

MTA doktori értekezés

**A miozin foszfátáz szerepe és szabályozása fiziológias és
patológias sejtfolyamatokban**



Dr. Lontay Beáta

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

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK.....	2
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
1. BEVEZETÉS.....	8
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	9
2.1. Poszttranszlációs módosítások funkcionális diverzitása	9
2.2. A fehérjék reverzibilis foszforilációja.....	10
2.3. A protein foszfatázok osztályozása	11
2.4. A protein foszfatáz 1 holoenzimek szerkezete	13
2.4.1. A protein foszfatáz 1 katalitikus alegysége	13
2.4.2. A protein foszfatáz 1 szabályozó alegységei.....	15
2.5. A miozin foszfatáz	16
2.5.1. A miozin foszfatáz szerkezete	16
2.5.2. A miozin foszfatáz szubsztrátjai és élettani szerepe.....	18
2.5.3. A miozin foszfatáz szabályozása	20
2.6. A smoothelin fehérjék és az SMTNL1	23
3. CÉLKITŰZÉSEK.....	27
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	28
4.1. Anyagok	28
4.2. Sejtvonalak	28
4.2.1. A kísérletben használt sejtvonalak.....	28
4.2.2. Sejtkultúra modellek	28
4.2.3. Sejttenyésztés és a sejtek lizálása	29
4.3. Egér törzsek fenntartása és élettani vizsgálata	29
4.3.1. Az egérkolóniák fenntartása	29
4.3.2. A reprodukív fitnessz vizsgálata.....	30
4.3.3. Átfogó Laboratóriumi Állatfigyelő Rendszer (Comprehensive Laboratory Animal Monitoring System (CLAMS)	30
4.3.4. Sebgyógyulás tanulmányozása egérbőrön	30
4.4 Szövetminták kinyerése és feldolgozása.....	31
4.4.1. Humán minták.....	31

4.4.2. Humán szöveti minták lízise.....	31
4.4.3. Agyszeletek preparálása, kezelése és szinaptoszóma preparálás	31
4.4. Biokémiai mérések	32
4.4.1. Protein foszfatáz aktivitásmérés.....	32
4.4.2. In vitro protein kináz esszé	32
4.4.3. Proteome Profiler humán foszfo-kináz és foszfo-MAPK array.....	32
4.4.4. Protein foszforilációs és defoszforilációs vizsgálat	33
4.4.5. Kaszpáz esszé	33
4.4.6. In vitro protein arginin metiltranszferáz kísérlet	33
4.5. Fehérje vizsgáló módszerek	34
4.5.1. Western blot analízis.....	34
4.5.2. Fehérje kölcsönhatások kimutatása immunprecipitációval.....	34
4.5.3. Fehérje kölcsönhatások kimutatása pull-down kísérlettel	34
4.5.4. Felületi plazmon rezonancia (SPR) vizsgálatok	35
4.5.5. Immunfluoreszcenciás vizsgálatok.....	35
4.5.6. Trikróm festés és immunhisztokémia	35
4.5.7. Duolink PLA fehérje-fehérje kölcsönhatási vizsgálat	36
4.5.8. Szöveti array elemzése.....	36
4.6. Nukleinsav alapú technikák	36
4.6.1. Myoblast sejtek transziens transzfekciója.....	36
4.6.2. Géncsendesítés siRNS segítségével keratinocita sejtekben és ex vivo humán bőrszövetben..	37
4.6.3. RNS izolálás és szemi-kvantitatív RT-PCR.....	37
4.6.4. Microarray analízis.....	38
4.6.5. Irányított mutagenézis.....	38
4.6.6. Rekombináns fehérjék termeltetése és tisztítása.....	38
4.6.7. Emlős két hibrid vizsgálatok.....	38
4.7. Sejtbiológiai kísérletek	39
4.7.1. Sejtéletképességi vizsgálat MTT festékkel	39
4.7.2. Sejtéletképességi vizsgálat SRB festékkel	39
4.7.3. Karcólási (scratch) vizsgálat	40
4.7.4. Valós idejű sejtvizsgálat JuLI™ készülékkel.....	40
4.7.5. Elektromos cellaszubsztrát impedancia érzékelés (ECIS)	40
4.7.6. Exocitózis esszé	40

4.7.7. Sejtanyagcsere vizsgálat SeaHorse készülékkel	41
4.7.8. Glükóz felvétel vizsgálata	42
4.7.9. Intraperitoneális glükóztolerancia teszt	42
4.7.10. Kolonizációs vizsgálat	42
4.8. Bioinformatikai analízis	42
4.8.1. Proteomikai elemzés	42
4.8.2. Statisztikai analízis	43
5. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉSÜK.....	44
5.1. A miozin foszfataáz szerepe a neurotranszmitter-kibocsátás szabályozásban.....	44
5.2. A miozin foszfataáz szerepe a génexpresszió szabályozásban	50
5.3. A protein foszfataázok szerepe a bőrszövet homeosztázisának fenntartásában és a patofiziológiai folyamatok molekuláris	61
5.4. Az SMTNL1 kettős hatásmechanizmusa: citoskeletális regulátor és transzkripciós kofaktor	69
5.4.1. A vázizom felépítése és plaszticitása	69
5.4.2. Az SMTNL1 a progeszteron receptor koregulátora szteroidhormon függő szövetekben	72
5.4.3. Az SMTNL1 a terhesség során izotípusváltozást indukál a vázizomzatban.....	74
5.5. Az SMTNL1 inzulinérzékenyítő hatása	79
5.5.1. Az inzulin jelátviteli pálya és az inzulin rezisztencia.....	79
5.5.2. Az SMTNL1 szerepe a vázizom inzulinérzékenyítésében	82
5.5.3. Az SMTNL1 szerepe a reprodukív tulajdonságok kialakításában.....	88
5.6. Az SMTNL1 szerepe a pajzsmirigyhormon által indukált fiziológiás és pathológiás folyamatokban izomban	92
5.6.1. A SMTNL1 fehérje szerepe a hyperthyreosisos vázizom anyagcseréjének szabályozásában...	92
5.6.2. A SMTNL1 és a T3 szelektíven szabályozzák a MYPT1 és MYPT2 izoformákat a miotubulusokban	97
6. KITEKINTÉS	103
7. AZ ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA.....	105
8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	107
9. A TÉZISEK ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK	109
10. FÜGGELÉK.....	111
11. IRODALOMJEGYZÉK.....	115

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

2-DG	2-deoxi-D-glükóz
8BrcAMP	8-bromoadenozin-3'-5'-ciklikus monofoszfát
AP	alkalikus foszfatáz
ATP	adenozin-5'-trifoszfát
ATP- γ S	adenozin-5'-O-(γ -tio)-trifoszfát
BCA	bikinkoniniksav
BCIP	5-bromo-4-kloro-3-indoil-foszfát
BSA	borjú szérum albumin
CaM	Ca ²⁺ -kalmodulin
CaMK-II	kalmodulin-függő kináz-II
cAMP	ciklikus adenozin-3',5'-monofoszfát
cGMP	ciklikus guanozin-3',5'-monofoszfát
CK-2	kazein kináz-2
CPI-17	17 kDa PKC által aktivált inhibitor
DARPP-32	32 kDa dopamin és cAMP által szabályzott foszoprotein
D-MEM	Dulbecco minimális esszenciális tápfolyadék
ECAR	extracelluláris savasodási ráta
ERK1/2	extracelluláris szignál által regulált kináz 1/2
ECL	nagy érzékenyséű kemilumineszcencián alapuló reagens
EDTA	etiléndiamin-tetraacetát
EGTA	etilénglikol-bisz-(2-aminometiléter)-tetraacetát
ERM	ezrin radixin moezin
FBS	marhaszérum
FITC	fluoreszcein-izotiocianát
FT-SMTNL1	Flag jelölőt tartalmazó rekombináns SMTNL1
G _L	a PP1c glikogénhez is kötődő regulátor alegysége májban
G _M	a PP1c glikogénhez is kötődő regulátor alegysége vázizomban
GLUT4	glükóz transzporter 4

GST-MYPT	glutation-S-traszferezáz-MYPT fúziós fehérje
GTP- γ S	guanozin-5'-O-(γ -tio) trifoszfát
HCS	high content screening
HK II	hexokináz II
HepG2	humán hepatokarcinóma
HGF	hepatocita növekedési faktor
HRP	torma peroxidáz
I-1	inhibitor-1
I-2	inhibitor-2
ILK	integrinekhez kapcsolódó kináz
InR	inzulinrezisztencia
IR	inzulin receptor
IRS1	inzulin receptor szubsztrát 1
IP	immunoprecipitáció
KEPI	kináz által aktivált PP1 inhibitor
M20	a miozin foszfatáz 20 kDa regulátor alegysége
MEM	minimális esszenciális tápfolyadék
MLC20	a miozin 20 kDa könnyűlánc
MLCK	miozin könnyűlánc kináz
MP	miozin foszfatáz
MYPT	miozin foszfatáz regulátor alegység
OCR	oxigénfogyasztási ráta
PAS	protein A sepharose
NBT	nitroblue-tetrazolium klorid
NIPP-1	nukleáris protein foszfatáz inhibitor-1
NKA	Na ⁺ /K ⁺ ATPáz
OA	okadainsav
PAGE	poliakrilamid-gélelektroforézis
PAK	p21-aktivált protein kináz
PBS	foszfáttal pufferelt sóoldat

PBST	Tween 20-at tartalmazó foszfáttal pufferelt sóoldat
PI3K	foszfatidilinozitol-3-kináz
PFA	paraformaldehid
PGF2 α	prostaglandin F2 α
PHI-1	foszfatáz holoenzim inhibitor-1
PJ	propídium-jodid
PKA	cAMP-függő protein kináz
PKC	protein kináz C
PKGI α	cGMP-függő protein kináz I α
PLK1	poló-szerű kináz 1
PP1	protein foszfatáz 1
PP1c	protein foszfatáz 1 katalitikus alegység
PP2A	protein foszfatáz 2A
PP2B	protein foszfatáz 2B
PP2C	protein foszfatáz 2C
PPM	fémion-függő foszfatázok
PR	progeszteron receptor
PTM	poszttranszlációs módosítás
Rb	retinoblasztóma fehérje
RIPA	radioimmunprecipitációs esszé puffer
RhoA	Ras fehérjével homológiát mutató onkoprotein
ROK	RhoA-aktivált protein kináz
SAPK/JNK	stressz-aktivált protein kináz/Jun amino terminális kináz
SDS	nátrium-dodecilszulfát
SMTNL1	smoothelin-szerű fehérje 1
T3	trijód tironin
TBS	Tris pufferelt sóoldat
TBST	Tween 20-at tartalmazó Tris pufferelt sóoldat
ZIPK	leucin cipzár motívummal kölcsönható protein kináz

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 vizsgálom biokémiai, molekuláris biológiai és proteomikai módszerekkel. Ismeretes, hogy 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 munkánk során elsősorban a miozin foszfatáz (MP) holoenzim szerepét vizsgáltuk, illetve annak egyik szabályozó fehérjét, 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.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Poszttranszlációs módosítások funkcionális diverzitása

Az elmúlt néhány évtized kutatásai alapján világossá vált, hogy az emberi proteom komplexitása túlmutat a human genomén. Míg a becslések szerint az emberi genom 20 000-25 000 fehérjét kódoló gént tartalmaz, addig az emberi proteomban található fehérjék száma a poszttranszlációs módosítások figyelembevételével ennek akár hússzorosa is lehet [8]. A genomi rekombináció, az alternatív promótereken történő transzkripció, a transzkripció eltérő terminációja és a transzkriptum alternatív szerkesztésén kívül a komplexitást a genom szintjétől a proteom szintjéig a fehérjék poszttranszlációs módosításai (PTM) még tovább növelik [9]. A PTM-ek olyan kémiai módosítások, amelyek kulcsszerepet játszanak a funkcionális proteomikában, mivel szabályozzák az aktivitást, a lokalizációt és a kölcsönhatást más biomolekulákkal, például fehérjékkel, nukleinsavakkal, lipidekkel és kofaktorokkal.

Az emberi proteom dinamikus, számos ingerre reagálva folyamatosan változik. Az eukarióta élőlények a poszttranszlációs módosításokat nagyon gyakran alkalmazzák a sejtaktivitás szabályozására. A PTM-ek különböző aminosav-oldalláncokon vagy a peptidkötéseken következnek be, és leggyakrabban enzimatis reakciók közvetíti őket. Becslések szerint a proteom 5%-a olyan enzimeket tartalmaz, amelyek több mint 200 féle poszttranszlációs módosítást végeznek [10]. Sok fehérje képes önmagát is módosítani autokatalitikus domének, például autokináz és autoprotolitikus domének segítségével [11].

A fehérje PTM-ek a módosítás jellegétől függően megfordíthatók is lehetnek, így például a protein kinázok a fehérjéket specifikus aminosav-oldalláncokon foszforilálják, ami a katalitikus aktiválás vagy inaktiválás gyakori fiziológiai mechanizmusa. Ezzel szemben a protein foszfatázok hidrolizálják a foszfátcsoportot, és visszafordítják a biológiai változást [12]. Ezzel ellentétben például a peptidkötések proteolitikus hasítása termodinamikailag kedvező, irreverzibilis reakció [13]. Következésképpen a fehérjék poszttranszlációs módosulásainak elemzése különösen fontos a fiziológiai folyamatok és a kóros elváltozások mint a szívbetegségek [14], a rák [15], a neurodegeneratív betegségek [16] és a cukorbetegség [17] megértése szempontjából. Bár a PTM-ek jellemzése nagy kihívást jelent, elvitathatatlanul fontos betekintést nyújt az etiológiai folyamatok hátterében álló sejtfunkciókba.

2.2. A fehérjék reverzibilis foszforilációja

Az eukarióta szervezetek legelterjedtebb szabályozási mechanizmusa a fehérjék foszforilációja és defoszforilációja. A foszforilációt a protein kinázok katalizálják, úgy hogy a nukleozid-trifoszfátok (leggyakrabban ATP) terminális foszfátcsoportját kovalens kötással hozzákapsolják a fehérjék szerin (Ser), treonin (Thr) vagy tirozin (Tyr) oldallánhoz. A foszforiláció megfordíthatóságát a protein foszfatázok (PP) biztosítják a fehérjékben észterkötéssel kapcsolódó foszfátcsoportok hidrolízisével. A fehérjékhez kötött foszfátcsoport negatív töltése különféle szerkezeti változásokat indukálhat, amelyek befolyásolhatják a fehérje-fehérje vagy a fehérje-ligandum kölcsönhatások erősségét, a fehérje vízdékonyságát és membrán-permeabilitását, illetve a fehérje stabilitását és biológiai aktiválását. Egy adott célfehérje foszforiláltságát a kinázok és a foszfatázok együttesen határozzák meg és ily módon közösen szabályozzák egyes jelátviteli útvonalak aktiválódását vagy deaktiválódását.

A protein kinázok szabályozó szerepének első leírása Edmond Fisher és Edward Krebs nevéhez köthető, akik 1955-ben felfedezték, hogy a glikogén lebontása során az inaktív foszforiláz *b* enzimet aktív *a* formába konvertáló enzim nem más, mint a foszforiláz kináz. Később az 1960-70-es években azonosították a cAMP és Ca^{2+} másodlagos hírvivőket, amelyek hatását a protein kinázok aktivitásának változásával hozták összefüggésbe. A glikogén szintézis és lebontás, a lipid- és piruvát anyagcsere, valamint koleszterin bioszintézis szabályozásáért egyértelműen a fehérjék foszforilációs változásait tették felelőssé [18]. Azonban egészen az 1970 évek végéig a folyamatok reverzibilitásáért felelős protein foszfatázokat csak „háztartási” segédenzimeknek tekintették. Az áttörés az 1980-as évek elején történt, amikor a 35 kDa méretű protein foszfatáz katalitikus alegységek tisztításával lehetővé vált a foszfatázok biokémiai és molekuláris szintű jellemzése. Ezzel megkezdődött a foszfatáz-kutatás „aranykora”, amikor is számos humán, gomba és növényi foszfatáz enzimet írtak le [12; 19; 20].

Az eukarióta sejtekben fellelhető, kovalensen fehérjékhez kapcsolódó foszfátcsoportok több mint 99%-a szerin (Ser) vagy treonin (Thr) aminosav oldalláncon található [21]. Ez a mennyiségi túlsúly azonban nem jelenti azt, hogy a Tyr oldallánc foszforilációja nem jelentős, ugyanis a Tyr kinázok alapvető szerepet játszanak a jelátvitel elindításában [22]. Míg az emberi szervezetben található hozzávetőlegesen 450 protein kináz katalitikus alegység egyetlen közös ősrre vezethető vissza, a protein foszfatázok nagyon sokfélék, minden bizonnyal konvergens evolúció révén alakultak ki. A humán protein foszfatáz katalitikus alegységet kb. 150 gén kódolja;

ezek között mintegy 40 Ser/Thr specifikus protein foszfatáz található [23]. A protein foszfatáz katalitikus alegységek viszonylag kis számát a katalitikus alegyékkel holoenzimet alkotó szabályozó alegységek kompenzálják. Az foszfatázok kombinatórikus természete nagyszámú holoenzim kialakulását eredményezi [24]. A szabályozó alegységek a holoenzim szubsztrát-specifitását, valamint katalitikus aktivitását határozzák meg, és a katalitikus alegységhez kötődve holoenzimeket különböző szubcelluláris kompartmentekhez irányítják.

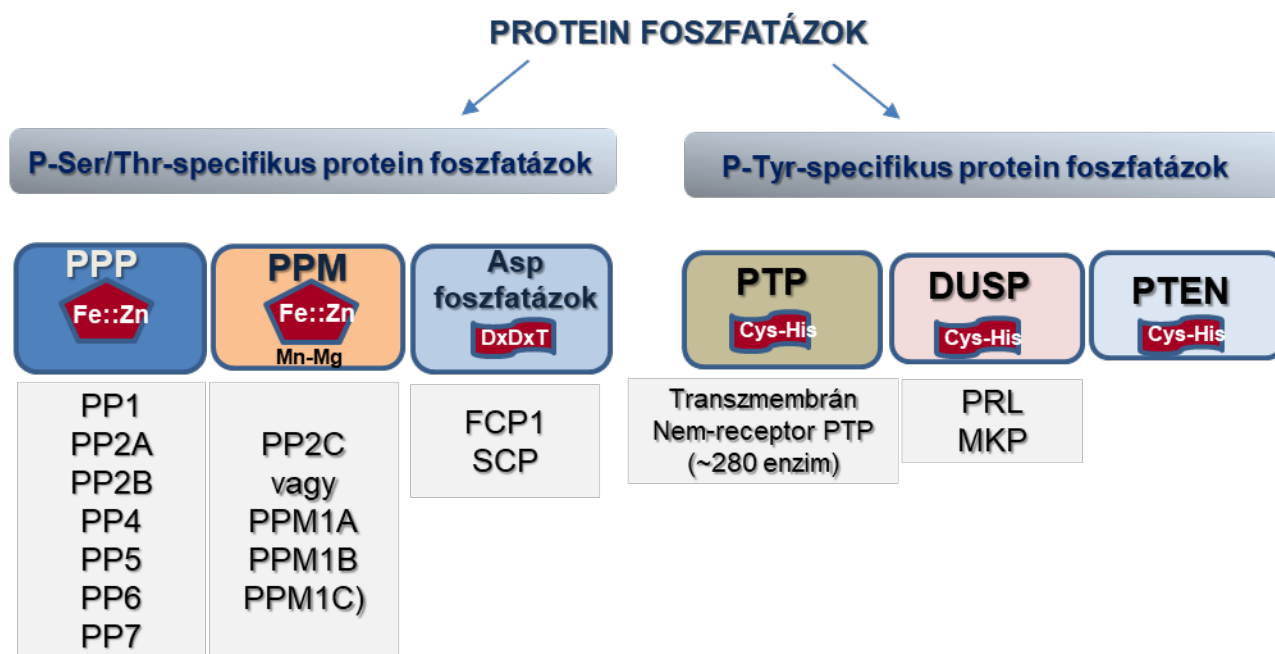
2.3. A protein foszfatázok osztályozása

A hőkorszakban, a 1980-as évek elején az eukarióta Ser/Thr protein foszfatázokat a tisztított katalitikus alegységek enzimológiai sajátosságai alapján két csoportba, 1-es és 2-es típusba osztották. Ezek szerint az 1-típusba tartozó PP1 foszfatáz a foszforiláz kináz β alegységét defoszforilálja, míg a 2-es típusú protein foszfatázok (PP2A, PP2B, PP2C) elsősorban az α alegységet preferálják [20]. További osztályozását tett lehetővé a kis molekulatömegű hőstabil inhibitorok iránti érzékenységük: míg az inhibitor-1 (I-1) és inhibitor-2 (I-2) fehérjék, valamint a heparin gátolják a PP1 enzimcsalád tagjait, addig ezek az anyagok a 2-es típusú protein foszfatázokra nem fejtenek ki jelentős gátló hatást [25; 26]. Fémion igényük szerint a 2-es típusú foszfatázokat további három alcsoportba sorolták: míg a PP2A aktivitásához nem igényel fémiont, addig a PP2B – vagy más néven a kalcineurin (CN) – Ca^{2+} /kalmodulin-függő enzim, míg a PP2C aktivitásához Mg^{2+} -ion szükséges [20; 27]. A 2-es típusú foszfatázok az okadánsavval szemben mutatott érzékenységük alapján is elkülöníthetők: ez a toxin a PP2A enzimcsalád tagjait nanomoláris koncentrációban gátolja, míg szinte hatástalan a PP2B enzimcsalád tagjainak aktivitására [28; 29]. Ez a kezdetleges osztályozás még nem vehette figyelembe a katalitikus alegységek szerkezetét és evolúcióját. A katalitikus alegységek klónozása és aminosav sorrendjük meghatározása után kiderült, hogy a PP2A és a PP2B filogenetikailag sokkal közelebb állnak a PP1-hez, mint a PP2C enzimekhez [25] (*1. ábra*).

Továbbá a fentiekben leírt szempontrendszerek szerint nem besorolható tulajdonságú újabb Ser/Thr specifikus protein foszfatáz enzimek felfedezése is szükségessé tette az eredeti osztályozás felülvizsgálatát [12]. Az első ilyen „új típusú” protein foszfatáz a PPX volt, amely a nevezéktanba PP4 néven került be. A PPX 45%-ban hasonló a PP1-hez és 65%-ban a PP2A-hoz, tehát filogenetikailag az utóbbihoz áll közelebb [30]. A későbbiekben a PP5 [31], a PP6 [25] és a PP7 [32] enzimcsaládokat is azonosították és jellemezték [12]. A Ser/Thr specifikus protein

foszfatázokat tehát filogenetikai szempontból két nagy csoportba sorolhatjuk, melyek két különböző géncsalád tagjai [33].

Az újabb Ser/Thr specifikus enzimek, illetve a Tyr-specifikus foszfatázok felfedezése után azt mondhatjuk, hogy a protein foszfatázok 6 fő családra bonthatók [18] (1. ábra).



1. ábra. A protein foszfatázok csoportosítása.

A foszfoprotein foszfatázok (PPP) családjának tagjai aktív centrumukban Fe^{2+} - Zn^{+} ionokat tartalmaznak, akárcsak a fémion-függő foszfatázok (PPM) családtagjai. Az utóbbiak azonban ezen kívül Mn^{2+} vagy Mg^{2+} fémionokkal igényelnek az aktivitásukhoz. Az aszpartát foszfatázok aktív centrumában egy DxDxT motívum található [34]. A PPP családba sorolják a protein foszfatáz 1 (PP1), protein foszfatáz 2A (PP2A), calcineurin (CN vagy PP2B), PP4, PP5, PP6 és PP7 enzimeket, valamint a molekuláris biológiai módszerekkel felismert „új típusú” foszfatázok különleges képviselőit [34] [35]. Ezek közül kiemelkedően fontosak a PP1 és PP2A enzimek, amelyek a sejtekben viszonylag nagy koncentrációban fordulnak elő és számos esszenciális biológiai folyamatot szabályoznak. A Tyr-specifikus foszfatázok (PTP) családjának tagjai aktív centrumukban Cys aminosavat tartalmaznak. A Tyr-specifikus foszfatázok közé tartoznak a protein tirozin foszfatázok (PTP), a Ser, Thr és Tyr oldalláncokat is defoszforiláló úgynevezett kettős specificitású foszfatázok (Dual Specificity Protein Phosphatase, DUSP), illetve a protein

foszfatázokkal távoli filogenetikai rokonságban álló lipid foszfatázok (mint a PIP foszfatázok és Phosphatase and Tensin homolog; PTEN) [36].

A PPM foszfatázokat ma PPM1 névvel jelöljük, és izoformáit nagybetűvel különböztetjük meg (A, B, C, D stb.). Az emlősökben a PPM-foszfatázoknak 20 izoformája van, pl. PPM1A, PPM1B stb. A toxinok, (például OA, MC és CLA) gátlásával szembeni teljes rezisztencia és a PPM1A kristályszerkezete megerősítette, hogy ezek a foszfatázok a PPP családtól eltérő, külön fehérje szupercsaládot alkotnak [37]. A PPM-család tagjai konzervált katalitikus régióval rendelkeznek, amely a PPP enzimekhez hasonló felépítésű [38]. A különböző izoformák specifikus régiói részt vehetnek a szubsztrát felismerésben és/vagy a foszfatázok funkcionális szabályozásában. Számos kis molekulatömegű inhibitorukat jellemezték már, de izoforma szelektivitást mutató inhibitort eddig nem találtak. Ezek az inhibitorok az általuk okozott káros mellékhatások miatt nem kerültek terápiás használatba. Legismertebb közülük a Sanguinarine (SNG), ami a PPM1A és PPM1B potenciális gátlószere [39].

2.4. A protein foszfatáz 1 holoenzimek szerkezete

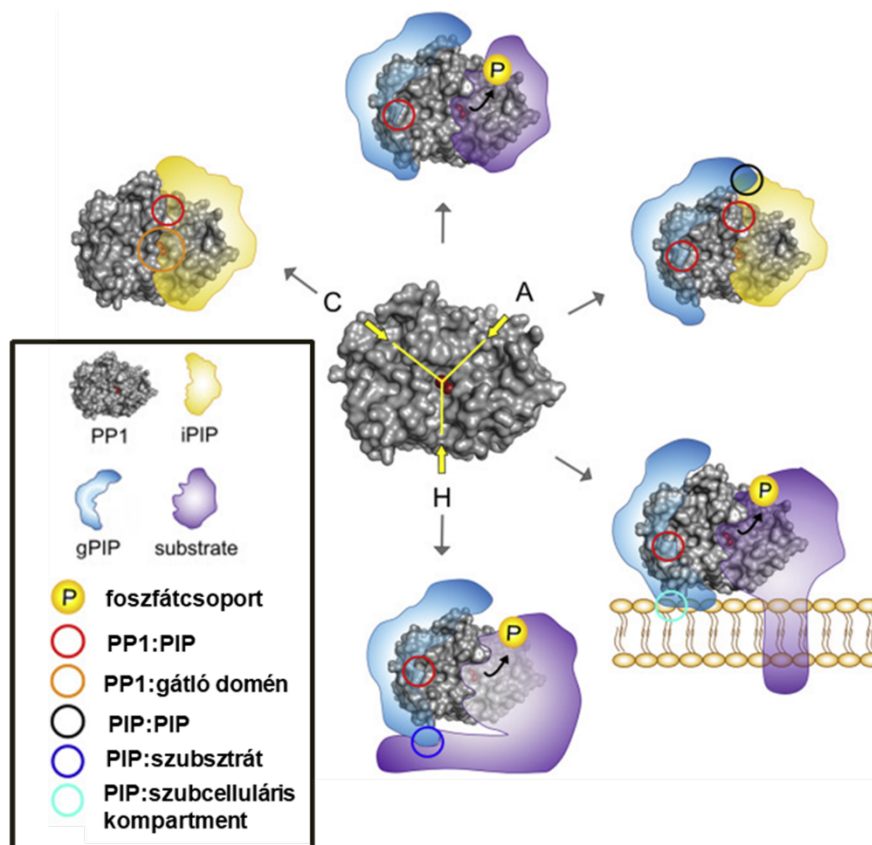
2.4.1. A protein foszfatáz 1 katalitikus alegysége

A protein foszfatáz 1 (PP1) holoenzimek katalitikus alegységből (PP1c) és egy vagy több szabályozó alegységből állnak. A PP1c (35-38 kDa) az egyik legkonzerváltabb eukarióta fehérje. A PP1 a foszfohidrolázok olyan nagy szupercsaládjának a tagja, amely mindhárom nagy filogenetikai csoportban (eubaktériumok, archeák és eukarióták) jelen van [40]. Az emlősökben három PP1 katalitikus alegységet kódoló gén van: PP1 α , PP1 γ és PP1 β/δ [41]. A PP1 γ izoformának két alternatív splicing-gal képződő variánsa ismeretes: a PP1 γ_1 és a PP1 γ_2 [19; 42; 43]. A PP1 α -nak szintén két splice variánsa van, a PP1 α_1 és PP1 α_2 [44]. A variánsok létezését a humán transzkriptom szekvencia elemzése is alátámasztotta (Ensembl, ENSP0000176139). A PP1 γ_2 csak a tesztiszben és agyban expresszálódik, a többi izoforma minden szövetekben általánosan előfordul, de eltérő sejten belüli lokalizációt mutat [45].

A PP1c szerkezetét a foszfát analóg wolframáttal [46], a mikrocisztin inhibitorral [47], a glikogén-kötő alegység rövid peptidszakaszával [48] és a MYPT szabályozó alegység N-terminális peptidjével [7] együtt kristályosítva Rtg diffrakcióval határozták meg. A fehérje N- és C-terminális szubdoménokra tagolható. Az N-szubdomén kompakt szerkezetű, Y-alakú katalitikus

árka magába foglalja az aktív centrumot annak két esszenciális fémionjával együtt. A katalitikus árok három ága, a C-terminális, a hidrofób-, illetve a savas-árok közül az utóbbi kettőnek van jelentősége a szubsztrátok kötésében. A PP1c izoformák aminosav szekvenciájának hasonlósága közel 90 %-os. A PP1 holoenzimek változatos szubsztrátspecifitása arra utal, hogy elsősorban a szabályozó alegységek azok, amelyek meghatározzák a PP1 funkcióinak tág spektrumát (2. ábra).

A PP1c katalitikus aktivitását a hozzá kötődő inhibitor fehérjék mellett mikroorganizmusok és rovarok által termelt sejtmembrán-permeabilis toxinok is gátolhatják. Ilyen például a mikrocisztin LR, egy ciklikus hexapeptid, ami részben a két fémion által kötött vízmolekulával lép kapcsolatba, valamint a hidrofób árokban kötődve lefedi a katalitikus centrumot is, és így gátolja a foszfoszubsztrát kötődését és hidrolízisét [49]. A mikrocisztin okozta gátlás irreverzibilis, ugyanis a mikrocisztin kovalens kapcsolatot is létesít a katalitikus alegységgel, bár ez a kötés a gátlásnak nem előfeltétele. A poliéter okadánsav (OA) a hidrofób árokhoz kötődik, és hidrogén-kötést alakít ki a Tyr-272-vel, amely a katalitikus centrum része [50]. A PPP foszfatázokat gátló toxinok között említhetők még a tautomycin (TM) [51], tautomicetin (TMC) [52], fostreicin, kalikulin A (CLA) [53] és egyéb lipidoldékony inhibitor molekulák, így a ciklosporin A (CsA) vagy FK506) [54], amelyek szintén a sejtmembránon átdiffundálva különböző specificitással gátolják az endogén defoszforilációs folyamatokat [55]. Az OA csak nagy koncentrációban gátolja a CN-t, viszont hatékony, de eltérő gátló hatást fejt ki a PP2A-ra ($IC_{50} \sim 0,2-0,3$ nM) és a PP1-re ($IC_{50} \sim 10-100$ nM) *in vitro*. A CN specifikus gátlószerei a CsA és az FK506. A foszfatázgátló toxinok bizonyos koncentráció tartományban sejtkultúrákban is alkalmasak lehetnek specifikus gátlás létrehozására. Így pl. a sejtek 50 nM CLA vagy 1 μ M TM kezelése a PP2A vagy a PP1 specifikus gátlását okozza, tehát ezzel a két foszfatáz által befolyásolt defoszforilációs folyamatok intracelluláris szinten is elkülöníthetők [56].



2. ábra A PP1 holoenzimek szerkezete. A PP1 katalitikus doménjének felületi ábrázolása (középen). A PP1 aktív centruma két fémiont (piros gömbök) tartalmaz, amely három szubsztrátkötő árok Y alakú metszéspontjában helyezkedik el: a savas árok (A), a C-terminális árok (C) és a hidrofób árok (H). Az r PP1-inhibitor fehérjék (PIP) (iPIP) sárgával, a célra irányító PIP fehérjék (gPIP) kékkel, a szubsztrátok pedig lilával vannak ábrázolva. A terápiás célok szempontjából fontos kölcsönhatási helyeket színes körök ábrázolják. A hajlított fekete nyilak a szubsztrát defoszforilációját jelzik. A PP1 felszíni struktúrája PyMOL (www.pymol.com) segítségével készült. A PIP-ek és a szubsztrátok sematikusan helyezkednek el a PP1-en. PP1, protein-foszfátáz 1; PIP, PP1-el interakcióban lévő fehérje. Módosított Ferreira és mtsai [3]

2.4.2. A protein foszfátáz 1 szabályozó alegységei

A PP1c túltermeltetése citotoxikus hatású ezért a szabad katalitikus alegység a sejtben legfeljebb rövid ideig átmenetileg létezhet, sokkal inkább különböző szabályozó alegységekhez kapcsolódva holoenzim formában fordul elő. Eddig közel 200 szabályozó alegységet írtak le, de a humán genom szekvencia elemzése alapján még számos további potenciális PP1-kötő fehérje prediktálható [40].

A protein kinázokkal összehaonlítva a Ser/Thr protein foszfátázok katalitikus doménjei viszonylag alacsony specifitásúak, így a protein kinázokkal ellentétben csak kismértékben képesek arra, hogy konzenzus aminosavszekvenciák alapján kössék meg a szubsztrátokat. A PP1c katalitikus alegység működését a szabályozó alegységek célfehérjékkel való kölcsönhatása

szabályozza [24]. Ezek a szabályozó alegységek az PP1c-vel kialakított kölcsönhatásuk révén képesek a holoenzimet a sejt különböző régióiba lokalizálni és módosítani annak szubsztrátspecifitását [57]. Továbbá a PP1-specifikus gátló fehérjék, mint például az Inhibitor-2 (I-2), kinase-enhanced protein phosphatase type 1 inhibitor (KEPI) [58] és a dopamine- and cAMP-regulated neuronal phosphoprotein (DARPP-32), blokkolják a PP1 aktív centrumát [59; 60]. A legtöbb PP1 szabályozó fehérje és néhány PP1 szubsztrát egy elsődleges PP1-kötő motívumon, az RVxF motívumon keresztül lép kölcsönhatásba a PP1c-vel, amely általában megfelel a [K/R][K/R][V/I][x][F/W] konszenzus szekvenciának, ahol az x a Phe, Ile, Met, Tyr, Asp vagy Pro kivételével bármely más aminosavmaradék lehet [61; 62]. Bár az RVxF kölcsönhatás szükséges a szabályozó fehérje kötődéséhez, közvetlenül nem befolyásolja a PP1c enzimatis aktivitását, mivel 20 Å távolságra van az aktív centrumtól. Újabban további szabályozó alegység dokkolóhelyeket is azonosítottak, mint például a SILK és MyPhoNE motívumok, amelyek szintén hozzájárulnak a PP1 aktivitásának és szubsztrátspecifitásának szabályozásához [62].

A PP1 fiziológiai szubsztrátjai a katalitikus alegységhez való kötődésük alapján két csoportba sorolhatók [24]. Egyes szubsztrátok (pl. a tumorsuppresszor BRCA1) nagy affinitású PP1-dokkolóhelyekkel rendelkeznek, és stabil heterodimer komplexeket alkotnak a foszfatázzal, akár defoszforilált állapotban is. Ezzel szemben más szubsztrátok (pl. glikogén-foszforiláz) csak gyenge kölcsönhatást alakítanak ki a katalitikus alegységgel [63]. A szubsztrátok hatékony *in vivo* defoszforilációjához olyan PP1-kölcsönható fehérjékre (PIP) van szükség, amelyek további szubsztrát-dokkolóhelyeket biztosítanak, vagy növelik a helyi szubsztrátkoncentrációt a foszfatáz adott kompartmenthez való kötésével. Ezek alapján a PP1 enzimek szubsztrátspecifitása egyértelműen a foszfatázt dokkoló motívumoktól és az ezekhez kapcsolódó célzó alegységektől függ [64].

2.5. A miozin foszfatáz

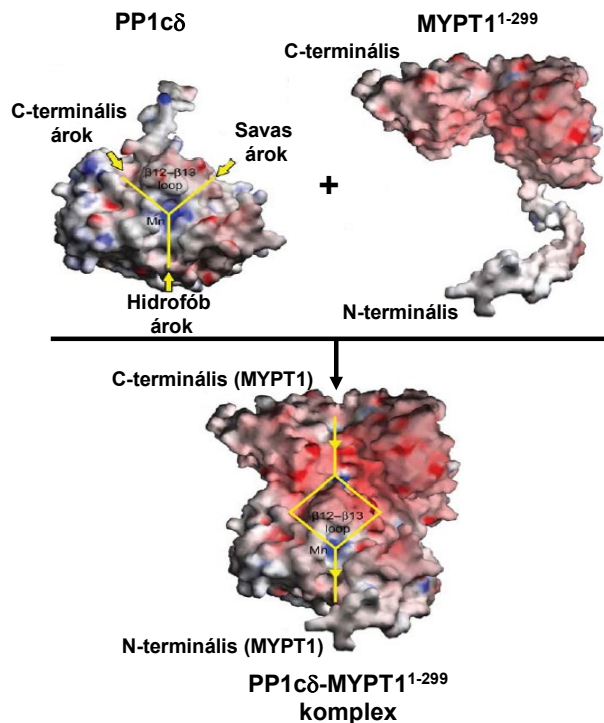
2.5.1. A miozin foszfatáz szerkezete

A miozin foszfatáz (MP) holoenzim egy foszfo-Ser/Thr-specifikus foszfatáz, amely a protein foszfatáz-1 (PP1) enzimsz család tagja. Heterotrimer szerkezetű: a defoszforilációt katalizáló PP1c β/δ katalitikus alegységből, egy 130/133 kDa molekulatömegű miozin foszfatáz célra irányító alegységből (myosin phosphatase targeting subunit, MYPT1) és egy jelenleg még

ismeretlen funkciójú 20 kDa molekulatömegű alegységből épül fel [65]. A miozin foszfatázt először Dario Alessi és munkatársai izolálták csirkeizációból, és igazolták, hogy defoszforilálja a 20 kDa miozin könnyű láncát (MLC20), ami a simaizom relaxációját segíti elő [66]. Néhány évvel később a miozin foszfatázt sikerült tisztítani emlős szövetekből; sertés húgyhólyagból [67] és patkány aortából is [68], továbbá kimutatták egy hosszabb (133 kDa) és rövidebb (110-130 kDa) MYPT1 izoforma létezését is. A miozin foszfatáz nevezéktana a szakirodalomban nem egységes, így különböző rövidítéseit ismerjük, például MP, MLCP vagy PP1M. Emellett az enzimet korábban M110-nek, myosin binding subunit-nak (MBS) és M130/M133-nak is nevezték [2]. Az értekezésben a MP-t rövidítést használom, valamint a Humán Genom Projekt nevezéktana szerint a PP1c β/δ (PPP1CB) és a MYPT1 (PPP1R12A) rövidítéseket alkalmazom a katalitikus alegység és a 130-133 kDa fő szabályozó alegység elnevezésére. Megállapítást nyert, hogy a három fő PP1c izoforma (α , β/δ , γ 1) közül az emlős sejtekben a MYPT1 kizárólag a PP1c β/δ izoformával lép kölcsönhatásba [69]. Azt is tudjuk, hogy a M20/21 alegység a MYPT1 C-terminális régiójához kötődik, és nem befolyásolja a foszfatáz aktivitását [70]. A MYPT1 regulátor alegység a MYPT fehérjecsaládba tartozik, melynek további tagjai a MYPT2, a MYPT3, a 85 kDa molekulatömegű miozin kötő alegység (MBS85), illetve a TGF β által gátolt membránasszociált fehérje (TIMAP). Közös jellemzőjük, hogy N-terminális régiójukban mindegyikük tartalmazza a PP1c-kötő RVxF motívumot, majd ezt egy ankirin-ismétlődéskezből álló régió követi. A MYPT1, MYPT2 és az MBS85 C-terminális végén egy leucin cipzárt is hordoz, ami a dimerizációban és a fehérje-fehérje kölcsönhatások kialakításában játszik szerepet [71].

Mivel a miozin foszfatáz felépítésében a MYPT1 vesz részt, ezért ennek a fehérjének a szerkezetét és funkcióját ismertetem részletesebben (3. ábra). A MYPT1 N-terminális régiójában tartalmaz egy konszenzusos RVxF PP1c-kötő motívumot (K35VKF38), amely úgy tűnik, hogy elengedhetetlen a MYPT1-PP1c kölcsönhatás kialakításában [72]. Emellett további fehérje kötő helyeket írtak le (lásd 4. ábra); ezek az N-terminális régióban a MYPT1¹⁰⁻¹⁷ miozin foszfatáz N-terminális elemnek vagy MyPhoNE-nak nevezett motívum; az ankirin ismétlődő régió 1, 5, 6 és 7 eleme [7]; valamint a 301 és 511 aminosav maradékok közötti savas régió(k) [73].

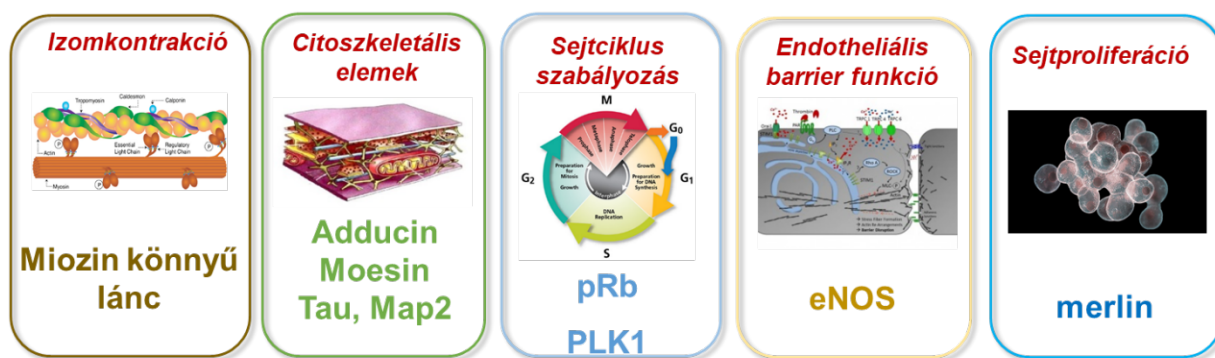
A MYPT1 regulátor alegység kötődése módosítja a PP1c δ szubsztrát-specifitását és aktivitását. A MP holoenzim mintegy 10-15-ször nagyobb aktivitással defoszforilálja a foszforilált miozint, mint a szabad katalitikus alegység (3. ábra) [74].



3. ábra. A PP1c δ –MYPT¹⁻²⁹⁹ komplex elektrosztatikus felszín megjelenítése. Módosítva [7]

2.5.2. A miozin foszfatáz szubsztrátjai és élettani szerepe

A miozin foszfatáz elsőként azonosított szubsztrátja a 20 kDa molekulatömegű miozin könnyű lánc (MLC20), amelynek foszforilációját követően a miozin II kötődik az aktinhoz, és így az aktomiozin komplex kontrakcióját indukálja. Ezt ellensúlyozza a MP által katalizált defoszforiláció, ami elernyedéshez vezet [65]. Az MLC20 foszforiláltsági szintjét a Ca²⁺/kalmodulin-függő miozin könnyű lánc kináz (MLCK) és a MP aktivitásai közötti viszony határozza meg (4. ábra). A MP további citoskeletális szubsztrátjai az ERM (ezrin, radixin, moezin), szerkezetileg rokon citoskeletális fehérjecsalád tagjai [75; 76], amelyek összekötőként működnek a transzmembrán fehérjék és a citoskeleton között, és számos sejtfunkciót töltenek be a sejtadhézióban, a migrációban vagy a proliferációban. Az inaktív ERM fehérjék zárt konformációban a citoszolban találhatóak, de konzervált treonin oldalláncukon történő foszforilációjuk (amit a Rho A-aktivált kináz (ROK) vagy PKC katalizál) indukálja a nyitott és



4. ábra. Az MP szubsztrátjai és élettani szerepük. Polo-like kinase 1 (PLK1); Retinoblasztoma fehérje (pRb), endotheliális nitrogén monoxid szintáz (eNOS)

aktív konformáció kialakulását, amely lehetővé teszi számukra, hogy kötődjenek a célmolekulákhoz [77]. A mikrotubulusokhoz kapcsolódó fehérjék, a Tau és a MAP2 szintén kölcsönhatásba lépnek a ROK-zal és a MYPT1-gyel. Kimutatták, hogy a MP defoszforilálja a ROK-foszforilált Tau fehérjét *in vitro*, ami azt sugallja, hogy az MP is szabályozhatja a mikrotubulus dinamikát [78] (5. ábra). Az is bizonyítást nyert, hogy a MP által defoszforilált szubsztrátok foszforilációjáért az esetek többségében a ROK a felelős. A miozin és ERM foszforiláció/defoszforiláció számos simaizomhoz kötött folyamatot szabályoz, így a vaszkuláris tónust, a gasztrointesztinális motilitást, hörgőasztmát és a méhösszehúzódást is. Ezáltal szerepe van a vaszkuláris simaizom hiperkontraktilitásban, ami magas vérnyomásban, koronáriás görcsben és kisagyi érgörcsben fejeződik ki [40; 79]. Az MP azonban nemcsak a simaizomokban, hanem a szervezet számos más szövetében is expresszálódik, változatos szubcelluláris lokalizációt mutat és ezzel társulva a sejtelettani folyamatok széles körét szabályozza.

A MP egyik újonnan leírt szubsztrátja az endotheliális nitrogén-monoxid-szintáz (eNOS). Az eNOS és a MYPT1 kölcsönhatásba lép az endotélsejtekben és ezáltal az eNOS a MP szubsztrátja. A MP az eNOS Thr497 oldalláncát képes defoszforilálni. A MP gátlása csökkentette mind az endotélsejtek NO-termelését, mind a transzendotheliális rezisztenciát (4. ábra) [80].

A klasszikus citoszkeletális szubsztrátok mellett számos más szubsztrátját is azonosították, így a sejtciklus és a proliferáció szabályozását meghatározó retinoblasztoma fehérje (pRb), polo-szerű kináz 1 (PLK1) és merlin fehérjéket is (4. ábra). A MYPT1 egyik figyelemreméltó sejtciklus-függő partnere a pRb tumorsuppresszor. Az alulfoszforilált pRb úgy szabályozza a sejtciklust és a proliferációt, hogy az E2F transzkripció faktort megköti, és az E2F-függő gének transzkripcióját visszaszorítja. A ciklin-függő kinázok hiperfoszforilálják az pRb-t, ami elősegíti a sejtciklus progresszióját. Ismeretes, hogy a PP1 és/vagy PP2A foszfatázok felelősek a pRb

defoszforilációjáért és reaktiválásáért [81]. Leukémiás sejtekben a MYPT1-et a foszforilált pRb-re ható PP1-et célra irányító alegységként azonosították [82]. Egy másik tanulmányban a MYPT1 overexpressziója a pRb foszforilációjának csökkenését eredményezte a Ser807/811 oldalláncokon, ami arra utal, hogy az MP más szabályozó helyen is modulálhatja a pRb aktivitását [83].

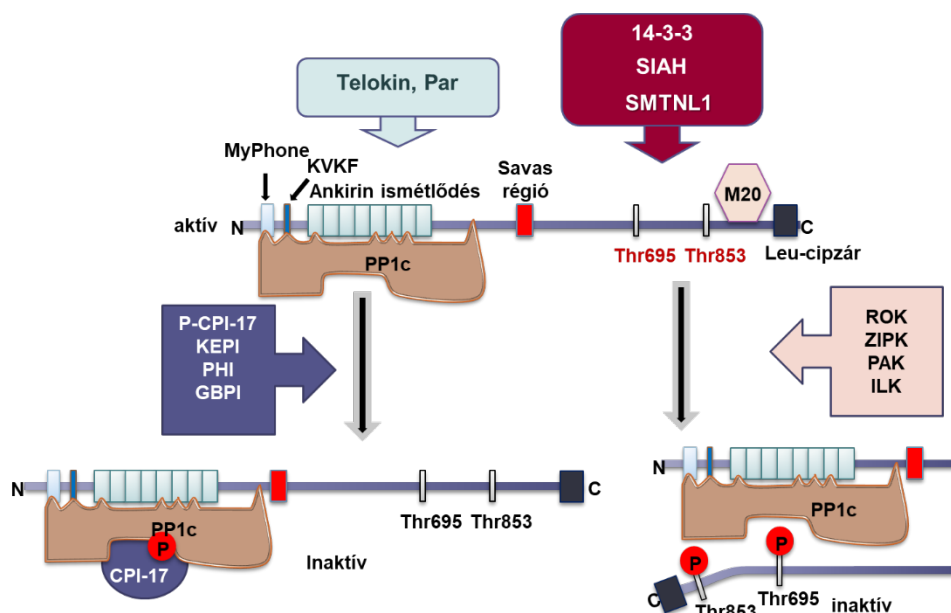
Az MP a polo-szerű kináz 1 (PLK1) defoszforilálásával a mitózis folyamatát is szabályozza. A PLK1 egy Ser/Thr kináz, amely számos mitotikus eseményt irányít, beleértve a G2/M átmenetet, a centroszómák érését, a mitotikus orsó-összeszerelést, a kromatidák szegregációját, a mitózisból történő kilépést és a citokinézist [84]. A mitózis során a foszfo-MYPT1 és a PLK1 a centromereken és a kinetokorokon lépnek egymással kölcsönhatásba [84]. Kimutatták, hogy a MYPT1 alegység a PLK1 térbeli és időbeli koordinációjával hozzájárul a mitotikus progresszió szabályozásához [85].

