Debreceni Egyetem
Általános Orvostudományi Kar
Orvosi Vegytani Intézet

36. OTDK Biológia Szekció

A smoothelin-szerű 1 fehérjét mimikáló peptid hatása az inzulinrezisztens endometriális sejtekre

Készítette:
Farkas Emese Vivien
Biotechnológia MSc hallgató
Debreceni Egyetem, Természettudományi és Technológiai kar

Témavezetők:
Dr. Lontay Beáta egyetemi docens
és
Dr. Keller Ilka PhD hallgató
Debreceni Egyetem, Orvosi Vegytani Intézet

Debrecen

2023

Tartalomjegyzék

1. Absztrakt **2**

2. Rövidítések **3**

3. Bevezetés **4**

3.1 A humán endometrium anatómiája és a menstruációs ciklus **4**

3.2 A humán endometriális sztromális sejtek (HESC) decidualizációja **5**

3.3 A humán endometriális epithelialis sejtek és szerepük **6**

3.4 Az SMTNL1 fehérje jellemzése, szerepe és hatásmechanizmusa **7**

3.5 A miozin foszfatáz (MP) jellemzése és szerepe **11**

3.6 A miozin foszfatáz szabályozása és annak élettani szerepe **12**

3.7 A leukémia-gátló faktor (LIF) **13**

3.8 Gesztációnális diabetes mellitus (GDB) **14**

4. Célkitűzés **16**

5. Anyagok és módszerek **17**

5.1 Felhasznált anyagok **17**

5.2 Sejtkultúrák fenntartása, kezelése és lízise **18**

5.3 Gélelektroforézis (SDS-PAGE) és Western Blot analízis **20**

5.4 Immunfluoreszcenciás festés **20**

5.5 High-Content Screening (HCS) mikroszkópia **22**

5.6 *In vitro* scratch assay **22**

5.7 Statisztikai analízis **23**

6. Eredmények és értékelésük **24**

6.1 Az SMTNL1-mimikáló peptid hatása a MYPT1 expressziójára **24**

6.2 Az SMTNL1-mimikáló peptid hatása a MYPT1 Thr853 foszforilációjára **26**

6.3 Az SMTNL1-mimikáló peptid nincs hatással a MLC expressziójára **27**

6.4 Az SMTNL1-mimikáló peptid hatása a MLC Ser19 foszforilációjára **28**

6.5 Az SMTNL1-mimikáló peptid hatása Ishikawa sejtek migrációjára **29**

7. Összefoglalás **31**

8. Köszönetnyilvánítás **33**

9. Függelék **34**

10. Irodalomjegyzék **35**

1. Absztrakt

A terhesség alatt expresszálódó szteroid hormonok hatására jelentős változások következnek be a simaizomzatban. A progeszteron és a 17β-ösztradiol a megfelelő nukleáris hormonreceptoraihoz kötődik, koordináltan megváltoztatva a génexpressziós mintázatokat a megfelelő célszövetekben. A simaizom kontraktilis aktivitását szabályozó fő mechanizmus a miozin 20kDa könnyű lánc (MLC20) Ca^{2+}/kalmodulin-függő miozin könnyű lánc kináz általi foszforilációja, míg a relaxációt az MLC20 miozin foszfatáz (MP) általi defoszforilációja váltja ki. A terhességet metabolikus változások sorozata jellemzi, amelyek elősegítik a zsírszövet felszaporodását a terhesség korai szakaszában, majd ezt követi az inzulinrezisztencia és a facilitált lipolízis a terhesség késői szakaszában. Amennyiben az inzulinszekréció nem megfelelő az inzulirezisztencia kompenzálására, ez hiperglikémiához és gesztációnális diabetes (GDB) kialakulásához vezethet. A smoothelin-szerű 1 fehérje (SMTNL1) expressziója a terhesség során a méh- és vaszkuláris simaizomban indukálódik. Az emelkedett progeszteronszint hatására az SMTNL1 Ser-301 oldalláncán a protein kináz A és G által foszforilálódik. Emellett az SMTNL1 fehérje citoplazmatikusan képes a MP-hoz kapcsolódni, fehérje-fehérje kölcsönhatás által gátolva a fehérje aktivitását, ezzel szabályozva a sejtek kontraktilitását, valamint így közvetlenül hat a trofoblasztsejtek implantációjára az endometriumba. A ligandkötött progeszteron receptor a válaszadó eleméhez kapcsolódik a sejtmagban, valamint a citoplazmában foszforilálódott SMTNL1 is képes a sejtmagba transzlokálódni, és hozzákötődve a ligandkötött progeszteron receptorhoz, koeffektorként képes szabályozni számos gén kifejeződését, így szabályozva terhesség során a vérnyomást és a méh kontraktilitását. Jelen kutatásunk eredményeként azt találtuk, hogy az SMTNL1 progeszteron jelenlétében fokozottan csökkenti a MP szabályozó alegységének, a MYPT1-nek az expresszióját. Továbbá egy eddig még nem jellemzett úton, annak gátló foszforilációját fokozza, így gátolva a MP holoenzimet; ezzel a MP szubsztrátjának, a MLC20 fokozott foszforilációját eredményezve. Ekképpen a sejtek citoszkeletális tulajdonságait módosítva, a migrációt kontroll körülmények esetén protein-protein interakcióval az SMTNL1 gátolja. GDB körülmények esetén génexpressziós szinten szabályozza az SMTNL1 a MYPT1 expresszióját, ráadásul gátló foszforilációját emelve csökkenti a migrációs kapacitást.

