

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

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

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	2
Rövidítések	4
Bevezetés	8
1. Irodalmi áttekintés	9
1.1. A protein foszfatázok és a miozin foszfatáz	9
1.1.1. A protein foszfatázok szerepe és csoportosítása	9
1.1.2. A protein foszfatáz-1 (PP1) enzimesalád	11
1.1.3. A miozin foszfatáz (MP) szerkezete	12
1.1.4. A miozin foszfatáz aktivitásának szabályozása	14
1.1.5. A miozin foszfatáz szubsztrátjai és élettani szerepe	17
1.2. A sebgyógyulás folyamata és szabályozása	19
1.2.1. A sebgyógyulás szakaszai	19
1.2.2. A re-epitelizáció és szabályozása	21
1.3. A neurotranszmitter-kibocsátás folyamata és szabályozása	25
1.3.1. A neurotranszmitter-kibocsátás főbb lépései	25
1.3.2. A SNARE komplex felépítése és működése	27
1.3.3. A SNAP-25 szabályozása foszforilációval és defoszforilációval	29
2. Célkitűzések	34
3. Anyagok és módszerek	35
3.1. Anyagok	35
3.2. Antitestek	35
3.3. A sebgyógyulás tanulmányozása egérbőrön	36
3.4. Trikróm festés és immunhisztokémia	37
3.5. Sejttenyésztés, a sejtek kezelése és lizálása	37
3.6. Géncsendesítés keratinocita sejtekben és <i>ex vivo</i> humán bőrszövetben	38
3.7. MTT sejtéletképességi vizsgálat	40
3.8. Kaszpáz esszé	40
3.9. Western blot analízis	41
3.10. Protein foszfatáz aktivitásmérési vizsgálat	41
3.11. Karcolási (scratch) vizsgálat	42
3.12. SRB proliferációs vizsgálat	43
3.13. JuLI™ valós idejű (real-time) sejtvizsgáló készülék	43
3.14. Electric cell-substrate impedance sensing (ECIS)	43

3.15.	Immunfluoreszcencia.....	44
3.16.	Immunprecipitáció	45
3.17.	Fehérje termeltetés és tisztítás.....	46
3.18.	<i>In vitro</i> protein kináz esszé	47
3.19.	Protein foszforilációs és defoszforilációs vizsgálat.....	47
3.20.	Tömegspektrometria	48
3.21.	Szinaptoszóma preparálás.....	48
3.22.	Flag-peptid és Flag-KEPI fehérje bejuttatása a szinaptoszómákba.....	49
3.23.	Exocitózis esszé	49
3.24.	Agyszeletek preparálása és kezelése.....	50
3.25.	Statisztikai analízis	51
4.	Eredmények.....	52
4.1.	A miozin foszfatáz szerepe a sebzáródásban.....	52
4.1.1.	A PP1 és a ROK gátlásának hatása az egérbőr sebek gyógyulására	52
4.1.2.	A PP1 és a ROK gátlásának hatása a keratinociták életképességére és foszfatáz aktivitására.....	53
4.1.3.	A PP1 gátlása lassítja a HaCaT sejtek migrációját és proliferációját	56
4.1.4.	A MYPT1 csendesítése gátolja a HaCaT monolayer záródását	60
4.1.5.	A MP működése zavart okoz a HaCaT sejtek barrier funkciójában	63
4.1.6.	A MYPT1 csendesítés hatására megnő a transzglutamináz-1 (TG1) expressziója	65
4.1.7.	A MP az Akt jelátviteli útvonalon keresztül gyorsítja a sebzáródást.....	68
4.2.	A miozin foszfatáz szerepe a neurotranszmitter-kibocsátásban	70
4.2.1.	A SNAP-25 és a MYPT1 fehérje-fehérje kölcsönhatást alakítanak ki	70
4.2.2.	A ROK <i>in vitro</i> foszforilálja, míg a MP defoszforilálja a SNAP-25 fehérjét	71
4.2.3.	A ROK és a MP gátlása módosítja a SNAP-25 foszforilációt B50 sejtekben	73
4.2.4.	A MP fokozza a szinaptoszómák neurotranszmitter-kibocsátását a SNAP-25 defoszforilációja által	75
4.2.5.	A MP és a ROK szabályozzák a SNAP-25 foszforilációját egér agyszeletekben....	77
5.	Megbeszélés	79
	Összefoglalás	92
	Summary	93
	Tárgyszavak (Keywords).....	94
	Irodalomjegyzék	95
	Köszönetnyilvánítás	109
	Függelék	111

Rövidítések

aCSF	mesterséges cerebrospinális folyadék
Akt	protein kináz B
ATP	adenozin-trifoszfát
BCA	bikinkoniniksav
BSA	marhaszérum-albumin
cGKIα	cGMP-dependens protein kináz I α
CPI-17	17 kDa molekulatömegű protein kináz C által aktivált inhibitor
CHAPS	3-[(3-kolamido-propil)-dimetil-ammónio]-1-propánszulfonát
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DARPP-32	dopamin és cAMP-regulált foszfoprotein, $M_r = 32000$
DMEM	Dulbecco által módosított Eagle médium
DTT	ditiotritol
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
ECIS	electric cell-substrate sensing
EGF	epidermális növekedési faktor
eNOS	endotéliális nitrogén-oxid szintetáz
ERM	ezrin, radixin, moezin
FBS	magzati borjú szérum
FM 2-10	N-(3-trietil-ammónium-propil)-4-(4-(diethyl-amino)-sztilil)-piridinium dibromid
GAPDH	gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz
GBPI	gasztrointesztinális- és agyspecifikus PP1 inhibitor
GSK3	glikogén szintáz kináz-3
H1152	(S)-(+)-2-metil-1-[(4-metil-5-izokinolinil)-szulfonil]-homopiperazin·2HCl

HB-EGF	heparint kötő epidermális növekedési faktor-szerű növekedési faktor
HDAC7	hiszton deacetiláz 7
HEPES	4-(2-hidroxietyl)-piperazin-1-etánszulfonsav
I-1	inhibitor-1
I-2	inhibitor-2
IgG	immunglobulin G
IP	immunprecipitáció
KEPI	kináz által aktivált protein foszfatáz-1 inhibitor
MAPK	mitogén-aktivált protein kináz
MC-LR	mikrocisztin-LR
MLC20	20 kDa molekulatömegű miozin könnyű lánc
MSB85	85 kDa molekulatömegű miozinkötő alegység
MOPS	3-(N-morfolino) propánszulfonsav
MP	miozin foszfatáz
M-RIP	miozin foszfatáz-Rho kölcsönható fehérje
mTOR	emlős rapamicin-célpont
MTT	metil-tiazol-tetrazólium
MYPT1	miozin foszfatáz szabályozó alegység
NHEK	normál humán epidermális keratinocita
NIPP-1	PP1 sejtmagi inhibitor
NP-40	4-nonil-fenil-polietilén glikol
NSF	N-etilmaleimid szenzitív faktor
OA	okadánsav
PAGE	poliakrilamid gélelektroforézis

PAS	protein A-Sepharose
PBS	foszfát pufferes sóoldat
PEI	polietilénimin
PHI-1	PP1 holoenzim inhibitor-1
PHI-2	PP1 holoenzim inhibitor-2
PHIN	PP1 holoenzim inhibitor domén
PI3K	foszfatidilinozitol 3-kináz
PKA	protein kináz A
PKC	protein kináz C
PLK1	polo-szerű kináz 1
PMA	forbol-12-mirisztát-13-acetát
PMSF	fenil-metil-szulfonil fluorid
PP1	protein foszfatáz-1
PP1cδ	protein foszfatáz-1 katalitikus alegység delta izoformája
PPP	foszfoprotein foszfatáz
pRB	retinoblasztóma fehérje
PRMT5	protein arginin metiltranszferáz 5
RIPP-1	PP1 ribosomális inhibitor
ROK	RhoA-aktivált protein kináz
SDS	nátrium-dodecil-szulfát
Ser	szerin
SNAP	szolubilis NSF-asszociált protein
SNAP-25	25 kDa molekulatömegű szinaptoszóma-asszociált protein
SNARE	szolubilis NSF-asszociált protein receptor (SNAP REceptor)

SPR	felületi plazmon rezonancia
SRB	szulforodamin B
TGFβ	transzformáló növekedési faktor béta
TBS	Tris puffer
TBST	0,1% (V/V) Tween-20-at tartalmazó Tris puffer
TCA	triklórecetsav
TG1	transzglutamináz-1
Thr	treonin
TIMAP	TGF β által gátolt membránasszociált fehérje
TM	tautomycin
TMC	tautomycetin
Tyr	tirozin
ZIPK	leucin cipzár motívummal kölcsönható protein kináz

Bevezetés

Az élettani folyamatok szabályozásának egyik legfontosabb módja a fehérjék reverzibilis foszforilációja és defoszforilációja. Eme poszttranszlációs módosítás révén változás jöhet létre a fehérje térszerkezetében és aktivitásában is, ezáltal pedig módosul az adott fehérjét tartalmazó jelátviteli pálya aktivitása és az útvonal által szabályozott élettani folyamat. A fehérjék foszforilációját a protein kinázok, míg defoszforilációját a protein foszfatázok katalizálják. Ezek a protein kinázok és foszfatázok, attól függően, hogy milyen aminosav oldalláncon fejtik ki hatásukat, lehetnek szerin/treonin-, tirozin-, vagy kettős specificitásúak.

A miozin foszfatáz (MP) holoenzim a szerin/treonin-specifikus protein foszfatáz-1 (PP1) enzimesalád tagja. Az enzim trimer szerkezetű: a defoszforilációt katalizáló PP1 δ katalitikus alegységből, egy 130/133 kDa molekulatömegű, a miozin könnyű lánchoz is kötődő szabályozó alegységből (MYPT1) és egy ismeretlen funkciójú 20 kDa molekulatömegű alegységből épül fel. A miozin foszfatáz elsőként azonosított szubsztrátja a 20 kDa molekulatömegű miozin könnyű lánc (MLC20), amelynek defoszforilációja által a MP a simaizom kontraktilis állapotát szabályozza. A MP egyéb citoskeletális szubsztrátjait is azonosították, így az ERM fehérjéket (ezrin, radixin, moezin), és a Tau, MAP2 szubsztrátokat is. A miozin foszfatáz által defoszforilált szubsztrátok foszforilációjáért az esetek többségében a RhoA-aktivált kináz (ROK) a felelős. Emellett magát a MYPT1 szabályozó alegységet is a ROK egyik szubsztrátjaként írták le, és a ROK által katalizált MYPT1 Thr696 foszforiláció a MP holoenzim gátlását eredményezte.

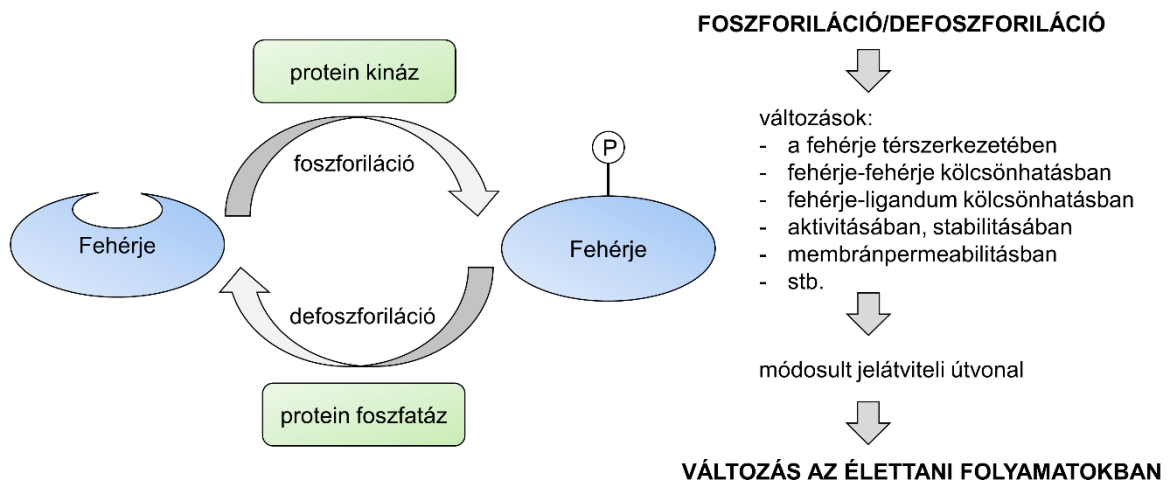
Az új évezredben született kutatási eredmények jelentősen kiszélesítették a MP-zal kapcsolatos ismereteinket. Fény derült arra, hogy az enzim messze nemcsak a simaizomban expresszálódik, hanem a szervezet megannyi szövetében is megtalálható és változatos szubcelluláris lokalizációt mutat, és ezzel társulva széleskörű sejtélettani folyamatokat katalizál. Részt vesz a sejtciklus és a proliferáció szabályozásában a retinoblasztóma fehérje és a merlin defoszforilációja által; a sejtmagban a protein arginin metiltransferáz 5 (PRMT5) defoszforilációjával génexpresszió szabályozását befolyásolja. Az idegélettani folyamatokban is szerepe lehet a szintaxin és a szinapszin defoszforilációjával a neurotranszmissziót regulálva. Disszertációmban a MP és a ROK sebgyógyulásban és a neurotranszmitter-kibocsátásban játszott szerepét ismertetem az enzimpár új szubsztrátjainak és az azokhoz kötött molekuláris mechanizmusoknak a leírásával.

1. Irodalmi áttekintés

1.1. A protein foszfatázok és a miozin foszfatáz

1.1.1. A protein foszfatázok szerepe és csoportosítása

Az élő szervezetekben előforduló fehérjék közül számos rendelkezik kovalensen kötött foszfátcsoporttal. A fehérjék foszforilációját a protein kinázok katalizálják, miközben foszfátdonorként ATP-t használnak fel. A folyamat reverzibilitását a protein foszfatázok biztosítják, melyek hidrolizálják a fehérjékről ezeket a foszfátcsoportokat. A foszforiláció különféle fizikai-kémiai módosulásokat indukál, amely a fehérje-fehérje vagy a fehérje-ligandum kölcsönhatás erősségének, a fehérje vízdékonysági sajátságainak, membránpermeabilitásának, illetve a fehérje stabilitásának és aktiválásának változásaiban nyilvánulhat meg. Ezen jelenségek az egyes jelátviteli útvonalak aktiválódásához vagy deaktiválódásához is vezethetnek. A fehérje foszforiláció-defoszforiláció révén tehát a legkülönbélebb élettani folyamatok válnak szabályozhatóvá, a sejtsztódástól kezdve az izom-összehúzódon át a neurotranszmitter-kibocsátásig (*Sheppeck et al., 1997*).



1. ábra: Élettani folyamatok szabályozása a fehérjék foszforilációja és defoszforilációja által.

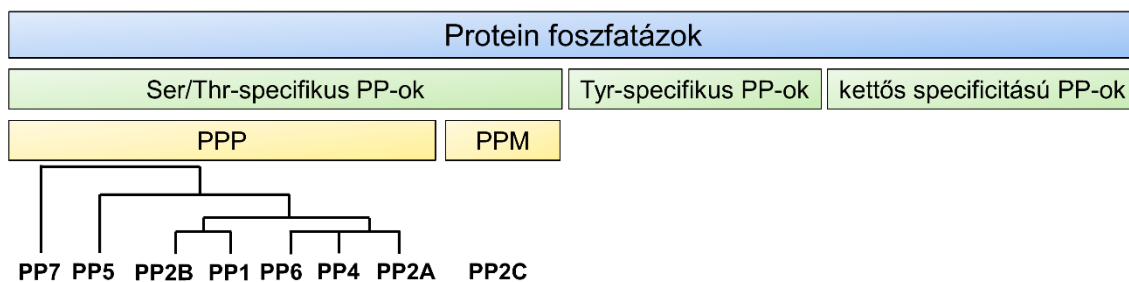
A fehérje foszforilációs állapotát protein kinázok és foszfatázok aktivitásának egymáshoz viszonyított relatív aránya határozza meg (*Cohen et al., 1990*). Kezdetben a protein kinázokra irányult nagyobb figyelem, mivel úgy gondolták, hogy a fehérje foszforiláció-defoszforiláció szabályozása elsősorban a kinázok aktivitásának másodlagos hírvivők általi regulációjával valósul meg, míg a foszfatázok inkább csak passzív szereplői a regulációs

folyamatoknak. Azonban idővel ez a koncepció tarthatatlanná vált, mivel számos olyan mechanizmusra derült fény, melyek befolyásolják a protein foszfatáz aktivitást az élő szervezetben. Ma már általánosan elfogadott, hogy a protein foszfatázok ugyanolyan fontos szereppel bírnak az élettani folyamatok szabályozásában, mint a kinázok (*Oliver – Shenolikar, 1998*).

Az eukarióta sejtekben fellelhető, kovalensen fehérjékhez kapcsolódó foszfátcsoportok több, mint 99%-a szerin (Ser) vagy treonin (Thr) aminosav oldalláncon található (*Mansuy – Shenolikar, 2006*). Aszerint, hogy mely oldallánccokat képesek defoszforilálni, megkülönböztethetünk szerin/treonin (Ser/Thr) specifikus, tirozin (Tyr) specifikus, illetve kettős specifitású protein foszfatázokat (lásd 2. ábra), utóbbiak mindhárom aminosavról képesek eltávolítani a foszfátcsoportot (*Wera – Hemmings, 1995*). 1988-ig enzimológiai és fehérjekémiai módszerekkel az eukarióta Ser/Thr protein foszfatázok négy főbb típusát azonosították és különítették el. Ezek a protein foszfatáz-1 (PP1), illetve a protein foszfatáz-2A, 2B és 2C enzimsaládok. Az 1-es és 2-es típusú foszfatázokat az alapján különböztették meg egymástól, hogy a foszforiláz kináz enzim melyik alegységét defoszforilálják, illetve hogy mennyire érzékenyek az inhibitor-1 (I-1) és inhibitor-2 (I-2) fehérjékre. Míg a 2-es típusú protein foszfatázok (PP2A, PP2B, PP2C) a foszforiláz kináz α alegységet defoszforilálják, addig a PP1 annak β alegységét. Továbbá míg az I-1 és I-2 hőstabil inhibitorok gátolják a PP1 aktivitását, addig a 2-es típusú protein foszfatázokra nem fejtenek ki gátló hatást (*Cohen et al., 1990*). A 2-es típusú foszfatázokat további három alcsoportba sorolták aszerint, hogy milyen divalens kationt igényelnek az aktivitásukhoz: míg a PP2A nem igényel kationt, addig PP2B – vagy más néven kalcineurin – Ca^{2+} /kalmódulin-függő enzim, a PP2C aktivitásához pedig Mg^{2+} -ion szükséges (*Ingebritsen – Cohen, 1983*). A PP2 típusok az okadánsavval szemben mutatott érzékenységük alapján is elhatárolhatóak (*Bialojan – Takai, 1988, Cohen et al., 1989*). Mindmáig ezt a klasszikus felosztást és nevezéktant használjuk, noha szekvencia-analízis révén nagyon korán fény derült arra, hogy a PP2A és a PP2B filogenetikailag sokkal közelebb állnak a PP1-hez, mint a PP2C enzimekhez (*Cohen et al., 1990*).

Később további Ser/Thr specifikus protein foszfatáz enzimsaládokat fedeztek fel, melyek nem illeszthetők bele a fenti kategóriákba, és vagy az előbb ismertetett foszfatázok egyikéhez hasonlítanak, vagy két csoport közötti „intermedier” állapotot reprezentálnak (*Wera – Hemmings, 1995*). A legelső ilyen új protein foszfatáz katalitikus alegységet 1988-ban publikáltak, miután a fehérjét kódoló cDNS-t nyúl májból izolálták. Az új protein foszfatáz, mely a PPX elnevezést kapta, és később a nomenklatúrába mint PP4 került be, 45%-ban hasonló a PP1-hez és 65%-ban a PP2A-hoz, tehát filogenetikailag az utóbbihoz áll közelebb (*da Cruz e*

Silva et al., 1988). A későbbiekben a PP5 (*Becker et al.*, 1994), a PP6 (*Cohen et al.*, 1990) és a PP7 (*Andreeva et al.*, 1998) enzimsaládokat is azonosították és jellemezték (*Wera – Hemmings*, 1995). A Ser/Thr specifikus protein foszfatázokat filogenetikai szempontból két nagy csoportba sorolhatjuk, melyek két különböző géncsalád termékei. A fémion-függő foszfatázok (PPM) családjába a PP2C és a hozzá hasonló enzimek tartoznak, míg a foszfoprotein foszfatázok (PPP) közé a PP1, PP2A, PP2B, illetve a később felfedezett velük rokon foszfatázok (*Andreeva – Kutuzov*, 1999).



2. ábra: *A protein foszfatázok csoportosítása, és a PPP-k filogenetikai leszármazása. Módosított ábra Shi, 2009. alapján.*

Az emlős sejtekben a szerin/treonin-specifikus protein foszfatáz aktivitás több, mint 90%-áért a PP1 és a PP2A enzimek a felelősek, így élettani szempontból ez a két foszfatáz típus tűnik a legfontosabbnak. (*Oliver – Shenolikar*, 1998). A következőkben a PP1 enzimsaládot mutatom be részletesebben, mivel a disszertációm tárgyát képező miozin foszfatáz is ebbe a családba tartozik.

1.1.2. A protein foszfatáz-1 (PP1) enzimsalád

A PP1 katalitikus alegységének (PP1c) több izoformája is létezik, az emlősökben ezeket mai tudásunk szerint három különböző gén kódolja (*PP1A*, *PP1B*, *PP1C*). Itt jegyezném meg, hogy a szakirodalomban többfajta nomenklatúrával is lehet találkozni, az enzimsalád jelölésére a foszfoprotein foszfatáz-1 (PPP1) megnevezés is használatos, a fenti génekre pedig *PPP1CA*, *PPP1CB* és *PPP1CC* néven is hivatkoznak. A géntermékek alternatív splicingja révén további izoformák keletkeznek: a *PP1A* gén által kódolt mRNS-nek három, míg a *PP1B* és a *PP1C* által kódolt transzkriptumnak két splice variánsa ismeretes. A *PP1B* esetében azonban fehérjeszinten nem jelenik meg a különbség, mivel a splicing az 5' nem transzlálódó régióban történik. A PP1 α 1-3, a PP1 β (amit neveznek PP1 δ -nak is) és a PP1 γ 1 fehérjék mindenütt előfordulnak a szervezetben, míg a PP1 γ 2 jellemzően a herében található meg

(Korrodi-Gregório et al., 2014). Az egyes izoformák 35-38 kDa molekulatömegűek, és aminosav szekvenciáik kb. 90%-os hasonlóságot mutatnak. A katalitikus centrum erősen konzervált, a különbségek csak az N- és a C- terminálison mutatkoznak meg (Wakula et al., 2003).

A PP1 enzimek tipikusan heterodimerek formájában működnek, vagyis a katalitikus alegységhez valamilyen regulátor fehérje kapcsolódik, amelyek tovább növelik a működőképes holoenzimek számát. Eddig több mint 200 PP1c-kölcsönható fehérjét (PIP = PP1 interacting protein) azonosítottak. Ezek többféle funkcióval is bírhatnak: különböző szubcelluláris régiókhoz vagy szubsztrátokhoz irányíthatják a holoenzimet, befolyásolhatják a holoenzim szubsztrát-specifitását, gátolhatják a PP1c katalitikus aktivitását, vagy lehetnek ezek a PP1c-hez kapcsolódó fehérjék maguk a PP1c szubsztrátjai is (Chatterjee – Köhn, 2013). Egyes szabályozó alegységek preferenciálisan egy adott PP1c izoformához kötődhetnek, pl. a miozin foszfatáz szabályozó alegység (MYPT1) jellemzően a PP1c β/δ izoformához kapcsolódik, míg a neurabin a PP1c γ -hoz (Korrodi-Gregório et al., 2014). A regulátor fehérjék többségének szekvenciájában kódolnak egy PP1c-kötő motívumot, az (R/K)-(V/I)-X-(F/W) szekvenciát (nevezik egyszerűen csak RVxF motívumnak is, az X a prolint kivéve bármilyen aminosav lehet), melyen keresztül a katalitikus alegység hidrofób árkához kapcsolódnak (Egloff et al., 1997).

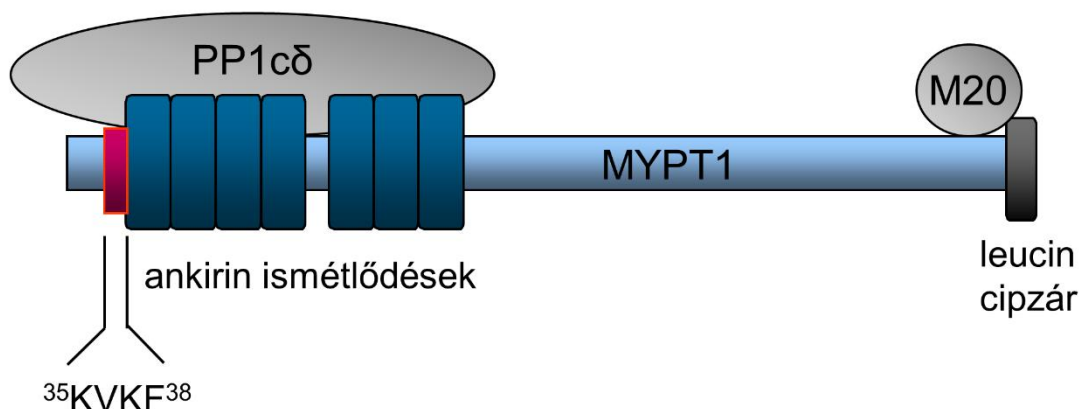
A PP1 rendkívül sokféle funkcióval rendelkezik, köszönhetően annak, hogy mindenütt jelen van a szervezetben, és szubsztrátok széles körét képes defoszforilálni. Szerepet játszik többek között a sejtciklus és az apoptózis, a fehérje szintézis, a glikogén metabolizmus, az izomkontrakció, a citoskeleton újrendeződés, illetve a különféle receptorok és ioncsatornák működésének szabályozásában (Ceulemans – Bollen, 2004).

1.1.3. A miozin foszfatáz (MP) szerkezete

A miozin foszfatáz (MP) – vagy más néven miozin könnyű lánc foszfatáz – a PP1 enzimesaládba tartozó holoenzim, mely trimer állapotban fordul elő, eltérően a tipikusan dimer PP1 holoenzimektől. A PP1 katalitikus alegység β/δ izoformája mellett ugyanis két alegységet is tartalmaz: a 110-130 kDa molekulatömegű miozin foszfatáz targeting alegységet (myosin phosphatase targeting subunit, MYPT1), illetve egy 20 kDa molekulatömegű fehérjét (M20), melynek a funkciója nem tisztázott (Hartshorne et al., 1998). A miozin foszfatázt először Dario Alessi és munkatársai izolálták csirkeizomból az 1990-es évek elején, és úgy jellemezték, mint egy olyan enzimet, mely a miozin könnyű lánc kináz (MLCK) hatását ellentételezve defoszforilálja a 20 kDa miozin könnyű láncot (MLC20), és így a simaizom relaxációját segíti elő (Alessi et al., 1992). Nem sokkal később az emlős miozin foszfatázt is sikerült tisztítani

disznó húgyhólyagból (*Shirazi et al., 1994*). A további kutatások arra irányultak, hogy felderítsék az enzim pontos struktúráját, az élő szervezetben betöltött szerepét és szabályozásának módjait.

A MYPT1 regulátor alegység a MYPT fehérjecsaládba tartozik, melynek további tagjai a MYPT2, a MYPT3, a 85 kDa molekulatömegű miozinkötő alegység (MSB85), illetve a TGF β által gátolt membránasszociált fehérje (TIMAP). Ezek különböző gének termékei. Közös jellemzőjük, hogy N-terminális régiójukban mindegyikük tartalmazza a PP1c-kötő RVxF motívumot, majd ezt egy ankirin-ismétlődésből álló régió követi. A MYPT1, MYPT2 és az MBS85 a C-terminálison leucin cipzárt is hordozhat, mely a dimerizációban és a fehérje-fehérje kölcsönhatások kialakításában játszik szerepet. (*Grassie et al., 2011*). Mivel a miozin foszfatáz felépítésében a MYPT1 vesz részt, ezért ennek a fehérjének a szerkezetét és funkcióját ismertetném részletesebben.



3. ábra: A miozin foszfatáz holoenzim szerkezete. Forrás: *Ito et al., 2004*.

A MYPT1 mintegy 1000 aminosavból álló fehérje, melynek szerkezetét az 3. ábrán láthatjuk. Ahogyan fentebb is említettem, a fehérje N-terminális végén található a PP1c-kötő motívum, mely jelen esetben KVKF aminosav-szekvenciát jelent. Ezt hét ankirin-szerű ismétlődés követi. A MYPT1 izoformái a C-terminálisukban is eltérhetnek, és az 1030 aminosav hosszúságú variáns leucin cipzárat is tartalmazhat (*Ito et al., 2004*). A csirke MYPT1-nek pl. két izoformáját írták le (M130 és M133), a rövidebb variáns esetében az mRNS-ből kivágódik egy 123 nukleotidból álló centrális exonszakasz (*Shimizu et al., 1994*).

A humán MYPT1-et kódoló gén a 12. kromoszóma rövid karján (12q15-21) helyezkedik el (*Takahashi et al., 1997*). A fehérje a legtöbb szövetben expresszálódik, legnagyobb

mennyiségben a simaizombban fordul elő, ahonnan először izolálták. A sejten belül is valamennyi sejt-kompartimentben megtalálható. Lontay és munkatársai a HepG2 hepatoblasztóma sejtek sejt-magi, citoskeletális és mikroszomális-mitokondriális frakciójából is kimutatták, de a citoszolban és a plazmamembránhoz kapcsoltn is jelen volt (Lontay et al., 2005).

A miozin foszfatáz holoenzimben mind a PP1cδ katalitikus alegység, mind a 20 kDa molekulatömegű M20 alegység a MYPT1-hez kapcsolódik, az előbbi annak N-terminálisához, utóbbi pedig annak C-terminálisához. A PP1cδ a bekötődéséhez a MYPT1 KVKF szekvenciáját, illetve ankirin ismétlődéseit veszi igénybe. Felületi plazmon rezonancia (SPR) alapú kutatások bizonyították, hogy a KVKF PP1c-kötő szekvencia jelenléte mindenképpen szükséges ahhoz, hogy ez a fehérje-fehérje kölcsönhatás kialakuljon (Tóth et al., 2000). További MYPT1-régiók – a polipeptidlánc legeleje (1-22), illetve egy centrális régióban lévő mintegy 200 aminosavból álló (304-511) polipeptidszakasz – is kapcsolódnak a PP1cδ alegységhez (Tanaka et al., 1998). A MYPT1 regulátor alegység módosítja a PP1cδ szubsztrát-specifitását és aktivitását. Az összeállt holoenzim mintegy 10-15-ször nagyobb aktivitással defoszforilálja a foszforilált miozint, mint a szabad katalitikus alegység (Johnson et al., 1997). Az M20 alegység szerepére mindmáig nem derült fény, jelenléte nem szükséges a miozin foszfatáz aktivitásához.

1.1.4. A miozin foszfatáz aktivitásának szabályozása

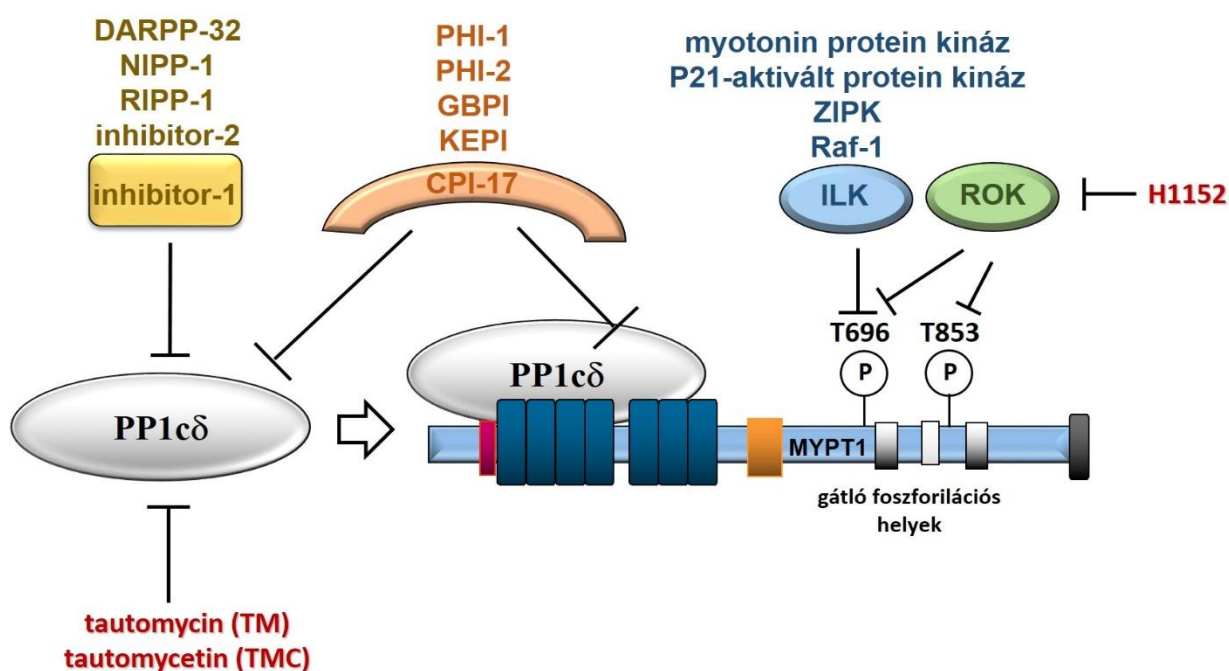
Ha tanulmányozni szeretnénk, hogy egy enzim milyen szerepet tölt be az élő szervezetben, az egyik kézenfekvő lehetőségünk az, ha valamilyen módon gátoljuk az enzim aktivitását, és megfigyeljük, hogy ez a gátlás milyen következményekkel jár. A kieső funkciókból, elváltozásokból következtethetünk az enzim szerepére. Ha az inhibitort *in vivo* kísérletben alkalmazzuk, az is fontos szempont, hogy a vegyület valamilyen módon képes legyen átjutni a sejtmembránon, és ott kifejteni a hatását, ahol az szükséges.

Az elsőként azonosított toxin, melyről utóbb kiderült, hogy potens protein foszfatáz inhibitor, az okadánsav (OA) volt (Tachibana et al., 1981). Akira Takai és munkatársai bizonyították, hogy az OA szelektíven gátolja a PP1 és PP2A katalitikus alegységet, utóbbit nagyobb érzékenységgel ($IC_{50} = 315$ nM a PP1c-re, 1,2 nM a PP2Ac-ra), miközben a PP2B aktivitását csak alig, míg a PP2C-ét egyáltalán nem befolyásolja (Takai et al., 1992). Később további protein foszfatáz inhibitorokat azonosítottak, melyek változatos kémiai szerkezettel rendelkeznek: lehetnek ciklikus peptidok (mikrocisztinek, nodularinok), terpenoidok (kantaridin) vagy poliketidek. Utóbbi csoportba tartozik az okadánsav is, továbbá a kalikulin-A, illetve a tautomycin (TM) és a tautomycetin (TMC) (Sheppeck et al., 1997). Mind a TM-et, mind a TMC-t Xing-Chun Cheng munkacsoportja izolálta *Sterptomyces* baktériumtörzsekből

az 1980-as évek végén (Cheng et al., 1987, Cheng et al., 1989). Ezeknek a foszfatáz inhibitoroknak az a különlegességük, hogy a fentebb említett toxinokkal szemben nagyobb szelektivitással gátolják a PP1c-t, mint a PP2Ac-t (tautomycinre $K_i = 0,16$ nM, illetve 0,4 nM) (MacKintosh – Klumpp, 1990). Ezért a későbbiekben szelektív PP1 gátlószerekként kezdték el használni őket a tudományos kutatásban. MCF-7 sejteket 1-10 μ M TM-mel kezelve azt tapasztalták, hogy a PP1 aktivitás szignifikáns és koncentrációfüggő csökkenése mellett a PP2A aktivitása alig változott (Favre et al., 1997). 5 μ M TMC-t szinaptoszóma preparátumhoz adva a toxin szelektíven gátolta a PP1 enzimeket (Lontay et al., 2012). Munkánk során mi is a TM-et és a TMC-t használtuk a PP1 szelektív gátlására. *In vitro* kísérletekben mikrocisztin-LR-t (MC-LR) adtunk a fehérje extraktumhoz, hogy így gátoljuk irreverzibilisen a protein foszfatázok széles körét. Ez a toxin ciklikus peptidek közé tartozik és 1 μ M koncentrációban alkalmazva nemcsak a PP1 és a PP2A enzimeket gátolja, hanem a PP4 és a PP5 enzimeket is (Sheppeck et al., 1997).

Nemcsak toxinok alkalmasak arra, hogy a protein foszfatázok működését gátoljuk. Az élő szervezetek maguk is termelnek olyan fehérjéket, melyek a PP katalitikus alegységekhez kapcsolódva gátolják azok aktivitását. Az inhibitor-1 (I-1) és inhibitor-2 (I-2) hőstabil fehérjék potens és specifikus PP1c inhibitorok ($K_i = 1,6$ nM, illetve 3,1 nM) (Cohen et al., 1990, Oliver – Shenolikar, 1998). További PP1c inhibitor fehérjék a dopamin és cAMP-regulált foszfoprotein, $M_r = 32000$ (DARPP-32), a PP1 sejtmagi inhibitor (NIPP-1) és a PP1 riboszomális inhibitor (RIPP-1). Az I-1 és a DARPP-32 homológ fehérjék, azonban míg az I-1 a szervezet megannyi szövetében expresszálódik, addig a DARPP-32 elsősorban az agyban található meg. Mindkét fehérje PKA általi foszforiláció következtében válik potens PP1 inhibitorrá, és azok a hormonok, neurotranszmitterek aktiválják őket, melyek megemelik az intracelluláris cAMP koncentrációját. Az I-2 és a NIPP-1 – ellentétben az előbb tárgyalt két fehérjével – foszforilálatlan formában aktívak, stabil és inaktív komplexeket képeznek a PP1 katalitikus alegységgel (Oliver – Shenolikar, 1998). A RIPP-1 a PP1c nem-kompetitív inhibitora, gátló hatása függ a PP1 szubsztrátjától ($K_i = 20-400$ nM) (Beullens et al., 1996).

Az 1990-es évek közepén Masumi Eto és munkatársai sertés aortából egy olyan fehérjét izoláltak, mely nemcsak a szabad PP1 katalitikus alegység aktivitását gátolta effektíven, hanem a miozin foszfatáz holoenzimét is (Eto et al., 1995). Az újonnan felfedezett fehérje a 17 kDa molekulatömegű protein kináz C által aktivált inhibitor (CPI-17) elnevezést kapta, ugyanis a CPI-17 Thr-38-as pozícióban történő PKC általi foszforilációja szükséges ahhoz, hogy potens inhibitorrá váljék: a PP1c-t foszforilálatlan állapotban $IC_{50} = 1,3$ μ M, míg foszforiláltan $IC_{50} = 0,18$ nM koncentrációban gátolja (Eto et al., 1997).



4. ábra: A miozin foszfatáz szabályozása. A sárgával jelölt fehérjék (I-1, I-2, DARPP-32, NIPP-1, RIPP-1) potens és specifikus PP1 inhibitorok. A CPI-17 és homológjai a szabad PP1 katalitikus alegységet és a MP holoenzimet is effektíven gátolják. A ROK, illetve a kék színnel jelölt kinázok a MYPT1 gátló foszforilációja révén deaktiválják a MP-t. Az ábrán piros színnel tüntettem fel a munkám során használt toxin inhibitorokat: a TM és a TMC szelektív PP1 inhibitorok, míg a H1152 a ROK specifikus gátlószere.

Később további CPI-17-szerű fehérjéket is felfedeztek, melyek szerkezetükben és funkciójukban hasonlóak. Mindegyikük hordoz egy centrális PP1 holoenzim inhibitor domént (PHIN domén), illetve tartalmaznak egy aktiváló foszforilációs helyet. Ezen fehérjék közé tartozik a PP1 holoenzim inhibitor-1 és -2 (PHI-1 és a PHI-2), a kináz által aktivált PP1 inhibitor (KEPI) és a gastrointesztinális- és agyspecifikus PP1 inhibitor (GBPI) (Eto, 2009). Ezek közül mi a KEPI-t használtuk a miozin foszfatáz gátlására, melyet Qing-Rong Liu és társai írtak le először (Liu et al., 2002). Kísérletünkben a fehérjét fagyasztásos-felolvasztásos módszerrel juttattuk be a szinaptoszómákba, ahol engodén kinázok (véltetően a PKC) foszforilálták is a Thr-73 oldalláncon. Ez az a foszforilációs hely, melyen foszforilálódva potens MP inhibitorrá válik ($IC_{50} = 8 \text{ nM}$) (Erdődi et al., 2003).

A miozin foszfatáz aktivitása a MYPT1 alegység foszforilációja útján is szabályozódik. A RhoA-aktivált kináz (ROK) a humán MYPT1-et a Thr696 és a Thr853 pozícióban foszforilálja, mely a MP holoenzim gátlását eredményezi (Kimura et al., 1996). A MYPT1

Thr696 gátló foszforilációs helyét a leucin cipzár motívummal kölcsönható protein kináz (ZIPK), az integrinhez kapcsolt kináz (ILK), a myotonin protein kináz, a Raf-1 és a p21-aktivált protein kináz is foszforilálhatja (Kiss et al., 2019). A protein kináz A-val (PKA) és a protein kináz G-vel (PKG) eredményesen foszforilálták a MYPT1-et *in vitro* a Ser692, Ser695 és Ser852 aminosav-oldalláncokon. Azt találták, hogy a MYPT1 PKA és PKG általi foszforilációja nincs közvetlen hatással a MP aktivitására, azonban a Ser695 foszforiláció gátolja a Thr696 későbbi foszforilációját, ezáltal megvédi a MP-t a deaktiválódástól (Wooldridge et al., 2004).

1.1.5. A miozin foszfatáz szubsztrátjai és élettani szerepe

A MYPT1-hez a MP másik két alegységén kívül számos további fehérje kapcsolódhat. Az egyik ilyen fehérje a holoenzim elsőként beazonosított szubsztrátja, a miozin könnyű lánc (MLC20), mely foszforilált formájában a MYPT1 ankirin ismétlődéseivel kapcsolódik. A MYPT1 ilyen módon egy közös platformot biztosít a foszfo-MLC20 és a PP1c δ találkozásához (Hirano et al., 1997). A MYPT1 C-terminális végéhez bekötődhetnek savas foszfolipidek, a GTP-RhoA és a cGMP-dependens protein kináz I α (cGKI α) is (Ito et al., 2004). További kölcsönható partnerek a miozin foszfatáz-Rho kölcsönható fehérje (M-RIP), a 14-3-3 β és az interleukin-16 prekursor. Ezeknek a kölcsönhatásoknak a jelentősége azonban még nem teljesen tisztázott (Grassie et al., 2011). A későbbiekben az MLC20 mellett a miozin foszfatáz számos új szubsztrátját írták le. Ezek a felfedezések új távlatokat nyitottak az enzimrel kapcsolatos kutatásokban, mivel fény derült arra, hogy szerepe jóval változatosabb annál, mint amit kezdetben gondoltak róla. A citoskeletális folyamatokban való részvétele mellett ugyanis a sejtciklus és a sejtproliferáció, az embrionális fejlődés, a génexpresszió, az endotéliális és epitéliális barrier funkció és a neurotranszmitter-kibocsátás szabályozásában is részt vesz (Kiss et al., 2019). A következőkben röviden ismertetem, hogyan befolyásolja ezeket a folyamatokat a MP.

