

**DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

**Keller Ilka**

**A miozin foszfatáz szerepe és szabályozása az uterus  
fiziológias és pathológias folyamataiban**

**DEBRECENI EGYETEM**

**Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola**

**Debrecen, 2025**

**DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

**A miozin foszfatáz szerepe és szabályozása az uterus  
fiziológias és pathológias folyamataiban**

**Keller Ilka**

**Témavezető: Dr. Lontay Beáta**



**DEBRECENI EGYETEM**

**MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA**

**DEBRECEN, 2025**

# Tartalomjegyzék

<b>TARTALOMJEGYZÉK</b>	<b>3</b>
<b>RÖVIDÍTÉSEK</b>	<b>6</b>
<b>BEVEZETÉS</b>	<b>9</b>
<b>IRODALMI ÁTTEKINTÉS</b>	<b>11</b>
<b>A fehérjék poszttranszlációs módosításai és szerepük fiziológias és pathológias folyamatokban</b>	<b>11</b>
A fehérjék poszttranszlációs módosításai	11
A protein foszforiláció jelentősége	12
<b>A protein foszfatázok szerepe és csoportosítása</b>	<b>13</b>
A protein-foszfatáz-1 (PP1) enzimes család	14
A fémion-függő protein foszfatáz (PPM) enzimes család	16
A $Mg^{2+}/Mn^{2+}$ -függő protein foszfatáz 1 A (PPM1A) szerkezete, szerepe és jelentősége	16
A $Mg^{2+}/Mn^{2+}$ -függő protein foszfatáz 1 B (PPM1B) szerkezete, szerepe és jelentősége	17
<b>A miozin foszfatáz (MP) szerkezete, szabályozása és jelentősége</b>	<b>19</b>
A miozin foszfatáz szerkezete	19
A miozin foszfatáz szabályozása	20
A miozin foszfatáz élettani jelentősége	22
A miozin foszfatáz szerepe daganatos elváltozásokban	27
<b>Az smoothelin-szerű fehérje 1 (SMTNL1)</b>	<b>29</b>
Az SMTNL1 fehérje szerkezete	29
Az SMTNL1 fehérje szerepe az vázizom adaptációban	30
Az SMTNL1 szerepe a reprodukív fitnessben és a glükóz homeosztázisban	32
<b>A humán női reprodukív traktus uterust érintő pathológias elváltozásai és daganatai</b>	<b>34</b>
Az uterus szövettani szerkezete	34
A női nemi ciklus	35
Az endometrium funkcionális eltérései	36
Az uterus daganatos elváltozásai	38
Lehetséges molekuláris mechanizmusok az uterus pathológias elváltozásai és daganati kialakulásának háttérében	40
<b>CÉLKITŰZÉSEK</b>	<b>42</b>
<b>ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK</b>	<b>43</b>
Vegyszerek	43
Antitestek	43
Sejttenyésztés Ishikawa sejtek esetén	44
Sejttenyésztés HeLa sejtek esetén	44
Sejttenyésztés tsA201 sejtek esetén	44
Ishikawa sejtek tranziens transzfekciója rekombináns SMTNL1 fehérjével	45
HeLa és tsA201 sejtek tranziens transzfekciója rekombináns PPM1B és MYPT1 fehérjével	45
Ishikawa sejtek in vitro terhesség (P4) és gesztációs diabétesz (GDB) modellje	46
HeLa sejtek Sanguinarine kezelése és szubcelluláris frakcionálása	46
Ishikawa és HeLa sejtek életképesség vizsgálata	47
Ishikawa sejtek karcolási esszéje	48
HeLa és Ishikawa sejtek immunfluoreszcens festése	48

Ishikawa és HeLa sejtek feltárása, teljes sejtízátum formában	49
SDS-gélelektroforézis és Western blot analízis	49
Ishikawa sejtek glikogén mennyiségének mérése	50
Ishikawa sejtek glükóz felvételi esszéje	51
Ishikawa sejtek RNS izolálása és szemi-kvantitatív RT-PCR analízise	51
Humán cervicális karcinóma lizátumok feldolgozása	52
Immunprecipitáció	52
A MYPT1 és PPM1B fehérjék pull-down kötődésvizsgálata	53
Hela sejtek Duolink „Proximity Ligation Assay” fehérje-fehérje interakciós esszéje	53
Miozin foszfatáz aktivitásmérés	55
In vitro RhoA kináz esszé (ROK) és PPM1 foszfatáz esszé	55
Statisztikai analízis	56
<b>EREDMÉNYEK</b>	<b>57</b>
<b>A PPM1B fehérje szerepe az MP/PRMT5/H4 jelátviteli pálya szabályozásában</b>	<b>57</b>
A PPM1B és MYPT1 fehérjék kölcsönhatásának bizonyítása	57
A PPM1B szubsztrátja a miozin foszfatáz MYPT1 alegysége	60
A PPM1B gátlása a MYPT1 gátló foszfoszilációjának emelkedését okozza HeLa sejtek nukleáris frakciójában	64
A PPM1B gátlása a PRMT5 aktivitásának szabályozásán keresztül közvetve modulálja a génexpressziót a H4 fehérje szimmetrikus dimetilációjának módosítása révén	67
Az FT-PPM1B overexpressziója csökkenti a PMRT5 aktivitását a MP aktivációján keresztül HeLa sejtekbe	69
Humán cervicális karcinóma szöveti lizátumok módosult PPM1B-MYPT1-PRMT5-H4 tengelye korrelál <i>in vitro</i> eredményeinkkel	75
<b>Az SMTNL1 fehérje szerepe inzulinrezisztens Ishikawa endometriális epitheliális sejtek kontraktilis tulajdonságaira</b>	<b>76</b>
Az FT-SMTNL1 overexpresszió elősegíti az endometriális epitheliális sejtek differenciációját	76
Az SMTNL1 overexpressziója csökkenti a MYPT1 expresziós szintjét és gátolja a MP aktivitást	83
FT-SMTNL1 overexpresszió közvetetten szabályozza az MLC20 foszforilációját a MP gátlásán keresztül Ishikawa sejtekben	87
Az FT-SMTNL1 overexpressziója gátolja az Ishikawa sejtek migrációs képességét	89
Az SMTNL1 szabályozza az IRS-1 és Akt-1 Ser foszforilációját és aktivitását Ishikawa sejtekben	90
AzSMTNL1 közvetetten szabályozza a MAPK aktivitást az Ishikawa sejtek <i>in vitro</i> GDB modelljében	92
Az FT-SMTNL1 transzfekció progesteron-függő módon elősegíti az Ishikawa sejtek glikogénraktározását és glükózfelvételét	96
<b>MEGBESZÉLÉS</b>	<b>99</b>
<b>A PPM1B tumorszuppresszív szerepe a MP/PRMT5/H4 protoonkogén jelátviteli pályán</b>	<b>99</b>
<b>Az SMTNL1 fehérje elősegíti a humán endometriális epitheliális sejtek differenciációját, és inzulinérzékenyítést okoz <i>in vitro</i> terhes és gesztációs diabétesz modellben</b>	<b>102</b>
<b>ÖSSZEFOGLALÁS</b>	<b>109</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>111</b>
<b>TÁRGYSZAVAK (KEYWORDS)</b>	<b>112</b>
<b>HIVATKOZÁSOK</b>	<b>113</b>
<b>KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS</b>	<b>123</b>



# Rövidítések

<b>2-NBDG</b>	2-N-7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl-amino-2-dezoxi-glükóz
<b>Akt-1</b>	Protein kináz B
<b>AMPK</b>	AMP-aktivált protein kináz
<b>BCA</b>	Bicinkoninsav
<b>BSA</b>	Borjú szérum albumin
<b>CBD1</b>	Ca <sup>2+</sup> -kalmodulin kötő domén 1
<b>CBD2</b>	Ca <sup>2+</sup> -kalmodulin kötő domén 2
<b>CH</b>	Kalponin homológ domén
<b>CHASM</b>	Kalponin homológia asszociált simaizom fehérje
<b>DAPI</b>	4', 6-diamidino-2-fenilindol
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>DUSP7</b>	Duál specificitású protein foszfatáz 7
<b>DUSP9</b>	Duál specificitású protein foszfatáz 9
<b>EDTA</b>	Etiléndiamin-tetraecetsav
<b>EGTA</b>	Etilén-glikol-bisz(β-aminoetil-éter)-N,N,N',N'-tetraecetsav
<b>ERK ½</b>	Extracelluláris jel által szabályozott kináz
<b>FBS</b>	Foetális borjú szérummal
<b>FIC</b>	Foszfatáz ihibitor koktél
<b>FSH</b>	Follikulus stimuláló hormon
<b>FT-SMTNL1</b>	Flag-jelölt rekombináns SMTNL1 fehérje
<b>FT-PPM1B</b>	Flag-jelölt rekombináns PPM1B fehérje
<b>GDB</b>	<i>in vitro</i> gesztációs diabétesz modell
<b>GLUT4</b>	Glükóz transzporter 4-es típus
<b>GST</b>	Glutation-S-transzferáz
<b>H4</b>	Hisztón 4
<b>HCC</b>	Hepatocelluláris karcinóma
<b>HCS</b>	Nagy áteresztőképességű szűrőberendezés
<b>HEPES</b>	4-(2-hidroxietyl)-1-piperazin-etánszulfonsav
<b>HK</b>	Hexokináz
<b>HPV</b>	Humán papillomavírus

<b>IGF</b>	Inzulinszerű növekedési faktor
<b>ILK</b>	Integrinhez kapcsolódó kináz
<b>IR</b>	Inzulin receptor
<b>IRS-1</b>	Inzulin receptor-szubsztrát 1
<b>JNK</b>	c-Jun N-terminális kináz
<b>KCl</b>	Kálium-klorid
<b>KEPI</b>	Kináz által fokozott PP1 inhibitor
<b>LH</b>	Luteinizáló hormon
<b>MAPK</b>	Mitogén-aktivált protein kináz
<b>M<math>\alpha</math>R</b>	Mikrocisztin-LR
<b>MEP50</b>	Metiloszóma fehérje 50
<b>MLC20</b>	20 kDa miozin könnyű lánc
<b>MP</b>	Miozin foszfatáz
<b>MPA</b>	Medroxiprogesteron-acetát
<b>MUC-1</b>	Mucin 1
<b>MYPT1</b>	Miozin foszfatáz célzó alegység 1
<b>Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub></b>	Nátrium-ortovanadát
<b>Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub></b>	Tetranátrium-pirofoszfát
<b>NaCl</b>	Nátrium-klorid
<b>NaF</b>	Nátrium-fluorid
<b>NEAA</b>	Nem esszenciális aminosavak
<b>Nkx2.5</b>	NK2 homeobox 5
<b>nPKC<math>\epsilon</math></b>	Új típusú protein kináz C $\epsilon$
<b>OA</b>	Okadánsav
<b>OD</b>	17- $\beta$ -ösztadiol
<b>P4</b>	<i>in vitro</i> terhesség modell
<b>PAS</b>	Protein A Sepharose
<b>PBS</b>	Foszfáttal pufferolt sóoldat
<b>PFA</b>	Paraformaldehid
<b>PI3K</b>	Foszfatidilinozitol-3-kináz
<b>PIC</b>	Proteáz inhibitor koktél
<b>PIP2</b>	Foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát
<b>PIP3</b>	Foszfatidilinozitol-3,4,5-triszfoszfát
<b>PKA</b>	cAMP-függő protein kináz

<b>PKG</b>	cGMP-függő protein kináz
<b>PMSF</b>	Fenil-metil-szulfonil-fluorid
<b>PP1c</b>	Protein foszfatáz 1 katalitikus alegység
<b>PP2A</b>	Protein foszfatáz-2A
<b>PP2Ac</b>	Protein foszfatáz-2A katalitikus alegység
<b>PPAR<math>\gamma</math></b>	Peroxiszóma proliferátor-aktivált receptor gamma
<b>PPM1</b>	Mg <sup>2+</sup> /Mn <sup>2+</sup> -függő protein foszfatáz M1
<b>PPM1A</b>	Mg <sup>2+</sup> /Mn <sup>2+</sup> -függő protein foszfatáz 1A
<b>PPM1B</b>	Mg <sup>2+</sup> /Mn <sup>2+</sup> -függő protein foszfatáz 1B
<b>PPP1CB</b>	Protein foszfatáz katalitikus alegység $\beta/\delta$ izoforma
<b>p53</b>	Tumor protein p53
<b>pRb</b>	Retinoblasztóma protein
<b>PRMT5</b>	Protein arginin-metiltranszferáz 5
<b>PTEN</b>	Foszfatáz és tensin homológ
<b>Raf-1</b>	Proto-onkogén szerin/treonin-protein kináz
<b>RhoGDI1</b>	Rho GDP-disszociációs inhibitor
<b>RIPA</b>	Rádióimmunprecipitációs vizsgálati puffer
<b>ROK</b>	Rho A aktivált kináz
<b>SD</b>	Szórás
<b>SDS</b>	Nátrium-dodecil-szulfát
<b>SDS-PAGE</b>	Nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis
<b>SMTN</b>	Smoothelin fehérje
<b>SMTN-B</b>	Smoothelin B fehérje
<b>SMTNL1</b>	Smoothelin-szerű fehérje 1
<b>SNG</b>	Sanguinarine
<b>TBS</b>	Tris-pufferolt sóoldat
<b>TIMAP</b>	TGF $\beta$ által gátolt membránasszociált fehérje
<b>VEGF</b>	Vaszkuláris endoteliális növekedési faktor
<b>ZIPK</b>	Zipper-interakciós protein kináz

# Bevezetés

Az endometrium funkcionális elváltozásai magasan hajlamosítanak fertilitási zavarok kialakulására, illetve felvetik az eltérés alapján kialakuló daganatos betegségek megjelenését is (1). Az uterus malignus elváltozásai magas incidenciával és malignitással jelentkeznek fertilis és posztmenopauzális korban lévő nők esetén egyaránt. A női reprodukciós traktusból eredő daganatok kialakulásának megértéséhez elengedhetetlen az endometriális sejtek fiziológias adaptációjának és differenciációjának tanulmányozása a női nemi ciklus függvényében, mivel a sejtek ezen folyamatok során jelentős morfológiai és funkcionális átalakuláson mennek keresztül, melyben bekövetkező hibás szabályozás alapot szolgáltat szöveti és szervi szintű elváltozások megjelenésére (2). Továbbá az elégtelen szteroidhormon válasz, avagy a hormonális eltolódás infertilitási rizikót hordoz magában. Ezen hormonális, funkcionális és daganatos eltérések gyakorta mutatnak összefüggést inzulinrezisztencia fennállásával, mely kapcsoltság molekuláris háttere még nem tisztázott (3).

A smoothelin-szerű fehérje 1-et (SMTNL1) izomból és szteroidhormonokra érzékeny szövetekből izolálták, illetve ismeretes a fehérje különböző sejtípusok esetén betöltött kontraktilis funkciót szabályozó szerepe, melyet a miozin foszfatáz (MP) holoenzim gátlásán keresztül valósít meg (4). Emellett a SMTNL1 a protein kináz A által a Ser301 helyen történő foszforiláció után a sejtmagba transzlokálódik, és a progeszteron receptor-B transzkripciós ko-aktivátoraként működik, ezáltal képes számos gén expresszióját módosítani (5). A SMTNL1-null egerek csökkent reprodukciós képességet mutatnak és predisponáltak a 2-es típusú cukorbetegség kialakulására (6). Ugyanakkor a SMTNL1 endometriális hámsejtekben betöltött szerepét eddig még nem írták le, viszont mivel előzetes irodalmi adatok a MP holoenzim szabályozó miozin célzó alegység 1 (MYPT1) expressziójának csökkentésén keresztül összefüggésbe hozták az SMTNL1-et a méh simaizom tónusának szabályozásában vemhes egerek esetén, kínálkozik a fehérje szerepének mélyebb tanulmányozása az endometriális szövetek és sejtek fiziológias és patológias folyamatiban (6).

A MYPT1 fehérje az MP enzim szabályozó alegysége, mely egy Ser/Thr-specifikus 1-es típusú protein-foszfatáz és protein foszfatáz 1c (PP1c) katalitikus alegységgel rendelkezik (7). Az MP, mint a sejtek kontraktilis funkcióinak egyik fő modulátora már jól ismert, azonban számos egyéb MP-függő élettani folyamat is azonosításra került az elmúlt években, melyek az MP tumorszuppresszor szerepére utalnak (8). Az MP-t lokalizációját már több sejtvonal sejtmagi frakciójában is igazolták, illetve hepatocelluláris karcinóma (HCC) esetén a MYPT1

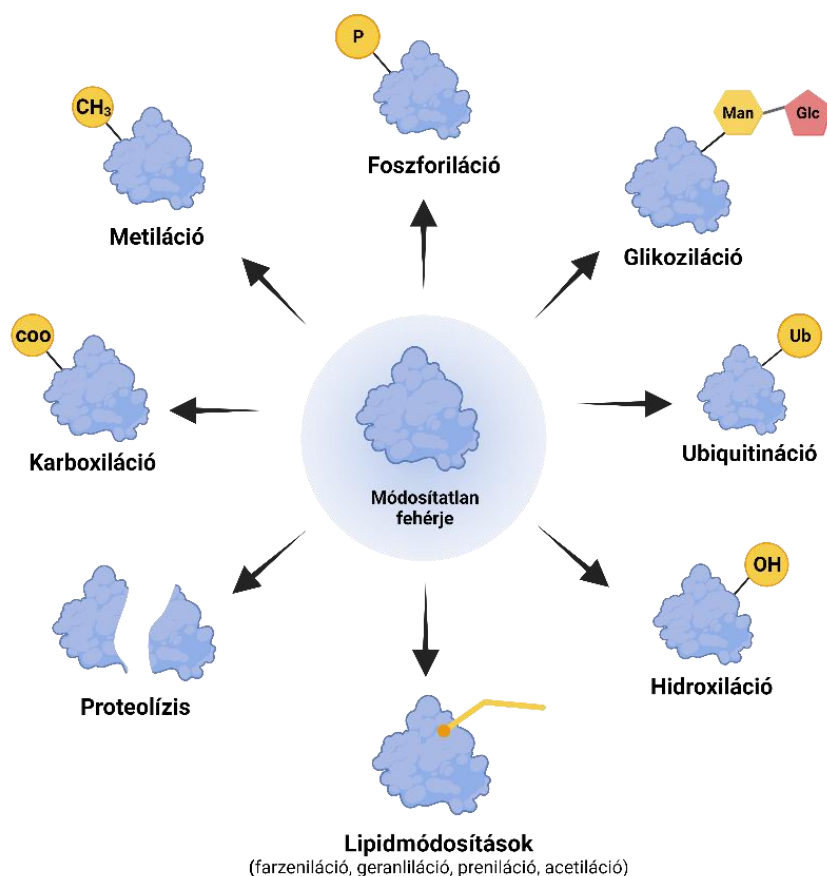
csökkent expresszióját és az MP csökkent aktivitását írták le (9). Az MP génexpresszió szabályozásában betöltött szerepét feltárták, mint a MP/PRMT5/hisztin jelátviteli útvonal egyik elemét sejtekben (9). A protein arginin-metiltransferáz 5 (PRMT5), mint a metilozóma komplex része, képes a hisztin 2A és 4 fehérjék szimmetrikus arginin dimetilációval módosítani, amely poszttranszlációs módosítás felborítja olyan tumorsuppresszorok és protoonkogének expressziós tengelyét, mint pl. a retinoblasztóma vagy a p53 tumorsuppresszor (p53) fehérje (9). Az MP egyik lehetséges felső szabályozó eleme a  $Mg^{2+}$ -függő 1B proteín-foszfataz (PPM1B), amelyet MYPT-kötő fehérjeként tömegspektrometriás elemzéssel azonosítottak annak intranukleáris interakciójából (10,11). Mivel az endometriális, de a cervixalis carcinomák esetén is számos esetben deprimált proteín foszfataz expressziót rögzítettek, mely korrelált a tumorok tumor/nyirokcsomó-érintettség/metasztázis (TNM) stádiumával és klinikai progressziójával (12), sürgető olyan tanulmány kivitelezése, mely olyan jelátviteli útvonalat tanulmányoz uterusszarkómák esetén, mely fókuszában meghibásodott proteín foszfataz jelátviteli útvonal áll.

# Irodalmi áttekintés

## A fehérjék poszttranszlációs módosításai és szerepük fiziológias és pathológias folyamatokban

### A fehérjék poszttranszlációs módosításai

Az eukarióta sejtekben a fehérjék transzlációját és foldingját követően poszttranszlációs módosítások nyújtanak lehetőséget az előállított fehérje további aktivitásának szabályozására, a sejtben belüli kompartmentekbe való juttatására, avagy a fehérje eliminációjára. A fehérjék transzláció utáni módosításai közül a leggyakoribbak a palmitoiláció, preniláció, foszforiláció, proteolízis, ADP-riboziláció, karboxilálás, ubikvitinálás, acetiláció, proteólízis, metiláció és hidroxiláció

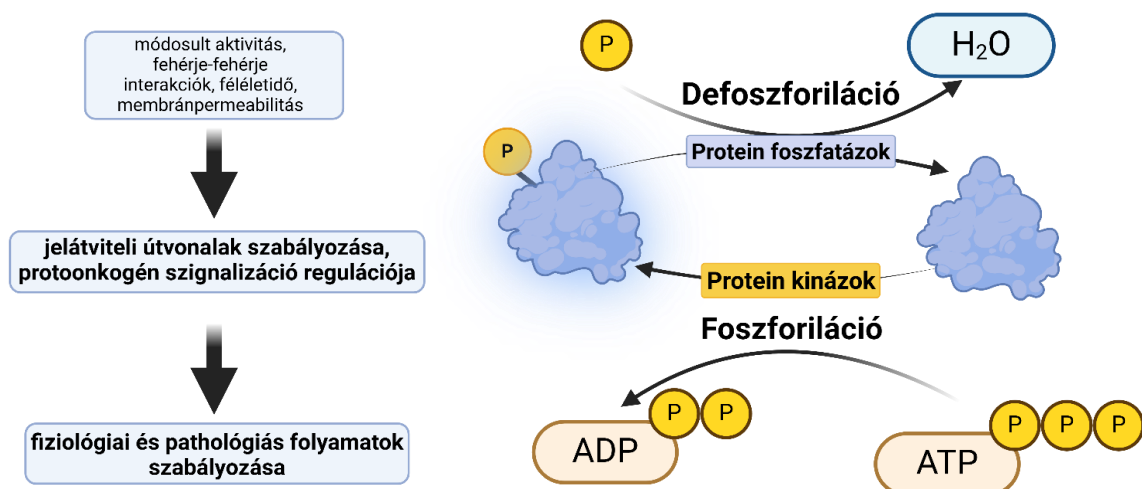


1. ábra: A fehérjék poszttranszlációs módosításai: A fehérjék transzlációjuk után számos módosításon eshetnek át poszttranszlációs módosítás révén.. Az ábra a biorender.com felületén készült.

(13,14) (**1. ábra**). A poszttranszlációs módosítások jelentőségét hivatott jelezni, hogy ezen szabályozott folyamatok meghibásodása nem csak az adott fehérje és így a sejt diszfunkcióját idézheti elő, hanem alapja lehet az egész szövet, avagy szerv pathológiás funkcióvesztésének, súlyosabb esetben akár daganatos sejtburjánzást okozhat jelátviteli folyamatok felborításával (15,16). A poszttranszlációs módosítások lehetnek reverzibilisek, illetve irreverzibilisek, okozhatják a módosított fehérje túlzott aktivációját, avagy teljes gátlását, azáltal, hogy a módosítás megváltoztatja a kérdéses fehérje térszerkezetét, azáltal átalakul a fehérje és kérdéses kölcsönható partnere között kialakító fehérje-fehérje kölcsönhatás (17,18).

## A protein foszforiláció jelentősége

Habár a poszttranszlációs módosítások skálája széles (18), a protein foszforiláció fontossága vitathatatlan (**2. ábra**). Ezen reverzibilis módosítás leírása egészen 1943-ra tehető, amikor is Cori és Green glikogén metabolizmust feltérképező vizsgálatai nyomán azonosították (19) a glikogén lebontását szabályozó protein foszfatáz 1 enzimet (PP1, avagy foszforiláz foszfatáz), mely foszfatáz működése során foszfát csoportot távolított el szubsztrátjáról, a glikogén foszforilázzal, azaz defoszforilálta azt, ezen módosítás eredményeképpen pedig csökkent a glikogén lebontásának rátája. Ezen defoszforiláció reverzibilis voltát biztosító protein kináz felfedezése 1955-re tehető, illetve Edmond H. Fischer és Edwin G. Krebs nevéhez fűződik, akik a glikogén foszforiláz szabályozásának vizsgálata során kimutatták az enzimet aktiváló protein kináz létezését (20).



**2. ábra:** A fehérjék foszforiláció mechanizmusa és lehetséges következménye. A fehérje foszforilációt végző kinázok a módosításhoz szükséges foszfát csoportot ATP terminális foszfátjából nyerik. A folyamat reverzibilizálásáról a protein foszfatázok gondoskodnak. A módosított fehérje aktivitása megváltozhat, ezáltal jelátviteli útvonal indulhat meg a sejtben belül. A szabályozási mechanizmus felborulása pathológiás következményekkel járhat. Az ábra a biorender.com felületén készült. ATP: adenozin trifoszfát, ADP: adenozin-difoszfát

A foszforiláció létrejöttéhez a protein kinázok leggyakrabban az ATP terminális foszfátcsoportját használják fel foszfátdonorként (2. *ábra*) (21), melyet a fehérjék hidroxilcsoportot tartalmazó Ser, Thr avagy Tyr oldalláncaihoz kovalensen kapcsolnak. A protein foszfatázok ezen foszfátcsoport hidrolízisével állítják vissza a defoszforilált állapotot (22). Ezen módosítás eredményeképp a szubsztrát fehérje aktivitása módosulhat, ezen felül megváltozhat a fehérje-fehérje kölcsönhatások száma és erőssége, illetve módosulhat a fehérje féléletideje és membránpermeabilitása is (16).

Amennyiben a foszforiláción-defoszforiláción áteső fehérje egy jelátviteli útvonal tagja, a poszttranszlációs módosítás a szignalizációs kaszkád lefolyását is befolyásolhatja, így esély nyílik számos élettani folyamat precíz szabályozására, mint pl.: az izomösszehúzódás, vagy az inzulin jelátviteli kaszkád. Amennyiben a fiziológias szabályozási mérleg felborul akár a foszfatázok, akár a kinázok javára, az a jelátviteli folyamat zavara révén protoonkogén jelátvitelt is megindíthat (2. *ábra*). A fehérjék foszforilált/defoszforilált állapotát általánosságban a sejtben jelen lévő protein kinázok és protein foszfatázok kifejeződésének aránya, illetve aktivitása szabja meg (22). A fiziológias protein kináz és foszfatáz egyensúly eltolódása bármely irányba metabolikus és onkogén rendellenességek kialakulásának ad lehetőséget (23).

## **A protein foszfatázok szerepe és csoportosítása**

A protein foszfatázokat elsőként specifikusságuk alapján csoportosították, mely felosztás során beszélhetünk Ser/Thr-specifikus és Tyr-specifikus protein foszfatázokról, illetve kettős specificitású protein foszfatázokról, melyek mindhárom aminosavmaradékról képesek eltávolítani a foszfátcsoportokat (24). 1988-ig a Ser/Thr-specifikus protein foszfatázokat négy nagy enzimesaládba sorolták aszerint, hogy a foszforiláz kináz fehérje melyik alegységén képesek módosítást végezni, illetve, hogy gátolhatóak-e kis molekulásúlyú hőstabil inhibitor fehérjékkel (I-1 és I-2). Ezen megfontolások alapján a protein foszfatázok négy enzimesaládjá az alábbiak szerint alakult: protein foszfatáz-1 (PP1), a protein foszfatáz-2A (PP2A), PP2B és PP2C (22). A foszforiláz kináz  $\alpha$  alegységének modifikációjáért a 2-es típusú protein foszfatázok felelnek (PP2A, B és C), míg a PP1 család a  $\beta$  alegység defoszforilációját katalizálja. A kis molekulásúlyú I-1 és I-2 inhibitor fehérjékkel való megfontolás alapján, amennyiben a gátlás megvalósul ezen fehérjék által, akkor a kérdéses foszfatáz a protein PP1 szupercsalád tagja, mivel a protein foszfatáz 2 (PP2) szupercsalád aktivitását ezen gátlófehérjék nem módosítják (22).

A 2000-es években az protein foszfatáz enzimek aminosav szekvenciájának vizsgálata eredményeként egy új osztályozási rend honosodott meg, mely a katalitikus alegységek négy csoportját hozta létre. Ezen felosztás alapján megkülönböztetünk Tyr-specifikus protein foszfatázokat (PTP), melyek katalitikus alegységük aktív centrumában Cys oldalláncot tartalmaznak, Ser/Thr specifikus foszfoprotein foszfatázokat (PPP), amelyek stabilitásuk érdekében  $Zn^{2+}$ -és  $Fe^{2+}$  ionokkal alkotnak komplexet, fémion-függő foszfatázokat (PPM), amelyek stabilitásukat  $Zn^{2+}$  és  $Fe^{2+}$  ionon kívül még  $Mg^{2+}$  és  $Mg^{2+}$  ionnal is biztosíthatják, illetve aszpartát-függő protein foszfatázokat, melyek katalitikus alegységükben DxTxT motívumot tartalmaznak (3. *ábra*).

A Tyr specifikus protein foszfatázok osztályozása a következőképpen alakult: protein tyrozin foszfatázok (PTP), a duál specifikus foszfatázok (DUSP), melyek mind Tyr, Thr és Ser oldalláncok defoszforilációjára is képesek, illetve végezetül a csoport tagjai a lipid foszfatáz (PTEN) enzimek.

A Ser/Thr specifikus protein foszfatázok közül kiemelkedő jelentőséggel bírnak a PP1 szupercsaládhoz tartozó enzimek, mivel eukarióta sejtekben nagy számban fordulnak elő, illetve esszenciális jelátviteli folyamatok széles skáláját szabályozzák (25). A szupercsalád tagjainak katalitikus alegysége a 31-35 kDa molekulatömegű PP1c, aminek szerepe van a meiózis, apoptózis, fehérje szintézis, neurotranszmitter kibocsátás, citoskeletális újrendeződés folyamatainak lebonyolításában (26).

## **A protein-foszfatáz-1 (PP1) enzimcsalád**

A PP1c katalitikus alegységnek humán szervezetben több izoformája létezik, melyet mai ismeretünk szerint három gén: a PPP1CA, PPP1CB és PPP1CC kódol (27,28). A három gén termékeinek alternatív splicingja számos más izoforma kialakulását eredményezi, amelyek aminosav szekvenciája kb. 90%-os szekvencia hasonlóságot mutat, katalitikus centrumuk pedig erősen konzervált (26,29). A PP1c katalitikus helyét javarészt savas aminosavmaradékok veszik körül (30,31), mely jelenség magyarázatot szolgáltat arra a tényre, hogy a PP1c miért preferálja a foszforiláz kináz  $\beta$ -alegységét, a savasabb tulajdonságú  $\alpha$ -alegységgel szemben (32).

A szabad PP1c egyedi jellemzője, hogy szubsztrátjainak defoszforilálása során nem meghatározott konszenzus szekvenciát ismer fel, hanem a hatékony szubsztrátkötés feltétele az aktív helyétől távol elhelyezkedő felszíni dokkoló motívumoktól függ. A szabad PP1c katalitikus alegység rendkívül széles szubsztrát-specifitást mutat (30).

A PP1c szubsztrátjai két nagy csoportra oszthatók a katalitikus alegység iránti affinitás alapján. Egyes szubsztrátok (például a tumorszuppresszor BRCA1) magas affinitással kötődnek a PP1c-hez, vele stabil heterodimer komplexeket alkotnak (33). Ezzel szemben a szubsztrátok másik csoportja (például a glikogén-foszforiláz) csak gyenge kölcsönhatásokat alakítanak ki PP1c-vel, és stabil komplexek kialakítására nem képesek (34). Ezen szubsztrátok defoszforilációjához olyan PP1c-hez kapcsolódó, szabályozó alegységre van szükség, amely további szubsztrát-dokkoló helyeket biztosít.

Ezen szabad PP1c-hez gyenge affinitással kötődő szubsztrátok miatt jellemző a PP1c tartalmú protein foszfatázok felépítésére a holoenzim szerkezet, mely egy katalitikus PP1c és egy szabályozó alegységből áll, melyek meghatározzák az enzimkomplex működését, biztosítják a katalitikus alegység szubsztrát-specifitását, illetve az enzim szubcelluláris kompartmentbe való irányítását (35). A PP1c katalitikus alegység sejteken belül betöltött széleskörű szerepét a hozzá kötődni képes szabályozó alegységek nagy száma biztosítja, melyekből jelenleg kb. 200 került leírásra (36).

A szabályozó alegységek a PP1c kötő motívum (R/K)-(V/I)-X-(F/W), (avagy röviden RVxF szekvencia, ahol az x prolint kivéve bármely lehetséges aminosavat jelöl) segítségével kapcsolódnak a katalitikus PP1c alegység hidrofób árkához (36,37). Ezen szabályozó alegységek szintén a PP1 szubsztrátjai lehetnek (35). Az ismert szubsztrát szabályozó alegységek közel fele önmagában is rendelkezik enzimatis funkcióval, melyek PP1 általi defoszofilációt követően válnak aktívvá, mint például a BRCA1, a fókális adhéziós kináz (FAK), és a kaspáz-2 (38-41).

A szabályozó alegység specifikus szerkezete a PP1-et képes olyan sejt-kompartmentekhez irányítani, mint a plazmamembrán (pl. integrin  $\alpha$ IIB), mitokondriumok (pl. nem hagyományos prefoldin RPB5 kölcsönhatás-fehérje: URI), endoplazmatikus retikulum (pl. génaktiválással szabályozott DNS-károsodási 34 fehérje: GADD34), az aktin-citoszkeleton (pl. spinofilin), kromatin (pl. Repo-man) és nukleoluszok (pl. MIF4G domén 1-el rendelkező nukleoláris fehérje 1: NOM1) (42).

Egyes szabályozó alegységek irányító képessége nem korlátozódik egy szubsztrátra, ilyen típusú szabályozó alegységek közül ismeretes pl.: a GADD34, a miozin-foszfatáz célzó alegység 1 (MYPT1), a foszfoprotein-foszfatáz 1 nukleáris célfehérjéje (PNUTS). A GADD34 a PP1c katalitikus aktivitását az eukarióta iniciációs faktor 2 alfa alegysége (eIF2 $\alpha$ ), a transzformáló növekedési faktor béta receptor 1 (TGF- $\beta$ -R1), és az I- $\kappa$ B kináz (IKK) defoszforilációjához rendeli (43). A PNUTS a PP1c-t a  $\gamma$ -aminovajsav receptorhoz, az limfocita citoszkeletális fehérje 1-hez (LCP1) és a telomer ismétlődés kötő faktor 2 (TRF2) fehérjékhez

irányítja (44). A MYPT1 szabályozó alegység interakciós repertorárja igen széles, melyek közül megemlíthetők pl.: a retinoblastoma-fehérje (pRb), a miozin, és a moezin, amelyek így PP1c általi defoszoforilációval befolyásolhatóvá válnak (45).

## **A fémion-függő protein foszfatáz (PPM) enzimcsalád**

A fémion-függő protein foszfatáz (PPM, más néven PP2C) család tagjai Ser/Thr specifikus protein foszfatázok, melyek aktivitásukhoz és stabilitásukhoz kétértékű fém ionokkal alkotnak komplexet. A PPM szupercsalád tagjai a PPP enzimektől eltérő módon nem tartalmaznak szabályozó alegységet, katalitikus alegységükben találhatóak azon domének, melyek meghatározzák a szubsztrátspecificitást, és szabályozzák aktivitásukat (46). A PPM enzimcsaládból humán szervezetben eddig 20-at azonosítottak, melyek közül a legjobban tanulmányozottak a PPM1A, PPM1B és PPM1D izoformák. Katalitikus alegységük azon doménje, mely a  $Mg^{2+}/Mn^{2+}$  ion kelátkötéséért felelős jelentősen konzervált, és biztosítja az enzim aktivitását (47). Előzetes irodalmi adatok kimutatták, hogy vas (II)-ionok is stabilizálhatják a PPM foszfatázok szerkezetét, ám a kadmiumion gátló hatást gyakorol a PPM protein foszfatázokra (47). A katalitikus centrumban elhelyezkedő fémkötő aminosavmaradékok a stabilitás biztosításán túl szerepet játszanak a PPM foszfatázok aktivitásának szabályozásában is (48). A PPM enzimcsalád tagjai részt vesznek a sejtciklus, a sejtdifferenciáció szabályozásában, továbbá szerepet játszanak immunválaszok koordinálásában is (49). A PPM-foszfatáz gének mutációja, túlzott kifejeződése vagy hiánya abnormális sejtválaszokat eredményez, amelyek különféle malignus daganatok kialakulásához vezethetnek (50).

A PPM1A és PPM1B N-terminális régiói 76%-os azonosságot mutatnak, illetve későbbi kutatási munkánk során mindkét izoforma említésre kerül, ezért a következő fejezetben ismertetni kívánom a két protein foszfatázt.

### **A $Mg^{2+}/Mn^{2+}$ -függő protein foszfatáz 1 A (PPM1A) szerkezete, szerepe és jelentősége**

A PPM1A kristályszerkezetét Barford és munkatársai 1996-ban jellemezték először (51), és ez az egyik legjobban karakterizált PPM foszfatáz, mely megtalálható humán szervezetben. Kifejeződési szintje a Humán Protein Atlasz adatai alapján különlegesen magas a herében és a csontvelőben (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000100614-PPM1A>). A PPM1A két doménből, egy N-terminális katalitikus doménből és egy 90 aminosav hosszúságú C-terminális részből áll. A katalitikus domén központja egy  $\beta$ -szendvics, amely két mangániont

tartalmaz, és  $\alpha$ -hélixek veszik körül, stabilizálva a szerkezetét. A PPM1A aktivitása  $Mn^{2+}$  vagy  $Mg^{2+}$  ionoktól függ, bár további kutatások alapján akár vas-(II)-ionok is biztosíthatják a katalitikus aktivitást, míg a kadmiumionok gátolhatják a PPM1A működését (48). A PPM1A kristályszerkezetének elemzése alapján a fehérje rendelkezik még egy  $\beta$ -szállal, amely a katalitikus központ felé néz, illetve hasonló pozícióba hajlik az N-terminusa is (48). A PPM1A szekvenciájában második Gly N-mirisztoil módosítása határozza meg az enzim membránhoz való kötődését és a szubsztrát felismerést is (48).

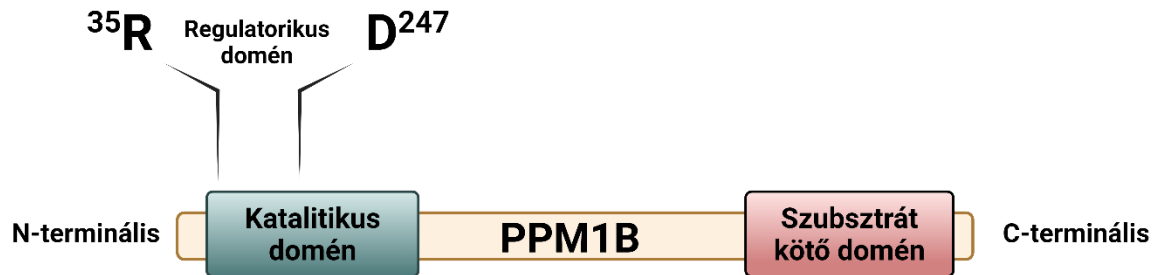
A PPM1A számos szisztémás funkció szabályozásában vesz részt, úgy, mint az angiogenezis, a gyulladás és az immunválasz, különböző jelátviteli útvonalakon keresztül. Ezen folyamatokban betöltött szabályozó szerepe annak köszönhető, hogy számos jelátviteli útvonal, mint például a p38 mitogén-aktivált protein kináz (MAPK), a c-Jun N-terminális kináz (JNK), és a TGF- $\beta$  jelátviteli útvonal szereplőjeként tartják számon (52).

Előzetes irodalmi adatok alapján a PPM1A fontos szerepet játszhat a humán malignus daganatok kialakulásában. Mivel a PPM1A képes defoszforilálni a TGF- $\beta$  útvonal alsóbb elemeit, nevezetesen a SMA és MAD homológ fehérje család 2/3 tagját (SMAD2/3), ezáltal képes gátolni a TGF- $\beta$  jelátviteli útvonalat (53). Továbbá recidívára hajlamos betegek hólyagrák biopsziáiban csökkent a PPM1A kifejeződése (54). Ezen csökkent PPM1A expresszió együtt járt hólyagrák szövettani típusának alacsony differenciáltsággal, izominvazivitásával és rosszabb prognózissal. Ezen összefüggések azt sugallják, hogy a PPM1A aktivitása és fiziológiás kifejeződése gátolhatja a daganatképződést (55). Ösztrogénreceptor-negatív emlőrákban szintén csökkent PPM1A expressziót regisztráltak, összehasonlítva ösztrogénreceptor-pozitív típusal (50). Továbbá lejegyzett irodalmi adat, miszerint a PPM1A elvesztése elősegíti a tripla negatív emlőrák kialakulását, ami arra utal, hogy a PPM1A alapvető tumorszuppresszív funkcióval bír a rossz prognózisú emlőrákok kialakulása során. A PPM1A kiütése fokozta az HepG2 sejtek proliferációját (56).

#### **A $Mg^{2+}/Mn^{2+}$ -függő protein foszfatáz 1 B (PPM1B) szerkezete, szerepe és jelentősége**

A PPM1B-t, (más néven PP2C $\beta$ ) először 1992-ben azonosították (57). A humán PPM1B a kettős kromoszómán található gén által kódolt, jelenleg öt izoformája ismert, melyek számos szövetben expresszálódnak, mint pl.: PP2C $\beta$ 1 és PP2C $\beta$ 2 váz-és szívizomban, míg a PP2C $\beta$ 3, PP2C $\beta$ 4 és PP2C $\beta$ 5-ös izoformát gasztrointesztinális traktusban és a herében írták le (58).

A PPM1B fehérje N-terminálisán található a katalitikus domén, mely 310 aminosavból áll, melyben benne foglaltatik az enzim aktivitásáért felelős, Arg33-tól Asp247-ig terjedő katalitikus centrum. Az enzim C-terminálisa felelős a szubsztrát felismeréséért és kötéséért (4. ábra) (59).



4. ábra: A PPM1B szerkezete. Az ábrán feltüntetett szerkezeti elemek: N-terminális, katalitikus domén, szabályozó domén, szubsztrát kötő domén. Az ábra a biorender.com felületén készült.

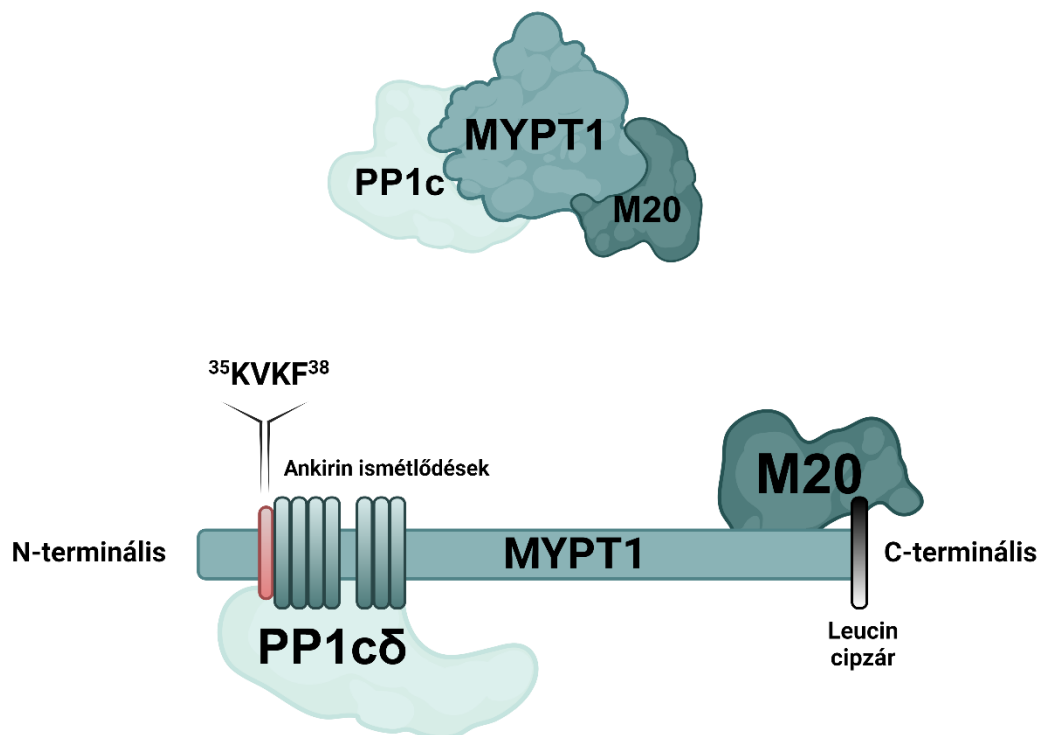
A PPM1B protein foszfatáz szabályozása kevéssé ismert. Expressziójának csökkentésében szerepet játszik a miR-181a-5p, illetve a miR-186 mikroRNS-ek, melyek a PPM1B kifejeződésének mértékét csökkentik, azáltal, hogy mRNS-ének 3' régióját kötve csökkentik az mRNS stabilitását (60). A PPM1B transzkripciójának szabályozásában részt vesz a Forkhead Box O3 (FOXO3) foszforilált állapotban (61). A TNF- $\alpha$  jelátviteli útvonal aktiválódása esetén a protein kináz A (PKA) képes a PPM1B-t foszforilálni a Ser195 oldalláncon, ezzel kijelöli a fehérjét ubiquitináció általi degradációra (62).

A PPM1B kölcsönható partnerei között leírták a „RAS protein aktivátor-szerű fehérje 2”-t (RAS protein activator like 2), amely a PPM1B-vel komplexet képezve csökkenti az AMP-aktivált protein kináz (AMPK $\alpha$ ) foszforilációját (63). Azonosították a PPM1B szerepét továbbá még a p53-as fehérje defoszforilálásában is, melyhez a PPM1B a glióma amplifikált szekvencia 41 (GAS41)-es fehérjével alkotott komplexe szükséges (64). Az ubiquitin-specifikus proteáz 12 és 46 (USP12 és USP46) biztosítja a PPM1B stabilitását az által, hogy PPM1B-ről eltávolítja az ubikvitin oldalláncot, így a PPM1B döntő szerepet tölt be tumor sejtek kemokin termelésének szabályozásában (65). Végezetül hepatocelluláris karcinómában a tripartit motívumot tartalmazó fehérje 59 (TRIM59) PPM1B-vel kialakított kölcsönhatása a PPM1B degradációját okozta (66). A PPM1B lokalizációja nem korlátozódik a sejtek citoplazmájára, hanem megtalálható a nukleáris kompartmentben is. Jelenlétét leírták HepG2 sejtek sejtmagjában, mint a MYPT1 fehérje sejtmagi kölcsönható partnerét (9).

## A miozin foszfatáz (MP) szerkezete, szabályozása és jelentősége

### A miozin foszfatáz szerkezete

A MP a PP1 szupercsalád tagjaként 36 kDa molekulatömegű katalitikus PP1c alegységet tartalmaz, mely rendhagyó módon nem a PP1-re jellemző dimer szerkezetet vesz fel, hanem holotrimer komplexet alkot a MYPT1 szabályozó alegységgel, illetve egy 20 kDa molekulatömegű, eddig ismeretlen funkciójú alegységgel (M20) (5. ábra) (8,67).



**5. ábra:** A miozin foszfatáz szerkezete. A MP holoenzim PP1cδ katalitikus, MYPT1 szabályozó és M20 ismeretlen funkciójú alegységből épül fel. A MYPT1 ábrán feltüntetett régiói: N-terminális, KVKF szekvencia (PP1c-kötő motívum); ankyrin ismétlődési régió; Leucinin cipzár; C terminális. Az ábra a biorender.com felületén készült.

**MYPT1:** miozin célzó alegység 1, **M20:** 20 kDa molekulásúlyú alegység, **PP1cδ:** PP1c katalitikus alegység

A MYPT1 szabályozó alegység a MYPT fehérjecsalád tagja. A család további jelentős tagjai között megemlítendő még a MYPT1 fehérjén kívül a MYPT2, a 85 kDa molekulatömegű miozin-kötő alegység (MSB85), illetve a TGFβ által gátolt membránasszociált fehérje (TIMAP) is, mely fehérjék mind különböző génről íródnak át (68). A MYPT fehérjecsalád közös jellemzőjeként említendő, hogy a PP1c katalitikus alegységgel való kapcsolat kialakításáért felelős RVxF kötő motívumuk a fehérjék N-terminális régióján helyezkednek el.

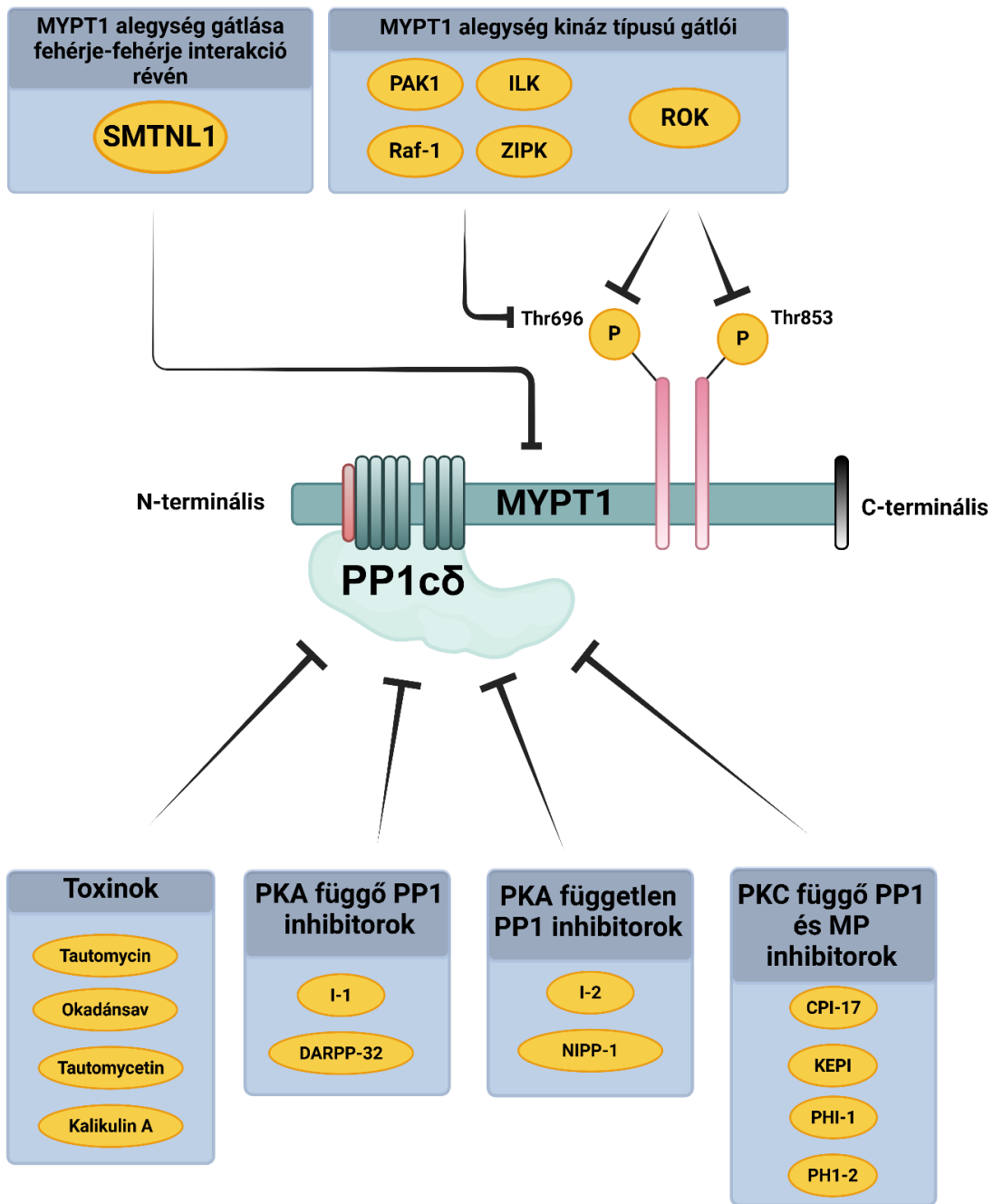
A humán MYPT1-et a 12. kromoszóma rövid karján található 12q15-21-es gén kódolja (69), a fehérje pedig globálisan expresszálódik a szervezet legtöbb szövetében, kiemelkedő mértékben a simaizomban (70).

A MYPT1 fehérje 1030 aminosavból áll, N-terminális régiója megegyezik a MYPT fehérjecsalád egyéb tagjainak jellemző szekvenciáival: rajta PP1c kötésért felelős RVxF motívum található, mely ezen fehérje esetén módosult KVKF aminosavakra, illetve felfedezhető még ezen régióban hét ankirin-ismétlődő szekvencia is, melyek szintén a PP1c katalitikus alegységgel való kölcsönhatás stabilizálásában vesznek részt (5. *ábra*). Tovább erősíti a katalitikus és szabályozó alegység közötti kapcsolatot a MYPT1 fehérje N-terminálisának első 22 aminosava, illetve a centrális régiójában található 304-511 polipeptid szekvencia (71). A MYPT1 izoformái közötti különbségek létrejöttére az alternatív splicing teremt lehetőséget, ami a fehérje izoformái között a C-terminális régióban eredményez különbségeket, mely variábilis módon tartalmazhat leucin cipzárt, ezzel 1030 aminosavra növelve a fehérje hosszát (72). A MYPT1 fehérje a humán szervezetben a PP1c $\delta$  azaz PP1c $\beta$  izoformájával létesít holoenzim kapcsolatot. A PP1c $\delta$  katalitikus alegység MYPT1 szabályozó alegységgel való kötődése az enzim defoszforilációs aktivitását 10-15-szörösére növeli. Az eddig ismeretlen funkciójú M20 alegység a MYPT1 szabályozó alegység C-terminálisához kapcsolódik, viszont jelenléte nem befolyásolja a miozin foszfatáz enzim aktivitását (8).

## A miozin foszfatáz szabályozása

Az MP holoenzim aktivitásának szabályozása megvalósulhat mind a katalitikus alegység gátlásával, mind a szabályozó alegység poszttranszlációs módosításán, mind kölcsönható fehérjéin keresztül (6. *ábra*). Mivel a MP enzim PP1c katalitikus alegységet tartalmaz, ezért működése gátolható azon toxinokkal, amelyekről ismeretes, hogy általánosságban képesek gátolni a protein foszfatázokat. Az ilyen típusú vegyületek közé tartozik az okadánsav (OA), mely mind a PP1, mind a PP2A típusú katalitikus alegység potens inhibitora, bár még PP2A-ra nézve az  $IC_{50,OA}=1,2$  nM, addig a PP1-re ez az érték 315 nM, tehát a PP2A nagyobb érzékenységgel reagál a toxinra a PP1-el szemben (73). Szelektív PP1 inhibitor toxinok közül fontos megemlíteni a tautomycint, a tautomycetint és a kalikulin -t, melyek alkalmazása a PP1 gátlása mellett nem befolyásolja a PP2A enzim aktivitását (10) (6. *ábra*).