2. Rövidítések

DSC – decidualizált sztromális sejt

E2 – ösztradiol

ECM – extracelluláris mátrix

EGF – epidermális növekedési faktor

ER – ösztrogén receptor

FDC – follikuláris dentritikus sejt

FFA – szabad zsírsav

GDM – gesztációnális diabetes mellitus

hESC – humán endometriális sztromális sejt

IGF-1 – inzulin növekedési faktor-1

IL-15 – interleukin-15

MLC20 – miozin könnyű lánc

MLCK – miozin könnyű lánc kináz

MP – miozin foszfatáz

MYPT1 – miozin foszfatáz szabályozó alegység-1

PDGF – vérlemezkéből-származó növekedési faktor

PP1c – protein foszfatáz-1 katalitikus alegység

PR – progeszteron receptor

RGD – arginin-glicin-aszparaginsav motívum

ROCK – Rho-asszociált kináz

TGF-β – transzformáló növekedési faktor β

TNF-α – tumor nekrózis faktor α

uNK – uterális természetes ölősejt

3. Bevezetés

3.1 A humán endometrium anatómiája és a menstruációs ciklus

Az emberi méh három fő szövettani rétegből tevődik össze: az első, külső kötőszöveti réteg a perimetrium, amely szerkezetét tekintve laza rostos kötőszövet, és rögzíti a méhet a medence aljzatához. A második az izomréteg, másnéven a myometrium, amely egy három rétegű simaizomszövet; hosszanti, haránt, és körkörös izmokból épül egymásra, ezzel elősegítve a méh összehúzódását. A harmadik az üreggel érintkező funkcionális réteg az endometrium, melyet a myometriumtól membrana basalis választja el; ezen alaphártyán található meg elsőként a bazális sejtor. Ezen sejtrétegben találhatóak azon osztódásra és differenciálódásra képes sejtek, amelyek a menstruáció közben levált funkcionális réteget pótolni képesek. Az endometriumot egyrétegű, mikrociliás, köbös epithelium határolja el az uterus üregétől (Szentágothai és Réthelyi, 1989).

Fogamzóképes korban lévő nők a pubertáskor és a menopauza közötti időszakban hormonálisan szabályozott endometriális proliferációs, differenciációs és a rákövetkező leválásból álló havi ciklusokon mennek keresztül. Mindezen folyamatok annak érdekében mennek végbe, hogy a női reproduktív szerv felkészüljön a terhességre, mely folyamatot menstruációs ciklusnak hívunk. Ilyen fizikai változások a humán endometriumban szükségesek ahhoz, hogy megfelelően képes legyen az embrió beágyazására a méhfal. Az endometrium megváltozása, beleértve a morfológiai és biokémiai adaptációját a petefészek szteroid hormonjai által – melyek az ösztrogén és a progeszteron – mennek végbe, amelyek a menstruációs ciklus alatt termelődnek. A proliferatív (vagy follikuláris) fázisban, az ovuláció előtt az ösztrogén szint megemelkedik, és megvastagodásra, proliferációra készteti az endometriumot. Ebben a fázisban az a réteg, amely korábban levált az előző menstruáció során, regenerálja magát a bazális rétegből, amíg el nem éri a 0,5-5 mm-es vastagságot a ciklus 14. napjára. Endometriális csőszerű mirigyek formálódnak, amelyek fokozatosan nyílszerű, tubuláris struktúrákká válnak. A spirális artériák is meghosszabbodnak a folyamat során, biztosítva a megfelelő vérellátást az osztódó szövet felé (Reed *et al.*, 2018). A proliferatív fázist követi az ovuláció, majd a szekréciós (vagy luteális) fázis, mely promotálja a megnövekedett progeszteron szintet, ezzel a morfológiai transzformációját az endometriális sztromális sejteknek (hESC). A hESC-k fibroblaszt-szerű megjelenésből köbös, epitheliális sejt szerű deciduális sejtekké alakulnak a decidualizációnak nevezett folyamat során. Nem megfelelő decidualizáció egy közvetlen oka az implantációs sikertelenségnek és a későbbiekben bekövetkező embrió elvetélésének (Michalski *et al.*, 2018).

3.2 A humán endometriális sztromális sejtek (hESC) decidualizációja

A humán endometrium decidualizációjának szinkronizáltan kell megtörténnie a blasztociszta megérkezéséig, amely folyamat magában foglalja a progeszteron hatását az ösztrogén alapú fibroblaszt-szerű prekurzor sejtekre a sztrómában. A keletkező sejt a decidualizált sztromális sejt (DSC), mely kritikus a környező trofoblaszt, hematopoetikus, uterális természetes ölősejt (uNK) és mezenchymalis sejtek kialakulásához. A decidualizációs reakció a vérerek körül iniciálódik és a sztrómán át terjed a késői luteális fázisban és a terhes endometriumban. A vérerek miatti asszociáció miatt valószínű, hogy a decidua sejtek átjáróként működnek közre a leukociták belépése számára, valamint a hemosztázisban is szerepet játszanak (Dunn *et al*., 2003).

Az implantációt az embrió és az endometrium közötti komplex kölcsönhatás szabályozza, amely a petesejtek érésének korai szakaszában kezdődik. Az oocyta szinkron fejlődése és az endometrium érése, majd az embrió orientációja, appozíciója, adhéziója és a blasztociszta endometriális inváziója kulcsfontosságú az implantáció szempontjából.

A progeszteron és az ösztrogén az endometrium fejlődésének domináns hormonális modulátorai. Mind az epithél, mind a sztromális kompartment expresszál progeszteron- és ösztrogén receptorokat, és a válasz mértéke ezeknek a receptoroknak a szintjétől függ, valamint maguknak a hormonoknak a koncentrációjától. A follikuláris fázisban az ösztradiol (E2) stimulálja az ösztrogén receptor (ER) expresszióját és a proliferációt. A proliferáció leállítja az ösztrogénreceptorok progeszteron blokkolását az ovuláció idején, ekkor növekszik a 17β-hidroxiszteroid dehidrogenáz aktivitás, ami az E2-ből történő ösztriol (E3) konverziót teszi lehetővé. Luteális fázis során növekvő glikoprotein és peptid szekréció tapasztalható a méh üregébe, majd a decidualuzáció során progeszteron-dependens speciális leukocita infiltráció következik be. Ekkor növekszik a mitózis és differenciáció mértéke a sztrómában (Diedrich *et al*., 2007).

