

**Doktori (PhD) értekezés tézisei**

**A miozin foszfatáz szerepe a sebzáródásban és a neurotranszmitter-  
kibocsátás folyamatában**

Horváth Dániel

Témavezető: Dr. Lontay Beáta



**DEBRECENI  
EGYETEM**

DEBRECENI EGYETEM

Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2019

## **A miozin foszfatáz szerepe a sebzáródásban és a neurotranszmitter-kibocsátás folyamatában**

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

Írta: Horváth Dániel okleveles molekuláris biológus

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

Témavezető: Dr. Lontay Beáta

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora

tagok: Dr. Keller-Pintér Anikó, PhD

Prof. Dr. Tóth Attila, az MTA doktora

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Élettani Intézet Könyvtára  
2019. június 04. 10:00 óra

Az értekezés bírálói:

Dr. Apáti Ágota, PhD

Dr. Tóth István Balázs, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora

tagok: Dr. Apáti Ágota, PhD

Dr. Keller-Pintér Anikó, PhD

Prof. Dr. Tóth Attila, az MTA doktora

Dr. Tóth István Balázs, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK  
Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme  
2019. június 04. 12:00 óra

## **BEVEZETÉS**

### **A protein foszfatázok és a PP1 enzimesalád**

Az élő szervezetekben előforduló fehérjék közül számos rendelkezik kovalensen kötött foszfátcsoporttal. A fehérjék foszforilációját a protein kinázok katalizálják, míg a folyamat reverzibilitásáért a fehérjéket defoszforiláló protein foszfatázok a felelősek. Aszerint, hogy milyen aminosav oldalláncokon hatnak, megkülönböztethetünk szerin/treonin (Ser/Thr) specifikus, tirozin (Tyr) specifikus, illetve kettős specificitású protein foszfatázokat. Az emlős sejtekben a Ser/Thr-specifikus protein foszfatáz aktivitás több, mint 90%-áért a PP1 és a PP2A enzimek a felelősek.

A PP1 enzimek heterodimerek formájában működnek, vagyis a protein foszfatáz 1 katalitikus alegységhez (PP1c) valamilyen regulátor fehérje kapcsolódik, amelyek tovább növelik a működőképes holoenzimek számát. A PP1c-kölcsönható fehérjék többféle funkcióval is bírhatnak: különböző szubcelluláris régiókhoz vagy szubsztrátokhoz irányíthatják a holoenzimet, befolyásolhatják a holoenzim szubsztrát-specifitását, gátolhatják a PP1c katalitikus aktivitását, vagy lehetnek maguk a PP1c szubsztrátjai is. A PP1 szerepet játszik többek között a sejtciklus és az apoptózis, a fehérje szintézis, a glikogén metabolizmus, az izomkontrakció és a citoskeleton újrendeződés szabályozásában.

### **A miozin foszfatáz szerkezete, szabályozása és funkciója**

A miozin foszfatáz (MP) a PP1 enzimesaládba tartozó holoenzim, mely rendhagyó módon nem dimer, hanem trimer PP1 holoenzimet alkot. A PP1 katalitikus alegység  $\beta/\delta$  izoformája mellett két alegységet tartalmaz: a 110-130 kDa molekulatömegű miozin foszfatáz szabályozó alegységet (myosin phosphatase targeting subunit, MYPT1), illetve egy 20 kDa molekulatömegű fehérjét (M20), melynek a funkciója eddig még nem tisztázott. A miozin foszfatázt először csirkeizomból izolálták az 1990-es évek elején, és olyan enzimeként jellemezték, mely a 20 kDa miozin könnyű láncot (MLC20) defoszforilálva elősegíti a simaizom relaxációját. A MYPT1 regulátor alegység a MYPT fehérjecsaládba tartozik, melyek közös jellemzője, hogy N-terminális régiójukban mindegyikük tartalmazza a PP1c-kötő RVxF motívumot, melyet egy ankirin-ismétlődéskezből álló régió követ. A mintegy 1000 aminosavból felépülő fehérje a legtöbb szövetben expresszálódik, legnagyobb mennyiségben a simaizomban fordul elő.

A MP aktivitása többek között a MYPT1 alegység foszforilációja útján szabályozódik. A RhoA-aktivált kináz (ROK) a humán MYPT1-et a Thr696 és a Thr853 pozícióban foszforilálja, mely a MP holoenzim gátlását eredményezi. A MYPT1 Thr696 gátló

foszforilációs helyét más kinázok is foszforilálhatják, pl. a leucin cipzár motívummal kölcsönható protein kináz (ZIPK) vagy az integrinhez kapcsolt kináz (ILK). Az enzim aktivitását gátló fehérjék is blokkolhatják. A 17 kDa molekulatömegű protein kináz C által aktivált inhibitor (CPI-17) és homológjai, pl. a kináz által aktivált PP1 inhibitor (KEPI), olyan fehérjék, melyek foszforilált állapotban nemcsak a szabad PP1c aktivitását gátolják effektíven, hanem a MP holoenzimet is. Emellett a holoenzim aktivitását a szabályozó alegységhez kötődő gátló kölcsönható fehérjék, így pl. a smoothelin-szerű 1 fehérje is módosíthatja.

A már fent említett MLC20 mellett a MP számos új szubsztrátját írták le. Az ezrin, radixin és moezin (ERM fehérjék), az adducin, a Tau és a MAP2 a citoskeleton újrendeződésében játszanak szerepet, és szubsztrátjai mind a miozin foszfatáznak, mind a RhoA-aktivált kináz (ROK) enzimnek. Emellett azonban a MP-t a sejtmagban is lokalizálták, és sejtmagi szabályozó szerepére is fény derült. A MP a génexpresszióra több módon is hatást gyakorol. Szubsztrátja a hiszton deacetiláz 7 (HDAC7) fehérje, mely a MP általi defoszforiláció következtében a sejtmagba transzlokálódik, hogy ott egy transzkripciós komplex részeként szabályozza egyes gének átírását. Egy friss kutatási eredmény szerint a ROK foszforilálja, míg a MP defoszforilálja a protein arginin metiltransferáz 5 (PRMT5) enzimet a Thr-80 oldalláncon, így szabályozva a hepatokarcinóma sejtek tumorigenezisét. A PRMT5 foszforilált állapotban aktív és katalizálja a hiszton fehérjék szimmetrikus dimetilációját arginin aminosavmaradékokon, mely a tumorigenezis velejárája. Emellett a MP defoszforilálja a retinoblasztóma fehérjét (pRB), mely a sejtciklus szabályozásában vesz részt. Szintén szubsztrátja a MP-nak a merlin nevű fehérje, mely számos sejttypus proliferációját szabályozza, és a MP általi defoszforilációja aktiválja a sejtproliferációt gátló és tumorszuppressziós hatását. A MP a mitózis szabályozásában is részt vesz azáltal, hogy defoszforilálja és inaktiválja a polo-szerű kináz 1-t. A MP az erek tónusát is szabályozza az endotéliális nitrogén-oxid szintetáz (eNOS) defoszforilációja révén: a fehérjét defoszforilálva aktiválja az enzimet, így az NO-termelést és a vazodilatációt fokozva.

