz gátlását, a miozin emelkedett foszforilációját és a sejtek tapadásának gyengülését eredményezik.

A MP holoenzim szabályozása kölcsönható fehérjével kialakított interakción keresztül is megvalósulhat. Az inhibitor-1 (I-1) és inhibitor-2 (I-2) kisméretű hőstabil fehérjék a PP1-et gátló fehérjéket, melyek a szabad PP1 katalitikus alegységhez kötődve csökkentik annak aktivitását. Ezzel szemben a CPI-17 fehérje nemcsak a PP1c katalitikus alegységet, hanem magát a MP holoenzimet is képes gátolni foszforiláció függő módon. A CPI-17 család másik

tagja, a kináz által aktivált PP1 inhibitor (KEPI) valamint a 32 kDa dopamin és cAMP által szabályozott foszfoprotein (DARP-32) szintén gátló hatással bírnak. A 14-3-3 β egy a citoszkeletális átrendeződést elősegítő fehérje, ami a MYPT1-hez kapcsolódva csökkenti annak miozinhoz való kötődését és a MP komplex miozinról történő disszociációját eredményezi a miozin könnyű lánc fokozott foszforilációjához vezetve.

1.4. A smoothelin fehérjék és az SMTNL1 szerkezete és funkciója

A miozin foszfatáz egyik lehetséges szabályozó kölcsönható fehérjéje a smoothelin-szerű 1 fehérje (SMTNL1), amely a simaizomra jellemző smoothelin (SMNT) fehérjecsalád tagja. melynek további tagjai a smoothelin A (SMTN-A) és smoothelin B (SMTN-B) fehérjék, valamint a smoothelin-szerű 2 fehérje ismeretlen funkciójú fehérje. Az SMTN-A fehérje egy 59 kDa molekulatömegű rövid izoforma, mely a viscerális simaizmokban expresszálódik, míg a 100 kDa nagyságú hosszú izoforma, az SMTN-B az erek simaizomzatára jellemző. Az SMTN fehérjecsalád tagjai nagyfokú szekvencia homológiát mutatnak főként a C-terminális vég tekintetében, melyen egy 2-es típusú kalponin homológ (CH) domén található. Az SMTN-A és -B fehérjékkel ellentétben az SMTNL1 nem képes az aktin kötésére. Ennek oka feltehetően az aktin-kötő domén/ek hiánya, melyből az SMTN-B fehérjén kettő, míg az SMTN-A fehérjén egy található, illetve utóbbiak tartalmaznak még egy-egy tropomiozin-kötő motívumot is. Az SMTNL1 szintén képes kötődni a tropomiozinhoz, mely elősegíti a vékony filamentumokhoz való asszociációját a CH-domén és a rendezetlen N-terminális végen keresztül. Az SMTNL1 CH-doménjének N-terminális vége a ligandum nélküli kalmodulinnal (CaM) való kölcsönhatását teszi lehetővé, míg a Ca²⁺-kötött kalmodulinhoz elsősorban egy másik, az ún. Ca²⁺-CaM-kötő doménen keresztül kapcsolódik. Az SMTNL1 Ser301 oldalláncát ciklikus nukleotid függő protein kinázok (PKA/PKG) foszforilálják, ami meghatározó jelentőséggel bír a fehérje funkciói során.

A szervezet fiziológias és patológias változásainak hatására a vázizomzat jelentős változásokon megy keresztül. Az izomrostok izotípusa, az 1 típusú lassú, a 2A típusú gyors oxidatív és a 2B típusú gyors glikolitikusabb rostok aránya változik, amely kihatással van az izomzat kontraktilis sajátságai mellett a szervezet anyagcsere folyamataira is. A MP a sima- és vázizomzat kulcsfontosságú szabályozó eleme, melynek aktivitását szabályozó egyik fehérje a smoothelin-szerű 1 fehérje (SMTNL1). Az SMTNL1 részt vesz az izomzat kontraktilitásának szabályozásában, valamint azok fiziológias stressz hatására történő adaptációjában. Kimutattuk, mind az egyedfejlődés és terhesség során, hogy a vázizom adaptációs váltoásaival a MYPT1 és SMTNL1 expressziója is változott, amely nemtől függő eltérést is mutatott, a MYPT1 expressziójának és a miozin foszfatáz aktivitásának megkétszereződését mutattuk ki a születést követő 6-12. napokon. Az SMTNL1 hiánya vagy Ser301 oldalláncon történő foszforilációja magasabb miozin foszfatáz aktivitás következtében kialakuló relaxáltabb fenotípust eredményezett, mely a foszforilálatlan SMTNL1 miozin foszfatázt gátló hatására enged következtetni. Bizonyítottuk a MYPT1 és a SMTNL1 fehérje-fehérje kölcsönhatását is, amely mechanizmus által az SMTNL1 gátolja a MP holoenzim aktivitását. A PKA/PKG általi SMTNL1 Ser301 oldalláncon történő foszforilációjának hatására az SMTNL1 transzlokációját mutattuk ki a sejtmagba, ami ezáltal a *mypt1* gén expresszióját szabályozza. Az SMTNL1 expressziója nem korlátozódik a vázizomra, hanem megtalálható még simaizomban és szteroid hormonokra érzékeny szövetekben is. Terhesség során a MP szerepet játszik az anya vérnyomásának és méhizomzat kontraktilitásának szabályozásában. A MYPT1 magasabb expresszióját és a MP fokozott aktivitását mutattuk ki a méh és a vaszkuláris simaizomban a terhesség során egér és humán mintákon. A MYPT1 expressziója nemcsak terhesség hatására, hanem a SMTNL1 fehérje hiányában is emelkedett, illetve a terhesség és a SMTNL1 hiányának együttes hatására a MYPT1 húszszorosan emelkedett expresszióját tapasztaltuk.

2. CÉKITŰZÉS

A MP széleskörű fiziológias szerepére utal, hogy a miozin II mellett számos egyéb szubsztrátját azonosították, illetve, hogy a MP szabályozó alegysége, a MYPT1 változatos sejten belüli lokalizációt mutat különböző sejtípusokban. Munkacsoportunk kimutatta és jellemezte a MP egyik új szabályozó elemét, a MYPT1 alegységgel kölcsönható SMTNL1 fehérjét. Ezek alapján szeretnénk volna feltárni a MP diverz sejtelettani funkcióit és bonyolult szabályozási lehetőségeit fiziológias és patológias folyamatokban. Főbb célkitűzéseink a következők voltak:

- A MP agyszövetbeli lokalizációja, de ismeretlen neuronális funkciója miatt célul tűztük ki a neurotranszmitter kibocsátásban betöltött szerepének leírását, különös tekintettel az exocitózist kiváltó SNARE komplex elemeivel való kölcsönhatására neuroblasztóma, szinaptoszóma és agykérgi modelleken.
- A MP sejtmagban betöltött szerepének tanulmányozása a MYPT1 sejtmagon belüli pontos lokalizációjának és kölcsönható partnereinek meghatározásával humán hepatokarcinóma sejtekben, valamint a génexpresszió szabályozásában betöltött szerepének feltárása.
- A protein foszfatáz-1 enzimek, és ezen belül a MP szerepének vizsgálata a bőr homeosztázisának fenntartásában és a sebzáródás hatására indukálódó molekuláris mechanizmusokban szabályozásában.
- Az SMTNL1 mint transzkripció kofaktor terheességben betöltött szerepének vizsgálata a vázizomzat adaptációs folyamataiban.
- Az SMTNL1 KO állatok reprodukív fenotípusának hátterében álló molekuláris mechanizmusok felderítése az endometriumban.
- Az SMTNL1 KO állatok inzulinrezisztens fenotípusának hátterében álló molekuláris mechanizmusok megismerése.
- A SMTNL1 fehérje szerepének meghatározása hipertireózisos betegek vázizomzatában.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Sejtvonalak és sejtkultúra modellek

Kísérleteinkhez a következő sejtvonalakat használtuk: humán keratinocita (HaCaT), B50 neuroblasztóma, HeLa, HepG2 hepatocelluláris karcinóma, C2C12 egér mioblaszt, tsA201, valamint normál humán epidermális keratinocita (NHEK) sejtek.

C2C12 differenciáció: C2C12 egér mioblasztokat foetális borjú szérumot (FBS) tartalmazó DMEM médiumban tenyésztettük (37 °C, 5% CO₂). Differenciációhoz 2% lószérumot, fenolvörös nélküli DMEM-et és 1000 mg/L glükózt alkalmaztunk 6 napig.

Hipertireózis modell: A médiumhoz 10 nM 3,3',5-trijód-tironint (T3) adagoltunk a differenciáció 1. vagy 4. napjától, míg a kontroll 1 nM T3-at kapott. A sejtek morfológiai változásait fénymikroszkóp alatt figyeltük.

Inzulinrezisztencia modell: Differenciációt követően a sejtek további 3 napos kezelésével alakítottunk ki inzulinrezisztenciát magas (25 mM) glükóz jelenlétében, normál cukortartalmú (5.5 mM) médium szolgált kontrollként. A kezeléseket SMTNL1-t expresszáló vagy üres vektorral transzfektált sejtekre egyaránt alkalmaztuk.

Tenyésztés és sejtlízis Tenyésztés: A sejtvonalakat FBS-t és L-glutamint tartalmazó DMEM-médiumban, 37 °C-on és 5% CO₂ mellett tenyésztettük. Az NHEK sejtek esetében EpiLife médiumot használtunk növekedési faktorokkal.