Bár a progeszteron és az ösztrogén az endometrium differenciációjának kulcsfontosságú modulátorai, szerepük ebben a folyamatban összetett. A hormonális aktivitás nemcsak a progeszteron, ösztrogén és receptoraik szintjétől függ, hanem a progeszteron és az ösztrogén metabolizmusának sebességétől is (pl. azon enzimek felszabályozását, amelyek az E2-t ösztronná (E1) vagy ösztron-szulfáttá alakítja, illetve a szulfát csoport eltávolítását az E2-ről és az ösztronról). A progeszteron és az ösztrogén aktivitását a koaktivátorok és represszorok hatása is befolyásolja. Ezenkívül mindkét hormon számos endometriális fehérje expresszióját szabályozza parakrin jelátviteli módon. A progeszteronon és az ösztrogénen kívül számos

egyéb endokrinológiai tényező is ismert, amelyek közvetítik az endometrium működését. Rágcsálókban a prosztaglandinokról (PG-k) úgy gondolják, hogy elősegítik a megnövekedett vaszkuláris permeabilitást az implantáció során, és a PG-termelésben részt vevő enzimek (COX-1 és COX-2) expressziója ciklikus változást mutat (Diedrich *et al*., 2007).

In vitro a cAMP érzékennyé teszi a sztromális sejteket a progeszteronra, így gyorsabb növekedést és differenciációt tesz lehetővé a deciduális fenotípus irányába. A decidualizáció idején jelentős változások következnek be az endometriumban az extracelluláris mátrix szerkezete és funkciója tekintetében is. Ezek a változások rögzítést biztosítanak a sejtek számára, de emellett az új mátrix szerepet játszhat a trofoblasztok migrációjának elősegítésében. A laminin eloszlása, amely a deciduális sejt közelében helyezkedik el és ezért hiányzik a myometriumban, valószínűleg trofoblaszt inváziót szabályzó szereppel bír. A fibronektin is a deciduális sejt körül lokalizálódik, valamint mivel arginin-glicin-aszparaginsav (RGD) motívumot tartalmaz, a kihorgonyzásban játszhat szerepet (Dunn *et al*., 2003).

3.3 Humán endometriális epithelialis sejtek és szerepük

A humán endometriumban történő változások esszenciálisak a terhesség megalapozásához. Ezen változások progeszteron által indukáltak *in vivo*, és a szövetre specifikus uNK megjelenésével is jár, mely bőséges CD56 expresszióval jellemezhető (Dunn *et al*., 2003).

Amellett, hogy a sztróma fizikai támaszt ad az azt fedő epitheliumnak, ezen kívül parakrin faktorokat is biztosít, melyek mediálják az epithél sejtek válaszait a szteroid hormonokra. Epitheliális rákos sejtek számos szinten megzavarják a normális sejt-sejt kölcsönhatásokat. Ezen sejtek tipikusan abnormális onkogén vagy tumorszupresszor génexpressziót mutatnak, és akár el is veszíthetik a helyi szöveti környezet általi szabályozottságukat. Ez az abnormalitás a mezenchyma/sztróma felől érkező parakrin szignálokra is hatással van, amely érinti mind az embrionális és mind a felnőtt szöveteket, és az epithélium-ECM-sztróma közötti kapcsolat változásaihoz vezethet. Ezek alapján feltételezhető, hogy az ilyen változások a növekedés szabályozási zavarához és végül neopláziához vezethetnek (Arnold *et al*., 2002).

Számos tanulmány számol be az endometrium hámsejtjeinek szövettani és ultrastrukturális módosulásáról a menstruációs ciklus során. A korai/középső szekréciós fázisban a hámsejteket általában három fő ultrastrukturális jellemzővel írnak le: glikogén felhalmozódás, óriási mitokondriumok és nukleáris csatornarendszer jelenléte. Egyes tanulmányok különbségeket írnak le az apikális morfológiában (csillók, mikrobolyhok és

pinopodák), mások pedig jelentős ultrastrukturális eltéréseket ismernek fel a hámsejtekben (Bartosch *et al*., 2011).

Különbségek ismerhetőek fel a felszíni és a mirigyhám között, főként a pinopódák tekintetében. A felszíni hámban a pinopódák a teljes luminális sejtfelszínt elfoglalják, citoplazmájuk organellumokban szegény, míg a mirigyhámban a pinopódák vékonyabbak és szabálytalan alakúak, citoplazmájuk gyakran megtelik szekréciós anyaggal. A felszíni pinopodák sejtjei kevés sejtkontaktust mutatnak az apikális régiónál, míg a mirigyhámban ezek gyakoriak. A felszíni és mirigyhám csúcsi sejtnyúlványainak eltérő morfológiai jellemzői különböző funkciókhoz kapcsolódhatnak. Míg a felszíni pinopódák az implantációs ablak körül jelennek meg, amelyek fontosak az embrió rögzítésében és beágyazódásában (amit a sejtkontaktusok fellazulása segít), addig a mirigyes pinopódák valószínűleg a ciklus egészében, sőt a terhesség korai szakaszában is jelen vannak, és részt vesznek a szekrécióban (Bartosch *et al*., 2011).

Korábban kimutatták, hogy a pinopódák apikális régiói az előnyben részesített helyek a humán blasztociszták kötődéséhez, ami a trofoblaszt és a pinopódus sejtek által az apikális junkciós komplexek megosztásán keresztül történik. Érdekes módon az immunhisztokémiai vizsgálatok során a felszíni és mirigyhámok eltérő fenotípust mutatnak, különösen az implantációs ablakban, ami szintén alátámasztja lehetséges eltérő funkciójukat. Egyes markerek mindkét epitheliumban expresszálódnak, de jelentősen eltérő intenzitással vagy sejtes lokalizációval (heparin-kötő epidermális növekedési faktor (HB-EGF); leukémia-gátló faktor (LIF) és LIF receptor; ER; progeszteron receptor (PR)). Más markerek kizárólag egy epitéliumban expresszálódnak, és expressziója hirtelen megszakad a felszíni és mirigyhám találkozásánál (pl. citokeratin 13). Ezenkívül számos tanulmány kimutatta, hogy a hámsejt-sejt kötődésben szerepet játszó fehérjék (pl. E-cadherin, α-6-integrin, β-catenin és dezmoplakin) átrendeződnek a felszíni hámban az implantációs periódus során (Bartosch *et al*., 2011).