Az ezrin, radixin és moezin (ERM fehérjék), az adducin, a Tau és a MAP2 a citoskeleton újrendeződésben játszanak szerepet, és szubsztrátjai mind a miozin foszfatáznak, mind a RhoA-aktivált kináz (ROK) enzimnek (Matsumura – Hartshorne, 2008). Az ERM család tagjai egymáshoz nagyon hasonló szerkezettel rendelkező fehérjék, melyek feladata a membránfehérjék és a citoskeleton közötti kapcsolatok megteremtése, ilyen módon pedig a sejtadhézióhoz és -migrációhoz való hozzájárulás. A ROK ezeket a fehérjéket a C-terminálisukon található treonin oldalláncon foszforilálja, ezáltal aktiválva őket (Matsui et al., 1998). Korábbi kutatások bizonyították, hogy az ezrin és a moezin N-terminálisukkal kötődnek a MYPT1 C-terminális végéhez, a MP pedig defoszforilálja az előzőleg ROK-kal foszforilált

moezint (Fukata et al., 1998). Az adducin az epitél sejtek sejt-sejt kapcsolatainak helyén akkumulálódik, és elősegíti a spektrin fehérje aktin filamentumokhoz való kötődését. Az adducin ROK általi foszforilációja indukálta az adducin és az aktin filamentumok közötti interakciót *in vitro*, a MP-zal pedig eredményesen defoszforilálták a fehérjét (Kimura et al., 1998). A ROK/MP enzimpár a Tau és a MAP2 fehérjék foszforilációs állapotát is szabályozza. A Tau és a MAP2 mikrotubulus-asszociált fehérjék, melyek szabályozzák a mikrotubulusok szerkezetét és összeépülését. A Tau ROK általi foszforilációja csökkentette a Tau képességét a mikrotubulus-összeszerelődés elősegítésére *in vitro* (Amano et al., 2003).

A MP nemcsak a citoplazmában található meg, a MYPT1 jelenlétét HepG2 sejtek (Lontay et al., 2005) és neuronok (Lontay et al., 2004) sejtmagjában is kimutatták. Később kiderült, hogy a génexpresszióra több módon is hatást gyakorol. Szubsztrátja a hiszton deacetiláz 7 (HDAC7) fehérje, mely foszforiláció hatására kijut a sejtmagból a citoplazmába, ahonnan a MP általi defoszforiláció következtében ismét a sejtmagba transzlokálódik, hogy ott egy transzkripciós komplex részeként szabályozza bizonyos gének átírását (Parra et al., 2007; Compagnucci et al., 2015). Egy egészen friss kutatási eredmény szerint a ROK foszforilálja, míg a MP defoszforilálja a protein arginin metiltransferáz 5 (PRMT5) enzimet a treonin-80 oldalláncon, így szabályozva a hepatokarcinóma sejtek tumorigenezisét. A PRMT5 foszforilált állapotban katalizálja a hiszton fehérjék szimmetrikus dimetilációját, mely a tumorigenezis velejárója. A MYPT1 csendesítése fokozta a hiszton 2A és 4 szimmetrikus dimetilációját a PRMT5-specifikus arginin oldalláncon, és jelentős változásokat indukált a HepG2 sejtek génexpressziós mintázatában, melyek többek között a retinoblasztóma fehérjét (pRB), illetve más tumorszupresszorokat kódoló és a sejtproliferációval, sejthalállal összefüggésben lévő géneket érintették (Sipos et al., 2017).

A sejtciklus szabályozásában részt vevő, tumorszupresszor retinoblasztóma fehérjének ugyancsak kölcsönható partnere a MYPT1, és a MP defoszforilálja is azt a treonin-826 oldalláncon. A THP-1 leukémiás sejtek kalikulin A-val, egy protein foszfatáz inhibitorral történő előkezelése megakadályozta a danurobicin-indukált sejthalált, egyúttal gátolta a MP aktivitását és megnövelte a pRB foszforilációs szintjét (Kiss et al., 2008). Újabb kutatások szerint a MP a szerin-807/811 oldalláncon is defoszforilálhatja a retinoblasztóma fehérjét, ugyanis a MYPT1 overexpressziója 293T sejtekben csökkentette a pRB foszforilációját ezeken a helyeken, továbbá gátolta a pRB által szabályozott E2F transzkripciós faktor aktivitását (Cho et al., 2011). Szintén szubsztrátja a MP-nak a merlin nevű fehérje, mely számos sejtípus proliferációját szabályozza. A merlin a MYPT1 C-terminális végén található leucin cipzár doménhez kapcsolódik, és a MP általi defoszforilációja aktiválja a sejtproliferációt gátló és

tumorszupresszor hatását. Azt is kimutatták, hogy a MP gátló fehérjéje, a CPI-17 upregulálódik a rákos sejtekben, így a merlin tumorszupresszor funkciója kiesik (Jin et al., 2006). A MP a mitózis szabályozásában is részt vesz azáltal, hogy defoszforilálja és inaktíválja a polo-szerű kináz 1-t (polo-like kinase 1, PLK1). A PLK1 a mitózis több elemét (G2/M átmenet, mitotikus orsó összeszerelődés, testvérkromatidák szétválása) szabályozó Ser/Thr-kináz (Yamashiro et al., 2008). A MYPT1 hiányában a sejtek hamarabb belépnek az M fázisba (Chiyoda et al., 2012).

A MP az erek tónusát is szabályozza az endotéliális nitrogén-oxid szintetáz (eNOS) defoszforilációja révén. Az eNOS az L-arginin nitrogén-monoxiddá (NO) történő átalakulását katalizálja, amennyiben a Thr-497 aminosav oldallánca defoszforilált állapotban van. Az eNOS a MYPT1-en keresztül kapcsolódik a MP holoenzimhez, amely a fehérjét defoszforilálva aktiválja az enzimet, az NO-termelést és a vazodilatációt (Bátori et al., 2017). A miozin foszfátáz az idegsejtekben is megtalálható, ahol egyes neuronális fehérjék foszforilációját szabályozza a ROK-kal együtt. A MP és a ROK neuronális szubsztrátjaiként azonosították a szinapszint és a szintaxint, és exocitózis esszéivel kimutatták, hogy a PP1 enzimek tautomycetinnel (TMC) való gátlása csökkenti, míg a ROK Y27632-vel való blokkolása megnöveli a neurotranszmitter-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. (Lontay et al., 2004; Lontay et al., 2012). Kutatásaimat többek között ebben az irányban folytattam, disszertációm egyik későbbi fejezete pedig a fenti hipotézis bizonyításáról szól.

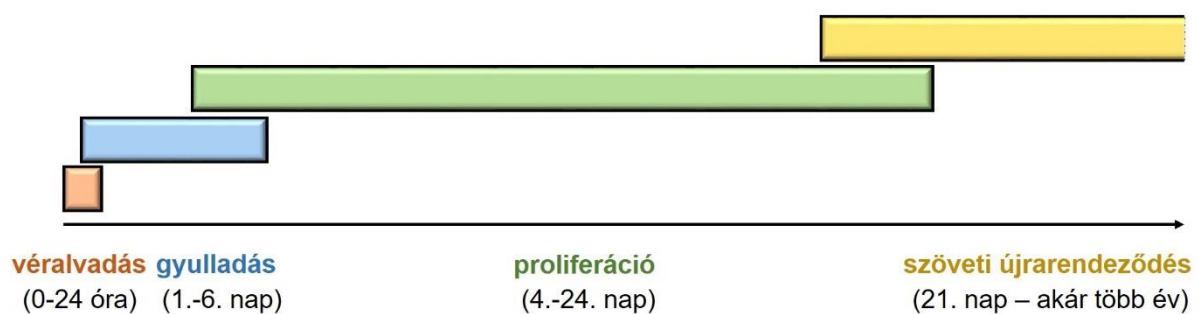
1.2. A sebgyógyulás folyamata és szabályozása

1.2.1. A sebgyógyulás szakaszai

A seb az érintett szövetek anatómiai struktúrájában és funkciójában bekövetkezett károsodás. Kiterjedése, súlyossága eltérő lehet, és a szervezet valamennyi szövetét és szervét érintheti. A sebeket többféleképpen is csoportosíthatjuk. A kiváltó ok alapján megkülönböztethetünk zúzott, horzsolts, szakított, vágott, harapott, szúrt vagy lőtt sebet, égési sérülést, a teljesség igénye nélkül. Beszélhetünk zárt vagy nyílt sebekről, előbbi esetben a bőr nem szenved sérülést, csak az alatta lévő szövetek, utóbbi esetben a bőr integritása károsodik, esetlegesen az alsóbb rétegek szöveteivel egyetemben. Gyógyulás szempontjából

elkülöníthetünk normálisan gyógyuló, normál szöveti regenerációra képes akut sebeket, illetve nem, vagy csak abnormálisan lassan gyógyuló krónikus sebeket (Velnar et al., 2009).

A különféle sebtípusok gyógyulása között természetesen lehetnek eltérések, de az akut sebgyógyulás folyamata minden esetben ugyanazon a négy – didaktikai szempontból elkülönített – fázison megy keresztül. Ezek a szakaszok egymás után, de időben átfedő módon zajlanak le, megfelelően szabályozottan (5. ábra). A négy szakasz a következő: véralvadás, gyulladás, proliferációs fázis, szöveti újrarendeződés (remodelling) (Velnar et al., 2009, Guo – DiPietro, 2010).



5. ábra: A sebgyógyulás fázisai és időbeli lefolyása. Módosított ábra Than et al., 2017. alapján.

A seb kialakulása után azonnal megindul a **vérzéscsillapítás**: az erek simaizmai összehúzódnak, illetve a véralvadási kaszkád eredményeképpen fibrinszálak csapódnak ki, melyekbe a vér alakos elemi beleragadnak, trombus képezve. Ezen folyamat célja a vérvesztés minimalizálása, emellett a fibrinhálózat elősegíti a sebgyógyulásban résztvevő további sejtpopulációk mozgását. A vérlemezkékből és a környező szövetek sejtjeiből proinflammatorikus citokinek és növekedési faktorok szabadulnak fel, melyek beindítják a **gyulladás fázist**. Ezek a kemoattraktív ágensek (mint pl. a transzformáló növekedési faktor béta; TGFβ) a korai gyulladás szakaszban – a seb kialakulását követő 24-36 órán belül – a sérült szöveti régióba vonzzák a neutrofil granulocitákat, melyek fagocitotikus aktivitásukkal megkezdik a szervezetbe kerülő mikroorganizmusok eliminálását (Robson et al., 2001). A jelenlévő baktériumok, amennyiben az immunrendszer nem takarítja el őket, megakadályozzák a további sebgyógyulást. A sebzés után 48-72 órával megjelennek a seb területén a makrofágok, melyeket szintén kemoattraktív anyagok vonzanak oda (Velnar et al., 2009). Az aktiválódott makrofágok számos feladatot látnak el. Először is folytatják a neutrofil granulociták által megkezdett fagocitotikus tevékenységet, elbontják a mikroorganizmusokat, a sérült szövetdarabokat, valamint az apoptotikusan elhalt neutrofilokat is. Másodszor: citokineket

bocsátanak ki, melyek aktiválják azokat a sejtpopulációkat, melyek végrehajtják a proliferációs szakasz több fejleményét, többek között az angiogenezist és az új kötőszöveti mátrix képződését. Harmadrészt pedig – ugyancsak a szekretált citokinek révén – aktiválják a limfocitákat, melyek bevégeznek a gyulladásos fázist. A kutatások szerint a szöveti makrofágok jelenléte, aktivitása a sebgyógyulásban, szemben a neutrofil granulocitákkal, elengedhetetlenül fontos. Utóbbi sejtpopuláció részvétele azért nélkülözhető, mert a makrofágok az ő szerepüket is helyettesíteni tudják (*Witte – Barbul, 1997*).

A **proliferációs fázis** a sérülés után kb. 3 nappal kezdődik, és hossza mintegy két hét. Ekkor a fibroblasztok a seb területére migrálnak, és megkezdik a kötőszöveti mátrixfehérjék (úgy mint hialuronsav, fibronektin, proteoglikánok, kollagén) szintézisét. Megindul az új kötőszöveti rostok kiépülése, így a sérült szövet elkezd visszanyerni szakitószilárdságát. A növekedési faktorok és citokinek hatására az endotél sejtek proliferálni kezdenek, és megindul az új kapillárisok képződése (angiogenezis), miáltal a szövet vérellátása javul (*Velnar et al., 2009*). Továbbá a keratinociták proliferációja is megindul, az új sejtek pedig a seb felszínére vándorolnak (re-epitelizáció), hogy helyreállítsák az epidermisz barrier funkcióját a folyadékvesztés és a kórokozók bejutásának megakadályozása érdekében (*Witte – Barbul, 1997*).

Az **érés fázis** (szöveti reorganizáció, remodelling) a sebgyógyulás utolsó szakasza, mely akár több évet is igénybe vehet. Az extracelluláris mátrix újjáépül, szerkezeti felépítése felveszi a normális struktúrát (remodelling). A proliferációs fázisban képződött hajszálerek egy része elhal, a szövet erezettségének mértéke visszaáll eredeti állapotába. A kontrakciós erőhatások miatt – melyet vélhetően a miofibroblasztok fejtenek ki – a sebgyógyulásnak már a korai fázisaiban megfigyelhető a seb összehúzódása, méretének csökkenése. A seb az érési fázisban teljesen eltűnik, és az eredeti szöveti struktúra és funkció helyreáll (*Guo – DiPietro, 2010*).

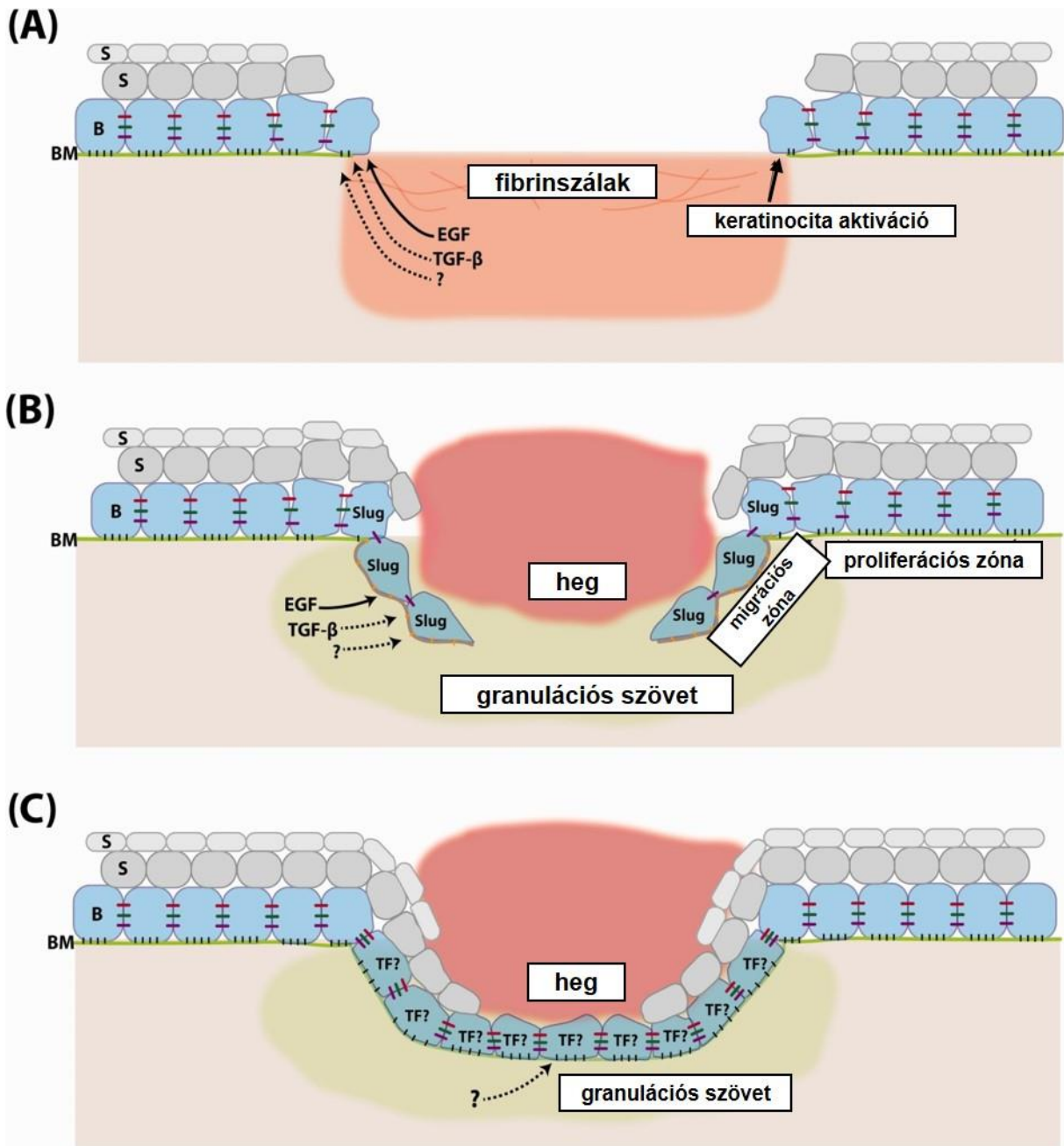
A sebgyógyulás gyorsaságát számos tényező befolyásolhatja. A nem megfelelő oxigénellátottság, a patogén baktériumok nagyszámú jelenléte és gyors szaporodása, az előrehaladott életkor, a stressz, a cukorbetegség, az alkoholfogyasztás, a dohányzás, az elhízás és a tápanyaghiány mind-mind lelassíthatják a sebgyógyulás végbemenetelét (*Guo – DiPietro, 2010*).

1.2.2. A re-epitelizáció és szabályozása

A bőr a test felszínét borító kültakaró, mely elhatárolja és védi a szervezetet a külvilágtól. Az emberi bőr három 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*) sejtszejtjei állandóan osztódva folyamatosan megújítják azt. Az epiteliális sejtek a tight junction struktúrák által szorosan összekapcsolódva találhatóak az átlagosan 75-150 µm vastagságú epidermiszben, miközben a bőrfelszín közelében lévő sejtek fokozatosan elszarusodnak és elhalnak (Wong et al., 2016). Az epidermisz barrier funkcióját elsősorban ez a terminálisan differenciálódott, sejtmagjukat vesztett keratinocitákból álló elszarusodott réteg (*stratum corneum*) biztosítja (Wagner et al., 2018). 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 granulomokat 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* (Eckert et al., 2009).

A sebgyógyulás egyik fontos történése a re-epitelizáció (lásd 6. ábra), mely a seb környékén található keratinocita sejtek proliferációját, migrációját és differenciációját foglalja magában, célja pedig a többrétegű hámszövet helyreállítása, hogy a bőr ismét el tudja látni barrier funkcióját. A re-epitelizáció során az osztódó és vándorló keratinociták telenövik a granulációs szövet felületét (Haensel – Dai, 2018). A proliferáció és a migráció eseményei térben elkülönülnek egymástól: a sebszél közvetlen közelében lévő sejtek migrálnak, míg az attól távolabb lévő keratinociták proliferálnak. A legújabb kutatások azt mutatják, hogy a két régió között található egy „vegyes zóna” is, ahol a proliferáció és a migráció párhuzamosan egymás mellett zajlanak. Park és munkatársai azt is bizonyították, hogy mind a bazális, mind a differenciálódó szuprabazális sejtek a sebtérület felé vándorolnak (6. ábra, B és C panel), a vándorlás sebessége korrelál felsőbb rétegekben lévő keratinociták differenciációjának gyorsaságával, továbbá a sejtek migrációjának iránya a sejtosztódás irányát is meghatározza a proliferációs régióban (Park et al., 2017, Haensel – Dai, 2018). Ahhoz, hogy a sejtek migrálni tudjanak, az őket a bazális membránnal összekapcsoló hemidezmoszómáknak fel kell szakadniuk, és a vándorló keratinocitáknak új integrin receptorokat kell kihelyezniük, melyekkel az átmeneti mátrixfehérjékhez tudnak kötődni és így továbbcsúszni (Martin, 1997). A keratinociták előrehaladásuk érdekében mátrix metalloproteinázokat és plazmint is szekretálnak, hogy az előttük lévő fibrinszálakat feloldják. Miután a keratinociták telenöttek a sebet, migrációjuk megáll. A bazális membrán újjáalakul, és a hemidezmoszómális kapcsolatok is helyreállnak, és a felsőbb rétegek differenciációs programja pedig beindul. (Martin, 1997).



6. ábra: A re-epitelizáció folyamata. Forrás: Haensel – Dai, 2018. Jelölések: BM = bazális membrán, B = bazális keratinociták, S = szuprabazális keratinociták. Piros vonal: tight junction. Zöld vonal: adherens junction. Lila vonal: dezmoszóma. Fekete vonalak a sejt és a bazális membrán között: hemidezmoszóma. TF: transzkripciós faktorok, melyek fenntartják a sejtek epiteliális identitását. Sima nyíl: bizonyított hatás. Szaggatott vonallal jelzett nyíl: potenciális hatás. EGF: epidermális növekedési faktor. TGF- β : transzformáló növekedési faktor béta.

A re-epitelizáció szabályozásában számos növekedési faktor vesz részt, melyek térben és időben szabályozottan termelődnek és fejtik ki hatásukat. Lehetnek kismolekulájú hormonok vagy makromolekulák (pl. fehérjék), és a keratinociták proliferációját, migrációját, illetve differenciációját egyaránt stimulálhatják. Egyazon növekedési faktor többféle hatást is kiválthat, és ezeket autokrin, parakrin vagy endokrin módon is kifejthetik. A legfontosabb keratinocita motogén (migrációt stimuláló) növekedési faktorok az epidermális növekedési faktor (EGF), a transzformáló növekedési faktor alfa (TGF- α), az inzulin-szerű növekedési faktor-1 (IGF-1), a fibroblaszt növekedési faktor-7 és -10 (FGF-7, FGF-10), illetve a hepatocita növekedési faktor (HGF) (*Seeger – Paller, 2015*). Az EGF az EGF receptor tirozin kinázhoz kötődve a GRB2-SOS-Ras-Raf-MEK-ERK promigratorikus jelátviteli kaszkádot aktiválva indukálja a migrációt (*Ando – Jensen, 1993; Cobb – Goldsmith, 1995*). A növekedési faktorok hatására a keratinociták aktiválódnak, ellaposodnak, és a mozgásuk irányába membránkitüremkedéseket, lamellipódiumokat növesztenek. A lamellipódium képződés hátterében aktin filamentumok és mikrotubulusok koordinált összeszerelődése áll. Ezek a membránfüggelékek segítik elő a keratinociták mozgását (*Koivisto et al., 2003*).

A sejtmigráció szabályozásában a foszfatázok és kinázok is jelentős szerepet játszanak. A kísérletes eredmények olykor néha ellentmondóak lehetnek. HaCaT sejteket okadánsavval és kalikulin-A-val kezelve karcos (scratch) eszével azt tapasztalták, hogy a PP1 és a PP2A együttes gátlása lassította a migrációt (*Ruzsnavszky et al., 2013*). Egy másik kutatócsoport ugyanakkor arra jutott, hogy az aktív PP2A az ERK defoszforilációja által gátolja a keratinociták migrációját (*Pullar et al., 2003*). A TGF- β 1 – mely a keratinociták proliferációját gátolja, míg a migrációját aktiválja – downregulálta a foszfatáz és tenzin homológ (PTEN) expresszióját humán keratinocita (HaCaT) sejtekben, úgy tűnik tehát, hogy a PTEN – mely a foszfatidilinozitol-3,4,5-triszfoszfátot defoszforilálja – gátolja a keratinociták migrációját (*Räsänen – Vaheeri, 2010, Wang et al., 2016*). A PP2B (kalcineurin)-NFAT útvonal ugyanakkor serkenti a sejtmotilitást, mivel ez az útvonal elősegíti a T-plasztin nevű fehérje expresszióját, mely keresztkötések által stabilizálja az aktin hálózatot és hozzájárul a lamellipódiumok képződéséhez (*Brun et al., 2014*). Fibronektinen növesztett humán keratinocitákat protein szerin/treonin kináz inhibitorokkal (pl. staurosporin) kezelve intenzívebb lamellipódium-képződést és sejtmigrációt tapasztaltak. A staurosporin többek között a protein kináz A, C, G, az Akt (vagy más néven protein kináz B), a miozin könnyű lánc kináz (MLCK) és a RhoA-aktivált kináz (ROK) gátlószere is (*Koivisto et al., 2003*). A fenti eredményeket összefoglalva az 1. táblázatban mutatom be.

1. táblázat: A keratinociták migrációjának szabályozása különféle kinázok és foszfatázok által

ENZIM	KERATINOCITA MIGRÁCIÓRA GYAKOROLT HATÁS	HIVATKOZÁS
PP1 és/vagy PP2A	serkentés	<i>Ruzsnavszky et al., 2013.</i>
PP2A	gátlás	<i>Pullar et al., 2003.</i>
PP2B	serkentés	<i>Brun et al., 2014.</i>
PTEN	gátlás	<i>Wang et al., 2016.</i>
Ser/Thr kinázok	gátlás	<i>Koivisto et al., 2003.</i>

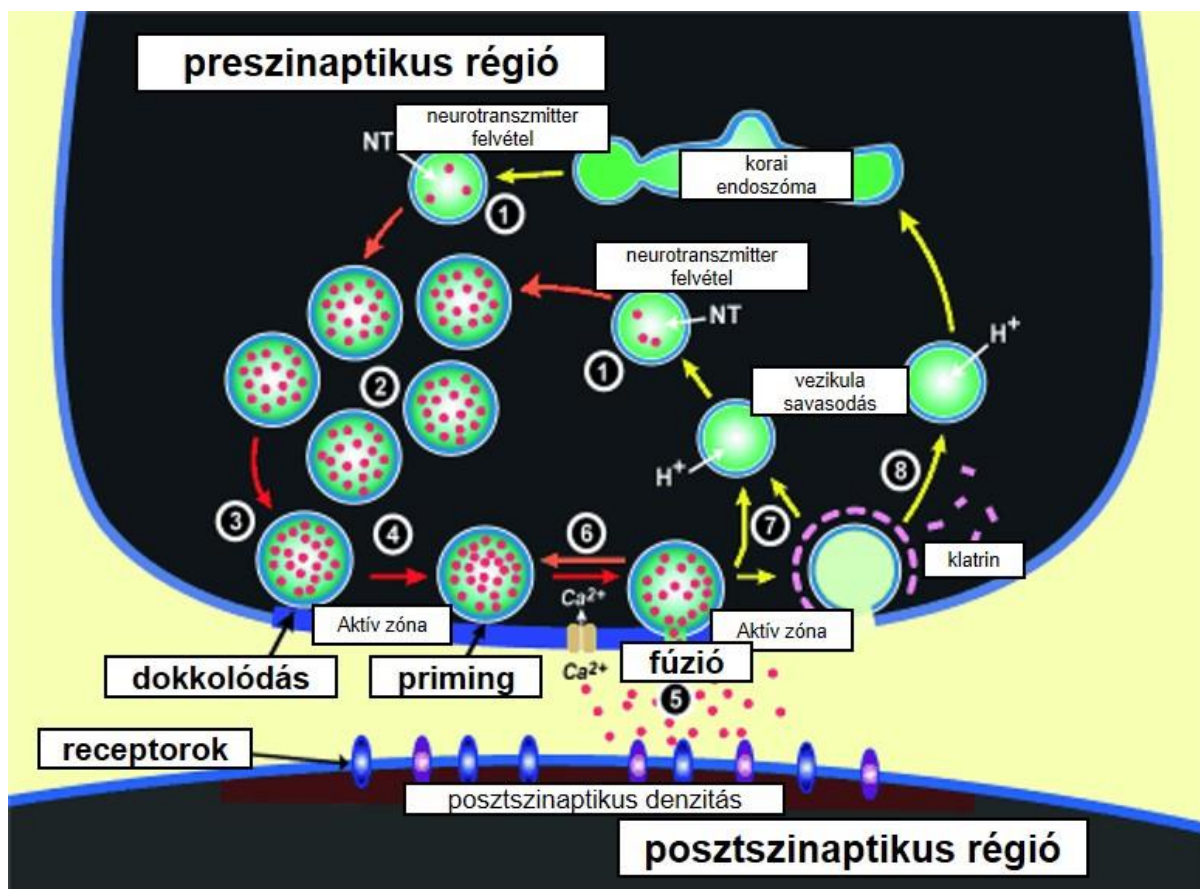
A fenti lista ugyan korántsem teljes, de láthatjuk, hogy a keratinociták sejt migrációját számtalan jelátviteli útvonal, megannyi kináz és foszfatáz szabályozhatja. Ezek pontos szerepének felderítése még erősen hiányos. Azt is érdemes megjegyezni, hogy a fentebb említett HaCaT egy immortalizált sejt vonal, azonban a korlátlan növekedési potenciáltól eltekintve hasonló a normál keratinocitákhoz. A HaCaT sejtek képesek a differenciációra, expresszálják a differenciációs markereket (keratin-1, -10, involucrin, filaggrin), nude egérre transzplantálva pedig megfelelően strukturált és differenciálódott epidermális szövetet hoznak létre (*Boukamp et al., 1988*). Doktori munkám egyik célja annak meghatározása volt, hogy a miozin foszfatáz (MP) és enzimpárja, a RhoA-aktivált kináz (ROK) hogyan befolyásolják a humán keratinociták proliferációját és migrációját, illetve milyen szerepet töltenek be a sebzáródás folyamatában.

1.3. A neurotranszmitter-kibocsátás folyamata és szabályozása

1.3.1. A neurotranszmitter-kibocsátás főbb lépései

Az idegsejtek közötti kommunikációt lehetővé tevő kémiai szinapszisokat a XIX. század végén fedezték fel a kor híres neuroanatómusai, többek között Rudolf von Kölliker és Ramon y Cajal, majd működési elvét Bernard Katz írta le (*Katz, 1969; Südhof, 2014*). Eszerint az ingerületátvitel folyamatában az axonon végigfutó akciós potenciál az idegvégződést elérve a depolarizációt vált ki, minek hatására megnyílnak a feszültség-kapuzott kalcium csatornák. A sejtbe beáramló Ca^{2+} ionok ezután kiváltják a neurotranszmittereket tartalmazó szinaptikus vezikulumok fúzióját a preszinaptikus membránnal. Az exocitózis révén a vezikulumok tartalma a szinaptikus résbe ürül, majd a neurotranszmitterek a posztzinaptikus idegsejt membránjához diffundálnak, és az ott található receptorokhoz kötődve depolarizációt váltanak ki (*Südhof, 2014*).

A folyamat főbb mozzanatait az 7. ábra szemlélteti. Az első lépésben a vezikulumok – melyek vagy az endoszómából fűződnek le, vagy közvetlenül a preszinaptikus membránból reciklizálódnak – ATP igényes aktív transzport révén feltöltődnek neurotranszmitterekkel. Ezután a vezikulumok az aktív zóna közelébe vándorolnak, ahol a szinaptikus hólyagok exocitózisa megvalósul. A következő lépés a dokkolódás, melynek során a vezikulumok a preszinaptikus membránhoz horgonyzódnak ki. Miután ez megtörtént, 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+} ezután kiváltja a vezikulumok exocitózisát a fúziós pórus megnyílásával. Az exocitózist követően különféle mechanizmusok biztosítják a vezikulumok újratermelődését („vesicle recycle”). A szinaptikus hólyag vagy a preszinaptikus membránhoz kapcsolódva töltődhet fel („kiss and stay”), vagy klatrint nem igénylő endocitózissal gyorsan recirkulálódhat („kiss and run”), vagy éppen klatrinfüggő endocitózissal újjáalakulhat, hogy azután az endoszómába olvadjon (Südhof, 2014).



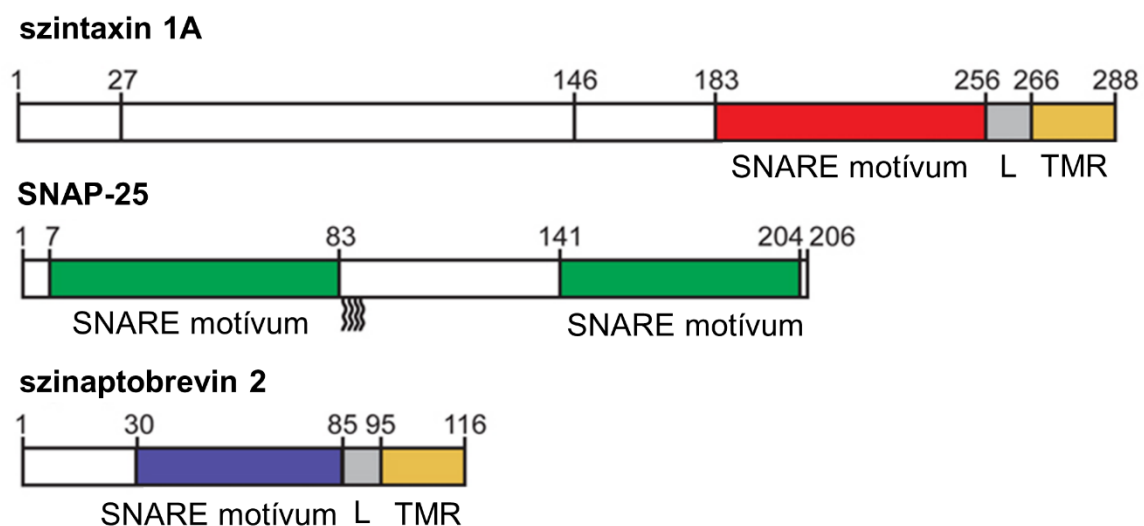
7. ábra: A neurotranszmitter-kibocsátás és a vezikulum recikláció lépései. (1) A vezikulumok neurotranszmitterekkel (NT) való feltöltődése. (2) Aktív zóna közelébe történő vándorlás. (3)

Dokkolódás. (4) Priming. (5) Ca^{2+} -indukált fúzió. (6) „Kiss and stay”. (7) „Kiss and run”. (8) Klatrinfüggő endocitózis és az endoszómába való beolvadás. Forrás: Südhof, 2014.

Az elmúlt évtizedekben a kutatók komoly erőfeszítéseket tettek annak érdekében, hogy molekuláris szinten is betekintést nyerjenek a fenti folyamatok mibenlétére. Áldozatos munkájuk eredményeképpen ma már széleskörű ismeretekkel rendelkezünk a neurotranszmitter-kibocsátást megvalósító fehérjék szerkezetéről és funkciójáról. A következő pontban röviden bemutatom, hogyan működik az a molekuláris gépezet, amely a vezikulumokat a preszinaptikus membránhoz kapcsolja és azzal fuzionáltatja.

1.3.2. A SNARE komplex felépítése és működése

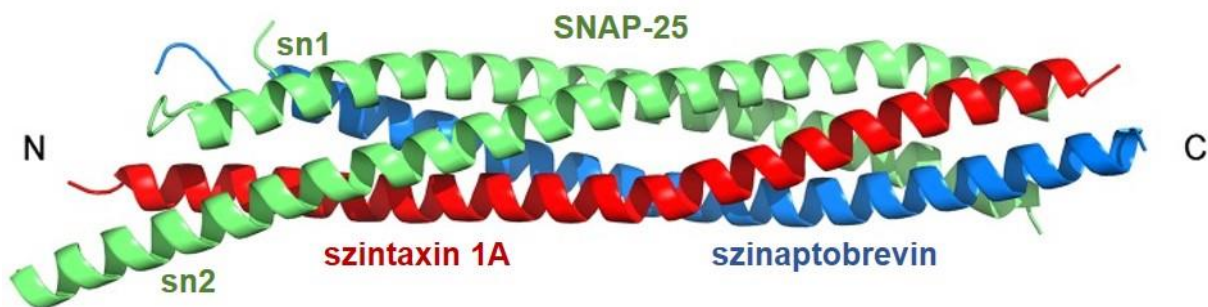
Az 1980-as és 90-es években egy seregnyi preszinaptikus fehérjét azonosítottak. Megfigyelték, hogy az a botulinum toxin, amely meggátolja a vezikulumok fúzióját a sejtthártyával, proteolitikusan hasít három preszinaptikus fehérjét: a vezikulumok membránjához kihorgonyzott szinaptobrevint (Schiavo et al., 1992), illetve a sejtmembránhoz kötődő SNAP-25 (25 kDa molekulatömegű szinaptoszóma-asszociált protein) és szintaxin fehérjéket (Blasi et al., 1993; Schiavo et al., 1993).



8. ábra: A SNARE fehérjék szerkezete. Forrás: Stein et al., 2009. Nature. L: linker régió. TMR: transzmembrán régió. „Hullámvonalak” a SNAP-25-höz kapcsolódva: palmitoil láncok.

Később fény derült arra is, hogy ez a három fehérje valóban kulcsszerepet játszik a dokkolásban és a fúzióban azáltal, hogy egy komplexet – az ún. SNARE komplexet – alkotva képesek összekapcsolódni. A három fehérje az emlősökben mintegy 60 tagot számláló SNARE (szolubilis N-etilmaleimid szenzitív faktort (NSF) kötő fehérje (SNAP) receptor) fehérjecsald tagjai. Vagyis olyan proteinek, melyek kötik a szolubilis NSF-kötő fehérjéket (SNAP; nem állnak rokonságban a SNAP-25-tel, félreérthető módon egyezik a betűszavuk!) (Han et al., 2017). A SNARE komplexet alkotó fehérjék sematikus szerkezete az 8. ábrán látható.

A SNARE komplexben részt vevő fehérjék mindegyike hordozza az ún. SNARE motívumot, amely 60-70 aminosav hosszúságú, evolúciósan konzervált szekvencia. A szintaxin és a szinaptobrevin egy-egy, míg a SNAP-25 két ilyen SNARE motívumot tartalmaz. A három fehérje ezeken a motívumokon keresztül kapcsolódik össze, amelyek ilyenkor alfa-hélix szerkezetet vesznek fel. A szinaptobrevin és a szintaxin 1-1, míg a SNAP-25 a maga két SNARE motívumával járul hozzá a SNARE komplex kialakulásához. A komplexben a 4 alfa-hélix párhuzamos módon, nagyon szorosan egymáshoz tapadva helyezkedik el, egy rendkívül stabil nyálábót alkotva (Han et al., 2017, illetve 9. ábra).

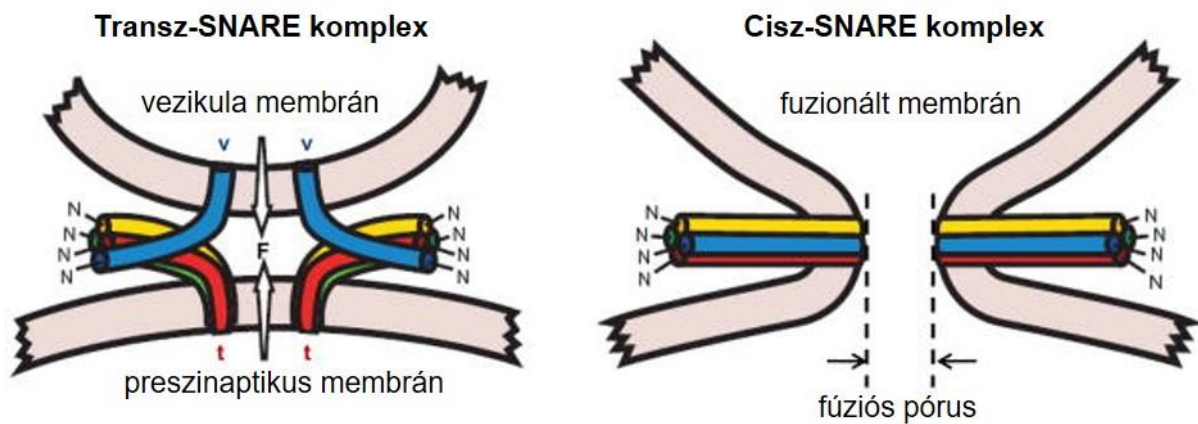


9. ábra: Az összekapcsolódó SNARE motívumok térbeli elrendeződése. Forrás: Han et al., 2017.

A szintaxin és a szinaptobrevin a C-terminálisukon elhelyezkedő transzmembrán régiójukkal (TMR) ágyazódnak bele a membrán kettős lipidrétegébe. Ezt a régiót egy linker szekvencia kapcsolja össze a SNARE motívummal (8. ábra). A SNAP-25 is membrán asszociált, de ez a fehérje nem transzmembrán régióval kötődik a sejtthártyához, hanem palmitoil-láncokkal (Han et al., 2017).

Amikor a szintaxin, a SNAP-25 és a szinaptobrevin közel kerülnek egymáshoz, az N-terminálisuktól kiindulva a C-terminális irányába elindul az „összecipzáródásuk”, minek

eredményeképpen először egy *transz*-SNARE komplex jön létre (10A. ábra). Ekkor a szinaptikus vezikulum és a preszinaptikus membrán még különálló egységek, melyek fúziója azonban megindul, mivel a SNARE komplex összeépülése következtében fellépő mechanikai erőhatások a két membránfelületet egymás irányába nyomják (Stein et al., 2009).



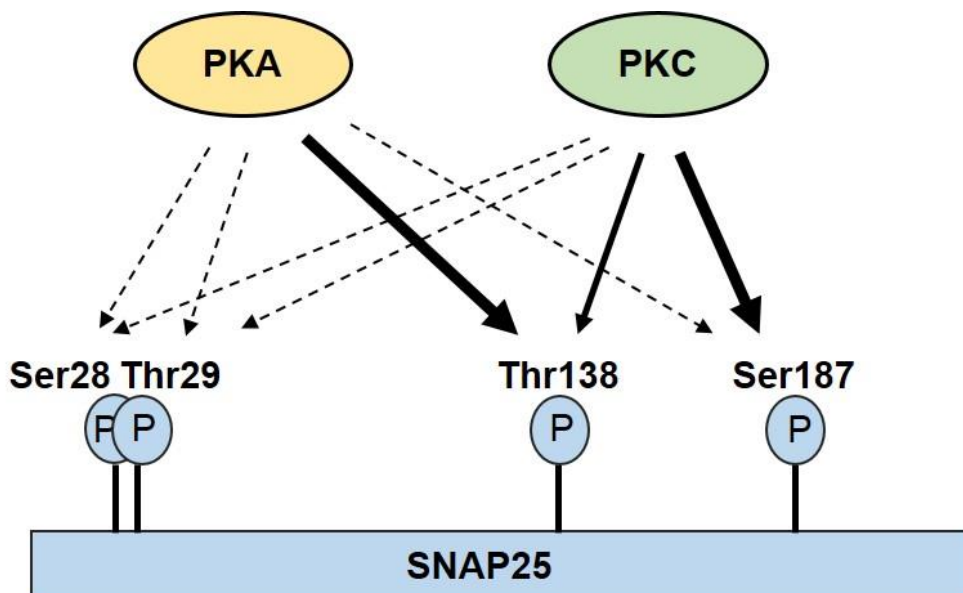
10. ábra: A SNARE komplex működése. Forrás: Südhof – Rothman, 2009.