A miozin foszfatáz az idegsejtekben is megtalálható. A MP és a ROK neuronális szubsztrátjaiként azonosították a szinapszin és a szintaxin fehérjéket, és exocitózis esszéivel kimutatták, hogy a PP1 enzimek tautomycetinnel (TMC) való gátlása csökkenti, míg a ROK Y27632-vel való blokkolása megnöveli a neurotransmitter-kibocsátás mértékét. Pull-down esszéivel és az azt követő tömegspektrometriás elemzéssel a fenti fehérjék mellett a 25 kDa molekulatömegű szinaptoszóma-asszociált protein (SNAP-25) is a MYPT1 kölcsönható partnerének bizonyult, felvetve annak a lehetőségét, hogy ez a fehérje is a MP szubsztrátja. Kutatásaimat többek között ebben az irányban folytattam.

## **A sebgyógyulás folyamata és szabályozása**

A seb az érintett szövetek anatómiai struktúrájában és funkciójában bekövetkezett károsodás. Az akut sebgyógyulás folyamata négy – didaktikai szempontból elkülönített – fázison megy keresztül: véralvadás, gyulladás, proliferációs fázis, szöveti újrendeződés (remodelling). Ezek a szakaszok egymás után, de időben átfedő módon zajlanak le és sokrétűen szabályozottan.

A seb kialakulása után azonnal megindul a vérzéscsillapítás. A vérlemezkékből és a környező szövetek sejtjeiből proinflammatorikus citokinek és növekedési faktorok szabadulnak fel, melyek beindítják a gyulladásos fázist. Először a neutrofil granulociták érkeznek a sérült szöveti területre, melyek fagocitotikus aktivitásukkal megkezdik a szervezetbe kerülő mikroorganizmusok eltakarítását, majd a sebzés után 2-3 nappal megjelennek a makrofágok is. Ezek a sejtek folytatják a kórokozók elpusztítását, aktiválják azokat a sejtpopulációkat, melyek végrehajtják a proliferációs szakasz több fejleményét, illetve aktiválják a limfocitákat, melyek bevégeznek a gyulladásos fázist. A proliferációs fázis a sérülés után kb. 3 nappal kezdődik, és hossza mintegy két hét. A fibroblasztok megkezdik a kötőszöveti mátrixfehérjék szintézisét, és megindul az új kötőszöveti rostok kiépülése. Új kapillárisok is képződnek, így a szövet vérellátása javul. A re-epitelizáció folyamata során pedig az epitelsejtek proliferálnak és a seb felszínére vándorolnak, hogy helyreállítsák az epidermisz barrier funkcióját. Az érési fázis a sebgyógyulás utolsó szakasza, mely akár több évet is igénybe vehet. Az extracelluláris mátrix újjáépül, szerkezeti felépítése pedig felveszi a normális struktúrát (remodelling).

Mint láthattuk, 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. A re-epitelizáció szabályozásában számos növekedési faktor vesz részt, melyek térben és időben szabályozottan termelődnek és fejtik ki hatásukat. A sejt migráció szabályozásában a foszfatázok és kinázok is jelentős szerepet játszanak, de ezek pontos szerepe még kérdéses. HaCaT sejteket okadánsavval és kalikulin-A-val kezelve karcolási (scratch) eszével azt tapasztalták, hogy a PP1 és a PP2A együttes gátlása lassította a migrációt. Egy másik kutatócsoport ugyanakkor arra jutott, hogy az aktív PP2A az ERK defoszforilációja által gátolja a keratinociták migrációját. Doktori munkám egyik célja annak meghatározása volt, hogy a MP és enzim párja, a ROK hogyan befolyásolja a humán keratinociták proliferációját és migrációját, illetve milyen szerepet töltenek be a sebzáródás folyamatában.

## **A neurotranszmitter-kibocsátás folyamata**

Az idegsejtek közötti kommunikációt a kémiai szinapszisok biztosítják. Az ingerületátvitel egy többlépcsős folyamat, melynek első lépéseként a vezikulumok ATP igényes aktív transzport révén feltöltődnek neurotranszmitterekkel. Ezután a vezikulumok az aktív zóna közelébe vándorolnak, ahol megtörténik a dokkolódás, melynek során a vezikulumok a preszinaptikus membránhoz horgonyzódnak ki. Ezután további molekuláris átrendeződés zajlik le, mely azt a célt szolgálja, hogy a vezikulumokat képessé tegye a sejtmembránnal való fúzióra. Ezt a lépést a szakirodalom „priming”-nak nevezi. A beáramló  $Ca^{2+}$  végül kiváltja a vezikulumok exocitózisát a fúziós pórus megnyílásával.

A vezikulák dokkolódásában és fúziójában az ún. SNARE (szolubilis N-ethylmaleimid szenzitív faktort kötő fehérje receptor) komplex kulcsszerepet játszik. A komplexet három fehérje alkotja: a vezikulumok membránjához kihorgonyzott szinaptobrevin, illetve a sejtmembránhoz kapcsolódó SNAP-25 és szintaxin. A SNARE komplexben részt vevő fehérjék mindegyike hordozza a 60-70 aminosav hosszúságú, evolúciósan konzervált SNARE motívumot, melyeken keresztül összekapcsolódnak. Amikor a három fehérje közel kerül egymáshoz, az N-terminálisuktól kiindulva a C-terminálisuk irányába elindul az összeépülésük, és az eközben fellépő mechanikai erőhatások a két membránfelületet egymás irányába nyomják és fuzionáltatják, ilyen módon pedig egy pórus képződik, melyen keresztül a neurotranszmitterek a szinaptikus részbe jutnak. A folyamat exergonikus, a fehérjék összeépülése spontán módon történik; energia a SNARE komplex felbontásához szükséges.