Az NF2 tumorsuppresszor géntermék, a merlin is a MP szubsztrátja. A merlinnek az ERM-család fehérjéihez hasonló a szerkezete, de szabályozása azokkal ellentétes: a foszforilált merlin inaktív, míg a defoszforilált forma aktív [86]. Több mechanizmuson keresztül is gátolja a sejtproliferációt, anti-mitogén jelátvitelt indít el és gátolja az onkogén génexpressziót. Az MP a merlin zárt konformációját a Ser518 oldallánc defoszforilációval aktiválja [87]. Kimutatták, hogy a MP a merlin defoszforilációját és aktiválódását közvetítő oxidatív stressz hatására aktiválódik, és ezáltal modulálja a Hippo jelátviteli útvonalat a kardiomiocitákban [88].

2.5.3. A miozin foszfatáz szabályozása

A miozin foszfatáz szabályozásának egyik lehetséges módja a MYPT1 alegységének Ser és/vagy Thr oldalláncokon történő foszforilációja. Számos foszforilációs helyet azonosítottak eddig a MYPT1 szekvenciáján belül, de a foszfatáz aktivás változást szemponjából a Thr696 és Thr853 oldalláncok foszforilációja a legjelentősebb (5. ábra).

A Thr696 és Thr853 oldalláncok RhoA aktivált protein kináz által katalizált foszforilációja a holoenzim gátlását eredményezi [89]. A ROK mellett számos más kináz gátolja a miozin foszfatázt a MYPT1 Thr696 oldalláncának foszforilációjával, így a leucin cipzár motívummal kölcsönható protein kináz (ZIPK), az integrinhez kötött kináz (ILK)[65], a miotónusos disztrófia protein kináz, a Raf-1 [90] és a p21-aktivált protein kináz enzimek [71]. A MYPT1 Thr696Ala és Thr853Ala mutánsait felhasználva azt is megállapították, hogy a Thr696 vagy Thr853



5. ábra. Az MP szerkezete és szabályozása. Az ábra felső része a MYPT1 főbb szerkezeti régióit és a PP1c-vel valamint az M20/21 alegységgel való kölcsönhatását ábrázolja. Az alsó rész az MP gátlását mutatja a MYPT1 szabályozó alegységének Thr696 és Thr853 oldalláncokon történő foszforilációjával -(jobbra). Alul a foszforilált CPI-17 okozta gátlás sémája is látható (balra). Az MP-aktivitás foszforilációtól függő szabályozásának további részleteit lásd a szövegben.[2]

foszforilációja okozza a PP1c gátlását [91]. A jelenleg elfogadott hipotézis szerint ezeknek a helyeknek a foszforilációja olyan szerkezeti elmozdulást idéz elő a MYPT1-ben, amely lehetővé teszi, hogy a MYPT1-ben található gátló foszforilációs peptid kölcsönhatásba lépjen a PP1c szubsztrátkötő árkával és katalitikus centrumával (5. ábra). Ezeket a konformációs változásokat elősegítheti a MYPT1 C-terminális régióinak feltételezett, részben rendezetlen szerkezete.

A cdc2 kináz foszforilálja a MYPT1 Thr435 és/vagy Ser432 oldalláncát, ami megnöveli a MP miozin iránti affinitását [2]. Ezzel szemben a MYPT1 Ser445, Ser472 és Ser910 oldalláncokon a foszfatáz gátlását, a miozin emelkedett foszforilációját és a sejtek tapadásának gyengülését eredményezi. A már ismertetett Thr696 és Thr853 gátló foszforilációs helyek előtt található a Ser695 és a Ser852 oldalláncok is foszforilálhatók a cAMP- és cGMP-függő protein kinázokkal (PKA és PKG). A PKA vagy PKG-függő Ser695 foszforiláció gátolja a Thr696 foszforilációját ROK, vagy más MYPT1 kináz által, megakadályozva ezzel a MP gátlását [92]. Fontos kérdés az MP szabályozásával kapcsolatban annak reverzibilitása. Így pl. a gátlás “visszafordításában” MYPT1 foszfatázoknak van szerepe, és számos közlemény bizonyította, hogy az izolált PP1c, PP2A katalitikus alegység (PP2Ac), a PP2A holoenzimek és a PP2B is részt vehet a foszfo-Thr696 és -Thr853 defoszforilációjában [80; 93] (5. ábra).

A MP holoenzim szabályozása kölcsönható fehérjékkel kialakított kapcsolaton keresztül is megvalósulhat. Az inhibitor-1 (I-1) és inhibitor-2 (I-2) kisméretű, PP1-et gátló hőstabil fehérjék, amelyek a szabad PP1 katalitikus alegységhez kötődve csökkentik annak aktivitását, de a holoenzimeket csak kisebb mértékben gátolják. Ezzel szemben a 17 kDa (CPI-17) C-kináz-függő foszfatáz inhibitora (CPI-17) nagy hatékonysággal gátolhatja mind a PP1c, mind az MP (PP1c-MYPT1 komplex) aktivitását, és bár nem tartalmaz kanonikus PP1c-kötő motívumot, a PP1c-vel és a MYPT1-gyel is szoros interakciót hoz létre [94]. A CPI-17 család másik tagja, a C kináz által aktivált PP1 inhibitor (KEPI), hasonló gátló hatással bír. A KEPI egyaránt gátolja a PP1c-t és a MP-t [56], valamint gátló hatását az MP-re THP-1 sejtekben is leírták [93]. Egyéb CPI-17 családtagok: a foszfatáz holoenzim inhibitor-1 és -2 (PHI-1 és -2) és a gyomor-bél-és agy-specifikus PP1 inhibitor (GBPI), amelyek PP1c-kötő RVxF motívumot tartalmaznak, és gátló foszforilációs szekvenciájuk nagymértékű hasonlóságot mutat a CPI-17-hez [27]. A 14-3-3 β citoszelektális átrendeződést elősegítő fehérje, a MYPT1-hez kapcsolódva csökkenti annak miozinhoz való kötődését és a MP miozinról történő disszociációját eredményezi, ami a miozin könnyű lánc fokozott foszforilációjához vezet. A telokin MYPT1 kölcsönható fehérje aktiválja az MP-t anélkül, hogy megváltoztatná a MYPT1 Thr696 vagy Thr853 oldalláncok foszforilációját [95]. A telokin egy 17 kDa fehérje, amely a miozin könnyűlánc-kináz C-terminális doménjét tartalmazza [96], és a fázisos simaizmokban nagymértékben expresszálódik [97]. A telokinnak nincs kináz aktivitása, és a MP-t aktiváló mechanizmusa még nem ismert. A tumorsuppresszor prosztata apoptózisválasz (Par-4) fehérjéről szintén kiderült, hogy fokozza a MP aktivitását. Érrendszeri simaizomsejtekben a Par-4 kolokalizálódik az aktin filamentumokkal [98], és közvetlenül kötődik a MYPT1-hez. A Par-4 fehérjével kialakított kapcsolat gátolja a ZIPK hozzáférését a MYPT1 gátló foszforilációs helyeihez, így aktív állapotban tartja a MP holoenzimet [99] (5. ábra).

A közelmúltban azonosítottuk a MP egy új gátló fehérjét, a smoothelin-szerű 1 fehérjét (SMTNL1), amely a simaizom összehúzódásában játszik szerepet (6. ábra). Az SMTNL1 az izomfehérjék smoothelin családjának tagja, és egy C-terminális kalponin homológia (CH) domént tartalmaz [100]. Az SMTNL1 közvetíti a sima- és vázizomzat nemtől függő, edzés által kiváltott adaptációit [101] és gátolja a miozin foszfatáz aktivitást [102]. Az SMTNL1 fehérje jellemzőit és a MYPT1-re és MP-re kifejtett hatását később részletezem (ld. a "Smoothelin-like 1 protein (SMTNL1)" fejezetet).

Az MP szabályozásában mindezek mellett a MYPT1 alegység foszforilációtól eltérő poszttranszlációs változásai is szerepet játszhatnak. Így például a MYPT1 alegységet az aszparaginil hidroxiláz gátló hypoxia-indukált faktor hidroxilálja az ankirin ismétlődések régiójában. A módosítás fiziológiai jeletősége még nem teljesen jellemzett, de a kísérleti eredmények az sugallják, hogy szabályozhatja a HIF/hypoxia modulált jelátviteli pályát [103]. Emellett a MYPT1 alegységet a hiszton lizil metiltranszferáz (SETD7) metilálja a Lys442 oldalláncán, és a folyamat reverzibilitását a hiszton demetiláz LSD1 biztosítja. Daganatos sejtekben a fokozott demetiláció miatt a MYPT1 stabilitása csökken, ami a MYPT1 ubiquitin-proteasómális útvonalon történő lebomlását eredményezi. Ennek következtében a retinolasztóma fehérje foszforilációja megnő, ami a sejtciklus beindulását okozza [83]. A MYPT1 proteasómális degradációját a Seven in absentia homolog 2 (SIAH2) E3-ligáz is elősegíti [104]. Végül a kaszpáz-3 a MYPT1 C-terminális régióját hasítja (Asp884), ezáltal fokozza a Thr696 és Thr853 gátló foszforilációját [105] (5. ábra).

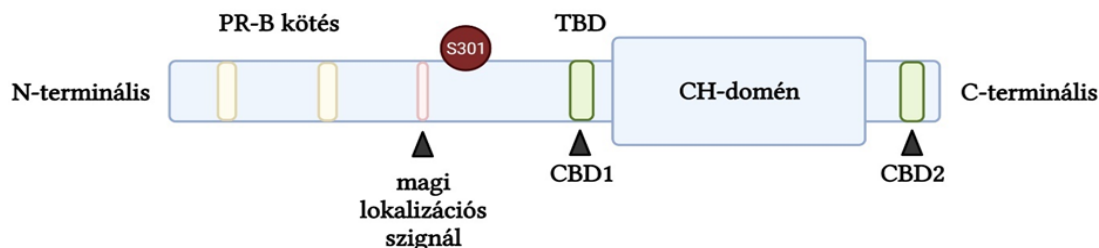
2.6. A smoothelin fehérjék és az SMTNL1

A miozin foszfatáz egyik lehetséges szabályozó fehérjéje a smoothelin-szerű 1 fehérje (SMTNL1), a simaizomra jellemző smoothelin (SMNT) fehérjecsalád tagja. Ebbe a családba tartozik még a smoothelin A (SMTN-A) és smoothelin B (SMTN-B), valamint egy smoothelin-szerű 2, ismeretlen funkciójú fehérje. Az SMTN-A egy 59 kDa molekulatömegű rövid izoforma, mely a vizcerális simaizmokban expesszáldódik, 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 végükön, ahol egy 2-es típusú kalponin homológ (CH) domén (342-459 aminosavmaradék) található. Az SMTN-A és -B fehérjékkel ellentétben az SMTNL1 nem képes az aktin megkötésére. Ennek oka feltehetően az aktin-kötő domén/ek hiánya, melyből az SMTN-B fehérjén kettő, míg az SMTN-A fehérjén egy található. Továbbá az utóbbiak tartalmaznak még egy-egy tropomiozin-kötő motívumot is. Az SMTNL1 szintén képes kötődni a tropomiozinhoz, ami elősegíti a vékony filamentumokhoz való asszociációját a CH-doménen és a rendezetlen N-terminális végen keresztül (6. ábra).

Az SMTNL1 CH-doménjének N-terminális végén található IQ motívum (apo-CaM-kötő domén, CBD2) a fehérje Ca^{2+} -mentes kalmodulinnal (CaM) való kölcsönhatását teszi lehetővé, míg a Ca^{2+} -kötött kalmodulinhoz elsősorban az ún. Ca^{2+} -CaM-kötő doménen keresztül (CBD1)

kapcsolódik. Az SMTNL1 N-terminális szakasza erősen rendezetlen, ami felveti a más fehérjékkel történő kapcsolódás és szabályozás lehetőségét.

Az SMTNL1 fehérjét foszfoproteomikai elemzésekkel a PKG szubsztrátjaként írták le nyúl



6. ábra. A SMTNL1 fehérje szerkezete. A SMTNL1 fehérje C-terminálisán (342-459) CH doménnel rendelkezik, míg N-terminális vége (1-341) rendezetlen szerkezetű. A CH domén a kalmodulinhoz, illetve a tropomiozinhoz való kötődéshez szükséges, azonban F-aktinhoz nem kapcsolódik. A fehérje intracelluláris lokalizációját a CH domén közelében található Ser301-es oldallánc foszforilációs állapota szabja meg, amely a ciklikus nukleotid függő kinázok célpontja a sima- és vázizomban. A foszforiláció feltehetően olyan konformációváltozást idéz elő, amely a foszforilációs helytől N-terminálisan elhelyezkedő magi lokalizációs szignált exponálja. Az ábra a biorender.com felületén készült. PR-B: progeszteron receptor-B; TBD: tropomiozin kötő domén; CBD: kalmodulin kötő domének

ileumban (akkori elnevezése szerint CHASM; calponin homology-associated smooth muscle) [100]. Jelenlegi ismereteink szerint az SMTNL1 Ser301 oldallánca az egyetlen hely, amit a PKA és a PKG protein kinázok foszforilálnak [100], és kulcs szerepet játszik a SMTNL1 funkciójában. Érdekes módon az SMTN család többi tagjából hiányzik [100]. Az SMTNL1 gátló hatással van az simaizom MP aktivitásra és a rekombináns SMTNL1 fehérje permeabilizált, simaizomba történő bejuttatása a kontraktilis erő jelentős változását okozta. Míg a CH-domén elengedhetetlen volt a maximális relaxációhoz, önmagában nem okozott jelentős erőváltozást. Míg a teljes hosszúságú SMTNL1 képes volt elnyomni az MP aktivitását *in vitro*, az SMTNL1 CH-domént nélkülöző variánsa hatástalan volt, ami arra utal, hogy a CH-domén fontos szerepet játszik az SMTNL1 simaizom-összehúzódsra gyakorolt hatásainak közvetítésében [106].

Az SMTNL1 fehérje funkcionális vizsgálataihoz posztgraduális éveim során a Duke Egyetemen létrehoztuk az *smtnl1* ^{-/-}, KO egértörzseket (B6 és 129 alapon) úgy, hogy a fehérje 3-8 exonjait (a 230-421 aminosavakat kódoló szakaszt, mely tartalmazza a Ser301 foszforilációs helyet és a CH domént) célzott géndeléciónal eltávolítottuk. Az egerek embrionális fejlődése, az utódok mérete és alapaktivitása kezdetben normálisnak bizonyult [101], azonban több ezer szaporulatot követően három jól jellemezhető fenotípusbeli elváltozást találtunk.

Az első fenotípus jellemzője, hogy az *smtnl1* KO állatok WT alomtársaikhoz képest edzéshez adaptálódott fenotípust mutattak, ami mind a sima-, mind a vázizomban leírt hatásokban megmutatkozott. *Smtnl1*^{-/-} egerekből származó aorták fokozott vazorelaxációt mutattak. Kontroll egerekben az adrenerg agonisták hatására az SMTNL1 Ser301 oldalláncon emelkedett foszforilációt detektáltunk [101], amelyet az agonistákra adott kontraktilis válaszok jelentős csökkenése kísért [101]. Vázizomban az SMTNL1 2a típusú izomrostra specifikus expresszióját írtuk le. Az SMTNL1 delécio hatására a 2a típusú rostok és az miozin nehézlánc 2a típusának (MHC2A) expressziója növekedett, addig a 2b típusú rostok és az MHC2b expressziója pedig csökken míg más, ismert edzés-indukálta fehérjék expressziója nem változott [101]. Az SMTNL1 KO egerekkel végzett vizsgálatok azt sugallják, hogy a fehérje fiziológiai szerepe a testmozgásra adott adaptív válaszok elősegítése a sima- és vázizomban. A *m. soleus* izomból készített metszetek elektronmikroszkópos vizsgálata nem mutatott változást az izom ultraszerkezetében a SMTNL1 kiütésének hatására. Azonban a SMTNL1 KO egerek 5 hetes állóképességi edzése és az azt követő terheléses vizsgálatok rávilágítottak arra, hogy a hím KO egerek szignifikánsan később fáradnak el, többet futnak és a munkavégzésük is nagyobb a vad típusú (WT) társaikhoz képest, míg a nőstény KO egerek teljesítménye nem különbözik jelentősen a WT nőstényekétől. A vázizom rosttípusizálásából kiderült, hogy a SMTNL1 delécioja a vázizom rostösszetételének átalakítását indukálja: a mozgásszegény KO egerek *m. plantaris*-a alapállapotban több 2a és kevesebb 2b rostot tartalmaz a WT egerekhez képest, hasonlóan az 5 hetes edzésen átesett WT egerekhez, de a SMTNL1 delécioja az 1 és 2x típusú rostokra nincs hatással. A KO egereken végzett további vizsgálatok feltárták, hogy az egerek testsúlya, izomtömege, vérnyomása, glükóztoleranciája, szérumértékei nem változtak jelentősen, minden érték a normál tartományba esett [101].

Kimutattuk, hogy az SMTNL1 a MYPT1 expresszióját szabályozza az egyedfejlődésben és meghatározó szabályozó eleme a simaizom kontraktilitásának. Az izom adaptációs változásai közben mind az egyedfejlődés mind a terhesség során, a MYPT1 és SMTNL1 expressziója is változott. Így például a MYPT1 expressziójának és a miozin foszfatáz aktivitásának megkétszereződését mutattuk ki a születést követő 6-12. napokon. Az SMTNL1 hiánya, illetve a Ser301 oldalláncon történő foszforilációjának hatására kialakult magasabb miozin foszfatáz aktivitás következtében egy relaxáltabb izom fenotípus jelent meg, mely a foszforilálatlan SMTNL1 MP-t gátló hatásával állhat összefüggésben. Ezzel összhangban bizonyítottuk a MYPT1 és a SMTNL1 kölcsönhatását is, és igazoltuk azt, hogy az SMTNL1 gátolja a MP holoenzim

aktivitását. A SMTNL1 Ser301 oldallánc PKA/PKG általi foszforilációjának hatására az SMTNL1 transzlokációját mutattuk ki a sejtmagba, ami lehetővé teszi, hogy a *mypt1* gén expresszióját szabályozza [102]. Feltérképeztük az SMTNL1 expresszióját, és leírtuk, hogy az nem korlátozódik a vázizomra, hanem megtalálható még simaizomban és szteroidhormonokra érzékeny szövetekben is, így jelentős expressziós szintet mutat a petefészekben, herében, az emlőállományban, de a mellékvesében is. Eredményeink szerint a terhesség során a MP szerepet játszik az anya vérnyomásának és a 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 húszszorosán megnövekedett expresszióját tapasztaltuk. A terhesség koordináltan megváltoztatta mind az érrendszeri, mind a méh simaizomzatának összehúzódnási tulajdonságait, csökkentve a szisztémás vérnyomást és fenntartva a méh relaxációját. A terhesség okozta adaptációk hátterében álló pontos molekuláris mechanizmusokat még nem sikerült teljes mértékben meghatározni, de valószínűleg a miozin foszforilációját szabályozó fehérjék expressziójának változásaihoz kapcsolódnak. Az SMTNL1 elsődleges célgénje ezekben az izmokban a MYPT1. Az SMTNL1 delécioja 30-40-szeresére növeli a MYPT1 expresszióját újszülöttekben, és a fejlődés során mind az SMTNL1, mind a MYPT1 expressziója több mint 20-szorosára nő. A terhesség szintén szabályozza az SMTNL1 és a MYPT1 expresszióját, és az SMTNL1 delécioja nagymértékben fokozta a MYPT1 expresszióját a vaszkuláris simaizomban, ami a fenilefrinre adott válaszként az erőfejlődés jelentős csökkenését eredményezi, valamint az izmot acetilkolinra érzékennyé teszi. Eredményeink alapján a szexuális fejlődés és a terhesség az SMTNL1 és a MYPT1 révén közvetíti a sima és harántcsíkolt izmok adaptációját [102].

Mivel a változások szteroidhormon-függő, izomspecifikus szabályozásáról szóló ismereteink továbbra is hiányosak voltak, és a MP aktivitásának szabályozása ezen folyamatokban még ismeretlenek maradtak, disszertációmban új eredményként bemutatom a folyamatok hátterében álló molekuláris mechanizmusok felderítésére irányuló újabb kutatásainkat. Ugyancsak a disszertáció Eredmények fejezetében tárgyalom az *smtnl1* KO állatok reprodukív és metabolikus fenotípusánk felismerését és jellemzését.

3. CÉLKITŰZÉSEK

A MP a citoszeletális folyamatokban és az izom összehúzásban betöltött szerepét elsősorban a miozin II 20 kDa könnyű láncának defoszforilációján keresztül fejt ki, és így szabályozza a kontraktilitást, a sejtmozgásokat és a migrációt izom és nem-izom sejtekben. A MP széleskörű fiziológus 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 szerettük volna feltárni a MP diverz sejtelettani funkcióit és bonyolult szabályozási lehetőségeit fiziológus és patológus 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.
- A MYPT1 alegység SMTNL1 általi szabályozásának jellemzése vázizom szövetben az terhesség során.
- Az SMTNL1 mint transzkripciós kofaktor terhességben betöltött szerepének vizsgálata a vázizomzat adaptációs folyamataiban.
- Az SMTNL1 KO állatok reprodukív fenotípusának háttérében álló molekuláris mechanizmusok felderítése az endometriumban.
- Az SMTNL1 KO állatok inzulinrezisztens fenotípusának háttérében álló molekuláris mechanizmusok megismerése.
- A SMTNL1 fehérje szerepének meghatározása hyperthyreosisos betegek vázizomzatában.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. *Anyagok*

A felhasznált anyagok, antitestek és vegyszerek a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) cégtől származtak, az ettől való eltérést minden esetben külön jelöltem. A Mikrocisztin-LR előállítás és tisztítása korábban leírt módon történt [107].

4.2. *Sejtvonalak*

4.2.1. *A kísérletben használt sejtvonalak*

Humán keratinocita (HaCaT), a B50 neuroblasztóma, HeLa, hepG2 hepatocelluláris carcinoma, C2C12 myoblast, tsA201 és normál humán epidermális keratinocita (NHEK) sejteket használtunk.

4.2.2. *Sejtkultúra modellek*

C2C12 sejtek differenciációjára: A normál felnőtt nőstény C3H egerek combizmából létrehozott, immortalizált C2C12 eger mioblaszt (ECACC 91031101; C2C12) sejteket 1000 mg/L glükózt, 2 mM L-glutamint (Lonza; Basel, Switzerland), 10% (V/V) foetális borjú szérumot (FBS) tartalmazó DMEM-ben, 5% CO₂ szint mellett, 37 °C-on tenyésztettük. A C2C12 sejtek differenciációjához 1000 mg/L glükózt, 2 mM L-glutamint és 2% (V/V) lószérumot tartalmazó, fenolvörös nélküli DMEM-et (differenciáltató médium) alkalmaztunk 6 napon keresztül.

A *hipertireózis modellben* a differenciáció 1. napjának vagy 4. napjának kezdetétől a differenciáltató médiumot 1 M HCl:EtOH 1:4 arányú oldatában oldott, 10 nM-os végkoncentrációjú 3,3',5-trijód-tironinnal (T3) is kiegészítettük. A kontroll minden esetben 1 nM T3-at tartalmazott. A sejtek állapotát, valamint a differenciáció következtében végbemenő morfológiai változásokat fénymikroszkóp alatt követtük nyomon.

Az *inzulinrezisztencia modellben* a 3 napos differenciáltatás elteltével még 3 napig kezeltük a sejteket az inzulinrezisztencia kialakításához. Az indukált inzulinrezisztenciához (HG – 25 mM glükóz) fenolvörös mentes DMEM-et használtunk 2% (V/V) lószérummal, 2 mM L-glutaminnal, valamint 100 nM inzulinnal kiegészítve. A nem inzulinrezisztenciás sejteket normál cukortartalmú (LG – 5,5 mM glükóz) fenolvörös mentes 2% (V/V) lószérummal 2 mM L-glutaminnal, valamint 50 pM inzulinnal kiegészített médiummal kezeltük. Ezt a két kezelést egészítettük ki 10 nM medroxiprogesteron-17-acetát (MPA) hozzáadásával vagy anélkül. Minden kezelési formát az

üres plazmával transzfektált sejteken és a N-terminális Flag-jelölővel ellátott SMTNL1 pcDNA-3.1 expressziós plazmával (FT-SMTNL1) transzfektált sejteken is végrehajtottuk.

4.2.3. Sejtenyésztés és a sejtek lizálása

A humán keratinocita (HaCaT), a B50 neuroblasztóma, HeLa, hepG2 hepatocelluláris carcinoma, és a tsA201 sejteket 10% (V/V) borjú szérumot (FBS), illetve 2 mM L-glutamint tartalmazó Dulbecco által módosított Eagle médiumban (DMEM) tenyésztettük 37 °C hőmérsékleten és 5%-os szén-dioxid szint mellett. A normál humán epidermális keratinocita (NHEK) sejteket EpiLife médiumban tenyésztettük, mely humán keratinocita növekedési faktorokat is tartalmazott (Gibco, Life Technologies).

A sejtlízishez RIPA puffert használtunk, melynek összetétele: 25 mM Tris-HCl, pH 7,6, 150 mM NaCl, 0,25% (m/V) nátrium-dezoxikolát, 1% (m/V) NP-40, 0,1% (m/V) nátrium-dodecilszulfát (SDS). HaCaT sejtek lizálásához Tris-Triton puffert használtunk: 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 100 mM NaCl, 1 mM etilén-diamin-tetraecetsav (EDTA), 1 mM etilén-glikol-tetraecetsav (EGTA), 1% (V/V) Triton X-100, 10% (V/V) glicerin, 0,1% (m/V) SDS, 0,5% (m/V) nátrium-dezoxikolát. A pufferekhez használat előtt, frissen 1x proteáz inhibitor mixet (Roche, Bázél, Svájc) és 1x protein foszfátáz inhibitor koktélt (1 mM NaF, 1 mM Na₄P₂O₇, 1 mM β-glicerofoszfát, 1 mM Na₃VO₄) adtunk. A fehérje koncentrációkat Pierce BCA Protein Assay Kittel (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) határoztuk meg.

4.3. Egér törzsek fenntartása és élettani vizsgálata

4.3.1. Az egérkolóniák fenntartása

A sebgyógyulás tanulmányozására 6-7 hetes hím Balb/c egereket használtunk fel. Az egereket 35-75% relatív páratartalmú, 19-25 °C hőmérsékletű környezetben tartottuk *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 kongenikus 129 SvEv *smtnl1*^{-/-} egértörzset a Charles River Laboratories közreműködésével készült [101]. A vemhességi vizsgálatokhoz 6-8 hetes ivarérett nőstény egereket a lavarge módszerrel [108] választottuk ki. Az ivarzó nőstényeket egy éjszakán át felnőtt hímekkel párosítottuk. A hüvelydugó meglétét a vemhesség 0. napjának tekintettük. Az

álvehességi vizsgálatokhoz a Taconic cégtől beszerezett vazektomizált hímekkel 1:2 arányban vegyítettük a nőstényeket.

4.3.2. A reprodukív fitnessz vizsgálata

Az *smtnl1*^{-/-} kolóniák szaporodási adatait másfél év alatt gyűjtöttem össze az *smtnl1*^{+/+} x *smtnl1*^{+/+} és *smtnl1*^{-/-} x *smtnl1*^{-/-} egerek (n=1651) között létrehozott, életkorban illeszkedő keresztezésekből. Az embrionális letalitás, a vemhességig eltelt idő és a vemhesség közötti intervallum, mint a reprodukív fenotípus jellemzői és a vemhesség gyakorisága tekintetében adatok gyűjtésére *smtnl1*^{+/+} x *smtnl1*^{+/+} és *smtnl1*^{-/-} x *smtnl1*^{-/-} kísérleti tenyészpárokat (egyenként n=40) használtunk. A már bizonyítottan termékeny hímek és szűz nőstények 6-8 hetesek voltak. Az alom mérete az egyes alomban megszámlált utódok száma volt. Az embrionális letalitást úgy mértük, hogy a vemhesség 7., 13., 17. napján vagy a születéskor a méh felboncolásakor megkerestük az elhalt embriókat, és az elhalt embriók átlagos számaként adjuk meg. A hímek aránya a hím utódok százalékos aránya volt az egyes alomban. A vemhességig eltelt idő a tenyész pár felállítására és a megtermékenyítést jelző hüvelyi dugó első megfigyelése közötti napok száma volt. A vemhességek közötti időintervallum az első vemhességben a hüvelyi dugó első megfigyelése és a második vemhességben a dugó első megfigyelése közötti napok száma volt.

4.3.3. Átfogó Laboratóriumi Állatfigyelő Rendszer (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.

4.3.4. Sebgyógyulás tanulmányozása egérbőrön

A sebzés előtt az egerek hátáról eltávolítottuk a szőrt, majd izofluránnal altattuk őket (Abbott Animal Health, Abbott Park, IL, USA). A dorzális bőrfelületen három 4 mm átmérőjű, kör alakú, teljes vastagságú sebet ejtettünk [109]. A sebeket 1 µM végkoncentrációjú szelektív protein foszfatáz-1 (PP1) inhibitor tautomycinnel (TM), illetve 10 µM végkoncentrációban H1152 ROK inhibitorral kezeltük, a gátlószereket hidrofíl anionos krémbe alkalmaztuk, és napi kétszer 12 órás időközönként (n=6) kentük a sebekre 7 napon keresztül. A sebekről minden nap Olympus kamerával (Olympus, Tokió, Japán) felvételeket készítettünk méretarány mellett ugyanazon

beállításokkal, területüket pedig ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) programmal határoztuk meg. A relatív sebfelszíneket a 0. napi területekhez viszonyítottuk százalékos értékekben (átlag $\pm$ SEM). A sebeket hisztológiai és Western blot analízissel vizsgáltuk.

4.4 Szövetminták kinyerése és feldolgozása

4.4.1. Humán minták

A MYPT1 fehérje expresszióját humán *ex vivo* bőrszöveti biopsziákban is vizsgáltuk. A sebészi úton eltávolított felnőtt donorokból származó biopsziák tartalmazták a bőrszövetben előforduló összes sejttípust, és érett *stratum corneum*mal rendelkeztek. A mintákat a Genoskin (Toulouse, Franciaország) cégtől rendeltük.

A 73 eu- és hyperthyreosisos donor *m. sternohyoideus* izmából vett biopsziákon végzett kísérleteket a Debreceni Egyetem Regionális és Kutatásetikai Bizottsága (DEOEC RKEB/IKEB 3517-2011) hagyta jóvá, és azok megegyeznek az Európai Unió Tanácsa által előírt etikai szabályoknak. A donorok írásos beleegyező nyilatkozatot írtak alá a jelen értekezésben foglalt tanulmányban való részvételre. A donorokat elsősorban nemük és betegségük alapján választottuk ki. Minden biopszia *struma nodosában* (euthyreosisos), illetve Graves-kórban vagy *struma nodosa colloidis*-ben (hyperthyreosisos) szenvedő nőbetegtől származik. Törekedtünk rá, hogy minden feltárással kerülő minta 60 év alatti páciensből származzon. Az humán vázizom biopsziákat érintő eljárásokat az East Carolina University and Medical Center intézményi felülvizsgálati bizottsága hagyta jóvá. Human cervicalis carcinoma biopsziákat RIPA pufferben szolubilizálva rendeltük (Protein Biotechnologies (Ramona, CA, USA)).

4.4.2. Humán szöveti minták lízise

A minták homogenizálását módosított RIPA pufferben [25 mM Tris (pH 7,6), 150 mM NaCl, 0,1% SDS, 1% Triton X-100, 1 mM etilén-diamin-tetraecetsav (EDTA), 1 mM ditiotritol (DTT), 1 mM PMSF, 10x PIC, 50x PPIC, 1 μ M MC-LR] jégén, üvegből készült Potter-Elvehjem szövethomogenizáló eszköz segítségével végeztük el. A homogenizátumokat 10 percig centrifugáltuk (16 000 x g-n, 4 °C-on), majd a felülúszót használtuk további vizsgálatokra.

4.4.3. Agyszeletek preparálása, kezelése és szinaptoszóma preparálás

C3H egerekből perparált agykéregből Microm HM 650 V vibratómmal 200 μ m vastagságú szeleteket metszettünk, melyeket mesterséges cerebrospinális folyadékba helyeztünk. Az

agyszeletekhez inhibitorokkal inkubáltuk majd 8 mM KCl-ot adtunk hozzá. Az inzerteket egy órára enyhe túlnyomásos karbogén gázt tartalmazó kamrába helyeztük. 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.

4.4. Biokémiai mérések

4.4.1. Protein foszfatáz aktivitásmérés

Protein foszfatáz aktivitásméréssel vizsgáltuk az inhibitorok és a csendesítés hatását a sejtek protein foszfatáz aktivitására. A lizátumok felülúszóit 0,1% β-merkaptóetanolt tartalmazó 20 mM koncentrációjú Tris-HCl (pH 7,4) pufferben a hígítottuk, és 1 μM ³²P-jelölt pulykazúza miozin 20 kDa könnyű láncának (³²P-MLC20) vagy 1 μM ³²P-jelölt pulykazúza teljes miozin (³²P-miozin) szubsztráttal 30 °C-on inkubáltuk. Az előbbi teljes PP1 enzimaktivitást, míg a második csak a miozin foszfatáz aktivitásméréséhez használtuk. A reakcióidő 20-60 másodperc volt, a reakciót, amelyet 200 μl 10% (V/V) triklórecetsav (TCA) és 200 μl 6 mg/ml BSA hozzáadásával állítottuk le. A reakció során felszabadult radioaktívan jelölt foszfátot (³²P_i) folyadék szcintillációs számlálóval (Perkin Elmer) határoztuk meg. A foszfatáz aktivitást a minták fehérjetartalmához normalizáltuk, a kezelt minták aktivitását pedig a kontroll érték %-ában adtuk meg.

4.4.2. In vitro protein kináz esszé

5 μM Flag-SNAP-25[110], Flag-PRMT5 [111] vagy GST-MYPT1 [112] fehérjét 120 percig 30 °C-os vízfürdőben inkubáltunk 20 ng/μl ROK enzimmal, 1 mM γ-[³²P]ATP-vel és 1 μM mikrocisztin-LR protein foszfatáz inhibitorral. A reakciót forró 5x SDS-PAGE mintapuffer hozzáadásával állítottuk le. Poliakrilamid gélelektroforézist követően a beépült foszfátot autoradiográfiával detektáltuk.

4.4.3. Proteome Profiler humán foszfo-kináz és foszfo-MAPK array

A humán foszfo-kináz (ARY003B) és foszfo-MAPK (ARY002B) array kitéket (R&D Systems; Minneapolis, MN, USA) a gyártó utasításait követve alkalmaztuk humán vázizom és kezelt C2C12 sejlizátumokon. A mintákat az Array Buffer 1-ben hígítottuk és a membránokkal együtt inkubáltuk 4 °C-on, majd a membránokat detektálás céljából biotinilált antitest koktélaban inkubáltuk. Végül a membránokat hígított Streptavidin-HRP-ben inkubáltuk szobahőn, majd a

sávokat kemilumineszcenciásan, a kitben lévő Chemi Reagent Mix segítségével, röntgenfilmen tettük láthatóvá.

4.4.4. Protein foszforiláció és defoszforiláció vizsgálata

Anti-Flag gyöngyökhöz rögzített Flag-SNAP-25 vagy Flag-PRMT5^{wt} és -PRMT5^{T80A} fehérjéket foszforiláltunk nem-radioaktív módon 0,5 mM ATP, 5mM MgCl₂ és ROK (0.4 U/ml) jelenlétében. A kináz reakciót követően a foszforilált PRMT5 fehérjék defoszforilálására Flag-MYPT1 vagy rPP1c δ oldatot, illetve ezek kombinációjával létrehozott holoenzimet (PP1c és MYPT1) alkalmaztunk.

A PPM1B defoszforilációs vizsgálatához GST, illetve a GST-MYPT1 ROK-kal történő foszforilációját követően a gyöngyöket 1xTBS-el mostuk, majd PPM1B-t tartalmazó vagy anélküli inkubáció következett PPM1B esszé pufferben (20 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM MnCl₂, 1 mM DTT, 1 mg/ml BSA, 0.1% Tween és proteáz gátlók) 45 percig, 30°C-on. Az inkubációt követően a mintákat 1xTBS-el mostuk, és a gyöngyöket SDS minta pufferrel inkubáltuk 100°C-on, 5 percig.

4.4.5. Kaszpáz esszé

A kaszpáz-3 aktivitásmérése során az enzim az Ac-DEVD-AMC szubsztrát (Calbiochem, San Diego, CA, USA) hasításával fluoreszcens AMC-t szabadít fel, melynek intenzitását fluoriméterrel mérjük. A kezelést vagy csendesítést követően a sejteket lízis pufferrel (10 mM HEPES, pH 7,25, 2 mM EDTA, 0,1% (V/V) CHAPS, 1 mM PMSF, 5 mM DTT, 1x proteáz inhibitor mix) felvettük, centrifugáltuk, majd a felülúszókat 200 μ l 2x reakció pufferrel (200 mM HEPES, pH 7,25, 20% (m/V) szacharóz, 0,1% (V/V) CHAPS, 5 mM DTT) mértük 37 °C-os vízfürdőben 60 percig történő inkubálást követően. Az AMC fluoreszcenciáját 360 nm gerjesztési, és 460 nm emissziós hullámhosszon mértük Fluoroskan FL készülékkel (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

4.4.6. In vitro protein arginin metiltransferáz kísérlet

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

4.5. Fehérje vizsgáló módszerek

4.5.1. Western blot analízis

A sejtlizátumokat és szöveti homogenizátumokat 5x SDS-poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE) mintapufferrel (50% (V/V) glicerin, 10% (m/V) SDS, 100 mM DTT, 0,01% (m/V) brómfenolkék, 0,31 M Tris, pH 6,8) inkubáltuk 100 °C hőmérsékleten, 5 percig, majd SDS PAGE-t követően nitrocellulóz membránra (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) transzferáltuk. A membránt 5%-os (m/V) marhaszérum-albumin (BSA) oldatban inkubáltuk Tris pufferben (TBS: 125 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 25 mM Tris-HCl, pH 7,4). Az elsődleges antitestekkel 0,5% (m/V) BSA/0,1% Tween-20-at tartalmazó TBS (TBST) oldatban hígítottuk. A membránokat mosás után a megfelelő másodlagos antitestekkel inkubáltuk, majd a mosás után a detektáláshoz SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate Kitet (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) használtunk és a jeleket FluorChem FC2 Imager (Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA) vagy ChemiDoc Touch Imaging System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) készülékkel vizualizáltunk.

4.5.2. Fehérje kölcsönhatások kimutatása immunprecipitációval

A Protein A Sepharoset (PAS) előzetesen duzzasztottunk (GE Healthcare, Chicago, IL, USA; #17-0780-01), melyhez hozzáadtuk a kötőpufferben [50 mM Tris, pH 7,0] 1:60 arányban hígított, az immunprecipitálni kívánt fehérjét kötő antitestet és 2 órán keresztül, folyamatos kevertetés mellett 4 °C-on inkubáltuk. 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. Az immunoprecipitációt Anti-Flag M2 Affinity Gel gyöngyökkel is végeztünk hasonló módon. Itt az elúció vagy 1x SDS mintapufferrel való 5 perces főzéssel történt vagy a tisztított Flag peptiddel történő kompetícióval szorítottuk le a Flag-jelölt rekombináns fehérjét.

4.5.3. Fehérje kölcsönhatások kimutatása pull-down kísérlettel

A MYPT1-gyel 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 a fehérjéket tömegspekrometriás analízissel azonosítottuk.

GST-t (Glutathione-S-transzferázt) vagy GST-MYPT1-et expresszáló *E.coli* lizátumokat

Glutathion Sepharose 4B gyöngyökkel (P1743-1VL, Merck) kötő pufferben (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% (V/V) Triton X-100, pH: 7,4) kiegészítve 1x PIC-el) inkubáltunk, majd 1x-esTBS-sel mostuk, majd üres vektor által transzfektált MOCK, vagy FT-PPM1B által transzfektált tsA201 lizátumokkal inkubáltuk, 120 percig, 4°C-on. A gyöngyöket mostuk 1xTBS oldattal, majd 2x-es SDS minta pufferrel 5 percig, 100 °C inkubáltuk.

4.5.4. Felületi plazmon rezonancia (SPR) vizsgálatok

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

4.5.5. Immunfluoreszcenciás vizsgálatok

A sejteket 4% paraformaldehid/PBS oldattal (HaCaT, hepG2, HeLa) vagy felszálló etanol sorral (B50) fixáltuk, majd Triton X-100/PBS oldattal permeabilizáltuk, és 1% lószérum vagy BSA/PBS oldatával blokkoltuk. Az elsődleges antitesteket 1:250, a másodlagos antitesteket és a Texas Red-X phalloidint pedig 1:2000 hígításban alkalmaztuk éjszakán át. A sejtmagokat DAPI-val festettük meg, és ProLong Gold Antifade médiummal fixáltuk. Az immunjeleket Leica konfokális mikroszkóppal vagy Opera Phoenix High Content Analysis műszerrel (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) vizualizáltuk, és a beépített Harmony szoftverrel (4.8 verzió) elemeztük.

4.5.6. Trikróm festés és immunhisztokémia

A kivágott sebeket 10%-os formalinnal fixáltuk, paraffinba ágyasztuk, majd 4 µm vastagságú szeleteket metszettünk ki belőlük. A metszeteket rögzítettük, xilénnel deparaffinizáltuk, és etanollal dehidratáltuk, majd Masson-Goldner-féle trikróm festéssel megfestettük őket. A metszeteket pikrinsavval pácoltuk, majd a sejtmagokat timsós hematoxilinnal festettük. A metszeteket mostuk, majd narancs G és savanyúfukszin-Ponceau oldattal (0,05 g savanyúfukszin, 0,05 g Ponceau S, 2 ml tömény ecetsav, 100 ml desztillált víz) festettük, ezután 2 percig 5 g/dl foszforvolfrámsav oldattal, végül 10 percig anilinkék oldattal (0,5 g anilinkék, 2 ml tömény ecetsav, 100 ml desztillált víz) inkubáltuk. Humán bőrszöveti mintákban a metszeteket 4 °C-on inkubáltuk az elsődleges antitestekkel, majd mosást követően két órán át a torna peroxidázzal konjugált másodlagos antitestekkel. Az immunjeleket 3,3'-diamino-benzidin kromogén

szubsztráttal hívtuk elő. A metszeteket xilénnel megtisztítottuk, beágyasztuk és tárgylemezre ragasztottuk, végül Leica S40 mikroszkóppal vizualizáltuk.

4.5.7. Duolink PLA fehérje-fehérje kölcsönhatási vizsgálat

A Duolink PLA fehérje-fehérje interakciós esszét (DUO92007, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a gyártó utasításai alapján végeztük el, HeLa sejt kultúrában. A HeLa sejteket Cell Carrier Ultra üveg aljú lemezre szélesztettük (PerkinElmer, Waltham, MA, USA, 4%(v/v) PFA/TBS oldatban fixáltuk, majd 0,2% Triton-X-100/TBS oldatban permeabilizáltuk. A mintákat elsődleges antitestekkel inkubáltuk, pozitív kontrollként az MP holoenzimet reprezentáló módon MYPT1 és PPc1 β ellen termeltetett elsődleges antitesteket, illetve a MYPT1 ismert szubsztrátját, a pRb fehérjét alkalmaztuk. A negatív kontroll csoportban elsődleges antitestet nem alkalmaztunk. A Duolink PLA próbát az elsődleges antitestekhez ligáltunk, majd az így kifejlődő fluoreszcens jeleket Opera Phoenix™ HCS mikroszkóp segítségével vizualizáltuk. A sejtek területének meghatározására a citoplazmát Alexa 688-as Falloidin-nal (Invitrogen™, Waltham, Massachusetts, USA, Katalógusszám: A22284), a sejtmagot DAPI-val festettük. A sikeres fehérje-fehérje kölcsönhatást jelző fluoreszcens jelek mértékét a mikroszkóp beépített szoftvere analizálta (Harmony software, version 4,8). A fluoreszcens szignál értékét a sejtszámra normalizáltuk. A negatív kontroll csoport értékének átlagát 100%-nak vettük, minden más csoport eredményét erre a számra normalizáltuk, eredményeinket oszlopdiagrammon ábrázoltuk.

4.5.8. Szöveti array elemzése

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

4.6. Nukleinsav alapú technikák

4.6.1. Myoblast sejtek tranziens transzfekciója

A mioblaszt sejtek transzfekcióját GeneJuice transzfekciós reagenssel végeztük a *pM11-NT-FT-SMTNL1*: M11 vektorba klónozott, N terminálisán Flag jelölőt tartalmazó rekombináns SMTNL1 fehérjét (NM_024230.2; GeneCopoeia Inc.; Rockville, MD, USA) kódoló plazmiddal és *pcDNA3.1*. (V790-20; Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA) üres vektorokkal. A

sejteket előre kollagénezett sejtenyésző lemezen tenyésztettük egy éjszakán át 37 °C-on. Kontrollként minden esetben az üres plazmával transzfektált (MOCK) sejteket használtuk. A transzfekció sikerességét a Flag jelölő elleni antitesttel, Western blot analízissel ellenőriztük.

4.6.2. Géncsendesítés siRNS segítségével keratinocita sejtekben és ex vivo humán bőrszövetben

A HaCaT, B50 és hepG2 sejtek MYPT1 expressziójának és a HaCat sejtek PP1c expressziójának downregulációját siRNS-sel kivitelezttük. Lipofectamine 2000 transzfekciós reagenshez (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) siRNS-t adtunk, melyeket előzetesen OptiMEM-ben (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), hígítottunk. A kontroll sejtekhez non-target siRNS/Lipofectamine mixet adtunk. Az siRNS végkoncentrációja 40 nM volt mind a kontroll (NT siRNS), mind az siMYPT1-transzfektált sejtek esetében. A sejteket 4 órán keresztül szérummentes, majd 44 órán át 10% (V/V) FBS-t tartalmazó DMEM-ben tenyésztettük.

A MYPT1 fehérje expresszióját humán *ex vivo* bőrszöveti biopsziákban is gátoltuk. Humán *ex vivo* bőrszövetben az siRNS-t és a Lipofectamine 2000-t Genoskin médiumban az *ex vivo* humán bőrszövetbe injektáltuk, majd 2 napra inkubátorba helyeztük (37 °C, 5% CO₂). Ezután a bőrszövetekből homogenizáló pufferben (10 mM HEPES, pH 7,9, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 10% (V/V) glicerin, 1% NP-40) készítettünk kivonatot. A fehérje koncentrációkat ezúttal is BCA esszével határoztuk meg.

4.6.3. RNS izolálás és szemi-kvantitatív RT-PCR

A human vázizom biopsziákból a gyártó előírásai alapján teljes RNS-t izoláltunk az RNeasy Fibrous Tissue kit (Qiagen; Hilden, Germany) segítségével. A minták homogenizálásához TissueRuptor-t (Qiagen; Hilden, Germany) használtunk, majd a mintákat proteináz K-val kezeltük 55 °C-on, 10 percig. Az RNS koncentrációt NanoDrop ND-1000 spektrofotométerrel (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA) határoztuk meg.

Ischikawa sejtek RT-PCR elemzéséhez a reverz transzkripciót cDNS-szintézis készlettel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) végeztük. A cDNS-t PCR-amplifikációhoz 2x Xceed qPCR SyberGreen Master mix (Institute of Applied Biotechnologies, Prága - Strašnice, Cseh Köztársaság) használtuk. A PCR-t LightCycler 480 (Roche Applied Science, Penzberg, Németország) géppel végeztük. Az egyes minták Cp-értékeit a belső háztartási gének, köztük a GAPDH és a Cyclophilin A átlagára normalizáltuk.

4.6.4. Microarray analízis

Az euthyreosis és hyperthyreosisos vázizom minták, az UV kezelt HaCat sejtek, *Smtnl1* WT és KO vemhes és nem vemhes állatok vázizom és méhizom minták, valamint a siMYPT kezelt HepG2 sejtek génexpressziós mintáinak vizsgálatát Affymetrix Human Gene 1.0 ST microarray analízissel hajtottuk végre. Affymetrix Mouse Genome 430 vagy Human Affymetrix Mouse Genome 430 microarray elemzések az GenoMed Medical Genomic Technologies Ltd. és a Duke University Microarray Facilityben készültek. A microarray analízis nyers adatai a Gene Expression Omnibus (GEO) adatbázisban tekinthetők meg (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/GSE178996>).

4.6.5. Irányított mutagenézis

A vad típusú humán teljes hosszúságú PRMT5, SNAP25 és PPM1B-t kódoló pReceiver-M11 expressziós vektort a GeneCopoeia Inc., (USA) cégtől vásároltuk. A PRMT5T80A, a SNAP25T187A és SNAP25T138A pontmutációit, illetve a PPM1B inaktív foszfatáz mutánsát a QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit segítségével végeztük a gyártó utasításai szerint. A mutagenézishez használt primerpárokat a közleménye tartalmazzák [110; 111]. A mutációkat tartalmazó plazmidok szekvenciáját DNS-szekvenálással ellenőriztük, amelyet az UD-GenoMed Medical Genomic Technologies Ltd. végzett. (Debrecen, Magyarország) végezte.