Lízis: A sejtlízishez RIPA- vagy Tris-Triton puffereket alkalmaztunk proteáz- és foszfatáz-inhibitor hozzáadásával. A fehérjekoncentrációt a Pierce BCA Protein Assay Kit segítségével határoztuk meg.

Sejtenyésztés és transzekció A humán keratinocita (HaCaT), a B50 neuroblasztóma, human hepatocelluláris carcinoma (hepG2) és a tsA201 sejteket 10% borjú szérumot (FBS), illetve 2 mM L-glutamint tartalmazó Dulbecco által módosított Eagle médiumban (DMEM), míg a normál humán epidermális

keratinocita (NHEK) sejteket EpiLife médiumban tenyésztettük. A human emlő adenokarcinóma (MCF-7) sejteket 2 mM L-glutamin, és 10% FBS tartalmú MEM oldatban tenyésztettük.

Géncsendesítés A HaCaT és B50 és hepG2 sejtek MYPT1 expressziójának és HaCat sejtek PP1c expressziójának downregulációját siRNS-sel kiviteleztek. Lipofectamine 2000 transzfekciós reagenshez siRNS-t adtunk, melyeket előzetesen OptiMEM-ben hígítottunk. Ezt a mixet 4 óra elteltével adtuk a sejtekhez és további 44 órán keresztül növesztettük őket. Humán *ex vivo* bőrszövetben az siRNS-t és a Lipofectamine 2000-t Genoskin médiumban az *ex vivo* humán bőrszövetbe injektáltuk.

MTT sejtéletképességi vizsgálat A HaCaT, hepG2 és B50 sejteket inhibitoros kezelése vagy 24 csendesítése után a szérumentes DMEM-et, és MTT oldatot pipettáztunk rájuk, a formazán zárványokat dimetil-szulfoxidban feloldottuk. A színintenzitást az abszorbancia 540 nm történő detektálásával határoztuk meg.

3.2. Egér törzsek

Kolóniák fenntartása

Sebgyógyulási kísérletekhez 6-7 hetes hím Balb/c egereket használtunk. Az egérkolóniák fenntartása 19-25 °C hőmérsékletű, 35-75% relatív páratartalmú környezetben történt ad libitum etetéssel. Az állatkísérletek a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottság (DEMÁB) (9/2008/DEMÁB, 7/2010/DEMÁB, 6/2011/DEMÁB, 5/2015/DEMÁB) vagy a Duke University Animal Care and Use Committee engedélyével történtek és megfeleltek az állatokon végzett kísérletekre vonatkozó hazai, európai uniós és USA etikai szabályoknak és a Debreceni Egyetem Etikai Kódexnek. A terhességi vizsgálatokhoz lavarge módszert alkalmaztunk, ivarzó nőtények és felnőtt hímek párosításával.

Reproduktív fitness A smtnl1-/- kolóniák szaporodási paramétereit több mint 1651 egyedre kiterjedően vizsgáltuk. Elemeztük az embrionális letalitást, az alom méretét, a vemhességig eltelt időt és a vemhességek közötti intervallumot.

Sebgyógyulási modellek Balb/c egerek dorzális bőrfelületén teljes vastagságú sebet ejtettünk. A sebeket 7 napon keresztül napi kétszer a PP1 és ROK szelektív inhibitorával kezeltük. A sebekről készült felvételeket ImageJ programmal elemeztük.

Intraperitoneális Glükóztolerancia teszt *Smtnl1* WT és KO vemhes és nem vemhes állatokat 12 órás éheztetést követően 2 mg/testsúly kg intraperitoneális injekcióval kezeltük majd a vércukorszintet 120 percen keresztül követtük nyomon Ascensia Breeze Blood Glucose Monitoriny System készülékkel. Duolink PLA fehérje-fehérje kölcsönhatási vizsgálat

Comprehensive Laboratory Animal Monitoring System (CLAMS) Normál tápon tartott egereket anyagcsere paramétereinek vizsgálatára CLAMS-be helyeztünk és 48 óra étetés/24 óra koplalás/24 óra táplálási periódusokkal monitoroztuk 4 napon keresztül. Az oxigénfogyasztás, a termelt szén-dioxid térfogata és a légzéscsere arány, a hő, a felhalmozott tápanyag- és folyadékmennyiség és az állatok mozgása 20 percenként került mérésre.

3.3. Szövetminták

Humán minták A MYPT1 fehérje expresszióját humán *ex vivo* bőrszöveti biopsziákban és *m. sternohyoideus* izmokból származó mintákban vizsgáltuk. A bőrből vett minták érett stratum corneummal és különböző sejttípusokkal bírtak, ezeket a Genoskin (Toulouse, Franciaország) szolgáltatta. A hipertireózisos donorok izommintáit etikai engedéllyel (DEOEC RKEB/IKEB 3517-2011) és írásos beleegyezéssel gyűjtöttük. A minták zöme 60 év alatti női donoroktól származott Graves-kór, *struma nodosa* vagy *struma nodosa colloidis* diagnózis mellett.

Humán szövetek lízise A biopsziák homogenizálása módosított RIPA pufferben történt (25 mM Tris, pH 7,6, 150 mM NaCl, 0,1% SDS, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA, DTT és proteázgátlók jelenlétében). A minták centrifugálása után a felülúszót biokémiai mérésekhez használtuk.

Agyszeletek preparálása és kezelése C3H egerekből perparált agykéregből Microm HM 650 V vibratómmal 200 μ m vastagságú szeleteket metszettünk, melyeket mesterséges cerebrospinális folyadékba helyeztük. Az agyszeletekhez inhibitorokkal inkubáltuk majd 8 mM KCl-ot adtunk hozzá. Az inzerteket egy órára enyhe túlnyomásos karbogén gázt tartalmazó kamrába helyeztük.

Szinaptoszóma preparálás C3H egereket CO₂-dal eutanizáltunk és agypreparátumot készítettünk. Az agykérget homogenizáltuk, a felülúszót Percoll-gradiens (23-15-10-3%) tetejére mértük, és ultracentrifugával centrifugáltuk 32500 *g*-vel 5 percig 4 °C-on. A 10/15%-os, illetve a 15/23%-os fázisok határán lévő frakciókat centrifugáltuk és a pelletet Krebs-pufferben reszuszpendáltuk.

Exocitózis esszé A szinaptoszómák membránjának FM 2-10 festékekkel történő feltöltését 30 mM KCl hozzáadásával stimuláltuk. A pelletet Krebs-pufferben reszuszpendáltuk, az exocitózist 30 mM KCl-dal váltottuk ki, a fluoreszcencia intenzitás változásait pedig Fluoroskan FL készülékkel követtük nyomon.

3.4. Fehérje analízisek

Western blot analízis. A fehérjéket poliakrilamid gélelektroforézissel molekulatömeg szerint elválasztottuk, majd nitrocellulóz membránra transzferáltuk. A membrán szabad kötőhelyeit 5% marhaszérum-albumin (BSA) oldattal blokkoltuk, majd a membránt egy éjszakán át inkubáltuk az elsődleges antitestekkel 4 °C-on és 2 órán keresztül a másodlagos antitestekkel. Az immunjeleket SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate Kittel detektáltuk.

In vitro protein kináz esszé. 5 μ M Flag-SNAP-25, Flag-PRMT5 vagy GST-MYPT1 fehérjét 120 percig 30 °C-os vízfürdőben inkubáltunk 20 ng/ μ l ROK enzimmal, 1 mM γ -[³²P]ATP-vel és 1 μ M mikrocisztin-LR protein foszfátáz inhibitorral. A reakciót forró 5x SDS-PAGE mintapuffer hozzáadásával állítottuk le. Poliakrilamid gélelektroforézist követően a beépült foszfátot autoradiográfiával detektáltuk.

Protein foszfatáz aktivitásmérési vizsgálat Az inhibitorokkal kezelt vagy siRNS-sel transzfektált sejteket a kezelések lejárta után lizáltuk, majd a felülúszókat 0,1% β -merkaptoetanolt tartalmazó 20 mM-os Tris-HCl pufferben hígítottuk 1 μ M 32 P-jelölt pulykazúza MLC20 szubsztrát jelenlétében. A reakciót 10% (V/V) triklórecetsav (TCA) és 6 mg/ml BSA hozzáadásával állítottuk le, és a felszabadult radioaktívan jelölt foszfátot szcintillációs számlálóval határoztuk meg.

In vitro protein arginin metiltranszferáz kísérlet A ROK által foszforilált, anti-Flag gyöngyökhöz kikötött Flag-PRMT5^{wt} fehérjék felhasználásával metiltranszferáz kísérleteket végeztünk. S-adenozil-L-metionint és hiszton fehérjékből álló keveréket adtunk a reakcióelegyhez. A metiltranszferáz reakció rPP1c δ , Flag-MYPT1 vagy ezek keverékének jelenlétében vagy hiányában ment végbe.

Pull-down kísérletek A MYPT1-el kölcsönható sejtmagi fehérjék meghatározásához Flag-MYPT1 fehérjét kötöttünk anti-Flag M2 affinitás gélhez és HepG2 sejtmagi frakciót és szinaptoszóma lizátumot adtunk hozzá. A Flag-MYPT1-et a hozzá kötődött fehérjékkel Flag-peptid segítségével eluáltuk, majd SDS-gélelektroforézist követően MS kompatibilis ezüst-festéssel tettük láthatóvá a fehérjesávokat és tömegspekrometriás analízissel azonosítottuk.

