

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Az inzulinrezisztencia és a neurotranszmisszió szabályozási mechanizmusai fehérje foszforilációval

Tamás István

Témavezető: Dr. Lontay Beáta



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2023

Tartalom

Tartalom	2
Rövidítések	6
Bevezetés	11
1. Irodalmi bevezetés.....	14
1.1. Reverzibilis foszforiláció, mint poszttranszlációs módosítás.....	14
1.1.1. Protein kinázok és protein foszfatázok	14
1.1.2. A protein foszfatázok osztályozása.....	15
1.2. A PPP enzimesalád és a PP1	17
1.2.1. PPP (PP1c/PP2Ac) aktivitását gátló kis méretű inhibitor molekulák rövid bemutatása	18
1.2.2. A PP1c kölcsönhatói	19
1.3. A miozin foszfatáz.....	22
1.4. A miozin foszfatáz különböző funkciói.....	24
1.4.1. Alapvető funkciók, a citoskeletális folyamatok szabályozása	24
1.4.2. A miozin foszfatáz génexpresszióban betöltött szerepe	25
1.4.3. A miozin foszfatáz szerepe a neurotranszmitter felszabadulásában	25
1.5. A miozin foszfatáz működését befolyásoló tényezők	26
1.5.1. A miozin foszfatáz szabályozása foszforiláció által	26
1.5.2. A PP1c/miozin foszfatáz szabályozása gátló kölcsönhatókkal.....	27
1.5.3. PP1c gátlását okozó inhibitor fehérjék	27
1.5.4. A MP/PP1c gátlását okozó inhibitor fehérjék	28
1.6. Ingerület átvivő anyagok felszabadulása és szabályozása.....	30
1.6.1. Neurotranszmitterek felszabadulásának mechanizmusa.....	30
1.6.2. A SNARE (oldható N-etilmaleimid-érzékeny faktor) -asszociált protein receptor (SNAP REceptor) komplex	32
1.6.3. A SNAP-25 foszforiláció általi szabályozása	34

1.7.	Smoothelin-like 1 fehérje (SMTNL1)	38
1.7.1.	A smoothelin fehérjék, és a SMTNL1 szerkezete	38
1.7.2.	A SMTNL1 molekuláris funkciója	39
1.8.	Az inzulin jelátviteli pálya.....	41
1.8.1.	Az inzulin hormon és fiziológiai hatása	41
1.8.2.	Inzulinrezisztencia	44
2.	Célkitűzések	48
3.	Anyagok és módszerek.....	50
3.1.	Anyagok.....	50
3.2.	Antitestek.....	50
3.3.	SPR kölcsönhatási vizsgálatok	51
3.4.	Rekombináns fehérje termeltetés és tisztítás	51
3.5.	In vitro Rho A asszociált kináz reakció.....	52
3.6.	B50 neuroblasztóma sejtek fenntartása	52
3.7.	Géncsendesítés.....	52
3.8.	Irányított mutagenézis	53
3.9.	Western blot analízis	53
3.10.	MTT életképességi vizsgálat.....	54
3.11.	Protein foszfatáz aktivitás mérés	54
3.12.	Szinaptoszóma preparálás és kezelés	54
3.13.	Agyszelet preparátumok elkészítése	55
3.14.	Immunfluoreszcencia.....	56
3.15.	Sejttenyésztés, differenciáltatás és inzulinrezisztencia modell.....	56
3.16.	Tranziens transzfekció	57
3.17.	Proteome Profiler analízis.....	57
3.18.	PI3K aktivitás mérés	58
3.19.	Seahorse XF96 mérések.....	58

3.20.	Glükóz felvételi vizsgálatok	59
3.21.	Statisztikai elemzések	59
4.	Eredmények.....	60
4.1.	A miozin foszfatáz szerepe a neurotranszmitter felszabadulásában.....	60
4.1.1.	A SNAP-25 és a MYPT1 kölcsönhatásának vizsgálata.....	60
4.1.2.	A SNAP-25 fehérje foszforilációja Rho A asszociált kinázzal	61
4.1.3.	A MYPT1 csendesítése megemeli a SNAP-25 Thr ¹³⁸ oldallánc foszforilációs szintjét.....	61
4.1.4.	A miozin foszfatáz serkenti a szinaptoszómák exocitózist a SNAP-25 defoszforilálásán keresztül	63
4.1.5.	A ROK és a MP enzimpáros befolyásolja a SNAP-25 Thr ¹³⁸ oldallánc foszforilációs szintjét egér agyszeletekben	65
4.2.	A SMTNL1 szerepe az inzulinrezisztenciában	67
4.2.1.	Kontroll és inzulinrezisztens sejtek proteome-profiler vizsgálata.....	67
4.2.2.	Az SMTNL1 túltermelés csökkenti az IRS1 fehérjék Ser oldalláncainak foszforilációját differenciált inzulinrezisztens C2C12 sejtekben.....	69
4.2.3.	Az SMNTL1 elősegíti a PI3K aktivitását inzulinrezisztens C2C12 sejtekben	71
4.2.4.	Az inzulin jelátvitel pálya szereplőinek szabályozása SMTNL1 által. ...	72
4.2.5.	A SMTNL1 a JNK, ERK1/2 és IRS1 foszforilációját szabályozza egy új típusú PKC expressziója révén.....	75
4.2.6.	A SMTNL1 serkenti a glikolízist és a mitokondriális légzést inzulin rezisztens sejtekben	77
5.	Megbeszélés	81
5.1.	A miozin foszfatáz szerepe az ingerület átvivő anyagok felszabadulásában .	81
5.2.	A SMNTL1 szerepe az inzulin jelátvitel szabályozásában	86
	Összefoglalás	93
	Summary.....	95

Tárgyszavak (keywords)	97
Irodalomjegyzék	98
Köszönetnyilvánítás	120
Függelék	122

Rövidítések

2-DG	2-deoxi-D-glükóz
4EBP1	eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1
Akt	protein kináz B
AMPK	AMP-aktivált protein kináz
AS160	160 kDa Akt szubsztrát
ATP	adenozin-trifoszfát
Bad	BCL2 Associated Agonist Of Cell Death
BCA	bikinkoniniksav
BSA	marhaszérum-albumin
Casp9	kaspáz-9
CH domén	kalponin-homológia domén
CPI-17	17 kDa molekulatömegű protein kináz C aktivált inhibitor
CREB	cAMP response element-binding protein
DAG	diacil-glicerol
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DARP-32	32 kDa molekulatömegű cAMP szabályozott foszfoprotein
DMEM	Dulbecco által módosított Eagle médium
DTT	ditiotreitol
DUSP	kettős specificitású protein foszfatáz
ECAR	extracelluláris savasodási ráta
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
eNOS	endoteliális nitrogén-oxid szintetáz
ERK1/2	extracelluláris szignál által szabályozott kináz 1/2
ERM	ezrin, radixin, moezin
FAO	zsírsav oxidáció
FBS	magzati borjú szérum
FCCP	karbonil cianid- <i>p</i> -trifluorometoxifenilhidrazon
Foxo	forkhead box protein
FT-SMTNL1	FLAG jelölővel ellátott rekombináns SMTNL1
GAPDH	glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz
GBPI	gasztrointesztinális- és agyspecifikus PP1 inhibitor

GDM	terhességi diabétesz (gesztációs diabetes mellitus)
GLUT4	glükóz transzporter 4
Grb2	growth factor receptor-bound protein 2
Grb10/14	growth factor receptor-bound protein 10/14
GSK-3β	glikogén-szintáz-kináz-3
H1152	(S)-(+)-2-metil-1-[(4-metil-5-izokinolinil)-szulfonil]-
homopiperazin·2HCl	
HDAC7	hiszton deacetiláz 7
HEPES	4-(2-hidroxi-etil)-piperazin-1-etánszulfonsav
HRP	torma peroxidáz
I-1	inhibitor-1
I-2	inhibitor-2
IGF-1	insulin-like growth factor-1
IGF-1R	insulin-like growth factor-1 receptor
IgG	immunglobulin G
IKK	I κ B kináz
ILK	integrin linked kinase
IP	immunprecipitáció
IR	inzulin receptor
IRS1	inzulin receptor szubsztrát 1
IRS2	inzulin receptor szubsztrát 2
IRS3	inzulin receptor szubsztrát 3
IRS4	inzulin receptor szubsztrát 4
JNK	c-Jun N-terminális kináz
KEPI	kináz aktivált protein foszfatáz-1 inhibitor
M20/21	miozin foszfatáz 20/21 kDa alegysége
MAP2	mikrotubulus asszociált protein 2
MAPK	mitogén-aktivált protein kináz
MC-LR	mikrocisztin-LR
mdm2	Mouse double minute 2
MDPK	myotonic dystrophy protein kinase
MEK	mitogén-aktivált protein kináz
MEP50	metiloszóma komplex fehérje 50

MLC20	20 kDa miozin könnyű lánc
MLCK	miozin könnyű lánc kináz
MOPS	3-(N-morfolino) propán-szulfonsav
MP	miozin foszfatáz
MPA	medroxi-progeszteron 17-acetát
MSB85	85 kDa miozin kötő alegység
mTOR	emlős rapamicin célpont
MTT	metil-tiazol-tetrazólium
MyPhoNE	miozin foszfatáz N -terminális elem
MYPT1	miozin foszfatáz szabályozó alegység 1
MYPT2	miozin foszfatáz szabályozó alegység 2
MYPT3	miozin foszfatáz szabályozó alegység 3
NIPP-1	PP1 sejtmagi inhibitor
NP-40	4-nonil-fenil-polietilén glikol
nPKC	novel típusú PKC
NSF	N-etil-maleimid szenzitív faktor
OA	okadánsav
OCR	oxigén fogyasztási ráta
PAGE	poliakrilamid gélelektroforézis
PAK	p21 aktivált kináz (PAK)
PAS	protein A-Sepharose
PBS	foszfáttal pufferelt sóoldat
PBST	0,1% (V/V) Tween 20-at tartalmazó foszfáttal pufferelt sóoldat
PDGF	paletet-derived growth factor
PDPK1	foszfatidil-inozitol (PI) függő protein kináz 1
PGC-1α	peroxiszóma proliferáció aktivált receptor gamma izoformája
PH	pleckstrin homológia domén
PHLPP	PH domain Leucine rich repeat Protein Phosphatase
PI	foszfatidil-inozitol foszfatáz
PI3K	foszfatidil-inozitol-3 kináz
PIP2	foszfatidil-inozitol-4,5-bifoszfát
PIP3	foszfatidil-inozitol-3,4,5-trifoszfát
PIPs	PP1 kölcsönható fehérjék

PKA	cAMP-függő protein kináz A
PKC	protein kináz C
PKCϵ	protein kináz C epsilon izoforma
PKCζ	protein kináz C zéta izoforma
PKCθ	protein kináz C theta izoforma
PKG	cGMP-függő protein kináz G
PMA	forbol-12-mirisztát-13-acetát
PNUTS	foszfatáz-1 sejtmagi célra irányító alegység
PP1	protein foszfatáz-1
PP1c	protein foszfatáz-1 katalitikus alegység
PP1cδ	protein foszfatáz-1 katalitikus alegységének delta izoformája
PP2	protein foszfatáz-2
PP2A/B	protein foszfatáz-2A/B
PPM	fémion függő protein foszfatáz
PPP	foszfoprotein foszfatáz
PR	progeszteron receptor
PRAS40	proline-rich Akt substrate of 40 kDa
pRB	retinoblasztóma fehérje
PRMT5	protein arginin metiltranszferáz 5
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
PTP	protein tirozin foszfatáz
PTP1B	protein tirozin foszfatáz 1B
Pyk2	prolin gazdag tirozin kináz 2
Raf	Raf protoonkogén Ser/Thr kináz
Ras	patkány szarkóma vírus
RIPA	radioimmunprecipitációs puffer
RIPPOs	protein foszfatáz 1-gyel kölcsönható szabályozók
ROK	RhoA-asszociált protein kináz
S6K1	p70S6 kináz
SAPK/JNK	stressz-aktivált protein kináz/Jun amino terminális kináz
SDS	nátrium-dodecil-szulfát
Ser	szerin
SH-2	src homology 2 domén

Shc	SHC-transforming protein 1
SHIP1/2	SH-2 containing inositol 5' polyphosphatase
SHPTP2 (Syp)	src homology 2 protein tirozin foszfátáz
SILAC	stable isotope labeling of amino acids in cell culture
SLiMs	rövid lineáris motívumok
SMTNL1	smoothelin-szerű fehérje 1
SNAP	szolubilis NSF-asszociált protein
SNAP-25	25 kDa molekulatömegű szinaptoszóma-asszociált protein
SNARE	oldható NSF-asszociált protein receptor (SNAP REceptor)
SOCS	Suppressor of cytokine signalling
SOS	Son of Sevenless
SPR	felületi plazmon rezonancia
SREBP1	sterol regulatory element-binding transcription factor 1
STAT	signal transducer and activator of transcription
Tau	mikrotubulus asszociált fehérje
TBC1D4/1	Rab GTP-áz aktiváló fehérje
TBS	Tris-el puffereelt sóoldat
TBST	0,1% (V/V) Tween-20-at tartalmazó Tris puffer
TCA	triklór-ecetsav
TF	transzkripció faktor
Thr	treonin
TIMAP	TGFβ-által gátolt membrán asszociált fehérje
TM	tautomicin
TMC	tautomicetin
Trb3	Tribbles homolog 3
TSC-2/1	Tuberous Sclerosis Complex 2/1
Tyr	tirozin
WT	vad típusú
Y27632	transz-4-[(1R)-1-aminoetil]-N-4-piridinilciklohexáncarboxamid
dihidroklorid	
ZIPK	leucin cipzár motívummal kölcsönható protein kináz

Bevezetés

Az élő szervezetek alapvető építő elemeiben, a sejtekben lejátszódó számos biokémiai folyamat finomhangolására az evolúció többféle poszttranszlációs módosítást alakított ki. A módosítások közé tartozik a fehérjék foszforilációja, valamint defoszforilációja. Ennek a megfordítható folyamatnak köszönhetően a fehérjék aktivitása, szerkezete, valamint affinitása más molekulákhoz, sejtalkotókhoz képes megváltozni. A foszforiláció és defoszforiláció révén a fehérje hálózatok által kialakított jelátviteli pályák is módosulhatnak, lehetővé téve a sejtek környezeti stimulusokra adott válaszainak kialakulását. Ezek a módosulások szerteágazóan sok élettani folyamatot képesek befolyásolni. Amíg a foszfát csoport aminosav oldalláncokba történő beépítését a protein kinázok, addig a foszfátcsoportok eltávolítását a protein foszfatázok végzik. Ezen enzimeket az alapján csoportosítjuk, hogy mely aminosav oldalláncon végzik a módosítást. Oldallánc szerinti specificitás alapján szerin (Ser)/treonin- (Thr), tirozin- (Tyr) specifikus, illetve kettős specificitású osztályokba soroljuk a protein kinázokat és a protein foszfatázokat. Az utolsó csoport érdekessége, hogy mindhárom aminosavmaradékon képesek a poszttranszlációs módosításra. A foszfátcsoport további aminosavakba is beépülhet (pl.: hisztidin, aszpartát), de élettani szempontból az előbb említett foszforilációk játszanak nagyobb szerepet.

A protein foszfatázok egyik képviselője a protein foszfatáz-1 (PP1) családba tartozó miozin foszfatáz (MP) holoenzim, mely egy Ser/Thr specifikus foszoprotein foszfatáz. A MP három alegységből épül fel: áll egy katalízisért felelős 35-38 kDa molekulatömegű PP1 α (protein foszfatáz-1 katalitikus alegységének delta izoformája) alegységből, továbbá egy 130/133 kDa molekulatömegű célra irányító/szabályozó, miozin könnyű láncot is kötni képes (miozin foszfatáz szabályozó alegység 1 - MYPT1) alegységből, valamint egy még nem teljesen tisztázott funkciójú 20/21 kDa molekulatömegű (M20/M21) alegységből. Az enzim szerepét legelőször a 20 kDa miozin könnyű lánc (MLC20) defoszforilációja kapcsán írták le. Ennek révén a MP hatással van a simaizom kontraktilitására. A miozin könnyűláncon kívül a MP-nak számos más citoszkeletális célpontját is leírták, ezek közül például MAP2 (mikrotubulus asszociált protein 2) az ERM (ezrin, radixin, moezin), továbbá a Tau (mikrotubulus asszociált) fehérjét. A MP szubsztrátjait számos esetben a RhoA-asszociált protein kináz (ROK) foszforilálja, ilyen módon az enzimpáros által igen sok fehérje áll foszforiláció általi szabályozás alatt.

Számos kutatási eredmény látott napvilágot, melyek rávilágítottak a miozin foszfatáz szerteágazó funkcióira, felépítésére és működését befolyásoló tényezőkre. Funkcióit a rendkívül széles szubsztrát specifitásán keresztül, defoszforilációs folyamatok katalizálásával képes ellátni. Sejten belüli előfordulása széles spektrumon mozog, valamint nem csupán a simaizomzatban, hanem több más szövetben is kifejeződik. Kifejti hatását a sejt migrációban, sejtadhézióban, a proliferációban, a sejt ciklus előrehaladásában, valamint sejt magi lokalizációja révén a protein arginin metiltranszferáz 5 (PRMT5) defoszforilációján keresztül különböző gének expressziójára is hatással van. Az idegsejtek közötti kommunikációban kiemelkedően fontos szereppel bíró idegi fehérjék közül a SNARE (oldható NSF-asszociált protein receptor (SNAREceptor)) komplex elemeinek defoszforilációja révén az ingerület átvivő anyagok felszabadulását is befolyásolhatja.

A Smoothelin-szerű fehérje 1 (SMTNL1) génexpressziós szinten, valamint közvetlen kötődése révén is képes befolyásolni a miozin foszfatáz aktivitását. A SMTNL1 a smoothelin fehérjék családjába tartozik, expresszióját megfigyelték mind sima, mind harántcsíkolt izomszövetben is. A SMTNL1 képes szabályozni a vaszkuláris simaizomzat kontraktilitását, valamint az izommunka által indukált kardiovaszkuláris és harántcsíkolt izomszövetek adaptációját is. Terhesség során emelkedett expressziós szintet mutat a méh és vaszkuláris simaizomzatban, valamint a nemi hormonokra érzékeny szövetekben.

Előzetes eredmények alapján a terhesség fokozta a MYPT1 expresszióját, és a SMTNL1 deléciója tovább emelte a miozin foszfatáz aktivitását. A SMTNL1 izomsejtekben kifejtett metabolikus hatására eddig egereken végzett gén deléziós kísérletek eredményei álltak rendelkezésre. Ezek alapján a SMTNL1 gén hiánya fokozta egér szövetekben az inzulinrezisztenciával összefüggésbe hozható markerek mértékét. A KO egerek glükóz toleranciája lecsökkent, melyet a terhesség némiképp kompenzálni tudott. További markerként szolgált az IRS1 (inzulin receptor szubsztrát 1) fehérje szerin oldalláncainak megemelkedett foszforilációs szintje, valamint a GLUT4 (glükóz transzporter 4) expressziójának drasztikus csökkenése. Az IRS1 fehérje tirozin helyett szerin oldalláncai mutattak magasabb fokú foszforilációt (Ser³⁰⁷, Ser³¹⁸, Ser⁶¹², Ser¹¹⁰¹), melyek a szakirodalom alapján a már kialakult inzulinrezisztencia jelenlétére utalnak.

Disszertációm első részében a MP neurotranszmitter kibocsátásban betöltött szerepét tárom fel a SNARE komplex egyik elemén a SNAP-25-ön (25 kDa molekulatömegű szinaptoszóma-asszociált protein) keresztül. A tanulmány második felében pedig a SMTNL1

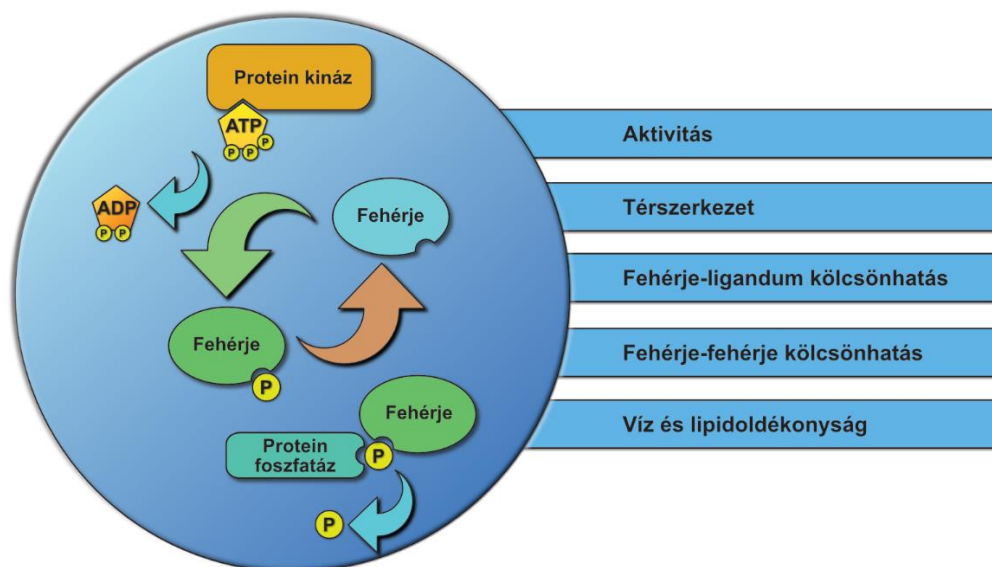
hatását vizsgálom *in vitro* inzulinrezisztens állapotban C2C12 egér izomsejt modellt alkalmazva.

1. Irodalmi bevezetés

1.1. Reverzibilis foszforiláció, mint poszttranszlációs módosítás

1.1.1. Protein kinázok és protein foszfatázok

Az élővilágot felépítő makromolekulák közül a fehérjék jelentős része átmegy valamilyen poszttranszlációs módosításon. Ezek közül a fehérjék reverzibilis foszforilációjának kiemelten fontos szerepe van. A fehérjék foszforilációját a protein kináz enzimek katalizálják úgy, hogy a általában adenosin-trifoszfát (ATP) γ -foszfát csoportja kerül át hidroxilcsoportot tartalmazó α -aminosavakra, úgy, mint szerin (Ser), treonin (Thr), és tirozin (Tyr) (Brautigan, 2013). A folyamat reverzibilitásáért a protein foszfatázok felelősek, melyek hidrolizálják a fehérje foszfátcsoporttal kialakított foszfoészter kötését. A foszforilációnak és a defoszforilációnak számos hatása lehet a fehérjét tekintve. Szabályozhatja a fehérje enzimaktivitását szerkezeti tulajdonságai megváltoztatása révén, módosíthatja a fehérje-ligandum, fehérje-fehérje kölcsönhatást, a fehérje víz- és lipidoldékonyságát, és még sok más tényezőt. Ezek a változások olyan élettani folyamatokat befolyásolnak, mint az sejtkontraktilitás, génexpresszió, ingerületátvitel, sejtciklus vagy anyagcsere. A módosulások különböző jelátviteli pályákon keresztül valósulnak meg (Sheppeck, Gauss and Chamberlin, 1997) (1. ábra).



1. ábra. A fehérjék foszforilációja, defoszforilációja, valamint ennek hatása a fehérjékre.

Steady-state, azaz egyensúlyi állapotban a különböző fehérjék foszforilációs szintjét a protein foszfatázok és protein kinázok egymással összevetett aktivitási szintjei szabják meg (Cohen *et al.*, 1990; Hunter, 1995).

Összehasonlítva a protein kináz és foszfatáz gének számát egy igen érdekes számbeli különbséget figyelhetünk meg. Míg a humán genomban 518 gén kódol valamilyen protein kinázt (Johnson and Hunter, 2005), addig protein foszfatázokkal kapcsolatos genetikai információért csupán 150 gén felelős, és ezekből még kevesebb, 40 gén kódol Ser/Thr specifikus protein foszfatázt (Pennisi, 2002). Kezdeti kutatások során éppen ezért jóval nagyobb hangsúlyt kaptak a protein kinázokkal kapcsolatos kutatások, és úgy vélték, hogy rendkívül sok protein kináz létezhet. (Hunter, 1987, p. 19). Ahogy egyre több és több kísérleti eredmény látott napvilágot a protein foszfatázokról, úgy az ezen enzimekkel kapcsolatos tudásanyag is egyre nagyobb hangsúlyt kapott a további sejtélettani vizsgálatok során. Manapság már igen széleskörűen elfogadott, hogy a protein foszfatázok éppolyan nélkülözhetetlenek a sejtbiológiai folyamatok koordinálásában, mint a protein kinázok (Oliver and Shenolikar, 1998).

1.1.2. A protein foszfatázok osztályozása

A fehérjék foszforilációja döntően szeril/treonil, valamint tirozil aminosavmaradékokon történik. Ezeken kívül hisztidil, lizil és arginil- oldalláncok is foszforilálódhatnak, bár ezek száma csekély (Brautigan, 2013, p. 20). A foszforilációval kapcsolatos kutatások során fény derült arra, hogy a fehérjéket több oldalláncon számos protein kináz is foszforilálhatja, mely lehetővé teszi számos fiziológiai jel integrációját (Salazar and Höfer, 2009). A foszfoaminosav jelölésekkel végzett első kutatások alapján úgy gondolták, hogy a tirozil foszforilációk a teljes foszforilációk kevesebb mint 1%-ért, a többiért a szeril és treonil oldalláncok felelősek. A tirozil oldalláncok majdnem tízszeres mértékben megnövekedett foszforilációját figyelték meg a Rous szarkóma vírussal transzformált sejtekben (Hunter and Sefton, 1980). Ez a megfigyelés alapozta meg ennek a poszttranszlációs módosításnak a tumoros elváltozásokban betöltött szerepének feltárására irányuló további kutatásokat (Hunter, 2009). Később sokkal kifinomultabb módszerek segítségével: aminosavak stabil radioizotópos jelölésével sejt kultúrákban (stable isotope labeling of amino acids in cell culture - SILAC), valamint tömegspektrometriai mérésekkel több mint 2000 foszoprotein vizsgálatát végezték el, melyből kiderült, hogy a teljes foszforilációk 1,8%-a tirozil, 98,2%-a treonil és szeril oldalláncokon mennek végbe (Olsen *et al.*, 2006).

A Ser/Thr specifikus protein foszfatázokat legelőször a protein foszfatáz-1 (PP1) és protein foszfatáz-2 (PP2) családokba sorolták (Ingebritsen and Cohen, 1983). A PP1 családba tartozó protein foszfatázok aktivitása érzékeny a heparinra, valamint kis molekulatömegű hőstabil gátló fehérjékre (inhibitor-1, és inhibitor-2). A PP2 enzimes család tagjait ezek a faktorok nem befolyásolják (Cohen, 2002). A kutatások előrehaladtával, a katalitikus alegységek szekvenciáinak azonosításával, valamint a bioinformatikai elemzések térhódítása révén a protein foszfatázok osztályozása átalakult.

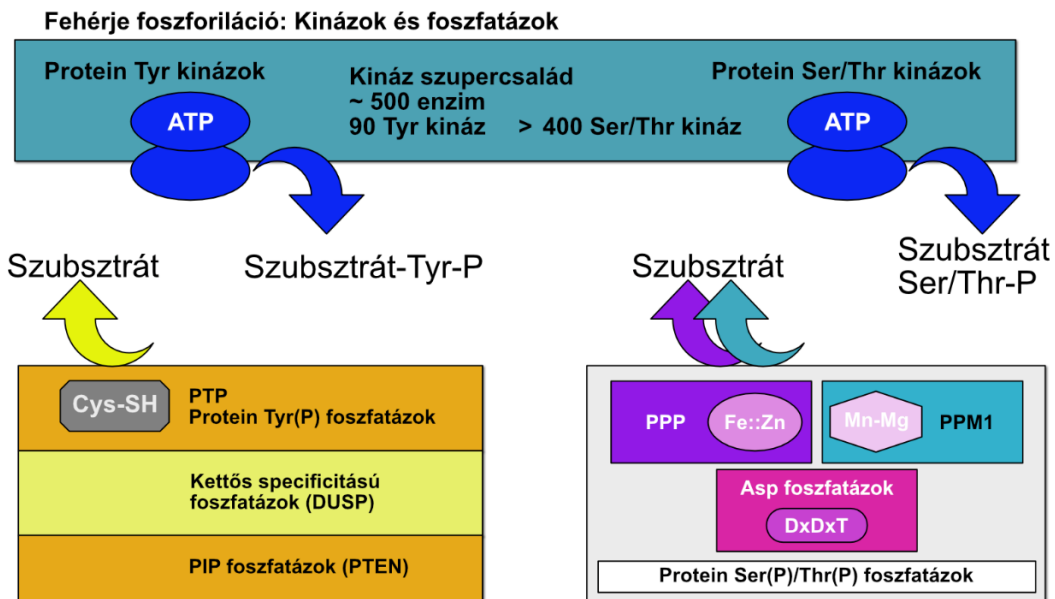
A PP2-es családba tartozó enzimek további alcsoportokra bonthatóak attól függően, hogy milyen fémiont hordoznak aktív centrumukban. A PP2A fémion független, a PP2B (kalcineurin) Ca^{2+} /kalmodulin függő protein foszfatáz, a PP2C Mg^{2+} függő enzim, mely később a fémion függő protein foszfatáz (PPM) szupercsalád része lett a Ser/Thr specifikus protein foszfatázok között (Ingebritsen and Cohen, 1983; Cohen, 1997).

Az előbb említett új rendszerezés alapján a Ser/Thr specifikus protein foszfatázokat három családba soroljuk. A foszfoprotein foszfatázok (Phosphoprotein phosphatases – PPP), melyek Fe^{2+} - Zn^{2+} ionokat tartalmaznak. A PPM családba tartozó enzimeket Mn^{2+} / Mg^{2+} ionok aktiválják, végül az utolsó alcsoport az aszpartát protein foszfatázok, melyek egy DxDxT motívumot hordoznak az aktív centrumukban. A PPP enzimes család tovább bontható PP1, PP2A, PP2B (PP3-ként is hivatkoznak rá), és novel típusú protein foszfatáz alcsoportokra (PP4, PP5, PP6 PP7) (Brautigan, 2013; Brautigan and Shenolikar, 2018).

A protein tirozin foszfatázok (PTP), melyeket szintén több alcsoportba sorolunk szekvenciájuk, szerkezetük és funkciójuk alapján, a klasszikus értelemben vett tirozin foszfatázok a tirozil- oldallánc foszfoészter kötését hasítják.

Az utolsó csoport a kettős specifitású protein foszfatázok (DUSPs – Dual-specificity phosphatases), melyek képesek a szeril, treonil valamint a tirozil oldalláncok foszfoészter kötését is hidrolizálni (Pot and Dixon, 1992; Barford, Jia and Tonks, 1995).

Léteznek olyan protein foszfatázok is, melyek nem képesek katalizálni defoszforilációs folyamatot, ezeket pszeudofoszfatázoknak nevezzük. Ilyen enzimek lehetnek Ser/Thr és Tyr specifikus protein foszfatázok is. Egyes vélemények alapján egyszerű szekvencia mutációkról van szó, de olyan álláspont is létezik, mely szerint a szubsztráttal kölcsönhatva kompetitíven gátolja az aktív protein foszfatázokat (Mattei *et al.*, 2021). Említésre méltó még a hisztidin foszfatázok csoportja, egy széles, és funkcionálisan diverz csoport, mely két ágra osztható. A csoport tagjai között igen csekély a szekvencia azonosság (Rigden, 2007). A főbb protein foszfatázok csoportosítását a **(2. ábra)** foglalja össze.



2. ábra. A protein foszfatáz enzimek osztályozása. PPP: foszfoprotein foszfatázok; PPM: fémionfüggő protein foszfatázok; ATP: adenozin-trifoszfat; PIP: foszfatidil inozitol foszfát; PTEN: Phosphatase and tensin homolog; Módosított ábra, források: (Brautigan, 2013; Ezerarcú fehérjék - Buday László, Nyitray László, Perczel András, 2018, p. 788).

1.2. A PPP enzimcsalád és a PP1

A PPP családba tartozó enzimek tagjai magasfokú konzerváltságot mutatnak, mely körülbelül 80%-os (Brautigan, 2013). Ezen protein foszfatátokat kódoló gének hasonlósága nemcsak az eukariótákban, hanem a baktériumokban és archeobaktériumokban is megfigyelhető, ami az evolúció során kialakult igen fontos szerepükre utal (Brautigan and Shenolikar, 2018). Az egyszerűbb eukarióta szervezetekben elengedhetetlenül fontos funkciót látnak el, főleg olyan esetekben, ahol a PPP enzimek kódolásáért felelős génekből csupán egy variáns fordul elő (Zhang, Ou and Zhang, 2004). Úgy vélik, hogy az egyes PPP funkcióvesztés miatt fellépő letális fenotípusok hatására jöttek létre különböző PPP izoformák melyek funkcióikat tekintve átfedőek lehetnek (Brautigan and Shenolikar, 2018). Attól függetlenül, hogy a PPP családba tartozó enzimeket különböző alcsoportokba soroljuk (PP1, PP2A stb.) vannak olyan enzimek, melyek szekvenciájukat tekintve közelebb állnak egymáshoz magán az enzimcsaládon belül. Például a humán 2-es típusú PPP-k (PP2A, PP4, és PP6) közelebbi rokonságban állnak egymáshoz, mint a többi PPP enzimhez. Az egy PPP csoportba tartozó izoformák között is vannak funkcionális különbségek (Brautigan and Shenolikar, 2018). A PPP családba tartozó protein foszfatázok további érdekessége, valamint tovább erősíti a kritikus szerepüket, hogy több xenobiotikumra is érzékenyek, mint például poliketidek (pl.: okadánsav,

kalikulin-A), vagy ciklikus polipeptidek (pl.: mikrocisztin, nodularin). Ezek a vegyületek a PPP enzimek aktív centrumába kötődve fejtik ki hatásukat, így ezen enzimek gátlása révén ezek a vegyületek citotoxikusak (Swingle, Ni and Honkanen, 2007).

Az enzimes családomban belül a PP1 jellemzésével folytatnám a továbbiakat, mivel a miozin foszfatáz felépítésében a PP1 katalitikus alegység egyik izoformája játszik szerepet. Fontos megjegyezni, hogy eddig csupán katalitikus alegységek kerültek részletezésre, de ezek az enzimek nem monomer formában fordulnak elő, hanem valamilyen szabályozó alegységgel alkotnak holoenzimeket, melyeket a későbbiekben részletezek. A katalitikus alegység jelölése: PP1c (protein foszfatáz-1 katalitikus alegység), valamilyen PP1c katalitikus alegységet hordozó holoenzim: PP1.

Az emberi PP1c enzimek kódolásáért három gén felelős: PPP1CA (másnéven (PP1 α), PPP1CB (másnéven PP1c δ/β), valamint a PPP1CC másnéven (PP1c γ). Ezek a PP1c alegység izoformák is magasfokú konzerváltságot mutatnak (~90%-os szekvencia egyezés), és 35-38 kDa molekulásúlyúak. Az előbb említett három génnek több splice variánsa is létezik: (PP1c α_1 , PP1c α_2), PP1c δ/β , PP1c γ_1 és PP1c γ_2) (Sasaki *et al.*, 1990; Zhang *et al.*, 1993; Barker *et al.*, 1994; Ceulemans and Bollen, 2004; Aoyama *et al.*, 2011). Expressziójukat tekintve a PP1c α_1 , a PP1c β és a PP1c γ_1 minden sejtben kifejeződik, míg a PP1c γ_2 csupán a tesztiszben és az agyi szövetekben (Korrodi-Gregório, Esteves and Fardilha, 2014). A különböző izoformák közötti különbségek főként az N és C terminális régiókban mutatkoznak meg, míg az enzim izoformák három, központi szekvencia régiójában elhelyezkedő aminosavak több mint 70%-os egyezést mutatnak (Ceulemans and Bollen, 2004).

1.2.1. PPP (PP1c/PP2Ac) aktivitását gátló kis méretű inhibitor molekulák rövid bemutatása

Az előző fejezetben már röviden említésre került, hogy a Ser/Thr specifikus foszfoprotein foszfatázokat számos, természetben előforduló toxin képes gátolni. Ilyenek például a két rokonvegyület csoportba tartozó ciklikus peptidmolekulák, a mikrocisztinek és a nodularinok, melyeket kék és zöld algák állítanak elő (Carmichael, 1992, 1994; Namikoshi *et al.*, 1992). A mikrocisztinek ciklikus heptapeptidek, melyek több D-aminosavat is tartalmaznak (Sheppeck, Gauss and Chamberlin, 1997). Egyik tagja ennek a csoportnak a mikrocisztin-LR, melyet a *Microcystis*, *Oscillatoria* nemzetségbe tartozó algák és *Anabaena* nemzetségbe tartozó cianobaktérium állít elő. A nodularinok ciklikus szerkezetű pentapeptidek, amelyek szintén

gátolják az enzimes család egyes tagjainak aktivitását (főként a PP1c, PP2Ac) (Botes *et al.*, 1985; Rinehart *et al.*, 1988; Honkanen *et al.*, 1991).

Az elsők között leírt poliketid vegyületcsoportba tartozó inhibitor az okadánsav (Schmitz *et al.*, 1981; Tachibana *et al.*, 1981), melyet tengeri szivacsokból (*Halichondria okadaii* and *H. melanodocia*) nyertek ki, majd később tengeri planktonokból is előállították (Sheppeck, Gauss and Chamberlin, 1997). Az okadánsav potens tumor promóter vegyület (MacKintosh and Klumpp, 1990). Később Takai és munkatársai rámutattak az okadánsav szelektív gátló hatására: A PP2Ac-vel szemben szelektívebb: $IC_{50}=1,2$ nM, míg a PP1c-re nézve $IC_{50}=315$ nM. A PP2C (PPM) enzimek aktivitására semmilyen szinten sem, a PP2B (PP3) enzimek aktivitására pedig nagyon kis mértékben van hatással (Takai *et al.*, 1992). Az okadánsav PP2Ac-ra szelektív koncentrációban kezelt hepatocelluláris karcinóma (HepG2) sejtekben a kialakult gátlás hatására a MYPT1 (miozin foszfatáz szabályozó alegység 1 - Myosin Phosphatase Targeting subunit 1) mindkét gátló foszforilációs oldalláncán (Thr⁶⁹⁵, Thr⁸⁵⁰) emelkedett foszforilációs szintet, valamint a MYPT1 plazmamembránhoz való migrációját figyelték meg (Lontay *et al.*, 2005).

Az okadánsav jellegű gátlók közé tartoznak még többek között a kalikulinok, a tautomycin (TM) valamint a tautomicetin (TMC) is. A TM-et először *Streptomyces spiroverticillatus* fermentációs eljárása során állították elő. A TMC a TM egy változata, melynek a spiroketális része hiányzik, és *Streptomyces griseochromogenus*-ból nyerték ki először (Sheppeck, Gauss and Chamberlin, 1997). A TM nagyobb szelektivitást mutat a PP1c-vel szemben: TM $K_i=0,16$ nM; PP2Ac $K_i=0,4$ nM, mint a PP2Ac-val szemben. A TM és az okadánsav kötődése kölcsönösen kizárja egymást, ami arra utal, hogy ugyanazon kötőhelyen osztozik a két inhibitor (MacKintosh and Klumpp, 1990). Szinaptoszóma preparátumokon végzett kísérletek során TMC-vel sikerült a miozin foszfatáz (MYPT1 - PP1c δ) szelektív gátlását elérni (Lontay *et al.*, 2012).

1.2.2. A PP1c kölcsönhatói

A PP1c enzimek katalitikus aktivitásához, illetve annak specifikusságához és maximalizálásához a katalitikus alegységekkel kölcsönható szabályozó alegységek szükségesek, melyekből holoezimek épülnek fel. Körülbelül 200 validált kölcsönható fehérjét írtak le eddig, melyek nem csak a szubsztrát specificitást, de az enzimaktivitást, és a szubcelluláris lokalizációt is képesek befolyásolni (Bollen *et al.*, 2010; Choy, Page and Peti, 2012). A PP1c működését módosító, kölcsönható fehérjék először a PP1-interacting proteins

(PP1 kölcsönható fehérjék - PIPs) (Heroes *et al.*, 2013) névre hallgattak, az újabb nomenklatúrában már Regulatory Interactor of Protein Phosphatase one (protein foszfatáz 1-gyel kölcsönható szabályozók - RIPPOs)-ként hivatkoznak ezekre az interakciós partnerekre. A katalitikus alegységek, és a számos kölcsönható fehérje kombinációja révén rendkívül magasfokú specificitással rendelkező holoenzimek jönnek létre (Wu *et al.*, 2018).

Bár léteznek olyan interakciós partnerek, melyek egy adott PP1c izoformához kötődnek, a legtöbb RIPPO képes az összes PP1c izoformával kölcsönhatásba lépni. Ennek hátterében egyrészt a PP1c sajátos felszíni karakterisztikája áll, mely lehetővé teszi számos kölcsönható partnerrel alkotott komplex létrejöttét, azaz a kötődésért a PP1c oldaláról az enzim felszínén található specifikus régiók felelősek, melyek gyakran csupán 4-8 aminosav hosszúságúak és $\sim 400\text{\AA}^2$ -nyi felületet ölelnek fel a PP1c felszínén (Bollen *et al.*, 2010).

A kölcsönható partnerek pedig olyan aminosav szekvenciákkal rendelkezhetnek Short Linear Motifs (rövid lineáris motívumok - SLiMs), melyek az előbb említett PP1c felszínén található dokkoló helyekkel képesek kölcsönhatásba lépni (Garvanska and Nilsson, 2020). Ilyen rövid szekvencia például az interakciós partnerek 90%-ban megtalálható RVxF (K/R-x1-V/I-x2-F/W az x bármilyen aminosav lehet prolint leszámítva), mely a PP1c-vel való kapcsolódás során horgony szerepet tölt be. (Egloff *et al.*, 1997; Wakula *et al.*, 2003; Bollen *et al.*, 2010). Vannak olyan szekvenciák is, melyek másodlagos kölcsönhatások kialakításában játszanak szerepet. Ilyen például a SILK ([GS]IL[RK]), melyet az inhibitor-2 esetében írtak le, és elengedhetetlen a megfelelő gátlás kialakításához (Huang *et al.*, 1999; Hendrickx *et al.*, 2009). További másodlagos, kötődést elősegítő lineáris motívum a MyPhoNE (miozin foszfatáz n-terminális elem - Myosin Phosphatase N-terminal Element, RxxQ[VIL][KR]x[YW] szekvencia) mely megtalálható például a MYPT1-ben, és az interakciós partner felismerésben játszik szerepet (Terrak *et al.*, 2004; Hendrickx *et al.*, 2009).

A kölcsönható fehérjéknek más és más hatásuk van, ennek megfelelően többféle osztályba is sorolhatjuk őket: szubsztrát targeting/aktiváló, valamint szubsztrát specificitásért felelő/inhibitorikus fehérjék. Több interakciós partner rendelkezik továbbá specifikus doménekkel, melyek a PP1-et különböző sejten belüli kompartmenthez horgonyozzák, mint például a plazmamembrán (pl.: integrin α IIB), mitokondrium (pl.: prefoldin chaperone - URI), endoplazmatikus retikulum (pl.: growth arrest and DNA damage-inducible protein-34 - GADD34), glikogén részecskék (pl.: G-alegységek), az aktin citoskeleton (pl.: spinophilin, és neurabin-2), kromatin (pl.: Repo-man), vagy a sejtmagvacska (pl.: Nucleolar Protein With

MIF4G Domain 1 - NOM1) (Bollen *et al.*, 2010). A különböző kölcsönhatókat és azok szerepét az (1. táblázat) foglalja össze.