Élő szervezetek által termelt szelektív PP1 inhibitorok szintén képesek gátolni az MP aktivitását a PP1c-n keresztül. Ezen inhibitorok hatásköre elkülönül az alapján, hogy hatásuk független-e PKA általi foszforilációtól (22).



6. ábra: A miozin foszfatáz szabályozása. Az MP holoenzim gátlása megvalósulhat a PP1c katalitikus alegység gátlásán, illetve a MYPT1 szabályozó alegység poszttranszlációs módosításai, és fehérje-fehérje interakciói által. Az ábra a biorender.com felületén készült. **I-1**: inhibitor-1, **I-2**: inhibitor-2, **DARPP-32**: cAMP-regulált foszfoprotein, **NIPP-1**: PP1 sejtmagi inhibitor, **CPI-17**: 17 kDa molekulatömegű protein kináz C által aktivált inhibitor, **PHI-1** és **PHI-2**: PP1 holoenzim inhibitor-1 és -2, **KEPI**: kináz által aktivált PP1 inhibitor, **PAK1**: p21-aktivált protein kináz, **ZIPK**: leucin cipzár motívummal kölcsönható protein kináz, **ILK**: integrinhez kapcsolt kináz, **SMTNL1**: smoothelin-szerű fehérje 1, **ROK**: Rho A aktivált kináz, **Raf-1**: proto-onkogén szerin/treonin-protein kináz

A PKA által a PP1 gátlására képes a kis molekulású inhibitor-1 hőstabil fehérje, míg a inhibitor-2-es fehérje (I-2) PP1 gátló aktivitása PKA független (I-1, I-2) (22). A szervezetben belül előfordulnak az I-1 és I-2 fehérjével homológ további inhibitorok: I-1-el homológ a cAMP-regulált foszfoprotein (DARPP-32), míg I-2-vel azonos működésű a PP1 sejtmagi inhibitor (NIPP-1) fehérje (25). Ezen homológ fehérjék működésükkel sejtszinten modulálják a PP1 katalitikus alegység aktivitását (25).

A katalitikus alegység szelektív gátlásán túl leírtak olyan fehérjéket, melyek a MP aktivitását képesek gátolni, nemcsak a PP1c alegység monomer formában történő gátlásával, hanem akkor is, ha az enzim már felvette komplex PP1c $\delta$ -MYPT1 holoenzim szerkezetét. A fehérjecsalád jellemzője, hogy tagjai egységesen tartalmazznak egy PP1 holoenzim inhibitor domént (PHIN domén), illetve aktivitásuk PKC általi foszforiláció révén szabályozott. Ezen család tagjai a 17 kDa molekulatömegű protein kináz C által aktivált inhibitor (CPI-17), továbbá a PP1 holoenzim inhibitor-1 és -2 (PHI-1 és a PHI-2), és kináz által aktivált PP1 inhibitor (KEPI) is (74).

A MYPT1 alegység szabályozására lehetőség nyílik mind fehérje-fehérje kölcsönhatás, mind foszforiláció révén. A MYPT1 fehérje Thr696-os, illetve Thr853-as oldalláncán található gátló hatású foszforilációs helyeinek foszforilációja a MP holoenzim gátlását eredményezik. Ezen aminosavmaradékokat számos protein kináz foszforilálhatja, melyek közül a legfontosabb a Rho A aktivált kináz (ROK). Emellett szelektíven a Thr696-os oldallánc gátló foszforilációját katalizálja a proto-onkogén szerin/treonin-protein kináz (Raf-1) a p21-aktivált protein kináz (PAK1), a leucin cipzár motívummal kölcsönható protein kináz (ZIPK), és az integrinhez kapcsolt kináz (ILK) is (75). A MYPT1 fehérje-fehérje kölcsönhatás révén való gátlására lehetőség nyílik a smoothelin-szerű fehérje 1 (SMTNL1) által (4).

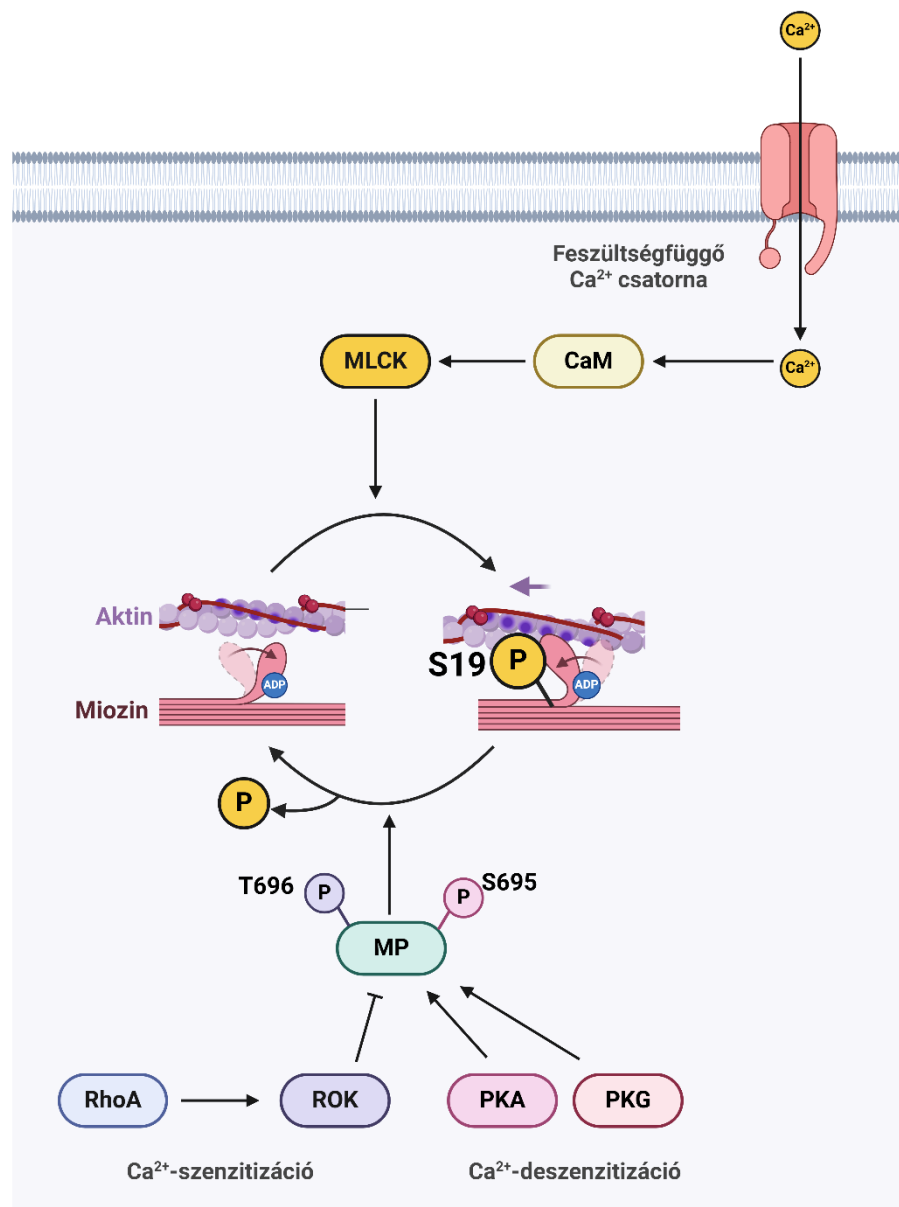
### **A miozin foszfatáz élettani jelentősége**

A miozin foszfatáz-t az 1990-es évek elején Alessi és munkatársai csirkeizületéből izolálták (76), emlős szervezetből Shirazi és munkatársai azonosították 1994-ben (67,77). Az elválasztás disznó húgyhólyag simaizom frakciójából történt, az így izolált MP, hasonlóan a csirkeizületéből kinyert izotípushoz nagyfokú affinitást mutatott a simaizom miozin iránt, melyet a 150 kDa molekulású szabályozó alegység eltávolítása esetén teljesen elveszített (67,77). A teljes enzim a mikrocisztin kezelt simaizom relaxációját változza ki (67,77).

A MP az elválasztás során, mint a miozin könnyű lánc kináz (MLCK) antagonistá partnerre jelent meg, amely a 20 kDa molekulatömegű miozin könnyű lánc (MLC20)

defoszforilációját katalizálta. Ezen aktivitása révén az MP szerepe bizonyosodott az izomkontrakció folyamatának szabályozásában (76).

A simaizom kontrakció kulcsfontosságú részvevője a simaizom típusú miozin II-es fehérje, mely foszforilációjának dinamikus változása az izomösszehúzódás alapja. Továbbá ezen posztranzlációs módosítás a kontrakció finomhangolásán túl szerepet játszik a sejtosztódás folyamatában, a sejtmozgásban-és migrációban is.



7. ábra: Az akto-miozin ciklus szabályozása az MLCK/MP általi MLC foszforiláció függvénye. A simaizomkontrakció  $\text{Ca}^{2+}$ -függő lezajlásához szükséges az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció növekedése, a Ca-kalmodulin kináz aktiválódása, és a MLC foszforilációja. A relaxációt az IC  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció csökkentével szinkron az MP katalizálja, az MLC defoszforilálásán keresztül. A  $\text{Ca}^{2+}$ -független mechanizmust a PKA és PKG általi MYPT1 aktiváló foszforiláció (S695) és ROK-függő MYPT1 gátló foszforiláció (T696) szabályozza. Az ábra a biorender.com felületén készült

MP: miozin foszfatáz CaM: kalcium-kalmodulin kináz, MLCK: miozin könnyű lánc kináz, ROK: RhoA aktivált kináz, PKA: protein kináz A, PKG: protein kináz G

A miozin II-es fehérje felépítését tekintve egy pár 200 kDa molekulatömegű nehézláncból (MHC) és két pár könnyű láncból (egy 17 kDa molekulásúlyú MLC17, és egy 20 kDa molekulásúlyú MLC20) áll. A miozin II-es foszforiláció általi szabályozására az MLC20 foszforilációs helyei adnak lehetőséget. Az MLC20 foszforilálása után a miozin II reverzibilisen kötődik az aktin filamentumokhoz, ezáltal elindítva az izomkontrakcióhoz szükséges kereszthíd ciklust (7. *ábra*) (78,79). Az MLC20 foszforilációját a  $Ca^{2+}$ -kaldmodulin-függő miozin könnyű lánc kináz (MLCK) végzi, a folyamat reverzibilitását a MP biztosítja relaxációt okozva (78,80).

Az MLC20 foszforilációjára több aminosavoldallánc is sor kerülhet. MLCK által preferált foszforilációs hely a Ser19 aminosavmaradék, mely iniciálja az aktin vékony filamentummal való kölcsönhatást, kontrakciót előidézve, melyek relaxációt beindító MP általi defoszforiláció követ (7. *ábra*). Az MLC20 Thr18 oldalláncán is foszforilálódhat, mely módosítás feltehetően gátolja a Ser defoszforilációját és a relaxációt (81,82). Asimaizomkontrakciót előidéző MLCK aktivitás a sejt intracelluláris  $Ca^{2+}$ -szintjének függvénye, így olyan jelátviteli útvonalakhoz kapcsolt, melyek a sejtek  $IC_{Ca^{2+}}$ -szintjét növelik. A sejtválasz lecsengése után visszaálló normál intracelluláris  $Ca^{2+}$  koncentráció pedig az MP aktiválódásának kedvez, beindítva a relaxációt (78).

A simaizom kontrakció szabályozására lehetőség nyílik egy intracelluláris  $Ca^{2+}$  koncentrációtól független útvonalon is, mely fő mediátora a ROK (7. *ábra*) (83). Ezen mechanizmus, melyet a szakirodalom kalcium-szenzitizáció néven is számontart a ROK a MYPT1 szabályozó alegységet annak Thr696-os gátló foszforilációs helyén foszforilálja, kiváltva ezzel az MP gátlását, és a simaizom kontrakciót. A folyamat visszafordíthatóságáért a PKA és cGMP-függő protein kináz (PKG)-függő mechanizmusok felelősek, mely protein kinázok a MYPT1 Ser695-ös foszforilációs helyét célozzák, a kalcium-deszenzitizáció folyamata során. A MYPT1 Ser695-ös foszforilációja esetén gátolt a Thr696-os aminosavoldallánc későbbi foszforilációja, ezáltal az MP felszabadul a gátlás alól (84), és simaizom relaxáció következik be egy  $Ca^{2+}$ -független útvonalon (85).

Habár a MP izomkontrakcióban betöltött szerepének feltérképezésére számos tanulmány irányult, további kutatások kimutatták, hogy az enzim működése nem korlátozódik kizárólag az akto-miozin ciklikus szabályozására. A MYPT1 alegység révén a MP képes számos más szubsztráttal kapcsolatot kialakítani, ezáltal működése széles skálán képes szabályozó funkciót ellátni, túlmutatva azon az eredeti elképzelésen, miszerint az MP egyetlen funkciója a váz-és simaizom kontrakciójának finomhangolása (8).

Az MP kölcsönható partnereit változatos szubcelluláris kompartmentben azonosították, többet közülük a sejt citoplazmájában, de akár a sejtmagban is detektáltak (**8. ábra**) (86). A változatos fehérje-fehérje interakciós repertoár lehetőséget biztosít a MP számára, hogy ne csak a celluláris homeosztázis szabályozásában vegyen részt, hanem egész szervezetre kiterjedő szisztémás hatást is gyakoroljon (75).

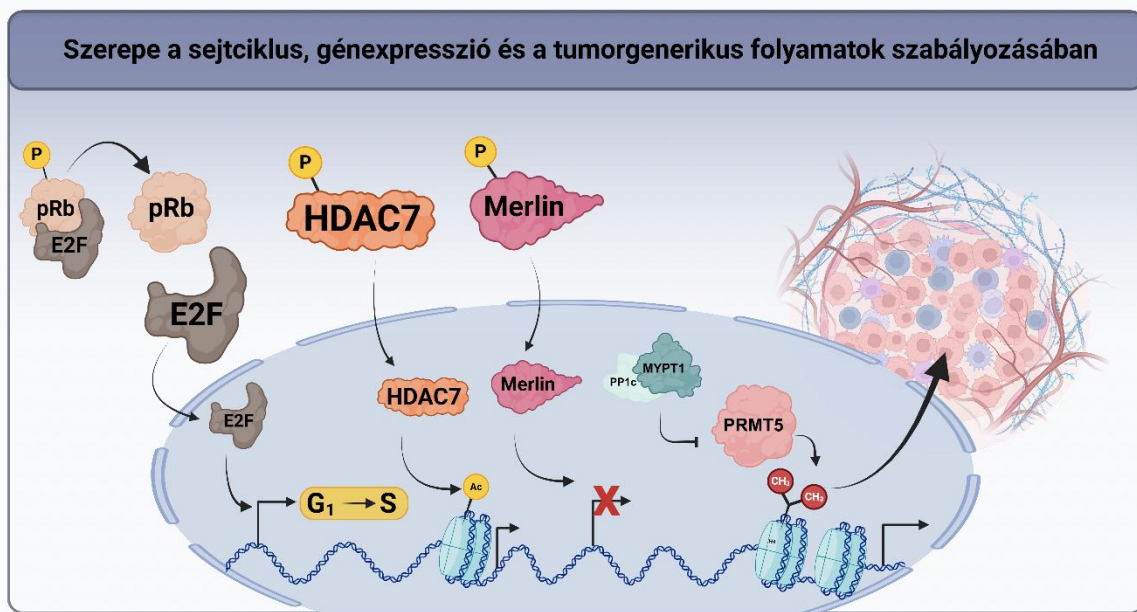
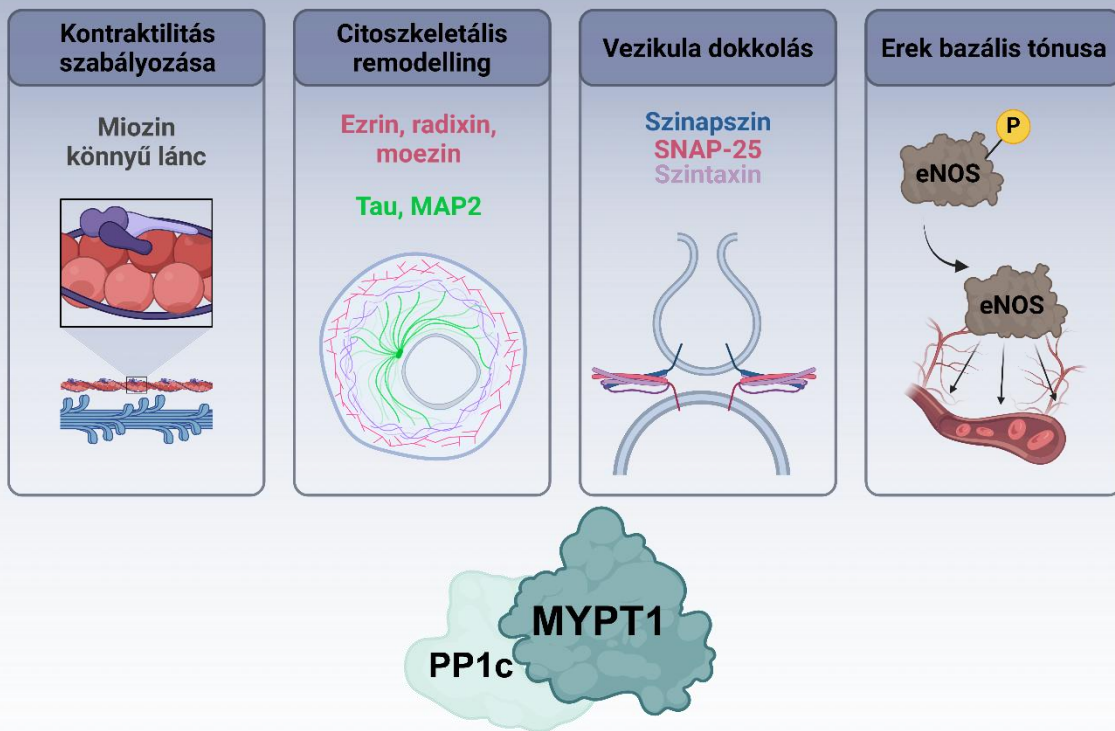
A MP kulcsfontosságú sejtfunkciók szabályozása defoszforiláció révén valósul meg, melyben a defoszoforilációt a MP biztosítja, a szubsztrátok foszforilációért pedig többnyire a ROK a felelős. Jellemzően a ROK a szubsztrátjait C-terminus közelében elhelyezett Thr foszforiláció révén aktiválja, mely foszfát csoport hidrolíziséért és így a folyamat megfordíthatóságáért a MP a felelős (45). Az MP citoplazmatikus kölcsönható partnerei közül például ismeretesek az ezrin, radixin és moezin (összefoglalva: ERM) fehérjék, melyek citoskeletális-és membránfehérjék között teremtenek kapcsolatot, így biztosítják a sejtadhézió kialakítását, továbbá a migráció folyamatában is fontos szerepet töltenek be (45,75).

További citoplazmatikus lokalizációt mutató MP kölcsönható fehérje az adducin, mely epithelsejtek alakjának kialakításában tölt be szerepet az aktin citoskeletális fehérje és a spektrin között alakítva ki kapcsolatot (75). Továbbá ismeretes még a tubulin asszociált alegység (Tau) és a mikrotubulus asszociált protein 2 (MAP2) fehérjék, mint MP kölcsönható partnerek, melyek a citoskeleton remodellingjében azáltal vesznek részt, hogy a mikrotubulusok dinamikus instabilitását modulálják (**8. ábra**) (87).

A MP szisztémás hatásainak leírása során fény derült arra, hogy a MP az erek bazális tónusát is befolyásolja az endotheliális nitrogén monoxid szintáz (eNOS) defoszforilációjával. A defoszforilált eNOS aktivitása nő, így emelkedik az általa L-argininből képzett citrullin mennyisége, ami simaizom relaxációt okoz, és lokális vazodilatációt vált ki (**8. ábra**) (88). A MP a neurotransmitter kibocsátásra is hatást gyakorol, mivel szabályozza a szinaptikus vezikulák dokkolását. A folyamatban részvevő fehérjék közül a 25 kDa molekulatömegű szinaptoszóma-asszociált proteint (SNAP-25), a szintaxint és szinapszint azonosították, mint a MYPT1 szabályozó alegység kölcsönható partnereket, melyek foszforiláltsága befolyásolja a neurotranszmitterek szinaptikus részbe történő ürítését (**8. ábra**) (86).

Az MP a pRb-vel létesített kölcsönhatásán keresztül képes a sejtciklust is befolyásolni (**8. ábra**) (89). A tumorsuppresszor pRb-t a MP a Thr826-os oldalláncán képes defoszforilálni, ezáltal aktiválni a fehérje működését, előidézve a G1 ellenőrzőpont stabilitását, illetve indukálva a sejtek G0-ba való átlépését (89).

# A miozin foszfatáz szerepe és jelentősége



8. ábra: A miozin foszfatáz eddig ismert funkciói. Az MP szabályozza a sejtek kontraktilis funkcióját az aktomiozin komplexen keresztül, szerepet vállal a citoszkeletális remodellingben az ezrin, moezin, radixin fehérjével kialakított kapcsolata révén, illetve a mikrotubulus reorganizációt is modulálja a Tau és MAP2 fehérjékkel létesített kölcsönhatásán keresztül. A neurotranszmitter kibocsátás szabályozását szintaxin, szinapszin és SNAP-25 kapcsolata révén szabályozza, az erek bazális tónusához az eNOS defoszforulációja révén járul hozzá. A génexpressziót az MP a pRb, HDAC7 és Merlin fehérjékkel való kölcsönhatása révén képes befolyásolni, továbbá intranukleáris pozícióban szabályozza a PRMT5 aktivitását is. Az ábra a biorender.com felületén készült.

**Tau:** tubulin asszociált alegység, **MAP-2:** mikrotubulus asszociált protein 2, **E2F:** transzkripciós faktor; **SNAP-25:** szinaptoszóma-asszociált proteint **HDAC7:** hiszton deacetiláz 7; **MYPT1:** miozin célzó alegység 1; **pRb:** retinoblasztóma protein; **PRMT5:** protein arginin metiltransferáz 5; **eNOS:** endotheliális nitrogén monoxid szintáz

Frissebb irodalmi adatok alapján fény derült az MP génexpresszió szabályozásában betöltött szerepére is. A MP a génexpressziót egyrészt a hiszton deacetiláz 7 (HDAC7) fehérje módosításán keresztül is modulálhatja: a HDAC7 a MP általi defoszforiláció hatására képes a sejtmagba jutva szabályozni különböző gének kifejeződését (**8. ábra**) (90). További támogató adat az MP génkifejeződés szabályozásában betöltött funkciójára azon ismeretek, melyeket a MP intranukleáris interakciós partner listája szolgáltat. A MYPT1 egyik nukleáris kölcsönható fehérjéje a protein arginin metiltransferáz 5 (PRMT5), mely a metiloszóma komplex részeként a hiszton fehérjék szimmetrikus dimetilációját módosítja (9). Az emelkedett szimmetrikus dimetiláció hatására a génexpresszió mértéke módosul, és megborul a különböző protoonkogének és tumorszupperesszor gének expressziós mintázata, mely egyensúly a protoonkogének kifejeződésének növekedése irányába tolódik túlzott PRMT5 aktiválódás esetén, malignus transzformáció felé tolja a sejteket (9,91). Több humán malignus karcinómában leírták a MYPT1 fehérje expressziójának csökkenését, melyet a PRMT5 aktivációjának, illetve a hiszton 4 és hiszton 2A (H4 és H2A) fehérjék szimmetrikus dimetilációjának növekedése követett (**8. ábra**) (9).

### **A miozin foszfataz szerepe daganatos elváltozásokban**

Az onkogenezis egy összetett folyamat, amelynek háttérében állhatnak mind genetikai, mind epigenetikai mutációk, melyek kóros felhalmozódása maga után vonja a protoonkogének és tumorszupperesszorok génexpressziós egyensúlyának felborulását, így indukálva korlátlan sejtproliferációt, és megnyúlt sejt-túlélést (92). Habár számtalan tanulmány irányult a tumorgenezis háttérében álló molekuláris változások tisztázására, jelenlegi ismereteink alapján hiánypótlásra szorul olyan mechanizmusok további feltérképezése és molekuláris kulcsszereplők jellemzése, melyek meghibásodása jelátviteli útvonalak felborulását okozzák daganatokban. Előzetes irodalmi adatokra támaszkodva kijelenthető, hogy a tumorok kialakulásában, fejlődésében és túlélésében az MP aktivitásának elnyomása kulcsfontosságú tényező, mely felismerések a MP-t tumorok meghibásodott jelátviteli útvonalának központjába állítják (9).

Előzetes irodalmi adatok alapján tudjuk, hogy a MYPT1 fehérje gyakran alacsony szinten fejeződik ki humán rosszindulatú daganatokban (9), habár a jelenség molekuláris magyarázata jelenleg tisztázás alatt áll. Gyomorrákból származó szöveti biopsziákon, és sejt kultúrában egyaránt igazolódott a MYPT1 csökkent expressziója, továbbá a fehérje megváltozott kifejeződési szintje összefüggést mutatott a gyomorrákos szövetek klinikai stádiumaival, és a sejtek teljes túlélésével (93). A MYPT1 transzfekciója gyomorrákból

származó SNU-58 sejtek esetén gátolta a sejtosztódást, a sejtciklus előrehaladását, valamint a sejtek migrációját és invázióját. A jelenség magyarázatát a MYPT1 transzfekció hatására megemelkedő Cyclin D1 és c-myc expresszióban találták, továbbá, jelentősen fokozódott az E-kadherin kifejeződése is, ami mellett csökkent az invázióval összefüggő gének, a 2-es szöveti metalloproteináz-inhibitor (TIMP-2) és 2-es mátrix metalloproteináz (MMP-2) expressziója SNU-58 gyomorrák sejtekben (93).

Az MP szerepet játszik a sejtosztódás szabályozásában is, a korábban már ismertetett tumorszuppresszor, a pRb-vel kialakított kapcsolatán keresztül (75,94). Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy az MP gátlása csökkentette leukémiás sejtek kemoterápiás szerek által kiváltott sejthalálát, míg az MP aktiválása érzékenyítő hatást gyakorolt (95). A jelenség háttérében megfigyelték, hogy kemoterápiás szerek kombinált alkalmazása csökkentette a MYPT1<sup>Thr696</sup> foszforilációjának szintjét, így növelte az MP enzimaktivitását át közvetlenül a pRb fehérje defoszforilációját, és aktiválását, ami a tumoros sejtek proliferációjának gátlását eredményezte (95). Továbbá THP-1 leukémás sejteken végzett kalikulin-A általi kezelés növelte a MYPT1 mindkét gátló hatású, Thr696 és Thr853 foszforilációs helyének foszforilációját, ami a MP gátlásához vezetett, közvetve növelve a pRb foszforilációját, ezáltal csökkentette a leukémiás sejtek kemoterápiás szerre való érzékenységét (89).

Gasztrointesztinális sztrómális tumorokon (GIST) végzett kutatások is alátámasztották a MPYT1 tumorszuppresszor karakterét. GIST daganatokban kórosan magasan expresszálódó mikroRNS-675 mellett a MYPT1 expressziója csökkent, amely tovább növelte a tumortípus agresszivitását a RhoA/NF2/YAP1 jelátviteli útvonal által (96).

A továbbiakban az MP sejtciklust szabályozó és tumorszuppresszív funkcióját írták le, mivel az MP kapcsolatot alakít ki a merlin fehérjével is (8. *ábra*) (97). A MP a merlint defoszforilálja és ezáltal aktiválja, ami így gátolja a túlzott sejtproliferációt, ezáltal is tumoros átalakulás ellen védve a sejteket (97). Ezen szubsztrát-enzim kapcsolat RT4 hólyagrák-eredetű sejtek vizsgálatával is bizonyosodott (94). A merlin fehérje fehérje aktivációja a Ser518-as oldalláncának defoszforilációjával történik, melyet CPI-17-es MP inhibitor gátolt, fokozva a merlin foszforilációján keresztül a Ras protoonkogén aktivációját. Kimutatták, hogy a CPI-17 szintje számos human tumoros sejtvonalban megemelkedett, szuppresszálva a MP, és ezen keresztül a merlin fehérje aktivitását (94). Továbbá emelkedett ezrin, radixin és moezin (ERM) fehérjék foszforilációja is, melyet az MP gátlásával kialakult emelkedett merlin fehérje foszforiláció okozott (94,98).

NCI-H446 kissejtes tüdőráksejteken ROK inhibitor alkalmazása hatására a sejtek növekedése, proliferációja, adhéziója, migrációja és inváziója csökkent, míg apoptózisuk

jelentősen növekedett, és ezt a jelenséget a MYPT1 Thr696 foszforilációjának csökkenése kísérte(99). További tanulmányok szintén igazolták a MYPT1 Thr696 foszforilációjának csökkenésének szerepét a vastagbélrák-eredetű sejtek növekedésének gátlásában (100).

Korábbi tanulmányok a MYPT1 alegységet már leírták a HepG2 sejtek sejtmagi frakciójában, ahol igazolódott kölcsönhatás a MYPT1 és a PRMT5 enzim között (9). A PRMT5 génexpresszióra kifejtett hatását, és ezen effektus MP általi befolyásoltságát már korábban ismertettem. Hepatocelluláris karcinómában leírták a MP/PRMT5/H4 protoonkogén tengely aktivitását, melyet a MP-t gátló hatású MYPT1 Thr853, és a PRMT5 enzimet aktiváló Thr80 oldalláncok foszforilációja mellett a H2A/4 szimmetrikus dimetilációjának megnövekedett szintje igazolt (9). A PRMT5 Thr80 oldalláncon történő foszforilációját így ROK és az MP együttesen, antagonisztikusan szabályozza (9). Mivel a MP és a PRMT5 sejtmagon belüli lokalizációja ismeretes, ám a ROK-t a magi frakción belül még nem írták le, felmerült a kérdés, hogy mi lehet az MP/PRMT5/hisztin jelátviteli útvonal felső sejtmagi szabályozója?

Kutatócsoportunk korábbi eredményei alapján már azonosításra került a MYPT1 fehérje sejtmagi interakciója, mely kölcsönható partner listából csak egy protein foszfatáz aktivitással rendelkező potenciális jelölt mutatkozott, mely a MP aktiválására a MYPT1 szabályozó alegység gátló hatású Thr foszforilációinak eltávolítása révén képes lehet. Ezen enzim a  $Mg^{2+}/Mn^{2+}$ -dependens foszfatáz 1 B (PPM1B) volt (10).

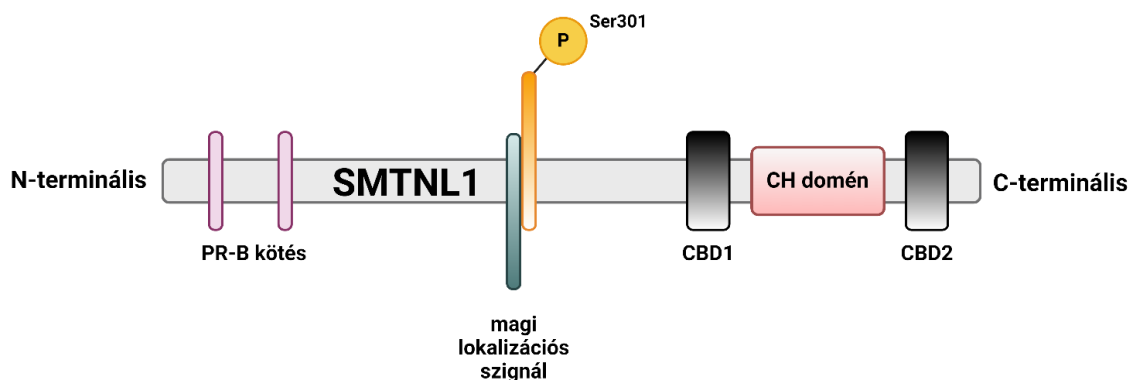
## **Az smoothelin-szerű fehérje 1 (SMTNL1)**

### **Az SMTNL1 fehérje szerkezete**

A smoothelin-szerű fehérje 1 (SMTNL1), melyet izolálásakor kalponin homológia asszociált sima izom fehérje (CHASM) néven írtak le, elsőként nyúl ileum simaizom rétegéből nyerték ki és azonosították, mint a PKG szubsztrátját (5). A fehérjét az izomfehérjék smoothelin (SMTN) családjába sorolták, amely család további két fehérjét tartalmaz: a smoothelin A (SMTN-A), illetve a smoothelin B (SMTN-B) fehérjéket. Ezeket azonos gén kódolja (101-103), míg az SMTNL1 egy külön gén terméke (104). Az SMTN fehérjecsalád tagjai expresszálódnak vizcerális és vaszkuláris simaizomban egyaránt (105),(106,107), IIA típusú vázizomrostokban (108), továbbá leírták az SMTNL1 fehérjét olyan szteroidhormon rezponzív szövetekben is, mint az endometriumban mind a myometriumban (6).

Az SMTNL1 fehérje szerkezeti homológiát mutat az SMTN család másik kettő tagjával az SMTN-A-val, illetve az SMTN-B-vel, mely homológia alapján a fehérjék C-terminálisuk közelében kettős típusú kalponin homológia (CH) domént tartalmaznak (**9. ábra**) (109),

melyalkalmassá teszi az azt hordozó simaizom fehérjét aktin filamentum kötésére (78). Habár az SMTNL1 CH domént tartalmaz, mégsem képes az aktin kötésére (5), viszont a CH domén révén tropomiozinhoz kapcsolódik, illetve a CH domén N-terminálisa közelében található apo-CaM kötőhely (CBD2 domén), mely tartalmaz egy IQ motívum-ot (IQxxxRGxxxR szekvencia) amely segítségével az SMTNL1 kalmodulinnal létesít kapcsolatot. Kalmodulin kötésére az SMTNL1 egy másik doménje révén, a Ca<sup>2+</sup>-CaM-kötő domén (CBD1) révén is képes (110). A két különböző kalmodulinkötő hely közötti különbséget az biztosítja, hogy még az IQ motívumban található CBD2-es a kalmodulin Ca<sup>2+</sup> független kötődését preferálja, addig a CBD1-es a Ca<sup>2+</sup>-kötött kalmodulinnal való kölcsönhatásáért felelős (104).



**9. ábra: A SMTNL1 szerkezete.** Az ábrán feltüntetett régiók: N-terminális, PR-B receptor kötő régió, magi lokalizációs szignál, Ser301-es foszforilációs hely, CBD1 domén, CH domén, CBD2 domén, C terminális. Az ábra a biorender.com felületén készült. CH: kalponin homológdomént, CBD1: Ca<sup>2+</sup>-függő kalmodulin-kötő domén, CBD2: Ca<sup>2+</sup>-független kalmodulin kötő domén PR-B: progeszteron receptor-B.

Jelenlegi ismereteink szerint az SMTNL1 fehérje csak a Ser301 oldalláncán történő foszforiláció által szabályozódik (5). A foszforilációs hely közelében, az N-terminális felé található a magi lokalizációs szekvencia, ami a foszforilációt követő konformációváltozás hatására válik felfedetté, így az SMTNL1 fehérje a sejtmagba transzlokálódik, ahol a progeszteron receptor-B (PR-B) ko-aktivátoraként számos gén expresszióját befolyásolja (5). A PR-B kötéséért felelős szekvenciák az SMTNL1 fehérje N-terminálisának közelében találhatóak. A fehérje C-terminálisa rendezetlen szerkezetű (104).

## Az SMTNL1 fehérje szerepe az vázizom adaptációban

SMTNL1 karakterizálása okán további kutatások indultak szerepének felderítésére a sima-és vázizom kontraktilitásában, mely tanulmányok eredményei alapján az SMTNL1 a vázizomzat plaszticitásának egyik fő szabályozó elemének ígérkezett (5). Az SMTNL1 fehérje

szerepét a vázizom adaptációra KO egér modellen vizsgálták, ahol génmódosított állatok vázizomzatának rostösszetétele változott vad típusú társaikhoz képest. Az állatok *musculus plantaris*-ből izolált izomrostok IIB típusú izomrostjainak száma csökkent, mivel az izomrostok a IIA izotípus felé tolódtak el KO egyedek esetén. Mind a IIA, mind a IIB izomrosttípusra anaerob glikolitikus anyagcsere jellemző, viszont a IIA lassabb kontrakciós idejű, magasabb oxidatív kapacitású, ám alacsonyabb erő kifejtésre képes a IIB izotípushoz képest, ami a legnagyobb erő kifejtésre képes, ám legfáradékonyabb rosttípus.

Továbbiakban egyaránt módosult SMTNL1 gén kiütése hatására az állatok reprodukzív fenotípusa és metabolizmusa is vad típusú egyedekéhez viszonyítva. A metabolizmus változása kifejezetten stressz határa (edzés, vemhesség) jelentkezett, a populáció génmódosított példányaiban. SMTNL1 KO hím egerek a fizikai terhelést kevesebb fáradással bírták, mint vad típusú társaik, nőstény populációban pedig a génmódosítás nem befolyásolta az állóképességet (108).

A szerkezeti leírásban már ismertetett Ser301 foszforilációs hely PKA vagy PKG általi foszforilációjának hatására az SMTNL1 a sejtmagba transzlokálódik, ahol a progeszteron receptor B (PR-B) ko-aktivátoraként számos gén kifejeződését szabályozza, többek között a MYPT1 expresszióját is (6). A MYPT1 fehérje génexpressziójának szabályozásának eredményeképp az SMTNL1 hatást gyakorol az erek simaizmának, illetve az méh myometriumának terhesség során bekövetkező adaptációjára (111), szteroid hormon rezponzív szövetekben ezen progeszteron-függő hatása érvényesül dominánsan (111).

Korábbi közlemények leírták továbbá, hogy az SMTNL1 fehérje a sejtek citoplazmatikus régiójában kapcsolatot alakít ki a MP holoenzim szabályozó alegységével, a MYPT1-el, melyet fehérje-fehérje interakció révén képes gátolni, ezzel is szerepet betöltve a sejtek kontraktilis funkcióinak lebonyolításában (4). Az SMTNL1 a MYPT1-el feltehetően a CH doménje segítségével lép fehérje-fehérje interakcióba, mivel azon mutáns SMTNL1 fehérje, aminek CH doménjét eltávolították a továbbiakban nem gátolta az MP aktivitását (112).

*In vitro* rágcsáló vázizom kísérletekben, hyperthyroid környezetben korábban már korábban lejegyzett IIB rosttípus irányú fenotípus váltás bekövetkezését az SMTNL1 fehérje sikeresen gátolta (113). Az SMTNL1 gén csendesítése együtt járt relaxáltabb izomtónus megjelenésével, melyet a MP enzim aktivitásának növekedése kísért (108). Mindezen előzetes irodalmi adatok magyarázzák az SMTNL1 fehérje váz-és simaizomrost adaptációban és kontraktilitásban betöltött moduláló szerepét.

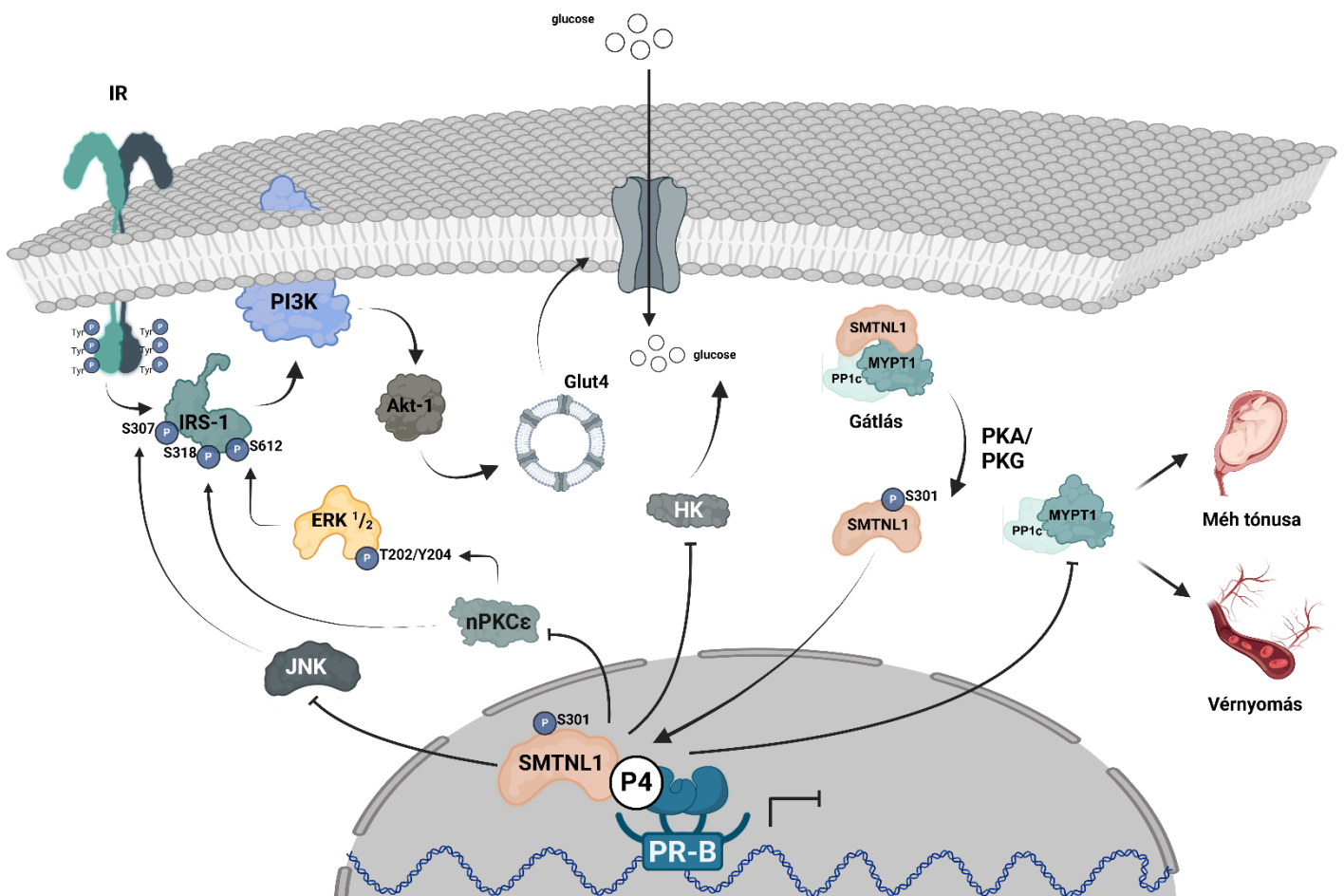
## **Az SMTNL1 szerepe a reprodukzív fitnessben és a glükóz homeosztázisban**

Az SMTNL1 KO egerek csökkent reprodukzív fitnesssel bírtak, mely megmutatkozott megemelkedett embrionális lethálitásban, csökkent alomméretben, illetve két terhesség közötti megnyúlt időintervallumban (6). Egérvizsgálatok SMTNL1 fehérje kifejeződésének emelkedését rögzítették vemhes, és pszeudo-vemhes egyedekben (6). Egérmoldellen vemhesség hatására megemelkedő MYPT1 expresszió drámaian kifejezetté vált SMTNL1 deléció esetén, mind vaszkuláris simaizomban, mind uterus myometriumban vizsgálva, ezzel molekuláris magyarázatot szolgáltatva a terhesség hatására ezen szervekben fellépő izomrelaxáció, és csökkent vérnyomás hátterére (114).

Mindezen felül a génmódosított állatok glükóztolerancia tesztje kimutatta, hogy az SMTNL1 deléció csökkentette az állatok glükóztoleranciáját, mely során éhezés után kapott bólus szénhidrátra hiperglicaemiás vércukorszintet produkáltak vad típusú társaikhoz képest (6). Az inzulin jelátviteli kaszkád elemeit vizsgálva a KO egerekben lecsökkent az inzulin receptor szubsztrát 1 (IRS-1), illetve a glükóz transzporter 4 (GLUT4) kifejeződése (114). C2C12 sejtmodellel vizsgálva fény derült az SMTNL1 fehérje inzulin jelátviteli kaszkádot szabályozó funkciójára, miszerint az SMTNL1 fehérje több szignalizációban kulcsszerepet betöltő fehérje posztranzlációs módosítását szabályozta indirekt módon, *in vitro* inzulin rezisztenciát modellező körülmények között.

Az inzulin által indukált kaszkád a sejtek homeosztázisában nélkülözhetetlen fontosságú útvonal, mely lehetővé teszi inzulin-függő szövetek számára a glükóz extracelluláris térből való felvételét. A jelátvitelt az inzulin receptorához, az inzulin receptorhoz (IR) való kötődése indítja be (115). Az IR tyrozin kinázokra jellemző módon, ligandum kötődésének hatására dimerizálódik, és Tyr oldalláncain autofoszforilálódik, ami lehetővé teszi a jel áttételét a kaszkád következő elemére az IRS-1-re, amely központi adapter fehérjékként működik a folyamatban. Az aktivált IRS-1 a kaszkád következő elemét, a foszfatidil-inozitol-3-kinázt (PI3K) aktiválja, mely működése során foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfátból (PIP2) foszfatidil-inozitol-3,4,5-triszfoszfátot (PIP3) állít elő. A PIP3 másodlagos hírvivőként funkcionál a folyamatban, intracelluláris koncentrációjának növekedése toborozza és aktiválja a protein kináz B-t (Akt-1), amely további célfehérjéket foszforilál, mely folyamat eredményeként GLUT4 tartalmú vezikulák dokkolása következik be a sejtmembránba. Így a sejtek képessé válnak glükóz felvételére az extracelluláris térből, illetve szabályozódik a vércukorszint is (116).

Az inzulinrezisztencia hatására az IRS-1 fehérjén túlsúlyra kerül a Ser foszforiláció (10. ábra), amely gátolja a jelátvitel továbbítását a kaszkád következő elemére, a PI3K-ra, mivel az IRS-1 megemelkedő Ser foszforilációja a kaszkád elemeinek disszociációját idézi elő. Ezen ismeretek alapján az IRS-1 Ser foszforilációja tipikus sejtszintű markere az inzulin rezisztenciának. Az *in vitro* inzulinrezisztens C2C12 modellen az SMTNL1 fehérje indirekt módon csökkentette a környezeti körülmények hatására megemelkedett IRS-1 Ser307, Ser318 és Ser612 oldalláncok foszforilációját. Az indirekt gátlás jellege progeszteron-függő módon jelentkezett, mely során az SMTNL1 gátolta az új típusú protein kináz C  $\epsilon$  (nPKC $\epsilon$ ), és JNK (117) és a kettős specificitású kináz 7 (DUSP7) kifejeződését egyaránt (113). A



**10. ábra: A SMTNL1 fehérje eddig ismert funkciói.** Az SMTNL1 fehérje közvetlenül szabályozza az inzulin jelátvitelt. A PR-B receptor ko-aktivátorakén csökkenti a nPKC $\epsilon$  és a JNK expresszióját, melynek következtében nő az ERK 1/2 aktivitása és az IRS-1 Ser foszforilációja, mely kiváltja az inzulin jelátviteli kaszkád disszociációját. Az SMTNL1 csökkenti a HK expresszióját, csökkentve a glikolitikus anyagcsereút hatékonyságát. Az SMTNL1 fehérje-fehérje interakció révén gátolja a MP-t, annak MYPT1 szabályozó alegységén keresztül, továbbá génexpressziós szinten is csökkenti a MYPT1 kifejeződését, ezáltal szabályozva a méh tónusát és a vérnyomást terhesség során. Az ábra a biorender.com felületén készült. **Akt-1:** Protein kináz B, **ERK 1/2:** Extracelluláris jel által szabályozott kináz, **GLUT4:** Glükóz transzporter 4-es típus, **IR:** inzulin receptor, **IRS-1:** Inzulin receptor-szubsztrát 1 **JNK:** c-Jun N-terminális kináz, **MYPT1:** miozin foszfatáz célzó alegység 1 **PI3K:** Foszfadilinozitol-3-kináz. **PP1c:** Protein foszfatáz 1 katalitikus alegység, **HK:** hexokináz, **nPKC $\epsilon$ :** új típusú protein kináz C  $\epsilon$  **SMTNL1:** Smoothelin-szerű fehérje 1

poszttranszlációs fehérjemódosítások progeszteron-függésére az SMTNL1 PR-B ko-aktivátor tulajdonsága adott magyarázatot (111). Továbbá az SMTNL1 a hexokináz (HK) expressziójára kifejtett thyroid hormon-független gátló hatásán keresztül csökkentette a hiperthyreozisban fellépő emelkedő metabolikus rátát *in vitro* kísérletekben (113).

## **A humán női reproduktív traktus uterusot érintő pathológiás elváltozásai és daganatai**

### **Az uterus szövettani szerkezete**

Az uterus falának szerkezete szövettanilag három különböző rétegre különül el, melyek mind stuktúrájukban, mind funkciójukban eltérnek egymástól. A méh legkülső, kismedence üregével érintkező rétege a perimetrium, mely infraperitoneális helyzetet foglal el. A peritoneum meshothel sejtrétege alatt a szövetet laza rostos kötőszövet építi fel, feladata az uterus mechanikai védelmének ellátása (118). A perimetrium alatt helyezkedik el a méh simaizomrétege, a myometrium, mely a benne futó simaizmok rostirányultsága alapján három réteget alkot, egy külső hosszanti, középső körkörös, és belső hosszanti réteget. A középső izomréteg a legvastagabb, melyben fellelhető az uterus szövetére jellemző, *arteria uterinából* kiágazó sűrű érhálózat, így számos szakirodalom *stratum vasculare*-ként is referál rá. A myometrium a méh kontraktilitását biztosítja, mely funkció kiemelkedően jelentős szereppel bír szülés során (119).

Az uterus legbelső rétege az endometrium, mely a méh üregét szegélyező belső nyálkahártya (120). Az endometrium mind strukturálisan, mind funkcionálisan változik a női nemi ciklussal való összefüggésben, valamint terhesség során integritásának adaptálódása a beágyazódás és a terhesség kiviselésének alapfeltétele, mélyrehatóbb tanulmányozására számos kutatás irányult (121). Az endometrium további sejtes rétegekre tagolható, melyek más és más szereppel bírnak a méh nyálkahártyájának fiziológiájában. A myometriumtól elhatároló *lamina basalis*on nyugszik a *stratum basale* sejteinek rétege, melyek progenitor sejtekből áll. Ezen sejtek osztódás révén képesek regenerálni a menstruációs ciklus során leváló *stratum functionale* sejtek rétegét. A *stratum functionale* egyszerű csöves mirigyeket tartalmaz, melyeket luemnét egy sejt rétegben szegélyezik a felszínről betérjedő epitheliális sejtek (122). A réteg továbbá számos spirális artériát tartalmaz, melyek hossza és strukturáltsága szinkron változik a női nemi ciklusban termelődő szteroid hormonok (progeszteron és ösztrogén) hatására (123). Ezen hormonok nem csak a spirális artériákra fejtenek ki domináns hatást, hanem szabályozzák a *stratum functionalis* differenciációját is. Az endometrium *stratum*

*functionalisa* leválik a menstruációs vérzés során, és fiziológiás, zavartalan differenciációja szükséges ám nem elégséges feltétele embrió beágyazódásának (124).

Az endometrium legapikálisabb sejtrétege az endometriális epithelium, melyet egyrétegű hengerhám alkot, mely sejteken szteroid hormon dependens módon csillók jelennek meg. Az epitheliális sejtek rétege az első érintkezési front a beágyazódó embrió trophoblast sejtrétege és az anyai méh között, ezért ezen sejtek funkcionális integritása kritikus a fiziológiás fertilitási funkciók betöltéséhez, melyhez elengedhetetlen a női nemi ciklus során felszabaduló szteroid hormonok által vezényelt változások sorrendbeli lezajlása (125).

## **A női nemi ciklus**

A női nemi ciklus menstruációs ciklus kb. 28 napból áll, melyen belül három, egymással szoros összefüggésben lévő fázist különböztethetünk meg: a folliculáris-fázist, az ovulációt és a luteális-fázist (126). A ciklus számolása mindig a menstruáció első napjától indul, amit a potenciálisan legalacsonyabb szintű progeszteron-és ösztrogénszint jellemez, így téve lehetővé a menstruációs vérzés bekövetkeztét. A lecsökkent progeszteron-és ösztrogénszint továbbá felszabadítja a negatív feedback gátlása alól az adenohypophysis gonadotrop sejtjeit, melyek elsőként folliculus stimuláló hormont (FSH) ürítenek a keringésbe, beindítva a folliculáris fázist. Az agyalapi mirigy FSH hormonának hatására az ovariumban ciklusonként kb. 10-15 primer tüsző választódik ki, és indul fejlődésnek, viszont általában csak egy domináns tüsző (Graaf-tüsző) végzi be a meiosis I-et. A fejlődő tüszőket kezdetben egy réteg folliculáris laphámsejt borítja, melyek FSH hatására granulosa sejtekké differenciálódnak, melyek már köbös megjelenésűek, és ösztrogén termelésére képesek. Az ovariumból felszabaduló ösztrogén az endometrium str. basale rétegének proliferációjának indukcióját váltja ki, melynek következtében regenerálódni kezd a stratum functionale. Az endometrium ütemesen megvastagszik, mirigyei megnagyobbodnak, de még nem szekretálnak. A megemelkedő ösztrogénszint továbbá gátolja az agyalapi mirigy FSH felszabadítását negatív feedback által, ami így indukálja az luteinizáló hormon (LH) elválasztást, mely dinamikusan növekedve kiváltja az LH-csúcsot (127).

Az LH csúcs következményeként a ciklus kb. 14. napján bekövetkezik az ovuláció. Az LH csúcs kiváltja a domináns tüsző megrepedését, és a petesejt kiszabadul az ovariumból, ovuláció pillanatában a petesejt osztódása a második meiotikus szakaszban van, és a sejtosztódás sikeres megtermékenyítés nélkül sosem fejeződik be. A kiszakadt Graaf-tüsző először bevérzik a környező sztrómális szövetből, majd vérzés szervülése révén *corpus luteum*má (sárgatestté) alakul. A *corpus luteum* LH hatására progeszteront termel (2). A

progeszteron egyrészt negatív feedback mechanizmus révén gátolja az agyalapi mirigy LH termelését, másrészt az endometrium luteális fázisát indítja be, mely során a *stratum functionale* mirigyei szekréciós aktivitását mutatnak, a sejtek differenciáción mennek keresztül, bennük nagy mennyiségű glikogén raktározódik, melyet az egyszerű csöves mirigyek lumenébe ürítenek. Ezen funkcionális és morfológiai változások az esetleges megtermékenyítés esetén bekövetkező beágyazódás, és az embrió táplálása miatt nélkülözhetetlenek (128).