A Duolink PLA fehérje-fehérje interakciós esszé. A HeLa sejteket PFA/TBS oldatban fixáltuk, és permeabilizáltuk. A mintákat elsődleges antitestekkel inkubáltuk, a negatív kontroll csoportban elsődleges antitestet nem alkalmaztunk. A Duolink PLA próbát az elsődleges antitestekhez ligáltunk, majd az így kifejlődő fluoeszcens jeleket Opera PhoenixTM HCS mikroszkóp segítségével vizualizáltuk.

Szöveti array elemzése 25 klinikai esetből származó humán májtumor és normál szövetmintát, valamint 15 tumoros sejtlizátumot triplikátumban tartalmazó SomaPlex fehérje microarray slide-okat elemeztünk 3% anti-phospho-PRMT5^{T80}, -phospho-MYPT1^{T850} és -histone H2A, anti-PRMT5, - MYPT1¹⁻²⁹⁶ és H2AR3me2s antitestek segítségével. A szöveti array slide-okat ECL eljárással detektáltuk.

Immunhisztokémia A humán bőrszöveti metszeteket, egér és humán vázizomszöveteket éjszakán át inkubáltuk az elsődleges antitestekkel, majd mosást követően másodlagos antitestekkel. Az immunjeleket 3,3'-diaminobenzidin kromogén szubsztráttal hívtuk elő. Human rektális abdominális és egér vázizom mintákat izopentánnal fagyasztott metszeteken vizsgáltuk. A glikogént Perjódsavas Schiff-festéssel tettük láthatóvá. Az egérsebeket Masson és Goldner módszere szerint festettük.

Immunfluoreszcencia A sejteket 4% paraformaldehid/PBS oldattal (HaCaT, hepG2) vagy felszálló etanol sorral (B50) fixáltuk, majd Triton X-100/PBS oldattal permeabilizáltuk, 1% lószérum vagy BSA/PBS oldatával blokkoltuk. Az elsődleges antitesteket 1:250, a másodlagos antitesteket és a Texas Red-X phalloidint pedig 1:2000 arányban alkalmaztuk éjszakán át. A sejtmagokat DAPI-val festettük meg, és ProLong Gold Antifade médiummal fixáltuk. Az immunjeleket Leica konfokális mikroszkóppal vizualizáltuk.

Immunprecipitáció Protein A-Sepharose (PAS) gyantához antitesteket kötöttünk ki, majd az előtisztított B50 lizátumot illetve az *smtnl1*^{-/-} WT és KO egér vázizom kivonatot hozzáadtuk a PAS-antitest komplexekhez, és 4 °C-on 90 percig inkubáltuk őket. Miután az antitestekhez bekötődtek a megfelelő fehérjék, a felülúszót eltávolítottuk, a gyantát pedig átmostuk 1x immunprecipitációs pufferrel, illetve PBS-sel. A gyantát 100 °C-on 5 percig főztük 1x SDS-PAGE mintapufferrel, és a mintákból Western blotot végeztünk.

Fehérjetermeltetés és tisztítás Emlős tsA201 sejtekbe polietilénimin segítségével Flag-SNAP-25 vagy Flag-KEPI fehérjét kódoló plazmidot juttattunk be. A

sejteket a transzfekció kezdete után 24 órával lizáltuk és a termeltetett fehérjét Anti-Flag M2 affinitási géllal tisztítottuk. A kikötött fehérjét 300 µg/ml Flag-peptid/TBS-sel eluáltuk.

Felületi plazmon rezonancia (SPR) A PRMT5 és a SNAP25 fehérjék MYPT1-el való kölcsönhatását SPR alapuló kötődési kísérletekkel tanulmányoztuk Biacore 3000 készülék segítségével. CM5 szenzor chip felszínére GST-MYPT1¹⁻¹⁰⁰⁴, GST-MYPT1⁶⁶⁷⁻¹⁰⁰⁴ és His-MYPT1¹⁻⁶³³ fehérjét kötöttünk ki. PRMT5 vagy SNAP25 fehérjét injektáltunk a felszínre különböző töménységben, a szenzorgrammokat a BIAevaluation 3.1 szoftver segítségével elemezve meghatároztuk az asszociációs állandókat (K_a).

3.5. Sejtbiológiai technikák

Kaspáz-3 aktivitásmérési vizsgálat A HaCaT sejteket konfluens állapotig növesztettük, 24 órán át szérum-éhezettük, inhibitorokkal kezeltük, lizáltuk, és centrifugálás után a felülúszóhoz hozzáadtuk az Ac-DEVD-AMC szubsztrátot. A felszabadult fluoreszcens AMC-t intenzitását 460 nm hullámhosszon mértük.

Karcolási (scratch) vizsgálat Konfluens HaCaT sejtekere Tecan Freedom EVO 150 géppel egyforma széles karcoltot ejtettünk. Karcolás után a sejteket inhibitorokkal kezeltük, majd 24 órán át növesztettük. A MYPT1 csendesítés esetében a sejteket siRNS-sel transzfektáltuk, majd 24 órával karcoltuk.

Electric cell-substrate impedance sensing (ECIS) A HaCaT sejteket 8W10E ECIS 8 elektródás tenyésztőedényben növesztettük. 5 mA áramerősségű és 60 kHz frekvenciájú elektromos impulzust alkalmazva az elektródok felületén kiégettük a sejteket. A sejtréteg integritásának helyreállítását az impedancia plató maximális értéke jelentette.

JuLITM valós idejű (real-time) sejtvizsgáló készülék HaCaT sejteket karcolat ejtését követően 10% FBS/DMEM-ben tenyésztettünk, majd inhibitorokat adtunk hozzá. A MYPT1-csendesített és a non-target siRNS-sel transzfektált sejteket megkarcoltuk és annak benövését JuLITM Br készülékkel vizsgáltuk 24 órán keresztül.

3.6. Bioinformatikai elemzések

Microarray analízis *Smtnl1* WT és KO vemhes és nem vemhes állatok vázizom és méhizom mintáin és az siMYPT1 hepG2 sejtekből RNS preparáltunk és MessageAmp Premier kittel jelöltük. Affymetrix Mouse Genome 430 vagy Human Affymetrix Mouse Genome 430 microarray elemzések az UD Genomed Medical Genomic és a Duke University Microarray Facilityben készültek.

Statisztikai analízis A statisztikai analízist GraphPad Prism 6 programmal végeztük el. A normalizált adatok statisztikai kiértékelését parametrikus összehasonlításban két csoport esetén t-teszt, 2-nél több csoport esetén egyutas ANOVA vagy általános lineáris modell alkalmazásával végeztük. Varianciaanalízis során Tukey-tesztet alkalmaztunk.

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉSÜK

4.1. A miozin foszfatáz szerepe a neurotranszmitter-kibocsátás szabályozásában

Kutatásaink célja az MP idegszövetben betöltött funkciójának mélyebb megismerése volt, mivel a MP az idegszövet szinte minden régiójában jelen van, különösen magas expressziós szinteket mutatva például a látópályában, a középgagyban és más specifikus agyi magcsoportokban. Előzetesen bizonyítottuk, hogy az MP, illetve annak regulátor alegysége, a MYPT1, jelen van az agykéreg szinaptoszómák preszinaptikus frakciójában, és kölcsönhatásba lép több szinaptikus fehérjével, például a szinaptofizinnel, a SNAP-25-tel és a Rho-kinázzal (ROK).

A neurotranszmitterek vezikulákból történő felszabadulásának szabályozásában kritikus szerepet játszanak foszforilációs és defoszforilációs folyamatok. A vezikulák az aktív zónában dokkolódnak, majd a Ca^{2+} beáramlása exocitózist vált ki, amely során a vezikulák tartalma a szinaptikus részbe kerül. Ennek a folyamatnak alapvető szereplője a SNARE-komplex (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein REceptor), amely három

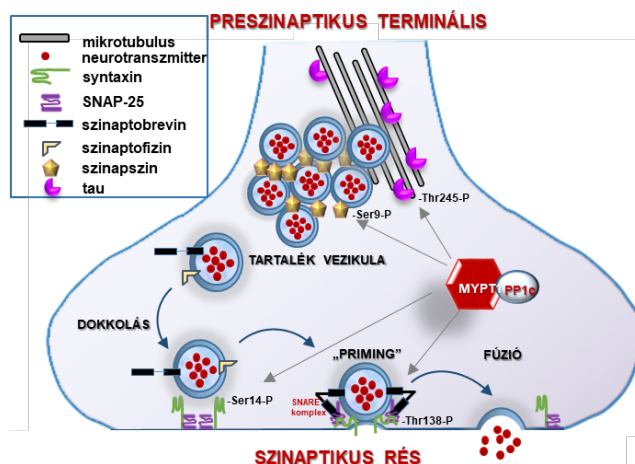
fehérjéből áll: a szinaptobrevinből, a SNAP-25-ből (Synaptosomal-associated protein 25) és a szintaxinból. A neurotranszmitterek exocitózisa szigorúan szabályozott folyamat, amely a SNARE fehérjekomplex összeszerelődésén és működésén alapul, és az exocitózis során a vezikula- és plazmamembrán fúziójáért felelős. Az egyik kulcsfehérje, a SNAP-25, foszforilációja kiemelten fontos a vezikulumok” primingjában”, azaz exocitózisra kész állapotba hozásában.