3.4 Az SMTNL1 fehérje jellemzése, szerepe és hatásmechanizmusa

A sima- és vázizom fenotípusos plaszticitást mutatnak az olyan fiziológiai igénybevételekre adott válaszként, mint a testmozgás és a terhesség. Minden fenotípusos állapotot strukturális, kontraktilis és receptorfehérjék egyedi készletének expressziója jellemez, amelyek korrelálnak a génexpresszió különböző mintázataival. A terhesség a szteroid hormonok, a 17β-ösztradiol és a progeszteron hatására jelentős változásokat idéz elő a simaizomzatban az egész testben. Mindkét hormon a megfelelő nukleáris

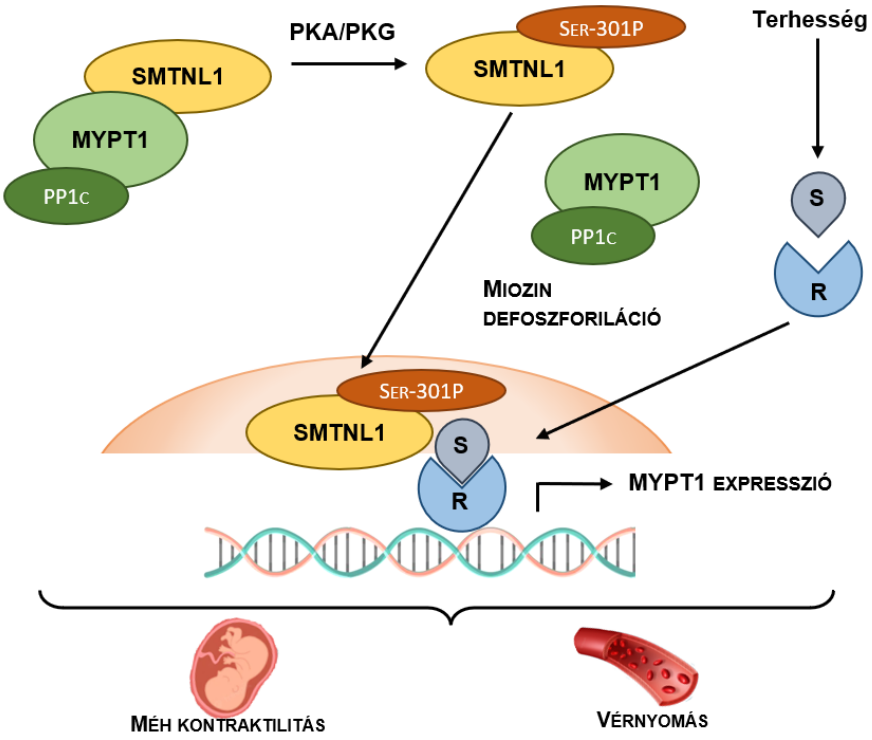
hormonreceptorokhoz (PR és ER) kötődik, koordináltan megváltoztatva a génexpressziós mintázatokat a megfelelő célszövetekben (Lontay *et al*., 2010).

Az összes simaizom kontraktilis aktivitását szabályozó fő mechanizmus a 20 kDa molekulasúlyú miozin könnyű lánc (MLC20) kalcium/kalmodulin-függő miozin könnyű lánc kináz (MLCK) általi foszforilációja, míg a relaxáció az MLC20 miozin-foszfatáz (MP) általi defoszforilációja során következik be. A MP lehetséges fehérje effektora a smoothelin-szerű 1 fehérje (SMTNL1). Az SMTNL1 kalponin homológia domént (CH_2) tartalmaz a C-terminálisán, míg a primer szekvencia fennmaradó kétharmada teljesen egyedi az emlős adatbázisokban. Az egereken végzett géndeléciós vizsgálatok kimutatták, hogy az SMTNL1 szerepet játszik a cGMP/cAMP által közvetített edzéshez való adaptációban, amely magában foglalja a vaszkuláris simaizomzat kontraktilis aktivitásának közvetlen modulálását. Azt is kimutatták, hogy az SMTNL1 gátolja a MP aktivitást a miozinnal és az izolált könnyű láncokkal szemben *in vitro* a miozin foszfatáz szabályozó alegységgel (MYPT1) kialakított kapcsolatán keresztül (Lontay *et al*., 2010).

Az SMTNL1 fehérjét a simaizomban írták le először a protein kináz G (PKG) szubsztrátjaként. Szerkezeti vizsgálatok alapján az SMTNL1 a smoothelin (SMTN) aktin kötő fehérjecsaláddal nagyfokú szekvenciahomológiát mutat, amelyek tagjai a SMTN-A, SMTN-B és az SMTN-szerű fehérje. Ezek mindegyikének szerepe van a simaizom összehúzódás szabályzásában és hozzájárulnak a vaszkuláris adaptációhoz, amely eseménynek fontos szerepe van a magas vérnyomás, a terhesség és a fokozott fizikai aktivitás esetében. Az SMTNL1 fehérje többféle szerepet játszik az összehúzódás szabályozásában; többek között összehúzódást szabályzó molekulákkal (ilyenek például a kalmodulin, tromopiozin és a MP) képes kölcsönhatni, valamint a kontraktilis fenotípus és a Ca^{2+}-szenzitizáció kapacitásának transzkripciós kontrollját képes szabályozni. A kontraktilitást a MP gátlásán keresztül is kifejti, ezzel befolyásolva a MLC defoszforilációját. Tehát az SMTNL1 fontos szerepet játszik az adaptív válaszok közvetítésében mind a simaizomban, mind a harántcsíkolt izomzatban a differenciáció és a terhesség alatt. Az a felismerés, hogy a terhesség és az SMTNL1 deléció nagymértékben növeli a MYPT1 expresszióját a vaszkuláris és a méh simaizom sejtjeiben, olyan molekuláris mechanizmust biztosít, amely megmagyarázza a terhesség által kiváltott relaxációt ezekben a szövetekben. Tehát a terhesség elősegíti a MYPT1 expresszióját, növeli a miozin defoszforilációját, deszenzitizálja a méhet és az érrendszeri simaizomzatot Ca^{2+} szignálokra, ezáltal elősegíti a méh relaxációját és csökkenti a szisztémás vérnyomást (Lontay *et al*., 2015).