A PP1c-vel kölcsönható fehérjék osztályozása

Kölcsönható	Szerep
MYPT1	célra irányítás
glikogén targeting alegységek (G alegységek)	célra irányítás
integrin αIIB	plazmamembránhoz horgonyzás / gátlás
URI	mitokondriumhoz horgonyzás
GADD34	endoplazmatikus retikulumhoz horgonyzás / gátlás
NOM1	sejtmagvacskához horgonyzás
spinophilin	aktin citoskeletonhoz horgonyzás
neurabin-2	célra irányítás / gátlás
Repo-man	kromatinhoz horgonyzás / célra irányítás
PNUTS	célra irányítás / gátlás
NIPP-1	gátlás
Inhibitor-1	gátlás
Inhibitor-2	gátlás
CPI-17	gátlás
KEPI	gátlás

1. táblázat. A PP1c-vel kölcsönható partnerek és funkcióik rövid összefoglalása.

Ezek a targeting alegységek a PP1c-t a szubsztrátok közelébe irányítva, a szubsztrát koncentráció ilyen módon történő növelésével nagyságrendekkel magasabb defoszforilációs hatásfokot képesek létrehozni (Ferrell and Cimprich, 2003).

In vitro körülmények között a PP1c interakciós partnerek majdnem fele rendelkezik enzimaktivitást gátló hatással abban az esetben, ha a szubsztrát glikogén foszforiláz (Hendrickx *et al.*, 2009). Ezeket a partnereket gyenge gátlóként is értelmezhetjük, azonban néhány specifitásért felelős partner már nanomólos koncentrációban is képes gátlást okozni úgy, mint a GADD34 (Connor *et al.*, 2001), neurabinok (Carmody *et al.*, 2008), PNUTS (foszfatáz-1 sejtmagi célra irányító alegység - Phosphatase 1 Nuclear Targeting Subunit) (Y.-M. Kim *et al.*, 2003), valamint a NIPP-1 (PP1 sejtmagi inhibitor 1 - Nuclear Inhibitor of Protein Phosphatase-1) (Beullens *et al.*, 2000). Ezeket a partnereket érdekesebb specifitásért felelős kölcsönhatóként értelmezni, mivel a szubsztrátoknak csupán egy kisebb hányadánál figyelhető

meg gátló hatás (Bollen *et al.*, 2010). Egyes partnereknél azonban éppen az ellenkezője figyelhető meg, azaz kifejezetten bizonyos szubsztrátok felé képesek növelni a PP1c aktivitását, mint például a glikogén targeting alegységek, vagy a MYPT1 (Bollen, 2001; Cohen, 2002)

Ezeket leszámítva léteznek valódi gátlást előidéző kölcsönható partnerek, melyek a PP1c aktív centrumába kötődve gátolják az enzim aktivitását. Vannak azonban olyan gátló fehérjék is, melyek esetében foszforiláció is szükséges a gátló hatás kialakulásához. Ilyenek például az inhibitor-1, CPI-17 (17 kDa molekulatömegű protein kináz C által aktivált inhibitor - Protein kinase C-potentiated inhibitor protein of 17 kDa) és paralógjai (Ceulemans and Bollen, 2004; Eto, 2009). Az egyik ilyen paralóg a KEPI (kináz által aktivált protein foszfatáz-1 inhibitor - Kinase C-Enhanced PP1 Inhibitor), mely elsőként morfin függő egerek agyszövetéből került leírásra (Liu *et al.*, 2002). Ez az inhibitor, szekvenciáját tekintve közelebb áll az inhibitor-1-hez, mint a CPI-17-hez. A gátló hatáshoz a KEPI esetében is foszforiláció szükséges (Liu *et al.*, 2002). Érdekes módon a MYPT1-en is található olyan foszforilációs hely, mely képes gátló hatást kifejteni, mint egy pszeudoszubsztrátként működve (Khromov *et al.*, 2009).

1.3. A miozin foszfatáz

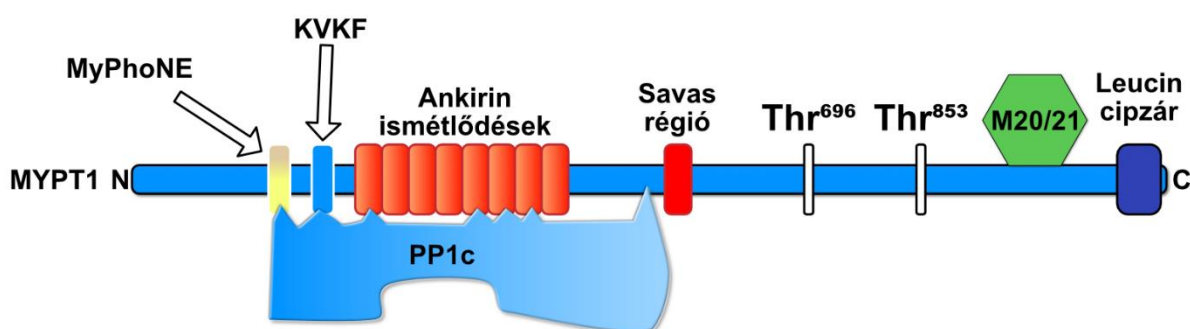
A miozin foszfatáz (MP) enzimet először csirke zúza (Alessi *et al.*, 1992; Shimizu *et al.*, 1994), majd később sertés húgyhólyag preparátumból is sikerült kimutatni (Shirazi *et al.*, 1994). A MP három alegységből épül fel: egy 38 kDa molekulatömegű protein foszfatáz-1 katalitikus alegységből (PP1c β/δ - (PPP1CB gén terméke)), egy 110-133 kDa molekulatömegű miozint is kötő szabályozó/targeting MYPT1 (PPP1R12A gén terméke) alegységből, valamint egy 20/21 kDa molekulatömegű M20/21 alegységből (Kiss, Erdődi and Lontay, 2019a).

A holoenzimet felépítő alegységek interakcióit mélyrehatóan tanulmányozták különböző kötődési és szerkezeti vizsgálatokkal. Az eredményekből világossá vált, hogy a holoenzimben a PP1c felelős a defoszforiláció katalizálásáért, mely kölcsönhat a MYPT1-gyel, ami az enzim célra irányításában lát el funkciót, főként a foszforilált 20 kDa miozin könnyűlánc (MLC20) esetében. A MYPT1 C-terminális régiójához kötődik az M20/21 alegység, mely nem befolyásolja a foszfatáz aktivitást közvetlenül. A MYPT1 alegység minden emlős sejttípusban expresszálódik, míg az M20/21 a szívizomzatban és simaizomzatban fordul elő (Kiss, Erdődi and Lontay, 2019a). Az M20/21 alegység pontos fiziológiai szerepe még nem teljesen feltárt, de az eddigi eredmények alapján a kardiomiocitákban a Rho-A asszociált kináz (ROK) gátló

foszforilációját segíti elő a MYPT2 alegységen (főként szívben előforduló MYPT izoforma) gátolva ezzel a MP aktivitását (Shichi *et al.*, 2010). Kiderült továbbá, hogy az M20/21 alegység képes kötődni, és ezáltal befolyásolni a mikrotubulusok újra rendeződési dinamikáját (Takizawa *et al.*, 2003). Emlős sejtekben a miozin foszfatáz esetében megfigyelhető a katalitikus és a szabályozó alegység közötti exkluzivitás, azaz a főbb PP1c izoformák közül a PP1c β/δ főként a MYPT1 alegységgel alakít ki kölcsönhatást (Scotto-Lavino *et al.*, 2010).

Az emlős MYPT családba tartozó fehérjék öt gén termékei (MYPT1, MYPT2, MBS85-85 kDa miozin kötő alegység, MYPT3, és TIMAP - TGF β -által gátolt membrán asszociált fehérje), melyek mindegyike a már említett regulatorikus/targeting feladatot látja el. A család tagjai rendelkeznek az RVxF motívummal, valamint ankirin ismétlődésekkel is. A MYPT1, MYPT2, és az MBS85 rendelkezik egy C-terminális leucin cipzárral, mely a fehérje-fehérje interakcióban és a dimerizációban lát el feladatot. A MYPT3 és a TIMAP prenilációk révén a plazmamembránhoz horgonyzódnak (Grassie *et al.*, 2011).

A miozin foszfatáz szabályozó alegysége a MYPT1 is rendelkezik az előzőekben taglalt RVxF rövid lineáris PP1c kötő motívummal (K³⁵VKF³⁸), mely elengedhetetlen a MYPT1 és a PP1c interakciójához (Tóth *et al.*, 2000). A MYPT1 7 vagy 8 ankirin ismétlődést hordozhat, melyek ~33 aminosavból állnak, ezekből 20 aminosav konzervált. A 171-197-es régió kevésbé homológ, de a csirkében konzervált M130/M133 alegységgel mutat hasonlóságot (Shimizus *et al.*, 1994; Terrak *et al.*, 2004). Úgy vélik, hogy az ankirin ismétlődések alapja egy β -hairpin-helix-loop-helix szerkezet ($\beta_2\alpha_2$) (Sedgwick and Smerdon, 1999). Mivel az ankirin ismétlődések révén a MPYT1 több másik fehérjével képes kölcsönhatást kialakítani, ezért erre a struktúrára interakciós platformként is hivatkoznak (Bennett and Baines, 2001).



3. ábra. A MP sematikus felépítése. MYPT1: miozin foszfatáz szabályozó alegység 1; MyPhoNE: miozin foszfatáz n-terminális elem; PP1c: PP1 katalitikus alegység. Módosított ábra, forrás: (Kiss, Erdődi and Lontay, 2019a).

MYPT1 esetében az RVxF motívum az első ankirin ismétlődéstől N-terminális irányba található (35-38-as aminosavak) (Cohen, 2002). A PP1c-vel való kölcsönhatás kialakításában további kötő motívumok is részt vesznek, ilyenek az RVxF szekvenciától N-terminális irányban (MYPT1 esetében a 10-17-es aminosavak) elhelyezkedő MyPhoNE, az ankirin ismétlődések közül az 1, 5, 6 és a 7-es (Terrak *et al.*, 2004), valamint a 301-511-es, a fehérje közepén elhelyezkedő központi aminosavak (Tóth *et al.*, 2000). A MYPT1-gyel kapcsolatos kutatások során az is világossá vált, hogy ez a szabályozó alegység hidrophil karakterisztikájú, hidrophób jelleget nem igazán hordoz. A MYPT1-en található továbbá egy savas régió is melyre D/E (aszparaginsav/glutaminsav) régióként hivatkoznak. (Hartshorne, Ito and Erdödi, 2004). A MYPT1-en találhatóak továbbá foszforilációs helyek is mint például a Thr⁶⁹⁶ és Thr⁸⁵³-as szabályozó foszforilációs helyek, melyek funkcióit a későbbiekben a „Miozin foszfatáz szabályozása foszforilációval által c. fejezetben” részletesen taglalom. A MYPT1- fehérjén található még egy M20/21 alegységet kötő régió is (934-1006) (Ito *et al.*, 2004), valamint a C terminális végén egy leucin cipzár motívum is (Hartshorne, Ito and Erdödi, 2004). A miozin foszfatáz sematikus felépítését a **(3. ábra)** illusztrálja.

1.4. A miozin foszfatáz különböző funkciói

1.4.1. Alapvető funkciók, a citoszkeletális folyamatok szabályozása

A miozin foszfatáz alapvető funkciója az aktomiozin komplex összehúzóerejének szabályozása a MLC20 defoszforilációja révén, valamint hozzájárul a sejtmigráció (Xia, Stull and Kamm, 2005), és sejtadhézió (Zagórska *et al.*, 2010) szabályozásához is. Az ERM (ezrin, radixin, és moezin) fehérjék defoszforilációja által a citoszkeleton elrendeződésében is fontos szerepet tölt be. Ezek a fehérjék összekötő funkciót látnak el a transzmembrán fehérjék és az alatta található sejtvas között. A ERM fehérjék ennek révén számos sejten belüli funkciót (sejt adhézió, migráció, proliferáció) látnak el (Kiss, Erdödi and Lontay, 2019a). Az ERM fehérjék a citoplazmában találhatóak szoros konformációban, azonban a ROK vagy PKC általi foszforiláció hatására (ezrin: Thr⁵⁶⁷, radixin: Thr⁵⁶⁴, moezin: Thr⁵⁵⁸) nyitottabb, valamint aktívabb konformációt vesznek fel, mely lehetővé teszi a célpontjaikhoz való kötődésüket (Fukata *et al.*, 1998; Fehon, McClatchey and Bretscher, 2010). Több tanulmányban is leírták a miozin foszfatáz szerepét az ERM fehérjék defoszforilációjában (Fukata *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2012; Kovacs-Kasa *et al.*, 2016).

A mikrotubulushoz asszociált fehérjék közül a Tau és a MAP2 esetében is sikerült bizonyítani a ROK és a MP-zal való kölcsönhatást. PC12 (phenocromocytoma) sejtekben *in*

vitro körülmények között MP a ROK által foszforilált Tau fehérjét defoszforilálja, ami arra utal, hogy phenocromocytoma sejtekben a MP feltehetőleg hatással van a mikrotubulusok újra rendeződésének dinamikájára (Amano *et al.*, 2003).

1.4.2. A miozin foszfataz génexpresszióban betöltött szerepe

A miozin foszfatazt HepG2 sejtek mikroszómális és nukleáris frakcióiban (Lontay *et al.*, 2005, p. 2), továbbá idegsejtek sejtmagjában (Lontay *et al.*, 2004) is kimutatták. A MP egyik szubsztrátja a hiszton deacetiláz 7 (HDAC7), mely a IIa típusú deacetilázok közé tartozik. Ez az enzim a transzkripció komplex egyik tagjaként számos gén represszióját okozza úgy, mint a Nur77, mely a T-limfocita differenciációban játszik fontos szerepet (Parra *et al.*, 2005). A HDAC7 Ser¹⁵⁵, Ser³¹⁸ és Ser⁴⁸⁸-as oldalláncokon foszforilálódik a protein kináz D által, mely révén a citoplazmába transzlokálódik, ahol a 14-3-3 fehérjékkel lép kölcsönhatásba (Kao *et al.*, 2001, p. 7; McKinsey, Zhang and Olson, 2001). A citoplazmában a HDAC7 a miozin foszfatazhoz kötődve (Parra, Mahmoudi and Verdin, 2007) defoszforilálódik a szeril-oldalláncain, melynek hatására újra a sejtmagba transzlokálódik (Compagnucci *et al.*, 2015).

HepG2 sejteken végzett kísérletek alapján még több MP interakciós partnert sikerült leírni, úgy, mint az RNS helikáz, protein foszfataz 1B, valamint a replikációs fehérje A-t. Sikerült továbbá a MP és a metiloszóma komplex több tagja közötti kölcsönhatást is kimutatni, mint például a protein arginin metiltranszferáz 5 (PRMT5), metiloszóma komplex fehérje 50 (methylosome protein 50 - MEP50), vagy a PCln (Sipos *et al.*, 2017). A PRMT5 fontos szerepet játszik a transzkripció szabályozásában, az RNS szállításban, valamint a sejten belüli jelátviteli folyamatokban a ω-NG, NG-szimmetrikus arginin dimetiláció révén. A MP a PRMT5 Thr⁸⁰-as oldalláncának defoszforilációja által gátolja a PRMT5 aktivitását, mintegy ellensúlyozva a ROK által létrehozott aktivációt. A PRMT5 szimmetrikusan dimetilálja a hisztonok H2A-R3-as és H4-R3-as oldalláncait, ezáltal represszáltabb metilációs mintázatot hoz létre. HepG2 sejtekben a MYPT1 hiánya 2627 sejtciklusban, tumor morfológiában és metabolizmusban szerepet játszó gén expresszióját befolyásolja, melyre teljes RNS preparátumokon végzett microarray kísérleti adatok utalnak (Sipos *et al.*, 2017).

1.4.3. A miozin foszfataz szerepe a neurotranszmitter felszabadulásában

A MP idegsejtekben való előfordulását, valamint az idegi folyamatokban betöltött szerepét is sikerült már korábbi tanulmányok során leírni. A MYPT1 szabályozó alegysége patkány agyi cDNS könyvtár szűrése során írták le először (Fujioka *et al.*, 1998). A patkány

teljes agyi térképezése során a MYPT1 minden agyi régióban kimutatható volt, de a kortexben, a szaglóiidegben, a striátumban, a hippocampusban, és a köztiagyban magasabb koncentrációt és enzimaktivitást mértek (Lontay *et al.*, 2004). A MYPT1 idegi mintákban mért mennyisége a C2C12 mioblaszt sejtvonalban található mennyiséggel összemérhető volt (Wu *et al.*, 2003). A MYPT1 jelenléte kortikális szinaptoszómákban és primer idegsejtekben is megfigyelhető volt, a MYPT1 és PP1c δ komplexe szinaptofizinnel ko-lokalizálódott, valamit ko-precipitálódott. A szinaptofizin egy tipikus pre-szinaptikus marker fehérje (Lontay *et al.*, 2004). Tömegspektrometriás elemzések rámutattak arra is, hogy a MYPT1-gyel több idegi fehérje is képes kölcsön hatni úgy, mint a szinapszin-I, calcineurin A alegység, Ca²⁺-kalmódulin függő kináz II és a SNARE komplex elemei: szintaxin, és a SNAP-25 A szintaxin Ser¹⁴-es kazein kináz-2 általi foszforilációját előzetesen már leírták (Gil *et al.*, 2011), és úgy vélték, hogy a szinapszin PKA általi Ser⁹-es foszforilációja képes befolyásolni a neurotranszmitter felszabadulást a vezikulák aktin citoszkeletonhoz való horgonyzása révén (Hilfiker *et al.*, 2005). Kortikális szinaptoszómákat PP1 enzimekre specifikus inhibitorral, TMC-vel kezelve a depolarizáció által indukált exocitózis csökkent mértékét figyelték meg, míg Y27632-vel (transz-4-[(1R)-1-aminoetil]-N-4-piridinilciklohexáncarboxamid dihidroklorid – ROK gátlószer) való kezelés hatására nőtt az exocitózis mértéke. Nem utolsósorban a ROK és a MYPT1 jelenlétét elektronmikroszkópos eljárással is bizonyították a szinaptoszómákban. Mind a ROK, mind a miozin foszfatáz képes pre- és posztszinaptikus fehérjéken keresztül a neurotranszmissziót befolyásolni. A ROK és a miozin foszfatáz általi szintaxin-I Ser¹⁴-es és szinapszin-I Ser⁹-es oldalláncok szabályozását is leírták már korábban. (Lontay *et al.*, 2012).

1.5. A miozin foszfatáz működését befolyásoló tényezők

1.5.1. A miozin foszfatáz szabályozása foszforiláció által

A holoenzim katalitikus aktivitása foszforilációk révén is megváltozhat, melyben fontos szerepe van a MYPT1 C-terminális végén elhelyezkedő konszenzus szekvenciáknak. Ebben a régióban számos protein kináz által felismert szekvencia található, melyeken keresztül létrejöhet a MP szabályozása (Kiss, Erdődi and Lontay, 2019a). A humán MYPT1-et tekintve a Thr⁶⁹⁶ és Thr⁸⁵³-as aminosavak foszforilációja a MP csökkent aktivitását vonja maga után. Elsőként a ROK enzimet írták le, amely képes mindkét oldalláncot foszforilálni (Kimura *et al.*, 1996). Későbbiekben több protein kináz is azonosítottak, melyek a Thr⁶⁹⁶-os oldalláncot foszforilálják, ilyen például az integrin-linked kinase (ILK) (Murányi *et al.*, 2002), zipper-interacting protein kinase (leucin cipzár motívummal kölcsönható protein kináz - ZIPK)

(MacDonald *et al.*, 2001; Niiro and Ikebe, 2001) proto onkogén Ser/Thr kináz (Raf-1) (Broustas *et al.*, 2002), myotonic dystrophy kinase (MDPK) (Murányi *et al.*, 2001), valamint a p21-aktivált protein kináz is (Hartshorne, Ito and Erdödi, 2004; Ito *et al.*, 2004; Grassie *et al.*, 2011).

A MYPT1 dupla mutánsával végzett kísérletek alapján arra is fény derült, hogy mind a Thr⁶⁹⁶, és a Thr⁸⁵³ is képes gátló hatást kifejteni *in vitro* körülmények között. (Murányi *et al.*, 2005). A ciklikus AMP (adenozin monofoszfát) és GMP (guanozin monofoszfát) aktivált protein kinázok (PKA és PKG) az előbb taglalt foszforilációs helyek előtt, pontosabban a Ser⁶⁹⁵ és Ser⁸⁵² oldalláncokat képesek foszforilálni. A Ser⁶⁹⁵-ös oldallánc foszforilációja ezen enzimek által képes volt meggátolni a ROK, és egyéb más protein kinázok általi gátlást (Wooldridge *et al.*, 2004). A foszforilációk hatásának felderítéséhez további kísérleteket végeztek a PKA és a ROK enzimekkel (Grassie *et al.*, 2012; Sutherland, MacDonald and Walsh, 2016). Ezek alapján a PKA általi Ser⁸⁵²-es foszforiláció meggátolja a mellette található Thr⁸⁵³-as oldalláncon bekövetkező foszforilációt. Érdekes módon a PKA képes mind a négy oldalláncot (Ser⁶⁹⁵, Thr⁶⁹⁶, Ser⁸⁵², Thr⁸⁵³) foszforilálni, de ennek a MYPT1 foszforilációs mintázatnak nincs gátló hatása (Grassie *et al.*, 2012; Sutherland, MacDonald and Walsh, 2016).

1.5.2. A PP1c/miozin foszfatáz szabályozása gátló kölcsönhatókkal

A PP1 enzimek felépítése kapcsán már említésre kerültek olyan kölcsönható partnerek, melyek targeting/specifitásért felelősek. Ebben a fejezetben pedig azokról az interakciós partnerekről lesz szó, melyek a MP holoenzim, vagy akár az önállóan előforduló PP1c katalitikus alegység gátlását okozzák, és maguk az emlős sejtek is előállítják ezeket a fehérjéket a MP vagy a PP1c finomhangolása érdekében.

1.5.3. PP1c gátlását okozó inhibitor fehérjék

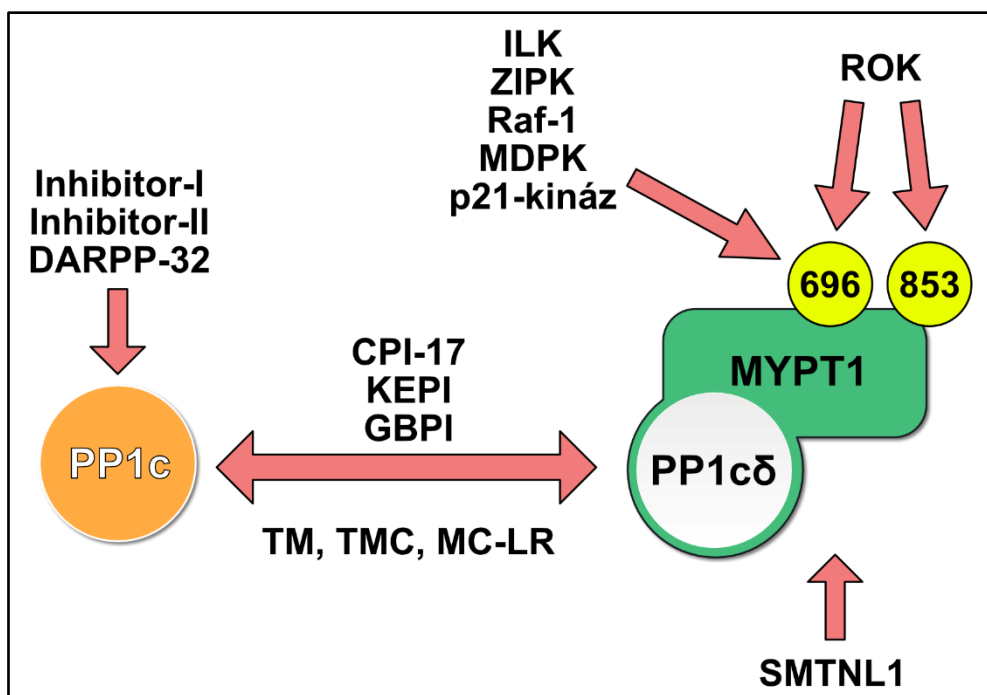
A gátlásért felelős fehérjék úgynevezett „első generációijába” tartozik az inhibitor-1 (I-1), inhibitor-2 (I-2), valamint a dopamine and cAMP regulated phosphoprotein of 32 kDa (32 kDa molekulatömegű dopamin és cAMP szabályozott foszfoprotein - DARPP-32), melyek a tisztított holoenzimek felé alacsonyabb gátló hatást mutattak (Eto, 2009). Emiatt a jelenség miatt ezért úgy vélik, hogy a PP1 holoenzimek először disszociálnak, mielőtt ezek az inhibitorok ki tudnák fejteni hatásukat (Cohen, 2002; Ceulemans and Bollen, 2004). Mind az I-1 és az I-2 a PPP1R14B génről íródik át (Lagercrantz *et al.*, 1996). Az alternatív iniciációs szekvencia erről a génről egy 203 hosszúságú (I-2) és egy 147 hosszúságú (I-1) polipeptid átíródását teszi lehetővé (Eto, Karginov and Brautigan, 1999). Míg az I-1 szinte minden

szövettypusban előfordul, addig az I-2 izomszövetben fordul elő (Eto, Karginov and Brautigan, 1999). Az I-1 esetében megfigyelték a foszforiláció hatását, mely növelte a gátló hatást, amennyiben a peptid a Thr⁵⁷-es oldalláncon foszforilálódik (Eto, Karginov and Brautigan, 1999). Az I-2 esetében azonban nincsen szükség foszforilációra a gátló hatás kialakulásához (Bollen *et al.*, 2010). További kis molekulatömegű PP1c inhibitor fehérje még a korábban említett DARPP-32, mely elsődlegesen az agyban expresszálódik, és az I-1-gyel mutat szekvencia homológiát (Williams *et al.*, 1986). A DARPP-32 esetében is megfigyelték, hogy foszforiláció hatására potensebb inhibitorrá válik, és már nanomólos koncentrációban is kifejti hatását a PP1c-vel szemben (Hemmings *et al.*, 1984).

1.5.4. A MP/PP1c gátlását okozó inhibitor fehérjék

Az egyik legismertebb MP-t és PP1c-t is gátló fehérje a CPI-17, mely a Thr³⁸-as oldalláncon foszforilálódva válik aktívvá (Eto *et al.*, 1997), és először sertés aortából származó DNS könyvtár szűrése során fedezték fel. A CPI-17 főleg simaizomzathoz köthető szövetekben (aorta, húgyhólyag) fejeződik ki, míg más izom, valamint nem izom eredetű szövetek alacsony expressziót mutattak mRNS szinten (Eto *et al.*, 1997). A potens gátló hatás kialakulásához elengedhetetlen Thr³⁸-as foszforiláció, melyhez PKC (protein kináz C) aktivitásra van szükség, bár több protein kináz is képes lehet foszforilálni a CPI-17-et ezen az oldalláncon (ROK, ZIPK) (Eto, 2009). A CPI-17 Thr³⁸-as oldallancát *in vitro* foszforiláló további enzimek: ILK (Deng *et al.*, 2002), PAK (p21 aktivált kináz) (Takizawa, Koga and Ikebe, 2002), PKA (Dubois *et al.*, 2003), PKG (Erdodi *et al.*, 2003), és a protein kináz N1 (Hamaguchi *et al.*, 2000). Bár a CPI-17 nem rendelkezik PP1c kötő motívummal, mégis képes a komplexben lévő miozin foszfatázt, valamint a szabadon előforduló PP1c katalitikus alegységet is nagy hatékonysággal gátolni.

Ugyan ebbe az inhibitor fehérje családba tartozik még a KEPI, valamint a GBPI (gasztrointesztinális- és agyspecifikus PP1 inhibitor - gastrointestinal-and brain specific PP1 inhibitor), mely rendelkezik RVxF motívummal, és a gátló foszforilációs szekvenciája hasonló a CPI-17-hez (Eto, 2009). Az előbb felsorolt fehérjék közül a KEPI is képes a komplexben lévő MP-ot és a szabadon lévő PP1c-t gátolni (Erdodi *et al.*, 2003), valamint kutatási eredmények arra is utalnak, hogy gátló hatását a miozin foszfatázra THP-1 és MCF-7 sejtekben is kifejti (Dedinszki, Kiss, *et al.*, 2015).



4. ábra. A PP1c és MP működését befolyásoló faktorok. Az inhibitor-1, 2, DARPP-32, a PP1c katalitikus alegységre specifikus, és hatékony inhibitor fehérjék. A CPI-17 és paralógjai a holoenzimet, és a szabad katalitikus alegységet is képesek gátolni. Kis molekulatömegű PP1c inhibitor molekulák: tautomycin (TM), tautomycin (TMC), mikrocisztin-LR (MC-LR). A MYPT1 alegység foszforilációján keresztül gátló hatást kifejtő protein kinázok (MDPK, p21 aktivált protein kináz, ZIPK, Raf-1, ILK. valamint ROK). A MP aktivitását gátló SMTNL1 fehérje, mely a holoenzimhez kötődve fejt ki hatását.

Liu és munkatársai azonosították a KEPI gátló fehérjét, morfiumra érzékeny agyi régiókból származó minták mRNS szűrései során. A KEPI az előzőekben említett CPI-17-tel mutat homológiát. A PKC-val való foszforiláció hatására ~600 szorosára nő a gátló hatása (Liu *et al.*, 2002). A GBPI a KEPI homológjaként lett leírva (Liu *et al.*, 2004). A PKC által foszforilált GBPI nagyfokú gátló hatással bír a PP1c-vel szemben, melyet a PKA-val való további foszforiláció azonban megszüntet. Ez a peptid rendelkezik továbbá egy KVHW (RVxF) motívummal az N-terminális oldalán, mely elengedhetetlen a szabadon lévő PP1c kötődéséhez (Liu *et al.*, 2004)

Érdekes még, hogy vannak olyan inhibitorok, melyek holoenzim specificitást mutatnak. *In vivo* például az inhibitor-3 és a CPI-17 olyan komplexeket gátolnak, ahol kifejezetten az SDS22 és MYPT1 a szabályozó alegységek a katalitikus alegységek mellett (Lesage *et al.*, 2007; Eto, 2009). A miozin foszfatazt szabályozó faktorokat a **(4. ábra)** foglalja össze.

A miozin foszfatázzal kapcsolatos kutatások feltártak még egy, a miozin foszfatázra nézve gátló hatást kifejtő fehérjét, mely főleg a simaizom összehúzódásban betöltött szerepe által kapott figyelmet. Ez a Smoothelin-szerű 1 fehérje (Smoothelin-like 1 protein - SMTNL1). A SMTNL1 a smoothelin szerű fehérjék családjába tartozik, a C-terminális végén egy calponin homológia (CH) doménnel (Borman, MacDonald and Haystead, 2004). A SMTNL1 szerepét elsőként az izommunkát követő adaptációs folyamatokban írták le sima, és harántcsíkolt izomszövetben (Wooldridge *et al.*, 2008). Sikertült továbbá a miozin foszfatáz gátló hatását is igazolni (Borman *et al.*, 2009; Lontay *et al.*, 2010).

1.6. Ingerület átvivő anyagok felszabadulása és szabályozása

1.6.1. Neurotranszmitterek felszabadulásának mechanizmusa

A biológiailag aktív anyagok (pl.: neurotranszmitterek, hormonok) szekréciója a szinaptikus terminálokból és endokrin sejtekből, számos élettani folyamatot szabályoznak. Így például a hasnyálmirigy β -sejtjei által termelt és szekretált inzulin kulcsfontosságú a glükóz megfelelő metabolizmusához, vagy az adrenális kromaffin sejtek és a szimpatikus ganglionokban található neuronok által felszabadított katekolaminok, melyek a pulzust és a vérnyomást szabályozzák (Gao *et al.*, 2016).

Az idegsejtek egymással, és más sejt típusokkal alapvetően kétféle módon képesek kommunikálni: kémiai hírvivő molekulák szekréciójával és felvételével, valamint sejtek közötti „gap junction” -nak nevezett struktúrákon keresztül. A klasszikus értelemben vett szinaptikus neurotranszmisszió, ahol neuromodulátorok (pl.: aminosavak: glutamát, aszpartát; monoaminok: dopamin, epinefrin stb.) szabadulnak fel és diffundálnak. A „gap junction” általi kommunikáció elektromos szinapszisokra jellemző. Majdnem az összes szinaptikus kommunikáció neurotranszmitterek révén zajlik, a gerincesek agyi régióiban az elektromos szinapszisok kifejezetten ritkák. A neuromodulátorok, és neuropeptidek felszabadulása nemcsak az idegsejtekben figyelhető meg. Számos endokrin sejt, illetve differenciált sejt, mint például az adipociták is szekretálnak neuropeptideket, valamint több, nem idegi eredetű sejt is kiválaszt diffúzibilis neurotranszmittet, például nitrogén monoxidot (Südhof, 2008).

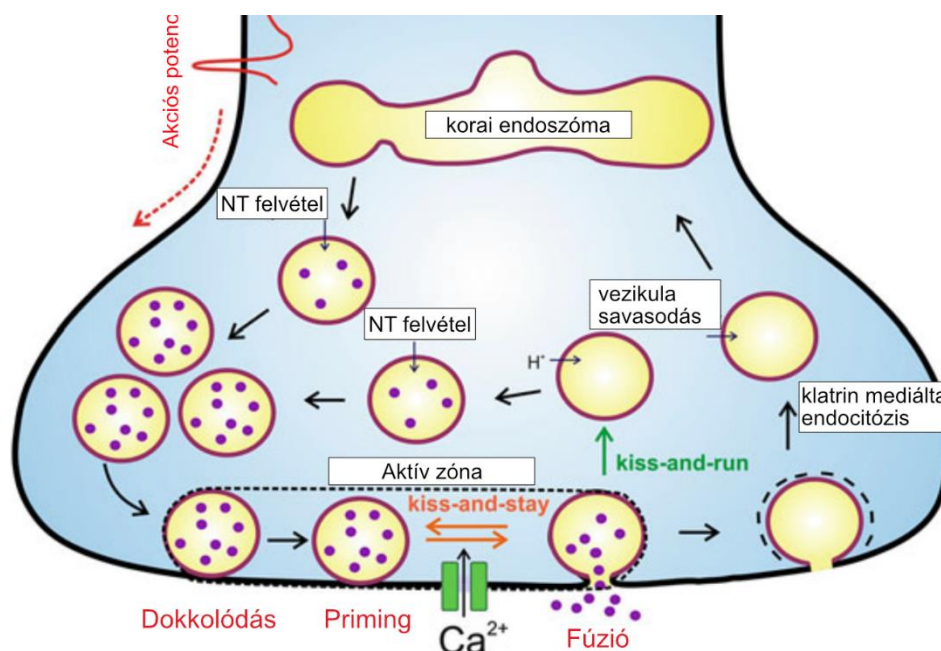
Az idegsejtek főként kémiai szinapszisok segítségével kommunikálnak egymással. Ebben a folyamatban a preszinaptikus régiókban vezikulákba csomagolt neurotranszmitterek játszanak fontos szerepet, melyek felszabadulásához az idegsejtben kialakuló, és annak axonján végig haladó akciós potenciálra van szükség. Ez a folyamat végül Ca^{2+} beáramlást indukál, mely megindítja az exocitózist. Az exocitózis által felszabadult neurotranszmitterek a

posztszinaptikus idegsejten található receptorokon keresztül depolarizációt váltanak ki. A vezikulumok a preszinaptikus terminálban „aktív zónának” nevezett régióban horgonyzódnak ki (Südhof, 2013; Rizo, 2018).

A neurotranszmittereket szállító vezikulumok egyrészt a preszinaptikus sejtmembránból hasznosulhatnak újra, vagy a korai endoszómából válhatnak le. Feltöltődésük ingerületátvivő anyagokkal ATP felhasználásából származó energiát igényel. A folyamat végén a vezikulumok az aktív zóna közelébe szállítódnak, majd kapcsolódnak a preszinaptikus membránhoz. Ezt a lépést dokkolódásnak nevezzük. Az exocitózis megindulása előtt még egy lépés van, mely előkészíti a vezikulumokat a sejtmembránnal való összeolvadásra, ezt vezikula „priming” -nak hívjuk. Ezek után Ca^{2+} ionok áramlanak a sejten belüli térbe, mely elindítja a vezikulumok tartalmának kiáramlását, a fúziós pórus megnyílásán keresztül. Exocitózist követően a vezikulumok újra alakulnak/hasznosulnak, feltöltődésük többféle módon is történhet:

- A) a preszinaptikus sejtmembránhoz horgonyzódva („kiss and stay”)
- B) klatrin nélküli gyors újra hasznosulás/keringés („kiss and run”)
- C) klatrin-tól függő endocitózis, majd a korai endoszómába való beolvadás után töltődnek fel neurotranszmitterekkel (Südhof, 2014).

A neurotranszmitterek felszabadulását, valamint a szinaptikus vezikulumok újratermelődését az **(5. ábra)** részletezi.



5. ábra. A szinaptikus régióban lejátszódó folyamatok: vezikulumok feltöltődése, ingerület átvívó anyagok felszabadulása, vezikulumok újra hasznosulása. NT: neurotranszmitter. Módosított ábra, forrás: (Pasquarelli, Picollo and Carabelli, 2018).

1.6.2. A SNARE (oldható N-etilmaleimid-érzékeny faktor) -asszociált protein receptor (SNAP REceptor) komplex

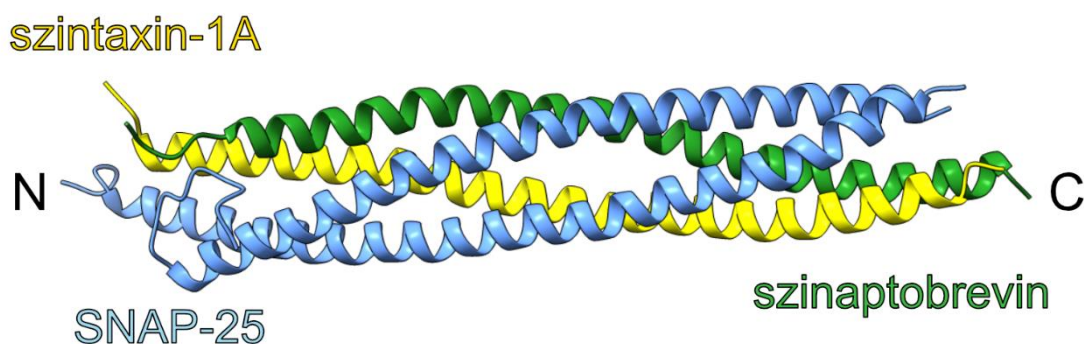
Az exocitózisban három preszinaptikus fehérje által összeépülő komplex játszik kulcs szerepet. A SNARE komplexet felépítő fehérjékre jellemző egy körülbelül 65 aminosavból álló SNARE motívum, melynek jellegzetessége, hogy egy úgynevezett „coiled-coil” szerkezetet képesek felvenni. Az idegi SNARE fehérjék a szintaxin-1, SNAP-25 (25 kDa molekulatömegű szinaptoszóma-asszociált protein), valamint a szinaptobrevin-2. Mind a szintaxin, mind a szinaptobrevin egy SNARE motívummal rendelkezik, mely a fehérjék transzmembrán régiója (TMR) előtt található. A szintaxin a sejtmembránhoz asszociálódik, míg a szinaptobrevin a vezikula membránban helyezkedik el (Rizo, 2018).

A SNARE komplex elemei mind emlős, mind pedig élesztő sejtekben körülbelül 60 tagot számláló család tagjai közé tartoznak, melyek képesek kölcsönhatásba lépni az oldható NSF-kötő fehérjékkel (SNAP proteins - Soluble NSF Attachment Proteins, a betűszo által jelzett fehérjék nem állnak kapcsolatban a SNAP-25-el) (Han, Pluhackova and Böckmann, 2017).

A SNAP-25 két SNARE motívummal rendelkezik, valamint palmitoiláció révén a plazmamembránhoz is horgonyzódik. A három SNARE fehérjéből egy szoros, meglehetősen

stabil SNARE komplex épül fel (Söller, Bennett, *et al.*, 1993), mely négy parallel lefutású hélixből áll (Poirier *et al.*, 1998; Sutton *et al.*, 1998; Han, Pluhackova and Böckmann, 2017), és a két membránrészt (vezikula és plazmamembrán) közel hozza egymáshoz (Hanson *et al.*, 1997), mely elengedhetetlen a membránok fúziójához. A szinaptobrevinre gyakran v-SNARE-ként is hivatkoznak a vezikulákhoz való asszociációja miatt, míg a szintaxin-1 és SNAP-25 fehérjéket t-SNARE (target – célpont membránrészen helyezkedik el) elemként említik (Söller, Whiteheart, *et al.*, 1993). A három fehérje térbeli elhelyezkedése a (6. ábra)-n látható.

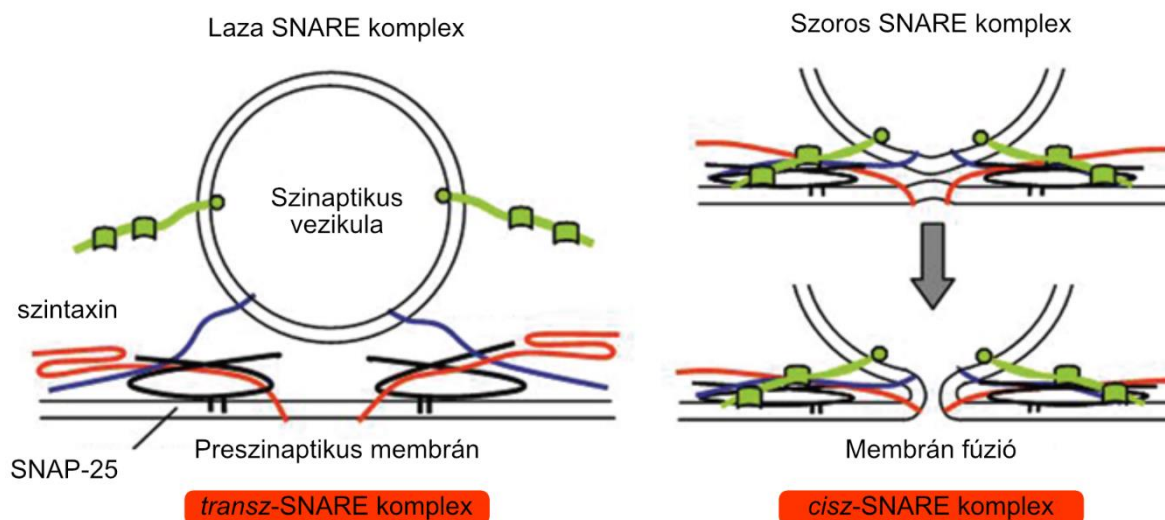
A fúziós lépés előtt a két membrán között felépült komplexet *transz*-SNARE komplexnek hívjuk. Azokat a komplexeket, melyek a membránfúzió után ugyanazon membrán részen helyezkednek el *cisz*-SNARE komplexnek nevezzük.



6. ábra. A SNARE komplex coiled-coiled szerkezetének térbeli elrendeződése. Forrás: (Brewer *et al.*, 2015) PDB ID:2NIT A 3D modell vizualizációja a ChimeraX szoftver segítségével készült (Pettersen *et al.*, 2021).

A felszabadulásra kész vezikulák létrejövetele, azaz a „priming” folyamatában kulcsfontosságú a *transz*-SNARE komplexek N-terminális oldalának a részleges összefűződése (Sørensen *et al.*, 2006). Úgy vélik, hogy olyan vezikulumok esetében melyek morfológiailag már dokkolt állapotban vannak (nagyon kicsi a távolság az aktív zóna és a vezikula között <5 nm) a *transz*-SNARE komplexek részlegesen már össze vannak fűződve (Hammarlund *et al.*, 2007; Imig *et al.*, 2014).