A preszinaptikus terminálisokban az MP lokalizációját immunhisztokémiai és elektronmikroszkópos vizsgálatokkal térképeztük fel. Kimutattuk, hogy az enzim specifikusan feldúsul az aktív zónák környezetében, ahol közvetlen közelségben található a SNARE komplexszel és a kalciumcsatornákkal. Ez a térbeli elrendeződés lehetővé teszi az MP számára, hogy gyorsan és hatékonyan szabályozza a neurotranszmitter-kibocsátás folyamatát. A SNARE komplex foszforilációs állapota meghatározó jelentőségű a neurotranszmitter-tartalmú vezikulák exocitózisában. Kutatásaink során kimutattuk, hogy az MP specifikusan defoszforilálja a SNAP-25 Ser187 oldalláncát. Ez a defoszforiláció közvetlen hatással van a SNARE komplex összeszerelődésének kinetikájára és stabilitására. Fehérje kötődési vizsgálataink kimutatták, hogy a SNAP-25 foszforilált formája elősegíti a SNARE komplex kialakulását, míg a defoszforilált forma stabilizálja a már kialakult komplexet.

Vizsgálataink során megerősítettük, hogy a MP szabályozó alegysége, a MYPT1, és a ROK lokalizálható mind a preszinaptikus terminálisokban, mind a postszinaptikus sejtestekben patkány agykérgi szinaptoszómákban és cochleáris magban. A preszinaptikus fehérjék foszforilációjának szabályozására alkalmaztunk PP1 és ROK specifikus inhibitorokat, például a tautomicitint (TMC) és az Y27632-t. A TMC gátolta a depolarizáció által kiváltott exocitózist, míg az Y27632 ellentétes hatást váltott ki. Ez arra utalt, hogy a ROK és MP koordináltan szabályozzák a preszinaptikus folyamatokat.

Az MP aktivitásának jelentőségét a neurotransmitter-kibocsátásban több kísérletes megközelítéssel is igazoltuk. Elektrofiziológiai mérésekkel kimutattuk, hogy az MP gátlása fokozza a spontán neurotransmitter-kibocsátást, amit a miniatűr posztszinaptikus áramok frekvenciájának növekedése jelez. Ez a hatás specifikus az MP-re, mivel más protein foszfatázok gátlása nem eredményezett hasonló változásokat. Az MP aktiválása ezzel szemben csökkentette a neurotransmitter-kibocsátást, ami arra utal, hogy az enzim aktivitása és a szinaptikus vezikulák fúziója között fordított összefüggés áll fenn.

Tömegspektrometriás vizsgálatok és koimmunoprecipitáció segítségével kimutattuk, hogy a MYPT1 fehérje szorosan kölcsönhatásba lép a SNAP-25-tel. A SNAP-25 Thr138 oldalláncának foszforilációját a ROK katalizálja, míg a



1. ábra A MP neurotransmitter kibocsátásban betöltött szerepe. Az MP defoszforilálja a szintaxin Ser14 és a SNAP-25 Thr138 oldalláncait, ami fokozza a szinaptikus vezikulák befűződését. A szinapszin Ser9 oldalláncának foszforilációs szintje befolyásolja a szinaptikus tartalék vezikulákhoz való affinitását, szabályozva azok transzportját az aktív zónába. A Tau Thr245 foszforilációja-defoszforilációja szabályozza a mikrotubulusok összeszerelődését és a vezikulák mozgását.

defoszforilációt az MP végzi. A SNAP-25 foszforiláció mértékét TMC vagy KEPI (egy specifikus MP-gátló) használatával vizsgáltuk. A KEPI alkalmazása emelte a SNAP-25 Thr138 foszforilációs szintjét, miközben csökkentette a neurotransmitter-kibocsátás mértékét. Ez közvetlenül bizonyította a SNAP-25 defoszforiláció és az exocitózis funkcionális összefüggését. Az MP idegrendszeri szerepét igazoltuk egér agyszeleteken, ahol a KCl-indukált depolarizáció a SNAP-25 Thr138 defoszforilációját eredményezte. A szinaptikus vezikulák ciklusának szabályozásában az MP további szubsztrátokat is defoszforilál.

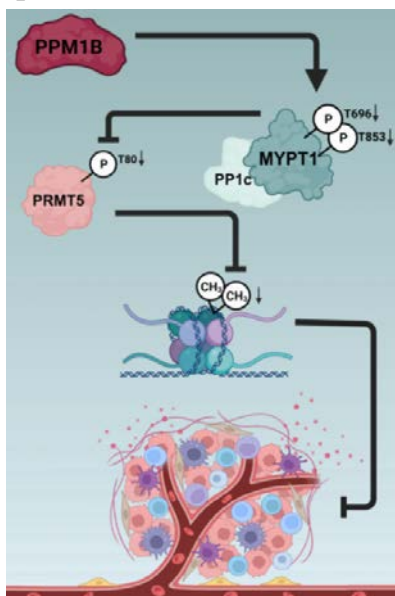
Azonosítottuk, hogy a szinapszin I fehérje, amely a vezikulák aktin citoszkeletonhoz való kapcsolódásában játszik szerepet, szintén az MP szubsztrátja. A szinapszin I defoszforilációja befolyásolja a vezikulák mobilitását és a readily releasable pool (RRP) méretét. Konfokális mikroszkópiás vizsgálataink azt mutatták, hogy az MP gátlása növeli a mobilis vezikulák arányát és az RRP méretét, ami magyarázatot ad a fokozott neurotranszmitter-kibocsátásra.

Eredményeinkből egyértelműen látható, hogy az MP segíti az ingerületátvivő anyagok felszabadulását azáltal, hogy defoszforilálja a SNAP-25 Thr138 oldalláncának foszforilált formáját. A folyamat során a ROK és MP egymással antagonisztikus módon szabályozzák a SNARE-komplex működését és a vezikulumok exocitózisát. Ezek alapján a ROK/MP komplex a neurotranszmitter-kibocsátás egyik alapvető molekuláris szabályozó mechanizmusának tekinthető (1. ábra)

4.2. A miozin foszfatáz szerepe a génexpresszió szabályozásában

A MP sejtmagi funkcióinak feltárása jelentősen átformálta az enzimkomplexről alkotott képünket. Míg korábban elsősorban citoplazmatikus szabályozó enzimként tartottuk számon, mára egyértelművé vált, hogy az MP kulcsfontosságú szerepet játszik a génexpresszió epigenetikai és transzkripciós szintű szabályozásában is. Kutatócsoportunk egyik legjelentősebb eredménye a protein arginin metiltranszferáz 5 (PRMT5) és az MP közötti funkcionális kapcsolat feltárása volt. A MP sejtmagi funkciójának további vizsgálatakor az interaktóm elemzése során kimutattuk, hogy kölcsönhatásba lép a metiloszóma komplex tagjaival, köztük a PRMT5, MEP50 és PICln fehérjékkel. A PRMT5 kulcsfontosságú enzim az arginin szimmetrikus dimetilációjában, amellyel a génexpressziót gátolja. A PRMT5, protein arginin metiltranszferáz, szimmetrikus dimetilációt katalizál különböző célfehérjéken, köztük a hiszton fehérjéken is. Konfokális mikroszkópiával igazoltuk a PRMT5 és MEP50 fehérjék

kolokalizációját a MYPT1 alegységgel HepG2 sejtekben, amit immunprecipitációs technikákkal is megerősítettünk. Az SPR kötődési vizsgálatok kimutatták, hogy a PRMT5 a MYPT1 N-terminális régiójához kötődik, és ez a kölcsönhatás kritikus a PRMT5 aktivitásának szabályozásában. Proteomikai vizsgálataink során azonosítottuk, hogy a PRMT5 Thr80 oldallánca reverzibilis foszforiláción megy keresztül. Foszfospecifikus antitestek alkalmazásával és tömegspektrometriai elemzéssel igazoltuk, hogy ez a



2. ábra A PPM1B/MP/PRMT5/hisztin jelátviteli pálya szerepe a daganatképződésben

foszforilációs hely az MP specifikus szubsztrátja. In vitro foszfatáz assay-k segítségével kimutattuk, hogy az MP rendkívül hatékonyan defoszforilálja ezt az oldallácot. Ezáltal a MP gátló hatást fejt ki az enzimre, és csökkenti a hisztonok szimmetrikus dimetilációját.

A PRMT5 Thr80 foszforilációs állapota jelentősen befolyásolja annak metiltranszferáz aktivitását. Metilációs assay-k és western blot analízisek azt mutatták, hogy a foszforilált forma fokozott enzimaktivitással rendelkezik. Az MP általi defoszforiláció csökkenti a PRMT5 katalitikus hatékonyságát, ami közvetlen hatással van a hiszton fehérjék metilációs mintázatára. Immunprecipitációs kísérleteink feltárták, hogy az MP gátlása jelentősen növeli a

H4R3me2s és H3R8me2s módosítások globális szintjét, ami általában transzkripciós represszióval társul.

Különösen érdekes, hogy az MP-PRMT5 szabályozási tengely kiemelt jelentőséggel bír a tumorszuppresszor gének expressziójának szabályozásában. A MP génexpresszióra gyakorolt hatásainak pontosabb megértése érdekében microarray analízist végeztünk, amely során 2429 gén expressziójának változását azonosítottuk MYPT1 csendesített HepG2 sejtekben. Az elemzés során kiderült, hogy a megváltozott gének közel 40%-a kapcsolatban áll a daganatképződés folyamataival. Számtalan tumorszuppresszor gén, például a retinoblasztóma vagy a c-Myc gén expressziója jelentősen csökkent a MYPT1 gátlása hatására. A PRMT5 foszforilációjának szintje daganatos szövetekben, különösen hepatocelluláris karcinómában és emlőrákban, jelentős növekedést mutatott, ami együtt járt a hiszton H4 és H2A fehérjék fokozott dimetilációjával. Ez azt jelzi, hogy az MP aktivitásának csökkenése hozzájárul a PRMT5 túlzott aktivitásához és ezáltal a tumorszuppresszor gének elnyomásához (2. ábra).

