

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**A miozin foszfatáz szerepe és szabályozása az
uterus fiziológiás és pathológiás folyamataiban**

Dr. Keller Ilka

Témavezető: Dr. Lontay Beáta



DEBRECENI EGYETEM

Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2025

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**A miozin foszfatáz szerepe és szabályozása az
uterus fiziológiás és pathológiás folyamataiban**

Dr. Keller Ilka

Témavezető: Dr. Lontay Beáta



DEBRECENI EGYETEM

Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2025

A miozin foszfatáz szerepe és szabályozása az uterus fiziológiás és pathológias folyamataiban

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az Elméleti Orvostudományok tudományágban

Írta: Dr. Keller Ilka, általános orvos

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány doktori iskolája
(Jelátviteli folyamatok sejt- és molekuláris biológiája programja) keretében

Témavezető: Dr. Lontay Beáta egyetemi docens

Az értekezés bírálói:

Dr. Mótyán János András, PhD

Dr. Lipinszki Zoltán, PhD

A bírálóbizottság:

elnök:

Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora

tagok:

Dr. Vas Virág, PhD

Dr. Szőőr Árpád, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK,
Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme
2025. április 14., 14:00 óra

Bevezetés

A protein foszfatázok és a PP1 enzimszalád

A fehérjék posztranszlációs módosításai jelentős szerepet játszanak a fehérjék aktivitásának szabályozásában, melyek közül kiemelt jelentőségű a fehérjék foszforilációja, amelyet protein kinázok katalizálnak, a foszfátcsoportot a szubsztrátok Ser/Thr avagy Tyr aminosavmaradékaihoz kapcsolják. A folyamat visszafordíthatóságáról a protein foszfatázok gondoskodnak. A fehérje foszforiláció szabályozza a célfehérjék aktivitását, kölcsönhatásait és stabilitását, valamint kritikus szerepet tölt be számos élettani folyamat precíz irányításában. Az egyensúly megbomlása a kinázok és foszfatázok aktivitása között így metabolikus és onkogén zavarok kialakulását is eredményezheti.

A protein foszfatázok funkcionak széles skálája a katalitikus és szabályozó alegységeik kombinációjának nagy számából adódik. A Ser/Thr specifikus protein foszfatázok 90%-a foszofoprotein foszfatáz (PPP), mely tovább osztályozható PP1 és PP2A katalitikus alegységgel rendelkező alcsoportokra. A PP1c protein foszfatázok jelentős szerepet vállalnak kulcsfontosságú sejtélettani folyamatok lebonyolításában, úgy mint: apoptózis, differenciáció, sejtciklus szabályozása, glükóz homeosztázis.

A PP1 katalitikus alegységgel rendelkező protein foszfatázok jellemzően heterodimer szerkezetben fordulnak elő emlős sejtekben, mely formában protein foszfatáz 1 katalitikus alegységhez (PP1c), szabályozó alegység kötődik. Ezen szabályozó alegység jelöli ki a célfehérjét, de megvalósulhat rajta keresztül az enzim aktivitásának módosítása is.

A fémion-függő protein foszfatázok (PPM) és a Mg^{2+}/Mn^{2+} -függő protein foszfatáz 1 B (PPM1B)

A fémion függő protein foszfatázok (PPM, más néven PP2C enzimek), Ser/Thr-specifikus protein foszfatázok, melyek stabilitásukhoz kétértékű fémionokat (legfőképpen Mg^{2+} és Mn^{2+} , de akár Fe^{2+} is) kötnek. A PPM szupercsalád tagjai nem rendelkeznek szabályozó alegységgel, a katalitikus aktivitásért és a célfehérje kötéséért egyaránt a katalitikus doménjük felel. A PPM enzimek részt vesznek a sejtciklus és sejt differenciáció finomhangolásában, valamint az immunválasz koordinálásában. Kóros kifejeződésük malignus transzformáció irányába hajtja a sejteket, mely változások rögzítésre kerültek már tripla negatív emlőrák, hólyagrák és májkarcinóma esetén is. A PPM1A és PPM1B tumorszuppresszor funkciójának alaposabb

feltérképezése különösen fontos a rossz prognózisú tumorok kialakulásának megértésében és kezelésében.

A PPM1B fehérjét először 1992-ben írták le, humán szervezetben eddig öt izoformája került azonosításra különböző szövetekben (pl. vázizom, szívizom, gasztrointesztinális traktus, here). A PPM1B szabályozása megvalósulhat például mikroRNS-ek (miR-181a-5p, miR-186) és foszforilációs folyamatok (pl. PKA által a Ser195 oldalláncon) által is. A PPM1B részt vesz a TNF- α jelátviteli útvonalban, az AMPK α és a p53 fehérje defoszforilációjában, ezáltal szabályozza a sejtek stresszválaszát és túlélését. A PPM1B enzim aktivitását a sanguinarine (SNG) alkaloid vegyület potensen gátolja.

A PPM1B csökkent kifejeződése korrelál számos humán daganat agresszivitásával: például hepatocelluláris karcinómában a fehérje degradációját írták le. A PPM1B lokalizációja lehet citoplazmatikus és nukleáris is. HepG2 sejteken végzett vizsgálatok során rögzítették a fehérjét a sejtmagban, ahol a miozin foszfatáz (MP) szabályozó alegységével a miozin célzó alegységgel (MYPT1) létesített kölcsönhatást.

A miozin foszfatáz (MP) szerkezete, funkciója és szabályozása

A miozin foszfatáz (MP) a PP1 szupercsalád tagja, szerkezetileg eltér a család többi tagjától, mivel esetében a PP1c katalitikus alegységhez MYPT1 szabályozó alegységen kívül egy eddig tisztázatlan funkciójú 20 kDa molekulatömegű M20 alegység is kapcsolódik.

Az MP leírása az simaizom kontrakció dinamikájának szabályozásához kötődik, ahol a 20 kDa molekulatömegű miozin könnyű lánc (MLC20) defoszforilálását végzi, ám mivel a MYPT1 szabályozó alegység révén számos szubsztráttal képes kölcsönhatást kialakítani, az MP működése nem korlátozódik az izomkontrakció szabályozására.

Az MP aktivitásának szabályozása megvalósulhat a MYPT1 alegység gátló foszforilációjával a Thr696-os és Thr853-as aminosavmaradékon RhoA-aktivált protein kináz (ROK) által, illetve fehérje-fehérje kölcsönhatások révén is. Az MP-t PP1c alegységén keresztül is lehetséges gátolni többféle inhibitorral, mint például a protein kináz C által aktivált inhibitor (CPI-17) és az okadánsav.

