

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Az inzulinrezisztencia és a neurotranszmisszió
szabályozási mechanizmusai fehérje foszforilációval**

Tamás István

Témavezető: Dr. Lontay Beáta



DEBRECENI EGYETEM

Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2023

Az inzulinrezisztencia és a neurotranszmisszió szabályozási mechanizmusai fehérje foszforilációval

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

Írta: **Tamás István** okleveles molekuláris biológus

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

Témavezető: **Dr. Lontay Beáta**

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora
tagok: Dr. Apáti Ágota, PhD
Dr. Sarang Zsolt, PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Élettani Intézet Könyvtára
2023. május 15. 11:00 óra

Az értekezés bírálói:

Dr. Keller-Pintér Anikó, PhD
Dr. Sztretye Mónika, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora
tagok: Dr. Apáti Ágota, PhD
Dr. Keller-Pintér Anikó, PhD
Dr. Sarang Zsolt, PhD
Dr. Sztretye Mónika, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK Szülészeti és
Nőgyógyászati Intézet tanterme 2023. május 15. 13:00 óra

Bevezetés

Az élővilágban előforduló poszttranszlációs módosítások között a fehérje foszforilációnak és defoszforilációnak kiemelkedően fontos sejtélettani szerepe van. Ennek a módosításnak köszönhetően lehetővé válik sejtek számára, hogy a környezetből érkező stimulusokra reagáljanak. A fehérjék foszforilációját a protein kinázok végzik az adenosin-trifoszfát (ATP) γ -foszfát csoportjának hidroxil csoportot tartalmazó α -aminosavakra (szerin/Ser, treonin/Thr, tirozin/Tyr) történő áthelyezésével. Bizonyos fehérjéken több foszforilációs hely is található, melyeket akár több különböző protein kináz is foszforilálhat, ezáltal számos fiziológiai jel integrációja válik lehetségessé. Ennek a folyamatnak a megfordíthatóságaért a protein foszfatázok felelősek a foszfát csoport hidrolízisével. Bár a protein kinázokat kódoló gének száma jóval magasabb a protein foszfatázokhoz viszonyítva, jelentőségük a mai napra már vitathatatlan. Élő szervezetekben a fehérje foszforiláció döntően Ser/Thr oldalláncokon megy végbe. A Ser/Thr specifikus protein foszfatázok közül pedig döntően a PPP (foszfoprotein foszfatázok) családba tartozó PP1 és PP2A enzimek felelősek ezeknek az oldalláncoknak a defoszforilációjáért.

A PP1c enzimek és a miozin foszfatáz

A PP1c (protein foszfatáz 1 katalitikus alegység) enzimek minden eukarióta sejten megtalálhatóak, különbségek csak a különböző izoformák expressziós szintjei között vannak. Funkciójukat tekintve rendkívül sok sejten belüli folyamat szabályozásában vesznek részt: sejtadhézió, sejtciklus szabályozás, génexpresszió szabályozása, ingerület átvivő anyagok felszabadulása, apoptózis, és még megannyi sejten belüli folyamat. A PP1c enzimek érzékenyek bizonyos xenobiotikumokra, mint például a mikrocisztin (MC-LR), vagy a tautomycin (TMC). A PP1c enzimek 35-38 kDa molekulahúlyúak, szekvenciájukat tekintve magasfokú konzerváltságot mutatnak (~90%).

A protein foszfatázok egyik jellegzetessége, hogy nem monomer formában működnek, hanem a megfelelő specificitás eléréséhez számos interakciós partnerrel lépnek kölcsönhatásba holoenzimeket alkotva. Ezek az interakciós partnerek egyrészt a PP1c enzimek felszínén található speciális kötőfelületek révén, másrészt az kölcsönható partnerekben található rövid lineáris motívumokon (SLiMs) keresztül alakítanak ki kapcsolatot a PP1c enzimekkel. A kölcsönható partnereknek eltérő funkciójuk lehet, ennek megfelelően megkülönböztethetünk szubsztrát targeting/aktiváló, valamint szubsztrát specificitásért/gátlásért felelős kölcsönhatókat is.

Az egyik subsztrát specificitásért felelős kölcsönható partner a miozint is kötni képes MYPT1 (miozin foszfatáz szabályozó alegység 1). Ez egy 110-133 kDa molekulatömegű fehérje, és a PP1c δ (PP1c enzim delta izoforma) alegységgel együtt, valamint egy eddig nem teljesen tisztázott funkciójú 20/21 kDa molekulatömegű alegységgel együtt építik fel a miozin foszfatáz (MP) holoenzimet. A MYPT1 hordoz egy RVxF (KVKF) motívumot, mely elengedhetetlen a katalitikus alegységgel való kölcsönhatáshoz. Rendelkezik továbbá egy MyPhoNE (miozin foszfatáz n-terminális elem) motívummal is, mely másodlagos kölcsönhatás kialakításában fontos. A MYPT1 fehérjén találhatóak még ankirin ismétlődések is, melyek egyrészt a PP1c kötődésében játszanak szerepet, másrészt ez a régió interakciós platformként is funkcionál más fehérjékkel kialakított kölcsönhatások során. A MYPT1-en található még egy savas D/E (aszparaginsav/glutaminsav) régió is, valamint két - szabályozás szempontjából kiemelten fontos - foszforilációs hely is (Thr⁶⁹⁶, és Thr⁸⁵⁰). A MYPT1 C terminális végén található a M20/21 alegység kötésért felelős régió, valamint további interakciókért felelős leucin cipzár.

A miozin foszfatáz funkciói

Eredetileg a MP citoskeletális folyamatokban betöltött szerepe alapján jellemezték, azaz a miozin könnyűlánc defoszforilációja révén képes volt egyrészt a miozin könnyűlánc kináz (MLCK) hatását ellensúlyozni, másrészt ezáltal a sejtek összhuzékonyságát befolyásolni. Az enzimet először csirkeizóból izolálták. További kutatások során azonban világossá vált, hogy az alapvető funkciók mellett a MP nagyon sok élettani folyamatot képes befolyásolni széles subsztrát specificitásán keresztül, valamint széleskörű szubcelluláris lokalizációjának köszönhetően. A MP például az ERM (ezrin, radixin, moezin) fehérjéket is defoszforilálja, ezáltal képes hatással lenni az előzőleg említett sejtadhéziós, sejt migrációs folyamatokra. A MP a mikrotubulus asszociált fehérjék (MAP) működését is képes befolyásolni úgy, mint Tau, vagy adducin. Továbbá endotél sejtekben az eNOS foszforilációján keresztül szabályozza a NO felszabadulását.