Miután SNARE komplexet felépítő három fehérje térben közel kerül egymáshoz, megkezdődik az összekapcsolódásuk az N-terminális rész felől a C-terminális régió felé. A SNARE komplex működését a (7. ábra) szemlélteti. A preszinaptikus sejtmembrán és vezikulum ebben a szakaszban még nem alkotnak egy egyéget, de az összeolvadásuk ezzel megkezdődik a SNARE komplex szorosabbra fűződése révén (Stein *et al.*, 2009).



7. ábra. A SNARE komplex működés közben. Módosított ábra, forrás: (Snyder, Kelly and Woodbury, 2006).

A fúzió miatt a két lipid réteg elkezd egyesülni, és egy úgynevezett hemi-diafragma keletkezik. A teljes összeolvadást követően kialakult póruson keresztül a neurotranszmitterek már ürülni képesek. Ebben az állapotban a SNARE-komplex teljesen összeépült és összehúzódott, *cisz*-SNARE komplex alakul ki, a húzóerő végül megszűnik. A folyamat energiaigényét tekintve a jelenleg leginkább elfogadott elmélet, hogy a SNARE komplex összeépülésekor felszabaduló energia fedezi az összehúzódáshoz szükséges energiát is, külön ATP-re a membránfúzióhoz nincs szükség. (Hanson *et al.*, 1997; Lu, Zhang and Shin, 2008; Stein *et al.*, 2009; Han, Pluhackova and Böckmann, 2017).

A teljes összehúzást követően a plazmamembrán mellett elhelyezkedő *cisz*-SNARE komplexek stabil szerkezetűek. Szétszerelésükhöz és újra hasznosulásukhoz az NSF-re valamint az NSF általi ATP hidrolíziséből származó energiára, és különböző adapterként funkcionáló SNAP-ek segítségével van szükség (pl.: Sec18 és Sec17 élesztő esetén) (Söllner, Bennett, *et al.*, 1993; Banerjee *et al.*, 1996; Mayer, Wickner and Haas, 1996). Az NSF rendelkezik SNAP kötődést lehetővé tévő doménnel, melyet adapterként használva képes a SNARE komplexhez kapcsolódni, valamint az ATP-ből származó energia révén disszociáltatni azt (Nagiec, Bernstein and Whiteheart, 1995; Südhof, 2014).

1.6.3. A SNAP-25 foszforiláció általi szabályozása

Az ingerületátvivő anyagok felszabadulása főként az extracelluláris térből beáramló kalciumionoktól függő folyamat, és bár ez a kulcs szabályozó mozzanat, egyetlen Ca^{2+}

beáramlás azonban nem feltétlenül eredményezi az összes vezikula ürülését. Ennek fényében úgy tűnik, hogy még egy szabályozási szint is létezik, azaz exocitózis előtt már egy kész vezikula állomány („readily releasable pool of vesicles”) áll rendelkezésre (Tian, Das and Sheng, 2003; Snyder, Kelly and Woodbury, 2006).

A fehérje foszforiláció egy kulcs mechanizmus az exocitózis finomhangolásában. A szekréciós útvonalakat felépítő fehérjék számos tagja foszforilálódik valamilyen protein kináz által, például PKA (Risinger and Bennett, 1999; Nagy *et al.*, 2004), kazein kináz II (Foletti *et al.*, 2000; Dubois *et al.*, 2002), PKC (Fujita *et al.*, 1996, p. 18; Shimazaki *et al.*, 1996; Nagy *et al.*, 2002), vagy Ca^{2+} és kalmodulin függő protein kináz-II (Davletov *et al.*, 1993; Hilfiker *et al.*, 1999). Az exocitózishoz szükséges apparátus tagjai közül a továbbiakban a SNAP-25-tel kapcsolatos foszforiláció általi szabályozási lehetőségeket részletezem.

A SNAP-25 fehérjén több aminosav is foszforilálódhat, melyek felderítésével, a foszforilációkat katalizáló protein kinázok azonosításával, illetve a foszforilációt kísérő élettani változások leírásával több munkacsoport is foglalkozott. Az idő előrehaladtával számos foszforilációs helyet és több élettani szerepet sikerült azonosítani. Az élettani hatásokat tekintve azonban vannak ellentmondások az irodalomban, ezért a SNAP-25 foszforilációjával kapcsolatos információkat a kutatások időrendbeli rendezésével foglalom össze.

Elsőként PC12 sejtes modellben azonosították a PKC szerepét, mely a SNAP-25 Ser¹⁸⁷-es oldalláncát foszforilálja. *In vitro* immunprecipitációs kísérletekben a PKC hatására megnövekedett Ser¹⁸⁷-es SNAP-25 foszforiláció csökkentette a szintaxinnal való kölcsönhatását, majd PC12 sejteket PKC agonistával PMA (forbol-12-mirisztát-13-acetát) stimulálva fokozódott a sejtek noradrenalin szekréciója. Ezek alapján a kutatók úgy vélték, hogy ez a folyamat a SNARE-komplex lebomlásának és újjáalakulásának sebességétől függ, így ebben a folyamatban a PKC a SNARE komplex lebomlását segítheti elő (Shimazaki *et al.*, 1996).

Egy ezt követő tanulmányban izoelektromos fókuszálást használva mutatták ki, hogy a SNAP-25-öt a PKC potenciálisan három oldalláncon is képes lehet foszforilálni: Ser²⁸, Ser¹⁸⁷, valamint Thr²⁹ (Genoud *et al.*, 1999). Ezt követően Risinger és munkatársai PKA-val végzett kísérletei azt bizonyították, hogy a Thr¹³⁸-as oldalláncot a PKA foszforilálja, és úgy vélték, hogy ez a foszforiláció nem játszik szerepet a SNARE komplex kialakulásában. (Risinger and Bennett, 1999). Ez a foszforilációs hely minden izoformában konzervált, kivéve a SNAP-23B-t, mely nem idegi eredetű sejtekben fordul elő. Eredményeikből arra a következtetésre jutottak, hogy ez a foszforiláció nem befolyásolja a SNAP-25 és a szintaxin kötődését. Érdekes módon

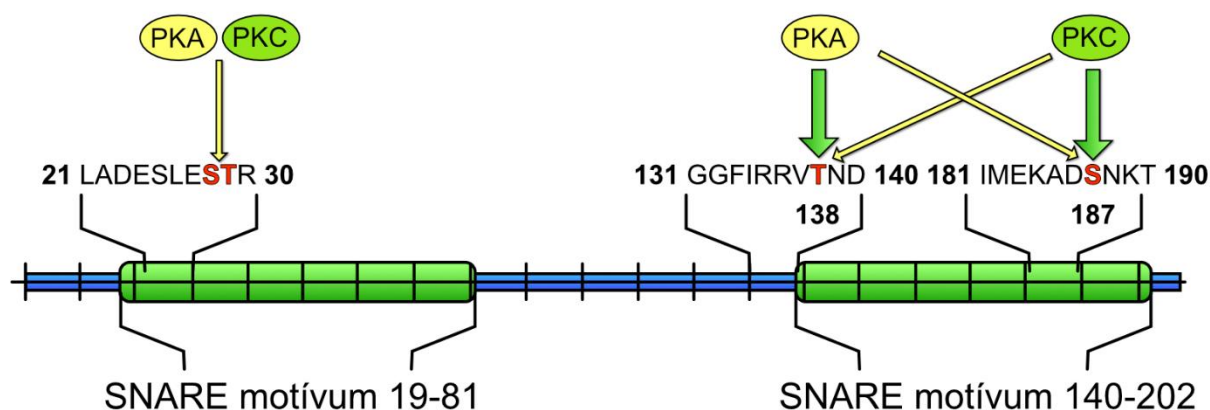
Risinger és munkacsoportja (Risinger and Bennett, 1999) nem figyelte meg a Ser¹⁸⁷-es foszforilációt, melyet Shimazaki és munkatársai korábban írtak le (Shimazaki *et al.*, 1996). Erre potenciális magyarázat lehet, hogy a Risinger és munkatársai által használt rekombináns fehérje nem rendelkezett a natív fehérjére jellemző palmitoilációval, valamint a bakteriális expresszió miatt a fehérje feltekeredése sem biztos, hogy megfelelő volt (Snyder, Kelly and Woodbury, 2006).

Ezeket követően további kutatásokat végeztek, melyekben a SNAP-25 PKC általi foszforilációja megváltoztatta a SNAP-25 lokalizációját. A megemelkedett foszforilációs szint hatására a SNAP-25 citoszolból a membránhoz való migrációját figyelték meg (Kataoka *et al.*, 2000; Takahashi, Itakura and Kataoka, 2003). Nagy és munkatársai *in vivo* kromaffin sejteken végzett kísérletekben a PMA-val való PKC indukálása során a Ser¹⁸⁷-es oldallánc emelkedett foszforilációját, valamint a már korábban is tapasztalt emelkedett szekréciót figyelték meg. Elméletük szerint a foszforiláció csökkenti a szintaxin SNAP-25 közötti kölcsönhatást, ezért azok a komplexek, melyek két szintaxin és egy SNAP25-ből állnak felbomlanak, mintegy előkészítve a negyedleges szerkezet kialakulását a v-SNARE-el (Nagy *et al.*, 2002). További kísérleteket végezve a foszforilációt mimikáló SNAP-25 Ser¹⁸⁷ -> Asp¹⁸⁷ mutáns az első exocitózis után növelte, míg a foszforilációs hely nélküli Ser¹⁸⁷ -> Ala¹⁸⁷ mutáció csökkentette a második catekolamin felszabadulás mértékét. A jelenség magyarázata az lehet, hogy a Ser¹⁸⁷-es foszforiláció növeli az exocitózisra kész vezikulák összegyűlését (Nagy *et al.*, 2002).

További eredmények is arra utalnak, hogy a Ser¹⁸⁷-es foszforiláció a vezikulák összegyűjtésében/toborzásában („vesicle recruitment”) tölthet be szerepet. PMA kezelés során PC12 sejtekben a vezikulák a plazmamembránhoz közeli régióba migráltak, valamint ezzel egyidőben a SNAP25 Ser¹⁸⁷-es foszforilációs szintje is emelkedést mutatott (Shoji-Kasai *et al.*, 2002). Nagy és munkatársai további kísérletek során a PKA-t aktiválva a kromaffin sejtek magasabb szintű catekolamint kiválasztását figyelték meg, mely a SNAP-25 Thr¹³⁸ -> Ala¹³⁸ mutáció esetén visszaesést mutatott. Ezen eredmények alapján úgy vélik, hogy a Thr¹³⁸-as foszforiláció exocitózisra kész vezikula pool („slowly releasable pool”, és „readily releasable pool”) méretét képes befolyásolni (Nagy *et al.*, 2004).

A SNAP-25-tel kapcsolatos további kutatások során COS7 sejteket forskolinnal (PKA agonista) kezelve az expresszálandó SNAP-25 Ser²⁸, Thr²⁹, Thr¹³⁸ és Ser¹⁸⁷-es oldalláncok nagyjából hasonló szinten foszforilálódtak. *In vitro* PKA kináz reakcióban is szintén ezek az oldalláncok foszforilálódtak (Gao *et al.*, 2012).

Tisztított rekombináns fehérjét vizsgálva a Thr¹³⁸ (PKA) gátolta, míg a Ser¹⁸⁷ (PKC) serkentette a SNARE komplex kialakulását. (Gao *et al.*, 2016).



8. ábra. A SNAP-25 fehérje foszforilációs térképe. A PKA és PKC enzimekkel végzett kísérletek alapján mindkét enzim képes a négy azonosított oldalláncot foszforilálni. A két enzimnek azonban más a preferált foszforilációs helye, ezt a zöld nyilak jelzik. Az adott protein kináz által kevésbé preferált foszforilációs helyet a sárga nyíl jelöli. Módosított ábra, forrás: (Snyder, Kelly and Woodbury, 2006).

A SNAP-25 foszforilációit a **(8. ábra)** foglalja össze. Ezek közül a Thr¹³⁸ és a Ser¹⁸⁷-es oldalláncok esetében figyeltek meg exocitózist befolyásoló hatásokat. Összefoglalva: a Thr¹³⁸ foszforiláció esetében az exocitózisra kész vezikula pool („slowly releasable pool”, és „readily releasable pool”) növekedése figyelhető meg, ezért ennek a foszforilációnak valószínűleg a vezikula priming folyamatában lehet szerepe (Nagy *et al.*, 2004). Fontos azonban azt is megjegyezni, hogy bizonyos kísérleti rendszerekben a Thr¹³⁸-as foszforiláció inkább gátló hatást fejtett ki a SNARE komplex összeépülésében (Gao *et al.*, 2016). A SNAP-25 Ser¹⁸⁷-es foszforilációjával kapcsolatban pedig a vezikulák összegyűlésével („vesicle recruitment”) kapcsolatban figyeltek meg változásokat (Nagy *et al.*, 2002; Shoji-Kasai *et al.*, 2002).

Az előző bekezdésekben képet kaptunk a SNAP-25-öt foszforiláló protein kinázokról, viszont ezeknek a reverzibilitásáért felelős protein foszfatázokról mindezidáig igen kevés információval rendelkezünk. *In vitro* rekombináns fehérjéken végzett kísérletek eredményei alapján a SNAP-25 defoszforilációjáért főként PP1 enzimek felelősek, és az előzőleg említett négy (Ser²⁸, Thr²⁹, Thr¹³⁸, és Ser¹⁸⁷) oldallánc mindegyikéről képesek eltávolítani a foszfát csoportot. PP2A esetében figyeltek meg Thr¹³⁸ és Ser¹⁸⁷ felé preferenciát, melyet tovább erősít az a tény, hogy a PKC általi foszforilációt követően a PP2A (mely a Ser²⁸, Thr²⁹ oldalláncokat

nem képes defoszforilálni) nagyobb aktivitást mutatott. A PP2B-vel végzett kísérletek alapján ez az enzim nem játszik szerepet a SNAP-25 defoszforilációjában (Gao *et al.*, 2012).

Iida és munkatársai szinaptoszómákon és protein foszfatáz gátlószerekkel végzett kísérletei ellentmondásosak az előzőekben említettekkel: a PP2A szelektív gátlója az okadánsav megakadályozta a SNAP-25 defoszforilációját, a PP1-re szelektív tautomycin viszont nem volt képes ezt a hatást kifejezteni PKC aktivációt követően (Iida *et al.*, 2013).

Ezek alapján úgy tűnik, hogy a Thr¹³⁸-at preferenciálisan PP1, addig a Ser¹⁸⁷-et a PP2A protein foszfatáz defoszforilálja, azonban a konkrét holoenzimek azonosítására még nem került sor.

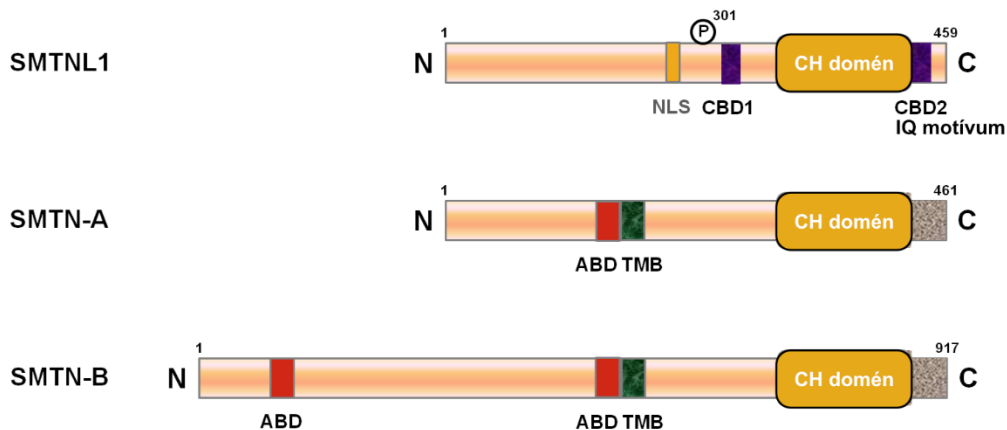
1.7. Smoothelin-like 1 fehérje (SMTNL1)

1.7.1. A smoothelin fehérjék, és a SMTNL1 szerkezete

A SMTNL1 fehérjét azonosításakor a Calponin Homology-Associated with Smooth Muscle (CHASM) néven publikálták, és elsőként nyúl ileum simaizomzatból izolálták, mint a cGMP aktivált protein kináz (PKG) szubsztrátját (Borman, MacDonald and Haystead, 2004). A smoothelin fehérjék családjába tartozik, melynek két további tagja van: Smoothelin A (SMTN-A) és a smoothelin B (SMTN-B), melyek egy *smtn* génről íródnak át (Van Eys *et al.*, 1997; Rensen *et al.*, 2002). A SMTNL1 viszont egy ettől eltérő, egyedi génről íródik át (Ulke-Lemée *et al.*, 2011). A viscerális simaizomban az SMTN-A, egy 59 kDa molekulatömegű izoforma expresszálódik (Van Der Loop *et al.*, 1997), míg a 100 kDa molekulatömegű SMTN-B vaszkuláris simaizomban fordul elő (Wehrens *et al.*, 1997; Krämer *et al.*, 1999). A smoothelineket gyakran használják a differenciálódott simaizomzat indikátoraként (Van Der Loop *et al.*, 1997). Az SMTN család három tagja szekvencia homológiát mutat, főleg a C-terminális végükön, mely tartalmaz egy 2-es típusú kalponin homológia (CH) domént (Ishida *et al.*, 2008), mely a simaizomban előforduló kalponinra hasonlít, és magas affinitást mutat a citoskeletális aktin felé (Horowitz *et al.*, 1996). A SMTNL1 expresszióját tekintve előfordul a vaszkuláris simaizomban és a harántcsíkolt izomzatban is (Wooldridge *et al.*, 2008). Bár a SMTNL1 is tartalmaz egy CH domént, ennek révén nem képes filamentális aktint kötni, melyet ko-szedimentációs kísérletek során bizonyítottak (Borman, MacDonald and Haystead, 2004). A CH doménon kívül a smoothelinek további aktin kötő doméneket is tartalmaznak (SMTN-B: kettő, SMTN-A: egy), valamint mindkettő rendelkezik tropomiozin kötő doménnel (Quensel *et al.*, 2002). Érdekes módon a SMTNL1 is képes a tropomiozint kötni, és ennek az interakciónak köszönhetően a SMTNL1 a vékony filamentumokhoz (kontraktilis filament, mely aktinból,

tropomiozinból és troponinból áll) lokalizálódik. Ez az interakció a CH domén és a rendezetlen N-terminális régió keresztül valósul meg (MacDonald *et al.*, 2012).

Az SMTNL1 képes továbbá kalm modulinnal (CaM) is kölcsönhatásba lépni egy IQ motívumon keresztül (IQxxxRGxxxR konszenzus szekvencia), mely a CH domén N-terminális oldalán található (apo-CaM- kötő rész vagy másnéven CBD2), valamint egy másik CaM kötő régió révén a Ca^{+2} -CaM kötő domén segítségével (CBD1) (Ishida *et al.*, 2008; Ulke-Lemée *et al.*, 2014). A CBD1 a kalciumot is kötő kalm modulinnal szemben mutat nagyobb affinitást, míg a CBD2 a kalcium mentes (apo-) CaM-al alakít ki kölcsönhatást (Ulke-Lemée *et al.*, 2014). Jelenlegi ismereteink alapján a SMTNL1 egyetlen foszforilációs hellyel rendelkezik a Ser³⁰¹-el, melyet a PKA és a PKG protein kinázok foszforilálnak (Borman, MacDonald and Haystead, 2004), és kulcs szerepet játszik a SMTNL1 funkciójában. Az SMTN családba tartozó fehérjék sematikus felépítését a **(9. ábra)** foglalja össze.



9. ábra. A SMTN családba tartozó fehérjék sematikus felépítése. CH domén: calponin homológia domén; ABD, aktin kötő domén; TMB; tropomiozin kötő domén; CBD1, Ca^{+2} -CaM kötő régió; CBD2, apo-CaM kötő régió IQ motívummal; NLS, nukleáris lokalizációs szignál. Módosított ábra, forrás: (Turner and Macdonald, 2014).

1.7.2. A SMTNL1 molekuláris funkciója

A SMTNL1 funkcionális jellemzésére egér knock out (KO) törzset tenyésztettek, és az izommunka során fellépő adaptációs folyamatokat vizsgálták. A SMTNL1 KO egerek az állóképiséget mérő tesztek során jobban teljesítettek a vad típusú társaikhoz képest, amelyet az izommunkára adaptálódott fenotípus kialakulása eredményezett. Maga az izommunka is csökkentette a SMTNL1 szintjét, kifejezetten nőstény egerekben mind a sima, mint a harántcsíkolt izomzatban. A SMTNL1 expressziója eltérő a különböző simaizom típusokban,

valamint nemenként is expressziós különbségeket mutat. SMTNL1 deléció vagy Ser³⁰¹ foszforiláció esetén relaxáltabb simaizom fenotípust írtak le, amely megnövekedett miozin foszfatáz aktivitásra utal (Wooldridge *et al.*, 2008). A SMTNL1 fehérjét a Ca²⁺ deszenzitizációs (ciklikus nukleotid indukált relaxáció) folyamatokban betöltött szerepe alapján is jellemezték permeabilizált nyúl ileum simaizomzaton végzett kísérletek segítségével. Ezek során a SMTNL1 Ser³⁰¹-es foszforilációját indukálták PKG aktiváció révén (Borman, MacDonald and Haystead, 2004). *In situ* kísérletekben MLC20 szubsztrátot használva kimutatták a teljes hosszúságú foszforilálatlan SMTNL1 gátló hatását a miozin foszfatázzal szemben, míg a MLCK (miozin könnyű lánc kináz) aktivitását nem befolyásolta. A gátlás CH domén függő, a CH domén deléciós mutánsokkal végzett kísérletek során nem tapasztalták a miozin foszfatáz csökkent aktivitását (Borman *et al.*, 2009). Simaizom sejteket tekintve tehát a következő modell állt elő a SMTNL1 és a miozin foszfatáz kölcsönhatása kapcsán (Lontay *et al.*, 2010): A nem foszforilált SMTNL1 a MYPT1-hez kötődve gátolja a miozin foszfatáz aktivitását, ennek következtében a MLC20 defoszforilációját.

Bár a SMTNL1 fehérjével kapcsolatos első vizsgálatok során annak összhúzóelemekre kifejtett hatására fókuszáltak, a SMTNL1 szteroidhormon függő szövetekben, mint az endometrium és a myometrium, is expresszálódik (Lontay *et al.*, 2010). A terhesség alatti adaptációs folyamatok nagyban függenek a sejtek/szövetek szteroid hormonokra adott válaszaitól. A SMTNL1 és a progeszteron receptor (PR) kölcsönhatását korábbi kutatások során sikerült bizonyítani mind *in vivo* és *in vitro* (Bodoor *et al.*, 2011). Terhesség, valamint indukált álderhesség alatt a vaszkuláris és a miometriális simaizom emelkedett SMTNL1 expresszót mutatott (Lontay *et al.*, 2010), míg progeszteron receptor esetében megnövekedett expressziót sikerült kimutatni mind a reproduktív, mind a nem reproduktív egér szövetekben SMTNL1 deléciója esetén (Bodoor *et al.*, 2011). A PR szabályozásában közvetlen kapcsolatot is sikerült kimutatni, mivel a SMTNL1 RNS interferenciás gátlása emelkedett PR szintet eredményezett, valamint a génexpressziós vizsgálatok annak ko-regulátor szerepét feltételezték az SMTNL1 esetében, szabályozva ezzel a PR expresszióját (Bodoor *et al.*, 2011). A SMTNL1 PKA és PKG általi foszforilációt követően a Ser³⁰¹ aminosavmaradékán a sejtmagba transzlokálódik (Lontay *et al.*, 2010), majd a progeszteron-B (PR-B) alegységhez kötődve gátolja annak transzkripció aktivitását, mely a MYPT1 expresszióját is szabályozza (Bodoor *et al.*, 2011).

Terhesség során a fiziológiai adaptációk női nemi hormonok, az ösztrogén és a progeszteron hatására jönnek létre. A vázizomzat metabolikus tulajdonságának megváltozásával elkezdődik a terhességre való felkészülés, amely azonban akár inzulin

rezisztenciához is vezethet (terhességi diabétesz - GDM). A SMTNL1 fehérjével végzett további kutatások fényt derítettek arra, hogy a terhesség, és a SMTNL1 deléciója a vázizomzatban glikolitikusabb fenotípust eredményez. Már maga a terhesség is képes volt a vázizomzat fenotípusát oxidatívból a glikolitikusabb irányba tolni. Ezt a folyamatot a SMTNL1 és a progeszteron kölcsönhatása is szabályozza, amely megváltoztatta a kontraktilis, és metabolikus fehérjék expresszióját. Az *smtnl1*^{-/-} KO egerek esetében alacsonyabb metabolikus hatékonyságot, és csökkent glükóz toleranciát figyeltek meg. A terhesség esetén fordított hatást figyeltek meg a SMTNL1 deléciója során, ebben az esetben nőtt a metabolikus aktivitás és a glükóz tolerancia. Ezen eredmények alapján úgy tűnik, hogy a SMTNL1-nek szerepe van a szteroid hormonok által közvetített rosttípus váltásban a terhesség során (Lontay *et al.*, 2015). A felsorolt előzetes eredmények alapján elképzelhető, hogy a SMTNL1 képes lehet a vázizom sejtek inzulin érzékenységét befolyásolni a progeszteron receptoron keresztül kifejtett hatása révén.

1.8. Az inzulin jelátviteli pálya

1.8.1. Az inzulin hormon és fiziológiai hatása

Az inzulin egy igen széleskörűen tanulmányozott polipeptid hormon (Taylor, 1991), melyet a hasnyálmirigy β sejtjei állítanak elő tápanyagbevitel következtében. A vérbe kerülve számos anyagcsere folyamatot, többek közt a glükóz homeosztázisát is befolyásolja, a keringő glükóz felszívódásának serkentése által, főként az izomszövetekbe, kisebb mértékben a máj, és zsírszövetekbe (Lee and Pilch, 1994). Hatását specifikus receptorhoz való kötődés révén fejti ki, magát az inzulin receptort 1971-ben sikerült karakterizálni. Ezen receptor felépítését tekintve heterotetramer, mely 2α és 2β glikoprotein alegység összekapcsolódásából épül fel diszulfidhidak segítségével, és a sejtmembránban találhatóak (Kido, Nakae and Accili, 2001). Maga a hormon az extracellulárisan található α alegységhez kötődve konformációs változást indukál, melynek révén a β alegység ATP-t köt (Lee and Pilch, 1994). Az ATP kötődése a β alegység tirozin kináz aktivitását fokozza, és ennek a tirozin kináz aktivitásnak köszönhetően további intracelluláris szubsztrátok tirozin oldalláncai foszforilálódnak. Ezeket inzulin reszponzív szubsztrátoknak (Insulin responsive substrates - IRS) nevezzük. Az IRS fehérjék további intracelluláris szignalizációs molekulákhoz kötődve képesek az inzulin által kiváltott jeleket továbbítani (Kido, Nakae and Accili, 2001).

Jelenleg négy különböző IRS fehérjéről vannak információink. Az IRS1 és IRS2 közel azonos szöveti expressziót mutat. Az IRS1-et mind az inzulin receptor, mind az inzulin like

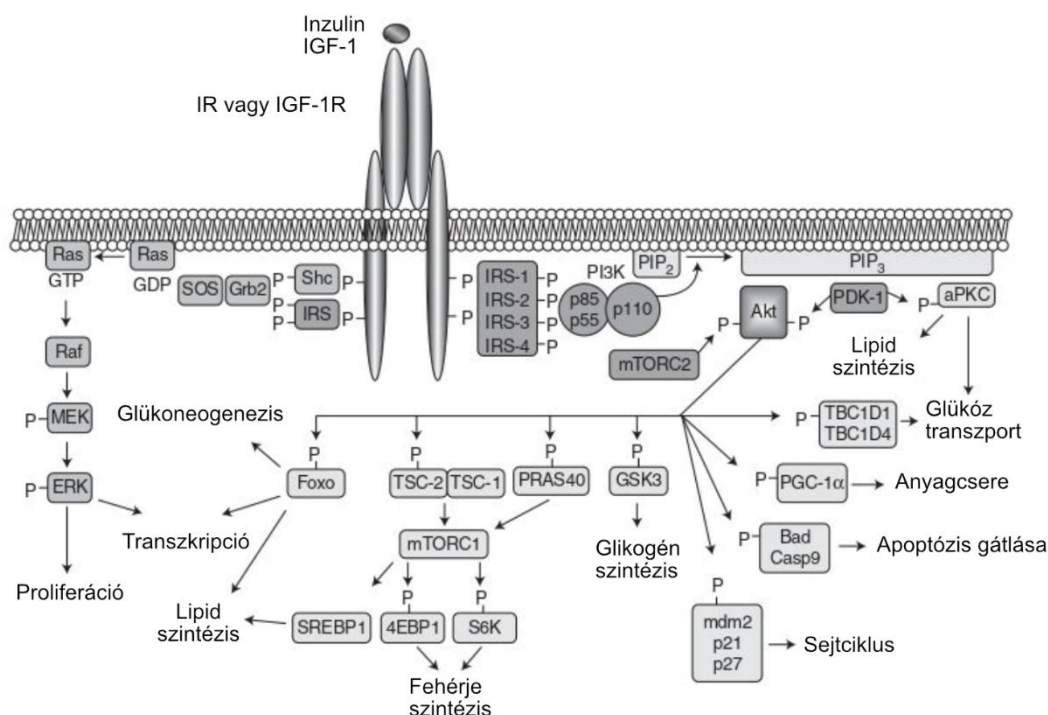
growth factor 1 receptor (IGF-1R) foszforilálja. Ezek a folyamatok a fentebb említett módon közvetítik az inzulin általi növekedési jelet a sejten belülre, és kötik össze a glükóz érzékelést, valamint az inzulin szekréciót az IRS1-gyel, mely a legfőbb IRS forma a vázizomzatban. Az eddigi kutatások alapján az IRS2 inkább májban expresszálódik, és a hasnyálmirigy β sejtjeinek, valamint a májsejtek növekedését segíti elő (Kido, Nakae and Accili, 2001). Az IRS3 és az IRS4 kevésbé jellemzett fehérje. Az IRS3 csak zsírszövetben, a hasnyálmirigy β sejtjeiben és a májban fordul elő, míg az IRS4 az agyban, a tímuszban (csecsemőmirigyben), illetve a vesében fejeződik ki (Withers and White, 2000; Burks and White, 2001).

A tirozin oldalláncon foszforilált IRS fehérjék specifikus src-homológia-2 domén (SH2) fehérjékhez kötődnek úgy, mint a foszfatidil-inozitol-3 kináz (PI3K) vagy a foszfortirozin foszfatáz SHPTP2 (Syp) enzimek. Az IRS-hez kapcsolódhatnak továbbá más, enzimaktivitás nélküli fehérjék is, melyek az IRS-t számos sejten belüli folyamattal kötik össze. Ilyen például az adapter fehérje Grb2-vel való kölcsönhatás, mely aktiválja a ras (patkány szarkóma vírus) útvonalat, ezáltal kialakítva az inzulin sejtnövekedésben betöltött szerepét (Kido, Nakae and Accili, 2001; Wilcox, 2005).

A hormon kötődés és az IRS1 aktiválódása után a PI3K a sejtmembránban található foszfatidil inozitol-4,5 biszfoszfát (PIP₂) -ből foszfatidil inozitol-3,4,5 (PIP₃) trifoszfátot állít elő. A PIP₃ a protein kináz B/Akt PH doménjéhez kötődve a sejtmembránhoz horgonyozza az Akt-ot. A membrán asszociáció után a Thr³⁰⁸-as (szubsztrát szelektivitásért felelős), valamint a Ser⁴⁷³-as (aktivitást elősegítő ún. „priming” foszforiláció) oldalláncokon foszforilálódik a foszfatidilinozitol-függő protein kináz 1 (PDPK1), valamint az mTORC2 (emlős rapamicin célpont 2-es komplexe) révén (Beg *et al.*, 2017). Az Akt1 az AS160-at (Akt substrate of 160 kDa) foszforilálva megszünteti a Rab fehérjékre kifejtett gátló hatását, ezáltal a GLUT4 (glükóz transzporter 4) transzporterek a vázizomsejtek plazmamembránjába történő transzlokációját segíti elő. Az inzulin ezzel a sejtbiológiai hatása révén megteremti a glükóz sejtbe jutásának lehetőségét (Kohn *et al.*, 1996; Kupriyanova and Kandrór, 1999; Karlsson *et al.*, 2005).

Az Akt a Ser/Thr kináz aktivitása révén az inzulin jelátviteli pálya további részeit is képes aktiválni (Boucher, Kleinridders and Kahn, 2014). A PI3K további Ser/Thr kinázokon keresztül fejti ki hatását úgy, mint az előbb említett Akt1, protein kináz C (PKC), és PDPK 1 és 2. A PI3K aktiválódása a glükóz transzporter fehérjék sejtmembránba történő transzlokációján kívül indukálja a glikogén-, lipid- és fehérjeszintézist, gátolja a lipidbontást, valamint szabályozza a májban lévő glükoneogenezist is (Burks and White, 2001).

A glükóz felvétele izomsejtekbe inzulin függő módon történik a GLUT4 transzporter fehérjéken keresztül. Az izomszövet felelős a teljes szervezet 60-70%-ának inzulin által közvetített glükózfelvételéért (Smith, 2002). Táplálkozás után az inzulin glikogén szintézist indukál a glikogén szintáz aktiválása révén, mely következtében intenzív izommunka során lehetővé válik az anaerob energiafelszabadulás glikolízis által. Alapállapotban, alacsony inzulinszint mellett az izomsejtek glükóz és glikogén felhasználása csekély, az inzulin gátolja a fehérje lebontását, míg az inzulin hiánya elősegíti azt, hogy aminosavak juthassanak a glükoneogenezisbe. Éhezés során a fehérjeszintézis 50%-os csökkenést mutat (Giorgino, Laviola and Eriksson, 2005). Az inzulin közvetlen anabolikus hatásáról szóló adatok nem teljesen egyértelműek, de úgy tűnik, hogy képes a fehérjeszintézis intermediereinek foszforilációját szabályozni. Amennyiben megfelelő mennyiségű aminosav áll rendelkezésre, az IGF-1 növekedési hormonnal közösen az inzulin anabolikus hatása (Giorgino, Laviola and Eriksson, 2005). Inzulinszereztség során az izomsejtek glikogén szintézise lecsökken, melynek egyik oka a csökkent glükózfelvétel (Hunter and Garvey, 1998). Az inzulin jelátvitel főbb komponenseit a (10. ábra) foglalja össze.



10. ábra. Az inzulin jelátvitel főbb komponensei. Az elméleti bevezetőben nem taglalt, de az ábrán szereplő rövidítések: IGF-1(R): inzulin szerű növekedési faktor-1(receptor); IR: inzulin receptor; Ras: RAS (patkány szarkóma vírus) GTP-áz; Raf: Raf proto-onkogén szerin / treonin-protein-kináz; MEK: mitogén aktivált protein kináz; SOS: Son of Sevenless; Grb2: Growth

factor receptor-bound protein 2; Shc: SHC-transforming protein 1; TBC1D4/1: Rab GTPáz aktiváló fehérje; PGC-1 α : peroxiszóma proliferáció aktivált receptor gamma izoformája; Bad: BCL2 Associated Agonist Of Cell Death; Casp9: kaszpáz-9; mdm2: Mouse double minute 2; PRAS40: proline-rich Akt substrate of 40 kDa; TSC-2/1: Tuberous Sclerosis Complex 2/1; 4EBP1: Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1; Foxo: forkhead box protein; SREBP1: Sterol regulatory element-binding transcription factor 1. Módosított ábra, forrás: (Boucher, Kleinridders and Kahn, 2014).

A sejtekbe a glükóz ATP független módon áramlik be glükóz transzporter (GLUT) fehérjék segítségével (Hunter and Garvey, 1998). A GLUT családba tartozó fehérjéket szekvencia homológia alapján három osztályba soroljuk.

Ezek a transzporterek inzulinérzékenységüket tekintve eltérőek, emiatt képesek a különböző sejt- és szövettípusok glükóz igényeinek megfelelően működni. A zsír- és izomszövetekben főleg GLUT4 transzporter található meg, a sejtmembránba való transzlokációjához inzulinra van szükség. (Burks and White, 2001). A PI3K aktiválódása kulcsfontosságú a GLUT4 membránba történő transzlokációjában mind izom, mind adipocita sejtekben (Kido, Nakae and Accili, 2001).

1.8.2. Inzulinrezisztencia

Az inzulinrezisztenciával összefüggésbe hozható betegségek a felnőtt népesség körülbelül 15-28%-át érintik világszerte. Ilyen betegségek közé tartozik többek között a glükóz intolerancia, elhízás, reprodukciós problémák, valamint a 2-es típusú diabétesz (Meigs, 2003). Az inzulinrezisztencia jellegzetessége, hogy az inzulinra érzékeny sejtek/szövetek a hormon hatására már csak csökkent mértékben képesek reagálni. Ilyen inzulinra érzékeny szövettípus például a vázizom, a máj, valamint a zsírszövet. Inzulinrezisztenciás állapotban a hasnyálmirigy β sejtjei még több inzulint állítanak elő, melyet a keringésbe juttatnak (Boucher, Kleinridders and Kahn, 2014).

A glükóz egyik legfőbb felvételi helye a vázizomzat, normál egészséges, glükózra érzékeny egyéneknél (Abdul-Ghani and DeFronzo, 2009). A véráramba jutott glükóz körülbelül egyharmadát a máj, míg a többit a perifériás szervek veszik fel. Vázizomzat esetében az inzulinrezisztencia hatására csökken a sejtek glükózfelvétele.

Az inzulin hatása a különböző szöveteket tekintve eltérő (izom, máj, zsírszövet), így az inzulinrezisztencia sejtbiológiai háttere is szövetenként más és más. A továbbiakban az izomszövetekre jellemző inzulinrezisztencia molekuláris mechanizmusait fejtem ki.

Sejtes szinten az inzulin által közvetített jelátvitel többféle módon csökkenhet, ezek közé tartozik az IRS1 szerin oldalláncainak emelkedett foszforilációja, az IRS1, valamint az IR degradációja. Az IRS1 számos foszforilációs helyel rendelkezik, melyek között található tirozin és szerin oldallánc is (Herschkovitz *et al.*, 2018). A tirozin oldalláncok az IRS fehérjék aktivációjához elengedhetetlenek, míg a foszforilált szerin aminosavak egy negatív feedback loop kialakításában fontosak, így inaktíválva az IRS fehérjék által továbbított jeleket. Ennek a negatív hatásnak a kóros elváltozása lehet az egyik inzulinrezisztenciát kiváltó ok.

A megemelkedett IRS szerin/treonin foszforilációval a csökkent tirozin kináz aktivitást is megfigyelték inzulinrezisztens állapotban mind rágcsálókban mind emberekben (Karasik *et al.*, 1990; Dunaif *et al.*, 1995; Zhou, Dolan and Dohm, 1999; Shao *et al.*, 2000, p. 1). Több tanulmány is utal arra, hogy az IRS1 szerin foszforilációk állnak ennek a kóros folyamatnak a hátterében, például megemelkedett szerin foszforilációs mintázatot figyeltek meg számos rágcsáló modellben (J. K. Kim *et al.*, 2004; Um *et al.*, 2004; Furukawa *et al.*, 2005), valamint az IRS1 gátló szerin oldalláncainak Ser → Ala mutációiban a magas zsírtartalmú táplálkozás okozta inzulinrezisztenciát sikerült kivédeni *in vivo* (Morino *et al.*, 2008). *In vitro* eredmények pedig arra utalnak, hogy ez a foszforilációs mintázat az IR-IRS1 és/vagy az IRS1-PI3K disszociációját okozza, mely megakadályozza a PI3K aktiválódását, és ezzel az inzulin jelátvitel megfelelő működését (Li, DeFea and Roth, 1999; Moeschel *et al.*, 2004). Az inzulinrezisztenciás állapotban az IRS1 fehérjén a Ser³⁰⁷, Ser³¹⁸, Ser⁶¹² és Ser¹¹⁰¹-es oldalláncokon figyeltek meg emelkedett foszforilációs szintet rágcsáló modellekben (J. K. Kim *et al.*, 2004; Um *et al.*, 2004; Tremblay *et al.*, 2007).

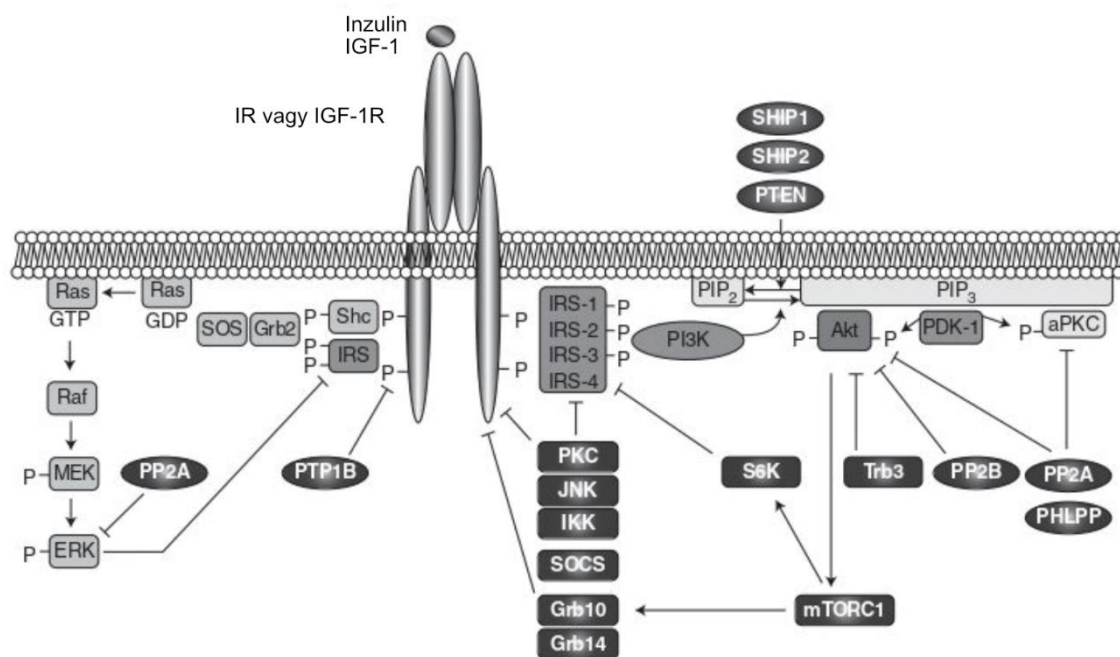
Az IRS1 fehérje szerin oldalláncait több jelátviteli pálya protein kinázai is képesek foszforilálni. Ilyenek például a JNK (Aguirre *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2003; Taniguchi *et al.*, 2007), IκB kináz (IKK) (Herschkovitz *et al.*, 2018), protein kináz C (Müssig, Staiger, *et al.*, 2005; Herschkovitz *et al.*, 2018) és p70S6 kináz (S6K1) (Tremblay *et al.*, 2007), valamint az ERK1/2 (Copps and White, 2012). További eredményekből arra is fény derült, hogy a hosszú inzulin stimulus hatására az IR internalizálódik, és degradálódik (Martin, Desai and Steiner, 1983; Garvey, Olefsky and Marshall, 1985; Watanabe *et al.*, 1986), a degradáció az IRS1 esetében is megfigyelhető (Sun *et al.*, 1999; Haruta *et al.*, 2000). Az előbb említett folyamatokat bizonyos citokinek, és maga a hiperinzulinémia is tovább erősíti. Az IRS fehérjék foszforilációs profiljának ilyen jellegű megváltozása csökkent inzulin választ, valamint csökkent glükózfelvételt eredményez (Boucher, Kleinridders and Kahn, 2014).