4.6.6. Rekombináns fehérjék termeltetése és tisztítása

Emlős tsA201 sejtekbe polietilénimin (PEI) segítségével Flag-SNAP-25, Flag-MYPT1 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 fehérjéket 300 µg/ml Flag-peptid/TBS-sel eluáltuk.

4.6.7. Emlős két hibrid vizsgálatok

Az emlős két hibrid vizsgálatokat HepG2 sejteken végeztük. A sejteket Eugene 6 reagenssel (Roche) transzfektáltuk 1500 ng 5xGal4-luciferáz riporter plazmiddal, 500 ng VP16 vagy 500 ng nukleáris receptor-VP16 fúziós plazmiddal (PR-A, PR-B (vagy PR-B deléciós/mutáns konstrukciók), ER α , ER β , AR és GR), 500 ng pM-Gal4DBD vagy pM-Gal4DBD-SMTNL1 plazmidokkal (vagy pM-SMTNL1 deléciós plazmidok), és 200 ng citomegalovírus β -galaktozidáz (β -gal) és 300 ng pBSIIKS plazmidokkal. A 24 órás transzfekciót követően a sejteket vívőanyaggal (etanol) vagy a megfelelő receptor ligandumával kezeltük az alábbiak szerint: 10nM R5020 a PR-

A és B esetben, 100 nM 17 β -ösztadiol az ER α és β esetben, 100 nM Dexametazon a GR esetben, 100nM R1881 az AR esetben, vagy 100 nM RU486 és ZK98299 a progeszteron receptor esetében. A 8-Br-cAMP PR-B transzkripció aktivitására gyakorolt hatásának elemzéséhez a HeLa sejteket 10 ng SV40-PR-B-vel, 1500 ng MMTV-luciferáz riporter plazmiddal, 200 ng β -gal és 1290 ng pBSIIKS plazmiddal transzfektáltuk, majd hordozó vagy 10 nM R5020-mal 8-Br-cAMP (10 nM-1 mM) jelenlétében inkubáltuk, majd ezt követően a luciferáz és β -gal vizsgálatokhoz lizáltuk. Az SMTNL1 PR-B transzkripció aktivitására gyakorolt hatásának elemzéséhez riporter próbákat végeztünk HeLa sejtekben. A sejteket tranziens módon transzfektáltuk 10 ng SV40-PR-B-vel, a pcDNS 3.1-SMTNL1 növekvő koncentrációjával (75, 150 és 300 ng), valamint 1500 ng MMTV-luciferáz riporter plazmiddal és különböző mennyiségű pBSIIKS plazmiddal együtt, majd inkubáltuk hordozóval vagy 10 nM R5020-mal 100 μ M 8-Br-cAMP- dal vagy anélkül. Az adatokat normalizált értékként mutatom be, amely az abszolút luciferáz-aktivitást jelenti, korrigálva a transzfekciós hatékonysággal a β -gal-aktivitással való normalizálással.

4.7. Sejtbiológiai kísérletek

4.7.1. Sejtéletképességi vizsgálat MTT festéssel

A különböző kezeléseknek a sejtek életképességére gyakorolt hatását metil-tiazol-tetrazólium (MTT) esszével tanulmányoztuk. A sejteket konfluens állapotig növesztettük, majd 24 órán át szérummentes DMEM-ben tartottuk. Ezt követően a sejteket kezeltük, a médiumot eltávolítottuk, szérummentes DMEM-et majd 10-10 μ l 5 mg/ml koncentrációjú MTT oldatot (3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólium-bromid) adtunk hozzá. A kék színű formazán zárványok megjelenését követően a médiumot eltávolítottuk, és a formazán kristályokat 100-100 μ l dimetil-szulfoxidban (DMSO) feloldottuk. A színintenzitást LabSystems Multiskan MS spektrofotométerrel határoztuk meg az abszorbancia 540 nm hullámhosszon történő detektálásával.

4.7.2. Sejtéletképességi vizsgálat SRB festéssel

A sejtek proliferációját szulforodamin B (SRB) esszével tanulmányoztuk. A kezelést követően a sejtekhez triklórecetsavat (TCA) adtunk 10% (V/V) végkoncentrációban, 4 °C-on 1 órán át inkubáltuk, majd mosást és szárítást követően a mintákhoz 0,4% (m/V) SRB-t tartalmazó 1%-os ecetsav oldatot pipettáztunk.

4.7.3. Karcolási (scratch) vizsgálat

A sejtek migrációs képességét karcolási vizsgálattal tanulmányoztuk. Tecan Freedom EVO 150 készülékkel (Tecan Group Ltd., Männedorf, Svájc) karcoltot ejtettünk, majd 24 órán át növesztettük a sejteket, kezeltük, majd Leica DM IL LED mikroszkóppal (Leica Camera AG, Wetzlar, Németország) fotókat készítettünk a karcolatokról. A kezelések során a negatív kontrollhoz 0%, a pozitív kontroll sorozathoz 10% FBS/DMEM-et adtunk. A C2C12 sejtek migrációját festést követő High Content Screening vizsgálattal követtük nyomon Opera Phoenix™ HCS készülékkel. A végső karcolatok méretét ImageJ szoftverrel (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) vagy az Opera beépített szoftverével határoztuk meg. A szabad területek nagyságát minden esetben a kontrollhoz viszonyítottuk, azt 100%-nak véve.

4.7.4. Valós idejű sejtvizsgálat JuLI™ készülékkel

Konfluens sejt kultúrát megkarcoltunk, kezeltünk és 24 órán át 0% FBS/DMEM-ben inkubáltuk, majd a sejteket JuLI™ Br készülékkel (NanoEnTek, Szöul, Dél-Korea) vizsgáltuk, mely 24 órán keresztül óránként készített felvételt a sebzáródás állapotáról. A karcolatok méretét ImageJ-vel (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) határoztuk meg.

4.7.5. Elektromos cellaszubsztrát impedancia érzékelés (ECIS)

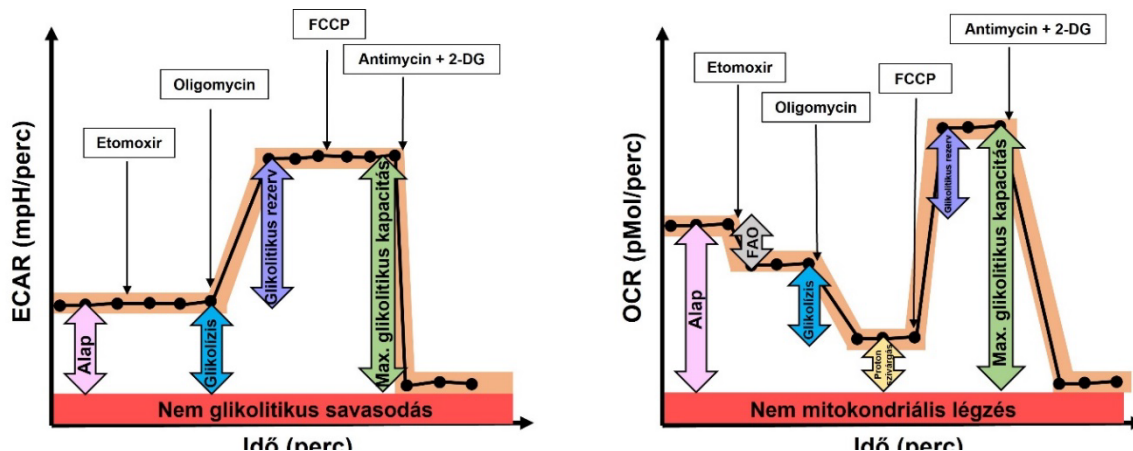
Az élő, adeherens sejtek közötti ellenállás mérésére szolgáló electric cell-substrate impedance sensing (ECIS) (Applied Biophysics) készülék a sejtrétegen sebet égetett (5 mA áramerősségű és 60 kHz frekvenciájú elektromos impulzus), majd a terület benövését és a sejt-sejt kapcsolatok helyreállítását az impedancia folyamatos monitorozásával követi nyomon. A sejtréteg integritásának helyreállítását az impedancia plató maximális értéke jelentette. Az impedancia mérésével a sejtek barrier funkcióját is tanulmányoztuk az impedancia valós idejű (real-time) nyomon követésével 6 órán keresztül.

4.7.6. 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.

4.7.7. Sejtanyagcsere vizsgálat SeaHorse készülékkel

Kísérleteinkben a laktát termelés és a mitokondriális oxidatív foszforiláció vizsgálatát az extracelluláris savasodási ráta (ECAR) illetve az oxigénfogyasztási ráta (OCR) mérésén keresztül, SeaHorse analízissel végeztük el. (7. ábra).



7. ábra: Az extracelluláris savasodási ráta (ECAR) és az oxigénfogyasztás (OCR) mérése. Kísérleteinkben a laktát termelést és a mitokondriális oxidatív foszforilációt az extracelluláris savasodási ráta (ECAR) illetve az oxigénfogyasztási ráta (OCR) mérésével, SeaHorse készülék határoztuk meg. Méréseink során a következő inhibitorokat használtunk. (1) Az etomoxir egy kismolekulájú inhibitor, mely irreverzibilisen gátolja a zsírsavak β -oxidációját. (2) Az oligomycin a mETC V komplex protoncsatornájának gátlásán keresztül fejt ki hatását. (3) Az FCCP egy szétkapcsoló ágens, mely átjárhatóvá teszi a mitokondrium belső membránját a protonokra, ami az oxidatív foszforiláció fokozódásával jár. (4) Az antimycin A a mETC III-as komplexét gátolja, míg a 2-deoxi-D-glükóz egy olyan glükóz analóg, melynek jelenléte az ATP szintézis kompetitív gátlásához vezet.

A kísérlet kivitelezése során a mioblaszt sejteket XF96 sejtenyésző lemezen (Agilent Technologies; Santa Clara, CA, USA) növesztettük, majd 1000 mg/L glükózt tartalmazó XF Assay médium (Agilent Technologies; Santa Clara, CA, USA) jelenlétében inkubáltuk. Az 1. táblázatban részletezett inhibitorokat szenzor kazettára töltöttük fel (50 μ M etomoxir; 2 μ M oligomycin; 4 μ M FCCP; 10 μ M antimycin + 100 mM 2-deoxi-D-glükóz). Ezt követően a szenzor cartridge-ot oxigénezett inkubátorba tettük 1 órára 37 °C-ra, majd az injektálást, inkubációt és mérést követően 1 N NaOH-ban oldottuk fel a sejteket és BCA esszé kittel fehérjekoncentrációt mértünk. Az adatok kiértékeléséhez használt műveleteket a 1. táblázat foglalja össze.

ECAR
anaerob glikolízis = alap – antimycin+2-DG
maximális glikolízis = oligomycin – antimycin+2-DG
glikolitikus rezerv = oligomycin – alap

OCR
aerob glikolízis = etomoxir – oligomycin
maximális légzés = FCCP – antimycin+2-DG
FAO= alap – etomoxir
glikolitikus rezerv = maximális légzés – FAO – aerob glikolízis

1. táblázat: A SeaHorse analízis kiértékelése során alkalmazott eljárások

4.7.8. Glükóz felvétel vizsgálata

2-NBDG (2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il) Amino)-2-Deoxiglükóz) felvételi mérésekhez C2C12 sejteket tenyésztettük és kezeltük. A sejteket 100 nM inzulinnal kezeltük 30 percig, majd glükóz mentes médium került a sejtekre, mely 2 μ M 2-NBDG (Sigma-Aldrich) tartalmazott. Az inkubálást 120 percig végeztük 37°C-on. A fluoreszcenciát 485 nm-es excitáció és 535 nm-es emissziós beállítással mértük egy Tecan Spark Multimode mikroplate olvasóval (Tecan Treading AG, Männedorf, Germany). A fluoreszcens adatokat pmol-ban kaptuk, mely 1 mg fehérjére vonatkoztattunk.

4.7.9. 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 Monitoring System készülékkel.

4.7.10. Kolonizációs vizsgálat

A HeLa sejteket transzfektáltuk, az üres vektorral kezelt mock szolgált kontrollként. A sejteket 12 napig tenyésztettük, majd a kultúrákat 1X PBS-szel mostuk, és 30 percig RT-n szárítottuk. A sejteket 0,27 m/m% Coomassie Brilliant Blue R250 festékkel (B0149) festettük, vizualizáltuk és a telepeket ImageJ szoftverrel számoltuk. A kolóniák számát a kiindulási sejtek számához normalizáltuk. A MOCK transzfektált csoportok átlagos kolóniaszámát 100%-nak vettük, az összes többi csoportot arányként fejeztük ki.

4.8. Bioinformatikai analízis

4.8.1. Proteomikai elemzés

A proteomikai elemzéshez a WT és SMTNL null egerek Plantaris-mintáit a vemhesség 0. és 14. napján homogenizáltuk. A mintákat párhuzamosan többdimenziós proteomikai elemzésnek

vetettük alá mikro-anioncserélő elválasztás, 1D SDS PAGE és LC-MALDI TOF-TOF MS/MS elemzés segítségével. A fehérjéket ezüsfestéssel tettük láthatóvá, majd kivágtuk MALDI-TOF TOF tömegspektrometriás azonosítás céljából. Az egyes fehérjék változását denzitometria és iTRAQ kombinációjával határoztuk meg [113]. A MYPT1 interakcióban lévő fehérjék azonosításához a peptid keverékeket közvetlenül "triple play" LC-MS/MS-sel elemeztük 3D-ioncsapdás tömegspektrométerrel (LCQ-Fleet, Thermo Fisher Scientific). Az MS/MS-adatokból a Mascot Distiller szoftver (v2.2.1.0) által generált csúcslistákat a Mascot rendszer segítségével az NCBI adatbázis humán alcsoportjában azonosítottuk.

4.8.2. Statisztikai analízis

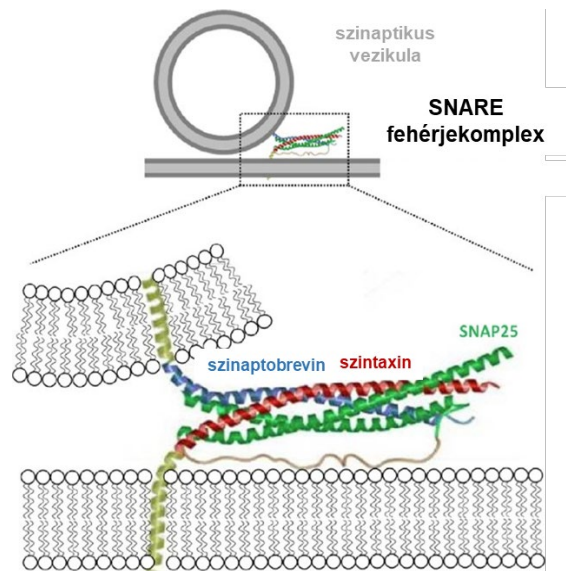
Az immunoblottok és fehérje array-k eredményeinek denzitometrállását ImageJ szoftverrel végeztük. Az oszlopdiagrammok elkészítéséhez, valamint a statisztikai analízisekhez GraphPad Prism 8 szoftvert használtunk. A foszforilált fehérjéket a nem foszforilált fehérjékre, a nem foszforilált fehérjéket pedig a belső kontrollra normalizáltuk. 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. Két csoport összehasonlítására párosítatlan kétmintás *t*-próbát, 4 vagy több csoport összehasonlítására egy- vagy kétutas ANOVA-t használtunk, kiegészítve a *post hoc* teszttel. Az adatok átlag $\pm$ SEM értékét mutatják, ahol „*n*” az egymástól független kísérletek számát jelzi. A kiugró értékeket Thompson-Tau teszttel és Grubbs's teszttel szűrtük ki. A különbségeket statisztikailag szignifikánsnak értékeltük, amennyiben $p < 0.05$ (*). Az egérkolónia elemzése esetén a normalizált adatokat t-tesztekkel (két csoport esetén) vagy általános lineáris modellekkel (GLM, >2 csoport esetén) elemeztük. Ha bármely kovariáns vagy tényező szignifikáns volt a GLM-ekben, a Tukey-féle eljárást alkalmaztuk a csoportátlagok páronkénti különbségeinek tesztelésére. A tesztek az R statisztikai környezet (R Development Core Team 2008) vagy az SPSS 17.0 for Windows segítségével végeztük.

5. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉSÜK

5.1. A miozin foszfatáz szerepe a neurotranszmitter-kibocsátás szabályozásban

A miozin foszfatáz fiziológiai szerepének vizsgálata eddig nagyrészt a simaizom kontrakcióra irányult, amely folyamatban a miozin II 20 kDa könnyűláncának defoszforilációjával annak foszforilációs szintjét szabályozza. Azonban a MP a simaizom mellett számos más szövettípusban is előfordul, így többek között az idegszövetben. Emiatt feltételeztük, hogy élettani szerepe túlmutat klasszikus citoskeletális szubsztrátjainak szabályozásán. A MP és a MYPT1 valamennyi agyrégióban kimutatható, de magasabb expressziós szintje egyes magcsoportokban az idegsejtekre specifikus fiziológiai funkciókat sejtet. Magas expressziós szintet a mutatott a MYPT1 a látópályában (*tractus opticus*) és a boltozatban (*fornix*), a paraventrikuláris magok parvocelluláris részében és a periventrikuláris magokban, a középagyban, a harmadik agyidegmag központjában (*nucleus oculomotorius*), a vörösmagban (*nucleus ruber*), az emlőmagokban (*nucleus mammillaris*), valamint a kocsányközi magokban (*nucleus interpeduncularis*) [114]. Mukacsóportunk a MP-t már előzetesen kimutatta az agykéregből izolált szinaptoszómák preszinaptikus frakciójában, és igazolta kölcsönhatását a szinaptofizin fehérjével, a ROK-kal és a PP1c δ izoformával [114]. Ezek alapján feltételeztük, hogy a MP szerepet játszhat a szinapszisok vezikuláris transzportjában és a neurotranszmitterek kibocsátásában.

A neurotranszmitter-kibocsátást elsődlegesen a beáramló kalciumion váltja ki, de a folyamat végbemenetelét a neuronális fehérjék foszforilációja és defoszforilációja is szabályozza. Az ingerületátvitel első lépéseként a vezikulumok aktív transzport révén feltöltődnek neurotranszmitterekkel. Ezután a vezikulumok az aktív zóna közelébe vándorolnak, ahol megtörténik a dokkolódás, amely során a vezikulumok a preszinaptikus membránhoz horgonyzódnak. Ezután további molekuláris átrendeződés zajlik le, mely a vezikulumok sejtmembránnal való fúziójára, a „priming”-ra irányulnak. Végül a beáramló Ca^{2+} a fúziós pórus megnyílásával kiváltja a vezikulumok exocitózist [115]. A vezikulák dokkolódásában és fúziójában az ún. SNARE (szolubilis N-etilmaleimid szenzitív faktort kötő fehérje receptor) komplex játszik kulcsszerepet (8. ábra).



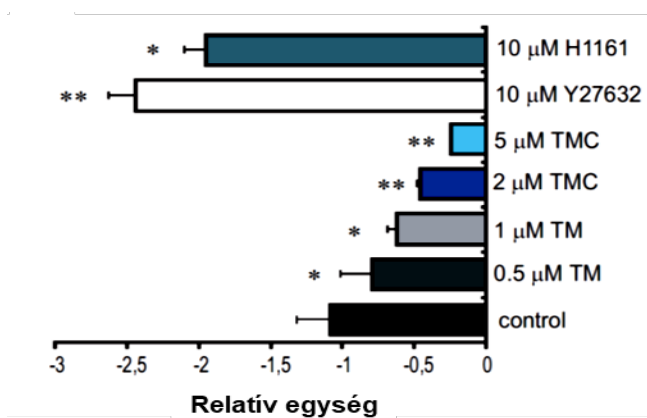
8. ábra. A SNARE komplex szerkezete. Módosítva [6] alapján

A komplexet három fehérje alkotja: a vezikulumok membránjához kihorgonyozott szinaptobrevin, illetve a sejtmembránhoz kapcsolódó SNAP-25 és szintaxin (8. ábra). A SNARE komplexben részt vevő fehérjék mindegyike hordozza a 60-70 aminosav hosszúságú, evolúciósan konzervált SNARE motívumot, melyeken keresztül összekapcsolódnak [116]. A három fehérje komplex képződése N-terminálisuktól kiindulva a C-terminálisuk irányába halad, és az eközben fellépő mechanikai erőhatások a két membránfelületet egymás irányába nyomják és fúzionáltatják. A folyamat eredményeként pórus képződik, melyen keresztül a neurotranszmitterek a szinaptikus részbe jutnak. A folyamat exergonikus, a fehérjék összeépülése spontán módon történik; energia csak a SNARE komplex felbontásához szükséges [117].

A SNAP-25 két legfontosabb foszforilációs helye a Thr138 és a Ser187, melyeket a protein kináz A (PKA) és C (PKC) is foszforilálhatja [118]. A Thr138-nak a priming folyamatában lehet szerepe, mivel PKA általi foszforilációja együtt jár az exocitózissal kész („primed”) állapotban lévő vezikula pool-ok méretének növekedésével. A SNAP-25 Thr138 oldalláncon történő foszforilációja befolyásolja a SNAP-25 és a szintaxin közötti kölcsönhatás erősségét és a SNARE-komplex összeépülést, továbbá a sejtek noradrenalin szekrécióját is. A Ser187 aminosavmaradék foszforilációja a SNARE-komplex összekapcsolódását, a vezikulumok plazmamebránhoz történő vándorlását, vagy éppen a feszültség kapuzott kalcium-csatornák SNAP-25 általi gátlását is szabályozhatja. Míg a foszforilációt katalizáló protein kinázok ismertek, a reverzibilitást biztosító preotin foszfatázokról hiányosak ismereteink. Előzetes eredményeink alapján a MP az

idegrendszerben is expresszáldódik, és számos idegi fehérjével mutat kölcsönhatást, ennek ellenére az enzim idegrendszerben betöltött szerepe kevésbé ismert [119].

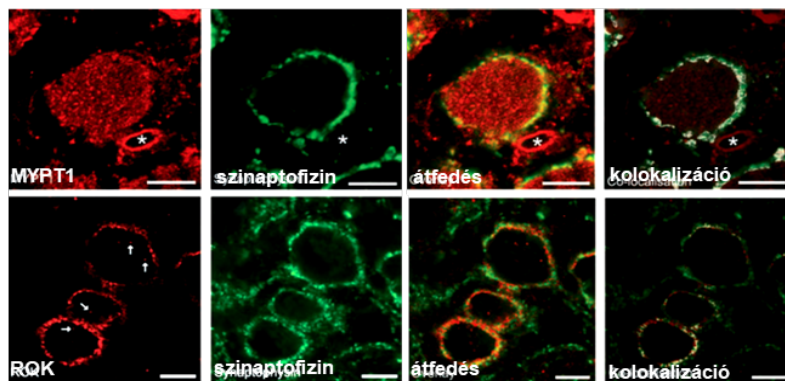
Munkánk során igazoltuk a MYPT1 és a ROK jelenlétét a patkány agykérgi szinaptoszómákban és a ventrális cochleáris magban elektron-, illetve konfokális mikroszkópia segítségével. A MYPT1 mind a preszinaptikus terminálisokban, mind a posztzinaptikus sejttestekben megjelent, míg a ROK a preszinaptikus terminálisokban dominált [120]. A PP1 specifikus inhibitora, a tautomocetin (TMC) koncentráció-függő módon gátolta a szinaptoszómák depolarizáció által kiváltott exocitózist és csökkentette a neurotranszmitter felszabadulást (9. ábra).



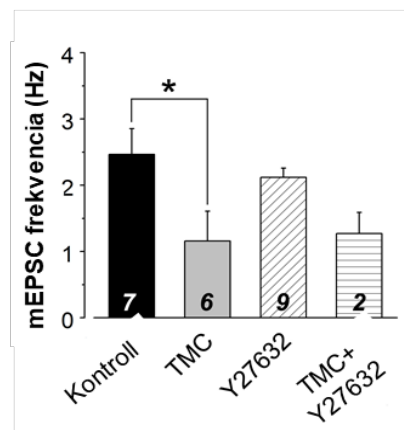
9. ábra. PP1 és ROK inhibitorok hatása a KCl-indukált, Ca^{2+} -függő exocitózisa az agykérgi szinaptoszómákban. 10 μM Y27632 és 5 μM TMC önmagában vagy együttes alkalmazásuk hatása a Ca^{2+} -függő exocitózisa a kortikális szinaptoszómákban. Az exocitózis sebességét az FM 2-10 fluoreszcencia relatív változásaként fejeztük ki.. $n = 3-5$. ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$.

A MYPT és a ROK a glutamaterg óriásszinapszisban az akusztikus rostok végterminálisai és a “bushy-sejtek” sejttestjei között helyezkednek el (10. ábra). A MP-gátló TMC és a ROK-gátló Y27632 és H1161 inhibitorok ellentétes irányú hatást fejtettek ki mind a szinaptoszómákban, mind a cochleáris magban, ami a két enzim összehangolt, ugyanazon célfehérjére ható szabályozó szerepére utalt (10. ábra). A patkány hallóidegeken elektrofiziológiai méréseket végeztünk a DE Élettani Intézetével kollaborációban excitatórikus posztzinaptikus áramokat (EPSC) mérve a MP és ROK specifikus inhibitorainak jelenlétében, amiből azok pre- és posztzinaptikus izolációjára következtítettünk, amit az elektromikroszkópiás felvételek is alátámasztottak [5].

A



B

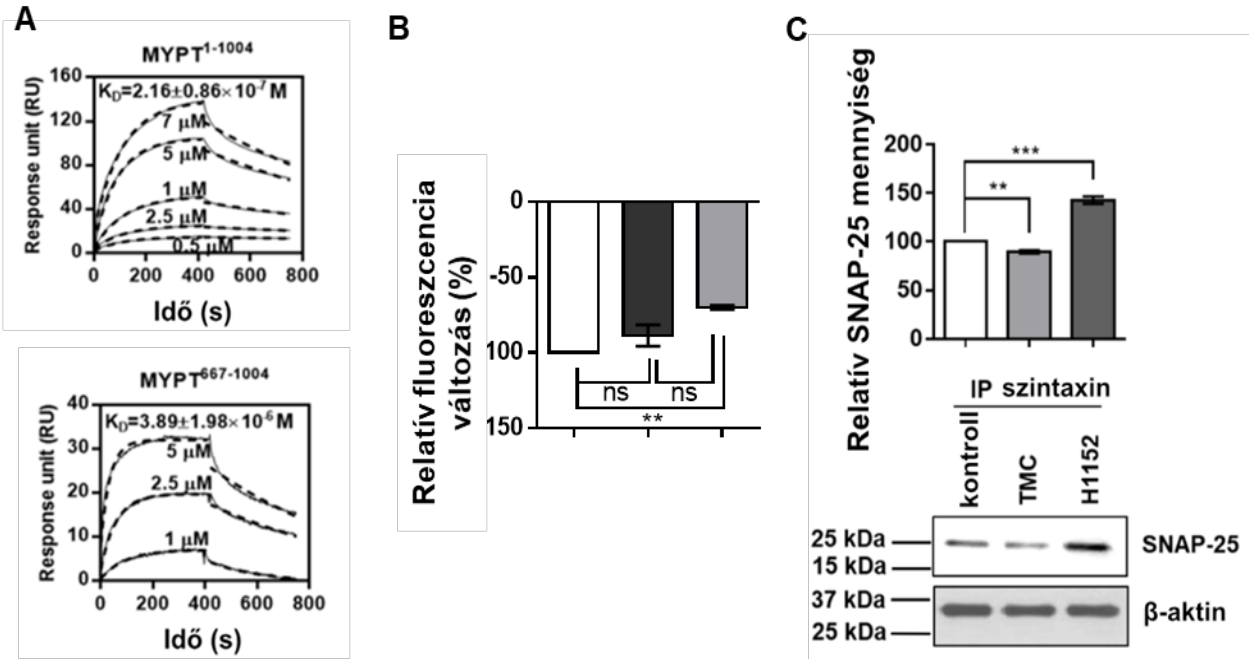


10. ábra A MP és ROK lokalizációja és szerepe az akusztikus ideg- bushy sejt szinapszisokban. (A) A MYPT1 és ROK (piros)-specifikus immunreakciók jelenlétének és eloszlásának konfokális vizsgálata a hallóidegvégződés bokorsejt szinapszisban. *: egy kapilláris keresztmetszete. Szinaptofizin (zöld) jelöli a preszinaptikus végződést. A MYPT1 és szinaptofizin, illetve ROK és szinaptofizin kolokalizációja a jobb szélén látható. A kolokalizációt mutató pixeleket az ImageJ szoftver "Co-localization highlighter" plug-injének segítségével azonosítottuk. A méretarány: 10 μ m. (B) A PPI inhibitor (TMC) és a ROK inhibitor (Y27632), illetve az inhibitorok kombinált alkalmazásának hatása a hallóideg-bokorsejt sejt között kialakult szinapszisban kiváltott excitatorikus posztzinaptikus áramokra (EPSC) (50 Hz). $n = 3-5$. * $p < 0,05$.

A molekuláris mechanizmus feltérképezésére MYPT1 pull down vizsgálatot követő tömegspektrometriás elemzéssel 18 MYPT1 alegységgel kölcsönható szinaptoszómális fehérjét azonosítottunk, amelyek közül a szinapszin-I, a SNAP-25, a szintaxin-1, a calcineurin-A alegység és a Ca^{2+} -kalmodulin függő kináz II kölcsönhatását a MYPT1-gyel koimmunoprecipitációs és pull-down kísérletekkel is megerősítettük [120].

A SNAP-25 fehérje és a MYPT1 szabályozó alegység közötti fehérje-fehérje kölcsönhatását felületi plazmonrezonanciás módszerrel is bizonyítottuk. A SNAP-25 fehérje a különböző hosszúságú MYPT1 mutánsokkal keresztkötött felületére való fecskendezését követően mért szenzorgrammok alapján viszonylag erős kölcsönhatást észleltünk a teljes hosszúságú MYPT1-gyel ($K_d = 2,16 \pm 0,86 \times 10^{-7}$), (11. A. ábra felső panel), azonban a SNAP25 a MYPT1 N- és

C-terminális régióhoz is egyaránt kötődött. A disszociációs állandók alapján azonban egyértelmű preferenciát mutatott a C-terminális régió felé ($K_d=4,25 \pm 3,13 \times 10^{-7}$) (11. A ábra alsó panel).

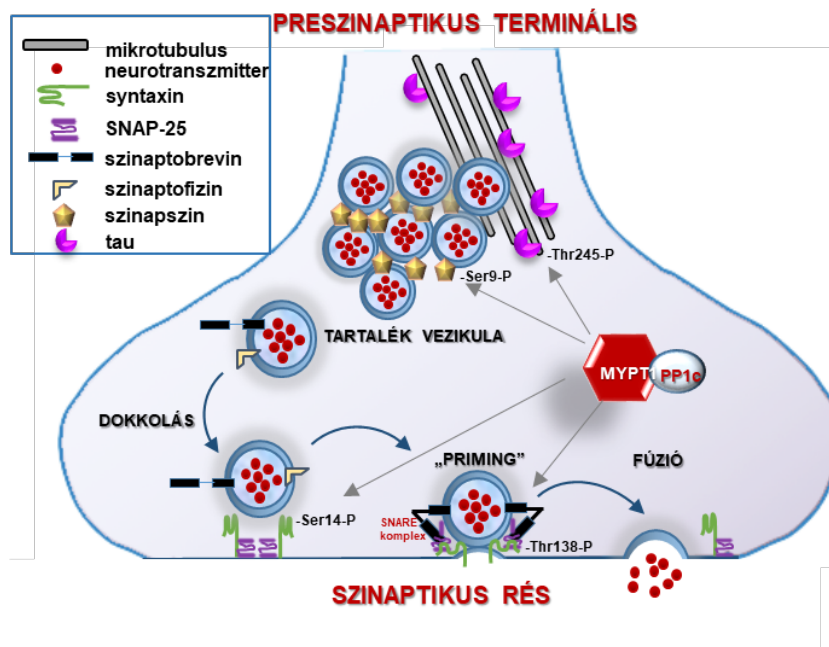


11. ábra. A MP kölcsönhat a SNAP-25 fehérjével, ezáltal elősegíti a neurotranszmitter kibocsátást. (A) Felületi plazmonrezonanciás vizsgálatok céljából a teljes hosszúságú GST-MYPT1¹⁻¹⁰⁰⁴ (A fent) és a C-terminális GST-MYPT1⁶⁶⁷⁻¹⁰⁰⁴ (A lent) fehérjéket GST elleni ellenanyaggal immobilizáltuk a szenzochipre. (B) A MP inhibitor Flag-KEPI fehérje, hatása a neurotranszmitter-kibocsátásra. Flag-peptidet (fekete oszlop) és Flag-KEPI fehérjét (szürke oszlop) juttattunk be a szinaptoszómákba fehérje transzdukcióval, és Exocitózis esszével vizsgáltuk hatásukat a neurotranszmitter-kibocsátásra. A szinaptoszómába bejuttatott, membránkötött FM 2-10 festék fluoreszcencia intenzitása az exocitózis mértékével egyenes arányban csökken. (C). A TMC és H1152 hatása szinaptoszóma preparátumokban a SNAP-25 és a szintaxin kölcsönhatására. A szinaptoszómákat inhibitorokkal kezeltük, lizáltuk, majd elvégeztük az immunprecipitációkat szintaxin elleni antitesttel. A kihúzott fehérjék mennyiségét SNAP-25 elleni antitestekkel detektáltuk. ANOVA: $p < 0,0001$. ($n=3-5$). Átlagok $\pm$ SEM ($n=5$), ANOVA Dunett's post hoc elemzés, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Emellett a TMC növelte, míg az Y27632 csökkentette a MYPT1 Thr696, a miozin-II könnyű lánc Ser19, a szinapszin-I Ser9 és a szintaxin-1 Ser14 foszforilációs szintjét intakt szinaptoszómákban, amelyet szemi-kvantitatív Western blot analízissel igazoltunk. Az eredmények arra utalnak, hogy a PP1M és a ROK szabályozza a preszinaptikus fehérjék foszforilációs állapotát, és ezáltal a neurotranszmissziót [120]. A MP szelektív gátlása Flag-KEPI fehérjével egyértelműen a neurotranszmisszió mértékének csökkenéséhez vezetett, amelyet a membránhoz kötött fluoreszcens festék csökkent változásával igazoltunk (11. ábra B panel).

Továbbá rekombináns fehérjéket használva *in vitro* foszforilációs/defoszforilációs vizsgálatokkal és tömegspektrometriás elemzéssel igazoltuk, hogy a ROK foszforilálja, míg az MP defoszforilálja a SNAP-25 fehérjét annak Thr138 oldalláncán. A MYPT1 csendesítése a B50 neuroblasztóma sejtekben növelte a SNAP-25 foszforilációját a Thr138 aminosavmaradékon. A PP1 tautomicitinnel (TMC) történő gátlása növelte, míg a ROK H1152-vel történő gátlása csökkentette a SNAP-25 Thr138-foszforilációját a B50 sejtekben, agykérgi szinaptoszómákban és agyszeletekben is [110]. Fehérje transzdukcióval a MP-t szelektíven gátló KEPI fehérjét juttatva a kortikális szinaptoszómába a SNAP-25 foszforiláció növekedését és az exocitózis mértékének csökkenését tapasztaltuk, ami arra utal, hogy a MP a SNAP-25 defoszforilációja révén elősegíti a neurotransmitter-kibocsátást. A Flag-KEPI transzdukció hatására a SNAP-25 Thr138 foszforiláció megemelkedett a kontrollhoz képest.

A foszforiláció mértéke és a SNARE komplex elemeinek kölcsönhatása közötti összefüggést is tanulmányoztuk kortikális szinaptoszómában (11. ábra C panel). Ezek alapján a ROK kináz gátlása fokozta, míg a MP foszfatáz gátlása csökkentette a SNAP-25 és a szintaxin közötti kölcsönhatást. Eredményeink alapján a MP a SNAP-25 fehérje Thr138 oldalláncának defoszforilációja által elősegíti az ingerületátvivő anyagok idegsejtekből történő felszabadulását.



12. 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.

Vizsgálatainkat egér agyszeleteken is elvégeztük, és azt tapasztaltuk, hogy a KCl indukált depolarizáció a SNAP-25 Thr138 foszforilációs szint csökkenését eredményezte, amelyet a MP inhibitor szignifikánsan növelt. A fenti eredmények alapján a ROK/MP enzimpár a szinaptikus vezikulumok szállításában, fúziójában és a neurotranszmitter kibocsátás folyamatában antagonisztikusan szabályozza a SNAP25 foszforilációját annak Thr138 oldalláncán leresztüli katalízis során (12. ábra).

5.2. A miozin foszfatáz szerepe a génexpresszió szabályozásban

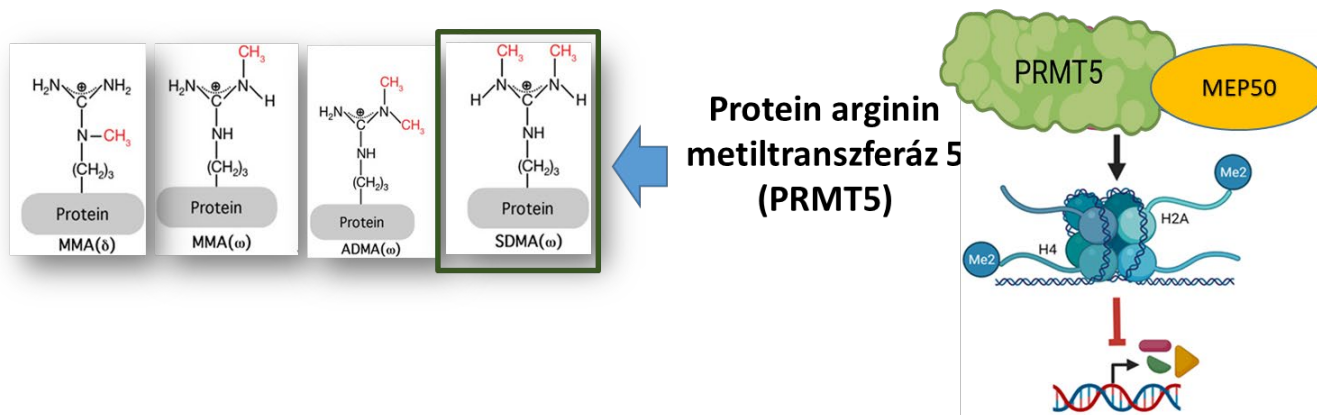
A MP alegységei a citoskeletonon kívüli sejtfrakciókban, így a HepG2 sejtek sejtmagjában és mikroszomális frakciójában [111], valamint neuronális sejtek sejtmagjában is immunreaktivitást adtak [114]. Az egyik nem-citoszkeletális MP szubsztrát a hiszton-deacetiláz 7 (HDAC7), amely a génexpresszió szabályozásában résztvevő transzkripciós komplex tagja, amely többek között a T-limfociták differenciálódásában szerepet játszó Nur77 represszoraként működik [121]. A HDAC7 enzimet a protein kináz D is foszforilálja, ami ezt követően transzlokálódik a citoplazmába, ahol a 14-3-3 fehérjékkel társul. A HDAC7 a citoplazmában a MP holoenzimhez kötődik, amely defoszforilálja a HDAC7 foszfo-Ser oldalláncát és elősegíti a visszatérését a sejtmagba [2].

Az MP másik génexpresszió szabályozó hatása az Nkx2.5 transzkripciós faktor szubcelluláris transzlokalizációján keresztül érvényesül. Az Nkx2.5 a kardiomiogén differenciálódás egyik legkorábbi markere, ami szükséges a szívizomsejtek differenciálódásához. A MP és a Nkx2.5 közötti kölcsönhatását kísérletesen igazolták. A Wnt3a-jelátviteli pálya aktiválja a ROK-t, amely foszforilálja a MYPT1-et a Thr853 gátló foszforilációs helyen, ami a MP transzlokációját okozza a sejtmagba, ahol komplexet képezhet az Nkx2.5-tel. Egy kromoszómarégió-karbantartó 1 (Crm1) -függő útvonalon keresztül a MP az Nkx2.5 sejtmagból citoplazmába történő kijutását indukálja, és így a Nkx2.5 transzkripciós aktivitásának gátlását eredményezi [122].

Bár a fent említett MP szubsztrátok szerepet játszanak a génexpresszió szabályozásában, de valamennyi folyamatban a MP közvetett, a transzkripciós faktorok transzlokációját szabályozó módon hat. A MP közvetlen sejtmagi szerepének és szabályozásának feltérképezése érdekében azonosítottuk a nukleáris MYPT1 interaktomot pull down vizsgálatot követő tömegspektrometriás analízissel, és számos fehérjét, köztük az RNS helikázt, fémion függő protein foszfatáz 1B-t (PPM1B) és a replikációs protein A-t azonosítottunk humán hepatocelluláris karcinóma sejtekből.

Érdekes módon kimutattuk a MYPT1 kölcsönhatását a metiloszóma komplex valamennyi tagjával, így a protein arginin metiltransferáz 5 (PRMT5), MEP50 és PCIn fehérjékkel is [111].

A PRMT5 az arginin guanidin csoportjának metilációs módosítását végző Protein Arginin Metiltransferáz (PRMT) enzimsalád tagja. Ezek közül a PRMT1, -3, -4, -5, -6 és -8 enzimeknek aktivitását már leírták, azonban a PRMT2, -7, -9 enzimek aktivitása még nem bizonyított. A PRMT5 az egyetlen szimmetrikus metiltransferáz aktivitással rendelkező enzim (13. ábra).



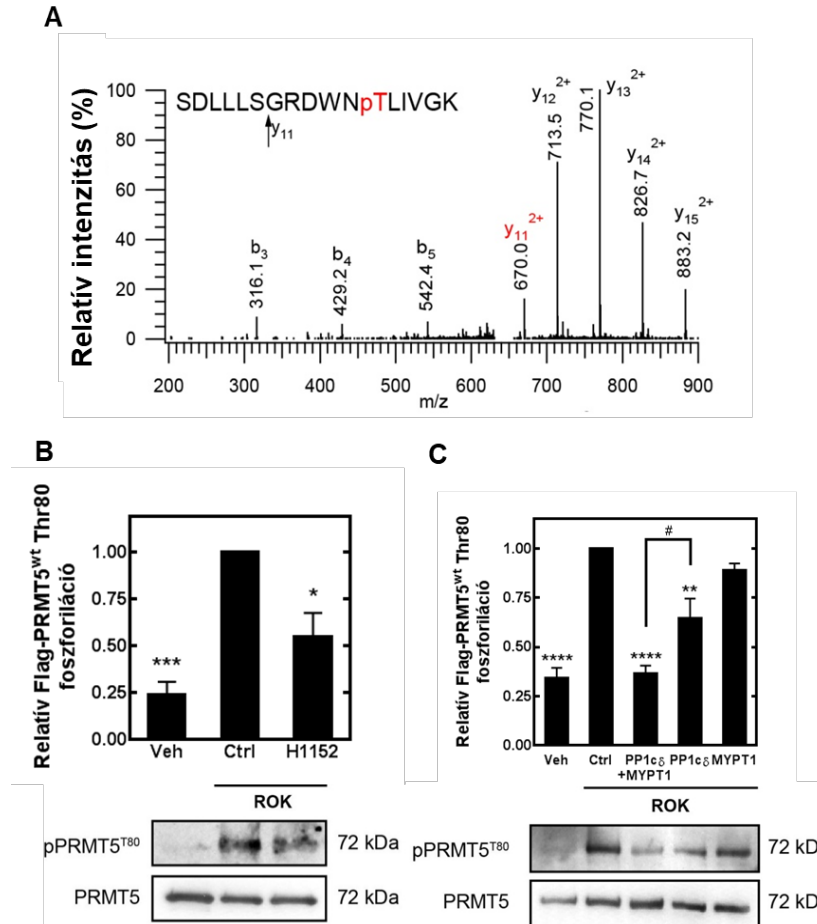
13. ábra. A PRMT5 szimmetrikus dimetilációt katalizál. A protein arginin metiltransferáz enzimsalád (PRMT) tagjai -a PRMT5 kivételével- az arginin különböző N-atomjait monometilálják (MMA δ , ω) vagy aszimmetrikusan dimetilálják (ADMA). SDMA: szimmetrikus arginin dimeiláció. MEP50: methylosome protein 50 vagy más néven WD repeat-containing protein 77.

A PRMT5-nek számos citoszolikus és sejtmagi kölcsönható partnere van, melyek a génexpresszióban, RNS szállításban, valamint a sejten belüli jelátviteli folyamatokban játszanak szerepet. A metiloszóma komplex többek között az Sm fehérjék metilációja révén snRNP-k (small nuclear ribonucleic proteins) biogenezisében játszik szerepet, de a sejtmagban számos, transzkripciós elongációt szabályozó, valamint a kromatin szerkezetét befolyásoló, átrendező faktorokkal kölcsönhatva transzkripciós koaktivátorként működik. Az enzim főbb szubsztrátjai a kromatint fölépítő hisztonfehérjék. A PRMT5 a hiszton H2A és H4 harmadik argininjét szimmetrikusan dimetilálja, ami jelentős génexpresszió gátlást eredményez. A PRMT5 aktivitását befolyásolja a működéshez szükséges partnerek kötődése, így a metiloszóma tagjai: a methylosome protein 50 vagy más néven WD repeat-containing protein 77 (MEP50) és a PLCIn fehérjék. Ez utóbbiak enzimatisz aktivitással nem rendelkeznek, de az enzimkomplex aktivitása a PRMT5 egyéni aktivitásához képest nagyobb [123; 124]. A PRMT5 enzim több szeril-, treonil-, és tirozil oldalláncon foszforilálódhat, így lehetőség van a működésének foszforiláció általi szabályozására [125]. A PRMT5 foszforilációját végző protein kináz enzimekről, és a

defoszforilációt végző protein foszfatáz enzimekről azonban nem állt rendelkezésre információ [123].

Konfokális mikroszkópiával HepG2 sejtekben kimutattuk a MYPT1 sejtmagi és citoplazmatikus kolokalizációját a metiloszóma komplex MEP50 és PRMT5 tagjaival, A kölcsönhatást a Pearson-féle kolokalizációs koefficiens meghatározásával számszerűsítettünk Tömegspektroszkópiás kísérletekben a MEP50 és PICln fehérjék 2-2, míg a PRMT5 8 peptidtalálattal lett azonosítva a Flag-MYPT1 interaktomban. Mivel a PRMT5 felelős a metiloszóma komplex katalitikus aktivitásáért, a továbbiakban a MYPT1 PRMT5 enzimmel való kölcsönhatására koncentráltunk. Immunprecipitációs kísérletekkel igazoltuk a két fehérje közötti kapcsolatot, majd SPR kötődési kísérlettel bizonyítottuk, hogy közvetlenül is kötődnek egymáshoz. A PRMT5 egyaránt asszociálódott a teljes hosszúságú GST-MYPT1¹⁻¹⁰⁰⁴ ($K_a = (1,62 \pm 0,29 \times 10^7) \text{ M}^{-1}$) és az N-terminális His-MYPT1¹⁻⁶³³ fehérjékhez ($K_a = (8,82 \pm 0,31 \times 10^6) \text{ M}^{-1}$), azonban nem kötődött a C-terminális GST-MYPT1⁶⁶⁷⁻¹⁰⁰⁴ fragmentumhoz, ami alapján feltételezhetően a MYPT1 N-terminális szakasza biztosítja a PRMT5 fehérje kötődését.

A MP feltételezett defoszforilációs helyének azonosításához olyan protein kinázokkal végeztünk *in vitro* kináz esszét, amelyek által foszforilált aminosavmaradékokat és környéküket a MP felismerheti. Így rekombináns Flag-PRMT5 fehérjét radioaktív ATP (γ -³²P-ATP) szubsztrát jelenlétében PKA és PKC, illetve ROK enzimek jelenlétében foszforiláltunk, de csak az utóbbi esetén tapasztaltunk szignifikáns foszforilációt. A foszforilált PRMT5 tömegspektrometriás analízisével a PRMT5 fehérje Thr80 oldalláncát azonosítottuk, mint specifikus ROK foszforilációs helyet (14. ábra). Ezután a Thr80 oldallánc ROK-általi foszforilációját *in vitro* kináz esszét követően anti-foszfo-PRMT5^{T80} antitest segítségével Western blot analízissel is igazoltuk. Ezt tovább erősítette az, hogy a PRMT5 Thr80 oldallánc foszforilációja szelektív ROK inhibitor (H1152) jelenlétében közel 50%-kal csökkent.