### **A SNAP-25 szabályozása foszforiláció és defoszforiláció által**

A neurotranszmitter-kibocsátást elsődlegesen a beáramló kalciumion váltja ki, de a folyamat végbemenetelét fehérjék foszforilációja és defoszforilációja is szabályozza. A kutatások szerint a SNAP-25 két legfontosabb foszforilációs helye a Thr-138 és a Ser-187, melyeket a protein kináz A (PKA) és C (PKC) is foszforilál. A Thr138-nak a priming folyamatában lehet szerepe, mivel PKA általi foszforilációja együtt jár az exocitózisra kész („primed”) állapotban lévő vezikula pool-ok méretének növekedésével. *Risinger és Bennett* kutatásai szerint a SNAP-25 Thr138 oldalláncon történő foszforilációja nem módosítja a SNAP-25 és a szintaxin közötti kölcsönhatás erősségét, ellenben *Gao és munkatársai* szerint a Thr138 oldalláncon történő foszforiláció gátolja a SNAP-25 és a szintaxin közötti kölcsönhatást és a SNARE-komplex összeépülést, továbbá a PC12 sejtek noradrenalin szekrécióját is. A Ser187 aminosavmaradék foszforilációja a neurotranszmitter-kibocsátás folyamatának számos elemét szabályozhatja, többek között a SNARE-komplex összekapcsolódását, a vezikulumok plazmamebránhoz történő vándorlását, vagy éppen a feszültség kapuzott kalcium-csatornák

SNAP-25 általi gátlását. A kutatások szerint a Ser187 aminosav oldalláncot a protein foszfatáz 2A (PP2A) defoszforilálja, a PP1 és a protein foszfatáz 2B (PP2B) azonban nem, míg a Thr138 oldallánc defoszforilációját elsődlegesen a PP1 végzi.

## CÉLKITŰZÉSEK

Célunk az volt, hogy a MP és a ROK (1) sebzáródásban, illetve (2) neurotranszmitter-kibocsátásban játszott szerepéről minél teljesebb képet kapjunk.

### (1) A MP szerepe a sebzáródásban:

- A PP1 és a ROK inhibitorok (tautomycin, H1152) hatásának vizsgálata az epidermális sebzáródásra egérmodellen.
- Annak vizsgálata, hogy hogyan hatnak a PP1 és ROK inhibitorok a humán keratinocita (HaCaT) sejtek életképességére, a bennük található foszfatázok aktivitására, a keratinociták proliferációjára és migrációjára, a sejt-sejt kapcsolatokra és a barrier funkcióra.
- A MP szerepének vizsgálata a HaCaT sejtek fenti folyamataiban.
- A MP szerepének vizsgálata a keratinociták migrációját és a sebgyógyulást befolyásoló molekuláris mechanizmusokban, a jelátviteli pályák feltérképezése. Humán bőrszöveti sejtekben a MYPT1 csendesítése, majd a szövetlizátumok MAPK array vizsgálata.

### (2) A MP szerepe a neurotranszmitter-kibocsátásban:

- Munkacsoportunk korábbi kutatási eredményei alapján a SNAP-25 fehérje a miozin foszfatáz potenciális szubsztrátjának tűnt. Célunk ennek a hipotézisnek az igazolása volt. A SNAP-25 és a MP alegységeinek (MYPT1, PP1c $\delta$ ) kölcsönhatásának igazolása immunoprecipitációval.
- A SNAP25 mint a ROK és a MP szubsztrátjának igazolására tisztított SNAP-25-fehérje ROK enzimmel történő *in vitro* foszforilálása és a foszforilációs helyek tömegspektrometriás azonosítása. A foszforilált SNAP-25 fehérje defoszforilálása a MP alegységeivel, és ennek ellenőrzése Western blot analízissel, a foszforilált SNAP-25-re specifikus antitest felhasználásával.
- A SNAP-25 ROK/MP-általi szabályozásának *in vivo* vizsgálata B50 neuroblasztóma sejtekben és egér agyszeletekben.
- A MP neurotranszmitter-kibocsátásra gyakorolt hatásának vizsgálata excitózis esszéivel, kontroll és KEPI-vel kezelt szinaptoszómák felhasználásával.

## **ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK**

### **A sebgyógyulás tanulmányozása egérbőrön**

6-7 hetes hím Balb/c egerek (n=6) hátáról eltávolítottuk a szőrt, majd a bőrfelületen három, egyenként 4 mm átmérőjű, kör alakú, teljes vastagságú sebet ejtettünk. A sebeket 7 napon keresztül napi kétszer 1  $\mu\text{M}$  tautomycinnel (TM), a PP1 szelektív inhibitorával, illetve 10  $\mu\text{M}$  H1152-vel, a ROK specifikus inhibitorával kezeltük. A sebekről Olympus kamerával minden nap felvételt készítettünk, területüket pedig ImageJ programmal határoztuk meg.

### **Trikróm festés**

Az előző pontban tárgyalt kísérlet végén az egéreseket kivágtuk, 10%-os formalinnal fixáltuk, paraffinba ágyasztuk, majd 4  $\mu\text{m}$  vastagságú szeleteket metszettünk ki belőlük. A metszeteket mounting médium segítségével üveglapra rögzítettük, xilénnel deparaffinizáltuk, és felszálló etanol sorral dehidratáltuk, majd Masson és Goldner módszere szerint festettük.

### **Immunhisztokémia**

A humán bőrszöveti metszeteket egy éjszakán át inkubáltuk anti-transzglutamináz-1 (anti-TG1), illetve anti-MYPT1 elsődleges antitestekkel, majd mosást követően két órán át torma peroxidázzal konjugált másodlagos antitestekkel. Az immunjeleket 3,3'-diaminobenzidin kromogén szubsztráttal hívtuk elő. A metszeteket xilénnel megtisztítottuk, beágyasztuk és tárgylemezre ragasztottuk, végül Leica S40 mikroszkóppal vizualizáltuk.

### **Sejttenyésztés**

A humán keratinocita (HaCaT), a B50 neuroblasztóma és a tsA201 sejteket 10% borjú szérumot (FBS), illetve 2 mM L-glutamint tartalmazó Dulbecco által módosított Eagle médiumban (DMEM), míg a normál humán epidermális keratinocita (NHEK) sejteket EpiLife médiumban tenyésztettük 37 °C hőmérsékleten, 5% szén-dioxid és 95% levegő vízgőzzel telített keverékében.