Az inzulin jelátvitelben az IRS fehérjék után elhelyezkedő egyik effektor, az Akt1 is csökkent foszforilációt mutatott 2-es típusú diabéteszes vázizom szövetben fiziológias mennyiségű inzulin hatását követően (Krook *et al.*, 1998). IRS hiányában az Akt Thr³⁰⁸-as aktiváló foszforilációja nem volt detektálható (Dong *et al.*, 2008, p. 1; Long *et al.*, 2011), ezzel szemben a Ser⁴⁷³-as „priming” foszforilációja az mTOR komplex 2 (mTORC2) által megmarad, emiatt ez a foszforiláció nem jó indikátora az IRS-PI3K jelátviteli pályának (Sarbasov *et al.*, 2005). A glükóz transzporterek plazmamembránba történő kihelyeződése az inzulin hatását tekintve az egyik utolsó jelátviteli lépésnek számít. Vázizomzat esetén maga a GLUT4 kihelyeződésében és sejten belüli transzportjában bekövetkezett változások is hozzájárulhatnak az inzulinrezisztencia kialakulásához (Bouzakri, Koistinen and Zierath, 2005).

Az inzulinrezisztencia patogenezisében még egy fontos mechanizmus lehet a lipidek által előidézett inzulinrezisztencia. Az első erre vonatkozó adatok 1941 környékéről származnak nyulakon végzett kísérletekből. Hipoglikémiás állapotban is sikerült csökkent inzulin választ előidézni intravénásan adagolt lipidek segítségével (Young, 1962). A lipidek által okozott inzulinrezisztenciával kapcsolatos kutatások szerteágazóak, és igen sokféle molekuláris mechanizmussal kapcsolatos modellt állítottak fel ennek kapcsán. Az egyik lehetséges molekuláris célpont a PKC enzimekkel kapcsolatos kutatásokhoz köthető. A PKC csoportba tartozó enzimek közül is a novel, azaz az „új” típusúak (nPKC) kaptak figyelmet. Ezek az enzimek DAG (diacil glicerol) hatására aktiválódnak, és nem igényelnek Ca²⁺ ionokat a működésükhöz. Hatásukat hosszan elnyújtva fejtik ki (Dries, Gallegos and Newton, 2007), ezáltal potenciálisan jó célpontjai lehetnek a lipidek általi inzulinrezisztencia kialakításában. Ezekkel a megfigyelésekkel összefüggésben az inzulinrezisztens izom és májszövetekből származó mintákban nPKC enzimek emelkedett aktivitását figyelték meg. A humán mintákon végzett kísérletekben a vázizomzatban jelenlévő PKC θ (Szendroedi *et al.*, 2014) és PKC ϵ (Perreault *et al.*, 2018) transzlokációját figyelték meg 2-es típusú diabéteszben a normál testsúlyú kontrollokhoz képest. A novel PKC-k esetében gátló hatást figyelhetünk meg vázizomzatban, melyek az IRS1 gátló szerin foszforilációi révén fejthetik ki inzulin rezisztenciát előidéző hatásukat (Petersen and Shulman, 2018). Glükóz intolerancia és 2-es típusú diabétesz esetén az atípusos PKC-k (atypical protein kinase C), abnormálisan magas aktivációját az inzulinrezisztencia egyik kiváltó okának gondolják vázizomzatban (Beeson *et al.*, 2003; Y.-B. Kim *et al.*, 2003). Érdekes még megemlíteni, hogy az IRS1 Ser¹¹⁰¹-es

oldalláncát a nPKC-on kívül az mTORC1/S6K1 is foszforilálja így deaktiválva a PI3K/Akt útvonalat vázizomzatban (Kido *et al.*, 2020).

Az irodalmi adatok alapján elmondható, hogy az inzulinrezisztencia egy igen komplex folyamat, és a résztvevő jelátviteli pályák nagyon sok eleme érintett lehet a patológiás állapot kialakulása során. Az inzulin jelátvitel negatív regulátorait a **(11. ábra)** foglalja össze.



11. ábra. Az inzulin jelátvitel negatív effektorai. Az elméleti bevezetőben nem taglalt, de az ábrán szereplő rövidítések: SHIP1/2: SH-2 containing inositol 5' polyphosphatase; PTEN: Phosphatase and tensin homolog; PP2A/B: protein foszfatáz 2A/B; PTP1B: protein tirozin foszfatáz 1B; PHLPP: PH domain Leucine rich repeat Protein Phosphatase; Trb3: Tribbles homolog 3; Grb10/14: Growth factor receptor-bound protein 10/14; SOCS: Suppressor of cytokine signalling; Módosított ábra, forrás: (Boucher, Kleinridders and Kahn, 2014).

Izomszövetben az inzulinrezisztencia egyik lehetséges regulátora az előző fejezetekben részletezett SMTNL1, mely sima és vázizomzatban is (Borman, MacDonald and Haystead, 2004), valamint szteroid hormonokra érzékeny szövetekben is kifejeződik (Wooldridge *et al.*, 2008; Bodoor *et al.*, 2011).

2. Célkitűzések

Kutatásaink során a RhoA-asszociált protein kináz és a miozin foszfatáz neurotransmitter-kibocsátásban betöltött szerepét szeretnénk volna tanulmányozni, hogy jobban megértsük a két enzim szerepét ebben a folyamatban. Ehhez több kísérleti rendszert is kidolgoztunk *in vitro* eljárásoktól kezdve a sejtes kísérleteken át, egészen az *ex vivo* szinaptoszómákon végzett kísérletekig. Nem utolsósorban pedig rekombináns fehérjéket is előállítottunk a kísérleteinkhez.

Először a SNAP-25 és a miozin foszfatáz MYPT1 alegység közötti kölcsönhatás mélyreható tanulmányozását tűztük ki célul többek között felületi plazmonrezonanciás (SPR) eljárással. Különböző hosszúságú MYPT1 fragmenseket használva az interakcióért felelős MYPT1 régió feltérképezése is célunk volt.

Az interakciók igazolása után sejtes fehérje expresziós rendszerrel előállított, és tisztított SNAP-25 *in vitro* foszforilációját terveztük meg ROK enzimmal, majd a foszforiláció visszaigazolását Western-blot eljárással, foszfospecifikus antitestekkel kívántuk ellenőrizni. Az interakció és a ROK SNAP-25 közötti enzim-szubsztrát kölcsönhatás leírása után pedig a MP tüzetesebb vizsgálatát terveztük meg sejtes, valamint *ex vivo* szinaptoszómás modellben.

Első lépésben B50 neuroblasztóma sejtek MYPT1 génjének csendesítését szeretnénk volna kidolgozni siRNS technikával, majd csendesítést követően meghatározni a sejtek életképességét MTT eljárással, valamint a csendesítés sikerességét Western-blot módszerrel.

Megterveztük a kontroll és csendesített minták foszfatáz aktivitásának méréseit radioaktív izotópos technika segítségével, valamint a SNAP-25 Thr¹³⁸-as foszforilációjának vizsgálatát szintén Western-blot technikával. Ezekkel a kísérletekkel az idegi eredetű sejtekben szeretnénk volna tisztázni a miozin foszfatáz, és kifejezetten a MYPT1 szerepét.

A sejtes kísérletek után a miozin foszfatáz szerepének pontosabb meghatározása volt a célunk szinaptoszóma preparátumokat felhasználva. A TMC és H1152 inhibitorok hatásásaira is kíváncsiak voltunk szinaptoszóma preparátumokat alkalmazva, és a kezeléseket után a SNAP-25 Thr¹³⁸-as foszforilációs szintjének vizsgálatát terveztük Western-blot segítségével. Az inhibitoros kezeléseket után a SNAP-25 és szintaxin kölcsönhatásának vizsgálatát terveztük meg immunprecipitáció segítségével, hogy jobban megértsük a SNAP-25 Thr¹³⁸-as foszforilációjának hatását a SNARE komplex kialakulásában.

Végezetül a szinaptoszóma preparátumokon végzett inhibitoros kezeléseket szeretnénk volna megismételni egér agyszelet mintákon immunfluoreszcenciás eljárást alkalmazva. A foszforilációs hatások tanulmányozására konfokális mikroszkópiát terveztünk.

További kutatásainkkal a miozin foszfatáz aktivitását befolyásoló SMTNL1 fehérje szerepét vizsgáltuk indukált, inzulinrezisztencia modellben. Ehhez a modellhez egér C2C12 egér mioblaszt sejtvonalat használtuk, és differenciáltattunk.

Első lépésben az inzulin rezisztenciát megfelelő módon modellezni képes *in vitro* sejtes rendszer felállítását terveztük meg. Amint a modell replikálható módon és megfelelően működött, számos vizsgálatot terveztünk meg annak eldöntésére, hogy a SMTNL1 képes-e valamilyen módon befolyásolni az inzulinrezisztenciás állapotot.

Az indukált inzulinrezisztencia kialakításához hosszútávú hiperinzulinémiás kezeléseket terveztünk magas cukortartalmú médiumot használva.

A SMTNL1 túltermelés, valamint a progeszteron kezelések hatását szeretnénk volna összevetni üres plazmával transzfektált sejtekből származó mintákkal. Az összehasonlításhoz többféle sejtbioológiai eljárást terveztünk meg: A differenciált, és kezeléseken átesett sejtek elemzése Proteome Profiler segítségével (sok jelátviteli komponens foszforilációjának egyszerre történő vizsgálata). Az inzulin jelátviteli pálya elemeinek specifikus vizsgálata Western-blot módszerrel. Az inzulinrezisztens és kontroll sejtek közötti metabolikus különbségek feltárása Seahorse XF96 mérésekkel. A glükóz felvétel mértékének, valamint a PI3K aktivitásának mérése ezekre specifikus mérési módszerek alkalmazásával.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Anyagok

A felhasznált anyagok, antitestek és vegyszerek a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) cégtől származtak, az ettől való eltérés minden esetben jelölve. A Mikrocisztin-LR előállítás és tisztítása korábban leírt módon történt (Máthé *et al.*, 2009).

3.2. Antitestek

Antitest	Gyártó
Anti SNAP-25	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
anti-aktin	
anti-FLAG	
anti-GST	
anti-szintaxin	
HPR konjugált anti-nyúl IgG	
anti-csirke IgG	
MYPT1 1-296	munkacsoportunk készítette (Lontay et al., 2004)
Texas Red-X phalloidin	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)
Alexa Fluor 488-konjugált anti-nyúl IgG	Molecular Probes (Eugene, Or, USA)
Alexa Fluor 546-konjugált anti-kecske IgG	
To-Pro-3	
Alexa Fluor 546-konjugált anti-egér IgG	
anti-SNAP-25 T138	Abgent (San Diego, CA, USA)
IRS1	Cell Signaling (Danvers, MA, USA)
IRS1 S307	
IRS1 S318	
IRS1 S612	
IRS1 S1101	
Akt1 T308	
Akt1 S473	
mTOR S2448	
GSK-3 β S9	

AMPK α T172	
GLUT4	
JNK p46	
JNK Y185	
ERK 1/2	
ERK 1/2 T202/Y204	
PI3K p85:	Millipore (Burlington, MA, USA)
PP2A	BD Transduction Laboratories (Franklin Lakes, NJ, USA)
nPKC ϵ	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)

2. táblázat. A kísérletekhez használt antitestek összefoglalása.

A munka során használt antitesteket és fluoreszcens anyagokat a (2. táblázat) részletezi.

3.3. SPR kölcsönhatási vizsgálatok

A MYPT1 és a SNAP-25 fehérjék közötti kölcsönhatást Biacore 3000-es felületi plazmonrezonanciás műszerrel vizsgáltuk (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Amin kötés segítségével GST elleni antitest lett immobilizálva CM5 chip felületére, mely után a teljes hosszúságú GST-MYPT1¹⁻¹⁰⁰⁴, vagy annak C-terminális fragmentje (GST-MYPT1⁶⁶⁷⁻¹⁰⁰⁴) lett a felülethez kötve. Ezeknek a fehérjéknek az előállítása korábbi protokollok alapján történt (Tóth *et al.*, 2000; Kiss *et al.*, 2002). A többi esetben His-tag jelöléssel ellátott MYPT1 fehérje fragmentek (His-MYPT1¹⁻²⁹⁶ vagy His-MYPT1¹⁻⁶³³) lettek immobilizálva közvetlenül a CM5 szenzor chip felületére, amin kötéssel (Hirano, Phan and Hartshorne, 1997; Tóth *et al.*, 2000). A SNAP-25 kötődésének vizsgálata a korábban leírt módszerek alapján történt (Kiss *et al.*, 2008; Sipos *et al.*, 2017). A kinetikai paramétereket és a disszociációs konstans (K_d) értékeket a szenzogramokból nyertük ki a BIAevaluation 3,1 szoftver segítségével 1:1 interakciós modellt alkalmazva.

3.4. Rekombináns fehérje termeltetés és tisztítás

A FLAG-SNAP-25 fehérjét (WT és Thr^{138A} mutáns) tartalmazó plazmidot (GeneCopeia, Rockville, MD, USA) *tsa201* sejtekbe transzfektáltuk polietilénimin (PEI) transzfekciós ágenssel. 15 μ g plazmidot és 30 μ l (1 μ g/ μ l) PEI-t 150 mM-os steril NaCl oldatban inkubáltunk 30 percig. 1 mL transzfekciós reagenst 4 mL szérum mentes DMEM-mel (Dulbecco által módosított Eagle médium - Dulbecco's modified Eagle's medium) összekeverve a sejtekre adagoltunk ~60%-os konfluenciánál. 6 óra elteltével 5 mL 20%-os

FBS-t (magzati borjú szérum - Fetal Bovine Serum) tartalmazó DMEM médiumot adtunk a sejtekhez. 18 óra elteltével a sejteket feltártuk, és elkezdjük a fehérje tisztítást.

A *tsa201* – (transformed human kidney) egy sejtvonal, mely az SV40-es hőszenzitív T antigént is expresszálja. Tenyésztési karakterisztikájának (relatív gyorsan növekvő, és könnyen fenntartható) köszönhetően emlős expressziós rendszerek felállítására használják. Tenyésztéséhez normál sejtenyésztési körülmények szükségesek (DMEM + 10% FBS + 2,5mM L-glutamin 5%-os CO₂ tartalmú párával telített 37°C-os inkubátorban).

3.5. *In vitro* Rho A asszociált kináz reakció

A kísérletekhez *tsa201* sejteket transzfektáltunk FLAG-SNAP-25 plazmiddal. A sejtekből készített preparátumokból anti-FLAG M2 Sepharose gél affinitás kromatográfiás eljárással (Sigma-Aldrich) tisztítottuk a rekombináns SNAP-25-öt. A gyöngyöket TBS-el mostuk, majd ROK enzimmal (20 ng/μl) és ATP-vel (0,5 mM) inkubáltuk 30 percig 30°C-on. A reakcióelegyben 1 μM MC-LR segítségével gátoltuk az esetleg szennyeződésként előforduló protein foszfatázok aktivitását kontroll mintákban is. A reakciók befejezése után a gyöngyöket TBS-el mostuk, majd a gyöngyökre SDS mintapuffert mértünk, és 100°C-on főztük 5 percig, ezzel eluálva a fehérjéket a gyöngyökről. A foszforilációt foszfospecifikus antitestekkel ellenőriztük Western-blot segítségével.

3.6. *B50 neuroblasztóma sejtek fenntartása*

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

3.7. *Géncsendesítés*

A géncsendesítést B50 neuroblasztóma sejteken végeztük el, mely a következő módon történt: a sejteket a tripszines felválasztást követően szérum mentes médiumban vettük fel, majd ehhez közvetlenül hozzáadtuk az előzőleg előkészített siRNS-t tartalmazó transzfekciós reagenst (szuszpenziós transzfektálás). Az eljárás során így nem a már letapadt sejtekbe juttattuk az siRNS-t, növelve ezzel a transzfekciós hatékonyságot. A 80%-os konfluenciát elérő B50 neuroblasztóma sejteket steril PBS-el mostuk, majd tripszinezéssel felválasztottuk a tenyésztő edény aljáról. Ezután 100 nM-os végkoncentrációban 4 különböző duplaszálú siRNS-t (Thermo Scientific – ON-TARGET plus SMARTpool) tartalmazó elegyet juttattunk a

sejtekbe, melyek mindegyike az endogén MYPT1-et célozták. A transzfekcióhoz Dharmafect2 (Dharmacon, Lafayette, CO, USA) reagenst használtunk, a gyártó leírása alapján. 48 óra elteltével a sejteket feltártuk Western-blot elemzéshez, foszfatáz aktivitásméréshez, és MTT életképességi vizsgálathoz. A géncsendesítést 6 lyukú plate-ekben végeztük (1×10^5 sejt/well) Western-blot és foszfatáz aktivitásméréshez, az MTT vizsgálatokhoz 96-lyukú plate-et használtunk (3×10^3 sejt/well).

3.8. Irányított mutagenézis

A vad típusú SNAP-25-öt tartalmazó plazmidot (pReciever-M13) a GeneCopeia (Rockville, MD, USA) cégtől vásároltuk. A pontmutáció kialakításához QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis készletet használtunk (Qiagen, Hilden, Németország), valamint a már előzőleg leírt primereket (Horváth *et al.*, 2017). Az újonnan szintetizált mutáns DNS-t XL10-Blue (Agilent, Santa Clara, CA, USA) szuperkompetens sejtekbe transzformáltuk. A termeltetett mutáns plazmidot EZ-10 Spin Column Plasmid DNA Miniprep (Bio Basic, Markham, Kanada) készlet segítségével preparáltuk. A mutációkat szekvenálással ellenőriztük.

3.9. Western blot analízis

A szinaptoszómákból, valamint a sejtenyészetekből kinyert szolubilizált fehérje preparátumokat 5x SDS-PAGE (nátrium-dodecil szulfát-poliakrilamid gél elektroforézis) mintapufferben (50% glicerol, 10% SDS, 0,31M Tris.HCl, 100 mM ditiotreitol, 0,01% brómfenol-kék) 100°C-on 5 percig inkubáltuk. A fehérjéket 12%-os SDS géleken elválasztottuk gélelektroforézis segítségével. (Laemmli, 1970). Az fehérjéket nitrocellulóz membránra transzferáltuk (Bio-Rad, Hemel Hempstead, UK). Transzferálást követően a membránokat blokkoltuk (5% BSA (Bovine serum albumin) TBS oldatban (136 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 25 mM Tris-HCl pH 7,4) melyhez 0,1%-ban Tween-20 detergenst adtunk - TBST) 1 órán keresztül szobahőmérsékleten, majd ebben a pufferben hígítva inkubáltuk az elsődleges antitesteket egész éjszakán át 4°C-on. Ezt követően a membránokat TBST pufferrel mostuk, majd a másodlagos antitestekkel szobahőmérsékleten 1-2 órán keresztül inkubáltuk. A másodlagos antitesteket 0,5%-os BSA-TBST oldatban hígítottuk. Az immunreakciókat FluorChem FC2 (Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA), valamint Bio-Rad ChemiDoc Touch (Hercules, CA, USA) eszközzel detektáltuk. A sávok denzitometriás elemzését Image J, valamint BioRad ImageLab szoftverek segítségével végeztük.

3.10. MTT életképességi vizsgálat

A B50 neuroblasztóma sejtek életképességét a már korábban leírt módon végeztük (Dedinszki, Sipos, *et al.*, 2015). Az életképesség mérése előtt a sejtekben a MYPT1 alegység expresszióját siRNS interferencia segítségével csökkentettük. Tíz μL MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid PBS-ben oldva 5mg/mL) oldatot adtunk a sejtekhez, majd 5%-os CO_2 atmoszférájú párasított inkubátorban 37°C -on egy órán keresztül inkubálódtak. A formazán kristályokat dimetil-szulfoxid (DMSO) segítségével feloldottuk, majd az abszorbanciát 540nm-en mértük (LabSystems, Multiskan MS, LabSystems Diagnostics Oy, Vantaa, Finnország).

3.11. Protein foszfatáz aktivitás mérés

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

3.12. Szinaptoszóma preparálás és kezelés

A szinaptoszómák C3H egerek cerebrális kortexéből lettek preparálva egy korábban leírt protokoll alapján (Lontay *et al.*, 2012), pár módosítással. Az egerek (3-5 kísérlethez) széndioxid inhalációval eutanizáltak. Dekapitációt követően, a kortexeket 1 gramm agyszövet/10 mL jéghideg puffer arányban homogenizáltuk, melynek összetétele: 0,32 M szacharóz, 1,0 mM EDTA, 0,25 mM DTT, pH 7,4. A homogenizátumot 1000 x g-n centrifugáltuk 10 percig 4°C -on Allegra X-12R centrifuga segítségével (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). A felülúszót 12 mL-re egészítettük ki homogenizáló puffer segítségével, és Percoll gradiensen (23; 15; 10 és 3% Percoll/homogenizáló oldat) 32500 x g-n centrifugáltuk 5 percig 4°C -on Beckman L7-55 ultracentrifuga segítségével (Beckman Instruments Inc., Fullerton, CA, USA). A 10/15% és 15/23% közötti frakciókat összegyűjtöttük, majd négyszeresére hígítottuk Krebs pufferben (118 mM NaCl, 5 mM KCl, 25 mM NaHCO_3 , 1 mM MgCl_2 , 10 mM D-glükóz, pH 7,4), és újra centrifugáltuk 12600 x g-n 25 percig 4°C -on. A felülúszót eltávolítottuk, és a pelletet újra

felvettük 3 mL Krebs pufferben majd CaCl_2 -t adtunk hozzá 1,2 mM végkoncentrációban, így inkubáltuk 30°C-on, 1 órán keresztül KCl, valamint inhibitorok jelenlétében és azok nélkül (5 μM TMC vagy 10 μM H1152).

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

3.13. Agyszelet preparátumok elkészítése

A kísérleteket mesterséges cerebrospinális folyadékban (aCSF) végeztük, melynek összetétele: 120 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 26 mM NaHCO_3 , 10 mM glükóz, 1,25 mM NaH_2PO_4 , 2 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 3 mM mio-inozitol, 0,5 mM aszkorbinsav és 2 mM nátrium-piruvát, pH 7,2. Az agyszeletek preparálásához módosított aCSF (alacsony nátrium tartalmú) médiumot használtunk, melyben a 95 mM NaCl-ot 130 mM szacharózzal és 60 mM glicerollal helyettesítettük. Az agyszeletek preparálásához C3H egereket (8 és 30 napos egyedeket mindkét nemből) használtunk. Dekapitálás, és az agy eltávolítása után 200 μm vastag koronális agyi szeleteket készítettünk jéghideg alacsony nátrium tartalmú aCSF pufferben, melyekhez egy HM 650 V vibratómot használtunk (Microm International GmbH, Walldorf, Németország). Preparálás után a szeleteket Millicell CM sejtenyésztő plate inzertekbe helyeztük (PICM01250; Millipore, Billerica, MA, USA), melyek aCSF puffert tartalmaztak. Ezeket az inzerteket fluoreszcens festékekkel való jelölésre használatos inkubáló edénybe helyeztük (Koszeghy *et al.*, 2012). Az inkubáló oldatot aCSF pufferre cseréltük, mely 10 μM H1152-t vagy 5 μM TMC-t tartalmazott 8 mM KCl-al, vagy a nélkül. Ilyen módon az agyszeleteket 60 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten, alacsonyabb CO_2 nyomáson (95% O_2 ; 5% CO_2). Az inkubálást követően a szeleteket vagy folyékony nitrogénben fagyasztottuk Western-blot elemzésekhez, vagy Mounting Médium (VWR, Radnor, PA, USA) segítségével kriosztáttal való munkához készítettük elő. A szeleteket Leica CM 1860 kriosztát (Leica, Nussloch, Németország) segítségével 6 mikronos vastagságú szeletekre vágtuk immunhisztokémiai kísérletekhez.

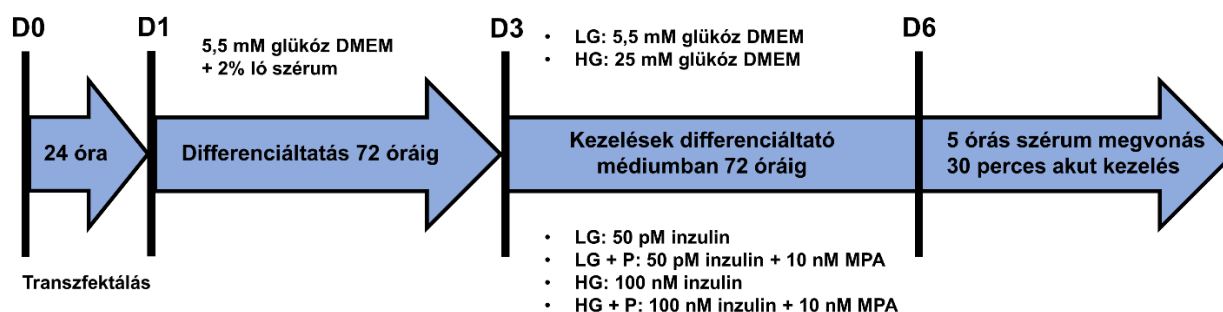
3.14. Immunfluoreszcencia

Az immunfluoreszcenciás festéséhez az agyszeleteket kiszárítottuk, majd blokkoló oldatban inkubáltunk (TBS + 10% lószérum, és 0,2% Triton-X100) 1 órán keresztül szobahőmérsékleten. A festési eljáráshoz 1:100 hígításban alkalmaztuk az elsődleges antitesteket egész éjszakán át történő inkubálással 4°C-on. Ezt követően az agyszeleteket TBS-el mostuk, majd másodlagos antitestekkel 1:200 hígításban (Alexa Fluor 488 konjugált nyúl elleni IgG, Alexa Fluor 546 konjugált egér és kecske elleni IgG) inkubáltuk. Az metszeteket Leica SP8 konfokális mikroszkóp segítségével vizsgáltuk (Leica Microsystems, Wetzlar, Németország).

3.15. Sejttenyésztés, differenciáltatás és inzulinrezisztencia modell

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

A fentebb leírt 3 napos differenciáltatás elteltével még 3 napig kezeltük a sejteket az inzulinrezisztencia kialakításához. A kezelő médiumokat szintén 24 óránként cseréltük. Az indukált inzulinrezisztenciához (HG – 25 mM glükóz) fenolvörös mentes DMEM-et használtunk 2% (V/V) lószérummal, 2 mM L-glutaminnal, valamint 100 nM inzulinnal kiegészítve. A nem inzulinrezisztenciás sejteket normál cukortartalmú (LG – 5,5 mM glükóz) fenolvörös mentes 2% (V/V) lószérummal 2 mM L-glutaminnal, valamint 50 pM inzulinnal kiegészített médiummal kezeltük. Ezt a két kezelést egészítettük ki 10 nM medroxiprogesteron-17-acetát (MPA; Sigma-Aldrich) hozzáadásával vagy anélkül. Minden kezelési formát az üres plazmiddal transzfektált sejteken és a N-terminális Flag-jelölővel ellátott SMTNL1 pcDNA-3.1 expressziós plazmiddal (FT-SMTNL1) transzfektált sejteken is végrehajtottuk. A 3 napos differenciáltatás és 3 napos kezelés végére a mioblasztok miotubulusokká fuzionáltak. Az eljárást a **(12. ábra)** részletezi.



12. ábra. A differenciáltatási és kezelési protokoll, melynek segítségével kiváltottuk az inzulinrezisztenciát C2C12 sejtekben.

A Western blot analízis, proteome profiler és PI3K enzimaktivitási kísérletek előtt a médiumot lecseréltük szérum- és hormonmentes médiumra 5 órára a sejtek PBS-el való átmosása után. Feltárás előtt 30 percre újra hormonkezelést végeztünk 100 nM vagy 50 pM inzulinnal (akut inzulin kezelés). A sejteket Western-blot elemzésekhez radioimmunoprecipitációs (RIPA) pufferben (25 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 0.25% (m/v) nátrium-deoxikolat, 1% (v/v) NP-40, 0.1% (m/v) nátrium-dodecil-szulfát) tártuk fel. A PI3K enzimaktivitási esszéhez a mintákat a megvásárolt készlethez kapott kiegészítő protokoll alapján preparáltuk.

3.16. *Tranziens transzfekció*

FT-SMTNL1 plazmid, valamint kontrollként inzert nélküli pcDNA-3.1 plazmidokat juttattunk a sejtekbe. A transzfekcióhoz GeneJuice transzfekciós reagenst használtunk (Novagen, Merck Millipore, Darmstadt, Germany). A transzfekció az siRNS bejuttatásánál taglalt módon, szuszpenzióban történt a transzfekció hatékonyságának növelés érdekében. A sejteket PBS-el mostuk, majd tripszines kezeléssel felválasztottuk a tenyésztő edények aljáról. Ezután 3 µg plazmid - 6 µl GeneJuice arányban összekevert transzfekciós reagenst adtunk a sejtekhez. Ez után a sejteket a tenyésztő edényekre pipettáztuk, majd a 2 ml-re egészítettük ki 10%-FBS tartalmú DMEM-mel a végtérfogatot. A 96 lyukú plate-ek esetében térfogatarányosan csökkentettük a mennyiségeket. A transzfekciós arányokhoz, valamint a szuszpenzióban történő transzfekcióhoz a gyártó útmutatásait vettük alapul.

3.17. *Proteome Profiler analízis*

Különböző fehérjék egyidejű foszforilációs szintjét R&D Systems Proteome Profiler Human Phospho-Kinase Array Kit (Minneapolis, MN, USA) segítségével elemeztük. Az

előzőleg leírt kezelési protokoll elvégzése után a sejteket feltártuk, majd 200 µg fehérjét használtunk a kísérletekhez a gyártó leírása alapján. A készlet tartalmazta a vizsgálatához szükséges összes puffert és reagenst. A membránokon keletkezett kemilumineszcenciás jeleket Bio-Rad ChemiDoc Touch készülékkel vizualizáltuk, a folt intenzitásokat ImageJ segítségével elemeztük.

3.18. PI3K aktivitás mérés

A PI3K aktivitást egy ELISA-kit (PI3-Kinase Activity ELISA, Pico, Echelon Biosciences Inc., Salt Lake City, UT, USA) segítségével mértük meg, a gyártó útmutatásai alapján. Az abszorbanciákat 450nm-en mértük fotométerrel (Multiskan GO, Thermo Scientific).

Az immunoprecipitációhoz a PI3K p85 (Merck Millipore) alegység elleni antitestet használtunk, a gyártó kiegészítő protokollja alapján. A reakciókban használt fehérje mennyiségét ugyanezen antitest segítségével ellenőriztük Western-blot eljárás segítségével. A felszabadított foszfatidilinozitol (3,4,5)-trifoszfát (PIP₃) mennyiségét a PI3K expressziós szintjéhez normalizáltuk.

3.19. Seahorse XF96 mérések

A sejtek metabolikus aktivitását Agilent Seahorse XF (ASX) 96 műszerrel, ASX assay 5,5 mM glükózt tartalmazó médium segítségével mértük. A zsírsav oxidációt gátló etomoxirt 50 µM-os koncentrációban alkalmaztuk. Az ATP szintáz enzim proton csatornáját (F₀ alegység) 2 µM Oligomycin hozzáadásával gátoltuk, valamint ezzel különböztettük meg az ATP szintézishez kapcsolt O₂ fogyasztást. A mobil ion szállító FCCP-t (carbonyl cyanide p-trifluormethoxyphenylhydrazone) 4 µM-os végkoncentrációban adtuk a sejtekhez, melynek segítségével a légzési kapacitást számoltuk. Az FCCP potens mitokondriális oxidációt szétkapcsoló ún.: „uncoupler”. Az ATP szintézist gátolja olyan módon, hogy a mitokondriális belső membránon keresztül protonokat szállít. A III-as komplex gátlásához 10 µM Antimycin A-t használtunk. A glikolízis gátlásához a kompetitív 2-dezoxiglükózt használtuk 100 mM-os koncentrációban, mely a hexokinázt gátolja. Öt mérési pontot vettünk fel az alapvonalhoz, valamint minden inhibitor injektálása, és a mérési médium összekeverése után is. A méréseket követően a sejteket 1 N NaOH-ban feloldottuk, majd a fehérje mennyiséget BCA módszer segítségével határoztuk meg.

Az anaerob mitokondriális aktivitástól független glikolízis mértékét az Antimicin A + 2-DG értékek az alapértékekből történő kivonásával számoltuk ki. A zsírsav oxidációhoz az etomoxir injektálást követő értékeket vontuk ki az alapértékekből. A maximális glikolízis kiszámolásához az oligomicin injektálás utáni értékekből vontuk ki az Antimicin A + 2-DG értékeket. Az aerob glikolízist pedig úgy számoltuk ki, hogy az etomoxir injektálás értékeiből kivontuk az oligomicin injektálás utáni értékeket.

3.20. Glükóz felvételi vizsgálatok

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

3.21. Statisztikai elemzések

A miozin foszfatáz idegi folyamatokban betöltött szerepének vizsgálatai során az egyes kísérleteknél eltérő statisztikai próbákat végeztünk, ezeknek a leírása megfelelő ábrák alatt találhatóak.

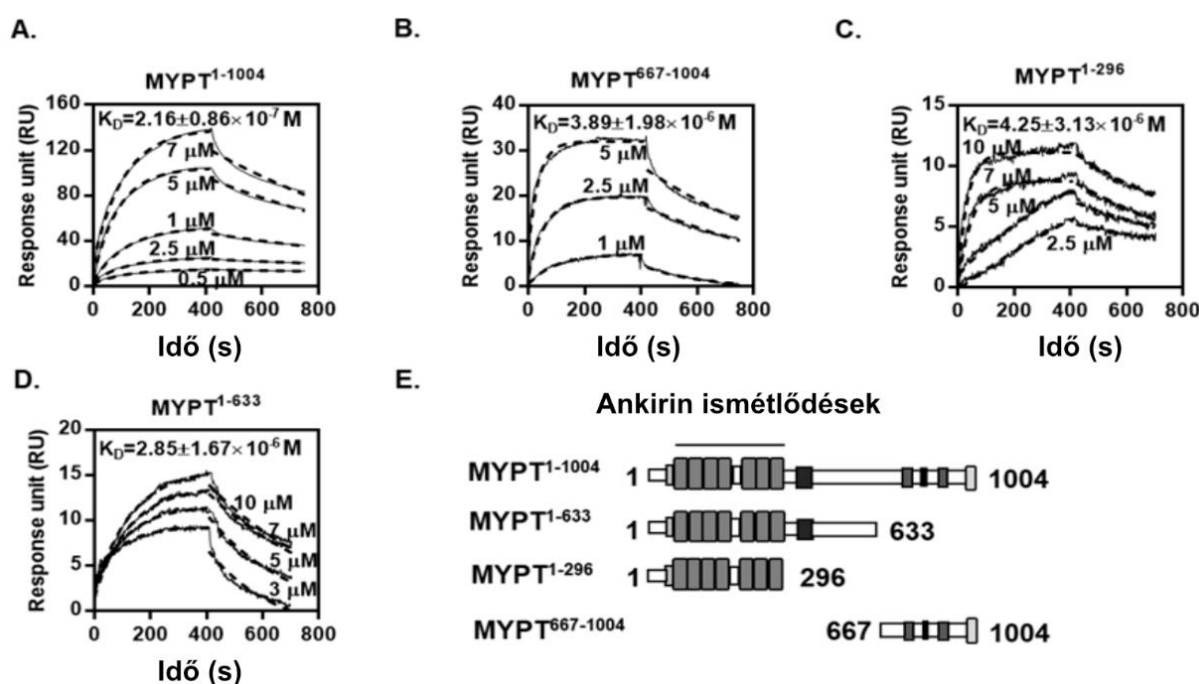
A SMTNL1 inzulinrezisztenciában betöltött szerepének vizsgálatai során a következő statisztikai elemzéseket végeztük a bemutatott eredményekkel kapcsolatban: A SMNTL1 vs üres plazmával transzfektált sejtek adatai: Kétutas ANOVA: Sidak féle post hoc teszt: Átlag $\pm$ SEM; n=3; *,p<0,05). A különböző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

4. Eredmények

4.1. A miozin foszfatáz szerepe a neurotranszmitter felszabadulásában

4.1.1. A SNAP-25 és a MYPT1 kölcsönhatásának vizsgálata

A SNAP-25 MYPT1 kölcsönhatásban szerepet játszó MYPT1 régió azonosításához felületi plazmonrezonanciás (Surface Plasmon Resonance; SPR) vizsgálatokat végeztünk. Ehhez teljes hosszúságú, trunkált MYPT1 mutánsokat, valamint Flag jelölővel ellátott SNAP-25 fehérjét használtunk (13. ábra (E) panel).



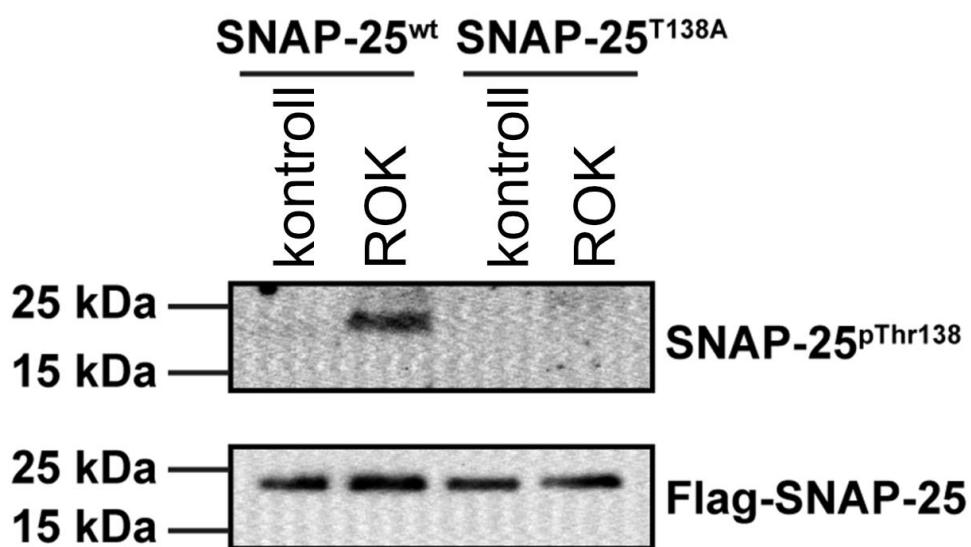
13. ábra. A MYPT1 kölcsönhat a SNAP-25 fehérjével. Felületi Plazmonrezonanciás vizsgálatok során a teljes hosszúságú GST-MYPT1¹⁻¹⁰⁰⁴ (A) és a C-terminális GST-MYPT1⁶⁶⁷⁻¹⁰⁰⁴ (B) fragmentet GST elleni ellenanyaggal immobilizáltuk. Az N-terminális His-MYPT1¹⁻²⁹⁶ (C), valamint a His-MYPT1¹⁻⁶³³ (D) trunkált mutánsokat direkt, amin kötéssel immobilizáltuk. (E) A MPYT1és trunkált mutánsok sematikus felépítése.

Ebben a kísérletben azt szeretnénk volna megvizsgálni, hogy az előzőleg már bizonyított kölcsönhatást (Lontay *et al.*, 2012) a MYPT1 szabályozó alegység melyik régiója alakítja ki a SNAP-25 fehérjével. Az SPR kísérleteket teljes hosszúságú, valamint trunkált mutáns MYPT1 és a SNAP-25 fehérjékkel végeztük el (13. ábra). A szenzogramok alapján a teljes hosszúságú MYPT1 egy relatívan erős kölcsönhatást alakított ki ($K_D = 2,16 \pm 0,86 \times 10^{-7}$). Az eredményekből

az is látszik, hogy a SNAP-25 mind az N- (MYPT1¹⁻²⁹⁶ $K_d=4,25\pm3,13\times10^{-6}$; MYPT1¹⁻⁶³³ $K_d=2,85\pm1,67\times10^{-6}$) és mind a C-terminális ($K_d=3,89\pm1,98\times10^{-6}$) MYPT1 régiókhoz is képes kötődni, bár a C terminálishoz erősebb affinitást mutatott.

4.1.2. A SNAP-25 fehérje foszforilációja Rho A asszociált kinázzal

Az előzetes eredmények arra utaltak, hogy a ROK/MP enzimpárosnak vannak szinaptoszómális célpontjai úgy, mint a szinapszin és szintaxin-I (Lontay *et al.*, 2012). Ezek fényében arra voltunk kíváncsiak, hogy a ROK képes-e a SNAP-25 fehérjét foszforilálni, legfőképpen az előzőleg említett szabályozásban is szerepet játszó Thr¹³⁸-as oldalláncon.



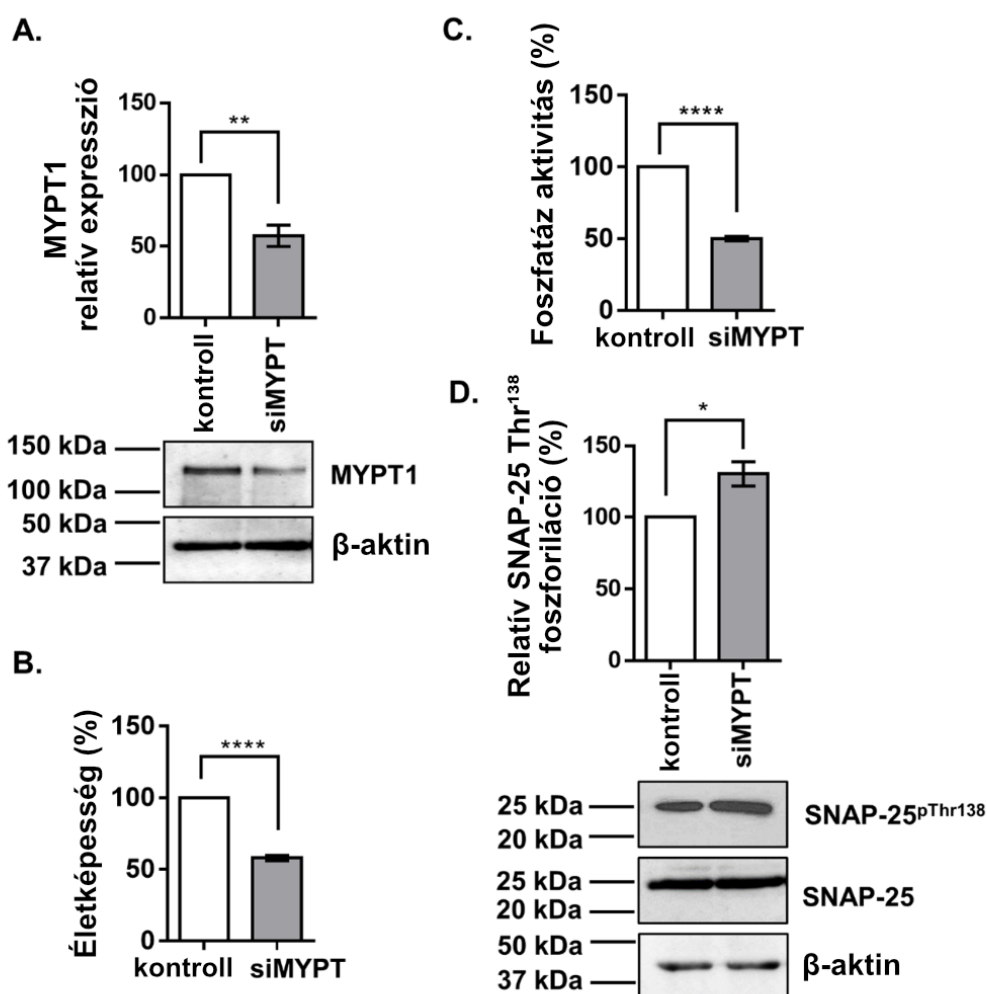
14. ábra. *In vitro* ROK kináz esszé vad típusú és SNAP25^{T138A} mutáns variánssal. A teljes SNAP-25 mennyisége SNAP-25 elleni antitest segítségével mérve, a foszforiláció mértékét foszfospecifikus antitesttel detektáltuk.