Az MP számos sejtéletteni folyamatot szabályoz, citoplazmatikus kölcsönható partnerei közül kiemelendők az ezrin, radixin és moezin (ERM) fehérjék, és az adducin, melyek a sejtadhéziót a és migrációt szabályozzák, továbbá megemlítendők a Tau és a MAP2, melyek mikrotubulus-asszociált fehérjék, és a citoskeleton átrendeződését irányítják. Emellett a MP képes szabályozni

a sejtciklust, melyet a retinoblasztóma protein (pRb) defoszforilációja révén ér el. Az MP továbbá befolyásolja az erek simaizom tónusát az endotheliális nitrogénmonoxid szintáz (eNOS) defoszforilációjával és aktiválásával. Szintén szerepet játszik a MP a neurotranszmitterek szekréciójában a szinaptoszóma-asszociált proteint (SNAP-25) és szintaxin fehérjékkel való kölcsönhatás révén.

Az MP képes hatást gyakorolni a génexpresszióra, több támadási ponton keresztül, a hiszton deacetiláz 7 (HDAC7) és a protein arginin metiltransferáz 5 (PRMT5) fehérjével való kölcsönhatása révén. A HDAC7 defoszforiláció általi aktivációja esetén hiszton fehérjék poszttranszlációs módosításával szabályozza a génexpressziót. A PRMT5 a metiloszóma protein 50 (MEP50) fehérjével metiloszóma komplexet alkot, és hiszton fehérjék (H2A és H4) szimmetrikus dimetilációját végzi, így módosul tumorszuppresszorok és protoonkogének transzkripciójának egyensúlya oly módon, mely malignus transzformációt indukál. A PRMT5 aktiváló Thr80-as foszforilációjának eltávolítása tumorprotektív potenciált hordoz. Ezen funkció betöltéséhez elengedhetetlen a MYPT1 nukleáris lokalizációban történő defoszforilálása melyre a MYPT1 sejtmagi kölcsönható partnerei közül egyedül a PPM1B ígérkezik potenciális jelöltnek. Az MP aktivitásának és kifejeződésének zavarait leírták hepatocelluláris carcinomából immortalizált HepG2 sejtek, illetve leuemiás sejtvonalak esetén is. Az MP abnormális aktivitása szerepet játszhat daganatos megbetegedések progressziójában, mivel a sejtciklus szabályozásában és génexpresszió finomhangolásában betöltött szerepe közvetlenül befolyásolja a sejtek proliferációját és túlélését.

Az SMTNL1 fehérje szerkezete és funkciói

Az SMTNL1 (smoothelin-szerű fehérje 1) elsőként nyúl ileum simaizomból került izolálásra, mint a cGMP-függő protein kináz (PKG) szubsztrátja, azóta pedig expresszióját leírták vizszerális és vaszkuláris simaizmokban, IIa típusú vázizomrostokban, valamint szteroidhormon-érzékeny szövetekben, például az endometriumban és myometriumban is.

Az SMTNL1 foszforiláció általi szabályozását protein kináz A (PKA) vagy a PKG biztosítja a Ser301-es aminosavmaradékon, sejtmagba való transzlokációt eredményez, ahol az SMTNL1 a progeszteron receptor B (PR-B) ko-aktivátoraként számos gén expresszióját szabályozza, például a MYPT1 kifejeződését is.

SMTNL1 KO egereken végzett vizsgálatok alapján az SMTNL1 szerepet játszik a vázizom plaszticitásának szabályozásában, mivel a génmódosított egyedek *musculus plantaris*-ának

rostösszetétele megváltozott, I1b rostok aránya csökkent, míg a I1a rostok aránya nőtt. C2C12 *in vitro* hyperthyreosis modellben az SMTNL1 gátolta a I1b rostok felé történő izotípus váltást. Az SMTNL1 KO egerekben szintén megfigyelhető volt a reprodukív fitnessz csökkenése, mely megmutatkozott magasabb embrionális lethálisban, kisebb alomméretben, valamint hosszabb időintervallumokban két terhesség között. A vemhesség során az SMTNL1 szabályozta az MYPT1 expresszióját, kiváltva az érfalak és a méhizomzat adaptációját a terhességi periódus alatt.

Továbbá a KO egerek glükóztolerancia teszt során a bólus szénhidrát adására nem tudták vércukorszintjüket rendezni, mely jelenséget csökkent GLUT-4 és IRS-1 expresszió kísért, kiváltva az inzulin-jelátviteli kaszkád zavarát. C2C12 sejteken végzett *in vitro* inzulinrezisztens modellben az SMTNL1 a PR-B receptor ko-aktivátoraként progeszteron-függő módon szabályozta az inzulin jelátvitel fő elemeinek, például az IRS-1 és a PI3K foszforilációját. Emellett gátolta a JNK és nPKCε aktivitását, amellyel inzulin érzékenyítő hatást váltott ki inzulinrezisztens körülmények között.

A humán női reprodukív traktus uterus érintő patológiás elváltozásai és daganatai

Az endometrium az uterus üregét borító nyálkahártya, mely igazodik a női nemi ciklus hormonhatásaihoz, terhesség során pedig felelős az embrió beágyazódásáért és a terhesség fenntartásáért. Az endometrium rendellenességei összefüggenek számos patológiás állapot és malignus transzformáció kialakulásával. Ilyen funkcionális eltérés pl.: az endometriózis, illetve a policisztikus ovarium szindróma (PCOS), mely súlyos hormonális egyensúlyzavart okoz és inzulinrezisztencia kialakulásához is vezethet, emelve az endometriális hiperplázia és carcinoma, valamint meddőség kialakulásának kockázatát.

Az uterus daganatai közé tartoznak az endometriális carcinomák és az uterus szarkómák, továbbá a méhnyakrák, mely előfordulási aránya miatt kitüntetett figyelmet érdemel. A humán papillomavírus (HPV) 16-os és 18-as törzsei általi fertőzés nagyban hajlamosít a carcinoma kialakulására.

Az uterus patológiás elváltozásai és daganatképződése mögött álló molekuláris mechanizmusokban kiemelt szerepet játszanak a sejtcitoskeleton szabályozó elemei, különösen a miozin foszfatáz (MP). Az MP kifejeződése hormonfüggést mutat, mivel a PR-B ko-aktivátora, az SMTNL1 csökkenti a MYPT1 expresszióját. Az endometriális epitheliális sejtek esetében az MP szerepének további feltárása hozzájárulhat a PCOS és az endometriózis pathogenezisének

mélyebb megértéséhez. Ezen túl a foszfatáz-kináz egyensúly zavara, például a ROK/MP tengely működési hibái, közvetlenül összefüggésbe hozhatók a tumorképződéssel.

Tanulmányok rámutattak, hogy a MYPT1 expresszió csökkenése és foszforilációjának növekedése daganatok kialakulásához vezethet, miközben az MP önálló tumorszuppresszor szerepének feltérképezésére is irányult már tanulmány. Ezek az eredmények sürgetik az MP további vizsgálatát az uterus patológiás elváltozásainak és daganatos megbetegedéseinek témakörében.