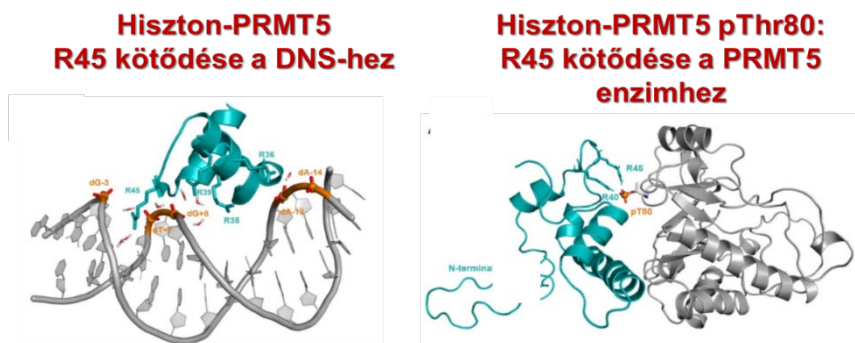
14. ábra. A PRMT5 Thr80 oldalláncát módosítja a ROK/MP enzimpár. A ROK foszforilálja a PRMT5 Thr80 oldalláncát. (A) A PRMT5 foszfopeptidek ioncsapdás ütközésindukált disszociációs (CID) spektrumai. CID m/z: 656,338 (3+) SDLLLSGRDWNpTLIVGK peptidet azonosított, amely a vad típusú fehérje [69-85 aminosavak] peptidjének felel meg. A módosítási helyként a Thr80-at azonosítottuk (lásd az y11 fragmentumiont (foszforilált)). A peptidfragmentumok jelölése a Biemann-féle nomenklatura szerint történt [5]. (B) A ROK-inhibitor (10 μ M H1152) hatása a PRMT5 ROK általi foszforilációjára. A negatív kontroll mintákat ROK hiányában (Veh), a pozitív kontroll mintákat pedig ROK jelenlétében (Ctrl) készítettük. A Thr80 relatív foszforilációs szintjét anti-pPRMT5^{T80} antitesttel, Western blot segítségével határoztuk meg. A PRMT5 blotok belső kontrollként szolgáltak. (C) 25 nM FT-MYPT1 és 5 nM rPP1c δ vagy ezek kombinációjának hatása a PRMT5 Thr80 foszforilációs szintjére Western blot analízis szerint. Az adatokat a ROK-foszforilált PRMT5-tel hasonlítottuk össze. Az értékek átlagok $\pm$ SEM; * p <0,05, ** p <0,01, * p <0,001, **** p <0,0001, # p <0,05, egyirányú ANOVA, majd Tukey-féle többszörös összehasonlító teszt, n =3.**

Továbbá Flag-MYPT1 és rekombináns PP1c δ enzimek együttes alkalmazása esetén ~63%-kal csökkent a foszforilált Flag-PRMT5^{T80} foszforilációs szintje, míg a PP1c δ önmagában csak ~36%-kal csökkentette a Thr80 foszforilációt. A PRMT5 Thr80 oldalláncának PP1c δ általi fokozott

defoszforilációja MYPT1 jelenlétében a MYPT1 célirányító és aktiváló szerepére utal a MP által katalizált defoszforiláció során (14. ábra).

A Thr80 foszforiláció PRMT5 fehérjére gyakorolt hatását az enzim metiltranszferáz aktivitásának mérésével vizsgáltuk *in vitro* kísérletekben. A hiszton H4 és H2A fehérjék Arg3 oldalláncának szimmetrikus dimetilációja csökkent (a H4R3met2 46%-kal és a H2AR3met2 64%-kal) a miozin foszfatáz jelenlétében, míg a PRMT5 fehérjéhez kötődő MEP50 mennyisége nem változott. A PRMT5 aktivitásához szükséges MEP50 kötődését tehát nem befolyásolja a PRMT5 ROK általi foszforilációja.

A PRMT5 foszforilációjának a metiloszóma komplexre kifejtett esetleges hatásait a 4 PRMT5 és 4 MEP50 egységből álló oktamer komplexben kívántuk vizsgálni. Azonban a komplex kristályosítása és szerkezetvizsgálata méretéből adódóan nem volt megoldható. Emiatt kiterjedt molekuladinamikai szimulációkat végeztünk a Pécsi Tudományegyetem Biofizikai Intézetének munkatársai (Hetényi Csaba és Börzsei Rita) segítségével. A nem-foszforilált illetve a Thr80 oldalláncon foszforilált humán PRMT5 és a MEP50 közötti dimer modelljéhez illesztettük a teljes hosszúságú hiszton H4 fehérje modelljét. A teljes hosszúságú hiszton H4-et *in situ* építettük be a humán PRMT5-MEP50 dimerbe, kísérleti H4-fragmentumok felhasználásával, valamint szerkezet- és energiaelemzéseket végeztek a komplexált és az egyedi fehérje partnerekre is. Az eredmények alapján a foszforilált PRMT5 metiltranszferáz aktivitása nagyobb a foszforilálatlan PRMT5 enzimhez képest (15. ábra) [126].



15. ábra. A PRMT5 kizárólag a hiszton 4 szabad formáját metilálja.

Ezzel összhangban azt találtuk, hogy HepG2 sejtekben MYPT1 csendesítés hatására a PRMT5 Thr80 foszforilációja mintegy 46%-kal megemelkedett, és 40%-kal, illetve 45%-kal növekedett a H2AR3 és H4R3 oldalláncok szimmetrikus dimetilációja, míg a hiszton fehérjék mennyisége nem változott. A fenti eredményeket kvantitatív módszerrel is megerősítettük.

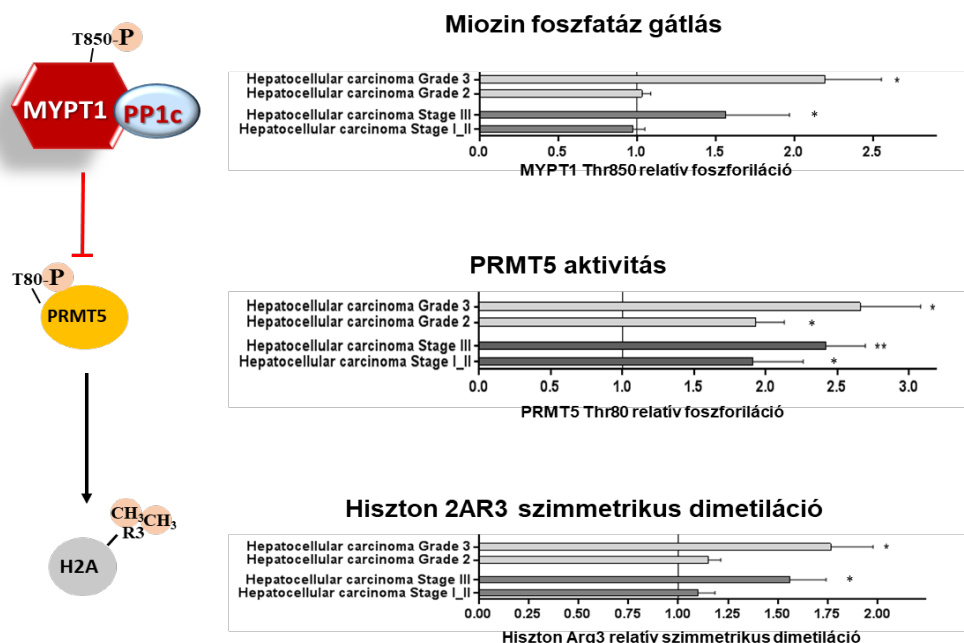
MYPT1 csendesített HepG2 sejtmagi frakciókban a specifikus PRMT5 aktivitás 65%-kal emelkedett a non-target kontroll sejtek magfrakciójához képest. Továbbá, hasonló tendenciát tapasztaltunk MCF7 emlőkarcinóma sejtek magi frakcióiban is az siMYPT1 kezelés hatására. Ezen eredmények arra utaltak, hogy a Thr80 oldallánc a PRMT5 működését szabályozó foszforilációs hely, és hogy foszforiláció hatására emelkedik, míg defoszforiláció hatására csökken az enzim metiltranszferáz aktivitása.

A miozin foszfatáz hiszton fehérjék dimetilációjának szabályozásához kapcsolódó funkciójának pontosabb meghatározására microarray analízist végeztünk az Affymetrix Human Gene 1.0 ST Array alkalmazásával (*Táblázat S1*). A non-target kontroll és siMYPT1 HepG2 sejtekből származó minták összehasonlítása során 2429 gén mutatott megváltozott expressziós mintázatot a két csoport között. A bioinformatikai analízis eredményét különböző szabályozási útvonalakkal összevetve változást mutatott például az RXR-funkció (PPAR α , γ , IL1R, JUN) az LPS/IL-1 útvonal általi gátlása, a C-vitamin antioxidáns hatása (STAT5, MAPK3 and 9), a sejtciklus szabályozása (Not7, PPP2C, CDK2, E2F3, Rb protein) vagy az IL-4 és IL-8 jelátviteli útvonal génjeinek expressziója (*Függelék Táblázat S1*). A MYPT1 csendesítésének eredményeként azt találtuk, hogy az összes érintett gén 39.5%-a kapcsolódik valamilyen daganatos megbetegedéshez, mint pl. limfohaematopoetikus-, máj- vagy emlőrák és vesesejtes karcinóma képződése. Fertőző betegségekhez és fejlődési zavarokhoz kapcsolódó géneket 10,9% -ban és 6,99% -ban azonosítottunk. Emellett számos tumorszuppresszor és transzkripciós faktor expressziója jelentős mértékben csökkent a MYPT1 csendesítés hatására, mint pl. a retinoblasztóma és c-Myc fehérje esetében.

A microarray-elemzés adatai arra mutattak rá, hogy MP csökkent expressziós szintje daganatképződéssel összefüggésbe hozható gének expressziójának változását eredményezte. Emiatt fordított fázisú szöveti array analízist végeztünk húsz hepatocelluláris karcinómában szenvedő beteg mintáján és 15 egyéb daganatos sejtvonal lizátumán az egészséges kontrolljaihoz képest (*16. ábra*). A PRMT5 fehérjeexpressziója a vizsgált daganatos szövetek ~75%-ában növekedést mutatott az egészséges kontrollokhoz képest. A THP-1 monocitikus leukémia és a Raji Burkitt lymphoma sejtek mutatták a legnagyobb növekedést [111]. A PRMT5 relatív foszforilációja a Thr80-on a daganatos szövetek mindegyikében jelentősen megemelkedett, különösen a leukémiás, tüdő-, vastagbél- és emlőrákos karcinómákban, valamint a HCC szövetekben. A MYPT1 relatív expressziója változatos expressziós mintázatot mutatott, azonban

a MP holoenzim aktivitását meghatározó MYPT1 Thr850 gátlóhelyen történő foszforilációjának emelkedését tapasztaltuk szinte minden esetben, így például akár 10-12-szeres emelkedést is detektáltunk az emlő- és tüdőkarcinómákban (16. ábra).

Korábbi vizsgálatok [127] eredményeit alátámasztva a daganatos szövetlízátumokban a hiszton fehérjék emelkedett expresszióját és szimmetrikus dimetilációját igazoltuk. Így a vizsgált

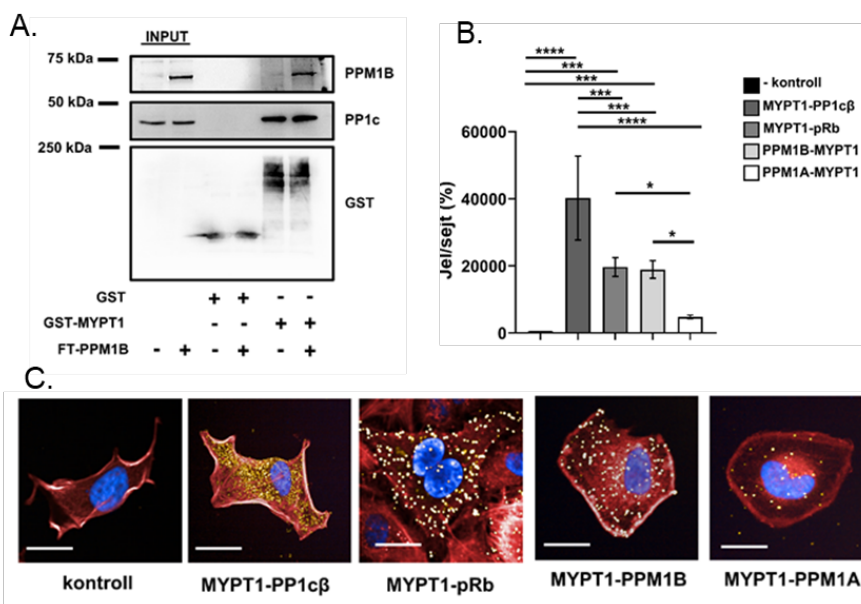


16. ábra. Human hepatocelluláris karcinóma (HCC) biopsziák fehérje expressziós profilja. Fordított fázisú fehérje microarray analízist végeztünk a PRMT5 (felső), MYPT1 (középső) és hiszton H2A (alsó) fehérjék poszttranszlációs módosításának tanulmányozására normál és daganatos human biopsziákban. A humán HCC-mintákat (n=20) a klinikailag igazolt tumor stádium (világisszürke oszlopok) vagy grádus, fokozat (világosszürke oszlopok) besorolása alapján csoportosítottuk. Az értékek az adott fehérje foszforilációjának vagy szimmetrikus dimetilációjának átlagát jelentik a megfelelő nem daganatos mintákhoz képest expressziójukra normalizálva. Az adatok átlagok $\pm$ SEM; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, Student t-próbával.

ráktípusok 88%-a a génexpresszió gátlását eredményező Arg3 szimmetrikus dimetilációs jel emelkedését mutatta, ami a tumorszupresszorok, így a pRb génexpresszió gátlását eredményezte. Méréseink arra utalnak, hogy az MP csökkent aktivitása kapcsolatban áll a PRMT5 megnövekedett aktivitásával és a hiszton fehérjék szimmetrikus dimetilációjával, különösen a hólyag- és vastagbélrákban, az MCF7 emlőrákban, a THP1 monocitás leukémiában, a vese adenokarcinómában és a hepatocelluláris karcinómában. Elemzéseink alapján a PRMT5 foszforilációja és aktiválása, valamint a H4 hiszton arginin-metilációja korrelál a hepatocelluláris karcinóma szövetek grádusával és státuszával (n=20) (16. ábra). A fentiek bizonyították, hogy a

tumorsupresszor útvonalak szabályozásában, a MP a PRMT5 onkoprotein negatív szabályozója. Tehát a MP kettős funkcióval rendelkezik a daganatképződésben, mivel nemcsak a sejtmigrációt és metasztázis kialakulását szabályozó citoskeletális elem, hanem a génexpresszió kulcsfontosságú szabályozójaként is működik, és tumorsupresszor tulajdonságokkal rendelkezik.

Mivel nukleáris lokalizációt csak a MP és a PRMT5 mutat, de ezen enzimek effektora a ROK nem, felmerült a kérdés, hogy mi lehet a MP/PRMT5/hiszton jelátviteli útvonal upstream

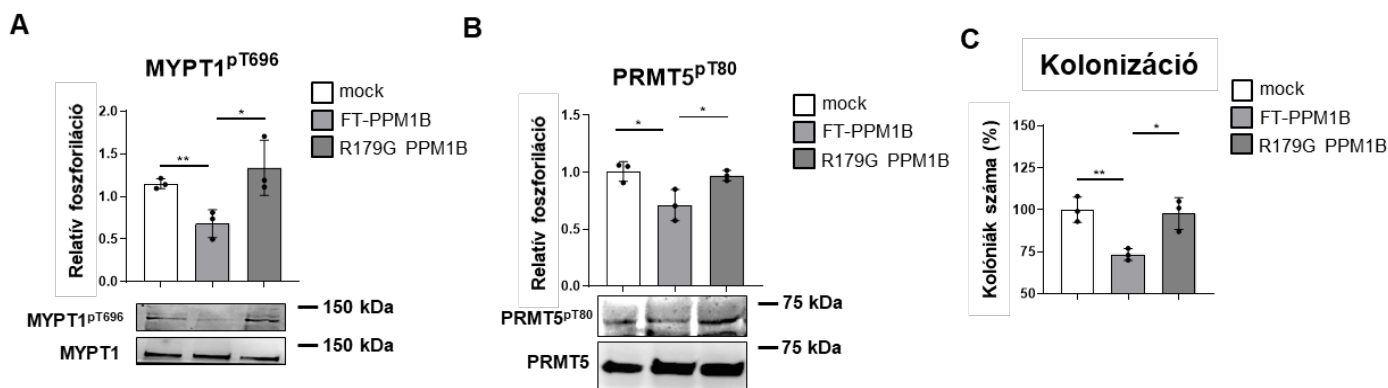


17. ábra: A PPM1B és MYPT1 közötti fehérje-fehérje kölcsönhatás igazolása (A) GST-hez vagy GST-MYPT1-hez kötött Glutathione-Sepharose 4B gyöngyöket inkubáltunk FT-PPM1B transzfektált vagy nem transzfekciót tsA201 sejtizátumokkal. A kölcsönhatást Western blot analízissel detektáltuk anti-GST és anti-Flag antitestek alkalmazásával. A PP1cβ szolgált pozitív kontrollként. **(B)** A MYPT1 és PPM1B közötti kölcsönhatások kvantitatív elemzése Duolink PLA fehérje-fehérje interakciós esszé segítségével. A retinoblasztóma fehérjére (pRb), illetve a PP1cβ-ra specifikus antitestekkel jelölt csoportokat pozitív kontrollként használtuk. Az MYPT1 kölcsönhatását PPM1A antitesttel is vizsgáltuk. Az oszlopdiagram mutatja a Duolink PLA esszé során megjelenített fluoreszcens jelek számát mutatja, sejtszámra normalizálva. A negatív kontroll csoport értékét 100%-nak tekintettük. A csoport átlaga $\pm$ SD ($n=3-9$). A csoportokat egyutas ANOVA segítségével hasonlítottuk össze, ahol (*) $p < 0,05$, (***) $p < 0,001$ és (****) $p \leq 0,0001$. **(C)** Az F-aktint Alexa688 Falloidinnal (piros), a sejtmagokat pedig DAPI-val (kék) festettük meg. A fehérje-fehérje kölcsönhatásokat sárga fluoreszcens jel mutatja. Méretarány: 10 μ m.

szabályozója. Korábbi eredményeink alapján a MYPT1 nukleáris interaktomjában a hiszton és a metiloszóma-komplex tagjain kívül több más fehérjét is leírtunk [111]. A MYPT1 kölcsönható fehérjék között egyetlen katalitikus aktivitással rendelkező fehérjét azonosítottunk tömegspektrometriás elemzéssel, ez pedig a Mg^{2+}/Mn^{2+} -függő fehérje-foszfataz 1 B izoforma

szanguinarinnal (SNG) történő gátlása kivédte a MYPT1 defoszforilációját. A HeLa lizátumok miozin foszfatáz aktivitásának mérése teljes ^{32}P -miozinnal is alátámasztotta ezeket az eredményeket (18. B ábra). A MP enzimaktivitása a PPM1B SNG általi gátlása következtében 23%-os ($p=0,02$) csökkenést mutatott a kezeletlen kontroll 100%-nak vett értékéhez képest. Az OA (okadánsav), amely szelektív protein-foszfatáz 1 és 2A inhibitor, 50 nM-os koncentrációban alkalmazva 29%-os aktivitáscsökkenést ($p=0,04$) eredményezett az MP aktivitásban. Az OA és SNG inhibitorok kombinált alkalmazása additív hatást mutatott, és 40%-os csökkenést eredményezett ($p=0,007$) a kezeletlen kontrollhoz képest. Mivel az OA 50 nM-os koncentrációban csak a PP2A-t gátolja, a PP1-et nem [128], és még 1 μM OA alkalmazása sem befolyásolta a PP1 aktivitását a sejtekben [129], ezért eredményeink alapján elmondható, hogy a MP holoenzim aktivitását nem a PP1c katalitikus alegység közvetlen gátlása módosította, hanem a MYPT1 szabályozó alegység poszttranszlációs módosításán keresztül, közvetett szabályozó elemek, mint pl.: a PP2A vagy PPM1B gátlása csökkentették.

A PPM1B szerepének további validálása érdekében HeLa sejteket transzfektáltunk (19. ábra) a Flag-PPM1B vad típusú (FT-PPM1B) és a foszfatáz-inaktív R179G mutáns formájával (R179G PPM1B) [130]. Egyik overexpressziós körülmény sem befolyásolta a MYPT1 és PRMT5



19. ábra. Az aktív PPM1B és az inaktív R179G mutáns hatása a MYPT1 expressziójára, a MP aktivitására, valamint a HeLa sejtek kolonizációs képességére. Az üres vektor (mock), a vad típusú Flag-PPM1B (WT PPM1B) és a Flag-R179G inaktív PPM1B mutáns (R179G PPM1B) transzfektált HeLa sejtek fehérjéit anti-MYPT1^{pT696} (A), és anti-PRMT5^{pT80} (B) antitestek segítségével Western blot elemzéssel vizsgáltuk. Az értékek átlag $\pm$ SD, $n=3$. A csoportokat párosítatlan t -próbával hasonlítottuk össze két csoport összehasonlítása esetén, vagy egyutas ANOVA-val több csoport összehasonlítása esetén, amelyet Tukey post-hoc teszt követett, ahol $p < 0,05$ (*) és $p < 0,01$ (**). (C) A kontroll, FT-PPM1B és R179G mutáns PPM1B overexpresszáló HeLa sejteket 12 napig tenyésztettük és a festődő kolóniák számából kiszámítottuk a túlélési tényezőt. Az értékek átlaga $\pm$ SD, és $n=3$. A csoportokat egyirányú ANOVA-val hasonlítottuk össze, majd Tukey többszörös összehasonlító teszttel, ahol $p < 0,05$ (*) és $p < 0,01$ (**).

expresszióját. A MYPT1 foszforilációja a Thr696 oldalláncon csökkent a FT-PPM1B jelenlétében, a R179G PPM1B-t overexpresszáló mintákban mért értékekhez képest (19A. ábra). Az MP szubsztrátjának, a PRMT5-nek az aktivitását is befolyásolta az aktív PPM1B jelenléte. A PRMT5 relatív foszforilációja a Thr80 oldalláncon csökkent az FT-PPM1B overexpressziójának hatására, míg az R179G PPM1B mutáns overexpressziója nem volt szignifikáns hatással (19B. ábra).

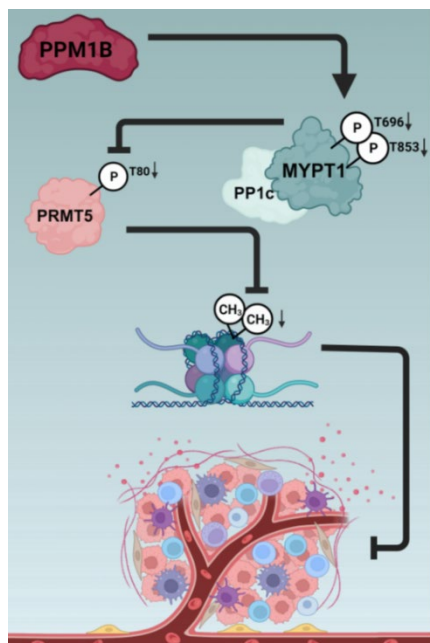
Ezek az eredmények a PPM1B *in vivo* szerepére utalnak a MYPT1 Thr696 gátló foszforilációs helyének szabályozásában és a PRMT5 aktivitására gyakorolt közvetett hatásában. A WT PPM1B és annak foszfataáz-inaktív R179G mutánsának overexpressziója hatásai közötti különbség további igazolására 12 napos kolonizációs vizsgálatot végeztünk. A WT-PPM1B-t overexpresszáló csoport kolonizációs aktivitása 27%-kal csökkent a mock kontrollhoz képest, a mutáns R179G PPM1B overexpressziója pedig gyakorlatilag hatástalan volt, ami az aktív PPM1B gátló szerepét bizonyítja a HeLa sejtek kolóniaképződésében (19C. ábra).

A PPM1B SNG-vel történő gátlása az MP gátlását és a PRMT5 fokozott aktivitását eredményezte, ami a H4 hiszton szimmetrikus dimetilációjának növekedéséhez, és a tumorsuppresszor retinoblasztóma fehérje szintjének csökkenéséhez vezetett HeLa sejtekben. A PPM1B overexpressziója ezekkel ellentétes hatást fejtett ki [112]. Végül a humán méhnyakrák biopsziák az egészséges kontroll mintákhoz képest a PPM1B fehérje teljes eliminációját mutatták. A daganatos biopsziákban megemelkedett a gátló MYPT1^{pT696} és a szabályozó PRMT5^{pT80} aminosavmaradékok foszforilációja, valamint a H4 szimmetrikus dimetilációja, amit a retinoblasztóma fehérje szignifikánsan csökkent expressziója kísért. Ezért a PPM1B/MP tengely tumorsuppresszor szerepét a PRMT5 gátlásán keresztül értelmezzük, ami a H4 arginin-dimetilációja révén szabályozva a génexpressziót [112].

Bár a legtöbb korábbi eredmény azt sugallta, hogy az MP a ROK jelátvitel downstream effektora, egyre több eredmény utal a ROK-független hatására a daganatképzés kialakulásának gátlásában. A MYPT1 stabil Thr696 foszforilációja a daganatképződéssel egyértelmű korrelációját igazoltuk több munkacsoporttal összhangban, akik a MYPT1 mutációit, valamint megváltozott foszforilációját és expresszióját dokumentálták különböző ráktípusokban [131]. Érdekes módon a MYPT1 csökkent expressziója nem mindig kísérte a tumor kialakulását, de a MYPT gátló foszforilációja igen. Ez a jelenség-legalábbis részben- az MP PPM1B-vel történő szabályozásával magyarázható. Érdekes módon azokban a daganattípusokban, ahol a PPM1B downregulációját mutattuk ki, mint például a hólyag-, a gyomor- és a hepatocelluláris karcinóma, csak a MYPT1

gátló foszforilációja mutatott korrelációt, a MYPT1 fehérjeexpressziója nem [111], ami magyarázza az MP tumorszupresszor aktivitását anélkül, hogy a fehérjeexpressziójában bármilyen változás történt volna. Bár ez a hipotézis még további kísérleteket igényel, a miRNS általi szabályozás lehetősége sem zárható ki.

Összességében eredményeink szerint a PPM1B-t a MP új foszfatázaként és az MP/PRMT5/hisztin jelátviteli útvonal upstream szabályozójaként azonosítottuk. Betekintést nyújtottunk abba a molekuláris mechanizmusba, amellyel a PPM1B a miozin foszfatáz aktiválásán keresztül szabályozza a daganatos sejtek kialakulását. A jelátviteli útvonalak szabályozásának



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

részletes megértése új célzott terápia fejlesztésére ad lehetőséget azáltal, hogy a PPM1B enzim új tumorszupresszorként írtuk le. (20. ábra)

5.3. A protein foszfatázok szerepe a bőrszövet homeosztázisának fenntartásában és a patofiziológiai folyamatok molekuláris

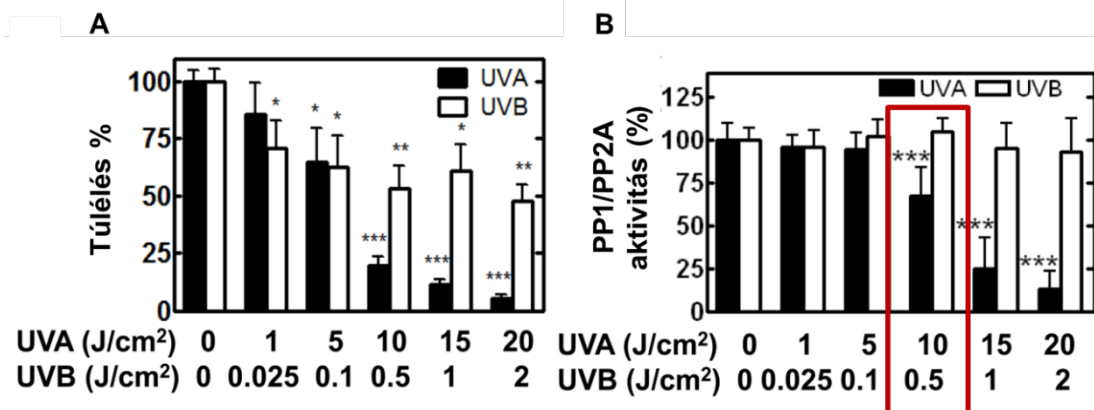
Az emlősök felhámja, a bőr külső rétege létfontosságú határfelületet képez a test és a külvilág között, amely a szervezet első védvonala a kórokozók, az UV-fény és a vegyi anyagok, valamint a mechanikai sérülések ellen. A human bőr három jól elkülöníthető rétegből áll, ezek kívülről befelé haladva az epidermisz, a dermisz és a hipodermisz. A rétegek közül az epidermisz a biológiailag leginkább aktív, mivel a bazális réteg (*stratum basale*) sejtei állandóan osztódva

folyamatosan megújítják azt. Az epitéliális sejtek a tight junction struktúrák által szorosan összekapcsolódva találhatóak az epidermiszben, miközben a bőrfelszín közelében lévő sejtek fokozatosan elszarusodnak és elhalnak [131]. Az epidermisz barrier funkcióját elsősorban ez a terminálisan differenciálódott, sejtmagjukat vesztett keratinocitákból álló elszarusodott réteg (*stratum corneum*) biztosítja [132]. A bazális réteg felett a *stratum spinosum* helyezkedik el, melyet a dezmoszómák kiterjedt hálózata jellemez. A következő réteg a *stratum granulosum*, ahol a sejtek fehérjéket és lipideket magukba záró granulumokat termelnek, melyeket a terminális differenciáció későbbi szakaszában kiürítenek az intercelluláris térbe. A *stratum granulosum* feletti szöveti régióban a sejthalál folyamata felgyorsul, az intracelluláris struktúrák elpusztulnak, és kialakul a teljesen differenciálódott korneocitákból álló *stratum corneum* [133]. Mindegyik kompartment folyamatosan önmegújuláson vagy örökös növekedési cikluson megy keresztül a posztnatalis homeosztatis és regeneratív folyamatok során. A bazális réteg sejtei főként őssejtek vagy proliferatív progenitorok. Miután leválnak az alapmembránról (bazális membrán; BM), kifelé vándorolnak, és egy szorosan szervezett differenciálódási folyamaton mennek keresztül.

A bőrt gyakran érik különböző külső stresszhatások, így UV sugárzás vagy sebképződés, amelyek szöveti sérülést és barrier károsodást eredményeznek. Ezen patomechanizmusok mögött az egyik legfontosabb szabályozási folyamat a fehérjék reverzibilis foszforilációja. A protein Ser/Thr kinázok szerepét már leírták ezekben a folyamatban, [134], de a reverzibilitásért felelős protein foszfatázok közreműködéséről sokkal kevesebbet tudunk. Ennek felderítésére az UV sugárzás által kiváltott patomechanizmusokat és a sebgyógyulás folyamatát vizsgáltam.

A szélsőségesen magas ultraviola (UV) sugárzás káros hatással van a bőrre, mivel bőrpírt, égést, pigmentációt, hiperpláziát, immunszuppressziót, bőröregedést és rákot okoz [135]. Az UV spektrumot három tartományra osztják: UVC (200-290 nm), UVB (290-320 nm) és UVA (320-400 nm). A napfényből a Föld légkörében lévő ózon, oxigén és vízgőz kiszűri az UVC és UVB sugarakat, emiatt az UVA teszi ki a Földet érő ultraibolya sugárzás 95%-át. Az UVA hosszabb hullámhossza miatt a bőrszövet mélyebb rétegeibe hatol, egészen a *dermis*ig, amíg az UVB az *epidermis* rétegében nyelődik el. Az UVA sugárzás reaktív oxigén gyököket (ROS) kelt a sejtekben, amik a lipidek, fehérjék és nukleinsavak sérülést okozzák [135].

Vizsgálatainkban a PP1 és PP2A enzimsaládók szerepét tanulmányoztuk az UV sugárzásra adott sejtválaszokban. A human epidermist modellező HaCaT keratinocitákon és Balb/c egérbőrön a PP1 szelektív gátlószerének, a tautomycin (TM) jelenlétében mértük a sejtek



Minimális Effektív Dózis

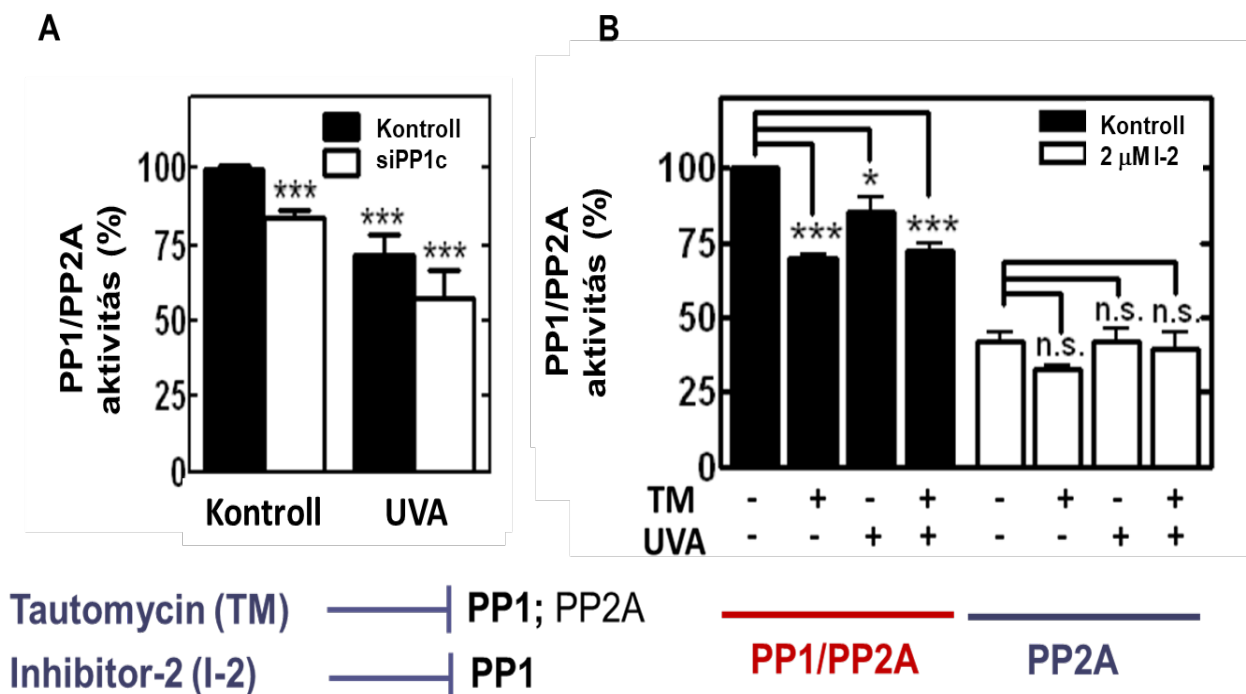
21. ábra. Az UV-sugárzás hatása a HaCaT sejtek életképességére és a protein foszfatázok aktivitására. (a) A sejteket különböző UVA (1-20 J/cm²) és UVB (0,0025-2 J/cm²) dózisokkal sugároztuk be. MTT-méréseket végeztünk a HaCaT-sejtek sejtelétképességének értékelésére az UVA-sugárzás előtt (kontroll) és után. (b). A HaCaT sejteket a jelzett dózisú UVA- vagy UVB-sugárzásnak tettük ki, majd ³²P-MLC20 szubszttráttal vizsgáltuk a PP1 és PP2A foszfatázok együttes specifikus aktivitást. A nem besugárzott sejtek foszfatázaktivitását 100%-nak vettük. n=5 A csoportokat egyirányú ANOVA-val hasonlítottuk össze, majd Tukey többszörös összehasonlító teszttel, ahol p<0,05 (*) és p<0,01 (**).

túlélését, valamint a lizátumban lévő legfontosabb foszfatáz enzimek a PP1 és PP2A aktivitását (21. ábra).

A 10 J/cm² UVA-dózis a HaCaT-sejtek halálát idézte elő, és a foszfatáz aktivitás 30 %-os csökkenését eredményezte, míg az ettől alacsonyabb dózis tartományban az UVA besugárzásnak nem volt hatása. Az UVB sugárzás befolyásolta a foszfatáz aktivitást a vizsgált dózis tartományban. Ezek alapján határoztuk meg a minimális effektív dózist (10 J/cm²) és így a továbbiakban összesen 531 J/cm² dózist alkalmaztuk (21. ábra).

HaCaT sejtekben a PP1c-csendesítés csökkentette a foszfatáz aktivitást és gátolta a sejtek életképességét a kontroll és az UVA besugárzásnak kitett sejtekben (22.A. ábra). Érdekes módon az UVA sugárzás a Ser/Thr PPP enzimesalád másik alcsaládjára, a PP2A enzimekre nem volt hatással, de jelentősen gátolta a PP1 enzimek aktivitását a PP1 család szelektív inhibitora (I-2) jelenlétében végzett mérések szerint (22. B. ábra). Az UVA PP1 enzimre kifejtett hatásának hátterében a katalitikus központban lévő ciszteinil oldalláncok és a fémion(ok) oxidációja állhat, ami az UVA sugárzás során termelődött reaktív oxigén gyökök keletkezésének tulajdonítható [136].

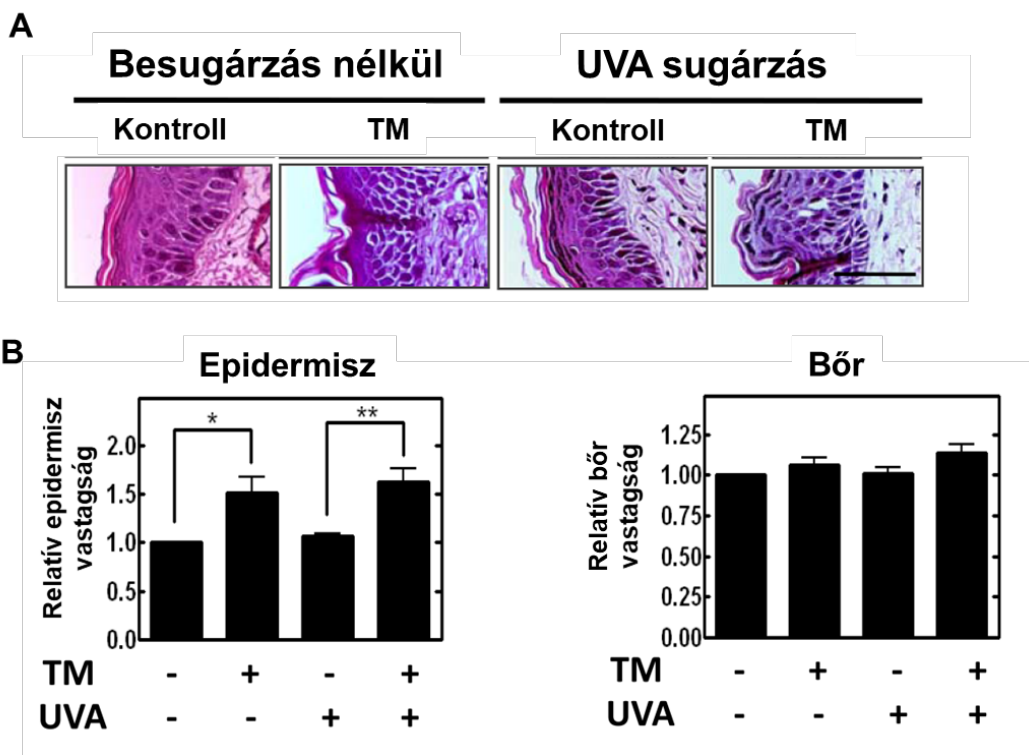
A PP1c-csendesítés és az UVA-sugárzás megváltoztatta a HaCaT sejtek génexpressziós profilját. 19 olyan gént találtunk, amelynek génexpressziója PP1-enzimtől függő módon változott



22. ábra. A PP1 csendesítés és az UVA-sugárzás hatása a HaCaT sejtek életképességére és protein foszfatáz aktivitására. (A) A HaCaT sejteket “non-target” (kontroll) vagy PP1-specifikus siRNS-sel (siPP1) transzfektáltuk, vagy 10 J/cm² UVA-sugárzásnak (UVA) vagy kombinált kezelésnek tettük ki. A lízátumok foszfatáz aktivitását vizsgáltuk. (B) Az 1 μM TM-mel kezelt HaCaT sejtek foszfatáz aktivitását 10 J/cm² UVA besugárzással vagy anélkül vizsgáltuk. A teljes (PP1+PP2A) és a PP2A aktivitásokat 2 μM inhibitor-2 (I-2) hiányában (fekete sávok) és jelenlétében (fehér sávok) mértük. A csoportokat egyirányú ANOVA-val hasonlítottuk össze, majd Tukey többszörös összehasonlító teszttel, ahol $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) és $p < 0,01$ (***).

UVA sugárzás hatására keratinocitákban, így a microarray-analízis a keratin1/10-et, az S100A8 kalciumkötő fehérjét, és a hiszton 1b-t kódoló gének megváltozott expressziós szintjét mutatta ki [137]. Az említett gének expressziójának változását NHEK normál humán keratinocita és TM-kezelt egér bőrmintákon is igazoltunk. A PP1-specifikus gátló TM-kezelt Balb/c egerekben a keratin1/10 és az S100A8 fehérjék szintjének növekedését, valamint a hiszton H1b fehérjék szintjének csökkenését mutattuk ki microarray és fehérje expressziós módszerekkel az UVA-sugárzást követően. Ebből arra következtethetünk, hogy az UVA hatását legalább részben a PP1 aktivitás csökkenése okozta génexpressziós módosulások mediálják.

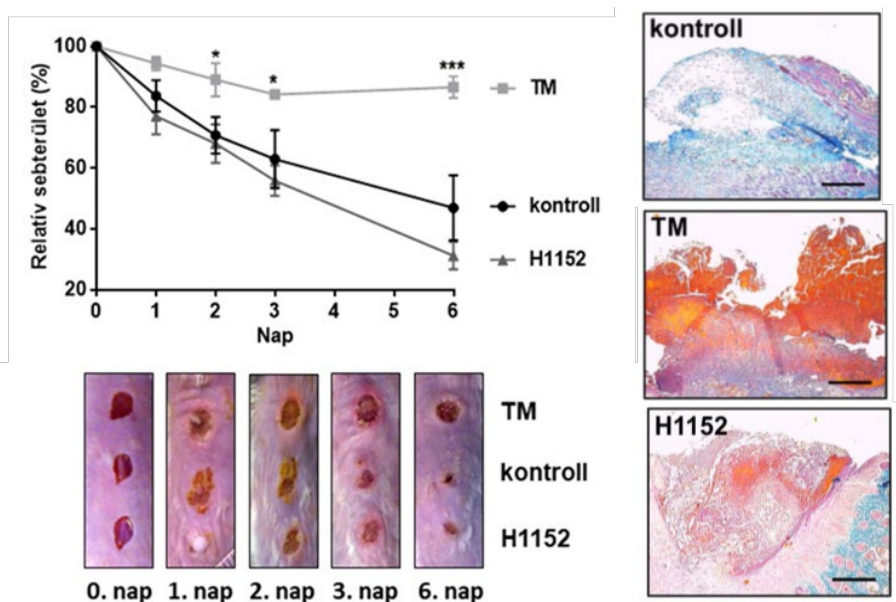
Meglepő módon a PP1 gátlószer önmagában jelentős vastagodást okozott az epidermiszben és UVA kezeléssel kombinálva ez tovább fokozódott, a teljes bőrvastagság szignifikáns változása nélkül (23. ábra). Emellett jelentős hegesedést, fokozott pigmentációt és pruritogén hatást tapasztaltunk.



23. ábra A PPI-gátlás és az UVA-sugárzás hatása az egér háti bőr vastagságára. (A) Nem-besugárzott és UVA-besugárzott egerek háti bőrén kontroll és TM-kezelt felületet jelöltünk meg, majd H&E festés után fénymikroszkóppal dokumentáltuk Méretsáv=20 μ m. (B) A képeket Image J program segítségével elemeztük és ábrázoltuk. és (B). Átlagok $\pm$ SEM párosított t-próba * p <0,05, ** p <0,01. $n=9$ egér).

A protein foszfatázok bőr homeosztázisának szabályozásában nemcsak az UV sugárzás elleni védekezésben játszanak szerepet, de az epidermis sejteinek differenciációjában és az akut, külső környezeti tényezőkre adott válaszokban is. A sebgyógyulás folyamata négy elkülönített fázison át történik: véralvadás, gyulladás, proliferációs fázis és szöveti újrarendeződés (remodelling). Ezek a szakaszok egymás után, de időben átfedő módon, szabályozottan zajlanak le [138]. A seb kialakulása után azonnal megindul a vérzéscsillapítás, a proinflammatorikus citokinek és növekedési faktorok felszabadulása, majd a mikroorganizmusok neutrofil granulociták általi fagocitózisa [139]. A re-epitelizáció folyamata során az epitelsejtek proliferálnak és a seb felszínére vándorolnak, hogy helyreállítsák az epidermisz barrier funkcióját. Az érési fázis során az extracelluláris mátrix újjáépül, szerkezeti felépítése pedig felveszi a normális struktúrát. A sebgyógyulás egyik fontos történése a re-epitelizáció, mely a seb környékén található keratinociták proliferációját, migrációját és differenciációját foglalja magában. A proliferáció és a migráció eseményei térben elkülönülnek egymástól: a sebszél közvetlen

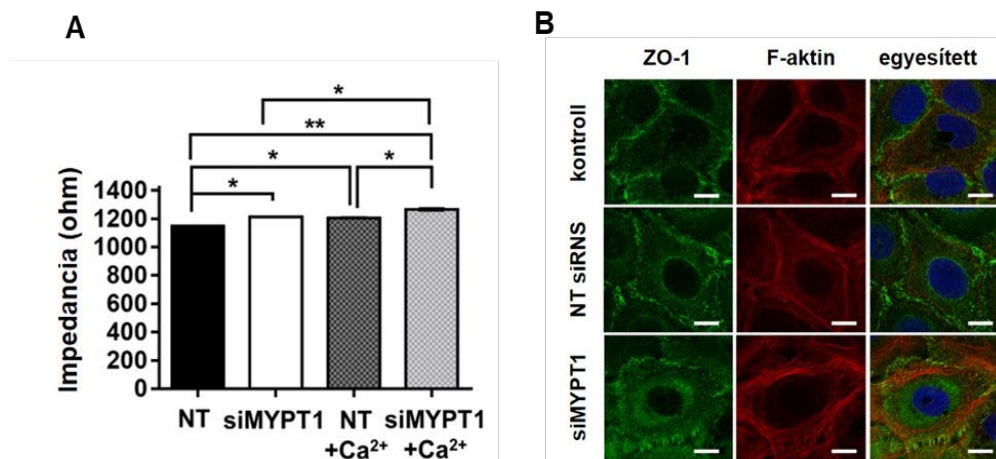
közelében lévő sejtek migrálnak, míg az attól távolabb lévő keratinociták proliferálnak [140]. A re-epitelizáció szabályozásában számos növekedési faktor vesz részt.



24. ábra: A PP1 gátlása megakadályozza az egérbőrön ejtett sebek gyógyulását. Relatív sebterület mérete az egyes kezelések és a sebzés óta eltelt napok függvényében. $n=6$, kiértékelés kétutas ANOVA-val és post-hoc Dunnett-tesztel. $*p<0,05$; $***p<0,001$. (bal fent) A sebekről készült fényképek reprezentatív minták. Egérbőrből kimetszett sebminták trikróm festése a re-epitelizáció tanulmányozására a sebzés utáni 6. napon Masson-Goldner eljárással. (jobb oldali panelek) A sejtmagok sötétbarnák, a citoplazma és az izmok téglavörösen festődnek, míg a kötőszövet és a nyálkahártya kék. Méretskála hossza: 300 μm .

Korábbi munkánk szerint a protein foszfatázok és kinázok is jelentős szerepet játszanak a folyamatban [141]. A foszfatázok szerepének pontos kivizsgálása érdekében HaCaT sejteket okadánsavval és kalikulin-A-val kezeltünk és karcólási esszével vizsgáltuk a sejt migrációt. Azt tapasztaltuk, hogy a PP1 és a PP2A együttes gátlása lassította a migrációt. A PP1 és a ROK sebzáródásban játszott szerepét egerek hátbőrén ejtett sebek TM és H1152 inhibitorokkal történő kezelésével tanulmányoztuk. A TM, a PP1 inhibitora a sebgyógyulás teljes elmaradását eredményezte és a trikróm festés szerint a re-epitelizáció folyamatának teljes leállítását eredményezte (24. ábra).

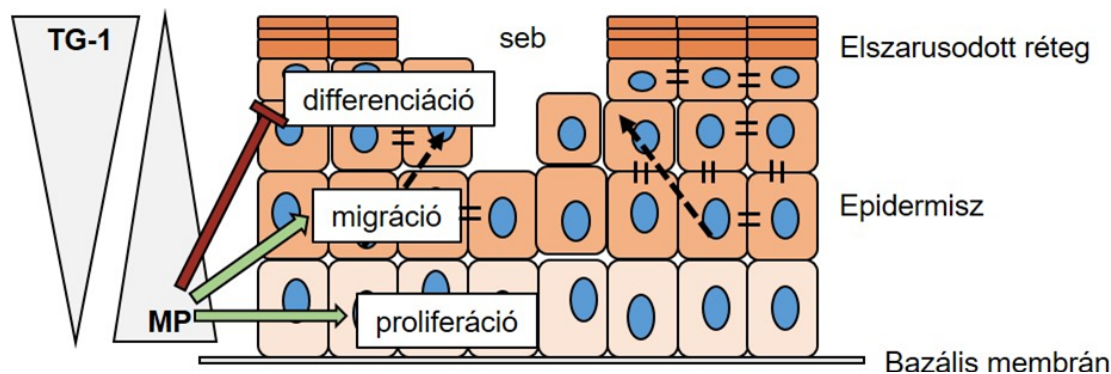
Mivel a PP1 enzimsaládon belül a MP specifikus hatását kívántuk vizsgálni, ezért nemcsak a PP1 gátlószereit alkalmaztuk, de a MYPT1 szabályozó alegység csendesítését is elvégeztük. Humán keratinocita (HaCaT) sejtek migrációját karcólási esszével tanulmányozva azt tapasztaltuk, hogy a TM, valamint a MYPT1 csendesítése szignifikánsan lassította, míg a ROK inhibitora, a H1152 gyorsította a sebzáródást [1]. A MYPT1 csendesítése és a keratinociták barrier



25. ábra: *A MYPT1 csendesítés hatása humán keratinociták közötti sejt-sejtkapcsolatokra. (A) Differenciálatlan és kalciummal differenciáltatott (+Ca²⁺) HaCaT sejteket non-target (NT), illetve siMYPT1 plazmidokkal transzfektáltunk, és ECIS készülékkel mértük az impedanciát. A statisztikai elemzést kétutas ANOVA-val és post hoc Tukey-tesztel végeztük. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, ns: nem szignifikáns. (B) HaCaT sejtek immunfluoreszcenciás festése (B) anti-zonula 1 (ZO1) antitesttel (zöld), illetve fluoreszcensen jelölt Texas Red-X phalloidinnel az F-aktin (piros) kimutatására. A sejtamgokat (kék) DAPI-val festettük meg. A sejteket siRNS-sel transzfektáltuk. a méretskála: 10 μ m.*

funkciójára is hatással volt (25.A. ábra), azáltal, hogy gátolta a sejt-sejt adhéziót, amit az ECIS módszerrel mérhető impedancia növekedése igazolt. A MP alegység csendesítése gyengítette a keratinociták közötti sejt-sejt kapcsolatot. Látható, hogy a két sejt közötti membránszakasz egymástól szakaszosan elvált, a zonula 1 (ZO-1) membránmarker festődése szakaszossá és heterogénné vált (25. ábra B panel zöld).