Az eredmények alapján a ROK képes foszforilálni a vad típusú SNAP-25 fehérjét (**14. ábra**). Ez a foszforilációs hatás a pontmutáció hatására elmarad. Ezek alapján sikerült igazolni, hogy SNAP-25 a ROK enzim szubsztrátja. Ezen túlmenően pedig sikerült azt is bizonyítani, hogy a Thr¹³⁸-as oldalláncon képes a foszfátcsoport beépítésére. A ROK tehát egy kritikus szabályozási ponton képes a SNAP-25 foszforilációjára.

4.1.3. A MYPT1 csendesítése megemeli a SNAP-25 Thr¹³⁸ oldallánc foszforilációs szintjét

Kísérletsorozatunk eredményeképpen sikerült bizonyítani, hogy a PP1 inhibitorok képesek befolyásolni a SNAP-25 foszforilációs szintjét (Horváth *et al.*, 2017). A továbbiakban

arra voltunk kíváncsiak, hogy ha a miozin foszfatáz szabályozó alegységének expresszióját lecsökkentjük RNS interferencia segítségével, akkor hogyan változik a SNAP-25 Thr¹³⁸-as foszforilációja B50 sejtekben. Arra is kíváncsiak voltunk, hogy a csendesítés milyen hatással van a sejtek életképességére, valamint arra, hogy ezen lizátumokban milyen mértékű a foszfatáz aktivitás.

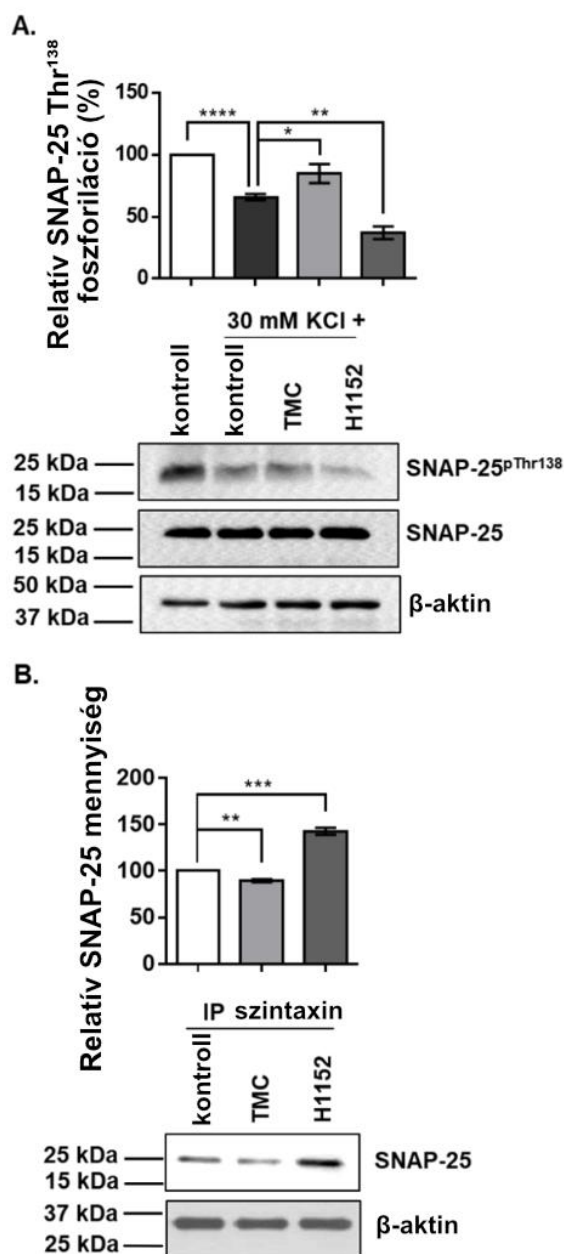


15. ábra. A MYPT1 alegység géncsökkentése B50 neuroblasztóma sejtekben siRNS segítségével. MYPT1 expresszió vizsgálata 100 nM siRNS transzfekciót követően (A). A MYPT1 relatív expresszióját a MYPT1 ellen termeltetett antitesttel detektáltuk. Az MTT kísérletek (B) 48 órával a transzfekciót követően készültek. Foszfatáz aktivitás mérés (C) kontroll és siRNS-el transzfektált sejt-lizátumokon ³²P-MLC20 szubsztátot alkalmazva. A SNAP-25 Thr¹³⁸-as foszforilációjához foszfospecifikus antitestet alkalmaztunk (D). A foszforilációs jelek és a SNAP-25 jeleket aktin belső kontrollra normalizáltuk. A grafikonokon átlagok ± SEM (n=5), statisztika: student féle t-teszt *p<0,05; **p<0,01; ****p<0,0001

A géncsendesítés sikerességét Western blot elemzésekkel vizsgáltuk, és a csendesített sejtekben ~ 43%-os csökkenést tapasztaltunk a MYPT1 expressziójában **(15. ábra (A) panel)**. A géncsendesítés hatására a sejtek életképessége is csökkent ~42%-kal a kontrollhoz képest **(15. ábra (B) panel)** az MTT vizsgálatok alapján. A MYPT1 csendesítésére a teljes foszfatáz aktivitás 50%-ra esett vissza **(15. ábra (C) panel)**, mely arra utal, hogy a B50 sejtekben a miozin foszfatáz a legnagyobb mértékben előforduló PP1 holoenzim. A géncsendesítés hatására a SNAP-25 Thr¹³⁸ oldallánc foszforilációja körülbelül 30%-ban emelkedett a kontroll sejtekhez viszonyítva a szemi-kvantitatív Western blot alapján **(15. ábra (D) panel)**. Az eredmények alapján elmondható, hogy a miozin foszfatáz képes defoszforilálni a SNAP-25 fehérjét a Thr¹³⁸-as oldalláncon, valamint a MYPT1 csendesítésével ennek az oldalláncnak a foszforilációja a MYPT1 expressziójának visszaesésével növekszik.

4.1.4. A miozin foszfatáz serkenti a szinaptoszómák exocitózist a SNAP-25 defoszforilálásán keresztül

Előzetes eredmények rávilágítottak arra, hogy a TMC PP1 inhibitor csökkentette, míg a ROK inhibitor Y27632 növelte a Ca²⁺ függő exocitózist patkány kortikális szinapszisokban (Lontay *et al.*, 2012). Ahhoz, hogy jobban megértsük a SNAP-25 foszforiláció általi szabályozásának fiziológiai szerepét kortikális szinaptoszómákat preparáltunk egér agyszövetből magas áteresztőképességű exocitózis kísérletekhez. A miozin foszfatáz és ROK függő fiziológiai válasz méréséhez TMC foszfatáz, és H1152 ROK inhibitorokkal kezeltük a szinaptoszómákat.

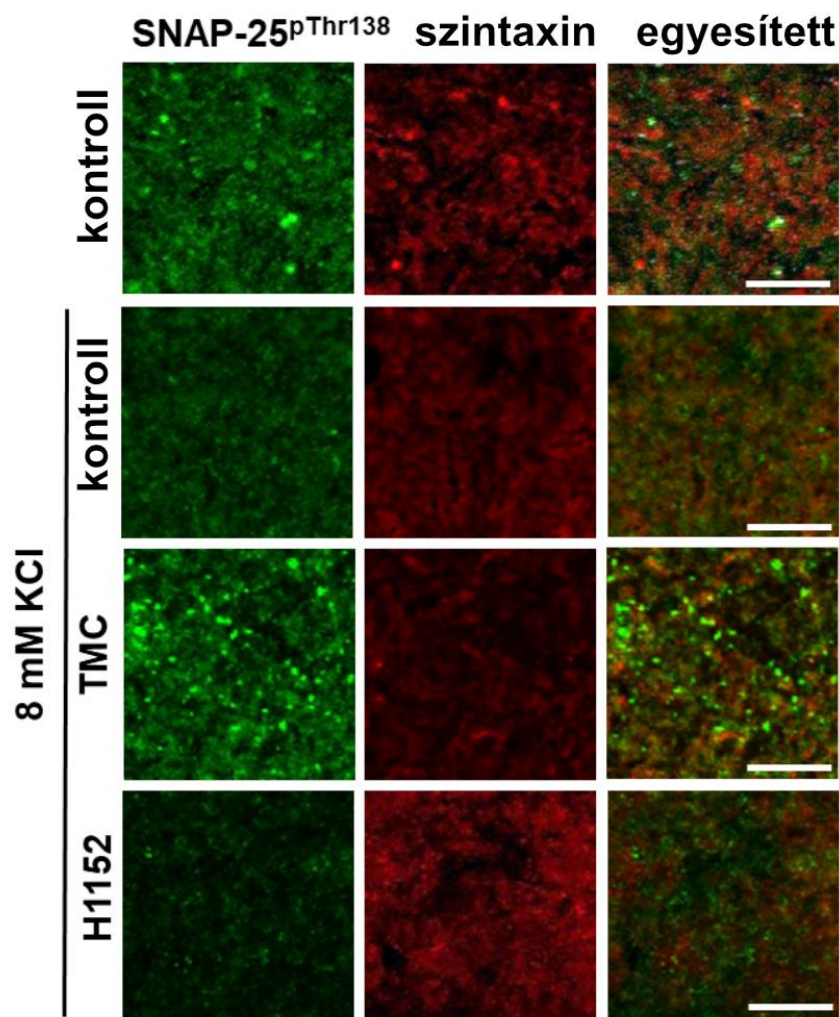


16. ábra. PP1 és ROK inhibitorok hatása az egér agyi szinaptoszómákban található SNAP-25 foszforilációra. A KCl depolarizációs hatása TMC és H1152 inhibitorokkal kombinálva. Belső kontroll: aktin. ANOVA $p < 0,0001$ (A). A TMC és H1152 hatása a szinaptoszóma preparátumokban található, SNAP-25 foszforilációra, és a szintaxin kölcsönhatására (B). A szinaptoszómákat inhibitorokkal kezeltük, lizáltuk, majd elvégeztük az immunprecipitációkat szintaxin elleni antitesttel. A kihúzott fehérjék mennyiségét szintaxin és SNAP-25 elleni antitestekkel detektáltuk. ANOVA: $p < 0,0001$. A statisztikai elemzésekhez $n=3-5$ paralel kísérletet végeztünk. Átlagok $\pm$ SEM ($n=5$), ANOVA Dunett's post hoc elemzés, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$

A depolarizáció hatását a SNAP-25 Thr¹³⁸ foszforiláció mértékére a szinaptoszómákban Western blot analízis segítségével vizsgáltuk **(16. ábra (A) panel)**. A Thr¹³⁸-oldallánc relatív foszforilációja alacsonyabb volt a KCl hatására a nem kezelt kontroll mintákhoz viszonyítva. Ebből arra következtetünk, hogy a depolarizációnak is hatása van a SNAP-25 foszforilációs szintjére. A KCl segítségével végzett depolarizációt követően a SNAP-25 Thr¹³⁸-as alapszintű foszforilációja TMC jelenlétében megnőtt, azonban szignifikánsan lecsökkent H1152 hatására. Az előzetes eredmények alapján megpróbáltuk a SNAP-25 Thr¹³⁸-as foszforilációjának a szerepét vizsgálni a SNARE-komplex kialakulásában immunoprecipitációs eljárással, szintaxin elleni antitest segítségével olyan szinaptoszómákból, melyeket TMC-vel vagy H1152-vel kezeltünk **(16. ábra (B) panel)**. A SNAP-25 relatív mennyisége csökkent a szintaxin által kihúzott mintában PP1 gátlás esetén, míg ROK gátlás esetén nőtt a kölcsönhatásban lévő fehérje mennyisége. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a Thr¹³⁸-as oldallánc foszforilációja a SNARE komplexben a SNAP-25 és a szintaxin közötti kölcsönhatás kialakulását gátolja.

4.1.5. A ROK és a MP enzimpáros befolyásolja a SNAP-25 Thr¹³⁸ oldallánc foszforilációs szintjét egér agyszeletekben

Az előzőleg szinaptoszómákon kapott eredményeket *ex vivo* fiziológiai modelleken is meg szeretnénk volna vizsgálni. Az agyi preparátumokat egér kortexből állítottuk elő, melyeket alacsony Na⁺ tartalmú cerebrospinális folyadék alatt tartattunk, majd KCl segítségével depolarizációt váltottunk ki TMC (5 µM) vagy H1152 (10 µM) jelenlétében.



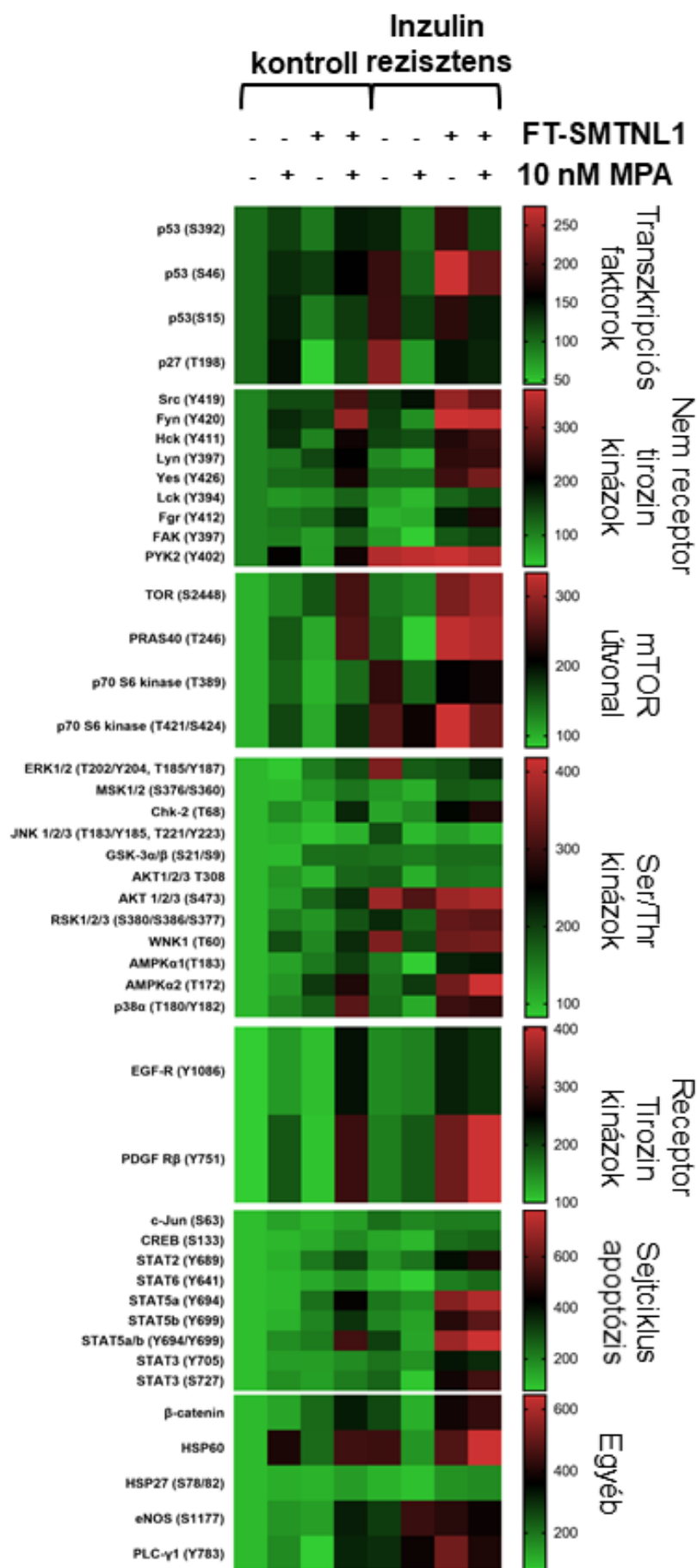
17. ábra. A PPI és ROK inhibitorok hatása agyszelet preparátumokon. A négy csoport agyszelet (kontroll, KCl-kezelt, KCl + TMC kezelt, KCl + H1152 kezelt) anti SNAP-25 Thr¹³⁸, valamint anti szintaxin antitesttel vizsgáltuk a mintákat. A SNAP-25 és a szintaxin kollokalizációja az egyesített képen látható, a scale bar: 10 μ m.

Az immunofluoreszcenciából az előzőleg kapott eredményeket látjuk. A 8 mM-os KCl mérsékelte a teljes SNAP-25 Thr¹³⁸-as foszforilációt a szintaxin expressziójának csökkentése nélkül. A TMC kezelés emelte, míg a H1152 csaknem teljesen megszüntette a SNAP-25 Thr¹³⁸ oldallánc foszforilációját KCl depolarizáció során. Ezek az immunfluoreszcenciás eredmények tovább erősítik a Western blot analízis által kapott adatokat (**17. ábra**). A MP csökkenti a SNAP-25 Thr¹³⁸ foszforilációt, míg a ROK képes emelni ennek az oldalláncnak a foszforilációját. A kapott eredmények alapján a ROK-MP enzimpáros új szubsztrátjaként sikerült azonosítani a SNAP-25 fehérjét.

4.2. A SMTNL1 szerepe az inzulinrezisztenciában

4.2.1. Kontroll és inzulinrezisztens sejtek proteome-profiler vizsgálata

Az inzulinrezisztencia modellezésére használt C2C12 sejteket transzfektáltunk teljes hosszúságú FLAG jelölővel ellátott SMTNL1-gyel (FT-SMTNL1), valamint üres plazmival. Az egér C2C12 mioblaszt sejtvonal egy széles körben használt modell *in vitro* kísérletekhez (Wong, Al-Salami and Dass, 2020). Az inzulinrezisztenciát krónikus inzulin kezeléssel (100 nM) indukáltuk, emellett kezelésként az inzulinrezisztenciás és fiziológiás sejtekhez 10 nM szintetikus progeszteront (MPA) is adtunk bizonyos esetekben a terhességi cukorbetegség modellezésére. A fiziológiás állapotú sejtek 50 pM inzulinnal voltak kezelve. Az inzulin jelátvitel, valamint több Tyr és Ser/Thr kináz foszforilációs állapotának vizsgálatához fehérje foszforilációs array vizsgálatot végeztünk (**18. ábra**).

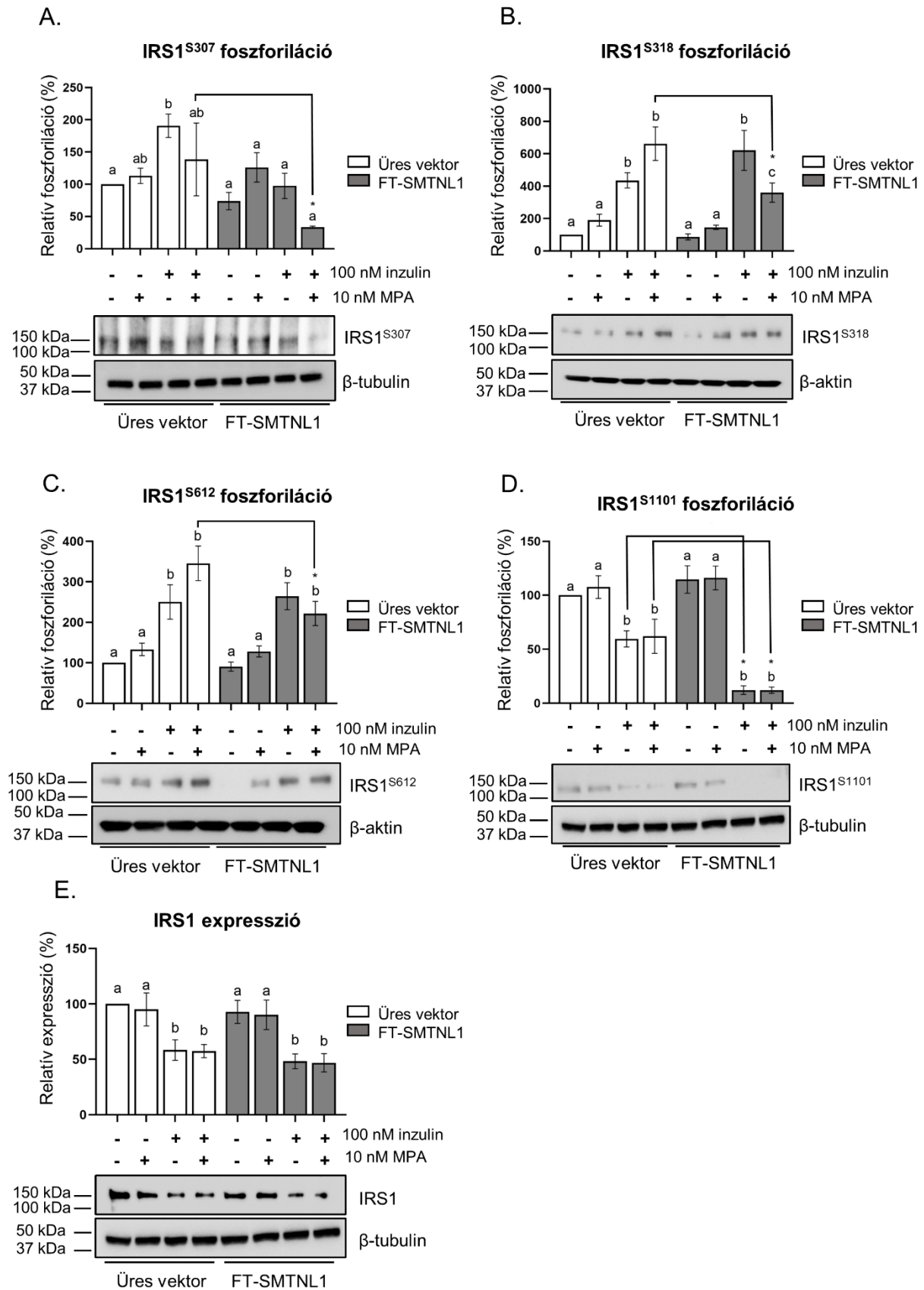


18. ábra. Transzfektált és kezelt C2C12 sejtizátumok Proteome Profiler elemzése. A vizsgált fehérjék foszforilációs állapotát a heatmap alapján osztályoztuk, a kontrollt használva viszonyítási alapként. Színkód: piros jobban foszforilált, zöld: kevésbé foszforilált. Az elemzésekhez 200µg fehérjét használtunk mind az A és mind a B membránokra, a folt intenzitásokat ImageJ segítségével értékeltük ki.

Az SMTNL1 overexpresszált sejtekben transzkripciós faktorok úgy, mint a STAT5a és b (Signal transducer and activator of transcription) körülbelül kétszeres foszforilációs szintet mutattak, azonban a STAT2 és 6, valamint CREB (cAMP response element-binding protein) és c-Jun foszforilációjára nem volt hatással. A sejtciklus szabályozásában szerepet játszó p53 Ser⁴⁶ foszforilációja emelkedett szintet mutatott az SMTNL1-et túltermelő inzulinrezisztens sejtekben. A nem receptor tirozin kináz Pyk2 (prolin gazdag trozin kináz 2) és a PDGF (paletet-derived growth factor) receptor tirozin kináz emelkedett foszforilációt mutatott MPA kezelés és SMTNL1 overexpresszió hatására az inzulinrezisztens sejtekben. Több fontos Ser/Thr kináz is emelkedett foszforilációt mutatott inzulinrezisztencia hatására, és ezt tovább fokozta a SMTNL1 túltermelődése. Az AMPKα2 Thr¹⁷² (AMP activated protein kinase) és Akt1/2/3 Ser⁴⁷³ is emelkedett foszforilációt mutatott ezekben a sejtekben. Az mTOR Ser²⁴⁴⁸ mellett a c-Jun-N-terminális kináz (JNK1/2/3) Thr¹⁸³, valamint az ERK1/2 Thr²⁰² is emelkedett foszforilációt mutatott. A p38 és a Chk2 és MSK1/2 foszforilációs szintje nem változott. Ezek alapján úgy tűnik, hogy az SMTNL1 kritikus szabályozási pontokon képes hatást kifejteni az inzulin jelátviteli pályán belül.

4.2.2. Az SMTNL1 túltermelés csökkenti az IRS1 fehérjék Ser oldalláncainak foszforilációját differenciált inzulinrezisztens C2C12 sejtekben

A proteome profiler elemzés eredményeire alapozva a SMTNL1 pontos molekuláris mechanizmusát szeretnénk volna feltérképezni az inzulinrezisztencia modellben. Ezért a preparált mintákból Western-blot elemzések segítségével részletesebben megvizsgáltuk a jelátviteli pálya komponenseit (**19. ábra**).



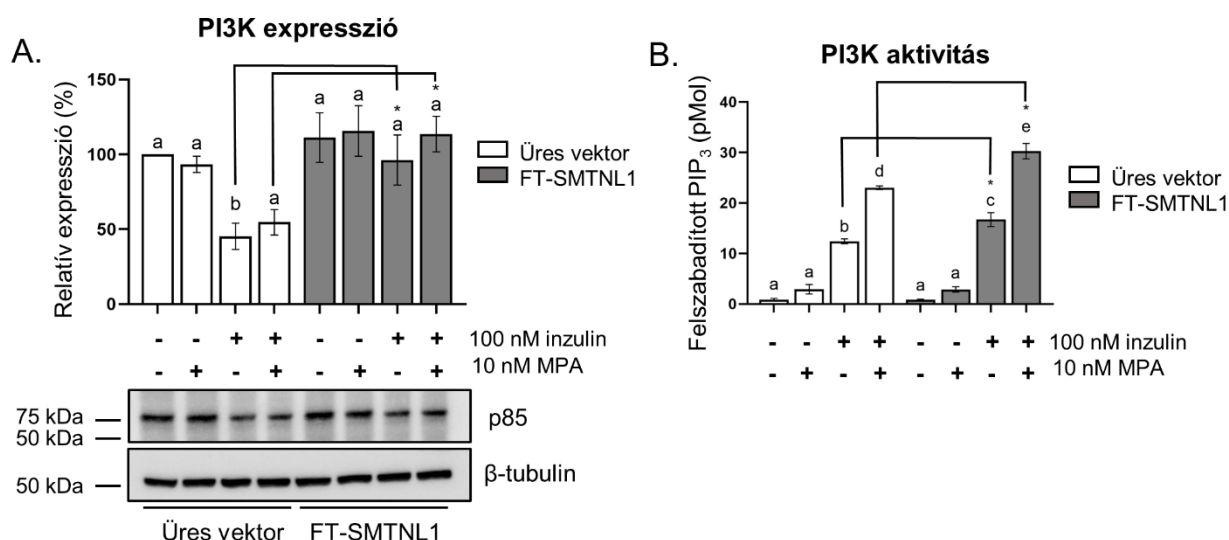
19. ábra. Az IRS1 expressziójának, valamint az IRS1 foszforilációs helyeinek Wester-blot elemzése. A differenciáltatás és az inzulinrezisztencia indukálása után a C2C12 sejteket

lizáltuk, majd Western-blot segítségével vizsgáltuk az IRS1 foszforilációját IRS^{S307} (A), IRS1^{S318} (B), IRS1^{S612} (C), IRS1^{S1101} (D) antitestekkel. Az IRS1 expresszióját is ellenőriztük (E). A SMNTL1 vs üres plazmida transzfektált sejtek adatai: Kétutas ANOVA: Sidak féle post hoc teszt: Átlag $\pm$ SEM; n=3; *, p<0,05). A különböző kezelések hatásának vizsgálatához: Kétutas ANOVA: Tukey's post hoc analízis: Átlag $\pm$ SEM; n=3; p<0,05; a különböző betűk jelzik a szignifikáns eltérést a vizsgált csoportok között ezeknél az ábráknál.

Megvizsgáltuk az inzulinrezisztencia IRS1 expresszióra kifejtett hatását **(19. ábra (E) panel)**. Az adatokból jól látszik, hogy inzulinrezisztens állapotban az IRS1 expressziója szignifikánsan lecsökken, ami utalhat a magas inzulin szint miatt fellépő degradációra is. Az IRS1 Ser³⁰⁷ **(19. ábra (A) panel)**, Ser³¹⁸, **(19. ábra (B) panel)**, és Ser⁶¹² **(19. ábra (C) panel)** foszforilációk megnövekedtek inzulinrezisztens állapotban, azonban az MPA kezelésnek önmagában nem volt hatása. A SMTNL1-et túltermelő sejtekben a vizsgált Ser oldalláncok csökkent foszforilációt mutattak MPA kezeléssel kombinálva, azonban az IRS Ser¹¹⁰¹-es foszforilációs szintje csökkent inzulinrezisztens sejtekben progeszteron nélkül is **(19. ábra (D) panel)**. A SMTNL1-nek feltehetőleg modulációs szerepe lehet, mivel a progeszteron receptor természetes ligandjával a progeszteronnal kezelt sejtekben az IRS1 Ser³⁰⁷, Ser³¹⁸, és a Ser⁶¹²-es oldalláncok foszforilációs szintjét csökkentette. Ezek alapján úgy véljük, hogy génexpressziós változásokat indukálva a SMTNL1 az IRS1-et foszforiláló kinázok és defoszforiláló foszfatázok génexpresszióját képes befolyásolni. Az IRS¹¹⁰¹-es foszforiláció úgy tűnik, hogy ligandum független módon szabályozóik.

4.2.3. Az SMNTL1 elősegíti a PI3K aktivitását inzulinrezisztens C2C12 sejtekben

Annak érdekében, hogy pontosabb képet kapjunk az inzulin jelátvitel egyik kulcsszereplőjéről, megvizsgáltuk a PI3K p85 alegység expresszióját **(20. ábra (A) panel)**, valamint megmértük a sejtizátumokból immunprecipitáció segítségével kinyert PI3K aktivitását **(20. ábra (B) panel)**.



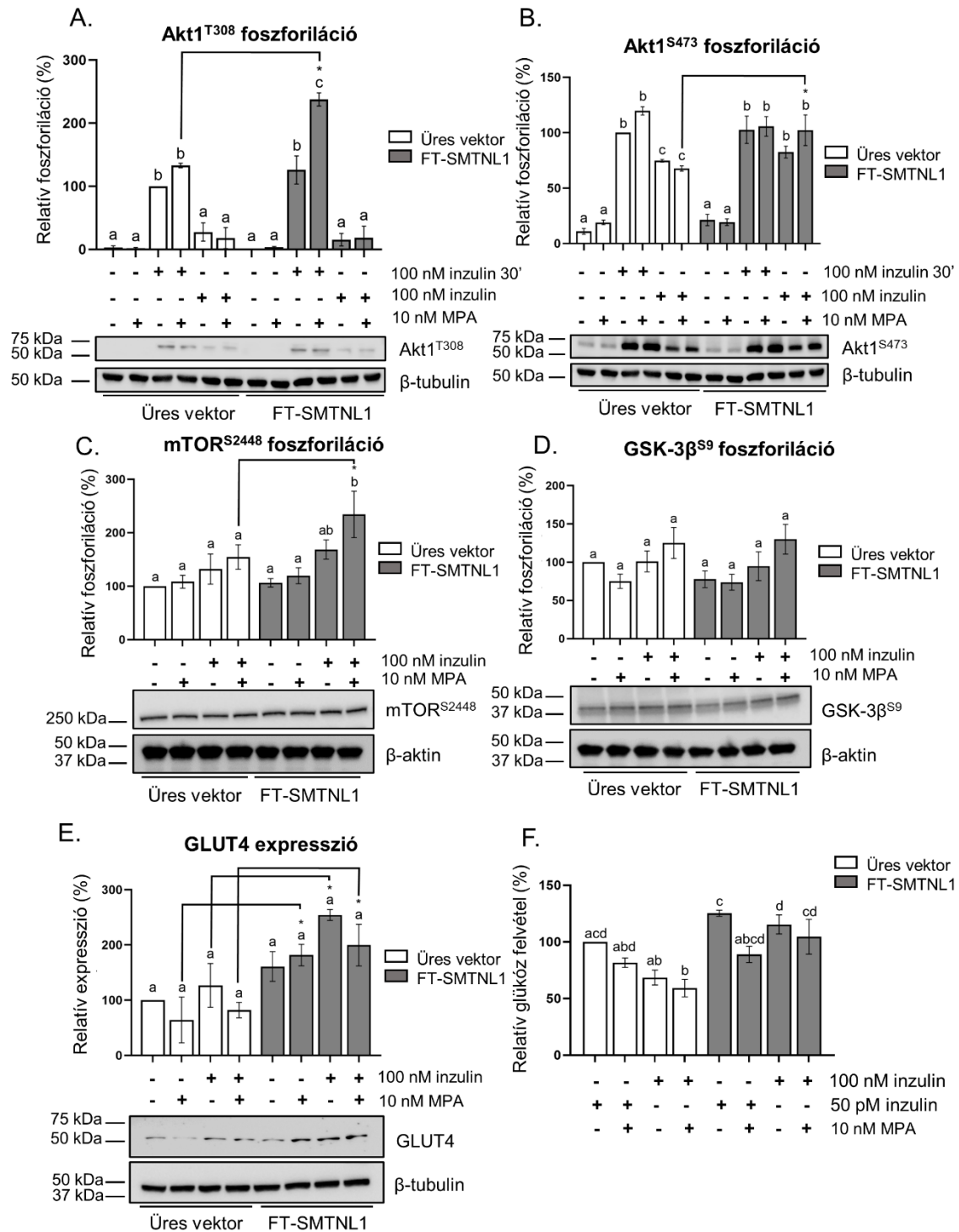
20. ábra. A SMTNL1 hatása a PI3K aktivitására és expressziójára inzulinrezisztens C2C12 sejtekben. PI3K p85 alegység expressziója differenciáltatott és kezelt C2C12 sejtekben (A). A PI3K aktivitást ELISA módszerrel mértük meg (B). A SMNTL1 vs üres plazmiddal transzfektált sejtek adatai: Kétutas ANOVA: Sidak féle post hoc teszt: Átlag $\pm$ SEM; $n=3$; *, $p<0,05$). A különböző kezelések hatásának vizsgálatához: Kétutas ANOVA: Tukey's post hoc analízis: Átlag $\pm$ SEM; $n=3$; $p<0,05$; a különböző betűk jelzik a szignifikáns eltérést a vizsgált csoportok között ezeknél az ábráknál.

A krónikus inzulin szint hatására a p85 expressziója szignifikánsan visszaesett, de az SMTNL1 túltermelés esetén, ez a hatás elmaradt az üres plazmiddal transzfektált sejtekkel összevetve. A PI3K aktivitást a felszabadult PIP₃ termék alapján mértük szendvics ELISA módszerrel. Az MPA kezelés, és a SMNTL1 túltermelés nem befolyásolta az enzimaktivitást inzulinrezisztens sejtekben, de maga az inzulin kezelés hatására a PI3K aktivitás megemelkedett. A krónikus inzulin hatását az MPA, valamint az SMNTL1 túltermelés képes volt tovább emelni inzulinrezisztens sejtekben. Ezek alapján elmondható, hogy a SMNTL1 serkenti a PI3K aktivitást C2C12 sejtekben a PI3K expressziójának visszaesése mellett is.

4.2.4. Az inzulin jelátvitel pálya szereplőinek szabályozása SMTNL1 által.

Az Akt/PKB foszforilációja (21. ábra (A) és (B) panel), valamint aktivációja inzulin rezisztens sejtekben megnövekedett, amelynek hatására az inzulin jelátvitel további szereplői is aktiválódtak. Mind a Thr³⁰⁸ és a Ser⁴⁷³-as oldallánc is foszforilálódott az akut 30 perces stimuláció hatására, azonban az MPA hatására nem tapasztaltunk változást. Az Akt1 aktivitása tovább fokozódott az inzulinrezisztens sejtekben. Az SMTNL1 nem befolyásolta az Akt1 expressziót (nem prezentált eredmények), de képes volt drasztikusan befolyásolni az Akt1

foszforilációját a Ser⁴⁷³-as oldalláncon. Az inzulinrezisztens állapot megfigyeléséhez két új kezelést hajtottunk végre. Ezekben a mintákban a sejtek fiziológiás inzulint és glükózt kaptak hosszú távon. Magas inzulint csupán az utolsó 30 perces kezelés során kaptak. A kapott eredményekből látszik, hogy a fiziológiás körülmények között tartott sejtek egy 30 perces magas inzulinra jóval magasabb Akt1 foszforilációval reagáltak. Ezzel ellentétben a krónikus hosszú távú inzulin kezelés után magas inzulinnal stimulált sejtek már nem képesek Akt aktivációra, amely az inzulinrezisztencia kialakulására utal. A lecsökkent Akt1 foszforiláció a számos inzulinrezisztencia marker egyike. Az fentebb említett eredmények mellett a SMTNL1 túltermelés MPA kezeléssel kombinálva magasabb Akt Thr³⁰⁸-as foszforilációt eredményezett a fiziológiás kezelés utáni akut 30 perces 100 nM-os kezelés hatására. Az Akt1 Ser⁴⁷³-as foszforilációját SMTNL1 túltermelése MPA kezeléssel kombinálva még inzulinrezisztens állapotban is magasan tudta tartani.



21. ábra. A SMTNL1 overexpresszió és az inzulinrezisztencia hatása az inzulin jelátviteli pályára. Az Akt1 foszforiláció esetében (A-B panel) ugyanazt a kezelési eljárást használtuk, viszont ehhez két új kezelést adtunk hozzá. A 72 órás fziológias körülmények között történő kezelést követően ezek a minták 100 nM inzulint kaptak az utolsó 30 perces kezelés során. Ezekben a sejtekben az Akt1 foszforilációja meghaladta a krónikus inzulin kezelést kapott sejtekben lévő Akt1 foszforilációt. A kísérletek során megvizsgáltuk továbbá az mTOR^{S2448} foszforilációját (C), a GSK-3β^{S9} foszforilációját (D), és a GLUT4 expresszióját (E). A glükóz

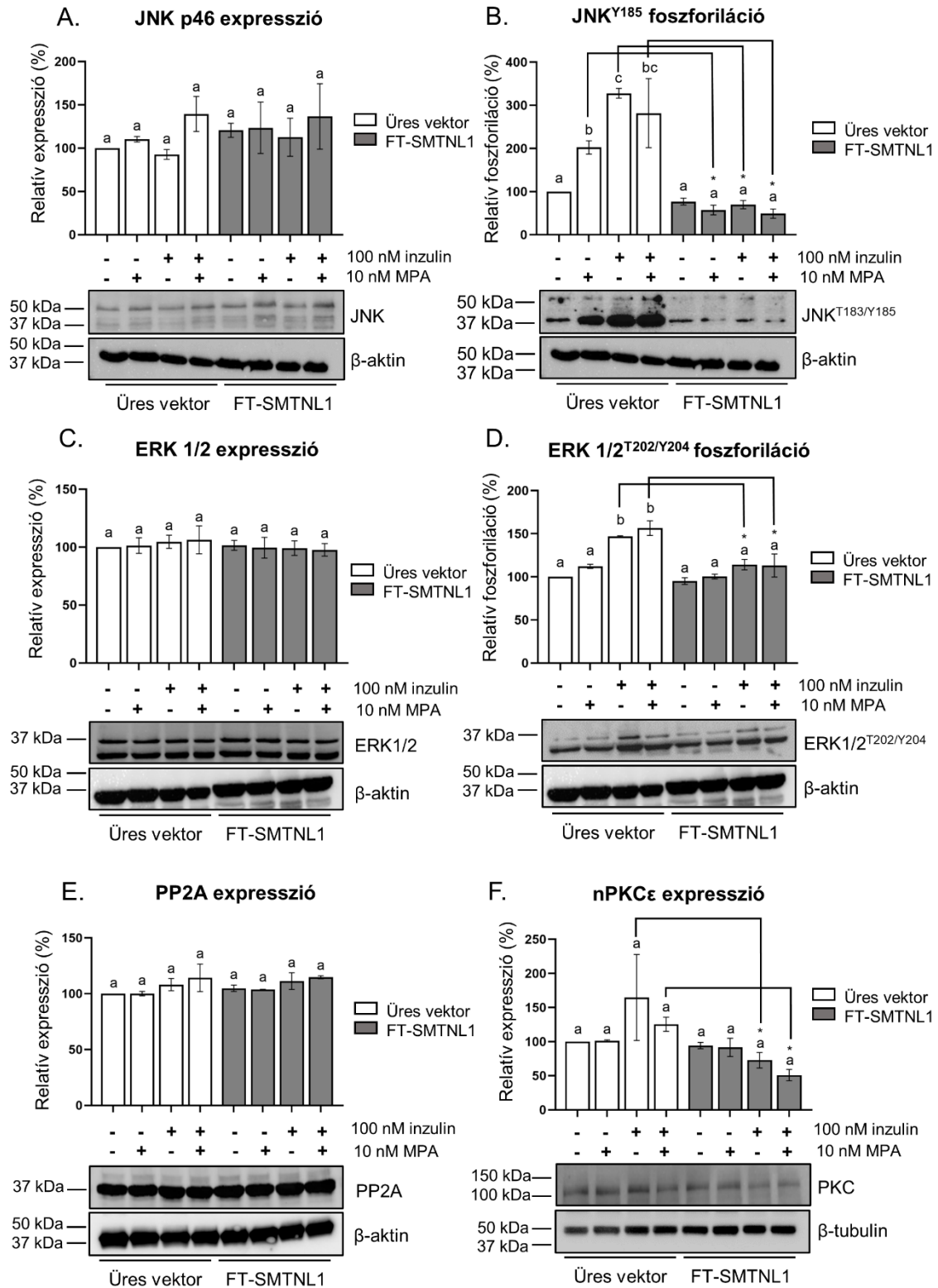
*felvételi esszéhez 2-NBDG fluoreszcens vizsgálatot használtunk (F). A SMNTL1 vs üres plazmida transzfektált sejtek adatai: Kétutas ANOVA: Sidak féle post hoc teszt: Átlag $\pm$ SEM; $n=3$; *, $p<0,05$). A különböző kezelések hatásának vizsgálatához: Kétutas ANOVA: Tukey's post hoc analízis: Átlag $\pm$ SEM; $n=3$; $p<0,05$; a különböző betűk jelzik a szignifikáns eltérést a vizsgált csoportok között.*

A glikogén-szintáz-kináz (GSK-3 β) expresszióját (nem bemutatott eredmény), valamint a Ser⁹-es foszforilációját nem befolyásolta szignifikánsan semmilyen kezelés **(21. ábra (D) panel)**. A downstream effektorok közül az mTOR expressziója (nem bemutatott adat), valamint a Ser²⁴⁴⁸-as foszforilációja nem változott meg a krónikus inzulin, valamint MPA jelenlétében. Abban az esetben viszont, ha a sejtek túltermelték a SMTNL1-et, és MPA-val voltak kezelve az mTOR aktivációját váltotta ki **(21. ábra (C) panel)**. Megvizsgáltuk továbbá az mTOR downstream elemének, a p70S6 kináz foszforilációját is, mely nem mutatott változást (nem bemutatott adatok), valamint az expressziójában is tapasztaltunk kisebb növekedést magas inzulin hatására.

Végezetül a GLUT4 expresszióját is megvizsgáltuk, ami szignifikáns emelkedést mutatott SMTNL1-et túltermelő és inzulinrezisztens sejtekben **(21. ábra (E) panel)**. Ezen felül a glükóz felvétel szignifikánsan megnövekedett SMTNL1-et túltermelő sejtekben az üres plazmida transzfektált sejtekhez képest **(21. ábra (F) panel)**. Összefoglalva, eredményeink arra utalnak, hogy a SMTNL1 túltermelés segít megőrizni az inzulin jelátvitel integritását az inzulin jelátviteli pálya downstream elemeinek foszforilációja révén, valamint a SMTNL1 hatással van továbbá a glükózfelvételre is a GLUT4 expresszió szabályozása révén.

4.2.5. A SMTNL1 a JNK, ERK1/2 és IRS1 foszforilációját szabályozza egy új típusú PKC expressziója révén

A következő kísérletek során potenciális upstream regulátorokat is górcső alá vettünk. Mivel mind az ERK1/2 és JNK foszforilációját befolyásolta az inzulinrezisztencia és a SMNTL1 túltermelés a proteome profiler elemzés alapján **(18. ábra)**. Western-blot segítségével megvizsgáltuk ezeknek a protein kinázoknak az expressziós szintjét, valamint a foszforilációs állapotát. Az említett fehérjék expressziós szintje nem változott **(22. ábra (A) és (C) panel)**.