### **Géncsendesítés HaCaT sejtekben**

A HaCaT sejtek MYPT1 expressziójának downregulációját dupla szálú siRNS-sel kiviteleztük. 5  $\mu\text{l}$  Lipofectamine 2000 transzfekeciós reagenshez 100 pmol siRNS-t adtunk, melyeket előzetesen 250-250  $\mu\text{l}$  OptiMEM-ben hígítottunk. Az előzetesen feltripszinezett, szérummentes DMEM-ben lévő sejtekhez hozzáadtuk ezt a mixet, 4 óra elteltével 10% FBS-t mértünk hozzájuk, majd további 44 órán keresztül növesztettük őket. A sejteket végül lizáltuk.

### **Géncsendesítés humán *ex vivo* bőrszövetben**

Az siRNS-t és a Lipofectamine 2000-t ezúttal a Genoskin által a bőrszövetek fenntartására biztosított speciális médiumban hígítottuk és az *ex vivo* humán bőrszövetbe

injektáltuk. Két nap inkubáció után a mintákat folyékony nitrogénben fagyasztottuk, dörzsmozsárban széttörtük és lízis pufferben homogenizáltuk. Végül a lizátumokat Western blottal vagy humán MAPK Protein Profiler array segítségével vizsgáltuk meg. Utóbbi esetben a gyártó által megadott protokollt követtük.

### **MTT sejtéletképességi vizsgálat**

A sejteket 96-lyukú tenyésztőedényben szélesztettük, és a sejtek inhibitoros kezelése (1  $\mu\text{M}$  TM, 10  $\mu\text{M}$  H1152, 12 óra) után a lyukakba 100  $\mu\text{l}$  szérummentes DMEM-et, és 10  $\mu\text{l}$  5 mg/ml MTT oldatot pipettáztunk. A sejteket mintegy 30 percre újból inkubátorba helyeztük, majd a médiumot eltávolítottuk, és a formazán zárványokat 100-100  $\mu\text{l}$  dimetil-szulfoxidban (DMSO) feloldottuk. A színintenzitást spektrofotométerrel határoztuk meg az abszorbancia 540 nm hullámhosszon történő detektálásával.

### **Kaspáz-3 aktivitásmérési vizsgálat**

A HaCaT sejteket 6-lyukú tenyésztőedényben konfluens állapotig növesztettük, 24 órán át széruméheztettük, inhibitorokkal kezeltük (1  $\mu\text{M}$  TM, 10  $\mu\text{M}$  H152, 12 óra), majd lizáltuk, és centrifugálás után a felülúszóhoz hozzáadtuk az Ac-DEVD-AMC szubsztrátot. A csöveket 60 percre 37 °C-os vízfürdőbe helyeztük, és a felszabadult fluoreszcens AMC-t intenzitását 360 nm gerjesztési és 460 nm emissziós hullámhosszon mértük Fluoroskan FL készülékkel.

### **Western blot**

A fehérjéket poliakrilamid gélelektroforézissel molekulatömeg szerint elválasztottuk, majd nitrocellulóz membránra transzferáltuk. A membrán szabad kötőhelyeit 5% marhaszérum-albumin (BSA) oldattal blokkoltuk, majd a membránt egy éjszakán át az elsődleges antitestekkel inkubáltuk 4 °C-on. Mosást követően a membrán felületére mértük a másodlagos antitesteket, 2 óra szobahő történő rázatás és újabb mosás után pedig az immunjeleket SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate Kittel detektáltuk.

### **Protein foszfatáz aktivitásmérési vizsgálat**

Az inhibitorokkal kezelt (1  $\mu\text{M}$  TM, 10  $\mu\text{M}$  H152, 1 óra) vagy siRNS-sel transzfektált sejteket a kezelések lejárta után lizáltuk, majd centrifugálás után a felülúszókat 0,1%  $\beta$ -merkaptoetanolt tartalmazó 20 mM-os Tris-HCl (pH 7,4) pufferben a háromszorosára hígítottuk, és 1  $\mu\text{M}$   $^{32}\text{P}$ -jelölt pulykazúza MLC20 jelenlétében 30 °C-on analizáltuk. A reakciót 200  $\mu\text{l}$  10% (V/V) triklórecetsav és 200  $\mu\text{l}$  6 mg/ml BSA hozzáadásával állítottuk le, és a felszabadult radioaktívan jelölt foszfátot szcintillációs számlálóval határoztuk meg.

### **Karcolási (scratch) vizsgálat**

96-lyukú tenyésztőedényben a HaCaT sejteket konfluens állapotig növesztettük, majd Tecan Freedom EVO 150 géppel minden lyukban egyforma széles karcoltot ejtettünk. Karcolás

után a sejteket inhibitorokkal kezeltük (1  $\mu$ M TM, 10  $\mu$ M H152), majd 24 órán át növesztettük. A MYPT1 csendesítés esetében a sejteket előbb siRNS-sel transzfektáltuk, és a transzfekció kezdete után 24 órával karcoltuk. Végül a karcolatokról fotókat készítettünk, és területüket ImageJ programmal határoztuk meg.

### **Szulforodamin B (SRB) sejtproliferációs vizsgálat**

A karcolási vizsgálat végén a sejtekhez 1 óra erejéig jéghideg 10%-os triklórecetsavat adtunk, majd ennek eltávolítása után 100  $\mu$ l 0,4% (m/V) SRB-t tartalmazó 1%-os ecetsav oldatot pipettáztunk a lyukakba. 10 perc inkubáció után a nem kötődött festéket eltávolítottuk, és a sejtek fehérjéi által kötött SRB-t 10 mM Tris-bázissal szolubilizáltuk. Az abszorbancia értékeket 540 nm hullámhosszon spektrofotométerrel határoztuk meg.

### **JuLI<sup>TM</sup> valós idejű (real-time) sejtvizsgáló készülék**

Petri-csésze felületét telenövő HaCaT sejteket pipettaheggyel megkarcoltunk és 10% FBS/DMEM-ben tenyésztettünk, melyhez hozzáadtuk az inhibitorokat. A MYPT1-csendesített és a non-target siRNS-sel transzfektált sejteket a csendesítés kezdete után 24 órával karcoltuk meg. A karcolatok benövését JuLI<sup>TM</sup> Br készülékkel vizsgáltuk, mely 24 órán keresztül óránként készített felvételt a sebzáródás állapotáról.

### **Electric cell-substrate impedance sensing (ECIS)**

A HaCaT sejteket 8W10E ECIS 8 elektródás tenyésztőedényben növesztettük. 5 mA áramerősségű és 60 kHz frekvenciájú elektromos impulzust kétszer 30 másodpercig alkalmazva az elektródok felületén kiégettük a sejteket, majd mértük az impedancia változását. A sejtréteg integritásának helyreállítását az impedancia plató maximális értéke jelentette. Az impedancia mérésével a HaCaT sejtek barrier funkcióját is tanulmányoztuk, ebben az esetben égetés nélkül. Az impedancia valós idejű nyomon követése legalább 6 órán keresztül történt.