Bár a MP csendesítése jelentős fiziológiai hatást váltott ki, de a háttérben álló molekuláris mechanizmus még jellemzésre várt. Mivel a fentiekben részletezett módon már meghatároztuk a PP1 enzimektől függő géneket [137], ezért a keratinociták migrációjával, proliferációjával vagy differenciációjával, illetőleg a sebgyógyulással összefüggésbe hozható géneket vizsgáltuk MYPT csendesítés hatására. Megállapítottuk, hogy az S100A8, low density lipoprotein receptor, vanilloid receptor-1, transzglutamináz-1, továbbá a keratin-1 és a keratin-10 fehérjék közül egyedül a transzglutamináz-1 (TG1) expressziós szintje mutatott szignifikáns eltérést a siMYPT mintákban. Míg a keratin-1 és -10 a korai terminális differenciáció markerei, addig a TG1 a *granulosum* és a *stratum corneum* érett keratinocitáiban expresszálódik, és a késői terminális differenciáció indikátorai [142]. A TG1 enzim egyes fehérjék (pl. involucrin, lorikrin) közötti γ -glutamil- ϵ -lizin izopeptid kötések kialakítása által elősegíti az úgynevezett elszarusodó sejtboríték, plazmamembrán alatt található fehérjeréteg – létrejöttét a differenciálódó keratinocitákban.



26. ábra A miozin foszfatáz sebzáródásban betöltött szerepe. A MP serkenti a keratinociták proliferációját és migrációját (zöld nyilak), míg gátolja a differenciációjukat (piros nyíl). Az enzim az alsóbb, osztódó és vándorló sejteket tartalmazó rétegekben aktív, míg a felsőbb rétegekben expressziója gátlódik, ezzel párhuzamosan pedig a TG-1 expresszió fokozódik, ami hozzájárul a hámsejtek terminális differenciációjához. (módosított ábra: [1].)

Vizsgálataink egyediségét az adja, hogy a normal és HaCat immortalizált keratinociták és egér bőrön végzett kísérletek mellett sebészeti úton eltávolított *ex vivo* human bőrön is elvégeztük a MYPT1 csendesítési kísérletet. Mind HaCaT sejtekben, mind *ex vivo* bőrszövetben a MYPT1-csengesítés fokozta a transzgultamináz-1 (TG1) expressziót. A normál bőrben a MYPT1 inkább az epidermisz mélyebb rétegeiben található meg, míg a TG1 elsősorban a *stratum granulosum*ban és *stratum spinosum*ban. Sebzés hatására a bazális rétegben még erősebb MYPT1 festődést tapasztaltunk, a TG1 pedig a bazális réteget kivéve az epidermisz valamennyi rétegében expresszáldott. Elképzelésünk szerint a bazális rétegben a MP elősegíti a sejtek proliferációját és migrációját, illetve a TG1 downregulációjával meggátolja a differenciációt (26. ábra).

A külső sejtrétegekben (*stratum granulosum*) a MYPT1 expressziója lecsökken, a TG1-é pedig megemelkedik, és így járul hozzá a keratinociták differenciációjához és a bőr elszarusodásához. MYPT-csengesített *ex vivo* humán bőrszövetek lizátumait humán foszfo-MAPK array-vel vizsgáltunk, és így a MYPT1-től függő foszforilációs állapotváltozásokról kaphattunk képet. Vizsgálati eredményünk az Akt jelátviteli útvonal és a hsp27 fehérje upstream regulátorainak jelentős változását mutatta. A hsp27 különféle sejtfolyamatokat szabályoz. A felsőbb, granuláris rétegekben foszforiláltabb formában fordul elő [143], és ismert, hogy expressziója és foszforilációja szükséges a keratinociták differenciációjához és a megfelelően rétegzett epidermisz kialakulásához [144]. Ezek alapján lehetséges, hogy az epidermisz felsőbb rétegében a downregulálódó MP-zal párhuzamosan aktiválódó Hsp27 segíti elő a differenciációt (26. ábra).

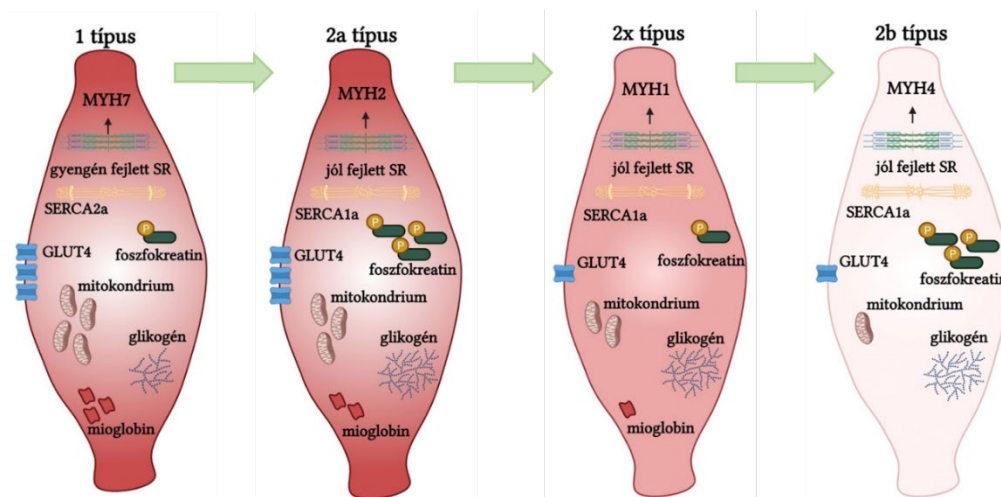
Ezek az adatok arra utalnak, hogy a PP1 enzimes család, azon belül is a MP kiemelt jelentőségű az epidermis homeosztázisának fenntartásában nemcsak az UV sugárzás elleni védelemben, de az a keratinociták proliferációjának és migrációjának előmozdítása révén, így ez az enzim potenciális célpontnak tekinthető a sebgyógyulás zavaraiával összefüggésben lévő betegségek (fibrózis, szaruhártya betegségek, krónikus fekélyek) kezelésében.

5.4. Az SMTNL1 kettős hatásmechanizmusa: citoskeletális regulátor és transzkripciós kofaktor

5.4.1. A vázizom felépítése és plaszticitása

A szervezet fiziológias (például a terhesség vagy edzés) és patológiás változásainak hatására a sima- és vázizomzat jelentős átalakuláson megy keresztül. Minden állapotot a strukturális, kontraktilis és receptorfehérjék egyedi készletének kifejeződése jellemez, amelyek a génexpresszió különböző mintázataival korrelálnak. A vázizom alapvető szerkezeti egysége a többmagvú, harántcsíkolt izomrost. Az emlősök vázizomrostjainak 4 fő típusát a 27. ábra szemlélteti. Az 1 típusú lassú, a 2a típusú gyors oxidatív és a 2b típusú gyors glikolitikusabb rostok aránya változik, ami kihatással van az izomzat kontraktilis sajátosságai mellett a szervezet anyagcsere folyamataira is. A 2x típusú rostok átmeneti rosttípust jeleznek. Rágcsálók esetében a különböző típusú izomrostokat arab számmal, míg a humán eredetű izomrost típusokat római számmal szokás jelölni, disszertációm megírásakor én is ezt a jelölést követtem.

A kisebb átmérőjű 1-es típusú rostok miozin nehézlánc 1 fehérjét (MyHC 1) és 2a típusú Ca^{2+} -ATPázt (SERCA2a) expresszálnak, lassú összehúzódásúak, nem fáradékonyak, szarkoplazmás retikulumuk gyengén fejlett. Mitokondriumban gazdagok és kiterjedt kapilláris hálózattal rendelkeznek. A szarkoplazmában lévő nagy mennyiségű mioglobin adja jellegzetes vörös színüket. Ezen felül magas trigliceridtartalom és a szarkoplazma alacsony glikogéntartalma jellemzi (27. ábra). Döntően aerob anyagcserét folytatnak, melynek üzemanyaga a glikolízisből származó piruvátból a piruvát dehidrogenáz (PDH) enzim aktivitása nyomán előállított, vagy a szabad zsírsavak β -oxidációjából keletkező acetyl-CoA, amely a mitokondriális oxidatív foszforilációban hasznosul. A folyamat során 36-38 mol ATP/mol glükóz keletkezik,



Miozin nehézlánc (MyHC)	1	2a	2x	2b
Kontrakció/relaxáció	lassú	gyors	gyorsabb	leggyorsabb
Anyagcsere	aerob	anaerob	anaerob	anaerob
Oxidatív kapacitás	magas	magas	közepes	alacsony
Glikolitikus kapacitás	alacsony	magas	magasabb	legmagasabb
Fáradékonyság	nem fáradékony	kevésbé fáradékony	közepesen fáradékony	nagyon fáradékony

27. ábra: A vázizmot felépítő különböző típusú rostok összehasonlítása.

amely biztosítja a kontrakció teljes ATP igényének hosszútávú fedezését. Ezzel szemben glikolitikus kapacitásuk és foszfokreatin szintjük alacsony [145; 146] (27. ábra).

A nagyobb átmérőjű 2-es típusú rostok gyors összehúzódásúak, szarkoplazmás retikulumuk jól fejlett, SERCA1a-t expresszálnak és a rostokat kevésbé dús kapilláris hálózat veszi körül az 1-es típusú rostokhoz képest. Energiaszükségletüket anaerob glikolízisből fedezik, amely energetikailag kedvezőtlen, de gyors módja az ATP előállításának (2-3 mol ATP/mol glükóz). Az ehhez szükséges glükóz az extracelluláris térből vagy a szarkoplazmában raktározott glikogénből származik, a folyamat végterméke a laktát. A fehér színű, miozin nehézlánc 2b-t (MyHC 2b) expresszáló 2b típusú rostok igen magas glikogén- és foszfokreatintartalmuknak köszönhetően nagy erő kifejtésre képesek, de ehhez kevés és kisméretű mitokondrium társul, ezért intenzív igénybevétel esetén hamar kifáradnak (27. ábra). Ezzel szemben a rózsaszín, miozin nehézlánc 2a-t (MyHC 2a) expresszáló 2a típusú rostok oxidatív és glikolitikus kapacitása egyaránt nagy (a magas mitokondrium-, foszfokreatin- és mioglobin tartalomnak köszönhetően), ennél fogva kevésbé fáradékonyak, de kisebb erő kifejtésre képesek a 2b típusú rostokhoz képest (27. ábra). A humán vázizmokban az MyHC 2b nem detektálható, annak ellenére, hogy a fehérjét kódoló gén (Myh4) megtalálható a genomban. A 4 rosttípus közül a legkésőbb fedezték fel a miozin nehézlánc

2x (MyHC 2x) fehérjét expresszáló 2x típusú rostokat, amelyek tulajdonságaikat tekintve átmenetet képeznek a 2a és 2b típusú rostok között (7. ábra). Érdekes megjegyezni, hogy a patkány és egér 2x típusú rostokkal ellentétben a humán IIX típusú rostok rendelkeznek a legalacsonyabb oxidatív kapacitással [145; 147]. Bár léteznek olyan izmok, melyek szinte kizárólag egyféle rosttípusból épülnek fel, pl. a rágcsálók *m. soleus* izma (1-es típus), a legtöbb emlős vázizomban az 1-es és 2-es típusú rostok változatos kombinációja figyelhető meg, és az expresszált MyHC fehérjék minősége és mennyisége jellemző az adott izomra. Az érett vázizomrost MyHC összetétele és ezáltal a fenotípusa dinamikusan változik, amit a beidegzésük és a szervezet működésében betöltött funkciójuk mellett számos hormonális faktor -különösképpen a pajzsmirigyhormonok- befolyásolhat. Az 1-es típusú rostokra jellemző lassú fenotípus kialakításáért és fenntartásáért nagyrészt a beidegző motorneuronoktól szinte folyamatosan érkező alacsony frekvenciájú stimulusok felelősek, míg a 2-es típusú rostok gyors fenotípusára jellemző tulajdonságok megjelenését a beidegzés kevésbé befolyásolja [148; 149]. A pajzsmirigyhormonok a beidegzéssel ellentétes hatást fejtenek ki, ugyanis a gyors fenotípusra jellemző kontraktilis fehérjék expressziójának transzkripciós szintű szabályozása révén a 2-es típusú rostok kialakulását indukálják. Hormonhatásra az izotípus arány az 1-es típusú rostoktól a 2-es típusú rostok felé tolódik el (27. ábra). A vázizom izotípusa az izomzat testtömeghez viszonyított magas aránya miatt meghatározza nemcsak a kontraktilis sajátosságokat, de a teljes szervezet anyagcseréjét is

Az előző fejezetekben ismertetett módon a MP egyik potenciális regulátora az SMTNL1. Azt, hogy a MP aktivitását az SMTNL1 gátolja, már korábban kimutattuk teljes miozin és az izolált miozin könnyű lánc szubsztrátokkal is *in vitro* [27, 28]. Továbbá, leírtuk azt is, hogy az SMTNL1 a vázizomban specifikusan expresszálódik a 2a típusú adaptív rostokban, és hogy a gén deléciója elősegíti e rostok számának megnövekedését. Eredményeink arra utaltak, hogy az SMTNL1 mind a vázizom, mind az érrendszeri plaszticitás közvetítésében szerepet játszik [28]. Az SMTNL1 KO egerekkel végzett vizsgálatok során számos nemhez kapcsolódó különbséget figyeltünk meg [28]. Így például a mozgásszegény és edzett nőstény SMTNL1 KO egerek érrendszeri simaizomzata jelentősebb változásokat mutatott adrenerg agonisták hatására, mint hím alomtársaiké. Az edzés az SMTNL1 expressziójának nagyobb mértékű csökkenését eredményezte a nőstényekben, mint a hímekben. A hím SMTNL1 KO egerek harántcsíkolt izmai nagyobb hajlamot mutattak az oxidatív fenotípusra való átállásra. Ezek az eredmények együttesen azt sugallták, hogy az SMTNL1 szerepet játszik a nemi hormonok hatásának közvetítésében mind az

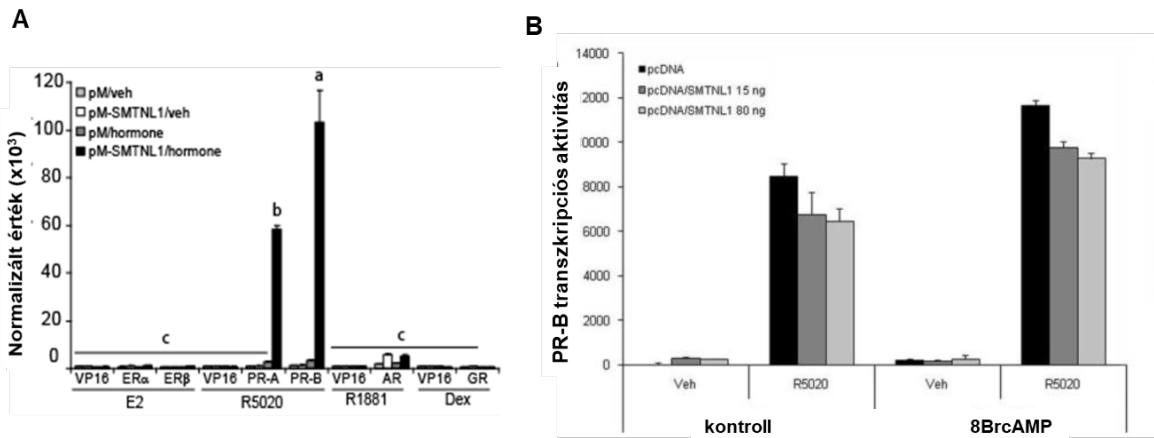
érrendszeri, mind a vázizomzat plaszticitásában. Disszertációmban az ezzel kapcsolatos újabb vizsgálataink eredményeit ismertetem.

5.4.2. Az SMTNL1 a progeszteron receptor koregulátora szteroidhormon függő szövetekben

A kérdés, miszerint milyen molekuláris mechanizmussal szabályozza az SMTNL1 az izom adaptációs folyamatait a női nemi hormonok hatására, még megválaszolatlan maradt. Ennek felderítésére sejt kultúrában, SMTNL1 KO állatmodellen és humán vázizom mintákon végeztünk vizsgálatokat. Korábbi munkánk alapján már ismert volt, hogy az SMTNL1 fehérjét a PKA és PKB foszforilálja az N-terminálishoz közeli calponin homológ domén közelében található Ser301-es oldalláncon, és β -adrenerg stimulációt követően az SMTNL1 citoplazmából a sejtmagba ifányuló transzlokációját mutat [100; 101]. Az SMTNL1 overexpresszáló HeLa sejtekben a defoszforilált SMTNL1 fehérje a citoszolban halmozódik fel, de a PKA aktiválását (8BrcAMP) követően az foszforilációja megnő és a sejtmagba transzlokálódik. A foszforiláció feltehetően olyan változást idéz elő a fehérje konformációjában, amely a foszforilációs helytől N-terminálisan elhelyezkedő, a fehérje defoszforilált állapotában nem hozzáférhető sejtmagi lokalizációs szignált exponálja. A foszforilációs hely szerin aminosavának alaninná mutálása blokkolta a SMTNL1 transzlokációját a sejtmagba [102].

Emlős kéthibrid rendszerben és koimmunprecipitációs kísérletekkel összesen 3 különböző sejtvonalban (HepG2, 293T, T47D) igazoltuk, hogy foszforilációját és a sejtmagba való transzlokációját követően a SMTNL1 szelektíven és ligandfüggő módon, csak a progeszteron receptorhoz (PR) kötődik (28. ábra A panel). Ezzel bizonyítottuk, hogy az SMTNL1 a sejtmagban transzkripció koregulátorként funkcionálva gátolja a PR által szabályozott gének kifejeződését [150].

Az SMTNL1 ligandumfüggő kötődése a PR-hoz az SMTNL1 1-230 aminosavat tartalmazó régiója és a PR 1-722 régiója között alakult ki. A két fehérje közötti fiziológiai kapcsolatot globális génexpressziós és transzkripció riporter vizsgálatokkal is igazoltuk vad típusú és *smtnl1*^{-/-}



28. ábra. Az SMTNL1 köti és szabályozza a progeszteron receptort. (A) HepG2 sejteket transzfektáltunk és emlős kéthibrid vizsgálatot végeztünk ösztrogén receptor (ER α és β izoforma), progeszteron receptor A és B (PR-A és B), androgen receptor (AR) illetve glikokortikoid receptorokkal (GR). A sejteket 24 óra elteltével a receptorok megfelelő szintetikus liganumaival kezeltük (E2: ösztrogén, R5020: medroxyprogeszteron, R1881: tesztoszteron, Dex: dexametozon) majd ezt követően luciferáz és β -gal vizsgálatokhoz gyűjtöttük be őket. pM: üres plazmimid; pM-SMTNL1: human SMTNL1 gént tartalmazó plazmid; veh.: vivőanyag (B) Az SMTNL1 koncentráció függését és a cAMP hatását vizsgáltuk a PR-B transzkripció aktivitására. HeLa sejteket HeLa sejteket PR-B expressziós vektorral transzfektáltunk SMTNL1 expressziós vektor nélkül (0 ng) vagy növekvő koncentrációval (75, 150 és 300 ng) az MMTV-luciferáz riporter plazmiddal együtt. A transzekciót követően a sejteket 24 órán át inkubáltuk hordozóval vagy 10 nM R5020-mal 8Br-cAMP (10 nM-1mM) jelenlétében, majd a sejteket luciferáz és β -gal aktivitását mértük. $n = 3 \pm SEM$

vemhes és nem vemhes egereken, valamint kontroll és RNS-interferenciával csendesített progeszteron érzékeny sejt vonalakon. A hormonkötő régió meglétét kiemelt jelentőségűnek találtuk a fehérjék közötti kölcsönhatás kialakulásában (PR 632-687 régió [151]) de az emlős kéthibrid vizsgálatok alapján ez nem volt elégséges a stabil interakció kialakulásához. Az SMTNL1 koncentrációfüggő módon gátolta a PR transzkripció aktivitását, és ehhez a progeszteronon kívül az SMTNL1 Ser301 foszforilációját kiváltó 8Br-cAMP agonista kezelésre is szükség volt (28. B. ábra). Ez a terhesség során a Ser301 oldalláncon történő foszforilációt követő SMTNL1 sejtmagi transzlokációjához és az az SMTNL1 kofaktorkénti működéséhez volt szükséges. Microarray vizsgálatok alapján az SMTNL1 kontraktilis elemek, sejtmagi receptorok, anyagcsere enzimek és maga a *mypt1* génexpresszióját is modulálta (<https://discovery.genome.duke.edu/express/resources/2419>). Kísérleteink alapján bizonyítottá vált, hogy az endometriális simaizom kontrakcióval kapcsolatos és progesztinérzékeny gének (oxitocin receptor, connexin 43 és ciklooxygenáz-2) és a prolaktinok génexpressziója csökkent vemhes SMTNL1 KO egerekben. Ez azt sugallja, hogy az SMTNL1 a PR-B jelátvitel

bifunkcionális társszabályozója, és így egy olyan molekuláris mechanizmust biztosít, amelynek révén a PR-B célzottan megváltoztatja a génexpressziós mintázatokat az simaizom sejteken belül, hogy koordináltan elősegítse a simaizom funkció változását a terhesség alatt.

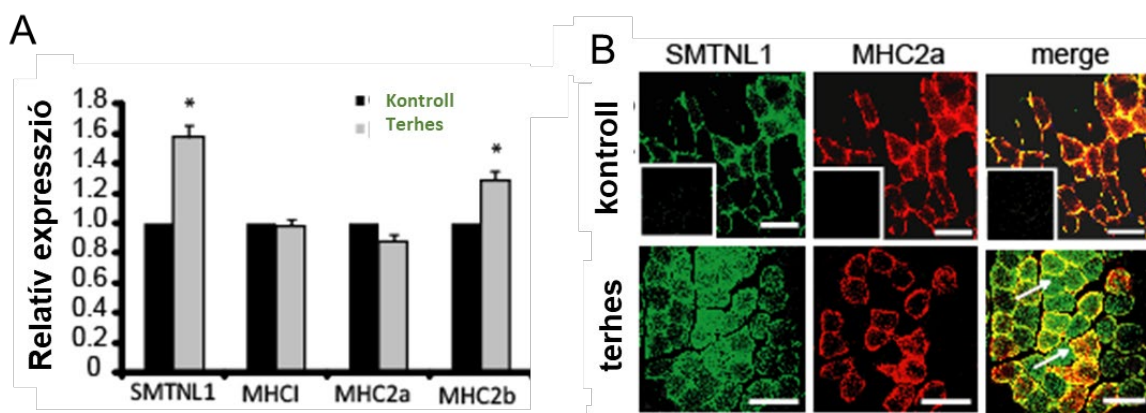
5. 4. 3. Az SMTNL1 a terhesség során izotípusváltást indukál a vázizomzatban

Az SMTNL1 terhesség során kifejtett hatását, vemhes és nem-vemhes, WT és SMTNL1 KO egerekből származó *soleus* és *plantáris* vázizom mintákon vizsgáltuk. Az SMTNL1 expressziója jelentősen megemelkedett vemhesség és álvemhesség hatására a nem-vemhes egyedekhez viszonyítva, és az SMTNL1 Ser301 oldalláncának foszforilációja 3,5-szeres emelkedést mutatott vemhesség hatására [152]. Rágcsáló és humán vázizom minták izomrost-típusálása során a 2b típusú glikolitikusabb izomrostok számában szignifikáns emelkedést, míg a 2a típusú oxidatívabb rostok esetében tendenciális csökkenést tapasztaltunk terhesség SMTNL1 hiányos egerekben (2. táblázat).

	Nem-vemhes		Álvemhes		Vemhes	
GENOTÍPUS	<i>smtnl1</i> +/+	<i>smtnl1</i> -/-	<i>smtnl1</i> +/+	<i>smtnl1</i> -/-	<i>smtnl1</i> +/+	<i>smtnl1</i> -/-
2a rosttípus %	34.77±1.9	32.22±2.5	24.84±2.2 *	26.00±2.5 #	25.29±1.8 *	24.45±2.1 **
2b rosttípus %	45.58±2.7	49.22±2.7	58.44±1.9	60.96±3.3 *	61.12±2.4 *	65.32±3.0 **
SMTNL1 pozitív rostok %	36.06±1.6	N/A	39.77±1.9	N/A	42.87±1.9 #	N/A
Relatív glikogén tartalom	1.00±0.0	1.18±0.2	1.25±0.03	1.32±0.1 #	1.26±0.04 #	1.39±0.2 *

2.táblázat. Az SMTNL1 elécioja és a vemhesség glikolitikus fenotípusra való rosttípusváltást indukált egér vázizomban. Nem-vemhes, álvemhes és vemhes *smtnl1* +/+ és *smtnl1* -/- állatok *plantaris* izmának kvantitatív rostsámlálása. Közéértékek ±SEM (n=14-15/csoport), t-próba, $p<0$,^{1#}, $p<0,05$ * és ** $p<0,001$.

A szövetminták immunhisztokémiás elemzése alapján elmondhatjuk, hogy vad típusú nem-vemhes egerek vázizmában az SMTNL1 expressziója a 2a típusú rostokra korlátozódik, míg vemhesség hatására más, a 2a típustól eltérő rostokban is megjelenik az SMTNL1, mint például a 2a-2b átalakulás során az 2x típusú izomrostokban. Vemhesség és álvemhesség hatására 15-20%-kal megemelkedett a 2b típusú glikolitikusabb izomrostok száma, míg nem változott az 1-es típusú oxidatívabb izotípus. A 2a típusú izomrostok indikátoraként ismert MHC2a expressziója csökkent, míg az MHC2b expresszió 20%-os emelkedést mutatott humán vázizom mintákban, ami a vemhesség hatására bekövetkező oxidatívabb glikolitikusabb típusba történő átalakulást mutatja (29. ábra).

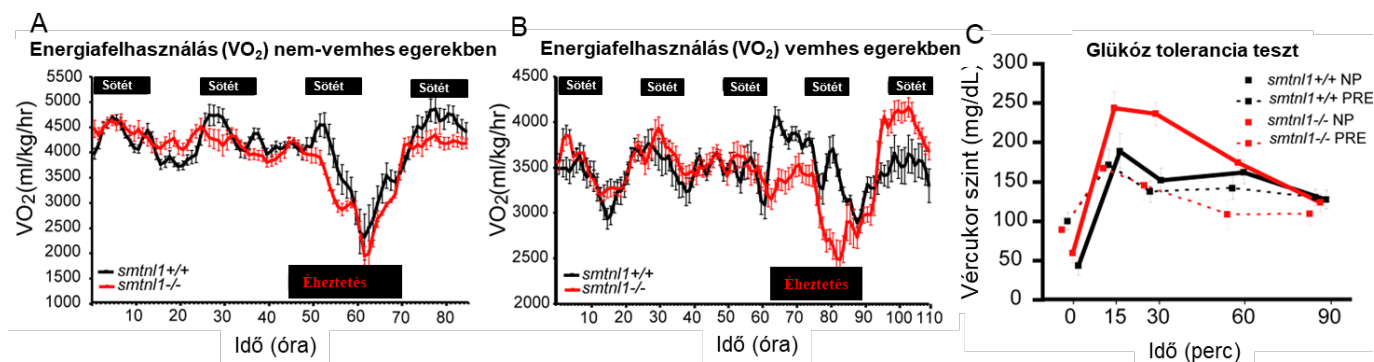


29. ábra. A terhesség a human vázizomban glikolitikus fenotípusra való rosttípusváltást indukált (A) *A* plantaris izom rosttípusváltásának számszerűsített adatai (B) *A* plantaris izom vizsgálata immunfluoreszcenciás konfokális mikroszkópia segítségével. Az SMTNL1 (zöld) a kontroll vázizomban a 2a típusú rostokban (piros) expresszálódik. Az SMTNL1 expressziója a 2a rosttípustól eltérő típusú rostokban is kimutatható (nyilak). A bal alsó inzertek másodlagos antitest kontrollokat mutatnak.

A 2b típusú rostok számának emelkedése növeli az izomerőt, ezáltal képessé teszi az anyaállatot a fejlődő magzat súlya jelentette teher hordására a vemhesség késői szakaszában. A vázizom fizikai erejének, teherbírásának növelése kiemelten fontos az anyaállat számára. A 2b típusú rostok számának növekedése mellett azonban 21%-kal emelkedett az izomrostok glikogén tartalma a vemhes SMTNL1 KO állatokban (2. táblázat). 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

Microarray analízissel és tömegspektrometriás analízissel (Táblázat S2) azt találtuk, hogy az *smtnl1* gén csendesítésének hatására számos anyagcsere útvonalhoz, illetve szteroidhormon által indukált jelátviteli pályához kapcsolható gén expressziója változott meg, köztük az inzulinrezisztenciára utaló gének is (<https://discovery.genome.duke.edu/express/resources/2419>). Az mRNS szintű változásokat proteomikai elemzéssel is alátámasztottunk (<http://dx.doi.org/10.6084/m9.figshare.127394>) (Függelék 2. táblázat). Az SMTNL1 KO állatok anyagcseréjüket tekintve kevésbé hatékonyak, glükóztoleranciát mutatnak. A Comprehensive Lab Animal Monitoring System (CLAMS) vizsgálatok alapján az SMTNL1 KO állatok a sötétciklusban csökkent aktivitást mutattak. Vemhes és nem-vemhes SMTNL1 KO egerek légzési hányadosának meghatározását is elvégeztük, melynek értékéből következtetni lehetett a szervezet által felhasznált makrotápanyagok egymáshoz viszonyított arányára. Megfigyeléseink alapján a SMTNL1 KO egerek anyagcsere aktivitása jelentősebb kisebb, kifejezetten a vemhes állatokban

(33.2%-os csökkenés) a WT egerekéhez képest (vemhesség hatására ott mindössze 6.2%-os csökkenés), ami a metabolikus hatékonyság csökkenésére utal.



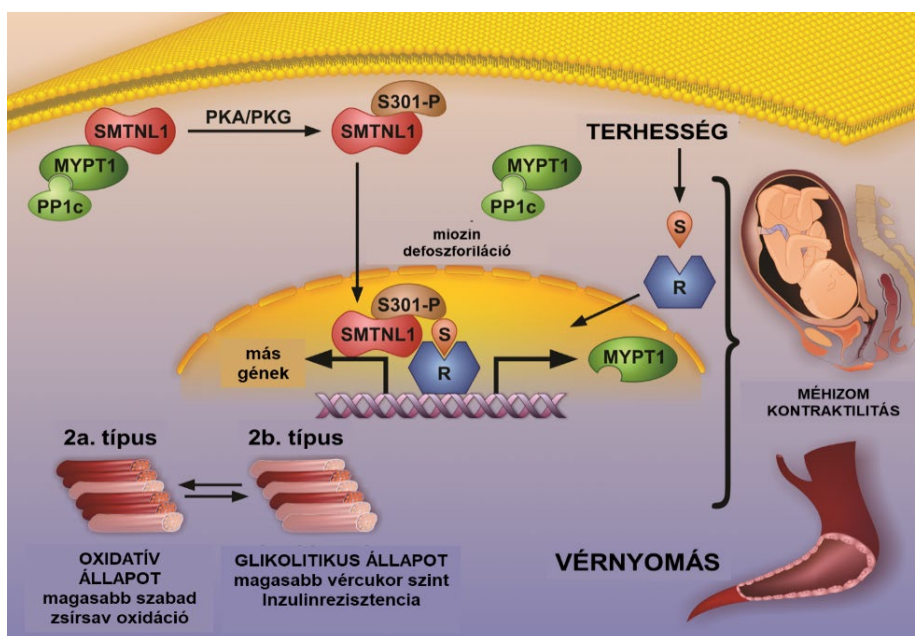
30. ábra. A vemhesség és az SMTNL1 deléció hatása az állatok anyagcseréjére (A) Nem-vehes (NP) és (B) vemhes (PRE) egerek energiafelhasználása az elfogyasztott oxigén mennyiségének (ml/kg/h) mérésével történt az idő múlásával. (C) Vércukorszint-változások (átlag $\pm$ 1 S.E.) *smtnl1*^{+/+} és *-/-*, vemhes vagy nem-vehes egereknél az intraperitoneális glükózinjekciót követő időben. $n = 6-13$ egyed/csoport, az eredményeket átlag $\pm$ SEM-ben fejeztük ki.

Az oxigénfogyasztás (VO₂) vemhes állatok esetén alacsonyabb volt a nem-vehesekhez képest (30.A ábra), míg a vemhes állatok mind a WT és a KO állatok esetén kisebb csökkenést mutattak a VO₂ értékekben éheztes során (30.B. ábra). A légzéscsere arány (VCO₂/VO₂; RER) a vemhes és nem-vehes KO állatok esetén egyaránt csökkent. A KO állatok jelentősen emelkedett tápanyag eltolódási értéket mutattak a WT kontrolljaikhoz képest, ami arra utal, hogy a zsírsavakról a szénhidrátfelhasználás felé tolódott el az anyagcseréjük. Bár a vemhes KO állatok anyagcsereútvonaluk eltolására hatékonyabban képesek, anyagcseréjük a fokozott szénhidrátfelhasználás miatt mégis sérült, és a vemhesség során fokozottabbá vált.

Az intraperitoneális glükóztolerancia teszt azt mutatta, hogy a SMTNL1 KO egerek csökkent glükóztoleranciával rendelkeznek (30. C ábra). A csökkent glükóztolerancia eredményeképpen kialakuló inzulinrezisztencia feltehetően a SMTNL1 kiütése következtében lecsökkenő GLUT4 és IRS1 expresszió következménye [152]. Elmondható tehát, hogy a terhesség és a SMTNL1 deléciója a vázizomzatban glikolitikusabb fenotípust eredményez. Már maga a terhesség is képes volt a vázizomzat fenotípusát oxidatívól a glikolitikusabb irányba tolni. Ezt a folyamatot a SMTNL1 és a progeszteron közötti kölcsönhatása is szabályozza, amely megváltoztatta a kontraktilis, és metabolikus fehérjék expresszióját. Az *smtnl1*^{-/-} KO egerek esetében alacsonyabb metabolikus hatékonyságot, és csökkent glükóz toleranciát figyeltünk meg. A vemhesség esetén fordított hatást figyeltünk meg a SMTNL1 deléciója során, ebben az esetben

nőtt a metabolikus aktivitás és a glükóz tolerancia. Ezen eredmények alapján úgy tűnik, hogy a SMTNL1-nek szerepe van a szteroid hormonok által közvetített rosttípus váltásban a terhesség során [152].

Eredményeinket összegezve elmondható, hogy leírtuk a sima- és vázizom terhesség során hormonális hatásra történő izotípus változását. A terhesség során a glikolitikus fenotípusra való átállás, a vázizom csökkent oxidatív rosttartalma molekuláris alapot szolgáltat a terhes nők fokozott súlygyarapodásának és inzulinrezisztenciájának magyarázatára. Ez a terhességre adott normális válasz evolúciós előnyt jelent az anya számára, ami által lehetővé válik a vércukorszint növelése a megfelelő magzati fejlődés érdekében, valamint a zsír hatékonyabb elraktározása a szoptatás kalóriaigényének kielégítésére. Eredményeink arra is utalnak, hogy a glikolitikus fenotípusra való átállás az anya fizikai erejének növelése révén is előnyt jelent, ui. a 2b típusú izomrostok az erő- és ellenállás-fokozással hozhatók kapcsolatban (mint például a súlyemelés



31. 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.

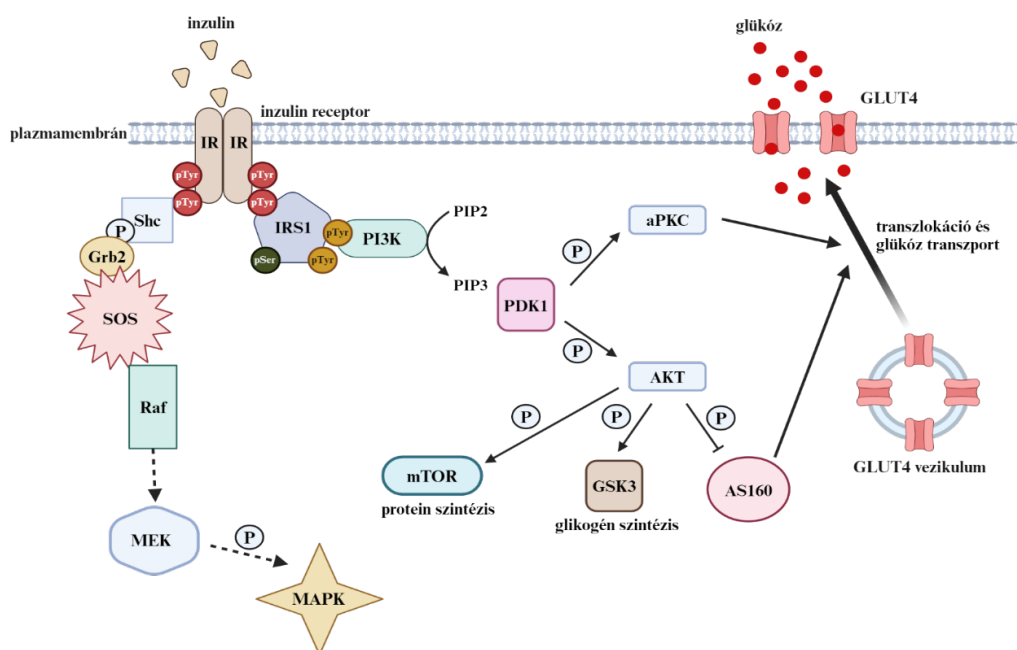
esetében). Az anya fizikai erejének növekedése lehetővé teszi a terhesség utolsó szakaszában a magzat megnövekedett súlyának viselését (31. *ábra*).

A terhességek ~4%-ában azonban a terhesség okozta inzulinrezisztencia terhességi cukorbetegséggé alakulhat. Ha tehát a terhesség evolúciós előnyként elősegíti a glikolízisre való átállást, akkor ez egyes nőket még fogékonyabbá teheti a terhességi cukorbetegség kialakulására, különösen a magas energiatartalmú nyugati étrend hatására. Így mivel az SMTNL1 hiányában inzulinrezisztens állapot alakult ki, feltételeztük, hogy normális vagy akár emelkedett szintje inzulinérzékenyítést vált ki. Az ezzel kapcsolatos további vizsgálataink eredményét a következő fejezetben mutatom be.

5.5. Az SMTNL1 inzulinérzékenyítő hatása

5.5.1. Az inzulin jelátviteli pálya és az inzulinrezisztencia

A vázizomzat fiziológiás körülmények között a bevitt glükóz felvételének fő felhasználója [153]. Míg a máj a véráramban lévő posztprandiális glükóznak körülbelül egyharmadát veszi fel,



32. ábra. A vázizom inzulin mediált glükózfelvétele. A vázizom inzulin által mediált glükóz felvétele során az inzulin kötődik a szarkolemmában található inzulin receptor (IR) extracelluláris α alegységéhez, melynek hatására a β alegység meghatározott Tyr oldalláncokon autofoszforilálódik, majd foszforilálja a hozzá kapcsolódó inzulin receptor szubsztát fehérjét (IRS1). A Tyr oldalláncokon foszforilált IRS1 fehérje dokkoló helyet biztosít a PI3K számára. Az aktiválódott PI3K enzim membránban megjelenő produktumai a protein kináz B/Akt enzim membránhoz való kötődését és aktiválódását idézik elő, amely az intracelluláris vezikulákban tárolt GLUT4 transzporter fehérjék szarkolemmába való transzlokációját indukálja. Az ábra a biorender.com felületén készült.

a maradékot a perifériás szövetek, elsősorban a vázizom veszi fel inzulinfüggő mechanizmuson keresztül. Az inzulin kötődése az inzulinreceptorhoz (IR) olyan jelátviteli kaszkádot indít el, amely az inzulinérzékeny glükóz transzporter fehérje 4 (GLUT4) transzlokációját eredményezi a plazmamembránba, hogy megkönnyítse a glükóz sejtbe történő szállítását (32. ábra).

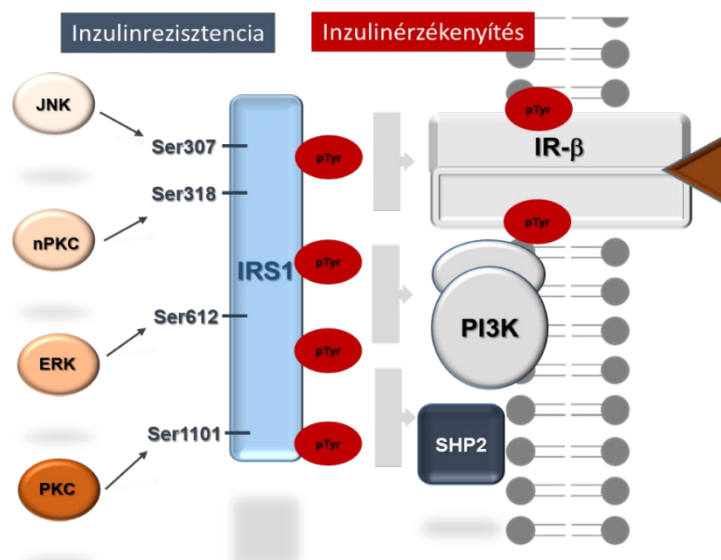
Az IR aktiválódása az inzulin kötődését követően az inzulin receptor 1 szubsztát (IRS1) fehérje foszforilációját eredményezi, amely viszont dokkolja és aktiválja a foszfatidil-inozitol-3-kinázt (PI3K). A PI3K katalitikus doménje konformációs változásokon megy keresztül, ami az

enzim aktiválódását eredményezi. Ezt követi a PI3K által katalizált PIP2 foszforilációja PIP3 -á, amely a PDK1 aktivációjához vezet. Ez az inzulinjel továbbítását eredményezi egy Ser/Thr specifikus protein kináz, az Akt/protein kináz B felé [154], amely foszforiláció hatására aktiválódik. Az Akt kináz doménjében található Thr308 oldalláncon történő foszforiláció aktiválja az enzimet míg a Ser473 oldallánc foszforilációja meghatározza a szubsztrát-szelektivitást és tovább fokozza az aktivitás. Ez utóbbi szabályozásáért a PIP3K mellett az mTORC2 is felelős [155]. Az Akt foszforilálja a 160 kDa molekulatömegű Akt szubsztrát fehérjét (AS160-at). A foszforilált AS160 a 14-3-3 fehérjével kölcsönhatást kialakítva gátolja a Rab fehérjék GTPáz aktivitását, amely következtében a Rab fehérjék GTP-kötött állapotban maradnak. Ez a Glut4 glükóztanszportrer transzlokációját eredményezi a plazmamembránhoz. Így az Akt elősegíti a GLUT4-tartalmú vezikulák transzlokációját a plazmamembránba, hogy közvetítse az inzulin által stimulált glükóztanszportot a vázizomba [156] (32. ábra).

Az inzulinrezisztencia (InR) a szövetek normál inzulin koncentrációra adott csökkent válaszadó képességét jelenti. Bár számos genetikai és fiziológiai faktor közrejátszik az InR kialakulásában és súlyosbításában, önkéntes emberek bevonásával készült tanulmányok az IRS fehérjék megváltozott aktivitását jelölik meg, mint az InR hátterében álló közös mechanizmust [157]. Az IRS a Tyr oldalláncok mellett Ser/Thr oldalláncokon is foszforilálódhat, melyek pozíciójuktól függő módon serkentik vagy gátolják az IRS inzulinjel közvetítő hatását (33. ábra). Az inzulin hatására aktiválódó PKB/Akt általi Ser foszforiláció például védelmet nyújt a tirozin foszfatázok ellen, pozitív visszacsatolási mechanizmussal aktív állapotban tartva az IRS1-t [158]. Az inzulin azonban áttételesen más Ser/Thr kinázokat is aktivál (ERK, JNK, PKC, mTOR), melyek meghatározott oldalláncok foszforilálódását indukálják és negatív visszacsatolási mechanizmussal gátolják az IRS működését, ami az inzulinhatás megszűnésével jár. Az mTOR és a JNK általi Ser307-es foszforiláció például gátolja az IR és az IRS1 közötti kölcsönhatást, míg a PI3K kötésért felelős Tyr oldalláncok közelében található Ser612-es oldallánc ERK általi foszforilációja a PI3K kötődését akadályozza, míg a zsírsavak által indukált inzulinrezisztenciában

az atípusos PKC enzimesalád tagjai a Ser1101 oldallánc foszforilációjával az SHP2 tirozin foszfatáz dokkolódását szabályozzák [159; 160; 161] (33. ábra).

Kényes egyensúly létezik tehát a pozitív IRS1 tirozin/szerin foszforiláció és a negatív IRS1



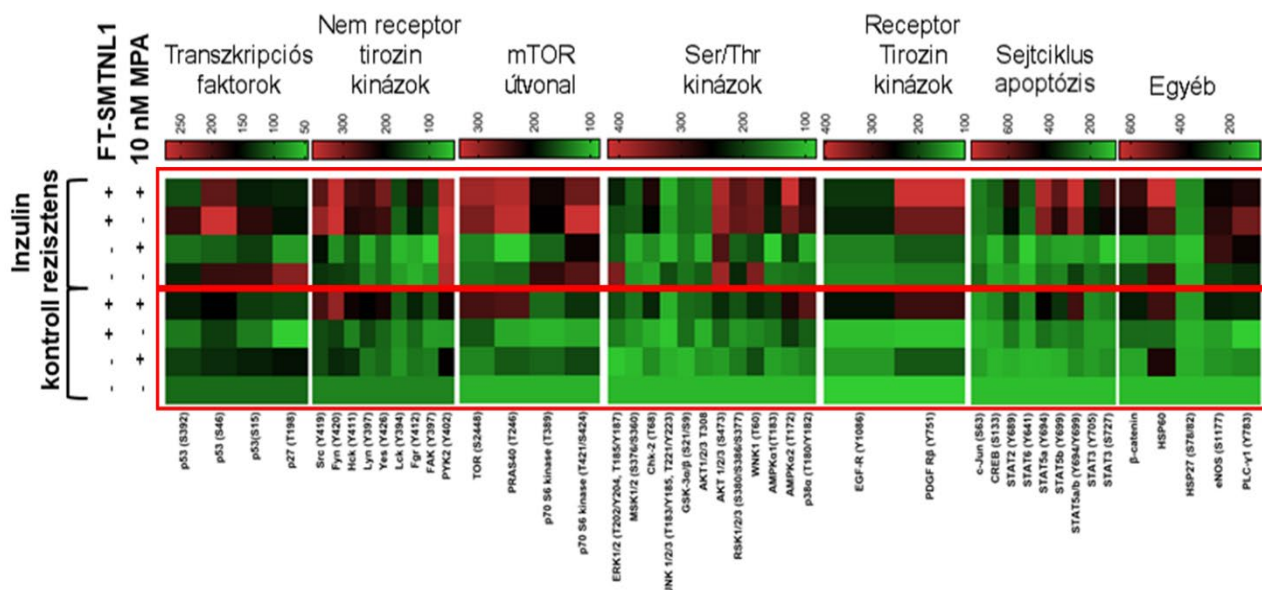
33. ábra. Az IRS1 Ser-aminosavmaradékokon történő foszforilációja szabályozza az IRS1 funkcióit. Az IRS1 Ser oldalláncokon történő foszforilációja kettős szerepet játszik az inzulinhatás fokozásában (inzulinérzékenyítés) vagy megszüntetésében (inzulinrezisztencia). A PKB/Akt inzulinra adott válaszként történő aktiválása kiváltja az inzulin jelátvitelt és elősegíti az IRS1 Tyr-maradékokon történő foszforilációját (ld. 32. ábra), pozitív visszacsatolási hurkot hozva létre az inzulinhatás számára. Az inzulin aktiválja a JNK-t, az ERK-t, a PKC-t és az mTOR-t is, amelyek az IRS1 foszforilációját specifikus helyeken indukálják és gátolják a funkcióit. Ez része az inzulin által indukált negatív visszacsatolású szabályozási mechanizmusnak, amely megszünteti az inzulin hatását.

szerin foszforiláció között, amely szabályozhatja az IRS1 működését. A szabad zsírsavak, citokinek, angiotenzin II, endotelin-1, aminosavak, sejtstressz és a hiperinsulinaemia fokozhatják a negatív IRS1 Ser-foszforilációt, ami inzulinrezisztenciához vezethet, amely a Ser/Thr kinázok (JNK, PKC, mTOR, S6K, IKK, ERK) aktiválódását és általuk IRS1 foszforilációját eredményezik, ami gátolja az IRS1 funkcióit. Az IRS pozitív Tyr/Ser foszforilációja és negatív Ser foszforilációja közötti egyensúly fontos szerepet játszik az IRS aktivitásának szabályozásában, ezáltal pedig a normál inzulinjelátvitelben. Ez az egyensúly különböző stresszhatások (pl. betegség) és molekulák (pl. hormonok, aminosavak, citokinek, zsírsavak) hatására felborulhat, ami a negatív Ser foszforiláció túlsúlyba kerülését és InR kialakulását eredményezi [162]. Az inzulinrezisztencia-szindróma a 20 évesnél idősebb felnőttek mintegy 24%-át érinti, és számos

rendellenességben nyilvánul meg, beleértve a glükóztolerancia károsodását, a 2-es típusú cukorbetegséget, az elhízást és a reprodukciós zavarokat [159] (33. ábra).