22. ábra. A JNK, ERK1/2 foszforilációjának, valamint a PP2A és PKC expressziójának vizsgálata Western blot segítségével. A preparált mintákból megvizsgáltuk a SAPK/JNK(A), valamint SAPK/JNK^{Y185}(B), az ERK1/2(C), ERK1/2^{T202/Y204} (D) foszforilációját, a PP2A expresszióját (E) és a nPKCε (F) expresszióját. A SMTNL1 vs üres plazmival transzfektált

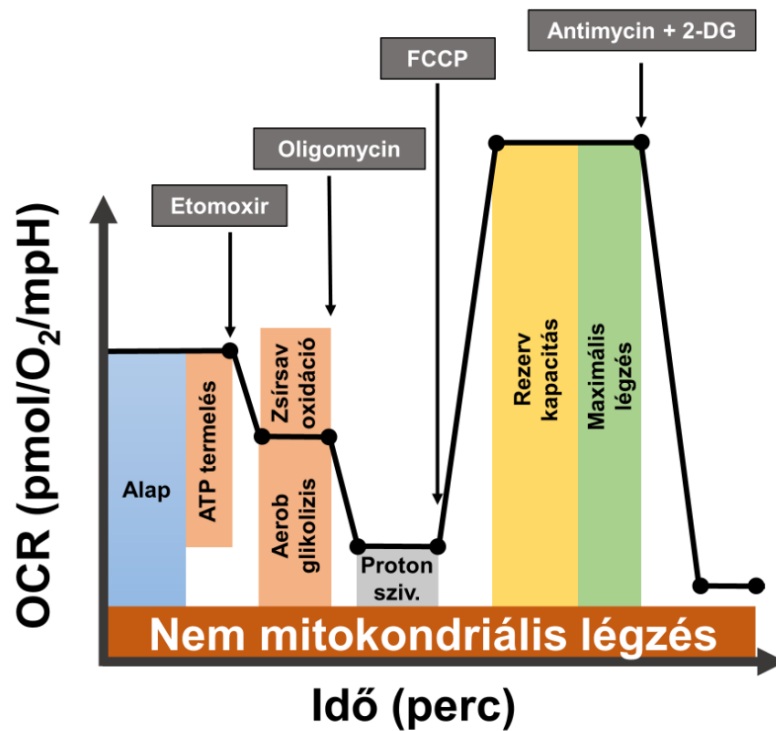
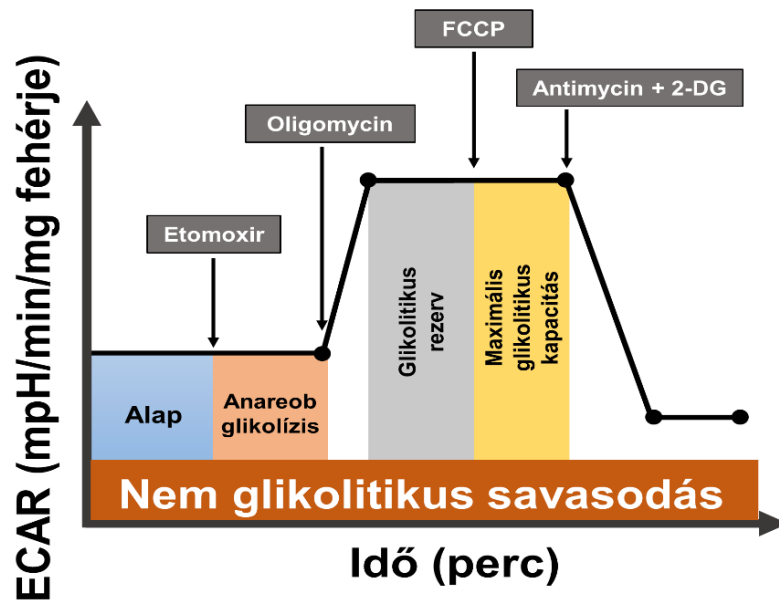
*sejtek adatai: Kétutas ANOVA: Sidak féle post hoc teszt: Átlag $\pm$ SEM; $n=3$; *, $p<0,05$). A különböző kezelések hatásának vizsgálatához: Kétutas ANOVA: Tukey's post hoc analízis: Átlag $\pm$ SEM; $n=3$; $p<0,05$; a különböző betűk jelzik a szignifikáns eltérést a vizsgált csoportok között.*

Az ERK1/2^{Thr202/Tyr204} és JNK^{Tyr185} foszforilációs szintek szignifikánsan növekedtek magas inzulin hatására, amelyet az SMTNL1 túltermelése képes volt csökkenteni **(22. ábra (B) és (D) panel)**. Az ERK és JNK MAPK (mitogén-aktivált protein kináz) szabályozásáért felelős protein foszfatáz 2A expressziója nem változott ebben a kísérleti rendszerben **(22. ábra (E) panel)**, azonban az új típusú PKC ϵ expressziója 50%-os visszaesését mutatott az overexpresszió hatására az üres plazmiddal való transzfekcióhoz képest **(22. ábra (F) panel)**. Megvizsgáltuk továbbá az atipikus PKC Zeta izoformáját is (PKC ζ – nem prezentált adatok), de ennek expressziójában szignifikáns eltérést nem tapasztaltunk. Ezek alapján a SMTNL1 az ERK1/2 hatását annak aktivitását fokozó PKC ϵ expressziójának gátlása révén képes befolyásolni.

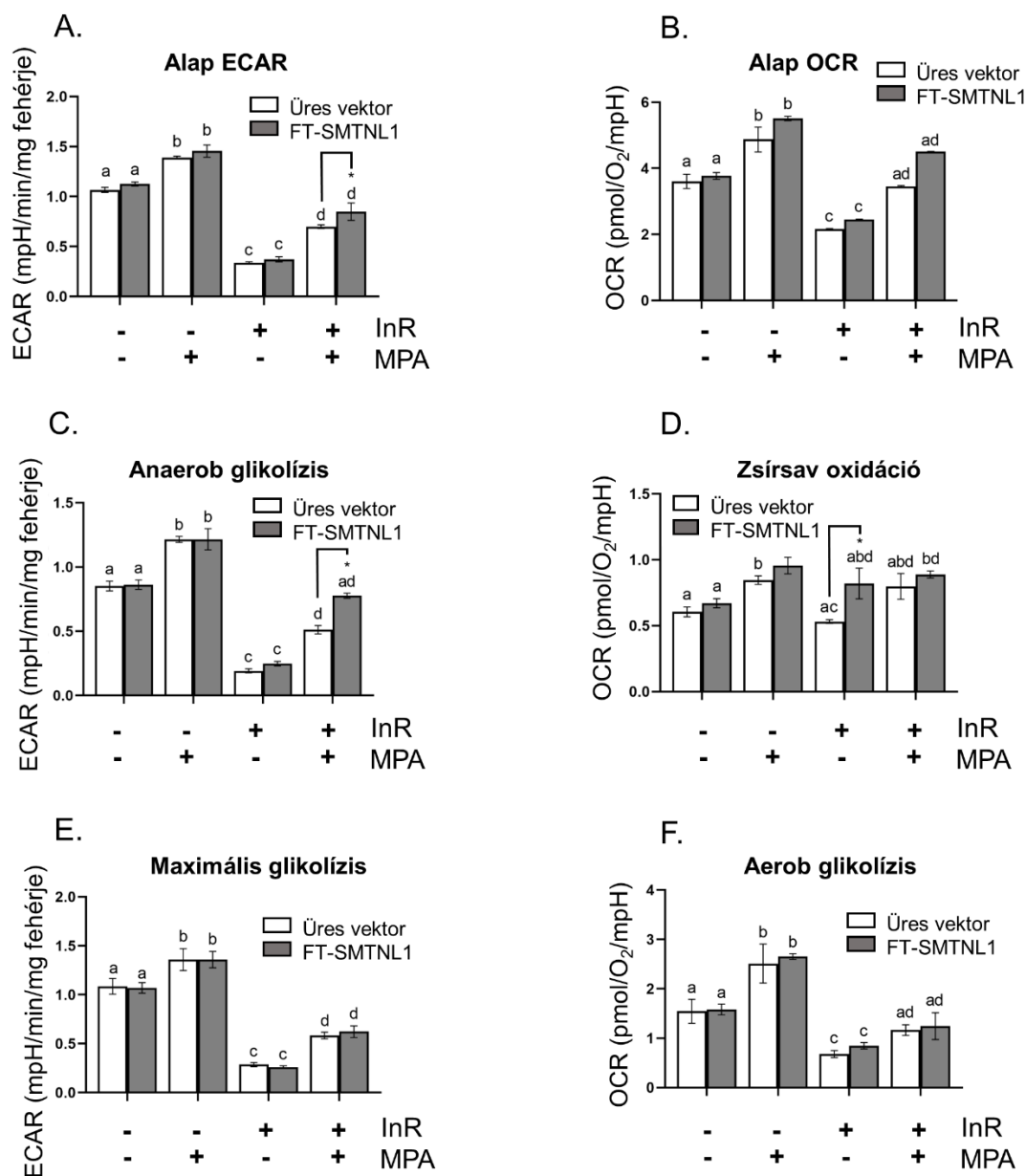
4.2.6. A SMTNL1 serkenti a glikolízist és a mitokondriális légzést inzulin rezisztens sejtekben

Az energiatermelő útvonalak vizsgálatához valós idejű méréseket végeztünk C2C12 sejteken. A mérések során az extracelluláris savasodást (Extracellular acidification rate – ECAR - **(23. ábra (A) panel)** panel, illetve az oxigén fogyasztás mértékét (Oxygen Consumption Rate – OCR - **(23. ábra (B) panel)** panel vizsgáltuk.

A mérések során az üres plazmiddal transzfektált sejteket hasonlítottunk össze a SMTNL1-gyel túltermeltetett sejtekkel, melyekben inzulinrezisztenciát alakítottunk ki, valamint MPA-val kezeltük. A glükóz oxigéntől független tejsavvá alakulása protonokat pumpál az extracelluláris térbe, mely a médium savasodását eredményezi **(24. ábra (A) panel)**. Különböző inhibitorok úgy, mint oligomycin, 2-DG antimycin A-val együtt történő egymás utáni injektálásával mértük a glikolízis hatékonyságát, a glikolitikus kapacitást, és ezekből tudtuk származtatni a glikolitikus tartalékot, valamint a nem glikolízisből származó savasodás mértékét is.



23. ábra. A Seahorse XF 96 mérések során használt inhibitorok, és a hatásuk által mérhető sejtanyagcsere paraméterek, a mérések során alkalmazott injektálási sorrend. A sejteket Seahorse XF 96 plate-eken tenyésztettük, a kísérletek során, mind a glikolitikus (ECAR – (A)), mind az oxidatív (OCR – (B)) paramétereket nyomon követtük.



24. ábra. C2C12 sejtek energetikai paraméterei SMTNL1 túltermeltetés után in vitro inzulinrezisztencia modellben. Az inhibitorok injektálása előtt felvettük az alapvonalakat ECAR (A) és OCR (B). A Seahorse XF96 mérések során nyomon követtük az anaerob glikolízist (C), a zsírsav oxidációt (D), a maximális glikolízist (E) továbbá az aerob glikolízist (F) is. A technikai replikátumok $n=23$ plate-enként a 96 well-t 4 részre osztottuk (24-1), ezekből 1 well volt a vak mérés, ebben nem voltak sejtek. A mérések után az értékeket fehérje mennyiségekhez normalizáltuk. A SMTNL1 vs üres plazmida transzfektált sejtek adatai: Kétutas ANOVA: Sidak féle post hoc teszt: Átlag $\pm$ SEM; $n=3$; *, $p<0,05$). A különböző kezelések hatásának vizsgálatához: Kétutas ANOVA: Tukey's post hoc analízis: Átlag $\pm$ SEM; $n=3$; $p<0,05$; a különböző betűk jelzik a szignifikáns eltérést a vizsgált csoportok között.

Az alap ECAR jelentősen megnövekedett MPA hatására, de drasztikusan lecsökkent krónikus inzulin hatására. Ezt a csökkenést volt képes a SMTNL1 túltermelés helyreállítani MPA jelenlétében **(24. ábra (A) panel)**. Hasonló eredményeket kaptunk az anaerob glikolízis számítása során. Az SMTNL1 túltermelése az ECAR jelentős növekedését eredményezte MPA kezeléssel együtt inzulinrezisztencia esetében az üres plazmával transzfektált sejtekkel összevetve **(24. ábra (C) panel)**. A maximális glikolízist az MPA kezelés megemelte, inzulinrezisztencia hatására viszont csökkent, és a SMTNL1 túltermelés nem befolyásolta a maximális glikolízist **(24. ábra (E) panel)**, valamint a glikolitikus tartalékot sem. (nem bemutatott adatok).

A mitokondriális légzést OCR-ként mértük az etomoxir, oligomocin, FCCP, és antimicin egymás utáni hozzáadását követően **(23. ábra (B) panel)**, ezzel vizsgáltuk az alap légzési arányt, ATP termelést, protoncsorgást, maximális légzést, és a nem mitokondriális légzést. A krónikus inzulin kezelés csökkentette az OCR-t, az MPA hatására ez a csökkenés nem volt megfigyelhető **(24. ábra (B) panel)**. Az alternatív tápanyagforrás esetleges változásához a zsírsavoxidáció mértékét az etomoxir és az oligomocin kezelésekre hatására tapasztalt OCR értékek különbségeként számoltuk. Az MPA növelte, az inzulinrezisztens állapot csökkentette, és a SMTNL1 túltermelés kis mértékben növelte a zsírsavoxidációs potenciált **(24. ábra (D) panel)**. Az aerob glikolízis **(24. ábra (F) panel)**, OCR tartalék (nem bemutatott adat), és a maximális respiráció (nem bemutatott adat) nem változott SMTNL1 túltermelés hatására. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a SMTNL1 főleg a glikolitikus útvonalon hat, ahol az alap ECAR-t képes növelni a kontroll sejtekhez viszonyítva. Ezek az eredmények tovább erősítik a hipotézisünket, miszerint a SMTNL1 inzulinérzékenyítő hatással bír.

5. Megbeszélés

5.1. *A miozin foszfatáz szerepe az ingerület átvivő anyagok felszabadulásában*

Bár az exocitózist kiváltó legfőbb sejtélettani mozzanat a Ca^{2+} ionok beáramlása az idegsejtekbe, számos kutatási adat utal arra, hogy ebben a folyamatban fontos szabályozó szerepet játszik a SNARE komplexet felépítő fehérjék (szintaxin, szinapszin, SNAP-25) foszforilációja és defoszforilációja is (Turner, Burgoyne and Morgan, 1999; Morgan *et al.*, 2005; Snyder, Kelly and Woodbury, 2006). A különböző foszforilációk hatásáról azonban eltérő vélemények születtek, a fiziológiai hatásokra megváltozott SNAP-25 foszforilációról már több adat is napvilágot látott (Tolar and Pallanck, 1998; Risinger and Bennett, 1999).

A MYPT1 és a SNARE komplex elemei között kialakuló kölcsönhatásokat munkacsoportunk előzetes tömegspektrometriai és pull-down kísérletekkel sikeresen bizonyította (Lontay *et al.*, 2012). Ezekre az eredményekre alapozva vizsgáltunk tovább. Arra voltunk kíváncsiak, hogy a SNAP-25-öt foszforilálni tudja-e a ROK, és vajon a defoszforilációért a MP-e felelős az előzőleg kritikusan leírt Thr¹³⁸-as foszforilációs oldalláncon, valamint milyen élettani hatása van a foszforilációnak és a defoszforilációnak.

Vizsgálataink során sikeresen igazolni tudtuk a SNAP-25 Thr¹³⁸ oldallánc ROK általi foszforilációját, melynek reverzibilitásáért a miozin foszfatáz által katalizált defoszforilációs folyamat felelős. A két enzim egymásnak ellent ható módon befolyásolja a SNAP-25-t, és ezáltal a SNARE komplex működését. A foszforilációval kapcsolatos eredményeink összhangban vannak korábbi, kortikális szinaptoszómákon, és egér óriás hallóidegén végzett tanulmánnyal, melyben sikerült kimutatni a ROK és MP jelenlétét, valamint ezen enzimek exocitózisban betöltött szerepét leírni (Lontay *et al.*, 2012). A két enzimnek ellentétes hatása van: a PP1 gátlása csökkenti, míg a ROK gátlása növeli az exocitózis mértékét (Lontay *et al.*, 2012). A jelenlegi eredmények ennek a kutatásnak a folytatásaként is értelmezhetőek.

Első lépésben a MYPT1 és a SNAP-25 kölcsönhatását vizsgáltuk felületi plazmon rezonanciás eljárással (**13. ábra**). Ezzel nem csak a kölcsönhatás meglétét, hanem a SNAP-25 fehérje kölcsönhatásáért felelős MYPT1 régiót is sikerült meghatározni. Ezen felül a kötődés erősségét is sikerült kvantifikálni, a kísérletek során mért disszociációs egyensúlyi állandó értékek segítségével. Ezek alapján a MYPT1 szabályozó alegység C-terminális régiója köti legerősebben a SNAP-25-öt.

A kölcsönhatást továbbá immunprecipitációval is sikerült bizonyítani, mely alapján az is kiderült, hogy a SNAP-25 nem képes közvetlenül a PP1cδ-hoz kötődni. Továbbá

immunofluoreszenciás eljárással a SNAP-25 és a MYPT1 jelenlétét is sikerült bizonyítani B50 sejtekben (Horváth *et al.*, 2017).

Irányított mutagenézis segítségével sikerült a SNAP-25 Thr¹³⁸ -> Ala¹³⁸-as mutánsát létrehozni. *In vitro* ROK protein kináz reakcióban a vad típusú SNAP-25-öt a ROK foszforilálta, míg a mutáns SNAP-25 esetében nem figyeltünk meg foszforilációt. Ezeket a SNAP-25 ellen termeltetett foszfospecifikus antitestekkel sikerült kimutatnunk Western-blot segítségével (**14. ábra**). Ez alapján a SNAP-25 fehérjét, mint új szubsztrátot sikerült leírunk, melyet tovább erősítenek a SNAP-25-tel végzett tömegspektrometriás, valamint *in vitro* autoradiográfiás és *in vitro* ROK foszforilációs, majd MP defoszforilációs eljárásokkal kapott eredmények. Ezek alapján a ROK a SNAP-25 Thr¹³⁸-as oldalláncát foszforilálja, a MP pedig képes hasítani a beépült foszfátot ezen az aminosav maradékon *in vitro* (Horváth *et al.*, 2017). B50 sejtekben csendesítve a MP MYPT1 alegységét a sejtek életképességének szignifikáns csökkenését figyeltük meg, ezzel párhuzamosan a sejtekből készített lizátumokban csökkent PP1 enzimaktivitást mértünk, valamint a SNAP-25 Thr¹³⁸ oldalláncának emelkedett foszforilációját is megfigyeltük. A géncsökkentést, valamint a SNAP-25 foszforilációs szintjét Western-blot technikával igazoltuk vissza (**15. ábra**). Eredményeink arra utalnak, hogy az idegi eredetű sejtekben a miozin foszfatáz egy igen fontos enzim, melynek hiánya drasztikus hatással van a sejtek életképességére. Jelenlegi kutatásunk, összhangban van kutatócsoportunk előzetes eredményeivel, - melyek alapján a miozin foszfatáz, az egyik domináns PP1 holoenzim szinaptoszómákban, valamint a MP az egyik kulcsszereplő az idegi fehérjék defoszforilációjában (Lontay *et al.*, 2004).

A SNAP-25 foszforilációi mögött lévő élettani hatások felderítésére több munkacsoport is vállalkozott korábbi kutatások során. Gao és munkatársai négy foszforilációs helyet azonosítottak, melyeket a PKA és a PKC is foszforilálnak: Ser²⁸, Thr²⁹, Thr¹³⁸, és a Ser¹⁸⁷ (Gao *et al.*, 2012, 2016). Ezeket a munkákat megelőzve a Thr¹³⁸, és a Ser¹⁸⁷ oldalláncokat azonosították, mint PKA és PKC célpontok (Shimazaki *et al.*, 1996; Risinger and Bennett, 1999; Nagy *et al.*, 2002, 2004; Gao *et al.*, 2012, 2016). Az élettani szerepek feltérképezése során a következő eredmények születtek: a Ser¹⁸⁷-et főként a PKC foszforilálja, mely a SNARE komplex kialakulásában, valamint a vezikulumok plazmamembránhoz való migrációjában játszik szerepet. (Shimazaki *et al.*, 1996; Nagy *et al.*, 2002; Gao *et al.*, 2012, p. 201, 2016). Kutatási eredmények arra is utalnak, hogy a SNAP-25 Ser¹⁸⁷-es foszforilációja elősegíti a szinaptobrevin *t*-SNARE-hez való kötődését, növelve a komplex stabilitását. PC12 sejtekben a PKC aktivációja elősegítette a K⁺ indukálta noradrenalin szekréciót (Gao *et al.*, 2016).

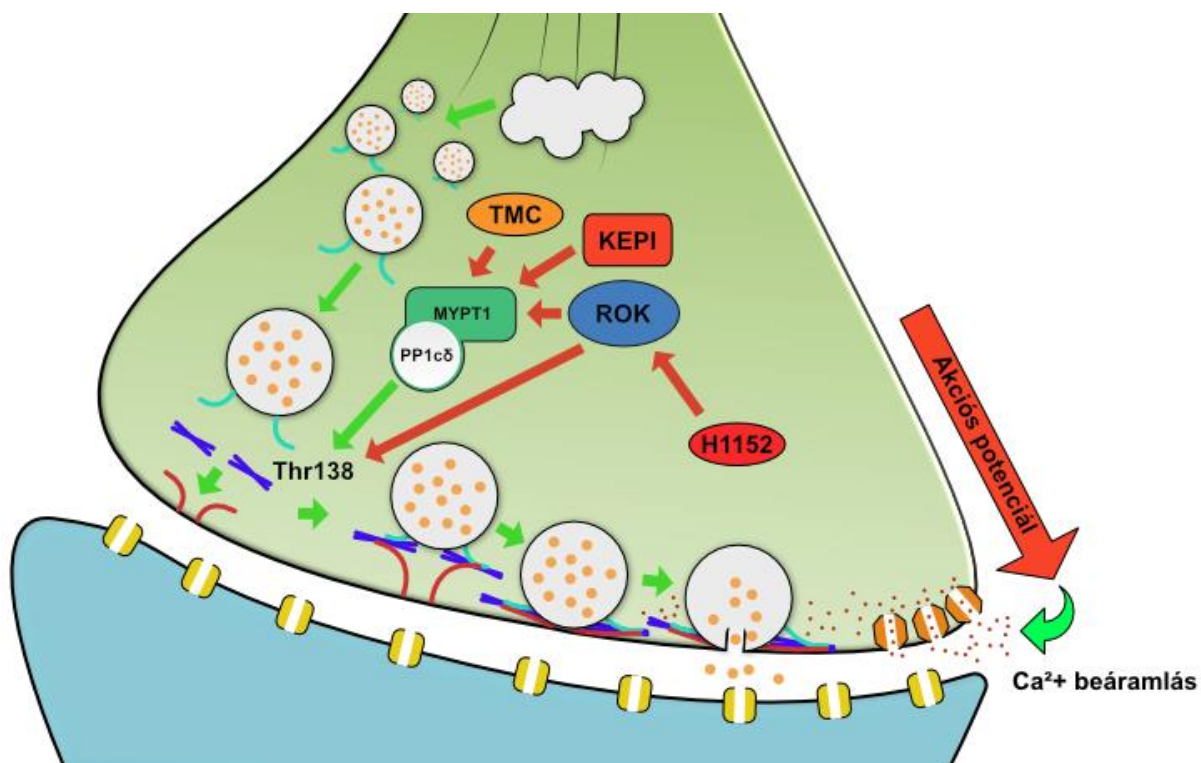
Egy további munkában a SNAP-25 PKC általi foszforilációja nem befolyásolta a neurotranszmitter felszabadulását. A SNAP-25 Ser¹⁸⁷-es oldalláncát nem tartalmazó mutánsával végzett kísérletek során a neurotranszmisszió mértéke nem változott, sőt a SNAP-25 Ser¹⁸⁷ -> Glu¹⁸⁷ mutánsával csökkent neurotranszmissziót figyeltek meg CA3 piramidális sejtekben PMA kezelés hatására (Finley, Scheller and Madison, 2003). Ezen eredmények ellentmondásosak az előzőleg leírt eredményekkel (Shimazaki *et al.*, 1996; Genoud *et al.*, 1999; Nagy *et al.*, 2002).

Az előzőek alapján elképzelhető, hogy egymással „versengő” útvonalak léteznek, melyek aktiválhatják a neurotranszmitter kibocsátást (Takahashi, Itakura and Kataoka, 2003). Nagy és munkatársainak további eredményei arra utalnak, hogy a PKA szabályozza a kibocsátható vezikula pool méretét, míg a PKC a vezikulák ingerület átvivő anyagokkal való feltöltődésében, és a vezikula „toborzásban” játszhat szerepet (Nagy *et al.*, 2004). A Ser¹⁸⁷-es foszforilációs hely élettani szerepét az is tovább erősíti, hogy a feszültség függő Ca²⁺ csatornákkal interakcióba lépő, és a Ser¹⁸⁷-es oldalláncon foszforilált SNAP-25 gátolta ezen ioncsatornák működését (Pozzi *et al.*, 2008).

A SNAP-25 Thr¹³⁸-as foszforilációjával kapcsolatban a SNARE komplex kialakulásának gátlását figyelték meg (Risinger and Bennett, 1999). A Thr¹³⁸-as aminosav a fehérje azon részén található, mely a szintaxin-I-el való interakcióját befolyásolja. Ennek megfelelően a PKA aktivációja mind tisztított SNAP-25, mind PC12 sejtek esetében (forszkolin kezelés hatására) a SNARE komplex kialakulásának gátlását eredményezte (Gao *et al.*, 2016). Bizonyos kutatási eredmények ennek ellentmondva viszont arra utalnak, hogy forszkolin kezelés és PKA aktiváció hatására a Thr¹³⁸-as oldallánc foszforilációja megemelkedett, viszont az exocitózis mértékében nem figyeltek meg változást (Hepp, Cabaniols and Roche, 2002). További eredmények alapján a PKA aktiváció indirekt módon segítette elő a Ca²⁺ általi exocitózist úgy, hogy egy exocitózisra kész vezikula poolt tartott fenn kromaffin sejtekben (Nagy *et al.*, 2004). Ezzel a jelenséggel kapcsolatban írták le a vezikula priming folyamatát. A Thr¹³⁸ -> Asp¹³⁸ mutáció azonban nem befolyásolta az exocitózis mértékét szignifikáns mértékben (Nagy *et al.*, 2004; Fu *et al.*, 2005).

A saját kísérleti eredményeink rávilágítottak arra, hogy a Thr¹³⁸-as foszforiláció gátló hatású. Szinaptoszómákat TMC-vel (PP1 gátlás) kezelve, majd immunprecipitációt végezve a szintaxin kevesebb SNAP-25-öt volt képes megkötni (**16. ábra**). Ezek az eredmények Gao és munkatársainak eredményeivel vannak összhangban, ahol a *in vitro* kísérletekben a SNAP-25 foszforiláció hatására kevesebb szintaxint volt képes kötni, a SNAP-25 Thr¹³⁸-as foszforilációja

bizonyos esetben PC12 sejtekben gátolta a noradrenalin felszabadulását (Gao *et al.*, 2016). Ezzel együtt a KCl indukálta depolarizáció is csökkenti a Thr¹³⁸-as foszforilációt kortikális szinaptoszómákban, melyet tovább erősített a H1152 (ROK gátlás) kezelés. TMC hatására ennek fordítottját figyeltük meg, azaz emelkedett foszforilációt mértünk ezen az oldalláncon (**16. ábra**). Az előbb taglalt eredményeket még inkább alátámasztják a TMC és H1152-vel kezelt B50 neuroblasztóma sejtekkel kapcsolatos adatok. A TMC kezelés hatására a SNAP-25 Thr¹³⁸-as oldalláncának emelkedett foszforilációja volt megfigyelhető, valamint TMC inhibitor kezelés hatására a géncsendesítéshez hasonlóan csökkent a protein foszfatáz aktivitás (Horváth *et al.*, 2017). A PP1c és MP-re specifikus inhibitor peptidjét (KEPI) szinaptoszómákba juttatva pedig az exocitózis mértékének csökkenését sikerült elérni, mellyel együtt a SNAP-25 Thr¹³⁸-as emelkedett foszforilációja is detektálható volt (Horváth *et al.*, 2017).



25. ábra. A ROK és MP enzimek a SNAP-25 Thr¹³⁸ foszforilációján keresztül szabályozzák az exocitózist idegsejtekben. A miozin foszfatáz a SNAP-25 defoszforilációja által hozzájárul a SNARE komplex felépüléséhez (SNAP-25 – szintaxin kölcsönhatás), és ez által az ingerület átvívó anyagok felszabadulásához. A ROK a SNAP-25 fehérjét foszforilálva a Thr¹³⁸-as oldalláncon gátolja az exocitózist. A ROK gátló hatását a MYPT1 alegység foszforilációján keresztül is kifejti.

Eredményeink tovább erősítik azt az elgondolást, miszerint a PP1 enzimek felelősek SNARE komplex foszforiláció általi szabályozásában (Baldwin, Rostas and Sim, 2003; Mansuy and Shenolikar, 2006).

Korábbi kutatási eredmények alapján a SNAP-25 defoszforilációjában a PP1 az egyik kulcs enzim. Kisebb mértékben a PP2A, míg a PP2B egyáltalán nem defoszforilálja *in vitro* ezt a fehérjét (Gao *et al.*, 2016). Defoszforilációt tekintve a PP1 enzimek mind a négy előzőleg azonosított oldalláncot képesek defoszforilálni (Gao *et al.*, 2012), ami arra is utal, hogy a PP1 valóban az egyik legfőbb protein foszfatáz, mely a SNAP-25 defoszforilációjáért felelős.

Egér agyszeleteket H1152-vel és TMC-vel kezelve, az előzőleg részletezett adatokhoz hasonló eredményeket kaptunk. Immunofluoreszenciás eljárással, és konfokális mikroszkópia segítségével a SNAP-25 Thr¹³⁸-as oldalláncán emelkedett foszforilációt mértünk **(17. ábra)** a MP gátlásának következtében. Eredményeink összhangban vannak továbbá azokkal az előzetes kísérleti adatokkal is, melyek alapján kortikális szinaptoszómákat H1152-vel (ROK gátlás) kezelve a depolarizáció indukált neurotranszmitter felszabadulás megemelkedett, míg a TMC (PP1 gátlás) kezelés csökkentette ennek mértékét. (Lontay *et al.*, 2012).

A ROK és MP szerepét előzőleg már sikeresen leírták, mint preszinaptikus fehérjék foszforilációs szintjét befolyásoló enzim párost. A SNARE komplex szinapszin I tagját a Ser⁹, a szintaxin 1-et a Ser¹⁴ oldalláncon képesek módosítani (Lontay *et al.*, 2012). A szinapszin módosítása a vezikulumok az exocitózis helyére, azaz aktív zónához történő migrálását képes szabályozni. Az MP és ROK enzimpáros képes továbbá a Tau fehérje foszforilációs állapotát is befolyásolni, ennek hatása a mikrotubulusok dinamikáját modulálja, valamint a vezikulumok szállításában játszik szerepet (Kiss, Erdődi and Lontay, 2019b). Eredményeink alapján a ROK/MP enzimpáros az ingerület átvivő anyagok felszabadulásának folyamatát képesek finom hangolni a SNARE komplex SNAP-25 tagján keresztül.

Összefoglalva, a SNAP-25 kölcsönhat a miozin foszfatázzal, annak MYPT1 alegységén keresztül. A ROK képes a SNAP-25 fehérjét annak Thr¹³⁸-as oldalláncán foszforilálni, amely folyamat reverzibilitásáért a miozin foszfatáz is felelős. A defoszforiláció következtében a SNAP-25 és a szintaxin között erősebb kölcsönhatás alakul ki, melynek hatására a SNARE komplex kialakulása kevésbé gátolt, ezzel növelve az exocitózis mértékét. Az általunk feltételezett folyamatot a **(25. ábra)** foglalja össze.

5.2. A SMNTL1 szerepe az inzulin jelátvitel szabályozásában

A tudományos munkámnak második részében a SMTNL1 hatását mutattam be differenciáltatott C2C12 sejtekben létrehozott indukált inzulinrezisztencia modellen keresztül. Progeszteron jelenlétében a SMTNL1 túltermelés csökkentette az IRS1 szeril-aminosavmaradékain lévő foszforilációt, mely a PI3K/Akt jelátviteli útvonalat aktiválódására utal. A kutatási eredményeink arra utalnak, hogy a SMNTL1 génexpressziós szinten fejt ki hatását, mégpedig egy új típusú (novel - nPKC) PKC expressziójának szabályozásán keresztül, amely az IRS1 Ser³¹⁸ oldalláncát közvetlenül, míg annak Ser⁶¹²-es oldalláncát közvetett módon az ERK1/2 aktivitásán keresztül szabályozza.

A vázizomzatban lejátszódó inzulin jelátvitel kaszkádot és az inzulinrezisztencia kialakulásában szerepet játszó szabályozó elemeket tömegspektrometriás eljárásokon alapuló módszerekkel már részletesen tanulmányozták (Mullen and Ohlendorf, 2010). Több munkacsoport által feltárt eredmények is arra utalnak, hogy az inzulin jelátvitel tagjainak foszforilációs szintje fontos tényező az inzulinrezisztencia kialakulásában. A SMTNL1 hatását először szélesebb körben vizsgáltuk Proteome Profiler vizsgálatokkal **(18. ábra)**. A SMTNL1 citoszkeletális és transzkripciós hatások elkülönítése végett MPA nélkül és annak jelenlétében is elvégeztük a vizsgálatokat. Az eredményeink arra utalnak, hogy az SMTNL1 főleg az mTOR és Ser/Thr kináz jelátviteli útvonalakon keresztül fejt ki hatását. A vizsgálataink összhangban vannak előzetes eredményekkel, melyekben *smtnl1* KO egerek proteomikai és mikroarray elemzését végezték el (Lontay *et al.*, 2015).

Az inzulinrezisztencia indukálása révén az IRS1 foszforilációja a Ser³⁰⁷, Ser³¹⁸, és Ser⁶¹² oldalláncokon emelkedett szintet mutatott. A SMTNL1 túltermeltetése csökkentette ezt, de csak progeszteron jelenlétében **(19. ábra)**. Inzulinrezisztens állapotban az IRS1 foszforilációja a tirozil-oldalláncok helyett főként szeril-oldalláncokon valósul meg. Ez az IRS1 és a PI3K disszociációját okozza, mely az inzulinrezisztenciában tapasztalt defektusokat okozza (Morino, Petersen and Shulman, 2006). Az IRS1 Ser³⁰⁷ és Ser³¹⁸-as foszforiláció az inzulin receptor és az IRS1 közötti kölcsönhatásban okoz zavarokat, mely csökkenti az inzulinra adott választ (Copps and White, 2012). A Ser³⁰⁷-es oldalláncot főként a JNK foszforilálja (Lee *et al.*, 2003; Müssig, Fiedler, *et al.*, 2005), és az eredményeink összhangban vannak több *in vivo* diabéteszes állatkísérlet során feltárt, és *in vitro* tanulmányokban kapott eredménnyel is (Manning and Davis, 2003), miszerint az inzulinrezisztens sejtekben a JNK kináz magas aktivitást mutatott. A SMTNL1 túltermelése nem befolyásolta a JNK expresszióját, de a JNK aktivációja szignifikáns mértékben visszaesett SMTNL1 **(22. ábra)**. Sikertelt feltárnunk továbbá az IRS1

Ser³¹⁸-as foszforilációjának szabályozási mechanizmusát is, melyet az inzulin által indukált PKC ζ foszforilál (Moeschel *et al.*, 2004). Ennek ellenére a PKC ezen izoformájának expressziójára nem volt hatással a SMTNL1 túltermelése. A PKC bármilyen izoformájának deléciója megakadályozza az inzulinrezisztencia kialakulását, a Ser³⁰⁸ és Ser³¹⁸-as foszforilációk visszaszorítása által (Boucher, Kleinridders and Kahn, 2014). A Ser³¹⁸-as foszforilációt a SMTNL1 túltermeltetése a PKC ϵ génexpressziós hatása révén képes volt visszaszorítani **(22. ábra)**.

Az IRS1 Ser⁶¹² oldalláncon történő foszforiláció közel esik a proximális szabályozó tirozil oldalláncokhoz. Ez egy negatív szabályozást tesz lehetővé az ERK1/2 és mTOR útvonalak révén. Az ERK1/2 aktiváció fontos szerepet játszik az inzulin által indukált PI3K-függő inzulinrezisztencia kialakulásában (Gual *et al.*, 2003). Ezt bizonyítja az is, hogy az ERK1/2 specifikus gátlása PD98059 inhibitorral visszaállította az inzulin érzékenységet (Fujishiro *et al.*, 2003). Kísérleteink során az ERK1/2 foszforilációja emelkedett volt krónikus inzulin esetén, és a SMTNL1 túltermeltetése vissza tudta ezt szorítani, különösen MPA jelenlétében. Az IRS Ser⁶¹² oldallánc csökkent foszforilációt mutatott **(19. ábra)**, ami feltehetőleg a SMTNL1 általi csökkent ERK1/2 aktivitásnak köszönhető. A kapott eredmények alapján úgy véljük, hogy C2C12 miotubulusokban az ERK1/2 az inzulin deszenzitációban egy kulcs szereplő, nem csupán az IRS1 Ser⁶¹² foszforilációja révén, de a GLUT4 szabályozása által is, mivel az ERK1/2 megemelkedett aktivitása a GLUT4 expressziójának negatív szabályozását is eredményezi (Krook *et al.*, 2000).

Eredményeink alapján a JNK és ERK1/2 expressziója nem változott, de a foszforilációjuk, és ezáltal feltehetően az aktivitásuk csökkent az SMTNL1 túltermeltetés hatására progeszteron jelenlétében **(22. ábra)**. Ez alapján feltételeztük, hogy a SMTNL1 upstream Ser/Thr protein kinázokat vagy foszfatázokat befolyásolhat génexpressziós szinten. Ennek ellentmond azonban, hogy *smtnl1* KO és WT egereken végzett microarray vizsgálatok alapján más MAP kináz expressziója nem változott (Lontay *et al.*, 2015). Mivel a MAPK aktivitás változását nem a MAPK génexpressziójának eltérő szabályozása okozta, ezért az azok foszforilációját és aktivitását szabályozó protein kinázok és foszfatázok expresszióját is elemeztük. Az egyik, irodalmi adatok alapján ismert szabályozó elem a protein foszfatáz 2A (PP2A), amely az ERK1/2 defoszforilációját katalizálva gátolja annak aktivitását (Yu *et al.*, 2004), azonban eredményeink alapján ennek a génnek az expressziója sem változott. **(22. ábra)**. További szabályozási elem lehet az új típusú PKC ϵ , mely az ERK1/2-t foszforilálva annak aktivitását fokozza, valamint cukorbeteg patkányokban a PKC ϵ fokozott expresszióját

figyelték meg vázizomzatban. A PKC ϵ expressziója visszaesett SMTNL1 túltermeltetés hatására inzulinrezisztens sejtekben. Tovább támogatja eredményeinket az a megfigyelés, miszerint a hiperinzulinémia által okozott inzulinrezisztencia krónikus PKC ϵ aktivációra vezethető vissza, azonban a többi új típusú PKC izoforma esetén ezt a jelenséget nem igazolták (Ikeda *et al.*, 2001). Ezek az adatok összhangban vannak előzőleg kapott eredményekkel, melyek során a KO egerek microarray vizsgálatai során a PKC izoformák expressziójában változásokat írtak le (Lontay *et al.*, 2015). A MAPK, JNK esetén feltételezésünk az, hogy annak aktivitását egy upstream enzim, a kettős specifitású foszfatáz 9 - dual specific phosphatase 9 (Major *et al.*, 2021) szabályozza, melyet SMTNL1 függő génként is leírtak egér vázizomzatban (Lontay *et al.*, 2015).

Vázizomzatban Az mTORC1/S6K1 felelős az IRS1 fehérje által aktiválódó PI3K/Akt útvonal deaktiválásáért az IRS1 Ser¹¹⁰¹ oldalláncon keresztül (Kido *et al.*, 2020). Érdekes módon a Ser¹¹⁰¹-es foszforiláció szignifikánsan csökkent az inzulinrezisztencia modellben, melyet a SMTNL1 tovább tudott csökkenteni **(19. ábra)**. Ezzel összhangban a *smtnl1* vemhes KO egerekben ez a foszforiláció emelt szintet mutatott, de a vemhes vad típusú egerekben ez nem volt megfigyelhető. Semmilyen más tanulmány nem írta le eddig a hosszú távú hiperinzulinémia hatásait az IRS1 Ser¹¹⁰¹-es foszforiláció vonatkozásában C2C12 sejtekben. Az a meglátásunk, hogy a hosszú távú inzulinrezisztens állapotú miotubulusokban lezajló folyamatok hátterében az IRS1 Ser¹¹⁰¹-es gátló feedback mechanizmusa érvényesül. Az IRS1 degradációja is hozzájárul az inzulin jelátvitel down regulációjához, melyet a mi eredményeink is igazoltak SMTNL1 fehérjétől független módon, valamint a szakirodalomban is találhatóak erre adatok (Pederson, Kramer and Rondinone, 2001).