Amennyiben megtermékenyítés nem következik be, a corpus luteum által termelt progeszteron legátolja az LH termelését, LH hiányában pedig a sárgatest sorvadni kezd, és visszafejlődik *corpus albicans*-szá. A rohamosan csökkenő progeszteron- és ösztrogénszint miatt a spirális artériák kontrakciója, majd dilatációja következik be, ami szöveti ischémiához és vérzéshez vezet, ami beindítja a menstruációt, és újraindítja a nemi ciklust az LH és FSH szintjének megnövekedésével (129).

### **Az endometrium funkcionális eltérései**

Az endometrium funkcionális eltérései számos patológiás állapothoz vezethetnek, amelyek befolyásolják mind a menstruációs ciklust, mind az általános reprodukív fitnesszt.

Az endometrium funkcionális integritásának felborulása együtt járhat amenorrhoea bekövetkeztével, mely a menstruáció hiánya, amely kialakulása lehet primer vagy szekunder eredetű (130). Primer amenorrhoea akkor beszélünk, ha a menstruáció 16 éves korig nem következik be (131), a szekunder amenorrhoeáról fertilis életkor során, korábban normális ciklus esetén bekövetkező menstruáció elmaradása esetén beszélünk, ami legalább 3 hónapos intervallumig fennáll. Okai között említhető fiziológias tényezők (mint pl.: terhesség, szoptatás, menopauza), és patológiás eltérések is (132). Patológiás okok között felsorolható a: policisztás ovárium szindróma (PCOS), hypothalamicus diszfunkció, illetve kiemelt jelentőségű, és nagy terápiás kihívást jelentő vonatkozás a pajzsmirigyhormon termelésének rendellenességei talaján kialakuló menstruációs zavar, és az agyalapi mirigy prolaktin termelő adenomája (133).

A dysmenorrhoea a fájdalmas menstruációt jelenti, amelynek eredete szintén lehet primer vagy szekunder (134). A primer dysmenorrhoea oka funkcionális eredetű, ám kóros strukturális eltérések nem kísérik. Hátterében a méh fokozott prosztaglészin termelése (különösen PGF2 $\alpha$ ) állhat (135). A szekunder dysmenorrhoea esetén a menstruáció során jelentkező túltott fájdalmat kóros strukturális elváltozások okozzák, mely alapulhat fennálló

endometriosison, adenomyosison, mely az endometrium mirigyeinek invázióját jelenti a myometrium szöveti rétegébe (136) (137).

Az endometriososis az endometrium vagy az ahhoz hasonló szövetek ektopikus jelenléte az uterus üregén kívül (138). Ezek a szövetek hormonálisan aktívak, és követik a menstruációs ciklus során bekövetkező funkcionális változásokat. A betegség kialakulására több teória is létezik, melyek szerint az endometriosiszt okozhatja retrográd menstruáció (139), metaplasia, mely során a coeloma-epithelium alakul át endometrialis szövétté, ekkor az ektópiás méhnyálkahártyát az ovarium felszínén lokalizálják (140) (141). Az endometriososis tünetei között említendő a dysmenorrhoea, a dyspareunia (fájdalmas közösülés), ciklussal összefüggést nem mutató krónikus kismencedei fájdalom, és az infertilitás, mely esetén az endometriális szövetek gyulladása és hegesedése akadályozhatja a petesejt szabad mozgását (142)

A policisztás ovárium szindróma (PCOS), bár eredete az ovarium diszfunkcionalitása, mégis sokrétűen érinti az endometrium működését, mely hormonális egyensúlyzavarba torkollik (143). A legfontosabb következmények között említendő az anovuláció, mely következményében nincs sárgatestképződés, és így progeszteronhiány lép fel, mely következtében az endometrium nem kerül szekréción fázisba, ami tartós ösztrogénhatás alá helyezi az méhnyálkahártyát (144). Az emelkedett ösztrogénszint folyamatos proliferációt eredményez az endometriumban, ami endometriális hiperpláziához és akár endometriális karcinóma kialakulásához is vezethet (145). Mivel az endometrium belépése a szekréción fázisba progeszteron hiányában gátolt, ezért felkészülése az esetleges megtermékenyítésre hibát szenved, ami talaja lehet meddőség kialakulásának (146). A PCOS-t gyakorta kíséri továbbá az endometrium gyulladós állapota, mely eltolja a beteg citokinprofilját, illetve alapjául szolgál inzulinrezisztencia kialakulásához, amely tovább gerjeszti, és tartósan fenntartja a gyulladást. Az inzulinrezisztencia, amely gyakori társbetegsége a PCOS-nek, nem csak szisztémás hatást gyakorol, de kifejezett az a női reproduktív rendszerre kifejtett effektusa is (3). A hyperinzulinizmus az ovarium ésrogéntermelést stimulálja, illetve a magas vércukorszinten keresztül hozzájárul a PCOS esetén endometriumban fennálló atrófiás szövettani kép kifejlődéséhez, továbbá az endometrium gyulladását és metabolikus diszfunkcióját is fenntarthatja. A PCOS klinikai tünetei között említendőek a rendellenes méhvérvzés, az infertilitás és az endometriális carcinogenesis fokozott rizikója (147).

## Az uterus daganatos elváltozásai

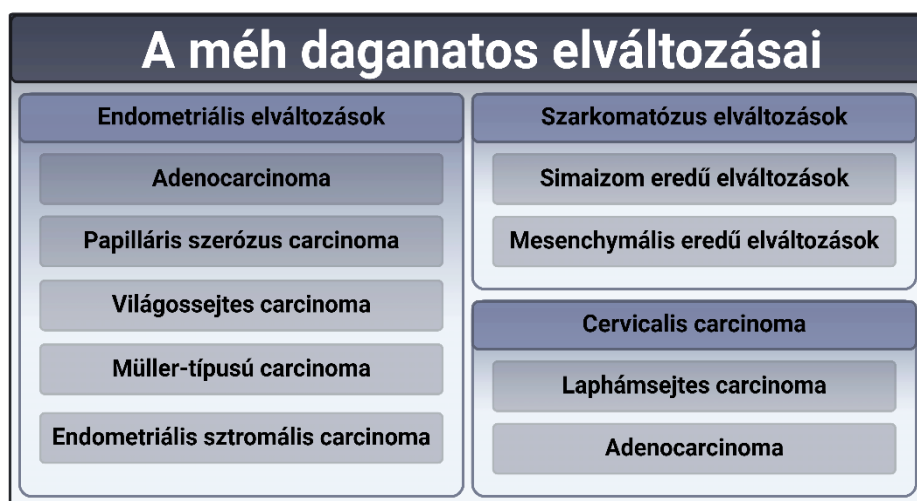
A női reproduktív traktus daganatos elváltozásai közül az uterust érintő rosszindulatú tumorok kiemelt jelentőséggel bírnak, mivel a méhből kiinduló carcinomák prevalenciája és incidenciája világszerte vezető helyet ér el a nőket érintő rákos megbetegedések között. Ezen daganatok szövettani típusai és klinikai viselkedésük sokrétűek és eltérőek, ami különböző diagnosztikai, illetve kezelési megközelítést indokol (1).

Az uterus daganatai két fő csoportba sorolhatóak: endometriális karcinómákra és uterus szarkómákra (**1. táblázat**). Ezen felül, ám feltétlenül megemlítendő alcsoport a méh nyaki szakaszából kiinduló cervix karcinóma, mely populációban mért előfordulási aránya miatt jelentős figyelmet kap, mint a nők körében kialakuló egyik leggyakoribb daganattípus.

Az endometriális karcinómák a méh belső nyálkahártyából, azaz az endometriumból kiinduló daganattípusok (12), melyek a méh daganatai közül az egyik leggyakoribb típust képviselik. Jellemzően posztmenopauzális korba lépő nőknél jelennek meg, kialakulásuknak kedvez a változó korrall bekövetkező hormonális diszbalansz, különösen az ösztrogén túlsúlya, mely jelentős szerepet játszik a betegség kifejlődésében.

Az endometriális karcinómák hisztológiai eredetük alapján több altípusba sorolhatóak (12), amelyek különböző klinikai viselkedést mutatnak. A mirigyes megjelenést mutató endometriális adenokarcinómák az endometriális karcinómák több mint 80%-át teszik ki, korai stádiumban való felismerése esetén jó prognózisú betegség, kialakulása gyakran ösztrogénfüggő. Az endometriális karcinómák további szövettani altípusa a papilláris szerozus

*1.táblázat: A méh daganatainak csoportosítása. A méh daganatai feloszthatók endometriális, szarkomatózus és cervicalis szövettani eredet szerint, mely főcsoportokon belül több alcsoportot lehet elkülöníteni. A táblázat a biorender.com felületén készült.*



karcinóma, mely ritkább megjelenésű, ám agresszívabb lefolyású, és atipikus kezdeti tüneti miatt gyakran előrehaladott stádiumban kerül diagnosztizálásra (148). Elmondható továbbá ezen altípusú malignus elváltozásról miszerint kialakulása nem hormonfüggő, és gyors hajlamot mutat metasztázis képzésére.

A világos sejtes karcinóma szintén ritka típusú, endometrium primer szövetből származó, magas malignitású daganat, amely kedvezőtlen prognózist mutat. A Müller-típusú carcinosarcomák kevert szöveti eredetűek, mind epitheliális, mind mesenchimális komponensekkel rendelkeznek. Ezek a daganatok rendkívül agresszívek, és rossz prognosztikus faktorúak (149).

A méh nyálkahártyájának epitheliumán túl foglalkoznunk kell az endometrium kötőszövetes sejtjeiből származó daganatokkal, a sztromális karcinómákkal is. Az endometrialis sztromalis karcinómák igen ritka típusú daganatok, növekedésük lassabb, és a prognózisuk is kedvezőbb lehet, ha a daganat korán felismerésre kerül.

A méh izomszövetéből kiinduló daganatos elváltozásokat, mint uterus szarkómaként definiálják. Eredő szövetük lehet a méh simaizomrétege (mint pl.: leiomyosarcoma) vagy kötőszövetes állománya (mint pl.: sztromális szarkómák) (150). Előfordulási arányuk ritkább, mint az endometriális karcinómáké, de gyakran agresszívebb lefolyásúak. Az uterus szarkómák nagyobb hajlamot mutatnak az áttétképzésre és gyors növekedésre. A leiomyosarcomák a méh simaizomszövetéből erednek, és rendkívül gyorsan, akár extrém méretűvé fejlődhetnek, ám jó tulajdonságuk, hogy méretük ellenére sebészi kimetszéssel jól kezelhető daganatok (151).

A cervix karcinóma, közismertebb néven a méhnyakrák, a méhnyak hámsejtjeiből kiinduló rosszindulatú daganat (152). A humán papillomavírus (HPV) 18 és 16-os törzsei általi fertőzés a méhnyakrák kialakulásának egyik legfontosabb kockázati tényezői. Az elváltozás megjelenési formái között megkülönböztetünk laphámsejtes karcinómát és adenocarcinómát (153).

A laphámsejtes karcinóma a leggyakrabban előforduló méhnyakrák típus, amely a méhnyak külső rétegéből (ectocervix) indul ki. A HPV fertőzés következményeként alakul ki, és jellemzően hosszú ideig tünetmentes maradhat, évente javasolt méhnyakrák szűréssel azonban az elváltozás korai stádiumában felismerhető. A cervix adenokarcinóma ritkább típus, amely a méhnyak belső rétegében (endocervix) lokalizált hámsejtekből alakul ki. Ezen elváltozás is összefüggésbe hozható a HPV fertőzéssel, de a betegség más típusú klinikai lefolyást mutat, mint a laphámsejtes társa (153). A cervix karcinóma prognózisa jelentősen javult a rendszeres HPV szűrés és a vakcináció bevezetésével, amely lehetővé tette a betegség korai stádiumban való felismerését és

## **Lehetséges molekuláris mechanizmusok az uterus pathológiás elváltozásai és daganati kialakulásának hátterében**

Az endometrium funkcionális eltérései szorosan összefüggnek a sejtek citoskeletális elemeinek szabályozásával, melyek befolyásolják a sejtadhéziót, a sej-sejt kommunikációt és a migrációt is. Mivel számos endometriomot érintő funkcionális zavar torkollik magas incidenciával és fertilitási zavarokkal járó kórképekbe, mint pl.: PCOS és endometriosis. Indokolt az endometrium irányában olyan kutatómunkák szervezése, melyek pontosabban feltárják a sejtek citoskeletális elemeinek szabályozását befolyásoló mechanizmusokat, fókuszba állítva azok szteroid hormon-függőségét és meghibásodását. A MP, mind az aktomiozin ciklus fő szabályozója potenciális jelöltnek ígérkezik egy feltáró vizsgálat alanyaként. Továbbá a MYPT1 SMTNL1 általi gátlása (4), illetve előzetes tanulmányok eredményei, melyek leírták az SMTNL1-t a progeszteron receptor ko-aktivátoraként, mely képessége révén negatívan szabályozta a MYPT1 génkifejeződését a méh simaizom rétegeiben (114) szintén új perspektívát és igényt nyitnak az MP endometriális sejtek tekintetében való bővebb feltérképezésére.

A tumorgenezis folyamatában a foszfatázok és kinázok által szabályozott fehérje foszforiláció egyensúlyának szerepére már számos kutatás irányult. Egyik jelentős, alaposan tanulmányozott jelátviteli útvonal, mely hozzájárul számos sejtípus onkogeneziséhez a ROK/MP tengely. A RhoA aktivált jelátviteli útvonal ROK-inhibitorok által történő gátlása hátráltatja a vaszkuláris endotheliális növekedési faktor (VEGF) által indukált angiogenezist, illetve endotélsejtek kapilláris hálózatokká való szerveződését (154). Más tanulmány rámutatott a citoskeletális stresszrostok és fókális adhézciók kialakulását kísérő MYPT1 foszforiláció növekedésére és az MP enzimaktivitásának csökkenésére, mint kísérőjelenségre (155,156).

Bár az előzetes irodalmi adatok az MP-t úgy jellemezték, mint a ROK által szabályozott elemet, egyre több eredmény utal arra, hogy az MP önálló tumorszuppresszor entitásként is megállja a helyét. Az előzőekben már bővebben tárgyaltam a MYPT1 expressziójának csökkenését és gátló foszforilációjának emelkedését, melyek összefüggést mutattak mutációk megjelenésével és daganatok kialakulásával. Viszont az uterus pathológiás elváltozásainak és daganatnak kialakulása okán újra kiemelő, hogy a MYPT1 túl-foszforilációja és expressziójának csökkenése változatos eredetű humán daganatok esetében is leírásra került (157).

Az MP tumorszuppresszív funkcióján túl megemlítendő a PP1c szerepe is a daganatok kialakulásának hátterében. Korábbi tanulmányok beszámoltak a PPP1R14B fehérjekódoló

génről, melynek terméke képes gátolni a PP1c-t. A PPP1R14B expressziós profilját több uterinális daganatból elemezve a PPP1R14B expressziója emelkedett tumoros szövetekben, kontroll párjukhoz viszonyítva. A PP1c inhibitor expressziója szoros összefüggést mutatott a daganat progressziójával, a deprimált túlélési aránnyal, és a lecsökkent progressziómentes intervallummal (12).

Mindezen előzetes irodalmi adatok támogatják a MYPT1 és a MP szerepének alaposabb feltárását az uterus pathológiás elváltozásai és daganati kialakulásának hátterében.

# Célkitűzések

A méh szöveteinek fiziológias homeosztázisának felborulása számos patológiás állapot kialakulására prediszponál, illetve alapja lehet daganatos betegségek kifejlődésének is. Az endometrium egészséges differenciációja és női nemi ciklus során megfelelően szabályozott proliferációja szempontjából az SMNTL1 fehérje kulcsszerepet tölt be, mint szteroidhormon receptor ko-aktivátor, továbbá számottevően befolyásolja az inzulin jelátviteli kaskád sikerességét is. Mindezen túl az SMTNL1 fehérje kiemelt szabályozó szereppel bír fehérje-fehérje kölcsönhatás révén a MYPT1 fehérjére, melynek aktivitása a cervixalis karcinómák kialakulása során a csökkent kifejeződést mutató PPM1B által szabályozott, így kísérletes munkánk célkitűzései az alábbiak voltak:

1) A PPM1B fehérje szerepének igazolása és mélyebb feltárása a MP/PRMT5/H4 protoonkogén tengelyen:

- PPM1B és MYPT1 fehérje fizikai és fiziológiai kölcsönhatásnak igazolása, illetve enzimaktivitást vizsgáló *in vitro* foszfatáz kombinált kináz esszék segítségével, HeLa és tsA201 sejtek felhasználásával
- A PPM1B gátlás hatásának vizsgálata a MP/PRMT5/H4 protoonkogén tengelyre HeLa sejtek magi és citoplazmatikus frakcióiban
- A PPM1B fehérje transzfekció hatásának vizsgálata a MP/PRMT5/H4 protoonkogén jelátviteli pálya elemeire HeLa sejteken.
- A PPM1B fehérje kapcsolata a MP/PRMT5/H4 protoonkogén tengellyel emberi cervixalis karcinómából származó tumoros és kontroll szöveti biopsziák lizátumainak vizsgálatával

2) Az SMTNL1 transzfekció hatásának vizsgálata humán endometriális adenocarcinómából származó Ishikawa sejtek inzulin jelátviteli útvonalára és differenciációjára,

- Ishikawa sejtek differenciációjának vizsgálata *in vitro* terhes és gesztációs diabétesz modellben
- Ishikawa sejtek migrációjának vizsgálata *in vitro* terhes és gesztációs diabétesz modellben
- Ishikawa sejtek inzulin jelátviteli útvonalának vizsgálata *in vitro* terhes és gesztációs diabétesz modellben
- Ishikawa sejtek glikogénraktározására és glükóz felvételének vizsgálata *in vitro* terhes és gesztációs diabétesz modellben

# Anyagok és módszerek

## Vegyszerek

A kísérletek során használt vegyszereket a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) cégtől vásároltuk. Eltérő esetben a forgalmazó cég nevét zárójelben jeleztük.

## Antitestek

A Western blot során felhasznált antitestek listáját az **2. táblázatban** összesítettük.

*2.táblázat: A Western Blot analízis során felhasznált antitestek listája*

Antitestek				
Antitest neve	Gyártó	Kat. szám	Típus	Hígítás
MYPT1	BD Transduction Laboratories (New York, USA)	612165	Egér, Monoklonális antitest	1:500
Phospho-MYPT1 (Thr696)	Merck-Millipore (Darmstadt, Germany)	ABS45	Nyúl, Monoklonális antitest	1:500
Phospho-MYPT1 (Thr853)	Merck-Millipore (Darmstadt, Germany)	36-003	Nyúl, Monoklonális antitest	1:500
PRMT5	Merck-Millipore (Darmstadt, Germany)	07-405	Nyúl, Monoklonális antitest	1:1000
Phospho-PRMT5 (Thr80)	Abmart Inc	Sipos et al.	Nyúl, Monoklonális antitest	1:500
GAPDH	Sigma-Aldrich (Missouri, USA)	sc-47724	Egér, Monoklonális antitest	1:5000
PPM1B	Abnova	H00005495-B01P	Egér, Monoklonális antitest	1:350
Flag	Sigma-Aldrich (Missouri, USA)	F742	Nyúl, Monoklonális antitest	1:1000
H4	Cell Signalling Technology (Massachusetts, USA)	L64C1	Egér, Monoklonális antitest	1:1000
Dimethyl-H4	Merck-Millipore (Darmstadt, Germany)	07-947	Nyúl, Monoklonális antitest	1:500
β-aktin	Santa Cruz Biotechnology	sc-47778	HRP-konjugált	1:20000
Lamin A/C	Santa Cruz Biotechnology	sc-7293	Nyúl, Monoklonális antitest	1:1000
α-tubulin	Santa Cruz Biotechnology	sc-53646	Egér, Monoklonális antitest	1:1000
PP1β	Santa Cruz Biotechnology	sc-365678	Egér, Monoklonális antitest	1:1000
pRb	Santa Cruz Biotechnology	sc-102	Egér, Monoklonális antitest	1:1000
IRS-1	Cell Signalling Technology (Massachusetts, USA)	2390	Nyúl, Monoklonális antitest	1:1000
Phospho-IRS-1 (Ser612)	Cell Signalling Technology (Massachusetts, USA)	3193	Nyúl, Monoklonális antitest	1:1000
Akt-1	Cell Signalling Technology (Massachusetts, USA)	2938	Nyúl, Monoklonális antitest	1:1000
Phospho-Akt-1 (Ser473)	Cell Signalling Technology (Massachusetts, USA)	3787	Nyúl, Monoklonális antitest	1:1000
Flag	Sigma-Aldrich (Missouri, USA)	F3165	Nyúl, Monoklonális antitest	1:1000
GAPDH	Sigma-Aldrich (Missouri, USA)	sc-47724	Egér Monoklonális antitest	1:5000
JNK	Cell Signalling Technology (Massachusetts, USA)	9252S	Nyúl, Monoklonális antitest	1:1000
Phospho-JNK(Thr138)	Cell Signalling Technology (Massachusetts, USA)	81E11	Nyúl, Monoklonális antitest	1:500
ERK1/2	Cell Signalling Technology (Massachusetts, USA)	4695S	Nyúl, Monoklonális antitest	1:1000
Phospho-ERK1/2 (Thr202)	Cell Signalling Technology (Massachusetts, USA)	98168S	Nyúl, Monoklonális antitest	1:500
MYPT-1	BD Transduction Laboratories (New York, USA)	612165	Egér Monoklonális antitest	1:500
Phospho-MYPT-1 (Thr696)	Merck-Millipore (Darmstadt, Germany)	ABS45	Nyúl, Monoklonális antitest	1:500
MLC20	Cell Signalling Technology (Massachusetts, USA)	3672S	Nyúl, Monoklonális antitest	1:500
Phospho-MLC20 (Ser18)	Cell Signalling Technology (Massachusetts, USA)	3674S	Nyúl, Monoklonális antitest	1:500
PP2A	BD Transduction Laboratories (New York, USA)	610555	Egér, Monoklonális antitest	1:1000
nPKCε Antibody	Sigma-Aldrich (Missouri, USA)	sc-214	Egér Monoklonális antitest	1:1000
DUSP9	Cell Signalling Technology (Massachusetts, USA)	59277	Nyúl, Monoklonális antitest	1:500
anti-mouse IgG	Cell Signalling Technology	#7076		1:5000
anti-rabbit IgG	Sigma-Aldrich	A0545		1:5000

## **Sejttenyésztés Ishikawa sejtek esetén**

Az endometriális adenocarcinomából immortalizált Ishikawa sejtvonalat (ECACC, #99040201) korábbi irodalmi forrásokban gyakran alkalmazták endometriális epithelium modellezésére (158-160). Az Ishikawa sejtek tenyésztő médiuma az alábbi komponensekből állt: fenolvöröst tartalmazó Dulbecco's Modified Eagle's Medium-ot (DMEM), mely 1000 mg/L glükózt tartalmazott, kiegészítettünk 5% foetális borjú szérummal (FBS), továbbá 2 mM koncentrációjú L-glutaminnal (Lonza), és 1% nem-esszenciális aminosavakkal (NEAA). A sejteket T75-ös flaskában tenyésztettük, 5% CO<sub>2</sub> szint mellett, 37°C-ra temperált inkubátorban. A sejteket hetente háromszor, 90%-os konfluencia elérése esetén passzáltuk. A sejtvonal mycoplasma fertőzésre teszteltük, mely vizsgálat hitelességét a gyártó validálta és dokumentálta.

## **Sejttenyésztés HeLa sejtek esetén**

A humán cervix carcinomából izolált HeLa sejtvonal (ECACC, #93021013) a világon elsőként immortalizált humán sejtvonal, mely izolálása óta széles körben alkalmazott *in vitro* kísérletekben. A HeLa sejteket fenolvöröst tartalmazó, 1000 mg/L glükóz koncentrációjú DMEM tenyésztettük, melyet kiegészítettünk 10% FBS-sel, továbbá 2 mM koncentrációjú L-glutaminnal (Lonza). A sejteket T75-ös flaskában tenyésztettük, 5%-os CO<sub>2</sub> szint mellett, 37°C-ra temperált inkubátorban. A sejteket hetente háromszor, 90%-os konfluencia elérése esetén passzáltuk. A sejtvonalak mycoplasma fertőzésre tesztjét a gyártó végezte és validálta.

## **Sejttenyésztés tsA201 sejtek esetén**

Az SV40 által transzformált humán embrionális vesesejteket (tsA201) (amelyeket az ECACC-tól vásároltunk, katalógusszám: 85120602) a gyártó utasításainak megfelelően tartottuk fenn. A tenyésztőközeg fenolvöröst tartalmazó, 1000 mg/L glükóz koncentrációjú DMEM volt, melyet 10% FBS-sel és 2 mM L-glutaminnal egészítettünk ki, és a továbbiakban komplett tenyésztő médiumként utalok rá. A sejteket 37°C-on, párásított, 5% CO<sub>2</sub>-t tartalmazó térben inkubáltuk. A sejtvonalakat mycoplasma fertőzésre teszteltük. A sejtek hitelességét a gyártó validálta és dokumentálta. A sejteket T75-ös flaskában tenyésztettük, hetente háromszor, 90%-os konfluencia elérése esetén passzáltuk.

## **Ishikawa sejtek tranziens transzfekciója rekombináns SMTNL1 fehérjével**

Az endometriális epitheliális sejt kultúra tranziens transzfekcióját GeneJuice transzfekciós reagenssel végeztük el, adharens sejtpopuláción, a gyártó utasításai szerint, az alábbi módosításokkal. Az Ishikawa sejteket 6-lyukú lemezre szélesztettük  $4 \times 10^5$  sejtszámban, a transzfekciót akkor végeztük, mikor a sejtek konfluenciája elérte a 70%-ot. A transzfekció elvégzéséhez három csoportot hoztunk létre, kezeletlen kontroll csoportot, üres plazmida kezelet, transzfekciós kontrollként használt MOCK csoportot, illetve a Flag-jelölt rekombináns SMTNL1 fehérjét overexpresszáló FT-SMTNL1 csoportot. Kísérletünk során a teljes hosszúságú, Flag-jelölt rekombináns SMTNL1 fehérjét kódoló vektort (pM13-NT-FT-SMTNL1: M13 vektorba inzertált, N terminálisán Flag jelölőt tartalmazó rekombináns SMTNL1 szekvencia) illetve a pEZ-M13 üres vektort (GeneCopoeia Rockville, USA) 2,5 ng/μl koncentrációban alkalmaztuk a 6-lyukú lemez egy-egy lyukában, 1500 μl végtérfogatra számolva, melyet fenolvöröst nem tartalmazó komplett tenyésztő médium felvéve adtuk a sejtekhez. A sejtek 72 órán keresztül inkubáltuk, médiumcsere ezen idő alatt nem történt. A transzfekció sikerességét a Flag jelölő elleni antitesttel, Western blot analízissel, illetve immunfluoreszcens festéssel (ld. alább) ellenőriztük.

## **HeLa és tsA201 sejtek tranziens transzfekciója rekombináns PPM1B és MYPT1 fehérjével**

A PPM1B transzfekciója HeLa és tsA201 sejt kultúrák esetében humán pRec-M11-FT-PPM1B vektorral történt (M11 vektorba inzertált, N terminálisán Flag jelölőt tartalmazó rekombináns PPM1B szekvencia, mellyel történt transzfekcióra a továbbiakban FT-PPM1B-ként referálunk) (GeneCopoeia Rockville, USA). A vektort 1,7 ng/ml koncentrációban, 1500 μl végtérfogatban alkalmaztuk, Gene Juice transzfekciós reagenst felhasználva, a gyártó utasításai szerint, az alábbi eltérésekkel. A HeLa és tsA201 sejt kultúrákat 6-lyukú lemezre szélesztettük, 40000 sejt/lyuk számban. A szélesztés másnapjára a sejt kultúra kb. 70% konfluenciát ért el, ezen az adharens sejt kultúrán történt a transzfekció, kontrollként kezeletlen csoportot, továbbá üres pEZ-M13 (üres vektor, GeneCopoeia Rockville, USA) által kezelt, transzfekciós MOCK kontroll csoportot is létrehozunk az FT-PPM1B csoport mellett. A MOCK csoport és az FT-PPM1B csoport vektor koncentrációja megegyezett, azaz 1,7 ng/μl koncentrációban alkalmaztuk 1500 μl végtérfogatra számolva, esetenként 4 μl Gene Juice transzfekciós reagenssel kiegészítve. A végtérfogat elérése szérumot tartalmazó komplett tenyésztő médium alkalmazásával történt. A HeLa és tsA201 sejtek MYPT1 fehérje

transzfekciója szintén kezeletlen kontroll, és MOCK kontroll csoport létrehozása mellett történt  $1,09 \times 10^{-3}$   $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  koncentrációjú humán pRec-M11-FT-MYPT1 (M11 vektorba inzertált, N terminálisán Flag jelölőt tartalmazó rekombináns MYPT1 szekvencia, mellyel történt transzfekcióra a továbbiakban FT-MYPT1-ként referálunk) plazmid felhasználásával, 1500  $\mu\text{l}$  végtérfogatban alkalmazva. A sejteket transzfekció után még további 72 óráig tenyésztettük.

### **Ishikawa sejtek *in vitro* terhesség (P4) és gesztációs diabétesz (GDB) modellje**

Az Ishikawa sejtek transzfekcióját követő napon a sejtek mostuk 1x foszfáttal pufferelt sóoldattal (PBS: pH 7,2; 2,7 mmol/L KCl, 1,5 mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 136,9 mmol/L NaCl, 8,9 mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ ), és médiumukat cseréltük az alábbiak szerint. Az *in vitro* terhesség modell (továbbiakban P4-ként referálunk rá) a 1000 mg/L glükóz koncentrációjú, fenolvöröst nem tartalmazó DMEM kiegészítésre került 5% FBS-sel, továbbá 2 mM koncentrációjú L-glutaminnal és 1% NEAA-val, amit tovább pótolunk 1  $\mu\text{M}$  medroxi-progeszteron-acetáttal (MPA), 10 nM 17- $\beta$ -ösztadiollal (OD), illetve 0,5 mM 8-Br-cAMP-vel, annak érdekében, hogy a terhesség során természetesen előforduló hormonokat reprezentáljuk. A P4 modell összeállításának végére a glükózkoncentráció 5,11 mM-osra hígult. A gesztacionális diabétesz modellben (továbbiakban: GDB), a P4 modellben tartott sejtek médiumához képest további 100 nM inzulin a médiumhoz, mely eredetileg 4.5 g/l glükózt tartalmazott. A GDB modell összeállításának végére a glükózkoncentráció 22,21 mM-osra hígult. A P4 és GDB modell glükózkoncentráció különbsége 17,1 mM. A sejteket feltárásig, összesen 72 óráig tenyésztettük az adott modell médiumában.

### **HeLa sejtek Sanguinarine kezelése és szubcelluláris frakcionálása**

A Sanguinarine (továbbiakban: SNG) PPM1 gátlószer kezelést megelőzően a HeLa sejtek DMEM 90% konfluencia eléréséig komplett tenyésztő médiumukban (1000 mg/L glükóz koncentrációjú DMEM, 10% FBS-sel, 2 mM koncentrációjú L-glutaminnal kiegészítve) tenyésztettük, majd a sejtek médiumát 1xPBS-sel való mosás után cseréltük szérummentes, fenolvöröst tartalmazó DMEM médiumra, melyet 0,1% FBS-sel pótolunk ki. A sejteket 24 óráig éhezettük a sejt kultúra sejt ciklusának szinkronizációja érdekében, majd 1  $\mu\text{M}$  SNG-t tartalmazó komplett tenyésztő médiummal való kezelés következett 1 órán keresztül, annak érdekében, hogy a PPM1B protein foszfatáz gátlás alá kerüljön. Amennyiben szubcelluláris frakcionálás nem történt, a sejteket a Ishikawa és HeLa sejtek feltárása szekcióban taglalt módon processzáltuk. A szubcelluláris frakcionálást a következőként végeztük. A kezelés leteltével a kultúrát saját médiumukban kapartuk fel, majd centrifugáltuk  $800 \times g$

fordulatszám 3 percig, az életképes sejtek pelletben való összegyűjtése érdekében. A centrifugálás végeztével a felülúszót eltávolítottuk, a pelletet pedig az “A puffer”-ben szolubilizáltuk, amely a következőket tartalmazta: 10 mM 4-(2-hidroxi-1-piperazin-1-yl)benzénszulfonsav (HEPES, pH 7,9), 10 mM kálium-klorid (KCl), 0,1 mM etiléndiamin-tetraecetsav (EDTA), 0,1 mM etilén-glikol-bisz(β-aminoetil-éter)-N,N,N',N'-tetraecetsav (EGTA), 1 mM nátrium-fluorid (NaF), 1 mM tetranátrium-pirofoszfát (Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>), 1 mM β-glicerofoszfát és 1 mM nátrium-ortovanadát (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>), melyet alkalmazás előtt frissen egészítettünk ki 1 mM ditiotreitollal (DTT) és 50x-es hígítású foszfatáz inhibitor koktéllal (FIC, P0044, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 10x-es hígítású proteáz inhibitor koktéllal (PIC, 05892791001, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), valamint 1 μM mikrocisztin-LR-rel (McoR). Szolubilizálást követően a sejteket Hamilton tű segítségével homogenizáltuk, majd centrifugálás következett 16000 x g fordulatszámon, 1 percig, 4 °C-on. A centrifugálást követően a felülúszót elmentettük, mint citoplazmatikus frakciót, és a pellettel dolgoztunk tovább. A pelletet “B puffer”-ben szuszpendáltuk, melynek összetétele a következő volt: 20 mM HEPES (pH 7,9), 420 mM nátrium-klorid (NaCl), 0,5 mM EDTA és 0,5 mM EGTA, amelyet keveréket használat előtt frissen felpótoltunk 10x PIC-el, 50x-es FIC-cel és 1 mM McoR-rel. A szuszpenziót jégen inkubáltuk B pufferben 25 percig, majd centrifugáltuk 12000 x g fordulatszámon, 10 percig, 4 °C-on. A centrifugálás után kapott felülúszót elmentettük, mint nukleáris frakciót. A minták fehérje koncentrációját bicinkoninsav esszé (BCA) (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA) segítségével mértük meg. Stésard sorként borjú szérum albumin (BSA) hígítási sort alkalmaztunk.

## **Ishikawa és HeLa sejtek életképesség vizsgálata**

Az Ishikawa illetve HeLa sejteket 96-lyukú lemezre szélesztettük 20000 sejt/lyuk sejtszámban, és a fentebb leírt módon transzfektáltuk, létrehozva kontroll, üres vektor által kezelt MOCK, illetve FT-SMTNL1 vagy FT-PPM1B csoportokat. A kezelés 72 óra hosszáig tartottuk fent, ennek leteltével 20 μM végkoncentrációban adtuk a kultúrákhoz AlamarBlue (Invitrogen™) reagenst. Az AlamarBlue reagens egy resazurin tartalmú, sejtekre nem toxikus hatású redox indikátor, mely sejtszintű metabolizációja során fluoreszcencia intenzitást bocsájt ki miközben redukálódik. Ezen tulajdonsága révén alkalmas sejtek életképességének vizsgálatára. A reagens hozzáadását követően a sejteket tartalmazó 96-lyukú lemezt 37°C-on 90 percig inkubáltuk, mely során az Alamar Blue reagens hatására kifejlődő színreakció elérte maximumát. A fluoreszcencia intenzitását 530/590 nm hullámhosszúságon regisztráltuk, Spark multimode reader segítségével (Tecan Group Ltd, Switzerland). A sejtek életképességének

meghatározásához csak Alamar Blue reagenst tartalmazó vakhoz viszonyítottuk A kezeletlen kontroll csoport értékének átlagát 100%-nak véve eredményeinket oszlopdigrammon reprezentáltuk.

### **Ishikawa sejtek karcolási esszéje**

A kezeletlen kontroll, üres plazmival transzfektált MOCK, avagy FT-SMNTL1 szekvenciát tartalmazó plazmival transzfektált Ishikawa sejteket Vybrant™ DiD Cell-Labeling Solution (Invitrogen™, Waltham, Massachusetts, USA, Katalógusszám: V22887) segítségével fluoreszcens módon jelöltük, majd kollagén bevonatú OptiPlate-96 Black lemezekre (PerkinElmer; Waltham, MA, USA) szélesztettük 20000 db sejt/lyuk sűrűségben, és 48 órán át tenyésztettük kontroll, P4 vagy GDB modellek között. A kezelés 48. órájában minden lyukat Tecan Freedom EVO 150 (Tecan Group Ltd, Svájc) robot segítségével karcoltunk meg, majd további 24 órán át tenyésztettük a sejteket, a migrációs potenciált pedig ezalatt az idő alatt rögzítettük valós időben az nagy áteresztőképességű szűrőberendezés: Opera Phoenix™ High Content Screening (továbbiakban: HCS) (PerkinElmer; Waltham, MA, USA) mikroszkóp 10x-es levegős objektíve (NA: 1.15) segítségével, óránként készítve fotókat sejtek sebzárodási folyamatáról. A szabadon maradt terület méretét, illetve a sejtek számát a mikroszkóp beépített Harmony (4.8-as verzió) szoftvere analizálta. A hormonkezelésben nem részesült kontroll, a MOCK csoport sebzárodásának átlagát 100%-nak véve reprezentáltuk a további kezelési körülmények eredményei oszlopdigrammon.

### **HeLa és Ishikawa sejtek immunfluoreszcens festése**

Az Ishikawa és HeLa sejteket OptiPlate-96 Black Plate (PerkinElmer; Waltham, MA, USA), 96-lyukú lemezre szélesztettük 20000 sejt/lyuk sejtszámban, és a fentiekben leírt módon transzfektáltuk őket, illetve Ishikawa sejtek esetén a transzfekciós csoportokat kontroll, P4 és GDB modellek között egyedileg létesítettük. A kezelést 72 órán keresztül tartottuk fent, melynek végén a sejteket 1x PBS-sel mostuk, majd 4%-os paraformaldehid (PFA) / 1x PBS oldatban fixáltuk szobahőn, 15 percig. Az inkubációs idő letelte után a mintákat 1x PBS-sel mostuk, majd 0,2%-os Triton-X 100 / 1x PBS detergens oldatot adtunk hozzá. Az inkubáció 10 percig, szobahőn történt, a sejtek membránjának permeabilizálása céljából. Ezt követően 1x PBS-sel való mosás következett, majd 1% BSA (borjú szérum albumin) / 1x PBS oldatban blokkoltuk a lyukakat 1 órán keresztül, szobahőn. A blokkolás után az elsődleges antitesteket 1:100 koncentrációban alkalmaztuk, 1% BSA / 1x PBS oldatban oldva. A felhasznált elsődleges antitestek a következők voltak: anti-MUC-1, anti-MYPT1, anti-MYPT1<sup>P<sup>T696</sup></sup>, anti-MLC, anti-

MLC<sup>pS18</sup>, anti-PRMT5, anti-PRMT5<sup>pT80</sup>, anti-H4 és anti-DM-H4. Az elsődleges antitestekkel az inkubáció 4 °C-on, egy éjszakán át tartott. A sejteket háromszor mostuk 1x PBS-sel, majd Alexa 488 (zöld) fluorofórral konjugált másodlagos antitesteket, illetve Texas-Red Phalloidint alkalmaztunk F-aktin jelölése céljából, melyeket 1:1000 hígításban adtunk a lyukakhoz 1% BSA / 1x PBS oldatban oldva. Az inkubáció 1,5 óráig szobahőn történt. A sejtek magját 4', 6-diamidino-2-fenilindollal (DAPI) (kék) jelöltük. A fluoreszcens jelek vizualizációja az Opera Phoenix™ HCS mikroszkóp segítségével történt. Lyukanként összesen 14-16 mező került leképzésre, átlagosan  $3 \times 10^4$  db sejtet detektálva. Az Alexa488-as fluorofór intenzitásának képeit Z tengely síkjának 0  $\mu\text{m}$  pozíciójában rögzítettük. Az Ishikawa sejtek esetén a fluoreszcencia intenzitás analíziséhez kezelési csoportonként 3 független lyuk, illetve egy lyuk legalább 9 egyedi mezejéből mért szummált intenzitás szolgált. A kapott intenzitás értékét autofluoreszcenciára szűrtük, a másodlagos antitest kontroll intenzitását minden lyuk összintenzitásából kivontuk. Az így nyert adatokat a DAPI-val jelölt sejtek számára normalizáltuk. A kontroll MOCK csoport értékét 100%-nak vettük, és az összes többi csoportot ennek arányként fejeztük ki, eredményeinket oszlopdiagrammon ábráztuk.

### **Ishikawa és HeLa sejtek feltárása, teljes sejtízátum formában**

A transzfektált és/vagy Ishikawa sejtek esetén kontroll/P4/GDB modellben kezelt sejteket a fentebb részletezett kezelés letelte után 1x PBS-sel mostuk, majd jéghideg, az alábbi módon kiegészített radioimmunprecipitációs esszé pufferben (RIPA) [25 mM Tris-HCl (pH 7,6), 150 mM NaCl, 1% nátrium-deoxikolat, 0,1% nátrium-dodecil-szulfát (SDS), 1% Triton-X 100, 1mM PMSF (fenil-metil-szulfonil fluorid), 10x PIC, 50x FIC (Foszfataz Inhibitor Koktél), 1  $\mu\text{M}$  MC-LR (microcystin-LR)] kapartuk fel. A sejtek lizátumát Branson 250 szonikátorral (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA) homogenizáltuk háromszor 10 másodpercig, 10% output beállításon, majd a sejtuszpenziókat 15 percig 16000  $\times$  g-n, 4 °C-on centrifugáltuk. A pellet elvetése után a felülúszóból fehérje koncentrációt mértünk BCA esszé (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA) segítségével. Stésard sorként borjú szérum albumin (BSA) hígítási sort alkalmaztunk.

### **SDS-gélelektroforézis és Western blot analízis**

A sejtek feltárását követően a lizátumokat merkaptóetanollal 30:1000-hez arányban kiegészített 6xSDS mintapufferben (Bio-Rad Laboratories; Hercules, CA, USA) 10 percig, 100°C-on felfőztük, majd mintánként 30-40  $\mu\text{g}$  fehérjét vittünk fel 4-20%-os, előre gyártott Criterion grádiens-gélekre (Bio-Rad Laboratories; Hercules, CA, USA). A fehérjék

gélelektroforézisét PowerPac HC tápegységgel (Bio-Rad Laboratories; Hercules, CA, USA) 200 V-on kiviteleztük, kb. 40 percig. A fehérjék nitrocellulóz membránra való transzferálása Criterion blotter készülék (Bio-Rad Laboratories; Hercules, CA, USA) segítségével történt, 100 V-on, 75 perc alatt. A membránok blokkolására 5% (m/V) BSA/ 1x Tris puffer (TBS: 136 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 25 mM Tris-HCl, pH 7,4) oldatot alkalmaztunk, mely 0,1% (V/V) Tween 20-at tartalmazott (TBST). A blokkolási idő 1,5 órán át tartott, szobahőn. Az elsődleges antitesteket 5% BSA/TBST oldatban hígítottuk a **3. táblázatban** jelzett arányok szerint, a membránok ezután 4 °C-on, egy éjszakán át inkubálódtak. Másnap a membránokat háromszor 10 percig 1x TBST-vel mostuk és 5% BSA/TBST-ben, 1:5000 arányban hígított HRP-konjugált másodlagos antitestekkel inkubáltuk szobahőn, 1,5 órán át. A kemilumineszcens jeleket WesternBright ECL reagensek (Advansta Inc.; San Jose, CA, USA) 1:1 arányú keverékével hívtuk elő, a vizualizációhoz ChemiDoc Touch Imaging System (Bio-Rad Laboratories; Hercules, CA, USA) készüléket alkalmaztunk.

### **Ishikawa sejtek glikogén mennyiségének mérése**

A transzfektált Ishikawa sejteket 6-lyukú lemezre szélesztettük, majd a fentiekben leírt módon kontroll, P4, illetve GDB modellekben kezeltük 72 órán keresztül. A kezelés letelte után a sejteket 5 percig 200 µl/lyuk tripszin segítségével elválasztottuk a tenyésztő lemez felszínétől, majd a tripszin hatását hatszoros térfogatú komplett tenyésztő médium hozzáadásával állítottuk le. A sejtek szuszpenzióját 2000 x g fordulatszámon, 4°C-on 4 percig centrifugáltuk. A sejtek pelletét mintánként 150µl 0,1M-os KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> oldatban szolubilizáltuk, majd szonikátor segítségével lizáltuk (10% output, Branson Sonifier 250. Fisher Scientific). A lizátumhoz mintánként 30 µl 25%-os triklórecetsav (TCA) oldatot adtunk, majd 16000 x g fordulatszámon centrifugáltuk, 5 percig 4°C-on. A felülúszókkal tovább dolgozva azokat kipótoltuk mintánként 300µl tömény H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> oldattal és 30 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. A lizátumokat mintánként 60 µl 6%-os fenol oldattal egészítettük ki, és további 5 perc inkubáció következett 90°C-on, mely inkubáció végére kifejlődött a színreakció. Az abszorbanciát 490 nm hullámhosszon mértük le, a koncentrációt stésard görbe alapján számoltuk, amely az alábbi ismert koncentrációjú glikogén hígítási mintákból állt: 0,00625 g/100 ml, 0,025 g/100 ml, 0,1 g/100 ml és reagens vak. A glikogén koncentráció g/100 ml-ben nyert eredményeit normalizáltuk a BCA teszttel mért fehérje koncentrációhoz, amelyet minden mintából egyedileg mértünk, a fehérjekoncentrációt g/100 ml egységben fejeztük ki. A normalizált eredmények glikogén/fehérje (g/g) egységgel rendelkeztek. A MOCK kontroll

csoport értékét 100%-nak vettük, és az összes többi csoportot arányként fejeztük ki oszlopdiagramon.

### **Ishikawa sejtek glükóz felvételi esszéje**

A 2-NBDG (2-N-7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl-Amino-2-Deoxyglucose) felvételi esszéhez az üres vagy FT-SMTNL1-et tartalmazó vektorral transzfektált Ishikawa sejteket 24-lyukú lemezre szélesztettük, majd a fentebb leírt módon 72 óráig kezeltük őket kontroll, P4, illetve GDB modellek között. A kezelés végén a sejteket mostuk 1x-es PBS oldattal, majd 1 óra hosszáig glükózmentes tenyésztő médiumban való inkubáció következett 5% CO<sub>2</sub> szint mellett, 37°C-ra temperált inkubátorban. Ezt követően 100 µM/lyuk koncentrációban adtunk a sejtekhez 2-NBDG-t, mellyel további 1 órás inkubáció történt. A sejteket ezután mostuk 1xPBS oldattal, és 0,1M-os KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 11,0) és lízis puffer segítségével lizáltuk, melyet előzőleg 1% Triton X-100-zal egészítettünk ki. A fluoerszcencia mértékét 485 nm hullámhosszúságú excitációs és 535 nm hullámhosszúságú emissziós spektrumon mértük le Tecan Spark Multimode microplate reader (Tecan Trading AG, Mannedorf, Germany) segítségével. Az így nyert adatokat a minták fehérjekoncentrációjára normalizáltuk, melyet BCA esszé alkalmazásával mértünk meg, borjú szérum albumin (BSA) hígítási sort felhasználva a fehérjekoncentráció stésardizálásához.

### **Ishikawa sejtek RNS izolálása és szemi-kvantitatív RT-PCR analízise**

A 6-lyukú lemezre szélesztett, fentiekben leírt módon transzfektált, majd 72 óráig kontroll, P4 és GDB modellek között kezelt Ishikawa sejtek teljes RNS tartalmának kivonásához 1 ml of TRIzol reagenst (Life Technologies, Carlsbad, CA) adtunk minden lyukhoz. A lizátumokat mintánként 200 µl klorofolmmal egészítettük ki, majd centrifugáltuk 18928 x g fordulatszámon, 4°C-on, 15 percig. A víztiszta RNS fázissal dolgoztunk tovább, ehhez adtunk hozzá a továbbiakban 500 µl izopropanolt, majd centrifugálás következett 18928 x g-n, 4°C-on, 10 percig. A pelletet 75% etanolban szuszpendáltuk, majd centrifugáltuk 18928 x g-n, 4°C-on, 5 percig. A pelletet 10µl nukleázmentes vízben szuszpendáltuk fel, a minták RNS koncentrációját NanoDrop Fluoropetrométer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) segítségével mértük meg, tisztaságukat 260/280 nm-en mért abszorbancia hányadosával ellenőriztük, és elfogadtuk, amennyiben a hányados 1,8-2 közötti értéket adott.

A reverz transzkripciót mintánként 0,6 µg RNS mennyiségből végeztük, 37°C-on, 120 percig cDNS Synthesis Kit-tel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), az

így előállított cDNS-t pedig RT-PCR módszerrel amplifikáltuk, 2x Xceed qPCR SyberGreen Master mix (Institute of Applied Biotechnologies, Prága – Strašnice, Csehország) segítségével.

A PCR reakció során felhasznált primer párok szekvenciáját a **3. táblázatban** összesítettük.

A PCR reakció ciklusai: 95°C 3 percig denaturáció céljából, majd a PCR reakciót 50 ismétlődő cikluson keresztül végeztük 95°C 3 mp, 60°C 30 mp, végül 72°C 90 mp. A reakciót LightCycler 480 (Roche Applied Science) műszer segítségével hajtottuk végre, gépenként és mintánként is triplikátumokat alkalmazva. Az egyes minták mRNS szintjére kapott Cp értékét a háztartási gének (GAPDH és Cyclophilin A) mértani közepére normalizáltuk. A csoportok statisztikai analízise során a hormonkezelésben nem részesült kontroll MOCK csoport értékeinek átlagát vettük 100%-nak, ehhez képest reprezentáltuk a további kezelési csoportok eredményeit, oszlop diagrammként, GraphPad Prism 8 szoftver segítségével.

*3. táblázat: A RT-PCR során használt primerek*

<b>PCR primerek</b>				
<b>Gén neve</b>	<b>Irány</b>	<b>Szekvenca (5' → 3')</b>	<b>Koncentráció/ reakcióközeg</b>	<b>T<sub>m</sub></b>
<b>Human GAPDH</b>	Forward	AGCCTCAAGATCAGCAATG	0,4 μM	52,6°C
<b>Human GAPDH</b>	Reverse	ATGGACTGTGGTCATGAGTCCTT	0,4 μM	57,9°C
<b>Human Cyclophilin A</b>	Forward	GTCTCCTTTGAGCTGTTGCAGAC	0,4 μM	58,2°C
<b>Human Cyclophilin A</b>	Reverse	CTTGCCACCAAGTCCATTATG	0,4 μM	56,7°C
<b>Human MUC-1</b>	Forward	TGCCGCCGAAAGAACTACG	0,4 μM	54,3°C
<b>Human MUC-1</b>	Reverse	TGGGGTACTCGCTCATAGGAT	0,4 μM	56,2°C

## **Humán cervicális karcinóma lizátumok feldolgozása**

A kontroll és tumoros szöveti lizátumokat a Protein Biotechnologies (Ramona, CA, USA) cégtől vásároltuk, ahol a gyártó a szöveti mintákat RIPA pufferben tárta fel, végkoncentrációként 1 mg/ml értéket rendelve a mintákhoz. 16000 x g fordulatszám, 4°C, 10 percig történő centrifugálást követően a minták felülúszóját és SDS minta pufferben (Bio-Rad Laboratories; Hercules, CA, USA) 5 percig, 100°C-on inkubáltuk. A minták fehérjetartalmának vizsgálatára Western Blot analízist alkalmaztunk.

## **Immunprecipitáció**

A tsA201 sejtkultúrát transzektáltunk FT-PPM1B vagy FT-MYPT1 szekvenciát tartalmazó plazmidokkal a fent leírt módon. A kultúrákat TBS-etiléndiamin-tetraecetsav (TBS/EDTA) puffer segítségével tártuk fel. Az immunprecipitáció a következőképpen történt.

Protein A Sepharose (PAS) gyanta (GE Healthcare, #17-0780-01) aspecifikus kötőhelyeit egy éjszakán át blokkoltuk 5% (w/v) BSA/TBS oldattal, 4°C-on. Ezt követően a PAS-hoz antitesteket (anti-PPM1B, anti-MYPT1 vagy anti-mouse) kötöttünk kötő puffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% (V/V) Triton X-100, pH: 7,0, kiegészítve 1x PIC-el) segítségével, 3 órán keresztül, gyenge forgatás közben, 4 °C-on. Az antitestek PAS-hoz kötését követően a transzfektált, PAS által előtisztított tsA201 lizátumokat (1 mg/ml) az antitesttel keresztkötött PAS gyantához adtuk és 2 óráig inkubáltuk, majd 3x 1xTBS-vel mostuk. A PAS-anti-MYPT1-FT-MYPT1 konjugátumokat PAS tisztított FT-PPM1B transzfektált tsA201 lizátummal inkubáltuk, míg a PAS-anti-PPM1B-FT-PPM1B konjugátumokra FT-MYPT1 transzfektált, PAS-tisztított tsA201 lizátum került, 3 órányi inkubációs időre. A gyöngyöket 1x TBS-sel mostuk, és 1x-es SDS mintapufferrel 100°C-on 5 percig inkubáltuk. Az immunprecipitáció sikerességét Western Blot analízissel ellenőriztük.

### **A MYPT1 és PPM1B fehérjék pull-down kötődésivizsgálata**

Glutation S-transzferázt (GST) vagy GST-MYPT1-et expresszáló *E.coli* lizátumokat Glutathion Sepharose 4B gyöngyökkel (P1743-1VL, Merck, Darmstadt, Germany) kötő pufferben (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% (V/V) Triton X-100, pH: 7,4, kiegészítve 1x PIC-el) inkubáltunk 120 percig 4°C-on, annak érdekében, hogy a GST és GST-MYPT1 a gyöngyökhöz kötődjön. A gyöngyökhöz kirögzített GST vagy GST-MYPT1 komplexeket 1x-es TBS-sel mostuk, majd MOCK, vagy FT-PPM1B által transzfektált tsA201 lizátumokkal inkubáltuk, 120 percig 4°C-on. A gyöngyöket háromszor mostuk 1xTBS oldattal, majd 2x-es SDS mintapufferrel 5 percig, 100°C-on inkubáltuk.