Emellett a MP génexpressziós folyamatokban is szerepet játszik a génexpressziót szabályozó enzimek defoszforilációval történő szabályozásával. Így például a holoenzim a hiszton deacetiláz 7 (HDAC7) enzim sejtmagi recirkulációját is szabályozza, továbbá a protein arginin metiltranszferáz 5 (PRMT5) Thr⁸⁰-as oldalláncát defoszforilálja, amely a hiszton fehérjék repressziós mintázatát, szimmetrikus dimetilációját eredményezi, és a tumorsuppresszorok expressziójának gátlását. A MP-t idegi eredetű sejtekben is sikerült kimutatni, valamint a kölcsönhatását is bizonyítani számos idegi eredetű fehérjével úgy, mint

szinaptofizin, mely egy posztzinaptikus marker fehérje. A MP MYPT1 alegységével tömegspektrometriás elemzések alapján további neuronális fehérje is kölcsönhat így a szinapszin-I. További idegi és egyéb szöveti régiókban előforduló fehérjékkel is kölcsönhat a MYPT1 úgy, mint a Calcineurin A alegység, Ca^{2+} -kalmodulin függő kináz II, valamint a SNARE (oldható NSF-asszociált protein receptor (SNAP REceptor)) komplex elemei közül a szintaxin-I, valamint a 25 kDa molekulatömegű szinaptoszóma asszociált fehérje (SNAP-25) is. Idegi folyamatok során sikerült továbbá a MP és a Rho asszociált kináz (ROK) egymásnak ellent ható hatásait leírni szinaptoszómákban. Preparált szinaptoszómákat TMC-vel kezelve a depolarizáció által indukált exocitózis emelkedett mértékét, míg a ROK gátlásával a Y27632 inhibitorral (transz-4-[(1R)-1-aminoetil]-N-4-piridinilciklohexáncarboxamid dihidroklorid) az exocitózis mértékének csökkenését figyelték meg.

A miozin foszfatáz szabályozása

A MP működését a katalitikus alegységre (PP1c) vagy holoenzimre specifikus, illetve a holoenzimre együttesen ható szabályozó elemek modulálják. Az előzőekben említett kisméretű inhibitor molekulák, például a PP1c aktív centrumába kötődve gátolják a PP1c protein foszfatázokat. Ilyen inhibitor molekulák például a TM, TMC, MC-LR.

Léteznek olyan PP1c-vel kölcsönható fehérjék, melyek a PP1c aktív centrumába kötődve fejtik ki gátló hatásukat. Ilyen inhibitor például az inhibitor-1, vagy az inhibitor-2. Az inhibitor-1 esetében foszforilációra is szükség van a gátló hatás kialakulásához.

Léteznek olyan gátló fehérjék is, melyek képesek a szabad katalitikus alegységet, valamint a MP holoenzimet is nagy hatékonysággal gátolni. Ilyen például a CPI-17 (17 kDa molekulatömegű protein kináz C aktivált inhibitor), valamint a KEPI (kináz aktivált protein foszfatáz-1 inhibitor) fehérjék. Ezek esetében szükséges foszforiláció a potens gátló hatás kialakulásához.

A MP szabályozása megvalósulhat továbbá a MYPT1 alegység foszforilációján keresztül is a MYPT1 Thr⁶⁹⁶ és a Thr⁸⁵⁰ gátló foszforilációs oldalláncain keresztül. A legjobban jellemzett szabályozó enzim a Rho A aktivált kináz (ROK), azonban a Thr⁶⁹⁶ oldalláncot több protein kináz is foszforilálja úgy, mint az ILK (integrin linked kinase), MDPK (myotonic dystrophy protein kinase), vagy a p21 aktivált protein kináz is.

További kutatások során sikerült azonosítani még egy gátló hatást kifejtő fehérjét, a smoothelin-szerű fehérje-1-et (SMTNL1). Ez a fehérje foszforilálatlan állapotban képes gátolni a MP aktivitását annak MYPT1 szabályozó alegységéhez kötődve.

Neurotranszmitterek felszabadulásának molekuláris mechanizmusa

Az idegsejtek közötti kommunikáció főként neurotranszmitterek/neuromodulátorok révén jön létre. Ennek alapja, hogy a preszinaptikus neuronban akciós potenciál alakul ki, mely végighalad a preszinaptikus sejt axonján, a sejtvégződést elérve Ca^{2+} ionok beáramlását okozza. Ennek hatására az idegsejt ingerület átvivő anyagokat szabadít fel (pl.: aminosavak: glutamát, aszpartát, mono-aminok: dopamin, epinefrin stb.). Ezek a neurotranszmitterek a szinaptikus részbe ürülést követően a posztszinaptikus membránban lévő receptorokhoz kötődve depolarizációt váltanak ki, így továbbítva a sejtbiológiai jeleket.

Ezen folyamatnak a molekuláris hátterében a SNARE fehérje komplex játszik fontos szerepet. Ez a komplex szinaptobrevinből - mely a szinaptikus vezikulában helyezkedik el -, valamint a SNAP-25 és szintaxin-I fehérjékből áll. Az utóbbi kettő a posztszinaptikus sejt membránjában helyezkedik el. Mindhárom fehérje rendelkezik egy ~65 aminosavból álló SNARE motívummal (szintaxin-I, szinaptobrevin 1-1, míg a SNAP-25 2 db ilyen motívummal). Ennek a komplexnek a megfelelő összeépülése szükséges a neurotranszmitterek idegsejtekből való felszabadulásához.

A SNAP-25

A SNARE komplex központi elemén a SNAP-25 fehérjén számos foszforilációs hely található, melynek révén az exocitózis folyamata finomhangolható. Korábbi kutatási eredmények rávilágítottak a SNAP-25 fehérjén található Thr¹³⁸-as és Ser¹⁸⁷-es oldalláncok fontosságára. Ezt a két oldalláncot főként a protein kináz A és C (PKA) és (PKC) enzimek foszforilálnak. A Thr¹³⁸-as oldalláncra elsősorban a PKA, míg a Ser¹⁸⁷ oldalláncra a PKC mutat preferenciát. A Ser¹⁸⁷ oldalláncon történő foszforiláció esetén megnövekedett exocitózist figyeltek meg, azonban a Thr¹³⁸ esetén nem teljesen egyértelműek a hatások, mivel itt serkentő és gátló hatást is megfigyeltek. *In vitro* eredmények arra utalnak, hogy a Thr¹³⁸ oldallánc foszforilációja gátolja a SNARE komplex összeépülését, mivel ez az oldallánc azon a régióban belül helyezkedik el, mely a szintaxinnal való kölcsönhatás kialakításában is fontos. *In vivo* viszont PKA serkentette a katekolamin felszabadítást. Az irodalomban élettani szempontból az az álláspont, hogy a Thr¹³⁸-as oldallánc az exocitózisra kész vezikula pool fenntartásában fontos („slowly releasable pool”, és „readily releasable pool”), míg a Ser¹⁸⁷ oldallánc foszforilációja a vezikula toborzásban („vesicle recruitment”) játszik szerepet.

A SNAP-25 defoszforilációjáért döntően a PP1 és PP2A enzimek játszanak szerepet. *In vitro* eredmények alapján a Thr¹³⁸ felé a PP1 enzimek mutatnak preferenciát, de a SNAP-25 mind a négy igazolt foszforilációs helyén képes hatást kifejteni.

SMTNL1

A SMTNL1 a smoothelinek családjába tartozó fehérje, amelyet nyúl ileum simaizomból izoláltak először. A smoothelin család két további tagja van, az SMTN-A és az SMTN-B, melyek egy *smtn* génről íródnak át. Az SMTNL1 expresszióját tekintve előfordul vaszkuláris simaizomban, valamint harántcsíkolt izomzatban is.