A SNARE komplex kialakulása exergonikus folyamat, a fehérjék összeépülése spontán módon történik (Lu et al., 2008). A fellépő húzóerőt a szintaxin és a szinaptobrevin linker régiói közvetítik a membránok felé. Az erőhatás következtében a lipid rétegek összekeverednek, és először egy ún. hemi-diafragma alakul ki, majd a továbbiakban a két membrán teljesen fuzionál, és pórus képződik. A SNARE-komplex elemei ekkor ugyanarra a fuzionált membránfelületre kerülnek, és tökéletesen összeépülve *cisz*-SNARE komplexet alkotnak (10B. ábra), ami által a további mechanikai erőhatás megszűnik. A fúzió tehát, mint láhattuk, nem igényel ATP-t, a szükséges energiát a SNARE-fehérjék exergonikus foldingja biztosítja (Stein et al., 2009, Han et al., 2017). Azonban a SNARE-komplex felbontása a pórusképződés után ATP-függő folyamat. A komplex disszociációját a már korábban említett N-etilmaleimid szenzitív faktor (NSF) és az ezt kötő SNAP végzik, mivel az NSF ATPáz aktivitásával az ATP hidrolízise által energiát szabadít fel. A SNAP közvetlenül kapcsolódik a SNARE-komplex elemeihez (így pl. a SNAP-25-höz), és disszociálja a komplex elemeit az NSF által kinyert energia segítségével (Südhof, 2014).

1.3.3. A SNAP-25 szabályozása foszforilációval és defoszforilációval

A neurotranszmitter-kibocsátást elsődlegesen a beáramló kalciumion váltja ki, de a folyamat végbemenetelét fehérjék foszforilációja és defoszforilációja is szabályozza. A SNAP-25 számos potenciális foszforilációs helyet tartalmaz: polipeptidláncában 10 szerin és 7 treonin

aminosav található (Gao et al., 2012). A kutatók az 1990-es évek közepétől tanulmányozzák, hogy milyen protein kinázok és mely aminosav-oldalláncon képesek foszforilálni ezt a fehérjét, illetve ezen poszttranszlációs módosítások milyen fiziológiai jelentőséggel bírnak. A kutatások azt mutatják, hogy a két legfontosabb SNAP-25 foszforilációs hely a treonin-138 (Thr138) és a szerin-187 (Ser187). *In vitro* és PC12 patkány pheochromocytoma sejteken végzett *in vivo* kísérletek alapján a protein kináz C (PKC) mind a Thr138 (Hepp et al., 2002), mind a Ser187 (Shimazaki et al., 1996, Hepp et al., 2002, Nagy et al., 2002, Shoji-Kasai et al., 2002) aminosav oldalláncon foszforilálja a SNAP-25-t. Úgy tűnik, hogy a PKC emellett a Ser28-on és a Thr29-en is hat, de a preferált foszforilációs hely a Ser187, illetve kisebb részben a Thr138 (Genoud et al., 1999, Gao et al., 2012). A protein kináz A (PKA) enzimmel végzett kísérletek ellentmondásos képet adtak: az első kísérleti eredmények arra utaltak, hogy a PKA csak a Thr138-on hat, míg a Ser187-en nem fejt ki aktivitást (Risinger – Bennett, 1999, Hepp et al., 2002, Nagy et al., 2004). Gao és munkatársai később azonban azt tapasztalták, hogy COS7 sejteket a PKA agonista forskolinnal kezelve a COS7-ben expresszált SNAP-25 a Ser28, Thr29, Thr138 és Ser187 oldalláncon közel azonos mértékben foszforilálódott. Továbbá tisztított SNAP-25-t a fenti pozíciókban *in vitro* is foszforilálták PKA-val (Gao et al., 2012). A legfrissebb kutatások szerint PC12 sejtekben a PKA elsődlegesen a Thr138, míg a PKC a Ser187 aminosav oldalláncon foszforilálja a SNAP-25-t (Gao et al., 2016) (11. ábra).



11. ábra: A SNAP-25 foszforilációs helyei, és az öt foszforiláló kinázok. Saját készítésű ábra. Vastag nyíl: preferált foszforilációs hely. Vékonyabb nyíl: kevésbé preferált foszforilációs hely. Szaggatott vonallal jelzett nyíl: potenciális foszforilációs hely.

A foszforilációs helyek jelentősége még nem teljesen tisztázott. A Thr138-nak a priming folyamatában lehet szerepe, mivel PKA általi foszforilációja együtt jár az exocitózissal kész („primed”) állapotban lévő vezikula pool-ok (mind a lassabban ürülő slowly releasable pool, mind a gyorsan ürülő readily releasable pool) méretének növekedésével. Mindemellett a PKA aktivitás fokozta a kromaffin sejtek katekolamin szekrécióját, míg a SNAP-25 Thr138Ala mutáns overexpressziója csökkentette azt. Ezek alapján arra következtettek, hogy a SNAP-25 Thr138 oldalláncon történő foszforilációja elősegíti az exocitózist a vezikulumok priming-jának előmozdítása által (Nagy et al., 2004). Risinger és Bennett kutatásai szerint a SNAP-25 Thr138-on történő foszforilációja nem módosítja a SNAP-25 és a szintaxin, illetve a SNAP-25 és a szinaptobrevin közötti kölcsönhatás erősségét, így sejtésük szerint ennek a foszforilációs helynek nincs szerepe a SNARE-komplex összeépülésében vagy disszociációjában (Risinger – Bennett, 1999). Ezzel ellentétben Gao és munkatársai szerint a Thr138-on történő foszforiláció gátolja a SNAP-25 és a szintaxin közötti kölcsönhatást és a SNARE-komplex összeépülést, továbbá a PC12 sejtek noradrenalin szekrécióját is (Gao et al., 2016).

2. táblázat: A SNAP-25 foszforilációs helyeinek élettani szerepe

foszforilációs hely	foszforiláció hatása, lehetséges szerepe
Thr138	<ul style="list-style-type: none"> - vezikula priming előmozdítása (Nagy et al., 2004) - SNARE komplex szétesése és az exocitózis gátlása (Gao et al., 2016)
Ser187	<ul style="list-style-type: none"> - a SNAP-25 és a szintaxin kölcsönhatásának gyengítése (Shimazaki et al., 1996) - a SNAP-25 és a szinaptobrevin közötti kölcsönhatás fokozása és a SNARE komplex összeszerelődés elősegítése (Gao et al., 2016) - vezikula toborzás a preszinaptikus membránhoz, exocitózissal kész vezikula pool újratöltése vezikulumokkal (Nagy et al., 2002, Shoji-Kasai et al., 2002) - SNAP-25 áthelyeződése a citoplazmából a plazmamembránba (Kataoka et al., 2000) - feszültség-kapuzott kalcium csatornák SNAP-25 általi gátlása (Pozzi et al., 2008)

Immunprecipitációs kísérletek azt mutatták, hogy a SNAP-25 Ser187 oldalláncon történő, PKC általi foszforilációja csökkenti a SNAP-25 szintaxinkötő képességét. Mivel a PKC stimulálása a PC12 sejtek noradrenalin kibocsátását is fokozta, a kutatók azt feltételezték, hogy a neurotranszmitter-kibocsátás intenzitása attól függ, hogy a SNARE-komplex milyen gyorsan szerelődik szét és kapcsolódik össze újra, és a PKC ezt a ciklust gyorsítja fel azáltal, hogy elősegíti a SNARE-komplex disszociációját (*Shimazaki et al., 1996*). Gao és munkatársai szerint azonban a Ser187 PKC általi foszforilációja éppen hogy elősegíti a SNARE-komplex összeszerelődését azáltal, hogy a foszforilált SNAP-25 jobban köti a szinaptobrevint, míg a szintaxinnal való kölcsönhatását nem módosítja (*Gao et al., 2016*). Más kutatások arra engednek következtetni, hogy a Ser187 a vezikula toborzásban („vesicle recruitment”) játszik szerepet. A PKC-t aktiváló forbol-12-mirisztát-13-acetát (PMA) hatására PC12 sejtekben a vezikulumok a sejtmembrán közelébe vándoroltak, és ez a folyamat együtt járt a SNAP-25 Ser187-es oldalláncon történő foszforilációjával. (*Shoji-Kasai et al., 2002*).

A vezikulumok első kiürülése után a foszfomimetikus SNAP-25 Ser187Asp mutáns fokozta, míg a nem-foszforilált formát utánzó Ser187Ala mutáns csökkentette a második alkalommal kiváltott exocitózis mértékét, ami mögött feltehetően az áll, hogy a Ser187 foszforiláció gyorsítja az exocitózisra alkalmas vezikula pool újratöltődését és a vezikula toborzást (*Nagy et al., 2002*). Ezekkel a megfigyelésekkel összhangban van az a kutatási eredmény is, amely szerint a Ser187 foszforilációja indukálja a SNAP-25 áthelyeződését a citoplazmából a sejtmembránba (*Kataoka et al., 2000*). A foszforilációs hely egy újabb szerepére világít rá az a felismerés, hogy feszültség-kapuzott kalcium csatornákkal kölcsönható SNAP-25 a Ser187 foszforilációja esetén gátolja ezeknek az ioncsatornáknak a működését, ezáltal egy negatív feedback mechanizmus révén szabályozza a neuron ingerlékenységét (*Pozzi et al., 2008*). A fenti kutatási eredményeket összefoglalóan az 2. táblázat tartalmazza.

Jóval kevesebbet tudunk arról, hogy milyen protein foszfatázok defoszforilálják a SNAP-25 fehérjét. Az ezzel kapcsolatos első publikáció csak 2012-ben jelent meg. Eszerint a PC12 sejtekben a forskolin kezelés hatására aktivált PKA által foszforilált SNAP-25, illetve az *in vitro* PKA-foszforilált SNAP-25 defoszforilációját főként a PP1, kisebb részben a PP2A végzi. Hasonló módon kivitelezett *in vivo* és *in vitro* kísérletek azt mutatták, hogy a PKC által foszforilált SNAP-25-t szintén a PP1 és a PP2A defoszforilálja, de ezúttal a PP2A hatékonyabbnak bizonyult. Vad típusú és mutáns tisztított SNAP-25-tel (Ser28Ala/Thr29Ala, Thr138Ala/Ser187Ala, illetve Ser28Ala/Thr29Ala/Thr138Ala/Ser187Ala) *in vitro* foszfatáz vizsgálatokat végeztek. Sajnos mivel egyszerre több aminosav együttes mutációjával végeztek kísérletet, így az egyedi foszforilációs helyek szerepére nincs információnk. Az eredmények

arra engednek következtetni, hogy a PP1 defoszforilálja mind a Ser28-at és/vagy a Thr29-et, illetve a Thr138-at és/vagy a Ser187-et is; azonban a PP2A csak az utóbbi két foszforilációs helyet defoszforilálja (egyiket vagy mindkettőt), a Ser28-at és a Thr29-et nem. A tanulmány szerint a PP2B nem defoszforilálja a SNAP-25 fehérjét (Gao et al., 2012). Egy másik kutatócsoport szinaptoszóma preparátumot különféle protein foszfatáz inhibitorokkal kezelve arra jutott, hogy a Ser187 aminosav oldalláncról a PP2A eltávolítja a foszfátcsoportot, a PP1 és a PP2B (kalcineurin) azonban nem (Iida et al., 2013). Az eredmények összegzéseként elmondhatjuk, hogy a Thr138 defoszforilációját elsődlegesen a PP1, míg a Ser187 defoszforilációját a PP2A végzi, de az enzimesaládokon belüli pontos holoenzimek még nem kerültek azonosításra.

2. Célkitűzések

Célunk az volt, hogy a miozin foszfatáz és a RhoA-aktivált kináz (1) sebzáródásban, illetve (2) neurotranszmitter-kibocsátásban játszott szerepéről minél teljesebb képet kapjunk. A két projekt során az alábbi kérdésekre kerestük a választ.

(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, hogyan befolyásolják a keratinociták proliferációját és sejtmozgását, illetve milyen hatásuk van a sejt-sejt kapcsolatokra és a barrier funkcióra. Ezekre a kérdésekre különféle vizsgálatokkal (MTT esszé, kaszpáz-3 aktivitásmérési esszé, foszfatáz aktivitásmérési esszé, szulforodamin B esszé, karcolási esszé, ECIS, immunfluoreszcencia) kerestük a választ.
- A miozin foszfatáz szerepének vizsgálata a HaCaT sejtek fenti folyamataiban.
- Annak vizsgálata, hogy a miozin foszfatáz milyen molekuláris mechanizmus útján befolyásolja a keratinociták migrációját és a sebgyógyulást. Humán bőrszöveti sejtekben a MYPT1 csendesítése, majd a szövetlizátumok MAPK array vizsgálata.

(2) A MP szerepe a neurotranszmitter-kibocsátásban:

- A SNAP-25 és a MP alegységeinek (MYPT1, PP1c δ) kölcsönhatásának igazolása immunoprecipitációval. Tisztított SNAP-25 *in vitro* foszforilációja ROK enzimmel, 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 sejtek és egér agyszeletek kezelése a PP1 és a ROK specifikus inhibitorával, továbbá egér kortikális szinaptoszómákba a MP-t gátló KEPI fehérjét bejuttatása, és a kezelések SNAP-25 foszforilációjára gyakorolt hatásának vizsgálata Western blottal.
- A MP neurotranszmitter-kibocsátásra gyakorolt hatásának vizsgálata exocitózis esszével, kontroll és KEPI-vel kezelt szinaptoszómák felhasználásával.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Anyagok

A későbbiekben minden anyag, vegyszer és készülék neve mellett zárójelben jelzett a gyártó cég neve. Ha ez nincs külön feltüntetve, akkor az anyag a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) cégtől származik.

3.2. Antitestek

Munkánk során az alábbi elsődleges és másodlagos antitesteket használtuk (WB: western blot, IF: immunfluoreszcencia, IH: immunhisztokémia):

3. táblázat: Az általunk használt antitestek.

Antitest	Gyártó	Katalógusszám	Hígítási arány	Állat
anti-Akt	Cell Signaling	#9272	WB: 1:1000	nyúl
anti-foszfo-Akt (S473)	Cell Signaling	#9271	WB: 1:500	nyúl
anti-aktin	Sigma-Aldrich	A 2066	WB: 1:5000	nyúl
anti-Flag	Sigma-Aldrich	F4042	WB: 1:5000	nyúl
anti-GAPDH	Santa Cruz	sc-47724	WB: 1:10000	egér
anti-β-katenin	Abcam	ab32572	IF: 1:250	nyúl
anti-PP1δ	Millipore	# 07-270	WB: 1:500	nyúl
anti-SNAP-25	Sigma-Aldrich	S9684	WB: 1:1000 IF: 1:100	nyúl
anti-foszfo-SNAP-25 (T138)	Abgent	#AP15001a	WB: 1:300	nyúl
anti-TG1	Santa Cruz	sc-365821	WB: 1:1000 IH: 1:50	egér
anti-α-tubulin	Santa Cruz	sc-53646	WB: 1:10000	egér
anti-MYPT1¹⁻²⁹⁶	Lontay et al., 2004	-	WB: 1:1500 IH: 1:100	nyúl
anti-ZO-1	ThermoFischer Scientific	61-7300	IF: 7,5 μ g/ml	nyúl
anti-foszfo-CPI-17 (T38)	Eto et al., 2013	-	1:5000	csirke
anti-nyúl IgG	Sigma-Aldrich	A 0545	WB: 1:2000 IF: 1:200	kecske
anti-egér IgG	Cell Signaling	#7076	WB: 1:2000	ló

			IF: 1:200	
anti-kecske IgG	Sigma-Aldrich	A 5420	IF: 1:200	nyúl
anti-csirke IgG	Sigma-Aldrich	A9046	WB: 1:5000	nyúl
Clean-Blot	Thermo Scientific	#21230	WB: 1:2000	

A sebgyógyulás tanulmányozása egérbőrön

A sebgyógyulás tanulmányozására 6-7 hetes hím Balb/c egereket használtunk fel. Az egereket 35-75% relatív páratartalmú, 19-25 °C hőmérsékletű környezetben tartottuk, a napszakok váltakozását pedig úgy modelleztük, hogy 12 óra megvilágítást 12 óra sötétség követett, ciklikusan. Az egerek az ivóvízhez és a táplálékhoz folyamatosan hozzáfértek (*ad libitum* etetés). A sebzés előtt az egerek hátáról eltávolítottuk a szőrt, ehhez egyszerű, kereskedelmi forgalomban kapható szőrtelenítő krémeket használtunk. Az egerek altatása izoflurán (Abbott Animal Health, Abbott Park, IL, USA) inhalációval történt. A dorzális bőrfelületen három, egyenként 4 mm átmérőjű, kör alakú, teljes vastagságú sebet ejtettünk, a sebfelszíneket pedig povidon-jóddal töröltük át, hogy megakadályozzuk a fertőzés kialakulását. A sebek kimetszése egyazon időpontban történt, és a művelet során egy korábban leírt protokollt követtünk (Müller-Decker et al., 2002). A sebeket 1 µM végkoncentrációjú szelektív protein foszfatáz-1 (PP1) inhibitor tautomycinnel (TM), illetve 10 µM végkoncentrációban alkalmazott RhoA-asszociált protein kináz (ROK) inhibitor H1152-vel kezeltük, a gátlószereket hidrofíl anionos krémekben oldottuk fel, és ezt kentük a sebekre 7 napon keresztül napi kétszer 12 órás időközönként. A kontroll sebeket csak az anionos krémmel kentük be. Az esetszám n=6 volt minden kezelés esetében. 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, majd minden kezelés esetében ábrázoltuk a relatív sebtérületeket az idő függvényében (átlag ± SEM). A kísérlet végén az állatokat eutanizáltuk, a sebeket kimetszettük, és a szubkután zsírt szikével eltávolítottuk. A sebeket keresztben kettévágtuk, és az egyik darabot hisztológiai vizsgálatnak vetettük alá (lásd 3.4. pont). A másik felet potter homogenizátorral lízis pufferben (25 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,6 M NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,5% (V/V) Triton X-100, 1x proteáz inhibitor mix, 1x PMSF) lizáltuk, egy korábbi protokoll alapján (Lontay et al., 2010). A lizátum fehérje koncentrációját bikinkoninksavas (BCA) esszével állapítottuk meg Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Waltham,

MA, USA) használatával. Standardként marhaszérum-albumin (BSA) hígítási sort használtunk, az abszorbanciát pedig 540 nm-en olvastuk le.

Minden általunk végzett állatkísérlet megfelelt az állatokon végzett kísérletekre vonatkozó hazai és az európai uniós etikai szabályoknak és a Debreceni Egyetem Etikai Kódexének. Az egereket a Debreceni Egyetem Kísérleti Állatháza bocsátotta rendelkezésünkre.

3.3. Trikróm festés és immunhisztokémia

A kivágott sebeket (lásd 3.3. pont) 10%-os formalinnal (foszfát-pufferes, pH 7,4) fixáltuk, paraffinba ágyztuk, majd 4 µm vastagságú szeleteket metszettünk. A metszeteket mounting médium segítségével (Superfrost/plus; A. Daigger & Company, Inc., Vernon Hills, IL, USA) üveglapra rögzítettük, xilénnel deparaffinizáltuk, és felszálló etanol sorral dehidratáltuk, majd Masson-Goldner-féle trikróm festéssel megfestettük őket. A módszer lényege, hogy a metszeteket három savanyú festékkel (oranzs G, savanyúfukszin, anilinkék) egymás után festjük, és a folyamat során a nagyobb moltömegű festék a lazább szerkezetű szövetelemekből kiszorítja a kisebb moltömegűt. A metszeteket előbb pirkinsavval pácoltuk fél percre, majd 15 perces csapvizes mosást követően a sejtmagokat timsós hematoxilinnal festettük. A metszeteket csapvízzel mostuk, majd inkubáltuk 3 percre előbb oranzs G oldattal (0,5 g oranzs G, 2 ml tömény ecetsav, 100 ml desztillált víz), majd újabb 3 percre savanyúfukszin-ponceau oldattal (0,05 g savanyúfukszin, 0,05 g ponceau S, 2 ml tömény ecetsav, 100 ml desztillált víz), ezután 2 percre 5 g/dl foszforvolfrámsav oldattal, végül 10 percre anilinkék oldattal (0,5 g anilinkék, 2 ml tömény ecetsav, 100 ml desztillált víz). Az egyes lépések között és az utolsó festési lépés után a metszeteket 2 ml/dl ecetsav oldattal mostuk. Végül a mintákat még izopropanollal is átöblítettük.

Humán bőrszöveti mintákban (Genoskin, Toulouse, Franciaország) a transzglutamináz-1 (TG1) és a MYPT1 fehérjét immunhisztokémiai módszerrel detektáltuk. A metszeteket egy éjszakán át 4 °C hőmérsékleten inkubáltuk az elsődleges antitestekkel, majd mosást követően két órán át a torma peroxidázzal konjugált másodlagos antitestekkel. Az immunjeleket 3,3'-diamino-benzidin kromogén szubsztráttal hívtuk elő. A metszeteket xilénnel megtisztítottuk, beágyztuk és tárgylemezre ragasztottuk, végül Leica S40 mikroszkóppal vizualizáltuk a MYPT1 és TG1 szöveti eloszlásának tanulmányozása céljából.

3.4. Sejtenyésztés, a sejtek kezelése és lizálása

A humán keratinocita (HaCaT), a B50 neuroblasztóma és a tsA201 sejteket (Sigma, St. Louis, MO, USA) 10% (V/V) borjú szérumot (FBS), illetve 2 mM L-glutamint tartalmazó Dulbecco által módosított Eagle médiumban (DMEM) tenyésztettük Nuairé NU-5510E inkubátorban (Nuairé, Plymouth, MN, USA) 37 °C hőmérsékleten és 5%-os szén-dioxid szint

mellett. A normál humán epidermális keratinocita (NHEK) sejteket Dr. Bíró Tamás laboratóriumából (Debreceni Egyetem, Élettani Intézet) kaptuk, és Dr. Szöllösi Attila bocsátotta a rendelkezésünkre. Az NHEK sejteket EpiLife médiumban tenyésztettük, mely humán keratinocita növekedési faktorokat is tartalmazott (Gibco, Life Technologies). A sejteket 6-, vagy 96-lyukú tenyésztőedényekben szélesztettük. Teljes konfluencia elérése esetén az NHEK sejtek differenciálódnak, míg 80% alatti konfluencia esetén differenciálatlanok maradnak.

B50/HaCaT sejteket tripszinezés után – a kísérlettől függően – 6- vagy 96-lyukú sejtenyésző edénybe, vagy 35 mm átmérőjű műanyag Petri-csészébe (Sarstedt, Nümbrecht, Németország) passzáltuk át, majd konfluens állapotig növesztettük. Miután a sejtek teljesen benőtték a felületet, a médiumot 24 órára lecseréltük szérumentes (0% FBS-t tartalmazó) DMEM-re, hogy a sejteket szinkronizáljuk. Ezután a sejteket a megfelelő inhibitorokkal kezeltük úgy, hogy a gátlószereket szérumos (10% FBS-t tartalmazó) DMEM-ben hígítottuk. Az alkalmazott végkoncentrációkat és a kezelési időket a későbbiekben részletezem.

Amennyiben a további célunk az inhibitoros kezelés fehérje expresszióra vagy fehérje foszforilációra gyakorolt hatásának Western blottal történő vizsgálata volt, úgy a sejteket lizáltuk. B50 sejtek esetében RIPA puffert használtunk, melynek összetétele: 25 mM Tris-HCl, pH 7,6, 150 mM NaCl, 0,25% (m/V) nátrium-dezoxikolat, 1% (m/V) NP-40, 0,1% (m/V) nátrium-dodecil-szulfát (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-dezoxikolat. A pufferekhez használat előtt, frissen 1x proteáz inhibitor mixet (Roche, Bazel, Svájc) és 1x protein foszfatáz inhibitor koktélt (1 mM NaF, 1 mM Na₄P₂O₇, 1 mM β-glicerofoszfát, 1 mM Na₃VO₄) adtunk. A sejtekről leszívtuk a médiumot, kétszer átmostuk a felületet foszfát pufferes sóoldattal (PBS), majd a sejteket a lízis pufferben felkapartuk sejtkaparóval, átmértük Eppendorf csövekbe, és 10 percig ultrahangos jeges vízfürdőben szonikáltuk. Ezt követően a csöveket 10 percig 15000 rpm fordulatszámon centrifugáltuk Eppendorf 5415R mikrocentrifugával, majd a felülúszókat új Eppendorf csövekbe pipettáztuk át, és további felhasználásig -20 °C hőmérsékleten tároltuk őket. A fehérje koncentrációkat Pierce BCA Protein Assay Kittel (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) határoztuk meg.

3.5. Géncsendesítés keratinocita sejtekben és *ex vivo* humán bőrszövetben

HaCaT sejtekben csendesítettük a MYPT1 génjét. Ehhez dupla szálú siRNS mixet (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) használtunk (siMYPT1), mely 4 féle

szekvenciát tartalmazott. Ezeket a 4. táblázatban tüntettem fel. Az 5 µl Lipofectamine 2000 transzfekciós reagenst (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) és a 100 pmol siRNS-t előbb külön-külön behígítottuk 250-250 µl OptiMEM médiumban (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 5 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk őket, majd a két Eppendorf cső tartalmát összemértük, és újabb 20 perc inkubációt követően a Lipofectamine/siRNS mixet a még szuszpenziós fázisban lévő sejtekhez adtuk. 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 szérumentes DMEM-ben hagytuk, hogy az siRNS hatékonyabban juthasson be a még nem letapadt humán keratinocitákba, majd a 4 óra elteltével a médiumhoz 10% (V/V) FBS-t adtunk. A sejteket ezután még 44 órán keresztül növesztettük.

4. táblázat: Az siMYPT1 mix RNS szekvenciái

siRNS #1	5' – CAACUAAACAGGCCAAUA – 3'
siRNS #2	5' – GCUAAAUAGUGGUCAUAUA – 3'
siRNS #3	5' – ACAAAGAGACGUUGAUUAU – 3'
siRNS #4	5' – CGGAUUCCAUUUCUAGAUA – 3'

Forrás: Thermo Scientific.

A MYPT1 fehérje expresszióját humán *ex vivo* bőrszöveti biopsziákban is gátoltuk. A mintákat sebészi úton távolították el a felnőtt donorok beleegyezésével. A biopsziák tartalmazták a bőrszövetben előforduló összes sejtípust, és érett *stratum corneummal* rendelkeztek. A mintákat a Genoskin (Toulouse, Franciaország) cégtől rendeltük. A Lipofectamine 2000-t és az siRNS-t (non-target, illetve siMYPT1) ebben a médiumban hígítottuk be, majd a transzfekciós mix egyik részét a biopsziák tetejére pipettáztuk, másik részét pedig a bőr mélyebb rétegeibe injektáltuk. A mintákat inkubátorba helyeztük (37 °C, 5% CO₂), és 2 napon át ott tartottuk, miközben a médiumot 24 óra elteltével lecseréltük, és a szövethez friss transzfekciós mixet tartalmazó médiumot adtunk. 2 nap után a bőrszöveteket lizáltuk: a folyékony nitrogénben fagyasztott mintákat dörzsmozsárban szétörtük, majd potterben homogenizáltuk lízis puffer (10 mM HEPES, pH 7,9, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 10% (V/V) glicerin, 1% NP-40) jelenlétében. A fehérje koncentrációkat ezúttal is BCA esszével határoztuk meg. Végül a MYPT1-csendesítés fehérje expresszióra és

foszforilációra gyakorolt hatásának tanulmányozása érdekében a lizátumokat Western blottal vagy humán MAPK Protein Profiler array (Research and Diagnostic Systems, Minneapolis, MN, USA) segítségével vizsgáltuk meg. Utóbbi esetben a gyártó által megadott protokollt követtük.

3.6. MTT sejtleletképességi vizsgálat

Az inhibitoros kezelésnek, illetve a MYPT1-csenedesítésnek a HaCaT vagy B50 sejtek életképességére gyakorolt hatását metil-tiazol-tetrazólium (MTT) esszével tanulmányoztuk. A sejteket 96-lyukú plate-en konfluens állapotig növesztettük, majd 24 órán át szérumentes DMEM-ben tartottuk. Ezt követően a sejteket kezeltük a megfelelő inhibitorokkal: a B50 sejteket 5 μ M tautomycetinnel (TMC) vagy 10 μ M H1152-vel 1 órán keresztül, míg a HaCaT sejteket 1 μ M tautomycinnel (TM) vagy 10 μ M H1152-vel 12 órán át. Az inhibitorokat 10% (V/V) FBS-t tartalmazó DMEM-ben hígítottuk. A kezelés letelte után a médiumot leszívtuk, és a lyukakba 100-100 μ l szérumentes DMEM-et, és 10-10 μ l 5 mg/ml koncentrációjú MTT oldatot (3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólium-bromid PBS-ben oldva) pipettáztunk. A sejteket mintegy 30 percre újból inkubátorba helyeztük (37 °C, 5% széndioxid), majd 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.

3.7. Kaszpáz esszé

A kaszpáz-3 enzim az apoptózis folyamatának egyik effektor enzime, aktivitásának mérésével képet kaphatunk arról, hogy az egyes inhibitorok (TM, H1152) illetve a MYPT1-csenedesítés milyen mértékben indukálnak apoptotikus sejtpusztulást. A kaszpáz-3 aktivitásmérési során az enzim az Ac-DEVD-AMC szubsztrát (Calbiochem, San Diego, CA, USA) hasításával fluoreszcens AMC-t szabadít fel, melynek intenzitását fluoriméterrel mérjük. A HaCaT sejteket 6 lyukú tenyésztőedényben konfluens állapotig növesztettük. A kezelést (1 μ M TM, 10 μ M H1152, 12 óra) vagy a csenedesítést követően a sejteket jégen felkapartuk, Eppendorf csőbe pipettáztuk és 13000 g-n 15 másodpercig centrifugáltuk. A felülúszót leszívtuk, majd a pelletet PBS-sel mostuk. A sejtekhez 220 μ l jéghideg lízis puffert (10 mM HEPES, pH 7,25, 2 mM EDTA, 0,1% (V/V) CHAPS, 1 mM PMSF, 5 mM DTT, 1x proteáz inhibitor mix) mértünk, a sejteket a pufferben szuszpendáltuk, és a csöveket 10 percig jégen állni hagytuk. Ezután a mintákat 13000 g-n 4 °C-on 3 percig centrifugáltuk, majd a felülúszókat (~200 μ l) új Eppendorf csövekbe pipettáztuk és 200 μ l 2x reakció puffert (200 mM HEPES, pH

7,25, 20% (m/V) szacharóz, 0,1% (V/V) CHAPS, 5 mM DTT) mértünk hozzájuk, melyhez előzőleg Ac-DEVD-AMC szubsztrátot adtunk. 1 ml pufferbe 2 µl szubsztrát került. A csöveket 60 percre 37 °C-os vízfürdőbe helyeztük, az 1 óra lejárta után pedig 100 µl mennyiségeket pipettáztunk mindegyik mintából triplikátumokban. Az AMC fluoreszcenciáját 360 nm gerjesztési, és 460 nm emissziós hullámhosszon mértük Fluoroskan FL készülékkel (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

3.8. Western blot analízis

A HaCaT vagy B50 teljes sejtes lizátumokat forró 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. A fehérjéket poliakrilamid gélelektroforézissel molekulatömeg szerint elválasztottuk, majd nitrocellulóz membránra (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) transzferáltuk. A membránt 2 órán át szobahőmérsékleten, rázatás mellett 5%-os (m/V) marhaszérum-albumin (BSA) oldatban inkubáltuk, a BSA-t 0,1% (V/V) Tween-20-at tartalmazó Tris pufferben (TBS: 136 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 25 mM Tris-HCl, pH 7,4) oldottuk fel. A szabad kötőhelyek BSA-val történő blokkolása után a membránokat elsődleges antitestekkel egy éjszakán át 4 °C hőmérsékleten inkubáltuk. Az antitesteket 0,5% (m/V) BSA/0,1% Tween-20-at tartalmazó TBS (TBST) oldatban hígítottuk a 3. táblázatban jelölt arányban. A membránokat 3-szor 10 perc TBST-vel való mosás után 2 órán keresztül a megfelelő másodlagos antitestekkel inkubáltuk, majd a membránokat 2-szer 10 percig TBST-vel, és 1-szer 10 percig TBS-sel mostuk. A detektáláshoz SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate Kitet (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) használtunk és FluorChem FC2 Imager (Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA) vagy ChemiDoc Touch Imaging System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) készülékkel vizualizáltunk. Bizonyos esetekben röntgenfilmet használtunk (AGFA HealthCare NV, Mortsel, Belgium). A sávok intenzitását ImageJ programmal (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) határoztuk meg.

3.9. Protein foszfatáz aktivitásmérési vizsgálat

Protein foszfatáz aktivitásmérési esszével vizsgáltuk az inhibitorok, illetve a MYPT1-csendesítés hatását a sejtek protein foszfatáz aktivitására. Konfluens és over-night szérum-éheztetett sejteket 48 órán át siRNS-sel (lásd 3.6. pont) vagy 1 órán keresztül inhibitorokkal kezeltünk. A HaCaT és NHEK sejteket 1 µM TM-mel vagy 10 µM H1152-vel, míg a B50 sejteket 5 µM TMC-vel vagy 10 µM H1152-vel kezeltük. A kezelések letelte után a sejteket lízis pufferben (50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 1%

(V/V) Triton X-100, 0,5% (V/V) proteáz inhibitor mix) tártuk fel. A lizátumokat 15000 rpm fordulatszámon 10 percen keresztül centrifugáltuk, majd a felülúszókat 0,1% β -merkaptóetanolt tartalmazó 20 mM koncentrációjú Tris-HCl (pH 7,4) pufferben a háromszorosára hígítottuk, és 1 μ M 32 P-jelölt pulykazúza miozin 20 kDa könnyű láncának (32 P-MLC20) jelenlétében 30 °C-on analizáltuk. A 32 P-MLC20 preparátumot munkacsoportunk egy korábbi protokoll alapján készítette el (Erdődi et al., 1995), a γ -[32 P]ATP-t pedig az Izotóp Intézet Kft.-től rendeltük. A mintákat a 30 °C-os vízfürdőben 1 percig előmelegítettük, és ezután hozzájuk adtuk a szubsztrátot. 20-60 másodperc inkubáció után a reakciót 200 μ l 10% (V/V) triklórecetsav (TCA) és 200 μ l 6 mg/ml BSA hozzáadásával állítottuk le. A kicsapódott fehérjét centrifugálással (10000 rpm, 3,5 perc) összegyűjtöttük és a reakció során felszabadult radioaktívan jelölt foszfátot (32 P_i) a 370 μ l felülúszóból szcintillációs számlálóval (Perkin Elmer) határoztuk meg. A foszfátáz aktivitást a minták fehérjetartalmához normalizáltuk, a kezelt minták aktivitását pedig a kontroll érték %-ában adtuk meg.

3.10. Karcolási (scratch) vizsgálat

A tautomycin (TM) és a H1152 kezelés, illetve a MYPT1 csendesítés humán keratinociták migrációs képességére kifejtett hatását karcolási (scratch) vizsgálatokkal tanulmányoztuk. 96-lyukú tenyésztőedényben a HaCaT sejteket konfluens állapotig növesztettük, majd Tecan Freedom EVO 150 géppel (Tecan Group Ltd., Männedorf, Svájc) minden lyukban egyforma széles karcolatot ejtettünk a robotkar segítségével. Inhibitoros kezelés esetén a TM-et 1 μ M, míg a H1152-t 10 μ M végkoncentrációban alkalmaztuk. Karcolás után a sejteket 24 órán át növesztettük. A sejteket szulforodamin B festékkel festettük – az SRB sejtproliferációs vizsgálat elvégzése (lásd. 3.12. pont), illetve a sejtek láthatóbbá tétele érdekében – majd Leica DM IL LED mikroszkóppal (Leica Camera AG, Wetzlar, Németország) fotókat készítettünk a karcolatokról. A kezelések során a negatív kontrollhoz 0% FBS-t tartalmazó DMEM-et adtunk, ahol a végső karcolat mérete megegyezett a kiindulási karcolat méretével. A pozitív kontroll sorozathoz 10% FBS/DMEM-et adtunk, míg a kísérleti kezelésnél az inhibitorokat ugyancsak 10% FBS-t tartalmazó DMEM-ben hígítottuk.

A MYPT1 csendesítés sejtmigrációra gyakorolt hatásának vizsgálata során a kontroll sejteket non-target siRNS-sel transzfektáltuk (siNT), míg a MYPT1-csendesített sejtekbe siMYPT1 dupla szálú RNS-t juttattunk be (lásd 3.6. pont – géncsendesítés). A sejtek konfluens állapotban tapadtak le a 96-lyukú tenyésztőedényben. A transzfekció kezdete után 24 órával ejtettük a karcolatot, majd a karcolás és médiumcsere után még további 24 órán át növesztettük a keratinocitákat. A végső karcolatok méretét ImageJ szoftverrel (National Institutes of Health,

Bethesda, MD, USA) határoztuk meg. A szabad területek nagyságát minden esetben a kontrollhoz viszonyítottuk, azt 100%-nak véve.

3.12. SRB proliferációs vizsgálat

A humán keratinociták proliferációját szulforodamin B (SRB) esszével tanulmányoztuk. Célunk a TM és a H1152 kezelés, illetve a MYPT1-csendesítés hatásának vizsgálata volt a sejtek proliferációjára. A HaCaT sejtekhez a karcolási vizsgálatot követően (lásd 3.11. pont) jéghideg triklórecetsavat (TCA) adtunk 10% (V/V) végkoncentrációban, 4 °C-on 1 órán át inkubáltuk, majd mostuk és szárítottuk őket. A lyukakba 100-100 µl 0,4% (m/V) SRB-t tartalmazó 1%-os ecetsav oldatot pipettáztunk, a tenyésztőedényt 10 percig szobahőmérsékleten hagytuk, majd a nem kötődött festéket 1% ecetsav oldattal történő mosással távolítottuk el. A scratch esszé kiértékeléséhez a karcolatokról Leica DM IL LED mikroszkóppal (Leica Camera AG, Wetzlar, Németország) fényképeket készítettünk (lásd 3.11. pont), majd a kötött SRB-t 10 mM Tris bázissal szolubilizáltuk, és az abszorbancia értékeket 540 nm hullámhosszon Multiskan GO Microplate Spectrophotometer készülékkel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) határoztuk meg.

3.13. JuLI™ valós idejű (real-time) sejtvizsgáló készülék

Konfluens HaCaT sejt kultúrát 100 µl-es steril pipettaheggyel megkarcoltunk, a PBS-sel mostunk és 10% FBS-t tartalmazó DMEM-ben tenyésztettük. Inhibitoros kezelés és azok kontrollja esetén a sejteket a karcolást megelőző 24 órán át 0% FBS/DMEM-ben inkubáltuk, a tautomycint 1 µM, míg a H1152-t 10 µM végkoncentrációban a karcolást követően adtuk a hozzájuk. A MYPT1-csendesített sejtek kontrollját a non-target siRNS-sel transzfektált keratinociták (siNT) adták. Ebben az esetben a sejteket a csendesítés kezdete után 24 órával karcoltuk meg, és a karcolás előtt nem volt szérum-éheztetés. A megkarcolt keratinocita sejteket inkubátorban található JuLI™ Br készülékkel (NanoEnTek, Szöul, Dél-Korea) vizsgáltuk, mely 24 órán keresztül óránként készített felvételt a sebzárodás állapotáról. A karcolatok méretét ImageJ-vel (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) határoztuk meg. Ezután diagramot készítettünk, ahol az X tengelyen a karcolás után eltelt időt ábrázoltuk, míg az Y tengelyen az adott idő alatt benőtt területet.

3.14. Electric cell-substrate impedance sensing (ECIS)

Az electric cell-substrate impedance sensing (ECIS) készülékkel (Applied Biophysics) a MP és a ROK sebzárodásban játszott szerepét tanulmányoztuk. A készülék a sejtrétegen sebet éget, majd a terület benövését és a sejt-sejt kapcsolatok helyreállítását az impedancia folyamatos monitorozásával követi nyomon. A non-target RNS-sel (NT siRNS), illetve siMYPT1-gyel

transzfektált HaCaT sejteket 8W10E ECIS 8 elektródás tenyészedényben növesztettük, ahol egyrétegű monolayert alkottak. A 48 órás MYPT1-csendesítést követően az elektródok felületén kiégettük a sejteket 5 mA áramerősségű és 60 kHz frekvenciájú elektromos impulzust kétszer 30 másodpercig alkalmazva. Az égetés után nyomon követtük az impedancia változását. A sejtréteg integritásának helyreállítását az impedancia plató maximális értéke jelentette, és ezt az időtartamot mind a non-target kontroll, mind a MYPT1-csendesített sejtek esetében megmértük. A PP1 és a ROK sejtmigrációra gyakorolt hatását inhibitorokkal is tanulmányoztuk: a HaCaT sejtekhez égetés után 1 μM tautomycint vagy 10 μM H1152-t adtunk, és a sejteket az inhibitorok jelenlétében növesztettük.

Az impedancia mérésével a HaCaT sejtek barrier funkcióját is tanulmányoztuk, ebben a kísérleti elrendezésben a monolayert nem égettük ki. A MYPT1 csendesítése után 24 órával egyes cellákba 2,4 mM Ca^{2+} -ot is adtunk, hogy a kalcium által indukált differenciáció barrier funkcióra kifejtett hatását is tanulmányozzuk. Az impedancia mérését a kalcium hozzáadása után 17 órával kezdtük meg. Mind a siRNS-sel transzfektált, mind az inhibitorokkal kezelt sejtek esetében az impedancia valós idejű (real-time) nyomon követése legalább 6 órán keresztül történt.

3.15. Immunfluoreszcencia

HaCaT és B50 sejteken egyaránt végeztünk immunfluoreszcens vizsgálatot. A lépések nagyon hasonlóak voltak, de a kísérlet részleteiben akadtak eltérések a felhasznált anyagok tekintetében, így a két sejtvonalat külön tárgyalom.

Konfluens HaCaT sejtkultúrát pipettaheggyel karcoltunk, és a korábban részletezett módon siMYPT1 vagy non-target RNS-sel transzfektáltunk, vagy karcolást követően inhibitorokkal (TM, H1152) kezeltünk. 24 órával a karcolás után a sejteket PBS-sel mostuk, és 4% (m/V) paraformaldehid/PBS oldattal fixáltuk (15 perc inkubáció szobahőmérsékleten), majd az üveglapokat háromszor 5 percen keresztül PBS-sel mostuk. Ezután a sejteket 10 percig szobahőn 0,2% (V/V) Triton X-100/PBS oldattal permeabilizáltuk. Ezt követően a sejteket 1 órán keresztül 4 °C-on 1% (V/V) lószérum/PBS oldatban (továbbiakban *blokkoló oldat*) blokkoltuk. A mintákat vizes kamrában 60-60 μl , blokkoló oldatban 1:250 arányban hígított anti- β -katenin elsődleges antitesttel 4 °C-on egy éjszakán át inkubáltuk. A sejteket háromszor 5 percig PBS-sel mostuk, majd 1:200 arányban hígított Alexa Fluor 488-konjugált anti-rabbit antitesttel, illetve Texas Red-X phalloidinnel 2 órán át 4 °C-on inkubáltuk. Háromszor 15 perc PBS mosást követően a sejtmagokat 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) 1 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációjú oldatával festettük meg. Végül az üveglapokat ismét 2x5 percig mostuk PBS-

sel, majd ProLong Gold Antifade médium (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) segítségével tárgylemezen (VWR, Radnor, PA, USA) fixáltuk őket.