5.5.2. Az SMTNL1 szerepe a vázizom inzulinérzékenyítésében

Előzetes eredményeink rávilágítottak az SMTNL1 anyagcsere szabályozásában betöltött szerepére a vázizom fenotípusának modulációján keresztül. A háttérben álló pontos molekuláris mechanizmus, az általa befolyásolt jelátviteli pálya azonban még nem volt ismert. Mivel a microarray analízis és a proteomikai vizsgálatok is arra világítottak rá, hogy az inzulin jelátviteli pálya érintett lehet (ld. előző fejezet), ezért munkánk során az SMTNL1 inzulinjelátviteli pályára kifejtett hatását vizsgáltuk, differenciált C2C12 sejtekben és SMTNL1 KO egérmodellben. Vizsgálatainkhoz hiperglikémiás/hiperinzulinémiás differenciált C2C12 miotubulusokat használtunk az SMTNL1 természetes ligandumának, a progeszteronnak jelenlétében és anélkül, és így modelleztük az inzulinrezisztens és terhességi cukorbeteg állapotot a vázizomban.

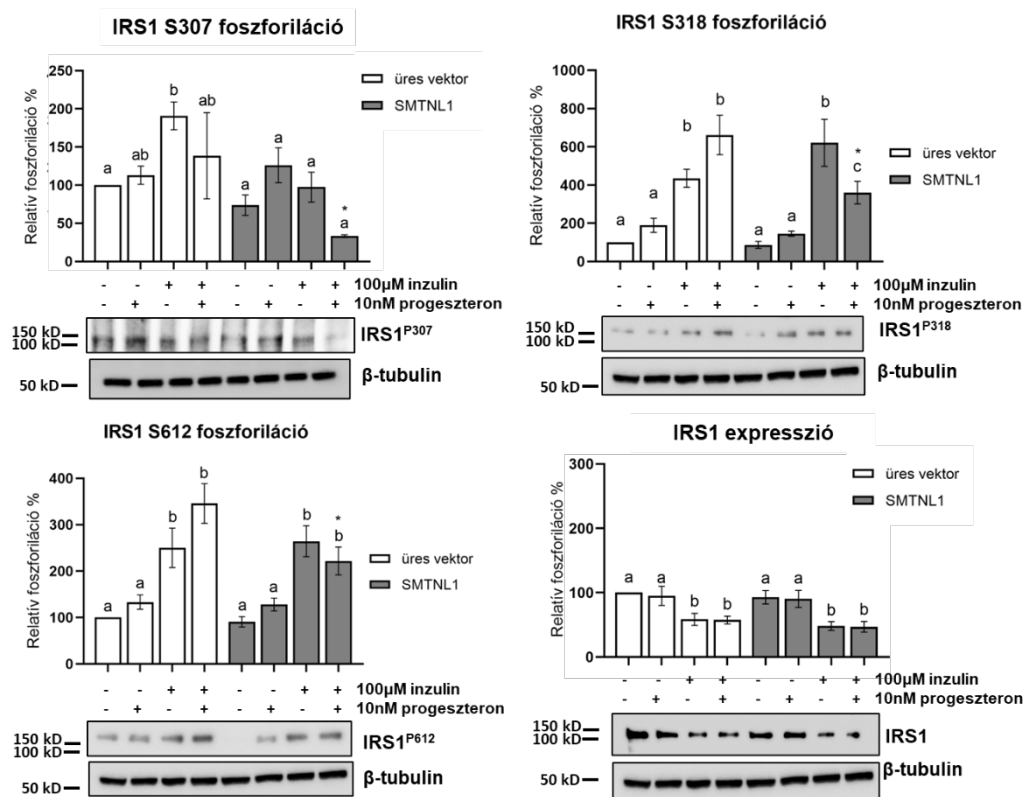


34. ábra. Az SMTNL1 progeszteron-függő hatása inzulinrezisztens vázizomsejtekben. FT-SMTNL1-transzfektált és merdoxyprogeszteronnal (MPA) kezelt C2C12 sejtizátumok Proteome Profiler elemzését végeztük. A vizsgált fehérjék foszforilációs állapotát a heatmap alapján osztályoztuk, a kezeletlen kontrollt használva viszonyítási alapként. Színek: piros jobban foszforilált, zöld: kevésbé foszforilált. Az elemzésekhez 200µg fehérjét használtunk, a folt intenzitásokat ImageJ segítségével értékeltük ki. MPA: merdoxyprogeszteron FT: Flag-jelölt SMTNL1.

Eredményeink alapján az SMTNL1 overexpressziója progeszteron jelenlétében csökkenti az IRS1 gátló Ser-foszforilációját, ami a PI3K/Akt jelátviteli útvonalat indukálja a C2C12 hiperinzulinémiás/hiperglikémiás inzulinrezisztens miotubulusokban (34. ábra). Adataink arra utalnak, hogy az SMTNL1 egy új típusú PKC expressziójának szabályozásával fejt ki hatását,

amely közvetlenül a Ser318 oldalláncon, közvetve pedig az ERK1/2 jelátviteli útvonal által a Ser612-en keresztül járul hozzá az IRS1 foszforilációjához. Az SMTNL1 által megváltoztatott jelátviteli útvonalakat Proteom Profiler analízissel vizsgáltuk a C2C12-es miotubulus mintákban. Az SMTNL1-hez kapcsolódó útvonalakként elsősorban az mTOR és a Ser/Thr-kináz jelátviteli pályákat azonosítottuk (34. ábra). Ezek az eredmények összhangban vannak az *Smtnl1* KO egerek vázizom mintáin végzett proteomikai és microarray-elemzéseinkkel [152].

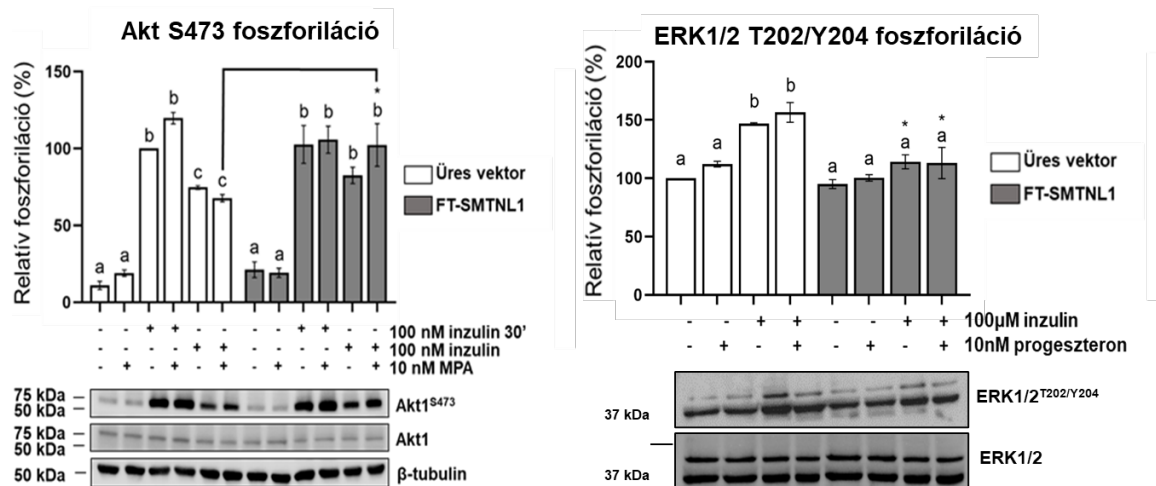
Az előszűrés szemi-quantitatív Western blottal történő validációjának alapján az IRS1 foszforilációja a Ser307, Ser318 és Ser612 helyeken az inzulinrezisztens modellben jelentősen megemelkedett (35. ábra), és az SMTNL1 overexpressziója csökkentette a foszforilációt ezeken



35. ábra. Az IRS1 expressziójának és foszforilációjának Western blot elemzése C2C12 inzulinrezisztens miotubulusokban. A differenciálást és az inzulinrezisztencia indukcióját követően a sejteket az IRS1 S307 (bal fent), S318 (jobb fent) és S612 (bal lent) foszforilációs helyei elleni antitesttel; valamint a fehérje alapexpresszióját IRS1 abszorbánsokkal (jobb lent) vizsgáltuk szemi-quantitatív Western blot módszerrel. A foszforilációs szinteket a nem-foszforilált fehérjéhez viszonyítottuk, amelyet viszont a β-tubulinhoz, mint belső terheléses kontrollhoz normalizáltunk. Az SMTNL1 kódoló vs. az üres vektorral transzfektált sejtek hatásait hasonlítottuk össze (kétutas ANOVA és Sidak's post hoc teszt, átlag ± SEM; n=3; *, p < 0,05). A különböző kezelések hatását is összehasonlítottuk (Kétirányú ANOVA és Tukey-féle post hoc teszt, Átlag ± SEM; n=3; p < 0,05; Különböző betűk jelzik az összehasonlított csoportok közötti szignifikáns különbségeket).

az aminosavmaradékokon, de csak progeszteron jelenlétében (35. ábra). Az IRS1 Ser307 és Ser318 foszforilációja megbontja az IR/IRS1 komplexet, és lehetővé teszi az inzulinnal szembeni deszenzitizációt [161; 163]. A Ser307 az IRS1-en a JNK foszforiláció fő helye. Eredményeink összhangban vannak más *in vivo* diabéteszes állatokon végzett és *in vitro* sejtkultúrák vizsgálatokkal, amelyek azt mutatták, hogy a JNK aktivitása az InR sejtekben megemelkedett [164]. Az SMTNL1 overexpressziója nem változtatta meg a JNK kinázok expresszióját, de aktivitásuk jelentősen csökkent SMTNL1 overexpresszió hatására az inzulinrezisztens modellben. Az IRS1 Ser318 foszforilációját is jellemeztük, amely az inzulin által indukált PKC ζ és ϵ célpontja [160]. Bár az előbbi PKC izoformának az aktivitása és expressziója nem volt SMTNL1-függő, az SMTNL1 overexpressziója mérsékelte a PKC ϵ szintjét, ami az IRS1 Ser318 foszforilációjának egyidejű csökkenésével járt. Az IRS1 Ser612 maradékának foszforilációjában túlnyomórészt az ERK1/2 és az mTOR útvonalak vesznek részt. Modellünkben az ERK1/2 foszforilálódott krónikus inzulinkezelést követően, és az SMTNL1 overexpressziója gátolta az ERK1/2 foszforilációját és ezáltal aktivitását, különösen progeszteron jelenlétében (36. ábra). Emellett az IRS1 Ser612 foszforilációja csökkent, ami valószínűleg az ERK1/2 aktivitás SMTNL1-függő csökkenésének eredménye. Továbbá feltételezzük, hogy az ERK1/2 nem csak a Ser612 foszforilációján, hanem a GLUT4 szabályozásán keresztül is inzulin-deszenzitáló hatást fejt ki a C2C12 miotubulusokban, mivel az ERK1/2 krónikus aktivációja a GLUT4 expressziójának downregulációjához és csökkent inzulin-indukált glükóz transzporthoz vezet [165].

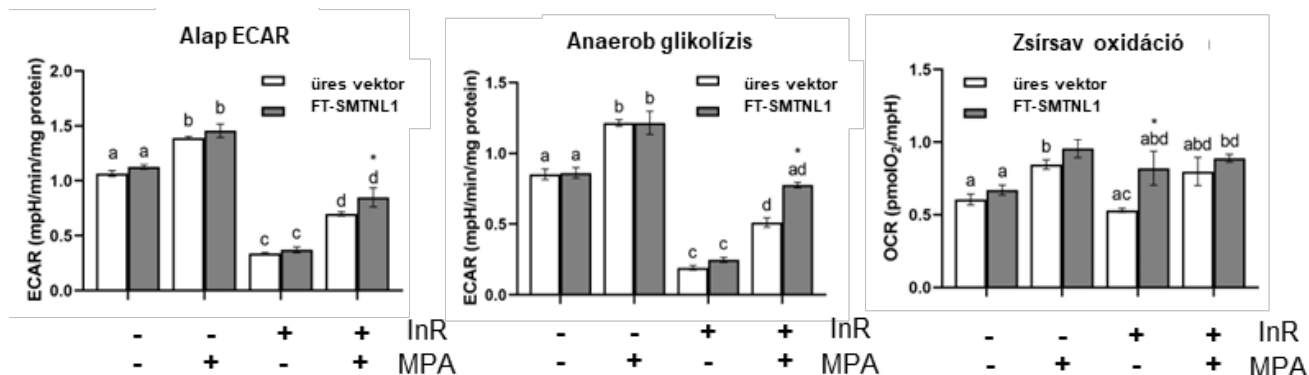
Az ERK1/2 fehérje mennyisége nem változott, de foszforilációja és feltehetően aktivitása csökkent az SMTNL1 overexpressziójának hatására progeszteronnal történő együttes kezelésre, ami arra utal, hogy az SMTNL1 a génexpresszió szintjén szabályozza az upstream Ser/Thr kinázokat és/vagy foszfatázokat (36. ábra jobb panel). A vemhes SMTNL1 KO egerek microarray-analízise során egyik MAP kináz kináz sem változott a WT-hez képest [152]. Ezért megvizsgáltuk az ERK1/2 lehetséges szabályozó elemeit. Míg a PP2A génexpressziója nem változott ebben a vizsgálatban [166], addig a másik lehetséges szabályozó enzim, az új típusú PKC ϵ expressziója jelentősen csökkent az SMTNL1 overexpresszió hatására, elősegítve a miotubulusok inzulinérzékenységét. Ez összhangban van a korábbi eredményeinkkel, amelyek a PKC izoformák változását mutatták ki SMTNL1 KO állatokban microarray analízis segítségével [152].



36. ábra. Az SMTNL1 overexpresszió hatása az Akt és ERK1/2 expressziójára és foszforilációjára Western blot analízissel. Az Akt1 foszforilációhoz (bal panel) az általános inzulinrezisztencia modellhez minden transzfekcióhoz két további mintát vittünk be. A fizioiógias körülmények között végzett 72 órás differenciálást követően a kezelés utolsó 30 percében 100 nM inzulint adtunk a sejtekhez az inzulinrezisztencia kialakulásának ellenőrzésére. A foszforilált fehérjéket normalizáltuk a nem-foszforilált fehérjék szintjéhez, amelyet viszont a β -aktinhoz, mint belső terheléses kontrollhoz normalizáltunk. Az ERK1/2 expressziót és foszforilációs (jobb panel) semi-quantitatív Western blot analízissel vizsgáltuk. Az SMTNL1 vs. az üres vektorral transzfektált sejtek értékeit (kétutas ANOVA és Sidak's post hoc teszt, átlag $\pm$ SEM; $n=3$; *, $p < 0,05$), valamint a különböző kezelések hatását is összehasonlítottuk (kétutas ANOVA és Tukey's post hoc teszt átlag $\pm$ SEM; $n=3$; $p < 0,05$; az eltérő betűk a csoportok közötti szignifikáns különbségeket jelzik).

A PI3K aktivitás, a felszabadult PIP3 koncentrációjával mérve, megnövekedett a C2C12 miotubulusok inzulin stimulációjának hatására, és ez a szint jelentősen alacsonyabb volt az inzulinrezisztens körülmények között. A p85 expressziója csökkent az inzulinrezisztencia esetén, de ezt és a PI3K aktivitását az SMTNL1 overexpressziója helyreállította [161]. A PI3K megváltozása befolyásolja downstream effektorának, az Akt-nak az aktivitását is. Érdekes módon az Akt fehérjeszintje nem változott semmilyen kezelés hatására a differenciált C2C12 sejtekben. Eredményeink alapján azonban az SMTNL1 differenciáltan szabályozta az Akt foszforilációját: az SMTNL1 overexpressziója megemelte a Thr473 foszforilációját, így aktivitását az inzulin-indukált kontroll sejtekben, de az inzulinrezisztens sejtekben a Ser473 foszforilációt csak kis mértékben indukálta a kontrollhoz képest (36. ábra jobbl panel).

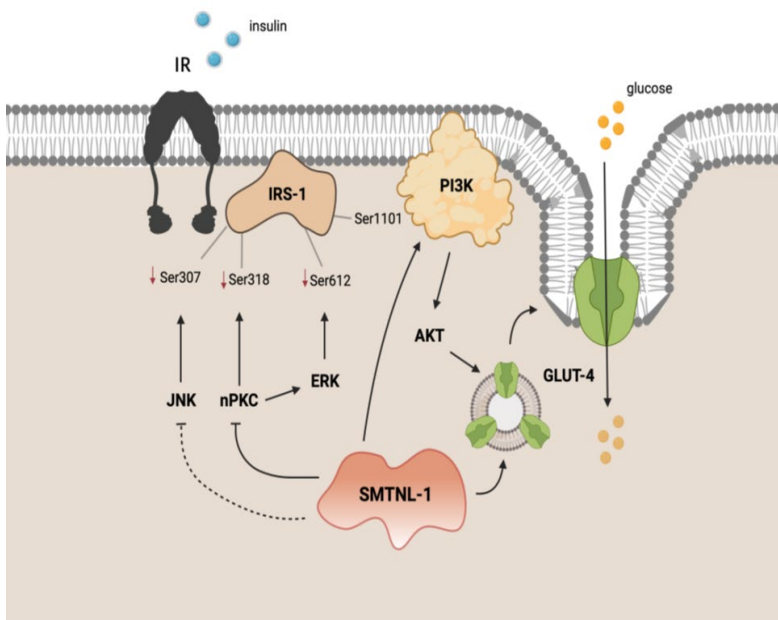
Az inzulin/PI3K jelátvitel downstream célpontja a Glut4 (32. ábra), ami a plazmamembránba transzlokálódva fokozott glükóztranszporthoz vezet [167]. Az SMTNL1 overexpressziója C2C12 miotubulusokban fokozott GLUT4 expresszióval járt az inzulinrezisztens



37. ábra A C2C12 inzulinrezisztens sejtek energetikai paramétereinek változása SMTNL1 vagy üres vektor transzfekcióját követően. A C2C12 sejteket sejttanyagcsere paramétereit Seahorse XF 96 műszerrel mértük. Mind a glikolitikus (ECAR - Extracelluláris savasodási ráta), mind az oxidatív (OCR - Oxigénfogyasztási ráta) változókat elemeztük. A mérések során az inhibitorok beadása előtt a sejtek ECAR (bal panel) és OCR alapszintjét mértük. A mitokondriális aktivitástól függetlenül anaerob glikolízis paramétereit úgy számoltuk ki, hogy az alapértékekből kivontuk az Antimycin A + 2-DG értékeket (középső panel). A zsírsav-oxidációt mérését az etomoxir beadása után mért OCR-értékeket kivonásával végeztük (jobb panel). Az SMTNL1 vs. az üres vektor-transzfektált sejtek értékeit hasonlítottuk össze (kétutas ANOVA és Sidak's post hoc teszt, átlag $\pm$ SEM; $n=3$; *, $p < 0,05$), valamint a különböző kezelések hatását (kétutas ANOVA és Tukey's post hoc teszt, átlag $\pm$ SEM; $n=23$; $p < 0,05$; különböző betűk jelzik a csoportok közötti szignifikáns különbséget). A mérések után az értékeket a fehérjetartalomra normalizáltuk. InR: inzulin rezisztens modell; MPA: medroxiprogesteron

modellben [152]. A glikolitikus funkció és a mitokondriális légzés kvitatív mérése szintén alátámasztotta az SMTNL1 inzulinérzékenyítő hatását az inzulinrezisztens C2C12 sejtekben. Az oxigén fogyasztási ráta (OCAR) és az extracelluláris savasodási ráta (ECAR) valós idejű metabolikus mérései kimutatták, hogy az SMTNL1 javította a glikolízist és elősegítette az alternatív energiaforrások felhasználását (37. ábra). Az inzulinrezisztenciás modellben csökkent az alap ECAR és az anaerob glikolízis. Az SMTNL1 overexpressziója progeszteron jelenlétében azonban enyhítette az ECAR és a glikolízis csökkenését anélkül, hogy befolyásolta volna a maximális glikolízist vagy a glikolitikus tartalékkapacitást. A progeszteron növelte a glikolitikus aktivitást és az ATP-termelődést a vázizomsejtekben, de az inzulinrezisztenciás sejtekben az értékek még mindig a kontrollszint alatt maradtak; csak az SMTNL1 overexpressziója progeszteron jelenlétében tudta visszaállítani a glikolitikus aktivitást és az ATP-termelődést. Az OCAR szintekben a kontroll és az SMTNL1-overexpresszáló sejtek között nem találtunk jelentős eltérést [4]. Ezekkel az eredményekkel összhangban állnak azzal, hogy az *smtnl1* KO egerek metabolikusan kevésbé hatékonyak voltak és glükóz intoleranciát mutattak; és azt, hogy a

terhesség a glükóztoleranciát a WT állatok szintjére emelte [152], ami megerősíti az SMTNL1 inzulin jelátviteli útvonal génexpressziójára gyakorolt szabályozó hatását.



38. ábra. Az SMTNL1 inzulinértékényítő 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 expressziójának indukálásával elősegíti a glükózfelvételt.[4].

Ezek az adatok együttesen arra utalnak, hogy az SMTNL1 több mechanizmuson keresztül indukálja a C2C12 miotubusok inzulinérzékenységét (38. ábra). 1) Az SMTNL1 negatívan szabályozza az inzulinfüggő Ser/Thr-kinázok upstream szabályozóinak expresszióját, amelyeket a hosszan tartó inzulin- és glükóz-expozíció aktivál. A PKC ϵ expressziójának csökkentésével az SMTNL1 gátolja az ERK1/2 aktivitását, ami az IRS1 Ser612 foszforilációjának későbbi csökkenésével a PI3K-Akt-mTOR útvonal aktiválását eredményezi. 2) Az SMTNL1 a heterológ IRS1 kinázokra is hat azáltal, hogy az inzulinrezisztencia kialakulása során az IRS1 Ser307 foszforilációjának szabályozásával gátolja az inzulin hatását, ami viszont az IR/IRS1 kölcsönhatásokat befolyásolja. 3) Az SMTNL1 elősegíti a glükózfelvételt az Akt útvonalak aktiválásával és a GLUT4 expressziójának indukálásával inzulinérzékenyítést okoz (38. ábra). Tehát az SMTNL1 az inzulin szignalizáció fontos szabályozójaként szolgál és potenciális terápiás célpont lehet az inzulinrezisztencia javítására vázizomban [4].

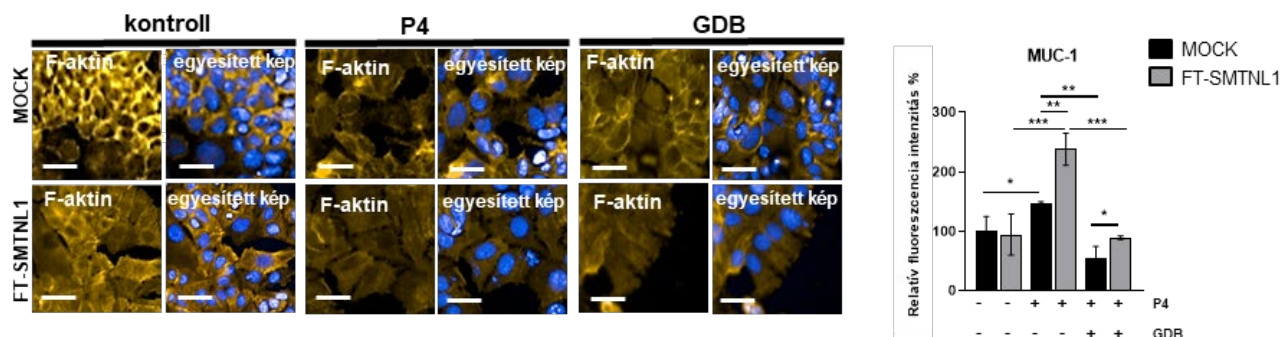
5.5.3. Az SMTNL1 szerepe a reprodukív tulajdonságok kialakításában

Az SMTNL1 KO állatokon végzett kísérletek fényében, az edzéshez adaptálódott és inzulinrezisztens fenotípus mellett csökkent reprodukív képességet is leírtunk. Megfigyeltük, hogy az embrionális letalitás szignifikánsan nagyobb, az utódszám jelentősen kevesebb volt, a vemhesség nehezebben alakul ki, vagyis a vemhesség kialakulásához jelentősen hosszabb időre volt szükség. Emellett az újszülött hím utódok száma meghaladta a nőstények számát, ami összességében egy gyengébb reprodukciós fenotípusra, valamint a populáció reprodukív fitneszének csökkenésére utal [150]. További kísérleteink célja a háttérben álló molekuláris mechanizmusok vizsgálata volt az endometriumban.

Az endometriális sejtek biztosítják a blasztociszták első érintkezési helyét [21]. A blasztocita és az endometriális epithelsejtek közötti párbeszéd, és az utóbbi megfelelő differenciálódása döntő fontosságú. A méhnyálkahártya szekréciós sejtjei morfológiai változásokon mennek keresztül a női ciklus luteális fázisában. A sejtfelszíni molekulák, mint például a Mucin-1 (MUC-1) kifejeződése a sikeres differenciálódást és a fogékony endometriumot jelzik [168]. Az egyrétegű oszlopos epitheliumban és a szekréciós sejtekben fellépő rendellenességek nem megfelelő trophoblast-endometrium kommunikációt okoznak, ami implantációs elégtelenséghez vezet. Az inzulinrezisztencia és az ebből eredő metabolikus szindróma súlyos anyagcsere eltolódást, differenciálódási rendellenességeket és a méhnyálkahártya integritásának kóros elváltozásait okozhatja [169]. Ezek a hibák különböző meddőségi rendellenességekhez, például policisztás petefészek szindrómához vezethetnek, ami az embrió beágyazódását megakadályozó elváltozások oka lehet, amelyek végső soron meddőséget is okozhatnak [170]. A meddőség a reprodukív korú női lakosság 5–10%-ában fordul elő [171]. Emellett a magas inzulin- és glükózsztint, valamint a hámsejtek proliferációját és differenciálását fokozó külső tényezők növelik az endometriózis és az endometriális hiperplázia kockázatát, ami az endometrium daganatos elváltozásához vezet, bár a folyamat pontos molekuláris mechanizmusa még nem ismert [171]. Mivel az SMTNL1 KO állatok egyértelműen fertilitási zavarokkal küzdöttek, további célunk az volt, hogy feltárjuk az SMTNL1 szerepét az endometriális epitheliális sejtek működésében, különös tekintettel a terhesség és a terhességi cukorbetegség körülményeire. Modellrendszerként Ishikawa sejteket, egy humán endometriális adenokarcinóma sejtvonalat használtunk. Ez a sejtvonala funkciójában és szerkezetében különbözik az endometriumban alatta elhelyezkedő endometriális sztrómális sejtektől. Ezek a sejtek luminális epitheliumot alkotnak,

amely a méhüreg felszínén, amely a csöves mirigyeket alkotja, és mélyen eléri az endometriális stromát [172]. Munkánk során az SMTNL1 fehérjét overexpresszáltattuk Ishikawa sejtekben és három különböző környezetben vizsgáltuk a túltermelés hatásait: kontroll, progeszteron-kezelt (P4, a terhességet modellezve), és terhességi cukorbetegség (gesztációs diabetes; GDB, magas glükóz és inzulin) körülmények között. A sejtek differenciálódását, migrációs képességét, valamint különböző jelátviteli útvonalak aktivitását mértük.

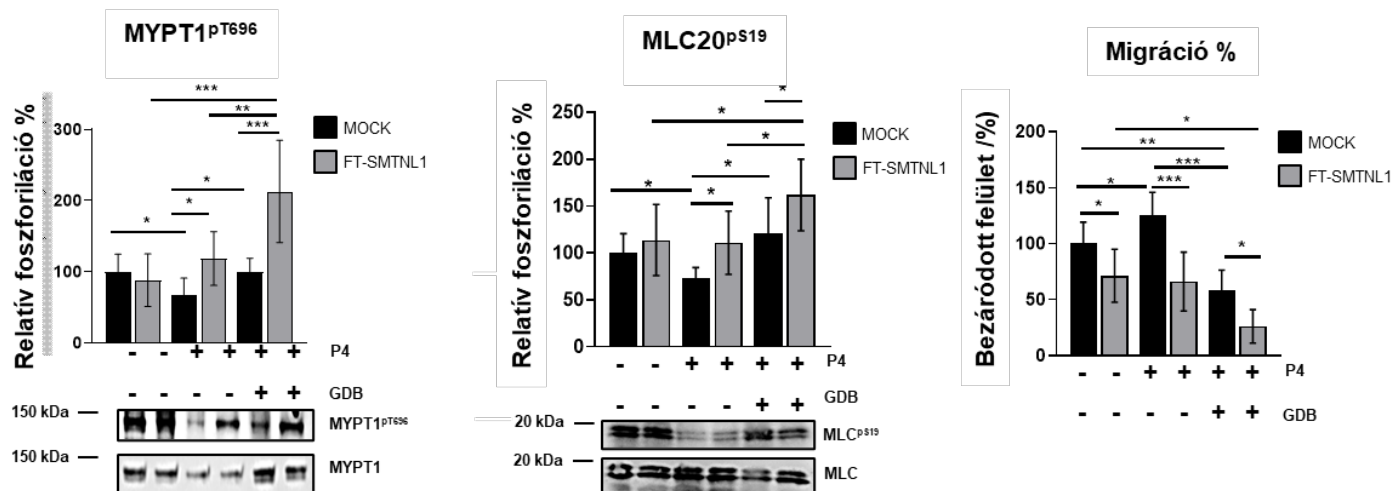
Eredményeink azt mutatták, hogy az SMTNL1 overexpressziója jelentősen fokozta az Ishikawa sejtek differenciálódását, különösen progeszteron jelenlétében (39. ábra).



39. ábra. Az SMTNL1 overexpresszió fokozza az Ishikawa sejtek differenciálódását. Kontroll, P4 (terhességi modell) és GDP (terhességi cukorbeteg) sejteket üres plazmida (MOCK) és FT-SMTNL1 expressziós vektorral (FT-SMTNL1) transzfektáltak. A differenciációt a sejtek aktin citoskeletonjának Texas-Red falloidinnel (sárga) történő festésével követtük. A sejtmagokat DAPI-val (kék) festettük. Méretség: 100 μ m. (bal oldali panel). A sejteket MUC-1 differenciációs markerrel is jellemeztük. A MUC-1 fehérje fluoreszcencia értékeit HCS vizsgálattal mértük, és a MOCK kontroll értékeivel viszonyítottuk %-os értékben. $n=7-8 \pm$ SD. Két csoportot párosítatlan t-tesztel, a három csoportot kétutas ANOVA tesztel elemeztük $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) és $p < 0.0001$ (***). P4: terhességi csoport (progeszteron), GDB: inzulin rezisztens és P4 (terhességi cukorbeteg csoportok).

Ezt a MUC-1 endometriális epitheliális differenciációs marker expressziójának növekedésével igazoltuk. A terhességi cukorbetegséget modellező környezet csökkentette a MUC-1 expressziót, de az SMTNL1 overexpresszálása részben ellensúlyozta ezt a hatást. A kontroll és a MOCK transzfektált Ishikawa sejtek sokszögűek, pleomorf tulajdonságúak, szabálytalan alakú magokkal és kisméretű, magas mag/citoplazmatikus aránnyal jellemezhetőek, de ezek progeszteron hozzáadására differenciálódtak: alacsonyabb sejtszámmal és kis vakuólumokkal és pleomorf magokkal rendelkező sejtekké váltak (39. ábra). A progeszteron-hiperglikémiás állapot megakadályozta az Ishikawa-sejtek morfológiai átalakulását, és a köbös szerkezet fennmaradt, ami a differenciálódás elmaradását mutatta. Ezt az SMTNL1 overexpressziója kompenzálni volt képes.

Kimutattuk, hogy az SMTNL1 overexpressziója csökkentette a MP MYPT1 szabályozó alegységének expresszióját és fokozta annak gátló foszforilációját, ami a miozin könnyű lánc (MLC20) foszforilációjának növekedéséhez vezetett (40. ábra).

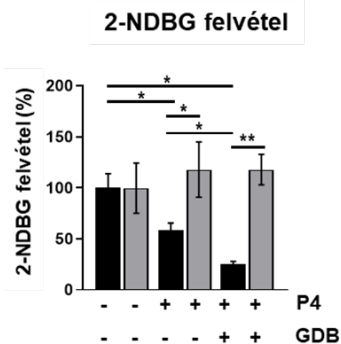


40. ábra. Az SMTNL1 overexpressziója növeli a MYPT1 és a miozin könnyű lánc (MLC20) foszforilációját és csökkenti az endometriális epithelialis sejtek migrációs képességét. Ishikawa sejtek kontroll, progeszteronnal kezelt (P4) és terhességi cukorbeteg (GDB) csoportjait üres plazmával vagy FT-SMTNL1 expresszáló plazmával transzfektáltunk és a sejtek lizátumait Western blot analízissel elemeztük a MYPT1, MYPT1^{pT696}, MLC20 és MLC20^{pS19} elleni antitestekkel. DiD fluoreszcens festékkel jelölt, üres vektorral (MOCK) vagy FT-SMTNL1-gyel transzfektált és a kezetlen kontroll, progeszteron kezelt (P4) vagy terhességi cukorbetegség (GDB) környezetben tartott Ishikawa sejteket scratch esszével vizsgáltuk (jobb panel). Két csoportot t-próbával, négy vagy több csoportot pedig kétutas ANOVA-val hasonlítottunk össze, ahol: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) és $p < 0,0001$ (***), $n=5$

Ezek a foszforilációbeli változások együttesen jelentősen csökkentették az Ishikawa sejtek migrációs képességét mindhárom vizsgált környezetben [173]. A nyálkahártya endometriális szöveteiben [174] végzett vizsgálatok alapján úgy tűnik, hogy a MP-nak fontos szerepe van az endometriális hámsejtekben, és a MYPT1 a fő szabályozó alegység az Ishikawa sejtekben jelen lévő MP-ben [173]. Ezenkívül az SMTNL1 csökkentheti az MP aktivitást mind a simaizomban [102], mind az endometriális hámsejtekben a MYPT1 expressziójának gátlásával is. Összességében eredményeink azt mutatják, hogy az MP elősegíti az Ishikawa-sejtek migrációját, amit az SMTNL1 csökkenteni képes inzulinrezisztens állapotban. Ez a megállapítás azért fontos, mert a szteroidhormonok egyensúlyának felbomlása kórosan módosítja a hám integritását és az endometriumsejtek migrációs képességét, és újabb bizonyítékot szolgáltat a szteroidhormonok hatása és a metabolikus rendellenességek között (40. ábra).

Számos eredmény utal az izolált endometriális sejt kultúrákban az inzulin ligandumok és az inzulinreceptorok aktivitásának hatásáról a sejtek proliferációjára és az endometrium sejtek differenciálódására. Az endometrium hiperglikémiás/hiperinzulinemiás metabolikus változásai a reproduktív diszfunkcióhoz és a szöveti atrófiához kapcsolódnak [175]. Megfigyeltük, hogy az SMTNL1 overexpressziója pozitív hatással volt az inzulin jelátvitelre is. Csökkentette az IRS1 gátló Ser612 oldalláncokon történő foszforilációját és növelte az Akt1 Ser473 foszforilációját terhességi és GDB modellben, ami a vázizomban leírt hatáshoz hasonlóan az inzulin érzékenység növekedésére utal.

Emellett az SMTNL1 overexpressziója növelte a glükóz felvételét (41. ábra) és a glikogén raktározást az Ishikawa sejtekben, különösen a terhességi cukorbetegséget modellező körülmények között. Az SMTNL1 progeszteronfüggő módon elősegítette a glükóz felvételét, és növelte a glikogéntartalmat az Ishikawa sejtekben, kompenzálva az inzulinrezisztenciát. Továbbá kimutattuk, hogy az SMTNL1 hatással volt az ERK1/2 MAPK jelátvitelre is, csökkentve annak foszforilációját és aktivációját a PP2A és DUSP9 foszfatázok fokozott expressziójának köszönhetően [173] (41. ábra).



41. ábra. Az SMTNL1 fokozza a glükóz felvételt. Az Ishikawa-sejtek 2-NDBG glükózfelvételét kontroll, progeszteron (P4) és terhességi cukorbetegség (GDB) körülmények között vizsgáltuk SMTNL1 overexpresszióval vagy anélkül. Az értékeket normalizáltuk és a kontroll MOCK csoporthoz viszonyított arányban fejeztük ki, amelyet 100%-nak tekintettünk. (jobb oldali panel) Két csoportot t-próbával, négy vagy több csoportot pedig kétutas ANOVA-val hasonlítottunk össze, ahol: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) és $p < 0,0001$ (***), $n = 5$

Összefoglalva, tanulmányunk betekintést nyújt az endometriális epitheliális sejtek működését szabályozó molekuláris mechanizmusokba terhesség és terhességi cukorbetegség során. Eredményeink kiemelik az SMTNL1 kulcsszerepét a sejt differenciálódás, migráció és metabolikus válaszok koordinálásában. Ezek a megállapítások potenciális jelentőséggel bírnak az endometriális diszfunkcióval összefüggő különböző reproduktív rendellenességek, így az endometriózis és az endometriális tumorok korai szakaszainak megértésében és kezelésében. Az ezen a területen folytatott további kutatások új terápiás stratégiákhoz vezethetnek a metabolikus rendellenességekkel vagy egyéb, az endometrium normál működését befolyásoló állapotokkal küzdő nők reproduktív eredményeinek javítására.

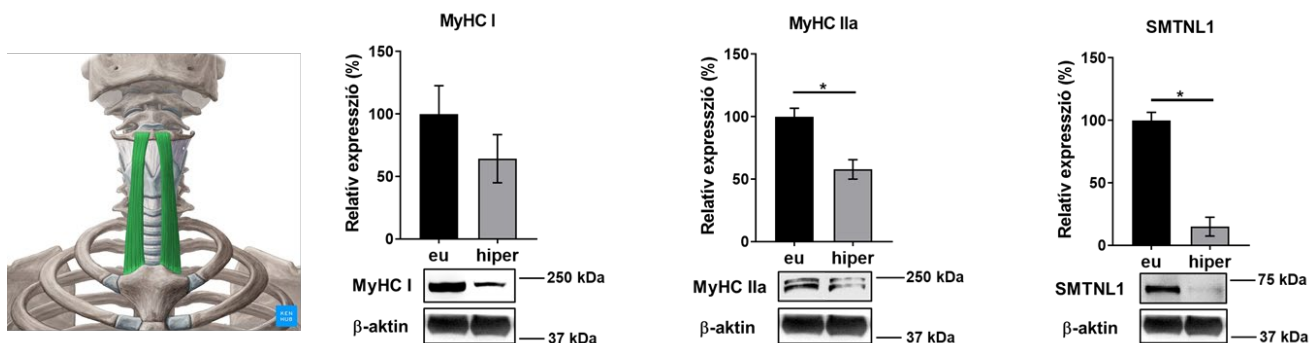
5.6. Az *SMTNL1* szerepe a pajzsmirigyhormon által indukált fiziológias és patológias folyamatokban izomban

5.6.1. A *SMTNL1* fehérje szerepe a hyperthyreosisos vázizom anyagcseréjének szabályozásában

A vizsgálataink középpontjában álló transzkripciós kofaktor, a *SMTNL1* fehérje figyelemreméltó abban a tekintetben, hogy képes szabályozni a vázizom különböző stresszhatásokra bekövetkező adaptálódását. A 5.4.1. fejezetben tárgyalt módon a vázizom adaptációja fiziológias és patológias folyamatok hatására is bekövetkezik. Patkányokon végzett kísérletekben kimutatták, hogy a pajzsmirigy megváltozott hormontermelése is képes a vázizom rostösszetételét jelentős mértékben átalakítani az MyHC expressziójának transzkripciós szintű szabályozása révén. Hyperthyreosis során a kiindulási rosttípustól függően az MyHC 1-ből 2a, a 2a-ból 2x, a 2x-ből pedig 2b lesz [176]. Ennek molekuláris mechanizmusa ismert, de szabályozó elemei még nem kerültek azonosításra.

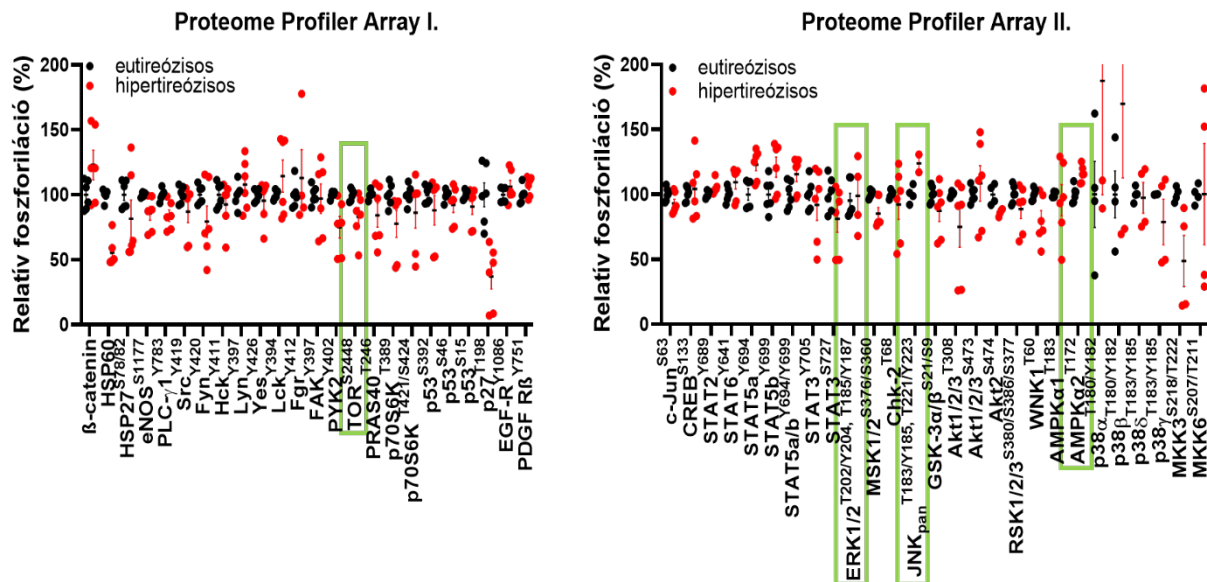
Az a munkahipotézisünk, miszerint az *SMTNL1* fehérje szabályozza a pajzsmirigyhormon által kiváltott izotípus változást a következő tényeken alapul: i, az *SMTNL1* KO egerek vázizomzatában az 2a típusú rostokban expresszálandó *SMTNL1* delécióna a vázizom rostösszetételének 2x vagy b irányú átalakulását indukálta [101]; ii, a vemhes nőstény egerek *m. plantaris* izmában a *SMTNL1* delécióna a 2a/2b típusú rostok arányának csökkenését eredményezi, ami egy összességében egy glikolitikusabb fenotípus kialakulását vonja maga után [152]. Vizsgálataink modellrendszereként pajzsmirigyműtéten átesett euthyreosisos és hyperthyreosisos nőbetegektől származó *m. sternohyoideus* biopsziákat, valamint fiziológias és szuprafiziológias aktív pajzsmirigyhormon kezelést kapott differenciált C2C12 myotubulusokat használtunk. Western blottal a MyHC IIa fehérje expressziójának számottevő csökkenését figyeltük meg a hyperthyreosisos humán vázizomban (42. ábra). Mivel szignifikáns izomtömeg-csökkenést nem írtunk le, ezért feltételezhető, hogy az MyHC I és IIa rostok csökkenése mellett az MyHC IIx rostok száma nőtt, ami az oxidatív(abb) rostok csökkenése miatt egy összességében glikolitikusabb fenotípust eredményezett. Bár az MyHC I fehérje expressziója is csökken, ez a változás statisztikailag nem szignifikáns, ami humán adatok hiányában a patkány *m. sternohyoideus* rostösszetételével magyarázható: fiziológias körülmények között az 1-es típusú rostok aránya mindössze 9%, míg a 2a típusú rostoké 24,2%, a 2x típusú rostoké pedig 20,8%.

A legmagasabb arányban a 2b típusú rostok vannak jelen (44,2%), azonban ez az izoforma a rágsálókkal ellentétben a humán vázizmokban nem detektálható [147], így ezt nem vizsgáltuk. Érdekes módon a SMTNL1 expressziója drámaian csökkent a hyperthyreosis során, ami arra enged következtetni, hogy a SMTNL1 szerepet játszhat a hyperthyreosisos vázizom patofiziológiájában (42. ábra).



42. ábra. MyHC IIa, MyHC I és SMTNL1 expresszió a hyperthyreosisos humán vázizomban. A vázizom biopsziák m. sternohyoideus-ból származtak (baloldali képen zölddel jelölve) és a fehérjéket Western blot analízissel vizsgáltuk. Az MyHC IIa, MyHC I és a SMTNL1 elleni specifikus antitestekkel kapott sávok denzitását elosztottuk a belső kontrollként használt β -aktin denzitásával, majd a hyperthyreosisos értékeket az euthyreosisos értékekre normalizáltuk. Az $n=3$ kísérletből származó relatív fehérje expressziót oszlopdiagramon ábrázoltuk (átlag $\pm$ SEM). A csoportokat kétmintás párosítatlan t -próbával hasonlítottuk össze, ahol $p<0,05$ (*). A baloldali kép forrása: <https://www.kenhub.com/en/library/anatomy/sternohyoid-muscle>

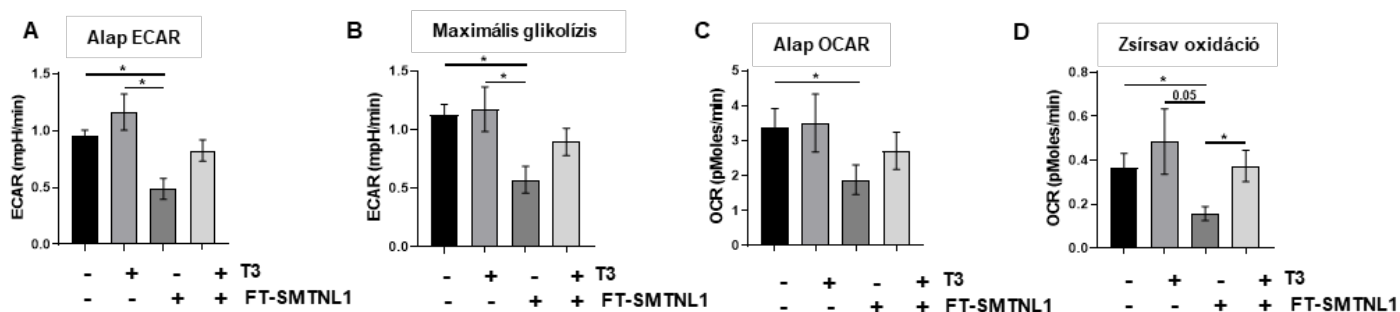
Az euthyreosisos és hyperthyreosisos humán biopsziák globális génexpressziós profiljának összehasonlítása és az adatok génontológiai analízise feltárta, hogy az mTOR, AMPK, PI3K/Akt és a MAPK szignalizációban résztvevő gének expressziója változott a legjelentősebb mértékben a hyperthyreosis hatására. Ezek a jelátviteli útvonalak többek között olyan biológiai folyamatokban játszanak szerepet, mint a sejt szerkezet és szerveződés, a sejt- és szövetfejlődés, a lipid metabolizmus, az anyagcsere és energiatermelés, valamint ezek zavarai. A microarray analízis során azonosított jelátviteli útvonalak hyperthyreosis által indukált fehérjeszintű változásainak tanulmányozására számos kináz relatív foszforilációs szintjét is megvizsgáltuk a hyperthyreosisban szenvedő donorok vázizmában (43. ábra). A Proteome Profiler eredményekből kiderül, hogy a Ser/Thr kinázok csoportján belül egyebek mellett az mTOR^{S2448} és az Akt2^{S474} foszforilációja és ezáltal az aktivitása szignifikánsan csökken míg az ERK1/2^{T202/Y204}, AMPK α 2^{T172} és a JNK_{pan}^{T183/Y185,T221/Y223} foszforilációja és aktivitása szignifikánsan nő a hyperthyreosis során (43. ábra).