A fehérje rendelkezik egy kalponin homológia (CH) doménnel, mely elengedhetetlen a MP-al kialakuló kölcsönhatás kialakulásához. A SMTNL1 fehérjét a PKA és PKG foszforilálja és szabályozza a Ser³⁰¹ oldalláncon történő foszforilációval. A módosítás hatására a SMTNL1 a sejtmagba transzlokálódik, ahol progeszteron receptorhoz kötődve szabályozza a génexpressziót

A SMTNL1 funkcionális jellemzése során megfigyelték az izommunka során fellépő adaptációs folyamatokat. A SMTNL1 KO egerek az állóképiséget mérő tesztek során jobban teljesítettek a vad típusú társaikhoz képest, amelyet az izommunkára adaptálódott fenotípus kialakulása eredményezett. SMTNL1 KO egereken végzett kísérletek alapján fény derült arra is, hogy a gén kiütése befolyásolja az egerek glükóz toleranciáját, valamint a SMTNL1 hatással van az inzulin jelátvitel egyes komponenseinek foszforilációs állapotára, illetve expressziójára. Az SMTNL1 KO egerekben az IRS1 fehérjék gátló foszforilációs oldalláncain emelkedett foszforilációs szintet mértek, valamint a GLUT4 transzporter csökkent expresszióját figyelték meg. Ezek az egerek továbbá csökkent metabolikus aktivitást mutattak. Ezek alapján úgy tűnik, hogy a SMTNL1 képes befolyásolni az inzulin rezisztenciában fontos molekuláris mechanizmusokat.

Inzulin jelátvitel

Az inzulint a hasnyálmirigy β sejtjei állítják elő és szekretálják a véráramba. Az inzulinra érzékeny sejtek (mint például az izomsejtek) inzulin receptorokat hordoznak a sejtfelszínükön, és hormonkötődés hatására beindul az inzulin jelátviteli kaskád. Az egyik legfontosabb mozzanat a hormon kötődését követően az inzulin receptorok autofoszforilációja tirozil oldalláncokon, amely az inzulin reszponzív elemek (IRS fehérjék) aktivációját eredményezi. Ezeken keresztül src-homológia-2 domén (SH2) fehérjékhez, pl. a foszfatidil-

inozitol-3 kinázhoz (PI3K) kötődnek. A jelátviteli folyamatok egyik végső mozzanata a GLUT4 transzporterek transzlokációja a citoplazmából a plazmamembránba.

Az inzulin jelátviteli pálya zavarai okozzák az inzulinrezisztenciát, melynek lényege, hogy az inzulinra érzékeny sejtek kisebb mértékben aktiválódnak, így a hasnyálmirigy még több inzulin választ ki. Az inzulinrezisztencia molekuláris mechanizmusának hátterében több jelátviteli pálya nem megfelelő működése áll. Az egyik ilyen komponens az IRS1 fehérjék megváltozott foszforilációs profilja, tirozil oldalláncok helyett szeril oldalláncok foszforilálódnak, melyek fiziológias körülmények között az inzulin jelátvitel megszüntetéséért felelnének, de patológiás állapotban az abnormális foszforilációs mintázat miatt a jelátvitel nem működik megfelelően.

Hipotézisünk szerint a SMNTL1 képes ebben a folyamatokban pozitív effektorként működni, és elősegíteni az inzulin érzékenység visszaállítását izomsejtekben.

Célkitűzések

(1) A miozin foszfatáz szerepe a neurotranszmitter-kibocsátásban:

- A SNAP-25 és a miozin foszfatáz MYPT1 alegysége közötti kölcsönhatás vizsgálata felületi plazmonrezonanciás (SPR) eljárással. Tisztított SNAP-25 *in vitro* foszforilációja ROK enzimmal, majd a foszforiláció igazolása Western blot analízis segítségével. A SNAP-25 és ROK enzim-szubsztrát kapcsolatának feltárása foszfospecifikus antitestekkel.
- B50 neuroblasztóma sejtek MYPT1 génjének kiütése siRNS technikával. Csendesítést követően a sejtek életképességének vizsgálata. A csendesítés igazolása Western blot módszerrel. Csendesített minták foszfatáz aktivitásának mérése, valamint a SNAP-25 Thr¹³⁸-as oldallánc foszforilációjának vizsgálata szintén Western blot technikával.
- A TMC és H1152 inhibitorok hatásának vizsgálata szinaptoszóma preparátumokban. A SNAP-25 Thr¹³⁸ foszforilációs szintjének vizsgálata Western blot vizsgálatokkal. Az inhibitoros kezelések után a SNAP-25 és szintaxin kölcsönhatásának vizsgálata immunprecipitáció segítségével.
- Egér agyszelet preparátumokon végzett inhibitoros kezelések konfokális mikroszkópiával történő vizsgálata.

(2) A SMTNL1 szerepének vizsgálata indukált inzulinrezisztencia modellben:

- *In vitro* inzulinrezisztencia modellrendszer felállítása C2C12 differenciáltatott egér mioblaszt/miotubulus sejtvonalon hosszútávú hiperinzulinémiás/hiperglikémiás kezelésekkel. A SMTNL1 túltermelésének, valamint a progeszteron kezelések hatásának összevetése üres plazmával transzfektált sejtekből származó mintákkal.
- A differenciáltatott, és kezeléseken átesett sejtek elemzése különböző módszerek segítségével: Proteome Profiler elemzés (sok jelátviteli komponens foszforilációjának egyszerre történő vizsgálata). Az inzulin jelátviteli pálya elemeinek specifikus vizsgálata Western blot technika segítségével. Az inzulinrezisztens és kontroll sejtek közötti metabolikus különbségek feltárása Seahorse XF96 mérésekkel. A glükóz felvétel mértékének, valamint a PI3K aktivitásának mérése.

Anyagok és módszerek

Rekombináns fehérje termeltetés és tisztítás

A FLAG-SNAP-25 fehérjét (WT és Thr^{138A} mutáns) tartalmazó plazmidot *tsa201* sejtekbe transzfektáltuk polietilénimin (PEI) transzfekciós ágenssel. 15 µg plazmidot és 30 µl (1 µg/µl) PEI-t 150 mM-os steril NaCl oldatban inkubáltunk 30 percig. 1 mL transzfekciós reagenst 4 mL szérumban tartalmazó DMEM-mel összekeverve a sejtekre adagoltunk ~60%-os konfluenciánál. 6 óra elteltével 5 mL 20%-os FBS-t tartalmazó DMEM médiumot adtunk a sejtekhez. 18 óra elteltével a sejteket feltártuk, és elkezdtük a fehérje tisztítást.

SPR kölcsönhatási vizsgálatok

A MYPT1 és a SNAP-25 fehérjék közötti kölcsönhatást Biacore 3000-es felületi plazmonrezonanciás műszerrel vizsgáltuk. GST elleni antitestet immobilizáltunk CM5 chip felületére, amin kötés segítségével, amelyenteljes hosszúságú GST-MYPT1¹⁻¹⁰⁰⁴, vagy annak C-terminális fragmentjét (GST-MYPT1⁶⁶⁷⁻¹⁰⁰⁴) immobilizáltunk a felülethez. A többi esetben His-tag jelöléssel ellátott MYPT1 fehérje fragmenteket (His-MYPT1¹⁻²⁹⁶ vagy His-MYPT1¹⁻⁶³³) immobilizáltunk közvetlenül a CM5 szenzor chip felületére. A felületen tisztított SNAP-25 fehérjét áramoltattunk, és a kinetikai paramétereket és a disszociációs konstans (K_d) értékeket a szenzogramokból nyertük ki a BIAevaluation 3,1 szoftver segítségével 1:1 interakciós modellt alkalmazva.