Célkitűzések

Sejtenyésztés. Az Ishikawa, HeLa és tsA201 sejteket a gyártó utasításai szerint javasolt médiumban tartottuk fenn, és 5% CO₂ szint mellett, 37 °C-on tenyésztettük, hetente háromszor passzáztuk. A médium összetétele Ishikawa sejtek esetén a következő volt: fenolvöröst tartalmazó Dulbecco's Modified Eagle's Medium-ot (DMEM), mely 1000 mg/L glükózt tartalmazott, kiegészítettünk 5% foetális borjú szérummal (FBS), továbbá 2 mM koncentrációjú L-glutaminnal, és 1% nem esszenciális aminosavakkal (NEAA). HeLa és tsA201 sejtek esetén: 1000 mg/L glükóz tartalmú, fenolvöröst tartalmazó DMEM került kiegészítésre, 2 mM L-glutaminnal és 10% FBS-sel.

Ishikawa, HeLa és tsA201 sejtek tranziens transzfekciója FT-SMTNL1, PPM1B vagy MYPT1 plazmiddal. Ishikawa, HeLa és tsA201 sejteket GeneJuice transzfekciós reagenssel transzfektáltuk, kontroll, üres vektor által transzfektált MOCK és FT-SMTNL1/FT-MYPT1/FT-PPM1B csoport létrehozásával. A felhasznált üres vektor és SMTNL1 plazmid koncentrációja egységesen $2,5 \times 10^{-3}$ µg/µl volt. PPM1B transzfekció esetén az üres plazmid és az FT-PPM1B vektor koncentrációja $1,7 \times 10^{-3}$ µg/µl volt, MYPT1 transzfekciójakor pedig $1,09 \times 10^{-3}$ µg/µl. A kezelést 72 óráig tartottuk fenn. A transzfekciós sikerességet Western blot és immunfluoreszcens festéssel ellenőriztük.

Ishikawa Sejtek *in vitro* terhesség (P4) és gesztációs diabétesz (GDB) modellje. Az Ishikawa sejtek transzfekcióját követően a sejteket 1x foszfáttal puffereelt sóoldattal (PBS) mostuk, és a médiumot a kezelési körülményeknek megfelelően fenolvörös nélküli médiumra cseréltük, melynek az összetétele az alábbiak szerint alakult. P4 modellben a médiumot 5% FBS-sel, 2 mM L-glutaminnal, 1% NEAA-val, 1 µM medroxi-progeszteron acetáttal (MPA), 10 nM 17-β-ösztadiollal és 0,5 mM 8-Br-cAMP-pel egészítettük ki. A P4 modell összeállításának végére a glükózkoncentráció 5,11 mM-osra hígult. A gesztacionális diabétesz modellben (továbbiakban: GDB), a P4 modellben tartott sejtek médiumához képest további 100 nM inzulin a médiumhoz, mely eredetileg 4,5 g/l glükózt tartalmazott. A GDB modell összeállításának végére a glükózkoncentráció 22,21 mM-osra hígult. A P4 és GDB modell glükózkoncentráció különbsége 17,1 mM. A sejteket 72 óráig kezeltük.

HeLa sejtek Sanguinarine kezelése és szubcelluláris frakcionálása. A HeLa sejteket 90%-os konfluencia eléréséig komplett tenyésztő médiumban növesztettük, majd a médiumot 0,1% FBS-t tartalmazó DMEM-re cseréltük, 24 órás éheztetés céljából. Ezt követően 1 µM Sanguinarine-

nal (SNG) kezeltük a sejteket. A sejteket vagy teljes sejt lizátum, vagy szubcelluláris frakcionálás során dolgoztuk fel, mely estén magi és citoplazmatikus frakciót állítottunk elő. A fehérje koncentrációt BCA esszével mértük.

Ishikawa és HeLa sejtek életképesség vizsgálata. A sejteket 96 lyukú lemezen 20,000 sejt/lyuk sűrűséggel tenyésztettük, és fentiekben ismertetett módon transzfekáltuk. 72 órás kezelés után a sejtek életképességét Alamar Blue esszé segítségével 530/590 nm-en mért fluoreszcencia jel rögzítésével mértük le.

Ishikawa sejtek karcólási esszéje. A sejteket Vybrant™ DiD Cell-Labeling Solution segítségével fluoreszcens módon jelöltük, majd kollagén bevonatú lemezekre helyeztük, és kontroll/P4/GDB körülmények között tenyésztettük FT-SMTNL1 transzfekeció mellett vagy a nélkül. 48 órás kezelés után a sejtek konfluens kultúráját megkarcoltuk, és a migrációs potenciált 24 órán keresztül, valós időbe követtük, magas szűrkeességű berendezés: high content screening (HCS) mikroszkóp 10x-es levegős objektíve (NA: 1.15) segítségével, óránként készítve fotókat sejtek sebzaróadási folyamatáról. A szabad területet arányát a sejtek számára normalizáltuk.

HeLa és Ishikawa sejtek immunfluoreszcens festése. A sejteket 96 lyukú lemezen tenyésztettük, transzfekeáltuk, és Ishikawa sejtek esetén kontroll/P4/GDB kezelési körülmények között tartottuk őket 72 órán át. A sejteket 4%-os paraformaldehid (PFA) /1x PBS oldatban fixáltuk, 0,2%-os Triton-X 100 / 1x PBS oldattal permeabilizáltuk, majd elsődleges antitestekkel inkubáltuk, O/N 4 °C-on. Az elsődleges antitestek hígítási aránya egységesen 1:100-hoz volt. Az Alexa488-as fluorofórral konjugált másodlagos antitesttel való inkubáció szobahőn történt, 1,5 órán keresztül, 1:1000 hígításban. A sejtmagokat DAPI-val, az aktin citoskeletonot Texas Red Phalloidinnal jelöltük. A fluoreszcens jeleket a HCS mikroszkóppal detektáltuk, a fluoreszcencia intenzitást normalizáltuk a DAPI jelölés által nyert sejtszámra.

Ishikawa és HeLa sejtek feltárása, teljes sejt lizátum formában. A HeLa és Ishikawa sejtek transzfekeció és vagy kontroll/P4/GDB kezelés után 1x PBS-sel mostuk, majd RIPA pufferben tártuk fel, 16 000 x g-n, 4 °C-on centrifugálva. A fehérje koncentrációt BCA teszttel mértük.