A terhesség olyan szövetekben indukálja az SMTNL1 expresszióját, mint a méh és a vaszkuláris simaizom, valamint a nemi hormonokra reszponzív szövetek. A méh simaizomzatában az SMTNL1 fontos szerepet játszik a terhességben az adaptív válaszok elősegítésében, és ezt a folyamatot kifejezetten az SMTNL1 és a PR szteroid hormon receptor kölcsönhatása közvetíti. *In vitro* és *in vivo* SMTNL1 szelektíven kötődik a PR-hoz, és nem kötődik más szteroidhormon receptorokhoz. Ez azt sugallja, hogy az SMTNL1 a PR jelátvitel bifunkcionális ko-regulátora, és így olyan molekuláris mechanizmust biztosít, amelynek révén a PR képes a génexpressziós minták megváltoztatására, így koordináltan elősegítve a méh simaizomfunkciójának változásait a terhesség alatt (Lontay *et al*., 2015).

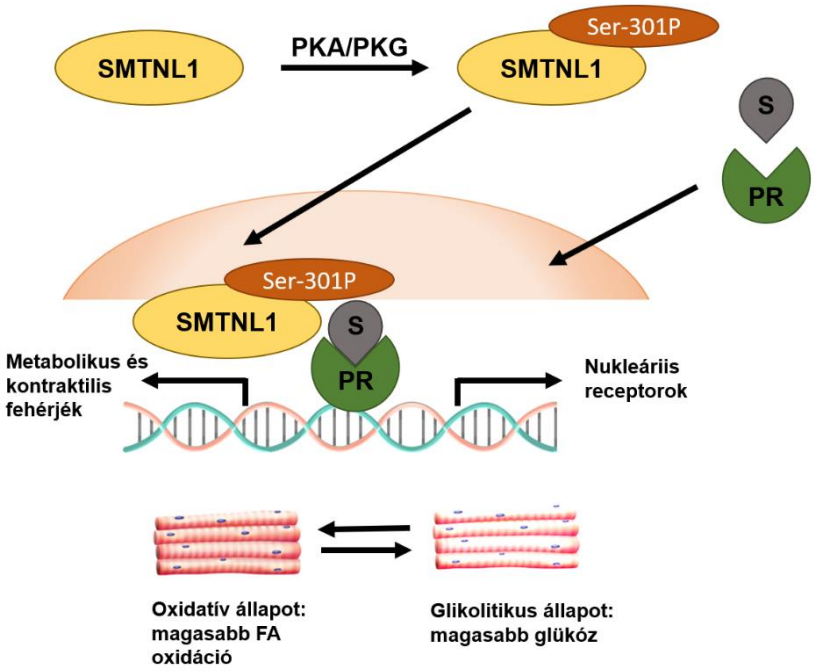
Munkacsoportunk eddigi eredményei szerint az SMTNL1 a PKA/PKG általi foszforiláció hatására disszociál a MP holoenzim MYPT alegységéről, és a sejtmagba transzlokálódik, ahol a PR-hoz a progeszteron hormon jelenlétében kötődik, ezáltal szabályozva a PR-hoz kötött gének expresszióját (1. ábra).



1. ábra: Az SMTNL1 szabályozó szerepe a terhesség alatt a MYPT1 expressziójára. A MYPT1 fokozott expressziója a méhben és a vaszkuláris simaizomban elősegíti a miozin defoszforilációját és az izomrelaxációt. PKA/PKG: protein kináz-A/protein kináz-B; S: szteroid hormon; R: szteroid hormon receptor; Ser-301P: az SMTNL1 fehérje szerin 301-es oldalláncán történő foszforilációja.
Az ábra saját készítésű a Lontay *et al*., 2015 cikk alapján.

A terhességi hormonok, például a progeszteron és az ösztrogén kiváltják a vázizomzat glikolitikus fenotípusra való átváltását a megfelelő nukleáris receptoraikon keresztül. Feltételezhetően az SMTNL1 negatív szabályozó szerepet játszik a PR és ER transzkripciós aktivitásában a vázizomban, és a PKA/PKG által közvetített jelátvitel specifikusan befolyásolhatja ezt a folyamatot az SMTNL1 foszforilációján keresztül a Ser-301 oldalláncon. Funkcionálisan ezért az SMTNL1 a PR transzkripciós kofaktoraként működik *in vivo*, és az SMTNL1 foszforilációja specifikusan gátolja ezt a funkciót (Lontay *et al*., 2015).

Az emelkedett szteroidhormon szint hatására (progeszteron) az SMTNL1 és a PR a sejtmagba kerül. Nem terhes állapotban az SMTNL1 a PR aktivitás visszaszorítására szolgál; terhesség alatt azonban ez a gátlás visszaszorul, és elősegíti a vázizom-specifikus gének aktiválódását, amelyek szabályozzák a metabolikus és kontraktilis fehérjék expresszióját. Ez az összehangolt válasz határozza meg az anya fiziológiai állapotát. A vázizomzatban a glikolitikus fenotípusra való átállás csökkenti a vázizomzat oxidatív kapacitását, elősegíti a zsírsavak megnövekedett raktározását és inzulinrezisztens állapotot indukál, ami a keringő glükózszint növekedését eredményezi. Az előbb leírt molekuláris mechanizmus sematikus ábrázolása a 2. ábrán látható.



2. ábra: A molekuláris mechanizmus, amellyel az SMTNL1 szabályozza a PR-B-t, hogy koordináltan elősegítse a vázizomzat adaptációját válaszul a terhességre. PKA/PKG: protein kináz-A/protein kináz-B; S: progeszteron; PR: progeszteron receptor; FA: zsírsavak; Ser-301P: az SMTNL1 fehérje szerin 301-es oldalláncán történő foszforilációja.
Az ábra saját készítésű a Lontay *et al*., 2015 cikk alapján.

3.5 A miozin foszfatáz (MP) jellemzése és szerepe

Fehérjék reverzibilis foszforilációja, amely a szerin (Ser), treonin (Thr) és tirozin (Tyr) reziduumokon megy végbe, az egyik leggyakoribb mechanizmus, amellyel a sejtfolyamatok összehangolt szabályozása megy végbe. A sejtek foszforilációs állapotát a protein kinázok és a protein foszfatázok aktivitása közötti egyensúly határozza meg (Fonyó, 2011).