In vitro Rho A aktivált kináz reakció

A kísérletekhez *tsa201* sejteket transzfektáltunk FLAG-SNAP-25 kódoló plazmiddal. A sejtekből készített preparátumokból anti-FLAG M2 Sepharose gél affinitás kromatográfiás eljárással tisztítottuk a rekombináns SNAP-25 fehérjét. A Sepharose gél TBS-pufferrel mostuk, majd ROK enzimmal (20 ng/µl) és ATP-vel (0,5 mM) inkubáltuk 30 percig 30°C-on. A reakcióelegyben 1 µM MC-LR segítségével gátoltuk az esetleg szennyeződésként előforduló protein foszfatázok aktivitását kontroll mintákban is. A reakciót követően a gyöngyöket TBS-el mostuk, majd a SDS mintapufferrel inkubáltuk 100°C 5 percig. A foszforilációt foszfospecifikus antitestekkel ellenőriztük Western blot analízis segítségével.

B50 neuroblasztóma sejtek fenntartása

A B50 sejteket (Sigma-Aldrich) 10% (V/V)-os FBS, valamint 2 mM L-glutamin tartalmú DMEM médiumban tartottuk fent, 5%-os CO₂ tartalmú párával telített 37°C-os inkubátorban.

Géncsendesítés

A B50 sejteket a tripszines felválasztást követően szérum mentes médiumban vettük fel, majd ehhez közvetlenül hozzáadtuk az előzőleg előkészített siRNS-t tartalmazó transzfekciós reagenst (szuszpenziós transzfektálás). A 80%-os konfluenciát elérő B50 neuroblasztóma sejteket steril PBS pufferrel mostuk, majd tripszinezéssel felválasztottuk a tenyésztőedény aljáról. Ezután 100 nM-os végkoncentrációban siRNS-t tartalmazó elegyet juttattunk a sejtekbe, melyek mindegyike az endogén MYPT1 génterméket célozták. A transzfekcióhoz Dharmafect2 reagenst használtunk, a gyártó leírása alapján. 48 óra elteltével a sejteket feltártuk Western blot elemzéshez, foszfatáz aktivitásméréshez, és MTT életképességi vizsgálatához. A géncsendesítést 6 lyukú tápedényekben végeztük (1×10^5 sejt/well) Western blot és foszfatáz aktivitásméréshez, az MTT vizsgálatokhoz 96-lyukú tápedényeket használtunk (3×10^3 sejt/well).

Irányított mutagenézis

A vad típusú SNAP-25 fehérjéttartalmazó plazmidot (pReciever-M13) a GeneCopeia cégtől vásároltuk. A pontmutáció kialakításához QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis készletet használtunk. Az újonnan szintetizált mutáns DNS-t XL10-Blue szuperkompetens sejtekbe transzformáltuk. A termeltetett mutáns plazmidot EZ-10 Spin Column Plasmid DNA Miniprep készlet segítségével preparáltuk. A mutációkat szekvenálással ellenőriztük.

Western blot analízis

A szinaptoszómákból, valamint a sejtenyészetekből kinyert szolubilizált fehérje preparátumokat 5x SDS-PAGE (nátrium-dodecil szulfát-poliakrilamid gél elektroforézis) mintapufferben (50% glicerol, 10% SDS, 0,31M Tris.HCl, 100 mM ditiotreitol, 0,01% brómfenol-kék) 100°C-on 5 percig inkubáltuk. A fehérjéket 12%-os SDS géleken elválasztottuk gélelektroforézis segítségével. Az fehérjéket nitrocellulóz membránra transzferáltuk. Transzferálást követően a membránokat blokkoltuk (5% BSA (Bovine serum albumin) TBS oldatban (136 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 25 mM Tris-HCl pH 7,4) melyhez 0,1%-

ban Tween-20 detergenst adtunk - TBST) 1 órán keresztül szobahőmérsékleten, majd ebben a pufferben hígítva inkubáltuk az elsődleges antitesteket egész éjszakán át 4°C-on. Ezt követően a membránokat TBST pufferrel mostuk, majd a másodlagos antitestekkel szobahőmérsékleten 1-2 órán keresztül inkubáltuk. A másodlagos antitesteket 0,5%-os BSA-TBST oldatban hígítottuk. Az immunreakciókat FluorChem FC2, valamint Bio-Rad ChemiDoc Touch eszközzel detektáltuk. A sávok denzitometriás elemzését Image J, valamint BioRad ImageLab szoftverek segítségével végeztük.

MTT életképességi vizsgálat

Az életképesség mérése előtt a sejtekben a MYPT1 alegység expresszióját siRNS interferencia segítségével csökkentettük. Tíz μL MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid PBS-ben oldva 5mg/mL) oldatot adtunk a sejtekhez, majd 5%-os CO_2 atmoszférájú párasított inkubátorban 37°C-on egy órán keresztül inkubálódtak. A formazán kristályokat dimetil-szulfoxid (DMSO) segítségével feloldottuk, majd az abszorbanciát 540nm-en mértük.

Protein foszfatáz aktivitás mérés

B50 neuroblasztóma sejtekben siRNS interferencia segítségével gátoltuk a miozin foszfatáz MYPT1 alegységének expresszióját, majd a sejteket lizáltuk. A foszfatáz aktivitásméréshez radioaktív ^{32}P -foszforral jelölt miozin könnyűlánc (^{32}P -MLC) szubsztrátot használtunk TM pufferben. A reakciót a radioaktív ^{32}P -MLC hozzáadásával indítottuk 1 μM -os koncentrációban. A reakciót 30°C-on 5 percig inkubáltuk, majd 200 μL 10% (V/V)-os TCA (triklór ecetsav) és 200 μL 6mg/mL BSA hozzáadásával állítottuk le. A $^{32}\text{P}_i$ tartalom centrifugálása után a felülúszó radioaktivitását Tri-Carb 2800TR szcintillációs számláló segítségével mértük meg.

Szinaptoszóma preparálás és kezelés

A szinaptoszómákat C3H egerek cerebrális kortexéből preparáltuk. Az egerek (3-5 kísérlethez) szén-dioxid inhalációval eutanizáltuk. Dekapitációt követően, a kortexeket 1 gramm agyszövet/10 mL jéghideg puffer arányban homogenizáltuk, melynek összetétele: 0,32 M szacharóz, 1,0 mM EDTA, 0,25 mM DTT, pH 7,4. A homogenizátumot 1000 x g-n centrifugáltuk 10 percig 4°C-on Allegra X-12R centrifuga segítségével. A felülúszót 12 mL-re egészítettük ki homogenizáló puffer segítségével, és Percoll gradiensen (23; 15;10 és 3% Percoll/homogenizáló oldat) 32500 x g-n centrifugáltuk 5 percig 4°C-on Beckman L7-55

ultracentrifuga segítségével. A 10/15% és 15/23% közötti frakciókat összegyűjtöttük, majd négyszeresére hígítottuk Krebs pufferben (118 mM NaCl, 5 mM KCl, 25 mM NaHCO₃, 1 mM MgCl₂, 10 mM D-glükóz, pH 7,4), és újra centrifugáltuk 12600 x g-n 25 percig 4°C-on. A felülúszót eltávolítottuk, és a pelletet újra felvettük 3 mL Krebs pufferben majd CaCl₂-t adtunk hozzá 1,2 mM végkoncentrációban, így inkubáltuk 30°C-on, 1 órán keresztül KCl, valamint inhibitorok jelenlétében és azok nélkül (5 µM TMC vagy 10 µM H1152).

Az állattartási protokollt (5/2015/DEMÁB; 6/2011/DEMÁB) a Laborállattudományi és Állatvédelmi Osztály hagyta jóvá, az Európai Unió és a Magyar Kormány által elfogadott iránymutatásokat követte. Az egerek *ab libitum* módon fértek élelemhez és vízhez, 25°C-on voltak tartva 12 órás nappal és éjjeli ciklusokkal a Debreceni Egyetemen Kísérleti Állatházában (XV-KÁT/2000).