### **Immunfluoreszcencia**

Az üveglapokon növesztett sejteket PBS-sel mostuk, és 4% paraformaldehid/PBS oldattal (HaCaT) vagy felszálló etanol sorral (B50) fixáltuk, majd 0,02-0,2% Triton X-100/PBS oldattal permeabilizáltuk. Ezt követően a sejteket 1 órán keresztül 4 °C-on 1% lószérum vagy BSA PBS-ben hígított oldatában blokkoltuk. Az elsődleges antitesteket 1:250, a másodlagos antitesteket és a Texas Red-X phalloidint pedig 1:2000 arányban hígítottuk ebben a blokkoló oldatban és adtuk a sejtekhez egy éjszakán át, illetve 2 órára. Végül a sejtmagokat megfestettük DAPI-val, és az üveglapokat ProLong Gold Antifade médiummal a tárgylemezekre fixáltuk. Az immunjeleket konfokális mikroszkóppal vizualizáltuk.

## **Immunprecipitáció**

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

## **Fehérje termeltetés és tisztítás**

Emlős tsA201 sejtekbe polietilénimin (PEI) segítségével Flag-SNAP-25 vagy Flag-KEPI fehérjét kódoló plazmidot juttattunk be. A sejteket a transzfekció kezdete után 24 órával lizáltuk és a termeltetett fehérjét Anti-Flag M2 affinitási géllal tisztítottuk. A kikötött fehérjéket 300 µg/ml Flag-peptid/TBS-sel eluáltuk.

## ***In vitro* protein kináz esszé**

5 µM Flag-SNAP-25 fehérjét 120 percig 30 °C-os vízfürdőben inkubáltunk 20 ng/µl ROK enzimmal, 1 mM  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]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 autoradiográfiás módszerrel detektáltuk.

## **Protein foszforilációs és defoszforilációs vizsgálat**

TsA201 sejtekben Flag-SNAP-25 fehérjét termeltettünk, majd a lizátumot 4 °C-on, 2 órán át Anti-Flag M2 affinitási géllal inkubáltuk. A gyanta mosása után hozzáadtuk a ROK enzimet, az ATP-t és a mikrocisztin-LR-t, majd a csöveket 30 °C-os vízfürdőbe helyeztük 30 percre. A kontroll minta a ROK kivételével valamennyi összetevőt tartalmazta. Ezután a felülúszót leszívtuk, a gyantát TBS-sel mostuk, majd a ROK foszforilált mintát kettéosztottuk, és az egyik csőhöz csak TBS-t adtunk, míg a másik mintához hozzáadtuk a MP alegységeit: 25 nM Flag-MYPT1-et és 5 nM PP1c $\delta$ -t. A csöveket 15 percre ismét 30 °C-os vízfürdőbe helyeztük, majd a gyantát TBS-sel mostuk és 1x SDS-PAGE mintapufferrel főztük.

## **Tömegspektrometria**

A megfelelő fehérjesávokat tripszinnel gélből emésztettük. A peptidkeverék 80%-át titán-dioxidos foszfopeptid-dúsításnak vetettük alá, míg a fennmaradó 20%-nyi mennyiséget folyadékromatográfiás-tömegspektrometriával analizáltuk, és az adatokból PAVA szoftverrel csúcslistát készítettünk. Az adatokat ProteinProspectorral összehasonlítottuk a Swissprot adatbázisban található humán adatokkal. Ezt követően a megbízhatóan azonosított peptidekkel egy újabb szűrést végeztünk úgy, hogy a változó módosítások körébe a Ser/Thr foszforilációt is belevettük. A foszfopeptidek foszforilációs helyének beazonosításakor az ún. SLIP pontszám küszöbértéke 6 volt, ez a helymeghatározás 95%-os pontosságának felel meg.

## **Szinaptoszóma preparálás**

C3H egereket CO<sub>2</sub>-dal eutanizáltunk és agypreparátumot készítettünk. A kortextet különválasztottuk az agy többi részétől, majd jéghideg homogenizáló oldatban homogenizáltuk, és centrifugáltuk. A felülúszót polikarbonát csövekben összeállított 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 négyszeres térfogatú Krebs-pufferrel hígítottuk, centrifugáltuk, a pelletet ismét Krebs-pufferrel mostuk, majd újabb centrifugálást követően a szinaptoszóma preparátumot Krebs-pufferben reszuszpendáltuk.

## **Flag-KEPI bejuttatása a szinaptoszómákba**

A szinaptoszómákat reszuszpendáltuk HBS pufferben, mely 25% DMSO-t is tartalmazott. A szuszpenziót háromfelé osztottuk, az egyik csőhöz nem adtunk semmit (kontroll), a másodikhoz Flag-peptidet, a harmadikhoz pedig tisztított Flag-KEPI fehérjét mértünk, egyaránt 0,3 µg/µl végkoncentrációban. A csöveket szárazjég-izopropanol hűtőkeverékbe helyeztük 3 percre (fagyasztás), ezt követően pedig 10 percre 4 °C-os vízfürdőbe (felolvasztás). Végül a csöveket centrifugáltuk, a pelletet Krebs-pufferrel kétszer átmostuk, majd Krebs-pufferben reszuszpendáltuk.

## **Excitózis esszé**

A szinaptoszómákat tartalmazó Eppendorf csöveket 3 percre 37 °C-os vízfürdőbe helyeztük, majd a csövekbe FM 2-10 festéket pipettáztunk. A csöveket újabb 1 percre visszahelyeztük a vízfürdőbe, majd 30 mM KCl hozzáadásával stimuláltuk az FM 2-10 felvételét a szinaptoszómákba. Újabb 2 perc 37 °C-on történő inkubáció után (festék internalizáció) az Eppendorf csöveket centrifugáltuk, a pelletet Krebs-pufferben reszuszpendáltuk, majd 100 µl mennyiségeket fekete 96-lyukú plate lyukaiba mértünk. Az excitózist 30 mM KCl-dal váltottuk ki, a fluoreszcencia intenzitás változásait pedig Fluoroskan FL készülékkel követtük nyomon (excitáció: 488 nm, emisszió: 540 nm).