SDS-gélelektroforézis és Western blot analízis. A sejtek fehérjemintáit 6xSDS minta pufferben 100 °C-on inkubáltuk, majd 30-40 µg fehérjét 4-20%-os Criterion géleken végeztünk SDS-PAGE gélelektroforézist. A transzferálás után a membránt 5%-os (m/V) BSA/TBST oldatban blokkoltuk, 1,5 óráig szobahőn, majd az elsődleges antitestek inkubációja O/N történt 4 °C-on. Másnap a membránokat TBST-vel való mosás után HRP-konjugált másodlagos antitestekkel

inkubáltuk, szobahőn 1,5 órán át, majd a kemilumineszcens jeleket WesternBright ECL reagensekkel vizualizáltuk, ChemiDoc Touch Imaging System készülék segítségével.

Ishikawa sejtek glikogén mennyiségének mérése. A transzfektált, kontroll/P4/GDB körülmények között kezelt Ishikawa sejteket a kezelés végén az edény aljától tripszinnel elválasztottuk, centrifugáltuk, majd 0.1M-os KH_2PO_4 oldatban lizáltuk. 25%-os TCA, tömény H_2SO_4 és 6%-os fenol oldat hozzáadása után a glikogén mennyiséget 490 nm hullámhosszon mértük le, a koncentrációt standard görbe alapján számoltuk. A kapott glikogén koncentráció BCA teszttel mért fehérje koncentrációra normalizáltuk.

Ishikawa sejtek glükóz felvételi esszéje. 2-NBDG (2-N-7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl-Amino-2-Deoxyglucose) felvételi esszéhez az transzfektált és kontroll, P4, illetve GDB körülmények között kezelt Ishikawa sejteket 72 óráig tenyésztettünk. A kezelés végén a sejteket 1 óra hosszúraig glükóz mentes tenyésztő médiumban inkubáltuk, majd 100 μM /lyuk koncentrációban adtuk a sejtekhez 2-NBDG-t, mellyel további 1 órás inkubáció történt. A sejteket ezután mostuk 1xPBS oldattal, és 0,1M-os KH_2PO_4 (pH 11,0) és lízis puffer segítségével lizáltuk, melyet előzőleg 1% Triton X-100-al egészítettünk ki. A fluoerszcencia mértékét 485/535 nm-es spektrumon mértük le Tecan Spark Multimode microplate reader segítségével. Az eredményeket BCA esszével mért fehérjekoncentrációjára normalizáltuk.

Ishikawa sejtek RNS izolálása és szemi-kvantitatív RT-PCR analízise. A transzfektált, majd 72 óráig kontroll, P4 és GDB körülmények között kezelt Ishikawa sejtek teljes RNS tartalmának kivonásához TRIzol reagenst és kloroformot, izopropanolt és 75%-os etanolt használtunk. A minták RNS koncentrációját NanoDrop Fluoropetrométer segítségével mértük meg, tisztaságukat 1,8-2 közötti értéket képviselő 260/280 nm-en mért abszorbancia hányados estén fogadtuk el. A reverz transzkripciót mintánként 0,6 μg RNS mennyiségből végeztük, cDNS Synthesis Kit-tel, a cDNS-t pedig RT-PCR módszerrel amplifikáltuk, 2x Xceed qPCR SyberGreen Master mix segítségével. A PCR reakció során humán Cyclophilin A, GAPDH és MUC-1 primer párokat alkalmaztunk. PCR reakció ciklusai a következők voltak: 95°C 3 perc, majd a PCR reakciót 50 ismétlődő cikluson keresztül végeztük 95°C 3 sec, 60°C 30 sec, végül 72°C 90 sec. A reakciót LightCycler 480 (Roche Applied Science) műszer segítségével hajtottuk végre, génenként és mintánként triplikátumokat alkalmazva.

Humán cervicális karcinóma lizátumok feldolgozása. A kontroll és tumoros szöveti lizátumokat a Protein Biotechnologies cégtől vásároltuk, ahol a gyártó a szöveti mintákat RIPA pufferben tárta fel, végkoncentrációként 1 mg/ml értéket rendelve a mintákhoz. A mintákat SDS minta

pufferben 5 percig, 100°C-on inkubáltuk. A minták fehérjetartalmának vizsgálatára Western Blot analízist alkalmaztunk.

Immunoprecipitáció. A tsA201 sejteket transzekáltuk FT-PPM1B vagy FT-MYPT1 plazmidokkal, majd TBS/EDTA pufferben tártuk fel őket. A Protein A Sepharose (PAS) gyantát blokkoltuk, antitesteket kötöttünk hozzá, majd a transzfektált lizátumokat immunprecipitáltuk. Az immunprecipitáció sikerességét Western Blot analízissel ellenőriztük.

A MYPT1 és PPM1B fehérjék pull-down kötődési vizsgálata. Glutathione-S-transzferázt (GST) vagy GST-MYPT1-et expresszáló *E.coli* lizátumokat Glutathion Sepharose 4B gyöngyökhöz rögzítettünk. A gyöngyökhöz kapcsolt GST vagy GST-MYPT1 komplexeket üres vektor által transzfektált MOCK, vagy FT-PPM1B által transzfektált tsA201 lizátumokkal inkubáltuk. A pull-down kötődési esszé sikerességét Western Blot analízissel ellenőriztük.

HeLa sejtek Duolink PLA fehérje-fehérje interakciós esszéje. A HeLa sejteket 4%-os PFA/TBS oldatban fixáltuk, permeabilizáltuk, majd elsődleges antitestekkel az alábbi kölcsönhatási csoportokat hoztuk létre: negatív kontroll (elsődleges antitest inkubációban nem részesült) MYPT1-PP1c β , MYPT1-pRb, MYPT1-PPM1B, MYPT1-PPM1A. Az elsődleges antitestek inkubációja után a „proximity ligation” próba hozzáadása következett, majd ligációra és az amplifikáció fluoreszcens nukleotidok segítségével A fluoreszcens jeleket és Opera PhoenixTM mikroszkóppal rögzítettük, és sejtszámra normalizáltuk.

Miozin foszfatáz aktivitásmérés. HeLa 90%-os konfluencia elérése után 24 óráig éhezettünk 0,1% FBS-t tartalmazó médiumban. Az éheztetést követően a sejteket 1 óráig kezeltük 1 μ M SNG-al, vagy 50 nM okadánsavval (OA), továbbá kombinált kezelési csoportban ezek keverékével. Az 1 órás inkubáció letelte után a sejteket 50 mM Tris/HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 0.15 % (m/V) pufferben tártuk fel 1xPIC-el, 1 mM PMSF-el és 50 mM 2-merkaptotetanollal. Szonikáltuk, centrifugáltuk, majd a minták felülúszóit 1 percig 30°C-on előinkubáltuk, további 1 percig kezeltük 1 μ M ³²P-jelölt pulykazúza miozin (³²P-miozin) jelenlétében. A reakciót 10% (V/V) triklórecetsav (TCA) és 6 mg/ml BSA hozzáadásával állítottuk le. A reakció során felszabadult radioaktívan jelölt foszfátot (³²Pi) scintillációs számlálóval (Perkin Elmer) határoztuk meg. A kapott foszfatáz aktivitási értékeket a minták MYPT1 mennyiségére normalizáltuk.