Agyszelet preparátumok elkészítése

A kísérleteket mesterséges cerebrospinális folyadékban (aCSF) végeztük, melynek 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 és 2 mM nátrium-piruvát, pH 7,2. Az agyszeletek preparálásához módosított aCSF (alacsony nátrium tartalmú) médiumot használtunk, melyben a 95 mM NaCl-ot 130 mM szacharózzal és 60 mM glicerollal helyettesítettük. Az agyszeletek preparálásához C3H egereket (8 és 30 napos egyedeket mindkét nemből) használtunk. Dekapitalás, és az agy eltávolítása után 200 µm vastag koronális agyi szeleteket készítettünk jéghideg alacsony nátrium tartalmú aCSF pufferben, melyekhez egy HM 650 V vibratómot használtunk. Preparálás után a szeleteket Millicell CM sejttenyésztő plate inzertekbe helyeztük, melyek aCSF puffert tartalmaztak. Ezeket az inzerteket fluoreszcens festékekkel való jelölésre használatos inkubáló edénybe helyeztük. Az inkubáló oldatot aCSF pufferre cseréltük, mely 10 µM H1152-t vagy 5 µM TMC-t tartalmazott 8 mM KCl-al, vagy a nélkül. Ilyen módon az agyszeleteket 60 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten, alacsonyabb CO₂ nyomáson (95% O₂; 5% CO₂). Az inkubálást követően a szeleteket vagy folyékony nitrogénben fagyasztottuk Western-blot elemzésekhez, vagy Mounting Médium segítségével kriosztáttal való munkához készítettük elő. A szeleteket Leica CM 1860 kriosztát segítségével 6 mikronos vastagságú szeletekre vágtuk immunhisztokémiai kísérletekhez.

Immunfluoreszcencia

Az immunfluoreszcenciás festéséhez az agyszeleteket kiszárítottuk, majd blokkoló oldatban inkubáltuk (TBS + 10% lószérum, és 0,2% Triton-X100) 1 órán keresztül

szobahőmérsékleten. A festési eljáráshoz 1:100 hígításban alkalmaztuk az elsődleges antitesteket egész éjszakán át történő inkubálással 4°C-on. Ezt követően az agyszeleteket TBS-el mostuk, majd másodlagos antitestekkel 1:200 hígításban (Alexa Fluor 488 konjugált nyúl elleni IgG, Alexa Fluor 546 konjugált egér és kecske elleni IgG) inkubáltuk. Az metszeteket Leica SP8 konfokális mikroszkóp segítségével vizsgáltuk.

Sejtenyésztés, differenciáltatás és inzulinrezisztencia modell

A C2C12 sejtek normál tenyésztését alacsony cukortartamú (5,5 mM) DMEM médiumban végeztük, melyhez 2 mM végkoncentrációban L-glutamint, valamint 10% (V/V) FBS-t adtunk. A tenyésztéshez 5%-os CO₂ tartalmú párával telített 37°C-os inkubátort használtunk. A differenciáltatást kollagénezett petri csészékben, valamint differenciáltató médiumban végeztük (fenolvörös nélküli 5,5 mM cukortartalmú DMEM, kiegészítve 2 mM L-glutaminnal és 2% (V/V) lószérummal). A differenciáltatást 3 napig végeztük. A differenciáltatás során a médiumot 24 óránként cseréltük.

A fentebb leírt 3 napos differenciáltatás elteltével még 3 napig kezeltük a sejteket az inzulinrezisztencia kialakításához. A kezelő médiumokat szintén 24 óránként cseréltük. Az indukált inzulinrezisztenciához (HG – 25 mM glükóz) fenolvörös mentes DMEM-et használtunk 2% (V/V) lószérummal, 2 mM L-glutaminnal, valamint 100 nM inzulinnal kiegészítve. A nem inzulinrezisztenciás sejteket normál cukortartalmú (LG – 5,5 mM glükóz) fenolvörös mentes 2% (V/V) lószérummal 2 mM L-glutaminnal, valamint 50 pM inzulinnal kiegészített médiummal kezeltük. Ezt a két kezelést egészítettük ki 10 nM medroxiprogesteron-17-acetát hozzáadásával vagy anélkül. Minden kezelési formát az üres plazmiddal transzfektált sejteken és a N-terminális Flag-jelölővel ellátott SMTNL1 pcDNA-3.1 expressziós plazmiddal (FT-SMTNL1) transzfektált sejteken is végrehajtottuk.

A Western blot analízis, proteome profiler és PI3K enzimaktivitási kísérletek előtt a médiumot lecseréltük szérums- és hormonmentes médiumra 5 órára a sejtek PBS-el való átmosása után. Feltárás előtt 30 percre újra hormonkezelést végeztünk 100 nM vagy 50 pM inzulinnal (akut inzulin kezelés).

Tranziens transzfekció

FT-SMTNL1 plazmid, valamint kontrollként inzert nélküli pcDNA-3.1 plazmidokat juttattunk a sejtekbe. A transzfekcióhoz GeneJuice transzfekciós reagenst használtunk. A transzfekció az siRNS bejuttatásánál taglalt módon, szuszpenzióban történt a transzfekció hatékonyságának növelés érdekében. A sejteket PBS-el mostuk, majd tripszines kezeléssel

felválasztottuk a tenyésztő edények aljáról. Ezután 3 µg plazmid - 6 µl GeneJuice arányban összekevert transzfekciós reagenst adtunk a sejtekhez. Ez után a sejteket a tenyésztő edényekre pipettáztuk, majd a 2 ml-re egészítettük ki 10%-FBS tartalmú DMEM-mel a végtérfogatot. A 96 lyukú plate-ek esetében térfogatarányosan csökkentettük a mennyiségeket. A transzfekciós arányokhoz, valamint a szuszpenzióban történő transzfekcióhoz a gyártó útmutatásait vettük alapul.

Proteome Profiler analízis

Különböző fehérjék egyidejű foszforilációs szintjét R&D Systems Proteome Profiler Human Phospho-Kinase Array Kit segítségével elemeztük. Az előzőleg leírt kezelési protokoll elvégzése után a sejteket feltártuk, majd 200 µg fehérjét használtunk a kísérletekhez a gyártó leírása alapján. A készlet tartalmazta a vizsgálathoz szükséges összes puffert és reagenst. A membránokon keletkezett kemilumineszcenciás jeleket Bio-Rad ChemiDoc Touch készülékkel vizualizáltuk, a felt intenzitásokat ImageJ segítségével elemeztük.

PI3K aktivitás mérés

A PI3K aktivitást egy ELISA-kit segítségével mértük meg, a gyártó útmutatásai alapján. Az abszorbanciákat 450nm-en mértük fotométerrel. Az immunoprecipitációhoz a PI3K p85 alegység elleni antitestet használtunk, a gyártó kiegészítő protokollja alapján. A reakciókban használt fehérje mennyiségét ugyanezen antitest segítségével ellenőriztük Western blot eljárás segítségével. A felszabadított foszfatidilinozitol (3,4,5)-trifoszfát (PIP₃) mennyiségét a PI3K expressziós szintjéhez normalizáltuk.