A keratinociták közötti tight junction tanulmányozása érdekében a zonula occludens 1 (ZO-1) fehérjét is festettük. Az anti-ZO-1 elsődleges antitestet a gyártó instrukcióinak megfelelően 7,5 µg/ml koncentrációban alkalmaztuk. A ZO-1 festés esetében a fenti protokollt annyiban módosítottuk, hogy permeabilizáláshoz 0,02% (V/V) Triton X-100/PBS-t alkalmaztunk, míg blokkoló oldatként 1% BSA/PBS-t használtunk, és az antitesteket is ebben hígítottuk.

A B50 sejtek esetében csak azokat a pontokat emelem ki, melyek eltértek a HaCaT sejteken végzett immunfluoreszcenciás festéstől. A B50 neuroblasztómákat speciális, kollagénnel borított üveglapokon – BioCoat Collagen Type I Cellware coverslips (Corning Inc., Corning, NY, USA) – növesztettük a maximális letapadás érdekében., és felszálló alkohol sorral fixáltuk: az üveglapokat 10-10 percig -20 °C-on 70%-os, 80%-os, végül 96%-os etanol oldatban inkubáltuk. A mosási lépéseket TBS-sel végeztük, a Triton X-100-at és a lószérumot is TBS-ben hígítottuk, a blokkoló oldat 1% lószérum/TBS volt. A B50 sejteket anti-SNAP-25, illetve anti-MYPT1 antitestekkel inkubáltuk (1:200 hígítás blokkoló oldatban). A másodlagos antitestek Alexa Fluor 488-konjugált anti-rabbit és Alexa Fluor 546-konjugált anti-mouse voltak, melyeket szintén 1:200 arányban hígítottuk be. A megfestett HaCaT és B50 sejteket végül Leica X8 konfokális mikroszkóppal (Leica Microsystems, Wetzlar, Németország) vizsgáltuk.

3.16. Immunprecipitáció

Protein A-Sepharose (PAS) gyantához (GE Healthcare, Little Chalfont, Egyesült Királyság) anti-SNAP-25, anti-MYPT1¹⁻²⁹⁶, vagy anti-PP1cδ antitestet kötöttünk úgy, hogy a PAS-t és az adott antitestet 1 órán keresztül 4 °C hőmérsékleten immunprecipitációs (IP) puffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% (V/V) Triton X-100) jelenlétében inkubáltuk, az Eppendorf csövek forgatása mellett. Ezzel párhuzamosan a B50 lizátumot előtisztítottuk: a sejt-lizátumot PAS-sal együtt inkubáltuk ugyancsak 4 °C-on, 1 órán át, forgatás mellett. Így a PAS-hoz aspecifikusan kötődő fehérjéktől megszabadultunk. Az Eppendorf csöveket centrifugáltuk (900 g, 4 °C, 3 perc), a PAS-antitest komplex felülúszóját eltávolítottuk, majd a komplexhez hozzáadtuk az előtisztított B50 lizátumot. Ezután újabb, 4 °C-on történő inkubáció következett 90 percen keresztül, melynek során az antitestekhez bekötődtek a megfelelő fehérjék, melyek más kölcsönható partnereket is magukkal húztak. Centrifugálás után (minden egyes ilyen lépést 4 °C-on, 3 percig, 900 g-vel végeztünk), a felülúszókat eltávolítottuk, és a PAS-antitest-kikötődött fehérje komplexeket kétszer átmostuk

IP pufferrel, egyszer pedig PBS-sel. Végül a gyantát 100 °C-on 5 percig főztük 1x SDS-PAGE mintapufferrel (10% (V/V) glicerin, 5% (V/V) β-merkaptotanol, 2% (m/V) SDS, 0,01% (m/V) brómfenolkék, 0,0625 M Tris, pH 6,8). A mintákból Western blotot végeztünk, hogy kiderítsük, a SNAP-25 kölcsönható partnere-e a miozin foszfatáz alegységeinek.

A sebzáródás projekt keretében az Akt1 és Akt2 immunprecipitációjára is sor került HaCaT sejtek lizátumából, abból a célból, hogy a MYPT1-csendesítés Akt foszforilációra gyakorolt hatását a két izoforma esetében külön-külön is tanulmányozni tudjuk. Az alkalmazott protokoll az alábbiakban tér el az előzőekben leírtaktól: a kontroll (NT siRNS-sel transzfektált) és MYPT1-csendesített HaCaT sejteket lízis pufferben (50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 1% (V/V) Triton X-100, proteáz inhibitor mix, foszfatáz inhibitor mix) feltártuk. 100 mg PAS-t 1 ml TBS-sel előinkubáltunk (forgatás, 4 °C, 30 perc), majd 100-100 µl gyantát a lizátumokhoz adtunk és újabb 30 percig inkubáltuk őket 4 °C-on forgatás mellett, előtisztítás céljából. Centrifugálás után (minden ilyen lépés esetében a paraméterek: 3 perc, 4 °C, 800 g) 400-400 µl lizátumot 1:50 arányban hígított anti-Akt1 vagy anti-Akt2 antitest (Cell Signaling, Danvers, MA, USA) jelenlétében inkubáltunk 4 °C-on 2 órán át, forgatás mellett. Végül 100-100 µl PAS-t mértünk a fehérje-antitest komplexekhez, és 4 °C-on egy éjszakán át forgattuk őket. Másnap az Eppendorf csöveket lecentrifugáltuk, a felülúszót eltávolítottuk, és a PAS-t kétszer binding pufferrel (300 mM Tris, pH 7,4, 1,5 M NaCl, 10 mM EDTA, 1% (V/V) Triton X-100, proteáz inhibitor mix, foszfatáz inhibitor mix), egyszer pedig TBS-sel mostuk. A TBS teljes leszívása után a fehérjéket forró 1x SDS mintapufferrel eluáltuk (100 °C, 5 perc).

3.17. Fehérje termeltetés és tisztítás

TsA201 emlős sejtekbe Flag-SNAP-25 vagy Flag-KEPI fehérjét kódoló plazmidot (GeneCopoeia, Rockville, MD, USA) juttattunk be polietilénimin (PEI) segítségével. 15 µg plazmidot, illetve 30 µl PEI-t 500-500 µl steril 150 mM NaCl-oldatban hígítottunk, majd 5 perc állás után csepegtetve egymáshoz adtuk őket. A transzfekciós mixet 30 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten, majd a 10 cm átmérőjű Petri-csészében lévő, a felületet kb. 50-60%-ban benövő tsA201 sejtekhez adtuk: 4 ml szérumentes DMEM-hez csepegtetve adtuk hozzá az 1 ml mixet. 6 óra elteltével a Petri-csészébe még belemértünk 5 ml 20% FBS-t tartalmazó DMEM-et. A sejteket a transzfekció kezdete után 24 órával lizáltuk, a lízis puffer összetétele: TBS, 1% (V/V) Triton X-100, 1x proteáz inhibitor mix. A termeltetett fehérjét Anti-Flag M2 affinitási géllal tisztítottuk: a gyöngyöket háromszor átmostuk TBS-sel, majd 180 µl gyöngyöt 900 µl lizátummal együtt inkubáltunk 2 órán át 4 °C hőmérsékleten, az Eppendorf csövek forgatása mellett. Centrifugálás (800 g, 3 perc, 4 °C) után a felülúszót eltávolítottuk, a gyöngyöket háromszor mostuk TBS-sel, majd a kikötött fehérjéket 300 µg/ml Flag-

peptid/TBS-sel eluáltak (forgatás egy éjszakán át 4 °C-on). Centrifugálás után a felülúszót (= eluátum) leszívtuk a gyantáról és új Eppendorf csőbe pipettáztuk át, a fehérjekoncentrációt pedig Bradford-módszerrel határoztuk meg. A tisztaságot poliakrilamid gélelektroforézissel és Coomassie Brilliant Blue-val történő gélfestéssel ellenőriztük.

3.18. *In vitro* protein kináz esszé

A kísérlet során a tisztított Flag-SNAP-25 fehérje ROK általi *in vitro* foszforilációját vizsgáltuk. 5 µM Flag-SNAP-25 fehérjét 120 percig 30 °C-os vízfürdőben inkubáltunk 20 ng/µl ROK enzimmel (Millipore, Billerica, MA, USA), 1 mM γ -[³²P]ATP-vel (Izotóp Intézet Kft., Budapest, Magyarország) és 1 µM mikrocisztin-LR (Máthé et al., 2009) protein foszfatáz inhibitorral, ROK esszé puffer (25 mM β -glicerofoszfát, 0,5 mM EGTA, 0,5 mM DTT, 5 mM MgCl₂, 20 mM MOPS, pH 7,2) jelenlétében. A kontroll mintához nem adtunk ROK-ot. A reakciót forró 5x SDS-PAGE mintapuffer hozzáadásával állítottuk le, és a mintát még 5 percig főztük 100 °C-on. Poliakrilamid gélelektroforézist követően a beépült foszfátot autoradiográfias módszerrel detektáltuk.

3.19. Protein foszforilációs és defoszforilációs vizsgálat

TsA201 sejtekben Flag-SNAP-25 fehérjét termeltettünk. A sejteket lizáltuk, majd a lizátumot 4 °C-on, 2 órán át, forgatás mellett Anti-Flag M2 affinitási géllal (Sigma, St. Louis, MO, USA) inkubáltuk. A gyantát háromszor mostuk TBS-sel, az egyes mosási és leszívási lépések között az Eppendorf csöveket 4 °C hőmérsékleten, 900 g-vel 3 percig centrifugáltuk. A mosás után az affinitási gélhez hozzáadtuk a ROK enzimet 20 ng/µl végkoncentrációban, illetve az ATP-t 0,5 mM végkoncentrációban. Mindezeket ROK esszé pufferben hígítottuk (ennek összetételét lásd az előző pontban), mely 1 µM mikrocisztin-LR-t is tartalmazott. Egy kontroll mintát is összeállítottunk, mely a ROK kivételével valamennyi összetevőt tartalmazta. A csöveket 30 °C-os vízfürdőbe helyeztük 30 percre. Ezt követően az Eppendorf csöveket centrifugáltuk, a felülúszót leszívtuk, és a gyantát háromszor mostuk TBS-sel. A ROK foszforilált mintát kettéosztottuk két Eppendorf csőbe, az egyik csőhöz csak TBS-t adtunk, míg a másik mintához hozzáadtuk a miozin foszfatáz holoenzim alegységeit: 25 nM tisztított Flag-MYPT1-et, illetve 5 nM rekombináns PP1c δ katalitikus alegységet, TBS-ben hígítva. A csöveket ismét 30 °C-os vízfürdőbe helyeztük, ezúttal 15 percre. Ezután a gyantát TBS-sel mostuk, majd 1x SDS-PAGE mintapufferrel főztük. A foszforiláció és a defoszforiláció sikerességét Western blottal ellenőriztük anti-Flag és anti-foszfo-SNAP-25 (Thr138) elsődleges és Clean-Blot (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) másodlagos antitestek felhasználásával.

3.20. Tömegspektrometria

A megfelelő fehérjesávokat sertés tripszin segítségével gélből proteolitikusan emésztettük. A peptidkeverék kb. 80%-át ezután titán-dioxidos (TiO₂) foszfopeptid-dúsításnak vetettük alá (Larsen et al., 2005). A foszfopeptid frakciókat, valamint a megmaradt kb. 20%-nyi eredeti peptidkeveréket folyadékkromatográfiás-tömegspektrometriával (LC-MS/MS) analizáltuk Orbitrap Elite tömegspektrométer készülékkel. Az MS/MS adatokból PAVA szoftverrel készítettünk csúcslistát (Guan et al., 2011). Az adatokat ProteinProspector keresőmotorral összehasonlítottuk a Swissprot adatbázisban található humán adatokkal. A keresési paramétereink a következők voltak: enzim: tripszin, maximum egy hiányzó hasítással; fix modifikáció: cisztein karbamidometiláció; változó módosítások (peptidenként maximum 2): acetiláció a fehérje N-terminusán, metionin oxidáció, piroglutaminsav képződés (N-terminális glutamin); tömegpontosság: 5 ppm a prekursorok és 0,8 Da a fragmens ionok esetében. Ezt követően a megbízhatóan azonosított peptidekkel egy újabb szűrést végeztünk a fenti keresési paramétereket használva, azzal a módosítással, hogy ezúttal két hiányzó hasítást engedélyeztünk, illetve a változó módosítások körébe a Ser/Thr foszforilációt is belevettük, és peptidenként maximum 3 változó modifikáció volt megengedve. Minden keresés esetében az alábbi elfogadási kritériumokat használtuk: fehérje azonosításkor a pontszám (score) legyen nagyobb, mint 22, az E-érték pedig kisebb, mint 0,01; míg peptid azonosítása esetén: pontszám>15, E-érték<0,05. A foszfopeptidek foszforilációs helyének beazonosításakor az ún. SLIP pontszám küszöbértéke 6 volt, ez a helymeghatározás 95%-os pontosságának felel meg (Baker et al., 2011).

3.21. Szinaptoszóma preparálás

A szinaptoszóma preparáláshoz egy korábban leírt protokollt használtunk (Dunkley et al., 1988) néhány módosítással. C3H egereket szén-dioxid inhalációval eutanizáltunk, majd dekapitációt követően agypreparátumot készítettünk. A kortextet különválasztottuk az agy többi részétől, majd az agykéreg darabokat lemértük táramérlegen. A kortexhez jéghideg homogenizáló oldatot adtunk (1 g kortexhez 10 ml-t), melynek összetétele a következő volt: 0,32 M szacharóz, 1,0 mM EDTA, 0,25 mM DTT, pH 7,4. Üveg homogenizátorral (potter) homogenizáltuk az agykérget, majd a szuszpenziót Allegra X-12R centrifugával (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) 1000 g-vel 4 °C hőmérsékleten 10 percig centrifugáltuk. A felülúszót 12 ml-re egészítettük ki homogenizáló oldattal. Polikarbonát csövekben Percoll-grádienszt állítottunk össze oly módon, hogy előbb a csövekbe mértünk 2 ml 23% (V/V) Percoll/homogenizáló oldatot, majd erre 2 ml 15%-os, majd 2 ml 10%-os, végül 2 ml 3%-os Percollt rétegeztünk. A Percoll grádiensre végül 2 ml-t rétegeztünk az előbbi centrifugálási

lépés felülúszójából. A polikarbonát csöveket 32500 g-vel 5 percig 4 °C-on centrifugáltuk Beckman L7-55 ultracentrifugával (Beckman Instruments Inc., Fullerton, CA, USA. A 10/15%-os, illetve a 15/23%-os fázisok határán lévő frakciókat négyszeres térfogatú Krebs-pufferrel (118 mM NaCl, 5 mM KCl, 25 mM NaHCO₃, 1 mM MgCl₂, 10 mM D-glükóz, pH 7,4) hígítottunk, majd 12600 g-n 25 percig 4 °C-on centrifugáltuk. A felülúszó leszívása után a pelletet reszuszpendáltuk Krebs-pufferben, és ismét centrifugáltuk 12600 g-vel, 4 °C-on, 20 percig. Végül a szinaptoszóma pelletet 3 ml Krebs-pufferben reszuszpendáltuk, és azonnal hozzáfektünk a Flag-KEPI fehérje bejuttatásához (lásd következő pont).

3.22. Flag-peptid és Flag-KEPI fehérje bejuttatása a szinaptoszómákba

A tisztított Flag-KEPI (lásd 3.17. pont) fehérjét Nichols és munkatársai által leírt módon (Nichols et al., 1989), fagyasztásos-felolvasztásos módszerrel juttattuk be a szinaptoszómákba. A szinaptoszómákat reszuszpendáltuk HBS pufferben (142 mM NaCl, 2,4 mM KCl, 1,2 mM K₂HPO₄, 1 mM MgCl₂, 5 mM D-glükóz, 0,1 mM EGTA, 10 mM HEPES), mely 25% (V/V) 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. Az Eppendorf csöveket szárazjég-izopropanol hűtőkeverékbe helyeztük 3 perc erejéig (fagyasztási lépés), ezt követően pedig 10 percre 4 °C-os vízfürdőbe (felolvasztás). Az olvasztás végeztével a csöveket centrifugáltuk (4000 g, 3 perc, 4 °C), és a pelletet kétszer mostuk Krebs-pufferrel. Végül a szinaptoszómákat felvettük Krebs-pufferben, 1,2 mM CaCl₂-ot és 30 mM KCl-ot adtunk hozzájuk a membrán depolarizációja céljából, és a mintákat 30 percre 30 °C-os vízfürdőbe helyeztük. Ezután a csövek tartalmát kettéosztottuk, az egyik sorozatból Western blotot végeztünk, hogy megvizsgáljuk, hogyan hatott a Flag-KEPI transzdukción a SNAP-25 foszforilációjára, míg a másik sorozatot exocitózis esszének (lásd 3.23. pont) vetettük alá.

3.23. Exocitózis esszé

Az FM 2-10 festék a szinaptoszóma kettős membránjának külső membránrétegéhez kötődik reverzibilisen, és a festék membránkötött állapotban fluoreszcenssé válik. Endocitózissal az FM 2-10 bejut a szinaptoszómába, majd az ezt követő exocitózissal kiürül, mely által fluoreszcenciáját elveszti, így a neurotransmitter-kibocsátással párhuzamosan a fluoreszcencia intenzitás csökken (Cousin és Robinson, 1999). Ilyen módon az exocitózis esszével megvizsgálhatjuk, hogy a Flag-KEPI fehérje bejuttatásának van-e valamilyen hatása a neurotransmitter-kibocsátásra.

Az esszé kivitelezéséhez a *Cousin* és *Robinson* által leírt protokoll (*Cousin* és *Robinson*, 2000) *Lontay* és munkatársai által módosított (*Lontay* et al., 2012), high-throughput változatát alkalmaztuk. A Krebs-pufferben felszuszpendált szinaptoszómákat tartalmazó Eppendorf csöveket 3 percre 37 °C-os vízfürdőbe helyeztük, majd a csövekbe 1-1 µl FM 2-10 festéket pipettáztunk. Összerázás után a csöveket újabb 1 percre visszahelyeztük a vízfürdőbe, majd KCl 30 mM végkoncentrációban történő hozzáadásával stimuláltuk az FM 2-10 felvételét a szinaptoszómákba. Újabb 2 perc 37 °C-on történő inkubáció után (festék internalizáció) az Eppendorf csöveket centrifugáltuk (1000 g, szobahő, 1 perc), és a pelletet 400-400 µl Krebs-pufferben reszuszpendáltuk, melyhez CaCl₂-ot adtunk 1,2 mM végkoncentrációban. Ebből 100-100 µl mennyiségeket fekete 96-lyukú plate (Corning, Corning, NY, USA) 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).

3.24. Agyszeletek preparálása és kezelése

8-30 napos C3H egereket szén-dioxiddal eutanizáltunk, dekapitáltuk őket, és agypreparátumokat készítettünk. Microm HM 650 V vibratóm (Microm International, Walldorf, Németország) segítségével az agykéregből 200 µm vastagságú szeleteket metszettünk. A művelet közben az agyat módosított – alacsony nátriumion tartalmú – mesterséges cerebrospinális folyadékban tartottuk. Ennek összetétele: 25 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 26 mM NaHCO₃, 10 mM glükóz, 1,25 mM NaH₂PO₄, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 3 mM mio-inozitol, 0,5 mM aszkorbinsav, 2 mM nátrium piruvát, 130 mM szacharóz és 60 mM glicerin, pH 7,2. Az agyszeleteket Millicell CM tenyésztőedény inzertekbe (Millipore, Billerica, MA, USA) helyeztük, melyekbe előzőleg mesterséges cerebrospinális folyadékot (aCSF) tettünk. Az aCSF összetétele: 120 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 26 mM NaHCO₃, 10 mM glükóz, 1,25 mM NaH₂PO₄, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 3 mM mio-inozitol, 0,5 mM aszkorbinsav, 2 mM nátrium piruvát, pH 7,2. Ezután eltávolítottuk az agyszeletekről az aCSF-et, és a négy inzertbe belemértük a következőket: az első inzertbe normál aCSF-et (kontroll), a másodikba 8 mM KCl-t tartalmazó aCSF-et (depolarizációs kontroll), a harmadikba 8 mM KCl-t és 5 µM tautomycetint (TMC) tartalmazó aCSF-et, míg a negyedikbe 8 mM KCl-t és 10 µM H1152-t tartalmazó aCSF-et. Az inzerteket egy órára enyhe túlnyomásos karbogén gázt (95% O₂, 5% CO₂) tartalmazó kamrába helyeztük szobahőmérsékleten. Végül a szeleteket folyékony nitrogénben lefagyasztottuk és további felhasználásig -70 °C-on tároltuk. Később az agyszeleteket lizáltuk lízis pufferben (20 mM HEPES, pH 7,5, 0,25 mM szacharóz, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% (V/V) Triton X-100, 1x proteáz inhibitor mix, 1 µM mikrocisztin-LR) oly módon, hogy 100 µl puffert az agyszelethez mértünk, majd egyszerűen pipettával addig

szuszpendáltuk, amíg homogenizálódott. A további lépések és a Western blothoz történő mintafőzés megegyeztek a sejtek lizálásánál leírtakkal. A fehérjemérés BCA esszével történt.

3.25. Statisztikai analízis

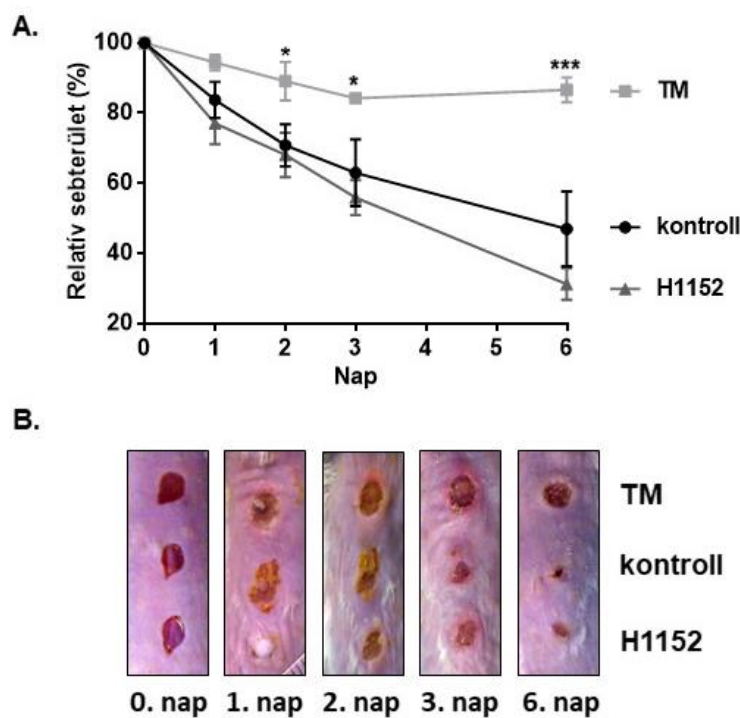
A statisztikai analízist és a diagramkészítést GraphPad Prism 6 programmal végeztük el. Az adatok statisztikai elemzése Student-féle t-teszttel vagy ANOVA teszttel történt *post hoc* Šidak- vagy Dunnett-teszttekkel. Minden diagram esetében az egyes oszlopok az átlagot, míg a hibasávok az átlag standard hibáját (SEM) jelentik.

4. Eredmények

4.1. A miozin foszfatáz szerepe a sebzáródásban

4.1.1. A PP1 és a ROK gátlásának hatása az egérbőr sebek gyógyulására

Hat-hét hetes hím Balb/c egerek hátbőrén 3-3 db azonos méretű sebet ejtettünk. A sebek teljes vastagságúak voltak, vagyis a bőr és a bőr alatti kötőszövet is sérült. A három seb egyikét 1 μ M TM-mel kezeltük a PP1 enzimek gátlása érdekében, egy másikat 10 μ M H1152-vel a ROK gátlása céljából, míg a harmadik seb kontrollként szolgált.

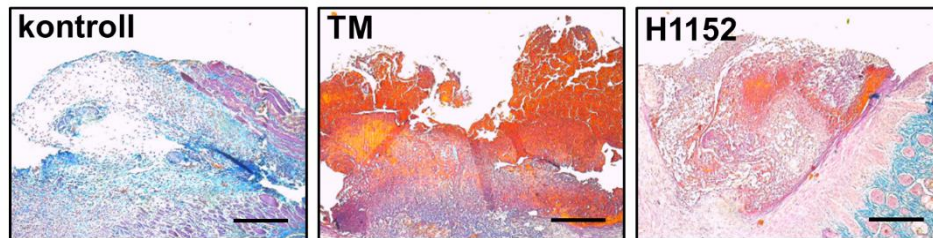


12. ábra: A PP1 gátlása megakadályozza az egérbőrön ejtett sebek gyógyulását. (A) Relatív sebterület mérete az egyes kezelések és a sebzés óta eltelt napok függvényében. $n=6$, kiértékelés kétutas ANOVA-val és post-hoc Dunnett-tesztel. $*p<0,05$; $***p<0,001$. (B) A sebekről készült fényképek (reprezentatív minták).

Célunk az volt, hogy megtudjuk, a fenti inhibitorok milyen módon befolyásolják a sebgyógyulást: gyorsítják, avagy lassítják-e a sebek bezáródását. A TM kezelés a sebgyógyulás teljes elmaradását eredményezte, a sebek mérete az eltelt 6 nap alatt alig változott (12. ábra). A TM-mel kezelt sebek területe 2 nap után kezdett el szignifikánsan különbözni a kontroll

sebekétől. A ROK gátlása a H1152 inhibitor következtében a sebzáródás kismértékű – de nem szignifikáns – gyorsulását okozta: a hatodik napra a kontroll sebek átlagos mérete a kiindulási terület kb. felére, míg a H1152-vel kezelt sebek mérete a negyedére zsugorodott.

A 6. nap után a sebeket kimetszettük, és a darabokon elvégeztük a Masson-Goldner-féle trikróm festést, hogy képet kapjunk arról, miképpen befolyásolták a kezelések a hámképződést (re-epitelizációt). A festés utáni mikroszkópos képek a 13. ábrán láthatóak.



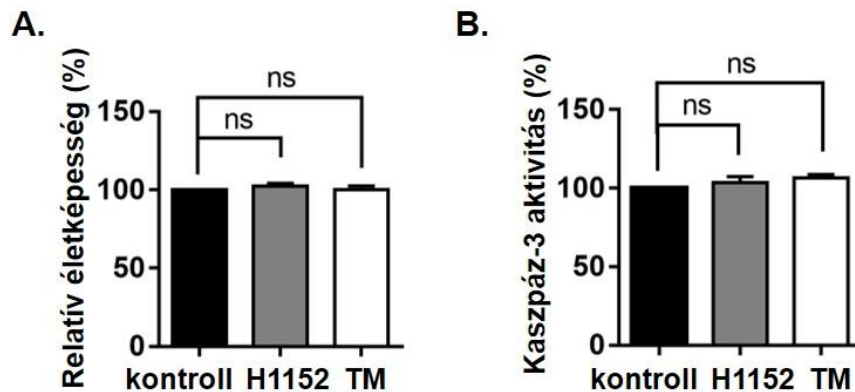
13. ábra: *Egérbőrből kimetszett sebminták trikróm festése a re-epitelizáció tanulmányozására. A kontroll, 1 μ M TM-mel, illetve 10 μ M H1152-vel 6 napon át kezelt egérsebeket a sebzés utáni 6. napon kivágtuk, majd Masson-Goldner eljárása szerint megfestettük. A sejtmagok sötétbarnák, a citoplazma és az izmok téglavörösen festődnek, míg a kötőszövet és a nyálkahártya kék. Beosztás hossza: 300 μ m.*

A TM-kezelt sebek re-epitelizációja nem indult meg, ellentétben a kontroll és a H1152-kezelt mintákkal. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a PP1 enzimeknek fontos szerepük van a sebgyógyulásban, mivel gátlásuk megakadályozza a folyamat normális végbemenetelét. Ezekben a kísérletekben a ROK gátlása nem okozott szignifikáns eltérést a kontrollhoz képest. Ugyan a sebgyógyulás kismértékű felgyorsulását tapasztaltuk a H1152 hatására, de ez a különbség ezen az egérmodellen nem volt szignifikáns, így azt a korábban közölt eredményt, miszerint a ROK gátlása gyorsítja a sebgyógyulást (Croze et al., 2016), nem sikerült igazolnunk.

4.1.2. A PP1 és a ROK gátlásának hatása a keratinociták életképességére és foszfatáz aktivitására

A következőekben a TM és a H1152 inhibitorokat humán keratinocita (HaCaT) sejt kultúrán alkalmaztuk, hogy megfigyeljük, milyen hatást gyakorolnak a keratinocita sejtek életképességére. A humán keratinocita HaCaT sejtek életképességét MTT esszével (14A. ábra), illetve kaszpáz-3 aktivitásmérési esszével (14B. ábra) is tanulmányoztuk. Éjszakán keresztüli széruméheztetett HaCaT sejteket 1 μ M TM-mel, illetve 10 μ M H1152-vel kezeltünk 12 órán

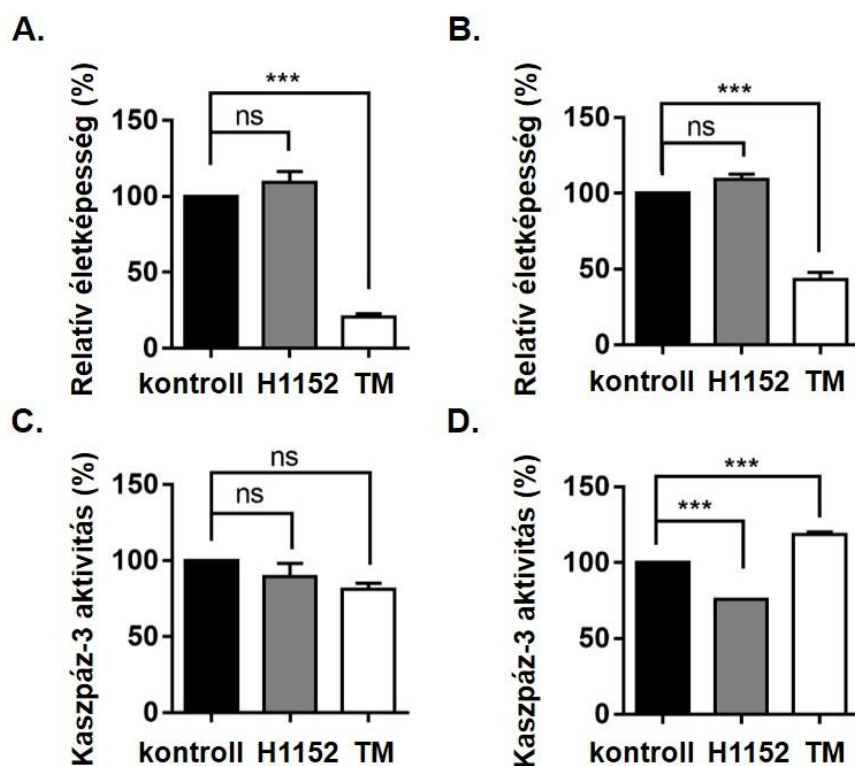
át, majd elvégeztük az életképességi vizsgálatokat az anyagok és módszerek részben leírtaknak megfelelően. Sem MTT esszével (14A. ábra), sem kaszpáz esszével (14B. ábra) nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést a kontroll, illetve a TM- és a H1152-kezelte sejtek életképessége között. Az inhibitorok nem váltottak ki apoptózist, az apoptózis indikátor kaszpáz-3 aktivitás változatlan maradt.



14. ábra: A TM és a H1152 kezelés hatása a HaCaT sejtek életképességére. (A-B) HaCaT sejteket széruméheztetést követően 1 μ M TM-mel, vagy 10 μ M H1152-vel kezeltünk 12 órán át. (A) MTT esszé. (B) Kaszpáz esszé. Mindkét kísérlet esetében az adatokat a kontroll értékekhez normalizáltuk, azt 100%-nak véve. Az ábrázolt értékek $n=6-9$ kísérlet átlagai \pm az átlag standard hibája (SEM). Statisztikai elemzés egyutas ANOVA-val és post hoc Šidak-tesztel, ns: nem szignifikáns.

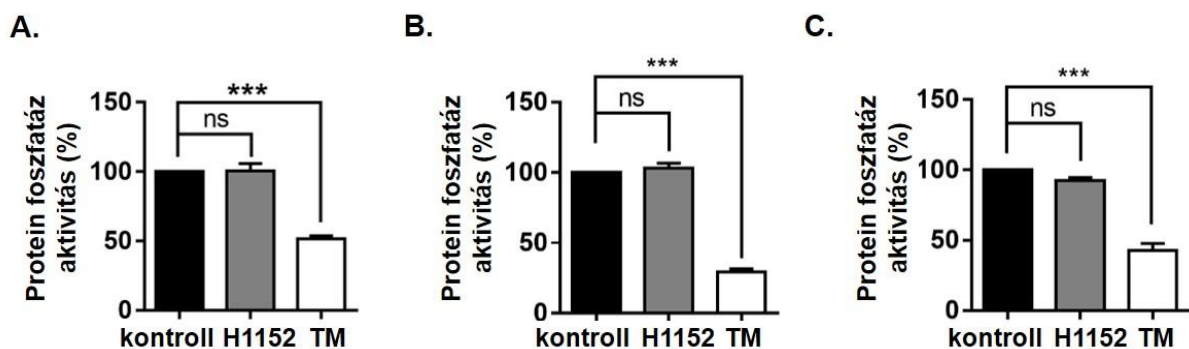
A fenti kísérleteket primer keratinocita sejteken is elvégeztük. Két különböző donorból származó primer normál humán epidermális keratinocita (NHEK) sejteket tenyésztettünk, majd differenciáltattuk őket. Mind a differenciálatlan (15A. és C. ábra), mind a differenciáltatott (15B. és D. ábra) NHEK sejteken elvégeztük az MTT (15A, B. ábra) és a kaszpáz vizsgálatokat (15C, D. ábra). Az MTT esszé alapján a TM mind a differenciálatlan (15A. ábra), mind a differenciálódott (15B. ábra) primer keratinociták életképességét drasztikusan csökkentette, míg a H1152-nek nem volt hatása az életképességre. A kaszpáz vizsgálat különböző eredményre vezetett attól függően, hogy differenciálatlan (15C. ábra) avagy differenciáltatott (15D. ábra) NHEK sejteken végeztük-e el őket. Míg az inhibitorok a differenciálatlan NHEK sejtek kaszpáz-3 aktivitását nem változtatták meg, addig differenciálódott NHEK sejtekben a H1152 kezelés szignifikánsan csökkentette, a TM pedig növelte azt. Úgy tűnik tehát, hogy a

TM kezelés következtében a differenciálatlan NHEK sejtek nekrotikusan pusztulnak el, míg a differenciálódott NHEK sejtekben a PP1 gátlása apoptózist is kivált.



15. ábra: A TM és a H1152 kezelés hatása primer keratinociták (NHEK sejtek) életképességére. Differenciálatlan (A, C) és differenciáltatott (B, D) NHEK sejteket egy éjszakán át szérumentes médiumban tartottunk, majd 12 órán keresztül 1 μ M TM-mel vagy 10 μ M H1152-vel kezeltünk. Ezt követően az életképességük tanulmányozása céljából elvégeztük az MTT (A, B), illetve a kaszpáz esszét (C, D). Az ábrázolt értékek $n=3$ független kísérlet eredményei. Statisztikai elemzés egyutas ANOVA-val és post hoc Šidak-tesztel, ns: nem szignifikáns, *** $p<0,001$.

Protein foszfatáz aktivitásmérési vizsgálatot is végeztünk mind HaCaT (16A. ábra), mind differenciálatlan (16B. ábra), illetve differenciáltatott NHEK sejtek (16C. ábra) lizátumából, radioaktív foszfátot hordozó miozin könnyű lánc (32 P-MLC20) szubsztrát segítségével. A ROK gátlásának nem volt hatása a foszfatáz aktivitására, míg a PP1 katalitikus alegység TM általi gátlása a protein foszfatáz aktivitást mindhárom esetben jelentősen csökkentette (HaCaT sejtek esetében a kontroll érték 51,7%-ára, differenciálatlan, illetve differenciáltatott NHEK esetében 29,2%, illetve 42,8%-ára). (16. ábra).



16. ábra: A TM és a H1152 kezelés hatása a HaCaT és NHEK sejtek protein foszfatáz aktivitására. HaCaT (A), differenciálatlan NHEK (B) illetve differenciáltatott NHEK (C) sejteket éjszakán keresztüli szérumeheztetést követően 1 μ M TM-mel, vagy 10 μ M H1152-vel kezeltünk 1 órán át, majd protein foszfatáz aktivitásmérési esszét végeztünk a sejtlyúzumból. Mindhárom kísérlet esetében az adatokat a kontroll értékekhez normalizáltuk, azt 100%-nak véve. Az ábrázolt értékek $n=3$ kísérlet átlagai \pm az átlag standard hibája (SEM). Statisztikai elemzés egyutas ANOVA-val és post hoc Šidak-teszttel, ns: nem szignifikáns, *** $p<0,001$.

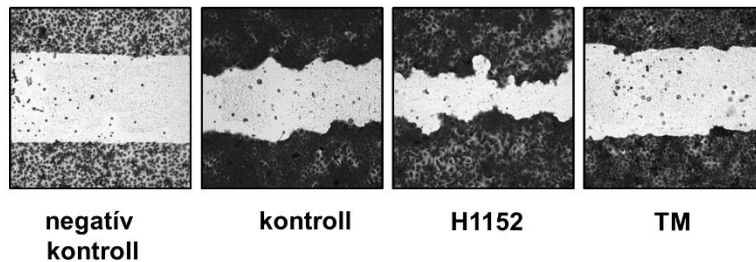
4.1.3. A PP1 gátlása lassítja a HaCaT sejtek migrációját és proliferációját

Azt már láthattuk, hogy a PP1 gátlása megakadályozza az egérbőrön ejtett sebek gyógyulását, záródását. Azt is láttuk, hogy a tautomycin még 12 órás alkalmazás után sem váltott ki sejtpusztulást a HaCaT sejtek körében. Mindezek figyelembe vételével arra voltunk kíváncsiak, hogy a TM kezelésnek – illetve a H1152-nek – milyen hatása van a HaCaT sejtek proliferációjára és migrációjára.

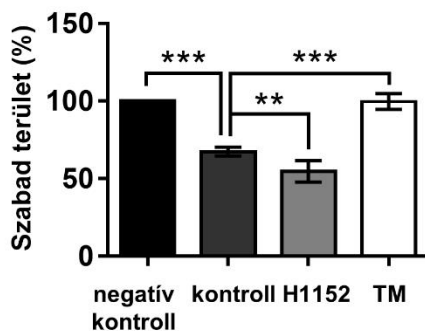
Ennek érdekében karcolási vizsgálatot végeztünk. A sejteket 96 lyukú tenyésztőedényben konfluens állapotig növesztettük, majd szérumeheztetést követően a sejtréteget Tecan Freedom EVO 150 robottal karcoltuk, ami egyforma méretű karcolatokat ejtett. A médium – és vele együtt a sejtörmelék – leszívása után a sejtekhez friss, 10% FBS-t tartalmazó DMEM-et adtunk, melyhez bizonyos lyukak esetében még 1 μ M TM-et vagy 10 μ M H1152-t is pipettáztunk. Mindemellett néhány lyukba szérummentes DMEM-et mértünk, ezek negatív kontrollként szolgáltak, itt ugyanis a sejtek nem vándoroltak és nem osztódtak, tehát a karcolatok mérete a kísérlet során ezekben a lyukakban állandó maradt. A karcolás és a friss médium hozzáadása után a sejteket 24 órán keresztül növesztettük, majd fixáltuk, szulforodamin-B-vel (SRB) festettük, és lefotóztuk (17A. ábra). A végső karcolatok területét ImageJ-vel határoztuk meg, és a kapott adatokat a szérummentes negatív kontroll területekhez normalizáltuk, azt 100%-nak véve (17B. ábra). Eredményeink alapján mind a TM, mind a

H1152 szignifikáns hatást gyakorolt a karcolatok záródásának sebességére a szérumban növesztett kontrollhoz képest, az előbbi lassította – sőt, tulajdonképpen teljesen meggátolta – míg utóbbi gyorsította azt. 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 gyakorlatilag nem migráltak, ez esetben a karcolatok mérete megegyezett a negatív kontrolléval (17A. és B. ábra).

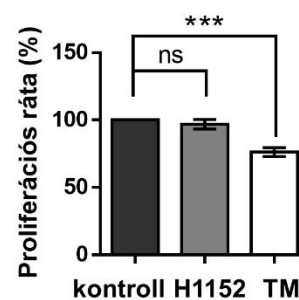
A.



B.



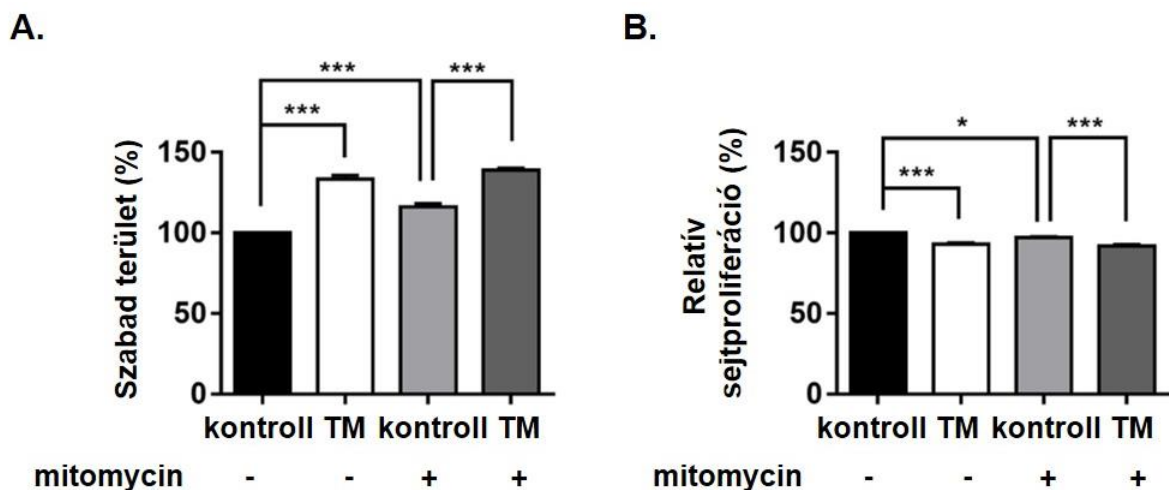
C.