A csendesítési kísérletek mellett a nukleáris MYPT1 interaktom elemzése megvilágította, hogy az sejtmagi MP szabályozásában a Mg^{2+}/Mn^{2+} függő protein foszfatáz 1B (PPM1B) kulcsszerepet játszik. A PPM1B kölcsönhatása a MYPT1-tel, különösen a Thr696 gátló foszforilációs hely defoszforilációjával, közvetlenül hozzájárul a teljes MP aktivitás fenntartásához. A PPM1B inhibitoros vagy mutáns formájának alkalmazásával a PRMT5 foszforilációja és aktivitása növekedett, ami a tumorszuppresszor gének expressziójának további csökkenéséhez vezetett. A HeLa sejtekben végzett vizsgálatok azt mutatták, hogy a PPM1B gátlása szignifikánsan növelheti a PRMT5 aktivitását és a hiszton H4 szimmetrikus dimetilációját, miközben csökkenti a tumorszuppresszor gének, például a retinoblasztóma fehérje expresszióját. Ezzel szemben a PPM1B túlzott expressziója csökkentette a PRMT5 aktivitását, gátolta a hiszton metilációját, és növelte a tumorszuppresszor gének aktivitását. Eredményeink alátámasztják, hogy

a PPM1B szabályozza az MP aktivitását, amely a PRMT5 foszforilációjának gátláson keresztül tumorsuppresszor szerepet tölt be.

Összefoglalva, az MP kulcsszerepet játszik a génexpresszió szabályozásában, különösen egyes daganatok kialakulásának gátlásában. A PPM1B foszfatáz mint a jelátviteli útvonal upstream szabályozója szorosan összefügg az MP működésével, megakadályozva a PRMT5 aktivitását és a hisztonfehérjék szimmetrikus dimetilációját. Az MP és PPM1B központi szerepet játszik a tumorsuppresszor gének szabályozásában, így potenciális terápiás célpontként szolgálhat jövőbeli rákellenes kezelésekben.

4.3. A protein foszfatázok szerepe a bőrszövet homeosztázisában

A bőrszövet, mint szervezetünk legnagyobb szerve, folyamatos megújulásra és adaptációra képes barrier rendszert alkot. Ebben a dinamikus rendszerben a protein foszfatázok, különösen az MP, összetett szabályozó szerepet töltenek be. Kutatásaink során részletesen feltártuk azokat a molekuláris mechanizmusokat, amelyeken keresztül az MP befolyásolja a bőrsejtek proliferációját, differenciációját és a szöveti regenerációt. Az epidermisz, a bőr legkülső rétege, olyan mechanikai és kémiai gátat képez, amely védi a szervezetet a külvilág káros hatásaitól. Az epidermisz rétegei folyamatos megújulási folyamatokon mennek keresztül, miközben biztosítják a bőrszövet homeosztázisát. Különböző stresszhatások, például UV-sugárzás vagy sebek, megszakíthatják ezt az egyensúlyt, szövetkárosodást és barrierfunkció-károsodást okozva. A fehérjék reverzibilis foszforilációja elengedhetetlen az epidermisz homeosztázisához. Míg a kinázok szerepét széles körben vizsgálták, a protein foszfatázok működése még kevésbé ismert ezen folyamatokban. Az UV-sugárzás intenzív szövetkárosító hatása jól ismert: bőrpírt, égést, öregedést és rákos elváltozásokat okozhat. Az UVA-sugárzás, amely az UV-sugárzás 95%-át teszi ki a Földön, ROS-képződést indukál a sejtekben, lipid-, fehérje- és DNS-károsodást

előidézve. Vizsgálataink a PP1 és PP2A enzimek szerepére összpontosítottak UVA-sugárzás okozta sejtválaszokban.

Kísérleteink során HaCaT keratinocitákat kezeltünk tautomycinnel (TM), a PP1 szelektív inhibitorával, valamint PP1c-csendesítést végeztünk. Az UVA-sugárzás (10 J/cm² dózis) csökkentette a sejtek túlélését, és a foszfatáz aktivitás 30%-os csökkenését eredményezte. A PP1c-csendesítés vagy TM-kezelés jelentősen fokozta a sejtek érzékenységet az UVA-val szemben, miközben a PP2A aktivitás változatlan maradt. Az UVA okozta PP1 gátlásért a ROS hatására oxidálódó cisztein- és fémion-központok felelnek, amelyek közvetlenül blokkolják az enzim katalitikus működését. Ezenkívül 19 olyan gén expresszióját azonosítottuk, amelyek PP1-től függően változtak UVA-sugárzás után, köztük a keratin1/10 és S100A8 kalciumkötő fehérjék génjeit. TM-kezelést követően Balb/c egerbőrben az epidermisz jelentős megvastagodását és pigmentációs zavarait figyeltük meg, különösen UVA-val kombinálva.

Bizonyítottuk, hogy a MP szerepet játszik a sebgyógyulás folyamatában is. Okadánsavval (PP2A inhibitora) és tautomycinnel kezelt HaCaT sejtvonalakban azt tapasztaltuk, hogy a PP1 és PP2A gátlása jelentősen lassította a sebzáródást, amit karcolásos eszközzel mutattunk ki. A PP1 gátlása egerek bőrsérülési modelljében teljes sebgyógyulási defektust okozott. Ezzel szemben a ROK inhibitora (H1152) felgyorsította a sebszél migrációját és a bőr regenerációját. A MYPT1 specifikus csendesítésével, amely az MP szabályozó alegysége, tovább vizsgáltuk a PP1 részvételét a sebgyógyulásban. A MYPT1 csendesítése gátolta a keratinociták sejt-sejt kapcsolatait és megváltoztatta az ECIS által mért barrierfunkciót. Sebgyógyulási modellekben kimutattuk, hogy a MYPT1 csendesítése fokozta a keratinizáció kulcsenzimének, a transzglutamináz-1-nek (TG1) az expresszióját. Miközben a normál bőrben a MYPT1 főként a bazális rétegben expresszálódik, a TG1 a felsőbb rétegekben, például a stratum spinosumban és granulosumban található meg. MYPT1-csendesített ex vivo

emberi bőrminták azt mutatták, hogy a TG1 expresszió eltolódása a késői differenciációt erősíti.

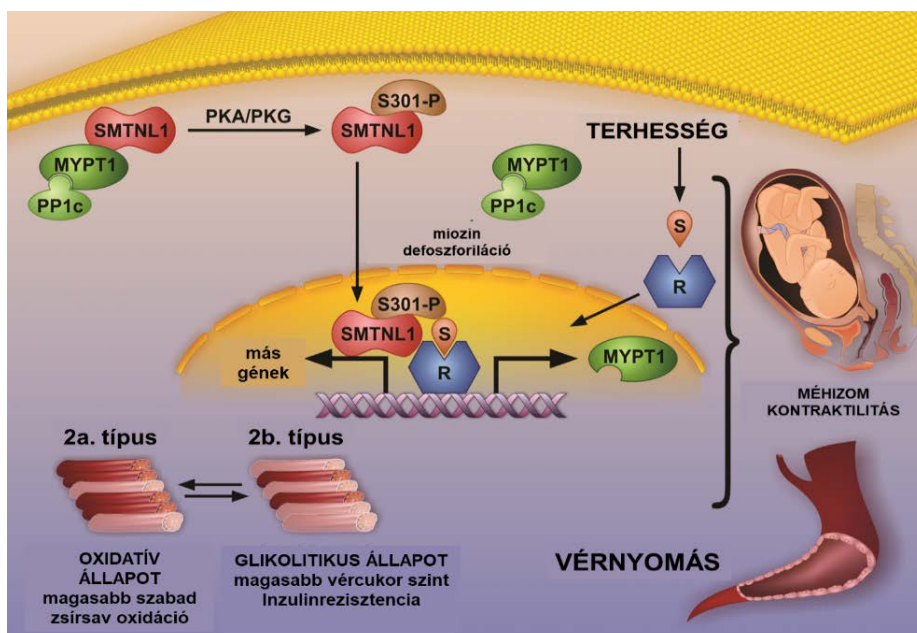
Vizsgálataink megerősítik, hogy a PP1 és az MP kiemelkedő jelentőséggel bírnak az epidermális homeosztázis fenntartásában. Az UV-sugárzás és sebgyógyulás által kiváltott foszfoprotein módosítások irányításával a PP1 szabályozza a keratinociták proliferációját, differenciációját és migrációját. Az MP gátlása jelentős epidermális zavarokhoz vezethet, ezért terápiás célpontként szolgálhat a sebgyógyulással összefüggő betegségek, például krónikus fekélyek vagy fibrózis kezelésében.