Seahorse XF96 mérések

A sejtek metabolikus aktivitását Agilent Seahorse XF (ASX) 96 műszerrel, ASX assay 5,5 mM glükózt tartalmazó médium segítségével mértük. A zsírsav oxidációt gátló etomoxirt 50 µM-os koncentrációban alkalmaztuk. Az ATP szintáz enzim proton csatornáját (F₀ alegység) 2 µM Oligomycin hozzáadásával gátoltuk, valamint ezzel különböztettük meg az ATP szintézishez kapcsolt O₂ fogyasztást. A mobil ion szállító FCCP-t (carbonyl cyanide p-trifluormethoxyphenylhydrazone) 4 µM-os végkoncentrációban adtuk a sejtekhez, melynek segítségével a légzési kapacitást számoltuk. Az FCCP potens mitokondriális oxidációt szétkapcsoló ún.: „uncoupler”. Az ATP szintézist gátolja olyan módon, hogy a mitokondriális belső membránon keresztül protonokat szállít. A III-as komplex gátlásához 10 µM Antimicin A-t használtunk. A glikolízis gátlásához a kompetitív 2-dezoxiglükózt használtuk 100 mM-os

koncentrációban, mely a hexokinázt gátolja. Öt mérési pontot vettünk fel az alapvonalhoz, valamint minden inhibitor injektálása, és a mérési médium összekeverése után is. A méréseket követően a sejteket 1 N NaOH-ban feloldottuk, majd a fehérje mennyiséget BCA módszer segítségével határoztuk meg.

Glükóz felvételi vizsgálatok

2-NBDG (2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl) Amino)-2-Deoxyglükóz) felvételi mérésekhez C2C12 sejteket az előzőleg leírt módon tenyésztettük és kezeltük. A differenciáltatott miotubulusokat PBS-el mostuk, majd 2% (V/V) lószérumot tartalmazó glükóz mentes DMEM tápoldatban inkubáltuk. A sejteket 100 nM inzulinnal kezeltük 30 percig, majd glükóz mentes médium került a sejtekre, mely 2 μ M 2-NBDG-t tartalmazott. Az inkubálást 120 percig végeztük 37°C-on. A fluoreszcenciát 485 nm-es excitáció és 535 nm-es emissziós beállítással mértük egy Tecan Spark Multimode mikroplate olvasóval. A negatív, vak, valamint a standard méréseket is elvégeztük a glükózfelvétel standardizálására. A sejteket háromszor mostuk, majd 0,1 M KH_2PO_4 pH 11,0 oldatban szolubilizáltuk fehérjemérés céljából. A fluoreszcens adatokat pmol-ban kaptuk, mely 1 mg fehérjére vonatkoztattunk.

Statisztikai elemzések

A MP idegi folyamatokban betöltött szerepének vizsgálata során használt statisztikai módszerek: student féle t-teszt: átlagok $\pm$ SEM (n=5), *p<0,05; **p<0,01; ****p<0,0001, valamint: ANOVA: Dunett's post hoc elemzés: Átlagok $\pm$ SEM (n=5), *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001.

A SMTNL1 inzulinrezisztenciában betöltött szerepének vizsgálatai során a következő statisztikai elemzéseket végeztük a bemutatott eredményekkel kapcsolatban: A SMNTL1 vs üres plazmával transzfektált sejtek adatai: Kétutas ANOVA: Sidak féle post hoc teszt: Átlag $\pm$ SEM; n=3; *,p<0,05). A különböző kezelések hatásának vizsgálatához: Kétutas ANOVA: Tukey's post hoc analízis: Átlag $\pm$ SEM; n=3; p<0,05; a különböző betűk jelzik a szignifikáns eltérést a vizsgált csoportok között.

Eredmények

A miozin foszfatáz szerepe a neurotranszmitter felszabadulásában

Kísérleteink során megvizsgáltuk a SNAP-25 és a miozin foszfatáz kölcsönhatását. Ennek bizonyítására felületi plazmonrezonanciás (SPR) eljárást alkalmaztunk, az eredmények alapján a MP MYPT1 alegysége fehérje-fehérje kölcsönhatásban van a SNAP-25 fehérjével. Annak kiderítésére, hogy melyik MYPT1 régió felelős ezért a kölcsönhatásért, a MYPT1 különböző trunkált mutánsait is használtuk a mérések során. A kapott disszociációs állandók alapján a MYPT1 C-terminális régiója köti a legerősebben a SNAP-25 fehérjét.

Irányított mutagenézis segítségével létrehoztuk a SNAP-25 Thr¹³⁸ -> Ala¹³⁸-as mutánsát. *In vitro* protein kináz reakcióban vizsgáltuk a ROK általi foszforilációt, melyet az erre az oldalláncra specifikus antitesttel vizsgáltuk Western blot kísérletekben. Az eredményeink alapján igazoltuk, hogy a SNAP-25 fehérje a ROK szubsztrátja, amelyet a Thr¹³⁸ oldalláncán foszforilál.

A miozin foszfatáz szerepének feltárása érdekében B50 neuroblasztóma sejtekben siRNS technikával a MYPT1-et kódoló gén expresszióját sikerült visszaszorítani. A csendesítés meglétét Western blot technikával ellenőriztük le. Az siMYPT1 kezelés hatására a sejtek életképességének drámai csökkenését írtuk le, amely arra utal, hogy az idegi eredetű sejtekben a PP1 enzimeknek jelentős szerepe van a sejtélettani folyamatok fenttartásában. A csendesítés hatására lecsökkent a protein foszfatáz aktivitás is, melyet radioaktív aktivitásmérési eljárással igazoltunk miozin szubsztrát felhasználásával. Foszfospecifikus antitesteket használva azt tapasztaltuk továbbá, hogy az endogén SNAP-25 Thr¹³⁸ oldallánc foszforilációja lecsökkent ezekben a sejtekben.

Kutatási eredményeink rávilágítottak arra is, hogy a ROK és MP enzimpáros képes befolyásolni az exocitózis folyamatát a SNARE komplex SNAP-25 foszforilációja révén. A MP gátlása TMC inhibitorral csökkentette a szintaxin által megkötött SNAP-25 mennyiségét immunprecipitációs kísérletekben, valamint magasabb Thr¹³⁸-as foszforilációt mutattunk ki szinaptoszóma preparátumokon végzett kísérletekben. H1152 (ROK gátlás) kezelés hatására a leírt hatások ellenkezőjét figyeltük meg. A szintaxinnal végzett immunprecipitáció során a megkötött SNAP-25 mennyisége megnőtt, továbbá a Thr¹³⁸-as oldallánc foszforilációja emelkedett szintet mutatott szinaptoszómákban. Eredményeink alapján maga a KCl-os depolarizáció is képes csökkenteni a SNAP-25 Thr¹³⁸-as foszforilációját.

Egér agy szeleteket kezelve TMC-vel hasonló eredményeket kaptunk, emelkedett foszforilációt figyeltünk meg, melyhez foszfospecifikus antitestet, és konfokális mikroszkópiát alkalmaztunk, ezekkel ellentétes eredményeket kaptunk a ROK H1152 általi gátlásának hatására. Az eredményeink rávilágítottak arra, hogy a ROK és MP enzimpáros a SNARE komplex elemei közül a SNAP-25 Thr¹³⁸ oldalláncán keresztül képesek befolyásolni az idegi folyamatokat.

A SMTNL1 szerepe az inzulinrezisztenciában

Kutatásaink során megvizsgáltuk a SMTNL1, illetve az MPA kezelések hatását C2C12 sejtekben indukált inzulinrezisztens állapotban.