## **Agyszeletek preparálása és kezelése**

C3H egerekből perparált agykéregből Microm HM 650 V vibratómmal 200 µm vastagságú szeleteket metszettünk, melyeket mesterséges cerebroszpinális folyadékba helyeztük. Ezután az agyszeletekhez adtuk a megfelelő inhibitorokat (5 µM tautomycetin (TMC) vagy 10 µM H1152) és 8 mM KCl-ot, és az inzerteket egy órára enyhe túlnyomásos karbogén gázt tartalmazó kamrába helyeztük.

## **Statisztikai analízis**

A statisztikai analízist és a diagramkészítést GraphPad Prism 6 programmal végeztük el. Az adatok statisztikai elemzése Student-féle t-tesztel vagy ANOVA tesztel történt, *post*

*hoc* Šidak- vagy Dunnett-teszttel. Minden diagram esetében az egyes oszlopok az átlagot, míg a hibasávok az átlag standard hibáját (SEM) jelentik.

## **EREDMÉNYEK**

### **A tautomycin gátolja az egérsebek gyógyulását**

A PP1 és a ROK sebzáródásban játszott szerepét egerek hátbőrén ejtett sebek tautomycin (TM) és H1152 inhibitorokkal történő kezelésével tanulmányoztuk. A TM, a PP1 szelektív inhibitora a sebgyógyulás teljes elmaradását eredményezte, a sebek mérete az eltelt 6 nap alatt alig változott. A TM-mel kezelt sebek területe 2 nap után kezdett el szignifikánsan különbözni a kontroll sebekétől. A ROK enzim H1152 általi gátlása a sebzáródás kismértékű – de nem szignifikáns – gyorsulását okozta.

A 6. nap után a sebeket kimetszettük, és a darabokon elvégeztük a Masson-Goldner-féle trikróm festést a re-epitelizáció tanulmányozása céljából. Azt találtuk, hogy a TM-mel kezelt egerek esetében a re-epitelizáció folyamata szinte teljes mértékben gátlást szenvedett. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a PP1 enzimeknek fontos szerepük van a sebgyógyulásban, mivel gátlásuk megakadályozza a re-epitelizáció végbemenetelét.

### **A TM és a H1152 hatása a keratinociták fiziológiai funkcióira**

Sem MTT esszével, sem kaszpáz esszével nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést a kontroll, illetve a 12 órán át 1  $\mu$ M TM-mel vagy 10  $\mu$ M H1152-vel kezelt humán keratinocita HaCaT sejtek életképessége között. A ROK gátlásának nem volt hatása a HaCaT sejtek protein foszfatáz aktivitására, azonban a TM a foszfatáz aktivitást a kontroll érték 51,7%-ára csökkentette. 96-lyukú tenyésztőedényben növesztett sejtek robottal történő karcolása és a sebzáródás tanulmányozása alapján a H1152-vel kezelt HaCaT sejtek esetében a végső karcolatok területe átlagosan 19%-kal volt kisebb, mint a szérumban növesztett kontroll karcolatoké, míg a TM-kezelt sejtek migrációja teljes mértékben leállt, ez esetben a karcolatok mérete megegyezett a negatív (szérumentes) kontrolléval. Az SRB vizsgálat alapján a TM kezelés gátolta a sejtproliferációt, a proliferációs ráta a kontroll értéknél 24%-kal volt alacsonyabb. A H1152 kezelés azonban kísérleteinkben nem befolyásolta a sejtproliferáció mértékét. A karcolási vizsgálatot úgy is elvégeztük, hogy a sejteket a karcolás előtt mitomycinnel előkezeltünk, mely a sejtciklus megakasztásával gátolja a sejtosztódást. Az SRB eszé alapján a mitomycin valóban gátolta a sejtproliferációt, a karcolási vizsgálat pedig azt mutatta, hogy a seb záródását is akadályozta. Ez arra utal, hogy a sejtosztódás elengedhetetlen

a sebzáródás folyamatában, és csupán a keratinociták migrációja nem elégséges a folyamat hatékony végbemeneteléhez.

A TM és a H1152 inhibitorok sejtmigrációra gyakorolt hatását Petri-csészében növesztett sejtek pipettaheggyel történő karcolásával és JuLI<sup>TM</sup> valós idejű (real-time) sejtvizsgáló készülékkel is tanulmányoztuk. Kétutas ANOVA analízissel és *post hoc* Dunnett-teszttel bizonyítottuk, hogy a TM kezelés ezúttal is gátolta, míg a H1152 kezelés elősegítette a sebzáródást ebben a kísérleti elrendezésben is. A H1152-vel kezelt sejtek már nyolc órával a karcolás után szignifikánsan nagyobb területet nőttek be, mint a kontroll sejtek, a TM-kezelés esetében pedig a különbség 16 óra elteltével vált szignifikánssá. A fenti eredményeket az ECIS kísérletek tovább erősítették. Az elektródakon kiégetett sebek teljes gyógyuláshoz a kontroll sejteknek 2,1 órára, a 10  $\mu$ M H1152-vel kezelt sejteknek 1,6 órára, míg az 1  $\mu$ M TM-mel kezelt sejteknek 2,7 órára volt szüksége. Kísérleteinkkel bizonyítottuk, hogy a PP1 és a ROK ellentétes módon szabályozza a keratinociták sebzáródását: előbbi serkenti, utóbbi gátolja.

#### **A MYPT1 csendesítése is gátolja a keratinociták mozgását**

96-lyukú tenyésztőedényben növesztett HaCaT sejtek karcolási vizsgálata azt mutatta, hogy azon sejtek esetében, melyekben a MYPT1 expresszióját gátoltuk, a végső karcolat területe mintegy háromszorosa volt a kontroll sebekének. A MYPT1 csendesítése tehát szignifikánsan lassította a karcolat záródását. Az SRB esszével alapján a MYPT1 csendesítése egészen kis mértékben – a kontrollhoz képest mindössze 7%-kal –, de szignifikánsan csökkentette a proliferációs rátát. JuLI<sup>TM</sup> valós idejű sejtvizsgáló készülékkel tanulmányozva a pipettaheggyel megkarcolt sejteket arra jutottunk, hogy a karcolás után 8 órával már szignifikáns volt az eltérés a kontroll és az siMYPT1-transzfektált sejtek által benőtt terület nagysága között. A MYPT1-csendesített sejtek a kontroll sejteknél mintegy 1 órával később nőttek tele az ECIS tenyésztőedényben kiégetett elektródot. Mindezek az eredmények azt bizonyítják, hogy a miozin foszfatáz elősegíti a keratinocita monolayeren ejtett seb benövését.