17. ábra: A TM és a H1152 hatása a HaCaT monolayeren ejtett karcolat záródására. (A) Karcolási vizsgálat. 96-lyukú tenyésztőedényben szélesztett keratinocitákat Tecan Freedom EVO 150 géppel karcoltunk, inhibitorokkal (1 μ M TM vagy 10 μ M H1152) kezeltünk és 24 órán át növesztettünk. A negatív kontroll nem tartalmazott FBS-t, ezek a karcolatok nem záródtak. A fenti képek a 24 órás kezelés letelte után, SRB festést követően készültek mikroszkóppal. (B) A karcolási vizsgálat kiértékelése. A szabad területek nagyságát ImageJ-vel határoztuk meg, majd a szérumban növesztett kontroll karcolatokhoz normalizáltuk, és oszlopdiagramon ábrázoltuk, a negatív kontrollt 100%-nak véve. Statisztikai analízis egyutas ANOVA-val és post hoc Šidak-tesztel. (C) A karcolási vizsgálat után a proliferáció mértékét SRB esszével határoztuk meg. Statisztikai próba: ANOVA és post hoc Šidak-teszt. Mindegyik kísérlet esetében n=3. *p<0,05; **p<0,01; *p<0,001; ns: nem szignifikáns.**

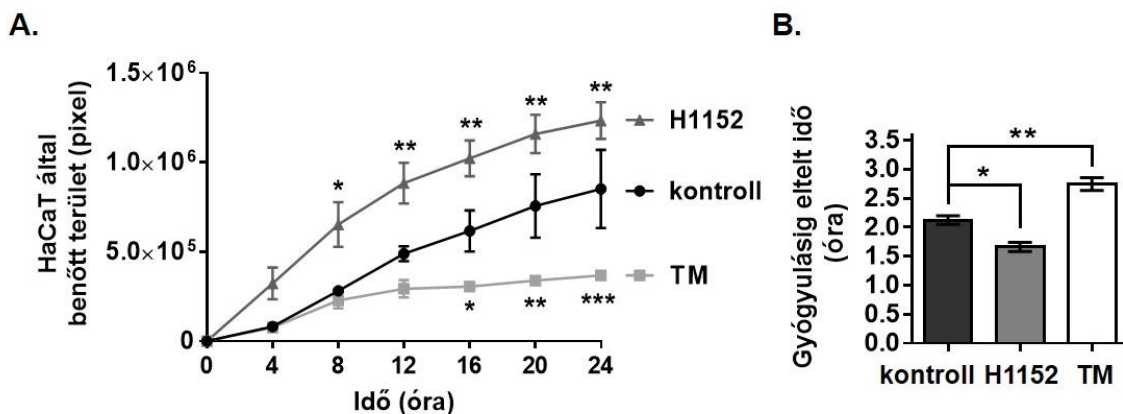
A sejtproliferáció mértékét SRB vizsgálattal (17C. ábra) elemeztük. Az SRB esszét közvetlenül a karcolási vizsgálat után végeztük el. Miután a karcolatok fotózása megtörtént, a sejtfehérjékhez kötődött SRB-t bázisos Tris-oldattal kioldottuk a sejtekből, és spektrofotométerrel meghatároztuk az abszorbanciát. Az abszorbancia arányos a kötött SRB festék mennyiségével, ami viszont a sejtszám függvénye. Eredményeink alapján a TM kezelés gátolta a sejtproliferációt, a proliferációs ráta a kontroll (amit ezúttal is 100%-nak vettünk) értéknél 24%-kal alacsonyabb. A H1152 kezelés azonban nem befolyásolta a sejtproliferáció mértékét (17C. ábra).

A karcolási vizsgálat hátránya, hogy nem tudjuk világosan elkülöníteni, hogy a karcolat záródásának sebességében megfigyelhető különbségek vajon az inhibitorok sejtosztódásra, vagy a sejtvándorlásra – esetleg mindkettőre – gyakorolt hatásának tudhatók-e be. Ezért a karcolási vizsgálatot úgy is elvégeztük, hogy bizonyos lyukakban lévő sejteket a karcolás előtt mitomycinnel előkezeltünk, mely a sejtciklus megakasztásával gátolja a sejtosztódást. A mitomycin gátolta mind a karcolat záródását (18A. ábra), mind a sejtproliferációt (18B. ábra). Ez arra utal, hogy a sejtosztódás elengedhetetlen a sebzáródás folyamatában, és csupán a keratinociták migrációja nem elégséges a folyamat hatékony végbemeneteléhez. A tautomycin további hozzáadása a sejtekhez lassította a sebzáródást (18A. ábra), és gátolta a proliferációt (18B. ábra) mind a kontroll, mind a mitomycinnel előkezelt sejtekhez képest.



18. ábra: A mitomycin sebzáródásra gyakorolt hatása. Konfuens HaCaT sejteket a Tecan Freedom EVO 150 géppel történő karcolás előtt előkezeltünk 30 µg/ml végkoncentrációban alkalmazott mitomycinnel. Ezután elvégeztük a karcolási (A) és az SRB vizsgálatokat (B). Kiértékelés egyutas ANOVA-val és post hoc Šidak-teszttel; n=8. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

A TM és a H1152 inhibitorok sejtmigrációra gyakorolt hatását más kísérleti elrendezésben is vizsgáltuk. 35 mm átmérőjű Petri-csészében humán keratinocitákból álló egyrétegű sejt-pázsitot növesztettünk. Éjszakán keresztüli széruméheztetést követően a sejteket pipettaheggyel manuálisan megkarcoltuk, majd 1 μ M TM-mel, illetve 10 μ M H1152-vel kezeltük. A sebzáródást JuLITM valós idejű (real-time) sejtvizsgáló készülékkel monitoroztuk, a karcolatok területét pedig ezúttal is ImageJ programmal határoztuk meg. Az adatok alapján elkészítettük a sebzáródás kinetikai görbéit, mégpedig úgy, hogy a benőtt terület nagyságát ábrázoltuk az idő függvényében, minden kezelés és a kontroll sejtek esetében is (19A. ábra). Kétutas ANOVA analízissel és *post hoc* Dunnett-teszttel bizonyítottuk, hogy az egyes kezelések szignifikánsan befolyásolták a sebzáródást ebben a kísérleti elrendezésben is. A TM kezelés ezúttal is gátolta, míg a H1152 kezelés elősegítette a sebzáródást (19A. ábra).



19. ábra: A TM és a H1152 sebzáródásra gyakorolt hatásának vizsgálata JuLI-val és ECIS-szel. (A) Petri-csészében növesztett keratinocita monolayeret pipettaheggyel karcoltunk, és JuLI készülékkel monitoroztuk a karcolat záródását. A benőtt területet ábrázoltuk az eltelt idő függvényében. Statisztikai analízis kétutas ANOVA-val és *post hoc* Dunnett-teszttel. (B) HaCaT sejteket ECIS plate-en konfluensre növesztettünk, elektródokkal sebeket égettünk ki, majd monitoroztuk az impedancia változását a konstans állapot, vagyis a sejtréteg integritásának helyreállításáig. Ezt az időt ábrázoltuk oszlopdiaqramon. Statisztikai próba egyutas ANOVA-val és *post hoc* Šidák-teszttel. Mindegyik kísérlet esetében $n=3$. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$.

A fenti eredményeket az ECIS kísérletek tovább erősítették (19B. ábra). HaCaT sejteket ECIS tenyésztőedény elektródjain növesztettünk, majd az elektródon a monolayeret kiegészítettük. A kiegészített terület benövésével nőtt az impedancia is, a karcolat záródásával az impedancia nem

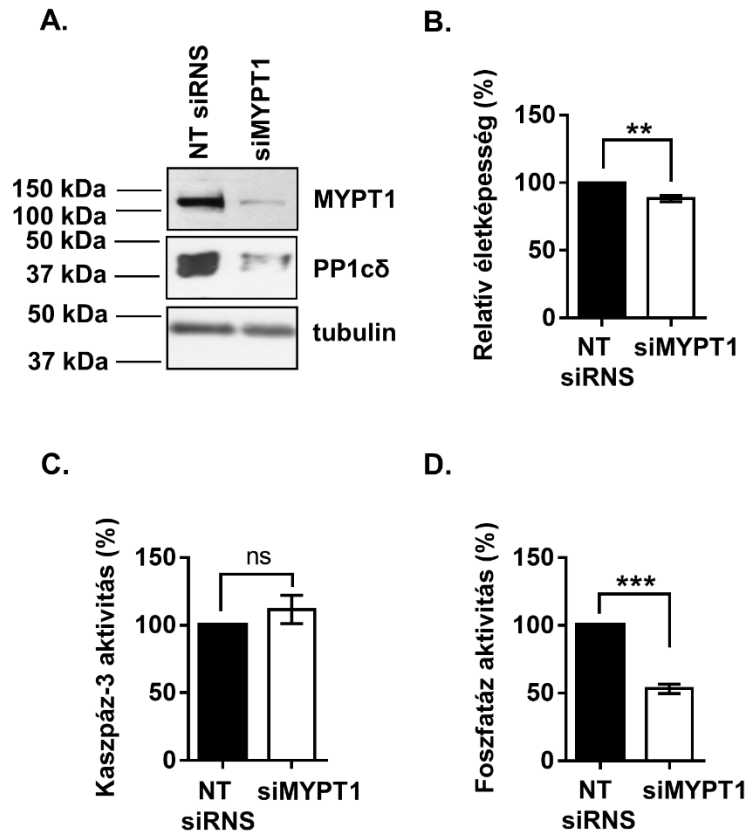
nőtt tovább. A 19B. ábrán látható grafikonon minden kezelés esetében ábrázoltuk ezt az időt. Látható, hogy a teljes gyógyuláshoz a kontroll sejteknek 2,1 órára, a 10 μ M H1152-vel kezelt sejteknek 1,6 órára, míg az 1 μ M TM-mel kezelt sejteknek 2,7 órára volt szüksége. A különbségek a kontroll és a kezelt minták között szignifikánsnak bizonyultak. Ez a kísérlet további megerősítésül szolgált az irányban, hogy a PP1 gátlása lassítja, míg a ROK gátlása elősegíti a migrációt. Vagyis a PP1 és a ROK ellentétes módon szabályozza a sejtmozgást: előbbi serkenti, utóbbi gátolja.

4.1.4. A MYPT1 csendesítése gátolja a HaCaT monolayer záródását

A következőekben a miozin foszfatáz sebzáródásban játszott szerepét kívántuk felderíteni. Ugyanazokat a kísérleteket végeztük el, mint amelyeket az előző két pontban bemutattam, csak ezúttal nem a PP1-et gátoltuk tautomycinnel, hanem specifikusan a miozin foszfatázt, a MYPT1 alegység csendesítésével. A csendesítés az anyagok és módszerek részben leírtaknak megfelelően siRNS-sel történt, melyet Lipofectamine 2000 transzfekciós reagenssel juttattunk be a HaCaT sejtekbe. A kontroll sejteket non-target dupla szálú RNS-sel (NT siRNS) transzfektáltuk. A transzfekció elindítása után még 48 órán keresztül növesztettük a sejteket, majd elvégeztük a megfelelő vizsgálatot.

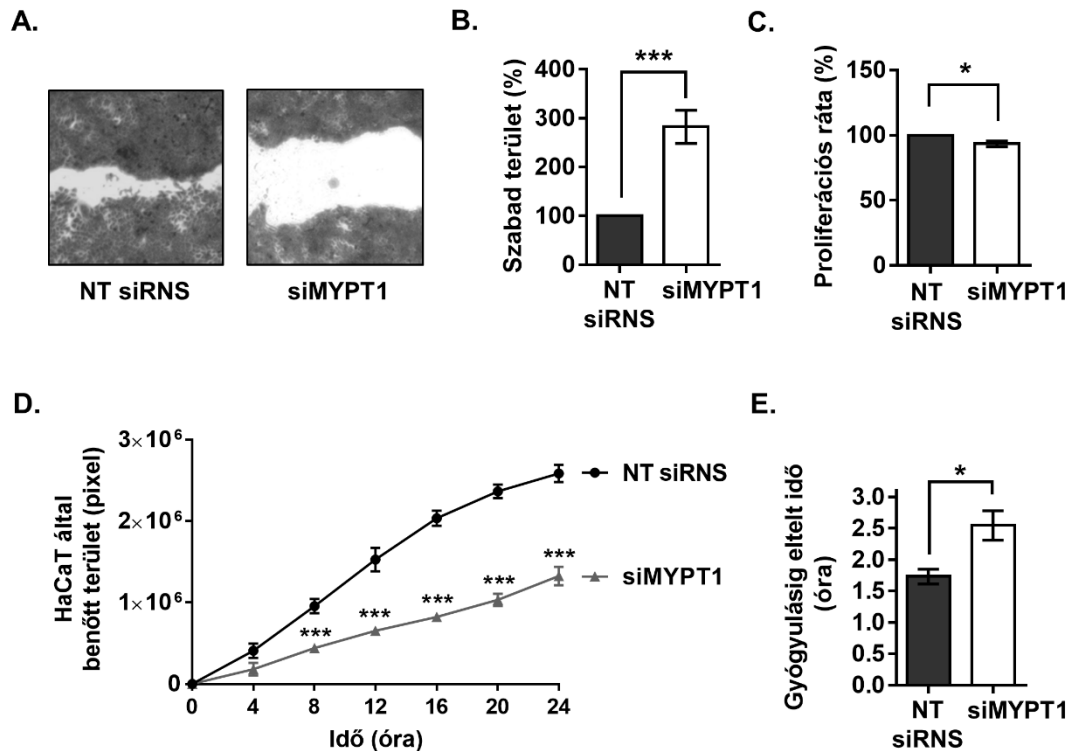
A sejtüzámokból Western blottal igazoltuk a MYPT1 csendesítés sikerességét (20A. ábra). Anti-PP1c δ antitesttel a miozin foszfatáz katalitikus alegységének expresszióját is vizsgáltuk, mivel a szakirodalomból ismertünk már olyan kutatási eredményeket, melyek bizonyították, hogy a MYPT1 csendesítés hatására a PP1c expresszió is csökken (Scotto-Lavino et al., 2009). Azt tapasztaltuk, hogy ez a jelenség HaCaT sejtekben is lejátszódik (20A. ábra). A MYPT1 csendesítés sejtek életképességére gyakorolt hatását MTT esszével (20B. ábra) és kaszpáz esszével (20C. ábra) is vizsgáltuk. MTT esszével azt tapasztaltuk, hogy a sejtek életképessége csak kismértékben (12%-kal) csökkent a kontrollhoz képest, de a különbség szignifikáns volt (20B. ábra). A kaszpáz esszé azt mutatta, hogy nincs szignifikáns eltérés a non-target duplaszálú RNS-sel, illetve az siMYPT1 RNS-sel transzfektált sejtek között a kaszpáz-3 aktivitás tekintetében, tehát a MYPT1 csendesítés nem vált ki apoptózist (20C. ábra).

A MYPT1 csendesítés a HaCaT sejtüzámból mért protein foszfatáz aktivitást mintegy 48%-kal mérsékelte (20D. ábra). Tehát a foszfatáz aktivitás ugyanúgy kb. a kontroll érték felére csökkent, mint a sejtek 1 órás 1 μ M TM-mel való kezelését követően, ami azzal magyarázható, hogy a MYPT1 csendesítés hatására – mint azt bizonyítottuk – a PP1c expressziója is drámaian visszaesik.



20. ábra: A MYPT1 csendesítés hatása a HaCaT sejtek életképességére és foszfataz aktivitására. (A) A csendesítés sikerességét igazoló Western blot. A MP katalitikus alegység (PP1cδ) expressziója szintén csökken a MYPT1 csendesítés hatására. Mintafelviteli kontroll: tubulin. (B) MTT (C) és kaspáz vizsgálat (D) Foszfataz aktivitásmérési vizsgálat sejtlizátumból. $n=3$ kísérlet, Student-féle t -teszt. $**p<0,01$; $***p<0,001$; ns: nem szignifikáns.

A MP aktivitás gátlásának sebzárodásra gyakorolt hatását karcolási esszével tanulmányoztuk. A transzfekció kezdete után 24 órával a sejtréteget Tecan Freedom EVO 150 robottal karcoltuk meg, majd médiumcsere után 24 órán keresztül növesztettük a keratinocitákat. A kísérlet végeztével a sejteket fixáltuk és SRB-vel festettük, majd fénymikroszkóppal lefotóztuk a karcolatokat (21A. ábra). A szabad területek nagyságát ImageJ-vel határoztuk meg, és a relatív területeket ábrázoltuk (21B. ábra). 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 (21A és B. ábra). SRB esszével azt tapasztaltuk, hogy a MYPT1 csendesítése kis mértékben – a kontrollhoz képest 7%-kal –, de szignifikánsan csökkentette a proliferációs rátát (21C. ábra).



21. ábra: A MYPT1 csendesítés hatása a HaCaT sejtek migrációjára és proliferációjára. (A) Karcolási esszé Tecan Freedom EVO 150 robottal. A karcolás a csendesítés elindítása után 24 órával történt, és karcolást követően a sejteket további 24 órán át inkubáltuk 10% FBS-t tartalmazó DMEM-ben. A szabad területeket ImageJ-vel határoztuk meg, és a relatív területet oszlopdiagramon (B) ábrázoltuk. (C) SRB esszé a sejtproliferáció tanulmányozására. (D) Karcolási esszé 35 mm átmérőjű Petri-csészében növesztett sejteken. Karcolás pipettahegygel, sebzáródás követése JuLI készülékkel. (E) Sebgyógyulás tanulmányozása ECIS-szel. Az elektródon nőtt sejtréteget kiegészítettük, majd mértük az elektród újbóli teljes benövéséig eltelt időt. Kísérletek száma $n=3$, kiértékelés Student-féle t -teszttel, illetve (D) esetében kétutas ANOVA-val és post hoc Šidák-teszttel; * $p<0,05$; *** $p<0,001$.

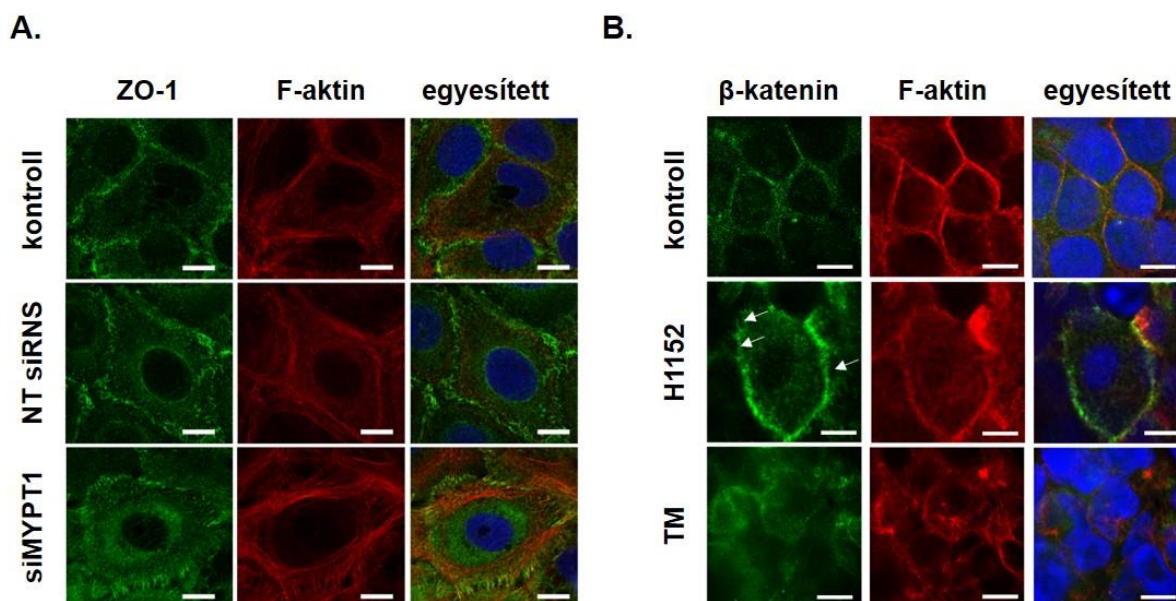
JuLI™ valós idejű sejtvizsgáló segítségével a sebzáródás kinetikájáról is képet kaphatunk. A transzfekciós mixet a szélesztéssel egy időben adtuk a sejtekhez, majd 24 órával később 100 μ l-es pipettahegygel karcoltunk. Azt tapasztaltuk, hogy a karcolás után 8 órával már szingifikáns volt az eltérés a kontroll és az siMYPT1-transzfektált sejtek által benőtt terület mérete között (21D. ábra). A HaCaT sejtek migrációs képességét a monolayeren mért impedanciával is mértük ECIS vizsgálattal (21E. ábra), és ezek alapján azt tapasztaltuk, hogy a MYPT1-csendesített sejtek kb. 1 órával később nőttek be a kiegészített elektródot, mint a

kontroll sejtek. Eredményeink alapján úgy tűnik, hogy a miozin foszfatáz elősegíti a keratinocita monolayeren ejtett seb benövését, mivel a MYPT1 expresszió gátlása minden kísérletben lassabb sebzáródást eredményezett. Amint láttuk, a MYPT1 csendesítése a protein foszfatáz-1 katalitikus alegység expresszióját is csökkentette, így jogosan vetődik fel a kérdés, miből gondoljuk, hogy a megfigyelt hatás a miozin foszfatáz és nem általában a PP1 enzimek gátlásának tudható-e be. Mivel azonban mind a robottal, mind a pipettaheggyel végzett karcolási esszé, továbbá az ECIS kísérlet során is a MYPT1 csendesítéssel a sebzáródás szignifikánsan nagyobb eltéréseket okozott, mint a TM kezelés következtében, ezért arra következtettünk, hogy a folyamatban a PP1 enzimek közül valóban meghatározó szerepet játszhat a miozin foszfatáz.

4.1.5. A MP működése zavart okoz a HaCaT sejtek barrier funkciójában

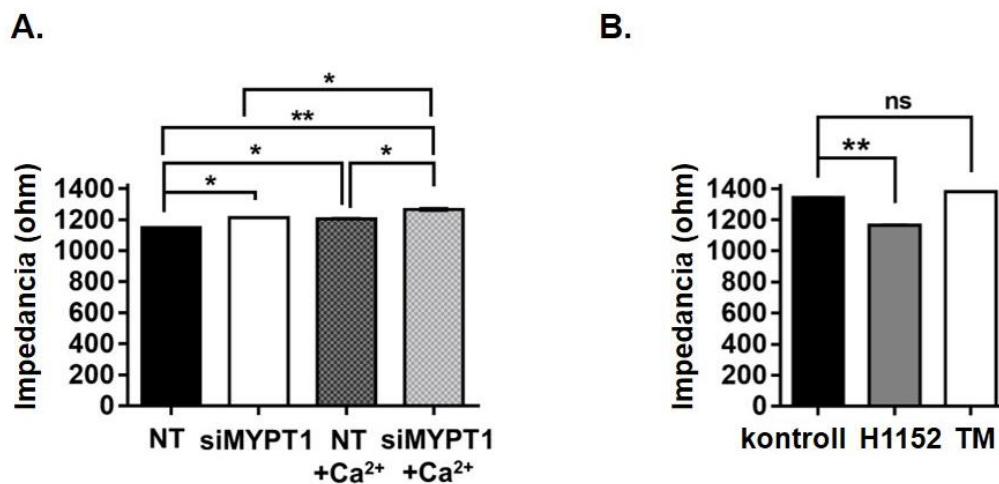
Szaruhártya epitelsejtek esetében már leírták a RhoA-asszociált kináz (ROK) sejt-sejt kapcsolatokban illetve a barrier funkció fenntartásában betöltött szerepét (*Yin – Yu, 2008*). Az azonban még nem volt világos, hogy a ROK szubsztrátjait defoszforiláló MP befolyásolja-e, és ha igen, akkor miképpen a keratinociták között lévő sejtadhéziót. Ezért célul tűztük ki, hogy tanulmányozzuk a PP1 tautomycinnel történő gátlásának, illetve a MYPT1 csendesítésének hatását a keratinociták közötti sejt-sejt kapcsolatra. A HaCaT sejteket az anyagok és módszerek részben ismertetett módon TM vagy H1152 inhibitorokkal kezeltük (*22B. ábra*), illetve siRNS-sel transzfektáltuk (*22A. ábra*), majd immunfluoreszcens festési módszert alkalmaztunk a tight junction felépítésében részt vevő ZO-1 (*22A. ábra*), illetve a zonula adherens-specifikus β -katenin (*22B. ábra*) elleni antitestekkel (ábrán zöld színnel láthatók). A citoskeletális F-aktint (piros) Texas-Red phalloidinnal, míg a sejtmagokat (kék) DAPI-val festettük meg (*22A. és B. ábra*).

A kontroll és a non-target siRNS-sel transzfektált keratinocitákban a ZO-1 folytonosan festődött, jelezve a zavartalan sejt-sejt kapcsolatokat. Az siMYPT1-transzfekció hatására azt tapasztaltuk, hogy megnövekedett a ZO-1 mennyisége azokon a helyeken, ahol a sejtek érintkeznek egymással, utalva az intenzívebb sejt-kapcsolatokra (*22A. ábra*). Az aktinszálak eloszlásában is változást láttunk, melyek inkább a kortikális régióban akkumulálódtak. A tautomycin kezelés némileg fokozta az aktin citoskeletális hálózat képződését, míg a H1152 gyengítette a sejtadhéziót, és elősegítette az ún. paracelluláris rések megjelenését a sejtek között (lásd a nyilakat a *22B. ábrán*).



22. ábra: A MYPT1 csendesítés és a TM/H1152 kezelés hatása humán keratinociták közötti sejt-sejt kapcsolatokra. HaCaT sejtek immunfluoreszcenciás festése (A) anti-ZO1 és (B) anti- β -katenin antitestekkel (zöld), illetve fluoreszcensen jelölt Texas Red-X phalloidinnel az F-aktin (piros) jelöléséhez. A sejtamagokat (kék) DAPI-val festettük meg. A sejteket előzetesen inhibitorokkal kezeltük, vagy siRNS-sel transzfektáltuk. Beosztás hossza: 10 μ m.

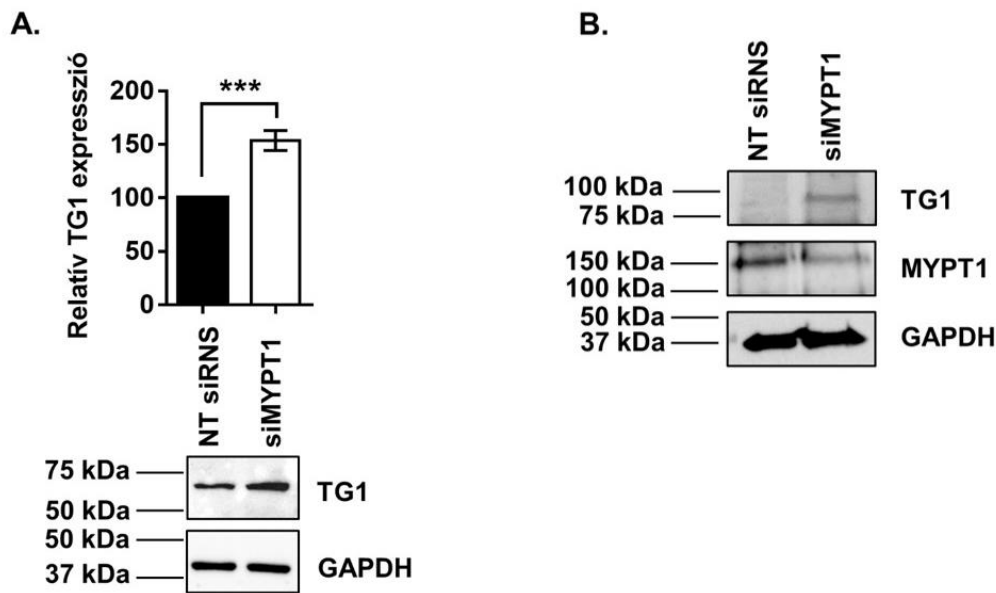
A PP1/ROK inhibitorok és a MYPT1 csendesítés barrier funkcióra kifejtett hatását ECIS készülékkel is tanulmányoztuk (23. ábra). A monolayert ezúttal nem égettük ki, az impedancia növekedése pedig a sejt-kapcsolatok szorosabbá válását jelezte. A géncsökkentést kalcium jelenlétében és hiányában is elvégeztük, a kalcium a HaCaT sejtek differenciáltatására szolgált. A 23A. ábrán láthatjuk, hogy 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. Mindez egybevágh az immunfluoreszcens festéssel kapott eredményeinkkel, vagyis a MYPT1-csökkentés során tapasztalt ZO-1 feldúsulással a sejtmembránban, illetve a markánsabb kortikális aktinhálózat megjelenésével (22A. ábra). A TM kezelés hatására az elektromos ellenállás nem változott szignifikánsan, ellenben a ROK H1152 általi gátlása csökkentette azt (23B. ábra). Úgy tűnik tehát, hogy a ROK és a MP befolyásolják a keratinociták közötti sejtadhéziót és a barrier funkciót, mégpedig úgy, hogy a ROK erősíti, míg a MP aktivitása gyengíti a sejtek közötti kapcsolatot.



23. ábra: ECIS. (A) Differenciálatlan és kalciummal differenciáltatott (+Ca²⁺) HaCaT sejteket non-target, illetve siMYPT1 RNS-sel transzfektáltunk, és ECIS készülékkel mértük az impedanciát. Az oszlopdiaqramon a csendesítés kezdete után 48 órával kapott összesített eredmények láthatóak. Statisztikai elemzés kétutas ANOVA-val és post hoc Tukey-teszttel. (B) Elektromos impedancia H1152, illetve TM kezelést követően. A diagramon n=3 kísérlet összesített eredménye látható. Kiértékelés kétutas ANOVA-val és post hoc Šidak-teszttel. *p<0,05; **p<0,01, ns: nem szignifikáns.

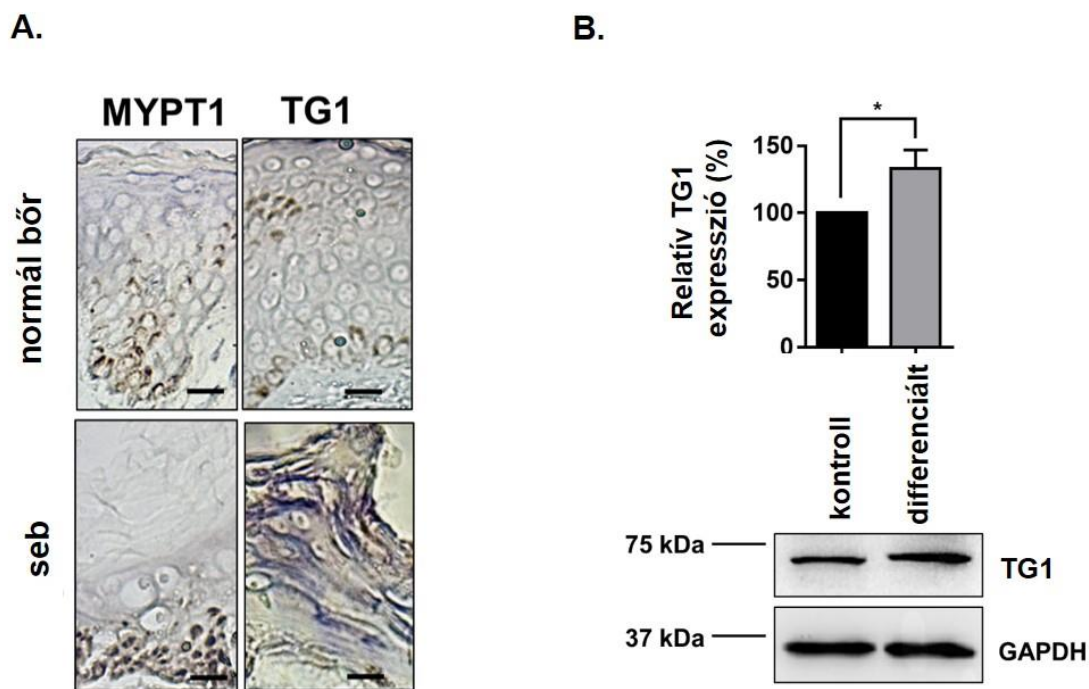
4.1.6. A MYPT1 csendesítés hatására megnő a transzglutamináz-1 (TG1) expressziója

A kutatási projekt következő fázisában azt szeretnénk volna kideríteni, hogy a miozin foszfatáz milyen molekuláris mechanizmus révén fejt ki a sebzáródásra gyakorolt, fentebb részletezett hatásait. Kutatócsoportunk egyik korábbi publikációjában már bemutatta azon gének listáját, melyek expressziójában a PP1 HaCaT sejtekben történő csendesítésének hatására microarray analízissel változás volt tapasztalható (Dedinszki et al., 2015). Utánajártunk, hogy a listán szereplő gének által kódolt fehérjék közül melyek azok, amelyek a szakirodalom szerint összefüggésbe hozhatók a keratinociták migrációjával, proliferációjával vagy differenciációjával, illetőleg a sebgyógyulással. Végül a MYPT1 csendesítés hatását az S100A8, low density lipoprotein receptor, vanilloid receptor-1, transzglutamináz-1, továbbá a keratin-1 és a keratin-10 fehérjék expressziós szintjére vizsgáltuk Western blot analízissel. A hat fehérje közül a transzglutamináz-1 (TG1) expressziós szintje mutatott szignifikáns eltérést a non-target kontrollhoz képest, mégpedig 53,8%-os növekedést (24A. ábra).



24. ábra: A MYPT1 csendesítése HaCaT sejtekben és humán bőrszövetben fokozza a TGI expresszióját. (A) MYPT1 csendesítése siRNS-sel HaCaT sejtekben, majd a transzglutamináz-1 (TGI) expresszió vizsgálata Western blottal. Az anti-TGI antitesttel kapott fehérjesávok denzitását elosztottuk a GAPDH belső kontroll sávok denzitásával. Az $n=3$ kísérletből származó relatív TGI expressziót oszlopdiagramon ábrázoltuk (átlag \pm SEM). Student-féle t -teszt, $***p<0,001$. (B) A MYPT1 csendesítése ex vivo humán bőrszöveti preparátumokban. A csendesítés sikerességét és a TGI expresszió változását Western blottal vizsgáltuk. Belső kontroll: GAPDH.

A MYPT1 csendesítését humán bőrszövetben is elvégeztük. A sebészi úton eltávolított bőrszövet minták (Genoskin) *ex vivo* szövetdarabok, amelyek gélágyra kifesztve, speciális tápoldat segítségével a biopszia után még 7 napig életképesek maradnak. A bőrpreparátumok fenntartják a bőr barrier funkcióját, proliferatív képességét és a sejtekben metabolikus folyamatok is lezajlanak. Az siMYPT1 bejutott a bőrszöveti sejtekbe, és a MYPT1 alegység expressziója valóban mérséklődött a non-target siRNS-sel transzfektált bőrszövethez képest (24B. ábra). Anti-TGI antitesttel Western blot vizsgálatot végezve az is kiderült, hogy humán bőrszövetben is a MYPT1 csendesítése együtt jár a TGI fehérje expresszió növekedésével (24B. ábra).



25. ábra: A MP a TG1 expresszió szabályozásán keresztül befolyásolja a keratinocita differenciációt. (A) Immunhisztokémia bőrmintákon anti-TG1 és anti-MYPT1 antitestekkel. Beosztás hossza: 50 μ m. (B) Differenciálatlan (kontroll) és differenciáltatott NHEK sejtek lizátumából Western blotot végeztünk a TG1 expressziós szint megállapítására. A mintafelviteli kontroll a GAPDH volt. Az oszlopdiaagramon, mely $n=6$ kísérlet eredményeit összegezi, a relatív TG1 szint látható. Statisztikai elemzés t -teszttel, $*p<0,05$.

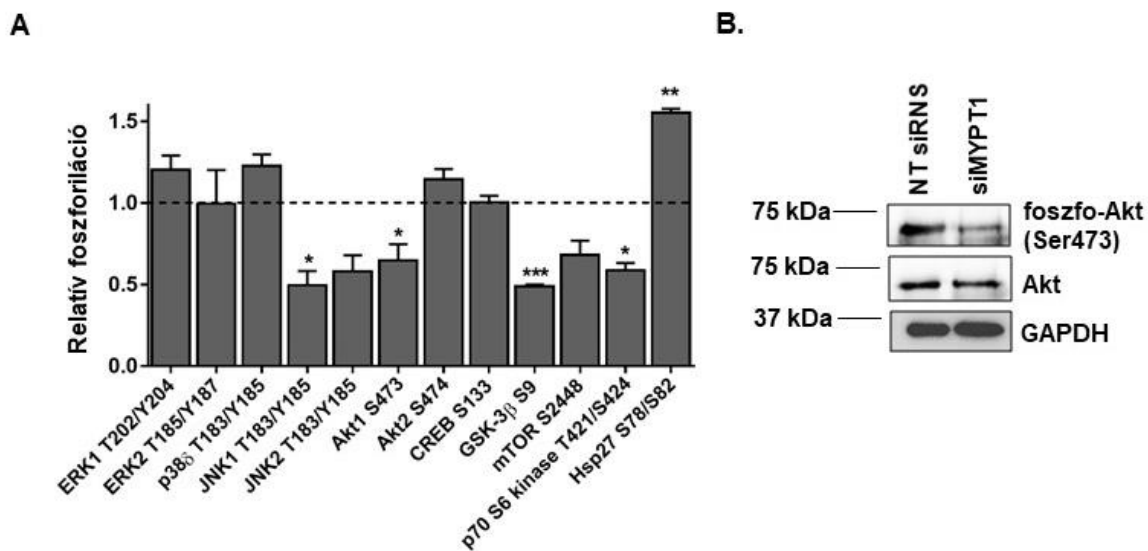
A MYPT1 és a TG1 epidermális szöveti eloszlását normál bőr és seb immunhisztokémiai vizsgálatával elemeztük. A sebeket a kimetszett *ex vivo* bőrdarabokon ejtették, a sebzés után 6 nappal a bőrdarabokat 10%-os formalinnal fixálták, dehidratálták, paraffinba ágyazták, majd metszték és tárgylemezre rögzítették (Genoskin). A kontroll bőrdarabokkal hasonlóképpen jártak el (25A. ábrán). Normál bőr esetében 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 a MYPT1 expressziója lecsökken, a TG1-é pedig megemelkedik. A TG1 itt

hozzájárul a keratinociták differenciációjához és a bőr elszarusodásához. NHEK sejtek lizátumaiból végzett Western blot vizsgálatok eredményei alapján a differenciálódott keratinocitákban 33,2%-kal emelkedik meg a TG1 fehérje szintje a differenciálatlan sejtekhez képest (25B. ábra).

4.1.7. A MP az Akt jelátviteli útvonalon keresztül gyorsítja a sebzáródást

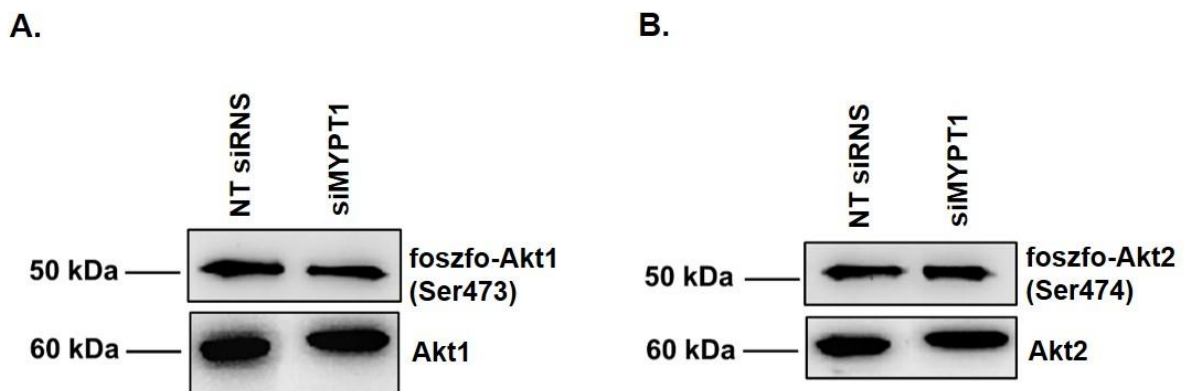
Kutatási projektünk utolsó fázisában azt szeretnénk kideríteni, hogy a miozin foszfatáz hogyan regulálja a TG1 expresszióját. Tudjuk, hogy a mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) útvonalnak szerepe van a sebgyógyulás és a TG1 génexpresszió szabályozásában (Jonak et al., 2011).



26. ábra: A MYPT1 csendesítés hatása a MAPK jelátviteli útvonal szereplőinek foszforilációs állapotára. (A) Non-target siRNS-sel transzfektált és siMYPT1 csendesített *ex vivo* humán bőrminták foszfo-MAPK array vizsgálata. Az oszlopdiagram a MYPT1-csendesített szövet relatív foszforilációs állapotát mutatja a non-target kontroll értékeihez viszonyítva. Kiértékelés *t*-teszttel, $n=3$, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. (B) A MYPT1 csendesítés hatása a humán *ex vivo* bőrszövetek Akt foszforilációjára anti-foszfo-Akt (Ser473) antitesttel. Az Akt fehérje szintjét anti-Akt, míg a felvitt fehérjemennyiséget anti-GAPDH antitesttel ellenőriztük.

Ezért a non-target siRNS-sel, illetve az siMYPT1 RNS-sel transzfektált *ex vivo* humán bőrszövetek lizátumait humán foszfo-MAPK array-re vittük fel, melynek segítségével a MAPK jelátviteli útvonallal összefüggésben lévő fehérjék MYPT1-csendesítés hatására bekövetkező

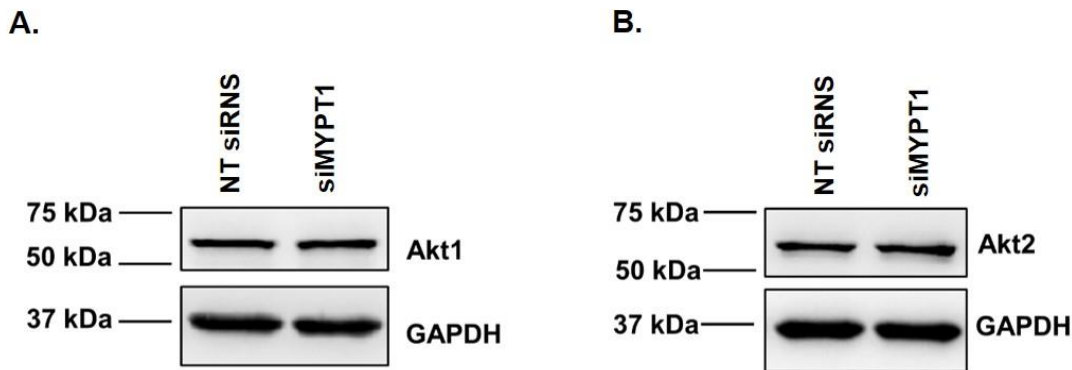
foszforilációs állapotváltozásairól kaphattunk képet (26A. ábra). Az oszlopdiaagramon a MYPT1-csendesített bőrszövetekben lévő fehérjék kontrollhoz viszonyított relatív foszforilációs szintjét ábrázoltuk. Az Akt jelátviteli útvonal több elemének – Akt1, GSK-3 β , p70 S6 kináz – foszforilációja csökkent a MYPT1 génexpresszió gátlása hatására. Míg az Akt1 S473 foszforiláció csökkent, addig az Akt2 S474 foszforiláció nem változott. A Hsp27 foszforilációja ellenben megnövekedett, míg a MAPK útvonal elemei – p38 kináz, ERK1, ERK2, CREB – nem mutattak változást, kivéve a JNK1 T183/Y185 foszforilációját, ami szignifikánsan csökkent. A többi fehérje foszforilációs állapota nem mutatott szignifikáns eltérést a kontrollhoz képest. A kontroll és MYPT1-csendesített *ex vivo* bőrminták lizátumaiból Western blotot is végeztünk anti-Akt és anti-foszfo-Akt (Ser473) antitestek segítségével, és az Akt foszforiláció csökkenését tapasztaltuk a MYPT1 kiütése hatására (26B. ábra). Ezek az antitestek azonban mindhárom Akt izoformát (Akt1, Akt2, Akt3) felismerik, így az Akt1 S473 és az Akt2 S474 foszforilációt nem tudtuk ilyen módon külön vizsgálni.