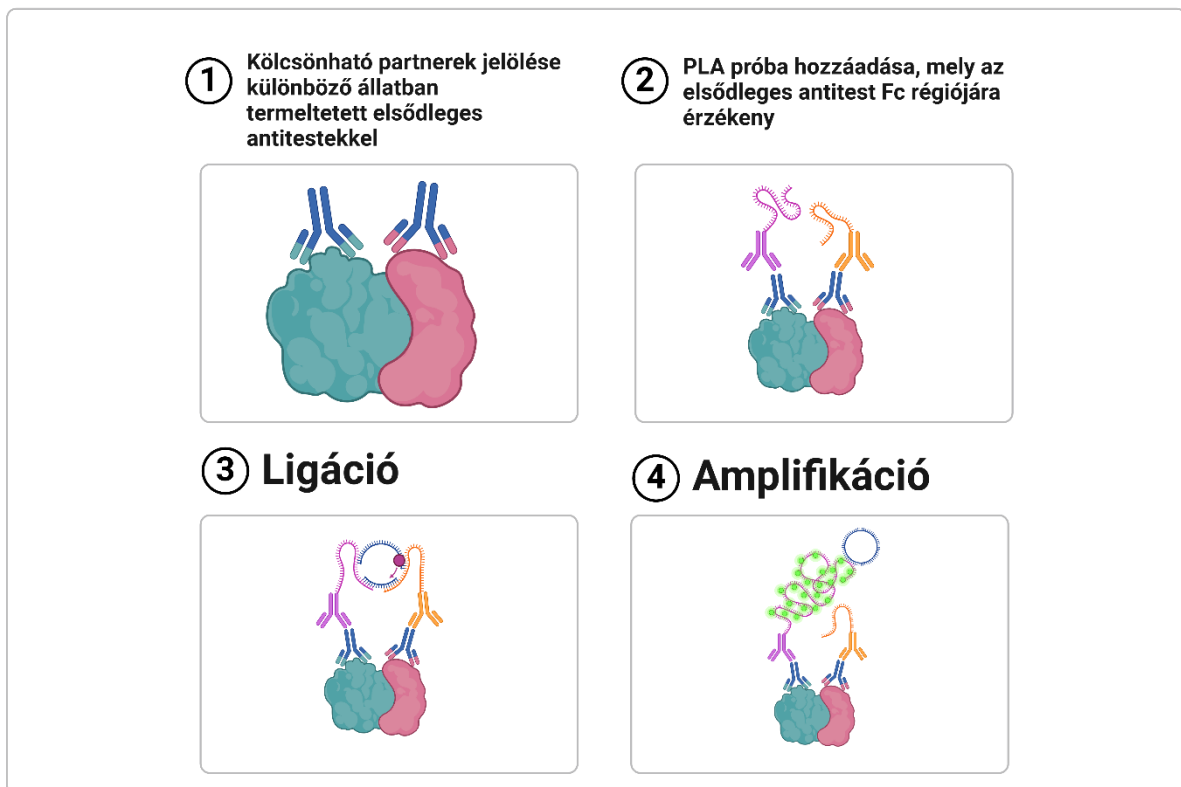
### **HeLa sejtek Duolink „Proximity Ligation Assay” fehérje-fehérje interakciós esszéje**

A Duolink PLA fehérje-fehérje interakciós esszét (DUO92007, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a gyártó utasításai alapján végeztük el, HeLa sejt kultúrán az alábbimódosításokkal. A HeLa sejteket 96-lyukú lemezre szélesztettük, (Cell Carrier Ultra üveg aljú lemezek, PerkinElmer, Waltham, MA, USA). A szélesztés másnapján, 80%-os konfluencia elérésekor a sejteket 4%(v/v) PFA/TBS oldatban fixáltuk, majd 0,2% Triton-X-100/TBS oldatban permeabilizáltuk. A mintákat elsődleges antitestekkel inkubáltuk a következők szerint: a PPM1B-MYPT1 interakciót vizsgáló csoportba MYPT1-re és PPM1B-re specifikus elsődleges antitest került. Pozitív kontrollként az MP holoenzimet reprezentáló módon MYPT1 és PPM1B ellen termeltetett elsődleges antitesteket használtuk fel. Pozitív kontrollként a MYPT1 ismert

szubsztrárját, a pRb fehérjét alkalmaztuk, mely csoportban a sejtek anti-pRb és anti-MYPT1 antitesttel lettek inkubálva. A negatív kontroll csoportban elsődleges antitestet nem alkalmaztunk.

Ezt követően Duolink PLA próbát ligáltunk az elsődleges antitestekhez, melyek között amplifikációs puffer hozzáadásával fluoreszcens oligonukleotidok szintézisét kiviteleztük (**11. ábra**). Az oligonukleotidok szintézise csak abban az esetben volt lehetséges az amplifikációs puffer hozzáadásával, ha az elsődleges antitesttel keresztkötött PLA próbával jelölt fehérjék megfelelő fizikai közelségben helyezkedtek el egymáshoz képest. Az így kifejlődő fluoreszcens jeleket Opera Phoenix™ HCS mikroszkóp segítségével vizualizáltuk, 40x-es vizes objektívvel 554 nm hullámhosszúságú excitációs és 576 nm hullámhosszúságú emissziós hullámhosszon. A sejtek területének meghatározására a citoplazmát Alexa 688-as Falloidin-nal (Invitrogen™, Waltham, Massachusetts, USA, Katalógusszám: A22284), a sejtmagot

## Duolink PLA fehérje-fehérje interakciós vizsgálat



**11. ábra: Duolink PLA fehérje-fehérje interakciós vizsgálat sematikus ábrája.** A kölcsönhatásban részt vevő partnerfehérjék jelölése különböző állapotban termeltetett elsődleges antitesttel történik, amit a „proximity ligation” próba hozzáadása követ, mely az elsődleges antitestek Fc régiójának kötésére képes. Amennyiben a bekötődött PLA próbák, és így az keresendő fehérjék megfelelő fizikai közelségben helyezkednek el egymástól, lehetőség nyílik a ligációra és az amplifikációra. Az amplifikáció fluoreszcensen jelölt nukleotidok felhasználásával történik, a kifejlődő jel két fehérje fizikai kölcsönhatását jelzi. Az ábra a biorender.com felületén készült.

DAPI-val festettük. A sikeres fehérje-fehérje interakciót jelző fluoreszcens jelek számát a mikroszkóp beépített szoftvere analizálta (Harmony software, version 4,8). A fluoreszcens szignál értékét a sejtszámra normalizáltuk. A negatív kontroll csoport értékének átlagát 100%-nak vettük, minden más csoport eredményét erre a számra normalizáltuk, eredményeinket oszlopdiagrammon ábrázoltuk.

### **Miozin foszfatáz aktivitásmérés**

HeLa sejteket 6-lyukú lemezre szélesztettünk, majd 90%-os konfluencia elérése után 24 óráig éhezettünk 0,1% FBS-t tartalmazó médiumban. Az éheztetést követően a sejteket 1 óráig kezeltük 1  $\mu$ M SNG-al, vagy 50 nM okadánsavval (OA), továbbá kombinált kezelési csoportban ezek keverékével, mely gátlószereket a HeLa sejtek szérumot tartalmazó tenyésztő médiumában oldottuk. Az 1 órás inkubáció letelte után a sejteket 50 mM Tris/HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,15 % (m/V) pufferben tártuk fel, mely kiegészítésre került 1x PIC-el, 1 mM PMSF-el és 50 mM 2-merkaptóetanollal. Ezt követően ultrahangos szonikálás következett, majd centrifugálás 16000  $\times$  g, 20 perc beállításon. A minták felülúszóit 1 percre 30°C-on előinkubáltuk, majd további 1 percre kezeltük 1  $\mu$ M  $^{32}$ P-jelölt pulykazúza miozin ( $^{32}$ P-miozin) jelenlétében. A  $^{32}$ P-miozin preparátumot munkacsoportunk előzetes protokoll alapján izolálta (161), a  $\gamma$ -[ $^{32}$ P]-ATP-t pedig az Izotóp Intézet Kft.-től szereztük be. 20-60 másodperc inkubáció után a reakciót 10% (V/V) TCA és 6 mg/ml BSA hozzáadásával állítottuk le. Centrifugálást (5600  $\times$  g, 3,5 perc) követően a kicsapódott fehérjét összegyűjtöttük és a reakció során felszabadult radioaktívan jelölt foszfátot ( $^{32}$ Pi) scintillációs számlálóval (Perkin Elmer) határoztuk meg.

A kapott foszfatáz aktivitási értékeket a minták MYPT1 mennyiségére normalizáltuk, mely mennyiséget GST-MYPT1 rekombináns fehérjével készült stésard görbe alapján határoztunk meg. A MP aktivitás értékeit a kezeletlen kontroll csoporthoz viszonyítva %-os arányként fejeztük ki, eredményeinket oszlopdiagrammon ábrázoltuk.

### **In vitro RhoA kináz esszé (ROK) és PPM1 foszfatáz esszé**

A GST-t vagy GST-MYPT1-et expresszáló *E. coli* lizátumokat Glutathion Sepharose 4B gyöngyökkel kötő pufferben inkubáltunk 120 percre, 4°C. A gyöngyöket 1x-es TBS-sel mostuk, majd ROK (20 ng/ $\mu$ l) enzimmel és ATP (1 mM)-vel inkubáltuk 45 percre, 30°C-on, 1  $\mu$ M of microcystin-LR-rel és 1x PIC oldattal kiegészített ROK esszé pufferben [20 mM MOPS pH 7,2 25 mM GlicP, 0,5 mM etilén-glikol-bisz( $\beta$ -aminoetil-éter)-N,N,N',N'-tetraecetsav (EGTA), és 0,5 mM ditiotreitól (DTT)]. Kontroll csoportként ROK nélküli mintát

alkalmaztunk. A foszforiláció megtörténte után a gyöngyöket 1x TBS-el mostuk, majd PPM1B-t tartalmazó vagy anélküli inkubáció következett PPM1B esszé pufferben (20 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM MnCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 1 mg/ml BSA, 0,1% Tween ésPIC) 45 percig, 30°C-on. Az inkubációt követően a mintákat 1xTBS-el mostuk, és a gyöngyöket SDS mintapufferrel inkubáltuk 100°C-on, 5 percig.

## Statisztikai analízis

A Western blot képek intenzitásának kvantifikálása Image J szoftver segítségével készült. A poszttranszlációsán módosított fehérjék által adott kemilumineszcens jel intenzitásának értékeit a módosítatlan fehérje expressziós értékére normalizáltuk, így fejezve ki a poszttranszlációs módosítás relatív értékét a teljes fehérjemennyiséghez viszonyítva. A módosítatlan fehérjék jelét a belső kontroll (GAPDH,  $\beta$ -aktin) jelének mértékére normalizáltuk. Az Ishikawa sejteken futtatott kísérleteink, illetve az MP aktivitásának mérése esetén a kapott adatok kiértékelésénél a kontroll csoport értékének átlagát vettük 100%-nak, melyhez képest kifejeztük az összes többi csoport eredményét %-os arányban. A HeLa sejtek esetén értékeinket a totál fehérje belső kontrollra, illetve a módosított fehérje totál fehérjére normált eredményeinek átlagát relatív számokként mutattuk be. A kapott értékekből GraphPad Prism 8 szoftver használatával készült oszlopdiagramm, a statisztikai analízisek szintén GraphPad Prism 8 szoftver által számítottak.

Két csoport közötti különbség szignifikanciájának kimutatására párosítatlan kétmintás t-próbát alkalmaztunk. Több csoport összehasonlításához azonos környezeti tényezők esetén egyutas, változó környezeti tényezők esetén kétutas ANOVA statisztikai analízist használtunk, kiegészítve Tukey *post hoc* teszttel. Az oszlopgrafikon minden oszlopa egy kísérleti csoport átlagát reprezentálja, +/- SD értékkel, ahol „n” az egymástól független kísérletek számát jelzi. A kiugró értékeket a GrapPad Prism 8 szoftver Grubbs's testével távolítottuk el. Két csoport közötti különbséget statisztikailag szignifikánsnak tekintettünk, amennyiben  $p < 0,05$  (\*).

# Eredmények

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

### A PPM1B és MYPT1 fehérjék kölcsönhatásának bizonyítása

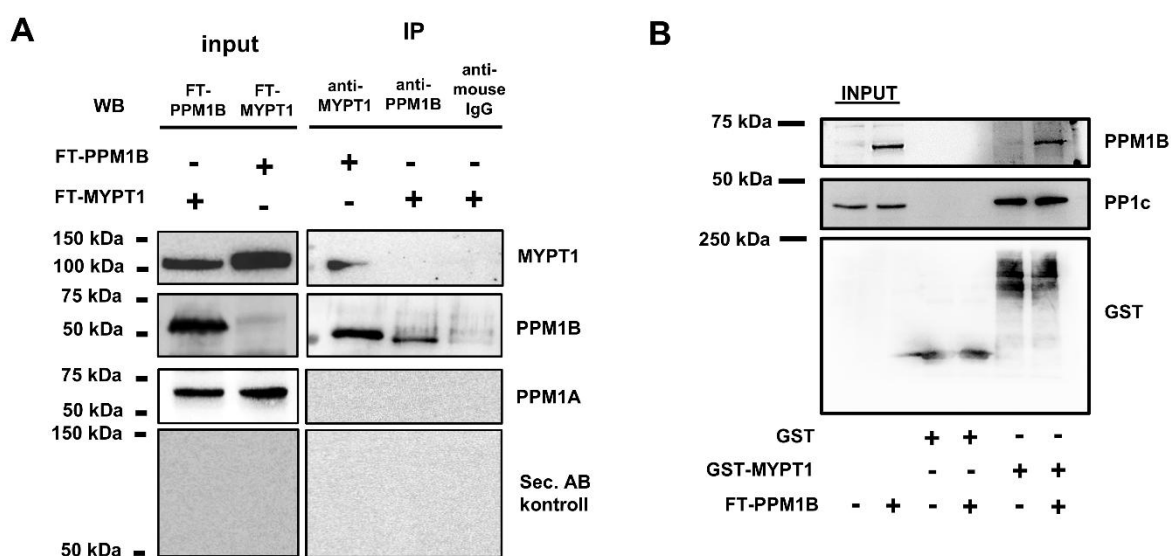
Habár előzetes közlemények már leírták a MP jelenlétét a sejtmagban, valamint részletezték a fehérje génexpresszió szabályozásában betöltött szerepét, melyet a PRMT5 defoszforilációján keresztül valósít meg (9,75) a MP sejtmagi szabályozó elemeiről még nincs elérhető adat. Az egyik lehetséges jelölt a MYPT1 nukleáris interaktómjában azonosított  $Mg^{2+}/Mn^{2+}$ -függő protein-foszfataz 1B (PPM1B), de ennek pontos funkciója és az MP/PRMT5/hiszton protoonkogén tengellyel való kapcsolata eddig nem feltárt.

A PPM1B-t a tömegspektrometriás elemzés során azonosították a GST-MYPT1 „pull down” frakciójában, mint a MYPT1 kölcsönható partnerét (10), és ez volt az azonosított partnerek közül az egyetlen potenciális MP-t szabályozó, foszfataz aktivitású enzim. Célunk az volt, hogy további bizonyítékokat nyerjünk ezen megelőző adatokra a PPM1B és a MYPT1 alegység közötti fehérje-fehérje kölcsönhatást illetően, és igazoljuk a PPM1B szabályozó szerepét az MP/PRMT5/H4 jelátviteli pályában.

Kísérletünk első lépéseként igazolni kívántuk a MYPT1 szabályozó alegység és a PPM1B közötti kölcsönhatást, mely kapcsolat feltárására immunprecipitációs vizsgálatokat (12A. *ábra*), „pull down” esszét (12B. *ábra*) illetve Duolink PLA fehérje-fehérje interakciós esszét (13A. és B. *ábra*) végeztünk.

A ko-immunprecipitációs vizsgálat során FT-PPM1B és FT-MYPT1 transzfektált tsA201 sejtek lizátumával inkubáltunk az MYPT1 és PPM1B ellen termeltetett antitesteket, melyeket előzetesen PAS gyöngyre rögzítettünk (12A. *ábra*). A ko-immunprecipitáció eredményeként elmondható, hogy a MYPT1 és a PPM1B sikeresen keresztkötött egymással, mind az FT-MYPT1, mind az FT-PPM1B lizátum által inkubált gyöngyökkel vizsgált, PPM1B antitest által validált csoportban. Az anti-MYPT1 antitesttel keresztkötött PAS gyöngyök sikeresen kikötötték mind a MYPT1, mind a PPM1B fehérjét. A PPM1B antitesttel keresztkötött PAS gyöngyök nem mutattak számottevő MYPT1 kötést, amely jelenség hátterében az állhat, hogy a PPM1B kötődési régiója a MYPT1-en átfedésben található az anti-MYPT1 antitest epitópjával.

Mivel a  $Mg^{2+}/Mn^{2+}$ -függő protein-foszfataz 1A (PPM1A) szekvenciája az enzimszaládon belül nagyfokú homológiát mutat a PPM1B-vel, illetve a MYPT1 sejtmagi interaktómjában azonosított PPM1B-hez köthető peptidek közül három a PPM1A enzim szekvenciájában is megtalálható volt, ezért kiegészítésként és eredményeink tisztázása érdekében a PPM1A jelenlétét is teszteltük az immunprecipitáció során (**12A. ábra**). A PPM1A antitesttel validált minták eredményei alapján, bár a fehérje jelen volt mind az FT-MYPT1 mind az FT-PPM1B transzfektált teljes sejt-lizátumokban, a PPM1A nem mutatott fehérje-fehérje kölcsönhatást a MYPT1 fehérjével.



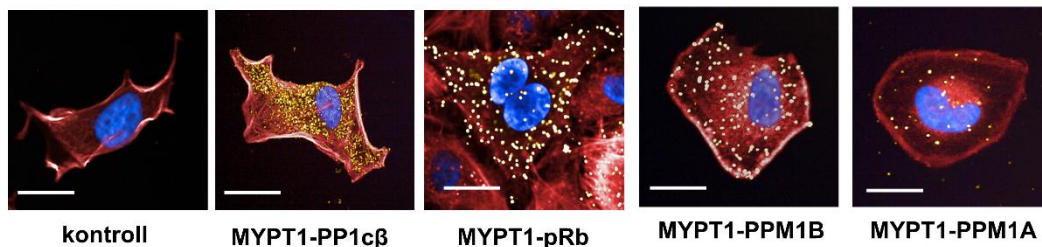
**12. ábra: A PPM1B és MYPT1 közötti fehérje-fehérje interakció igazolása (A)** Immunprecipitációs vizsgálat során tsA201 sejt-lizátumokkal olyan Protein-A Sepharose gyöngyöket inkubáltunk, melyekhez előzőleg MYPT1-re és PPM1B-re specifikus antitesteket kötöttünk. Az így kapott precipitátumokat Western blot elemzéssel vizsgáltuk a megadott antitestek segítségével. **(B)** A Flag-PPM1B kölcsönhatása GST-MYPT1-tel. GST vagy GST-MYPT1-hez kötött Glutathione-Sepharose 4B gyöngyöket inkubáltunk FT-PPM1B transzfektált vagy nem transzfektált tsA201 sejt-lizátumokkal. A kölcsönhatást Western blot analízissel detektáltuk anti-GST és anti-Flag antitestek alkalmazásával. A PP1c $\beta$  jelenléte pozitív kontrollként szolgált.

Kísérletünk következő lépéseként a PPM1B és a MYPT1 közötti kölcsönhatás megerősítése érdekében „pull down” vizsgálatokat is végeztünk GST-MYPT1 használatával, melyhez negatív kontrollként GST-t alkalmaztunk (**12B. ábra**). Az esszé kivitelezéséhez FT-PPM1B transzfektált, és nem transzfektált tsA201 lizátumokat használtunk, mely lizátumokkal inkubáltuk a GST- és GST-MYPT1 gyöngyöket. A Glutathione-Sepharose gyöngyökről eluáltuk a GST- és GST-MYPT1-hez kötődő fehérjéket, majd SDS-PAGE (poliakrilamid gélelektroforézis) segítségével elválasztottuk őket, végül Western blot analízissel vizsgáltuk azokat, PPM1B és GST ellen termeltetett elsődleges antitestekkel, illetve pozitív kontrollként rekombináns PP1 katalitikus alegység (PP1c) ellen termeltetett antitesttel. A GST nem, viszont a GST-MYPT1 kölcsönhatást mutatott a PPM1B-vel mind a kezeletlen, mind az FT-PPM1B

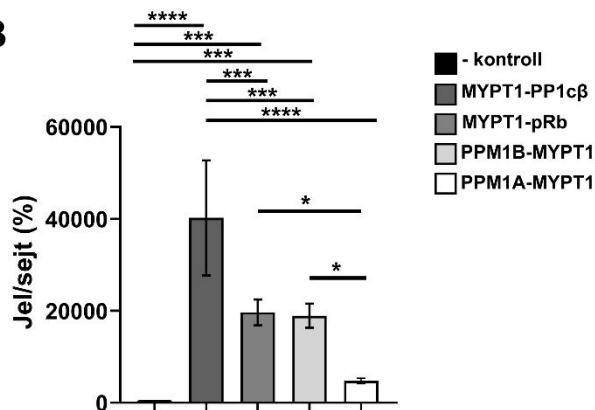
transzfekción átesett sejtizátumban, mely csoport esetén a kapcsolatot mutató jel intenzitása nőtt. Az MP katalitikus alegysége, a PP1c és a MYPT1 közötti kölcsönhatás stabilan igazolódott, egyenlő intenzitást mutatva mind a transzfekción átesett, mind a transzfekción át nem esett csoportban (**12B. ábra**).

A PPM1B és MYPT1 fehérjék kölcsönhatásának további igazolásaképpen Duolink PLA fehérje-fehérje interakciós esszé (**13. ábra**) végeztünk HeLa humán cervicalis carcinomából immortalizált sejtekben. Az interakciós esszé pozitív kontrolljaként olyan csoportot alkalmaztunk, mely anti-MYPT1 és anti-PP1c $\beta$  antitestekkel jelöltünk, ahol az anti-PP1c $\beta$  az MP katalitikus alegységére specifikus, így a kölcsönhatást jelző fluoreszcens jel a holoenzim jelenlétét mutatta (**13A. ábra**). További, már korábban igazolt MYPT1 kölcsönható partner a MP egyik szubsztrátja, a pRb, szintén pozitív kontrollként szolgált vizsgálatunkban.

**A**



**B**



**13. ábra: A PPM1B és MYPT1 közötti fehérje-fehérje kölcsönhatás igazolása Duolink PLA fehérje-fehérje interakciós esszé segítségével (A) A MYPT1 és PPM1B közötti kölcsönhatások kvantitatív elemzése Duolink PLA fehérje-fehérje interakciós esszé kivitelezésével. A retinoblasztóma fehérjére (pRb), illetve a PP1c $\beta$ -ra specifikus antitestekkel jelölt csoportokat pozitív kontrollként használtuk. Az MYPT1 kölcsönhatását PPM1A antitesttel is vizsgáltuk. Az F-aktint Alexa688 Falloidinnal (piros), a sejtmagokat pedig DAPI-val (kék) festettük meg. A fehérje-fehérje kölcsönhatásokat sárga fluoreszcens jel mutatja. Méretarány: 10  $\mu$ m. (D) Az oszlopdiaagram a Duolink PLA fehérje-fehérje interakciós esszé során megjelenített fluoreszcens jelek számát mutatja, sejt számra normalizálva. A negatív kontroll csoport értékét 100%-nak tekintettük, és minden más csoportot ehhez viszonyítva ábrázoltuk oszlopdiaagrammon, ahol egy oszlop az adott csoport átlagát  $\pm$  SD-t reprezentálja (n=3-9). A csoportokat egyutas ANOVA segítségével hasonlítottuk össze, ahol (\*)  $p < 0,05$ , (\*\*\*)  $p < 0,001$  és (\*\*\*\*)  $p \leq 0,0001$ .**

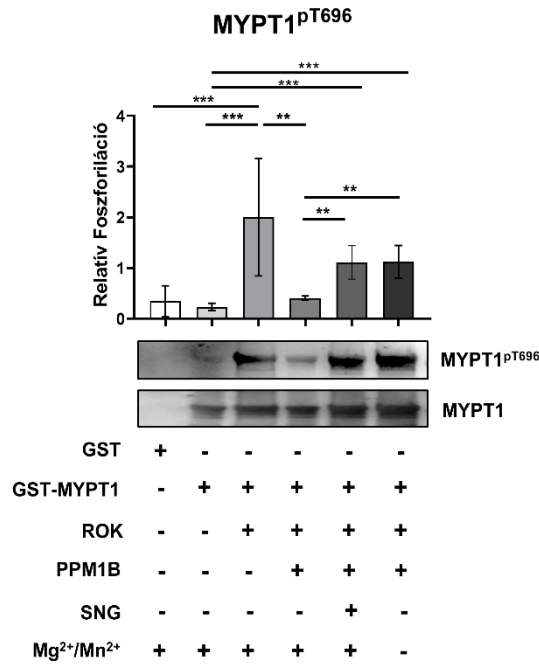
Negatív kontrollként olyan csoportot alkalmaztunk, mely antitest jelölésen át nem esett, így az esetlegesen megjelenő aspecifikus jelek kiszűrésére szolgált. A PPM1B és a MYPT1 kölcsönhatásának vizsgálatához a mintákat anti-MYPT1 és anti-PPM1B antitestekkel inkubáltuk. A sejtszámra normalizált, negatív kontroll csoportban mért egyedi fluoreszcens jelek számát 100%-nak tekintettük, ehhez hasonlítottuk a PP1c $\beta$  és a MYPT1, a pRb és a MYPT1, valamint a PPM1B és a MYPT1 közötti kölcsönhatás értékeit (**13B. ábra**).

Az elemzés igazolta az MP holoenzim alegységei közötti kölcsönös és erős interakciót a negatív kontroll csoporthoz képest ( $p < 0,0001$ ). Továbbá eredményeink HeLa sejtekben kimutatták a pRb és MYPT1 ( $p = 0,0004$ ), valamint a PPM1B és MYPT1 ( $p = 0,0006$ ) közötti kölcsönhatások szignifikáns számát az esszé során alkalmazott negatív kontrollhoz képest (**13B. ábra**). Az MYPT1 és PPM1B, valamint az MYPT1 és PPM1A közötti kölcsönhatás különbségének tisztázására egy olyan kölcsönható csoportot is létrehoztunk, amelyet anti-MYPT1 és anti-PPM1A antitestekkel jelöltünk meg. Ezen csoport nem mutatott szignifikáns eltérést a negatív kontroll csoporthoz fluoreszcens jeléhez képest ( $p = 0,7012$ ). Továbbá a PPM1A és MYPT1 közötti kölcsönhatását jelző fluoreszcens jel értéke szignifikánsan alacsonyabb volt ( $p = 0,0363$ ) a PPM1B és MYPT1 között mért kölcsönhatáshoz képest (**13B. ábra**). Mindezek az adatok igazolják az MYPT1 és szelektíven a PPM1B közötti kölcsönhatást, és jelzik azok lokalizációját és kölcsönhatását nemcsak a sejtmagban, hanem a citoplazmában is.

### **A PPM1B szubsztrátja a miozin foszfatáz MYPT1 alegysége**

Megelőző kísérleteinkben igazoltuk a MYPT1 és PPM1B fehérje-fehérje kölcsönhatását, a következő lépésként pedig a PPM1B MYPT1-re kifejtett szabályozó szerepét kívántuk bizonyítani. Ezen szabályozó szerep mélyebb feltérképezéséhez a GST-MYPT1-et ROK-kal foszforiláltunk, majd a foszforilált GST-MYPT1 fehérjét szubsztrátként alkalmaztuk *in vitro* foszfatáz esszéhez, amelyben rekombináns PPM1B enzimet vizsgáltunk (**14. ábra**). Az esszé végeztével a sejtek lizátumát Western blot analízissel vizsgáltuk a MYPT1 Thr696-os foszforiláció ellenőrzésére, mivel ezen foszforilációs hely poszttranszlációs módosítása a MYPT1 aktivitását szabályozó helye, illetve szubsztrátja mind a ROK, mind pedig potenciálisan a PPM1B enzimnek. A ROK és PPM1B aktivitásának ellenőrzése céljából negatív kontroll csoportként GST, és GST-MYPT1 fehérjéket használtunk, amelyek sem ROK sem PPM1B általi kezelésen nem estek át.

A MYPT1 Thr696 oldalláncának foszforilációjának Western blot analízise alapján a ROK sikeresen foszforilálta a gátló Thr696 aminosavmaradékot, melynek módosítatlan



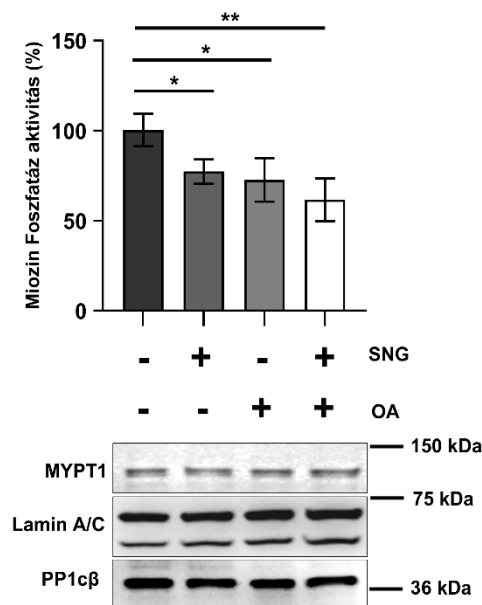
**14. ábra:** A PPM1B aktiválja az MP-t a MYPT1 Thr696 gátló foszforilációjának defoszforilálásával. (A) Tisztított GST vagy GST-MYPT1-t Glutation-Szefaróz 4B gyöngyökhöz kapcsoltunk. A gyöngyökhöz kötött GST-MYPT1-et ROK segítségével foszforiláltuk, majd PPM1B-vel inkubáltuk Mg<sup>2+</sup> és Mn<sup>2+</sup> ionok jelenlétében, vagy a nélkül, vagy Mg<sup>2+</sup> és Mn<sup>2+</sup> ionok + 1 μM Sanguinarine jelenlétében. A GST-MYPT1 foszforilációjának változását Western blot analízissel vizsgáltuk MYPT1<sup>pT696</sup> ellen termeltetett antitest alkalmazásával. Két csoportot párosítatlan kétmintás t-próbával, több csoportot egy utas ANOVA-val hasonlítottunk össze, ahol p < 0,05 (\*), p < 0,01 (\*\*) és p < 0,001 (\*\*\*). Egy oszlop értéke értékek n=3–11, átlag ± SD. SNG: sanguinarine, OA: okadánsav, ROK: RhoA-aktivált protein kináz.

fehérjéhez viszonyított relatív foszforilációja 8,61-szeresére nőtt (p=0,0004) a negatív kontroll GST-MYPT1 csoporthoz képest. A tisztított rekombináns, enzimatikusan aktív PPM1B hozzáadása szignifikánsan, 4,8-szorosan, azaz 1,99-ről 0,404-re csökkentette (p=0,0031) a MYPT1<sup>pT696</sup> relatív foszforilációját. Ezen relatív foszforilációban mutatkozó szignifikáns csökkenés a PPM1B foszfatázzal kezelt csoportban a ROK kezelt pozitív kontroll csoporthoz képest jelzés értékűen mutatja, hogy a MYPT1 Thr696 foszforilációs helyét valóban a PPM1B defoszforilálja, így a MYPT1 a PPM1B szubszttrátja.

A PPM1B aktivitásának élő sejteken való gátlásához a PPM1B enzimcsalád specifikus gátlószerét, a SNG használtuk. Az SNG egy olyan növényi benzo(c)fenantridin alkaloida, amelyet erős és specifikus PPM1B enzim gátlóként azonosítottak, illetve azért is esett ezen SNG vegyület alkalmazására a választásunk, mivel jelenleg nem áll rendelkezésre kereskedelmi forgalomban PPM1B-specifikus inhibitor, illetve az SNG-t széles körben használták a PPM1B gátlására (162,163). E célra olyan kísérleti körülményt hoztunk létre, ahol a hozzáadott PPM1B enzimen kívül további 1 μM SNG is a közegbe került. Ezen előzetes megfontolások után a

PPM1B, ROK és SNG kombinált kezelési körülmény hatására a MYPT1 Thr696 gátló helyének foszforilációja 2,76-szorosára nőtt ( $p=0,0062$ ) azon csoport relatív foszforilációs értékéhez képest, ahol mintát ROK- és PPM1B által együttesen kezeltük. Végezetül a PPM1B  $Mn^{2+}/Mg^{2+}$  ion-függőségét is vizsgálni kívántunk, ezért olyan kísérleti körülményt alkalmaztunk, ahol az ionok kivonásra kerültek a közegből kelátor segítségével. A  $Mn^{2+}/Mg^{2+}$  ionok elvonásával MYPT1 Thr696 foszforilációja 2,738-szorosára nőtt ( $p=0,006$ ) a ROK és PPM1B által együttesen kezelt csoport értékéhez képest, ami bizonyítja a folyamat fémion-függőségét, és így a PPM1B által kifejtett hatást.

A PPM1B MYPT1 szabályozásában betöltött további szerepének feltérképezése érdekében *in vitro* enzimaktivitást mérő vizsgálatot kívántunk kivitelezni HeLa sejtek kultúrájában, melynek célja a MP enzim aktivitásának mérése volt, különböző gátlószerek hozzáadása esetén, kezeletlen kontroll körülményhez viszonyítva (15. ábra). Kísérleti körülményeink során PP1 és 2 gátló OA-t (73), és ismételten a PPM1B inhibitorát, az SNG-t és alkalmaztuk (163). Az MP aktivitást HeLa sejtizátumokban mértük csirkeizólát, radioaktív izotóppal jelölt  $^{32}P$ -miozint használva az enzim szubsztrátjaként (161) (15. ábra). Az irodalmi adatok alapján a MYPT1 alegység PP1c katalitikus alegységgel való

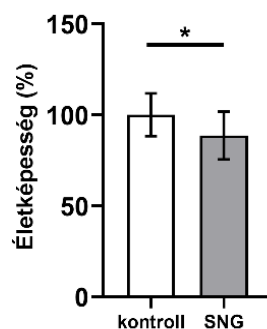


15. ábra: A PPM1B gátlása csökkenti az MP aktivitását. A HeLa sejteket  $1 \mu M$  SNG-vel vagy  $50 nM$  OA-val, avagy ezek kombinációjával kezeltük, kontrollként kezeletlen mintát alkalmaztunk. A miozin-foszfátáz aktivitását  $1 \mu M$   $^{32}P$ -miozin szubsztráttal szemben értékeltük. A mintákban felszabaduló  $^{32}P$ -t mértékét normalizáltuk az MYPT1 fehérje mennyiségéhez, amelyet GST-MYPT1 rekombináns fehérjén alapuló kalibrációs görbe segítségével számítottunk ki, és az értékeket a kontroll csoport %-os arányában ábrázoltuk oszlopdiaagrammon, ahol egy oszlop értéke a csoport átlagát mutatja,  $\pm SD$ ;  $n=3$ . A csoportokat egyutas ANOVA-val, Tukey post-hoc teszttel követve hasonlítottuk össze, ahol  $p < 0,05$  (\*) és  $p < 0,01$  (\*\*). A sejtizátumok MYPT1 és PP1c MP holoenzim tartalmának vizsgálata céljából Western blot analízis készült MYPT1, PP1cβ elleni antitestek felhasználásával, belső kontrollként lamin A/C szolgált. SNG: sanguinarine, OA: okadansav.

kölcsönhatása révén szignifikánsan növeli a PP1c katalitikus alegység enzimaktivitását foszforilált miozinnal szemben (7). Továbbá elfogadott, hogy a simaizom teljes miozin (vagy nehéz meromiozin) hatékonyan csak az MP holoenzim által defoszforilálódik sejtlizátumokban, illetve szövetkivonatokban. Ezért a  $^{32}\text{P}$ -miozint szubsztrátként alkalmazó vizsgálatok kizárólag az MP enzim aktivitását tükrözik (161).

A MP enzimaktivitása a PPM1B SNG általi gátlása következtében 23%-os ( $p=0,02$ ) csökkenést mutatott a kezeletlen kontroll 100%-nak vett értékéhez képest (**15. ábra**). Ezen változás jelezte a PPM1B gátoltságának szerepét az MP aktivitásának függvényében. Az OA (okadánsav), amely szelektív protein-foszfataz 1 és 2A inhibitor, 50 nM-os koncentrációban alkalmazva 29%-os aktivitáscsökkenést ( $p=0,04$ ) eredményezett az MP aktivitásban HeLa sejtekben kezeletlen kontroll csoporthoz viszonyítva. Az OA és SNG inhibitorok kombinált alkalmazása additív hatást mutatott, és 40%-os csökkenést eredményezett ( $p=0,007$ ) a kezeletlen kontrollhoz képest. Mivel az OA 50 nM-os koncentrációban csak a PP2A-t gátolja, a PP1-et nem (70), és még 1  $\mu\text{M}$  OA alkalmazása sem befolyásolta a PP1 aktivitását a sejtekben (164), ezért eredményeink alapján elmondható, hogy a MP holoenzim aktivitását nem a PP1c katalitikus alegység közvetlen gátlása módosította, hanem a MYPT1 szabályozó alegység poszttranszlációs módosításán keresztül, közvetett szabályozó elemek, mint pl.: a PP2A vagy PPM1B gátoltsága csökkentették az MP teljes enzimaktivitását.

Ezen MP aktivitást mérő kísérlet előzményeként figyelembe kellett vegyünk azon előzetes irodalmi adatokat, melyek az SNG életképességre kifejtett hatását lejegyezték. Yu és munkatársai 2020-ban kimutatták (165), hogy 4  $\mu\text{M}$  SNG-kezelés 24 órán keresztül szignifikánsan gátolta a THP-1 sejtek proliferációját, és elősegítette az apoptózist. Aburai és



**16. ábra:** Az SNG kezelés csökkenti a HeLa sejtek életképességét. HeLa sejtek 1  $\mu\text{M}$  SNG-vel kezeltünk (szürke oszlopok) avagy nem kezeltünk (fekete oszlop) 1 órán át, PPM1B inhibíció céljából. A kezelés végeztével a sejtek életképességét Alamar Blue esszé segítségével mértük. Az életképességet a kezeletlen csoport esetén 100%-nak tekintettük, ennek arányában ábrázoltuk a kezelt csoport eredményét oszlopdiagrammon, ahol egy oszlop az adott csoport átlagértéke  $\pm$  SD ( $n=4$ ). A statisztikai elemzést párosítatlan, kétmintás  $t$ -teszttel végeztük, ahol  $p < 0,05$  (\*). SNG: sanguinarine

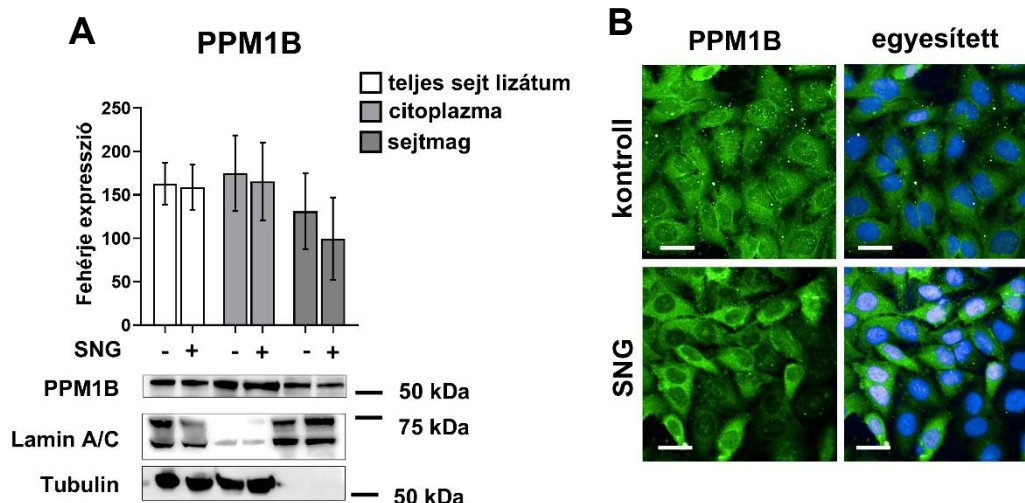
munkatársai 2010-ben (162) 1  $\mu$ M SNG-kezelés hatására megnövekedett kaszpáz 3/7 aktivitást mutattak ki már 6 óra elteltével is. Ezen előzetes irodalmi adatok ismeretében szükségesnek ítéltük meg a MP aktivitását mérő kísérletünk előzményeképpen, hogy megvizsgáljuk az SNG HeLa sejtek életképességére kifejtett hatását. A **16. ábrán** bemutatott eredményeink alapján a 60 percen keresztül alkalmazott 1  $\mu$ M SNG-kezelés 11,42%-kal csökkentette a HeLa sejtek életképességét kezeletlen kontroll csoporthoz viszonyítva ( $p=0,0105$ ) Alamar Blue életképességi teszt alapján.

### **A PPM1B gátlása a MYPT1 gátló foszfoszilációjának emelkedését okozza HeLa sejtek nukleáris frakciójában**

Előzetes kísérleteink eredményként bizonyítottuk, hogy a PPM1B SNG általi gátlása előidéz a MYPT1 gátló foszforilációs helyének megnövekedett foszforilációját *in vitro* kináz esszé esetén (**14. ábra**), illetve ezen módosításon keresztül az MP holoenzim aktivitásának csökkenését HeLa sejteken végzett enzimaktivitás mérés esetén (**15. ábra**).

A PPM1B gátlás MP-re gyakorolt *in vitro* szabályozó hatásának további, *in vivo* hatásának feltérképezése érdekében HeLa sejteket kezeltünk 1  $\mu$ M SNG-vel 1 órán keresztül. Mivel a MYPT1 és PPM1B közötti kölcsönhatást a citoszolikus és sejtmagi frakcióban is azonosítottuk, és előzetes eredmények alapján a PPM1B-t mint a MP feltehetően egyetlen sejtmagi szabályozó enzimeként azonosították (9), ezért a PPM1B gátlás hatását az SNG kezelt és kezeletlen HeLa sejtek több szubcelluláris frakciójában, úgy, mint teljes sejtlizátumban, citoplazmatikus és nukleáris frakcióban is vizsgálni kívántuk (**17. ábra**).

Első lépésként szerettük volna kizárni az SNG kezelés hatását a PPM1B fehérje expressziójára és lokalizációjának megváltozására a kezelés időtartama alatt, ennek érdekében, HeLa sejtek SNG kezelt, avagy kezeletlen, teljes sejtlizátumait, nukleáris és citoplazmatikus frakcióit Western blot, illetve immunfluoreszcens technikával vizsgáltuk (**17. ábra**). Eredményeink alapján az SNG kezelés szignifikánsan nem változtatta sem a PPM1B fehérje lokalizációját immunfluoreszcens technikával vizsgálva, sem pedig expresszióját Western blot analízissel elemezve (**17. ábra**). A különböző szubcelluláris frakciók tisztaságát minden esetben tubulinnal és lamin A/C-vel igazoltuk, melyek kizárólag sejtplazmában és sejtmagban található marker fehérjék.

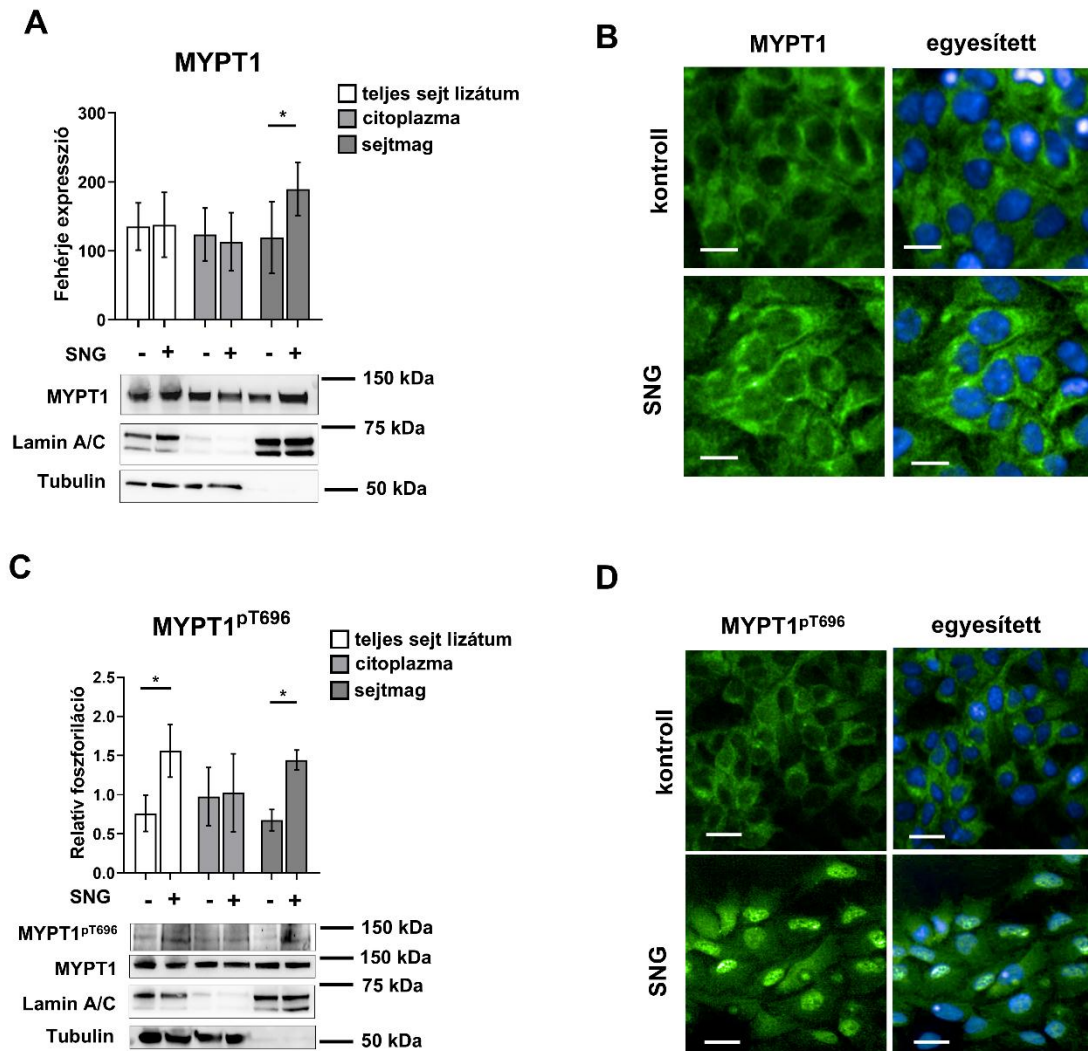


**17. ábra:** Az SNG kezelés nem módosítja a PPM1B expresszióját és lokalizációját HeLa sejtekben. (A) Kezeletlen vagy SNG-kezelt HeLa sejtek teljes sejtlizátumából, citoplazmatikus és nukleáris frakciójából származó fehérjemintákat SDS-PAGE segítségével elválasztottunk el, majd Western blot analízissel vizsgáltunk anti-PPM1B antitest segítségével. Az oszlopok a PPM1B expresszióját mutatják, ahol egy oszlop értéke átlag  $\pm$  SD ( $n=3-6$ ). (B) Kontroll kezeletlen és SNG-vel kezelt HeLa sejtek immunfluoreszcens festése PPM1B-re specifikus elsődleges antitesttel, melyet Alexa 488 (zöld) fluorofórral keresztkötött másodlagos antitesttel jelöltünk. A sejtmagokat DAPI-val festettük (kék). Méretarány: 10  $\mu$ m.

A PPM1B fehérje vizsgálata után figyelmünket a MYPT1 expressziójára, lokalizációjára és foszforilációjára fordítottuk (18. ábra). Eredményeink alapján az SNG nem befolyásolta a MYPT1 expresszióját, azonban 1,58-szorosára növelte a sejtmagi MYPT1 mennyiségét ( $p=0,0233$ ) az alkalmazott 1 órás kezelés végére, ami jelzi, hogy a MYPT1 a PPM1B gátlása következtében a sejtmagba transzlokálódott (18A. ábra). Ezt az eredményt immunfluoreszcens festéssel is igazoltuk (18B. ábra), ahol a MYPT1 nagyobb intenzitással festődött a HeLa sejtek DAPI-val jelölt területein.

Megvizsgáltuk továbbá a MYPT1 Thr696 aminosavmaradékának foszforilációját is (18C. ábra), amely SNG-kezelés hatására a teljes lizátumban 2,048-szorosára emelkedett ( $p=0,0119$ ) kezeletlen kontroll párjához képest. A sejtmagi foszforiláció szignifikánsan, 2,137-szeresére nőtt a MYPT1<sup>pT696</sup> esetében SNG-kezelés hatására ( $p=0,0201$ ) (18C. ábra), és a MYPT1<sup>pT696</sup> fluoreszcens festése (zöld) szintén figyelemreméltó növekedést mutatott kifejezetten a sejtmagi területeken (18D. ábra) immunfluoreszcenciás vizsgálattal követve.

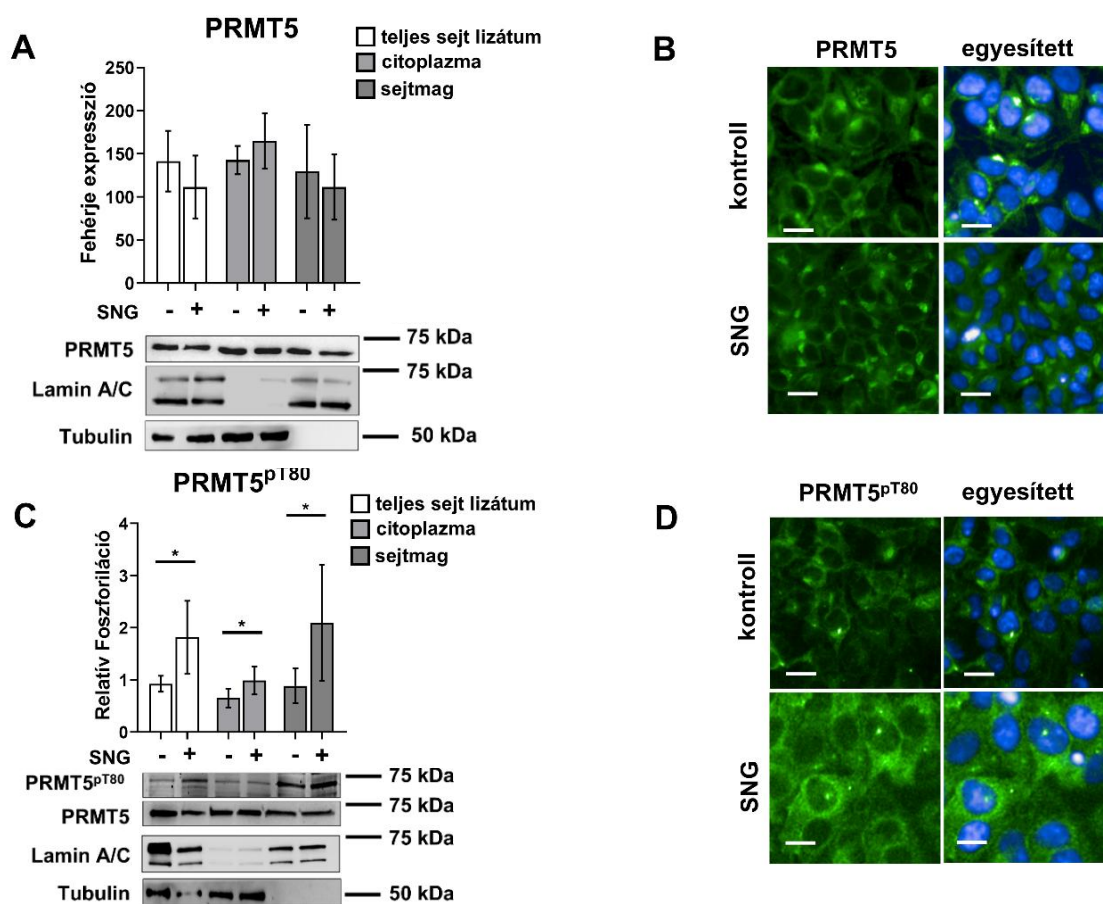
Ezeket a megfigyeléseket összefoglalva kijelenthetjük, hogy a MYPT1 citoplazmából a sejtmagba történő transzlokációját, melyet a Thr696 maradék megnövekedett foszforilációs szintje kísért, a PPM1B gátlása idézte elő (**18. ábra**).



**18. ábra:** Az SNG kezelés előidézi a MYPT1 magi transzlokációját a Thr696-os foszforiláció emelkedésén keresztül HeLa sejtekben. Kezeletlen vagy SNG-kezelt HeLa sejtek teljes sejlizátumából, citoplazmatikus és sejtmagi frakciójából származó fehérjemintákat SDS-PAGE segítségével elválasztottunk el, majd Western blot analízissel vizsgáltunk MYPT1 (A) és MYPT1<sup>T696</sup> (C) ellen termeltetett elsődleges antitestek segítségével. Az oszlopok a MYPT1 expresszióját (A), illetve a MYPT1<sup>pT696</sup> relatív foszforilációját (C) mutatják, ahol egy oszlop értéke átlag ± SD (n=3-13). Két csoportot kétmintás, párosítatlan t-tesztel, több csoportot kétutas ANOVA-val hasonlítottunk össze, ahol: p < 0,05 (\*). (B) és (D): Kontroll kezeletlen és SNG-vel kezelt HeLa sejtek immunfluoreszcens festése MYPT1-re (B) és MYPT1<sup>pT696</sup>-re (D) specifikus elsődleges antitestekkel, melyeket Alexa 488 (zöld) fluorofórral jelölt másodlagos antitesttel keresztköttünk. A sejtmagokat DAPI-val festettük (kék). Méretarány: 10 µm. SNG: sanguinarine.