Első lépésben ProteomeProfiler elemzést hajtottunk végre a sejtekből preparált mintákon. A SMTNL1 túltermelés hatására a STAT5a és STAT5b emelkedett foszforilációt mutatott, a STAT2, 6, valamint a CREB és a c-Jun foszforilációját nem befolyásolta. SMTNL1 túltermelés hatására a p53 Ser⁴⁶-os oldallánca azonban emelkedett foszforilációt mutatott inzulinrezisztens állapotban. Számos fontos protein kináz mutatott emelkedett foszforilációt inzulinrezisztens állapotban SMTNL1 túltermelés hatására úgy, mint az AMPK α 2 Thr¹⁷², valamint az Akt1/2/3 Ser⁴⁷³. Fontos továbbá megjegyezni az mTOR Ser²⁴⁴⁸, valamint a JNK1/2/3 Thr¹⁸³, valamint az ERK1/2 Thr²⁰² foszforilációja is megemelkedett inzulinrezisztens állapotban. A JNK és az ERK aktivációja az irodalmi adatok alapján fontos kinázok, melyek az IRS1-et fontos gátló Ser pozíciókban képesek foszforilálni.

További Western blot vizsgálatokban az IRS1 különböző kritikus Ser foszforilációit vizsgáltuk meg. Az IRS1 Ser³⁰⁷, Ser³¹⁸, és a Ser⁶¹² foszforilációk emelkedett szintet mutattak indukált inzulinrezisztens állapotban. Progeszteron kezeléssel kombinálva a SMTNL1 túltermelés azonban képes volt visszaszorítani ezeket a foszforilációkat. Kísérleteink során megfigyeltük az IRS1 fehérje csökkent expresszióját, mely utalhat a magas inzulin által kiváltott degradációra is. Magának az MPA kezelésnek nem volt hatása az inzulin rezisztens sejtekre. Ezek alapján úgy tűnik, hogy a SMTNL1fehérjének génexpressziót szabályozó szerepe van, mivel progeszteronnal együttes hatása bizonyult szignifikánsnak.

Az IRS1 Ser³⁰⁷-es oldalláncát a JNK foszforilálja, továbbá inzulinrezisztens állapotban ez az enzim magas aktivitást mutat. A Ser³¹⁸ foszforilációval karöltve ez a két foszforiláció az inzulin receptor és az IRS1 közötti kölcsönhatásban okoz zavarokat. A SMTNL1 túltermelése nem befolyásolta a JNK expresszióját, viszont az aktiváló foszforilációjában csökkent szintet detektáltunk. Az IRS1 Ser³¹⁸-as foszforilációját PKC enzimek katalizálják, ezeknek az enzimeknek a deléciója bizonyos esetekben képes kivédeni az inzulinrezisztens állapotot. Saját

eredményeink alapján a PKC ϵ génexpressziójára a SMTNL1 túltermelése hatással volt, a PKC ϵ expressziója lecsökkent. Az IRS1 Ser⁶¹² esetében az ERK1/2 és mTOR útvonalak is fontos szerepet játszanak. Az ERK1/2 gátlásával bizonyos rendszerekben sikerült visszaállítani az inzulin érzékenységet, továbbá az ERK1/2 aktivációja magasabb volt inzulinrezisztens állapotban. Vizsgálati rendszerünkben az ERK1/2 aktiváló foszforilációja magasabb volt, melyet a SMTNL1 túltermelése MPA kezeléssel kombinálva képes volt visszaszorítani. Eredményink alapján a SMTNL1 túltermelése és a progeszteron közös hatása képes volt a JNK, és az ERK1/2 hatását csökkenteni. Ezek alapján úgy tűnik, hogy a SMTNL1 génexpresszós hatása révén képes az inzulinrezisztenciás állapotot enyhíteni. Az IRS1 Ser¹¹⁰¹-gyel kapcsolatban is megfigyeltük a SMTNL1 érzékenyítő hatását, bár érdekes módon maga az inzulinrezisztencia hatására is csökkent ezen az oldalláncon lévő foszforilációs szint.

A PI3K-al kapcsolatban megfigyeltük a p85 alegység expressziójának csökkenését inzulinrezisztens állapotban, melyet a SMTNL1 túltermelése MPA kezeléssel kombinálva képes volt ellensúlyozni. Ugyan ezt az érzékenyítő hatást figyeltük meg a PI3K aktivitásában is. Eredményeink alapján még inzulinrezisztens állapotban képes a SMTNL1 magasan tartani a PI3K aktivitását.

Az inzulin jelátvitel következő tagjában, az Akt1 foszforilációjában csökkent mértéket figyeltünk meg abban az esetben, ha magas inzulinnal indukáltuk az inzulinrezisztenciát C2C12 sejtekben. A SMTNL1 túltermelés MPA-val kombinálva azonban képes volt az Akt1 foszforilációit még inzulinrezisztens állapotban is magasan tartani mind a Thr³⁰⁸-as mind a Ser⁴⁷³-as oldalláncon. Az Akt1 foszforilálja, és inaktíválja a GSK-3 β enzimet. Ennek eredményeként a glikogén szintáz aktiválódik, és megindul a glikogén raktárak kiépítése. Érdekes módon a GSK-3 β foszforilációját semmilyen kezelés nem befolyásolta. A downstream effektorok közül az mTOR expressziója, valamint a Ser²⁴⁴⁸-as foszforilációja nem változott meg a krónikus inzulin, valamint MPA jelenlétében. Abban az esetben viszont, ha a sejtek túltermelték a SMTNL1-et, és MPA-val voltak kezelve az mTOR aktivációját váltotta ki. Fontos továbbá megjegyezni azt is, hogy a SMTNL1 túltermelése magasan tartotta a GLUT4 expresszióját is még inzulinrezisztens állapotban is, sőt emelkedett glükóz felvételt mértünk ezekben a sejtekben.

Az inzulinrezisztens sejtek metabolikus paramétereit is megmértük Seahorse XF96 (ASX) műszerrel. Inzulinrezisztens állapotban a glikolitikus paraméterek csökkenését figyeltük meg. A SMTNL1 túltermelése, és MPA-val való kezeléssel kombinálva ez a paraméter szignifikánsan javult a maximális glikolízis, valamint glikolitikus tartalék befolyásolása nélkül. A SMTNL1 túltermelése MPA jelenlétében a glikolitikus aktivitás helyreállítását, és az ATP

termelés emelkedését eredményezte. A mitokondriális aktivitást az oxigén felhasználási ráta (OCR) mérésével vizsgáltuk. A SMTNL1 túltermelése beindította a zsírsav oxidációt. Eredményeink alapján elmondható, hogy a SMTNL1 túltermelése az inzulinrezisztenciában kialakult hatásokat képes bizonyos mértékig enyhíteni, ezáltal potenciálisan molekuláris célpontja lehet egy jövőbeli inzulinrezisztenciát célzó terápiának.

Összefoglalás

Vizsgálataink során a miozin foszfatáz szerepét tanulmányoztuk idegi folyamatokban, valamint az SMTNL1 hatását elemeztük indukált inzulinrezisztencia modellben C2C12 sejteket használva. A miozin foszfatázt először a simaizomzatban katalizált reakcióján (a 20 kDa miozin könnyű láncot (MLC20) defoszforilációja) keresztül írták le. A MLC20-t defoszforilálva a simaizomzat kontraktilis állapotát szabályozza. A MLC20-on kívül számos citoskeletális célpontját is azonosították úgy, mint az ERM vagy Tau fehérjék. Felépítését tekintve egy PP1 enzimsaládba tartozó katalitikus alegységből (PP1cδ), egy MYPT1 szabályozó/célra irányító alegységből, valamint egy M20/21 alegységből áll.