4.4. A terhesség által indukált izotípusváltást a vázizomzatban az SMTNL1 szabályozza

Az SMTNL1 terhesség során kifejtett hatását, terhes és nem-terhes, WT és KO *smtnl1* egerekből származó vázizom mintákon vizsgáltuk. Az SMTNL1 expressziója jelentősen megemelkedett terhesség és álterhesség hatására a nem-terhes egyedekhez viszonyítva, és az SMTNL1 Ser³⁰¹ oldalláncának foszforiláció 3,5-szeres emelkedést mutatott terhesség hatására. Rágcsáló és humán vázizom minták izomrost-tipizálása során a 2b típusú glikolitikusabb izomrostok esetében szignifikáns emelkedést, míg a 2a típusú oxidatívabb rostok esetében tendenciális csökkenést tapasztaltunk SMTNL1 hiányos egerekben terhesség hatására. A szövetminták immunhisztokémiás elemzése alapján elmondhatjuk, hogy vad típusú nem-terhes egerek vázizmában az SMTNL1 expressziója a 2a típusú rostokra korlátozódik, míg terhesség hatására más, a 2a típustól eltérő rostokban is expresszálódik SMTNL1, mint például a 2a-2b átalakulás alatt álló 2x típusú izomrostokban. Terhesség és ál-terhesség hatására 15-20%-al megemelkedett a 2b típusú glikolitikusabb izomrostok száma, míg nem volt hatásuk az 1-es típusú oxidatívabb izotípus számára. A 2a típusú izomrostok indikátoraként ismert MHC2a expressziója csökkent, míg az MHC2b expresszió 20%-os emelkedést mutatott humán vázizom mintákban, mely a terhesség hatására bekövetkező oxidatívból glikolitikusabb típusba történő átalakulást mutatja. A 2b típusú rostok

számának növekedése mellett 24%-al emelkedett az izomrostok glikogén tartalma. Ezen adatok tükrében arra következtethetünk, hogy a terhesség során az vázizomzat oxidatívból glikolitikusabb típusba történő fenotípusváltása játszódik le, és hogy az SMTNL1 szabályozó szerepet játszhat ebben a folyamatban.

Az *smtnl1* gén csendesítésének hatására számos anyagcsere útvonal és jelátviteli pályához csatolt gének változó expressziója mutatható ki, köztük az inzulinrezisztenciára utaló gének is, amelyet proteomikai elemzéssel is alátámasztottunk. Az *smtnl1* KO állatok anyagcseréjüket tekintve kevésbé hatékonyak, glükóz intoleranciát mutatnak. A CLAMS vizsgálatok alapján az SMTNL1 KO állatok a sötétciklusban csökkent aktivitást mutattak. Az oxigénfogyasztás (VO_2) terhes állatok esetén alacsonyabb volt a nem-terhesekhez képest, míg a terhes állatok mind a WT és a KO állatok esetén kisebb csökkenést mutattak a VO_2 értékekben éheztetés esetén. A légzéscsere arány (VCO_2/VO_2 ; RER) a terhes és nem-terhes KO állatok esetén egyaránt csökkent. A KO állatok

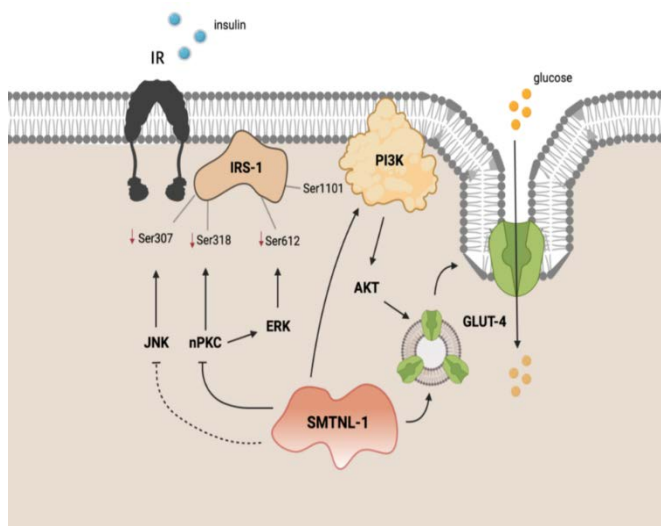


3. ábra. Az SMTNL1 hatásának molekuláris mechanizmusa. A citoszolban az SMTNL1 a miozin foszfatáz (PP1c-MYPT1) MYPT1 szabályozó alegységéhez kötődve gátolja a holoenzim aktivitását. PKA/PKG enzimek általi foszforiláció hatására a sejtmagba transzlokálódik. A terhesség során a megemelkedett szteroidhormon, a progeszteron (S) szintjére válaszul az SMTNL1 és a progeszteron receptor B (PR-B; R) együttesen segítik elő a vázizomzat adaptációját. Nem-terhes állapotban az SMTNL1 a PR-B aktivitásának gátlására szolgál; terhesség alatt azonban ez a gátlás feloldódik, ami elősegíti a metabolikus és kontraktilis fehérjék expresszióját szabályozó vázizom-specifikus gének aktiválódását. Ez az összehangolt szabályozás alkalmazkodik az anya fiziológiai állapotához.

jelentősen emelkedett tápanyag eltolódási értéket mutattak a WT kontrolljaikhoz képest, amely arra utal, hogy a zsírsavakról a szénhidrátfelhasználás felé az anyagcseréjük. Bár a terhes KO állatok anyagcsereútvonaluk eltolására hatékonyabban képesek, anyagcseréjük a fokozott szénhidrát felhasználás miatt mégis sérült, amely a terhesség során fokozottabbá válik (3. ábra).

4.5. Az SMTNL1 szerepe a vázizom inzulinérzékenyítésében

A vázizom jelentős szerepet tölt be a glükóz homeosztázis szabályozásában, mivel fiziológiai körülmények között a bevitt glükóz nagy részét ez a szövet tárolja. Az inzulin az inzulinreceptor (IR) aktiválásával egy komplex jelátviteli kaszkádot indít el, amelynek végén a GLUT4 fehérje transzlokációja biztosítja a glükózfelvételt a sejtekbe. A folyamat lényege, hogy az IR az IRS1 foszforilációján keresztül aktiválja a PI3K-Akt útvonalat, amely a GLUT4 membránba történő transzlokációjához vezet. Az inzulinrezisztencia (InR) az inzulin hatékonyságának csökkenését jelenti, amelyben a legfontosabb mechanizmus az IRS1 szabályozásának felborulása. Az IRS fehérjék pozitív (tirozin) és negatív (szerin) poszttranszlációs módosításának egyensúlya döntően



4. ábra. Az SMTNL1 inzulinértékenyítő hatása inzulinrezisztens C2C12 miotubulusokban. Az SMTNL1 csökkenti az új típusú PKC ϵ gén expresszióját (nPKC), ami közvetlenül csökkenti a Ser318 foszforilációt és az ERK1/2 aktivitásának gátlásával csökkenti az IRS1 Ser612 foszforilációját is. A Ser612 foszforiláció szabályozza a PI3K kötődését, és aktiválja a PI3K-Akt-mTOR útvonalat. Emellett az SMTNL1 feltehetően a DUSP7 kettős specificitású protein foszfatáz közreműködésével gátolja a JNK aktivitást, ami az IRS1 Ser307 foszforilációjának csökkenéséhez vezet. Az SMTNL1 elősegíti a glükózfelvételt az Akt és AMPK útvonalak aktiválásával, valamint a GLUT4

meghatározza az inzulinérzékenységet. Bár számos tényező hozzájárulhat az IRS1 szerin különböző helyeken történő foszforilációjához (ERK, JNK és mTOR aktivitása révén), ezek közös következménye az inzulin hatékonyságának csökkentése és az inzulinrezisztencia kialakulása.

Leírtuk, hogy az SMTNL1 kulcsszerepet játszik az inzulin jelátviteli útvonal szabályozásában. Kísérleteink differenciált C2C12 miotubulusokon és SMTNL1 KO egereken azt mutatták, hogy a progeszteron jelenlétében az SMTNL1 képes csökkenteni az IRS1 szerin oldalláncainak foszforilációját, különösen Ser307, Ser318 és Ser612 helyeken. Ez a hatás a PI3K és az Akt útvonal aktiválását eredményezi, javítva ezzel az inzulin által stimulált glükózfelvételt az inzulinrezisztens modellekben.

Az SMTNL1 gátolta az inzulinrezisztencia kialakulása során aktív kinázok, például az ERK1/2 és JNK aktivitását. Ezen útvonalak inaktiválása megakadályozta az IRS1 foszforilációját, amely az inzulin szignalizációs kaszkád blokkolását jelenti. SMTNL1-overexpresszáció hatására a GLUT4 fehérje expressziója növekedett, és a glükóz anyagcserét mérő vizsgálatok szerint a sejtek energiafelhasználása is javult, különösen progeszteronnal együtt. A glikolízist mérő ECAR- és OCAR-adatok szintén alátámasztották a fokozott ATP-termelést és a glikolízis helyreállítását az SMTNL1 által módosított sejtekben. Emellett az SMTNL1 KO egerek inzulinjelátvitelben mutatott eltérései azt sugallják, hogy az SMTNL1 kritikus szerepet játszik az inzulinérzékeny állapot fenntartásában. Az SMTNL1 hiánya inzulinérzékenységet, glükózintoleranciát és csökkent metabolikus hatékonyságot eredményezett, amelyet terhesség esetén az SMTNL1 jelenléte részben kompenzált (4. ábra).

4.6. Az SMTNL1 a progeszteron receptor kettős hatásmechanizmusú kofaktora

Az izomkontrakció szabályozása mellett az SMTNL1 részt vesz a terhesség során bekövetkező fiziológias adaptációs mechanizmusokban is, mely a női nemi hormonokon keresztül valósul meg. Az SMTNL1 *in vivo* és *in vitro* is szelektíven

kötődött a progeszteron receptorhoz (PR) progeszteron hormon hatására. Az SMTNL1 ligandumfüggő kötődése a PR-hoz az SMTNL1 1-230 aminosavat tartalmazó régiója és a PR 1-722 régiója között alakult ki. Bár a, de nem elégséges. A hormonkötő régió meglétét kiemelt jelentőségűnek találtuk a fehérjék közötti kölcsönhatás kialakulásában, de az emlős kéthibrid vizsgálatok alapján ez nem volt elégséges a stabil interakció kialakulásához. Az SMTNL1 koncentráció függő módon gátolta a PR transzkripció aktivitását, és ehhez a progeszteronon kívül az SMTNL1 Ser301 foszforilációját kiváltó 8BrcAMP agonista is szükséges volt. Ez a terhesség során a Ser301 oldalláncon történő foszforilációt követő SMTNL1 sejtmagi transzlokációjához és az SMTNL1 kofaktorkénti működéséhez volt szükséges. Microarray vizsgálatok alapján az SMTNL1 kontraktilis elemek, sejtmagi receptorok és maga a *mypt1* génexpresszióját is modulálta. Erdeményeink egy új izmadaptációs mechanizmusra világítanak rá, ami egy a terhességre adott normál, az anya számára evolúciós előnyt jelentő, a magzat fejlődését és védelmét biztosító válasz.