#### **A MP működése zavart okoz a HaCaT sejtek barrier funkciójában**

Szaruhártya epitélisejtek esetében már leírták a ROK sejt-sejt kapcsolatokban illetve a barrier funkció fenntartásában betöltött szerepét, a MP esetében azonban ilyen ismereteink még nem voltak. A tight junction felépítésében részt vevő zonula occludens 1 (ZO-1) fehérje immunfluoreszcens festésével azt tapasztaltuk, hogy az siMYPT1-transzfektáció hatására a kontrollhoz képest megnövekedett a ZO-1 mennyisége azokon a helyeken, ahol a sejtek érintkeznek egymással, utalva az intenzívebb sejt-kapcsolatokra. Az aktinszálak eloszlásában is változást láttunk, melyek inkább a kortikális régióban akkumulálódtak.

A PP1/ROK inhibitorok és a MYPT1 csendesítés barrier funkcióra kifejtett hatását ECIS készülékkel is tanulmányoztuk. A géncsökkentés esetén a kísérleteket kalcium jelenlétében és hiányában is elvégeztük; a kalcium a HaCaT sejtek differenciáltatására szolgált. Eredményeink alapján már maga a kalcium is megnövelte az impedanciát, utalva arra, hogy a keratinociták differenciációja eredményeképpen erősödnek a sejt-sejt kapcsolatok. A MYPT1 fehérje expressziójának gátlása hatására ugyancsak az elektromos impedancia növekedését tapasztaltuk a kontrollhoz képest. A TM kezelés hatására az elektromos ellenállás nem változott szignifikánsan, ellenben a H1152 csökkentette azt. Eredményeink alapján a ROK aktivitása erősíti, míg a MP-é gyengíti a keratinocita sejtek közötti kapcsolatot.

### **A MYPT1 csendesítés hatására megnő a transzglutamináz-1 (TG1) expressziója**

Western blot analízissel kimutattuk, hogy a MYPT1 fehérje expresszió gátlása esetén megnő a transzglutamináz-1 (TG1) fehérje mennyisége mind a humán keratinocita sejtekben, mind az *ex vivo* humán bőrszövetben. A MYPT1 és a TG1 epidermális szöveti eloszlását normál bőr és seb immunhisztokémiai vizsgálatával elemeztük. A normál bőrben a MYPT1 inkább az epidermisz mélyebb rétegeiben található meg, míg a TG1 elsősorban a *stratum granulosumban* és *stratum spinosumban*. 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. A fentebbi sejtrétegekben (*stratum granulosum*) a MYPT1 expressziója lecsökken, a TG1-é pedig megemelkedik. A TG1 itt hozzájárul a keratinociták differenciációjához és a bőr elszarusodásához.

### **A MP az Akt jelátviteli útvonalon keresztül gyorsítja a sebzáródást**

A non-target siRNS-sel, illetve az siMYPT1 RNS-sel transzfektált *ex vivo* humán bőrszövetek lizátumait humán foszfo-MAPK array-vel vizsgáltuk, és azt tapasztaltuk, hogy az Akt jelátviteli útvonal több elemének – Akt1, GSK-3 $\beta$ , p70 S6 kináz – foszforilációja csökkent a MYPT1 génextpresszió gátlása hatására. *Charette és McCance* kutatásai alapján a keratinocitákban az aktív Akt downregulálja a RhoA aktivitását, és a ROK gátlásán keresztül serkenti a migrációt, míg *Esposito és munkatársai* homobrasszinolid növényi hormonnal sikeresen stimulálták a PI3K – Akt jelátviteli útvonalat és gyorsította fel az egérsebek gyógyulását. Mivel kísérleteinkben a MP gátlása az Akt1 defoszforilációját eredményezte, úgy gondoljuk, hogy a MP nem közvetlenül az Akt-on fejt ki hatását, hanem valamelyik – jelenleg még meg nem határozott – upstream effektorán. Feltételezésünk szerint a MP közvetett módon

aktiválja az Akt-ot, és a jelátviteli pálya upregulációja révén kiváltja a keratinociták proliferációját és migrációját.

Az *ex vivo* bőrszövetben a MYPT1 expresszió gátlása következtében jelentősen megnövekedett a kis hősokk protein 27 (Hsp27) foszforilációja. Mivel korábbi kutatások szerint a Hsp27 expressziója és foszforilációja szükséges a keratinociták differenciációjához és a megfelelően rétegzett epidermisz kialakulásához, lehetséges, hogy a felsőbb rétegekben a downregulálódó MP-zal párhuzamosan aktiválódó Hsp27 segíti elő a differenciációt.

### **A ROK foszforilálja, míg a MP defoszforilálja a SNAP-25-t *in vitro* és *in vivo***

B50 neuroblasztóma sejtizátumból immunprecipitációs (IP) kísérletet végezve bizonyítottuk a SNAP-25 és a MYPT1 ko-precipitációját, továbbá a SNAP-25 és a MYPT1 immunfluoreszcens festésével kimutattuk a két fehérje kolokalizációját a B50 sejtek citoplazmájában és a neuronális nyúlványokban. Tisztított Flag-SNAP-25 szubsztráttal és ROK enzimmal végzett *in vitro* kináz esszével és tömegspektrometriás (LC-MS/MS) elemzéssel megállapítottuk, hogy a ROK a Thr138 aminosav oldalláncon foszforilálja a SNAP-25-t. Egy másik kísérletben a Flag-SNAP-25 fehérjét anti-Flag agarózhoz kötöttük ki, és előbb a ROK-kal, majd mosás után a MP alegységeivel együtt inkubáltuk. A Thr138 foszforilációra specifikus antitesttel Western blot vizsgálattal igazoltuk, hogy a ROK által foszforilált fehérjét a MP valóban defoszforilálta.

B50 neuroblasztóma sejteket a PP1 szelektív inhibitorral, tautomycetinnel (TMC), illetve a ROK specifikus gátlószerelemmel, H1152-vel kezeltünk, majd Western blottal vizsgáltuk a kezelések hatását a SNAP-25 Thr138 aminosav oldalláncon foszforilációjára. A ROK H1152 általi gátlásával a foszforiláció a kontroll értékhez képest 57,0%-kal csökkent, míg a PP1 enzimek TMC általi blokkolásával a SNAP-25 foszforiláció 46,9%-kal nőtt. A kezeléseket egér agyszeleteken is elvégeztük, és hasonló eredményeket kaptunk. Az is kiderült, hogy maga a KCl depolarizáció is együtt jár a SNAP-25 Thr138 foszforilációs szint csökkenésével.