Első felfedezése óta már bizonyosságot nyert, hogy ez az enzim nem csak a citoskeletális sejtalkotók defoszforilációján keresztül tölti be élettani szerepét. Egyrészt nem kizárólag a simaizomzatban fordul elő, másrészt számos szubsztrátot írtak le, melyeket a MP képes defoszforilálni, ezáltal rendkívül sok sejtélettani folyamatra képes hatással lenni. Szerepe van a génexpresszió szabályozásában (PRMT5 fehérjén keresztül), a sejtciklus előrehaladásában, vagy akár az ingerület átvivő anyagok felszabadulásában a SNARE komplex elemeinek defoszforilációja révén. A MP aktivitását sok tényező képes megváltoztatni, a kisméretű inhibitor molekuláktól kezdve az endogén kölcsönható partnereken át a MYPT1 alegység foszforilációjáig. A MP foszforilációs szabályozásában a RhoA-aktivált protein kináz (ROK) játszik fontos szerepet, mely a MYPT1 alegység foszforilációján keresztül képes gátló hatást kialakítani. A ROK és a MP enzimpáros sok esetben egymásnak ellentétes módon hatnak ugyanazon a szubsztráton.

Sikerült felderíteni az ingerület átvivő anyagok felszabadulásáért felelős SNARE komplex egyik tagjának, a SNAP-25 fehérjének a kölcsönhatását a MP holoenzim MYPT1 szabályozó alegységével felületi plazmonrezonanciás eljárással. *In vitro* protein kináz reakcióval, és foszfoprotein elleni antitestekkel sikerült bizonyítani a ROK általi foszforilációt a SNAP-25 Thr¹³⁸-as oldalláncán. A MYPT1 alegység siRNS interferenciás csendesítésének hatására B50 neuroblasztóma sejtekben a SNAP-25 Thr¹³⁸ oldallánc emelkedett foszforilációja volt megfigyelhető, mely tovább erősíti feltételezéseinket, miszerint a ROK/MP enzimpáros a felelős a SNAP-25 foszforilációs szabályozásáért. A csendesítés hatására a B50 sejtek csökkent életképességét, valamint a sejtekből készült mintákban csökkent foszfatáz aktivitást mértünk. Ezek a tények arra utalnak, hogy az idegi régiókban végbemenő sejtbiokémiai folyamatokban a PP1 enzimek hatása kiemelkedően fontos. Egér agykérgi szinaptoszóma preparátumának MP és ROK inhibitorokkal való kezelése során a SNAP-25 Thr¹³⁸ oldallánc ellentétes hatású

foszforilációs szintjét sikerült leírunk, amely további eredményül szolgál az enzimpáros szerepére. Ugyanezen eredményeket sikerült egér agyszeleteken is detektálnunk immunfluoreszcenciás eljárások segítségével. A SNAP-25 fehérje Thr¹³⁸ foszforilációjának a SNARE-komplex kialakulására kifejtett hatását immunprecipitációs kötődési vizsgálatokkal igazoltuk. A kevésbé foszforilált SNAP-25 nagyobb mértékben kötötte a SNARE-komplex szintaxin fehérjéjét, ami arra utal, hogy az exocitózisban a MP pozitív regulátor szerepet tölthet be.

Az SMTNL1 fehérjével végzett kísérletek során sikerült kidolgozni egy *in vitro* C2C12 mioblasztóma/miotubulus modellrendszert, melyben a krónikusan magas inzulinnal sikerült inzulinrezisztens állapotot létrehozunk. Proteome Profiler elemzés segítségével átfogó képet kaptunk a sejteken belüli folyamatok állapotáról inzulinrezisztencia esetében, valamint SMTNL1 túltermelés hatására. Bizonyítottuk az SMTNL1 inzulinérzékenyítő hatását, melyet főleg a progeszteronnal együtt fejtett ki. Az inzulinérzékenyítést az inzulin receptorhoz kötődő IRS1 Ser-oldalláncok foszforilációjának csökkentése révén detektáltuk foszfospecifikus antitestekkel. A SMTNL1 további jótékony hatást fejt ki az inzulin receptor által indukált jelátviteli elemekre is, így szabályozva a PI3K, Akt, és mTOR tengelyt. Eredményeink alapján az SMTNL1 fehérje a JNK és ERK1/2 foszforilációk indirekt módon történő visszaszorításával, még inkább hozzájárul az IRS1 Ser-aminosavmaradékok foszforilációinak csökkentéséhez. Ez a JNK és ERK1/2 enzimek aktivációjáért felelős új típusú PKC ϵ csökkent expressziójával magyarázható a SMTNL1 túltermelés hatására. A PI3K aktivitást, és a GLUT4 expresszióját a SMTNL1 magasan tartotta még inzulinrezisztens sejtekben is. A sejtek energetikai paramétereinek mérése során kiderült, hogy a SMTNL1 az indukált inzulinrezisztenciában is magasan tartja az alap glikolízist MPA kezeléssel kombinálva. Ugyanez volt érvényes a mitokondriális aktivitás mérésekor is, ahol a SMTNL1 túltermelés és az MPA kezelés fokozta az ATP szintézist még inzulinrezisztens állapotban is. Mindezen eredmények az SMTNL1 inzulinrezisztenciában és ahhoz köthető rendellenességek lehetséges gyógyszerhatástani célpontja, amely fokozott expressziójával a vázizom inzulinérzékenyítését és az anyagcserefolyamatok fiziológiás irányba történő elmozdulását segítheti elő.



Nyilvántartási szám: DEENK/486/2022.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Tamás István
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10056898

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Tamás, I.**, Major, E., Horváth, D., Keller, I., Ungvári, Á., Haystead, T. A. J., MacDonald, J. A., Lontay, B.: Mechanisms by which smoothelin-like protein 1 reverses insulin resistance in myotubules and mice.
Mol. Cell. Endocrinol. 551, 1-12, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2022.111663>
IF: 4.369 (2021)
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.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177046>
* These authors contributed equally this work.
IF: 2.766

További közlemények

3. Major, E., Győry, F., Horváth, D., Keller, I., **Tamás, I.**, Uray, K., Fülöp, P., Lontay, B.: Smoothelin-like protein 1 regulates development and metabolic transformation of skeletal muscle in hyperthyroidism.
Front Endocrinol (Lausanne). 12, 1-17, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fendo.2021.751488>
IF: 6.055
4. Major, E., Keller, I., Horváth, D., **Tamás, I.**, Erdődi, F., Lontay, B.: Smoothelin-like Protein 1 Regulates the Thyroid Hormone-Induced Homeostasis and Remodeling of C2C12 Cells via the Modulation of Myosin Phosphatase.
Int. J. Mol. Sci. 22 (19), 1-18, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms221910293>
IF: 6.208





5. Kónya, Z., Bécsi, B., Kiss, A., **Tamás, I.**, Lontay, B., Szilágyi, L., Kövér, K. E., Erdődi, F.: Aralkyl selenoglycosides and related selenosugars in acetylated form activate protein phosphatase-1 and -2A.
Bioorg. Med. Chem. 26 (8), 1875-1884, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2018.02.039>
IF: 2.802
6. Horváth, D., Sipos, A., Major, E., Kónya, Z., Batori, 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: 4.328
7. Sipos, A., Iván, J., Bécsi, B., Darula, Z., **Tamás, I.**, Horváth, D., Medzihradszky-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
8. 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: 33,965

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az érkekezés alapjául szolgáló közleményekre):
7,135**

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

Debrecen, 2022.12.01.