A PI3K aktivitást a felszabadult PIP₃ alapján mértük **(20. ábra)**, melynek mértéke az inzulin stimuláció hatására megnőtt, bár ennek a szintje szignifikánsabban alacsonyabb volt az inzulinrezisztens sejtekben. A PI3K p85 alegységének expressziója csökkent volt az inzulinrezisztens sejtekben, de a SMTNL1 túltermeltetés képes szinten tartani a p85 expresszióját, valamint aktivitását MPA jelenlétében **(20. ábra)**. A PI3K azonban további downstream effektorait is befolyásolja, így érdekes módon az Akt1 expressziója nem változott semmilyen általunk alkalmazott kezelés hatására a differenciáltatott C2C12 sejtekben (nem bemutatott adatok), hasonló módon a humán cukorbeteg vázizom mintákban (Czech and Corvera, 1999). Az eredményeink alapján a SMTNL1 különböző módon befolyásolta az Akt Ser⁴⁷³ és Thr³⁰⁸ oldallancainak foszforilációját **(21. ábra)**. Az inzulin által indukált Thr³⁰⁸ és Ser⁴⁷³ oldalláncon történő foszforiláció szignifikánsan csökkent inzulinrezisztens üres

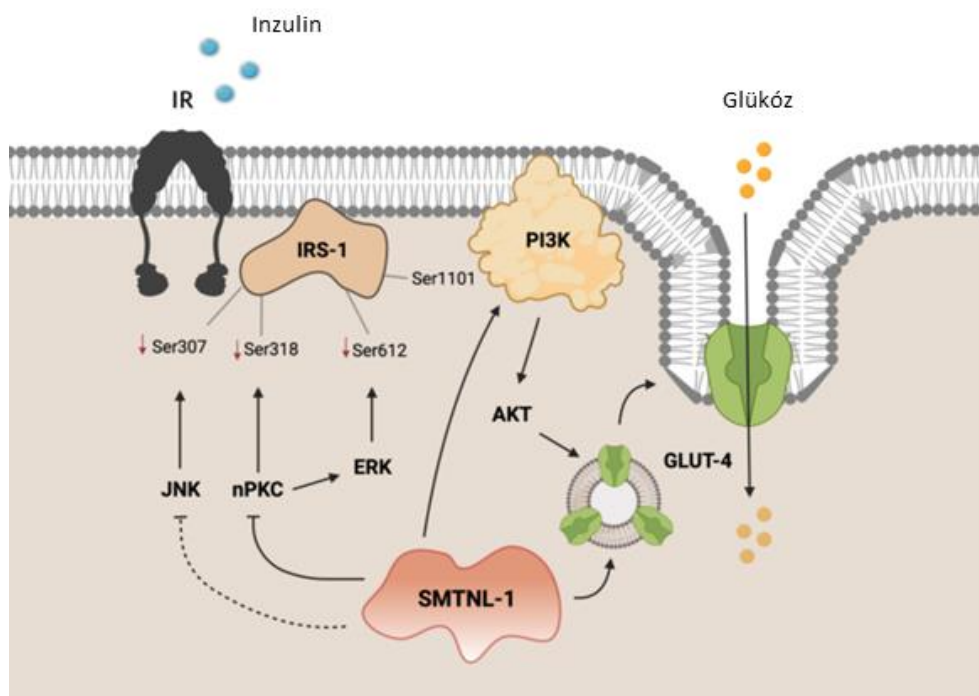
plazmával transzfektált sejtekben. A SMTNL1 túlermelletése megnövelte a Thr³⁰⁸ oldallánc foszforilációját, és csak kismértékben növelte az Akt Ser⁴⁷³ foszforilációját inzulinrezisztens sejtekben a kontrollhoz viszonyítva. Az inzulin által kiváltott hatás eléréséhez az Akt1 egymás utáni foszforilációjára van szükség mind a Thr³⁰⁸, mind a Ser⁴⁷³ oldalláncokon a foszfatidilinozitol dependens kináz-1 (PDK-1) és az mTORC2 által (Copps and White, 2012). A krónikus inzulin stimulálás azonban megakadályozza az Akt aktivációt a Thr³⁰⁸ oldallánc csökkent foszforilációja révén a Ser⁴⁷³ oldallánc foszforilációjának megváltozása nélkül (Kondapaka *et al.*, 2004). Ezek alapján az Akt Ser⁴⁷³ foszforiláció nem teljesen tükrözi az upstream IRS1/PI3K útvonal aktivitását.

Az Akt1 foszforilálja, és inaktíválja a GSK-3 β enzimet. Ennek eredményeként a glikogén-szintáz aktiválódik, valamint megindul a glikogén raktárak kiépítése (K. H. Kim *et al.*, 2004). Érdekes módon a GSK-3 β foszforilációját semmilyen kezelés nem befolyásolta **(21. ábra)**. Hasonló módon korábbi kísérletek rámutattak arra, hogy a GSK-3 β foszforilációja nem változott vázizomban inzulin kezelés hatására *db/db* egerekben, még az Akt Ser⁴⁷³ oldalláncának kétszeres foszforilációs szint emelkedése ellenére sem (Shao *et al.*, 2002). Ezen felül az Akt1 downstream szubsztrátjai közül az Akt 160 kDa-os szubsztrátja sem változott az inzulinrezisztencia által okozott Akt enzimatisz változás ellenére sem (Karlsson *et al.*, 2005). A proteome profiler elemzésünk alapján a klasszikus PI3K/Akt szubsztrátok, mint az eNOS, PRAS40, és WNK1, emelkedett foszforilációt mutattak az Akt aktiváció hatására. Ezeknek az eredményeknek az összegzéséül elmondható, hogy a SMTNL1 képes szelektíven szabályozni és fenntartani az Akt aktivitást inzulinrezisztenciás körülmények között is, és feltehetően ennek köszönhetően jönnek létre az Akt heterogén downstream hatásai (Li, Brown and Goldstein, 2010; Gonzalez *et al.*, 2011).

A PI3K/Akt az mTOR által szabályozott jelátviteli útvonalak révén olyan fiziológiás jelenségeket, mint a sejtnövekedést, vagy a rendelkezésre álló tápanyagokra adott választ szabályozza. Az Akt foszforilálja az mTOR-t a Thr²⁴⁴⁶/Ser²⁴⁴⁸ oldalláncokon (Sekulić *et al.*, 2000), ezeket az oldalláncokat foszforilálni képes továbbá a p70S6 kináz is (Chiang and Abraham, 2005). Az általunk kapott adatok összhangban vannak ezekkel az eredményekkel. Az Akt1 Ser⁴⁷³ oldallánc foszforilációjában bekövetkezett változás az mTOR aktivációján is megfigyelhető volt. Az inzulinrezisztens sejtekben az mTOR aktivációja megnövekedett SMTNL1 hatására **(21. ábra)**. Ezek az adatok rámutatnak arra, hogy a PI3K-Akt-mTOR útvonalat a SMTNL1 képes befolyásolni, a p70S6K expressziójának és foszforilációjának befolyásolása nélkül (nem bemutatott adatok). Egy másik inzulin/PI3K által szabályozott cél

fehérje a GLUT4, amely a plazmamembránba transzlokálódik megnövekedett glükóz felvételt eredményezve *in vitro* (Shepherd, Withers and Siddle, 1998; Czech and Corvera, 1999). A SMTNL1 túltermeltetése inzulinrezisztens C2C12 sejtekben megemelte a GLUT4 expresszióját **(21. ábra)**. A megemelkedett GLUT4 expresszió vázizom sejtekben csökkenti a vércukorszintet. Ezekkel az eredményekkel összhangban a vázizomban a GLUT4 expressziója szignifikánsan alacsonyabb volt *smtnl1*^{-/-} egerekben (Lontay *et al.*, 2015).

A glikolitikus funkciók és a mitokondriális légzés esetében is megfigyeltük a SMTNL1 inzulinérzékenyítő hatását. Az alap ECAR és anaerob glikolízis csökkent inzulinrezisztens sejtekben. A SMTNL1 túltermeltetése MPA kezeléssel kombinálva képes volt az ECAR értékét visszaállítani a maximális glikolízis, valamint glikolitikus tartalék befolyásolása nélkül **(23. ábra)**. A progeszteron megemelte a glikolitikus aktivitást, és az ATP termelést vázizom sejtekben, de ez az érték még mindig a kontroll szint alatt maradt inzulinrezisztens sejtekben. A SMTNL1 túltermelés MPA jelenlétében a glikolitikus aktivitás helyreállítását, és az ATP termelés emelkedését eredményezte. Ezekkel összhangban az *smtnl1* KO egerek csökkent metabolikus aktivitást mutattak, valamint glükóz intoleranciát figyeltek meg. A rágsálók vemhes állapota képes volt glükóz toleranciát a WT egerek értékeinek szintjére emelni (Lontay *et al.*, 2015). Ezek az eredmények tovább erősítik a SMTNL1 génexpressziót szabályozó szerepét az inzulin jelátvitelben. Inzulinrezisztens sejtekben a zsírsav felvétel emelkedettebb volt a zsírsav oxidációjához képest egészséges sejtekhez viszonyítva (Turcotte and Fisher, 2008), melyet a sejtes modellünkben az OCAR értékek mérésével is megerősítettük. Érdekes módon a SMTNL1 beindította a zsírsav oxidációt inzulinrezisztens sejtekben. Ezek az adatok is összhangban vannak az *smtnl1* KO vemhes egereken végzett kísérleti adatokkal, melyek alapján a vázizom glikolízis és zsírsav oxidációs rátája csökkent (Lontay *et al.*, 2015).



26. ábra. A SMTNL1 feltételezett hatásmechanizmusa inzulinrezisztenciában. A SMTNL1 a JNK és az új típusú PKC ϵ enzimek expressziós gátlásán keresztül csökkenti a JNK és ERK1/2 általi katalizált IRS1 Ser oldalláncok gátló foszforilációjának kialakulását. A SMTNL1 a PI3K aktivitás és expresszió megnövelésével inzulinérzékenyítő szerepet tölt be az inzulinrezisztens vázizomsejtek jelátvitelében.

Eredményeink nemcsak az inzulinrezisztencia általános mechanizmusára adhat magyarázatot, hanem a párhuzamos progeszteron általi kezelések miatt a terhességi cukorbetegség (GDM) folyamatának feltárásában is támogató adatokat szolgáltathatnak. A GDM-re jellemző a súlyos inzulinrezisztencia, valamint a 2-es típusú cukorbetegség kialakulásának fokozott kockázata. MPA, azaz szintetikus progeszteron vizsgálatainkban ko-regulátorként szolgált, de a GDM-re vonatkozóan is szolgálhat egy modellel, melyben a glükóz, az inzulin és a progeszteron szintje emelkedett. A GDM-ben szenvedő betegek esetén a maximális inzulin hatás utáni IRS1 tirozil oldalláncok foszforilációs szintje jóval alacsonyabb a nem terhes kontroll betegekhez képest, valamint a glükóz transzport is csökkent ebben a tünetegyüttesben (Friedman *et al.*, 1999). A PI3K és az IR redistribúciója is csökkent az inzulin által indukált IRS1 Ser oldalláncok foszforilációjának következtében. Emellett a PI3K aktivitás is csökkent, ami a GLUT4 transzlokációját is negatívan befolyásolta GDM-es betegekben (Shao *et al.*, 2002). Az *smtnl1* KO állatok egyik fenotípusos jellemzője a kialakult inzulinrezisztencia, amelyet súlyosbított az állatok vemhes állapota (Lontay *et al.*, 2015). Az IRS1 szeril oldalláncai közül a Ser³⁰⁷, Ser⁶¹², és a Ser³¹⁸-as oldalláncokon a SMTNL1

túlermeltetésének hatása a progeszterontól függött, és korrelált a PI3K aktivitással. Ezek alapján feltételezhető, hogy a SMTNL1 génexpressziós hatásai révén képes megakadályozni a GDM kialakulását. Az SMTNL1 feltételezett hatását a **(26. ábra)** illusztrálja.

Összefoglalás

Vizsgálataink során a miozin foszfatáz szerepét tanulmányoztuk idegi folyamatokban, valamint az SMTNL1 hatását elemeztük indukált inzulinrezisztencia modellben C2C12 sejteket használva. A miozin foszfatázt először a simaizomzatban katalizált reakcióján (MLC20 defoszforilációja) keresztül írták le. A miozin könnyű láncot defoszforilálva a simaizomzat kontraktilis állapotát szabályozza. A miozin könnyűláncon kívül számos citoskeletális célpontját is azonosították úgy, mint az ERM vagy Tau fehérjék. Felépítését tekintve egy PP1 enzimsaládba tartozó katalitikus alegységből (PP1c δ), egy MYPT1 szabályozó/célra irányító alegységből, valamint egy M20/21 alegységből áll.

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

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

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

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

Summary

Our research investigated the role of myosin phosphatase (MP) in neurotransmitter release, and SMTNL1 in insulin resistance model using C2C12 cells. The myosin phosphatase holoenzyme was first described in the dephosphorylation of the myosin light chain (MLC20), thus enabling the regulation of smooth muscle contractility. In addition to the myosin light chain, several cytoskeletal targets have been identified such as ERM or Tau proteins. MP is composed of a PP1c δ catalytic, a regulatory/targeting MYPT1, and an M20/21 subunit.

MP plays a role not only in the dephosphorylation of cytoskeletal elements. MP is expressed not only in smooth muscle cells but also in several other tissues. Moreover, MP is playing a key role in several important cellular processes, like cell cycle regulation, neurotransmitter release, and gene expression regulation by dephosphorylating several key interacting proteins. Many regulatory factors can modulate the activity MP ranging from small inhibitory molecules to interacting proteins and even MYPT1 phosphorylation via RhoA-associated protein kinase (ROK) on the inhibitory regulatory side chains. Proteins that are phosphorylated by ROK are usually dephosphorylated by MP, thus the enzyme pair counteract each other's effect.

The interaction between SNAP-25 with MP through the MYPT1 subunit was elucidated using surface plasmon resonance (SPR) experiments. *In vitro* protein kinase assays and phosphoprotein antibodies were used to demonstrate the phosphorylation of SNAP-25 by ROK on the Thr¹³⁸ residue. Elevated phosphorylation of the SNAP-25 Thr¹³⁸ side chain was observed in B50 neuroblastoma cells upon siRNA interference silencing of the MYPT1 subunit, further supporting our hypothesis that the ROK/MP enzyme couple is responsible for the phosphorylation regulation of SNAP-25. Moreover, as the result of silencing, the enzyme protein phosphatase activity, and the viability of B50 cells were decreased significantly suggesting that PP1 enzymes are the dominant protein phosphatases regulating cellular processes in neuronal cells. By treating mouse cortical synaptosomes with MP and ROK inhibitors (TMC and H1152), we were able to detect the opposite effect on the SNAP-25 Thr¹³⁸ phosphorylation (TMC increased, H1152 decreased the phosphorylation) providing further evidence for the role of this enzyme couple in neuronal processes. We obtained the same results, by using immunofluorescence and confocal microscopy on mouse brain tissue samples. We managed to describe the role of this phosphorylation site in the formation of the SNARE

complex with immunoprecipitation experiments. The less phosphorylated SNAP-25 bound to syntaxin to a greater extent, which indicates the positive role of MP in the process of exocytosis.

Experiments with the SMTNL1 protein have led to the development of an in vitro hyperinsulinaemic/hyperglycaemic C2C12 myoblastoma/myotubule insulin resistance model. Using proteome profiler kits, we got an overview of the intracellular processes during insulin resistance, and with overexpression of SMTNL1. We demonstrated the insulin-sensitizing effect of SMTNL1, mainly observed in the presence of progesterone. The insulin-sensitizing effect was detected mainly with the IRS1 phospho-specific antibodies, and we observed a decrease in the critical serine phosphorylation levels. SMTNL1 also shows additional beneficial effects downstream of the insulin receptor, for example, the PI3K, the Akt, and mTOR signaling pathways. Our data suggest that SMTNL1 further contributes to the decrease in the phosphorylation of IRS1 Ser residues by indirectly reducing JNK and ERK1/2 activity presumably via the novel PKC ϵ isoform. SMTNL1 was able to keep the activity of PI3K and the expression GLUT4 high even in insulin-resistant cells. Measuring the energetic parameters, it was revealed that SMTNL1 overexpression combined with MPA treatment restored basal glycolysis in insulin resistance. The same was also proved when mitochondrial activity was measured. SMTNL1 overexpression and MPA treatment enhanced ATP synthesis even in insulin-resistant conditions. All these findings suggest that SMTNL1 might be a potential drug target in insulin resistance and related disorders. Overexpression of SMTNL1 plays a role in maintaining normal insulin sensitivity and keeping cellular metabolic pathways at physiological levels.

Tárgyszavak (keywords)

Tárgyszavak:

- protein foszfatázok
- miozin foszfatáz
- RhoA-asszociált protein kináz
- neurotransmitter-kibocsátás
- SNAP-25
- SNARE
- SMTNL1
- inzulinrezisztencia
- inzulin
- inzulin jelátvitel

Keywords:

- protein phosphatases
- myosin phosphatase
- RhoA-associated protein kinase
- neurotransmitter release
- SNAP-25
- SNARE
- SMTNL1
- insulin resistance
- insulin
- insulin signaling

Irodalomjegyzék

Abdul-Ghani, M.A. and DeFronzo, R.A. (2009) 'Plasma Glucose Concentration and Prediction of Future Risk of Type 2 Diabetes', *Diabetes Care*, 32(suppl_2), pp. S194–S198. Available at: <https://doi.org/10.2337/dc09-S309>.

Aguirre, V. *et al.* (2002) 'Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action', *The Journal of Biological Chemistry*, 277(2), pp. 1531–1537. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M101521200>.

Alessi, D. *et al.* (1992) 'The control of protein phosphatase-1 by targetting subunits. The major myosin phosphatase in avian smooth muscle is a novel form of protein phosphatase-1', *European Journal of Biochemistry*, 210(3), pp. 1023–1035. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1992.tb17508.x>.

Amano, M. *et al.* (2003) 'Identification of Tau and MAP2 as novel substrates of Rho-kinase and myosin phosphatase', *Journal of neurochemistry*, 87(3), pp. 780–790. Available at: <https://doi.org/10.1046/J.1471-4159.2003.02054.X>.

Aoyama, H. *et al.* (2011) 'Isoform-specific roles of protein phosphatase 1 catalytic subunits in sarcoplasmic reticulum-mediated Ca²⁺ cycling', *Cardiovascular Research*, 89(1), pp. 79–88. Available at: <https://doi.org/10.1093/cvr/cvq252>.

Baldwin, M.L., Rostas, J.A.P. and Sim, A.T.R. (2003) 'Two modes of exocytosis from synaptosomes are differentially regulated by protein phosphatase types 2A and 2B', *Journal of Neurochemistry*, 85(5), pp. 1190–1199. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01779.x>.

Banerjee, A. *et al.* (1996) 'N-Ethylmaleimide-sensitive factor acts at a prefusion ATP-dependent step in Ca²⁺-activated exocytosis', *The Journal of Biological Chemistry*, 271(34), pp. 20223–20226. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.271.34.20223>.

Barford, D., Jia, Z. and Tonks, N.K. (1995) 'Protein tyrosine phosphatases take off', *Nature structural biology*, 2(12), pp. 1131–1137. Available at: <https://doi.org/10.1038/NSB1295-1043>.

Barker, H.M. *et al.* (1994) 'Three genes for protein phosphatase 1 map to different human chromosomes: sequence, expression and gene localisation of protein serine/threonine phosphatase 1 beta (PPP1CB)', *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1220(2), pp. 212–218. Available at: [https://doi.org/10.1016/0167-4889\(94\)90138-4](https://doi.org/10.1016/0167-4889(94)90138-4).

Beeson, M. *et al.* (2003) 'Activation of protein kinase C-zeta by insulin and phosphatidylinositol-3,4,5-(PO₄)₃ is defective in muscle in type 2 diabetes and impaired glucose tolerance: amelioration by rosiglitazone and exercise', *Diabetes*, 52(8), pp. 1926–1934. Available at: <https://doi.org/10.2337/diabetes.52.8.1926>.

Beg, M. *et al.* (2017) 'Distinct Akt phosphorylation states are required for insulin regulated Glut4 and Glut1-mediated glucose uptake', *eLife*, 6, p. e26896. Available at: <https://doi.org/10.7554/eLife.26896>.

Bennett, V. and Baines, A.J. (2001) 'Spectrin and ankyrin-based pathways: metazoan inventions for integrating cells into tissues', *Physiological reviews*, 81(3), pp. 1353–1392. Available at: <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.2001.81.3.1353>.

Beullens, M. *et al.* (2000) 'The C-terminus of NIPP1 (nuclear inhibitor of protein phosphatase-1) contains a novel binding site for protein phosphatase-1 that is controlled by tyrosine phosphorylation and RNA binding', *The Biochemical Journal*, 352 Pt 3, pp. 651–658.

Bodoor, K. *et al.* (2011) 'Smoothelin-like 1 protein is a bifunctional regulator of the progesterone receptor during pregnancy', *The Journal of biological chemistry*, 286(36), pp. 31839–31851. Available at: <https://doi.org/10.1074/JBC.M111.270397>.

Bollen, M. (2001) 'Combinatorial control of protein phosphatase-1', *Trends in biochemical sciences*, 26(7), pp. 426–431. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(01\)01836-9](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(01)01836-9).

Bollen, M. *et al.* (2010) 'The extended PP1 toolkit: designed to create specificity', *Trends in biochemical sciences*, 35(8), pp. 450–458. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.TIBS.2010.03.002>.

Borman, M.A. *et al.* (2009) 'The role of the calponin homology domain of smoothelin-like 1 (SMTNL1) in myosin phosphatase inhibition and smooth muscle contraction', *Molecular and cellular biochemistry*, 327(1–2), pp. 93–100. Available at: <https://doi.org/10.1007/S11010-009-0047-Z>.

Borman, M.A., MacDonald, J.A. and Haystead, T.A.J. (2004) 'Modulation of smooth muscle contractility by CHASM, a novel member of the smoothelin family of proteins', *FEBS letters*, 573(1–3), pp. 207–213. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2004.08.002>.

Botes, D.P. *et al.* (1985) 'Structural studies on cyanoginosins-LR, -YR, -YA, and -YM, peptide toxins from *Microcystis aeruginosa*', *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, (0), pp. 2747–2748. Available at: <https://doi.org/10.1039/P19850002747>.

Boucher, J., Kleinridders, A. and Kahn, C.R. (2014) 'Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(1), p. a009191. Available at: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009191>.

Bouzakri, K., Koistinen, H.A. and Zierath, J.R. (2005) 'Molecular mechanisms of skeletal muscle insulin resistance in type 2 diabetes', *Current Diabetes Reviews*, 1(2), pp. 167–174. Available at: <https://doi.org/10.2174/1573399054022785>.

Brautigan, D.L. (2013) 'Protein Ser/Thr phosphatases--the ugly ducklings of cell signalling', *The FEBS journal*, 280(2), pp. 324–325. Available at: <https://doi.org/10.1111/J.1742-4658.2012.08609.X>.

Brautigan, D.L. and Shenolikar, S. (2018) 'Protein Serine/Threonine Phosphatases: Keys to Unlocking Regulators and Substrates', *Annual Review of Biochemistry*, 87, pp. 921–964. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062917-012332>.

Broustas, C.G. *et al.* (2002) 'Phosphorylation of the myosin-binding subunit of myosin phosphatase by Raf-1 and inhibition of phosphatase activity', *The Journal of Biological Chemistry*, 277(4), pp. 3053–3059. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M106343200>.

Buday László(Prof. dr.), Nyitrai László(Prof. dr.), Perczel András(Prof. dr.) (2018) 'Ezerarcú fehérjék VIII.2', in *Ezerarcú fehérjék*. 1st edn. Semmelweis Kiadó és Multimédia Stúdió, p. 788.

Burks, D.J. and White, M.F. (2001) 'IRS proteins and beta-cell function', *Diabetes*, 50 Suppl 1(SUPPL. 1). Available at: <https://doi.org/10.2337/DIABETES.50.2007.S140>.

Carmichael, W.W. (1992) 'Cyanobacteria secondary metabolites--the cyanotoxins', *The Journal of Applied Bacteriology*, 72(6), pp. 445–459. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1992.tb01858.x>.

Carmichael, W.W. (1994) 'The toxins of cyanobacteria', *Scientific American*, 270(1), pp. 78–86. Available at: <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0194-78>.

Carmody, L.C. *et al.* (2008) 'Selective targeting of the gamma1 isoform of protein phosphatase 1 to F-actin in intact cells requires multiple domains in spinophilin and neurabin', *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 22(6), pp. 1660–1671. Available at: <https://doi.org/10.1096/fj.07-092841>.

Ceulemans, H. and Bollen, M. (2004) 'Functional diversity of protein phosphatase-1, a cellular economizer and reset button', *Physiological reviews*, 84(1), pp. 1–39. Available at: <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00013.2003>.

Chiang, G.G. and Abraham, R.T. (2005) 'Phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR) at Ser-2448 is mediated by p70S6 kinase', *The Journal of Biological Chemistry*, 280(27), pp. 25485–25490. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M501707200>.

Choy, M.S., Page, R. and Peti, W. (2012) 'Regulation of protein phosphatase 1 by intrinsically disordered proteins', *Biochemical Society transactions*, 40(5), pp. 969–974. Available at: <https://doi.org/10.1042/BST20120094>.

Cohen, P.T.W. *et al.* (1990) 'Protein serine/threonine phosphatases; an expanding family', *FEBS letters*, 268(2), pp. 355–359. Available at: [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)81285-V](https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)81285-V).

Cohen, P.T.W. (1997) 'Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life', *Trends in biochemical sciences*, 22(7), pp. 245–251. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(97\)01060-8](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(97)01060-8).

Cohen, P.T.W. (2002) 'Protein phosphatase 1--targeted in many directions', *Journal of Cell Science*, 115(Pt 2), pp. 241–256. Available at: <https://doi.org/10.1242/jcs.115.2.241>.

Compagnucci, C. *et al.* (2015) 'Rho-kinase signaling controls nucleocytoplasmic shuttling of class IIa histone deacetylase (HDAC7) and transcriptional activation of orphan nuclear receptor NR4A1', *Biochemical and biophysical research communications*, 459(2), pp. 179–183. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2014.12.033>.

Connor, J.H. *et al.* (2001) 'Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD34 assembles a novel signaling complex containing protein phosphatase 1 and inhibitor 1', *Molecular and Cellular Biology*, 21(20), pp. 6841–6850. Available at: <https://doi.org/10.1128/MCB.21.20.6841-6850.2001>.

Copps, K.D. and White, M.F. (2012) 'Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2', *Diabetologia*, 55(10), pp. 2565–2582. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00125-012-2644-8>.

Czech, M.P. and Corvera, S. (1999) 'Signaling mechanisms that regulate glucose transport', *The Journal of Biological Chemistry*, 274(4), pp. 1865–1868. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.274.4.1865>.

Davletov, B. *et al.* (1993) 'Phosphorylation of synaptotagmin I by casein kinase II', *The Journal of Biological Chemistry*, 268(9), pp. 6816–6822.

Dedinszki, D., Kiss, A., *et al.* (2015) 'Inhibition of protein phosphatase-1 and -2A decreases the chemosensitivity of leukemic cells to chemotherapeutic drugs', *Cellular Signalling*, 27(2), pp. 363–372. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2014.11.021>.

Dedinszki, D., Sipos, A., *et al.* (2015) 'Protein phosphatase-1 is involved in the maintenance of normal homeostasis and in UVA irradiation-induced pathological alterations in HaCaT cells and in mouse skin', *Biochimica et biophysica acta*, 1852(1), pp. 22–33. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.BBADIS.2014.11.005>.

Deng, J.T. *et al.* (2002) 'Phosphorylation of the myosin phosphatase inhibitors, CPI-17 and PHI-1, by integrin-linked kinase', *The Biochemical journal*, 367(Pt 2), pp. 517–524. Available at: <https://doi.org/10.1042/BJ20020522>.

Dong, X.C. *et al.* (2008) 'Inactivation of hepatic Foxo1 by insulin signaling is required for adaptive nutrient homeostasis and endocrine growth regulation', *Cell Metabolism*, 8(1), pp. 65–76. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.06.006>.

Dries, D.R., Gallegos, L.L. and Newton, A.C. (2007) 'A single residue in the C1 domain sensitizes novel protein kinase C isoforms to cellular diacylglycerol production', *The Journal of Biological Chemistry*, 282(2), pp. 826–830. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.C600268200>.

Dubois, T. *et al.* (2002) 'Identification of syntaxin-1A sites of phosphorylation by casein kinase I and casein kinase II', *European Journal of Biochemistry*, 269(3), pp. 909–914. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.0014-2956.2001.02725.x>.

Dubois, T. *et al.* (2003) 'Novel in vitro and in vivo phosphorylation sites on protein phosphatase 1 inhibitor CPI-17', *Biochemical and biophysical research communications*, 302(2), pp. 186–192. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)00130-X](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00130-X).

Dunaif, A. *et al.* (1995) 'Excessive insulin receptor serine phosphorylation in cultured fibroblasts and in skeletal muscle. A potential mechanism for insulin resistance in the polycystic ovary syndrome', *The Journal of Clinical Investigation*, 96(2), pp. 801–810. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI118126>.

Egloff, M.P. *et al.* (1997) 'Structural basis for the recognition of regulatory subunits by the catalytic subunit of protein phosphatase 1', *The EMBO journal*, 16(8), pp. 1876–1887. Available at: <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/16.8.1876>.

Erdodi, F. *et al.* (2003) 'Phosphorylation of protein phosphatase type-1 inhibitory proteins by integrin-linked kinase and cyclic nucleotide-dependent protein kinases', *Biochemical and biophysical research communications*, 306(2), pp. 382–387. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)00976-8](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00976-8).

Eto, M. *et al.* (1997) 'Molecular cloning of a novel phosphorylation-dependent inhibitory protein of protein phosphatase-1 (CPI17) in smooth muscle: its specific localization in smooth muscle', *FEBS letters*, 410(2–3), pp. 356–360. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)00657-1](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)00657-1).

Eto, M. (2009) 'Regulation of cellular protein phosphatase-1 (PP1) by phosphorylation of the CPI-17 family, C-kinase-activated PP1 inhibitors', *The Journal of biological chemistry*, 284(51), pp. 35273–35277. Available at: <https://doi.org/10.1074/JBC.R109.059972>.

Eto, M., Karginov, A. and Brautigan, D.L. (1999) 'A novel phosphoprotein inhibitor of protein type-1 phosphatase holoenzymes', *Biochemistry*, 38(51), pp. 16952–16957. Available at: <https://doi.org/10.1021/BI992030O>.

Fehon, R.G., McClatchey, A.I. and Bretscher, A. (2010) 'Organizing the cell cortex: the role of ERM proteins', *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 11(4), pp. 276–287. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrm2866>.

Ferrell, J.E. and Cimprich, K.A. (2003) 'Enforced proximity in the function of a famous scaffold', *Molecular Cell*, 11(2), pp. 289–291. Available at: [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(03\)00055-8](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(03)00055-8).

Finley, M.F.A., Scheller, R.H. and Madison, D.V. (2003) 'SNAP-25 Ser187 does not mediate phorbol ester enhancement of hippocampal synaptic transmission', *Neuropharmacology*, 45(6), pp. 857–862. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0028-3908\(03\)00283-1](https://doi.org/10.1016/s0028-3908(03)00283-1).

Foletti, D.L. *et al.* (2000) 'Phosphorylated syntaxin 1 is localized to discrete domains along a subset of axons', *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 20(12), pp. 4535–4544.

Friedman, J.E. *et al.* (1999) 'Impaired glucose transport and insulin receptor tyrosine phosphorylation in skeletal muscle from obese women with gestational diabetes', *Diabetes*, 48(9), pp. 1807–1814. Available at: <https://doi.org/10.2337/diabetes.48.9.1807>.

Fu, J. *et al.* (2005) 'Protease-activated receptor-1 activation of endothelial cells induces protein kinase Calpha-dependent phosphorylation of syntaxin 4 and Munc18c: role in signaling p-selectin expression', *The Journal of Biological Chemistry*, 280(5), pp. 3178–3184. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M410044200>.

Fujioka, M. *et al.* (1998) 'A new isoform of human myosin phosphatase targeting/regulatory subunit (MYPT2): cDNA cloning, tissue expression, and chromosomal mapping', *Genomics*, 49(1), pp. 59–68. Available at: <https://doi.org/10.1006/GENO.1998.5222>.

Fujishiro, M. *et al.* (2003) 'Three mitogen-activated protein kinases inhibit insulin signaling by different mechanisms in 3T3-L1 adipocytes', *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 17(3), pp. 487–497. Available at: <https://doi.org/10.1210/me.2002-0131>.

Fujita, Y. *et al.* (1996) 'Phosphorylation of Munc-18/n-Sec1/rbSec1 by protein kinase C: its implication in regulating the interaction of Munc-18/n-Sec1/rbSec1 with syntaxin', *The Journal of Biological Chemistry*, 271(13), pp. 7265–7268. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.271.13.7265>.

Fukata, Y. *et al.* (1998) 'Association of the myosin-binding subunit of myosin phosphatase and moesin: dual regulation of moesin phosphorylation by Rho-associated kinase and myosin phosphatase', *The Journal of cell biology*, 141(2), pp. 409–418. Available at: <https://doi.org/10.1083/JCB.141.2.409>.

Furukawa, N. *et al.* (2005) 'Role of Rho-kinase in regulation of insulin action and glucose homeostasis', *Cell Metabolism*, 2(2), pp. 119–129. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2005.06.011>.

Gao, J. *et al.* (2012) 'Phospholipase C-related but catalytically inactive protein (PRIP) modulates synaptosomal-associated protein 25 (SNAP-25) phosphorylation and exocytosis', *The Journal of biological chemistry*, 287(13), pp. 10565–10578. Available at: <https://doi.org/10.1074/JBC.M111.294645>.

Gao, J. *et al.* (2016) 'Differential role of SNAP-25 phosphorylation by protein kinases A and C in the regulation of SNARE complex formation and exocytosis in PC12 cells', *Cellular signalling*, 28(5), pp. 425–437. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.CELLSIG.2015.12.014>.

Garvanska, D.H. and Nilsson, J. (2020) 'Specificity determinants of phosphoprotein phosphatases controlling kinetochore functions', *Essays in Biochemistry*, 64(2), pp. 325–336. Available at: <https://doi.org/10.1042/EBC20190065>.

Garvey, W.T., Olefsky, J.M. and Marshall, S. (1985) 'Insulin receptor down-regulation is linked to an insulin-induced postreceptor defect in the glucose transport system in rat adipocytes', *The Journal of Clinical Investigation*, 76(1), pp. 22–30. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI111950>.

Genoud, S. *et al.* (1999) 'Activity-dependent phosphorylation of SNAP-25 in hippocampal organotypic cultures', *Journal of neurochemistry*, 72(4), pp. 1699–1706. Available at: <https://doi.org/10.1046/J.1471-4159.1999.721699.X>.

Gil, C. *et al.* (2011) 'Protein kinase CK2 associates to lipid rafts and its pharmacological inhibition enhances neurotransmitter release', *FEBS letters*, 585(2), pp. 414–420. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2010.12.029>.

Giorgino, F., Laviola, L. and Eriksson, J.W. (2005) 'Regional differences of insulin action in adipose tissue: insights from in vivo and in vitro studies', *Acta Physiologica Scandinavica*, 183(1), pp. 13–30. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-201X.2004.01385.x>.

Gonzalez, E. *et al.* (2011) 'Hyperinsulinemia leads to uncoupled insulin regulation of the GLUT4 glucose transporter and the FoxO1 transcription factor', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(25), pp. 10162–10167. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1019268108>.

Grassie, M.E. *et al.* (2011) 'The myosin phosphatase targeting protein (MYPT) family: a regulated mechanism for achieving substrate specificity of the catalytic subunit of protein

phosphatase type 1 δ ', *Archives of biochemistry and biophysics*, 510(2), pp. 147–159. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.ABB.2011.01.018>.

Grassie, M.E. *et al.* (2012) 'Cross-talk between Rho-associated kinase and cyclic nucleotide-dependent kinase signaling pathways in the regulation of smooth muscle myosin light chain phosphatase', *The Journal of biological chemistry*, 287(43), pp. 36356–36369. Available at: <https://doi.org/10.1074/JBC.M112.398479>.

Gual, P. *et al.* (2003) 'MAP kinases and mTOR mediate insulin-induced phosphorylation of insulin receptor substrate-1 on serine residues 307, 612 and 632', *Diabetologia*, 46(11), pp. 1532–1542. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00125-003-1223-4>.

Hamaguchi, T. *et al.* (2000) 'Phosphorylation of CPI-17, an inhibitor of myosin phosphatase, by protein kinase N', *Biochemical and biophysical research communications*, 274(3), pp. 825–830. Available at: <https://doi.org/10.1006/BBRC.2000.3225>.

Hammarlund, M. *et al.* (2007) 'Open syntaxin docks synaptic vesicles', *PLoS biology*, 5(8), p. e198. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050198>.

Han, J., Pluhackova, K. and Böckmann, R.A. (2017) 'The Multifaceted Role of SNARE Proteins in Membrane Fusion', *Frontiers in physiology*, 8(JAN). Available at: <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2017.00005>.

Hanson, P.I. *et al.* (1997) 'Structure and conformational changes in NSF and its membrane receptor complexes visualized by quick-freeze/deep-etch electron microscopy', *Cell*, 90(3), pp. 523–535. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80512-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80512-7).

Hartshorne, D.J., Ito, M. and Erdödi, F. (2004) 'Role of protein phosphatase type 1 in contractile functions: myosin phosphatase', *The Journal of biological chemistry*, 279(36), pp. 37211–37214. Available at: <https://doi.org/10.1074/JBC.R400018200>.

Haruta, T. *et al.* (2000) 'A rapamycin-sensitive pathway down-regulates insulin signaling via phosphorylation and proteasomal degradation of insulin receptor substrate-1', *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 14(6), pp. 783–794. Available at: <https://doi.org/10.1210/mend.14.6.0446>.

Hemmings, H.C. *et al.* (1984) 'DARPP-32, a dopamine-regulated neuronal phosphoprotein, is a potent inhibitor of protein phosphatase-1', *Nature*, 310(5977), pp. 503–505. Available at: <https://doi.org/10.1038/310503A0>.

Hendrickx, A. *et al.* (2009) 'Docking motif-guided mapping of the interactome of protein phosphatase-1', *Chemistry & Biology*, 16(4), pp. 365–371. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2009.02.012>.

Hepp, R., Cabaniols, J.P. and Roche, P.A. (2002) 'Differential phosphorylation of SNAP-25 in vivo by protein kinase C and protein kinase A', *FEBS letters*, 532(1–2), pp. 52–56. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)03629-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)03629-3).

Heroes, E. *et al.* (2013) 'The PP1 binding code: a molecular-lego strategy that governs specificity', *The FEBS journal*, 280(2), pp. 584–595. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08547.x>.

Herschkovitz, A. *et al.* (2018) 'Common inhibitory serine sites phosphorylated by IRS-1 kinases, triggered by insulin and inducers of insulin resistance', *The Journal of Biological Chemistry*, 293(19), p. 7266. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.W118.003468>.

Hilfiker, S. *et al.* (1999) 'Regulation of synaptotagmin I phosphorylation by multiple protein kinases', *Journal of Neurochemistry*, 73(3), pp. 921–932. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1999.0730921.x>.

Hilfiker, S. *et al.* (2005) 'Structural domains involved in the regulation of transmitter release by synapsins', *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 25(10), pp. 2658–2669. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4278-04.2005>.

Hirano, K., Phan, B.C. and Hartshorne, D.J. (1997) 'Interactions of the subunits of smooth muscle myosin phosphatase', *The Journal of biological chemistry*, 272(6), pp. 3683–3688. Available at: <https://doi.org/10.1074/JBC.272.6.3683>.

Honkanen, R.E. *et al.* (1991) 'Cyanobacterial nodularin is a potent inhibitor of type 1 and type 2A protein phosphatases', *Molecular Pharmacology*, 40(4), pp. 577–583.

Horowitz, A. *et al.* (1996) 'Mechanisms of smooth muscle contraction', *Physiological reviews*, 76(4), pp. 967–1003. Available at: <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.1996.76.4.967>.

Horváth, D. *et al.* (2017) 'Myosin phosphatase and RhoA-activated kinase modulate neurotransmitter release by regulating SNAP-25 of SNARE complex', *PLOS ONE*. Edited by S. Yu, 12(5), p. e0177046. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177046>.

Huang, H. *et al.* (1999) 'Characterization of the Inhibition of Protein Phosphatase-1 by DARPP-32 and Inhibitor-2*', *Journal of Biological Chemistry*, 274(12), pp. 7870–7878. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.274.12.7870>.

Hunter, S.J. and Garvey, W.T. (1998) 'Insulin action and insulin resistance: diseases involving defects in insulin receptors, signal transduction, and the glucose transport effector system', *The American journal of medicine*, 105(4), pp. 331–345. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0002-9343\(98\)00300-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9343(98)00300-3).

Hunter, T. (1987) 'A thousand and one protein kinases', *Cell*, 50(6), pp. 823–829. Available at: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90509-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90509-5).

Hunter, T. (1995) 'Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling', *Cell*, 80(2), pp. 225–236. Available at: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90405-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90405-0).

Hunter, T. (2009) 'Tyrosine phosphorylation: thirty years and counting', *Current Opinion in Cell Biology*, 21(2), pp. 140–146. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.01.028>.

Hunter, T. and Sefton, B.M. (1980) 'Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(3), pp. 1311–1315. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.77.3.1311>.

Iida, Y. *et al.* (2013) 'Protein phosphatase 2A dephosphorylates SNAP-25 through two distinct mechanisms in mouse brain synaptosomes', *Neuroscience research*, 75(3), pp. 184–189. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.NEURES.2013.01.002>.

Ikeda, Y. *et al.* (2001) 'Cellular mechanism of nutritionally induced insulin resistance in Psammomys obesus: overexpression of protein kinase Cepsilon in skeletal muscle precedes the onset of hyperinsulinemia and hyperglycemia', *Diabetes*, 50(3), pp. 584–592. Available at: <https://doi.org/10.2337/diabetes.50.3.584>.

Imig, C. *et al.* (2014) 'The morphological and molecular nature of synaptic vesicle priming at presynaptic active zones', *Neuron*, 84(2), pp. 416–431. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.10.009>.

Ingebritsen, T.S. and Cohen, P. (1983) 'Protein phosphatases: properties and role in cellular regulation', *Science (New York, N.Y.)*, 221(4608), pp. 331–338. Available at: <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.6306765>.

Ishida, H. *et al.* (2008) 'Solution structure of the calponin homology (CH) domain from the smoothelin-like 1 protein: a unique apocalmodulin-binding mode and the possible role of the C-terminal type-2 CH-domain in smooth muscle relaxation', *The Journal of biological chemistry*, 283(29), pp. 20569–20578. Available at: <https://doi.org/10.1074/JBC.M800627200>.

Ito, M. *et al.* (2004) 'Myosin phosphatase: structure, regulation and function', *Molecular and cellular biochemistry*, 259(1–2), pp. 197–209. Available at: <https://doi.org/10.1023/B:MCBI.0000021373.14288.00>.

Johnson, S.A. and Hunter, T. (2005) 'Kinomics: methods for deciphering the kinome', *Nature methods*, 2(1), pp. 17–25. Available at: <https://doi.org/10.1038/NMETH731>.

Kao, H.Y. *et al.* (2001) 'Mechanism for nucleocytoplasmic shuttling of histone deacetylase 7', *The Journal of Biological Chemistry*, 276(50), pp. 47496–47507. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M107631200>.

Karasik, A. *et al.* (1990) 'Increased protein kinase C activity is linked to reduced insulin receptor autophosphorylation in liver of starved rats', *The Journal of Biological Chemistry*, 265(18), pp. 10226–10231.

Karlsson, H.K.R. *et al.* (2005) 'Insulin-stimulated phosphorylation of the Akt substrate AS160 is impaired in skeletal muscle of type 2 diabetic subjects', *Diabetes*, 54(6), pp. 1692–1697. Available at: <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.6.1692>.

Kataoka, M. *et al.* (2000) 'Nerve growth factor-induced phosphorylation of SNAP-25 in PC12 cells: a possible involvement in the regulation of SNAP-25 localization', *Journal of neurochemistry*, 74(5), pp. 2058–2066. Available at: <https://doi.org/10.1046/J.1471-4159.2000.0742058.X>.

Khromov, A. *et al.* (2009) 'Phosphorylation-dependent autoinhibition of myosin light chain phosphatase accounts for Ca²⁺ sensitization force of smooth muscle contraction', *The Journal of biological chemistry*, 284(32), pp. 21569–21579. Available at: <https://doi.org/10.1074/JBC.M109.019729>.