### **A MP fokozza a szinaptoszómák neurotranszmitter-kibocsátását**

Fagyasztásos-felolvasztásos módszerrel Flag-KEPI fehérjét, a MP specifikus gátló fehérjéjét juttattunk át a szinaptoszóma membránra. Western blottal bizonyítottuk a Flag-KEPI sikeres bejuttatását és a szinaptoszómában lévő endogén kinázok általi foszforilációját. A MP a neurotranszmitter-kibocsátására kifejtett hatásának a PP1 enzimsalád egyéb tagjaitól való elkülönítésére a foszforilált KEPI specifikus MP gátló hatását alkalmaztuk. Exocitózis esszével mért eredményeink alapján a Flag-KEPI fehérje jelenléte már 30 másodperccel a KCl-dal kiváltott depolarizáció után szignifikánsan csökkentette a neurotranszmitter-kibocsátást a kontrollhoz képest. Western blottal kimutattuk, hogy a Flag-KEPI transzdukció hatására a

SNAP-25 Thr138 foszforiláció megemelkedett a kontrollhoz képest. Eredményeink alapján a MP elősegíti az ingerületátvivő anyagok idegsejtekből történő felszabadulását a SNAP-25 fehérje Thr-138 oldalláncának defoszforilációja által.

## ÖSSZEFOGLALÁS

A miozin foszfatáz (MP) holoenzim a Ser/Thr-specifikus protein foszfatáz 1 (PP1) enzimesalád tagja, mely egy protein foszfatáz 1 katalitikus alegységből (PP1c $\delta$ ), a miozinhoz is kötődő szabályozó alegységből (MYPT1), illetve egy ismeretlen funkciójú alegységből (M20) épül fel. Nevét elsőként azonosított szubsztrátja, a 20 kDa miozin könnyű lánc (MLC20) után kapta, melynek defoszforilációját katalizálva a simaizom relaxációját segíti elő. További kutatások során leírták, hogy a MP nemcsak izomsejtekben található meg, hanem a szervezet megannyi sejtípusában, szerepe pedig rendkívül változatos: részt vesz többek között a sejtciklus, a génexpresszió és a neurotranszmitter-kibocsátás szabályozásában is. Aktivitásának szabályozását többek között a RhoA-aktivált protein kináz (ROK) végzi, mely a MYPT1 alegységet foszforilálva gátolja az enzim működését. Emellett a MP-nak és a ROK-nak számos közös szubsztrátja van az élő szervezetben.

Vizsgálataim során a MP és a ROK sebzáródásban, illetve a neurotranszmitter-kibocsátásban játszott szerepét tanulmányoztam. Az egerek hátbőrén ejtett sebek gyógyulását a PP1 specifikus inhibitora, a tautomycin (TM) látványosan megakadályozta. Humán keratinocita (HaCaT) sejtek migrációját karcolási esszével tanulmányozva azt tapasztaltuk, hogy a TM, valamint a MYPT1 expresszió gátlása szignifikánsan lassította, míg a ROK inhibitora, a H1152 gyorsította a seb bezáródását. A MYPT1 csendesítése hatással a volt a sejt-sejt adhézióra, és növelte az impedanciát. Mind HaCaT sejtekben, mind *ex vivo* bőrszövetben a MYPT1-csendesítés fokozta a transzgultamináz-1 (TG1) expressziót. Eredményeink alapján a MP a bőr alsó rétegeiben serkenti a keratinociták proliferációját és migrációját, a TG1 expresszió downregulációjával pedig akadályozza azok differenciációját. Hatásait az Akt jelátviteli útvonalon és a hsp27 fehérje szabályozásán keresztül fejti ki.

Tömegspektrometriás elemzéssel és *in vitro* foszforilációs/defoszforilációs esszével bizonyítottuk, hogy a SNAP-25, a vezikulumok exocitózisát szabályozó SNARE-komplex egyik tagja, szubsztrátja a ROK/MP enzimpárnak, mely hatását a Thr138 aminosavoldalláncon fejti ki. Kortikális szinaptoszómába MP-t gátló KEPI fehérjét juttatva a SNAP-25 foszforiláció növekedését és az exocitózis mértékének csökkenését tapasztaltuk. Eredményeink alapján a MP a SNAP-25 defoszforilációja által elősegíti a neurotranszmitter-kibocsátást.

A doktori értekezést megalapozó közlemények elkészítéséhez a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal (FK 125043, K108308, EFOP-3.6.2-16-2017-00006, OTKA PD104878, K109249), a TÁMOP 4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0025, a TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0024, a TÁMOP-4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 és a Debreceni Egyetem (RH/751/2015) nyújtott támogatást.



Nyilvántartási szám: DEENK/24/2019.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Horváth Dániel  
Neptun kód: VLX0HJ  
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Horváth, D.**, Sipos, A., Major, E., Kónya, Z., Bátori, R. K., Dedinszki, D., Szöllősi, A. G., Tamás, I., Iván, J., Kiss, A., Erdődi, 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.* 1864 (10), 3268-3280, 2018.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.07.013>  
IF: 5.108 (2017)
2. **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.* 12 (5), 1-23, 2017.  
IF: 2.766





**További közlemények**

3. Kónya, Z., Bécsi, B., Kiss, A., **Horváth, D.**, Hadháziné Raics, M., Kövér, K. E., Lontay, B., Erdődi, F.: Inhibition of protein phosphatase-1 and -2A by ellagitannins: structure-inhibitory potency relationships and influences on cellular systems.  
*J. Enzym. Inhib. Med. Chem. "Accepted by Publisher"*, 3-56, 2019.  
IF: 3.638 (2017)
4. Sipos, A., Iván, J., Bécsi, B., Darula, Z., Tamás, I., **Horváth, D.**, Medzihradzky-Fölkl, K., 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. 7* (40590), 1-15, 2017.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/srep40590>  
IF: 4.122
5. Iván, J., Major, E., Sipos, A., Kovács, K., **Horváth, D.**, Tamás, I., Bai, P., Dombrádi, V., Lontay, B.: The Short-Chain Fatty Acid Propionate Inhibits Adipogenic Differentiation of Human Chorion-Derived Mesenchymal Stem Cells Through the Free Fatty Acid Receptor 2.  
*Stem Cells Dev. 26* (23), 1724-1733, 2017.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1089/scd.2017.0035>  
IF: 3.315

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 18,949**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):  
7,874**

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, 2019.02.04.