4.7. Az SMTNL1 szerepe a reproduktív funkciókban

Az SMTNL1-nek nemcsak a vázizom fenotípusra és az inzulinérzékenységre van hatása, hanem kulcsszerepet játszik a reproduktív folyamatok szabályozásában. SMTNL1 KO egereknél csökkent reproduktív képességet figyeltek meg: kevesebb utódszámot, magasabb embrionális mortalitást és a vemhesség beindulásának késleltetését rögzítették. A terhességi folyamatokat is vizsgáltuk humán endometriális sejtekben és endometrium-specifikus körülmények között. Az Ishikawa sejtvonalak modellként szolgáltak az endometrium vizsgálatához, különböző inzulinrezisztens körülmények között. Az SMTNL1 overexpresszióját követően a sejtek MUC-1 markerének, az endometriális differenciáció fontos fehérjéjének kifejeződése növekedett, különösen progeszteronnal kezelt sejtekben. Terhességi cukorbetegséget szimuláló magas glükóz- és inzulinkörnyezetben az SMTNL1 képes volt részben helyreállítani a sejtek differenciálódását, amit morfológiai változások és

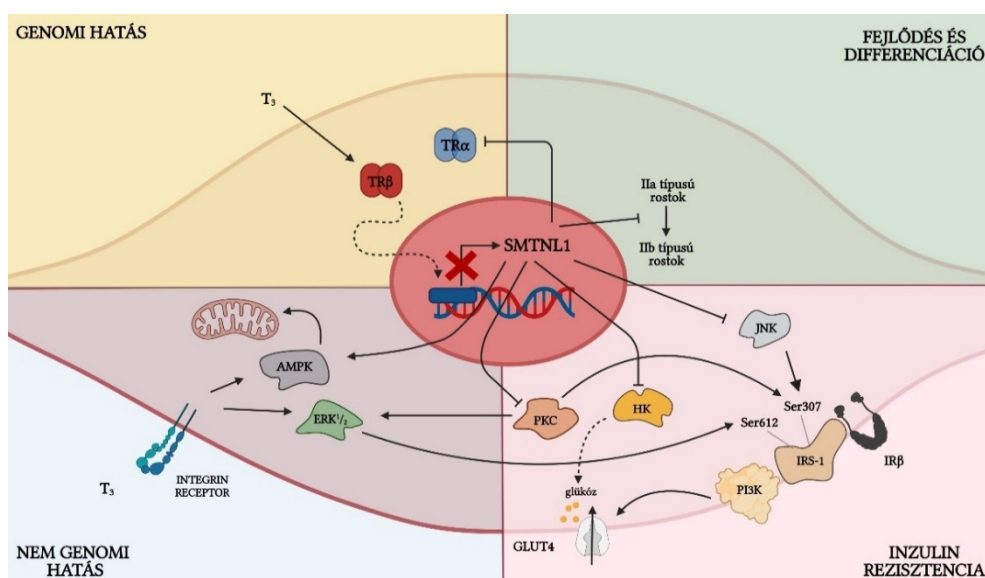
molekuláris markerek is alátámasztottak. Az SMTNL1 csökkentette az endometriális sejtek migrációs képességét a MYPT1 útvonal szabályozásával. Ezáltal gátolta a kontraktilis fehérjék túlzott aktivitását, amely a hámsejtek integritásának megőrzéséhez szükséges. A progeszteron jelenlétében az SMTNL1 fokozta az inzulinérzékenységet az IRS1 útvonal közvetítésével, ami fokozott glükózfelvételt és glikogén-raktározást eredményezett az endometriumban.

Összefoglalva, az SMTNL1 kulcsszerepet tölt be az inzulinérzékenység és az energetikai homeosztázis fenntartásában, különösen terhességgel vagy inzulinrezisztenciát okozó állapotokkal összefüggésben. A vázizomban az SMTNL1 javítja a PI3K-Akt-GLUT4 tengely működését, míg az endometriumban a sejtek differenciálódását és glükózfelvételét támogatja. Az SMTNL1 terápiás célpontként való azonosítása további kutatásokat tesz indokolttá, különös tekintettel a terhességi rendellenességekre, inzulinrezisztencia és reprodukív problémák kezelésére.

4.8. Az SMTNL1 szerepe a pajzsmirigyhormon által indukált fiziológiás és pathológiás folyamatokban izomban

Az SMTNL1 egy transzkripciós kofaktor, amely jelentős szerepet játszik a vázizom különböző stresszfaktorokhoz való adaptációjában. Vizsgálati eredményeink alátámasztották, hogy hipertireózis esetén a vázizom rostösszetételében átalakulások figyelhetők meg a MyHC expresszió transzkripciós szabályozása révén. A hipertireózis hatására a MyHC I rostok IIA típusúvá, azok IIX, majd IIB típusúvá alakulnak, és ez az adaptáció elsősorban szignifikáns mértékben csökkent MyHC IIA expresszióban nyilvánul meg. Továbbá, az SMTNL1 expressziója drámaian csökkent hipertireózis során, amely összefüggésben van az oxidatív rostok csökkenésével és a glikolitikus fenotípus fokozódásával eredményező változásokkal. A gének globális expressziós profiljának összehasonlításából az mTOR, AMPK, PI3K/Akt és MAPK jelátviteli útvonalakat érintő jelentős különbségeket tártunk fel, különösen a kinázok foszforilációs aktivitásában. A hipertireózis inzulinérzékenységet befolyásoló

hatásai között az IRS1 Ser307 és Ser612 oldalláncok foszforilációjának fokozódását figyeltük meg, amely az inzulin jelátvitel szuppressziójához vezetett. A SMTNL1 overexpressziója azonban képes volt visszafordítani ezt a hatást azáltal, hogy csökkentette az IRS1 negatív foszforilációját és fokozta az inzulin mediált glükózfelvételt.



5. ábra: A SMTNL1 szerepe a hyperthyreosisos vázizom anyagcseréjének szabályozásában. A SMTNL1 a következő mechanizmusokon keresztül képes a hyperthyreosis által indukált anyagcsereváltozások megelőzésére a vázizomban: 1) ellensúlyozza a szuprafiziológiás T3 által kiváltott glikolitikus irányú eltolódást; 2) inzulinérzékenyítő hatását a JNK gátlásán keresztül fejt ki; 3) gátolja a T3 nem genomi útvonalának eredményeképpen aktiválódó ERK1/2-t a PKC δ expressziójának szabályozásán keresztül; 4) a HK II enzim szabályozásán keresztül a glükóz foszforiláció és a glikolízis szabályozásában is részt vesz és 5) szelektíven gátolja a TR α expresszióját, amely a T3 fő effektora.

A MP és annak regulációja központi szerepet játszik a sejtek migrációjában és izomfejlődésében. Vizsgálati eredményeink alapján az SMTNL1 jelentősen befolyásolja az MP aktivitását, és a SMTNL1 overexpressziója gátolja a sejtek migrációs képességét a C2C12 mioblasztokban. A hipertireózisos modellekben vizsgáltuk a PP1c δ fehérje MYPT1 és MYPT2 izoformákkal alkotott komplexeinek expressziós és funkcionális változásait. Eredményeink arra utalnak, hogy a T3 kezelés a MYPT2 expresszióját folyamatosan növelte. A SMTNL1 azonban inkább a MYPT1 foszforilációját eredményezte, ami hozzájárult a migráció gátlásához. A MP lehetséges szubsztátja az Na⁺/K⁺ ATPáz (NKA), amely a sejtek ion-homeosztázisának fenntartásában döntő szerepet

játszik. A szuprafiziológiás T3 kezelés fokozta az NKA expresszióját és gátló foszforilációját, és SMTNL1 overexpresszióval kombinálva csökkentette az enzimaktivitást. Eredményeink alapján az SMTNL1 és T3 szelektíven szabályozzák a mioblasztok és miotubulusok MYPT izoformáit, valamint az ezekhez kapcsolódó MP-komplexeken keresztül befolyásolják a különböző metabolikus és mechanikai tulajdonságokat (5. ábra).

Összegezve elmondható, hogy az SMTNL1 egy potenciális célpont a hipertireózis és az ahhoz kapcsolódó izompatofiziológiai állapotok kezelésében. Állításunk azon alapul, hogy inzulinérzékenyítést okoz IRS1 negatív foszforilációjának csökkentésével, ellensúlyozni a T3 hatását, amely az intracelluláris metabolikus egyensúly helyreállítását eredményezi. Az SMTNL1 célzott terápiás lehetőségként használható, akár mimikáló peptidként, akár génexpresszió szintjén szabályozva, amely hozzásegíthet a hipertireózisos izomproblémák, például inzulinrezisztencia és szarkopénia mérsékléséhez. Ez a megközelítés új perspektívát kínál az izombetegségek patogenezisének és kezelésének megértésében.