27. ábra: A MYPT1 csendesítés hatása az Akt1 és az Akt2 foszforilációs állapotára HaCaT sejtekben. HaCaT sejteket non-target siRNS-sel, illetve siMYPT1 RNS-sel transzfektáltunk, majd 48 óra elteltével a sejtizátumokból immunprecipitációt végeztünk specifikus (A) anti-Akt1 és (B) anti Akt2 antitestekkel. A fehérjék foszforilációját anti-foszfo-Akt1/2 (S473/S474) antitesttel vizsgáltuk.

Az Akt izoformák specifikus foszforilációs változásaink a tisztázására non-target kontroll és MYPT1 csendesített humán keratinociták lizátumaiból az Akt1 és Akt2 izoformákat Akt izoformákra specifikus antitestekkel immunprecipitáltuk és a pan-foszfo-Akt antitesttel ellenőriztük a fehérjék foszforilációjában bekövetkezett változásokat (27. ábra). Eredményeink

azt mutatják, hogy HaCaT sejtekben a MYPT1 expresszió gátlása szintén csökkenti az Akt1 S473 foszforilációját (27A. ábra), míg az Akt2 S474 foszforilációs szintje nem módosul (27B. ábra). Non-target siRNS-sel, illetve siMYPT1-gyel transzfektált sejtek lizátumaiból Western blot analízist végezve azt tapasztaltuk, hogy mind az Akt1 (28A. ábra), mind az Akt2 (28B. ábra) fehérje mennyisége változatlan marad a MYPT1 expressziójának gátlása esetén.



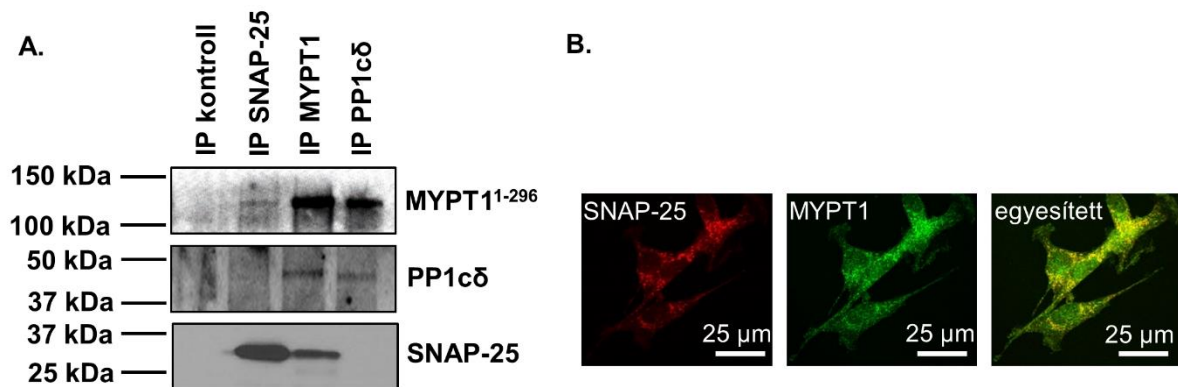
28. ábra: A MYPT1 csendesítés hatása az Akt1 és az Akt2 fehérjék expressziójára HaCaT sejtekben. Kontroll (NT siRNS) és MYPT1-csendesített HaCaT sejtek lizátumából (A) anti-Akt1 és (B) anti-Akt2 antitestek segítségével Western blot analízissel tanulmányozzuk az Akt1 és Akt2 fehérjék expresszióját.

4.2. A miozin foszfatáz szerepe a neurotranszmitter-kibocsátásban

4.2.1. A SNAP-25 és a MYPT1 fehérje-fehérje kölcsönhatást alakítanak ki

Lontay és munkatársai pull down analízissel és tömegspektrometriás elemzéssel korábban már kimutatták, hogy a SNAP-25 a tisztított GST-MYPT1 potenciális kölcsönható partnere (Lontay et al., 2012). Mivel további megerősítést szerettünk volna nyerni erre vonatkozóan, B50 neuroblasztóma sejt-lizátumból immunprecipitációs (IP) kísérletet végeztünk. Vizsgáltuk a SNAP-25 kölcsönhatását mind a MYPT1, mind a PP1 δ alegységgel. Az IP-t reciprok módon végeztük el, így az immobilizált SNAP-25 és a MYPT1 immunprecipitációján keresztül is a B50 sejtek lizátumából (29A. ábra). Kimutattuk a SNAP-25 és a MYPT1 ko-precipitációját, illetve a miozin foszfatáz két alegységének reciprok ko-precipitációját is. Azonban a SNAP-25 és a miozin foszfatáz katalitikus alegysége (PP1 δ) nem mutatott kölcsönhatást. A B50 sejtekben található SNAP-25 és a MYPT1 immunfluoreszcens festésével azok sejten belüli eloszlását is tanulmányoztuk (29B. ábra). Kimutattuk a SNAP-25 és a MYPT1 kolokalizációját

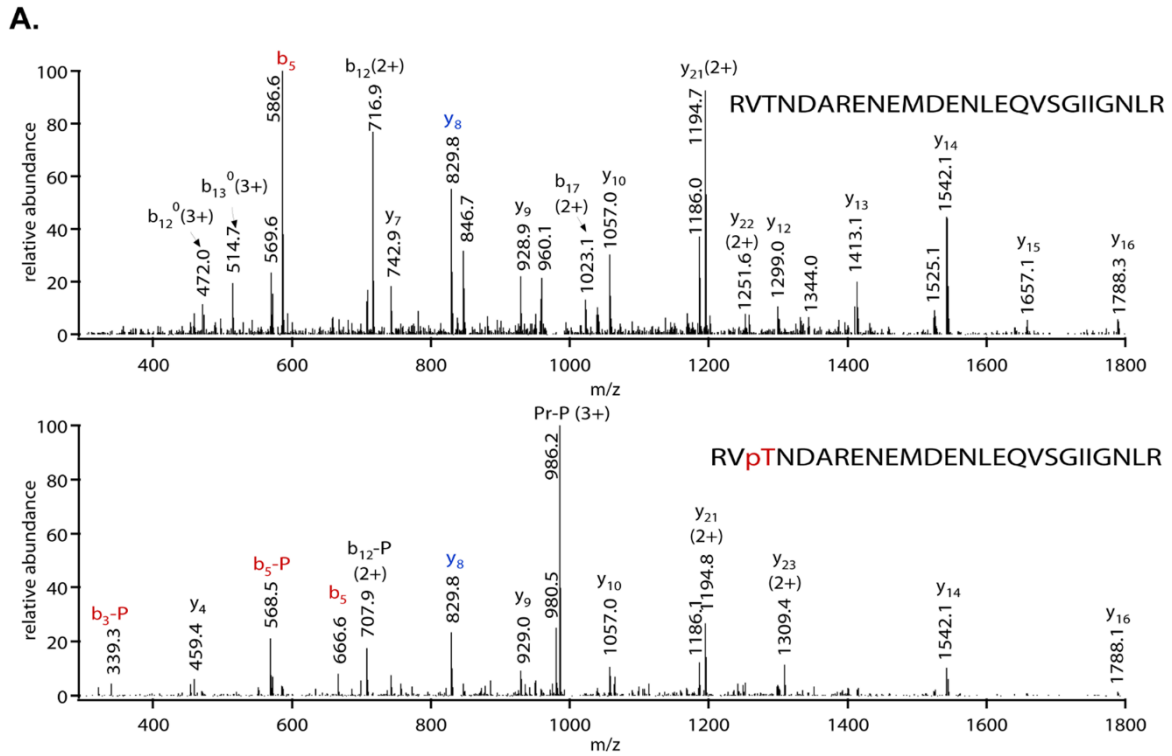
a B50 citoplazmájában és a neuronális nyúlványokban. A MYPT1 a sejtmagban is megtalálható volt.



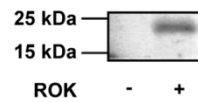
29. ábra: A SNAP-25 és a MYPT1 kölcsönhatásának és kolokalizációjának vizsgálata. (A) Protein A-Sepharose (PAS) gyöngyökhöz anti-SNAP-25, anti-MYPT1¹⁻²⁹⁶ vagy anti-PP1cδ antitestet kötöttünk, majd B50 lizátumból immunprecipitációt végeztünk. A mintákat Western blottal vizsgáltuk. A kontroll minta esetében a PAS-t nyúlszérummal inkubáltuk. (B) SNAP-25 (piros) és MYPT1 (zöld) immunfluoreszcens festése B50 neuroblasztómákban. A két fehérje kolokalizációja az egyesített képen látható.

4.2.2. A ROK *in vitro* foszforilálja, míg a MP defoszforilálja a SNAP-25 fehérjét

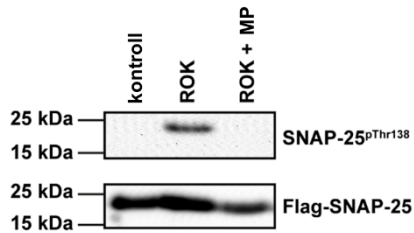
Az irodalmi áttekintésben már említettem, hogy a ROK és a MP hasonló szubsztrátok foszforilációját és defoszforilációját katalizálva regulációs enzimpárként viselkednek. Ezért a következő lépésben azt akartuk kideríteni, hogy a ROK képes-e foszforilálni a tisztított Flag-SNAP-25 fehérjét *in vitro*, és ha igen, akkor mely aminosavmaradék a foszforilációs hely. Ennek érdekében a tisztított SNAP-25 szubsztráttal és a ROK enzimmel *in vitro* kináz esszét végeztünk, majd a mintákat poliakrilamid gélen elválasztottuk, a SNAP-25 fehérjét tartalmazó sávokat pedig kivágtuk és tömegspektrometriás (LC-MS/MS) elemzés alá vetettük (30A. ábra). A vizsgálat során három peptidet sikerült azonosítani a mintákból: ¹³⁶RVT (foszforilált) NDAR¹⁴², ¹³⁶RVT(foszforilált)NDARENEMDENLEQVSGIIGNLR¹⁶¹, ¹³⁶RVT(foszforilált) NDARENEM(oxidált)DENLEQVSGIIGNLR¹⁶¹.



B.



C.



30. ábra: Tisztított Flag-SNAP-25 foszforilációja és defoszforilációja. (A) A ROK által foszforilált SNAP-25 tömegspektrometriás elemzése. Az ütközés indukált fragmentációs (CID: collision induced dissociation) spektrumok SNAP-25 (136-161. aminosav) peptideket mutatnak. Felső panel: $^{136}\text{RVTNDARENEMDENLEQVSGIIGNLR}^{161}$, $m/z=991,4868$ (3+), alsó panel: $^{136}\text{RVT(foszfo)NDARENEMDENLEQVSGIIGNLR}^{161}$, $m/z=1018,1437$ (3+). A Thr138 oldallánc foszforilációját a módosítatlan y_8 és a foszforilált b_5 fragmens ionok bizonyítják. (B) Tisztított Flag-SNAP-25 foszforilációja in vitro kináz esszével. A ROK által foszforilált SNAP-25 detektálása autoradiográfiával. (C) In vitro foszforilációs és defoszforilációs esszé. Gyantához kötött Flag-SNAP-25 fehérjét ROK-kal vagy anélkül (kontroll) inkubáltunk, majd a ROK-kal inkubált mintát a ROK eltávolítása és a gyanta mosása után a MP alegységeivel inkubáltuk. A SNAP-25 Thr138 oldalláncának foszforilációs állapotát Western blot analízissel vizsgáltuk anti-foszfo-SNAP-25 (Thr138) antitesttel, mintafelviteli kontrollként anti-Flag antitestet alkalmaztunk.

Mindhárom peptid kimutatásra került a ROK-kezelt mintából, míg a legutolsó peptid a kontroll mintában is megtalálható volt (5. táblázat).

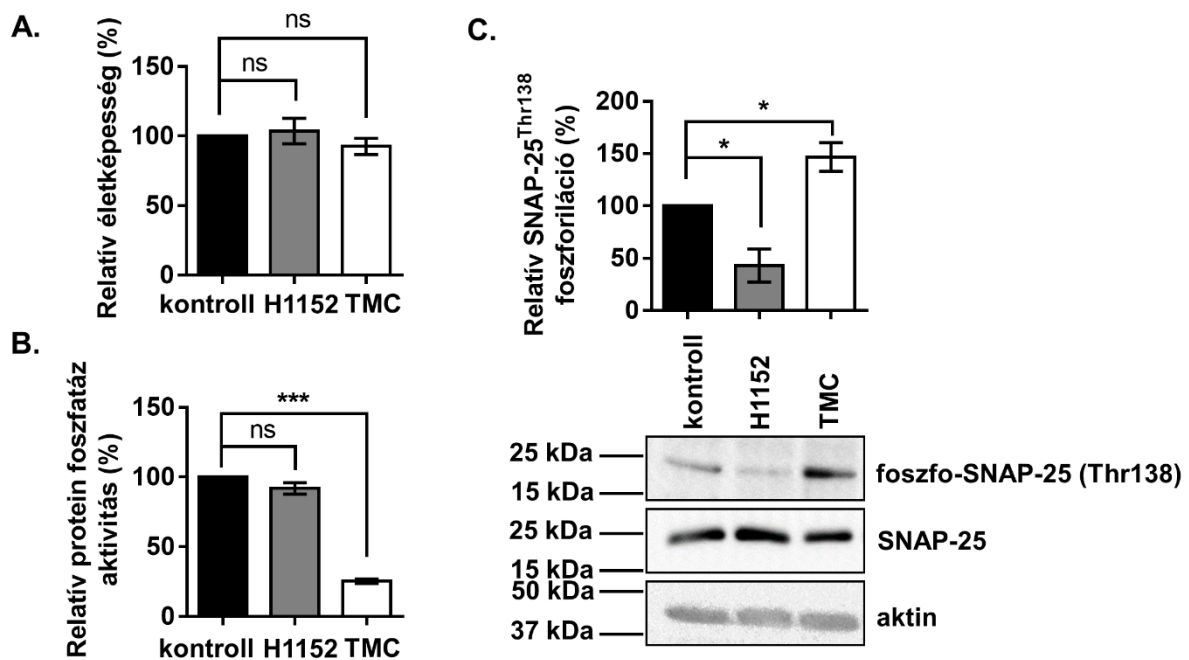
5. táblázat: A tömegspektrometriás elemzés alapján azonosított peptidek

Peptid	m/z	z	Kontroll	ROK	Start	Vég
RVT(foszforilált)NDAR	456,2084	2		+	136	142
RVT(foszforilált)NDARENEMDENLE	1018,143	3		+	136	161
QVSGIIGNLR	763,8593	4		+		
RVT(foszforilált)NDARENEM(oxidált)	1023,475	3	+	+	136	161
DENLEQVSGIIGNLR	767,8580	4		+		

Az elemzés azt is kimutatta, hogy a ROK enzimmel kezelt minta esetében a SNAP-25 Thr138 foszforiláció megnőtt, körülbelül a kontroll szint százszorosára. A SNAP-25 foszforilációját ROK-kal *in vitro* kináz vizsgálattal igazoltuk úgy, hogy a beépült radioaktív foszfátot autoradiográfias módszerrel detektáltuk (30B. ábra). Választ keresve arra a kérdésre, hogy vajon a SNAP25 a MP szubsztrátja-e és ha igen, akkor vajon a Thr138 aminosavmaradék defoszforilációját katalizálja-e, a Flag-SNAP-25 fehérjét anti-Flag agarózhoz kötöttük ki, és előbb a ROK-kal, majd mosás után a MP alegységeivel együtt inkubáltuk. A foszforilációt és a defoszforilációt a Thr138 foszforilációra specifikus antitesttel Western blot vizsgálattal igazoltuk (30C. ábra).

4.2.3. A ROK és a MP gátlása módosítja a SNAP-25 foszforilációt B50 sejtekben

B50 neuroblasztóma sejteket a PP1 szelektív inhibitorral, tautomycetinnel (TMC), illetve a ROK specifikus gátlószerelemmel, H1152-vel kezeltünk. A sejteket a kezelés előtt szérumban éhezettük, majd a fenti inhibitorokat 10% (V/V) FBS-t tartalmazó médiumban hígítottuk, és a sejtekhez adtuk. A TMC-t 5 μ M, míg a H1152-t 10 μ M végkoncentrációban alkalmaztuk. MTT esszével azt tapasztaltuk, hogy egyik inhibitor sem volt szignifikáns hatással a B50 sejtek életképességére (31A. ábra). Protein foszfatáz aktivitásmérési esszével miozin könnyűlánc szubsztrátot alkalmazva megvizsgáltuk, hogy a fenti gátlószerek hogyan befolyásolják a sejtliázumból mért foszfatáz aktivitást. Eredményeink alapján a H1152-nek nem volt szignifikáns hatása, míg a TMC általi PP1 gátlás mintegy 75%-kal csökkentette a protein foszfatáz aktivitást a kontrollhoz képest (31B. ábra). Ezek alapján úgy tűnik, hogy a protein foszfatáz aktivitás kb. 3/4 részéért a PP1 enzimek a felelősek a B50 sejtekben.



31. ábra: B50 neuroblasztóma sejtek kezelése PP1 és ROK inhibitorokkal. A sejteket 1 órán át 5 μM tautomycetinnel (TMC), vagy 30 percen keresztül 10 μM H1152-vel kezeltük. (A) A sejtek életképességét MTT vizsgálattal határoztuk meg ($n=6$). (B) Protein foszfatáz aktivitásmérési vizsgálat. ($n=3$). (C) Az inhibitorok hatása a SNAP-25 Thr138 foszforilációs állapotára Western blot analízissel az ábrán jelzett antitestekkel. Az egyes diagramok az átlagokat \pm az átlag standard hibáját (SEM) ábrázolják, $n=3$. A kontrollt minden esetben 100%-nak vettük. Kontroll és kezelt minták értékeinek összehasonlítása Student-féle párosítatlan t -próbbával: * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$.

Ezt követően Western blot analízissel megvizsgáltuk a gátlószerek hatását a SNAP-25 Thr138 oldallánc foszforilációs állapotára B50 sejtekben, a foszforilációs helyre specifikus anti-foszfo-SNAP-25 (Thr138) antitesttel (31C. ábra). A kapott sávokat denzitometráltuk, a foszfo-jel intenzitását pedig elosztottuk a kapcsolódó SNAP-25 jel erősségével, ilyen módon korrigálva az esetleges expressziós szintű vagy mintafelviteli eltéréseket. A normalizált kontroll SNAP-25 Thr138 foszforilációját 100%-nak véve a TMC-, illetve a H1152-kezelt sejtek relatív SNAP-25 foszforilációját is meghatároztuk. Eredményeink alapján mindkét inhibitornak szignifikáns hatása volt a B50 sejtekben lévő SNAP-25 foszforilációs állapotára a Thr138 aminosav oldalláncon. 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. Azt is kimutattuk, hogy ha a B50 sejtekben csendesítjük a MYPT1 alegységet, akkor a SNAP-25 Thr138 foszforiláció 30,4%-kal emelkedik meg a kontroll szinthez képest (Horváth et al, 2017). Bizonyítottuk tehát, hogy a miozin foszfatáz és a RhoA-asszociált kináz *in vivo* is modulálja a SNAP-25 foszforilációt.

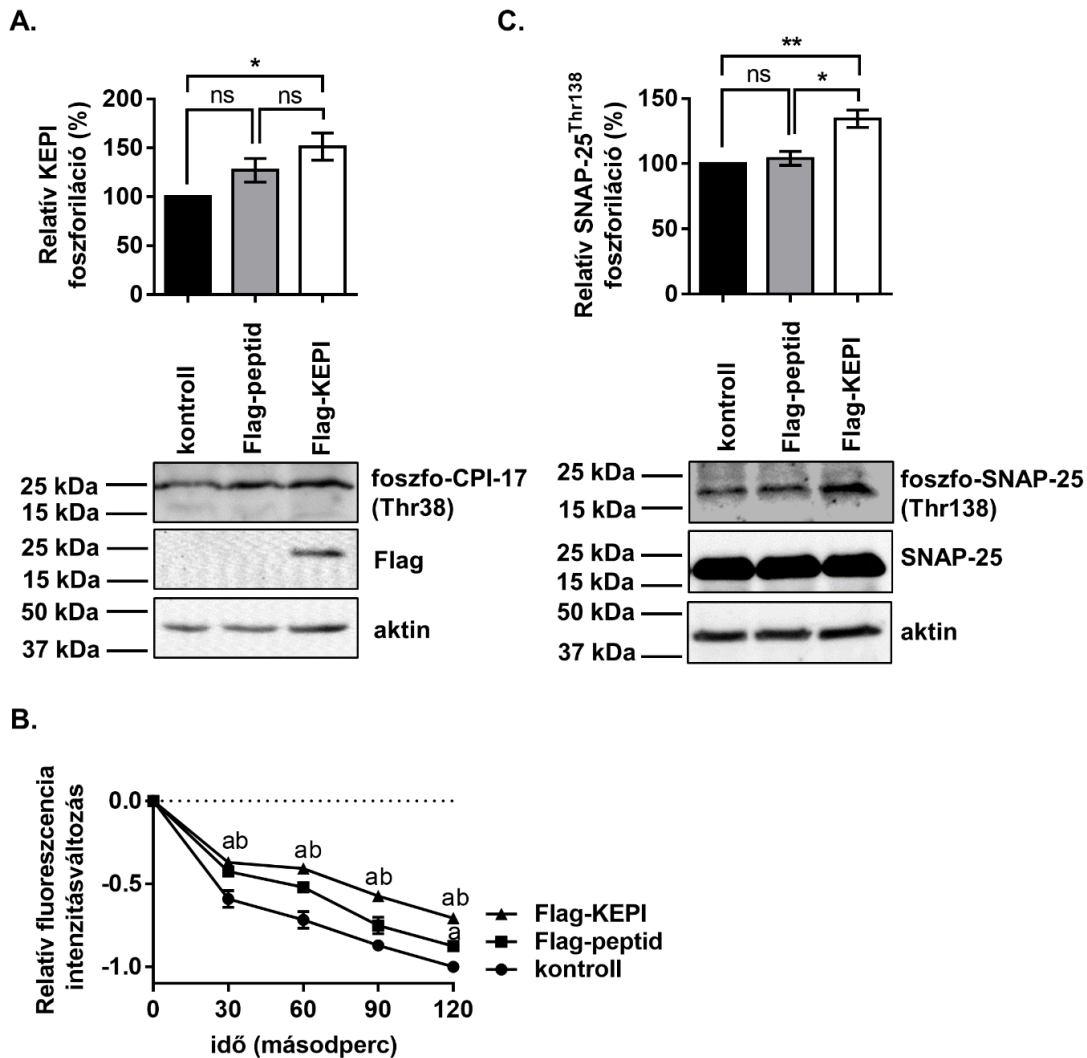
4.2.4. A MP fokozza a szinaptoszómák neurotranszmitter-kibocsátását a SNAP-25 defoszforilációja által

Egér agykérgi szinaptoszómát preparáltunk, majd fagyasztásos-felolvasztásos módszerrel (lásd 3.22. pont) Flag-peptidet, illetve tsA201 sejtekben termeltetett, és annak lizátumából tisztított Flag-KEPI fehérjét juttattunk át a szinaptoszóma membránon. A Flag-KEPI sikeres bejuttatását Western blottal bizonyítottuk, anti-Flag antitest segítségével (32A. ábra). A *kináz által aktivált protein foszfatáz-1 inhibitor* (KEPI) fehérje, akárcsak a hozzá hasonló *17 kDa molekulatömegű protein kináz C által aktivált inhibitor* (CPI-17), foszforilált állapotában gátolja a MP holoenzim aktivitását. A két fehérje nagyfokú szekvencia-homológiája miatt az anti-foszfo-CPI-17 (Thr38) antitest a foszforilált KEPI fehérjét is képes felismerni. Így ennek az antitestnek a segítségével megvizsgáltuk, hogy a fehérje transzdukcióval bejuttatott Flag-KEPI foszforilálódott-e a szinaptoszómában lévő kinázok hatására. Az antitesttel a kontroll és a Flag-peptiddel kezelt szinaptoszómák esetében is kaptunk jelet, ami arra utal, hogy a szinaptoszómában endogén CPI-17 vagy KEPI található. Azonban a Flag-KEPI bejuttatásának hatására az antitesttel detektált foszforilációs jel megnövekedett (32A. ábra), így arra következtettünk, hogy a bejuttatott Flag-KEPI valóban foszforilálódott, vagyis alkalmassá vált a miozin foszfatáz gátlására.

A MP a neurotranszmitter-kibocsátására kifejtett hatásának a PP1 enzimescsoport egyéb tagjaitól való elkülönítésére a foszforilált KEPI specifikus MP gátló hatását alkalmaztuk. Szinaptoszómális exocitózis esszéit végeztünk az „anyagok és módszerek” részben leírtaknak megfelelően úgy, hogy az exocitózis mértékével arányos fluoreszcencia-intenzitás-csökkenést fluoriméterrel detektáltuk (32B. ábra). A Flag-KEPI fehérje jelenléte már 30 másodperccel a KCl-dal kiváltott depolarizáció után szignifikánsan csökkentette a neurotranszmitter-kibocsátást mind a kontrollhoz, mind a Flag-peptidhez képest. Érdekes módon a Flag-peptidnek is volt némi, nem szignifikáns hatása a neurotranszmitter-kibocsátásra, aminek az okát jelenleg nem tudjuk megmagyarázni.

Western blottal kimutattuk, hogy a Flag-KEPI transzdukció hatására a SNAP-25 Thr138 foszforiláció megemelkedett a kontroll és a Flag-peptiddel kezelt szinaptoszómákban levő SNAP-25 foszforiláltsági szintjéhez képest (32C. ábra). Bizonyítottuk tehát, hogy a MP holoenzim KEPI általi gátlásával egyrészt csökken a neurotranszmitter-kibocsátás mértéke,

másrészt a SNAP-25 foszforiláció a Thr138 oldalláncon megemelkedik. Ebből arra következtettünk, hogy a MP elősegíti az ingerületátvivő anyagok idegsejtekből történő felszabadulását, mégpedig a SNAP-25 fehérje Thr-138 oldalláncának defoszforilációja által.

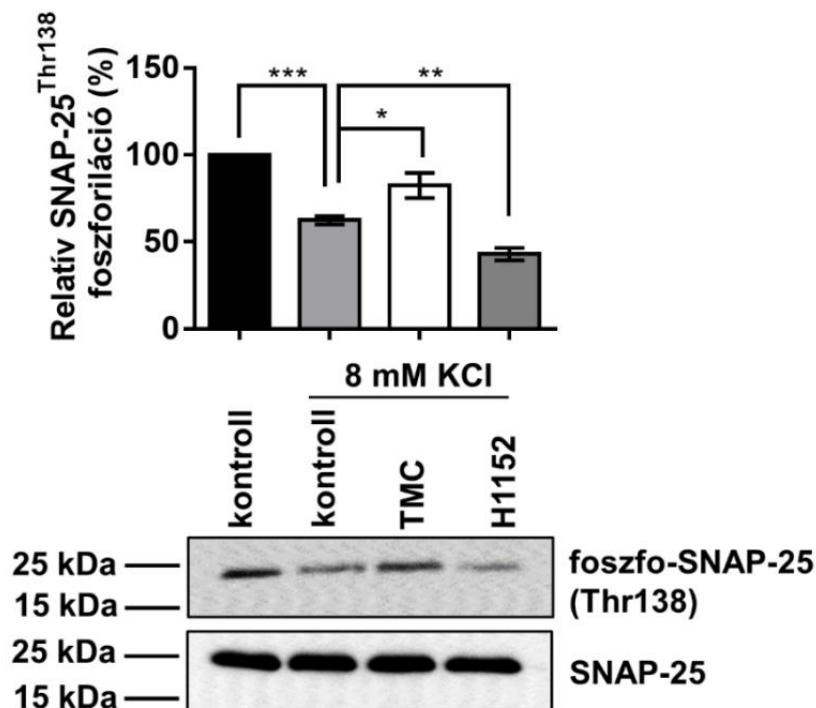


32. ábra: MP inhibitor Flag-KEPI fehérje bejuttatása a szinaptoszómákba, és hatása a neurotranszmitter-kibocsátásra és a SNAP-25 foszforilációra. Flag-peptidet és Flag-KEPI fehérjét juttattunk be a szinaptoszómákba fehérje transzdukcióval. (A) A Flag-KEPI bejutásának ellenőrzése Western blottal, anti-Flag antitesttel. A KEPI foszforilációt anti-foszfo-CPI-17 (Thr38) antitesttel vizsgáltuk, a relatív foszforilációt oszlopdiaagramon ábrázoltuk ($n=3$). (B) Exocitózis esszével vizsgáltuk a Flag-peptid és a Flag-KEPI hatását a neurotranszmitter-kibocsátásra. A szinaptoszómába bejuttatott, membránkötött FM 2-10 festék fluoreszcencia intenzitása az exocitózis mértékével egyenesen arányosan csökken. Az egyes időpontokhoz tartozó intenzitásváltozás értékek összehasonlítása t -próbával (a : szignifikáns eltérés ($p<0,05$))

az ugyanahhoz az időponthoz tartozó kontroll értékhez képest; *b*: szignifikáns eltérés ($p < 0,05$) a Flag-peptid hatásához képest). ($n=3$) (C) A Flag-peptid és a Flag-KEPI hatása a SNAP-25 Thr138 foszforilációra Western blot analízissel., $n=3$. Minden diagram esetében az átlag \pm SEM került ábrázolásra. Statisztikai próba: ANOVA és post hoc Dunnett-teszt. Jelölések: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, ns=nem szignifikáns.

4.2.5. A MP és a ROK szabályozzák a SNAP-25 foszforilációját egér agyszeletekben

A MP és a ROK szerepét egér kortikális agyszeletekben is tanulmányozni kívántuk, ezért 200 μ m vastagságú szeleteket metszettünk le az agykérgi régióból, majd az agyszeleteket 5 μ M TMC-vel, illetve 10 μ M H1152-vel kezeltük 1 órán át. A kezelés kezdetén 8 mM KCl-ot is adtunk a szövet fenntartásához használt mesterséges cerebrospinális folyadékhoz (aCSF). A KCl szerepe az agyszeletek neuronjainak a depolarizációjának kiváltása volt.



33. ábra: A PPI és a ROK inhibitorainak hatása a SNAP-25 Thr138 foszforilációra egér agyszeletekben. Egér kortikális agyszeleteket 5 μ M TMC-vel vagy 10 μ M H1152-vel kezeltünk 1 órán keresztül, 8 mM KCl jelenlétében, mely a depolarizáció kiváltására szolgált. A SNAP-25 Thr138 foszforilációját Western blottal tanulmányoztuk. A normalizált relatív SNAP-25 Thr138 foszforilációt oszlopdiagramon ábrázoltuk ($n=5$). Statisztikai analízis egyutas ANOVA-val és post hoc Dunnett-teszttel. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Az egy órás kezelés leteltével az agyszeletek lizátumából Western blot analízist végeztünk az inhibitorok hatásának vizsgálatára a SNAP-25 Thr138 foszforilációjára. A SNAP-25 expressziós szintjét anti-SNAP-25 antitesttel, míg a foszforiláció mértékét Thr138 foszforilációs helyre specifikus anti-foszfo-SNAP-25 (Thr138) antitesttel ellenőriztük. Eredményeink alapján a TMC általi PP1 gátlás megnövelte, míg a H1152 általi ROK inhibíció csökkentette a SNAP-25 foszforilációt a Thr138 aminosav oldalláncon, a kontrollhoz képest. Az is kiderült, hogy maga a KCl depolarizáció is együtt jár a SNAP-25 Thr138 foszforilációs szint csökkenésével (33. *ábra*).

5. Megbeszélés

A miozin foszfatáz szerepe a sebzáródásban

A sebek re-epitelizációja a keratinociták koordinált proliferációját, migrációját és differenciációját feltételezi (Coulombe, 2003). Ezért kutatásaink során azt vizsgáltuk, hogy a MP és a ROK milyen szerepet játszanak ezekben a folyamatokban. A HaCaT sejteken kapott eredményeinket összefoglalóan az 6. táblázat mutatja be.

6. táblázat: A ROK, a PPI és a MP szerepe a HaCaT sejtek élettani folyamataiban

vizsgált jellemző	alkalmazott módszer	H1152 hatása	TM hatása	siMYPT1 hatása
életképesség	MTT esszé	nincs változás	nincs változás	kismértékű csökkenés
apoptózis	kaszpáz esszé	nincs változás	nincs változás	nincs változás
protein foszfatáz aktivitás	PP aktivitásmérési esszé	nincs változás	kb. a felére csökken	kb. a felére csökken
proliferáció	SRB esszé	nincs változás	gátolja	gátolja
sejtmozgás	karcolási esszé robottal	elősegíti	gátolja	gátolja
sejtmozgás	karcolási esszé pipettaheggyel, és JuLI	elősegíti	gátolja	gátolja
sejtmozgás	ECIS („time to healing”)	gyorsítja	lassítja	lassítja
barrier funkció	ECIS (impedancia)	csökkenti	nincs változás	növeli

A ROK gátolja a HaCaT sejtek vándorlását

Eredményeink alapján az egérsebek tautomycinnel történő kezelése meggátolta azok záródását (12. ábra) és a re-epitelizációt (13. ábra), míg a H1152 nem fejtett ki szignifikáns

hatást a sebgyógyulás gyorsaságára (12. ábra). Egy kínai kutatócsoport korábban szintén arra az eredményre jutott, hogy az Y27632 ROK gátlószerral kezelt egérsbek területe a sebzés után 3, illetve 5 nappal sem különbözött szignifikánsan a kontroll sebekétől. Érdekesség azonban, hogy a konstitutívan aktív RhoA-t (a ROK aktivátorát) kódoló lentivirális vektor sebszövetbe juttatásával a sebgyógyulás kismértékű gyorsulását tapasztalták (Zhang et al., 2011). Zebradánió bőrén alkalmazott Y27632 ugyanakkor gátolta a re-epitelizációt (Richardson et al., 2016).

HaCaT sejteket H1152-vel kezelve sem MTT esszével, sem kaszpáz esszével nem tapasztaltunk eltérést a sejtek életképességében a kezeletlen sejtekhez képest (14. ábra). A ROK gátlása a primer humán keratinociták életképességét sem változtatta meg az MTT vizsgálat alapján, azonban a differenciáltatott NHEK sejtek kaszpáz-3 aktivitását szignifikánsan csökkentette (15. ábra). A ROK inhibíció antiapoptotikus hatását szaruhártya endotél sejtek (Okumura et al., 2009), illetve előbőrből származó primer keratinociták (Dakic et al., 2016) esetében mások is kimutatták – utóbbi esetben szintén a kaszpáz-3 aktivitásmérési esszét alkalmazva. Sőt, egy kutatás szerint az Y27632 segítségével a primer humán keratinociták immortalizációja is kivitelezhető (Chapman et al., 2010). Az Y27632 több munkacsoport eredményei szerint is fokozta a keratinociták proliferációját, melyet BrdU esszével (McMullan et al., 2003), illetve sejt számolással és a növekedési görbék meghatározásával (Chapman et al., 2010, Li et al., 2015) bizonyítottak. Sőt, az Y27632 proliferációt serkentő hatását más sejt típusokban, így szaruhártya endotél sejtek (Okumura et al., 2009) és periodontális ligamentumból származó őssejtek (Wang et al., 2017) esetében is leírták. Ezek alapján úgy tűnik, a ROK aktivitása gátolja a sejtek szaporodását. Kísérleteink során SRB esszével a HaCaT sejtek H1152-vel történő kezelésével nem mutattunk ki változást a sejtek proliferációjára (16. ábra). Az eltérés a kísérleti elrendezés különbözőségéből – alkalmazott ROK inhibitor és vizsgálati módszer – származhat; és meglehet, hogy az SRB esszé kevésbé érzékeny módszer a BrdU esszéhez képest. Akad azonban olyan publikáció is, amelyben az Y27632 a kontroll szaruhártya epitélsejtek proliferációját nem módosította, azonban ha ezeket a sejteket előzetesen heparint kötő epidermális növekedési faktor-szerű növekedési faktorról (HB-EGF) indukálták (mely megnövelte a sejtproliferáció mértékét), az Y27632 kezelést követően a proliferáció mértéke a kontroll szintre csökkent (Yin – Yu, 2008). Az eredmények tehát ellentmondásosak, és erősen függenek az alkalmazott modell és gátlószert kombinációjától.

A ROK sejt migrációban betöltött szerepét illetően szintén nincs egységes álláspont – alkalmazott módszertől, sejt típusától és az Y27632 kezelés hosszától függően egészen változatos eredményekre jutottak a kutatók. Utalás történt arra is, hogy a ROK valóban más-más módon

szabályozza a sejtmotilitást a különböző sejttípusokban. Az Y27632 egyes tanulmányok szerint fokozta (*Nobes – Hall, 1999, Charette – McCance, 2007, Yin – Yu, 2008, Jackson et al., 2011, Biggs et al., 2014, Wang et al., 2017*), másokban gátolta (*Tang et al., 2010, Richardson et al., 2016*) a migrációt. Akad olyan kutatási eredmény is, mely szerint az Y27632 kezelés nem módosítja a kontroll keratinocita sejtek migrációjának sebességét, ha azt azonban előzetesen stimulálták zsírszövet eredetű őssejtekből kinyert fehérje extraktummal, az Y27632 további hozzáadása hatására a migráció a kontroll szintre állt vissza (*Moon et al., 2012*). Arthur és Burridge fibroblasztokon végzett kísérleteiben ez azonban pont fordítva történt: az Y27632 a kontroll fibroblasztok migrációjára nem volt hatással, de a mozgásukban előzetesen gátolt sejtek vándorlását visszagyorsította (*Arthur – Burridge, 2001*). A fenti cikkekben a sejtmozgást pipettaheggyel végzett karcolási esszével (scratch assay), Boyden kamrával, illetve transwell esszével (transwell chamber) vizsgálták. Az Y27632-t 10-20 μM koncentrációban alkalmazták, és karcolás után a sejteket jellemzően 4-24 órán keresztül növesztették.

Szintén kérdéses az, hogy az aktin stresszkábelek hogyan járulnak hozzá a sejtmozgáshoz. Nobes és Hall brit kutatók fibroblasztokat a Rho inhibitorával, C3 transzferázzal kezelve azt tapasztalták, hogy az aktin stresszkábelek és a fokális adhéziók képződése súlyos zavart szenvedett, mindazonáltal a monolayer bezáródása ugyanolyan gyorsan megtörtént, mint a kontroll sejtek esetében. Ezentúl az aktív Rho gátolta a sejtek migrációját. Mindezekből arra következtettek, hogy a sejtmozgáshoz nincs szükség a stresszkábelek állandó jelenlétére, inkább azok „turnovere”, dinamikus újrendeződése mozdíthatja elő a folyamatot (*Nobes – Hall, 1999*). Más kutatók azt állítják, hogy a RhoA-indukált stresszkábel képződés elősegíti a keratinociták migrációját (*Moon et al., 2012*), míg Biggs és munkatársai szerint éppen, hogy gátolja azt (*Biggs et al., 2014*). Abban azonban konszenzus mutatkozik, hogy a ROK aktivitás Y27632 általi gátlása csökkenti az aktin stresszkábelek mennyiségét a sejtekben (*Nobes – Hall, 1999, Moon et al., 2012, Biggs et al., 2014*).

Eredményeink alapján a ROK enzim H1152 általi gátlása, melyet HaCaT sejtkultúrán 10 μM végkoncentrációban alkalmaztunk, serkenti a keratinociták vándorlását. Ezt robottal (*17. ábra*) illetve pipettaheggyel (*19. ábra*) végzett karcolási vizsgálattal is bizonyítottuk. Utóbbi módszerrel az is kiderült, hogy a H1152 kezelés már a karcolás után 8 órával szignifikáns különbséget eredményezett a karcolat méretében, és az eltérés 24 óra elteltével is szignifikáns maradt.

A β -katenin immunfestésével azt tapasztaltuk, hogy a H1152 hatására a sejtek között paracelluláris rések keletkeztek (*22B. ábra*). A sejt-sejt adhézió zavarára utal az ECIS-szel

mért, kontrollhoz képest alacsonyabb impedancia is (23B. ábra). Mindezek alapján feltételezzük, hogy a ROK szerepet játszik a sejt-sejt kapcsolatok kialakításában, és ezt egy korábbi tanulmány is megerősíti: az Y27632 kezelés gyengítette a szaruhártya epitelsejtek közötti adherens kapcsolatokat – az E-kadherin festődés intenzitása mérséklődött, és folytonossága megszakadt – és a tight junction-alapú barrier funkció is károsodott: az okkludin festődés diffúzabbá vált, és a transzsepiteliális elektromos rezisztencia (TER) is csökkent (Yin – Yu, 2008). Ellenpéldát azonban ezúttal is találni: humán mikrovaszkuláris endotelsejtek esetében a ripasudil, a ROK egy másik gátlószere növelte a TER-t, és megakadályozta a szoros sejt-kapcsolatok szétesését (Hida et al., 2018). A cigarettafüst hatására Calu-3 légúti epitelsejtekben megemelkedik a ROK aktivitása, míg a MP-é a MYPT1 gátló foszforilációja révén csökken, intenzívebbé válik az F-aktin polimerizáció, az okkludin és a ZO-1 közötti kapcsolat felbomlik, a barrier funkció pedig zavart szenved (Olivera et al., 2010).