In vitro RhoA Kináz és PPM1 foszfatáz esszé. GST-t vagy GST-MYPT1-et expresszáló *E. coli* lizátumokat Glutathion Sepharose 4B kötő pufferben inkubáltunk 120 percig, 4°C-on. A gyöngyöket ROK (20 ng/ μ l) enzimvel és ATP (1 mM)-vel inkubáltuk ROK esszé pufferben.

Kontroll csoportként ROK nélküli mintát alkalmaztunk. A foszforiláció megtörténte után a gyöngyöket PPM1B-t tartalmazó vagy anélküli inkubáció következett PPM1B esszé pufferben. A PPM1B ionfüggőségének igazolására Mn^{2+}/Mn^{2+} -tól mentes reakcióközeget is alkalmaztunk. PPM1B gátlását SNG hozzáadásával kiviteleztük. A MYPT1 Thr696-os foszforilációra kifejtett hatást Western Blot analízissel ellenőriztük.

Statisztikai analízis. A Western blot képeket Image J szoftver segítségével analizáltuk. A poszttranszlációsán módosított fehérjék értékeit normalizáltuk módosítatlan fehérje értékére. A módosítatlan fehérjék jelét a belső kontroll jelének mértékére normalizáltuk. Ishikawa sejteken futtatott kísérleteink, illetve az MP aktivitásának mérése esetén a kapott adatok kiértékelésénél a kontroll csoport értékének átlagát vettük 100%-nak. HeLa sejtek esetén értékeinket relatív számokként mutattuk be. A kapott értékekből GraphPad Prism 8 szoftver használatával készült oszlopdiagramm. Két csoport közötti különbség kimutatására párosítatlan kétmintás t-próbát alkalmaztunk. Több csoport összehasonlításához egyutas, vagy kétutas ANOVA statisztikai analízist használtunk, kiegészítve Tukey *post hoc* teszttel. Az oszlopgrafikon minden oszlopa egy kísérleti csoport átlagát reprezentálja, +/- SD értékkel, ahol „n” az egymástól független kísérletek számát jelzi. A kiugró értékeket a GraphPad Prism 8 szoftver Grubbs's tesztével távolítottuk el. Két csoport közötti különbséget statisztikailag szignifikánsnak tekintettünk, amennyiben $p < 0.05$ (*).

Eredmények és következtetések

A PPM1B fehérje szerepe az MP/PRMT5/H4 jelátviteli pálya szabályozásában

A PPM1B és MYPT1 fehérjék kölcsönhatásának bizonyítása

A MYPT1 és PPM1B fehérjék kölcsönhatásának vizsgálatát immunprecipitációs, pull-down és Duolink PLA Proximity ligation esszé alkalmazásával igazoltuk, mely eredmények alátámasztották a MYPT1 és a PPM1B között fennálló fizikai kölcsönhatást. A PPM1B és MYPT1 közötti enzim-szubsztrát kapcsolatot ROK kináz és PPM1B foszfataz esszé által validáltuk. Az *in vitro* foszfataz esszében a ROK által foszforilált GST-MYPT1-et használtunk, majd a PPM1B hatását a MYPT1 Thr696 foszforilációjára mértük, mely során bebizonyosodott, hogy a PPM1B szubsztrátja a MYPT1 Thr696-os gátló foszforilációs helye. A MYPT1 Thr696-os foszforiláció változását a PPM1B gátlószere, SNG alkalmazása során is vizsgáltuk, mely kezelés szignifikánsan növelte a MYPT1 Thr696 foszforilációját. A fémionok kivonásával végzett kezelés igazolta a PPM1B aktivitásának fémion-függőségét, mely során a MYPT1 foszforilációja szignifikánsan nőtt.

A következő lépésben a PPM1B és MYPT1 közötti igazolt interakció szabályozó hatását vizsgáltuk a miozin foszfataz (MP) aktivitására, HeLa sejtekben. A PPM1B SNG általi gátlása jelentős csökkenést okozott az MP enzimaktivitásában, míg az okadánsav (OA) alkalmazása szintén csökkentette az MP aktivitást. Az OA és SNG kombinációja additív hatást mutatott, amely tovább erősítette, hogy a PPM1B gátlása csökkenti az MP aktivitását. Eredményeink megerősítik, hogy a PPM1B a MP MYPT1 szabályozó aleggységével létesít kapcsolatot. *In vitro* kináz esszék eredményeként igazolódott, hogy a PPM1B és MYPT1 közötti kölcsönhatás fókusza a MYPT1 Thr696-os gátló foszforilációs helye. Korábbi irodalmi adatok már leírták a PPM1B-t mint a MYPT1 nukleáris kölcsönható partnerét HepG2 sejtekben. Bár az enzimek közötti sejtmagi fehérje-fehérje kölcsönhatások már korábban igazolták, a Duolink Proximity Ligation esszé által szerzett adatok alapján a két enzim közötti kölcsönhatás a sejtmagon kívül is fennállhat, és a sejtek citoplazmatikus területén szerepet játszhat a jelátvitel szabályozásában

A PPM1B gátlása a MYPT1 gátló foszforilációjának emelkedését okozza HeLa sejtek nukleáris frakciójában

Előzetes kísérleteink alapján igazoltuk, hogy a PPM1B gátlása SNG alkalmazásával, megnövelte a MYPT1 gátló foszforilációját *in vitro* kináz esszében, és csökkentette a MP holoenzim aktivitását. A PPM1B gátlás hatását HeLa sejtek különböző frakcióiban, teljes sejt lizátumban, citoplazmatikus és nukleáris frakcióban is vizsgáltuk, ahol az SNG kezelés nem változtatta meg a PPM1B fehérje expresszióját vagy lokalizációját, azonban a MYPT1 mennyisége 1,58-szorosára nőtt a sejtmagi frakcióban, jelezve, hogy a PPM1B gátlása a MYPT1 transzlokációját idézte elő a sejtmagba. A MYPT1 Thr696 foszforilációja szignifikánsan nőtt SNG kezelés hatására, mind a teljes sejt lizátumban (2,048-szoros növekedés), mind a sejtmagi frakcióban (2,137-szoros növekedés). Az eredmények alapján kijelenthetjük, hogy a PPM1B gátlása elősegíti a MYPT1 citoplazmából a sejtmagba történő transzlokációját a Thr696 foszforilációjának növekedésén keresztül.