A MP holoenzim három alegységből épül fel: első a protein foszfatáz-1 (PP1c), amely a katalitikus alegység, molekulasúlya 38 kDa; második a nagy miozin kötő alegység, melyet később miozin foszfatáz szabályozó alegységnek neveztek el (MYPT1), molekulasúlya 110-133 kDa; valamint a harmadik, kisebb, ismeretlen funkciójú alegység, a 20/21 kDa molekulasúlyú M20/21 alegység. A PP1c felelős a holoenzim katalitikus aktivitásért, és a szabályozó alegységgel képes kölcsönhatásba lépni. A MYPT1 szabályozó alegység célra irányítja a holoenzimet, és a szubsztrát kötéséért felelős a defoszforilációs folyamat során. Egyik első leírt szubsztrátja a miozin, és a PP1c-t a 20 kDa-os miozin könnyű lánc (MLC20) foszforilált reziduumai felé irányítja. Az M20/21 alegység a MYPT1 C-terminális régiójához kötődik, azonban nincs közvetlen hatással a foszfatáz aktivitásra (Kiss *et al*., 2019).

A PP1c kötőhelyet a MYPT1 C-terminális felében nem azonosítottak; ennek ellenére ez a MYPT1 régió fontos szerepet játszik az MP aktivitás foszforilációtól függő gátlásában. A MYPT1 számos protein kináz foszforilációs konszenzus helyet tartalmaz, és ezek közül a Thr696 és/vagy Thr853 foszforilációja (a számozás a humán izoformára vonatkozik) az MP aktivitás gátlását eredményezi. A Rho-asszociált kinázt (ROCK) először a Thr696 és a Thr853 foszforilációjának kinázaként azonosították, de később számos más kinázt is azonosítottak, köztük a Raf-1-et és a p21-aktivált protein kinázt is (Kiss *et al*., 2019).

Az MP szabályozásával kapcsolatban fontos kérdés az is, hogy melyik foszfatáz(ok) oldhatják fel a MP-t a foszforilált MYPT1 gátlása alól. Az izolált PP1c, protein-foszfatáz-2A (PP2A) katalitikus alegység (PP2Ac) és protein-foszfatáz-2B (PP2B, más néven kalcineurin) képes defoszforilálni a MYPT1 szabályzó alegységben a Thr696 és Thr853 oldalláncokat. Azt is megállapították, hogy a ciklosporin A, egy kalcineurin/PP2B gátló ágens növelte mind a Thr696, mind a Thr853 foszforilációs szintjét a MYPT1-ben, valamint befolyásolta az endothélsejtek barrier funkcióját, ami arra utal, hogy a PP2B fontos szerepet játszik ezen gátló helyek defoszforilációjában a sejtrendszerekben (Kiss *et al*., 2019).

3.6 A miozin foszfatáz szabályozása és annak élettani szerepe

A MYPT1 a miozin-foszfatáz célzó fehérjék (MYPT) családjába tartozik, és szerepet játszik a simaizom-összehúzódás szabályozásában, de a közelmúltban a MYPT1 más élettani folyamatokban is nagy figyelmet kapott, többek között a migrációban, a sejtadhézióban, génexpresszióban sejtciklusban és differenciációban betöltött szerepét vizsgálva.

A simaizomban a vastag filamentumokat a kötegekbe rendezett simaizom-miozin molekulák képezik. A miozin fej képes a vékony filamentumok aktinmolekuláiban jelenlévő miozinkötő helyekhez kapcsolódni, ezzel kereszthidak képződhetnek az egyes kötegek miozin- és aktin molekulái között. A simaizom-miozin molekula feji részéhez kapcsolódó MLC20 a miozin szabályozó alegysége. Nyugalmi, ellazult állapotban az MLC20 szabályozó fehérje nem engedi, hogy a miozin kapcsolatba léphessen az aktinnal, ezért nem alakulhatnak ki kereszthidak. A simaizom kontrahált/relaxált állapotát az MLC20 molekulán történő foszforilációs és defoszforilációs mechanizmusok határozzák meg. Az MLC20 defoszforilált formája megakadályozza a miozin aktinkötését, a foszforilált MLC20 kapcsolódása a miozinhoz azonban lehetővé teszi a kereszthídciklus megindulását, ezzel a kereszthidak kialakulását (Fonyó, 2011).

A foszforilált MLC20 szintjét két enzim, a miozin könnyű lánc kináz (MLCK) és a miozin könnyű lánc foszfatáz (MLCP) aktivitásának aránya szabja meg. Az MLCK aktivitása a myoplasma Ca^{2+}-koncentrációjától függ. A Ca^{2+} aktiváló hatását kalmodulinhoz kapcsolódva, mint Ca^{2+}-kalmodulin komplex fejti ki. Az összehúzódást az izomsejt citoplazmájában bekövetkező Ca^{2+}-koncentráció emelkedése indítja meg. A szabályozás kulcsfontosságú tagja továbbá egy kis G-fehérje, a Rho, amely aktivált állapotban megindítja a ROCK működését. A ROCK foszforilálja, ezzel reverzibilisen inaktiválja az MLCP-t. A Rho/ROCK aktiválását több különböző 7 transzmembrán receptor ligandkötése is képes megindítani. Lényeges, hogy együttesen indul meg a Ca^{2+}-jel kialakulása és a foszfatáz inaktiválása, emiatt ez a két mechanizmus összehangoltan képes működni (Fonyó, 2011).