43. ábra. Humán euthyreosis és hyperthyreosis vázizom biopsziák foszforilációs mintázatának vizsgálata.. A minták homogenizálását követően számos fehérje relatív foszforilációs szintjének egyidejű, gyors és érzékeny meghatározását végeztük el a human foszfo-kináz (bal panel) és foszfo-MAPK array segítségével (jobb panel). Az $n=3$ kísérletből származó eredményeket átlag $\pm$ SEM formában ábrázoltuk. A csoportokat kétmintás párosítatlan t -próbával hasonlítottuk össze, a részletes grafikon a függelékben található (1S. ábra), ahol $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)

A microarray és a Proteome Profiler array-k eredményeiből kitűnik (Táblázat S3), hogy a hyperthyreosisnak jelentős befolyása van a vázizom fejlődésére és anyagcseréjére az ezen folyamatokban szerepet játszó fehérjék expressziójának vagy aktivitásának módosításán keresztül, és a hyperthyreosis kulcsfontosságú szignalizációs útvonalakat szabályoz a humán vázizomban, ami az irodalom alapján várható, mivel a T3 az anyagcsere regulátora (43. ábra). A differenciáltatott C2C12 sejtekben a TR α /TR β arány csökkenését és a MyoD1 szignifikáns növekedését detektáltuk a szuprafiziológiás T3 kezelés hatására, míg a SMTNL1 overexpressziója a TR α expresszióját markánsan csökkentette [3].

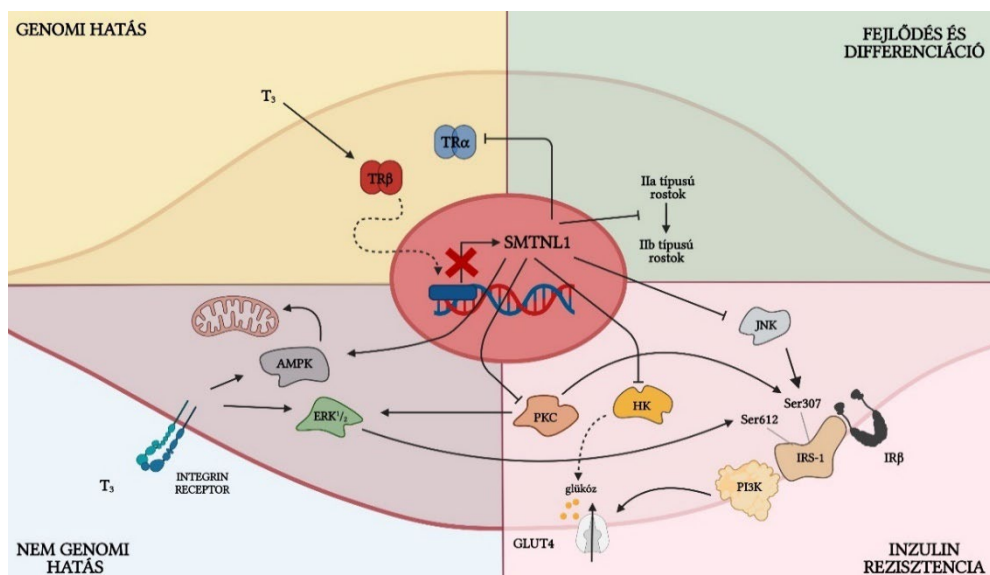
Továbbá a mioblasztok SeaHorse analízise rávilágított arra, hogy a SMTNL1 a glikolízis gátlásán keresztül antagonizálja a T3 hatását a miotubulusokban (44. ábra). A T3 kezelésre fokozódik a laktáttermelés, és a SMTNL1 overexpressziója nemcsak, hogy meggátolta a T3-indukált anaerob glikolízis fokozódását, de a mitokondriális oxidatív foszforiláció és a zsírsav oxidáció mértékét is szignifikánsan csökkentette. A kapott adatok fényében elmondható, hogy a feleslegben lévő T3 a laktáttermelés és a zsírsav oxidáció fokozódását indukálja, miközben a SMTNL1 a különböző anyagcserefolyamatok, főként a glikolízis szabályozásán keresztül antagonizálja a T3 hatását. Eredményeink alapján a SMTNL1 fehérje inzulinérzékenyítő és T3



44. ábra. A pajzsmirigyhormon hatás és az SMTNL1 overexpresszió hatása azC2C12 mioblasztok anyagcseréjére. Az extracelluláris savasodási ráta (ECAR) és az oxigénfogyasztási ráta (OCR) mérése Seahorse-elemzéssel történt. Az üres vektorral vagy FT-SMTNL1-transzfectált mioblasztok 72 órás T3-kezelése után glükózzal kiegészített Seahorse XF vizsgálati közeget adtunk a sejtekhez. A mioblasztokat etomoxirral (50 μ M), oligomycinell (2 μ M), FCCP-vel (4 μ M) és antimycinell (10 μ M) + 2-deoxi-D-glükózzal (100 mM) kezeltük. A protonkoncentráció-növekedés (A-B) és az oxigénkoncentráció-csökkenés (C-D) sebességét mértük. Az ábra az alap ECAR (A), alap OCAR (B) értékeket, a maximális glikolízist (C) és a zsírsav oxidáció mértékét (D) mutatja. Az értékek 4 csoportot jelentenek 23 technikai ismétléssel/csoport, n=3, átlag $\pm$ SEM. Az adatokat a fehérjetartalomra normalizáltuk. A csoportokat egyutas ANOVA és Tukey-féle post hoc teszt segítségével hasonlítottuk össze, $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**).

antagonizáló hatása révén képes a hyperthyreosis és az azt kísérő inzulinrezisztencia mérséklésére, melyet többek között az IRS kinázok aktivitásának, valamint a hexokináz enzim expressziójának csökkentésén keresztül ér el (44. ábra).

A hyperthyreosis egy felfokozott anyagcserével járó állapot, melyben a sejtek megnövekedett glükózigényét az intracelluláris glikogénraktárak fokozott lebontásából és/vagy az extracelluláris glükóz felvételének serkentéséből próbálja fedezni a sejt, azonban tünetként írták le a csökkent perifériális inzulinérzékenységet és glükóz intoleranciát is hyperthyreosis során [177; 178]. Ennek oka a vázizom inzulin-mediált glükózfelvételét szabályozó jelátviteli útvonal, ezen belül az IRS fehérjék megváltozott aktivitásában keresendő [157]. Eredményeink bizonyítékul szolgálhatnak arra vonatkozóan, hogy a szuprafiziológiás T3 szint zavart okoz az inzulin jelátvitelben egyrészt az IRS1 307-es és 612-es Ser foszforilációjának növelése által [3], ami a fehérje inaktiválódását és a PI3K disszociációját vonja maga után, másrészt a PI3K expressziójának csökkentésén keresztül, ami a serkentő PI3K általi foszforiláció csökkenését eredményezi. Ezek együttesen a negatív Ser foszforiláció túlsúlyba kerüléséhez járulnak hozzá, ami inzulinrezisztencia kialakulását indukálja. Az IRS1 gátló Ser foszforilációjának mérséklése révén a SMTNL1 fehérje azonban képes lehet a glükóz transzport inzulinra adott normál válaszadó képességét visszaállítani.



45. ábra: A SMTNL1 szerepe a hyperthyreosis 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. Módosítva: [3]

Munkahipotézisünk szerint a megnövekedett IRS1 Ser foszforiláció a szuprafiziológiás T3 kezelés következtében aktiválódott IRS1 kinázok, mint a ERK1/2 és a JNK hatásának eredménye, melyet a hyperthyreosis humán minták Proteome Profiler elemzése is alátámaszt (S.3. ábra). A SMTNL1 túltermeltetése következtében csökkenő IRS1 és ERK1/2 foszforiláció a PKC δ expressziójának visszaesésével magyarázható, amely egyrészt a Ser307 oldalláncot foszforilálja az IRS1-en [179], másrészt az ERK1/2 aktiválásáért is felelős [180]. A T3 által feltehetően nem-genomi útvonalon aktivált ERK1/2 az IRS1 Ser612 oldallánc foszforilációjának fokozódásáért felelős. A kapott adatok magyarázatot jelenthetnek a szuprafiziológiás T3 koncentráció által előidézett gátló IRS1 Ser foszforiláció fokozódására, továbbá alátámasztják a SMTNL1 fehérje inzulinérzékenyítő hatását. A T3-mal kezelt sejtekben a PP2Ac expressziójának csökkenése az AMPK foszforiláció tartós megemelkedését vonta maga után, ami a GLUT4 és hexokináz II (HK II) expressziójának indukálásán keresztül fokozta a glikolízist (45. ábra) [3].

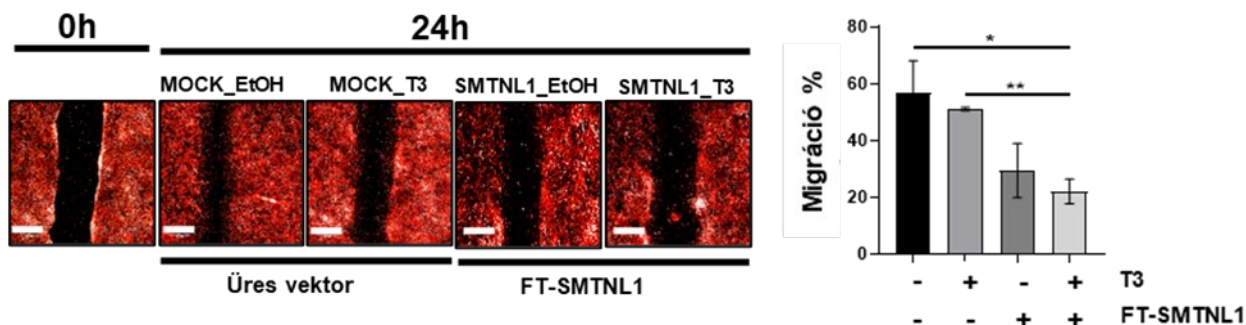
Eredményeinket összefoglalva a SMTNL1 általi szabályozás ígéretes lehet a hyperthyreosis és az azt kísérő inzulinrezisztencia gyógyításában (45. ábra), mivel képes szelektíven képes gátolni a TR α expresszióját. Emellett inzulinérzékenyítő hatást fejt ki egy inzulintól független, heterológ útvonalon, a JNK aktivitásának gátlásán keresztül, és gátolja a T3

nem-genomi hatásait. Mindemellett szabályozza a glükóz foszforilációt és a glikolízist, és ezen keresztül ellensúlyozza a T3 által indukált glikolitikus fenotípus kialakulását. Mindezen tulajdonságai miatt a SMTNL1 overexpressziója vagy -alternatív megoldásként- egy membránpermeabilis SMTNL1 mimikáló peptid inzulinérzékenyítő hatása révén képes lehet a hyperthyreosis során fellépő kezdődő inzulinrezisztencia ellensúlyozására a vázizomban.

5.6.2. A SMTNL1 és a T3 szelektíven szabályozzák a MYPT1 és MYPT2 izoformákat a miotubulusokban

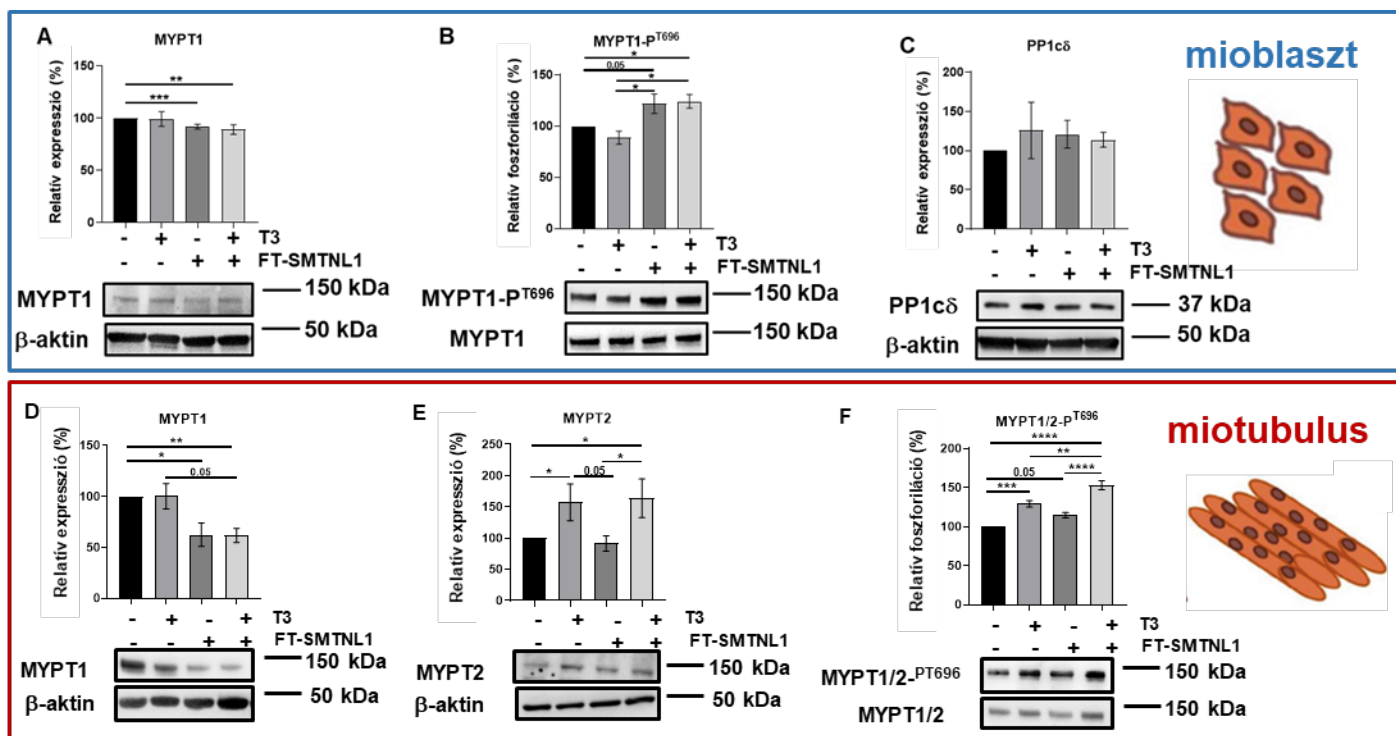
Korábbi tanulmányokból kitűnik, hogy a MP enzim aktivitása nemcsak a különböző sejtek migrációs képességét [1; 128; 181], de a vázizom modellezésére használt C2C12 sejtek differenciációját is szabályozhatja [182]. Mivel a migráció és a differenciáció a vázizom fejlődésében is fontos szerepet játszik, ezért a SMTNL1 fehérje és a MP közötti kapcsolatot, valamint ezen fehérjék potenciális szabályozó szerepét is vizsgáltuk az említett folyamatokban és a már differenciálódott sejtek homeosztázisának fenntartásában a hyperthyreosis modellezésére szolgáló kísérleti rendszerben. Emiatt utánajártunk, hogy a SMTNL1 túltermeltetése és a szuprafiziológiás T3 kezelés hogyan befolyásolja a C2C12 mioblasztok migrációját. Megállapítottuk, hogy a SMTNL1 overexpressziója jelentős mértékben visszavetette a sejtek migrációs képességét a T3 jelenlétében (46. ábra).

A jelenséget a SMTNL1 MP enzimet gátló hatásával magyaráztuk. Felvetésünk igazolására nemcsak a MP-t felépítő alegységek, hanem az enzim szubsztrátjának (MLC20)



46. ábra. T3-kezelt és SMTNL1 overexpresszáló mioblasztok karcólásos vizsgálata. A mioblasztokat üres vektorral vagy FT-SMTNL1-tel transzfektáltuk. 48 órás tenyésztés és 5 órás szérumeheztetést követően megkarcoltuk, majd további 24 órán át tiszta oldószer (EtOH) vagy etanolban oldott 10 nM T3 jelenlétében növesztettük. A karcólásos területekről 10x-es objektívvel készítettünk fényképeket a jelzett időpontokban. Méretség: 500 μ m. (bal panel) A jobb oldali daigramm a 24 óra elteltével lefedett karcólásos területeket mutatja. $n=3$, átlag $\pm$ SEM. Az adatokat az üres vektor-transzfektált kontrollhoz normalizáltuk. A csoportok átlagai közötti különbségeket kétirányú ANOVA (B) vagy egyirányú ANOVA (C), majd Tukey post hoc teszt követte, $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,0001$ (****).

expresszióját és foszforilációját is megvizsgáltuk. A C2C12 mioblasztokon végzett kísérleti eredményeink értelmében a SMTNL1 overexpressziója önmagában és a T3 kezeléssel kombinálva a MYPT1 expresszióját szignifikánsan csökkentette, míg a Thr696-os oldallánc foszforilációját szignifikánsan növelte. A MYPT1 gátló foszforilációjának növekedését mindkét esetben az MLC20 Ser19 oldallánc foszforilációjának szignifikáns emelkedése kísérte (47. ábra). Eredményeinket alátámasztja az a megfigyelés, hogy a SMTNL1 KO egerekben a MYPT1 expressziójának növekedése mellett csökkent MLC20 Ser19 foszforilációt detektáltak az állatok



47. ábra. Az SMTNL1 overexpressziója szabályozza a miozin foszfatáz foszforilációját a mioblasztokban és miotubulusokban. A C2C12 mioblasztokat (A-C) és miotubulusokat (D-F) üres vektorral vagy FT-SMTNL1 plazmiddal transzfektáltuk, és 10 nM T3-mal kezeltük 24 órán át. A teljes sejt lizátumokat anti-MYPT1 (A, D), anti-MYPT1-^{PT696} (B, E), anti-MYPT2 (E), és anti-PP1cδ (C) antitestekkel Western blot segítségével elemeztük. $n=3$, átlag $\pm$ SEM. Az adatokat az üres vektorral transzfektált kontrollra normalizáltuk. A csoportok átlagai közötti különbségeket egyutas ANOVA és Tukey-féle post hoc teszt segítségével határoztuk meg, $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)

simaizmában [102]. A MP enzim MYPT1 alegységének Thr696 foszforiláció általi gátlása a nem-izom miozin foszforilációjának lassabb turnoverét eredményezheti, ezáltal stabilabb adhézisos struktúrák jönnek létre, amik akadályozzák a sejtek citoszkeletonjának átrendeződését és a sejtek migrációját.

A SMTNL1 tranziens overexpressziója során a fehérje expressziója kezdetben nagyon magas, majd a differenciáció progressziójával párhuzamosan csökken. Fiziológias T3 koncentráció mellett a SMTNL1 overexpressziója a korai és késői differenciációs markerek upregulálódását okozza, ami alapján úgy tűnik, hogy a SMTNL1 segíti a C2C12 mioblasztok miotubulusokká történő differenciációját. A molekuláris szintű változásokon túlmenően a differenciáció során bekövetkező morfológiai változásokat is nyomonkövettük. Megfigyeléseink szerint a SMTNL1 overexpressziója kisebb méretű, de nagyobb számú miotubulus kialakulását indukálja, ami támogatja a SMTNL1 fehérje differenciációt elősegítő hatásáról alkotott hipotézisünket.

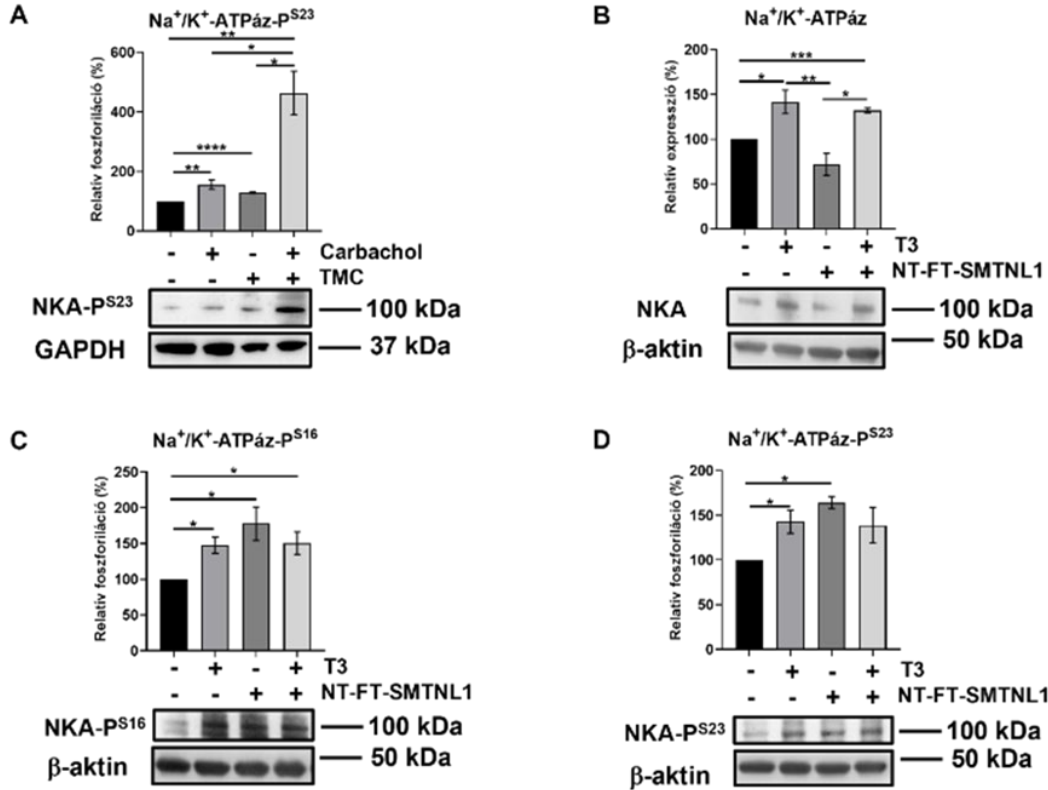
Az eredményekből kitűnik, hogy míg a mioblasztokban a PP1c δ inkább a MYPT1 izoformával alkot komplexet, addig az érett miotubulusokban elsősorban a MYPT2 az, amely a PP1c δ -val közösen vesz részt a MP holoenzim felépítésében (47. ábra). Érdekes módon a szuprafiziológias T3 kezelés a differenciálódó mioblasztokban a MYPT2 expresszióját növelte, míg a PP1c δ és a MYPT1 expressziójára nem volt hatással, ahogy azt a proliferatív fázisban lévő mioblasztok vizsgálatánál is tapasztaltuk (47. A és C). A miotubulusok vizsgálatánál is hasonló eredményre jutottunk: a MYPT1 expressziója T3 kezelés hatására nem változott, de a SMTNL1 overexpressziója és a kombinált kezelés szignifikáns visszaesést okozott a fehérje relatív expressziójában (47.D. ábra). Ezzel szemben a MYPT2 expressziója drámaian, emelkedett a T3 kezelés, valamint a kombinált kezelés hatására, miközben a SMTNL1 overexpressziója nem volt hatással rá (47.E. ábra). A PP1c δ expressziója kis mértékben csökkent a T3 kezelés és/vagy a SMTNL1 overexpressziójának következtében (47. C ábra). Ezen eredmények összecsengenek azzal, hogy a SMTNL1 kiütése a MYPT2 expressziós szintjét nem befolyásolja a vázizomban [102]. A mioblasztokon és a miotubulusokon nyert eredményeket összegezve úgy tűnik, hogy a T3 és a SMTNL1 szelektíven szabályozzák a különböző MYPT izoformák kifejeződését mind a differenciálatlan, mind a már differenciálódott sejtekben (49. ábra). Az SMTNL1 túltermelés által indukált MYPT1 és MLC20 fokozott foszforilációja arra utal, hogy az SMTNL1 létfontosságú szerepet játszik az MP aktivitás szabályozásában az izomképződés kezdeti szakaszában. A kulcsfontosságú szabályozó fehérjék foszforilációs állapotának modulálásával az SMTNL1 segít összerendezni a mioblasztok differenciálódásának és érett izomrostokká történő fúziójának összetett folyamatát [183].

A C2C12 sejtek differenciálódásával a nem-izom miozinról a vázizom típusú miozin felé történő eltolódás figyelhető meg, és a 6. napon a nem-izom miozin alig volt kimutatható a miotubusokban, míg az vázizom-miozin koncentrációja megnőtt [32]. A MYPT1-PP1c δ simaizom típusú holoenzim alacsony affinitást mutat a foszforilált vázizom-miozinhoz, emellett az vázizom-miozin foszforilációja csökkent, de nem szűnt meg a differenciálódás 6. napján [32], ami arra utal, hogy a miotubulusokban, illetve érett vázizomban is jelen lévő MP nincs hatással az izom kontraktilitásának szabályozásával a nem-izom szövetektől eltérően, emiatt a MP alternatív szubsztrátjai léteznek az vázizomban [183].

Az MP egyik lehetséges szubsztrát jelöltje a vázizomban a Na⁺/K⁺-ATPáz (NKA). Az NKA egy transzmembrán pumpa, amely nélkülözhetetlen a sejtek ion- és vízhomeosztázisához, a membránpotenciálok fenntartásához és a különböző anyagok Na⁺ -hoz kapcsolt transzportjához. A vázizomban található az egyik legnagyobb és legdinamikusabb NKA-raktár a szervezetben [184]. Ezért az NKA szabályozása akár szubsztrátjainak koncentrációja, akár az FXYP fehérjékkel való fehérje-fehérje kölcsönhatások, akár kovalens módosítás - elsősorban foszforiláció - révén döntő fontosságú [36]. A NKA számos szabályozó foszforilációs helye közül kiemelendő két foszforilációs hely: a Ser23-as és Ser16-es oldalláncok, amelyek az NKA gátlásáért felelősek [185]. Az NKA-t már azonosítottuk a MYPT1 interakcióban egér szinaptoszóma kivonatból végzett pull-down assay-vel, majd tömegspektrometriás elemzéssel [114]. A C2C12 sejt lizátumból végzett koimmunoprecipitáció szintén kimutatta az NKA és a MYPT közötti kölcsönhatást.

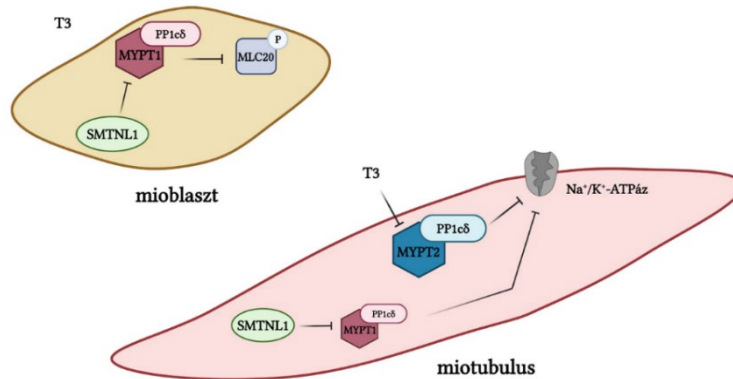
Kísérleteink alapján a NKA expresszióját a szuprafiziológias T3 kezelés növelte, míg a SMTNL1 overexpressziója kismértékben csökkentette (48. A. ábra). Eredményeink összhangban vannak Riis és mtsai munkájával, melyben azt találták, hogy az NKA expressziója 89%-ban megemelkedett a hyperthyreosisban szenvedő betegek mintáiban az euthyreosisos donorok mintáival összevetve [186]. A NKA Ser23 és Ser16 foszforilációs helyeinek vizsgálatakor mind a szuprafiziológias T3 kezelés, mind a SMTNL1 overexpresszió következményeként szignifikánsan emelkedett foszforilációt mutattunk ki (48. C és D ábra). Ez vélhetően a MP holoenzim megnövekedett gátló foszforilációjának köszönhető, amely így nem képes a NKA-t defoszforilálni. Ezt a megfigyelést egerek *m. plantaris* izmából készített preparátum PP1 szelektív inhibitorral (TMC) történő kezelése is alátámasztja, melyben fokozott NKA α 1 Ser23-as foszforilációt detektáltunk, az NKA aktiváláshoz karbakolt, kolinerg agonistát, alkalmazva (48. A.

ábra). Ezen eredmények alapján kijelenthetjük, hogy mind a T3, mind a SMTNL1 a különböző MYPT izoformákat tartalmazó MP holoenzim gátlásán keresztül részt vesz a NKA foszforilációs állapotának és ezáltal aktivitásának szabályozásában (48. ábra) [183]



48. ábra: A SMTNL1 overexpresszió és a szuprafiziológiás T3 kezelés hatása a NKA expressziójára és foszforilációjára a miotubulusokban. Egerek *m. plantaris* izmából készített preparátumot 10 μ M TMC-vel kezeltünk 30 percig, amit egy 10 percig tartó 10 μ M-os carbacholos kezelés követett. A mintákat homogenizáltuk, és a NKA-P^{S23} elleni specifikus antitesttelelemezttük (A). A mioblasztokat üres plazmiddal (MOCK) vagy rekombináns SMTNL1 fehérjét expresszáló plazmiddal (NT-FT-SMTNL1) transzfektáltuk, majd differenciáltattuk. A miotubulusokat 10 nM T3-mal kezeltük, majd Western blot analízist végeztünk a NKA (B), NKA-P^{S16} (C) és NKA-P^{S23} (D) elleni specifikus antitestekkel. A kapott eredmények $n=3$ kísérletből származnak, melyek átlag $\pm$ SEM értékét ábrázoltuk. Minden esetben a nem kezelt és/vagy üres plazmiddal transzfektált kontrollra normalizáltunk. A csoportok közötti különbségeket Tukey-féle post hoc teszttel kombinált egyutas ANOVA-val elemeztük, ahol $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) és $p < 0,0001$ (****).

Fontos megjegyezni, hogy a NKA hipo- vagy hiperfunkciója egyaránt hátrányos következményekkel jár az izomfunkcióra nézve: a NKA hiperfunkciója hiperpolarizáló hatású, ami a membránpotenciált még negatívabbá teszi, melyben nehezebb elérni a feszültségfüggő Na⁺ csatornák nyitásához és a Ca²⁺ felszabadulásához szükséges küszöböt, ezáltal az izom ingerlékenysége csökken, ami izomgyengeség kialakulásához vezet. A pumpafehérje



49. ábra: A MP enzim különböző módon szabályozódik az eltérő differenciációs állapotú izom sejtekben. A nem differenciált mioblasztokban a MP felépítésében a PP1cδ mellett a MYPT1 izoforma vesz részt, melynek expresszióját és aktivitását, ezen keresztül pedig a sejtek citoskeletális átrendeződését és migrációját a SMTNL1 fehérje szabályozza. Ezzel szemben a miotubulusokban a PP1cδ elsősorban a MYPT2 izoformával alkot komplexet, melynek aktivitása T3 által szabályozott, és amely lehetséges szabályozó eleme a NKA-nak, a fehérje foszforilációs állapotának befolyásolásán keresztül. Ezen eredmények hozzájárulhatnak a hyperthyreosis során fellépő izomgyengeség jobb megértéséhez, amely a betegek életminőségének javítását szolgálja.

hipofunkciója esetén a membránpotenciál pozitívabb, a sejtmembrán deporalizáltabb, emiatt a feszültségfüggő Na^+ csatornák egy része inaktivált állapotba kerül, ezért az akciós potenciál amplitúdója kisebb, kevesebb Ca^{2+} szabadul fel, ami kisebb mértékű összehúzódást, ezáltal pedig izomgyengeséget eredményez [187]. Ezen oknál fogva a rendszer finomhangolása kritikus jelentőséggel bír.

Eredményeink alapján MYPT2 szelektív felülszabályozása a hyperthyroid izomszövetekben egy adaptív válaszra utal, amelynek célja az izom-összehúzódási és elernyedési ciklusok finomhangolása a megemelkedett metabolikus igényekre válaszul. A hyperthyreosis izomgyengeséggel és fáradtsággal jár együtt, ami részben a MP-ok megváltozott szabályozásának tulajdonítható (49. ábra). A MYPT2 és a PP1cδ fokozott expressziója egy kompenzációs mechanizmust képviselhet, amely ellensúlyozza a magas T3 szintek által kiváltott fokozott izomkontraktilitást és energiafelhasználást. Az MP-ok aktivitásának modulálásával a pajzsmirigyhormon segít fenntartani az izom-összehúzódás és elernyedés kényes egyensúlyát, biztosítva az optimális izomfunkciót a változó élettani körülmények között. Ezen eredmények integrációja finomhangolt kölcsönhatást tár fel a SMTNL1 és a pajzsmirigyhormon között a MP szabályozásában. Míg a SMTNL1 gátló hatást fejt ki a MYPT1-re a korai mioblaszt differenciálódás során, addig a T3 szelektíven felülszabályozza a MYPT2-t a hyperthyroid izomszövetekben. Ez a differenciális szabályozás kiemeli a MP szabályozás összetettségét és a szabályozó fehérjék és hormonális jelek sokoldalú szerepét az izomfunkció modulálásában (49.

ábra). Az SMTNL1 és a T3 kölcsönhatásának megértése a MP szabályozás kontextusában értékes betekintést nyújthat a megváltozott izomdifferenciációval és pajzsmirigy-diszfunkcióval összefüggő izombetegségek patogenezisébe [183].

6. KITEKINTÉS

A disszertációmban összefoglalt eredmények rávilágítanak a MP, a simaizomzat kontraktilitását szabályozó enzim sokrétű és rendhagyó funkcióira. Kimutattuk, hogy az MP szabályozó MYPT1 alegysége valamennyi eddig vizsgált sejttypusban expresszálódik és változatos szubcelluláris lokalizációt mutat az eukarióta sejtekben. A citoplazma és a citoszkeleton mellett a MYPT1 és a PP1c egyaránt megtalálható a sejtek nukleáris, mitokondriális és plazmamembrán frakcióiban, és a MYPT1-interaktomokban azonosított fehérjék többsége nem releváns a citoszkeletális szabályozás szempontjából, ami arra utal, hogy az MP sokkal több mint a miozin könnyűlánc defoszforilációjának kizárólagos szabályozója. Továbbá a MYPT1 funkciója is több mint a szubsztrátspecifitás meghatározása a MP holoenzimen belül: ugyanis állványfehérjeként szolgálhat, vagy nukleocitoplazmatikus transzfermechanizmust biztosít a fehérjék számára - még a PP1c-vel való kölcsönhatása nélkül is.

A miozin foszfatazt évtizedek óta a RhoA/ROK jelátvitel downstream célpontjának tekintik, de terápiás potenciálját ezidáig figyelmen kívül hagyták. Számos adat bizonyítja a MP ROK-tól független hatását és szabályozását, ami kiterjeszti a MP jelátvitel hatáskörét és fontosságát. Az MP különböző jelátviteli útvonalakban betöltött szerepére vonatkozó megállapításaink alapján az MP modulálása a miozin foszfataz holoenzimre specifikus aktivátor(ok) tervezésével lehetőséget biztosíthat a tumorigenezis gátlására vagy az inzulinérzékenység fokozására, miközben a kulcsfontosságú downstream molekulák, mint a pRb, PRMT5 vagy PLK defoszforilációjának fokozása szintén új terápiás megközelítést jelenthet. A genetikai és farmakológiai eszközök kombinációja lehetővé teszi ezen összefüggések feltárását, és hozzájárulhat a defoszforilációs folyamatok által szabályozott molekuláris események teljesebb megértéséhez.

Az SMTNL1 a MP szabályozásával és attól független útvonalakon keresztül szintén szerepet játszhat az inzulinrezisztencia megelőzésében azáltal, hogy az IRS Ser foszforilációjának csökkentésével hozzájárul a progeszteronfüggő inzulinérzékenységhez. Ezért a SMTNL1 fehérjét mimikáló membránpermeabilis peptid reális terápiás eszköz lehet az endometriális hámsejtek progeszteronfüggő gátlására hiperglikémia és inzulinérzékeny endometrium esetén a terhességi

cukorbetegségben vagy más anyagcsere-rendellenességekben. Eredményeink klinikai következményei jelentősek, mivel az SMTNL1 modulálása és a pajzsmirigyhormon-szintek vagy azok downstream célpontjainak modulálása új terápiás stratégiákat kínálhat az izommal kapcsolatos betegségek kezelésében. Például az SMTNL1 expressziós szintjének módosítása az izomregeneráció során elősegítheti a szatellita sejtek differenciálódását és fúzióját, fokozva a sérült izomrostok javítását és regenerációját. Ez különösen releváns lehet az izomdisztrófiák esetében, ahol a károsodott izomregeneráció hozzájárul a progresszív izomgyengeséghez és sorvadáshoz. Hasonlóképpen, a pajzsmirigyhormon jelátvitel modulálása vagy a downstream effektorok, mint például a MYPT2 célzása, enyhítheti az izomtűneteket a hyperthyreosisban szenvedő betegeknél. A hyperthyroid izomszövetekben az MP aktivitás egyensúlyának helyreállítására irányuló farmakológiai beavatkozások javíthatják az izomerőt, az állóképességet és az érintett egyének általános életminőségét.

7. 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 transzglutamináz 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 tumorszuppresszorok 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 transzkripció kofaktoraként ligandum-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 terheességhez 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 hyperthyreosis során tapasztalható izomgyengeség kialakulásához.

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani mentoraimnak, akik pályafutásom kezdete óta a becsületes, szakmai tökéletességre és pontosságra és a tudományos eredmények reális, mértéktartó értelmezésére tanítottak. Elsőként szeretném megköszönni Dr. Erdődi Ferenc egykori PhD témavezetőm azóta is szakadatlan szakmai támogatását és barátságát, disszertációm véleményezését. Szintén köszönöm a Dr. Timothy Haystead (Duke University Cancer Research Institute) posztdoktori munkacsoportvezetőmnél töltött éveket, akinél a változatos módszertani tapasztalatok mellett gondolatébresztő beszélgetésekkel gazdagodhattam, és akivel jelenleg is eredményesen együttműködünk. Dr. William T. Gerthoffer és Dr. Cherie A. Singer (University of Nevada, Reno) segítségét is köszönöm, akiknél egy másfél évig tartó tanulmányutam alkalmával elmélyíthettem molekuláris biológiai tudásom és gyakorlati alkalmazásában is jártasságot szerezhettem. Köszönetet szeretnék mondani Dr. Gergely Pál akadémikus úrnak, aki munkámat mindig támogatta és figyelemmel kísérte pályafutásom során. Köszönöm Dr. Dombrádi Viktor egyetemi oktatóként, majd munkatársként nyújtott segítségét és tanácsaiért, és köszönöm, hogy szakmai tanácsaival és észrevételeivel hozzájárult disszertációm elkészüléséhez.

Végtelenül hálás vagyok azért, hogy munkám során nagy szakértelmű együttműködő partnerekkel dolgozhattam, így Dr. Fülöp Péter (DE Belgyógyászati Intézet), Dr Győry Ferenc (DE Sebészeti Intézet), Dr Hetényi Csaba és Dr Börzsei Rita (Pécsi Orvostudományi Egyetem) segítségéért is hálás vagyok.

A jelenlegi disszertáció a PhD hallgatóim lelkiismeretes munkája nélkül nem jöhetett volna létre, ezért köszönöm Dr Sipos Adrienn, Dr. Horváth Dániel, Dr Major Evelin és Dr. Tamás István munkáját. Köszönöm továbbá Dr Iván Judit munkacsoportomban végzett munkáját és barátságát. Kifejezetten szerencsésnek érzem magam, mert jelen munkacsoportom tagjaival való munka igazán inspiráló, így köszönöm Dr. Keller Ilka, Dr. Makai Attila, Ungvári Ádám, Kinter Richárd PhD hallgatók munkáját. Köszönettel tartozom a TDK munkájukban kiváló teljesítményt nyújtó Dr Tóth Klaudia, Dr. Tari Dóra, Kovács Szonja, Székely Mihály, Reem Khamis, Farkas Emese, Szalmás Fanni, Széles Sára és minden eddigi diplomamunkát és TDK pályamunkát végző hallgatónak.

Szeretnék köszönetet mondani az Orvosi Vegytani Intézet minden dolgozójának, hogy bármikor hozzájuk fordulhattam segítségért. Külön szeretném megköszönni Dr. Kiss Andrea, Dr.

Tar Krisztina, Dr. Jenei Attila, Dr. Kókai Endre és Dr. Bécsi Bálint baratságát és a tőlük munkám során kapott tanácsokat. Köszönöm Kelemenné Szántó Ágota, Docsa Andrea és Dr. Németh Árpádné mindennapos kísérletes munkámban való hibátlan, hatékony segítségét. Köszönöm Dr. Hegedűs Csaba műszeres kísérletekben nyújtott segítségét. Szintén köszönöm Patka Andrea, Gregus Andrea és Kovács Éva segítségét a pályázatokkal valamint a kutató- és oktatómunkával kapcsolatos adminisztratív feladatokban.

Hálás köszönettel tartozom családomnak, szüleimnek, férjemnek és gyerekeinknek, aki szeretetükkel végig támogattak munkám során!

Kutató munkámat az alábbi pályázatok támogatták témavezetőként: NKFIH/OTKA 143533, 125043, 104878; University of Debrecen, KutEgy2015; BMC Korea Research Fund 2012; Mecenatúra 7A1YC50007 és résztvevőként: Live Longer, EFOP-3.6.2-16-2017-00006; NKFIH/OTKA 109249, 80709, T043296; TÁMOP-4.2.2. A-11/1/KONV-2012-0025s, OTKA 80709, 2009-2013, ETT266/2006, ETT 206/2003.

9. 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, Bátori 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, Medzihradszky 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, Loiselle D, Safi R, Zheng D, Devente 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, Loiselle 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, Batori 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, Szücs 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.

10. FÜGGELÉK

Táblázat S1. Az siMYPT1 HepG2 sejtekben legalább 1,5-szeres génexpressziós változást mutató gének.

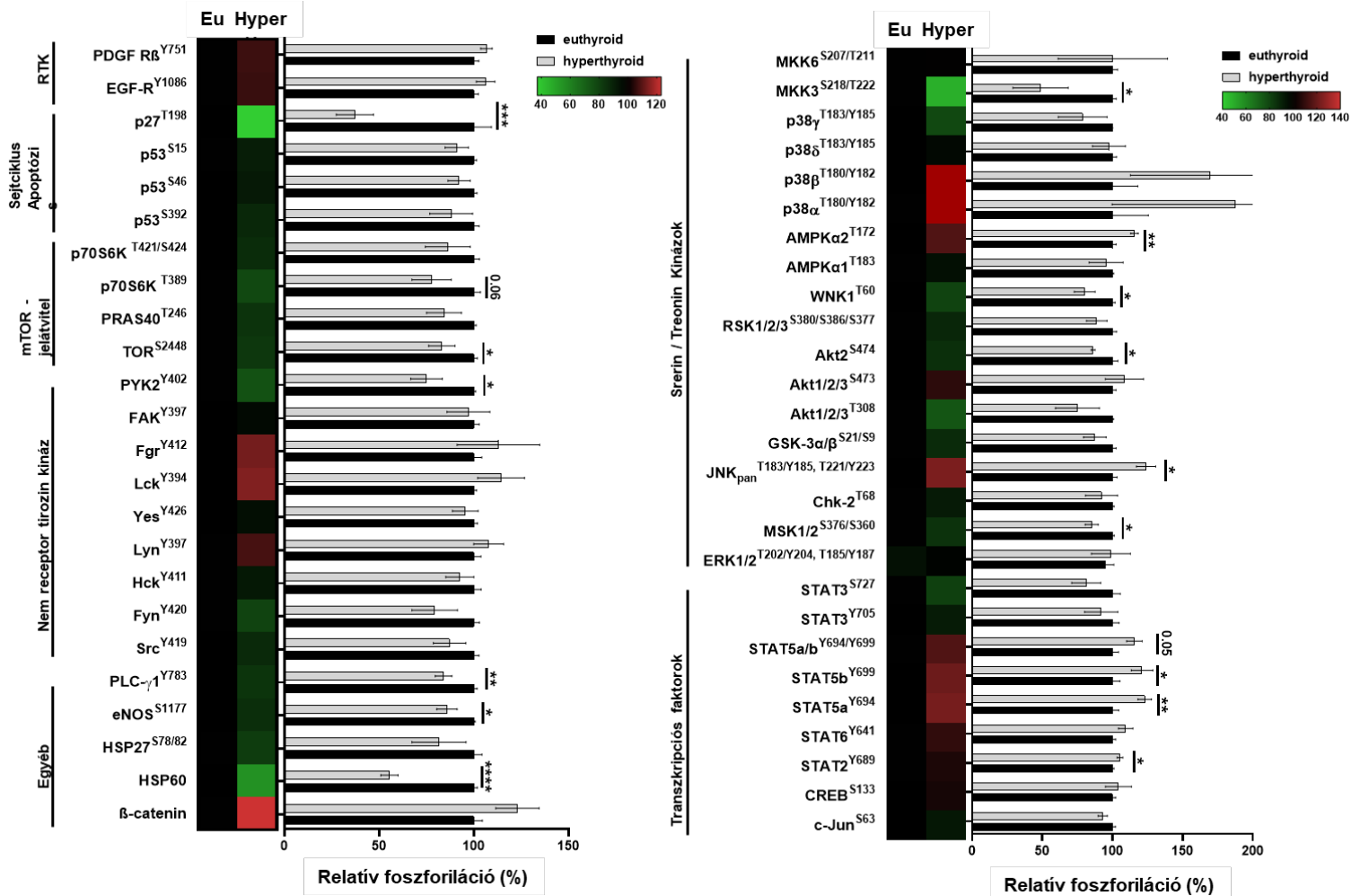
Gén jele	Gén neve	Szabályozás	Változás
PPP1R12A	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 12A	down	2.0050275
EPHA2	EPH receptor A2	up	1.5645913
SLC2A1	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1	up	1.6917205
TGFBR3	transforming growth factor, beta receptor III	up	1.5754458
TMCO1	transmembrane and coiled-coil domains 1	down	1.9577281
KLF6	Kruppel-like factor 6	up	1.6079206
ANKRD1	ankyrin repeat domain 1 (cardiac muscle)	up	2.1838295
HEPACAM HEPN1	hepatocyte cell adhesion molecule HEPACAM opposite strand 1	down	1.6288424
OAS1	2',5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa	up	1.6448771
SLC2A1	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1	up	1.6917205
TGFBR3	transforming growth factor, beta receptor III	up	1.5754458
TMCO1	transmembrane and coiled-coil domains 1	down	1.9577281
KLF6	Kruppel-like factor 6	up	1.6079206
ANKRD1	ankyrin repeat domain 1 (cardiac muscle)	up	2.1838295
HEPACAM HEPN1	hepatocyte cell adhesion molecule HEPACAM opposite strand 1	down	1.6288424
OAS1	2',5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa	up	1.6448771
DUSP6	dual specificity phosphatase 6	up	1.5159508
LPAR6	lysophosphatidic acid receptor 6	up	1.5162095
IRF9	interferon regulatory factor 9	up	1.6238389
IFI27	interferon, alpha-inducible protein 27	up	1.6448994
KIAA1199	azonosítatlan fehérje	up	2.1050441

SNORD68 RPL13	small nucleolar RNA, C/D box 68 ribosomal protein L13	up	1.7279054
MIR21	microRNA 21	up	1.9698615
KRT23	keratin 23 (histone deacetylase inducible)	up	1.5333802
SLC16A6	solute carrier family 16, member 6 (monocarboxylic acid transporter 7)	up	2.1183825
DTNA	dystrobrevin, alpha	up	1.6605202
ICAM1	intercellular adhesion molecule 1	up	1.5522647
GDF15	growth differentiation factor 15	up	1.6862459
MFSD2B	major facilitator superfamily domain containing 2B	down	1.519762
SNX17	sorting nexin 17	down	1.6879824
FETUB	fetuin B	down	1.7819421
KNG1	kininogen 1	down	1.505488
FILIP1L	filamin A interacting protein 1-like	up	1.5426576
SLC7A11	solute carrier family 7, (cationic amino acid transporter, y ⁺ system) member 11	up	1.6259567
ITGA2	integrin, alpha 2 (CD49B, alpha 2 subunit of VLA-2 receptor)	up	1.794632
EGR1	early growth response 1	up	1.6131204
SPRY4	sprouty homolog 4 (Drosophila)	up	1.6954104
GMDS	GDP-mannose 4,6-dehydratase	up	1.5297856
IER3	immediate early response 3	up	2.0160716
SERPINE1	serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1	up	1.6623654
C8orf4	chromosome 8 open reading frame 4	up	1.5722965

Táblázat S2. Az *SMTNL1* WT és KO vemhes és nem vemhes egerek vázizom mintáinak MALDI TOF-TOF szekvenciaadatai. A táblázatban csak a többszörös peptidazonosítást (>5) adó fehérjék adatai szerepelnek.