A PPM1B gátlása a PRMT5 aktivitásának közvetett szabályozásán keresztül modulálja a génexpressziót a H4 fehérje szimmetrikus dimetilációjának módosításával

Korábbi irodalmi adatok szerint a sejtmagi MP gátolja a PRMT5 aktivitását a Thr80 aktiváló foszforilációjának defoszforilálása révén. Ezen ismeret birkában vizsgáltuk, hogy a PPM1B gátlás hogyan befolyásolja a PRMT5 aktivitását és a H4 fehérje szimmetrikus dimetilációját. Eredményeink szerint az SNG kezelés nem változtatta meg a PRMT5 expresszióját, de szignifikánsan növelte a PRMT5 Thr80 foszforilációját minden vizsgált frakcióban, melynek következtében a H4 szimmetrikus dimetilációja a teljes sejt lizátumban 1,54-szeresére, míg a sejtmagi frakcióban 3,25-szeresére nőtt, miközben a H4 fehérje expressziója nem változott. A fluoreszcens képek alapján a PRMT5, és H4 lokalizációja és kifejeződését az alkalmazott kezelések nem változtatták, viszont a Western blottal igazolt növekedett PRMT5 Thr80-as foszforiláció és H4 szimmetrikus dimetiláció a fluoreszcens képeken is nyomon követhető volt.

Az SNG inhibitor alkalmazása HeLa sejteken megerősítette, hogy a PPM1B aktivitásának csökkenése a MYPT1 Thr696-os foszforilációjának emelkedését eredményezte, ami összefüggött a PRMT5 Thr80 foszforilációjának emelkedésével. A PRMT5 aktiválása magával vonta a H4-es fehérje szimmetrikus dimetilációjának növekedését, ami egyértelműen hozzájárul az onkogenézis szabályozásához.

Az FT-PPM1B overexpressziója csökkenti a PMRT5 aktivitását a MP aktivációján keresztül HeLa sejtekben

A PPM1B izoformához kapcsolódó specifikus hatások kimutatása érdekében HeLa sejteket FT-PPM1B plazmiddal transzfektáltunk. Az overexpresszió validálását Western blot és immunfluoreszcens technikákkal végeztük, a transzekció életképességre kifejtett hatását Alamar Blue esszé segítségével követtük, amely 25,25%-os csökkenést mutatott az üres vektorral transzfektált MOCK csoportban a kezeletlen kontrollhoz képest, míg az FT-PPM1B transzekció nem okozott változást a sejtek életképességében. A PPM1B overexpresszió nem befolyásolta az MYPT1 kifejeződését, de az MP aktivitását növelte és a PRMT5 aktivitást csökkentette a MYPT1 Thr696-os foszforiláció növelésével, illetve a PRMT5 Thr80-as foszforiláció csökkentésével, ami csökkent H4 szimmetrikus dimetilációt eredményezett. Eredményeink szerint a PPM1B által szabályozott MP aktivitás közvetlen kapcsolatban áll a PRMT5 aktivitásával, illetve a sejtmagban kulcsszerepet játszik az MP szabályozásában, és a PPM1B aktivitásának csökkenése hozzájárul a daganatképződéshez.

Humán cervicalis carcinoma szöveti lizátumok módosult PPM1B-MYPT1-PRMT5-H4 tengelye korrelál *in vitro* eredményeinkkel

A humán cervicalis carcinoma szövetekben végzett Western blot analízis alapján a PPM1B és MYPT1 expressziója csökkent a daganatos mintákat egészséges egyénekből származó biopsziákhoz viszonyítva, míg a PRMT5 foszforilációja emelkedett tumoros szöveti lizátumokban. A H4 szimmetrikus dimetilációja is növekedett a daganatos szövetekben, a pRb tumorszuppresszor expressziója pedig csökkent a tumoros mintákban, ami megerősíti, hogy a PPM1B/MP/PRMT5/H4 tengely szerepe fontos a méhnyakrákban. Összegzésül, kutatásaink megerősítik, hogy a PPM1B az MP/PRMT5/H4 jelátviteli út vonal kritikus felsőbb szabályozó eleme, és tumorszuppresszor funkcióval bír. A PPM1B és MP farmakológiai aktiválása potenciális rákterápiás megközelítést kínálhat, különösen a méhnyakrák kezelésében.

Az SMTNL1 fehérje szerepe Ishikawa endometriális epithelilális sejtek kontraktilis tulajdonságaira és inzulin jelátvitelére

Az SMTNL1 fehérje szerepe inzulinrezisztens Ishikawa endometriális epitheliális sejtek kontraktilis tulajdonságaira

Az SMTNL1 fehérje fontos szerepet játszik az endometriális epitheliális sejtek különböző élettani folyamatainak szteroidhormon-függő szabályozásában. Az SMTNL1 szerepének további feltérképezéséhez kutatásaink során Ishikawa sejtvonalat alkalmaztunk. Ishikawa sejteket FT-SMTNL1 plazmiddal transzfektáltunk, az overexpresszó sikerességét Western blot és immunfluoreszcens technikával validáltuk, a transzfekció sejtekre életképességére kifejtett hatását Alamar Blue esszével vizsgáltuk, mely nem mutatott szignifikáns eltérést az FT-SMTNL1 túltermelt csoportban a kontroll csoporthoz képest.

További kísérleteinkben különböző hormonális kezeléseket alkalmaztunk, terhesség (P4) és P4-el kombinált inzulinrezisztens körülményt gesztacionális diabéteszt (GDB) modellezésére. A GDB kezelés alkalmazása az endogén SMTNL1 kifejeződését csökkentette Ishikawa sejtek esetén, mely eredményt Western blot analízissel validáltunk. A kísérleteink során alkalmazott inzulinrezisztens állapot igazolása céljából az Akt-1 fehérje expresszióját és foszforilációját vizsgáltuk. Az akut inzulin kezelés növelte az Akt-1 Ser473-as foszforilációját a kontroll csoportban, míg a GDB környezetben nem volt nyomon követhető az inzulin hatására bekövetkező foszforilációs változás. Ezen eredmények igazolták az Ishikawa sejtek esetén beállított inzulinrezisztens állapot megvalósulását.

Az Ishikawa sejtek szteroidhormonok hatására bekövetkező differenciációjának morfológiai változását HCS mikroszkóppal követtük. A P4 kezelés hatására az Ishikawa sejtek morfológiája változott a hormonkezelésben nem részesült kontroll csoporthoz képest, szférikus alakból columnáris formára, mely külső változás a GDB modellben kezelt csoport esetén elmaradt. Az FT-SMTNL1 transzfekció a differenciációt jellemző morfológiai változásokat progeszteronnal szinergista módon segítette elő, még a differenciációs blokkot szenvedett GDB kezelt csoportban is. Az MUC-1 differenciációs marker expresszióját mind immunfluoreszcenciával, mind RT-PCR-rel analízissel vizsgáltuk. Eredményeink alapján az FT-SMTNL1 transzfekció elősegítette a MUC-1 expresszióját, mind P4 mind GDB modellek között. Az FT-SMTNL1 transzfekció és progeszteron szinergikus hatása különösen a P4 kezelési modellben mutatkozott meg.