A PP1 elősegíti a keratinociták proliferációját és migrációját

A PP1-nek a keratinociták életképességében, proliferációjában és migrációjában betöltött szerepét a sejtek 1 μ M tautomycinnel (TM), a PP1 specifikus inhibitorával történő kezelésével tanulmányoztuk. A TM kezelés a HaCaT sejtek lizátumából mért protein foszfatáz aktivitást a kontroll érték kb. felére csökkentette (16. ábra). Ez valamelyest magasabb érték annál, melyet Dedinszki és munkatársai mértek: ők HaCaT sejteket szintén 1 μ M TM-mel ugyancsak 1 órán át kezelve a foszfatáz aktivitás mintegy 30%-os csökkenését tapasztalták (Dedinszki et al., 2015). A primer humán keratinocita NHEK sejtek életképességében drámai csökkenést tapasztaltunk MTT esszével a TM kezelés hatására, és a PP1 gátlása a differenciáltott NHEK kaszpáz-3 aktivitását is megnövelte, ami a sejtek apoptózisára utal (15. ábra). A PP1 és a PP2A egyidejű gátlása okadánsavval számos sejt-típusban – így a C50 és a JB6 egér epidermális sejtekben is – apoptózist indukált (Rajesh et al., 1999). Az NHEK-kel ellentétben a TM az immortalizált humán keratinocita HaCaT sejtek életképességét nem csökkentette az MTT esszé alapján (14A. ábra), és azok apoptózisát sem váltotta ki (14B. ábra). Ugyanakkor kutatócsoportunk korábbi eredményei szerint, ha a HaCaT sejtek PP1 aktivitását RNS interferenciával gátoljuk (pan-siPP1c bejuttatásával), az MTT esszével mért sejtéletképesség kb. 25-30%-kal csökken. Továbbá a tautomycin HaCaT sejtekben kiváltja a poli(ADP-ribóz) polimeráz (PARP) részleges degradációját, ami apoptózisra utal, tekintve, hogy a PARP kaszpáz-3 általi hasítása az apoptózis indikátora (Dedinszki et al., 2015).

Az SRB esszé azt mutatta, hogy a PP1 gátlása csökkenti a HaCaT sejtek proliferációs rátáját (17C. ábra). Egy korábbi kutatás szerint a szájúregi laphámrák sejtekben megemelkedik a PP1 katalitikus alegység alfa izoformájának (PP1 α) mennyisége a normál hámsejtekhez

képest, és a PP1 α overexpresszió elősegíti a tumorigenezist és a sejtproliferációt, míg a fehérje gátlása esetén a sejtek szaporodása lelassul (Hsu et al., 2006). Ugyanakkor egy másik publikáció szerint az interleukin-4 által kiváltott, c-myc közvetítette NHEK proliferációban nincs szerepe a PP1-nek és a PP2A-nak, tekintve, hogy azok okadánsavval történő gátlása nem volt hatással a c-myc mRNS szintjére (Yang et al., 1996).

Eredményeink alapján a TM kezelés gátolja a HaCaT sejtek migrációját, ezek alapján úgy tűnik tehát, hogy a PP1 aktivitás elősegíti azt (17-19. ábra). Ez egybevág egy korábbi kutatási eredménnyel, mely szerint az okadánsav, a PP1 és a PP2A gátlószere lassította a keratinociták migrációját és a seb benövését karcolási esszé során (Ruzsnavszky et al., 2013). A PP1 más sejttípusok mozgását is serkentheti. Egy frissen közölt cikkben azt valószínűsítik, hogy a PP1 az ún. kollapszin-válasz mediátor fehérje 2 (CRMP2) defoszforilációja révén elősegíti az egér embrionális fibroblaszt (MEF) sejtek vérlemezke eredetű növekedési faktor (PDGF) indukálta migrációját (Sarhan et al., 2017).

A TM hatására nem tapasztaltunk szingifikáns változást az a HaCaT monolayer elektromos ellenállásában a kontrollhoz képest ECIS kísérlettel (23B. ábra). Korábbi kutatások szerint a katalitikusan inaktív PP1 α overexpressziója késleltette – de meg nem akadályozta – a tight junction-ök kialakulását a kutyából származó MDCK-II veseepitélium sejtekben (Traweger et al., 2008).

A MP elősegíti a keratinociták szaporodását, mozgását, és gátolja a barrier funkciót

A MYPT1 regulátor alegység expresszióját RNS interferencia segítségével gátoltuk HaCaT sejtekben (20A. ábra) ezáltal vizsgálva a miozin foszfatáz lehetséges szerepét a keratinociták szaporodásában és vándorlásában. Az eredményeink nem mondanak ellent a TM-, illetve H1152-kezelés során szerzett megfigyeléseinkkel: az siMYPT1 transzfekció – csakúgy, mint a PP1 gátlása TM-mel, illetve ellentétben a ROK H1152 általi gátlásával – fékezte a HaCaT sejtek proliferációját (21C. ábra) és drámaian akadályozta migrációjukat (21A, B, D, E. ábra). A MYPT1 kiütése a sejtek életképességét kis mértékben csökkentette (20B. ábra), és apoptózist sem váltott ki (20C. ábra).

A miozin foszfatáz sejtleletani folyamatokban betöltött szerepéről keratinocitákban alig állnak rendelkezésre adatok, más sejttípusokban azonban részletesebben tanulmányozták. Sok esetben csupán a különféle kezelések MYPT1 foszforilációjára gyakorolt hatását monitorozták (amint a szakirodalmi bevezetőben említettem, a MYPT1 a Thr696 vagy a Thr853 helyeken történő foszforilációja a miozin foszfatáz gátlását eredményezi). Így például a 10 μ m-nél kisebb átmérőjű, levegőben lebegő részecskék hatására a MYPT foszforilációja és a ROK expressziója

egyaránt megemelkedett az A549 tüdőepitel sejtekben, de a sejtek életképességében nem tapasztaltak változást (*Chirino et al., 2017*).

A MP sejtmozgásra kifejtett hatása ugyanolyan ellentmondásos a szakirodalomban, mint a ROK szerepe. Korábbi kutatások bizonyos sejtípusok esetében a keratinocitákon tapasztalt eredményeinket támasztották alá. Eszerint a MYPT1 downregulációja HeLa sejtekben (*Xia et al., 2005*) és humán aorta simaizomsejtekben is (*Cheng et al., 2013*) gátolta a migrációt, ami arra utal, hogy a MP ezekben a sejtekben is valamilyen módon elősegíti a sejtek előrehaladását. Más sejtípusokban azonban ellenkező eredményre jutottak. Gyomorrák sejtekben a MYPT1 overexpressziója gátolta a sejtek szaporodását, a sejtciklus előrehaladását és a sejtek Transwell kamrában történő mozgását (*Wang – Sun, 2018*). A miozin foszfatáz aktivitásának fokozása – melyet PPP1R14C nevű gátlófehérjének siRNS-sel történő downregulációjával értek el – a prosztatarák sejtek proliferációját és migrációját is blokkolta (*Grey et al., 2018*). Humán retina mikrovaszkuláris endotélsejteket ripasudillal, a ROK gátlószerével kezelve a MYPT defoszforilációját tapasztalták, ezzel egyidejűleg pedig a sejtek proliferációja és migrációja is zavart szenvedett (*Yamaguchi et al., 2016*). A fenti publikációk alapján valószínűsíthető, hogy a MP – csakúgy, mint a ROK – sejtípustól függően elősegíti vagy gátolja a migrációt és a sejt szaporodást. A mi kísérleteinkben a MYPT1 csendesítése drámaian gátolta a HaCaT sejteken ejtett karcolat záródását (*21. ábra*).

A MYPT1 csendesítése erősítette a keratinociták közötti sejt-sejt kapcsolatokat: a ZO-1 mennyisége megnövekedett a sejtmembránban (*22A. ábra*), és az ECIS-szel mért impedancia is megemelkedett (*23A. ábra*). Mindez több tight junction-re és erősebb elhatároló funkcióra utal, vagyis a miozin foszfatáz elrontja a keratinociták barrier funkcióját. Egy kutatócsoport szintén humán keratinocitákon végzett kísérletei során hasonló eredményre jutott: a 2-es típus leukotrién B4 receptor egyik agonistája a MYPT1 gátló foszforilációjának és az aktin polimerizációjának indukálása által védte a barrier funkciót (*Chiba et al., 2016*). Egy másik publikáció szerint a Pals1-asszociált tight junction protein (PATJ) nevű fehérje a MYPT1-hez kötődve gátolja a miozin foszfatázt és a miozin defoszforilációját, és a miozin aktiválása révén segít megőrizni a zonula adherens stabilitását *Drosophila melanogaster* epitélsejtekben (*Sen et al., 2012*).

A MP az epidermisz alsóbb rétegeiben gátolja a differenciációt a TG1 downregulációja által

A keratinociták proliferációja és differenciációja között egyfajta finoman hangolt egyensúly mutatkozik. Az epidermisz alsó rétegeiben elhelyezkedő sejtek osztódnak, majd a proliferáció csökkenésével felfelé vándorolnak, és ott differenciálódnak. A ROK gátlása

hatására a keratinociták proliferációjának fokozódását figyelték már meg, miközben a terminális differenciációt szolgáló gének expressziója downregulálódik. Leírták továbbá, hogy a differenciálódó keratinocitákban a ROK aktivitása nő (McMullan et al., 2003). Eredményeink alapján úgy gondoljuk, hogy a miozin foszfatáz a ROK-kal ellentétes módon szabályozza ezeket a folyamatokat: míg a proliferációt és a migrációt serkenti, addig a keratinociták differenciációját gátolja. Miből következtettünk mindehhez? Egyrészt, mint láttuk, a MYPT1 csendesítése HaCaT sejtekben drámaian lassította azok mozgását, a karcolat benövését. Másodszor, immunhisztokémiával megállapítottuk, hogy a MP elsősorban az epidermisz mélyebb rétegeiben expresszálódik, a felsőbb rétegekben expressziós szintje alacsony (25A. ábra). Harmadszor, a transzglutamináz-1 (TG1) elsősorban a felsőbb, elszarusodó rétegekben található meg, ahol a MP expressziója nem jellemző (25A. ábra). Negyedszer, a MYPT1 csendesítése mind HaCaT sejtekben (24A. ábra), mind humán bőrszövetben (24B. ábra) fokozta a TG1 fehérje expresszióját. Ötödször, differenciáltatott NHEK sejtekben a TG1 fehérje szintje megemelkedett a differenciálatlan sejtekhez képest (25B. ábra).

Míg a keratin-1 és -10 a korai terminális differenciáció markerei, addig a TG1 és az involucrin a *stratum granulosum* és a *stratum corneum* érett keratinocitáiban expresszálódik, és a késői terminális differenciáció indikátorai (Bayer et al., 2017). A TG1 enzim egyes fehérjék (pl. involucrin, lorikrin) közötti γ -glutamil- ϵ -lizin izopeptid kötések kialakítása által elősegíti az úgynevezett elszarusodó sejtboríték (cornified cell envelope) – egy 15 nm vastagságú, közvetlenül a sejtmembrán alatt található fehérjeréteg – létrejöttét a differenciálódó keratinocitákban. A halpikkelybőrűség (ichthyosis) nevű betegségcsoport egyes típusai a TG1-et kódoló gén mutációjára vezethetők vissza (Candi et al., 1998). Egy korábbi publikáció szerint az Y27632 kezelés gátolta az egér keratinociták TG1 expresszióját, morfológiai változását és az elszarusodó sejtboríték kialakulását, ezért a cikk szerzői arra következtettek, hogy a ROK a TG1 expresszió szabályozása révén elősegíti a differenciációt (Kotake-Nara et al., 2007). Ez az eredmény éppen egybevág a mi felfedezésünkkel: úgy tűnik tehát, hogy a MP és a ROK ellentétes módon regulálják a TG1 expresszióját és a keratinociták differenciációját.

A MP az Akt jelátviteli útvonalon keresztül befolyásolja a keratinocita proliferációt, migrációt és differenciációt

Eredményeink alapján a MYPT1 csendesítés hatására humán bőrszövetben (26. ábra) és HaCaT sejtekben (27. ábra) is csökkent az Akt1 foszforilációja a Ser473-as aminosav oldalláncon, miközben sem az Akt1 és az Akt2 mennyisége, sem az Akt2 foszforiláció nem változott. Emellett az Akt jelátviteli útvonal más elemei – az emlős rapamicin-célpont (mTOR), a p70 S6 kináz és a glikogén szintáz kináz 3 (GSK3) – is defoszforilálódtak (26A. ábra).

Az Akt, vagy más néven protein kináz B, egy Ser/Thr kináz, mely az inzulin, illetve a növekedési faktorok által stimulált, foszfatidilinozitol 3-kináz (PI3K) által szabályozott jelátviteli útvonalak egyik fő downstream effektora. Közvetlenül a foszfoinozidid-dependens protein kinázok (PDK1 és PDK2) foszforilálják a Ser308 és a Ser473 oldalláncokon, mely által az Akt aktiválódik. A humán keratinocitákban mindhárom izoformája megtalálható, de az Akt3 lényegesen kisebb mennyiségben, mint az Akt1 és az Akt2 (*Thrash et al., 2006*). Korábbi vizsgálatok szerint a PI3K – Akt – mTOR jelátviteli útvonal fontos szerepet játszik a sebgyógyulásban, mégpedig gyorsítja azt. Charette és McCance kutatásai alapján a keratinocitákban az aktív Akt downregulálja a RhoA aktivitását, és a ROK gátlásán keresztül serkenti a migrációt (*Charette – McCance, 2007*). Mások kimutatták, hogy az Akt1 Ser473-foszforiláció megemelkedik a sebszél közelében lévő keratinocitákban, továbbá hogy az mTOR aktivációja drámaian fokozza a sejtproliferációt és a migrációt, míg inhibitora, a rapamicin késlelteti az egérségek gyógyulását (*Squarize et al., 2010*). Utóbbi cikk szerzői fel is vetik annak a lehetőségét, hogy ezen jelátviteli pálya farmakológiai úton történő aktiválása a sebgyógyulás gyorsításának egyik lehetséges jövőbeli stratégiája lehet. Történtek is kísérletek ebben az irányban: egy kutatócsoport a homobrasszinolid elnevezésű növényi hormonnal sikeresen stimulálta a PI3K – Akt jelátviteli útvonalat és gyorsította fel az egérségek gyógyulását (*Esposito et al., 2013*).

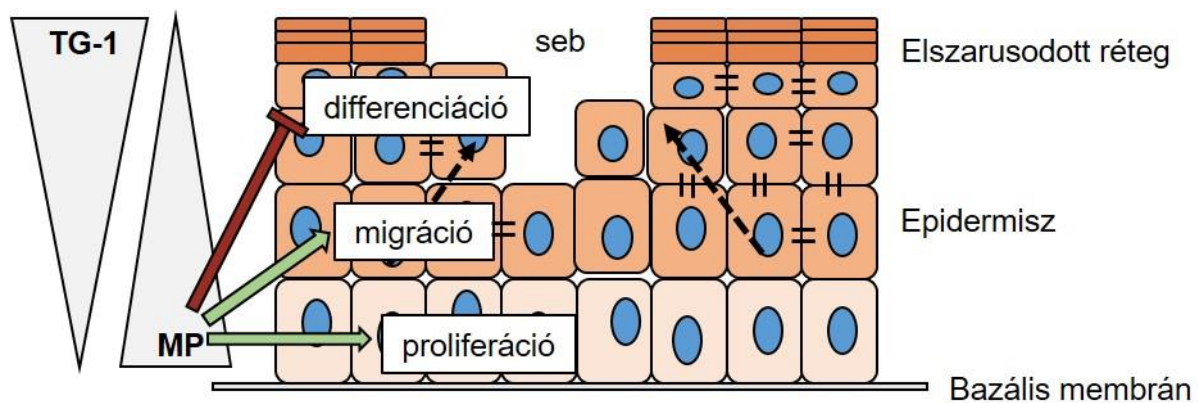
Mivel kísérleteinkben a MP gátlása az Akt1 defoszforilációját eredményezte, úgy gondoljuk, hogy a MP nem közvetlenül az Akt-on fejt ki hatását, hanem valamelyik – jelenleg még meg nem határozott – upstream effektorán. Feltételezésünk szerint a MP közvetett módon aktiválja az Akt-ot, és a jelátviteli pálya upregulációja révén kiváltja a keratinociták proliferációját és migrációját, illetve esetlegesen ezen az útvonalon gátolja a differenciációt is. A konstitutívan aktív PI3K ugyanis gátolja a monokultúrában lévő keratinociták terminális differenciációját. Emellett az Akt alacsony foszforilációját tapasztalták az epidermisz legfelső rétegeiben (*Pankow et al., 2006*). Azonban más kutatások szerint az Akt aktivitása fokozódik a keratinociták differenciációja során, és szerepe abban áll, hogy biztosítsa a sejtek túlélését a folyamat közben; az Akt1 hiányában ugyanis az epidermisz rétegződése abnormálisan történik csak meg a nagyfokú sejtelhalás miatt. (*Thrash et al., 2006*). A fenti publikációk közötti látszólagos ellentmondás feloldható, ha feltételezzük, hogy az Akt aktivitására csak a differenciációs folyamat kezdeti szakaszaiban van szükség, míg a későbbiekben – amikor a sejtek elszarusodnak, elhalnak és lekopnak a bőrrel – már nem.

A MP a Hsp27 által is szabályozhatja a keratinociták differenciációját

Az *ex vivo* bőrszövetben a MYPT1 expresszió gátlása következtében jelentősen megnövekedett a kis hősokk protein 27 (Hsp27) foszforilációja (26A. ábra). Ez a fehérje a Ser78/Ser82 foszforilációja esetén aktiválódik, és különféle sejt folyamatokat szabályoz, többek között a terminális differenciációt. A felsőbb, granuláris rétegekben foszforiláltabb formájában fordul elő (Bektas – Rubenstein, 2010). Korábbi kutatások szerint a Hsp27 expressziója és foszforilációja szükséges a keratinociták differenciációjához és a megfelelően rétegzett epidermisz kialakulásához (Jonak et al., 2011). Ezek alapján lehetséges, hogy a felsőbb rétegekben a downregulálódó MP-zal párhuzamosan aktiválódó Hsp27 segíti elő a differenciációt.

Az MP az alsóbb rétegekben elősegíti a proliferációt és a migrációt, a felsőbb rétegekben pedig inaktivációja hozzájárul a keratinociták differenciációjához

Hipotézisünk szerint a MP ellentétes módon szabályozza a keratinociták proliferációját és migrációját, illetve differenciációját: a szaporodást és a sejtmozgást serkenti, míg a differenciációt – a TG1 expresszió elnyomásával – gátolja (34. ábra). A MP az alsóbb sejtrétegekben aktív, míg a felsőbb, differenciálódó rétegekben az expressziója visszaesik, utat nyitva ezzel a TG1 upregulációja előtt.



34. ábra: Sematikus ábra a miozin foszfatáz sebzáródásban betöltött szerepéről. 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 gátolódik, ezzel párhuzamosan pedig a TG1 expresszió fokozódik, hozzájárulva a hámsejtek terminális differenciációjához. Forrás: Horváth et al., 2018.

Fenti hatásait vagy az MLC20 defoszforilációja által fejti ki, az aktin citoskeleton közvetlen szabályozásával, vagy más jelátviteli útvonalak regulációja útján. Mi két lehetséges útvonalat tártunk fel. (1) Az egyik az Akt jelátviteli pálya, ugyanis a MYPT1 csendesítése következtében az Akt1 defoszforilálódott HaCaT sejtekben és *ex vivo* humán bőrszövetben is. A szakirodalom szerint a foszforilált, aktív Akt serkenti a keratinociták proliferációját és migrációját, és előmozdítja a sebgyógyulást. Az alsóbb epidermális rétegekben az aktív MP az Akt egyik upstream regulátorának defoszforilációja által segítheti elő az Akt foszforilációját. (2) A MP a Hsp27 foszforiláció szabályozása által befolyásolhatja a keratinociták differenciációját. Elképzelésünk szerint a felsőbb rétegekben az inaktív MP valamilyen módon hozzájárul a Hsp27 foszforiláció növekedéséhez, ami – a szakirodalom szerint – elengedhetetlen a keratinociták differenciációjához. A pontos mechanizmus még nem ismert, ahogyan az sem világos, hogy a MP milyen útvonalon befolyásolja a TG1 expresszióját. Ezeknek a kérdéseknek a tisztázása még a jövő feladata.

Röviden összefoglalva, kutatómunkák legfontosabb felfedezése, hogy a MP elősegíti a sebzáródást a keratinociták proliferációjának és migrációjának előmozdítása révén, így ez az enzim potenciális célpontnak tekinthető a sebgyógyulás zavaraival összefüggésben lévő betegségek (fibrózis, szaruhártya betegségek, krónikus fekélyek) kezelésében.

A miozin foszfatáz szerepe a neurotranszmitter-kibocsátásban

A neurotranszmitter-kibocsátás többek között a SNARE komplex elemeinek – így a SNAP-25 fehérjének – a foszforilációja/defoszforilációja útján szabályozódik (*Morgan et al., 2005, Snyder et al., 2006*). Amint arra a szakirodalmi bevezetőben rámutattam, korábban számos tanulmány vizsgálta már a SNAP-25 foszforiláció szerepét ebben a folyamatban. Kutatómunkámat többek között én is e tárgyban folytattam. Munkacsoportunk a SNAP-25 korábban ismeretlen szabályozási mechanizmusát derítette fel: bizonyítottuk, hogy a ROK és a MP a SNAP-25 Thr138-as oldalláncának foszforilációján/defoszforilációján keresztül ellentétes módon szabályozzák a neurotranszmitter-kibocsátást.

Lontay és munkatársai pull-down technikával és tömegspektrometriás elemzéssel arra jutottak, hogy a miozin foszfatáz szabályozó alegységének (MYPT1) számos szinaptoszómális kölcsönható partnere van, mint pl. a szintaxin 1, a szinapszin I és a SNAP-25 (*Lontay et al., 2012*). Ez a felismerés indított el minket azon az úton, hogy tanulmányozni kezdjük: vajon a SNAP-25 valóban szubsztrátja-e a MP-nak és szubsztrátjait foszforiláló ROK-nak. Első kísérleteink arra irányultak, hogy a SNAP-25 és a MYPT1 közötti kölcsönhatás tényét több módon is igazoljuk. A fehérje-fehérje kölcsönhatást immunprecipitációval (29A. ábra) és

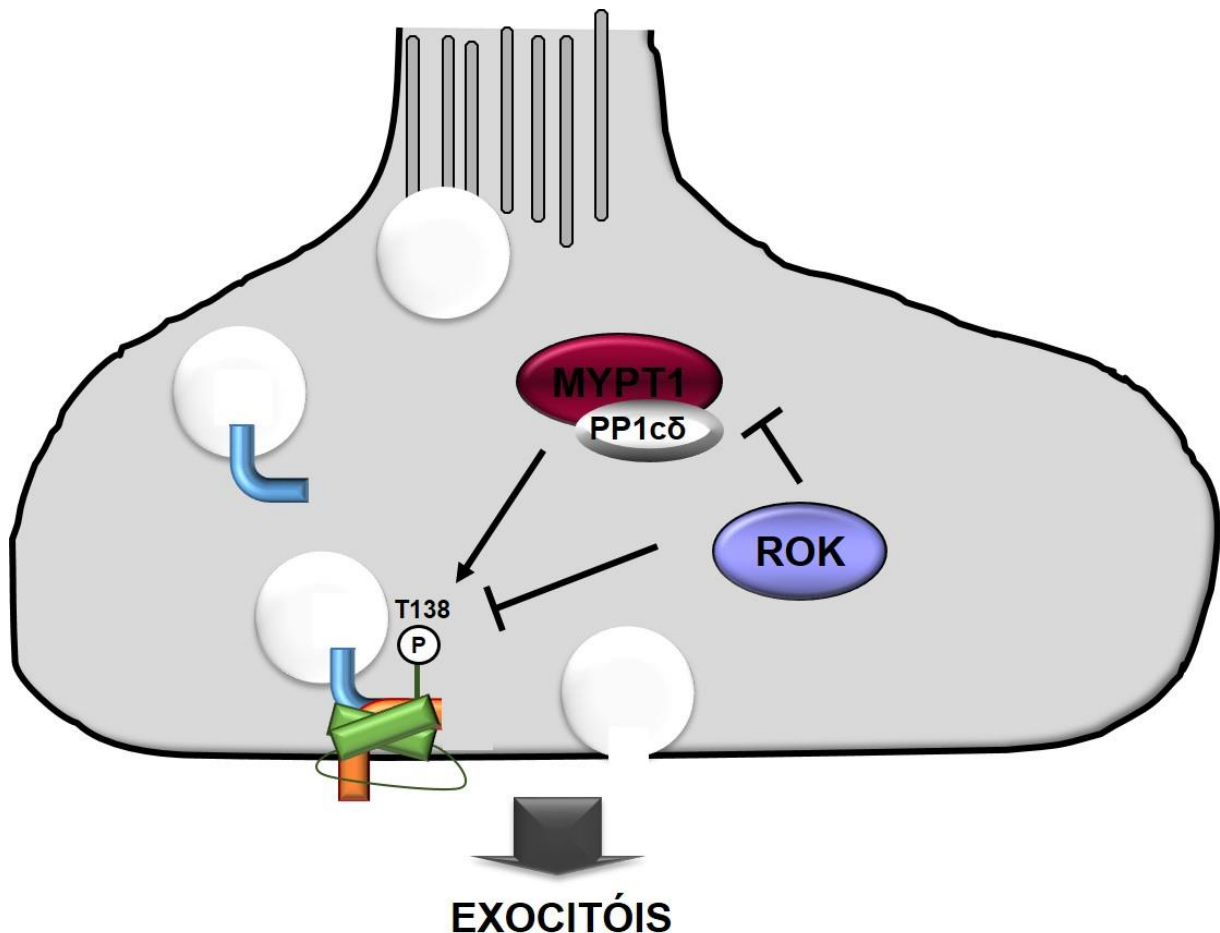
felületi plazmon rezonancia (SPR)-alapú kötődési vizsgálattal (Horváth et al., 2017) is bizonyítottuk. Utóbbi módszerrel azt is igazoltuk, hogy a SNAP-25 a MYPT1 N- és C-terminálisához is képes kapcsolódni, ugyanakkor a C-terminálishoz erősebben kötődik. Úgy találtuk, hogy a SNAP-25 a PP1c δ katalitikus alegységhez közvetlenül nem kapcsolódik (29A. ábra). Immunfluoreszcenciás festéssel és konfokális mikroszkópiával azt is megállapítottuk, hogy a MYPT1 és a SNAP-25 egyaránt megtalálható a B50 neuroblasztóma sejtek citoplazmájában és neuronális nyúlványaiban (29B. ábra).

Az már régóta közismert volt, hogy a SNAP-25 fehérjét mind a PKA (Risinger – Bennett, 1999), mind a PKC (Shimazaki et al., 1999) foszforilálja. Kutatásaink során leírtuk, hogy a SNAP-25 a ROK-nak is a szubsztrátja. Az enzimmal eredményesen foszforiláltuk a SNAP-25-t *in vitro* körülmények között (30A, B. ábra), tömegspektrometriás elemzéssel pedig a foszforilációs helyet is beazonosítottuk, mely a treonin-138-as aminosav oldallánc volt (30A. ábra). B50 sejtek (31C. ábra) és egér kortikális agyszeletek (33. ábra) H1152-vel való kezelésével igazoltuk, hogy a ROK élő sejtekben is foszforilálja a SNAP25 fehérjét a Thr138-as pozícióban. A SNAP-25 polipeptidláncában további ROK célpontot nem sikerült azonosítanunk.

A korábbi kutatások négy foszforilációs helyre fókuszáltak, ezek a Ser28, Thr29, Thr138 és a Ser187. Legintenzívebben a Ser187 foszforilációját és funkcióját tanulmányozták, a Thr138-nak jóval kevesebb figyelmet szenteltek, míg a Ser28 és a Thr29 szerepéről szinte semmit sem tudunk. Úgy tűnik, hogy a PKA és a PKC mind a négy aminosav-oldalláncot képes foszforilálni, de a PKA elsősorban a Thr138, míg a PKC a Ser187 foszforilációját katalizálja (Gao et al., 2012, Gao et al., 2016). A Ser187 foszforiláció a neurotranszmitter-kibocsátás folyamatának számos elemét szabályozhatja, többek között a SNARE-komplex összekapcsolódását (Shimazaki et al., 1996, Gao et al., 2016), a vezikulumok plazmamebránhoz történő vándorlását (Kataoka et al., 2000, Shoji-Kasai et al., 2002, Nagy et al., 2002), vagy éppen a feszültség kapuzott kalcium-csatornák SNAP-25 általi gátlását (Pozzi et al., 2008). A Thr138 szerepével kapcsolatban ellentmondásosak az eredmények: Nagy és munkatársai kísérleteiben a Thr138 foszforiláció serkentette a neurotranszmitter-kibocsátást (Nagy et al., 2004), míg Gao és munkatársai kutatásaiban gátolta azt (Gao et al., 2016). Előbbi munkacsoport úgy vélte, a Thr138 foszforilációja előmozdítja a vezikulumok primingját, utóbbi kutatócsoport eredményei arra engednek következtetni, hogy a foszforilált SNAP-25 kevésbé köti a szintaxint, ezért akadályozza a SNARE komplex összeépülését.

Eredményeink megerősítik az utóbbi állítást: a szintaxin több SNAP-25 fehérjét kötött meg a szinaptoszóma lizátumból végzett immunprecipitáció során, ha a szinaptoszómákat a

lízist megelőzően H1152-vel kezeltük, és ilyen módon a SNAP-25 foszforilációt gátoltuk. Ellenben a TMC-nek, a PP1 gátlószerének ellentétes volt a hatása. Így – osztva Gao és munkatársai véleményét – mi is azt gondoljuk, hogy a SNAP-25 foszforilációja a Thr138 aminosavmaradékon gátló hatással van a szintaxin kötésére (Horváth et al., 2017).



35. ábra: A MP/ROK a SNAP-25 foszforiláció szabályozásán keresztül modulálja a neurotranszmitter-kibocsátást. A MP a SNAP-25 (zöld) Thr138 pozícióban történő defoszforilációjával elősegíti a SNARE-komplex összeépülését és az exocitózist. A ROK a SNAP-25 foszforilációjával közvetlenül, a MP MYPT1 alegységének foszforilálásával – és így a MP gátlásával – pedig közvetetten is gátolja a folyamatot. Kék: szinaptobrevin, piros: szintaxin.

Gao és munkatársai korábban már azt is bizonyították, hogy a PP1 defoszforilálja a SNAP-25 fehérjét (Gao et al., 2012). Mi igazoltuk, hogy a PP1 enzimes család egyik tagja, a miozin foszfatáz eltávolítja a foszfátcsoportot a SNAP-25 Thr138-as aminosav oldalláncáról. Az előzetesen ROK-kal foszforilált SNAP-25-t eredményesen defoszforiláltuk *in vitro* a MP

alegységeivel inkubálva (30C. ábra). B50 sejteket (31C. ábra) és egér agyszeleteket (33. ábra) tautomycetinnel, a PP1 gátlószerével kezelve, továbbá szinaptoszómákba a MP specifikus inhibitor fehérjéjét, KEPI-t juttatva (32C. ábra) a SNAP25 Thr138 foszforiláció növekedését tapasztaltuk Western blot analízissel. Kutatócsoportunk korábbi megfigyelései szerint a H1152 növelte, míg a TMC csökkentette a kortikális szinaptoszómák depolarizáció-indukált neurotranszmitter-kibocsátását (Lontay et al., 2012).

Exocitózis esszéivel végzett kísérleteinkben azt tapasztaltuk, hogy a foszforilált és így aktivált KEPI is gátolta a neurotranszmitter-kibocsátást (32B. ábra). Mindezek alapján úgy gondoljuk, hogy a MP/ROK enzimpárnak fontos szerepe van az ingerületátvivő anyagok felszabadulásának szabályozásában: a MP elősegíti, míg a ROK gátolja azt. Korábbi eredmények alapján az enzimpár további preszinaptikus fehérjék foszforilációs állapotát is szabályozza. A szinaptikus vezikulumok membránjában helyet foglaló szinapszin I fehérjét a Ser9, míg a SNARE-komplex másik tagját, a szintaxin 1-et a Ser14 pozícióban foszforilálják/defoszforilálják. (Lontay et al., 2012). A szinapszin foszforilációs állapota befolyásolja a vezikulumok aktív zónához történő vándorlását. A MP/ROK a Tau fehérjét is szabályozza, melynek foszforilációja befolyásolja a mikrotubulusok összeszerelődését és a vezikulumok transzportját (Kiss et al., 2019). Valószínűsíthető tehát, hogy a MP és a ROK a neurotranszmitter-kibocsátás több részfolyamatát is szabályozhatja.

Eredményeinket a 35. ábra foglalja össze. Elgondolásunk szerint a miozin foszfatáz a SNAP-25 Thr138-as foszforilációs helyének defoszforilációjával megnöveli a SNAP-25 affinitását a szintaxin irányában, ezzel elősegítve a SNARE-komplex összekapcsolódását és a neurotranszmitter-kibocsátást. A ROK a SNAP-25 foszforilációjával – és MP aktivitásának gátlásával – a folyamatra negatív hatással van. Felfedezéseinkkel egy újabb lépést tettünk afelé, hogy jobban megérthessük, hogyan járulnak hozzá a protein kinázok és a foszfatázok a neurotranszmitter-kibocsátás finomhangolt szabályozásához a változó élettani feltételekhez történő adaptáció érdekében.

Összefoglalás

A miozin foszfatáz (MP) holoenzim a Ser/Thr-specifikus protein foszfatáz 1 (PP1) enzimes család tagja, mely egy protein foszfatáz 1 katalitikus alegységből (PP1 α), 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 sejttípusában, 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 karcosí 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 aminosav oldalláncon 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.

Summary

The myosin phosphatase (MP) holoenzyme is a member of the Ser/Thr-specific protein phosphatase 1 (PP1) enzyme family. It is composed of a PP1 catalytic subunit (PP1c δ), a myosin phosphatase targeting subunit (MYPT1) and an M20 subunit with unknown function. Its name was given after its first determined substrate, the 20 kDa myosin light chain (MLC20). The MP mediates the relaxation of the smooth muscle through the dephosphorylation of this protein. The enzyme can be found not only in muscle cells but in numerous cell types and has a wide range of functions: MP regulates cell cycle progression, gene expression and neurotransmitter release among others. Its activity can be regulated by RhoA-activated kinase (ROK), which enzyme phosphorylates MYPT1 at Thr696 and Thr853 and suppresses MP. Moreover, MP and ROK share numerous substrates and act like an enzyme pair in the living system.

I have studied the role of MP in the processes of wound healing and neurotransmitter release. Tautomycin (TM), a selective PP1 inhibitor spectacularly arrested the closure of murine dorsal skin wounds. We observed a significant delay in wound closure and the deceleration of cell migration when human keratinocytes (HaCaT cells) were treated with TM or siMYPT1. However ROK inhibitor H1152 accelerated the process. MYPT1 silencing had an impact on cell-cell adhesion and increased the impedance measured by ECIS. Silencing of MYPT1 upregulated transglutaminase 1 (TG1) protein expression both in HaCaT cells and in *ex vivo* human skin biopsies. Our results suggest that MP stimulates the proliferation and migration of keratinocytes in the deeper layers of the skin, but blocks their differentiation via downregulating TG1. MP regulates wound healing through Akt signaling pathway.

We proved that MP and ROK regulate the phosphorylation of SNAP-25, a member of SNARE complex, at Thr138. Introduction of KEPI, a MP inhibitor into mouse cortical synaptosomes increased SNAP-25 phosphorylation and decreased the extent of exocytosis. Our findings suggest that MP promotes neurotransmitter release by dephosphorylating SNAP-25.

Tárgyszavak (Keywords)

Tárgyszavak:

- protein foszfatázok
- miozin foszfatáz
- RhoA-asszociált kináz
- sebgyógyulás
- humán keratinociták
- sejtmigráció
- transzglutamináz-1
- Akt fehérje
- neurotranszmitter-kibocsátás
- SNAP-25
- SNARE

Keywords:

- protein phosphatases
- myosin phosphatase
- RhoA-associated kinase
- wound healing
- human keratinocytes
- cell migration
- transglutaminase-1
- Akt protein
- neurotransmitter release
- SNAP-25
- SNARE

Irodalomjegyzék

- Alessi, D., L. K. MacDougall, M. M. Sola, M. Ikebe, and P. Cohen. 1992. "The control of protein phosphatase-1 by targeting subunits. The major myosin phosphatase in avian smooth muscle is a novel form of protein phosphatase-1." *Eur J Biochem* 210 (3):1023-35.
- Amano, M., T. Kaneko, A. Maeda, M. Nakayama, M. Ito, T. Yamauchi, H. Goto, Y. Fukata, N. Oshiro, A. Shinohara, A. Iwamatsu, and K. Kaibuchi. 2003. "Identification of Tau and MAP2 as novel substrates of Rho-kinase and myosin phosphatase." *J Neurochem* 87 (3):780-90.
- Ando, Y., and P. J. Jensen. 1993. "Epidermal growth factor and insulin-like growth factor I enhance keratinocyte migration." *J Invest Dermatol* 100 (5):633-9.
- Andreeva, A. V., D. E. Evans, C. R. Hawes, N. Bennett, and M. A. Kutuzov. 1998. "PP7, a plant phosphatase representing a novel evolutionary branch of eukaryotic protein Ser/Thr phosphatases." *Biochem Mol Biol Int* 44 (4):703-15.
- Andreeva, A. V., and M. A. Kutuzov. 1999. "RdgC/PP5-related phosphatases: novel components in signal transduction." *Cell Signal* 11 (8):555-62.
- Arthur, W. T., and K. Burridge. 2001. "RhoA inactivation by p190RhoGAP regulates cell spreading and migration by promoting membrane protrusion and polarity." *Mol Biol Cell* 12 (9):2711-20. doi: 10.1091/mbc.12.9.2711.
- Baker, P. R., J. C. Trinidad, and R. J. Chalkley. 2011. "Modification site localization scoring integrated into a search engine." *Mol Cell Proteomics* 10 (7):M111.008078. doi: 10.1074/mcp.M111.008078.
- Bayer, A., M. Tohidnezhad, J. Lammel, S. Lippross, P. Behrendt, T. Klüter, T. Pufe, H. Jahr, J. Cremer, F. Rademacher, R. Gläser, and J. Harder. 2017. "Platelet-Released Growth Factors Induce Differentiation of Primary Keratinocytes." *Mediators Inflamm* 2017:5671615. doi: 10.1155/2017/5671615.
- Becker, W., H. Kentrup, S. Klumpp, J. E. Schultz, and H. G. Joost. 1994. "Molecular cloning of a protein serine/threonine phosphatase containing a putative regulatory tetratricopeptide repeat domain." *J Biol Chem* 269 (36):22586-92.
- Bektas, M., and D. S. Rubenstein. 2010. "What's in a name?: Heat shock protein 27 and keratinocyte differentiation." *J Invest Dermatol* 130 (1):10-2. doi: 10.1038/jid.2009.330.
- Beullens, M., W. Stalmans, and M. Bollen. 1996. "Characterization of a ribosomal inhibitory polypeptide of protein phosphatase-1 from rat liver." *Eur J Biochem* 239 (1):183-9.
- Bialojan, C., and A. Takai. 1988. "Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics." *Biochem J* 256 (1):283-90.
- Biggs, L. C., R. L. Naridze, K. A. DeMali, D. F. Lusche, S. Kuhl, D. R. Soll, B. C. Schutte, and M. Dunnwald. 2014. "Interferon regulatory factor 6 regulates keratinocyte migration." *J Cell Sci* 127 (Pt 13):2840-8. doi: 10.1242/jcs.139246.
- Blasi, J., E. R. Chapman, E. Link, T. Binz, S. Yamasaki, P. De Camilli, T. C. Südhof, H. Niemann, and R. Jahn. 1993. "Botulinum neurotoxin A selectively cleaves the synaptic protein SNAP-25." *Nature* 365 (6442):160-3. doi: 10.1038/365160a0.
- Boukamp, P., R. T. Petrussevska, D. Breitkreutz, J. Hornung, A. Markham, and N. E. Fusenig. 1988. "Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line." *J Cell Biol* 106 (3):761-71.
- Brun, C., A. Demeaux, F. Guaddachi, F. Jean-Louis, T. Oddos, M. Bagot, A. Bensussan, S. Jauliac, and L. Michel. 2014. "T-plastin expression downstream to the

- calcineurin/NFAT pathway is involved in keratinocyte migration." *PLoS One* 9 (9):e104700. doi: 10.1371/journal.pone.0104700.
- Bátori, R., B. Bécsi, D. Nagy, Z. Kónya, C. Hegedűs, Z. Bordán, A. Verin, B. Lontay, and F. Erdődi. 2017. "Interplay of myosin phosphatase and protein phosphatase-2A in the regulation of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation and nitric oxide production." *Sci Rep* 7:44698. doi: 10.1038/srep44698.
- Candi, E., G. Melino, A. Lahm, R. Ceci, A. Rossi, I. G. Kim, B. Ciani, and P. M. Steinert. 1998. "Transglutaminase 1 mutations in lamellar ichthyosis. Loss of activity due to failure of activation by proteolytic processing." *J Biol Chem* 273 (22):13693-702.
- Ceulemans, H., and M. Bollen. 2004. "Functional diversity of protein phosphatase-1, a cellular economizer and reset button." *Physiol Rev* 84 (1):1-39. doi: 10.1152/physrev.00013.2003.
- Chapman, S., X. Liu, C. Meyers, R. Schlegel, and A. A. McBride. 2010. "Human keratinocytes are efficiently immortalized by a Rho kinase inhibitor." *J Clin Invest* 120 (7):2619-26. doi: 10.1172/JCI42297.
- Charette, S. T., and D. J. McCance. 2007. "The E7 protein from human papillomavirus type 16 enhances keratinocyte migration in an Akt-dependent manner." *Oncogene* 26 (52):7386-90. doi: 10.1038/sj.onc.1210541.
- Chatterjee, J., and M. Köhn. 2013. "Targeting the untargetable: recent advances in the selective chemical modulation of protein phosphatase-1 activity." *Curr Opin Chem Biol* 17 (3):361-8. doi: 10.1016/j.cbpa.2013.04.008.
- Cheng, J. C., H. P. Cheng, I. C. Tsai, and M. J. Jiang. 2013. "ROS-mediated downregulation of MYPT1 in smooth muscle cells: a potential mechanism for the aberrant contractility in atherosclerosis." *Lab Invest* 93 (4):422-33. doi: 10.1038/labinvest.2013.40.
- Cheng, X. C., T. Kihara, H. Kusakabe, J. Magae, Y. Kobayashi, R. P. Fang, Z. F. Ni, Y. C. Shen, K. Ko, and I. Yamaguchi. 1987. "A new antibiotic, tautomycin." *J Antibiot (Tokyo)* 40 (6):907-9.
- Cheng, X. C., T. Kihara, X. Ying, M. Uramoto, H. Osada, H. Kusakabe, B. N. Wang, Y. Kobayashi, K. Ko, and I. Yamaguchi. 1989. "A new antibiotic, tautomycin." *J Antibiot (Tokyo)* 42 (1):141-4.
- Chiba, T., T. Nakahara, A. Hashimoto-Hachiya, T. Yokomizo, H. Uchi, and M. Furue. 2016. "The leukotriene B4 receptor BLT2 protects barrier function via actin polymerization with phosphorylation of myosin phosphatase target subunit 1 in human keratinocytes." *Exp Dermatol* 25 (7):532-6. doi: 10.1111/exd.12976.
- Chirino, Y. I., C. M. García-Cuellar, C. García-García, E. Soto-Reyes, ÁR Osornio-Vargas, L. A. Herrera, A. López-Saavedra, J. Miranda, R. Quintana-Belmares, I. R. Pérez, and Y. Sánchez-Pérez. 2017. "Airborne particulate matter in vitro exposure induces cytoskeleton remodeling through activation of the ROCK-MYPT1-MLC pathway in A549 epithelial lung cells." *Toxicol Lett* 272:29-37. doi: 10.1016/j.toxlet.2017.03.002.
- Chiyoda, T., 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. 2012. "LATS1/WARTS phosphorylates MYPT1 to counteract PLK1 and regulate mammalian mitotic progression." *J Cell Biol* 197 (5):625-41. doi: 10.1083/jcb.201110110.
- Cho, H. S., 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. 2011. "Demethylation of RB regulator MYPT1 by histone demethylase LSD1 promotes cell cycle progression in cancer cells." *Cancer Res* 71 (3):655-60. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2446.
- Cobb, M. H., and E. J. Goldsmith. 1995. "How MAP kinases are regulated." *J Biol Chem* 270 (25):14843-6.