- Kido, K. *et al.* (2020) 'Enhanced skeletal muscle insulin sensitivity after acute resistance-type exercise is upregulated by rapamycin-sensitive mTOR complex 1 inhibition', *Scientific Reports*, 10(1), p. 8509. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65397-z>.
- Kido, Y., Nakae, J. and Accili, D. (2001) 'Clinical review 125: The insulin receptor and its cellular targets', *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 86(3), pp. 972–979. Available at: <https://doi.org/10.1210/JCEM.86.3.7306>.
- Kim, J.K. *et al.* (2004) 'PKC-theta knockout mice are protected from fat-induced insulin resistance', *The Journal of Clinical Investigation*, 114(6), pp. 823–827. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI22230>.
- Kim, K.H. *et al.* (2004) 'Regulatory role of glycogen synthase kinase 3 for transcriptional activity of ADD1/SREBP1c', *The Journal of Biological Chemistry*, 279(50), pp. 51999–52006. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M405522200>.
- Kim, K.-M. *et al.* (2012) 'Molecular characterization of myosin phosphatase in endothelium', *Journal of Cellular Physiology*, 227(4), pp. 1701–1708. Available at: <https://doi.org/10.1002/jcp.22894>.
- Kim, Y.-B. *et al.* (2003) 'Insulin-stimulated protein kinase C lambda/zeta activity is reduced in skeletal muscle of humans with obesity and type 2 diabetes: reversal with weight reduction', *Diabetes*, 52(8), pp. 1935–1942. Available at: <https://doi.org/10.2337/diabetes.52.8.1935>.
- Kim, Y.-M. *et al.* (2003) 'PNUTS, a protein phosphatase 1 (PP1) nuclear targeting subunit. Characterization of its PP1- and RNA-binding domains and regulation by phosphorylation', *The Journal of Biological Chemistry*, 278(16), pp. 13819–13828. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M209621200>.
- Kimura, K. *et al.* (1996) 'Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase)', *Science (New York, N.Y.)*, 273(5272), pp. 245–248. Available at: <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.273.5272.245>.
- Kiss, A. *et al.* (2008) 'Myosin phosphatase interacts with and dephosphorylates the retinoblastoma protein in THP-1 leukemic cells: its inhibition is involved in the attenuation of daunorubicin-induced cell death by calyculin-A', *Cellular signalling*, 20(11), pp. 2059–2070. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.CELLSIG.2008.07.018>.
- Kiss, A., Erdődi, F. and Lontay, B. (2019a) 'Myosin phosphatase: Unexpected functions of a long-known enzyme', *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Cell Research*, 1866(1), pp. 2–15. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.07.023>.
- Kiss, A., Erdődi, F. and Lontay, B. (2019b) 'Myosin phosphatase: Unexpected functions of a long-known enzyme', *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research*, 1866(1), pp. 2–15. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2018.07.023>.
- Kiss, E. *et al.* (2002) 'Integrin-linked kinase phosphorylates the myosin phosphatase target subunit at the inhibitory site in platelet cytoskeleton', *The Biochemical Journal*, 365(Pt 1), pp. 79–87. Available at: <https://doi.org/10.1042/BJ20011295>.

- Kohn, A.D. *et al.* (1996) 'Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation', *The Journal of Biological Chemistry*, 271(49), pp. 31372–31378. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.271.49.31372>.
- Kondapaka, S.B. *et al.* (2004) '7-hydroxystaurosporine (UCN-01) inhibition of Akt Thr308 but not Ser473 phosphorylation: a basis for decreased insulin-stimulated glucose transport', *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 10(21), pp. 7192–7198. Available at: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0772>.
- Korrodi-Gregório, L., Esteves, S.L.C. and Fardilha, M. (2014) 'Protein phosphatase 1 catalytic isoforms: specificity toward interacting proteins', *Translational research: the journal of laboratory and clinical medicine*, 164(5), pp. 366–391. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.TRSL.2014.07.001>.
- Koszeghy, Á. *et al.* (2012) 'Activation of muscarinic receptors increases the activity of the granule neurones of the rat dorsal cochlear nucleus--a calcium imaging study', *Pflügers Archiv: European journal of physiology*, 463(6), pp. 829–844. Available at: <https://doi.org/10.1007/S00424-012-1103-1>.
- Kovacs-Kasa, A. *et al.* (2016) 'The protective role of MLCP-mediated ERM dephosphorylation in endotoxin-induced lung injury in vitro and in vivo', *Scientific Reports*, 6, p. 39018. Available at: <https://doi.org/10.1038/srep39018>.
- Krämer, J. *et al.* (1999) 'A novel isoform of the smooth muscle cell differentiation marker smoothelin', *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 77(2), pp. 294–298. Available at: <https://doi.org/10.1007/S001090050352>.
- Krook, A. *et al.* (1998) 'Insulin-stimulated Akt kinase activity is reduced in skeletal muscle from NIDDM subjects', *Diabetes*, 47(8), pp. 1281–1286. Available at: <https://doi.org/10.2337/diab.47.8.1281>.
- Krook, A. *et al.* (2000) 'Characterization of signal transduction and glucose transport in skeletal muscle from type 2 diabetic patients', *Diabetes*, 49(2), pp. 284–292. Available at: <https://doi.org/10.2337/diabetes.49.2.284>.
- Kupriyanova, T.A. and Kandrór, K.V. (1999) 'Akt-2 Binds to Glut4-containing Vesicles and Phosphorylates Their Component Proteins in Response to Insulin *', *Journal of Biological Chemistry*, 274(3), pp. 1458–1464. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.274.3.1458>.
- Laemmli, U.K. (1970) 'Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4', *Nature*, 227(5259), pp. 680–685. Available at: <https://doi.org/10.1038/227680a0>.
- Lagercrantz, J. *et al.* (1996) 'Isolation and characterization of a novel gene close to the human phosphoinositide-specific phospholipase C beta 3 gene on chromosomal region 11q13', *Genomics*, 31(3), pp. 380–384. Available at: <https://doi.org/10.1006/geno.1996.0063>.

Lee, J. and Pilch, P.F. (1994) 'The insulin receptor: structure, function, and signaling', *The American Journal of Physiology*, 266(2 Pt 1), pp. C319-334. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1994.266.2.C319>.

Lee, Y.H. *et al.* (2003) 'c-Jun N-terminal kinase (JNK) mediates feedback inhibition of the insulin signaling cascade', *The Journal of Biological Chemistry*, 278(5), pp. 2896-2902. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M208359200>.

Lesage, B. *et al.* (2007) 'A complex of catalytically inactive protein phosphatase-1 sandwiched between Sds22 and inhibitor-3', *Biochemistry*, 46(31), pp. 8909-8919. Available at: <https://doi.org/10.1021/bi7003119>.

Li, J., DeFea, K. and Roth, R.A. (1999) 'Modulation of insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation by an Akt/phosphatidylinositol 3-kinase pathway', *The Journal of Biological Chemistry*, 274(14), pp. 9351-9356. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.274.14.9351>.

Li, S., Brown, M.S. and Goldstein, J.L. (2010) 'Bifurcation of insulin signaling pathway in rat liver: mTORC1 required for stimulation of lipogenesis, but not inhibition of gluconeogenesis', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(8), pp. 3441-3446. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.0914798107>.

Liu, Q.R. *et al.* (2002) 'KEPI, a PKC-dependent protein phosphatase 1 inhibitor regulated by morphine', *The Journal of biological chemistry*, 277(15), pp. 13312-13320. Available at: <https://doi.org/10.1074/JBC.M107558200>.

Liu, Q.-R. *et al.* (2004) 'GBPI, a novel gastrointestinal- and brain-specific PP1-inhibitory protein, is activated by PKC and inactivated by PKA', *The Biochemical Journal*, 377(Pt 1), pp. 171-181. Available at: <https://doi.org/10.1042/BJ20030128>.

Long, Y.C. *et al.* (2011) 'Insulin receptor substrates Irs1 and Irs2 coordinate skeletal muscle growth and metabolism via the Akt and AMPK pathways', *Molecular and Cellular Biology*, 31(3), pp. 430-441. Available at: <https://doi.org/10.1128/MCB.00983-10>.

Lontay, B. *et al.* (2004) 'Localization of myosin phosphatase target subunit 1 in rat brain and in primary cultures of neuronal cells', *The Journal of comparative neurology*, 478(1), pp. 72-87. Available at: <https://doi.org/10.1002/CNE.20273>.

Lontay, B. *et al.* (2005) 'Okadaic acid induces phosphorylation and translocation of myosin phosphatase target subunit 1 influencing myosin phosphorylation, stress fiber assembly and cell migration in HepG2 cells', *Cellular Signalling*, 17(10), pp. 1265-1275. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2005.01.008>.

Lontay, B. *et al.* (2010) 'Smoothelin-like 1 protein regulates myosin phosphatase-targeting subunit 1 expression during sexual development and pregnancy', *The Journal of biological chemistry*, 285(38), pp. 29357-29366. Available at: <https://doi.org/10.1074/JBC.M110.143966>.

Lontay, B. *et al.* (2012) 'Protein phosphatase-1M and Rho-kinase affect exocytosis from cortical synaptosomes and influence neurotransmission at a glutamatergic giant synapse of the rat auditory system', *Journal of neurochemistry*, 123(1), pp. 84-99. Available at: <https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.2012.07882.X>.

- Lontay, B. *et al.* (2015) ‘Pregnancy and Smoothelin-like Protein 1 (SMTNL1) Deletion Promote the Switching of Skeletal Muscle to a Glycolytic Phenotype in Human and Mice’, *The Journal of Biological Chemistry*, 290(29), pp. 17985–17998. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.658120>.
- Lu, X., Zhang, Y. and Shin, Y.K. (2008) ‘Supramolecular SNARE assembly precedes hemifusion in SNARE-mediated membrane fusion’, *Nature structural & molecular biology*, 15(7), pp. 700–706. Available at: <https://doi.org/10.1038/NSMB.1433>.
- MacDonald, J.A. *et al.* (2001) ‘Identification of the endogenous smooth muscle myosin phosphatase-associated kinase’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(5), pp. 2419–2424. Available at: <https://doi.org/10.1073/PNAS.041331498>.
- MacDonald, J.A. *et al.* (2012) ‘Intrinsically disordered N-terminus of calponin homology-associated smooth muscle protein (CHASM) interacts with the calponin homology domain to enable tropomyosin binding’, *Biochemistry*, 51(13), pp. 2694–2705. Available at: <https://doi.org/10.1021/BI2019018>.
- MacKintosh, C. and Klumpp, S. (1990) ‘Tautomycin from the bacterium *Streptomyces verticillatus*. Another potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A’, *FEBS letters*, 277(1–2), pp. 137–140. Available at: [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)80828-7](https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)80828-7).
- Major, E. *et al.* (2021) ‘Smoothelin-Like Protein 1 Regulates Development and Metabolic Transformation of Skeletal Muscle in Hyperthyroidism’, *Frontiers in Endocrinology*, 12, p. 751488. Available at: <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.751488>.
- Manning, A.M. and Davis, R.J. (2003) ‘Targeting JNK for therapeutic benefit: from junk to gold?’, *Nature Reviews. Drug Discovery*, 2(7), pp. 554–565. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrd1132>.
- Mansuy, I.M. and Shenolikar, S. (2006) ‘Protein serine/threonine phosphatases in neuronal plasticity and disorders of learning and memory’, *Trends in neurosciences*, 29(12), pp. 679–686. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.TINS.2006.10.004>.
- Martin, C., Desai, K.S. and Steiner, G. (1983) ‘Receptor and postreceptor insulin resistance induced by in vivo hyperinsulinemia’, *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 61(8), pp. 802–807. Available at: <https://doi.org/10.1139/y83-123>.
- Máthé, C. *et al.* (2009) ‘Microcystin-LR induces abnormal root development by altering microtubule organization in tissue-cultured common reed (*Phragmites australis*) plantlets’, *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 92(3), pp. 122–130. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.AQUATOX.2009.02.005>.
- Mattei, A.M. *et al.* (2021) ‘The Roles of Pseudophosphatases in Disease’, *International Journal of Molecular Sciences*, 22(13), p. 6924. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms22136924>.
- Mayer, A., Wickner, W. and Haas, A. (1996) ‘Sec18p (NSF)-driven release of Sec17p (alpha-SNAP) can precede docking and fusion of yeast vacuoles’, *Cell*, 85(1), pp. 83–94. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81084-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81084-3).

McKinsey, T.A., Zhang, C.L. and Olson, E.N. (2001) 'Identification of a signal-responsive nuclear export sequence in class II histone deacetylases', *Molecular and Cellular Biology*, 21(18), pp. 6312–6321. Available at: <https://doi.org/10.1128/MCB.21.18.6312-6321.2001>.

Meigs, J.B. (2003) 'Epidemiology of the insulin resistance syndrome', *Current Diabetes Reports*, 3(1), pp. 73–79. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11892-003-0057-2>.

Moeschel, K. *et al.* (2004) 'Protein kinase C-zeta-induced phosphorylation of Ser318 in insulin receptor substrate-1 (IRS-1) attenuates the interaction with the insulin receptor and the tyrosine phosphorylation of IRS-1', *The Journal of Biological Chemistry*, 279(24), pp. 25157–25163. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M402477200>.

Morgan, A. *et al.* (2005) 'Regulation of exocytosis by protein kinase C', *Biochemical Society transactions*, 33(Pt 6), pp. 1341–1344. Available at: <https://doi.org/10.1042/BST20051341>.

Morino, K. *et al.* (2008) 'Muscle-Specific IRS-1 Ser→Ala Transgenic Mice Are Protected From Fat-Induced Insulin Resistance in Skeletal Muscle', *Diabetes*, 57(10), pp. 2644–2651. Available at: <https://doi.org/10.2337/db06-0454>.

Morino, K., Petersen, K.F. and Shulman, G.I. (2006) 'Molecular mechanisms of insulin resistance in humans and their potential links with mitochondrial dysfunction', *Diabetes*, 55 Suppl 2, pp. S9–S15. Available at: <https://doi.org/10.2337/db06-S002>.

Mullen, E. and Ohlendieck, K. (2010) 'Proteomic profiling of non-obese type 2 diabetic skeletal muscle', *International Journal of Molecular Medicine*, 25(3), pp. 445–458. Available at: https://doi.org/10.3892/ijmm_00000364.

Murányi, A. *et al.* (2001) 'Myotonic dystrophy protein kinase phosphorylates the myosin phosphatase targeting subunit and inhibits myosin phosphatase activity', *FEBS letters*, 493(2–3), pp. 80–84. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02283-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02283-9).

Murányi, A. *et al.* (2002) 'Phosphorylation of the myosin phosphatase target subunit by integrin-linked kinase', *The Biochemical journal*, 366(Pt 1), pp. 211–216. Available at: <https://doi.org/10.1042/BJ20020401>.

Murányi, A. *et al.* (2005) 'Phosphorylation of Thr695 and Thr850 on the myosin phosphatase target subunit: inhibitory effects and occurrence in A7r5 cells', *FEBS letters*, 579(29), pp. 6611–6615. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2005.10.055>.

Müssig, K., Fiedler, H., *et al.* (2005) 'Insulin-induced stimulation of JNK and the PI 3-kinase/mTOR pathway leads to phosphorylation of serine 318 of IRS-1 in C2C12 myotubes', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 335(3), pp. 819–825. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.07.154>.

Müssig, K., Staiger, H., *et al.* (2005) 'Shp2 is required for protein kinase C-dependent phosphorylation of serine 307 in insulin receptor substrate-1', *The Journal of Biological Chemistry*, 280(38), pp. 32693–32699. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M506549200>.

Nagiec, E.E., Bernstein, A. and Whiteheart, S.W. (1995) 'Each domain of the N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein contributes to its transport activity', *The Journal of*

Biological Chemistry, 270(49), pp. 29182–29188. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.270.49.29182>.

Nagy, G. *et al.* (2002) ‘Protein kinase C-dependent phosphorylation of synaptosome-associated protein of 25 kDa at Ser187 potentiates vesicle recruitment’, *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 22(21), pp. 9278–9286. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-21-09278.2002>.

Nagy, G. *et al.* (2004) ‘Regulation of releasable vesicle pool sizes by protein kinase A-dependent phosphorylation of SNAP-25’, *Neuron*, 41(3), pp. 417–429. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(04\)00038-8](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(04)00038-8).

Namikoshi, M. *et al.* (1992) ‘Identification of 12 hepatotoxins from a Homer Lake bloom of the cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*, *Microcystis viridis*, and *Microcystis wesenbergii*: nine new microcystins’, *The Journal of Organic Chemistry*, 57(3), pp. 866–872. Available at: <https://doi.org/10.1021/jo00029a016>.

Niirō, N. and Ikebe, M. (2001) ‘Zipper-interacting protein kinase induces Ca(2+)-free smooth muscle contraction via myosin light chain phosphorylation’, *The Journal of biological chemistry*, 276(31), pp. 29567–29574. Available at: <https://doi.org/10.1074/JBC.M102753200>.

Oliver, C.J. and Shenolikar, S. (1998) ‘Physiologic importance of protein phosphatase inhibitors’, *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 3. Available at: <https://doi.org/10.2741/A336>.

Olsen, J.V. *et al.* (2006) ‘Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks’, *Cell*, 127(3), pp. 635–648. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.09.026>.

Parra, M. *et al.* (2005) ‘Protein kinase D1 phosphorylates HDAC7 and induces its nuclear export after T-cell receptor activation’, *The Journal of Biological Chemistry*, 280(14), pp. 13762–13770. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M413396200>.

Parra, M., Mahmoudi, T. and Verdin, E. (2007) ‘Myosin phosphatase dephosphorylates HDAC7, controls its nucleocytoplasmic shuttling, and inhibits apoptosis in thymocytes’, *Genes & development*, 21(6), pp. 638–643. Available at: <https://doi.org/10.1101/GAD.1513107>.

Pasquarelli, A., Picollo, F. and Carabelli, V. (2018) ‘Boron-Doped Diamond and Graphitic Multiarrrays for Neurotransmitter Sensing’, in C. Kranz (ed.) *Carbon-Based Nanosensor Technology*. Cham: Springer International Publishing (Springer Series on Chemical Sensors and Biosensors), pp. 19–65. Available at: https://doi.org/10.1007/5346_2018_24.

Pederson, T.M., Kramer, D.L. and Rondinone, C.M. (2001) ‘Serine/threonine phosphorylation of IRS-1 triggers its degradation: possible regulation by tyrosine phosphorylation’, *Diabetes*, 50(1), pp. 24–31. Available at: <https://doi.org/10.2337/diabetes.50.1.24>.

Pennisi, E. (2002) ‘Human genome project. Genome institute wrestles mightily with its future’, *Science (New York, N.Y.)*, 298(5599), pp. 1694–1695. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.298.5599.1694>.

- Perreault, L. *et al.* (2018) 'Intracellular localization of diacylglycerols and sphingolipids influences insulin sensitivity and mitochondrial function in human skeletal muscle', *JCI insight*, 3(3), p. 96805. Available at: <https://doi.org/10.1172/jci.insight.96805>.
- Petersen, M.C. and Shulman, G.I. (2018) 'Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance', *Physiological Reviews*, 98(4), pp. 2133–2223. Available at: <https://doi.org/10.1152/physrev.00063.2017>.
- Poirier, M.A. *et al.* (1998) 'The synaptic SNARE complex is a parallel four-stranded helical bundle', *Nature Structural Biology*, 5(9), pp. 765–769. Available at: <https://doi.org/10.1038/1799>.
- Pot, D.A. and Dixon, J.E. (1992) 'A thousand and two protein tyrosine phosphatases', *Biochimica et biophysica acta*, 1136(1), pp. 35–43. Available at: [https://doi.org/10.1016/0167-4889\(92\)90082-M](https://doi.org/10.1016/0167-4889(92)90082-M).
- Pozzi, D. *et al.* (2008) 'Activity-dependent phosphorylation of Ser187 is required for SNAP-25-negative modulation of neuronal voltage-gated calcium channels', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(1), pp. 323–328. Available at: <https://doi.org/10.1073/PNAS.0706211105>.
- Quensel, C. *et al.* (2002) 'Smoothelin contains a novel actin cytoskeleton localization sequence with similarity to troponin T', *Journal of cellular biochemistry*, 85(2), pp. 403–409. Available at: <https://doi.org/10.1002/JCB.10143>.
- Rensen, S.S.M. *et al.* (2002) 'Expression of the smoothelin gene is mediated by alternative promoters', *Cardiovascular research*, 55(4), pp. 850–863. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(02\)00491-1](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(02)00491-1).
- Rigden, D.J. (2007) 'The histidine phosphatase superfamily: structure and function', *Biochemical Journal*, 409(2), pp. 333–348. Available at: <https://doi.org/10.1042/BJ20071097>.
- Rinehart, K.L. *et al.* (1988) 'Nodularin, microcystin, and the configuration of Adda', *Journal of the American Chemical Society*, 110(25), pp. 8557–8558. Available at: <https://doi.org/10.1021/ja00233a049>.
- Risinger, C. and Bennett, M.K. (1999) 'Differential phosphorylation of syntaxin and synaptosome-associated protein of 25 kDa (SNAP-25) isoforms', *Journal of neurochemistry*, 72(2), pp. 614–624. Available at: <https://doi.org/10.1046/J.1471-4159.1999.0720614.X>.
- Rizo, J. (2018) 'Mechanism of neurotransmitter release coming into focus', *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 27(8), pp. 1364–1391. Available at: <https://doi.org/10.1002/pro.3445>.
- Salazar, C. and Höfer, T. (2009) 'Multisite protein phosphorylation--from molecular mechanisms to kinetic models', *The FEBS journal*, 276(12), pp. 3177–3198. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07027.x>.
- Sarbassov, D.D. *et al.* (2005) 'Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex', *Science (New York, N.Y.)*, 307(5712), pp. 1098–1101. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1106148>.

Sasaki, K. *et al.* (1990) 'Identification of members of the protein phosphatase 1 gene family in the rat and enhanced expression of protein phosphatase 1 alpha gene in rat hepatocellular carcinomas', *Japanese Journal of Cancer Research: Gann*, 81(12), pp. 1272–1280. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.1990.tb02690.x>.

Schmitz, F.J. *et al.* (1981) 'Acanthifolicin, a new episulfide-containing polyether carboxylic acid from extracts of the marine sponge *Pandaros acanthifolium*', *Journal of the American Chemical Society*, 103(9), pp. 2467–2469. Available at: <https://doi.org/10.1021/ja00399a081>.

Scotto-Lavino, E. *et al.* (2010) 'Basis for the Isoform-specific Interaction of Myosin Phosphatase Subunits Protein Phosphatase 1c β and Myosin Phosphatase Targeting Subunit 1*', *Journal of Biological Chemistry*, 285(9), pp. 6419–6424. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.074773>.

Sedgwick, S.G. and Smerdon, S.J. (1999) 'The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework', *Trends in Biochemical Sciences*, 24(8), pp. 311–316. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(99\)01426-7](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(99)01426-7).

Sekulić, A. *et al.* (2000) 'A direct linkage between the phosphoinositide 3-kinase-AKT signaling pathway and the mammalian target of rapamycin in mitogen-stimulated and transformed cells', *Cancer Research*, 60(13), pp. 3504–3513.

Shao, J. *et al.* (2000) 'Decreased insulin receptor tyrosine kinase activity and plasma cell membrane glycoprotein-1 overexpression in skeletal muscle from obese women with gestational diabetes mellitus (GDM): evidence for increased serine/threonine phosphorylation in pregnancy and GDM', *Diabetes*, 49(4), pp. 603–610. Available at: <https://doi.org/10.2337/diabetes.49.4.603>.

Shao, J. *et al.* (2002) 'Phosphatidylinositol 3-kinase redistribution is associated with skeletal muscle insulin resistance in gestational diabetes mellitus', *Diabetes*, 51(1), pp. 19–29. Available at: <https://doi.org/10.2337/diabetes.51.1.19>.

Shepherd, P.R., Withers, D.J. and Siddle, K. (1998) 'Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling', *The Biochemical Journal*, 333 (Pt 3), pp. 471–490. Available at: <https://doi.org/10.1042/bj3330471>.

Sheppeck, J.E., Gauss, C.M. and Chamberlin, A.R. (1997) 'Inhibition of the Ser-Thr phosphatases PP1 and PP2A by naturally occurring toxins', *Bioorganic & medicinal chemistry*, 5(9), pp. 1739–1750. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0968-0896\(97\)00146-6](https://doi.org/10.1016/S0968-0896(97)00146-6).

Shichi, D. *et al.* (2010) 'Heart-specific Small Subunit of Myosin Light Chain Phosphatase Activates Rho-associated Kinase and Regulates Phosphorylation of Myosin Phosphatase Target Subunit 1*', *Journal of Biological Chemistry*, 285(44), pp. 33680–33690. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.122390>.

Shimazaki, Y. *et al.* (1996) 'Phosphorylation of 25-kDa synaptosome-associated protein. Possible involvement in protein kinase C-mediated regulation of neurotransmitter release', *The Journal of biological chemistry*, 271(24), pp. 14548–14553. Available at: <https://doi.org/10.1074/JBC.271.24.14548>.

Shimizus, H. *et al.* (1994) 'THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Characterization of the Myosin-binding Subunit of Smooth Muscle Myosin Phosphatase*', 269(48), pp. 3040730411–3040730411. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)43828-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)43828-8).

Shirazi, A. *et al.* (1994) 'Purification and characterization of the mammalian myosin light chain phosphatase holoenzyme. The differential effects of the holoenzyme and its subunits on smooth muscle.', *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 269(50), pp. 3159–31606. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)31736-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)31736-8).

Shoji-Kasai, Y. *et al.* (2002) 'Protein kinase C-mediated translocation of secretory vesicles to plasma membrane and enhancement of neurotransmitter release from PC12 cells', *The European journal of neuroscience*, 15(8), pp. 1390–1394. Available at: <https://doi.org/10.1046/J.1460-9568.2002.01972.X>.

Sipos, A. *et al.* (2017) 'Myosin phosphatase and RhoA-activated kinase modulate arginine methylation by the regulation of protein arginine methyltransferase 5 in hepatocellular carcinoma cells', *Scientific Reports*, 7(1), p. 40590. Available at: <https://doi.org/10.1038/srep40590>.

Smith, U. (2002) 'Impaired ('diabetic') insulin signaling and action occur in fat cells long before glucose intolerance--is insulin resistance initiated in the adipose tissue?', *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity*, 26(7), pp. 897–904. Available at: <https://doi.org/10.1038/SJ.IJO.0802028>.

Snyder, D.A., Kelly, M.L. and Woodbury, D.J. (2006) 'SNARE complex regulation by phosphorylation', *Cell biochemistry and biophysics*, 45(1), pp. 111–123. Available at: <https://doi.org/10.1385/CBB:45:1:111>.

Söllner, T., Bennett, M.K., *et al.* (1993) 'A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion', *Cell*, 75(3), pp. 409–418. Available at: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90376-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90376-2).

Söllner, T., Whiteheart, S.W., *et al.* (1993) 'SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion', *Nature*, 362(6418), pp. 318–324. Available at: <https://doi.org/10.1038/362318a0>.

Sørensen, J.B. *et al.* (2006) 'Sequential N- to C-terminal SNARE complex assembly drives priming and fusion of secretory vesicles', *The EMBO journal*, 25(5), pp. 955–966. Available at: <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601003>.

Stein, A. *et al.* (2009) 'Helical extension of the neuronal SNARE complex into the membrane', *Nature*, 460(7254), pp. 525–528. Available at: <https://doi.org/10.1038/NATURE08156>.

Südhof, T.C. (2008) 'Neurotransmitter release', *Handbook of Experimental Pharmacology*, (184), pp. 1–21. Available at: https://doi.org/10.1007/978-3-540-74805-2_1.

Südhof, T.C. (2013) 'Neurotransmitter release: the last millisecond in the life of a synaptic vesicle', *Neuron*, 80(3), pp. 675–690. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.10.022>.

Südhof, T.C. (2014) 'The molecular machinery of neurotransmitter release (Nobel lecture)', *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 53(47), pp. 12696–12717. Available at: <https://doi.org/10.1002/ANIE.201406359>.

Sun, X.J. *et al.* (1999) 'Insulin-induced insulin receptor substrate-1 degradation is mediated by the proteasome degradation pathway', *Diabetes*, 48(7), pp. 1359–1364. Available at: <https://doi.org/10.2337/diabetes.48.7.1359>.

Sutherland, C., MacDonald, J.A. and Walsh, M.P. (2016) 'Analysis of phosphorylation of the myosin-targeting subunit of myosin light chain phosphatase by Phos-tag SDS-PAGE', *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 310(8), pp. C681–691. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00327.2015>.

Sutton, R.B. *et al.* (1998) 'Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution', *Nature*, 395(6700), pp. 347–353. Available at: <https://doi.org/10.1038/26412>.

Swingle, M., Ni, L. and Honkanen, R.E. (2007) 'Small-molecule inhibitors of ser/thr protein phosphatases: specificity, use and common forms of abuse', *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 365, pp. 23–38. Available at: <https://doi.org/10.1385/1-59745-267-X:23>.

Szendroedi, J. *et al.* (2014) 'Role of diacylglycerol activation of PKC θ in lipid-induced muscle insulin resistance in humans', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(26), pp. 9597–9602. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1409229111>.

Tachibana, K. *et al.* (1981) 'Okadaic acid, a cytotoxic polyether from two marine sponges of the genus *Halichondria*', *Journal of the American Chemical Society*, 103(9), pp. 2469–2471. Available at: <https://doi.org/10.1021/ja00399a082>.

Takahashi, M., Itakura, M. and Kataoka, M. (2003) 'New aspects of neurotransmitter release and exocytosis: regulation of neurotransmitter release by phosphorylation', *Journal of Pharmacological Sciences*, 93(1), pp. 41–45. Available at: <https://doi.org/10.1254/jphs.93.41>.

Takai, A. *et al.* (1992) 'Inhibitory effect of okadaic acid derivatives on protein phosphatases. A study on structure-affinity relationship', *The Biochemical journal*, 284 (Pt 2)(Pt 2), pp. 539–544. Available at: <https://doi.org/10.1042/BJ2840539>.

Takizawa, N. *et al.* (2003) 'M20, the small subunit of PP1M, binds to microtubules', *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 284(2), pp. C250–C262. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00153.2002>.

Takizawa, N., Koga, Y. and Ikebe, M. (2002) 'Phosphorylation of CPI17 and myosin binding subunit of type 1 protein phosphatase by p21-activated kinase', *Biochemical and biophysical research communications*, 297(4), pp. 773–778. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)02302-1](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)02302-1).

Taniguchi, C.M. *et al.* (2007) 'The p85 α regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase potentiates c-Jun N-terminal kinase-mediated insulin resistance', *Molecular and Cellular Biology*, 27(8), pp. 2830–2840. Available at: <https://doi.org/10.1128/MCB.00079-07>.

Taylor, R. (1991) 'Insulin action 1991', *Clinical Endocrinology*, 34(2), pp. 159–171. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.1991.tb00287.x>.

Terrak, M. *et al.* (2004) 'Structural basis of protein phosphatase 1 regulation', *Nature*, 429(6993), pp. 780–784. Available at: <https://doi.org/10.1038/NATURE02582>.

Tian, J.-H., Das, S. and Sheng, Z.-H. (2003) 'Ca²⁺-dependent phosphorylation of syntaxin-1A by the death-associated protein (DAP) kinase regulates its interaction with Munc18', *The Journal of Biological Chemistry*, 278(28), pp. 26265–26274. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M300492200>.

Tolar, L.A. and Pallanck, L. (1998) 'NSF function in neurotransmitter release involves rearrangement of the SNARE complex downstream of synaptic vesicle docking', *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 18(24), pp. 10250–10256.

Tóth, A. *et al.* (2000) 'Study of the subunit interactions in myosin phosphatase by surface plasmon resonance', *European journal of biochemistry*, 267(6), pp. 1687–1697. Available at: <https://doi.org/10.1046/J.1432-1327.2000.01158.X>.

Tremblay, F. *et al.* (2007) 'Identification of IRS-1 Ser-1101 as a target of S6K1 in nutrient- and obesity-induced insulin resistance', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(35), pp. 14056–14061. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.0706517104>.

Turcotte, L.P. and Fisher, J.S. (2008) 'Skeletal muscle insulin resistance: roles of fatty acid metabolism and exercise', *Physical Therapy*, 88(11), pp. 1279–1296. Available at: <https://doi.org/10.2522/ptj.20080018>.

Turner, K.M., Burgoyne, R.D. and Morgan, A. (1999) 'Protein phosphorylation and the regulation of synaptic membrane traffic', *Trends in Neurosciences*, 22(10), pp. 459–464. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(99\)01436-8](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(99)01436-8).

Turner, S.R. and Macdonald, J.A. (2014) 'Novel contributions of the smoothelin-like 1 protein in vascular smooth muscle contraction and its potential involvement in myogenic tone', *Microcirculation (New York, N.Y.: 1994)*, 21(3), pp. 249–258. Available at: <https://doi.org/10.1111/MICC.12108>.

Ulke-Lemée, A. *et al.* (2011) 'Mapping and functional characterization of the murine smoothelin-like 1 promoter', *BMC molecular biology*, 12. Available at: <https://doi.org/10.1186/1471-2199-12-10>.

Ulke-Lemée, A. *et al.* (2014) 'Two domains of the smoothelin-like 1 protein bind apo- and calcium-calmodulin independently', *Biochimica et biophysica acta*, 1844(9), pp. 1580–1590. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.BBAPAP.2014.05.011>.

Um, S.H. *et al.* (2004) 'Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity', *Nature*, 431(7005), pp. 200–205. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature02866>.

Van Der Loop, F.T.L. *et al.* (1997) 'Differentiation of smooth muscle cells in human blood vessels as defined by smoothelin, a novel marker for the contractile phenotype',

Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 17(4), pp. 665–671. Available at: <https://doi.org/10.1161/01.ATV.17.4.665>.

Van Eys, G.J.J.M. *et al.* (1997) ‘Smoothelin expression characteristics: development of a smooth muscle cell in vitro system and identification of a vascular variant’, *Cell structure and function*, 22(1), pp. 65–72. Available at: <https://doi.org/10.1247/CSF.22.65>.

Wakula, P. *et al.* (2003) ‘Degeneracy and function of the ubiquitous RVXF motif that mediates binding to protein phosphatase-1’, *The Journal of biological chemistry*, 278(21), pp. 18817–18823. Available at: <https://doi.org/10.1074/JBC.M300175200>.

Watanabe, N. *et al.* (1986) ‘Long-term in vitro effects of insulin on insulin binding and glucose transport’, *Diabetes Research and Clinical Practice*, 2(1), pp. 1–8. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0168-8227\(86\)80022-5](https://doi.org/10.1016/s0168-8227(86)80022-5).

Wehrens, X.H.T. *et al.* (1997) ‘Localization of smoothelin in avian smooth muscle and identification of a vascular-specific isoform’, *FEBS letters*, 405(3), pp. 315–320. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)00207-X](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)00207-X).

Wilcox, G. (2005) ‘Insulin and insulin resistance’, *The Clinical biochemist. Reviews*, 26(2), pp. 19–39.

Williams\$, K.R. *et al.* (1986) ‘THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY DARPP-32, a Dopamine-and Cyclic AMP-regulated Neuronal Phosphoprotein PRIMARY STRUCTURE AND HOMOLGY WITH PROTEIN PHOSPHATASE INHIBITOR-1*’, 261(4), pp. 1890–1903. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)36026-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)36026-X).

Withers, D.J. and White, M. (2000) ‘Perspective: The insulin signaling system--a common link in the pathogenesis of type 2 diabetes’, *Endocrinology*, 141(6), pp. 1917–1921. Available at: <https://doi.org/10.1210/ENDO.141.6.7584>.

Wong, C.Y., Al-Salami, H. and Dass, C.R. (2020) ‘C2C12 cell model: its role in understanding of insulin resistance at the molecular level and pharmaceutical development at the preclinical stage’, *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 72(12), pp. 1667–1693. Available at: <https://doi.org/10.1111/JPHP.13359>.

Wooldridge, A.A. *et al.* (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’, *The Journal of biological chemistry*, 279(33), pp. 34496–34504. Available at: <https://doi.org/10.1074/JBC.M405957200>.

Wooldridge, A.A. *et al.* (2008) ‘Deletion of the protein kinase A/protein kinase G target SMTNL1 promotes an exercise-adapted phenotype in vascular smooth muscle’, *The Journal of biological chemistry*, 283(17), pp. 11850–11859. Available at: <https://doi.org/10.1074/JBC.M708628200>.

Wu, D. *et al.* (2018) ‘A substrate-trapping strategy for protein phosphatase PP1 holoenzymes using hypoactive subunit fusions’, *The Journal of Biological Chemistry*, 293(39), pp. 15152–15162. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.004132>.

Wu, Y. *et al.* (2003) 'Myosin phosphatase and myosin phosphorylation in differentiating C2C12 cells', *Journal of Muscle Research & Cell Motility*, 24(8), pp. 499–511. Available at: <https://doi.org/10.1023/B:JURE.0000009810.36038.53>.

Xia, D., Stull, J.T. and Kamm, K.E. (2005) 'Myosin phosphatase targeting subunit 1 affects cell migration by regulating myosin phosphorylation and actin assembly', *Experimental cell research*, 304(2), pp. 506–517. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.YEXCR.2004.11.025>.

Young, F.G. (1962) 'The Croonian Lecture: On Insulin and Its Action', *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 157(966), pp. 1–26.

Yu, L.-G. *et al.* (2004) 'Protein phosphatase 2A, a negative regulator of the ERK signaling pathway, is activated by tyrosine phosphorylation of putative HLA class II-associated protein I (PHAPI)/pp32 in response to the antiproliferative lectin, jacalin', *The Journal of Biological Chemistry*, 279(40), pp. 41377–41383. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M400017200>.

Zagórska, A. *et al.* (2010) 'New roles for the LKB1-NUAK pathway in controlling myosin phosphatase complexes and cell adhesion', *Science Signaling*, 3(115), p. ra25. Available at: <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000616>.

Zhang, R., Ou, H.-Y. and Zhang, C.-T. (2004) 'DEG: a database of essential genes', *Nucleic Acids Research*, 32(Database issue), pp. D271-272. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/gkh024>.

Zhang, Z. *et al.* (1993) 'Expression and characterization of rat protein phosphatases-1 alpha, -1 gamma 1, -1 gamma 2, and -1 delta', *Archives of biochemistry and biophysics*, 303(2), pp. 402–406. Available at: <https://doi.org/10.1006/ABBI.1993.1301>.

Zhou, Q., Dolan, P.L. and Dohm, G.L. (1999) 'Dephosphorylation increases insulin-stimulated receptor kinase activity in skeletal muscle of obese Zucker rats', *Molecular and Cellular Biochemistry*, 194(1–2), pp. 209–216. Available at: <https://doi.org/10.1023/a:1006942831223>.

Köszönetnyilvánítás

Kollégáim segítsége, családom és barátaim támogatása nélkül nem jöhetett volna létre a doktori értekezésem. Elmondhatatlanul hálás vagyok ezeknek a személyeknek, hogy ennyi időn át segítettek, és támogattak.

Először is szeretném megköszönni témavezetőmnek Dr. Lontay Beátának a sok évnyi támogatást, segítséget és szakmai iránymutatást. A több éves közös munka során mindig fordulhattam hozzá, amikor nehézségek merültek fel. Köszönöm, hogy bevezetett a tudomány világába, és utat mutatott mind a szakdolgozói, mind pedig a PhD-s éveim alatt.

Köszönetet szeretnék mondani Dr. Sipos Adrienn-nek, aki nélkül nem tudtam volna elsajátítani a megannyi laboratóriumi technikát. Mindezt olyan részletességgel, mint ami elengedhetetlen volt ennek a disszertációnak a megszületéséhez. Már szakdolgozóként tőle kezdtem el megtanulni, és gyakorlatba átültetni az összes sejtbiológiai, molekuláris biológiai eljárást. Ezek nélkül ez a dolgozat nem jöhetett volna létre.

Köszönöm Dr. Horváth Dániel munkásságát is, a SNAP-25 projektben végzett kísérletek kapcsán. Az inzulinrezisztencia projekten Ungvári Ádámmal együtt nyújtott segítségért is hálás vagyok.

Kollégáim közül köszönöm továbbá Dr. Major Evelinnek a rengeteg segítséget és hogy számíthattam rá a laboratóriumi munkák során. Nem utolsósorban a Seahorse XF mérésekkel kapcsolatban felbecsülhetetlen volt a szakmai hozzáértése.

Köszönöm továbbá Dr. Tóth Emesének és Dr. Iván Juditnak a sok segítséget, melyet a PhD-s éveim alatt kaptam tőlük. Emesének köszönöm továbbá az oktatásban nyújtott segítségét. A külföldi, és a magyar hallgatók gyakorlati oktatásának koordinálása nagyon nehéz lett volna a hozzáértése nélkül.

Hálás vagyok az Erdődi-labor minden tagjának, akik szakmailag és emberileg is támogattak. Köszönöm továbbá Dr. Kónya Zoltánnak a foszfatáz aktivitásméréssel kapcsolatos készséges munkáját, valamint, hogy mindig vevő volt beszélgetésekre. Köszönöm Dr. Bécsi Bálintnak az SPR-alapú mérések során nyújtott segítséget.

Hálás vagyok Kelemenné Szántó Ágota, Docsa Andrea és Németh Árpádné laborasszisztenseknek, segítségükért, melyet a laborban töltött időm alatt nyújtottak.

Köszönöm Dr. Karen Uraynak, hogy közleményeimet tüzetesen átnézte, hogy a nyelvi szakszerűség kifogástalan legyen.

Nem utolsó sorban köszönöm Dr. Erdődi Ferenc munkásságát is, akinek részletekbe menő kritikussága sokat segített munkámat.

Köszönöm Prof. Dr. Virág Lászlónak, hogy a disszertációm elkészítéséhez szükséges tudományos munkát az Orvosi Vegytani intézetben elvégezhettem.

Végezetül szeretnék köszönetet mondani családomnak, mert nélkülük ez a disszertáció tényleg nem jöhetett volna létre. A rengeteg támogatás és biztató szavak nélkül nem sikerülhetett volna ennek a munkának az elkészítése.

Hálás vagyok azért, hogy a hozzám került összes szakdolgozóval sikerült eredményes munkát végezni.

Köszönöm az Orvosi Vegytani intézet összes dolgozójának az együtt töltött éveket.

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/486/2022.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

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

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Tamás, I.**, Major, E., Horváth, D., Keller, I., Ungvári, Á., Haystead, T. A. J., MacDonald, J. A., Lontay, B.: Mechanisms by which smoothelin-like protein 1 reverses insulin resistance in myotubules and mice.
Mol. Cell. Endocrinol. 551, 1-12, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2022.111663>
IF: 4.369 (2021)
2. Horváth, D.*, **Tamás, I.***, Sipos, A., Darula, Z., Bécsi, B., Nagy, D., Iván, J., Erdődi, F., Lontay, B.: Myosin phosphatase and RhoA-activated kinase modulate neurotransmitter release by regulating SNAP-25 of SNARE complex.
PLoS One. 12 (5), 1-23, 2017.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177046>
* These authors contributed equally this work.
IF: 2.766

További közlemények

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





5. Kónya, Z., Bécsi, B., Kiss, A., **Tamás, I.**, Lontay, B., Szilágyi, L., Kövér, K. E., Erdődi, F.: Aralkyl selenoglycosides and related selenosugars in acetylated form activate protein phosphatase-1 and -2A.
Bioorg. Med. Chem. 26 (8), 1875-1884, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2018.02.039>
IF: 2.802
6. Horváth, D., Sipos, A., Major, E., Kónya, Z., Bátor, R. K., Dedinszki, D., Szöllősi, A. G., **Tamás, I.**, Iván, J., Kiss, A., Erdődi, F., Lontay, B.: Myosin phosphatase accelerates cutaneous wound healing by regulating migration and differentiation of epidermal keratinocytes via Akt signaling pathway in human and murine skin.
Biochim. Biophys. Acta. Mol. Basis Dis. 1864 (10), 3268-3280, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbdis.2018.07.013>
IF: 4.328
7. Sipos, A., Iván, J., Bécsi, B., Darula, Z., **Tamás, I.**, Horváth, D., Medzihradsky-Fölkl, K., Erdődi, F., Lontay, B.: Myosin phosphatase and RhoA-activated kinase modulate arginine methylation by the regulation of protein arginine methyltransferase 5 in hepatocellular carcinoma cells.
Sci. Rep. 7 (40590), 1-15, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/srep40590>
IF: 4.122
8. Iván, J., Major, E., Sipos, A., Kovács, K., Horváth, D., **Tamás, I.**, Bai, P., Dombrádi, V., Lontay, B.: The Short-Chain Fatty Acid Propionate Inhibits Adipogenic Differentiation of Human Chorion-Derived Mesenchymal Stem Cells Through the Free Fatty Acid Receptor 2.
Stem Cells Dev. 26 (23), 1724-1733, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1089/scd.2017.0035>
IF: 3.315

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 33,965

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

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

Debrecen, 2022.12.01.