SMTNL1 overexpressziója csökkenti a MYPT1 expressziós szintjét és gátolja a MP aktivitást

A citoskeletális fehérjék és azokat szabályozó felsőbb jelátviteli elemek expressziójában bekövetkező változások hozzájárulnak a sejtek alakjának és differenciálódásának fiziológias lezajlásához. Az endometriális epitheliális sejtek citoskeletális változásaiért felelős kulcs szabályozó elem a miozin foszfatáz (MP), amelynek MYPT1 szabályozó alegysége és az SMTNL1 kölcsönhatásban áll egymással. Az SMTNL1 a PR-B ko-aktivátoraként expressziós szinten csökkenti a MYPT1 mennyiségét. FT-SMTNL1 transzfektált kontroll/P4/GDB modellek között tenyésztett Ishikawa sejtek esetén az FT-SMTNL1 overexpresszió progesteron-függő módon csökkentette a MYPT1 kifejeződését mind P4, mind GDB kezeléseknél. A MYPT1 kifejeződése 35,34%-kal (P4) és 38,66%-kal (GDB) csökkent a nem-transzfektált kontroll csoportokhoz képest az immunfluoreszcencia intenzitás analízis alapján.

Western blot analízissel nyert eredményeink szerint az FT-SMTNL1 transzfekció 39,49%-kal (P4) és 50,91%-kal (GDB) csökkentette a MYPT1 expresszióját a nem-transzfektált kontroll csoportokhoz képest. Az MP aktivitását a MYPT1 szabályozó alegység Thr696-os gátló foszforilációjának vizsgálatával elemeztük, melyet az FT-SMTNL1 transzfekció növelt, különösen a GDB környezetben, ahol a foszforiláció 113,66%-kal nőtt a transzfektált kontroll párjához viszonyítva.

FT-SMTNL1 overexpresszió közvetetten szabályozza az MLC20 foszforilációját a MP gátlásán keresztül

Az FT-SMTNL1 transzfekció MYPT1 szabályozó alegységre kifejtett hatásai után az MP szubsztrátját, az MLC20-at és annak foszforilációjának vizsgálatát tűztük ki célul. Az FT-SMTNL1 transzfekciója nem befolyásolta az MLC20 expresszióját, de növelte annak Ser19 foszforilációját. A Western blot és immunfluoreszcens adatok azt mutatták, hogy az MLC20 Ser19 foszforilációja 37,78%-kal (P4) és 40,91%-kal (GDB) nőtt az FT-SMTNL1 overexpresszió hatására, összehasonlítva a transzfekcióban nem részesült kontroll csoportokkal. A P4 kezelés az MLC20 foszforilációját csökkentette, míg a GDB kezelés növelte azt a hormonkezelésben nem részesült kontroll csoporthoz viszonyítva.

Az FT-SMTNL1 overexpressziója gátolja az Ishikawa sejtek migrációs képességét

Az FT-SMTNL1 overexpresszió jelentősen csökkentette a sejtek migrációját, különösen P4 és GDB kezelés esetén, 59,68%-al P4 és 32,14%-al GDB esetén kontroll csoportokhoz viszonyítva. A P4 hormonkezelés önállóan növelte a migrációt, de az SMTNL1 overexpresszió csökkentette

azt. A GDB kezelés önállóan is csökkentette a migrációt, amit az FT-SMTNL1 transzfekció tovább fokozott. Összességében eredményeink alapján az SMTNL1 transzfekció progesteronfüggő-módon csökkentette a MYPT1 expresszióját, továbbá gátolta az MP aktivitást a MYPT1 szabályozó alegység Thr696-os gátló foszforilációjának emelésén keresztül, mely korrelált az MP szubsztrátjának, az MLC20 foszforilációjának növekedésével. Ezen változások magyarázzák sejtek migrációs képességének csökkenését, mely megerősíti az SMTNL1 szerepét a migrációt befolyásoló mechanizmusok szabályozásában, melyek kulcsszerepet játszanak az endometriális diszfunkciók kialakulásában.

Az SMTNL1 szabályozza az IRS-1 és Akt-1 Ser foszforilációját és aktivitását Ishikawa sejtekben

A fertilitási zavarok gyakran társulnak inzulinrezisztenciával. Korábbi kutatások C2C12 sejteken és *smtnl1 knock out* egerekben mutatták ki az SMTNL1 szerepét az inzulin jelátvitelében. Kísérleteinkben célul tűztük ki az IRS-1 és Akt-1 génextpressziójának és posztranzlációs változásainak vizsgálatát FT-SMTNL1 transzfekció hatására Ishikawa sejtekben P4 és GDB modellek között. Kísérleteink során az IRS-1 fehérje expressziója nem változott, de a Ser612 oldallánc foszforilációja, amely az inzulinrezisztencia sejtes markere, 34,87%-kal emelkedett a GDB kezelés hatására. Az FT-SMTNL1 transzfekció csökkentette ezen foszforilációt P4 és GDB kezelések hatására egyaránt. Az Akt-1 expressziója nem változott, de az Akt-1 S473 oldalláncának foszforilációja csökkent, jelezve inzulinrezisztens állapotot P4 és GDB csoportban a hormonkezelésben nem részesült csoporthoz képest. Az FT-SMTNL1 transzfekció növelte az Akt-1^{PS473} foszforilációját mindkét kezelés hatására. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az FT-SMTNL1 overexpresszió enyhíti az inzulinrezisztencia molekuláris jeleit *in vitro* terhességi cukorbetegségben.

Az FT-SMTNL1 transzfekció közvetetten szabályozza a MAPK aktivitást Ishikawa sejtekben

A továbbiakban az inzulin jelátvitel felsőbb szabályozó elemeit, különösen a MAPK kinázok aktivitását vizsgáltuk. Az ERK $\frac{1}{2}$ aktivitását jelző T202/Y204 foszforiláció növekedése megfigyelhető volt a GDB kezelés hatására, amit az FT-SMTNL1 transzfekció csökkentett. Az ERK $\frac{1}{2}$ aktivitását befolyásolja a nPKC ϵ expressziója, mely szintén csökkent az FT-SMTNL1 transzfekció hatására GDB kezelés hatására. Az ERK $\frac{1}{2}$ aktivitását gátló PP2A és DUSP9

enzimek kifejeződése és aktivitása emelkedett FT-SMTNL1 transzfekció esetén, a PP2A GDB modell esetén a DUSP9 mind P4 és GDB kezelés során is. Az FT-SMTNL1 transzfekció progeszteronfüggő-módon, közvetetten csökkentette az ERK $\frac{1}{2}$ aktivitást a nPKC ϵ expressziójának csökkentésével és a PP2A és DUSP9 foszfatáz expresszió növelésével. Ezen hatások révén az FT-SMTNL1 transzfekció közvetetten gátolta az ERK $\frac{1}{2}$ aktivitását, ami csökkent IRS-1^{S612} foszforilációt eredményezett, jelezve a MAPK útvonal szerepét inzulin jelátvitel szabályozásában. Az U0126 ERK $\frac{1}{2}$ inhibitor alkalmazása tisztázta Ishikawa sejtek esetén a glükózfelvétel és inzulin jelátvitel MAPK általi szabályozottságát. Az U0126 gátlószer hatására csökkent az ERK $\frac{1}{2}$ aktivitása, amit csökkent IRS-1^{S612} foszforiláció és emelkedett glükózfelvétel kísért, mind kontroll, P4 és GDB modellben.