- Cohen, P., S. Klumpp, and D. L. Schelling. 1989. "An improved procedure for identifying and quantitating protein phosphatases in mammalian tissues." *FEBS Lett* 250 (2):596-600.
- Cohen, P. T., N. D. Brewis, V. Hughes, and D. J. Mann. 1990. "Protein serine/threonine phosphatases; an expanding family." *FEBS Lett* 268 (2):355-9.
- Compagnucci, C., S. Barresi, S. Petrini, E. Bertini, and G. Zanni. 2015. "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 (2):179-183. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.12.033.
- Coulombe, P. A. 2003. "Wound epithelialization: accelerating the pace of discovery." *J Invest Dermatol* 121 (2):219-30. doi: 10.1046/j.1523-1747.2003.12387.x.
- Cousin, M. A., and P. J. Robinson. 1999. "Mechanisms of synaptic vesicle recycling illuminated by fluorescent dyes." *J Neurochem* 73 (6):2227-39.
- Cousin, M. A., and P. J. Robinson. 2000. "Two mechanisms of synaptic vesicle recycling in rat brain nerve terminals." *J Neurochem* 75 (4):1645-53.
- Croze, R. H., W. J. Thi, and D. O. Clegg. 2016. "ROCK Inhibition Promotes Attachment, Proliferation, and Wound Closure in Human Embryonic Stem Cell-Derived Retinal Pigmented Epithelium." *Transl Vis Sci Technol* 5 (6):7. doi: 10.1167/tvst.5.6.7.
- da Cruz e Silva, O. B., E. F. da Cruz e Silva, and P. T. Cohen. 1988. "Identification of a novel protein phosphatase catalytic subunit by cDNA cloning." *FEBS Lett* 242 (1):106-10.
- Dakic, A., K. DiVito, S. Fang, F. Suprynowicz, A. Gaur, X. Li, N. Palechor-Ceron, V. Simic, S. Choudhury, S. Yu, C. M. Simbulan-Rosenthal, D. Rosenthal, R. Schlegel, and X. Liu. 2016. "ROCK inhibitor reduces Myc-induced apoptosis and mediates immortalization of human keratinocytes." *Oncotarget* 7 (41):66740-66753. doi: 10.18632/oncotarget.11458.
- Dedinszki, D., A. Sipos, A. Kiss, R. Bator, Z. Konya, L. Virag, F. Erdodi, and B. Lontay. 2015. "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 (1):22-33. doi: 10.1016/j.bbadis.2014.11.005.
- Dunkley, P. R., J. W. Heath, S. M. Harrison, P. E. Jarvie, P. J. Glenfield, and J. A. Rostas. 1988. "A rapid Percoll gradient procedure for isolation of synaptosomes directly from an S1 fraction: homogeneity and morphology of subcellular fractions." *Brain Res* 441 (1-2):59-71.
- Eckert, R. L., M. T. Sturniolo, R. Jans, C. A. Kraft, H. Jiang, and E. A. Rorke. 2009. "TIG3: a regulator of type I transglutaminase activity in epidermis." *Amino Acids* 36 (4):739-46. doi: 10.1007/s00726-008-0123-9.
- Egloff, M. P., D. F. Johnson, G. Moorhead, P. T. Cohen, P. Cohen, and D. Barford. 1997. "Structural basis for the recognition of regulatory subunits by the catalytic subunit of protein phosphatase 1." *EMBO J* 16 (8):1876-87. doi: 10.1093/emboj/16.8.1876.
- Erdodi, F., B. Toth, K. Hirano, M. Hirano, D. J. Hartshorne, and P. Gergely. 1995. "Endothall thioanhydride inhibits protein phosphatases-1 and -2A in vivo" *Am J Physiol* 269(5 Pt 1):C1176-84.
- Erdodi, F., E. Kiss, M. P. Walsh, B. Stefansson, J. T. Deng, M. Eto, D. L. Brautigan, and D. J. Hartshorne. 2003. "Phosphorylation of protein phosphatase type-1 inhibitory proteins by integrin-linked kinase and cyclic nucleotide-dependent protein kinases." *Biochem Biophys Res Commun* 306 (2):382-7.
- Esposito, D., T. Rathinasabapathy, B. Schmidt, M. P. Shakarjian, S. Komarnytsky, and I. Raskin. 2013. "Acceleration of cutaneous wound healing by brassinosteroids." *Wound Repair Regen* 21 (5):688-96. doi: 10.1111/wrr.12075.
- Eto, M. 2009. "Regulation of cellular protein phosphatase-1 (PP1) by phosphorylation of the CPI-17 family, C-kinase-activated PP1 inhibitors." *J Biol Chem* 284 (51):35273-7. doi:

- 10.1074/jbc.R109.059972.
- Eto, M., J. A. Kirkbride, R. Chugh, N. K. Karikari, and J. I. Kim. 2013. "Nuclear localization of CPI-17, a protein phosphatase-1 inhibitor protein, affects histone H3 phosphorylation and corresponds to proliferation of cancer and smooth muscle cells." *Biochem Biophys Res Commun* 434 (1):137-42. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.03.055.
- Eto, M., T. Ohmori, M. Suzuki, K. Furuya, and F. Morita. 1995. "A novel protein phosphatase-1 inhibitory protein potentiated by protein kinase C. Isolation from porcine aorta media and characterization." *J Biochem* 118 (6):1104-7.
- Eto, M., S. Senba, F. Morita, and M. Yazawa. 1997. "Molecular cloning of a novel phosphorylation-dependent inhibitory protein of protein phosphatase-1 (CPI17) in smooth muscle: its specific localization in smooth muscle." *FEBS Lett* 410 (2-3):356-60.
- Favre, B., P. Turowski, and B. A. Hemmings. 1997. "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 (21):13856-63.
- Fukata, Y., K. Kimura, N. Oshiro, H. Saya, Y. Matsuura, and K. Kaibuchi. 1998. "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 (2):409-18.
- Gao, J., M. Hirata, A. Mizokami, J. Zhao, I. Takahashi, and H. Takeuchi. 2016. "Differential role of SNAP-25 phosphorylation by protein kinases A and C in the regulation of SNARE complex formation and exocytosis in PC12 cells." *Cell Signal* 28 (5):425-437. doi: 10.1016/j.cellsig.2015.12.014.
- Gao, J., H. Takeuchi, Z. Zhang, M. Fukuda, and M. Hirata. 2012. "Phospholipase C-related but catalytically inactive protein (PRIP) modulates synaptosomal-associated protein 25 (SNAP-25) phosphorylation and exocytosis." *J Biol Chem* 287 (13):10565-78. doi: 10.1074/jbc.M111.294645.
- Genoud, S., W. Pralong, B. M. Riederer, L. Eder, S. Catsicas, and D. Muller. 1999. "Activity-dependent phosphorylation of SNAP-25 in hippocampal organotypic cultures." *J Neurochem* 72 (4):1699-706.
- Grassie, M. E., L. D. Moffat, M. P. Walsh, and J. A. MacDonald. 2011a. "The myosin phosphatase targeting protein (MYPT) family: a regulated mechanism for achieving substrate specificity of the catalytic subunit of protein phosphatase type 1 δ ." *Arch Biochem Biophys* 510 (2):147-59. doi: 10.1016/j.abb.2011.01.018.
- Grassie, M. E., L. D. Moffat, M. P. Walsh, and J. A. MacDonald. 2011b. "The myosin phosphatase targeting protein (MYPT) family: a regulated mechanism for achieving substrate specificity of the catalytic subunit of protein phosphatase type 1 δ ." *Arch Biochem Biophys* 510 (2):147-59. doi: 10.1016/j.abb.2011.01.018.
- Grey, J., D. Jones, L. Wilson, S. Nakjang, J. Clayton, R. Temperley, E. Clark, L. Gaughan, and C. Robson. 2018. "Differential regulation of the androgen receptor by protein phosphatase regulatory subunits." *Oncotarget* 9 (3):3922-3935. doi: 10.18632/oncotarget.22883.
- Guan, S., J. C. Price, S. B. Prusiner, S. Ghaemmghami, and A. L. Burlingame. 2011. "A data processing pipeline for mammalian proteome dynamics studies using stable isotope metabolic labeling." *Mol Cell Proteomics* 10 (12):M111.010728. doi: 10.1074/mcp.M111.010728.
- Guo, S., and L. A. Dipietro. 2010. "Factors affecting wound healing." *J Dent Res* 89 (3):219-29. doi: 10.1177/0022034509359125.
- Haensel, D., and X. Dai. 2018. "Epithelial-to-mesenchymal transition in cutaneous wound healing: Where we are and where we are heading." *Dev Dyn* 247 (3):473-480. doi:

- 10.1002/dvdy.24561.
- Han, J., K. Pluhackova, and R. A. Böckmann. 2017. "The Multifaceted Role of SNARE Proteins in Membrane Fusion." *Front Physiol* 8:5. doi: 10.3389/fphys.2017.00005.
- Hartshorne, D. J. 1998. "Myosin phosphatase: subunits and interactions." *Acta Physiol Scand* 164 (4):483-93. doi: 10.1046/j.1365-201X.1998.00447.x.
- Hepp, R., J. P. Cabaniols, and P. A. Roche. 2002. "Differential phosphorylation of SNAP-25 in vivo by protein kinase C and protein kinase A." *FEBS Lett* 532 (1-2):52-6.
- Hida, Y., S. Nakamura, A. Nishinaka, Y. Inoue, M. Shimazawa, and H. Hara. 2018. "Effects of ripasudil, a ROCK inhibitor, on retinal edema and nonperfusion area in a retinal vein occlusion murine model." *J Pharmacol Sci* 137 (2):129-136. doi: 10.1016/j.jphs.2018.06.010.
- Hirano, K., B. C. Phan, and D. J. Hartshorne. 1997. "Interactions of the subunits of smooth muscle myosin phosphatase." *J Biol Chem* 272 (6):3683-8.
- Horváth, D., A. Sipos, E. Major, Z. Kónya, R. Bátori, D. Dedinszki, A. Szöllősi, I. Tamás, J. Iván, A. Kiss, F. Erdődi, and B. Lontay. 2018. "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. doi: 10.1016/j.bbadis.2018.07.013.
- Horváth, D., I. Tamás, A. Sipos, Z. Darula, B. Bécsi, D. Nagy, J. Iván, F. Erdődi, and B. Lontay. 2017. "Myosin phosphatase and RhoA-activated kinase modulate neurotransmitter release by regulating SNAP-25 of SNARE complex." *PLoS One* 12 (5):e0177046. doi: 10.1371/journal.pone.0177046.
- Hsu, L. C., X. Huang, S. Seasholtz, D. M. Potter, and S. M. Gollin. 2006. "Gene amplification and overexpression of protein phosphatase 1alpha in oral squamous cell carcinoma cell lines." *Oncogene* 25 (40):5517-26. doi: 10.1038/sj.onc.1209563.
- Iida, Y., S. Yamamori, M. Itakura, H. Miyaoka, and M. Takahashi. 2013. "Protein phosphatase 2A dephosphorylates SNAP-25 through two distinct mechanisms in mouse brain synaptosomes." *Neurosci Res* 75 (3):184-9. doi: 10.1016/j.neures.2013.01.002.
- Ingebritsen, T. S., and P. Cohen. 1983. "The protein phosphatases involved in cellular regulation. 1. Classification and substrate specificities." *Eur J Biochem* 132 (2):255-61.
- Ito, M., T. Nakano, F. Erdodi, and D. J. Hartshorne. 2004. "Myosin phosphatase: structure, regulation and function." *Mol Cell Biochem* 259 (1-2):197-209.
- Jackson, B., K. Peyrollier, E. Pedersen, A. Basse, R. Karlsson, Z. Wang, T. Lefever, A. M. Ochsenbein, G. Schmidt, K. Aktories, A. Stanley, F. Quondamatteo, M. Ladwein, K. Rottner, J. van Hengel, and C. Brakebusch. 2011. "RhoA is dispensable for skin development, but crucial for contraction and directed migration of keratinocytes." *Mol Biol Cell* 22 (5):593-605. doi: 10.1091/mbc.E09-10-0859.
- Jin, H., T. Sperka, P. Herrlich, and H. Morrison. 2006. "Tumorigenic transformation by CPI-17 through inhibition of a merlin phosphatase." *Nature* 442 (7102):576-9. doi: 10.1038/nature04856.
- Johnson, D., P. Cohen, M. X. Chen, Y. H. Chen, and P. T. Cohen. 1997. "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 (3):931-9.
- Jonak, C., M. Mildner, G. Klosner, V. Paulitschke, R. Kunstfeld, H. Pehamberger, E. Tschachler, and F. Trautinger. 2011. "The hsp27kD heat shock protein and p38-MAPK signaling are required for regular epidermal differentiation." *J Dermatol Sci* 61 (1):32-7. doi: 10.1016/j.jdermsci.2010.10.009.
- Kataoka, M., R. Kuwahara, S. Iwasaki, Y. Shoji-Kasai, and M. Takahashi. 2000. "Nerve growth factor-induced phosphorylation of SNAP-25 in PC12 cells: a possible involvement in the regulation of SNAP-25 localization." *J Neurochem* 74 (5):2058-66.

- Katz, B. 1969. "The Release of Neural Transmitter Substances." *Liverpool University Press*
- Kimura, K., Y. Fukata, Y. Matsuoka, V. Bennett, Y. Matsuura, K. Okawa, A. Iwamatsu, and K. Kaibuchi. 1998. "Regulation of the association of adducin with actin filaments by Rho-associated kinase (Rho-kinase) and myosin phosphatase." *J Biol Chem* 273 (10):5542-8.
- Kimura, K., M. Ito, M. Amano, K. Chihara, Y. Fukata, M. Nakafuku, B. Yamamori, J. Feng, T. Nakano, K. Okawa, A. Iwamatsu, and K. Kaibuchi. 1996. "Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase)." *Science* 273 (5272):245-8.
- Kiss, A., F. Erdödi, and B. Lontay. 2019. "Myosin phosphatase: Unexpected functions of a long-known enzyme." *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1866 (1):2-15. doi: 10.1016/j.bbamcr.2018.07.023.
- Kiss, A., B. Lontay, B. Bécsi, L. Márkász, E. Oláh, P. Gergely, and F. Erdodi. 2008. "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 (11):2059-70. doi: 10.1016/j.cellsig.2008.07.018.
- Koivisto, L., K. Alavian, L. Hakkinen, S. Pelech, C. A. McCulloch, and H. Larjava. 2003. "Glycogen synthase kinase-3 regulates formation of long lamellipodia in human keratinocytes." *J Cell Sci* 116 (Pt 18):3749-60. doi: 10.1242/jcs.00693.
- Korrodi-Gregório, L., S. L. Esteves, and M. Fardilha. 2014. "Protein phosphatase 1 catalytic isoforms: specificity toward interacting proteins." *Transl Res* 164 (5):366-91. doi: 10.1016/j.trsl.2014.07.001.
- Kotake-Nara, E., S. Takizawa, and K. Saida. 2007. "Endothelin-2/vasoactive intestinal contractor via ROCK regulates transglutaminase 1 on differentiation of mouse keratinocytes." *Biochem Biophys Res Commun* 357 (1):168-73. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.03.118.
- Larsen, M. R., T. E. Thingholm, O. N. Jensen, P. Roepstorff, and T. J. Jørgensen. 2005. "Highly selective enrichment of phosphorylated peptides from peptide mixtures using titanium dioxide microcolumns." *Mol Cell Proteomics* 4 (7):873-86. doi: 10.1074/mcp.T500007-MCP200.
- Li, Z., S. Han, X. Wang, F. Han, X. Zhu, Z. Zheng, H. Wang, Q. Zhou, Y. Wang, L. Su, J. Shi, C. Tang, and D. Hu. 2015. "Rho kinase inhibitor Y-27632 promotes the differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells into keratinocyte-like cells in xeno-free conditioned medium." *Stem Cell Res Ther* 6:17. doi: 10.1186/s13287-015-0008-2.
- Liu, Q. R., P. W. Zhang, Q. Zhen, D. Walther, X. B. Wang, and G. R. Uhl. 2002. "KEPI, a PKC-dependent protein phosphatase 1 inhibitor regulated by morphine." *J Biol Chem* 277 (15):13312-20. doi: 10.1074/jbc.M107558200.
- Lontay, B., K. Bodoor, D. H. Weitzel, D. Loiselle, C. Fortner, S. Lengyel, D. Zheng, J. Devente, R. Hickner, and T. A. Haystead. 2010. "Smoothelin-like 1 protein regulates myosin phosphatase-targeting subunit 1 expression during sexual development and pregnancy." *J Biol Chem* 285 (38):29357-66. doi: 10.1074/jbc.M110.143966.
- Lontay, B., A. Kiss, P. Gergely, D. J. Hartshorne, and F. Erdodi. 2005. "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 (10):1265-75. doi: 10.1016/j.cellsig.2005.01.008.
- Lontay, B., B. Pál, Z. Serfözö, Á Kőszeghy, G. Szücs, Z. Rusznák, and F. Erdödi. 2012. "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 (1):84-99. doi: 10.1111/j.1471-4159.2012.07882.x.
- Lontay, B., Z. Serfozo, P. Gergely, M. Ito, D. J. Hartshorne, and F. Erdodi. 2004. "Localization

- of myosin phosphatase target subunit 1 in rat brain and in primary cultures of neuronal cells." *J Comp Neurol* 478 (1):72-87. doi: 10.1002/cne.20273.
- Lu, X., Y. Zhang, and Y. K. Shin. 2008. "Supramolecular SNARE assembly precedes hemifusion in SNARE-mediated membrane fusion." *Nat Struct Mol Biol* 15 (7):700-6. doi: 10.1038/nsmb.1433.
- MacKintosh, C., and S. Klumpp. 1990. "Tautomycin from the bacterium *Streptomyces verticillatus*. Another potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A." *FEBS Lett* 277 (1-2):137-40.
- Mansuy, I. M., and S. Shenolikar. 2006. "Protein serine/threonine phosphatases in neuronal plasticity and disorders of learning and memory." *Trends Neurosci* 29 (12):679-86. doi: 10.1016/j.tins.2006.10.004.
- Martin, P. 1997. "Wound healing--aiming for perfect skin regeneration." *Science* 276 (5309):75-81.
- Matsui, T., M. Maeda, Y. Doi, S. Yonemura, M. Amano, K. Kaibuchi, and S. Tsukita. 1998. "Rho-kinase phosphorylates COOH-terminal threonines of ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins and regulates their head-to-tail association." *J Cell Biol* 140 (3):647-57.
- Matsumura, F., and D. J. Hartshorne. 2008. "Myosin phosphatase target subunit: Many roles in cell function." *Biochem Biophys Res Commun* 369 (1):149-56. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.12.090.
- McMullan, R., S. Lax, V. H. Robertson, D. J. Radford, S. Broad, F. M. Watt, A. Rowles, D. R. Croft, M. F. Olson, and N. A. Hotchin. 2003. "Keratinocyte differentiation is regulated by the Rho and ROCK signaling pathway." *Curr Biol* 13 (24):2185-9.
- Moon, K. M., Y. H. Park, J. S. Lee, Y. B. Chae, M. M. Kim, D. S. Kim, B. W. Kim, S. W. Nam, and J. H. Lee. 2012. "The effect of secretory factors of adipose-derived stem cells on human keratinocytes." *Int J Mol Sci* 13 (1):1239-57. doi: 10.3390/ijms13011239.
- Morgan, A., R. D. Burgoyne, J. W. Barclay, T. J. Craig, G. R. Prescott, L. F. Ciuffo, G. J. Evans, and M. E. Graham. 2005. "Regulation of exocytosis by protein kinase C." *Biochem Soc Trans* 33 (Pt 6):1341-4. doi: 10.1042/BST20051341.
- Máthé, C., D. Beyer, F. Erdodi, Z. Serfózo, L. Székvölgyi, G. Vasas, M. M-Hamvas, K. Jámbrik, S. Gonda, A. Kiss, Z. M. Szigeti, and G. Surányi. 2009. "Microcystin-LR induces abnormal root development by altering microtubule organization in tissue-cultured common reed (*Phragmites australis*) plantlets." *Aquat Toxicol* 92 (3):122-30. doi: 10.1016/j.aquatox.2009.02.005.
- Müller-Decker, K., W. Hirschner, F. Marks, and G. Fürstenberger. 2002. "The effects of cyclooxygenase isozyme inhibition on incisional wound healing in mouse skin." *J Invest Dermatol* 119 (5):1189-95. doi: 10.1046/j.1523-1747.2002.19501.x.
- Nagy, G., U. Matti, R. B. Nehring, T. Binz, J. Rettig, E. Neher, and J. B. Sørensen. 2002. "Protein kinase C-dependent phosphorylation of synaptosome-associated protein of 25 kDa at Ser187 potentiates vesicle recruitment." *J Neurosci* 22 (21):9278-86.
- Nagy, G., K. Reim, U. Matti, N. Brose, T. Binz, J. Rettig, E. Neher, and J. B. Sørensen. 2004. "Regulation of releasable vesicle pool sizes by protein kinase A-dependent phosphorylation of SNAP-25." *Neuron* 41 (3):417-29.
- Nichols, R. A., W. C. Wu, J. W. Haycock, and P. Greengard. 1989. "Introduction of impermeant molecules into synaptosomes using freeze/thaw permeabilization." *J Neurochem* 52 (2):521-9.
- Nobes, C. D., and A. Hall. 1999. "Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement." *J Cell Biol* 144 (6):1235-44.
- Okumura, N., M. Ueno, N. Koizumi, Y. Sakamoto, K. Hirata, J. Hamuro, and S. Kinoshita. 2009. "Enhancement on primate corneal endothelial cell survival in vitro by a ROCK inhibitor." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50 (8):3680-7. doi: 10.1167/iovs.08-2634.

- Oliver, C. J., and S. Shenolikar. 1998. "Physiologic importance of protein phosphatase inhibitors." *Front Biosci* 3:D961-72.
- Olivera, D., C. Knall, S. Boggs, and J. Seagrave. 2010. "Cytoskeletal modulation and tyrosine phosphorylation of tight junction proteins are associated with mainstream cigarette smoke-induced permeability of airway epithelium." *Exp Toxicol Pathol* 62 (2):133-43. doi: 10.1016/j.etp.2009.03.002.
- Pankow, S., C. Bamberger, A. Klippel, and S. Werner. 2006. "Regulation of epidermal homeostasis and repair by phosphoinositide 3-kinase." *J Cell Sci* 119 (Pt 19):4033-46. doi: 10.1242/jcs.03175.
- Park, S., D. G. Gonzalez, B. Guirao, J. D. Boucher, K. Cockburn, E. D. Marsh, K. R. Mesa, S. Brown, P. Rompolas, A. M. Haberman, Y. Bellaïche, and V. Greco. 2017. "Tissue-scale coordination of cellular behaviour promotes epidermal wound repair in live mice." *Nat Cell Biol* 19 (2):155-163. doi: 10.1038/ncb3472.
- Parra, M., T. Mahmoudi, and E. Verdin. 2007. "Myosin phosphatase dephosphorylates HDAC7, controls its nucleocytoplasmic shuttling, and inhibits apoptosis in thymocytes." *Genes Dev* 21 (6):638-43. doi: 10.1101/gad.1513107.
- Pozzi, D., S. Condliffe, Y. Bozzi, M. Chikhladze, C. Grumelli, V. Proux-Gillardeaux, M. Takahashi, S. Franceschetti, C. Verderio, and M. Matteoli. 2008. "Activity-dependent phosphorylation of Ser187 is required for SNAP-25-negative modulation of neuronal voltage-gated calcium channels." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (1):323-8. doi: 10.1073/pnas.0706211105.
- Pullar, C. E., J. Chen, and R. R. Isseroff. 2003. "PP2A activation by beta2-adrenergic receptor agonists: novel regulatory mechanism of keratinocyte migration." *J Biol Chem* 278 (25):22555-62. doi: 10.1074/jbc.M300205200.
- Rajesh, D., K. Schell, and A. K. Verma. 1999. "Ras mutation, irrespective of cell type and p53 status, determines a cell's destiny to undergo apoptosis by okadaic acid, an inhibitor of protein phosphatase 1 and 2A." *Mol Pharmacol* 56 (3):515-25.
- Richardson, R., M. Metzger, P. Knyphausen, T. Ramezani, K. Slanchev, C. Kraus, E. Schmelzer, and M. Hammerschmidt. 2016. "Re-epithelialization of cutaneous wounds in adult zebrafish combines mechanisms of wound closure in embryonic and adult mammals." *Development* 143 (12):2077-88. doi: 10.1242/dev.130492.
- Risinger, C., and M. K. Bennett. 1999. "Differential phosphorylation of syntaxin and synaptosome-associated protein of 25 kDa (SNAP-25) isoforms." *J Neurochem* 72 (2):614-24.
- Robson, M. C., D. L. Steed, and M. G. Franz. 2001. "Wound healing: biologic features and approaches to maximize healing trajectories." *Curr Probl Surg* 38 (2):72-140. doi: 10.1067/msg.2001.111167.
- Ruzsnavszky, O., B. Dienes, T. Oláh, J. Vincze, T. Gáll, E. Balogh, G. Nagy, R. Bátor, B. Lontay, F. Erdódi, and L. Csernoch. 2013. "Differential effects of phosphatase inhibitors on the calcium homeostasis and migration of HaCaT keratinocytes." *PLoS One* 8 (4):e61507. doi: 10.1371/journal.pone.0061507.
- Räsänen, K., and A. Vaheri. 2010. "TGF-beta1 causes epithelial-mesenchymal transition in HaCaT derivatives, but induces expression of COX-2 and migration only in benign, not in malignant keratinocytes." *J Dermatol Sci* 58 (2):97-104. doi: 10.1016/j.jdermsci.2010.03.002.
- Sarhan, A. R., J. Szyroka, S. Begum, M. G. Tomlinson, N. A. Hotchin, J. K. Heath, and D. L. Cunningham. 2017. "Quantitative Phosphoproteomics Reveals a Role for Collapsin Response Mediator Protein 2 in PDGF-Induced Cell Migration." *Sci Rep* 7 (1):3970. doi: 10.1038/s41598-017-04015-x.
- Schiavo, G., F. Benfenati, B. Poulain, O. Rossetto, P. Polverino de Laureto, B. R. DasGupta,

- and C. Montecucco. 1992. "Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin." *Nature* 359 (6398):832-5. doi: 10.1038/359832a0.
- Schiavo, G., O. Rossetto, S. Catsicas, P. Polverino de Laureto, B. R. DasGupta, F. Benfenati, and C. Montecucco. 1993. "Identification of the nerve terminal targets of botulinum neurotoxin serotypes A, D, and E." *J Biol Chem* 268 (32):23784-7.
- Scotto-Lavino, E., M. Garcia-Diaz, G. Du, and M. A. Frohman. 2009. "Basis for the isoform-specific interaction of myosin phosphatase subunits protein phosphatase 1c beta and myosin phosphatase targeting subunit 1." *J Biol Chem* 285 (9):6419-24. doi: 10.1074/jbc.M109.074773.
- Seeger, M. A., and A. S. Paller. 2015. "The Roles of Growth Factors in Keratinocyte Migration." *Adv Wound Care (New Rochelle)* 4 (4):213-224. doi: 10.1089/wound.2014.0540.
- Sen, A., Z. Nagy-Zsvér-Vadas, and M. P. Krahn. 2012. "Drosophila PATJ supports adherens junction stability by modulating Myosin light chain activity." *J Cell Biol* 199 (4):685-98. doi: 10.1083/jcb.201206064.
- Sheppeck, J. E., C. M. Gauss, and A. R. Chamberlin. 1997. "Inhibition of the Ser-Thr phosphatases PP1 and PP2A by naturally occurring toxins." *Bioorg Med Chem* 5 (9):1739-50.
- Shi, Y. 2009. "Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure." *Cell* 139 (3):468-84. doi: 10.1016/j.cell.2009.10.006.
- Shimazaki, Y., T. Nishiki, A. Omori, M. Sekiguchi, Y. Kamata, S. Kozaki, and M. Takahashi. 1996. "Phosphorylation of 25-kDa synaptosome-associated protein. Possible involvement in protein kinase C-mediated regulation of neurotransmitter release." *J Biol Chem* 271 (24):14548-53.
- Shimizu, H., M. Ito, M. Miyahara, K. Ichikawa, S. Okubo, T. Konishi, M. Naka, T. Tanaka, K. Hirano, and D. J. Hartshorne. 1994. "Characterization of the myosin-binding subunit of smooth muscle myosin phosphatase." *J Biol Chem* 269 (48):30407-11.
- Shirazi, A., K. Iizuka, P. Fadden, C. Mosse, A. P. Somlyo, A. V. Somlyo, and T. A. Haystead. 1994. "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 (50):31598-606.
- Shoji-Kasai, Y., M. Itakura, M. Kataoka, S. Yamamori, and M. Takahashi. 2002. "Protein kinase C-mediated translocation of secretory vesicles to plasma membrane and enhancement of neurotransmitter release from PC12 cells." *Eur J Neurosci* 15 (8):1390-4.
- Sipos, A., J. Iván, B. Bécsi, Z. Darula, I. Tamás, D. Horváth, K. F. Medzihradszky, F. Erdődi, and B. Lontay. 2017. "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. doi: 10.1038/srep40590.
- Snyder, D. A., M. L. Kelly, and D. J. Woodbury. 2006. "SNARE complex regulation by phosphorylation." *Cell Biochem Biophys* 45 (1):111-23. doi: 10.1385/CBB:45:1:111.
- Squarize, C. H., R. M. Castilho, T. H. Bugge, and J. S. Gutkind. 2010. "Accelerated wound healing by mTOR activation in genetically defined mouse models." *PLoS One* 5 (5):e10643. doi: 10.1371/journal.pone.0010643.
- Stein, A., G. Weber, M. C. Wahl, and R. Jahn. 2009. "Helical extension of the neuronal SNARE complex into the membrane." *Nature* 460 (7254):525-8. doi: 10.1038/nature08156.
- Südhof, T. C. 2014. "The molecular machinery of neurotransmitter release (Nobel lecture)." *Angew Chem Int Ed Engl* 53 (47):12696-717. doi: 10.1002/anie.201406359.
- Südhof, T. C., and J. E. Rothman. 2009. "Membrane fusion: grappling with SNARE and SM

- proteins." *Science* 323 (5913):474-7. doi: 10.1126/science.1161748.
- Tachibana, K., P. J. Scheuer, Y. Tsukitani, H. Kikuchi, D. Van Engen, J. Clardy, Y. Gopichand, F. J. J. Schmitz. 1981. "Okadaic acid, a cytotoxic polyether from sponges of the genus *Halichondria*." *Am. Chem. Soc.* 103:2469-2471.
- Takahashi, N., M. Ito, J. Tanaka, T. Nakano, K. Kaibuchi, H. Odai, and K. Takemura. 1997. "Localization of the gene coding for myosin phosphatase, target subunit 1 (MYPT1) to human chromosome 12q15-q21." *Genomics* 44 (1):150-2. doi: 10.1006/geno.1997.4859.
- Takai, A., M. Murata, K. Torigoe, M. Isobe, G. Mieskes, and T. Yasumoto. 1992. "Inhibitory effect of okadaic acid derivatives on protein phosphatases. A study on structure-affinity relationship." *Biochem J* 284 (Pt 2):539-44.
- Tanaka, J., M. Ito, J. Feng, K. Ichikawa, T. Hamaguchi, M. Nakamura, D. J. Hartshorne, and T. Nakano. 1998. "Interaction of myosin phosphatase target subunit 1 with the catalytic subunit of type 1 protein phosphatase." *Biochemistry* 37 (47):16697-703. doi: 10.1021/bi980782x.
- Than, U. T. T., D. Guanzon, D. Leavesley, and T. Parker. 2017. "Association of Extracellular Membrane Vesicles with Cutaneous Wound Healing." *Int J Mol Sci* 18 (5). doi: 10.3390/ijms18050956.
- Thrash, B. R., C. W. Menges, R. H. Pierce, and D. J. McCance. 2006. "AKT1 provides an essential survival signal required for differentiation and stratification of primary human keratinocytes." *J Biol Chem* 281 (17):12155-62. doi: 10.1074/jbc.M512116200.
- Traweger, A., G. Wiggin, L. Taylor, S. A. Tate, P. Metalnikov, and T. Pawson. 2008. "Protein phosphatase 1 regulates the phosphorylation state of the polarity scaffold Par-3." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (30):10402-7. doi: 10.1073/pnas.0804102105.
- Tóth, A., E. Kiss, F. W. Herberg, P. Gergely, D. J. Hartshorne, and F. Erdödi. 2000. "Study of the subunit interactions in myosin phosphatase by surface plasmon resonance." *Eur J Biochem* 267 (6):1687-97.
- Velnar, T., T. Bailey, and V. Smrkolj. 2009. "The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms." *J Int Med Res* 37 (5):1528-42. doi: 10.1177/147323000903700531.
- Wagner, T., M. Gschwandtner, A. Strajeriu, A. Elbe-Bürger, J. Grillari, R. Grillari-Voglauer, G. Greiner, B. Golabi, E. Tschachler, and M. Mildner. 2018. "Establishment of keratinocyte cell lines from human hair follicles." *Sci Rep* 8 (1):13434. doi: 10.1038/s41598-018-31829-0.
- Wakula, P., M. Beullens, H. Ceulemans, W. Stalmans, and M. Bollen. 2003. "Degeneracy and function of the ubiquitous RVXF motif that mediates binding to protein phosphatase-1." *J Biol Chem* 278 (21):18817-23. doi: 10.1074/jbc.M300175200.
- Wang, F., and Y. Sun. 2018. "Overexpression of Myosin Phosphatase Target Subunit 1 (MYPT1) Inhibits Tumor Progression and Metastasis of Gastric Cancer." *Med Sci Monit* 24:2508-2517.
- Wang, J., Y. Qiu, N. W. Shi, J. N. Zhao, Y. C. Wang, H. Jiang, and H. B. Qian. 2016. "microRNA-21 mediates the TGF- β 1-induced migration of keratinocytes via targeting PTEN." *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 20 (18):3748-3759.
- Wang, T., W. Kang, L. Du, and S. Ge. 2017. "Rho-kinase inhibitor Y-27632 facilitates the proliferation, migration and pluripotency of human periodontal ligament stem cells." *J Cell Mol Med* 21 (11):3100-3112. doi: 10.1111/jcmm.13222.
- Wera, S., and B. A. Hemmings. 1995. "Serine/threonine protein phosphatases." *Biochem J* 311 (Pt 1):17-29.
- Witte, M. B., and A. Barbul. 1997. "General principles of wound healing." *Surg Clin North Am* 77 (3):509-28.

- Wong, R., S. Geyer, W. Weninger, J. C. Guimberteau, and J. K. Wong. 2016. "The dynamic anatomy and patterning of skin." *Exp Dermatol* 25 (2):92-8. doi: 10.1111/exd.12832.
- Wooldridge, A. A., J. A. MacDonald, F. Erdodi, C. Ma, M. A. Borman, D. J. Hartshorne, and T. A. Haystead. 2004. "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 (33):34496-504. doi: 10.1074/jbc.M405957200.
- Xia, D., J. T. Stull, and K. E. Kamm. 2005. "Myosin phosphatase targeting subunit 1 affects cell migration by regulating myosin phosphorylation and actin assembly." *Exp Cell Res* 304 (2):506-17. doi: 10.1016/j.yexcr.2004.11.025.
- Yamaguchi, M., S. Nakao, R. Arita, Y. Kaizu, M. Arima, Y. Zhou, T. Kita, S. Yoshida, K. Kimura, T. Isobe, Y. Kaneko, K. H. Sonoda, and T. Ishibashi. 2016. "Vascular Normalization by ROCK Inhibitor: Therapeutic Potential of Ripasudil (K-115) Eye Drop in Retinal Angiogenesis and Hypoxia." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 57 (4):2264-76. doi: 10.1167/iovs.15-17411.
- Yamashiro, S., Y. Yamakita, G. Totsukawa, H. Goto, K. Kaibuchi, M. Ito, D. J. Hartshorne, and F. Matsumura. 2008. "Myosin phosphatase-targeting subunit 1 regulates mitosis by antagonizing polo-like kinase 1." *Dev Cell* 14 (5):787-97. doi: 10.1016/j.devcel.2008.02.013.
- Yang, Y., H. M. Yoo, I. Choi, K. H. Pyun, S. M. Byun, and H. Ha. 1996. "Interleukin 4-induced proliferation in normal human keratinocytes is associated with c-myc gene expression and inhibited by genistein." *J Invest Dermatol* 107 (3):367-72.
- Yin, J., and F. S. Yu. 2008. "Rho kinases regulate corneal epithelial wound healing." *Am J Physiol Cell Physiol* 295 (2):C378-87. doi: 10.1152/ajpcell.90624.2007.
- Zhang, M., N. Y. Liu, X. E. Wang, Y. H. Chen, Q. L. Li, K. R. Lu, L. Sun, Q. Jia, and L. Zhang. 2011. "Activin B promotes epithelial wound healing in vivo through RhoA-JNK signaling pathway." *PLoS One* 6 (9):e25143. doi: 10.1371/journal.pone.0025143.



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 alapján szolgáló közleményekre):
7,874**

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

Debrecen, 2019.02.04.



Köszönetnyilvánítás

Doktori értekezésem nem készülhetett volna el a kollégáim, barátaim és a családom támogatása, segítségnyújtása nélkül, akikre a doktori képzésem éveit során mindenben számíthattam. Az elkövetkező néhány sorban nekik szeretnék köszönetet mondani a közös munkáért, a kapott tanácsokért, a szakmai és a lelki támogatásért.

Legelőször témavezetőmnek, Dr. Lontay Beátának szeretném megköszönni sokéves segítségnyújtását és szakmai irányítását. Hálás vagyok, hogy személyében egy figyelmes, segítőkész és talpraesett embert ismerhettem meg, akihez mindig bátran fordulhattam, ha munkám során bármikor elakadtam, és kérdéseim merültek fel. Energikussága, dinamikus személyisége rám is inspirálóan hatott, örülök, hogy vele dolgozhattam.

Hálás vagyok Dr. Sipos Adriennek, aki idejét nem sajnálva vezetett be a labormunka rejtelmébe, és osztotta meg velem gyakorlati tudását. Szakdolgozóként, majd kezdő PhD hallgatóként is bátran számíthattam rá, a különféle molekuláris biológiai technikák megismerésében óriási segítséget nyújtott. Nagyra értékelem segítőkészségét, türelmét és tanácsait. Köszönöm Tamás István PhD hallgató társamnak azt a rengeteg munkát, melyet a kutatási projektjeinken – különösen a SNAP-25-projekten – végzett, hathatós segítséget nyújtva a publikációk elkészítésében. Technikai és informatikai felkészültsége, gyakorlatias és a lényegre fókuszáló hozzáállása egész munkacsoportunk számára nagy értéket képvisel.

Örülök, hogy kutatási projektjeimen együtt dolgozhattam Major Evelinnel és Dr. Iván Judittal. Amellett, hogy kísérletes munkájukkal segítették a projektek előrehaladását, személyiségükkel is hozzájárultak ahhoz, hogy munkacsoportunk egy családias kis közösség legyen. Evelin kedvessége, lelkiismeretessége és társasága, Judit humora és csapatjátékos attitűdje olyan helyé varázsolták a labort, melyet bátran nevezhettem második otthonomnak.

Hálás vagyok kollégáimnak, az Erdődi-labor minden tagjának, akikben szakmailag és emberileg is kiváló munkatársakat ismertem meg. Örülök, hogy ebben a közösségben dolgozhattam és élhettem annyi éven át. Köszönöm Kónya Zoltánnak a foszfátáz aktivitásméréssel és a megfelelő anime kiválasztásával kapcsolatos segítségnyújtását; Dr. Bécsi Bálintnak az SPR-alapú mérések kivitelezésével, Dr. Bátori Róbertnek a karcolási esszéjével, Dr. Dedinszki Dórának és Dr. Nagy Dénesnek az állatkísérletekkel, Dr. Kiss Andreának pedig a foszfátáz aktivitásméréssel és az NHEK sejteken végzett kaszpáz esszéjével kapcsolatos kísérletes munkáját.

Hálás vagyok Docsa Andrea, Kelemenné Szántó Ágota és Németh Árpádné laborasszisztenseknek. Andi, Ágota és Ági mindig igyekeztek a segítségemre lenni, és nemcsak a kísérletek során nyújtott asszisztenciájukat és kiváló munkájukat értékelem nagyra, hanem mindazt a bátorítást, figyelmet és kedvességet, amit a mindennapok során tőlük kaptam. Ők, és további munkatársaim, Mesi, Jocó és Kuljeet mind hozzájárultak ahhoz, hogy a laborunk egy jobb és barátságosabb hely legyen.

Köszönetet mondok Dr. Hegedűs Csabának a Tecan Freedom EVO 150 készülék használatával kapcsolatos elengedhetetlen segítségnyújtásáért. Köszönöm Herbály Mihályné Erzsikének a sebszövetek trikróm festésének nagyszerű kivitelezését. Köszönöm Dr. Darula Zsuzsannának a tömegspektrometriai mérések elvégzését, Dr. Szöllősi Attilának pedig az NHEK sejtek izolálását és rendelkezésünkre bocsátását. Köszönöm továbbá Dr. Karen Uraynak, hogy publikációim angol nyelvi szakszerűségét ellenőrizte.

Egy közösség nem működhet megfelelő vezetés nélkül. Éppen ezért nagyra értékelem Prof. Dr. Erdődi Ferenc laborcsoportunk élén végzett tevékenységét, fanyar, sok esetben mégis megvilágító erejű humorát. Köszönöm Prof. Dr. Virág Lászlónak, intézetünk igazgatójának, hogy munkavégzésemet az intézetben lehetővé tette, annak feltételeit biztosította.

Végül, de közel sem utolsó sorban szeretnék köszönetet mondani szüleimnek, a húgaimnak, Livinek és Csillának, szűkebb és tágabb családomnak, valamint barátaimnak, Gyurinak, Borinak, Gézának, Norbinak és Batchimegnek, hogy támogatásukról mindvégig biztosítottak, és ha kellett, lelket öntöttek belém. Örülök továbbá, hogy együtt dolgozhattam szakdolgozóimmal, Balácsi Dáviddal és Mahul Patellel. Minden barátomnak, családtagomnak, kollégámnak, az Orvosi Vegytani Intézet valamennyi dolgozójának sok sikert és örömet kívánok mind a szakmai- mind a magánélet területén.

Függelék

Az értekezés az alábbi közleményeken alapul:

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)

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