## A PPM1B gátlása a PRMT5 aktivitásának szabályozásán keresztül közvetve modulálja a génexpressziót a H4 fehérje szimmetrikus dimetilációjának módosítása révén

Előzetes irodalmi adatokból jól ismert tény, miszerint a MP szabályozó hatást fejt ki a PRMT5 fehérjére azáltal, hogy a PRMT5 Thr80-as aktiváló hatású aminosavoldalláncának defoszforilálása révén gátolja a PRMT5 működését (9). Ezen előzetes eredményre támaszkodva célul tűztük ki megvizsgálni a PPM1B inhibitor, az SNG kezelés hatását a PRMT5 aktivitására és expressziójára (19. ábra), illetve a PRMT5 szubsztrátjának, a H4



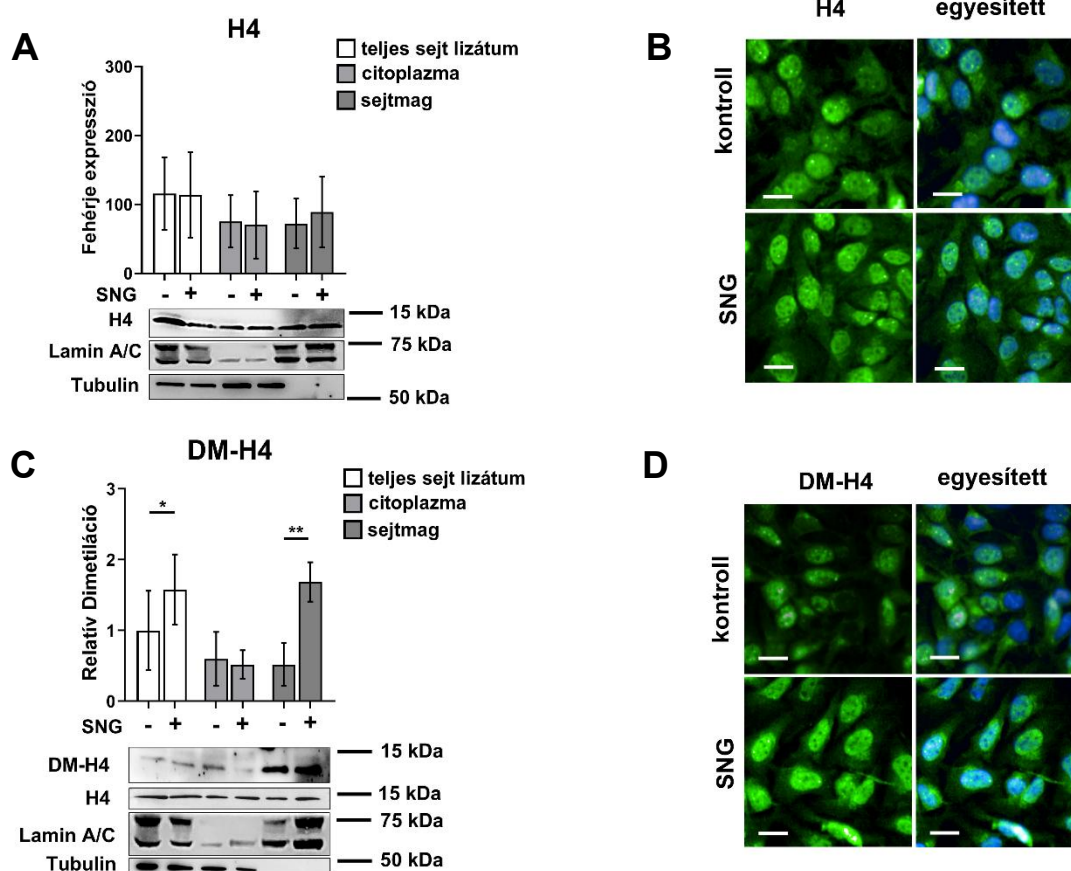
19. ábra: Az SNG kezelés nem változtatja sem a PRMT5 expresszió szintjét sem sejten belüli lokalizációját, de növeli annak aktivitását a Thr80-as foszforiláció emelésén keresztül HeLa sejtekben. Kezeletlen vagy SNG-kezelt HeLa sejtek teljes sejt-lizátumából, citoplazmatikus és nukleáris frakciójából származó fehérjemintákat SDS-PAGE segítségével elválasztottunk el, majd Western blot analízissel vizsgáltunk PRMT5 (A) és PRMT5<sup>pT80</sup> (C) ellen termeltetett elsődleges antitestek segítségével. A diagrammok a PRMT5 expresszióját (A), illetve a PRMT5<sup>pT80</sup> relatív foszforilációját (C) mutatják, ahol egy oszlop értéke átlag ± SD (n=3-12). Két csoportot kétmintás, párosítatlan t-tesztel, több csoportot kétutas ANOVA-val hasonlítottunk össze, ahol:  $p < 0,05$  (\*). (B) és (D): Kontroll kezeletlen és SNG-vel kezelt HeLa sejtek immunfluoreszcens festése PRMT5-re (B) és PRMT5<sup>pT80</sup>-re (D) specifikus elsődleges antitestekkel, melyeket Alexa 488 (zöld) jelölt másodlagos antiesttel keresztkötöttünk. A sejtmagokat DAPI-val festettük (kék). Méretarány: 10  $\mu$ m. SNG: sanguinarine

fehérjének az expressziójára, illetve szimmetrikus dimetilációjára (**20. ábra**). Kísérleteinkben HeLa sejtek szubcelluláris frakcióit Western blot analízissel (**19A.,C. és 20A.,C. ábra**) és immunfluoreszcens festéssel (**19B.,D. és 20B.,D. ábra**) vizsgáltuk.

Eredményeink alapján a PRMT5 expresszióját egyik vizsgált sejtfrakcióban sem befolyásolta az 1 óra hosszúságú SNG kezelés (**19A. ábra**), azonban a Thr80-as aminosavdallanc foszforilációjának relatív mértéke szignifikánsan megnövekedett az összes vizsgált sejtkompartmentumban az SNG kezelés hatására (**19C. ábra**). Így a SNG kezelés hatására a teljes sejtlizátumban, a citoplazmában, valamint a nukleáris frakcióban a PRMT5 Thr80-as foszforilációjának relatív mértéke 1,96-szorosára ( $p=0,0493$ ), 1,5-szeresére ( $p=0,0437$ ) és 2,36-szorosára ( $p=0,0208$ ) nőtt az SNG kezelésen át nem esett negatív kontroll mintához képest (**19C. ábra**).

Megvizsgáltuk továbbá a H4 expresszióját is (**20A. és B. ábra**), valamint annak szimmetrikus dimetilációját (**20C. és D. ábra**) Western blot analízissel. Korábbi eredményeinkkel összhangban, az SNG kezelés hatására a H4 szimmetrikus dimetilációjának relatív mértéke teljes sejtlizátumban a 1,54-szeresére ( $p=0,0339$ ), míg a sejtek magi frakciójában vizsgálva 3,25-szeresére nőtt ( $p=0,0035$ ) (**20C. ábra**) anélkül, hogy a H4 fehérje expressziós szintjében változás történt volna a kezelés hatására (**20A. ábra**).

Fluoreszcens mikroszkópiával készített képeink alapján a PRMT5, PRMT5<sup>pT80</sup>, H4 illetve DM-H4 fehérjék nem mutattak lokalizációs változást, Western blot analízissel pedig expressziós szintű változást sem. (**19. és 20. ábra**).



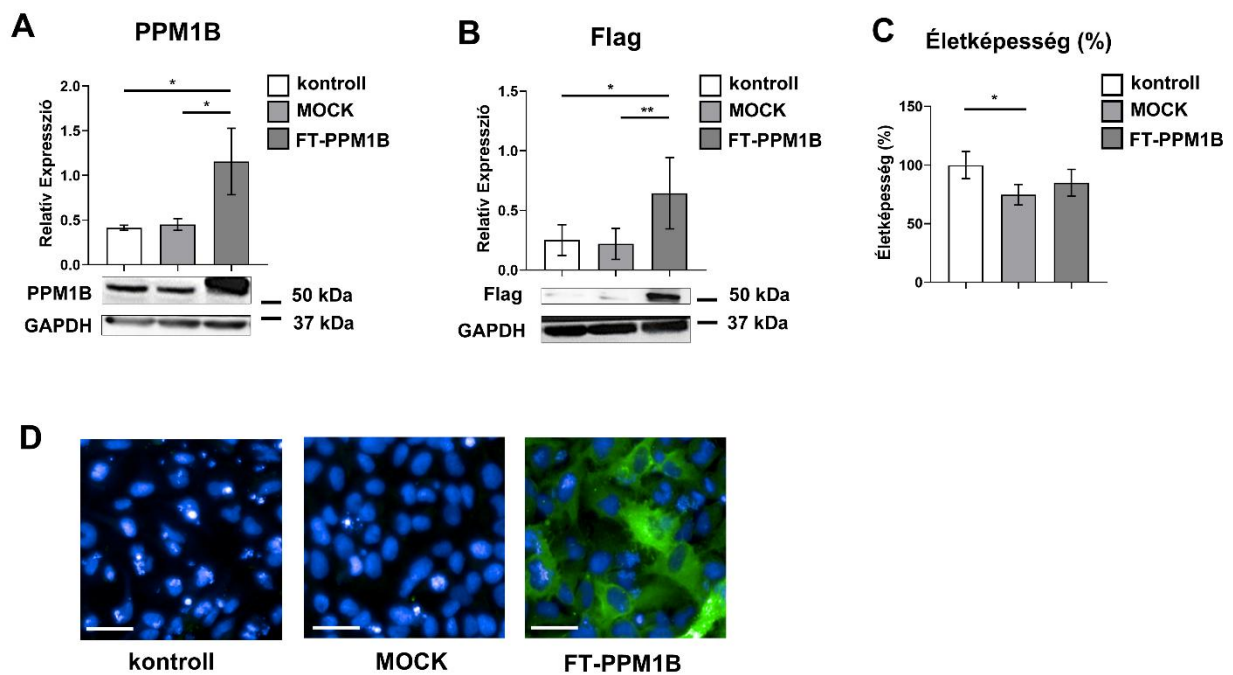
20. ábra: Az SNG kezelés nem változtatja sem a H4 fehérje kifejeződési szintjét sem sejten belüli lokalizációját, de növeli annak szimmetrikus dimetilációját, közvetett módon, a PRMT5 aktiválása által, HeLa sejtekben. Kezeletlen vagy SNG-kezelt HeLa sejtek teljes sejtlyizátumából, citoplazmatikus és nukleáris frakciójából származó fehérjemintákat SDS-PAGE segítségével elválasztottunk el, majd Western blot analízissel vizsgáltunk H4 (A) és DM-H4 (C) ellen termeltetett elsődleges antitestek segítségével. A diagrammok a H4 expresszióját (A), illetve annak relatív szimmetrikus dimetilációját (C) mutatják, ahol egy oszlop értéke átlag  $\pm$  SD ( $n=3-12$ ). Két csoportot kétmintás, párosítatlan  $t$ -teszttel, több csoportot kétutas ANOVA-val hasonlítottunk össze, ahol:  $p < 0.05$  (\*) és  $p < 0.01$  (\*\*). (B) és (D): Kontroll kezeletlen és SNG-vel kezelt HeLa sejtek immunfluoreszcens festése H4-re (B) és DM-H4-re (D) specifikus elsődleges antitestekkel, melyeket Alexa 488 (zöld) fluorofórral jelölt másodlagos antitesttel keresztkötöttünk. A sejtmagokat DAPI-val festettük (kék). Méretarány: 10  $\mu$ m, SNG: sanguinarine

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

Mivel a SNG az  $Mg^{2+}/Mn^{2+}$ -függő foszfatázok összes tagját gátolja (21), és jelenleg kereskedelmi forgalomban nem elérhető olyan inhibitor, ami specifikus PPM1B gátlást biztosítana, ezért kísérletünk következő lépéseként célul tűztük ki, hogy kimutassuk a PPM1B izoformához kapcsolódó specifikus hatásokat HeLa sejteken. Ennek az izoformának célzott,

specifikus csendesítése, vagy kiütése nehézségekbe ütközött, illetve biológiailag is kérdésesnek bizonyult, mivel már korábban lejegyzett irodalmi adat, miszerint számos daganatos szövetben a PPM1B expressziójának szintje már eleve csökkent, vagy szinte teljesen megszűnt a kontrollhoz képest, és az eddigi kísérleteinkhez alkalmazott HeLa sejtvonal cervicalis adenocarinomából származott (166).

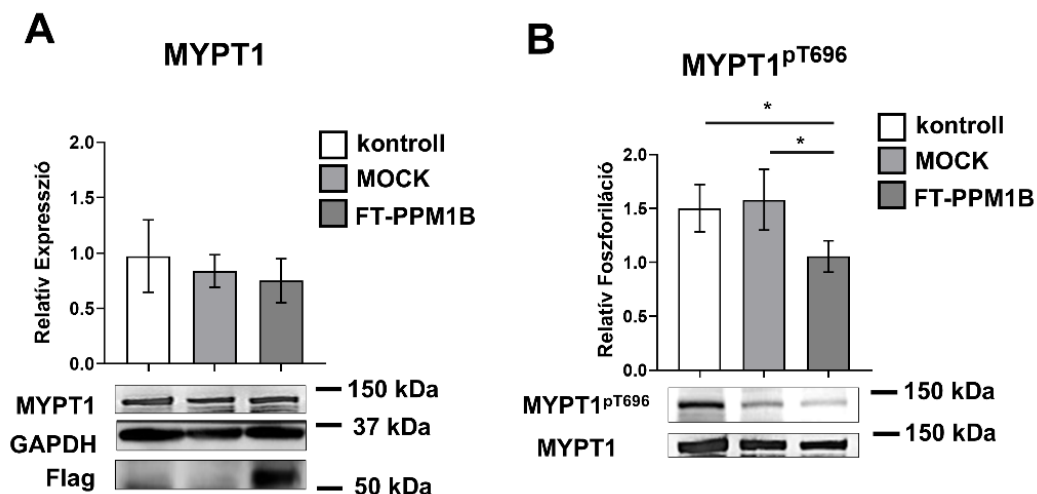
Ezen előzetes ismereteink alapján végül a PPM1B specifikus hatásait az enzim overexpressziójával igazoltuk, amihez a Flag-jelölt rekombináns fehérjével transzfektálunk HeLa sejteket, izoláltan előidézve a PPM1B izoforma túltermelődést (**21. ábra**). Az FT-PPM1B transzfekció hatékonyságát Western blot analízissel validáltuk, mind Flag-jelölt, mind pedig endogén PPM1B kifejeződésének mértékét vizsgálva a transzfekció során létrehozott kezeletlen kontroll, MOCK kontroll, illetve FT-PPM1B transzfektált csoportokban. Továbbá



**21. ábra:** Az FT-PPM1B transzfekció validálása HeLa sejt kultúrában. Nem kezelt (kontroll), üres vektorral transzfektált (MOCK) vagy Flag jelölt PPM1B szekvenciát tartalmazó plazmiddal (FT-PPM1B) transzfektált HeLa sejt kultúrából származó fehérjéket Western blot analízist vizsgáltunk anti-Flag (A) és anti-PPM1B (B) antitestekkel. Az egyedi fehérjék egyes mintákban mért expressziójának normalizálására GAPDH belső kontrollt alkalmaztunk, eredményeinket oszlopdiagramokon ábrázoltuk, ahol egy oszlop az adott csoport átlagértékét +/- SD formátumban mutatja (n=3-6). A csoportokat egy utas ANOVA-val hasonlítottuk össze, ahol  $p < 0,05$  (\*) és  $p < 0,01$  (\*\*). (C) A HeLa sejtek életképessége a FT-PPM1B transzfekció esetén, Alamar Blue esszé segítségével mérve. A kezeletlen kontroll csoport életképességét 100%-nak véve egy oszlop az adott csoport átlaga +/- SD értéket mutat (n=4). A csoportokat egy utas ANOVA-val hasonlítottuk össze, ahol  $p < 0,05$  (\*). (D) Immunfluoreszcens festés kontroll-, üres vektorral transzfektált (MOCK), valamint FT-PPM1B-vel transzfektált HeLa sejtekben, Flag-specifikus elsődleges antitest használatával, melyet Alexa488-as fluorofórral jelölt másodlagos antitesttel keresztkötöttünk (zöld). A sejtmagokat DAPI-vel festettük meg (kék). Méretarány: 20  $\mu$ m.

köveztük a FT-PPM1B expressziójának növekedését immunfluoreszcens festéssel úgy, hogy az anti-Flag elsődleges antitestet Alexa 488-as fluorofórral jelölt másodlagos antitesttel jelölve vizsgáltuk a fluoreszcens jel intenzitásának változását. A transzfekció hatását a sejtek életképességére Alamar Blue esszé segítségével is ellenőriztük. (21. *ábra*). A Flag-jelölt fehérjeexpressziós szintje 2,57-szeres ( $p=0,0113$ ) és 2,93-szoros ( $p=0,0066$ ) emelkedést mutatott FT-PPM1B transzfektált csoportban kontroll kezeletlen, illetve MOCK csoporthoz viszonyítva (21A. *ábra*). Az endogén PPM1B fehérje szintje 2,81-szeresére ( $p=0,0141$ ) és 2,56-szorosára ( $p=0,0179$ ) emelkedett a transzfekció hatására a kezeletlen kontroll, illetve MOCK kontroll csoportokhoz képest (21B. *ábra*). A transzfekció hatását a sejtek életképességére Alamar Blue esszé által vizsgálva kimutatta, hogy a transzfekciós protokoll a kezeletlen kontrollhoz képest szignifikáns, 25,25%-os ( $p=0,021$ ) életképesség-csökkenést váltott ki a MOCK kontroll csoportban, azonban szignifikáns életképességváltozást nem tapasztaltunk a kezeletlen kontroll csoportot az FT-PPM1B transzfekción átesett sejtekhez viszonyítva (21C. *ábra*).

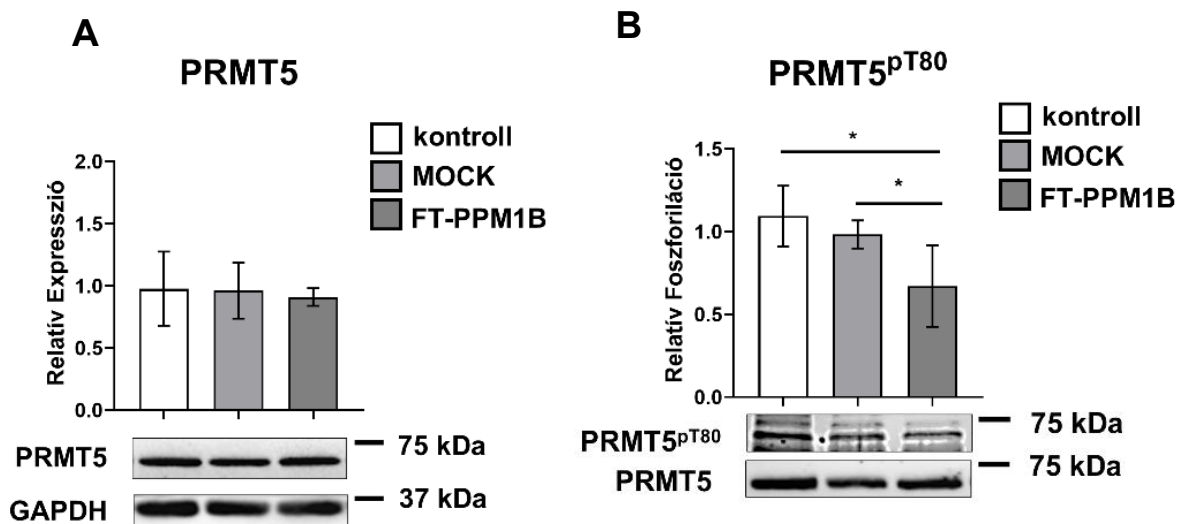
A PPM1B túltermeltetése nem befolyásolta az MYPT1 (22A. és 25A. *ábra*) expresszióját sem a MOCK csoporthoz, sem a kezeletlen kontroll csoporthoz képest, ami arra utal, hogy a PPM1B nem fejt ki hatást ezek gének expressziós folyamataira. Tovább vizsgálva viszont a MP aktivitását, eredményeink szerint az FT-PPM1B transzfekciója hatására a MYPT1 Thr696 oldalláncának relatív foszforilációs mértéke 0,7-szeresére csökkent



22. *ábra*: Az FT-PPM1B transzfekció hatása az MP expressziójára és aktivitására HeLa sejteken. Nem transzfektált (kontroll), üres (MOCK) és Flag-PPM1B szekvenciát tartalmazó (FT-PPM1B) vektorral transzfektált HeLa sejtek fehérjéit Western blot analízissel vizsgáltunk anti-MYPT1 (A), anti-MYPT1<sup>pT696</sup> (B) elsődleges antitestek felhasználásával. A kapott eredményeket oszlopdiagrammon ábráztuk, ahol egy oszlop az adott csoport átlagát  $\pm$  SD mutatja,  $n=3-6$ . Két csoportot párosítatlan kétmintás  $t$ -tesztel, több csoportot egyutas ANOVA-val hasonlítottunk össze, ahol  $p < 0,05$  (\*).

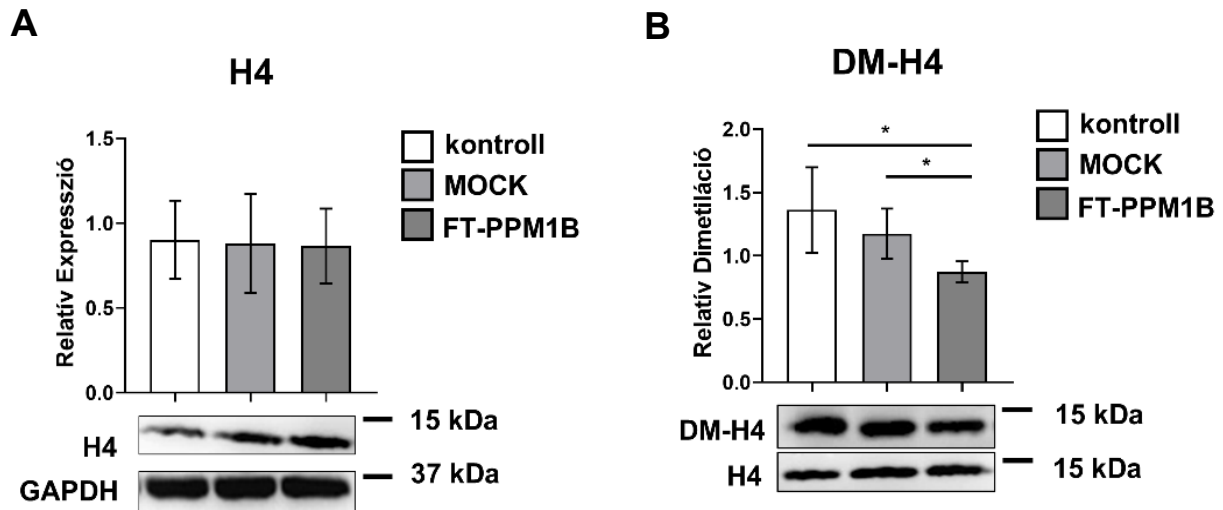
( $p=0,0425$ ) az üres vektorral transzfektált kontrollhoz képest, viszont a transzfekciós protokoll nem befolyásolta a MYPT1 foszforilációját, összehasonlítva MOCK-ot a kontroll csoporttal (**22B. ábra**). Eredményink fluoreszcens festés során is nyomon követhetőek voltak (**25A. és B. ábra**).

Az MP szubsztrátjának, a PRMT5 fehérjének aktivitását a Thr80-as foszforiláció változásával vizsgáltuk (**23B. ábra**). A PRMT5<sup>pT80</sup>-as foszforiláció szignifikáns módon, 0,61-szeres ( $p=0,0158$ ) csökkenést mutatott a PPM1B transzfekció hatására a kezeletlen kontrollhoz képest, illetve 0,68-szoros csökkenést ( $p=0,0354$ ) a MOCK kontrollhoz viszonyítva. A PRMT5 expresszióját egyetlen kezelési körülmény sem változtatta (**23A. ábra**). Western blottal nyert eredményeinket az immunfluoreszcens festés adatai is támogatták (**25B. és D. ábra**). Ezen eredmények azt jelzik, hogy a MYPT1 aktivitása közvetlenül korrelál a PRMT5 aktivitásával, mely összefüggés legfelső elemének, a MYPT1 aktivitásának a PPM1B expresszió növekedése a függvénye.



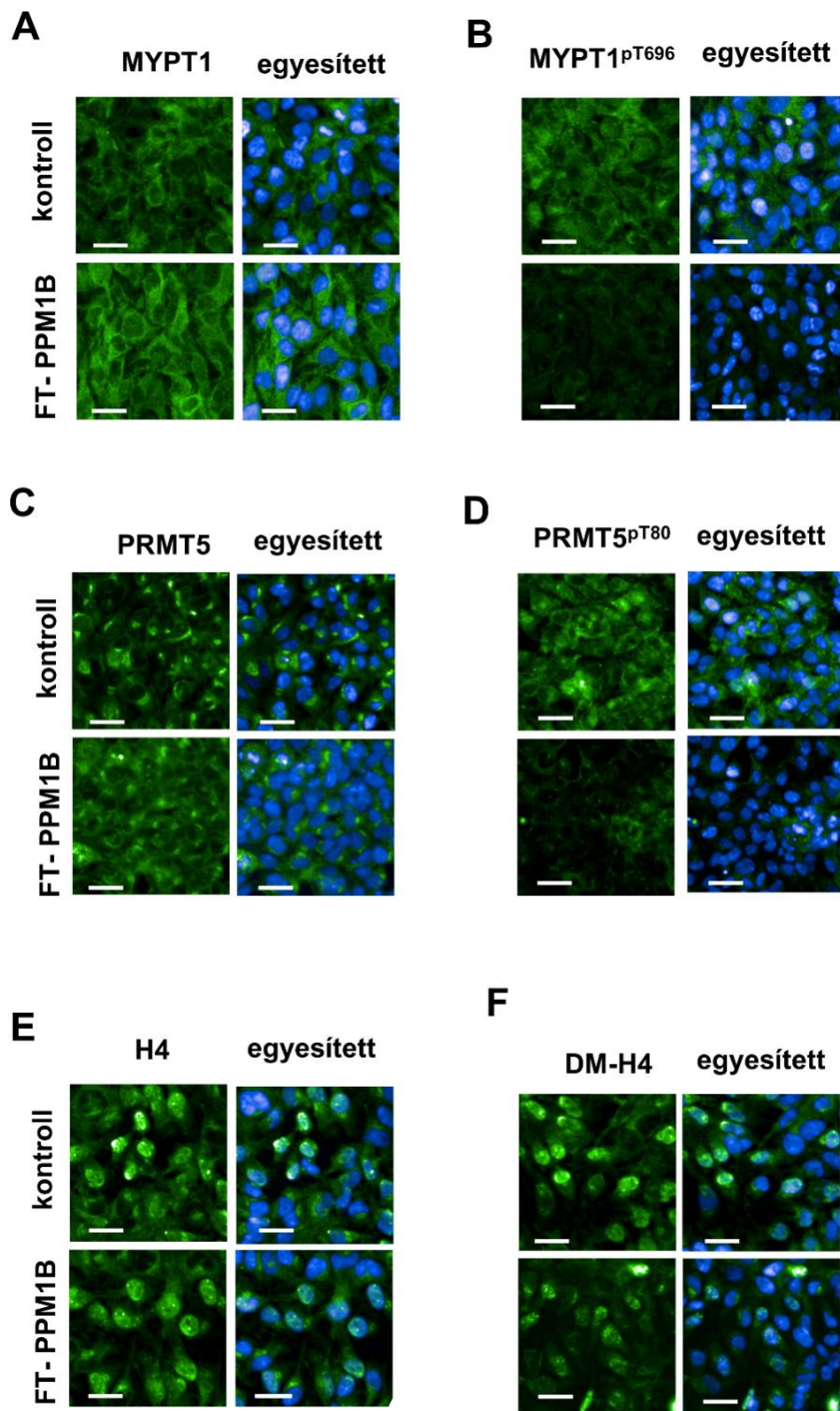
**23. ábra:** Az FT-PPM1B transzfekció hatása a PRMT5 expressziójára és aktivitására HeLa sejteken. Nem transzfektált (kontroll), üres vektorral (MOCK) és Flag-PPM1B szekveniát tartalmazó (FT-PPM1B) vektorral transzfektált HeLa sejtek fehérjéit Western blot analízissel vizsgáltunk anti-PRMT5 (A), anti-PRMT5<sup>pT80</sup> (B) elsődleges antitestek felhasználásával. A kapott eredményeket oszlopdiagrammon ábráztuk, ahol egy oszlop az adott csoport átlagát +/- SD mutatja,  $n=3-6$ . Két csoportot párosítatlan kétmintás  $t$ -teszttel, több csoportot egyutas ANOVA-val hasonlítottunk össze, ahol  $p < 0,05$  (\*).

Ezekkel az eredményekkel összhangban megvizsgáltuk a PRMT5 fő sejtmagi szubsztrátját, a H4 fehérjét, követve annak kifejeződését, illetve szimmetrikus dimetilációját PPM1B túltermeltetés hatására. Bár a H4 fehérje expressziós szintje nem változott egyetlen vizsgált kísérleti körülményben sem (**24A ábra**), szimmetrikus dimetilációjának relatív szintje 0,64-szeresére csökkent ( $p=0,0413$ ) a kezeletlen kontrollhoz és 0,74-szeresére ( $p=0,0312$ ) az MOCK kontroll csoporthoz képest (**24B. ábra**).



**24. ábra:** Az FT-PPM1B transzfekeció hatása az H4 expressziójára és szimmetrikus dimetilációjára HeLa sejteken. Nem transzfekeált (kontroll), üres vektorral (MOCK) és Flag-PPM1B szekvenciát tartalmazó (FT-PPM1B) vektorral transzfekeált HeLa sejtek fehérjeit Western blot analízissel vizsgáltunk anti-H4 (A) és anti-DM-H4 (B) elsődleges antitestek felhasználásával. A kapott eredményeket oszlopdiaqrammon ábrázoltuk, ahol egy oszlop az adott csoport átlagát +/- SD mutatja,  $n=3-6$ . Két csoportot párosítatlan kétmintás  $t$ -teszttel, több csoportot egyutas ANOVA-val hasonlítottunk össze, ahol  $p < 0,05$  (\*).

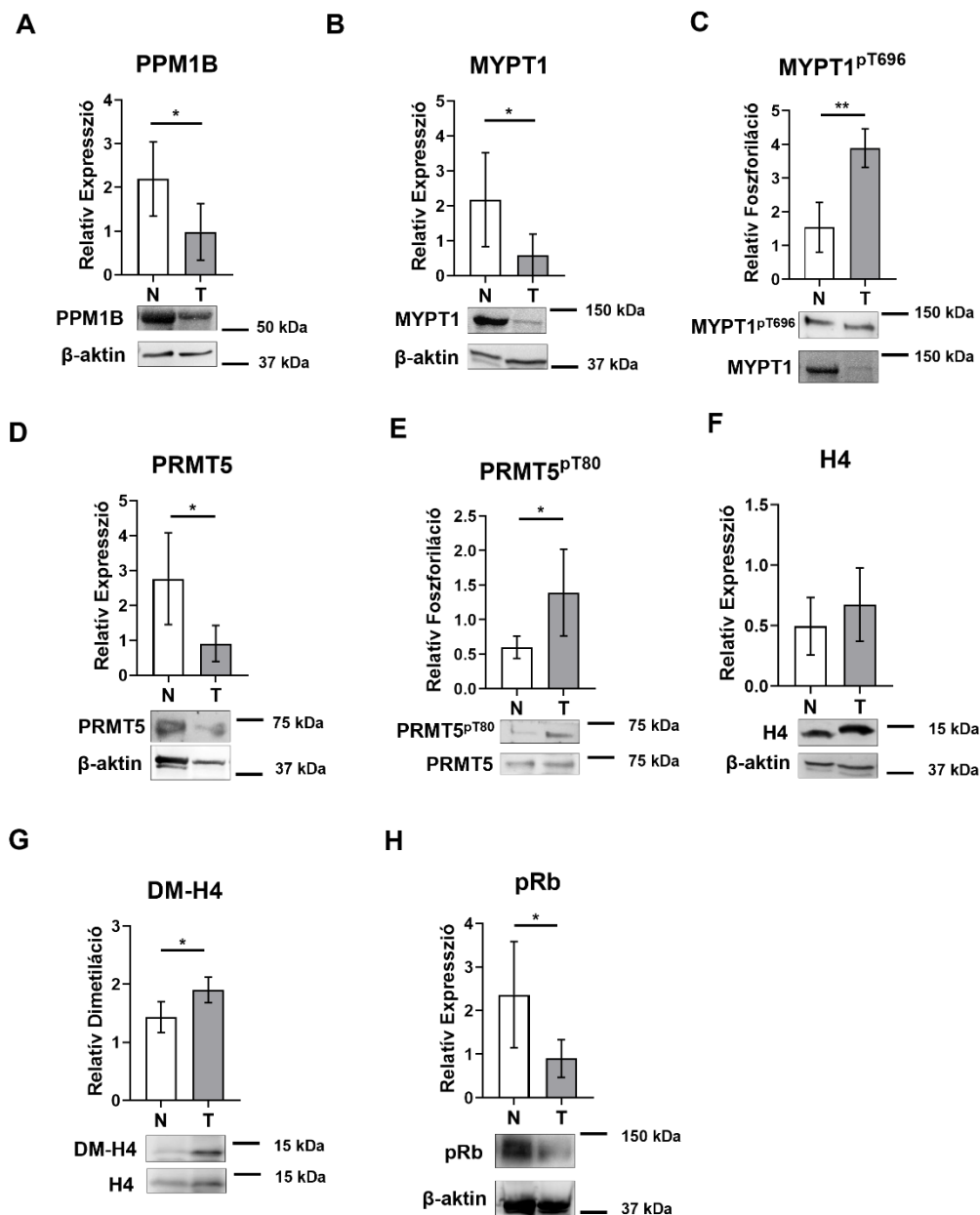
Kísérleteink kiegészítéseképpen immunfluoreszcens festést alkalmaztunk, mely során MYPT1, PRMT5 és H4 expresszióját és poszttranszlációs módosításait követtük. A fehérjékre és poszttranszlációs módosításokra specifikus elsődleges antitesttel keresztkötött Alexa488-as fluorofórral jelölt másodlagos antitest intenzitása és lokalizációja által megfigyelt eredmények összhangban álltak a Western blot analízisből származó adatokkal (**25A-F. ábra**).



25. ábra: Az FT-PPM1B transzfekció hatása az MP/PRMT5/H4 tumorigén tengelyre. Immunfluoreszcens festést végeztünk kontroll kezeletlen és FT-PPM1B transzfekción átesett HeLa sejteken, az alábbi specifikus antitestek felhasználásával: anti-MYPT1 (A), anti-MYPT1<sup>pT696</sup> (B), anti-PRMT5 (C), anti-PRMT5<sup>pT80</sup> (D), anti-H4 (E) és anti-DM-H4 (F), mely elsődleges antitesteket Alexa488-as fluorofórral jelölt másodlagos antitesttel kereszkötöttünk (zöld). A sejtmagokat DAPI-vel festettük (kék). Méretarány: 10  $\mu$ m.

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

Mivel eddigi kísérletink által nyert eredményeink bizonyították a PPM1B/MP/PRMT5/H4 tengely szoros együttműködését méhnyakrák-eredetű HeLa sejtekben, célunk volt ezen protoonkogén jelátviteli útvonal vizsgálata emberből származó



26. ábra: A PPM1B/MP/PRMT5/H4 onkogén jelátviteli útvonal elemeinek expressziója és aktivitása human méhnyakrák mintákban. Normál (N) és daganatos (T) humán cervicalis carcinomából származó szöveti lizátumokat Western blot analízissel vizsgáltunk anti-PPM1B (A), anti-MYPT1 (B), anti-MYPT1<sup>pT696</sup> (C), anti-PRMT5 (D), anti-PRMT5<sup>pT80</sup> (E), anti-H4 (F), anti-DM-H4 (G) és anti-pRb (H) elsődleges antitestek felhasználásával. Eredményeinket oszlopdiagrammon ábráztuk, ahol egy oszlop a csoport átlagát +/- SD formátumban jeleníti meg (n=3-8). A csoportokat párosítatlan kétmintás t-tesztel hasonlítottuk össze, ahol  $p < 0,05$  (\*) és  $p < 0,01$  (\*\*).

cervicalis karcinóma tumoros mintákon, és eltávolításukkor kimetszett ép, nem daganatos szöveteken is, melyeket kontrollként alkalmaztunk.

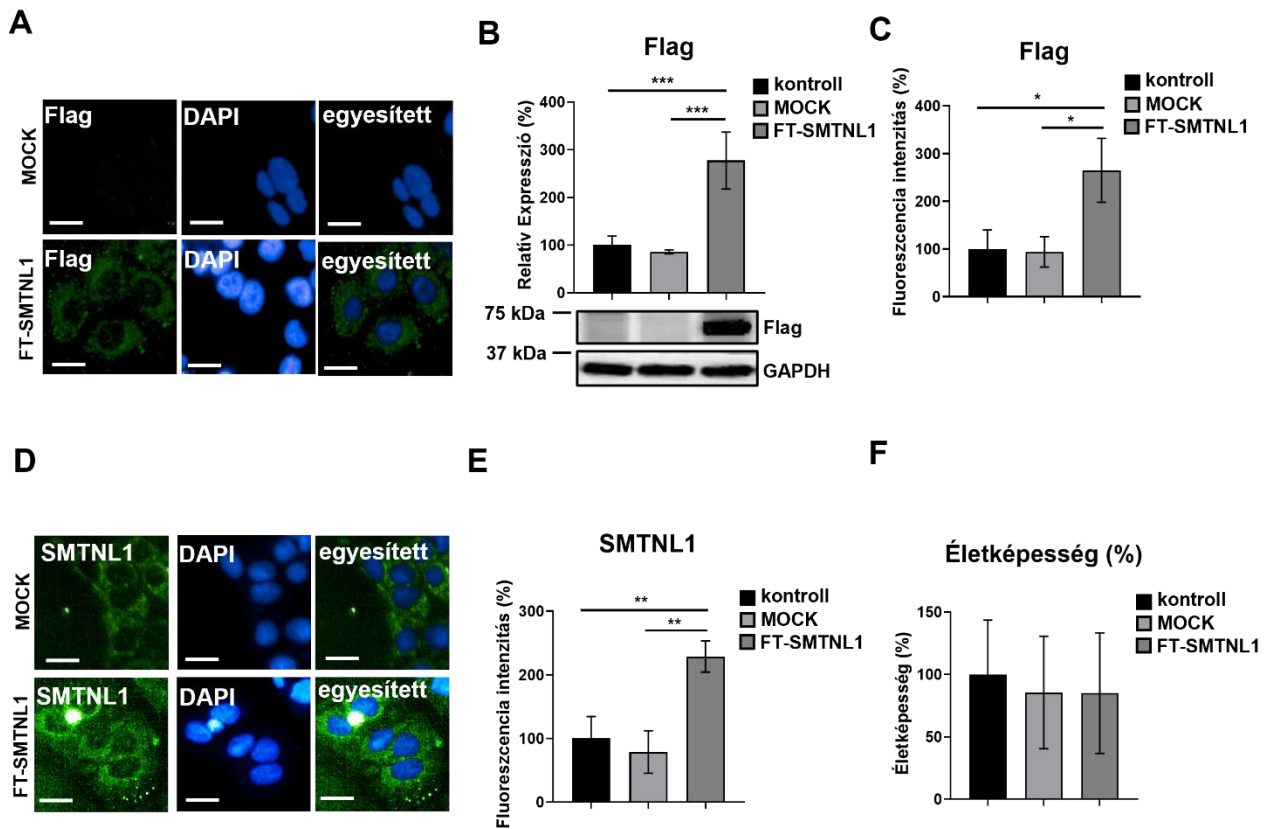
Az emberi biopsziákból származó fehérjemintákat Western blot analízisnek vetettük alá, mely során 18 pár daganatos szövet került ép párjával összehasonlításra. Eredményeink alapján a PPM1B és az MYPT1 fehérjék expressziója szignifikánsan csökkent a daganatos mintákban, a PPM1B 0,44-szeresére ( $p=0,0452$ ) a MYPT1 pedig 0,26-szorosára ( $p=0,0244$ ) a kontroll egészséges szövetekhez képest (**26A. és B. ábra**). Tovább vizsgálva a MYPT1 aktivitását a Thr696 gátló foszforilációs hely relatív foszforilációját mérve, annak statisztikailag szignifikáns, 2,52-szeres ( $p=0,0012$ ) emelkedését tapasztaltuk a daganatos mintákban (**27C. ábra**). A PRMT5 Thr80-os aktiváló foszforilációjának relatív mértéke 2,325-szeresére nőtt ( $p=0,0498$ ), míg a PRMT5 relatív expressziója csökkent a normál mintákban mért 2,76-os átlagról 0,97-re ( $p=0,022$ ) a daganatos mintákban (**26D. és E. ábra**). A H4 fehérje expressziója nem mutatott változást ( $p=0,34$ ), ám annak relatív szimmetrikus dimetilációja 1,327-szeresére nőtt ( $p=0,0499$ ) a daganatos mintákban a kontrollokhoz képest (**26F. és G. ábra**). Kísérleteinket a továbbiakban kiegészítettük egy, már korábban karakterizált tumorszuppresszor vizsgálatával, a pRb fehérjével. A pRb tumorszuppresszorról ismert, hogy a MP/PRMT5/H4 tumorgén útvonal módosítja, és ezt a megfigyelést cervicalis tumormintákon mi is igazoltuk. Az eredményeink szerint a pRb expressziója 0,38-szorosára csökkent ( $p=0,0435$ ) a kontroll lizátumokhoz viszonyítva a daganatos mintákban (**26H. ábra**).

## **Az SMTNL1 fehérje szerepe inzulinrezisztens Ishikawa endometriális epithelialis sejtek kontraktilis tulajdonságaira**

### **Az FT-SMTNL1 overexpresszió elősegíti az endometriális epithelialis sejtek differenciációját**

Előzetes irodalmi adatokból ismert, hogy az SMTNL1 fehérje kulcsfontosságú szabályozó szerepet játszik a szteroidhormonokra érzékeny szövetekben, mint például a méhben, azonban a részletes hatásmechanizmus mindeztidáig nem tisztázott. Annak érdekében, hogy feltérképezzük az SMTNL1 fehérje hatását az endometriális epithelialis sejtek differenciálódásra és életképességére, Ishikawa, endometriális epithelialis adenokarcinómából immortalizált hámsejteket transzfektáltunk üres vektorral (MOCK kontroll) vagy FT-SMTNL1 szekvenciát tartalmazó plazmiddal, negatív kontrollként kezeletlen csoport szolgált. A kísérleteink során alkalmazott Ishikawa sejtvonal az endometrium kolumnáris epitheliumát

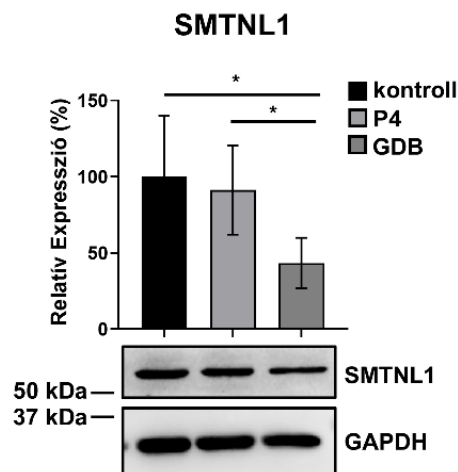
hivatott modellezni, amely funkciójában és szerkezetében különbözik az alatta elhelyezkedő endometriális stromális sejtektől. Az overexpresszió igazolását immunfluoreszcenciával (27A. és D. ábra) és Western blot analízissel (28B. ábra) végeztük, anti-Flag (27A. és B. ábra) és anti-SMTNL1 (27D. ábra) antitestek alkalmazásával. A transzfekeció hatását a sejtek életképességére Alamar Blue esszével mértük (27F. ábra).



27. ábra: Az FT-SMTNL1 transzfekeció hatása az Ishikawa endometriális epitheliális sejtekre. Kezeletlen kontroll, üres (MOCK) és FT-SMTNL1 szekvenciát tartalmazó vektorral transzfekektált (FT-SMTNL1) Ishikawa sejteket immunfluoreszcens festéssel (A, C, D, E) Western blot analízissel (B), és Alamar Blue életképesség technikával vizsgáltuk (F). Az immunfluoreszcens festés Flag-tag (A) és SMTNL1 (D) ellen termelt elsődleges antitestekkel történt, melyek detektálására Alexa 488 fluorofórral (zöld) jelölt másodlagos antitestet használtunk, a sejtmagokat DAPI-val (kék) jelöltük. Méretarány: 20  $\mu$ m. Az Alexa 488 fluoreszcencia intenzitását HCS mikroszkóp segítségével összegeztük, DAPI által meghatározott sejt számra normalizáltuk, majd egyes csoportok értékét a kezeletlen kontroll csoport átlagában, oszlopdiagrammon ábrázoltuk (C, E), ahol egy oszlop n=3, átlag +/- SD. Két csoport értékének összehasonlítására párosítatlan, kétmintás t-próbát, több csoport összehasonlítására egyutas ANOVA-t alkalmaztunk, ahol:  $p < 0,05$  (\*) ;  $p < 0,01$  (\*\*). Ishikawa sejt lízátumainak Western blot analízise Flag-tag ellen termeltetett elsődleges antitest segítségével (B). Az egyedi sávok denzitását GAPDH belső kontroll denzitásához viszonyítottuk. Egyes csoportok értékeit a kezeletlen kontroll csoport arányaként oszlopdiagrammon ábrázoltuk, ahol egy oszlop n=5, átlag +/- SD értéket képvisel. Két csoport közötti szignifikancia meghatározásához párosítatlan, kétmintás t-próbát, több csoport összehasonlítására egyutas ANOVA-t alkalmaztunk, ahol  $p < 0,05$  (\*) és  $p < 0,001$  (\*\*\*) . Az FT-SMTNL-1 transzfekeció Ishikawa sejtek életképességére kifejtett hatását Alamar Blue teszttel analízáltuk (F). A kezeletlen kontroll csoport életképessége 100%-nak lett tekintve, és az összes többi csoportot ennek arányában, oszlopdiagrammon ábrázoltuk, ahol egy oszlop értéke n=3, átlag +/- SD értéket képvisel. A csoportok összehasonlítása egyutas ANOVA statisztikai teszttel történt.

Immunfluoreszcencia festés esetén elsődleges antitesttel Flag-jelölt, illetve endogén SMTNL1 fehérje került jelölésre, melyet keresztkötöttünk Alexa 488-as, zöld színű fluorofórral jelölt másodlagos antitesttel detektálás céljából. A Flag-jelölő ellen termeltetett antitesttel vizsgálva az exogén, Flag jelölt rekombináns SMTNL1 citoplazmatikus lokalizációt mutatkozott, az anti-SMTNL1 antitesttel való festés esetén pedig, az endogén fehérjét vizsgálva ugyanazt a perifériás, homogén elrendezést bizonyította (27A. és D. ábra). A Flag-jelölő elleni elsődleges antitesttel történt immunfluoreszcens festés esetén a jelintenzitás 171%-os ( $p=0,012$ ) növekedést mutatott az FT-SMTNL1 overexpresszált csoportban a MOCK kontrollhoz képest, és 165%-os ( $p=0,0141$ ) növekedést a kezletlen kontroll csoporthoz képest (27C. ábra), ami az overexpresszió sikerességét igazolta. Az anti-SMTNL1 antitest jelintenzitásának elemzése is ezt igazolta, a fluoreszcencia intenzitása 128,67%-kal ( $p=0,0025$ ) és 150%-kal ( $p=0,0055$ ) növekedett az FT-SMTNL1 transzfektált csoportban a kontrollhoz és a MOCK csoporthoz képest (27F. ábra). Az overexpresszió Flag-jelölő elleni elsődleges antitestet felhasználásával történt Western blot analízise alapján a FT-SMTNL1 csoportban 177%-kal nőtt a Flag-fúziós fehérje expressziója a kezletlen kontrollhoz ( $p=0,0002$ ), míg 191,5%-kal ( $p<0,0001$ ) a MOCK kontrollhoz képest. (27B. ábra). Az FT-SMTNL1 transzfekció Alamar Blue esszével vizsgálva az Ishikawa sejtek életképességét nem befolyásolta (27F. ábra).

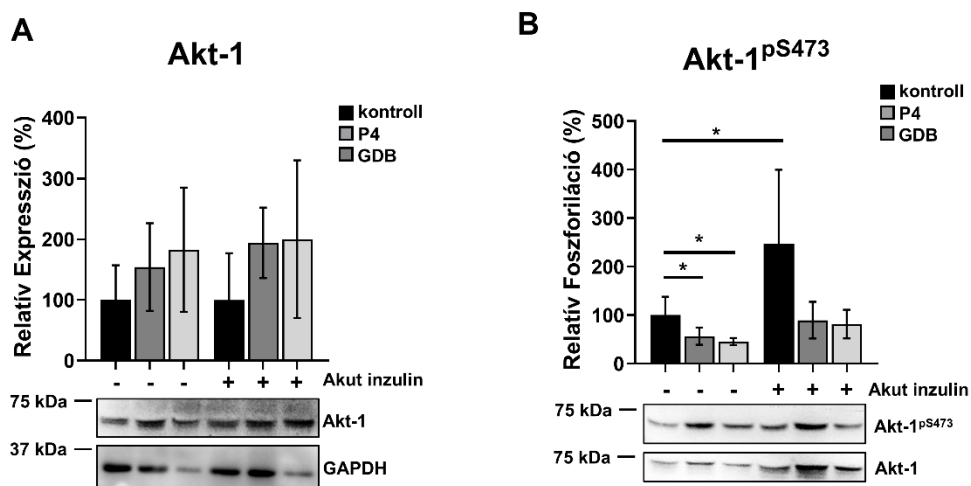
Mivel további kísérleteink során szteránvázis hormonok (medroxi-progeszteron-acetát és  $\beta$ -17-hidroxi-ösztadiol) alkalmazásával több kezelési körülményt is [terhesség (P4), és



28. ábra: A GDB modell csökkenti az SMTNL1 expresszióját Ishikawa sejtekben. Kezeletlen kontroll/P4/GDB modellek között kezelt Ishikawa sejtizátumainak Western blot analízise SMTNL1 fehérje ellen termeltetett elsődleges antitest segítségével. Belső kontrollként GAPDH-t alkalmaztunk. Egyes csoportok értékeit a kezeletlen kontroll csoport arányként oszlopdiagrammon ábrázoltuk, ahol az oszlopok  $n=5$ , átlag  $\pm$  SD-t értéket reprezentálnak. Két csoport közötti szignifikancia meghatározásához párosítatlan, kétmintás  $t$ -próbát, több csoport összehasonlítására egyutas ANOVA-t alkalmaztunk, ahol  $p<0,05$  (\*). P4: in vitro terhesség modell, GDB: inzulinrezisztens P4, gesztációs diabetesz modell.

gesztacionális diabetesz (GDB) modell] létesítettünk. GDB modell esetén a hormonok mellett a sejtek médiumának glükóz koncentrációját megemeltük (4,5 g/l), illetve inzulinnal (100 nM) pótoltuk.. Ezen kezelési modellek szteroid hormon szupplemtáció miatt potenciálisan befolyásolhatják az SMTNL1 expresszióját, ezért célul tűztük ki előzetes kísérletként megvizsgálni az endogén SMTNL1 expresszióját hormonnal nem kezelt kontroll, P4 és GDB modellek között. Eredményeink szerint az endogén SMTNL1 fehérje kifejeződési szintje GDB modellben 56,75%-os ( $p=0,034$ ) és 48%-os ( $p=0.0290$ ) csökkenést mutatott a kontroll és a P4 modellekhez képest, Western blot technikával vizsgálva (28. ábra).

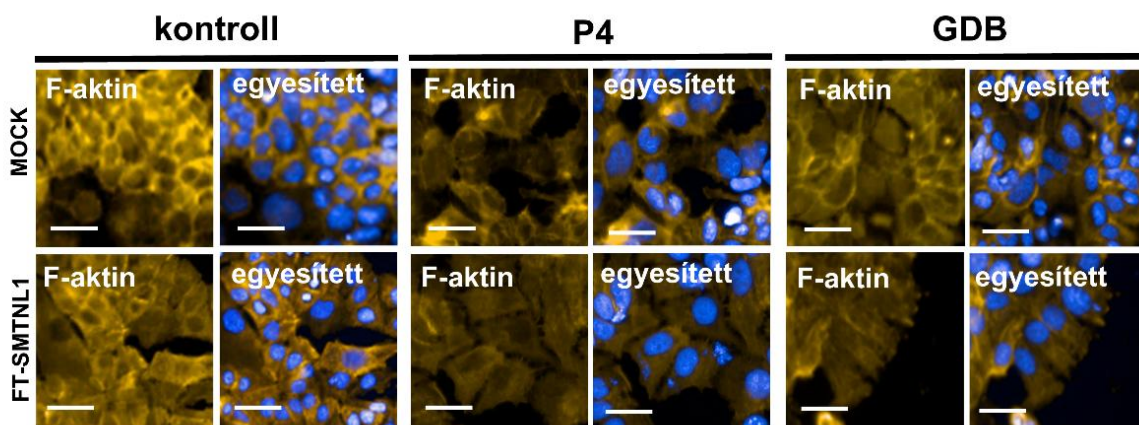
Az FT-SMTNL1 transzfekció Ishikawa sejtek differenciálódására gyakorolt hatását kontroll, *in vitro* terhes (P4), és gesztacionális diabetesz (GDB) modell esetén HCS mikroszkópiával és RT-PCR méréssel terveztük értékelni. Mielőtt kísérleteinket végrehajtottuk volna, ellenőrizni kívántuk az *in vitro* GDB modell hatását Ishikawa sejtek inzulin jelátvitelének kulcselemére (29. ábra), igazolva a sejtekben létrehozott inzulinrezisztenciát. A kísérletünk során alkalmazott GDB modell létrehozására korábbi publikációkban közölt protokollra támaszkodtunk (167), mely kezelési körülményt progeszteron hormon hozzáadásával bővítettük ki. A kezelés validálását Ishikawa sejteken Western blot technikával tettük meg, mely során az inzulin jelátvitel kulcselemének, az Akt fehérjének expressziós szintjét, illetve relatív foszforilációját vizsgáltuk (29. ábra).



29. ábra: Inzulinrezisztens modell igazolása Ishikawa sejt kultúrán. Kontroll/P4/GDB modellben kezelt Ishikawa sejtek kezelési időszak lezárultával 30 perces akut inzulin kezelésben részesültek, kontrollként inzulin kezelésen át nem esett csoportokat alkalmaztunk. A sejtek fehérjelizátumait Western Blot technika segítségével analizáltuk, Akt-1 (A), illetve Akt-1<sup>pS473</sup> (B) ellen termeltetett elsődleges antitestek használatával. Az Akt-1 fehérje expresszióját GAPDH belső kontrollra, az Akt-1<sup>pS473</sup> denzitását foszforilálatlan totál fehérje értékére normalizáltuk. Az akut inzulin kezelésben nem részesült, kezeltlen kontroll csoport értékét 100%-nak tekintettük, az egyes csoportok értékeit ennek arányában oszlopdiagrammon ábrázoltuk, ahol minden oszlop értéke  $n=3-6$ , átlag  $\pm$  SD. Két csoport értékét párosítatlan, kétmintás *t*-próbával, több csoport értékét kétutas ANOVA-val hasonítottuk össze, ahol  $p < 0,05$  (\*). P4: *in vitro* terhes modell, GDB: inzulinrezisztens P4, gesztációs diabetesz modell.