5. AZ ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

1. A miozin foszfatáz elősegíti a bőr normal homeosztázisának fenntartását és az epidermális sebgyógyulást. Hatását a proliferáció és migráció aktiválásával és a differenciáció gátlásával, valamint a transglutamináz 1 expressziójának szabályozásával az Akt jelátviteli útvonalon keresztül fejti ki.
2. Azonosítottuk a miozin foszfatáz és a Rho A aktivált kináz új neuronális szubsztrátjait, a syntaxin, synapsin és SNAP-25 fehérjéket, valamint az ezeket reguláló foszforilációs helyeket. Leírtuk, hogy a miozin foszfatáz a SNAP25 Thr138 defoszforilációjával elősegíti a neurotranszmitter kibocsátást úgy, hogy egyaránt fokozza a SNARE komplex kialakulását és annak stabilitását.
3. A miozin foszfatáz és a Rho A aktivált kináz a protein arginine metiltransferáz 5 (PRMT5) Thr80 oldalláncának módosítása révén modulálja a hiszton fehérjék génexpresszió-gátló arginin metilációját, ami a tumorsuppresszorok gátlásához vezet. Igazoltuk a miozin foszfatáz tumorgátló szerepét, mivel azt találtuk, hogy gátló foszforilációs helyének megemelkedett foszforilációja korrelált a PRMT5 aktivitásának növekedésével és a kialakult tumorok grádusával valamint státuszával humán hepatocelluláris karcinóma modellben. Igazoltuk, hogy a MP/PRMT5/hiszton onkogén jelpálya upstream regulátora a PPM1B magnézium-ion függő protein foszfatáz, ami az MP MYPT1 szabályozó alegységét defoszforilálva gátolja a tumorigenezist.
4. Kimutattuk, hogy az SMTNL egy kettős hatásmechanizmusú fehérje. Egyrészt a citoszolban a miozin foszfatáz MYPT1 alegységéhez kötődve gátolja az MP holoenzim aktivitását. Másrészt PKA/PKG foszforiláció hatására disszociál a MYPT1 alegységről és a sejtmagba transzlokálódva a progeszteron receptor transzkripciós kofaktoraként ligand-függő módon szabályozza egyes

sejtmagreceptorok, kontraktilis fehérjék és anyagcsere emzimek valamint a *mypt1* gén expresszióját.

5. Jellemeztük az SMTNL1 fehérje fiziológias hatásait és új izomadaptációs útvonalakat írtunk le. Az SMTNL1 a vázizomzat terhességhez való adaptációját is szabályozza, ami a vértöbblet és a magzat súlyának hordozására teszi képessé az anyát, azonban patológias esetekben inzulinrezisztencia kialakulásához is vezethet.
6. Leírtuk az SMTNL1 géncsendesített KO egértörzs reproduktív fenotípusát, amelyet csökkent fertilitás és megnövekedett embrionális halálozás jellemez; illetve felismertünk egy inzulinrezisztens fenotípust, amelyet az izomadaptációs folyamatok eredményeként létrejött glikolitikus izomtípus váltás okoz.
7. Azonosítottuk az SMTNL1 által szabályozott inzulin jelátviteli pálya elemeit, és bizonyítottuk, hogy az SMTNL1-nek a Ser/Thr protein kinázok és foszfatázok expressziójának módosításán keresztül inzulinérzékenyítő hatása van a vázizomban.
8. Bizonyítottuk, hogy az SMTNL1 továbbítja az aktív pajzsmirigyhormon által indukált változásokat a vázizomzatban. Az SMTNL1 overexpressziója a MP enzim gátlásán keresztül szignifikánsan lassítja a sejtek migrációját, míg miotubulusokká történő differenciációjukat -a T3 kezeléssel egyetemben- elősegíti. A MP pajzsmirigyhormon és SMTNL1 általi gátlásának köszönhetően az NKA pumpafehérje blokkolását okozzó gátló foszforiláció jelentős mértékben nő, ami hozzájárulhat a hipertireózis során tapasztalható izomgyengeség kialakulásához.

6. A TÉZISEK ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

1. Keller I, Ungvári Á, Major E, Horváth D, Kónya Z, Tóth E, Erdődi F, Kiss A, **Lontay B.** *Magnesium-dependent-Protein Phosphatase 1B Regulates the Protein Arginine Methyltransferase 5 Through the Modulation of Myosin Phosphatase.* J Biol Chem. 2024 Dec 18;108107. doi: 10.1016/j.jbc.2024.108107. (D1 IF=4,1)
2. Keller, I., Ungvári, Á., Kinter, R., Szalmás, F., Kókai, E., **Lontay, B.** *Smoothelin-like protein 1 promotes insulin sensitivity and modulates the contractile properties of endometrial epithelial cells with insulin resistance.* Front Endocrinol (Lausanne). 2024 May 31;15:1375771. doi: 10.3389/fendo.2024.1375771. eCollection 2024. (Q1 IF=5,7)
3. Tamas I, Major E, Horvath D, Keller I, Ungvari A, Haystead TA, MacDonald JA, **Lontay B.** *Mechanisms by which smoothelin-like protein 1 reverses insulin resistance in myotubules and mice.* Mol Cell Endocrinol. 2022 Jul 1;551:111663. doi: 10.1016/j.mce.2022.111663. (Q2 IF=4,1)
4. Major E, Győry F, Horváth D, Keller I, Tamás I, Uray K, Fülöp P, **Lontay B.** *Smoothelin-Like Protein 1 Regulates Development and Metabolic Transformation of Skeletal Muscle in Hyperthyroidism.* Front Endocrinol (Lausanne). 2021 Oct 5;12:751488. doi: 10.3389/fendo.2021.751488. (D1 IF=6,055)
5. Major E, Keller I, Horváth D, Tamás I, Erdődi F, **Lontay B.** *Smoothelin-Like Protein 1 Regulates the Thyroid Hormone-Induced Homeostasis and Remodeling of C2C12 Cells via the Modulation of Myosin Phosphatase.* Int J Mol Sci. 2021 Sep 24;22(19):10293. doi: 10.3390/ijms221910293. (D1 IF=6,208)
6. Horváth D, Sipos A, Major E, Kónya Z, Bátor R, Dedinszki D, Szöllosi A, TamásI, Iván J, Kiss A, Erdodi F, **Lontay B.** *Myosin phosphatase accelerates cutaneous wound healing by regulating migration and differentiation of epidermal keratinocytes via Akt signaling pathway in human and murine skin.* Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis. 2018 Oct;1864(10):3268-3280. doi: 10.1016/j.bbadis.2018.07.013. (Q1 IF=4,328)
7. Kiss A, Erdődi F, **Lontay B.** *Myosin phosphatase: Unexpected functions of a long-known enzyme.* Biochim Biophys Acta Mol Cell Res. 2019 Jan;1866(1):2-15. doi: 10.1016/j.bbamcr.2018.07.023. Epub 2018 Aug 2. doi: 10.1016/j.bbamcr.2018.07.023 (D1 IF=4,,05)
8. Sipos A, Iván J, Bécsi B, Darula Z, Tamás I, Horváth D, Medzihradsky KF, Erdődi F, **Lontay B.** *Myosin phosphatase and RhoA-activated kinase modulate arginine methylation by the regulation of protein arginine methyltransferase 5 in hepatocellular carcinoma cells.* Sci Rep. 2017 Jan 11;7:40590. doi: 10.1038/srep40590. (D1 IF=4,122)
9. Horváth D, Tamás I, Sipos A, Darula Z, Bécsi B, Nagy D, Iván J, Erdődi F, **Lontay B** *Myosin Phosphatase and RhoA-activated Kinase Modulate Neurotransmitter Release by Regulating SNAP-25 of SNARE Complex* PLoS One. 2017 May 9;12(5):e0177046. doi: 10.1371/journal.pone.0177046. eCollection 2017. (D1 IF=2,766)

10. **Lontay B**, Bodoor K, Sipos A, Weitzel DH, Loisel D, Safi R, Zheng D, Deventer J, Hickner RC, McDonnell DP, Ribar T, Haystead TA. *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. 2015 Jul 17;290(29):17985-98. doi: 10.1074/jbc.M115.658120. (D1 IF=4,258)
11. **Lontay B**, *Bodoor K, Safi R, Weitzel D, Loisel D, Wei Z, Lengyel Sz, McDonnell DP, Haystead TA *Smoothelin-Like 1 Protein is a Bifunctional Regulator of the Progesterone Receptor During Pregnancy* J Biol Chem. 285(38):29357-66., 2015 (D1 IF=4,773)
12. Dedinszki D, Sipos A, Kiss A, Bátori R, Kónya Z, Virág L, Erdődi F, **Lontay B** *Protein phosphatase-1 is involved in the maintenance of normal homeostasis and in UVA irradiation-induced pathological alterations in HaCaT cells and in mouse skin*. Biochim Biophys Acta. 2015 Jan;1852(1):22-33. doi: 10.1016/j.bbadis.2014.11.005. (D1 IF=5,158)
13. **Lontay B**, Pál B, Serfőző Z, Kőszeghy A, Szűcs G, Rusznák Z, Erdődi F. *Protein phosphatase-1M and Rho-kinase affect exocytosis from cortical synaptosomes and influence neurotransmission at a glutamatergic giant synapse of the rat auditory system*. J Neurochem. 2012 Jul 20. doi: 10.1111/j.1471-4159.2012.07882.x. (Q1 IF=3,973)

* Megosztott első szerzős közlemény

A disszertációban felhasznált saját közlemények összesített impakt faktora: 59,491.