Mivel a MYPT1 Thr696 vagy MYPT1 Thr853 oldalláncán történő foszforilálása hasonlóak az MLC Ser19 helyen történő foszforilációjával, ezért ezek a MYPT1 régiók szubsztrát analógokként működhetnek, amelyeket a MP nagyon lassú ütemben defoszforilál az MLC Ser19 foszforilációjához képest. Az MP-nak kulcsfontosságú szerepe van az aktomiozin kontraktilitásának szabályozásában az MLC defoszforilációján keresztül, de hozzájárul a sejtmigráció vagy sejtadhézió szabályozásához is. A MP szerepe az endothél barrier erősítésében/védelemben van közvetlenül, mivel a MYPT1 ROCK által kiváltott foszforilációja

a gátló foszforilációs helyeken MP inaktivációt eredményez, ami egyidejűleg a foszforilált MLC felhalmozódásával, aktin remodellinggel és az endotheliális sejtek összehúzódásával járó folyamat (Kiss *et al*., 2019).

3.7 A leukémia-gátló faktor (LIF)

Az implantáció során az emlősökben a legfontosabb esemény a receptív endometrium kifejlődése, illetve fiziológiás differenciációja deciduává. Több molekuláris marker lehet segítségünkre a receptív endometrium identifikálására, ilyenek az integrinek, interleukin-1 (IL-1), kalcitonin, amphiregulin, epidermális növekedési faktor (EGF), HB-EGF, kolónia stimuláló faktor 1, leukémia-gátló faktor (LIF), mucin, trofinin/tastin, HOXA-10 és a ciklooxigenáz (Aghajanova, 2004).

A leukémia-gátló faktor (LIF) egy szekretált glikoprotein, amelyet először egy olyan faktorként írtak le, amely az egér mieloid leukémiás M1 sejtek differenciációját indukálja makrofágokká. A LIF a citokinek családjába tartozó fehérje, mely fehérjéknek sokszor átfedő hatásaik lehetnek. A LIF pleiotróf hatásai közé tartozik többek között a proliferáció, differenciáció és a sejtek túlélése, továbbá a LIF képes a citokinek expresszióját indukálni további szabályozó molekulákkal együtt *in vitro*. A LIF potenciális inducerei közé tartozik az IL-1, tumor nekrózis faktor α (TNF-α), EGF, vérlemezkéből-származó növekedési faktor (PDGF) és a transzformáló növekedési faktor β (TGF-β) (Aghajanova, 2004).

A LIF gén felszabadulása az endometriális szövetből szükséges az endometriális fogékonysághoz és a korai embrionális fejlődéshez. A HOXA-10, HOXA-11 és LIF szintek szignifikánsan alacsonyabbak policisztás ovárium szindrómában (PCOS) szenvedő nőknél, valamint az elvetélési ráta magasabbnak bizonyult olyan nők esetében, akik policisztás ováriummal rendelkeznek. Azon embriók, melyekben kevesebb HOXA-10 gén volt, morfológiájukban megegyeztek a fiziológiás állapotúakkal, azonban amikor ezeket az embriókat a méhbe transzferálták, egérben képtelenek voltak beágyazódni, ezzel azt feltételezve, hogy a HOXA gén expressziójában történt változások összeköttetésben állnak a csökkent implantációs rátával (Kara *et al*., 2019).

A LIF fontos szerepét az is igazolja, hogy egy kísérlet során, melyet nőstény, LIF génre nézve homozigótán deficiens, transzgénikus egereken végeztek, az embrió implantáció nem történt meg. A beágyazódás hiánya nem az embrió defektusa miatt következett be. Ezt az igazolja, hogy amikor ugyanezen embriók át lettek helyezve egy álvemhes recipiensbe, ott sikeresen beágyazódtak. Exogén LIF gén addíciója homozigóta nőstényekbe az implantáció

normál periódusa alatt helyreállítja a folyamatot és a LIF $^{-/-}$ blasztociszták képesek a megfelelő beágyazódásra (Stewart *et al*., 1992).

A LIF a méhnyálkahártya epiteliális sejtjeiben is expresszálódik a megfelelő időpontban, és a LIF receptorok jelen vannak a preimplantációs embriókon. Egereken végzett vizsgálatok azt mutatják, hogy az LIF szerepet játszik az implantációban, és elősegítheti az embrionális fejlődést is (Diedrich *et al*., 2007).

3.8 Gesztációnális diabetes mellitus (GDM)

A gesztációnális diabetes mellitus (GDM) előfordulása megduplázódott az elmúlt 6-8 évben, és ez párhuzamban áll az elhízottság egyre gyakoribbá válásával. A GDM hosszútávú következményeként jelentkezhet az idővel kialakuló kettes típusú cukorbetegség az anyánál, valamint megnövekedett eséllyel lesz elhízott és glükóz intoleráns az utód. Az inzulinrezisztencia terhesség előtt is fennáll olyan nőkben, akiknél korábban GDM-t diagnosztizáltak, azonban gyakran rosszabbodik gesztáció alatt (Barbour *et al*., 2007).

Az inzulin szekréció alkalmatlan az inzulin rezisztencia kompenzálására, ami hiperglikémiához vezet. A krónikus inzulin rezisztencia egy központi komponens a GDM patofiziológiájában. A terhesség korai szakaszában az inzulin szekréció emelkedik, de az inzulin érzékenység változatlan marad, azonban csökkenhet, vagy akár növekedhet is. A terhesség későbbi szakaszában az anyai zsírsejt raktárak visszaesnek, miközben a posztprandiális szabad zsírsavak (FFA) szintje emelkedik és az inzulin-mediált glükóz felvétel 40-60%-kal romlik a terhesség előtti állapottal összehasonlítva. Az inzulin azon képessége, hogy szuppresszálja a lipolízist, szintén csökken a terhesség késői szakaszában, és ez tovább csökken a GDM-ban szenvedő nőknél, amely magasabb posztprandiális FFA-hoz, emelkedett máj glükóz termeléshez és súlyos inzulin rezisztenciához vezet (Barbour *et al*., 2007).