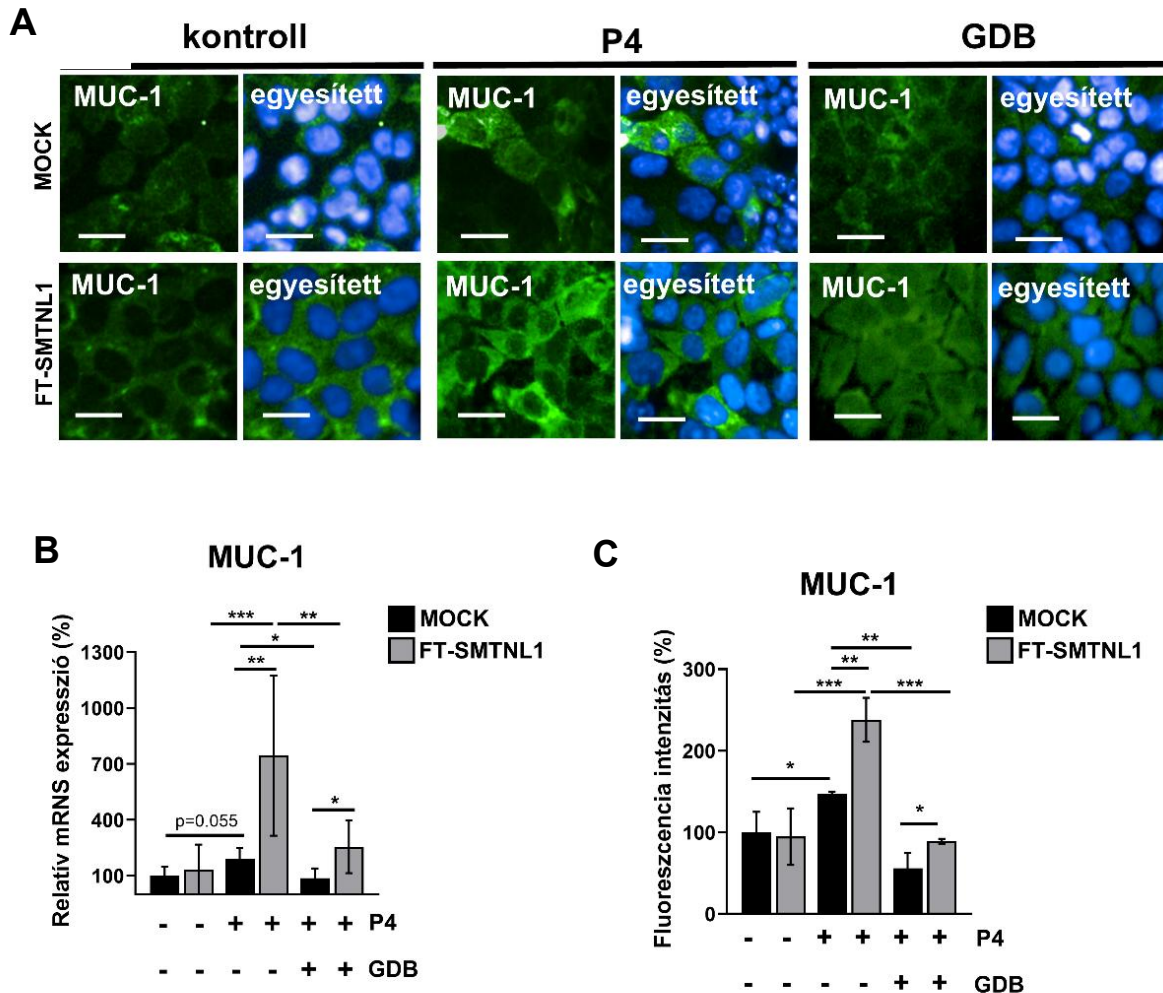
Kísérletünk során Ishikawa sejteket kontroll/P4/GDB modellek között tenyésztettünk, majd akut inzulin hozzáadásával mértük az Akt Ser473-as foszforilációjának változását, az akut inzulin által nem kezelt csoporthoz képest. Az Ishikawa sejteken alkalmazott P4 és GDB modell az Akt fehérje expressziós szintjét nem változtatta hormon által nem kezelt kontroll csoporthoz képest, illetve az akut inzulin hozzáadása sem módosította a fehérje kifejeződésének mértékét (**29A. ábra**). Az Akt<sup>PS473</sup> foszforilációja viszont növekedést mutatott a kontroll csoportban az akut inzulin kezelés hatására (**29B. ábra**). Ezen foszforilációs emelkedés nem volt nyomon követhető GDB kezelt csoport akut inzulinnal ellátott, és attól megvont tagjaiban, amely bizonyítja az epithelialis sejtek inzulinrezisztens állapotát (**29B. ábra**).

Miután sikeresen igazoltuk *in vitro* inzulinrezisztens modellünk hatását Ishikawa sejtek inzulin jelátvitelére, a továbbiakban célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk ezen GDB és P4 modellben az FT-SMTNL1 transzfekció milyen hatást fejt az Ishikawa sejtek differenciációjára és morfológiájára, immunfluoreszcens festéssel és RT-PCR technikával. Az Ishikawa sejtek morfológiai változásainak vizsgálatához az aktin citoszkéleont Texas Red Falloidinnel (sárga) és a mucin-1 (MUC-1) differenciációs markert elsődleges antitest jelölés után Alexa 488 fluorofórral (zöld) vizualizáltuk (**30. ábra és 31A. ábra**). A MUC-1 mRNS expresszióját RT-PCR technikával vizsgáltuk a fent jellemzett kontroll/P4/GDB modellekben FT-SMTNL1 transzfekció hatására vagy a nélkül (**31B. ábra**).



**30. ábra:** Az FT-SMTNL1 transzfekció elősegíti az Ishikawa sejtek differenciációjá kísérő alakváltozást. Üres (MOCK), avagy FT-SMTNL1 szekvenciát tartalmazó vektorral transzfektált Ishikawa sejtek differenciációjának vizsgálata immunfluoreszcens festéssel, kontroll/P4/GDB modellek között. Az immunfluoreszcens festés során az aktin citoszkéleont Texas-Red Falloidin festéssel (sárga), a sejtmagokat pedig DAPI-val (kék) jelöltük. Méretarány: 100  $\mu$ m. **P4:** *in vitro* terhes modell, **GDB:** inzulinrezisztens P4, gesztációs diabetes modell.

A P4 és GDB kezelések az Ishikawa sejtek citoszkeletonjának változását indukálták. A differenciálatlan kontroll csoportban tapasztalt kuboid morfológiájú sejtek elnyújtott, oszlopos morfológiájúvá alakultak át P4 és GDB modellben, bennük vakuolumok szaporodtak fel (30. *ábra*). Az FT-SMTNL1 túltermelése tovább fokozta ezeket a változásokat, progeszterontól független módon, hormonnal nem kezelt, kontroll csoportban (30. *ábra*). Az FT-SMTNL1



31. *ábra*: Az FT-SMTNL1 transzfekció progeszteron-dependens módon növeli a MUC-1 differenciációs marker kifejeződését Ishikawa sejtek differenciációja során. Üres (MOCK), avagy FT-SMTNL1 tartalmú vektorral transzfektált Ishikawa sejtek differenciációjának vizsgálata immunfluoreszcens festéssel (A, C) és RT-PCR technikával (B), kontroll/P4/GDB modellek között. Az immunfluoreszcens festés során a sejtmagokat DAPI-val (kék) jelöltük, a MUC-1 differenciációs markert elsődleges antitestet Alexa 488-as fluorofórral jelölt másodlagos antitesttel vizualizáltuk (zöld) (A). Méretarány: 100  $\mu$ m. A MUC-1 differenciációs marker mRNS expresszióját valós idejű PCR technikával követtük mely során egyes csoportok Cp értékeit GAPDH és Cyclophilin A háztartási gének Cp értékeinek mértani közepére normalizáltuk (B). Az fluoreszcens jel intenzitását HCS mikroszkóp szoftverével elemeztük, és a, DAPI által meghatározott sejtszámra normalizáltuk (C). Az értékeket a kezeltlen MOCK kontroll csoport arányában, oszlopdiagrammon ábrázoltuk, ahol egy oszlop értéke  $n=3-8 \pm$  SD (C-D). Két csoportot párosítatlan kétmintás t-próbával, több csoportot kétutas ANOVA-val hasonlítottunk össze, ahol:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) és  $p < 0,001$  (\*\*\*) (C, D). P4: in vitro terhes modell, GDB: inzulinrezisztens P4, gesztációs diabétesz modell.

transzfekció és a progeszteron szinergikus hatása kimutatható volt a P4 és GDB modellekben, mely két kezelés együttes alkalmazása a sejtek jelentős morfológiai átalakulását vonta maga után.

A MUC-1 differenciációs marker kifejeződésének szintjét mind immunhisztokémiai technikával festett sejtkultúra vizualizációjával, mind az Alexa 488 fluorofór intenzitásának mérésével, mind RT-PCR technikával igazoltuk (**31. ábra**). A MUC-1 elsődleges antitesttel jelölt minták fluoreszcencia intenzitásának mérése alapján mind az FT-SMTNL1 transzfekció, mind a progeszteron elősegítette a MUC-1 expresszióját (**31A. és C. ábra**). Immunfluoreszcenciával vizsgálva az FT-SMTNL1 túltermelése P4 modell között fokozta legnagyobb mértékben a MUC-1 kifejeződését. Ezen kezelési modellhez képest a fluorofór intenzitásának szignifikáns csökkenése mutatkozott 143,33%-kal ( $p < 0,0001$ ) a kontroll FT-SMTNL1 túltermelt csoportban, valamint 149%-kal ( $p < 0,0001$ ) a GDB modellben FT-SMTNL1 túltermelt csoportban. Az MUC-1 intenzitása szignifikánsan emelkedett a P4 MOCK csoportban 47,33%-kal ( $p = 0,0315$  a MOCK kontrollhoz képest. Az FT-SMTNL1 transzfekció mind P4, mind GDB modell között elősegítette a MUC-1 kifejeződését, 90,67%-kal ( $p = 0,0031$ ) növelve a differenciációs marker szintjét P4 MOCK, és 33%-kal ( $p = 0,0391$ ) a GDB MOCK csoportokhoz képest. A GDB modell hatására 91,33%-kal ( $p = 0,0029$ ) csökkentet a MUC-1 intenzitása a P4 MOCK mintákhoz képest (**31C. ábra**), mutatva, a GDB modell endometriális epithel sejtek differenciációjára kifejtett hátrányos hatását.

Az immunfluoreszcencia intenzitásának kiértékelést követően a MUC-1 mRNA expresszióját is elemeztük kontroll, P4 és GDB modellben, FT-SMTNL1 transzfekció hatására vagy a nélkül (**31B. ábra**), mely eredményeink az immunfluoreszcenciás méréssel korrelációt mutattak. A MUC-1 mRNA szintje a legkiemelkedőbb mértéket a P4 FT-SMTNL1 túltermelt csoportban érte el RT-PCR technikával mérve (**31B. ábra**), ami azt sugallja, hogy az SMTNL1 pozitív hatást gyakorolt az endometrium epitheliális sejteinek differenciálódására P4 kezelés estén. Az FT-SMTNL1 túltermelése 554,67%-kal növelte a MUC-1 mRNA expressziós szintjét a P4 FT-SMTNL1 transzfektált csoportban, viszonyítva a P4 MOCK kontroll csoporthoz. Az FT-SMTNL1 170%-kal növelte a MUC-1 mRNA expresszióját a GDB transzfektált csoportban, összehasonlítva a GDB MOCK kontrollal. A MUC-1 kifejeződése 90,67%-kal növekedett ( $p = 0,0551$ ) P4 MOCK sejtekben a kontroll MOCK csoport MUC-1 expressziójához képest, ami azt jelzi, hogy az Ishikawa sejtek sikeres differenciáción mentek keresztül P4 modell hatására. A GDB modell során a MUC-1 mRNA expresszió 104,16%-kal csökkent ( $p = 0,0307$ ) a P4 MOCK csoporttal összehasonlítva, ami azt mutatja, hogy a hiperinzulinémiás-hiperglikémiás környezet gátolta a differenciáció folyamatát. Az FT-

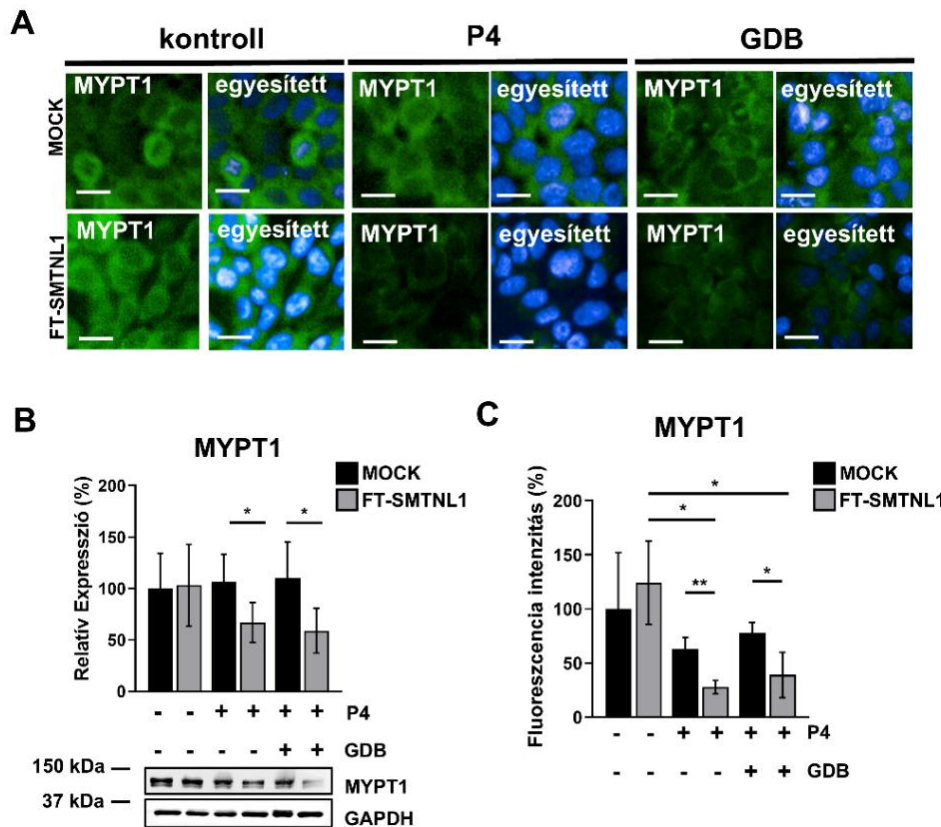
SMTNL1 túltermelt csoportok összehasonlítása során a P4 modellben mutatkozott a legmagasabbnak MUC-1 mRNA expresszió, ami 611,958%-kal csökkent ( $p=0,0001$ ) a kontrollhoz képest, és 488,83%-kal ( $p=0,0064$ ) a GDB mintákban az FT-SMTNL1 túltermelés hatására (**31B. ábra**).

### **Az FT-SMTNL1 overexpressziója csökkenti a MYPT1 expressziós szintjét és gátolja a MP aktivitást**

A citoskeletális fehérjék, és azokat módosító enzimek kifejeződési szintjében bekövetkező változások hozzájárulnak a sejtek alakjának és differenciálódásának megváltozásához. Az endometriális epitheliális sejtek citoskeletális változásaiért felelős kulcs szabályozó elem a MP, melynek MYPT1 szabályozó alegysége az SMTNL1 kölcsönható partnere (6,111). Az SMTNL1 expressziós szinten is gátolja a MYPT1 mennyiségét, mivel az SMTNL1 Ser301-es oldalláncán való foszforilációja esetén képes a sejtmagba transzlokálódni, ahol progeszteron receptor B ko-aktivátoraként működve számos gén kifejeződését szabályozza (6,111). Ezen előzetes irodalmi adatokra, illetve előzetes eredményeink alapján, melyeket az Ishikawa sejtek differenciációjának vizsgálata során nyertünk, célul tűztük ki, hogy elemezzük a SMTNL1 hatását a MP-ra, fókuszálva annak aktivitására, illetve génextpressziós változásaira egyaránt (**32. és 33. ábra**).

Ishikawa sejteket hormonok által nem kezelt kontroll, P4, GDB modellben tenyésztettünk. A sejteket vagy üres plazmával (MOCK kontroll), vagy pedig FT-SMTNL1 szekvenciát tartalmazó plazmával transzfektáltuk. A MYPT1 alegység kifejeződése mellett vizsgáltuk a MP aktivitását is a MYPT Thr696gátló foszforilációs helyének relatív foszforilációjának vizsgálatával Western blot technikával (**32B. és 33B. ábra**). Ezen adatokat immunfluoreszcens festéssel (**32A. és 33A. ábra**) illetve a fluoreszcencia intenzitásának analizisével által is támogattuk (**32C. és 33C. ábra**).

HCS mikroszkóppal mért fluoreszcens intenzitás analízise által nyert eredményeink alapján az FT-SMTNL1 overexpresszió csökkentette a MYPT1 expressziót mind a P4, mind a GDB modellekben. A MYPT1-t jelző fluorofór intenzitás csökkenést mutatott FT-SMTNL1 transzfekció esetén 35,34%-kal ( $p=0,0079$ ), illetve 38,66%-kal ( $p=0,0445$ ) a P4 és a GDB



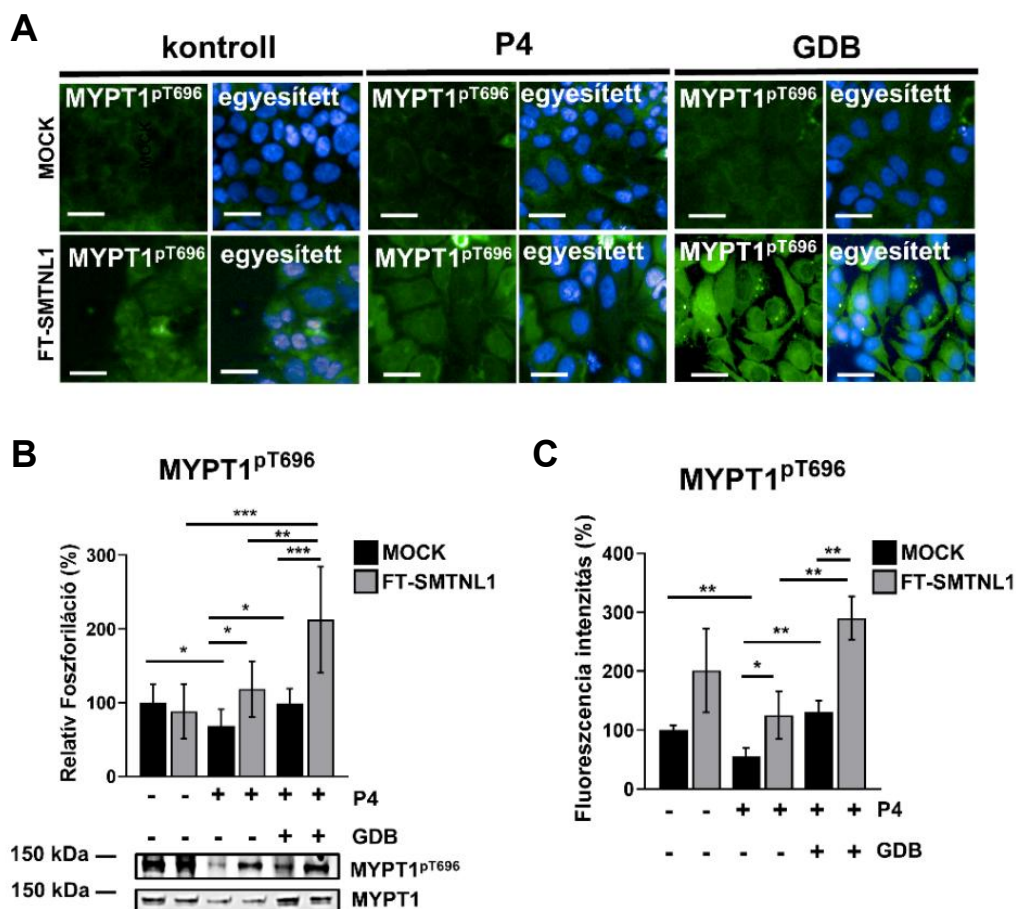
**32. ábra:** Az *FT-SMTNL1* transzfekció progeszteron-függő módon gátolja a *MYPT1* expresszióját endometriális epitheliális sejtekben. Ishikawa sejteket transzfektáltunk üres (MOCK) vagy *FT-SMTNL1* szekvenciát tartalmazó vektorral, kontroll/P4/GDB modell alkalmazásával. *MYPT1* (A) ellen termeltetett elsődleges antitesteket Alexa 488 fluorofórral (zöld) jelölt másodlagos antitesttel kereszt kötve immunfluoreszcens technikával vizualizáltuk a *MYPT1* kifejeződését. A sejtmagokat DAPI-val (kék) festettük. A képeket Opera Phoenix™ HCS segítségével készítettük. Méretarány: 20 µm. (A) Az Alexa 488 fluorofór jelintenzitását HCS mikroszkóp szoftverével összegeztük, majd a DAPI-val festett sejtmagok számára normáltuk (C). Sejtek fehérjemintáit Western blot analízissel elemeztük anti-*MYPT1* (B) antitesttel. A totál fehérje denzitását GAPDH belső kontrollra normáltuk. **B, C** adatait a MOCK transzfektált kontroll csoport átlagának arányában, oszlopdiagrammon ábrázoltuk, ahol egy oszlop értéke n=3–8, átlag ± SD. Két csoportot párosítatlan, két mintás t-tesztel, több csoportot kétutas ANOVA-val hasonlítottunk össze, ahol:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*). **P4:** in vitro terhes modell, **GDB:** inzulinrezisztens P4, gesztációs diabétesz modell.

MOCK kontrollokhoz képest (**32C. ábra**). Az *FT-SMTNL1* transzfektált csoportok összehasonlításakor a P4 és GDB kezeléseknél 96,33%-os ( $p=0,0132$ ) és 85%-os ( $p=0,0301$ ) csökkenés mutatkozott a *MYPT1*-et jelző fluorofór intenzitásában, összehasonlítva a hormonkezelésben nem részesült kontroll csoport *FT-SMTNL1* transzfektált csoportjához képest (**32C. ábra**).

A *MYPT1* expresszió változásait Western blot analízissel is nyomon követtük kontroll, P4 és GDB modellekben, *FT-SMTNL1* transzfekció mellett vagy a nélkül, és az eredmények egybeesnek a HCS analízis során mért tendenciákkal (**32B. ábra**). Az *FT-SMTNL1* overexpressziója a *MYPT1* kifejeződését a P4 és GDB csoportokban 39,49%-kal ( $p=0,0187$ )

és 50,91%-kal ( $p=0,0175$ ) csökkentette a P4 és GDB MOCK kontroll csoportokhoz képest (32B. ábra). Ezek az eredmények összhangban vannak az SMTNL1 fehérje korábban már leírt hatásával, miszerint a sima- és vázizomban a PR-B ko-aktivátoraként a MYPT1 expresszióját génkifejeződési szinten csökkenti (6).

A MYPT1 aktivitásának vizsgálatokor annak gátló foszforilációjának, név szerint Thr696 oldalláncának relatív foszforilációját kvantifikáltuk Western blot (33B. ábra) és immunfluoreszcens technikával (33A. és C. ábra), kontroll, P4 és GDB modellekben, FT-SMTNL1 overexpresszió esetén, avagy anélkül.



33. ábra: Az FT-SMTNL1 transzfekció gátolja az MP aktivitását Ishikawa sejtekben. Ishikawa sejteket transzfektáltunk üres (MOCK) vagy FT-SMTNL1 szekvenciát tartalmazó vektorral, kontroll/P4/GDB modell alkalmazásával. MYPT1<sup>pT696</sup> (A) ellen termeltetett elsődleges antitesteket Alexa 488 fluorofórral (zöld) jelölt másodlagos antitesttel kereszt kötve immunfluoreszcens technikával vizualizáltuk a MYPT1 poszttranszlációs változásait. A sejtmagokat DAPI-val (kék) festettük. A képeket Opera Phoenix™ HCS segítségével készítettük. Méretarány: 20 μm. (A) Az Alexa 488 jelintenzitását HCS mikroszkóp szoftverével összegeztük, majd a DAPI-val festett sejtmagok számára normáltuk (C). Sejtek fehérjemintáit Western blot analízissel elemeztük anti-MYPT1<sup>pT696</sup> (B) antitesttel. A foszforiláció mértékét a teljes fehérje denzitására normáltuk. B, C adatait a MOCK transzfektált kontroll csoport átlagának arányában, oszlopdiagrammon ábrázoltuk, ahol egy oszlop értéke n=3–8, átlag ± SD. Két csoportot párosítatlan, két mintás t-tesztel, több csoportot kétutas ANOVA-val hasonlítottunk össze, ahol:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) és  $p < 0,001$  (\*\*\*). P4: in vitro terhes modell, GDB: inzulinrezisztens

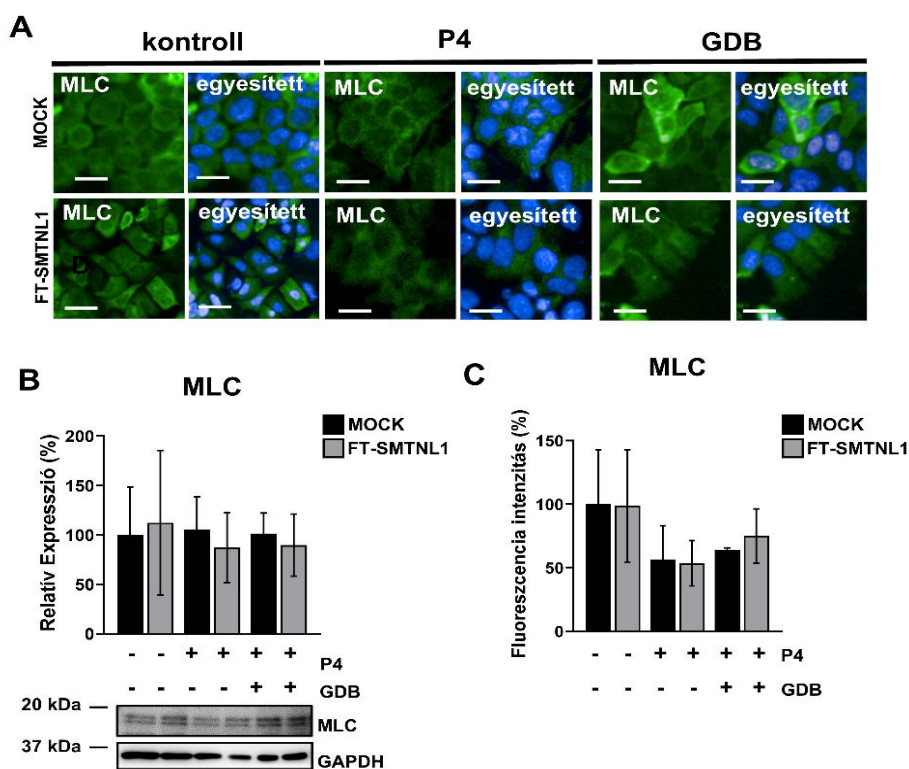
Western blot analízis által nyert eredményeink alapján az FT-SMTNL1 transzfekció jelentősen növelte a MYPT1<sup>pT696</sup> gátló foszforilációját a GDB csoportban 113,66%-kal ( $p=0,0002$ ) a GDB MOCK kontroll csoporthoz képest. A MYPT1<sup>pT696</sup> foszforilációja 31,8%-kal ( $p=0,0406$ ) csökkent a P4 MOCK kezelés hatására a kontroll MOCK csoporthoz képest, ami a MP aktivációját jelzi P4 modellben. Ezen aktivitás P4 kezelés és az FT-SMTNL1 transzfekció együttes hatására gátlódott, 50,3%-kal ( $p=0,0286$ ) növelve a Thr696-os foszforilációt a P4 FT-SMTNL1 kezelt csoportban (**33B. ábra**). A GDB modell a Thr696 foszforiláció relatív szintjében 30,94%-os ( $p=0,0304$ ) növekedést váltott ki P4 MOCK csoporthoz képest, ezzel ezen kezelés esetén a MYPT1 gátlását okozva, amely gátlást az FT-SMTNL1 overexpresszió ez esetben is tovább növelte 113,66%-kal ( $p=0,0002$ ) GDB MOCK kontrollhoz képest. Az FT-SMTNL1 transzfekció a legjelentősebb MYPT1 gátlást a GDB modellben váltotta ki, amelyhez képest 124,675%-os ( $p<0,0001$ ) Thr696oldalláncon történő foszforilációs csökkenés mutatkozott kontroll FT-SMTNL1 transzfektált csoportban, illetve 94,3%-os ( $p=0,036$ ) csökkenés P4 kezelt FT-SMTNL1 overexpresszált csoportban (**33B. ábra**).

A Western blot analízis adatait az immunfluoreszcens festés által nyert eredmények támogatták, ahol a sejtmagokat DAPI-val (kék), a MYPT1, illetve a MYPT1<sup>pT696</sup>-t foszforilációt az ezekre specifikus elsődleges antitesteket felismerő Alexa 488 fluorofórral kapcsolt másodlagos antitest (zöld) jelölt (**33A. ábra**). A fluorofór intenzitás analízise során kinyert adataink alapján a MYPT1 gátló foszforilációját az FT-SMTNL1 kezelés 70%-kal ( $p=0,0473$ ) növelte a P4, illetve 159,67%-kal ( $p=0,0026$ ) a GDB modellekben üres vektor kezelt P4 MOCK és GDB MOCK csoportokhoz képest. A P4 kezelés alkalmazása 45%-kal ( $p=0,0098$ ) csökkentette a MYPT1<sup>pT696</sup> foszforilációját a kontroll MOCK csoporthoz képest, míg a GDB modell 75,66%-os ( $p=0,0059$ ) növekedést eredményezett a P4 MOCK csoporthoz képest (**33C. ábra**).

Eredményeink igazolták a SMTNL1 gátló hatását a MYPT1 expressziójára és a MP aktivitására Ishikawa sejtekben, amelyet a progeszteron hormon és a terhességi cukorbeteg kezelés tovább fokozott. A MYPT1 citoplazmatikus és nukleáris lokalizációja nem változott a P4 és GDB modellekben az alkalmazott kezelés hatására (**32A. ábra**).

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

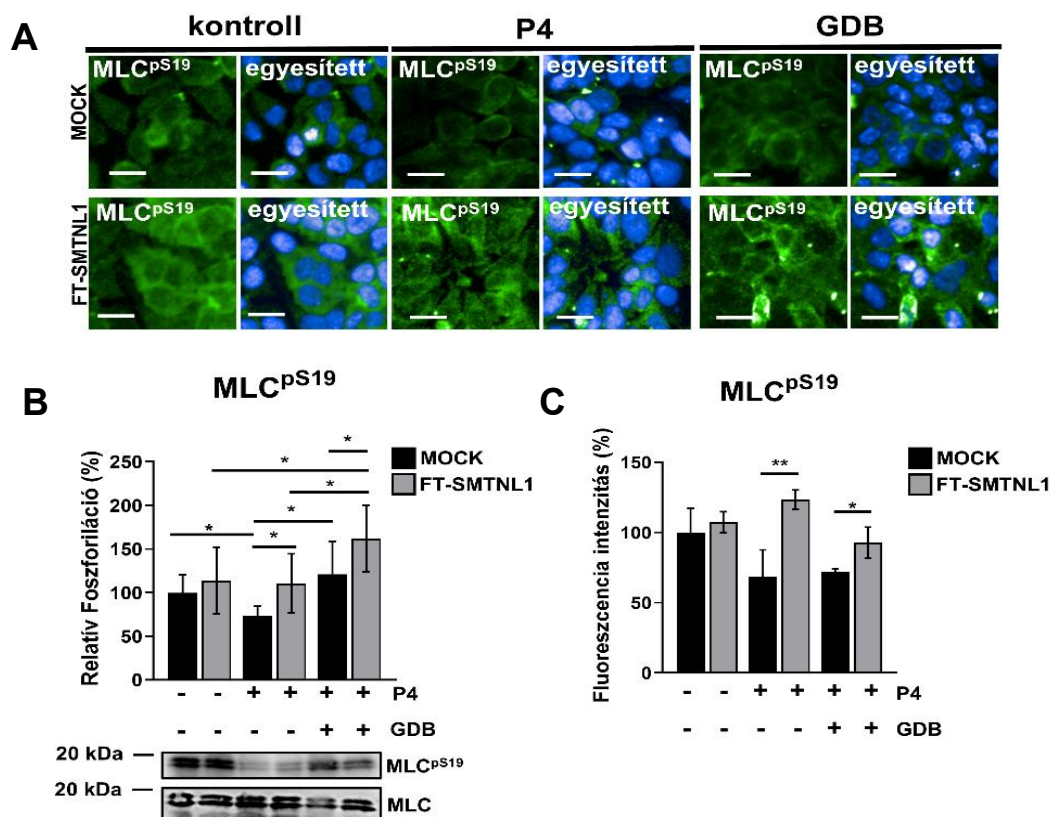
Az FT-SMTNL1 transzfekciója progeszteron-függő módon csökkentette a MYPT1 kifejeződését mind P4, mind GDB modellek között (32. ábra), továbbá befolyásolta az MP aktivitását a MYPT1 alegység gátló Thr696-os foszforilációjának emelésén keresztül P4 és GDB modellben egyaránt (33. ábra). Ezen eredményekre támaszkodva indokoltnak tartottuk megvizsgálni az FT-SMTNL1 transzfekció hatását az MP szubsztrátjára, a 20 kDa miozin könnyű láncra (MLC20), Western blot és immunfluoreszcens technikák segítségével (34. és 35. ábra). Az immunfluoreszcens festést HCS mikroszkópiával vizualizáltuk (34A. és 35A. ábra).



34. ábra: Az FT-SMTNL1 transzfekció nem befolyásolja az MLC lokalizációját és kifejeződését. Üres (MOCK) vagy FT-SMTNL1 szekenciát tartalmazó vektorral transzfektált Ishikawa sejteket kontroll, P4 és GDB modellek között tenyésztettünk. Immunfluoreszcens festést végeztünk anti-MLC (A) elsődleges antitest felhasználásával, amelyeket Alexa 488 fluorofórral (zöld) jelölt másodlagos antitest segítségével detektáltunk. A sejtmagokat DAPI-val (kék) festettük. A képeket Opera Phoenix™ HCS mikroszkópiával vizualizáltuk. Méretarány: 20 µm. Az immunfluoreszcens képek Alexa 488 jelintenzitását a HCS mikroszkóp beépített intelligens szoftverével összesítettük, az adatokat a DAPI-val festett sejtmagok számára normalizáltuk (C). A sejtek fehérjelizátumait Western blot analízissel elemeztük anti-MLC (B) antitesttel, GAPDH belső kontroll alkalmazásával. B és C adatait a MOCK transzfektált kontroll csoport átlagának arányában, oszlopdiagrammon ábrázoltuk, ahol egy oszlop értéke n = 3–8, átlag ± SD értéket képviselt. Két csoportot párosítatlan, két mintás t-tesztel, több csoportot kétutas ANOVA-val hasonlítottunk össze. P4: in vitro terhes modell, GDB: inzulinrezisztens P4, gesztációs diabétesz modell.

Western blot és Alexa 488-as fluorofór intenzitásának analizésével vizsgálva sem az alkalmazott hormonkezelések, sem az SMTNL1 transzfekció nem befolyásolta az MLC20 expresszióját Ishikawa sejtekben (34. ábra). Az immunfluoreszcens festés eredményei alapján az MLC jelentős mennyisége a citoplazmában lokalizálódott az Ishikawa sejtekben, és sem lokalizációját, sem expresszióját nem változtatta meg egyetlen alkalmazott kísérleti körülmény sem (34A. ábra).

Western blot analizéssel mérve az FT-SMTNL1 overexpresszió hatására az MLC20<sup>pS19</sup> foszforilációja 37,78%-kal ( $p=0,0342$ ) növekedett a P4 és 40,91%-kal ( $p=0,0315$ ) a GDB modellben, egyedileg összehasonlítva a P4 MOCK és GDB MOCK kontrollokkal (35B. ábra).



35. ábra: Az FT-SMTNL1 transzfekció hatása a 20 kDa miozin könnyű lánc foszforilációjára. Ishikawa sejteket transzfektáltunk üres (MOCK) vagy FT-SMTNL1-et tartalmazó vektorral, kontroll, P4 és GDB modellek között. Immunfluoreszcens festést végeztünk anti-MLC<sup>pS19</sup> (A) elsődleges antitest felhasználásával, amelyeket Alexa 488 fluorofórral (zöld) jelölt másodlagos antitesttel detektáltunk. A sejtmagokat DAPI-val (kék) festettük. A képeket Opera Phoenix™ HCS mikroszkópiával vizualizáltuk. Méretarány: 20  $\mu$ m. Az MLC<sup>pS19</sup> elsődleges antitest felhasználásával készült immunfluoreszcens képek Alexa 488 jelintenzitását a HCS mikroszkóp beépített intelligens szoftverével összesítettük, az adatokat a DAPI-val festett sejtmagok számára normalizáltuk (C) A sejtek fehérjelizátumait Western blot analizéssel elemeztük anti-MLC<sup>pS19</sup> (B) antitestekkel, a foszforiláció mértékét a módosítatlan fehérje denzitására normáltuk. B és C adatait a MOCK transzfektált kontroll csoport átlagának arányában, oszlopdiagrammon ábrázoltuk, ahol egy oszlop értéke  $n = 3-8$ , átlag  $\pm$  SD. Két csoportot párosítatlan, két mintás t-tesztel, több csoportot kétutas ANOVA-val hasonlítottunk össze, ahol:  $p < 0,05$  (\*) és  $p < 0,01$  (\*\*). P4: in vitro terhes modell, GDB: inzulinrezisztens P4, gesztációs diabetesz modell.

A progeszteron szupplementáció P4 csoportban 27%-kal ( $p=0,0305$ ) csökkentette az MLC20<sup>PS19</sup> foszforilációját a hormonnal nem kezelt MOCK csoporthoz képest. A P4 MOCK csoportot a GDB MOCK csoporttal összehasonlítva 47,89%-os ( $p=0,0187$ ) növekedés mutatkozott az MLC20<sup>PS19</sup> foszforilációjában GDB modell csoportban. Az FT-SMTNL1 transzfektált csoportokat összehasonlítva, az MLC foszforilációja a legnagyobb mértékben a GDB modellben emelkedett, amelyhez képest csökkenés volt kimutatható mind a P4, mind a kontroll modellek között FT-SMTNL1 overexpresszáló csoporthoz képest 51,02%-kal ( $p=0,0306$ ), illetve 48,1%-kal ( $p=0,0406$ ) (**35B. ábra**).

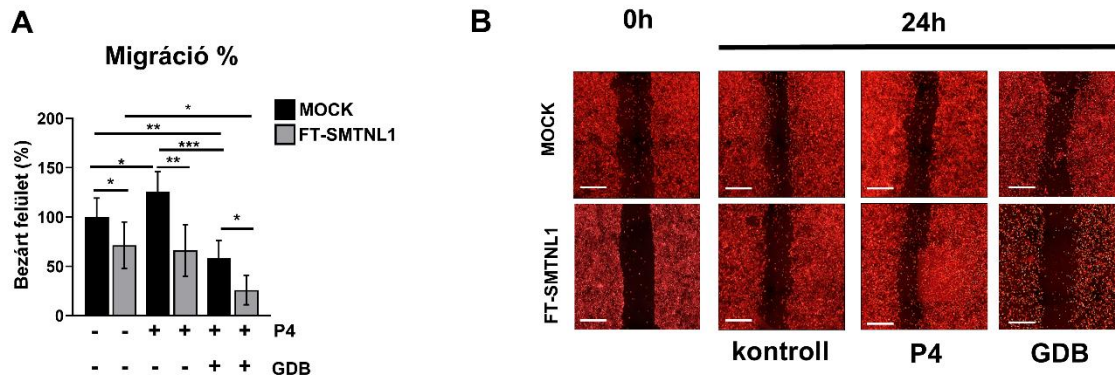
HCS mikroszkópiával vizsgálva az MLC Ser19-es foszforilációjának relatív mértékét az SMTNL1 transzfekció hatására mind a P4, mind a GDB modellekben megnövekedett az MLC Ser19 oldallánc foszforilációs szintje, 31%-kal ( $p=0,0014$ ) P4 csoportban, és 9%-kal ( $p=0,0327$ ) a GDB modellben a MOCK kontrollhoz képest (**35C. ábra**).

Az MLC foszforiláció változásai P4 és GDB modellekben FT-SMTNL1 hatására feltételezhetően az MP gátlásának következtében alakultak ki (**32. és 33. ábra**). Az FT-SMTNL1 transzfekció hatására lecsökkent MYPT1 expresszió mellett észlelt megnövekedett Thr696 gátló foszforiláció az MLC20 Ser19 foszforilációjának növekedésével járt együtt P4 és GDB modellekben (**35. ábra**).

## **Az FT-SMTNL1 overexpressziója gátolja az Ishikawa sejtek migrációs képességét**

Előzetes eredményeink alapján összefoglalható, hogy az SMTNL1 fehérje progeszteron-függő módon szabályozza az MYPT1 fehérjeexpresszióját és a MP aktivitását egyaránt endometriális epitheliális sejtekben. Ezen szabályozás az MLC20 Ser19 oldallánc foszforilációjának megváltozását eredményezi. Mivel mind az MP mind az MLC20 kulcsfontosságú szerepet töltenek be a sejtek kontraktilis funkcióiban, amelyek többek között a migrációt is befolyásolják, célul tűztük ki, hogy meghatározzuk az SMTNL1 transzfekció hatását az Ishikawa sejtek migrációjára a kontroll, P4 és GDB modellekben (**36. ábra**), karcólási esszé segítségével.

A sejtek által lefedett felület változását valós időben, 24 órán keresztül követtük HCS mikroszkópiával (**36B. ábra**). A bezáródott terület arányát a hormonnal nem kezelt MOCK kontroll csoportban 100%-nak vettük, eredményeinket ezen csoporthoz viszonyított értékeként ábrázoltuk (**36A. ábra**). A hormonnal nem kezelt FT-SMTNL1 transzfektált



**36. ábra:** Az FT-SMTNL1 transzfekció akadályozza az endometriális epitheliális sejtek migrációs képességét. Karcolási esszét végeztünk DiD fluoreszcens festékkel jelölt Ishikawa sejteken, amelyeket előzetesen üres (MOCK) vagy FT-SMTNL1 szekvenciát tartalmazó vektorral transzfektáltunk, majd 72 óráig hormonnal nem kezelt kontroll, P4 vagy GDB modellben tenyésztettünk. A kezelés 48. órájában sejteket karcoltuk, és további 24 órán keresztül rögzítettük a sebzáródás mértékét. Az egyedi csoportok által bezárt terület arányát, a hormonkezelést nem kapott kontroll MOCK csoport arányában fejeztük ki oszlopdiagrammon, ahol minden oszlop  $n=4-9$ , átlag  $\pm$  SD értéket képvisel. Két csoportot párosítatlan, két mintás  $t$ -tesztel, több csoportot kétutas ANOVA-val hasonlítottunk össze, ahol:  $p<0,05$  (\*),  $p<0,01$  (\*\*) és  $p<0,001$  (\*\*\*) (A). A karcolási esszé kezdeti és végpontján rögzített képek. Méretarány:  $500 \mu\text{m}$  (B). P4: *in vitro* terhes modell, GDB: inzulinrezisztens P4, gesztációs diabétesz modell.

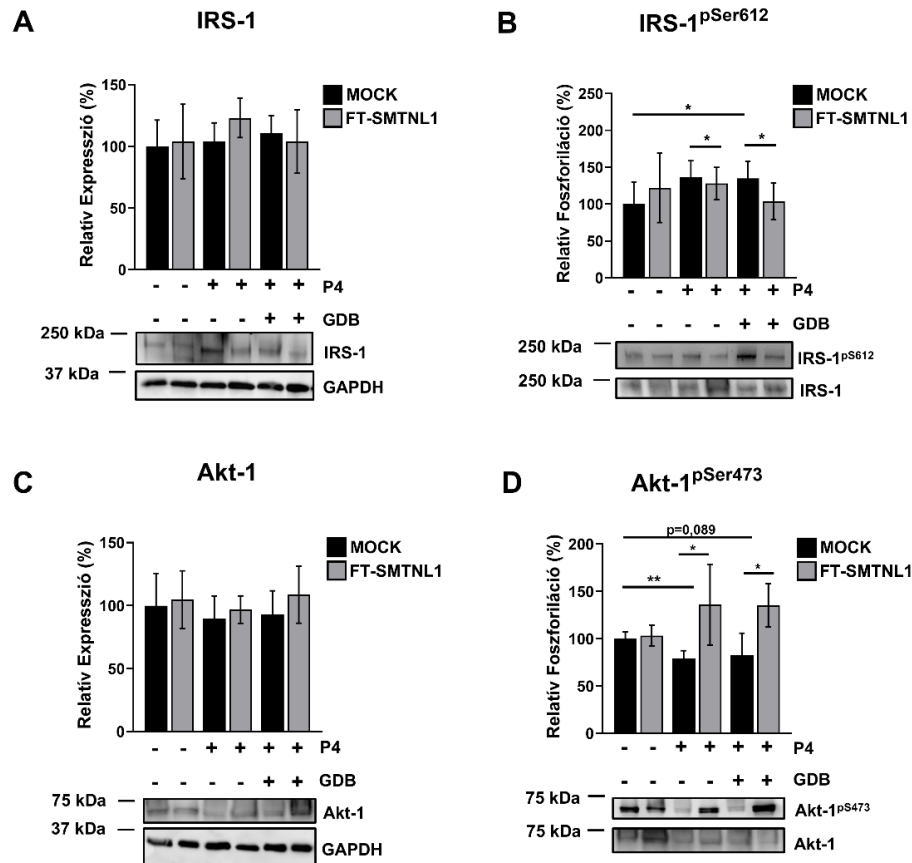
csoport migrációja 28,67%-kal ( $p=0,0227$ ) csökkent a MOCK kontroll csoporthoz képest. Az SMTNL1 overexpresszióra adott migrációs képesség-csökkenés legkifejezettebbnek a P4 és GDB modellekben mutatkozott, melyekben 59,68%-os ( $p=0,0003$ ) és 32,14%-os ( $p=0,0153$ ) csökkenést tapasztaltunk P4 MOCK és GDB MOCK kontroll csoportokhoz viszonyítva. A P4 hormonkezelés hatására 25,8%-kal ( $p=0,0355$ ) nőtt az Ishikawa sejtek migrációja összehasonlítva a nem kezelt MOCK kontroll kísérleti csoporthoz képest, mely jelenség összecseng az endometriális hámsejtek természetes migrációjának indukciójával terhesség alatt. Továbbá, a hormonkezelést nem kapott, FT-SMTNL1 transzfektált csoporthoz képest a migrációs képesség 45,33%-kal ( $p=0,0349$ ) csökkent GDB SMTNL1 transzfektált csoport esetén. Azonban a GDB hormonkezelés önmaga SMTNL1 transzfekció nélkül 41,85%-kal ( $p=0,0067$ ) csökkentette az Ishikawa sejtek migrációját a hormonkezelésben nem részerült MOCK kontrollhoz képest, és 67,66%-kal ( $p<0,0001$ ) a P4 MOCK csoporthoz képest, jelezve a terhességi cukorbetegség patológiás hatását a sejtek migrációjára.

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

A fertilitási zavarok jelenlétét gyakorta kísérő társbetegségként inzulinrezisztencia. Emellett előzetes irodalmi adatok kimutatták, hogy a 2-es típusú cukorbetegség és a metabolikus szindrómára utaló patológiás elváltozásokat mutattak ki az *smtnl1*  $-/-$  null

egerekben (6). További előzetes irodalmi adat alapján, rágszáló vázizom modellen vizsgálva az SMTNL1 kulcsszerepet töltött be az inzulin jelátvitel szabályozásában (167).

Az SMTNL1 endometriális epiheliális sejtekben való inzulin jelátvitelre gyakorolt hatásának tisztázása érdekében célul tűztük ki megfigyelni az IRS-1 és az Akt-1 génexpressziós és poszttranszlációs változásait P4 és GDB modellek között, SMTNL1 overexpresszió hatására (37. ábra).



37. ábra: Az FT-SMTNL1 transzfekció befolyásolja az inzulinreceptor szubsztrát 1 (IRS-1) és az Akt-1 foszforilációját Ishikawa sejtekben. Üres (MOCK) vagy FT-SMTNL1-et tartalmazó vektorral transzfektált Ishikawa sejteket kontroll, P4 vagy GDB modellben tenyésztettük. A sejtek fehérjelizátumait Western blot analízis segítségével vizsgáltuk, anti-IRS-1 (A), anti-IRS-1<sup>pS612</sup> (B), anti-Akt-1 (C) és anti-Akt-1<sup>pS473</sup> (D) elsődleges antitesteket alkalmazva. A totál fehérje denzitását GAPDH belső kontrollra, a foszforiláció mértékét a módosítatlan fehérje denzitására normáltuk. Az adatokat a MOCK transzfektált kontroll csoport átlagának arányában, oszlopdiagrammon ábráztuk, ahol egy oszlop értéke n=3-8, átlag +/- SD. Két csoportot párosítatlan, két mintás t-tesztel, több csoportot kétutas ANOVA-val hasonlítottunk össze, ahol: p<0,05 (\*) és p<0,01 (\*\*). P4: in vitro terhes modell, GDB: inzulinrezisztens P4, gesztációs diabetesz modell.

Az IRS-1 fehérje expresszióját kísérletünk során alkalmazott egyetlen körülmény sem befolyásolta jelentősen (37A. ábra); azonban az IRS-1<sup>pS612</sup> foszforilációja, amelynek emelkedése az inzulinrezisztencia sejszintű markere, 34,87%-kal (p=0,0203) emelkedett a GDB modellben, a MOCK csoportban a hormonkezelésben nem részesült MOCK kontrollhoz

képest. Az FT-SMTNL1 transzfekció mind a P4, mind a GDB modellel kombinálva csökkentette az IRS-1<sup>pS612</sup> foszforilációját a MOCK kontroll párjaikhoz képest, 23,62%-kal ( $p=0,0228$ ) P4, és 31,375%-kal ( $p=0,0305$ ) GDB modell esetén (**37B. ábra**). Az Akt-1 fehérje expressziója változatlan maradt mindegyik általunk vizsgált kísérleti körülményben (**37C. ábra**). A P4 és GDB modellek az Akt-1<sup>pS473</sup> foszforilációját 21,33%-kal ( $p=0,0034$ ) és 17,66%-kal ( $p=0,089$ ) csökkentették hormon által nem kezelt MOCK kontroll csoporthoz képest, ami az inzulinrezisztens modell sikeres létrehozását jelezte (**37D. ábra**). FT-SMTNL1 transzfekció esetén az Akt-1<sup>pS473</sup> foszforilációja 57,33%-kal ( $p=0,0110$ ) nőtt P4, és 53%-kal ( $p=0,0209$ ) növekedett GDB csoportban az azonos hormonkezelésben részesült MOCK transzfektált csoportokhoz képest (**37D. ábra**).

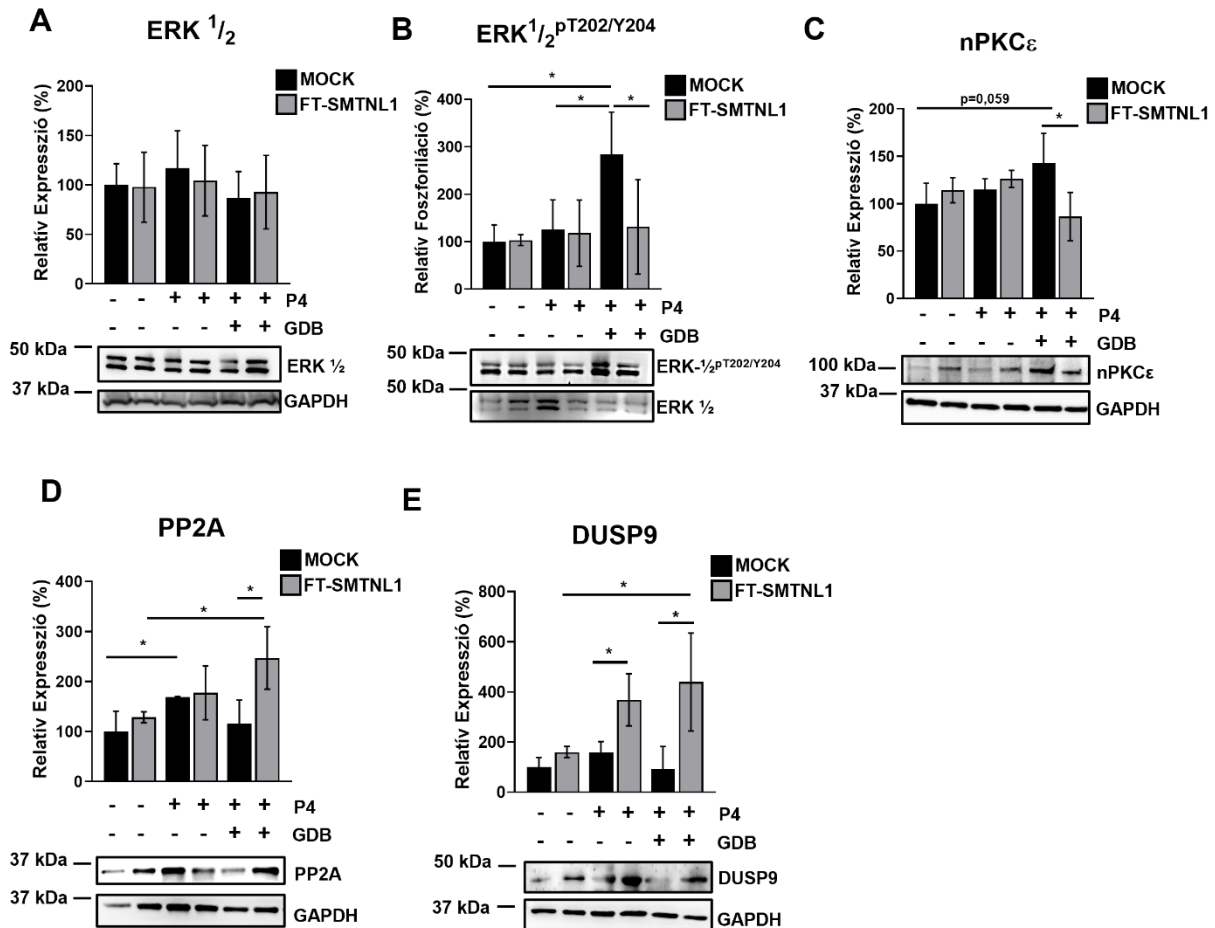
Összességében ezek az adatok alapján elmondható, hogy a terhesség és a hiperinzulinémia-hiperglikémia modellezése terhességi cukorbetegségben inzulinrezisztenciát indukált, és az FT-SMTNL1 overexpresszió ezen modellek hatására kifejlődő poszttranszlációs változásokat enyhítette.

### **Az SMTNL1 közvetetten szabályozza a MAPK aktivitást az Ishikawa sejtek *in vitro* GDB modelljében**

Mivel az FT-SMTNL1 overexpresszió P4 és GDB modellekben befolyásolta az IRS-1 és Akt-1 fehérjék inzulinrezisztenciát jelző poszttranszlációs módosításait, ezért kísérletünk következő céljával tűztük ki az inzulin jelátvitel felsőbb szabályozó elemeinek vizsgálatát. Az inzulin jelátvitel effektor fehérjéinek szabályozása egy összetett jelátviteli kaszkádon keresztül valósul meg, melyben a MAPK kinázok kiemelt szerepet töltenek be. A MAPK-ok aktivitása jelentősen változik inzulinrezisztencia során, az IRS-1<sup>pS612</sup> szabályozásában pedig az extracelluláris jel által szabályozott kináz ½ (ERK ½) kiemelt jelentőségű. Az ERK ½ aktivitása annak Thr202 és Tyr204 oldalláncának foszforiláltsági szintjének függvénye, melynek fő szabályozója az nPKC $\epsilon$ . Kísérletünkben az ERK ½ expresszióját és aktivitását a MOCK, avagy FT-SMTNL1-transzfektált Ishikawa sejtekben kontroll, P4 és GDB modellek között, továbbá értékeltük az FT-SMTNL1 transzfekció hatását nPKC $\epsilon$  kifejeződésére is.