ENZYME	accession	WTP	KO	KOP	function
malate dehydrogenase (cytosolic)	gi 387129	5	6	3,5	Asp/malate shuttle
aspartate aminotransferase	gi 871422	1	3	2,5	aspartate/malate shuttle
Creatinine kinase	gi 38259206	3	1	2,7	ATP salvage
heat shock protein 1, beta	gi 40556608	4,3	6,6	7,2	chaperone
myomesin 1 isoform 2	gi 145279198	5,5	6,6	6,1	contractile
myosin A1 catalytic light chain fast	gi 91114	3,1	4,5	8,9	contractile
Filamin C	gi 94378467	2,3	5,2	3,2	contractile
myomesin 2	gi 6678996	3,1	6,6	5,8	contractile
novel protein similar to dynein	gi 58864904	1,5	3,4	2,6	contractile
alpha actin 1	gi 4501881	1	3,1	2,5	contractile
myosin A2 catalytic light chain fast	gi 91115	6	5,5	8,2	contractile
Tropomyosin 1 alpha	gi 109081387	2	3,3	2,9	contractile
tropomyosin 2, beta	gi 11875203	2,1	3,1	2,8	contractile
Troponin T fast twitch	gi 2340050	1	3	1	contractile
troponin I, skeletal, fast 2	gi 6678391	2,5	9,2	8,1	contractile
fast skeletal muscle troponin C	gi 6678371	1	3,3	4,1	contractile
calmodulin 2	gi 4502549	1	2,2	2,9	contractile
myosin heavy chain 2B fast	gi 67189167	3,2	4,2	5,1	contractile
calsequestrin 1	gi 112181167	3,1	3	2,9	contractile
Myosin-binding protein C, fast-type	gi 81910387	1,5	9,3	11,3	contractile
TER ATPase	gi 94408011	1,4	3	3,9	endoplasmic reticulum
5-oxoprolinase	gi 23346557	1	1,9	1	glutathione synthesis
glycogen phosphorylase	gi 6755256	8,1	10,6	6,9	glycogen degradation
amylase-1,6-glucosidase	gi 82890909	9,2	1,4	11,2	glycogen degradation
glucose 6 phosphate dehydrogenase	gi 51114	4	1,1	3,5	glycolysis
aldolase	gi 7548322	2	1	5	glycolysis
GAPDH	gi 94396587	4	2,3	4,2	glycolysis
Phosphoglucose mutase	gi 33416468	1	5,5	4,6	glycolysis
glyoxylase	gi 21362640	3	3,2	3,1	glycolysis
6-phosphofructokinase	gi 13638207	4,9	2,1	8,9	glycolysis
hexokinase 2	gi 7305143	3,6	8,8	8,1	glycolysis
Transferrin	gi 17046471	2	3,1	2,5	iron transport
isocitrate dehydrogenase	gi 18250284	1	1	2,3	Krebs cycle
oxoglutarate dehydrogenase	gi 56206141	2,2	5,1	4,9	Krebs cycle
mitochondrial ATP synthase beta	gi 89574015	6,9	4,1	4,3	oxidative phosphorylation
ubiquitin-activating enzyme E1	gi 6678483	2,5	3,3	3	protein degradation
elongation factor 1 alpha 2	gi 6681273	1,25	9,6	9,2	protein synthesis

Táblázat S.3. ábra Humán euthyreosis és hyperthyreosis vázizom biopsziák foszforilációs mintázatának vizsgálata. A minták homogenizálását követően számos fehérje relatív foszforilációs szintjének egyidejű, gyors és érzékeny meghatározását végeztük el a human foszfo-kináz (bal panel) és foszfo-MAPK array segítségével (jobb panel) Az $n=3$ kísérletből származó eredményeket átlag $\pm$ SEM formában ábrázoltuk. A csoportokat kétmintás párosítatlan t-próbával hasonlítottuk össze, a részletes grafikon a függelékben található (1S ábra), ahol $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) . RTK: Receptor Tirozin Kináz; Eu: euthyroid; Hyper: hyperthyroid



11. IRODALOMJEGYZÉK

- [1] D. Horvath, A. Sipos, E. Major, Z. Konya, R. Batori, D. Dedinszki, A. Szoll Si, I. Tamas, J. Ivan, A. Kiss, F. Erd di, and B. Lontay, 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* 1864 (2018) 3268-3280.
- [2] A. Kiss, F. Erdodi, and B. Lontay, Myosin phosphatase: Unexpected functions of a long-known enzyme. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1866 (2019) 2-15.
- [3] E. Major, F. Gyory, D. Horvath, I. Keller, I. Tamas, K. Uray, P. Fulop, and B. Lontay, Smoothelin-Like Protein 1 Regulates Development and Metabolic Transformation of Skeletal Muscle in Hyperthyroidism. *Front Endocrinol (Lausanne)* 12 (2021) 751488.
- [4] I. Tamas, E. Major, D. Horvath, I. Keller, A. Ungvari, T.A. Haystead, J.A. MacDonald, and B. Lontay, Mechanisms by which smoothelin-like protein 1 reverses insulin resistance in myotubules and mice. *Mol Cell Endocrinol* 551 (2022) 111663.
- [5] K. Biemann, Appendix 5. Nomenclature for peptide fragment ions (positive ions). *Methods Enzymol* 193 (1990) 886-7.
- [6] H. Witt, F. Savic, S. Verbeek, J. Dietz, G. Tarantola, M. Oelkers, B. Geil, and A. Janshoff, Membrane fusion studied by colloidal probes. *Eur Biophys J* 50 (2021) 223-237.
- [7] M. Terrak, F. Kerff, K. Langsetmo, T. Tao, and R. Dominguez, Structural basis of protein phosphatase 1 regulation. *Nature* 429 (2004) 780-4.
- [8] M. Kokkinidis, N.M. Glykos, and V.E. Fadoulglou, Catalytic activity regulation through post-translational modification: the expanding universe of protein diversity. *Adv Protein Chem Struct Biol* 122 (2020) 97-125.
- [9] S.I. van Kasteren, H.B. Kramer, H.H. Jensen, S.J. Campbell, J. Kirkpatrick, N.J. Oldham, D.C. Anthony, and B.G. Davis, Expanding the diversity of chemical protein modification allows post-translational mimicry. *Nature* 446 (2007) 1105-9.
- [10] S. Ramazi, A. Allahverdi, and J. Zahiri, Evaluation of post-translational modifications in histone proteins: A review on histone modification defects in developmental and neurological disorders. *J Biosci* 45 (2020).
- [11] D.G. Knorre, N.V. Kudryashova, and T.S. Godovikova, Chemical and functional aspects of posttranslational modification of proteins. *Acta Naturae* 1 (2009) 29-51.
- [12] S. Wera, and B.A. Hemmings, Serine/threonine protein phosphatases. *Biochem J* 311 (Pt 1) (1995) 17-29.
- [13] C.T. Walsh, S. Garneau-Tsodikova, and G.J. Gatto, Jr., Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications. *Angew Chem Int Ed Engl* 44 (2005) 7342-72.
- [14] X. Cheng, K. Wang, Y. Zhao, and K. Wang, Research progress on post-translational modification of proteins and cardiovascular diseases. *Cell Death Discov* 9 (2023) 275.
- [15] S. Pan, and R. Chen, Pathological implication of protein post-translational modifications in cancer. *Mol Aspects Med* 86 (2022) 101097.
- [16] B. Lontay, A. Kiss, L. Virag, and K. Tar, How Do Post-Translational Modifications Influence the Pathomechanistic Landscape of Huntington's Disease? A Comprehensive Review. *Int J Mol Sci* 21 (2020).
- [17] B. Chatterjee, and S.S. Thakur, Investigation of post-translational modifications in type 2 diabetes. *Clin Proteomics* 15 (2018) 32.
- [18] D.L. Brautigan, Protein Ser/Thr phosphatases--the ugly ducklings of cell signalling. *FEBS J* 280 (2013) 324-45.

- [19] V. Dombradi, J.M. Axton, N.D. Brewis, E.F. da Cruz e Silva, L. Alphey, and P.T. Cohen, *Drosophila* contains three genes that encode distinct isoforms of protein phosphatase 1. *Eur J Biochem* 194 (1990) 739-45.
- [20] T.S. Ingebritsen, and P. Cohen, Protein phosphatases: properties and role in cellular regulation. *Science* 221 (1983) 331-8.
- [21] I.M. Mansuy, and S. Shenolikar, Protein serine/threonine phosphatases in neuronal plasticity and disorders of learning and memory. *Trends Neurosci* 29 (2006) 679-86.
- [22] T. Mustelin, T. Vang, and N. Bottini, Protein tyrosine phosphatases and the immune response. *Nat Rev Immunol* 5 (2005) 43-57.
- [23] E. Pennisi, Human genome project. Genome institute wrestles mightily with its future. *Science* 298 (2002) 1694-5.
- [24] M. Bollen, W. Peti, M.J. Ragusa, and M. Beullens, The extended PP1 toolkit: designed to create specificity. *Trends Biochem Sci* 35 (2010) 450-8.
- [25] P.T. Cohen, N.D. Brewis, V. Hughes, and D.J. Mann, Protein serine/threonine phosphatases; an expanding family. *FEBS Lett* 268 (1990) 355-9.
- [26] P.T. Cohen, Protein phosphatase 1--targeted in many directions. *J Cell Sci* 115 (2002) 241-56.
- [27] T.S. Ingebritsen, and P. Cohen, The protein phosphatases involved in cellular regulation. 1. Classification and substrate specificities. *Eur J Biochem* 132 (1983) 255-61.
- [28] C. Bialojan, and A. Takai, Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics. *Biochem J* 256 (1988) 283-90.
- [29] P. Cohen, S. Klumpp, and D.L. Schelling, An improved procedure for identifying and quantitating protein phosphatases in mammalian tissues. *FEBS Lett* 250 (1989) 596-600.
- [30] O.B. da Cruz e Silva, E.F. da Cruz e Silva, and P.T. Cohen, Identification of a novel protein phosphatase catalytic subunit by cDNA cloning. *FEBS Lett* 242 (1988) 106-10.
- [31] W. Becker, H. Kentrup, S. Klumpp, J.E. Schultz, and H.G. Joost, Molecular cloning of a protein serine/threonine phosphatase containing a putative regulatory tetratricopeptide repeat domain. *J Biol Chem* 269 (1994) 22586-92.
- [32] A.V. Andreeva, D.E. Evans, C.R. Hawes, N. Bennett, and M.A. Kutuzov, PP7, a plant phosphatase representing a novel evolutionary branch of eukaryotic protein Ser/Thr phosphatases. *Biochem Mol Biol Int* 44 (1998) 703-15.
- [33] A.V. Andreeva, and M.A. Kutuzov, Non-classical protein Ser/Thr phosphatases: what are they for? *Biochemistry (Mosc)* 64 (1999) 228-87.
- [34] G.J. Barton, P.T. Cohen, and D. Barford, Conservation analysis and structure prediction of the protein serine/threonine phosphatases. Sequence similarity with diadenosine tetraphosphatase from *Escherichia coli* suggests homology to the protein phosphatases. *Eur J Biochem* 220 (1994) 225-37.
- [35] P.T. Cohen, Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life. *Trends in biochemical sciences* 22 (1997) 245-51.
- [36] X.C. Zhang, A. Piccini, M.P. Myers, L. Van Aelst, and N.K. Tonks, Functional analysis of the protein phosphatase activity of PTEN. *Biochem J* 444 (2012) 457-64.
- [37] S. Tamura, K.R. Lynch, J. Lerner, J. Fox, A. Yasui, K. Kikuchi, Y. Suzuki, and S. Tsuiki, Molecular cloning of rat type 2C (IA) protein phosphatase mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 (1989) 1796-800.
- [38] R. Kamada, F. Kudoh, S. Ito, I. Tani, J.I.B. Janairo, J.G. Omichinski, and K. Sakaguchi, Metal-dependent Ser/Thr protein phosphatase PPM family: Evolution, structures, diseases and inhibitors. *Pharmacol Ther* 215 (2020) 107622.
- [39] N. Aburai, M. Yoshida, M. Ohnishi, and K. Kimura, Sanguinarine as a potent and specific inhibitor of protein phosphatase 2C in vitro and induces apoptosis via phosphorylation of p38 in HL60 cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 74 (2010) 548-52.

- [40] H. Ceulemans, and M. Bollen, Functional diversity of protein phosphatase-1, a cellular economizer and reset button. *Physiol Rev* 84 (2004) 1-39.
- [41] V. Dombradi, J. Krieglstein, and S. Klumpp, Regulating the regulators. Conference on protein phosphorylation and protein phosphatases. *EMBO Rep* 3 (2002) 120-4.
- [42] K. Sasaki, H. Shima, Y. Kitagawa, S. Irino, T. Sugimura, and M. Nagao, Identification of members of the protein phosphatase 1 gene family in the rat and enhanced expression of protein phosphatase 1 alpha gene in rat hepatocellular carcinomas. *Jpn J Cancer Res* 81 (1990) 1272-80.
- [43] P.T. Cohen, Two isoforms of protein phosphatase 1 may be produced from the same gene. *FEBS Lett* 232 (1988) 17-23.
- [44] T. Durfee, K. Becherer, P.L. Chen, S.H. Yeh, Y. Yang, A.E. Kilburn, W.H. Lee, and S.J. Elledge, The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. *Genes Dev* 7 (1993) 555-69.
- [45] Y.S. Chun, H. Shima, K. Nagasaki, T. Sugimura, and M. Nagao, PP1 gamma 2, a testis-specific protein-serine/threonine-phosphatase type 1 catalytic subunit, is associated with a protein having high sequence homology with the 78-kDa glucose-regulated protein, a member of the 70-kDa heat shock protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (1994) 3319-23.
- [46] M.P. Egloff, P.T. Cohen, P. Reinemer, and D. Barford, Crystal structure of the catalytic subunit of human protein phosphatase 1 and its complex with tungstate. *J Mol Biol* 254 (1995) 942-59.
- [47] J. Goldberg, H.B. Huang, Y.G. Kwon, P. Greengard, A.C. Nairn, and J. Kuriyan, Three-dimensional structure of the catalytic subunit of protein serine/threonine phosphatase-1. *Nature* 376 (1995) 745-53.
- [48] M.P. Egloff, D.F. Johnson, G. Moorhead, P.T. Cohen, P. Cohen, and D. Barford, Structural basis for the recognition of regulatory subunits by the catalytic subunit of protein phosphatase 1. *EMBO J* 16 (1997) 1876-87.
- [49] M. Campos, P. Fadden, G. Alms, Z. Qian, and T.A. Haystead, Identification of protein phosphatase-1-binding proteins by microcystin-biotin affinity chromatography. *J Biol Chem* 271 (1996) 28478-84.
- [50] S. Shibata, Y. Ishida, H. Kitano, Y. Ohizumi, J. Habon, Y. Tsukitani, and H. Kikuchi, Contractile effects of okadaic acid, a novel ionophore-like substance from black sponge, on isolated smooth muscles under the condition of Ca deficiency. *J Pharmacol Exp Ther* 223 (1982) 135-43.
- [51] X.C. Cheng, T. Kihara, H. Kusakabe, J. Magae, Y. Kobayashi, R.P. Fang, Z.F. Ni, Y.C. Shen, K. Ko, I. Yamaguchi, and et al., A new antibiotic, tautomycin. *J Antibiot (Tokyo)* 40 (1987) 907-9.
- [52] Z.R. Woydziak, A.J. Yucel, and A.R. Chamberlin, Tautomycin Synthetic Analogues: Selective Inhibitors of Protein Phosphatase I. *ChemMedChem* 16 (2021) 839-850.
- [53] T. Kurisaki, R.G. Taylor, and D.J. Hartshorne, Effects of the protein phosphatase inhibitors, tautomycin and calyculin-A, on protein phosphorylation and cytoskeleton of human platelets. *Cell Struct Funct* 20 (1995) 331-43.
- [54] G.E. Groblewski, A.C. Wagner, and J.A. Williams, Cyclosporin A inhibits Ca²⁺/calmodulin-dependent protein phosphatase and secretion in pancreatic acinar cells. *J Biol Chem* 269 (1994) 15111-7.
- [55] M. Guo, Z. Li, M. Gu, J. Gu, Q. You, and L. Wang, Targeting phosphatases: From molecule design to clinical trials. *Eur J Med Chem* 264 (2024) 116031.
- [56] D. Dedinszki, A. Kiss, L. Markasz, A. Marton, E. Toth, L. Szekely, and F. Erdodi, Inhibition of protein phosphatase-1 and -2A decreases the chemosensitivity of leukemic cells to chemotherapeutic drugs. *Cell Signal* 27 (2015) 363-72.
- [57] W. Peti, A.C. Nairn, and R. Page, Structural basis for protein phosphatase 1 regulation and specificity. *FEBS J* 280 (2013) 596-611.
- [58] Q.R. Liu, P.W. Zhang, Q. Zhen, D. Walther, X.B. Wang, and G.R. Uhl, KEPI, a PKC-dependent protein phosphatase 1 inhibitor regulated by morphine. *J Biol Chem* 277 (2002) 13312-20.

- [59] M.S. Kelker, R. Page, and W. Peti, Crystal structures of protein phosphatase-1 bound to nodularin-R and tautomycin: a novel scaffold for structure-based drug design of serine/threonine phosphatase inhibitors. *J Mol Biol* 385 (2009) 11-21.
- [60] B. Dancheck, M.J. Ragusa, M. Allaire, A.C. Nairn, R. Page, and W. Peti, Molecular investigations of the structure and function of the protein phosphatase 1-spinophilin-inhibitor 2 heterotrimeric complex. *Biochemistry* 50 (2011) 1238-46.
- [61] J.A. Marsh, B. Dancheck, M.J. Ragusa, M. Allaire, J.D. Forman-Kay, and W. Peti, Structural diversity in free and bound states of intrinsically disordered protein phosphatase 1 regulators. *Structure* 18 (2010) 1094-103.
- [62] A. Hendrickx, M. Beullens, H. Ceulemans, T. Den Abt, A. Van Eynde, E. Nicolaescu, B. Lesage, and M. Bollen, Docking motif-guided mapping of the interactome of protein phosphatase-1. *Chem Biol* 16 (2009) 365-71.
- [63] M.J. Hubbard, and P. Cohen, Regulation of protein phosphatase-1G from rabbit skeletal muscle. 2. Catalytic subunit translocation is a mechanism for reversible inhibition of activity toward glycogen-bound substrates. *Eur J Biochem* 186 (1989) 711-6.
- [64] M. Ferreira, M. Beullens, M. Bollen, and A. Van Eynde, Functions and therapeutic potential of protein phosphatase 1: Insights from mouse genetics. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1866 (2019) 16-30.
- [65] D.J. Hartshorne, M. Ito, and F. Erdodi, Myosin light chain phosphatase: subunit composition, interactions and regulation. *J Muscle Res Cell Motil* 19 (1998) 325-41.
- [66] D. Alessi, L.K. MacDougall, M.M. Sola, M. Ikebe, and P. Cohen, The control of protein phosphatase-1 by targetting subunits. The major myosin phosphatase in avian smooth muscle is a novel form of protein phosphatase-1. *Eur J Biochem* 210 (1992) 1023-35.
- [67] A. Shirazi, K. Iizuka, P. Fadden, C. Mosse, A.P. Somlyo, A.V. Somlyo, and T.A. Haystead, Purification and characterization of the mammalian myosin light chain phosphatase holoenzyme. The differential effects of the holoenzyme and its subunits on smooth muscle. *J Biol Chem* 269 (1994) 31598-606.
- [68] Y.H. Chen, M.X. Chen, D.R. Alessi, D.G. Campbell, C. Shanahan, P. Cohen, and P.T. Cohen, Molecular cloning of cDNA encoding the 110 kDa and 21 kDa regulatory subunits of smooth muscle protein phosphatase 1M. *FEBS Lett* 356 (1994) 51-5.
- [69] E. Scotto-Lavino, M. Garcia-Diaz, G. Du, and M.A. Frohman, Basis for the isoform-specific interaction of myosin phosphatase subunits protein phosphatase 1c beta and myosin phosphatase targeting subunit 1. *J Biol Chem* 285 (2010) 6419-24.
- [70] D. Shichi, T. Arimura, T. Ishikawa, and A. Kimura, Heart-specific small subunit of myosin light chain phosphatase activates rho-associated kinase and regulates phosphorylation of myosin phosphatase target subunit 1. *J Biol Chem* 285 (2010) 33680-90.
- [71] M.E. Grassie, L.D. Moffat, M.P. Walsh, and J.A. MacDonald, The myosin phosphatase targeting protein (MYPT) family: a regulated mechanism for achieving substrate specificity of the catalytic subunit of protein phosphatase type 1delta. *Arch Biochem Biophys* 510 (2011) 147-59.
- [72] A. Toth, E. Kiss, F.W. Herberg, P. Gergely, D.J. Hartshorne, and F. Erdodi, Study of the subunit interactions in myosin phosphatase by surface plasmon resonance. *Eur J Biochem* 267 (2000) 1687-97.
- [73] X. Hu, Z. Li, Y. Ding, Q. Geng, Z. Xiahou, H. Ru, M.Q. Dong, X. Xu, and J. Li, Chk1 modulates the interaction between myosin phosphatase targeting protein 1 (MYPT1) and protein phosphatase 1cbeta (PP1cbeta). *Cell Cycle* 17 (2018) 421-427.
- [74] D. Johnson, P. Cohen, M.X. Chen, Y.H. Chen, and P.T. Cohen, Identification of the regions on the M110 subunit of protein phosphatase 1M that interact with the M21 subunit and with myosin. *Eur J Biochem* 244 (1997) 931-9.

- [75] Y. Fukata, K. Kimura, N. Oshiro, H. Saya, Y. Matsuura, and K. Kaibuchi, Association of the myosin-binding subunit of myosin phosphatase and moesin: dual regulation of moesin phosphorylation by Rho-associated kinase and myosin phosphatase. *J Cell Biol* 141 (1998) 409-18.
- [76] K.M. Kim, C. Csontos, I. Czikora, D. Fulton, N.S. Umapathy, G. Olah, and A.D. Verin, Molecular characterization of myosin phosphatase in endothelium. *J Cell Physiol* 227 (2012) 1701-8.
- [77] M. Amano, T. Kaneko, A. Maeda, M. Nakayama, M. Ito, T. Yamauchi, H. Goto, Y. Fukata, N. Oshiro, A. Shinohara, A. Iwamatsu, and K. Kaibuchi, Identification of Tau and MAP2 as novel substrates of Rho-kinase and myosin phosphatase. *J Neurochem* 87 (2003) 780-90.
- [78] C. Gil, A. Falques, E. Sarro, R. Cubi, J. Blasi, J. Aguilera, and E. Itarte, Protein kinase CK2 associates to lipid rafts and its pharmacological inhibition enhances neurotransmitter release. *FEBS Lett* 585 (2011) 414-20.
- [79] A.P. Somlyo, and A.V. Somlyo, Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev* 83 (2003) 1325-58.
- [80] R. Batori, B. Becsi, D. Nagy, Z. Konya, C. Hegedus, Z. Bordan, A. Verin, B. Lontay, and F. Erdodi, Interplay of myosin phosphatase and protein phosphatase-2A in the regulation of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation and nitric oxide production. *Sci Rep* 7 (2017) 44698.
- [81] V. Kolupaeva, and V. Janssens, PP1 and PP2A phosphatases--cooperating partners in modulating retinoblastoma protein activation. *FEBS J* 280 (2013) 627-43.
- [82] A. Kiss, B. Lontay, B. Becsi, L. Markasz, E. Olah, P. Gergely, and F. Erdodi, Myosin phosphatase interacts with and dephosphorylates the retinoblastoma protein in THP-1 leukemic cells: its inhibition is involved in the attenuation of daunorubicin-induced cell death by calyculin-A. *Cell Signal* 20 (2008) 2059-70.
- [83] H.S. Cho, T. Suzuki, N. Dohmae, S. Hayami, M. Unoki, M. Yoshimatsu, G. Toyokawa, M. Takawa, T. Chen, J.K. Kurash, H.I. Field, B.A. Ponder, Y. Nakamura, and R. Hamamoto, Demethylation of RB regulator MYPT1 by histone demethylase LSD1 promotes cell cycle progression in cancer cells. *Cancer Res* 71 (2011) 655-60.
- [84] G. Totsukawa, Y. Yamakita, S. Yamashiro, H. Hosoya, D.J. Hartshorne, and F. Matsumura, Activation of myosin phosphatase targeting subunit by mitosis-specific phosphorylation. *J Cell Biol* 144 (1999) 735-44.
- [85] T. Chiyoda, N. Sugiyama, T. Shimizu, H. Naoe, Y. Kobayashi, J. Ishizawa, Y. Arima, H. Tsuda, M. Ito, K. Kaibuchi, D. Aoki, Y. Ishihama, H. Saya, and S. Kuninaka, LATS1/WARTS phosphorylates MYPT1 to counteract PLK1 and regulate mammalian mitotic progression. *J Cell Biol* 197 (2012) 625-41.
- [86] H. Jin, T. Sperka, P. Herrlich, and H. Morrison, Tumorigenic transformation by CPI-17 through inhibition of a merlin phosphatase. *Nature* 442 (2006) 576-9.
- [87] W. Li, J. Cooper, L. Zhou, C. Yang, H. Erdjument-Bromage, D. Zagzag, M. Snuderl, M. Ladanyi, C.O. Hanemann, P. Zhou, M.A. Karajannis, and F.G. Giancotti, Merlin/NF2 loss-driven tumorigenesis linked to CRL4(DCAF1)-mediated inhibition of the hippo pathway kinases Lats1 and 2 in the nucleus. *Cancer Cell* 26 (2014) 48-60.
- [88] T. Matsuda, P. Zhai, S. Sciarretta, Y. Zhang, J.I. Jeong, S. Ikeda, J. Park, C.P. Hsu, B. Tian, D. Pan, J. Sadoshima, and D.P. Del Re, NF2 Activates Hippo Signaling and Promotes Ischemia/Reperfusion Injury in the Heart. *Circ Res* 119 (2016) 596-606.
- [89] D.J. Hartshorne, M. Ito, and F. Erdodi, Role of protein phosphatase type 1 in contractile functions: myosin phosphatase. *J Biol Chem* 279 (2004) 37211-4.
- [90] C.G. Broustas, N. Grammatikakis, M. Eto, P. Dent, D.L. Brautigan, and U. Kasid, Phosphorylation of the myosin-binding subunit of myosin phosphatase by Raf-1 and inhibition of phosphatase activity. *J Biol Chem* 277 (2002) 3053-9.
- [91] S. Mori, R. Iwaoka, M. Eto, and S.Y. Ohki, Solution structure of the inhibitory phosphorylation domain of myosin phosphatase targeting subunit 1. *Proteins* 77 (2009) 732-5.

- [92] A.A. Wooldridge, J.A. MacDonald, F. Erdodi, C. Ma, M.A. Borman, D.J. Hartshorne, and T.A. Haystead, Smooth muscle phosphatase is regulated in vivo by exclusion of phosphorylation of threonine 696 of MYPT1 by phosphorylation of Serine 695 in response to cyclic nucleotides. *J Biol Chem* 279 (2004) 34496-504.
- [93] B. Kolozsvari, E. Bako, B. Becsi, A. Kiss, A. Czikora, A. Toth, G. Vamosi, P. Gergely, and F. Erdodi, Calcineurin regulates endothelial barrier function by interaction with and dephosphorylation of myosin phosphatase. *Cardiovasc Res* 96 (2012) 494-503.
- [94] T.P. Woodsome, M. Eto, A. Everett, D.L. Brautigan, and T. Kitazawa, Expression of CPI-17 and myosin phosphatase correlates with Ca(2+) sensitivity of protein kinase C-induced contraction in rabbit smooth muscle. *J Physiol* 535 (2001) 553-64.
- [95] A.S. Khromov, K. Momotani, L. Jin, M.V. Artamonov, J. Shannon, M. Eto, and A.V. Somlyo, Molecular mechanism of telokin-mediated disinhibition of myosin light chain phosphatase and cAMP/cGMP-induced relaxation of gastrointestinal smooth muscle. *J Biol Chem* 287 (2012) 20975-85.
- [96] P.J. Gallagher, and B.P. Herring, The carboxyl terminus of the smooth muscle myosin light chain kinase is expressed as an independent protein, telokin. *J Biol Chem* 266 (1991) 23945-52.
- [97] N. Choudhury, A.S. Khromov, A.P. Somlyo, and A.V. Somlyo, Telokin mediates Ca²⁺-desensitization through activation of myosin phosphatase in phasic and tonic smooth muscle. *J Muscle Res Cell Motil* 25 (2004) 657-65.
- [98] S. Vetterkind, and K.G. Morgan, The pro-apoptotic protein Par-4 facilitates vascular contractility by cytoskeletal targeting of ZIPK. *J Cell Mol Med* 13 (2009) 887-95.
- [99] S. Vetterkind, E. Lee, E. Sundberg, R.H. Poythress, T.C. Tao, U. Preuss, and K.G. Morgan, Par-4: a new activator of myosin phosphatase. *Mol Biol Cell* 21 (2010) 1214-24.
- [100] M.A. Borman, J.A. MacDonald, and T.A. Haystead, Modulation of smooth muscle contractility by CHASM, a novel member of the smoothelin family of proteins. *FEBS Lett* 573 (2004) 207-13.
- [101] A.A. Wooldridge, C.N. Fortner, B. Lontay, T. Akimoto, R.L. Nepl, C. Facemire, M.B. Datto, A. Kwon, E. McCook, P. Li, S. Wang, R.J. Thresher, S.E. Miller, J.C. Perriard, T.P. Gavin, R.C. Hickner, T.M. Coffman, A.V. Somlyo, Z. Yan, and T.A. Haystead, Deletion of the protein kinase A/protein kinase G target SMTNL1 promotes an exercise-adapted phenotype in vascular smooth muscle. *J Biol Chem* 283 (2008) 11850-9.
- [102] B. Lontay, K. Bodoor, D.H. Weitzel, D. Loisel, C. Fortner, S. Lengyel, D. Zheng, J. Devente, R. Hickner, and T.A. Haystead, Smoothelin-like 1 protein regulates myosin phosphatase-targeting subunit 1 expression during sexual development and pregnancy. *J Biol Chem* 285 (2010) 29357-66.
- [103] J.D. Webb, A. Muranyi, C.W. Pugh, P.J. Ratcliffe, and M.L. Coleman, MYPT1, the targeting subunit of smooth-muscle myosin phosphatase, is a substrate for the asparaginyl hydroxylase factor inhibiting hypoxia-inducible factor (FIH). *Biochem J* 420 (2009) 327-33.
- [104] E. Twomey, Y. Li, J. Lei, C. Sodja, M. Ribocco-Lutkiewicz, B. Smith, H. Fang, M. Bani-Yaghoub, I. McKinnell, and M. Sikorska, Regulation of MYPT1 stability by the E3 ubiquitin ligase SIAH2. *Exp Cell Res* 316 (2010) 68-77.
- [105] T. Iwasaki, T. Katayama, K. Kohama, Y. Endo, and T. Sawasaki, Myosin phosphatase is inactivated by caspase-3 cleavage and phosphorylation of myosin phosphatase targeting subunit 1 during apoptosis. *Mol Biol Cell* 24 (2013) 748-56.
- [106] M.A. Borman, T.A. Freed, T.A. Haystead, and J.A. Macdonald, The role of the calponin homology domain of smoothelin-like 1 (SMTNL1) in myosin phosphatase inhibition and smooth muscle contraction. *Mol Cell Biochem* 327 (2009) 93-100.
- [107] C. Mathe, D. Beyer, F. Erdodi, Z. Serfozo, L. Szekvolgyi, G. Vasas, M.H. M, K. Jambrik, S. Gonda, A. Kiss, Z.M. Szigeti, and G. Suranyi, Microcystin-LR induces abnormal root development by altering

- microtubule organization in tissue-cultured common reed (*Phragmites australis*) plantlets. *Aquat Toxicol* 92 (2009) 122-30.
- [108] H. Gruneberg, J.B. Burnett, and G.D. Snell, The Origin of Jerker, a New Gene Mutation of the House Mouse, and Linkage Studies Made with It. *Proc Natl Acad Sci U S A* 27 (1941) 562-5.
- [109] K. Muller-Decker, W. Hirschner, F. Marks, and G. Furstenberger, The effects of cyclooxygenase isozyme inhibition on incisional wound healing in mouse skin. *J Invest Dermatol* 119 (2002) 1189-95.
- [110] D. Horvath, I. Tamas, A. Sipos, Z. Darula, B. Becsi, D. Nagy, J. Ivan, F. Erdodi, and B. Lontay, Myosin phosphatase and RhoA-activated kinase modulate neurotransmitter release by regulating SNAP-25 of SNARE complex. *PLoS One* 12 (2017) e0177046.
- [111] A. Sipos, J. Ivan, B. Becsi, Z. Darula, I. Tamas, D. Horvath, K.F. Medzihradsky, F. Erdodi, and B. Lontay, Myosin phosphatase and RhoA-activated kinase modulate arginine methylation by the regulation of protein arginine methyltransferase 5 in hepatocellular carcinoma cells. *Sci Rep* 7 (2017) 40590.
- [112] I. Keller, A. Ungvari, E. Major, D. Horvath, Z. Konya, E. Toth, F. Erdodi, A. Kiss, and B. Lontay, Magnesium-dependent-Protein Phosphatase 1B Regulates the Protein Arginine Methyltransferase 5 Through the Modulation of Myosin Phosphatase. *J Biol Chem* (2024) 108107.
- [113] C. Schmidt, and H. Urlaub, iTRAQ-labeling of in-gel digested proteins for relative quantification. *Methods Mol Biol* 564 (2009) 207-26.
- [114] B. Lontay, Z. Serfozo, P. Gergely, M. Ito, D.J. Hartshorne, and F. Erdodi, Localization of myosin phosphatase target subunit 1 in rat brain and in primary cultures of neuronal cells. *J Comp Neurol* 478 (2004) 72-87.
- [115] T.C. Sudhof, The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci* 27 (2004) 509-47.
- [116] J.N. Jovanovic, T.S. Sihra, A.C. Nairn, H.C. Hemmings, Jr., P. Greengard, and A.J. Czernik, Opposing changes in phosphorylation of specific sites in synapsin I during Ca²⁺-dependent glutamate release in isolated nerve terminals. *J Neurosci* 21 (2001) 7944-53.
- [117] D.A. Snyder, M.L. Kelly, and D.J. Woodbury, SNARE complex regulation by phosphorylation. *Cell Biochem Biophys* 45 (2006) 111-23.
- [118] G. Nagy, U. Matti, R.B. Nehring, T. Binz, J. Rettig, E. Neher, and J.B. Sorensen, Protein kinase C-dependent phosphorylation of synaptosome-associated protein of 25 kDa at Ser187 potentiates vesicle recruitment. *J Neurosci* 22 (2002) 9278-86.
- [119] G. Nagy, K. Reim, U. Matti, N. Brose, T. Binz, J. Rettig, E. Neher, and J.B. Sorensen, Regulation of releasable vesicle pool sizes by protein kinase A-dependent phosphorylation of SNAP-25. *Neuron* 41 (2004) 417-29.
- [120] B. Lontay, B. Pal, Z. Serfozo, A. Koszeghy, G. Szucs, Z. Rusznak, and F. Erdodi, 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* 123 (2012) 84-99.
- [121] C. Compagnucci, S. Barresi, S. Petrini, E. Bertini, and G. Zanni, Rho-kinase signaling controls nucleocytoplasmic shuttling of class IIa histone deacetylase (HDAC7) and transcriptional activation of orphan nuclear receptor NR4A1. *Biochem Biophys Res Commun* 459 (2015) 179-183.
- [122] T. Ryan, M. Shelton, J.P. Lambert, B. Malecova, S. Boisvenue, M. Ruel, D. Figeys, P.L. Puri, and I.S. Skerjanc, Myosin phosphatase modulates the cardiac cell fate by regulating the subcellular localization of Nkx2.5 in a Wnt/Rho-associated protein kinase-dependent pathway. *Circ Res* 112 (2013) 257-66.
- [123] H. Kim, and Z.A. Ronai, PRMT5 function and targeting in cancer. *Cell Stress* 4 (2020) 199-215.

- [124] C.D. Krause, Z.H. Yang, Y.S. Kim, J.H. Lee, J.R. Cook, and S. Pestka, Protein arginine methyltransferases: evolution and assessment of their pharmacological and therapeutic potential. *Pharmacol Ther* 113 (2007) 50-87.
- [125] A. Motolani, M. Martin, M. Sun, and T. Lu, The Structure and Functions of PRMT5 in Human Diseases. *Life (Basel)* 11 (2021).
- [126] R. Borzsei, B. Bayarsaikhan, B.Z. Zsido, B. Lontay, and C. Hetenyi, The Structural Effects of Phosphorylation of Protein Arginine Methyltransferase 5 on Its Binding to Histone H4. *Int J Mol Sci* 23 (2022).
- [127] B. Zhang, S. Dong, Z. Li, L. Lu, S. Zhang, X. Chen, X. Cen, and Y. Wu, Targeting protein arginine methyltransferase 5 inhibits human hepatocellular carcinoma growth via the downregulation of beta-catenin. *J Transl Med* 13 (2015) 349.
- [128] B. Lontay, A. Kiss, P. Gergely, D.J. Hartshorne, and F. Erdodi, Okadaic acid induces phosphorylation and translocation of myosin phosphatase target subunit 1 influencing myosin phosphorylation, stress fiber assembly and cell migration in HepG2 cells. *Cell Signal* 17 (2005) 1265-75.
- [129] B. Favre, P. Turowski, and B.A. Hemmings, Differential inhibition and posttranslational modification of protein phosphatase 1 and 2A in MCF7 cells treated with calyculin-A, okadaic acid, and tautomycin. *J Biol Chem* 272 (1997) 13856-63.
- [130] Y. Zhao, L. Liang, Y. Fan, S. Sun, L. An, Z. Shi, J. Cheng, W. Jia, W. Sun, Y. Mori-Akiyama, H. Zhang, S. Fu, and J. Yang, PPM1B negatively regulates antiviral response via dephosphorylating TBK1. *Cell Signal* 24 (2012) 2197-204.
- [131] R. Wong, S. Geyer, W. Weninger, J.C. Guimberteau, and J.K. Wong, The dynamic anatomy and patterning of skin. *Exp Dermatol* 25 (2016) 92-8.
- [132] T. Wagner, M. Gschwandtner, A. Strajeriu, A. Elbe-Burger, J. Grillari, R. Grillari-Voglauer, G. Greiner, B. Golabi, E. Tschachler, and M. Mildner, Establishment of keratinocyte cell lines from human hair follicles. *Sci Rep* 8 (2018) 13434.
- [133] R.L. Eckert, M.T. Sturniolo, R. Jans, C.A. Kraft, H. Jiang, and E.A. Rorke, TIG3: a regulator of type I transglutaminase activity in epidermis. *Amino Acids* 36 (2009) 739-46.
- [134] L. Koivisto, K. Alavian, L. Hakkinen, S. Pelech, C.A. McCulloch, and H. Larjava, Glycogen synthase kinase-3 regulates formation of long lamellipodia in human keratinocytes. *J Cell Sci* 116 (2003) 3749-60.
- [135] A. Svobodova, D. Walterova, and J. Vostalova, Ultraviolet light induced alteration to the skin. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 150 (2006) 25-38.
- [136] H.S. Kim, M.C. Song, I.H. Kwak, T.J. Park, and I.K. Lim, Constitutive induction of p-Erk1/2 accompanied by reduced activities of protein phosphatases 1 and 2A and MKP3 due to reactive oxygen species during cellular senescence. *J Biol Chem* 278 (2003) 37497-510.
- [137] D. Dedinszki, A. Sipos, A. Kiss, R. Batori, Z. Konya, L. Virag, F. Erdodi, and B. Lontay, 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* 1852 (2015) 22-33.
- [138] T. Velnar, T. Bailey, and V. Smrkolj, The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *J Int Med Res* 37 (2009) 1528-42.
- [139] S. Guo, and L.A. Dipietro, Factors affecting wound healing. *J Dent Res* 89 (2010) 219-29.
- [140] M.C. Robson, D.L. Steed, and M.G. Franz, Wound healing: biologic features and approaches to maximize healing trajectories. *Curr Probl Surg* 38 (2001) 72-140.
- [141] O. Ruzsnavszky, B. Dienes, T. Olah, J. Vincze, T. Gall, E. Balogh, G. Nagy, R. Batori, B. Lontay, F. Erdodi, and L. Csernoch, Differential effects of phosphatase inhibitors on the calcium homeostasis and migration of HaCaT keratinocytes. *PLoS One* 8 (2013) e61507.

- [142] A. Bayer, M. Tohidnezhad, J. Lammell, S. Lippross, P. Behrendt, T. Kluter, T. Pufe, H. Jahr, J. Cremer, F. Rademacher, R. Glaser, and J. Harder, Platelet-Released Growth Factors Induce Differentiation of Primary Keratinocytes. *Mediators Inflamm* 2017 (2017) 5671615.
- [143] M. Bektas, and D.S. Rubenstein, What's in a name?: Heat shock protein 27 and keratinocyte differentiation. *J Invest Dermatol* 130 (2010) 10-2.
- [144] C. Jonak, M. Mildner, G. Klosner, V. Paulitschke, R. Kunstfeld, H. Pehamberger, E. Tschachler, and F. Trautinger, The hsp27kD heat shock protein and p38-MAPK signaling are required for regular epidermal differentiation. *J Dermatol Sci* 61 (2011) 32-7.
- [145] F.F. Bloise, A. Cordeiro, and T.M. Ortiga-Carvalho, Role of thyroid hormone in skeletal muscle physiology. *J Endocrinol* 236 (2018) R57-R68.
- [146] S. Schiaffino, Fibre types in skeletal muscle: a personal account. *Acta Physiol (Oxf)* 199 (2010) 451-63.
- [147] S. Schiaffino, and C. Reggiani, Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev* 91 (2011) 1447-531.
- [148] B. Gambke, G.E. Lyons, J. Haselgrove, A.M. Kelly, and N.A. Rubinstein, Thyroidal and neural control of myosin transitions during development of rat fast and slow muscles. *FEBS Lett* 156 (1983) 335-9.
- [149] D. Pette, and R.S. Staron, Mammalian skeletal muscle fiber type transitions. *Int Rev Cytol* 170 (1997) 143-223.
- [150] K. Bodoor, B. Lontay, R. Safi, D.H. Weitzel, D. Loiselle, Z. Wei, S. Lengyel, D.P. McDonnell, and T.A. Haystead, Smoothelin-like 1 protein is a bifunctional regulator of the progesterone receptor during pregnancy. *J Biol Chem* 286 (2011) 31839-51.
- [151] T.A. Manuck, 17-alpha hydroxyprogesterone caproate for preterm birth prevention: Where have we been, how did we get here, and where are we going? *Semin Perinatol* 41 (2017) 461-467.
- [152] 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, and 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.
- [153] M.A. Abdul-Ghani, and R.A. DeFronzo, Pathogenesis of insulin resistance in skeletal muscle. *J Biomed Biotechnol* 2010 (2010) 476279.
- [154] J. Boucher, A. Kleinriders, and C.R. Kahn, Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6 (2014).
- [155] M. Beg, N. Abdullah, F.S. Thowfeik, N.K. Altorki, and T.E. McGraw, Distinct Akt phosphorylation states are required for insulin regulated Glut4 and Glut1-mediated glucose uptake. *Elife* 6 (2017).
- [156] T.A. Kupriyanova, and K.V. Kandror, Akt-2 binds to Glut4-containing vesicles and phosphorylates their component proteins in response to insulin. *J Biol Chem* 274 (1999) 1458-64.
- [157] H.K. Karlsson, and J.R. Zierath, Insulin signaling and glucose transport in insulin resistant human skeletal muscle. *Cell Biochem Biophys* 48 (2007) 103-13.
- [158] K. Paz, Y.F. Liu, H. Shorer, R. Hemi, D. LeRoith, M. Quan, H. Kanety, R. Seger, and Y. Zick, Phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1) by protein kinase B positively regulates IRS-1 function. *J Biol Chem* 274 (1999) 28816-22.
- [159] J.B. Meigs, Epidemiology of the insulin resistance syndrome. *Curr Diab Rep* 3 (2003) 73-9.
- [160] K. Moeschel, A. Beck, C. Weigert, R. Lammers, H. Kalbacher, W. Voelter, E.D. Schleicher, H.U. Haring, and R. Lehmann, Protein kinase C-zeta-induced phosphorylation of Ser318 in insulin receptor substrate-1 (IRS-1) attenuates the interaction with the insulin receptor and the tyrosine phosphorylation of IRS-1. *J Biol Chem* 279 (2004) 25157-63.

- [161] P. Gual, T. Gremeaux, T. Gonzalez, Y. Le Marchand-Brustel, and J.F. Tanti, MAP kinases and mTOR mediate insulin-induced phosphorylation of insulin receptor substrate-1 on serine residues 307, 612 and 632. *Diabetologia* 46 (2003) 1532-42.
- [162] J.F. Tanti, P. Gual, T. Gremeaux, T. Gonzalez, R. Barres, and Y. Le Marchand-Brustel, Alteration in insulin action: role of IRS-1 serine phosphorylation in the retroregulation of insulin signalling. *Ann Endocrinol (Paris)* 65 (2004) 43-8.
- [163] K.D. Copps, and M.F. White, Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2. *Diabetologia* 55 (2012) 2565-2582.
- [164] A.M. Manning, and R.J. Davis, Targeting JNK for therapeutic benefit: from junk to gold? *Nat Rev Drug Discov* 2 (2003) 554-65.
- [165] A. Krook, M. Bjornholm, D. Galuska, X.J. Jiang, R. Fahlman, M.G. Myers, Jr., H. Wallberg-Henriksson, and J.R. Zierath, Characterization of signal transduction and glucose transport in skeletal muscle from type 2 diabetic patients. *Diabetes* 49 (2000) 284-92.
- [166] L.G. Yu, L.C. Packman, M. Weldon, J. Hamlett, and J.M. Rhodes, Protein phosphatase 2A, a negative regulator of the ERK signaling pathway, is activated by tyrosine phosphorylation of putative HLA class II-associated protein I (PHAPI)/pp32 in response to the antiproliferative lectin, jacalin. *J Biol Chem* 279 (2004) 41377-83.
- [167] M.P. Czech, and S. Corvera, Signaling mechanisms that regulate glucose transport. *J Biol Chem* 274 (1999) 1865-8.
- [168] F. Wu, D. Mao, Y. Liu, X. Chen, H. Xu, T.C. Li, and C.C. Wang, Localization of Mucin 1 in endometrial luminal epithelium and its expression in women with reproductive failure during implantation window. *J Mol Histol* 50 (2019) 563-572.
- [169] C. Sancakli Usta, G. Turan, M. Hocaoglu, C.B. Bulbul, K. Kilic, A. Usta, and E. Adali, Differential Expressions of Ki-67, Bcl-2, and Apoptosis Index in Endometrial Cells of Women With and Without Type II Diabetes Mellitus and Their Correlation with Clinicopathological Variables. *Reprod Sci* 28 (2021) 1447-1456.
- [170] A. Sharpe, L.C. Morley, T. Tang, R.J. Norman, and A.H. Balen, Metformin for ovulation induction (excluding gonadotrophins) in women with polycystic ovary syndrome. *Cochrane Database Syst Rev* 12 (2019) CD013505.
- [171] M. Dai, X.L. Zhu, F. Liu, Q.Y. Xu, Q.L. Ge, S.H. Jiang, X.M. Yang, J. Li, Y.H. Wang, Q.K. Wu, Z.H. Ai, Y.C. Teng, and Z.G. Zhang, Cholesterol Synthetase DHCR24 Induced by Insulin Aggravates Cancer Invasion and Progesterone Resistance in Endometrial Carcinoma. *Sci Rep* 7 (2017) 41404.
- [172] M. Nishida, The Ishikawa cells from birth to the present. *Hum Cell* 15 (2002) 104-17.
- [173] I. Keller, A. Ungvari, R. Kinter, F. Szalmas, E. Kokai, and B. Lontay, Smoothelin-like protein 1 promotes insulin sensitivity and modulates the contractile properties of endometrial epithelial cells with insulin resistance. *Front Endocrinol (Lausanne)* 15 (2024) 1375771.
- [174] A.N. Tullio, D. Accili, V.J. Ferrans, Z.X. Yu, K. Takeda, A. Grinberg, H. Westphal, Y.A. Preston, and R.S. Adelstein, Nonmuscle myosin II-B is required for normal development of the mouse heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (1997) 12407-12.
- [175] C. Wang, K. Jeong, H. Jiang, W. Guo, C. Gu, Y. Lu, and J. Liang, YAP/TAZ regulates the insulin signaling via IRS1/2 in endometrial cancer. *Am J Cancer Res* 6 (2016) 996-1010.
- [176] S. Izumo, B. Nadal-Ginard, and V. Mahdavi, All members of the MHC multigene family respond to thyroid hormone in a highly tissue-specific manner. *Science* 231 (1986) 597-600.
- [177] G. Dimitriadis, P. Mitrou, V. Lambadiari, E. Boutati, E. Maratou, E. Koukkou, D. Panagiotakos, N. Tountas, T. Economopoulos, and S.A. Raptis, Insulin-stimulated rates of glucose uptake in muscle in hyperthyroidism: the importance of blood flow. *J Clin Endocrinol Metab* 93 (2008) 2413-5.

- [178] P. Mitrou, S.A. Raptis, and G. Dimitriadis, Insulin action in hyperthyroidism: a focus on muscle and adipose tissue. *Endocr Rev* 31 (2010) 663-79.
- [179] M.W. Greene, N. Morrice, R.S. Garofalo, and R.A. Roth, Modulation of human insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation by protein kinase Cdelta. *Biochem J* 378 (2004) 105-16.
- [180] Y. Ueda, S. Hirai, S. Osada, A. Suzuki, K. Mizuno, and S. Ohno, Protein kinase C activates the MEK-ERK pathway in a manner independent of Ras and dependent on Raf. *J Biol Chem* 271 (1996) 23512-9.
- [181] D. Xia, J.T. Stull, and K.E. Kamm, Myosin phosphatase targeting subunit 1 affects cell migration by regulating myosin phosphorylation and actin assembly. *Exp Cell Res* 304 (2005) 506-17.
- [182] Y. Wu, F. Erdodi, A. Muranyi, K.D. Nullmeyer, R.M. Lynch, and D.J. Hartshorne, Myosin phosphatase and myosin phosphorylation in differentiating C2C12 cells. *J Muscle Res Cell Motil* 24 (2003) 499-511.
- [183] E. Major, I. Keller, D. Horvath, I. Tamas, F. Erdodi, and B. Lontay, 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* 22 (2021).
- [184] L.A. Vasilets, R. Postina, and S.N. Kirichenko, Mutations of Ser-23 of the alpha1 subunit of the rat Na⁺/K⁺-ATPase to negatively charged amino acid residues mimic the functional effect of PKC-mediated phosphorylation. *FEBS Lett* 455 (1999) 8-12.
- [185] A.M. Bertorello, A. Aperia, S.I. Walaas, A.C. Nairn, and P. Greengard, Phosphorylation of the catalytic subunit of Na⁺,K⁺-ATPase inhibits the activity of the enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 (1991) 11359-62.
- [186] A.L. Riis, J.O. Jorgensen, N. Moller, J. Weeke, and T. Clausen, Hyperthyroidism and cation pumps in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288 (2005) E1265-9.
- [187] W.S. Simonides, and C. van Hardeveld, Thyroid hormone as a determinant of metabolic and contractile phenotype of skeletal muscle. *Thyroid* 18 (2008) 205-16.