Az SMTNL1 transzfekció progeszteron-függő módon elősegíti az Ishikawa sejtek glikogén raktározását és glükózfelvételét

Az endometrium glikogénraktározása elengedhetetlen a homeosztázis fenntartásához, ezért az FT-SMTNL1 transzfekció hatását vizsgáltuk Ishikawa sejtek glikogén raktározására és glükóz felvételére. Az FT-SMTNL1 transzfekció növelte a glikogén raktározást, különösen P4 és GDB kezelés esetén, amit szinkron követett hasonló modellekben a glükózfelvétel fokozódása. A glikogénraktározás csökkenése a P4 és GDB csoportokban a hormonkezelés és a hiperglikémia-hiperinzulinémia hatásának következménye volt. Az FT-SMTNL1 transzfekció erős inzulinérzékenyítő hatást mutatott mindkét kezelés hatására. A GLUT4 transzporter expressziójában nem történt változás, így a glikogénraktározás és glükózfelvétel változása a transzporter lokalizációjának változásának tulajdonítható.

Összességében eredményeink azt mutatják, hogy az SMTNL1 fehérje kiemelkedő fontosságú az endometriális sejtek inzulin jelátvitelében, differenciációjában valamint a migráció szabályozásában. A kutatásunk megerősíti, hogy az SMTNL1 fehérje szerepe a női reprodukciós rendszer működésében és a metabolikus rendellenességek kezelésében kiemelkedő lehet, különösen terhességi cukorbetegségben és inzulinrezisztenciában.

Összefoglalás

A PPM1B fehérje központi szerepet játszik az MP nukleáris aktivitásának szabályozásában, mely működés elengedhetetlen az MP/PMRT5/H4 protoonkogén tengely tumorprotektív módon történő kiegyensúlyozásában. A PPM1B az egyetlen olyan protein foszfatáz, amely ezen tanulmány során bizonyított MYPT1 alegységgel kialakított kölcsönhatása révén képes a MYPT1 fehérjét a nukleuszban defoszforilálni Thr696-os oldalláncán, így elősegítve az MP működését. Ez a folyamat csökkenti a PRMT5 fehérje aktivációját, ezzel redukálva a H4 fehérje szimmetrikus dimetilációját, mely poszttranszlációs módosulás elburjánzása a protoonkogén/tumorszuppresszor mérleg felborulásához vezet, csökkentve tumorszuppresszorok és növelve a protoonkogének expresszióját. Kísérleti eredményeink igazolták a PPM1B és a MYPT1 kölcsönhatását HeLa méhnyakrák eredetű sejtek citoplazmatikus és sejtmai lokalizációban egyaránt. Az SNG inhibitorral végzett vizsgálataink során megfigyeltük, hogy a PPM1B gátlása fokozta a PRMT5 aktiváló foszforilációját és a H4 hiszton szimmetrikus dimetilációját, ezen változások humán cervix carcinomából származó szöveti lízátumok vizsgálatából is igazolódtak. Ezzel szemben a PPM1B transzfekciója kivédte ezeket az elváltozásokat. A PPM1B szerepe különösen hangsúlyos humán méhnyakrák szövetekben, ahol expressziója alacsonyabb a kontroll szövetekhez képest, amely összhangban áll a korábbi kutatásokkal, amelyek a PPM1B-t tumorelles faktorként azonosították. A kutatási eredményeink alapján a PPM1B ígéretes terápiás célpont lehet a daganatok kezelésében.

Az SMTNL1 fehérjét korábban, mint szteroidhormon-függő szövetekben fellelhető PR-B ko-regulátoraként azonosították, illetve ezen tanulmány során tipizáltuk azon tulajdonságát, amit az endometriális epitélium sejtjeinek differenciációjában és az inzulin jelátvitük szabályozásában betölt, *in vitro* terhes és gesztációs diabétesz modellben. Az FT-SMTNL1 transzfekció progeszteronfüggő módon szabályozta a sejtek citoskeletális elemeit, mint a MYPT1 és MLC20, amelyek molekuláris alapot biztosítottak a sejtek kontraktilitásának és migrációjának módosulására. Az FT-SMTNL1 transzfekció progeszteron függő módon gátolta a sejtek migrációját, illetve mérsékelte az inzulin rezisztenciára jellemző molekuláris változásokat az IRS-1 foszforilációjának közvetett modulálásával, melyhez igazodva nőtt a sejtek glükózfelvétele és glikogén tárolása. Ezek az eredmények alapján az SMTNL1 nemcsak az endometriális diszfunkciók, hanem az inzulinrezisztencia és daganatos betegségek terápiás célpontja is lehet.



Nyilvántartási szám: DEENK/23/2025.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

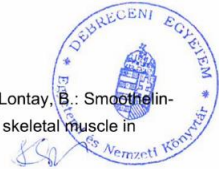
Jelölt: Keller Ilka
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudományi Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10080015

A PhD értekezés 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. 301 (2), 1-16, 2025.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbc.2024.108107>
IF: 4 (2023)
2. **Keller, I.**, Ungvári, Á., Kinter, R., Szalmás, A. 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). 15, 1-16, 2024.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fendo.2024.1375771>
IF: 3.9 (2023)

További közlemények

3. Tamás, I., Major, E., Horváth, D., **Keller, I.**, Ungvári, Á., Haystead, T. A. J., MacDonald, J. A., Lontay, B.: Mechanisms by which smoothelin-like protein 1 reverses insulin resistance in myotubules and mice.
Mol. Cell. Endocrinol. 551, 1-12, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2022.111663>
IF: 4.1
4. Major, E., Györy, 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). 12, 1-17, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fendo.2021.751488>
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. 22 (19), 1-18, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms221910293>
IF: 6.208

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 24,263

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
7,9**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2025.01.24.



A doktori értekezést megalapozó közlemények elkészítéséhez a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal (FK125043, K143533, K129104) a Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Kar Kutatási alap (1G3DBKJ0BFTK 247), az EFOP3.6.2-16-2017-00006 és EFOP-3.6.3-VEKOP-16-201700009 projekt, illetve az EU. UNKP-22-3-1. nyújtott támogatást.