Az ERK ½ expressziójában nem következett be változás egyetlen alkalmazott kísérleti körülményben sem (**38A. ábra**). Azonban az ERK ½ Thr202/Tyr204 relatív foszforilációja 184,33%-kal ( $p=0,0337$ ) és 158,67%-kal ( $p=0,0369$ ) nőtt a MOCK GDB csoportban a kontroll MOCK és P4 MOCK csoportokhoz képest. Az emelkedett ERK ½ foszforiláció 153%-kal ( $p=0,0451$ ) csökkent az FT-SMTNL1 transzfektált GDB csoportban a MOCK GDB csoporthoz képest (**38B. ábra**).

Az új típusú PKC $\epsilon$  hozzájárul az ERK  $\frac{1}{2}$  MAPK aktivitásának befolyásolásához az ERK $\frac{1}{2}$  foszforilációjának növelése által. Az ERK $\frac{1}{2}$  aktivitásával összhangban, a GDB modell 46,125%-kal ( $p=0,059$ ) növelte az nPKC $\epsilon$  kifejeződését a nem hormonkezelt MOCK kontrollhoz képest, illetve az nPKC $\epsilon$  expresszió 67,125%-kal ( $p=0,0190$ ) csökkent az FT-SMTNL1 transzfekció hatására a GDB modellben (38C. ábra).



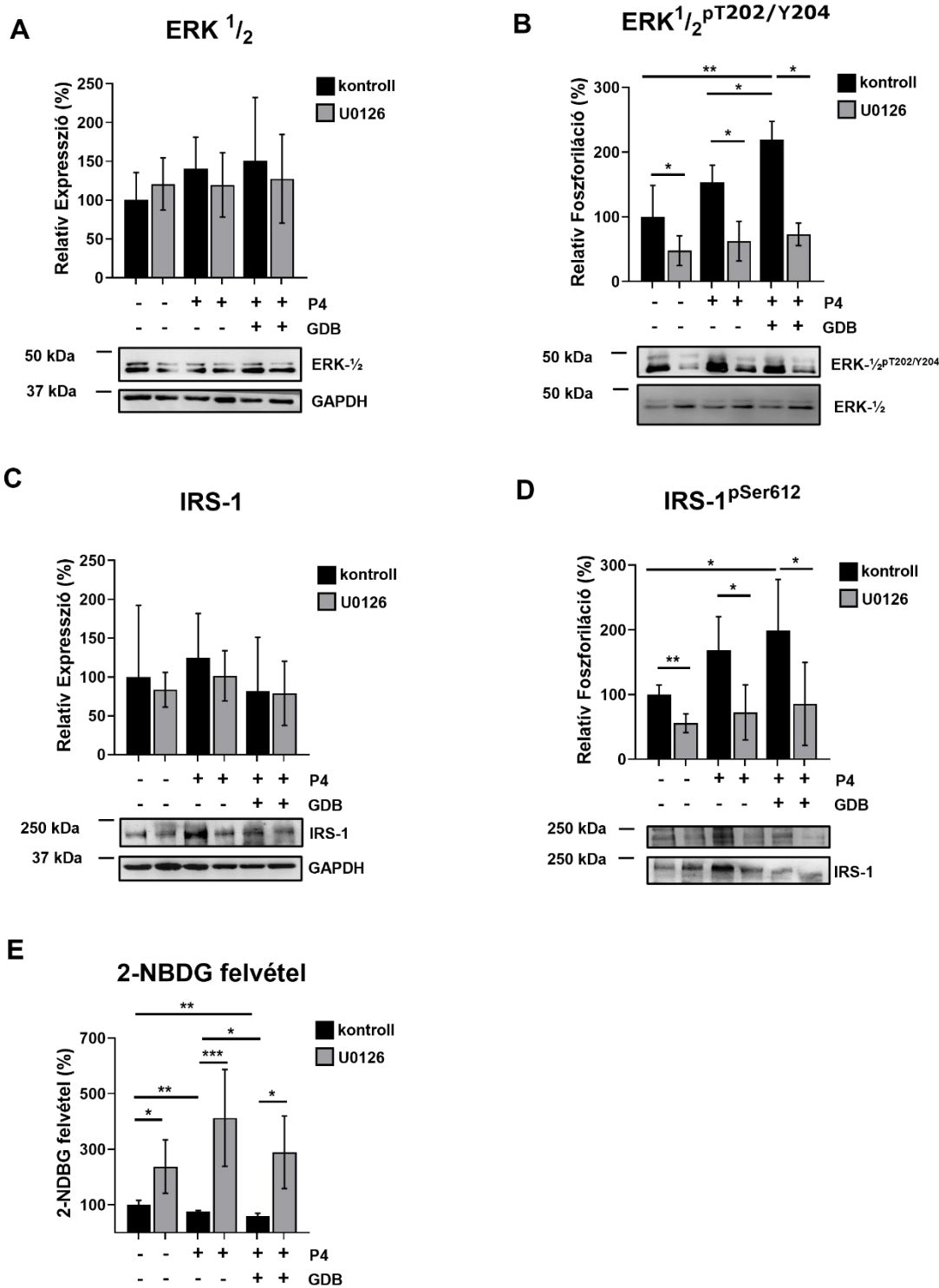
38. ábra: Az FT-SMTNL1 túlermelése befolyásolja az ERK1/2 aktivitását a PP2A és a DUSP9 expressziójának szabályozásával Ishikawa sejtekben. Üres (MOCK) vagy FT-SMTNL1-et tartalmazó vektorral transzfektált Ishikawa sejteket kontroll, P4 vagy GDB modellben kezeltünk. A sejtek fehérjelizátumait Western blot analízissel vizsgáltuk anti-ERK  $\frac{1}{2}$  (A), anti-ERK $\frac{1}{2}$  pT202/Y204 (B), anti-nPKC $\epsilon$  (C), anti-PP2A (D) és anti-DUSP9 (E) elsődleges antitesteket alkalmazva. A teljes fehérje denzitását GAPDH belső kontrollra, a foszforiláció mértékét a teljes fehérje denzitására normáltuk. Az adatokat a MOCK transzfektált kontroll csoport átlagának arányában, oszlopdiagrammon ábrázoltuk, ahol egy oszlop értéke  $n=3-7$ , átlag  $\pm$  SD. Két csoportot párosítatlan, két mintás  $t$ -tesztel, több csoportot kétutas ANOVA-val hasonlítottunk össze, ahol  $p<0,05$  (\*). P4: in vitro terhes modell, GDB: inzulinrezisztens P4, gesztációs diabétesz modell.

Emellett az ERK $\frac{1}{2}$  szabályozásában szerepet játszó regulátor a protein foszfatáz 2A (PP2A) és a kettős specifitású foszfatáz 9 (DUSP9) enzimek, amelyek az ERK1/2 aktiváló foszforilációs hely defoszforilációjával csökkentik az enzim aktivitását (168,169).

A PP2A egy Ser/Thr specifikus protein foszfatáz, amely az ERK $\frac{1}{2}$  defoszforilálását végzi a Thr202/Tyr204-os oldalláncon. A PP2A kifejeződése 68,67%-kal ( $p=0,0420$ ) nőtt a P4 modell hatására, a hormonkezelésben nem részesült MOCK kontroll csoporthoz viszonyítva. Ezenkívül a PP2A expressziója 131,33%-kal ( $p=0,0180$ ) nőtt az FT-SMTNL1 overexpresszió hatására a GDB modellben a GDB MOCK csoporthoz képest (**38D. ábra**). Az FT-SMTNL1 túltermeltetett csoportok összehasonlításakor a hormonkezelésben nem részesült kontroll csoportban 118,75%-kal ( $p=0,0228$ ) csökkent a PP2A expressziója a GDB FT-SMTNL1 transzfektált csoporthoz képest.

Az ERK $\frac{1}{2}$  másik potenciális szabályozója, a DUSP9, mely foszfatáz aktivitásával befolyásolja az ERK $\frac{1}{2}$  működését. A DUSP9 expressziója FT-SMTNL1 túltermelés esetén 346,66%-kal ( $p=0,0104$ ) nőtt a GDB, és 208,17%-kal ( $p=0,0231$ ) a P4 modell hatására (**38E. ábra**). Az FT-SMTNL1 túltermelt csoportok összehasonlításakor a DUSP9 expressziója 279%-kal ( $p=0,0443$ ) nőtt a kontroll és a GDB minták összehasonlítása esetén. Adataink azt sugallják, hogy az SMTNL1 képes csökkenteni az ERK $\frac{1}{2}$  MAPK aktivitását közvetetten az nPKC $\epsilon$  expressziójának csökkentésével és a PP2A és DUSP9 expressziójának növelésével inzuli rezisztens endometriális epitheliális sejtekben.

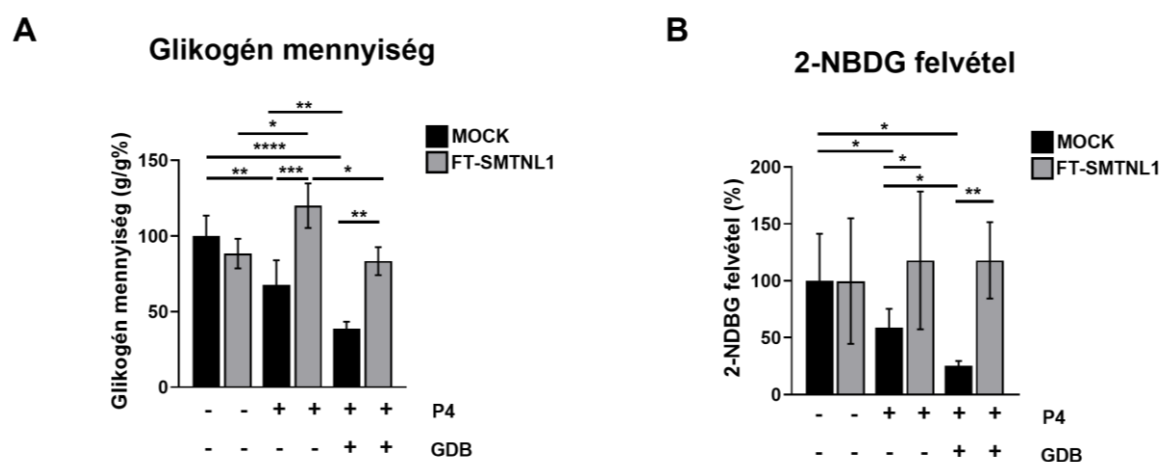
Annak érdekében, hogy tisztázhassuk, hogy az általunk tapasztalt IRS-1 Ser612-es foszforilációjában beállt változások valóban a MAPK útvonal által szabályozottak, ezért az ERK $\frac{1}{2}$  szelektív inhibitorát, az U0126-ot használtuk. Eredményeink alapján, az ERK $\frac{1}{2}$  expressziójának változása nélkül (**39A. ábra**), az ERK $\frac{1}{2}$ <sup>pT202/Y204</sup> foszforilációja minden alkalmazott körülmény hatására csökkent az U0126 kezelés esetén (**39B. ábra**). Az ERK $\frac{1}{2}$  gátlásával párhuzamosan az IRS-1<sup>pS612</sup> foszforilációja is csökkent (**39D. ábra**), miközben expressziója nem változott (**39C. ábra**). Az Ishikawa sejtek glükóz felvétele az NBDG esszé alapján nőtt (**39E. ábra**) U0126 inhibitor hatására, ami egyértelműen bizonyítja az ERK $\frac{1}{2}$  gátlásának inzulinérzékenyítő szerepét.



**39. ábra:** Az ERK<sup>1/2</sup> szelektív gátlása javítja az inzulin jelátvitelt és a glükózfelvételt az inzulinrezisztens Ishikawa sejtekben. Az Ishikawa sejteket 72 órán keresztül kontroll/P4/GDB modellben tenyésztettük, 2  $\mu$ M U0126 kezelés mellett vagy anélkül. A sejtek fehérjel ízatumait Western blot analízissel vizsgáltuk anti-ERK<sup>1/2</sup> (A), anti-ERK<sup>1/2</sup>pT202/Y204 (B), anti-IRS-1 (C) és anti-IRS-1<sup>pSer612</sup> (D) elsődleges antitestek felhasználásával. A teljes fehérje denzitását GAPDH belső kontrollra, a foszforiláció mértékét a teljes fehérje denzitására normáltuk. (E) Az Ishikawa sejteket 72 órán keresztül kontroll/P4/GDB környezetben tenyésztettük, 2  $\mu$ M U0126 kezelés mellett vagy anélkül, és a sejtek 2-NBDG felvételét rögzítettük. Az adatokat a MOCK transzfektált kontroll csoport átlagának arányában, oszlopdiagrammon ábrázoltuk, ahol egy oszlop értéke  $n=3-6$ , átlag  $\pm$  SD. Két csoportot párosítatlan, két mintás *t*-teszttel, több csoportot kétutas ANOVA-val hasonlítottunk össze, ahol  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) és  $p < 0,001$  (\*\*\*). P4: in vitro terhes modell, GDB: inzulinrezisztens P4, gesztációs diabetesz modell.

## Az FT-SMTNL1 transzfekció progeszteron-függő módon elősegíti az Ishikawa sejtek glikogénraktározását és glükózfelvételét

Mivel a méh endometriumának glikogénraktározása egyensúlya elengedhetetlen a fiziológiás homeosztázis fenntartásához, és előzetes eredményeink alapján az SMTNL1 elősegítette az Ishikawa sejtek differenciációját mind P4, mind GDB modellben elősegítve a differenciáció során bekövetkező alapvető funkcionális változások kifejlődését, kísérletünk következő lépéseként célul tűztük ki az SMTNL1 hatásának vizsgálatát Ishikawa sejtek glikogénraktározására és glükóz felvételére kontroll, P4 és GDB modell között (**40. ábra**).



**40. ábra:** Az FT-SMTNL1 transzfekció elősegíti az Ishikawa sejtek glükózfelvételét és glikogénraktározását. (A) A kontroll/P4/GDB modellben kezelt, üres (MOCK), avagy FT-SMTNL1 szekvenciát tartalmazó vektorral transzfektált Ishikawa sejtek glikogéntartalmát a sejtek fehérjekoncentrációjára normalizáltuk. A kontroll MOCK csoport értékét 100%-nak véve a további csoportok értékét ennek arányaként ábrázoltuk oszlopdiagramokon, ahol egy oszlop értéke  $n=3-9$  átlag  $\pm$  SD. Két csoportot párosítatlan, két mintás  $t$ -teszttel, több csoportot kétutas ANOVA-val hasonlítottunk össze, ahol  $p<0,05$  (\*),  $p<0,01$  (\*\*),  $p<0,001$  (\*\*\*) és  $p<0,0001$  (\*\*\*\*). (B) Az Ishikawa sejtek 2-NBDG glükózfelvételét kontroll, progeszteron (P4) és terhességi cukorbetegség (GDB) körülményekben, FT-SMTNL1 transzfekció mellett vagy anélküli csoportokban értékeltük. A 2-NBDG fluoreszcencia értékét normalizálást követően a kontroll MOCK csoport arányaként fejeztük ki oszlopdiagrammon, ahol egy oszlop értéke  $n=3$ -at képviselnek, átlag  $\pm$  SD. Két csoportot párosítatlan, két mintás  $t$ -teszttel, több csoportot kétutas ANOVA-val hasonlítottunk össze:  $p<0,05$  (\*) és  $p<0,01$  (\*\*). **P4:** *in vitro* terhes modell, **GDB:** inzulinrezisztens P4, gesztációs diabétesz modell.

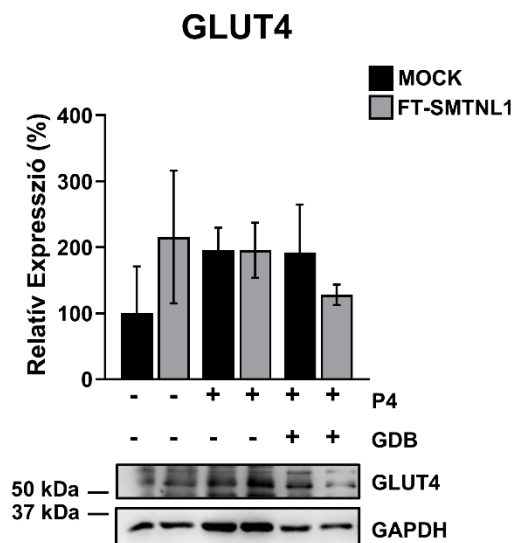
Az FT-SMTNL1 transzfekcióa sejtek glikogéntartalmát 52,5%-kal ( $p=0,0002$ ) növelte a P4 és 44,55%-kal ( $p=0,0024$ ) GDB modellben, a megfelelő MOCK kontrollokhöz viszonyítva. A glikogénraktározás hormonnal nem kezelt kontroll csoporthoz képest csökkent 32,5%-kal ( $p=0,0091$ ) a P4 és 61,25%-kal ( $p<0,0001$ ) a GDB modellt követően Ishikawa sejtekben. A GDB kezelés 28,75%-kal ( $p=0,01$ ) csökkentette a sejtek glikogéntartalmát a P4 MOCK csoporthoz képest. Összehasonlítva az FT-SMTNL1 transzfekción átesett csoportokban 36,67%-os ( $p=0,0226$ ) csökkenés mutatkozott a sejtek glikogéntartalmában a

GDB csoportban a P4 kezelt csoporthoz képest. A glikogéntartalom csökkenése a P4 modellben megfelel a terhesség során várásos nőkben lejegyzett fiziológiás inzulinrezisztencia jelenségének. Azonban a glikogénraktározás fokozott csökkenése a GDB csoportban a hiperglikémiás-hiperinulinémiás környezet hatásának tulajdonítható. A glikogéntartalom csökkenése mind a P4, mind a GDB modellben mérséklődött az FT-SMTNL1 transzfekció hatására. Ezek alapján elmondható, hogy az SMTNL1 erős inzulinérzékenyítő hatást mutatott mind a P4, mind a GDB modellek között kezelt Ishikawa sejtek esetén (**40A. ábra**).

Az SMTNL1 endometriális epitheliális sejtek glükóz homeosztázisára gyakorolt hatásainak további feltérképezésének érdekében a 2-NBDG glükóz felvételi esszét kiviteleztünk. 1 órán keresztül 2-NBDG glükózzal való inkubációt követően, az Ishikawa sejtek által felvett glükóz mennyiségét a 2-NBDG fluoreszcencia intenzitás kvantifikálása alapján mértük. Az FT-SMTNL1 transzfekció jelentősen növelte a glükózfelvételt az Ishikawa sejtekben (**40B. ábra**), 59,13%-kal ( $p=0,0459$ ) a P4, és 92,47%-kal ( $p=0,0037$ ) a GDB kezelt csoportokban, a MOCK kontrollhoz képest. A felvett glükóz mennyisége 41,33%-kal ( $p=0,0376$ ) és 76,67%-kal ( $p=0,0125$ ) csökkent a P4 MOCK és GDB MOCK transzfektált csoportokban a hormonkezelést nem kapott kontroll MOCK csoporthoz képest. A GDB kezelt csoport 2-NBDG glükózfelvétele csökkent a P4 MOCK csoporthoz képest 33,34%-kal ( $p=0,0127$ ). A P4 és GDB modellre válaszul bekövetkező csökkent glükózfelvétel javuló tendenciát mutatott mindkét hormon szupplementált csoportban FT-SMTNL1 transzfekció esetén, mely jelenség összefüggést mutat a szintén ezen csoportokban tapasztalt megnövekedő glikogénraktározás eredményeivel (**40. ábra**).

Összességében eredményeink azt jelzik, hogy az SMTNL1 elősegítette a glikogénraktározást és támogatta az endometriális epithelilás sejtek differenciálódás során bekövetkező alapvető funkcionális változásokat, miközben érzékenyítette a sejteket az inzulin hatására, növelve azok glükózfelvételét.

Annak érdekében, hogy kizárhassuk, hogy a glikogénraktározásban és glükóz felvételben tapasztalt változások oka nem az alkalmazott kísérleti körülmények hatására bekövetkező GLUT4 transzporter expressziójában beállt módosulás következménye, megvizsgáltuk a GLUT4 expresszióját kontroll, P4 és GDB modellek esetén, FT-SMTNL1 transzfekció mellett, vagy a nélkül (**41. ábra**). A GLUT4 transzporter expresszióját egyik alkalmazott kezelés sem változtatta jelentős módon (**41. ábra**), így a glikogénraktározás és a 2-NBDG felvétel megváltozása az SMTNL1 transzfekció által okozott transzporter lokalizáció változásának tulajdonítható.



**41. ábra:** GLUT4 expresszió változatlan kontroll/P4/GDB illetve FT-SMTNL1 transzfekció hatására. A kontroll/P4/GDB modellben kezelt, üres (MOCK), avagy FT-SMTNL1 szekvenciát tartalmazó vektorral transzfektált Ishikawa sejtek fehérjelizátumait Western blot analízissel értékeltük anti-GLUT4 ellen termeltetett elsődleges antitest használatával, a sávok denzitását a belső kontroll GAPDH denzitására normalizáltuk. A kontroll MOCK csoport értékét 100%-nak véve eredményeinket oszlopdiagrammon ábráztuk, ahol minden oszlop  $n=3-5$ , átlag  $\pm$  SD értéket képvisel. **P4:** in vitro terhes modell, **GDB:** inzulinrezisztens P4, gesztációs diabétesz modell.

# Megbeszélés

## A PPM1B tumorszuppresszív szerepe a MP/PRMT5/H4 protoonkogén jelátviteli pályán

A PPM1B szerepének feltárása a humán cervicalis karcinóma (méhnyakrák) kialakulásában egyre frekventáltabb kutatási területté válik a tumorbiológia és a molekuláris onkológia világában. A méhnyakrák, mint a női reproduktív szervrendszer egyik legnagyobb prevalenciával bíró rosszindulatú daganata, komplex pathomechanizmus révén alakul ki, és az ezen témakörben végzett kutatások célja, hogy feltérképezzék azokat a molekuláris jelátviteli útvonalakat, amelyek meghibásodása hajtja a sejtek onkogenezisét, valamint fokozza a daganatok metasztázis-képző hajlamát (170).

A PPM1B, ami egy  $Mg^{2+}/Mn^{2+}$ -függő protein foszfatáz, fontos szerepet játszik a sejtek jelátviteli útvonalainak szabályozásában, továbbá befolyásolhatja azokat a jelátviteli útvonalakat melyek a sejtek növekedését és túlélését szabályozzák (171). Előzetes tanulmányok már leírták a PPM1B tumorszuppresszív a funkcióját, ám a disszertáció készítésének idejében a Humán Protein Atlasz alacsony tumor-specificitást rendel a fehérjéhez. A PPM1B gátolta a gyomorrákból izolált sejtek migrációját és invázióját *in vitro*, illetve a tumor metasztázis képzését is *in vivo* az által, hogy defoszforilálta a Rho-aktiváló GTPáz inaktíváló fehérje 1 (RhoGDI1) fehérjét. Ezen eredmények alapján, mint egy diagnosztikus biomarkert karakterizálták (172). Továbbá a PPM1B overexpressziója gátolta a hólyagrák sejtek proliferációját és tumorigenitását (65). Hepatocelluláris karcinóma sejtek proliferációját és migrációs képességét a PPM1B csendesítése növelte (65), továbbá ezen sejtvonalban kimutatták a PPM1B degradációjának felgyorsulását is (66). A PPM1B szerepét a méhnyakrákban a szöveti minták vizsgálatai is alátámasztják. A méhnyakrák biopsziás szövetekben a PPM1B kifejeződése jelentősen csökkent és a kutatások arra utalnak, hogy ez a csökkenés összefüggésben áll a daganat progressziójával. Az eddigi kutatások azt is megmutatták, hogy a PPM1B mennyiségének helyreállítása, vagy annak aktivitásának fokozása a méhnyakrák kezelésében potenciális terápiás megközelítést kínálhat.

Munkánk során leírtuk a PPM1B-t mint az MP/PRMT5/hiszton 4 jelátviteli útvonal felsőbb szabályozó elemét, amely egy ezidáig nem jellemzett tumorképző mechanizmusban vesz részt HeLa sejtekben és méhnyakrákban egyaránt. Kísérleteink során immunprecipitációs, pull-down esszé, illetve Duolink technikák felhasználásával validáltuk a PPM1B protein

foszfatáz és a MP közötti kölcsönhatást, mind citoplazmatikus, mind sejtmagi lokalizációban, mely során a PPM1B a MP MYPT1 szabályozó alegységével létesített kapcsolatot (**12. és 13. ábra**). Ezen eredmény összecseng olyan korábbi irodalmi adatokkal, melyek tömegspektrometriás analízis alapján azonosították a PPM1B-t, mint a MYPT1 nukleáris kölcsönható partnerét (9). Bár az enzimek között sejtmagon belül fennálló fehérje-fehérje kölcsönhat már korábban igazolták, a Duolink Proximity Ligation esszé által nyert eredményeink alapján sejthető, hogy a két enzim közötti kölcsönhatás a nukleuszon kívül is fennáll (**13. ábra**), a sejtek citoplazmatikus régiójában töltve be jelátvitelt szabályozó szerepet. Eredményeink alapján a PPM1B mutatkozott a sejtek mind citoplazmatikus, mind magi frakciójában, ezen adatot alátámasztja olyan korábbi publikáció, mely az endogén PPM1B-t 3T3-L1 adipociták sejtmagjában lokalizálták, ahol a PPM1B peroxiszóma proliferátor aktivált receptor gamma (PPAR $\gamma$ )-val létesített kapcsolatot (166). Továbbá a PPM1B-t már leírták MAPK és az AMPK jelátvitel szabályozójaként is, melyek a sejtek citoplazmatikus frakciójára lokalizálódnak (171). HepG2 sejtek nukleáris és mikroszomális frakciójában, valamint neuronális sejtek magjában már szintén karakterizálták MYPT1 jelenlétét (70,86). Igazolódott ezen pozícióban a nukleáris MP és a metiloszóma komplex PRMT5 enzimje közötti kölcsönhatás, mely során a MP a PRMT5 aktivitásának modulációján keresztül szabályozza a génexpressziót (9).

Az előzetes irodalmi adatok alapján méltán merül fel a kérdés, mégis mi a jelentősége a PPM1B és az MP közötti kölcsönhatásnak? A válasz pedig a MP szabályozásában keresendő. A MYPT1 számos konszenzus szekvenciát tartalmaz, melyeken keresztül különféle protein-kinázokkal képes kapcsolat kialakítására, és ezek közül a Thr696 hely foszforilációja az MP aktivitásának gátlását eredményezi (173) (174) (8). Meglepő módon, a MYPT1 sejtmagi interaktomjában egyetlen olyan protein kinázt sem azonosítottak, mely biztosítaná a MYPT1 Thr696 oldallánc történő foszforilációját (70). Ezen ismeret annak lehetőségét veti fel, hogy a MP előzetesen a sejtek citoplazmatikus régiójában foszforilálódik, és ezen módosított állapotban transzlokálódik a sejtmagba (175).

*In vitro* kináz-foszfatáz esszék eredményei – mely során ROK kinázt és tisztított, enzimatikusan aktív, rekombináns PPM1B enzimet használtunk –, igazolták a PPM1B és MP között fennálló enzim-szubsztrát kapcsolatot, mely kölcsönhatás során a MP MYPT1 szabályozó alegységének Thr696 foszforilációs helyét azonosítottuk, mint a PPM1B szubsztrátját (**14. ábra**). A PPM1B-MYPT1 közötti kölcsönhatás validálásán túl a MP aktivitás mérését is elvégeztük HeLa sejtek kultúráján, mely során az SNG és OA gátlószereket önmagukban vagy kombináltan alkalmaztunk (**16. ábra**). Az SNG egy alkaloid vegyület,

melyet karakterizáltak, mint a PPM1 enzimek inhibitora (162,163), az OA pedig mind a PP1 mind PP2A gátlószere. Előzetes irodalmi adatokra támaszkodva választottuk meg a kísérleteink során alkalmazott koncentrációkat, melyek alapján az OA 50 nM-os koncentrációban alkalmazva csak a PP2A protein foszfatázok inaktiválását váltja ki, a PP1 típusúak működését bizonyítottan nem gátolja (70). Ezen adatokat figyelembe véve, a kísérletünk során tapasztalt, PP1c katalitikus alegységet tartalmazó MP aktivitásának csökkenése kizárólag a PPM1B gátlása által magyarázható (**16. ábra**). Az SNG alkalmazása esetén megfontolási szempont a mitogén-aktivált protein kináz foszfatáz-1 SNG általi gátlásának sejtes rendszerben mért 17  $\mu$ M-os félhatásos dózisa volt, ám kísérletünkben az SNG 1  $\mu$ M-os koncentrációban lett alkalmazva, így kizárható az SNG további aspecifikus határa (163). A PPM1B gátlása nem okozta az MP aktivitásának teljes gátlását (**16. ábra**), ezért feltételezhető, hogy a PPM1B-n kívül létezik még más MYPT1-et defoszforiláció által aktiválni képes protein foszfatáz, mellyel a PPM1B együttműködve az MP holoenzimet (176).

Az a következtetésünk, miszerint a PPM1B a sejtmagban a MP legfontosabb upstream szabályozója, azon alapszik, hogy a nukleáris MYPT1 interakcióban más protein foszfatáz nem került azonosításra (9), valamint a MYPT1 gátló foszforilációs szintje szignifikáns változást mutatott az SNG kezeléssel átesett HeLa sejtek sejtmagi frakciójában (**18. ábra**). A PPM1B SNG általi gátlása révén kifejlődő változásokat HeLa sejtek szubcelluláris frakcióiban vizsgáltuk a MP/PRMT5/H4 tengelyen. Az SNG kezelés hatására bekövetkező változások ezen foszfatáz gátlásának tulajdoníthatóak. A MYPT1<sup>Thr696</sup> foszforilációjának szignifikáns növekedése a nukleuszban és a teljes sejtlizátumban együtt járt a MYPT1 citoplazmából sejtmagba történő transzlokációjával, immunfluoreszcens festéssel, illetve Western blot analízissel vizsgálva (**18. ábra**). A MYPT1 fehérje megemelkedett gátló foszforilációjának hatása együtt járt a MP direkt szubsztrátjának, a PRMT5 fehérjének az aktiváló Thr80 foszforilációjának emelkedésével mind teljes sejtlizátumban, mind a citoplazmában és a sejtmagban, mely változást a PRMT5 szubsztrátjának, a H4-es fehérjének a teljes sejtlizátumban, illetve sejtmagi frakcióban mért emelkedett szimmetrikus dimetilációja követett (**19. és 20. ábra**).

Az SNG kezelés igazolásként, illetve a PPM1B izoforma specifikus hatásainak igazolására elvégeztük a FT-PPM1B overexpresszióját. Az FT-PPM1B transzfekció csökkentette a MYPT1 gátló foszforilációját a Thr696 oldalláncon, mely együtt járt a PRMT5 Thr80 aminosavmaradék foszforilációjának csökkenésével és a H4-es fehérje szimmetrikus dimetilációjának redukálódásával a HeLa sejtek nukleáris frakciójában (**22.-24. ábra**).

Kutatócsoporthozunk előzetes munkái már rögzítették HepG2 sejteken végzett kísérletek alapján a protoonkogén jelátviteli útvonal túlzott aktivációját MYPT1 csendesítése esetén, amely csökkentette számos tumorszuppresszor gén kifejeződését, miközben növelte potenciális onkogének expresszióját (9). HeLa sejteken kultúráján végzett kísérleteink által nyert *in vitro* eredményeink támogatásaként elemeztük a PPM1B által szabályozott MP/PRMT5/H4 jelátviteli útvonalat humán méhnyakrákból származó szöveti biopsziákon is, mely elemzésünk eredményi igazolták hipotézisünket (26. *ábra*). Ezen előzetes irodalmi publikációk koherensek azon megfigyelésünkkel, miszerint a PPM1B expressziója markánsan csökkent humán cervicalis karcinóma lizátumaiban egészséges szövetből származó kontroll párjukhoz képest (26. *ábra*).

Mivel általánosságban elmondható előző évek kutatási eredménye alapján, hogy a protein kinázok aktivitásának túlsúlyra jutása protoonkogén jelátvitelre hajlamosít, míg a protein foszfatázok aktivitásának elvesztése ugyanitt malignus átalakulást eredményezhet. A klinikumban használt terápiás szerek pont ezért kinázok aktivitását gátolják, vagy pedig protein foszfatázok aktivitását emelik. A munkánk során vizsgált miozin foszfatáz PP1c katalitikus alegységének aktiválása problémákba ütközik, mivel ezen alegység számos más PP1 szupercsaládba tartozó enzim szerkezetében fellelhető, így ennek aktiválása szerteágazó következményeket vonhat maga után. A miozin foszfatáz holeonzim aktivitásának specifikus fokozása elérhető lehet vagy a MYPT1 alegység kináz típusú gátlóinak inhibíciójával, vagy pedig a holoenzimet aktiváló kis molekulákkal. Az utóbbi lehetőségre potencialis jelölt a PPM1B fehérje. Eredményeink új perspektívát nyitnak azon a molekuláris mechanizmusra, amely révén a PPM1B a MP aktiválásán keresztül szabályozni képes az onkogenezist. Az MP és a PPM1B egyértelműen tumorszuppresszív szereppel bír, mely funkciók inaktiválódnak humán malignus daganatok kifejlődése során. A PPM1B és az MP prognosztikai jelentősége a legtöbb ráktípusban – például a méhnyakrákban – nyilvánvaló, farmakológiai szerrel történő aktiválásuk kemoterapeutikumként alkalmazva potenciális rákterápiás módszernek ígérkezik.

## **Az SMTNL1 fehérje elősegíti a humán endometriális epitheliális sejtek differenciációját, és inzulinérzékenyítést okoz *in vitro* terhes és gesztációs diabétesz modellben**

Az endometriális epithelium zavartalan differenciációja alapvető fontosságú a női reprodukciós ciklus egészséges lezajlásában. Az endometrium reakciókészsége szükséges, ám

nem elégséges feltétele a sikeres megtermékenyítésnek és a terhesség fenntartásának (177), mely kezdeti lépése a blasztociszta legkülső sejtrétege, a trophoblast, és az endometriális epitheliális sejtek közötti sejt-sejt kommunikáció. A diszfunkcionális vagy hibás hámsejtek reprodukciós kudarchoz vezethetnek. Az endometrium diszfunkciója számos szerzett és genetikai faktor eredménye lehet, az élet során kifejlődő társbetegségek közül az inzulinrezisztencia az egyik listavezető prediszponáló tényező, habár a molekuláris mechanizmus, ami által a glükóz metabolizmus zavara interferál a fertilizációval még nem egészében feltárt.

Hipotézisünk szerint a meghibásodott inzulin jelátvitel révén, szteroidhormon-függő módon fertilitási zavarokat okozó mechanizmus egyik fő szabályozó eleme az SMTNL1 fehérje. Az SMTNL1 fehérje egy relatíve új kutatási célpont a női reprodukív rendszer betegségei, különösen az endometriális (méhnyálkahártya) diszfunkciók területén. Az SMTNL1, amely az simaizomsejtek és szteroidhormon reszponzív szövetek PR-B receptor ko-aktivátoraként is ismert, SMTNL1 KO egerekben csökkent reprodukív képességet eredményezett, mely megmutatkozott az implantálódó embriók csökkent számában, az emelkedett az embrionális letalitásban, illetve a két vemhesség közötti megnyúlt időintervallumban is (111). Továbbá az SMTNL1 KO egerek nagyobb incidenciával fejtek ki metabolikus szindrómát, illetve gesztációval összefüggő inzulinrezisztens állapotokat, jelezve az SMTNL1 által szabályozott jelátviteli utak közötti kapcsolatot (111). Ezen előzetes adatok alapján az SMTNL1 részt vesz az inzulin jelátvitel, illetve az inzulinszerű növekedési faktorok (IGF) szignáljait közvetítő jelátviteli útvonalak, mint például a PI3K/Akt és a MAPK útvonalak szabályozásában is (167). Ezen mechanizmusok közvetlenül befolyásolják az endometriális sejtek proliferációját, differenciációját és túlélését. Az SMTNL1 expresszióját már korábban lejegyezték az endometriumban (111), mindezen előzetes kutatási eredmények pedig arra utalnak, hogy az SMTNL1 fehérje az endometriális szövetek fiziológiás állapotának fenntartása szempontjából fontos szerepet játszik (114),(6). Az SMTNL1 mind PR-B ko-aktivátorként, mind önálló integritásként való működése segíthet megőrizni az endometriális epithelium fiziológiás funkcióját, elősegítve ezzel a megfelelő sejtosztódást és differenciációt. Ezenkívül az SMTNL1 képes szabályozni a sejtek anyagcseréjét és az energiafelhasználást, amelyek kritikusak a méhnyálkahártya egészséges működésében, különösen a menstruációs ciklus különböző szakaszaiban és a terhesség fenntartásában.

Munkánk során endometriális epitheliális adenokarcinómából származó Ishikawa sejteket használtunk, amely sejt vonalat sok előzetes irodalmi publikáció is alkalmazta endometrium modellezésére (159,160). Az Ishikawa sejtek a méh luminális epitheliumát

reprezentálják, mely egy egyrétegű köbhám, az epitheliláis sejtek egyszerű csöves mirigyeket formálva terjednek le az endometrium mélyebb rétegeibe, a női nemi ciklus során pedig mind morfológiailag, mind funkcionálisan átalakulnak a progeszteron és ösztrogén szteroid hormonok hatására (178).

Kísérletünkben a kontroll kezelt és a MOCK transzfekciós csoport sejtjei köbös megjelenést mutattak, poligonális és pleomorph morfológiával, irreguláris alakú sejtmagot tartalmaztak, melyben kicsi, prominens nukleolusz volt található. A sejtek magas nukleusz/citoplazma aránnyal rendelkeztek (30. *ábra*). Ezen megfigyeléseink összhangban vannak előzetes közleményekkel (178). A kezelésünk során alkalmazott progeszteron a sejtek alakját differenciációs mechanizmus során megváltoztatta, mely folyamat eredményeként a sejtek megnagyobbodtak, alakjuk köbösből hengeresre váltott, bennük vakuolumok szaporodtak fel (30. *ábra*). Ezen eredmények egybeváltak azon korábban lejegyzett megfigyeléssel, miszerint patkány endometrium luminális felszínén progeszteron és ösztadiol hatására differenciációs mechanizmus indukálódott, mely során a sejteken sűrű mikrovillusok jelentek meg, a citoplazmában pedig számos vakuolum fejeződött ki (179). A progeszteron kezelés kombinációja hiperglikémiás körülményekkel együtt gátolta a differenciációra jellemző alaki változások megjelenését, a sejtek megtartották eredeti köbös formájukat (30. *ábra*). Az FT-SMTNL1 transzfekció elősegítette az Ishikawa sejtek *in vitro* differenciációját, szinergista hatást fejtve ki a kísérlet során alkalmazott progeszteronnal (30. *ábra*), illetve a GDB modellben differenciációs blokkot szenvedő sejtek külső alaki változásait is elősegítette (30. *ábra*). A morfológiai változásokat a MUC-1 differenciációs marker mRNS szintjének mérésével és HCS analízissel is megerősítettük. A MUC-1 fehérje humán diagnosztikai eljárások során is alkalmazott fertilitási marker, melyet meddőségi vizsgálatok esetén a ciklus „fertilitási ablak” időszakban vett endometriális biopsziából analizálnak (180,181). Az FT-SMTNL1 transzfekció mind P4 mind GDB modellekben emelte a differenciációs marker kifejeződését (31. *ábra*).

Mivel az FT-SMTNL1 transzfekció befolyásolta az Ishikawa sejtek differenciáció során bekövetkező citoskeletális változásait, ezért célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk egyéb citoskeletális szabályozó elemek expresszióját és aktivitását FT-SMTNL1 transzfekció esetén, kontroll, P4 és GDB modellek között, fókuszba állítva a sejtek migrációját és motilitását, melynek egyik fő szabályozója a MP. A MP fő citoskeletális szubsztrátja a MLC20, melyet defoszforilálva az MP képes szabályozni a sejtek kontraktilitását, migrációját, modulálva az akto-miozin komplex átrendeződését (182). Előzetes közleményekre támaszkodva, melyek rágcsejtek endometriumán végeztek vizsgálatokat (183), feltételeztük,

hogy a MP aktivitása elengedhetetlen az endometriális epithelális sejtek kontraktilis funkcióihoz, illetve hogy az Ishikawa sejttypusban expresszáldó MP izoforma szabályozó alegysége a MYPT1 (184). Továbbá, támogatta hipotézisünket azon publikáció, melyben az SMTNL1 a progeszteron receptor ko-aktivátoraként negatíván szabályozta a MYPT1 génkifejeződését vázizomban, a mellkasi aorta, és a méh simaizom rétegeiben (114). Így kísérletünk célpontjába az MP szabályozó alegységét, az MYPT1-t, és annak szubsztrátját, az MLC20-at helyeztük.

Eredményeink szerint az FT-SMTNL1 transzfekció progeszteron-függő módon csökkentette a MYPT1 fehérjének az expresszióját P4 modellben, mely hatás még kifejezettebbé vált a GDB környezetben (32. *ábra*). Az FT-SMTNL1 transzfekció hatására bekövetkezett redukált MYPT1 génexpresszó kiegészült GDB és P4 modellekben a MYPT1<sup>P696</sup> gátló foszforiláció emelkedésével, tovább fokozva az MP gátlását, melynek hátterében az SMTNL1-MYPT1 közötti fehérje-fehérje kölcsönhatás állt (6) (33. *ábra*). A deprimált MYPT1 expresszió és MP gátlás következményét, annak szubsztrátja, az MLC20 vizsgálatával elemeztük (34. és 35. *ábra*). Az MLC20 expressziója nem változott egyetlen alkalmazott kísérleti körülményben sem (34. *ábra*), viszont foszforilációja az MLC20<sup>Ser19</sup> oldalláncon FT-SMTNL1 transzfekció hatására megemelkedett P4 és GDB modellekben, összhangban MYPT1 kifejeződésének azonos körülményekben mért csökkenésével, és emelkedett gátoltságával (35. *ábra*).

Az MP aktivitásában a szabályozó MYPT1 alegysége és szubsztrátja, az MLC20 foszforilációjában bekövetkezett változások következményeit kontroll, P4 és GDB modellek között, FT-SMTNL1 transzfekció esetén, avagy anélkül a sejtek migrációs kapacitásán is felmértük (36. *ábra*). Az FT-SMTNL1 overexpressziója minden kísérleti körülményben negatíván befolyásolta az endometriális hámsejtek migrációját, összhangban azon előzetes kísérleti eredményünkkel, melyben az FT-SMTNL1 transzfekció a MYPT1 és MLC20-ra kifejtett szabályozó hatása (32.-35. *ábra*) magyarázza a sejtek csökkent migrációs képességét. Kísérleti eredményeink szerint az Ishikawa sejtek migrációja FT-SMTNL1 transzfekció hatására P4 és GDB modellben is csökkent (36. *ábra*). Eredményeinket alátámasztja azon megfigyelés, miszerint az FT-SMTNL1 transzfekció C2C12 mioblasztok migrációját csökkentette az MP gátlásán keresztül (185), továbbá hasonló megfigyelést tettek HepG2 sejtek migrációját vizsgálva is (114). Az MP aktivitása szabályozza a sejttest összehúzódását (186). Az MLC20 ciklikus foszforilációja és defoszforilációja, mely a sejtek kontrakciójának alapmechanizmusa, az MP gátlásán keresztül megreked a foszforilált fázisban, késleltetve ezáltal az effektív kontrakciót, ezáltal a migrációt is (187).

Összességében eredményeink és korábbi tanulmányok azt mutatják, hogy az MP elősegíti az Ishikawa sejtek migrációját, amíg az inzulinrezisztens állapotban alkalmazott FT-SMTNL1 overexpressziója hátráltatja azt. Ezen megállapítás fontossága abban rejlik, miszerint a szteroidhormonok homeosztázisának felborulása befolyásolhatja a méh endometrium epiteliális rétegének integritást, illetve az endometriális epitheliális sejtek migrációs képességét. Számos korábbi irodalmi adat mutatott ki összefüggést a szteroidhormonok homeosztázisának egyensúlyzavara és a metabolikus rendellenességek között. A diabétesszel kísért elhízás szindrómájának incidenciája C57BL/KsJ (*db/db*) egerekben a női nemi traktus progresszív celluláris atrófiájával és diszfunkciójával kísérve jelent meg (188), kifejezetten deprimálva az endometriális epithelium integritását (189) és csökkenve a sejtek érzékenységét az alkalmazott hormonterápiára (189,190). Emellett az elhízás és az inzulinrezisztencia fokozta az endometriális malignus folyamatok kialakulásának kockázatát (191,192). Számos méhsejt kultúrán végzett kísérlet arra utal, hogy az inzulin receptor aktivitása, illetve ligésjai befolyásolják az endometriális sejtek proliferációját és differenciálódását. Az endometriális hiperglikémia/hiperinzulínémia metabolikus következményei reproduktív diszfunkcióval és szövetsorvadással járnak (193). Eredményeink szerint az SMTNL1 fehérje kulcsszerepet játszik az endometriális sejtek inzulin jelátvitelének regulációjában.

Az IRS-1 fehérje Ser612 oldalláncának foszforilációja emelkedett GDB modellben, anélkül, hogy befolyásolta volna az IRS-1 expresszióját (**37. ábra**). Az FT-SMTNL1 túlzott kifejeződése csökkentette ezen Ser612 foszforilációt mind a P4, mind a GDB modellekben (**37. ábra**). Inzulinrezisztens állapotokban az IRS-1 fehérje Tyr foszforilációjának eltolódása Ser túlsúlyra az IRS-1 fehérje disszociációját idézi elő a PI3K-tól, ami az inzulin jelátvitel defektusát okozza (194). Ezen Ser612 oldallánc foszforilációért az ERK $\frac{1}{2}$  MAPK a felelős, mely révén az ERK $\frac{1}{2}$  aktivitása jelentős szerepet játszik a PI3K-függő inzulinrezisztencia kialakulásában és fenntartásában (195).

Az ERK $\frac{1}{2}$  kifejeződésének mértékét nem befolyásolta egyetlen kísérleti körülmény sem (**38A. ábra**), viszont emelkedett foszforilációját mértük GDB modell esetén, mely mérséklődött FT-SMTNL1 transzfekció alkalmazására, csökkentve ezzel az ERK $\frac{1}{2}$  aktivitását (**38B. ábra**), mely összhangban volt az IRS-1 Ser612 foszforilációjának csökkenésével, azonos kísérleti körülmények között (**37. ábra**). Az ERK $\frac{1}{2}$  aktivitás csökkenésének magyarázatára az ERK $\frac{1}{2}$ -t szabályozó Ser/Thr kinázok és foszfatázok expressziójának csökkenésében, avagy növekedésében kerestük a választ.

Az ERK $\frac{1}{2}$  MAPK egyik szabályozó eleme az új típusú PKC $\epsilon$  izoformája az endometriális szövetekben (196). PKC $\epsilon$  expresszió csökkent SMTNL1 KO *in vitro* egér

vázizom modellben (111), a lecsökkent PKC $\epsilon$  kifejeződés pedig negatívan befolyásolta az ERK $\frac{1}{2}$  aktivitását, ezáltal az IRS-1 Ser612 foszforilációját C2C12 sejtvonalon (167). Azonban kísérletünk során az FT-SMTNL1 transzfekció nem fejtett ki statisztikailag szignifikáns változást a nPKC $\epsilon$  expressziójára Ishikawa sejtekben P4 csak GDB modellben (**38C. ábra**). Vemhes SMTNL1 KO egerek méhén végzett mikroarray analízis vizsgálatokban a MAP kinázok expressziója nem modulálódott vad típusú társaikhoz hasonlítva (111). Ezért az ERK $\frac{1}{2}$  FT-SMTNL1 transzfekció hatására bekövetkező aktivitás-csökkenés magyarázatát a szabályozó foszfatázok kifejeződésének mértékében kerestük.

A PP2A, egy Ser/Thr specifikus protein foszfatáz, és az ERK $\frac{1}{2}$  MAPK negatív szabályozója (194). Kísérletünk során a PP2A expressziójának mértéke növekedett P4 modell hatására, de GDB modellben ez a növekedés megszűnt (**38D. ábra**). Az FT-SMTNL1 overexpressziója növelte a PP2A expresszióját és feltételezhetően aktivitását GDB modell esetén. Ezen eredmény szembe megy azon korábbi megfigyeléssel, miszerint vázizom modellen a PP2A expresszióját az FT-SMTNL1 overexpresszió nem befolyásolta (167), viszont az endometrium szteroidhormon érzékenysége választ ad a két eltérő sejttypusban leírt tapasztalatokra.

Az ERK $\frac{1}{2}$  másik potenciális szabályozója a DUSP9, mely szintén foszfatáz aktivitásával gátolja az ERK $\frac{1}{2}$  működését (197,198). A DUSP9 expressziója emelkedett FT-SMTNL1 túltermelése esetén mind P4, mind GDB modellek között (**38E. ábra**). Ezen eredmény összhangban van azon előzetes adatokkal, melyekben a DUSP9 akadályozta az inzulinrezisztenciát az ob/ob egérmódelben a vércukorszint csökkentésével az ERK $\frac{1}{2}$  defoszforilálásán és inaktiválásán keresztül (199). DUSP9 expressziója a szövet inzulin érzékenysége és a diéta típusa függvényében módosulhat (198).

Végezetül, az ERK $\frac{1}{2}$  szelektív inhibitora, az U0126-kezelés egyértelmű inzulinérzékenyítő hatást mutatott mind az IRS-1 foszforilációjára, mind a glükóz felvételére (**39. ábra**). Ez összhangban van korábbi megállapításokkal, amelyek szerint az U0126-kezelés a glükóz metabolizmus indukcióját eredményezte T-limfocitákban (200). Ez alátámasztja azt a hipotézisünket, miszerint az SMTNL1 inzulinérzékenyítést indukál az ERK $\frac{1}{2}$  közvetett gátlásán keresztül, a PP2A és a DUSP9 génexpressziójának módosításával.

Az Ishikawa sejtek glükóz felvétele szignifikánsan csökkent progeszteron szupplementált csoportokban, és ez a hatás legkifejezettebb a GDB modellben volt (**40B. ábra**). Ezen eredményeket alátámasztja azon korábbi megfigyelés, mely szerint *db/db* mutáns diabéteszes egerek esetén, szisztémásan emelkedett vércukor és inzulinszint mellett progresszív endometriális celluláris aftrófiát írtak le (192). Továbbá az inzulin közvetlenül

szabályozza endometriális epitheliális sejtek glikogén szintézisét, azáltal, hogy a jelátviteli kaszkádja során inaktíválja a GSK3 $\alpha/\beta$ -t, illetve stimulálja a glikogán szintáz 2 (GYS2) transzkripcióját (201). Az SMTNL1 progeszteron-függő módon segítette elő az Ishikawa sejtek glükóz felvételét mindkét hormon szupplementált csoportban, ezzel összhangban fokozta a sejtek glikogénraktározását is, kompenzálva ezzel az inzulin rezisztenciát (**40. ábra**). Ezen jelenséget korábban inzulinrezisztens miotubulus modellen is megfigyelték: FT-SMTNL1 overexpresszió iniciálta a glikolízist (167), és szabályozta a hexokináz aktivitását génextpressziós szinten (185).

Összességében a jelen tanulmány eredményei azt mutatják, hogy az endometriális sejtek rendezetlen proliferációja, amely endometriózis, embrionális beágyazódási zavarok során jelentkeznek, illetve endometriális malignus folyamatok kialakulásához vezethetnek, inzulinrezisztens kísérleti körülmények között fordultak elő dominánsan. Az SMTNL1 egyedülálló progeszteron-függő citoskeletális és génextpresszió szabályozóként működött, megelőzve és enyhítve az inzulinrezisztencia modellben előforduló differenciálódási és funkcionális hibákat endometriális epitheliális sejtek *in vitro* modelljében.

Az SMTNL1 szerepet játszhat az inzulinrezisztencia megelőzésében azáltal, hogy hozzájárul a progeszteron-függő inzulin érzékenyítéshez az IRS-1 fehérje Ser612 oldallánc foszforilációjának csökkentésén keresztül (**37B. ábra**), melyet az ERK $\frac{1}{2}$  aktivitásának indirekt szabályozásán át valósít meg (**38. ábra**). Az SMTNL1 az MLC20 foszforilációját az MP MYTP1 szabályozó alegységének gátlásán keresztül szabályozta (**32.-35. ábra**), ennek következtében gátolta a sejtek migrációját GDB modellben (**36. ábra**). Ezek a hatások relevánsak lehetnek az endometriális diszfunkcióval jellemzett metabolikus betegségekben, és az endometriózis kezelésében, valamint az endometriális daganatok korai stádiumában, illetve a metasztázisok kontrollálásában.

Az SMTNL1 mind az inzulin jelátvitellel, mind a sejtek differenciációjával új potenciális célpontot kínál a méhnyálkahártya betegségeinek, különösen az endometriosis kezelésére. Az SMTNL1 aktivitásának szabályozása, vagy annak célzott módosítása, elősegítheti a sejtek proliferációjának és differenciálódásának normalizálódását, ezáltal csökkentve az aberráns méhnyálkahártya betegségek kialakulásának kockázatát. Mindezek fényében az SMTNL1 ígéretes terápiás célpontnak ígérkezik a gyógyszerfejlesztés számára, az endometriális hámsejtek hiperglikémiás körülményekben, mint gesztációs diabétesz vagy más metabolikus rendellenességek során.

# Összefoglalás

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

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

az endometriális diszfunkciók, hanem az inzulinrezisztencia és daganatos betegségek terápiás célpontja is lehet.

# Summary

The PPM1B protein plays a crucial role in regulating the activity of MP within the nucleus, a function essential for balancing the MP/PRMT5/H4 proto-oncogene axis in a tumor-protective manner. Out of the intranuclear interactors of MP, PPM1B is the only protein phosphatase that, via its interaction with the MYPT1 subunit, is capable to dephosphorylate the Thr696 sidechain, thereby facilitating the tumorsuppressor function of MP. This process decreases the activation of the PRMT5 protein, hence reducing the symmetric dimethylation of the H4 protein, a post-translational modification whose upregulation unsettles the protooncogene/tumorsuppressor expression balance by reducing the expression of tumorsuppressors és increasing that of protooncogenes. Our experimental results confirmed the interaction between PPM1B és MYPT1 in the cytoplasm és nuclus of HeLa cells derived from cervix cancer. Based on our results using the PPM1B inhibitor SNG, we observed that the inhibition of PPM1B enhanced the activating phosphorylation of PRMT5 on the Thr80 sidechain, thereby elevating the symmetric dimethylation of H4 histones. These changes were also validated in tissue lysates derived from human cervical carcinóma biopsies. In agreement with this, PPM1B transfection prevented these alterations. The role of PPM1B is particularly crucial in human cervical cancer tissues, where its expression is lower compared to control tissues, which is consistent with previous research identifying PPM1B as a tumor suppressor factor. Based on these findings, PPM1B is a promising therapeutic target in cancer treatment.

The SMTNL1 protein was previously identified as a PR-B coactivator in steroid hormone-dependent tissues. In this study, we characterized its role during the differentiation of endometrial epithelial cells és its influence on insulin signaling in *in vitro* models of pregnancy és gestational diabetes. SMTNL1 regulated cytoskeletal elements, such as MYPT1 és MLC20, in a progesterone-dependent manner, providing a molecular basis for the regulation of cell contractility és migration. FT-SMTNL1 transfection inhibited cell migration in a progesterone-dependent manner és reversed molecular changes characteristic of insulin resistance by indirectly modulating IRS-1 phosphorylation that resulted in an enhanced glucose-uptake és glycogen content of Ishikawa cells. These findings suggest that SMTNL1 could be a therapeutic target not only for endometrial dysfunctions but also for insulin resistance és cancer.

# Tárgyszavak (keywords)

## Tárgyszavak:

PPM1B  
SMTNL1  
MYPT1  
PRMT5  
H4  
Inzulinrezisztencia  
Differenciáció  
tumor-szuppresszor  
endometriális sejtek  
progeszteron  
migráció  
terápiás célpont

## Keywords:

PPM1B  
SMTNL1  
MYPT1  
PRMT5  
H4  
insulin resistance  
differentiation  
tumor-suppressor  
endometrial cells  
progesterone  
migration  
therapeutic target.

# Hivatkozások

1. Ferris, D. O. (1950) Carcinoma of the uterus. *Can Med Assoc J* **62**, 156-161, illust
2. Kiesner, J., Eisenlohr-Moul, T., és Mendle, J. (2020) Evolution, the Menstrual Cycle, és Theoretical Overreach. *Perspect Psychol Sci* **15**, 1113-1130
3. Dunaif, A. (1997) Insulin resistance és the polycystic ovary syndrome: mechanism és implications for pathogenesis. *Endocr Rev* **18**, 774-800
4. Ichikawa K, I. M., Hartshorne DJ. (1996) Phosphorylation of the large subunit of myosin phosphatase és inhibition of phosphatase activity. *J Biol Chem*, 1;271(279):4733-4740
5. Borman, M. A., MacDonald, J. A., és Haystead, T. A. (2004) Modulation of smooth muscle contractility by CHASM, a novel member of the smoothelin family of proteins. *FEBS Lett* **573**, 207-213
6. Lontay, B., Bodoor, K., Weitzel, D. H., Loielle, D., Fortner, C., Lengyel, S., Zheng, D., Devente, J., Hickner, R., és Haystead, T. A. (2010) Smoothelin-like 1 protein regulates myosin phosphatase-targeting subunit 1 expression during sexual development és pregnancy. *J Biol Chem* **285**, 29357-29366
7. Johnson, D., Cohen, P., Chen, M. X., Chen, Y. H., és Cohen, P. T. (1997) Identification of the regions on the M110 subunit of protein phosphatase 1M that interact with the M21 subunit és with myosin. *Eur J Biochem* **244**, 931-939
8. Hartshorne, D. J., Ito, M., és Erdodi, F. (1998) Myosin light chain phosphatase: subunit composition, interactions és regulation. *J Muscle Res Cell Motil* **19**, 325-341
9. Sipos, A., Ivan, J., Becsi, B., Darula, Z., Tamas, I., Horvath, D., Medzihradzsky, K. F., Erdodi, F., és Lontay, B. (2017) Myosin phosphatase és RhoA-activated kinase modulate arginine methylation by the regulation of protein arginine methyltransferase 5 in hepatocellular carcinoma cells. *Sci Rep* **7**, 40590
10. Lontay, B., Pal, B., Serfozo, Z., Koszeghy, A., Szucs, G., Rusznak, Z., és Erdodi, F. (2012) Protein phosphatase-1M és Rho-kinase affect exocytosis from cortical synaptosomes és influence neurotransmission at a glutamatergic giant synapse of the rat auditory system. *J Neurochem* **123**, 84-99
11. Lontay, B., Pál, B., Serfözö, Z., Kőszeghy, Á., Szücs, G., Rusznák, Z., és Erdődi, F. (2012) Protein phosphatase-1M és Rho-kinase affect exocytosis from cortical synaptosomes és influence neurotransmission at a glutamatergic giant synapse of the rat auditory system. *J Neurochem* **123**, 84-99
12. Akhtar, M., Al Hyassat, S., Elaiwy, O., Rashid, S., és Al-Nabet, A. (2019) Classification of Endometrial Carcinoma: New Perspectives Beyond Morphology. *Adv Anat Pathol* **26**, 421-427
13. Emri, T., Csősz, É., és Tőzsér, J. (2011) *Fehérjebiotekhnológia*, Debreceni Egyetem, Debrecen
14. Dr. Tőzsér József, D. E. T., Dr. Csősz Éva, Dr. Tőzsér József. (2011) *Fehérjebiotekhnológia*, Debreceni Egyetem
15. Li, S., Iakoucheva, L. M., Mooney, S. D., és Radivojac, P. (2010) Loss of post-translational modification sites in disease. *Pac Symp Biocomput*, 337-347
16. Sheppeck, J. E., 2nd, Gauss, C. M., és Chamberlin, A. R. (1997) Inhibition of the Ser-Thr phosphatases PP1 és PP2A by naturally occurring toxins. *Bioorg Med Chem* **5**, 1739-1750
17. Wang, S., Osgood, A. O., és Chatterjee, A. (2022) Uncovering post-translational modification-associated protein-protein interactions. *Curr Opin Struct Biol* **74**, 102352
18. Walsh, C. T., Garneau-Tsodikova, S., és Gatto, G. J., Jr. (2005) Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications. *Angew Chem Int Ed Engl* **44**, 7342-7372
19. Cori, G. T., és Green, A. A. (1943) Crystalline muscle phosphorylase II: prosthetic group. *Journal of Biological Chemistry* **151**, 31-38
20. Fischer, E. H., és Krebs, E. G. (1955) Conversion of phosphorylase b to phosphorylase a in muscle extracts. *J Biol Chem* **216**, 121-132
21. Goldsmith, E. J., és Cobb, M. H. (1994) Protein kinases. *Curr Opin Struct Biol* **4**, 833-840

22. Cohen, P. T., Brewis, N. D., Hughes, V., és Mann, D. J. (1990) Protein serine/threonine phosphatases; an expanding family. *FEBS Lett* **268**, 355-359
23. Ruvolo, P. P. (2019) Role of protein phosphatases in the cancer microenvironment. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* **1866**, 144-152
24. Wera, S., és Hemmings, B. A. (1995) Serine/threonine protein phosphatases. *Biochem J* **311** (Pt 1), 17-29
25. Oliver, C. J., és Shenolikar, S. (1998) Physiologic importance of protein phosphatase inhibitors. *Front Biosci* **3**, D961-972
26. Ceulemans, H., és Bollen, M. (2004) Functional diversity of protein phosphatase-1, a cellular economizer és reset button. *Physiol Rev* **84**, 1-39
27. Barker, H. M., Brewis, N. D., Street, A. J., Spurr, N. K., és Cohen, P. T. (1994) Three genes for protein phosphatase 1 map to different human chromosomes: sequence, expression és gene localisation of protein serine/threonine phosphatase 1 beta (PPP1CB). *Biochim Biophys Acta* **1220**, 212-218
28. Sasaki, K., Shima, H., Kitagawa, Y., Irino, S., Sugimura, T., és Nagao, M. (1990) Identification of members of the protein phosphatase 1 gene family in the rat és enhanced expression of protein phosphatase 1 alpha gene in rat hepatocellular carcinomas. *Jpn J Cancer Res* **81**, 1272-1280
29. Zhang, Z., Bai, G., Shima, M., Zhao, S., Nagao, M., és Lee, E. Y. (1993) Expression és characterization of rat protein phosphatases-1 alpha, -1 gamma 1, -1 gamma 2, és -1 delta. *Arch Biochem Biophys* **303**, 402-406
30. Egloff, M. P., Cohen, P. T., Reinemer, P., és Barford, D. (1995) Crystal structure of the catalytic subunit of human protein phosphatase 1 és its complex with tungstate. *J Mol Biol* **254**, 942-959
31. Goldberg, J., Huang, H. B., Kwon, Y. G., Greengard, P., Nairn, A. C., és Kuriyan, J. (1995) Three-dimensional structure of the catalytic subunit of protein serine/threonine phosphatase-1. *Nature* **376**, 745-753
32. Bollen, M., és Stalmans, W. (1992) The structure, role, és regulation of type 1 protein phosphatases. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **27**, 227-281
33. Winter, S. L., Bosnoyan-Collins, L., Pinnaduwege, D., és Ésrulis, I. L. (2007) The interaction of PP1 with BRCA1 és analysis of their expression in breast tumors. *BMC Cancer* **7**, 85
34. Hubbard, M. J., és Cohen, P. (1989) Regulation of protein phosphatase-1G from rabbit skeletal muscle. 2. Catalytic subunit translocation is a mechanism for reversible inhibition of activity toward glycogen-bound substrates. *Eur J Biochem* **186**, 711-716
35. Bollen, M., Peti, W., Ragusa, M. J., és Beullens, M. (2010) The extended PP1 toolkit: designed to create specificity. *Trends Biochem Sci* **35**, 450-458
36. Cohen, P. T. (2002) Protein phosphatase 1--targeted in many directions. *J Cell Sci* **115**, 241-256
37. Egloff, M. P., Johnson, D. F., Moorhead, G., Cohen, P. T., Cohen, P., és Barford, D. (1997) Structural basis for the recognition of regulatory subunits by the catalytic subunit of protein phosphatase 1. *EMBO J* **16**, 1876-1887
38. Sankaran, S., Crone, D. E., Palazzo, R. E., és Parvin, J. D. (2007) Aurora-A kinase regulates breast cancer associated gene 1 inhibition of centrosome-dependent microtubule nucleation. *Cancer Res* **67**, 11186-11194
39. Bianchi, M., De Lucchini, S., Marin, O., Turner, D. L., Hanks, S. K., és Villa-Moruzzi, E. (2005) Regulation of FAK Ser-722 phosphorylation és kinase activity by GSK3 és PP1 during cell spreading és migration. *Biochem J* **391**, 359-370
40. Nutt, L. K., Buchakjian, M. R., Gan, E., Darbési, R., Yoon, S. Y., Wu, J. Q., Miyamoto, Y. J., Gibbons, J. A., Érsersen, J. L., Freel, C. D., Tang, W., He, C., Kurokawa, M., Wang, Y., Margolis, S. S., Fissore, R. A., és Kornbluth, S. (2009) Metabolic control of oocyte apoptosis mediated by 14-3-3zeta-regulated dephosphorylation of caspase-2. *Dev Cell* **16**, 856-866
41. Margolis, S. S., Perry, J. A., Weitzel, D. H., Freel, C. D., Yoshida, M., Haystead, T. A., és Kornbluth, S. (2006) A role for PP1 in the Cdc2/Cyclin B-mediated positive feedback activation of Cdc25. *Mol Biol Cell* **17**, 1779-1789
42. Zeke, A., Lukács, M., Lim, W. A., és Reményi, A. (2009) Scaffolds: interaction platforms for cellular signalling circuits. *Trends Cell Biol* **19**, 364-374

43. Li, H. Y., Liu, H., Wang, C. H., Zhang, J. Y., Man, J. H., Gao, Y. F., Zhang, P. J., Li, W. H., Zhao, J., Pan, X., Zhou, T., Gong, W. L., Li, A. L., és Zhang, X. M. (2008) Deactivation of the kinase IKK by CUEDC2 through recruitment of the phosphatase PP1. *Nat Immunol* **9**, 533-541
44. Lee, S. J., Lee, J. K., Maeng, Y. S., Kim, Y. M., és Kwon, Y. G. (2009) Langerhans cell protein 1 (LCP1) binds to PNUTS in the nucleus: implications for this complex in transcriptional regulation. *Exp Mol Med* **41**, 189-200
45. Fukata, Y., Kimura, K., Oshiro, N., Saya, H., Matsuura, Y., és Kaibuchi, K. (1998) Association of the myosin-binding subunit of myosin phosphatase és moesin: dual regulation of moesin phosphorylation by Rho-associated kinase és myosin phosphatase. *J Cell Biol* **141**, 409-418
46. Kamada, R. (2020) Metal-dependent Ser/Thr protein phosphatase PPM family: evolution, structures, diseases és inhibitors. *Pharmacol. Ther.*, 215, 107622.
47. Pan, C., Liu, H. D., Gong, Z., Yu, X., Hou, X. B., Xie, D. D., Zhu, X. B., Li, H. W., Tang, J. Y., Xu, Y. F., Yu, J. Q., Zhang, L. Y., Fang, H., Xiao, K. H., Chen, Y. G., Wang, J. Y., Pang, Q., Chen, W., és Sun, J. P. (2013) Cadmium is a potent inhibitor of PPM phosphatases és targets the M1 binding site. *Sci Rep* **3**, 2333
48. Kamada, R., Kudoh, F., Ito, S., Tani, I., Janairo, J. I. B., Omichinski, J. G., és Sakaguchi, K. (2020) Metal-dependent Ser/Thr protein phosphatase PPM family: Evolution, structures, diseases és inhibitors. *Pharmacol Ther* **215**, 107622
49. Lammers, T., Lavi, S. (2007) Role of type 2C protein phosphatases in growth regulation és in cellular stress signaling. *Crit. Rev. Biochem. Mol.*, 42, 437–461.
50. Mazumdar, A., Tahaney, W. M., Reddy Bollu, L., Poage, G., Hill, J., Zhang, Y., Mills, G. B., és Brown, P. H. (2019) The phosphatase PPM1A inhibits triple negative breast cancer growth by blocking cell cycle progression. *NPJ Breast Cancer* **5**, 22
51. Das, A. K., Helps, N. R., Cohen, P. T., és Barford, D. (1996) Crystal structure of the protein serine/threonine phosphatase 2C at 2.0 Å resolution. *Embo j* **15**, 6798-6809
52. Wang, Y., Dow, E. C., Liang, Y. Y., Ramakrishnan, R., Liu, H., Sung, T. L., Lin, X., és Rice, A. P. (2008) Phosphatase PPM1A regulates phosphorylation of Thr-186 in the Cdk9 T-loop. *J Biol Chem* **283**, 33578-33584
53. Lin, X., Duan, X., Liang, Y. Y., Su, Y., Wrighton, K. H., Long, J., Hu, M., Davis, C. M., Wang, J., Brunnicardi, F. C., Shi, Y., Chen, Y. G., Meng, A., és Feng, X. H. (2016) PPM1A Functions as a Smad Phosphatase to Terminate TGFβ Signaling. *Cell* **166**, 1597
54. Geng, J., Fan, J., Ouyang, Q., Zhang, X., Zhang, X., Yu, J., Xu, Z., Li, Q., Yao, X., Liu, X., és Zheng, J. (2014) Loss of PPM1A expression enhances invasion és the epithelial-to-mesenchymal transition in bladder cancer by activating the TGF-β/Smad signaling pathway. *Oncotarget* **5**, 5700-5711
55. Li, M., Xu, X., Su, Y., Shao, X., Zhou, Y., és Yan, J. (2022) A comprehensive overview of PPM1A: From structure to disease. *Exp Biol Med (Maywood)* **247**, 453-461
56. Pondugula, S. R., Flannery, P. C., Apte, U., Babu, J. R., Geetha, T., Rege, S. D., Chen, T., és Abbott, K. L. (2015) Mg<sup>2+</sup>/Mn<sup>2+</sup>-dependent phosphatase 1A is involved in regulating pregnane X receptor-mediated cytochrome p450 3A4 gene expression. *Drug Metab Dispos* **43**, 385-391
57. Abe, H., Tamura, S., Kondo, H.,. (1992) Localization of mRNA for protein phosphatase 2C in the brain of adult rats. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 13, 283–288
58. Marley, A. E., Kline, A., Crabtree, G., Sullivan, J.E., Beri, R.K. (1998) The cloning expression és tissue distribution of human PP2Cbeta. *FEBS Lett.*, 431, 121–124.
59. Kusuda, K., Kobayashi, T., Ikeda, S., Ohnishi, M., Chida, N., Yanagawa, Y., Shineha, R., Nishihira, T., Satomi, S., Hiraga, A., Tamura, S. (1998) utational analysis of the domain structure of mouse protein phosphatase 2Cbeta. *Biochem. J*, 332, 243–250.
60. Yang, J., Yuan, D., Li, J., Zheng, S., Wang, B.,. (2016) miR-186 downregulates protein. *Tumour Biol.*, 37, 4331–4341
61. Xu, Q., Li, Y., Zheng, Y., Chen, Y., Xu, X., Wang, M. (2020) Clostridium difficile toxin B induced colonic inflammation is mediated by the FOXO3/PPM1B pathway in fetal human colon epithelial cells. *Am. J. Transl. Res.*, 12, 6204–6219.

62. Choi, H. K., Park, S.Y., Oh, H.J., Han, E.J., Lee, Y.H., Lee, J., Jun, W.J., Choi, K.C., Yoon, H.G. (2013) PKA negatively regulates PP2C $\beta$  to activate NF- $\kappa$ B-mediated inflammatory signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 436, 473–477.
63. Bao, Y., Qian, C., Liu, M.Y., Jiang, F., Jiang, X., Liu, H., Zhang, Z., Sun, F., Fu, N., Hou, Z., Ke, Y., Li, Y., Qian, Z.M., (2021) PRKAA/AMPK $\alpha$  phosphorylation switches the role of RASAL2 from a suppressor to an activator of autophagy. *Autophagy*, 17, 3607–3621
64. Park, J. H., Smith, R.J., Shieh, S.Y., Roeder, R.G. (2011) The GAS41-PP2C  $\beta$  complex dephosphorylates p53 at serine 366 és regulates its stability. *J. Biol. Chem.*, 286, 10911–10917.
65. Yang, Z., Xu, G., Wang, B., Liu, Y., Zhang, L., Jing, T., Tang, M., Xu, X., Jiao, K., Xiang, L., Fu, Y., Tang, D., Zhang, X., Jin, W., Zhuang, G., Zhao, X., és Liu, Y. (2021) USP12 downregulation orchestrates a protumorigenic microenvironment és enhances lung tumour resistance to PD-1 blockade. *Nat Commun* **12**, 4852
66. Ying, H. N., Ji, L., Xu, Z.Y., Fan, X.X., Tong, Y.F., Liu, H., Zhao, J., Cai, X.J., (2020) TRIM59 promotes tumor growth in hepatocellular carcinoma és regulates the cell cycle by degradation of protein phosphatase 1B. *Cancer Lett.*, 473, 413–424.
67. Hartshorne, D. J. (1998) Myosin phosphatase: subunits és interactions. *Acta Physiol Scés*, 164 (164):483-193
68. Grassie, M. E., Moffat, L. D., Walsh, M. P., és MacDonald, J. A. (2011) The myosin phosphatase targeting protein (MYPT) family: A regulated mechanism for achieving substrate specificity of the catalytic subunit of protein phosphatase type 1 $\delta$ . *Archives of Biochemistry és Biophysics* **510**, 147-159
69. Takahashi, N., M. Ito, J. Tanaka, T. Nakano, K. Kaibuchi, H. Odai, és K. Takemura. (1997) Localization of the gene coding for myosin phosphatase, target subunit 1 (MYPT1) to human chromosome 12q15-q21. *Genomics*, 44 (41):150-152.
70. Lontay, B., Kiss, A., Gergely, P., Hartshorne, D. J., és Erdodi, F. (2005) Okadaic acid induces phosphorylation és translocation of myosin phosphatase target subunit 1 influencing myosin phosphorylation, stress fiber assembly és cell migration in HepG2 cells. *Cell Signal* **17**, 1265-1275
71. Tanaka, J., M. Ito, J. Feng, K. Ichikawa, T. Hamaguchi, M. Nakamura, D. J. Hartshorne, és T. Nakano. (1998) Interaction of myosin phosphatase target subunit 1 with the catalytic subunit of type 1 protein phosphatase. *Biochemistry*, 37 (47):16697-16703
72. Ito, M., T. Nakano, F. Erdodi, és D. J. Hartshorne. (2004) Myosin phosphatase: structure, regulation és function. *Mol Cell Biochem*, 259 (251-252):197-209.
73. Bialojan, C., és Takai, A. (1988) Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity és kinetics. *Biochem J* **256**, 539-544
74. 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 (251):35273-35277.
75. Kiss, A., Erdodi, F., és Lontay, B. (2019) Myosin phosphatase: Unexpected functions of a long-known enzyme. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* **1866**, 2-15
76. Alessi, D., MacDougall, L. K., Sola, M. M., Ikebe, M., és Cohen, P. (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**, 1023-1035
77. Shirazi, A., Iizuka, K., Fadden, P., Mosse, C., Somlyo, A. P., Somlyo, A. V., és Haystead, T. A. (1994) Purification és characterization of the mammalian myosin light chain phosphatase holoenzyme. The differential effects of the holoenzyme és its subunits on smooth muscle. *J Biol Chem* **269**, 31598-31606
78. Horowitz, A., Menice, C. B., Laporte, R., és Morgan, K. G. (1996) Mechanisms of smooth muscle contraction. *Physiol Rev* **76**, 967-1003
79. Chacko, S., Conti, M. A., és Adelstein, R. S. (1977) Effect of phosphorylation of smooth muscle myosin on actin activation és Ca<sup>2+</sup> regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 129-133
80. Ikebe, M., és Hartshorne, D. J. (1985) The role of myosin phosphorylation in the contraction-relaxation cycle of smooth muscle. *Experientia* **41**, 1006-1010

81. Ito, M., Okamoto, R., Ito, H., Zhe, Y., és Dohi, K. (2022) Regulation of myosin light-chain phosphorylation és its roles in cardiovascular physiology és pathophysiology. *Hypertens Res* **45**, 40-52
82. Sutherlés, C., és Walsh, M. P. (2012) Myosin regulatory light chain diphosphorylation slows relaxation of arterial smooth muscle. *J Biol Chem* **287**, 24064-24076
83. Somlyo, A. P., és Somlyo, A. V. (2003) Ca<sup>2+</sup> sensitivity of smooth muscle és nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, és myosin phosphatase. *Physiol Rev* **83**, 1325-1358
84. Wooldridge, A. A., MacDonald, J. A., Erdodi, F., Ma, C., Borman, M. A., Hartshorne, D. J., és Haystead, T. A. (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**, 34496-34504
85. Wu, X., Somlyo, A. V., és Somlyo, A. P. (1996) Cyclic GMP-dependent stimulation reverses G-protein-coupled inhibition of smooth muscle myosin light chain phosphate. *Biochem Biophys Res Commun* **220**, 658-663
86. Lontay, B., Serfozo, Z., Gergely, P., Ito, M., Hartshorne, D. J., és Erdodi, F. (2004) Localization of myosin phosphatase target subunit 1 in rat brain és in primary cultures of neuronal cells. *J Comp Neurol* **478**, 72-87
87. Amano, M., T. Kaneko, A. Maeda, M. Nakayama, M. Ito, T. Yamauchi, H. Goto, Y. Fukata, N. Oshiro, A. Shinohara, A. Iwamatsu, és K. Kaibuchi. (2003) Identification of Tau és MAP2 as novel substrates of Rho-kinase és myosin phosphatase. *J Neurochem*, 87 (83):780-790.
88. Bátori, R., B. Bécsi, D. Nagy, Z. Kónya, C. Hegedűs, Z. Bordán, A. Verin, B. Lontay, és F. Erdödi. (2017) Interplay of myosin phosphatase és protein phosphatase-2A in the regulation of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation és nitric oxide production. *Sci Rep*, 7:44698.
89. Kiss, A., Lontay, B., Becsi, B., Markasz, L., Olah, E., Gergely, P., és Erdodi, F. (2008) Myosin phosphatase interacts with és 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**, 2059-2070
90. Parra, M., T. Mahmoudi, és E. Verdin. (2007) Myosin phosphatase dephosphorylates HDAC7, controls its nucleocytoplasmic shuttling, és inhibits apoptosis in thymocytes. *Genes Dev*, 21 (26):638-643.
91. Borzsei, R., Bayarsaikhan, B., Zsido, B. Z., Lontay, B., és Hetenyi, C. (2022) The Structural Effects of Phosphorylation of Protein Arginine Methyltransferase 5 on Its Binding to Histone H4. *Int J Mol Sci* **23(19):11316**
92. Tsang, D. P., és Cheng, A. S. (2011) Epigenetic regulation of signaling pathways in cancer: role of the histone methyltransferase EZH2. *J Gastroenterol Hepatol* **26**, 19-27
93. Wang, F., és Sun, Y. (2018) Overexpression of Myosin Phosphatase Target Subunit 1 (MYPT1) Inhibits Tumor Progression és Metastasis of Gastric Cancer. *Med Sci Monit* **24**, 2508-2517
94. Jin, H., Sperka, T., Herrlich, P., és Morrison, H. (2006) Tumorigenic transformation by CPI-17 through inhibition of a merlin phosphatase. *Nature* **442**, 576-579
95. Tóth, E., Erdödi, F., és Kiss, A. (2021) Activation of Myosin Phosphatase by Epigallocatechin-Gallate Sensitizes THP-1 Leukemic Cells to Daunorubicin. *Anticancer Agents Med Chem* **21**, 1092-1098
96. Ling, X., Wang, R., Lin, L., Wu, Y., és Cheng, W. (2023) N6-methyladenosine-modified microRNA-675 advances the development of gastrointestinal stromal tumors via inhibiting myosin phosphatase targeting protein 1. *Genomics* **115**, 110704
97. Jin, H., T. Sperka, P. Herrlich, és H. Morrison. (2006) Tumorigenic transformation by CPI-17 through inhibition of a merlin phosphatase. *Nature* 442 (7102):7576-7109.
98. Chiyoda, T., Sugiyama, N., Shimizu, T., Naoe, H., Kobayashi, Y., Ishizawa, J., Arima, Y., Tsuda, H., Ito, M., Kaibuchi, K., Aoki, D., Ishihama, Y., Saya, H., és Kuninaka, S. (2012) LATS1/WARTS phosphorylates MYPT1 to counteract PLK1 és regulate mammalian mitotic progression. *J Cell Biol* **197**, 625-641
99. Yang, X., Di, J., Zhang, Y., Zhang, S., Lu, J., Liu, J., és Shi, W. (2012) The Rho-kinase inhibitor inhibits proliferation és metastasis of small cell lung cancer. *Biomed Pharmacother* **66**, 221-227

100. Umeda, D., Yano, S., Yamada, K., és Tachibana, H. (2008) Involvement of 67-kDa laminin receptor-mediated myosin phosphatase activation in antiproliferative effect of epigallocatechin-3-O-gallate at a physiological concentration on Caco-2 colon cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* **371**, 172-176
101. Guillaume J.J.M. van Eys, M. C. W. V., Erika D.J. Timmer, Xéser H.T. Wehrens, J. Vic Small, Jack A. Schalken, Frans C.S. Ramaekers, Frank T.L. van der Loop. (1997) Smoothelin Expression Characteristics: Development of a Smooth Muscle Cell in vitro System és Identification of a Vascular Variant. *Cell Structure és Function*, 22(21):65-72
102. Eys, G. J. J. M. v., ouml, ller, M. C. W., Timmer, E. D. J., Wehrens, X. H. T., Small, J. V., Schalken, J. A., Ramaekers, F. C. S., és Loop, F. T. L. v. d. (1997) Smoothelin Expression Characteristics: Development of a Smooth Muscle Cell in vitro System és Identification of a Vascular Variant. *Cell Structure és Function* **22**, 65-72
103. Rensen, S. S., Thijssen, V. L., De Vries, C. J., Doevendans, P. A., Detera-Wadleigh, S. D., és Van Eys, G. J. (2002) Expression of the smoothelin gene is mediated by alternative promoters. *Cardiovasc Res* **55**, 850-863
104. Ulke-Lemee, A., Ishida, H., Chappellaz, M., Vogel, H. J., és MacDonald, J. A. (2014) Two domains of the smoothelin-like 1 protein bind apo- és calcium-calmodulin independently. *Biochim Biophys Acta* **1844**, 1580-1590
105. van der Loop, F. T., Gabbiani, G., Kohnen, G., Ramaekers, F. C., és van Eys, G. J. (1997) Differentiation of smooth muscle cells in human blood vessels as defined by smoothelin, a novel marker for the contractile phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**, 665-671
106. Wehrens, X. H., Mies, B., Gimona, M., Ramaekers, F. C., Van Eys, G. J., és Small, J. V. (1997) Localization of smoothelin in avian smooth muscle és identification of a vascular-specific isoform. *FEBS Lett* **405**, 315-320
107. Krämer, J., Aguirre-Arteta, A. M., Thiel, C., Gross, C. M., Dietz, R., Cardoso, M. C., és Leonhardt, H. (1999) A novel isoform of the smooth muscle cell differentiation marker smoothelin. *J Mol Med (Berl)* **77**, 294-298
108. Wooldridge, A. A., Fortner, C. N., Lontay, B., Akimoto, T., Neppl, R. L., Facemire, C., Datto, M. B., Kwon, A., McCook, E., Li, P., Wang, S., Thresher, R. J., Miller, S. E., Perriard, J. C., Gavin, T. P., Hickner, R. C., Coffman, T. M., Somlyo, A. V., Yan, Z., és Haystead, T. A. (2008) Deletion of the protein kinase A/protein kinase G target SMTNL1 promotes an exercise-adapted phenotype in vascular smooth muscle. *J Biol Chem* **283**, 11850-11859
109. Ishida, H., Borman, M. A., Ostréser, J., Vogel, H. J., és MacDonald, J. A. (2008) Solution structure of the calponin homology (CH) domain from the smoothelin-like 1 protein: a unique apocalmodulin-binding mode és the possible role of the C-terminal type-2 CH-domain in smooth muscle relaxation. *J Biol Chem* **283**, 20569-20578
110. Quensel, C., Krämer, J., Cardoso, M. C., és Leonhardt, H. (2002) Smoothelin contains a novel actin cytoskeleton localization sequence with similarity to troponin T. *J Cell Biochem* **85**, 403-409
111. Bodoor, K., Lontay, B., Safi, R., Weitzel, D. H., Loiselle, D., Wei, Z., Lengyel, S., McDonnell, D. P., és Haystead, T. A. (2011) Smoothelin-like 1 protein is a bifunctional regulator of the progesterone receptor during pregnancy. *J Biol Chem* **286**, 31839-31851
112. Borman, M. A., Freed, T. A., Haystead, T. A., és Macdonald, J. A. (2009) The role of the calponin homology domain of smoothelin-like 1 (SMTNL1) in myosin phosphatase inhibition és smooth muscle contraction. *Mol Cell Biochem* **327**, 93-100
113. Major, E., Gyory, F., Horvath, D., Keller, I., Tamas, I., Uray, K., Fulop, P., és Lontay, B. (2021) Smoothelin-Like Protein 1 Regulates Development és Metabolic Transformation of Skeletal Muscle in Hyperthyroidism. *Front Endocrinol (Lausanne)* **12**, 751488
114. Lontay, B., Bodoor, K., Sipos, A., Weitzel, D. H., Loiselle, D., Safi, R., Zheng, D., Devente, J., Hickner, R. C., McDonnell, D. P., Ribar, T., és Haystead, T. A. (2015) Pregnancy és Smoothelin-like Protein 1 (SMTNL1) Deletion Promote the Switching of Skeletal Muscle to a Glycolytic Phenotype in Human és Mice. *J Biol Chem* **290**, 17985-17998
115. Le, T. K. C., Dao, X. D., Nguyen, D. V., Luu, D. H., Bui, T. M. H., Le, T. H., Nguyen, H. T., Le, T. N., Hosaka, T., és Nguyen, T. T. T. (2023) Insulin signaling és its application. *Front Endocrinol (Lausanne)* **14**, 1226655

116. Lee, J., és Pilch, P. F. (1994) The insulin receptor: structure, function, és signaling. *Am J Physiol* **266**, C319-334
117. Istvan Tamas, E. M., Daniel Horvath, Ilka Keller, Adam Ungvari, Timothy A Haystead, Justin A MacDonald, Beata Lontay. (2022) Mechanisms by which smoothelin-like protein 1 reverses insulin resistance in myotubules és mice. *Mol Cell Endocrinol* . 1:551:111663
118. Moro, F., Zermano, S., Ianieri, M. M., De Cicco Nardone, A., Carfagna, P., Ciccarone, F., Ercoli, A., Querleu, D., Scambia, G., és Testa, A. C. (2023) Dynamic transvaginal ultrasound examination for assessing anatomy of parametrium. *Ultrasound Obstet Gynecol* **62**, 904-906
119. Aghajanova, L., Hamilton, A. E., és Giudice, L. C. (2008) Uterine receptivity to human embryonic implantation: histology, biomarkers, és transcriptomics. *Semin Cell Dev Biol* **19**, 204-211
120. Vilella, F., Wang, W., Moreno, I., Quake, S. R., és Simon, C. (2021) Understésing the human endometrium in the 21st century. *Am J Obstet Gynecol* **225**, 1-2
121. Gurpide, E., és Bulletti, C. (1991) Introduction: research on the human endometrium. *Ann N Y Acad Sci* **622**, 1-5
122. Ferenczy, A., és Bergeron, C. (1991) Histology of the human endometrium: from birth to senescence. *Ann N Y Acad Sci* **622**, 6-27
123. Oehler, M. K., Rees, M. C., és Bicknell, R. (2000) Steroids és the endometrium. *Curr Med Chem* **7**, 543-560
124. Song, J. Y., és Fraser, I. S. (1995) Effects of progestogens on human endometrium. *Obstet Gynecol Surv* **50**, 385-394
125. Moore, L., Leongamornlert, D., Coorens, T. H. H., Sésers, M. A., Ellis, P., Dentre, S. C., Dawson, K. J., Butler, T., Rahbari, R., Mitchell, T. J., Maura, F., Nangalia, J., Tarpey, P. S., Brunner, S. F., Lee-Six, H., Hooks, Y., Moody, S., Mahbubani, K. T., Jimenez-Linan, M., Brosens, J. J., Iacobuzio-Donahue, C. A., Martincorena, I., Saeb-Parsy, K., Campbell, P. J., és Stratton, M. R. (2020) The mutational lésscape of normal human endometrial epithelium. *Nature* **580**, 640-646
126. Messinis, I. E., Messini, C. I., és Dafopoulos, K. (2014) Novel aspects of the endocrinology of the menstrual cycle. *Reprod Biomed Online* **28**, 714-722
127. Hampson, E. (2020) A brief guide to the menstrual cycle és oral contraceptive use for researchers in behavioral endocrinology. *Horm Behav* **119**, 104655
128. Gordon, C. M. (2008) The menstrual cycle és adolescent health. Preface. *Ann N Y Acad Sci* **1135**, xi-xii
129. Martinelli, L., Gajović, S., és Shim, J. (2021) Menstrual Cycle Control - A Controversial Example of Human Enhancement in Relation to Women's Body és Psyche. *Psychiatr Danub* **33**, 287-291
130. Baird, D. T. (1997) Amenorrhoea. *Lancet* **350**, 275-279
131. Ackerman, K. E., és Misra, M. (2018) Amenorrhoea in adolescent female athletes. *Lancet Child Adolesc Health* **2**, 677-688
132. Annamalai, A. K., Srinivasan, K. G., és Gurnell, M. (2023) Secondary amenorrhoea with absent axillary hair. *Eur J Intern Med* **111**, 117-118
133. Dewhurst, C. J. (1971) Amenorrhoea. *Br Med J* **1**, 711-713
134. Proctor, M., és Farquhar, C. (2003) Dysmenorrhoea. *Clin Evid*, 1994-2013
135. Proctor, M. L., és Farquhar, C. M. (2007) Dysmenorrhoea. *BMJ Clin Evid* **2007**
136. McKenna, K. A., és Fogleman, C. D. (2021) Dysmenorrhea. *Am Fam Physician* **104**, 164-170
137. Kennedy, S. (1997) Primary dysmenorrhoea. *Lancet* **349**, 1116
138. Ulukus, M., Cakmak, H., és Arici, A. (2006) The role of endometrium in endometriosis. *J Soc Gynecol Investig* **13**, 467-476
139. Rolla, E. (2019) Endometriosis: advances és controversias in classification, pathogenesis, diagnosis, és treatment. *F1000Res* **8**
140. Mehedintu, C., Plotogea, M. N., Ionescu, S., és Antonovici, M. (2014) Endometriosis still a challenge. *J Med Life* **7**, 349-357
141. Taylor, H. S., Kotlyar, A. M., és Flores, V. A. (2021) Endometriosis is a chronic systemic disease: clinical challenges és novel innovations. *Lancet* **397**, 839-852
142. Giudice, L. C., és Kao, L. C. (2004) Endometriosis. *Lancet* **364**, 1789-1799

143. Patel, S. (2018) Polycystic ovary syndrome (PCOS), an inflammatory, systemic, lifestyle endocrinopathy. *J Steroid Biochem Mol Biol* **182**, 27-36
144. Siddiqui, S., Mateen, S., Ahmad, R., és Moin, S. (2022) A brief insight into the etiology, genetics, és immunology of polycystic ovarian syndrome (PCOS). *J Assist Reprod Genet* **39**, 2439-2473
145. Yang, J., és Chen, C. (2024) Hormonal changes in PCOS. *J Endocrinol* **261(1):e230342**
146. Xu, Y., és Qiao, J. (2022) Association of Insulin Resistance és Elevated Ésrogen Levels with Polycystic Ovarian Syndrome (PCOS): A Review of Literature. *J Healthc Eng* **2022**, 9240569
147. Anagnostis, P., Tarlatzis, B. C., és Kauffman, R. P. (2018) Polycystic ovarian syndrome (PCOS): Long-term metabolic consequences. *Metabolism* **86**, 33-43
148. Liu, F. S. (2007) Molecular carcinogenesis of endometrial cancer. *Taiwan J Obstet Gynecol* **46**, 26-32
149. Corbett, H. V. (1954) Carcinoma of the uterus. *Med Illus* **8**, 534-535
150. Amant, F., Coosemans, A., Debiec-Rychter, M., Timmerman, D., és Vergote, I. (2009) Clinical management of uterine sarcomas. *Lancet Oncol* **10**, 1188-1198
151. Devaud, N., Vornicova, O., Abdul Razak, A. R., Khalili, K., Demicco, E. G., Mitric, C., Bernardini, M. Q., és Gladly, R. A. (2022) Leiomyosarcoma: Current Clinical Management és Future Horizons. *Surg Oncol Clin N Am* **31**, 527-546
152. Beckstrés, G., és Ellery, S. W. (1950) Carcinoma of the cervix. *Calif Med* **73**, 248-249
153. Zhang, S., Xu, H., Zhang, L., és Qiao, Y. (2020) Cervical cancer: Epidemiology, risk factors és screening. *Chin J Cancer Res* **32**, 720-728
154. van Nieuw Amerongen, G. P., Koolwijk, P., Versteilen, A., és van Hinsbergh, V. W. (2003) Involvement of RhoA/Rho kinase signaling in VEGF-induced endothelial cell migration és angiogenesis in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**, 211-217
155. Barnoud, T., Donninger, H., és Clark, G. J. (2016) Ras Regulates Rb via NORE1A. *J Biol Chem* **291**, 3114-3123
156. Liu, C. W., Wang, R. H., és Berndt, N. (2006) Protein phosphatase 1alpha activity prevents oncogenic transformation. *Mol Carcinog* **45**, 648-656
157. Henderson, B. E., és Feigelson, H. S. (2000) Hormonal carcinogenesis. *Carcinogenesis* **21**, 427-433
158. Rawlings, T. M., Makwana, K., Tryfonos, M., és Lucas, E. S. (2021) Organoids to model the endometrium: implantation és beyond. *Reprod Fertil* **2**, R85-r101
159. Hannan, N. J., Paiva, P., Dimitriadis, E., és Salamonsen, L. A. (2010) Models for study of human embryo implantation: choice of cell lines? *Biol Reprod* **82**, 235-245
160. Nishida, M. (2002) The Ishikawa cells from birth to the present. *Hum Cell* **15**, 104-117
161. Erdödi, F., Tóth, B., Hirano, K., Hirano, M., Hartshorne, D. J., és Gergely, P. (1995) Endothal thioanhydride inhibits protein phosphatases-1 és -2A in vivo. *Am J Physiol* **269**, C1176-1184
162. Aburai, N., Yoshida, M., Ohnishi, M., és Kimura, K. (2010) Sanguinarine as a potent és specific inhibitor of protein phosphatase 2C in vitro és induces apoptosis via phosphorylation of p38 in HL60 cells. *Biosci Biotechnol Biochem* **74**, 548-552
163. Vogt, A., Tamewitz, A., Skoko, J., Sikorski, R. P., Giuliano, K. A., és Lazo, J. S. (2005) The benzo[c]phenanthridine alkaloid, sanguinarine, is a selective, cell-active inhibitor of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1. *J Biol Chem* **280**, 19078-19086
164. Favre, B., Turowski, P., és Hemmings, B. A. (1997) Differential inhibition és posttranslational modification of protein phosphatase 1 és 2A in MCF7 cells treated with calyculin-A, okadaic acid, és tautomycin. *J Biol Chem* **272**, 13856-13863
165. Yu, Y., Luo, Y., Fang, Z., Teng, W., Yu, Y., Tian, J., Guo, P., Xu, R., Wu, J., és Li, Y. (2020) Mechanism of Sanguinarine in Inhibiting Macrophages to Promote Metastasis és Proliferation of Lung Cancer via Modulating the Exosomes in A549 Cells. *Onco Targets Ther* **13**, 8989-9003
166. Tasdelen, I., van Beekum, O., Gorbenko, O., Fleskens, V., van den Broek, N. J., Koppen, A., Hamers, N., Berger, R., Coffey, P. J., Brenkman, A. B., és Kalkhoven, E. (2013) The serine/threonine phosphatase PPM1B (PP2Cbeta) selectively modulates PPARgamma activity. *Biochem J* **451**, 45-53

167. Tamas, I., Major, E., Horvath, D., Keller, I., Ungvari, A., Haystead, T. A., MacDonald, J. A., és Lontay, B. (2022) Mechanisms by which smoothelin-like protein 1 reverses insulin resistance in myotubules és mice. *Mol Cell Endocrinol* **551**, 111663
168. Emanuelli, B., Eberle, D., Suzuki, R., és Kahn, C. R. (2008) Overexpression of the dual-specificity phosphatase MKP-4/DUSP-9 protects against stress-induced insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 3545-3550
169. Ma, Y., Liu, X., Zhou, M., Sun, W., Jiang, B., Liu, Q., Wang, M., Zou, Y., Liu, Q., Gong, Y., és Sun, G. (2024) CUL4B mutations impair human cortical neurogenesis through PP2A-dependent inhibition of AKT és ERK. *Cell Death Dis* **15**, 121
170. DeBerardinis, R. J., és Chésel, N. S. (2016) Fundamentals of cancer metabolism. *Sci Adv* **2**, e1600200
171. Li, Z., Chen, R., Li, Y., Zhou, Q., Zhao, H., Zeng, K., Zhao, B., és Lu, Z. (2023) A comprehensive overview of PPM1B: From biological functions to diseases. *Eur J Pharmacol* **947**, 175633
172. Li, R., Dou, J., Bai, T., Cai, B., és Liu, Y. (2022) Protein Phosphatase PPM1B Inhibits Gastric Cancer Progression és Serves as a Favorable Prognostic Biomarker. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* **30**, 366-374
173. Kimura, K., Ito, M., Amano, M., Chihara, K., Fukata, Y., Nakafuku, M., Yamamori, B., Feng, J., Nakano, T., Okawa, K., Iwamatsu, A., és Kaibuchi, K. (1996) Regulation of myosin phosphatase by Rho és Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science* **273**, 245-248
174. Broustas, C. G., Grammatikakis, N., Eto, M., Dent, P., Brautigam, D. L., és Kasid, U. (2002) Phosphorylation of the myosin-binding subunit of myosin phosphatase by Raf-1 és inhibition of phosphatase activity. *J Biol Chem* **277**, 3053-3059
175. Ryan, T., Shelton, M., Lambert, J. P., Malecova, B., Boisvenue, S., Ruel, M., Figeys, D., Puri, P. L., és Skerjanc, I. S. (2013) Myosin phosphatase modulates the cardiac cell fate by regulating the subcellular localization of Nkx2.5 in a Wnt/Rho-associated protein kinase-dependent pathway. *Circ Res* **112**, 257-266
176. Muranyi, A., Derkach, D., Erdodi, F., Kiss, A., Ito, M., és Hartshorne, D. J. (2005) Phosphorylation of Thr695 és Thr850 on the myosin phosphatase target subunit: inhibitory effects és occurrence in A7r5 cells. *FEBS Lett* **579**, 6611-6615
177. Lejeune, B., Van Hoeck, J., és Leroy, F. (1981) Transmitter role of the luminal uterine epithelium in the induction of decidualization in rats. *J Reprod Fertil* **61**, 235-240
178. Arnold, J. T., Lessey, B. A., Seppala, M., és Kaufman, D. G. (2002) Effect of normal endometrial stroma on growth és differentiation in Ishikawa endometrial adenocarcinoma cells. *Cancer Res* **62**, 79-88
179. Stavreus-Evers, A., Nikas, G., Sahlin, L., Eriksson, H., és Lésgren, B. M. (2001) Formation of pinopodes in human endometrium is associated with the concentrations of progesterone és progesterone receptors. *Fertil Steril* **76**, 782-791
180. Jeschke, U., Walzel, H., Mylonas, I., Papadopoulos, P., Shabani, N., Kuhn, C., Schulze, S., Friese, K., Karsten, U., Anz, D., és Kupka, M. S. (2009) The human endometrium expresses the glycoprotein mucin-1 és shows positive correlation for Thomsen-Friedenreich epitope expression és galectin-1 binding. *J Histochem Cytochem* **57**, 871-881
181. Wu, F., Mao, D., Liu, Y., Chen, X., Xu, H., Li, T. C., és Wang, C. C. (2019) Localization of Mucin 1 in endometrial luminal epithelium és its expression in women with reproductive failure during implantation window. *J Mol Histol* **50**, 563-572
182. Vicente-Manzanares, M., és Horwitz, A. R. (2010) Myosin light chain mono- és di-phosphorylation differentially regulate adhesion és polarity in migrating cells. *Biochem Biophys Res Commun* **402**, 537-542
183. Tullio, A. N., Accili, D., Ferrans, V. J., Yu, Z. X., Takeda, K., Grinberg, A., Westphal, H., Preston, Y. A., és Adelstein, R. S. (1997) Nonmuscle myosin II-B is required for normal development of the mouse heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 12407-12412
184. Yotova, I., Quan, P., Gaba, A., Leditznig, N., Pateisky, P., Kurz, C., és Tschugguel, W. (2012) Raf-1 levels determine the migration rate of primary endometrial stromal cells of patients with endometriosis. *J Cell Mol Med* **16**, 2127-2139

185. Major, E., Keller, I., Horvath, D., Tamas, I., Erdodi, F., és Lontay, B. (2021) Smoothelin-Like Protein 1 Regulates the Thyroid Hormone-Induced Homeostasis és Remodeling of C2C12 Cells via the Modulation of Myosin Phosphatase. *Int J Mol Sci* **22**
186. Totsukawa, G., Wu, Y., Sasaki, Y., Hartshorne, D. J., Yamakita, Y., Yamashiro, S., és Matsumura, F. (2004) Distinct roles of MLCK és ROCK in the regulation of membrane protrusions és focal adhesion dynamics during cell migration of fibroblasts. *J Cell Biol* **164**, 427-439
187. Ridley, A. J. (2001) Rho GTPases és cell migration. *J Cell Sci* **114**, 2713-2722
188. Garris, D. R. (1988) Deciduoma growth in the ovariectomized guinea pig: steroid hormone-mediated vascular support of endometrial differentiation. *Endocrinology* **122**, 2183-2190
189. Garris, D. R. (1990) The effects of estradiol és progesterone on reproductive tract atrophy és tissue adrenergic indices in diabetic C57BL/KsJ mice. *Proc Soc Exp Biol Med* **193**, 39-45
190. Garris, D. R., Coleman, D. L., és Morgan, C. R. (1985) Age- és diabetes-related changes in tissue glucose uptake és estradiol accumulation in the C57BL/KsJ mouse. *Diabetes* **34**, 47-52
191. Mu, N., Zhu, Y., Wang, Y., Zhang, H., és Xue, F. (2012) Insulin resistance: a significant risk factor of endometrial cancer. *Gynecol Oncol* **125**, 751-757
192. Garris, D. R., és Garris, B. L. (2003) Diabetes-induced, progressive endometrial involution characterization of periluminal epithelial lipoatrophy. *Diabetes* **52**, 51-58
193. Wang, C., Jeong, K., Jiang, H., Guo, W., Gu, C., Lu, Y., és Liang, J. (2016) YAP/TAZ regulates the insulin signaling via IRS1/2 in endometrial cancer. *Am J Cancer Res* **6**, 996-1010
194. Gual, P., Gremeaux, T., Gonzalez, T., Le Marchés-Brustel, Y., és Tanti, J. F. (2003) MAP kinases és mTOR mediate insulin-induced phosphorylation of insulin receptor substrate-1 on serine residues 307, 612 és 632. *Diabetologia* **46**, 1532-1542
195. Krook, A., Bjornholm, M., Galuska, D., Jiang, X. J., Fahlman, R., Myers, M. G., Jr., Wallberg-Henriksson, H., és Zierath, J. R. (2000) Characterization of signal transduction és glucose transport in skeletal muscle from type 2 diabetic patients. *Diabetes* **49**, 284-292
196. Haughian, J. M., Jackson, T. A., Koterwas, D. M., és Bradford, A. P. (2006) Endometrial cancer cell survival és apoptosis is regulated by protein kinase C alpha és delta. *Endocr Relat Cancer* **13**, 1251-1267
197. Shen, Z., Zhang, C., Qu, L., Lu, C., Xiao, M., Ni, R., és Liu, J. (2019) MKP-4 suppresses hepatocarcinogenesis by targeting ERK1/2 pathway. *Cancer Cell Int* **19**, 61
198. Khoubai, F. Z., és Grosset, C. F. (2021) DUSP9, a Dual-Specificity Phosphatase with a Key Role in Cell Biology és Human Diseases. *Int J Mol Sci* **22**
199. Ye, P., Xiang, M., Liao, H., Liu, J., Luo, H., Wang, Y., Huang, L., Chen, M., és Xia, J. (2019) Dual-Specificity Phosphatase 9 Protects Against Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Mice Through ASK1 Suppression. *Hepatology* **69**, 76-93
200. Marko, A. J., Miller, R. A., Kelman, A., és Frauwirth, K. A. (2010) Induction of glucose metabolism in stimulated T lymphocytes is regulated by mitogen-activated protein kinase signaling. *PLoS One* **5**, e15425
201. Flannery, C. A., Choe, G. H., Cooke, K. M., Fleming, A. G., Radford, C. C., Kodaman, P. H., Jurczak, M. J., Kibbey, R. G., és Taylor, H. S. (2018) Insulin Regulates Glycogen Synthesis in Human Endometrial Gléss Through Increased GYS2. *J Clin Endocrinol Metab* **103**, 2843-2850

# Köszönetnyilvánítás

Szeretném köszönetemet kifejezni témavezetőmnek, Dr. Lontay Beátának a sokéves közös munka során nyújtott türelméért, segítségéért és szakmai iránymutatásáért.

Köszönöm Dr. Virág László professzor úrnak, intézetünk igazgatójának, hogy lehetővé tette, hogy PhD éveimet az Orvosi Vegytani intézet falai közt tölthessem el.

Köszönöm Dr. Kókai Endrének a HCS mérésekben nyújtott segítségét.

Köszönöm kollégáimnak, Ésikának és Ágotának a mindennapi kísérletes munka során nyújtott technikai segítségüket és sosem szűnő biztatásukat.

Köszönöm kedves padtársamnak, Ádámnak a felsorolhatatlan minőségű és mennyiségű, technikai és mentális segítséget egyaránt, ami által értelmet nyert, hogy az „én” és „ő” padja nem, csak a „mi” padunk létezik. Remélem mértékegység nélküli támogatását viszonzozhatom akkor, mikor majd rá kerül a sor.

Köszönöm a PhD-s évek alatt szerzett barátnőimnek, Isottanak, Tuba Zsófinak, Jánosy Zsófinak, Víg Zsófinak, Fanninak, hogy értő és türelmes figyelmükkel és segítőkészségükkel társaim voltak a mind az önfeledt, mind a nehéz időszakokban is.

Köszönöm a PhD-s időszak során a labormunka által szerzett munkatársaimnak, Zolinak és Ricsinek a támogatást.

Köszönettel tartozom Zénónak a mindennapi reggeli kávéért.

Hálás vagyok a szüleimnek, hogy feltétlen szeretetükről biztosítva erőt adtak, hogy elérjem a célom.

# Függelék



**DEBRECENI  
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM  
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400  
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

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

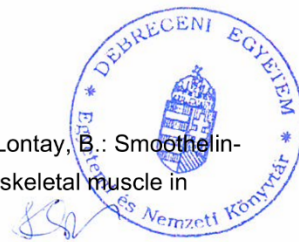
Jelölt: Keller Ilka  
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola  
MTMT azonosító: 10080015

## A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Keller, I.**, Ungvári, Á., Major, E., Horváth, D., Kónya, Z., Tóth, E., Erdődi, F., Kiss, A., Lontay, B.: Magnesium-dependent-protein phosphatase 1B regulates the protein arginine methyltransferase 5 through the modulation of myosin phosphatase. *J. Biol. Chem.* 301 (2), 1-16, 2025.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbc.2024.108107>  
IF: 4 (2023)
2. **Keller, I.**, Ungvári, Á., Kinter, R., Szalmás, A. F., Kókai, E., Lontay, B.: Smoothelin-like protein 1 promotes insulin sensitivity and modulates the contractile properties of endometrial epithelial cells with insulin resistance. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 15, 1-16, 2024.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fendo.2024.1375771>  
IF: 3.9 (2023)

## További közlemények

3. Tamás, I., Major, E., Horváth, D., **Keller, I.**, Ungvári, Á., Haystead, T. A. J., MacDonald, J. A., Lontay, B.: Mechanisms by which smoothelin-like protein 1 reverses insulin resistance in myotubules and mice. *Mol. Cell. Endocrinol.* 551, 1-12, 2022.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2022.111663>  
IF: 4.1
4. Major, E., Györy, F., Horváth, D., **Keller, I.**, Tamás, I., Uray, K., Fülöp, P., Lontay, B.: Smoothelin-like protein 1 regulates development and metabolic transformation of skeletal muscle in hyperthyroidism. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 12, 1-17, 2021.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fendo.2021.751488>  
IF: 6.055





5. Major, E., **Keller, I.**, Horváth, D., Tamás, I., Erdődi, F., Lontay, B.: Smoothelin-like Protein 1 Regulates the Thyroid Hormone-Induced Homeostasis and Remodeling of C2C12 Cells via the Modulation of Myosin Phosphatase.  
*Int. J. Mol. Sci.* 22 (19), 1-18, 2021.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms221910293>  
IF: 6.208

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 24,263**

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

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

Debrecen, 2025.01.24.