Sikeres implantáció esetén az endometrium epitéliuma hetekig fenntartja a glikogén szintézist az embrionális fejlődés során. Az anyai inzulin elősegíti a glikogén szintézist azáltal, hogy kötődik az endometrium hámsejtjeinek inzulinreceptorához, így jelátvitelt indítva az inzulinreceptor szubsztrát 1-en (IRS-1) keresztül. Az inzulinreceptorhoz kötődve az inzulin legalább hat tirozin-maradékon stimulálja a tirozin kináz receptorok β-alegységének foszforilációját. Az inzulinreceptor (IR) jelátvitelének kezdeti lépése hibás azoknál a GDM alanyoknál, akiknél szignifikánsan kisebb az IR maximális tirozin foszforilációja, mint azoknál a nőknél, akiknek terhesség alatt normális a glükóztoleranciája, és nincs változás a receptor kötésében vagy a receptorok számában. Ezeknek a tirozin-maradékoknak az autofoszforilációja

stimulálja a receptort az intracelluláris szubsztrátokhoz való kötődéshez (IRS-1-től IRS-6-ig) (Barbour *et al*., 2007).

Az IRS-1 a fő dokkoló fehérje az emberi vázizomzatban. Miután az IRS-1 a tirozin doméneken foszforilálódik, hatására a foszfatidilinozitol 3-kináz (PI3K) felszaporodik, ami egy döntő esemény a glükóz transzport stimulálásához. Az IR és IRS fehérjék tirozin foszforilációját a celluláris és membránkötött tirozin foszfatázok által végrehajtott defoszforilációs reakciók egyensúlyozzák ki. Az inzulinreceptor aktivitása mellett az IRS-1 fehérje szintje kritikus fontosságú az inzulinérzékeny szövetek glükózfelvételének szabályozásában. Vizsgálatok azt mutatják, hogy az IR-tól eltérően, az IRS-1 fehérje 30-50%-kal csökken a vázizomzatban normál túlsúlyos terhes és GDM alanyokban, összehasonlítva túlsúlyos, nem terhes kontroll alanyokkal, ami azt sugallja, hogy erős hatása van a terhességnek, és valószínűleg mégerősebb hatása van a GDM-nak az IRS-1 szintjének leszabályozásában (Barbour *et al*., 2007).

4. Célkitűzés

Korábban elért eredményeink azt mutatták, hogy az *smtnl1* KO egerek olyan reproduktív fenotípust mutatnak, amelyet meddőség, a magas embrionális halálozás és a megtermékenyítéshez szükséges hosszabb intervallum jellemeznek. A reproduktív rendellenességek kétféle módon kapcsolódnak az SMTNL1 fehérjéhez. Elsőként, az SMTNL1 génexpresszió szintjén szabályozza az inzulin jelátviteli elemeket az endometriumban. Másodszor, az SMTNL1 a MP-hoz kapcsolódva annak enzimatikus aktivitásának szabályozásával hatással van az endometrium sejtjeinek migrációjára. Emellett közvetlenül befolyásolja a simaizom- és hámsejtetek citoszkeletális tulajdonságait, ezáltal a trofoblasztok implantációját.

Hipotézisünk szerint, mivel a hámsejtek citoszkeletális tulajdonságait az SMTNL1 fehérje változtatni képes, ezért az SMTNL1 olyan szintetikus peptidjével kezeljük a sejteket, amely azt a szekvenciáját tartalmazza az eredeti fehérjének, amely a progeszteron receptorral képes kölcsönhatást kialakítani. Előzetes kísérlet során ennek a fehérjének a szekvenciáját kutatócsoportunk meghatározta. A TAT szekvencia jelenléte miatt membránpermeábilis, továbbá biotin jelölővel ellátott SMTNL1 N-terminális peptid alkalmazásával az SMTNL1 által kifejtett pozitív hatást várjuk. Ezzel az SMTNL1-mimikáló peptiddel és ennek a TAT-biotin peptid kontrollját használva *in vitro* scratch assay-t alkalmazva kívánjuk az endometriális epitheliális sejtek migrációját nyomon követni három körülményben, amelyek a kontroll kezeletlen, kontroll terhes (MPA) és gesztációnális diabetes (GDB) körülmények. Továbbá az SMTNL1-mimikáló peptid migrációra kifejtett hatását kívánjuk vizsgálni immunfluoreszcens festéssel és High Content Screening (HCS) mikroszkópiával, a MP, annak foszforilációs állapotát vizsgálva, illetve a kölcsönható és szabályozó fehérjéinek, illetve azok foszforiláltsági és aktivitási állapotának vizsgálatával. Ezeket a változásokat az antitestekhez kapcsolt fluoreszcens jel vizsgálatával kívánjuk követni, és analizálni az SMTNL1 hatását a MYPT1 és MLC fehérjékre szintén három körülmény, a kontroll kezeletlen, MPA és GDB körülmények között. Minden kísérlethez Western Blot analízissel kívánjuk alátámasztani a talált fiziológiás események molekuláris hátterét.

Kísérleteinkben Ishikawa sejteket használtunk a humán endometriális epithélium modellezésére. Ezen adenokarcinoma sejtek kiválóan reprezentálják az endometrium epitheliumának azt a funkcióját, hogy migrációs képessége miként változik különböző fiziológás állapotokban.

5. Anyagok és módszerek

5.1 Felhasznált anyagok

1 mM Sodium Pyruvate Solution – Biocenter #13-115E

1% Triton-x – Sigma #T8787-100ML

10% Criterion™ TBE Polyacrylamide Gel – Bio-Rad #3450051

10x Protease Inhibitor – Sigma #S8830-20TAB

150 mM NaCl – Sigma #31434-1KG-M

17-β-estradiol – Sigma #E2758

8 Br-cAMP – Sigma #B7880

Bovine Serum Albumin – Sigma Lot #SLCH5267

Charcoal/dexran treated fetal bovine serum - HyClone #SH30068.03

DNase/RNase free water – PanReac AppliChem #A7398,0500

Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose – Sigma #RNBK2820

Dulbecco′s Modified Eagle′s Medium - low glucose – Sigma #D6046

EDTA – Sigma #E5134-500G

Gene Juice Transfection Reagent – Merck #7937-3

Insulin solution human – Sigma #SLBV5127

Medroxyprogesterone acetate – Merck #M0250000

MYPT1 – Bio-Science #FS-15866119

Na-bicarbonate - Lonza #BE-115E

Nuclease-free Water – VWR #E476-500ML

Penicillin-Streptomycin – Gibco #15140122

PhenoVue™ Cell Painting Kit – PerkinElmer # A12379

Phosphate buffered saline – Merck #PPB006

Pierce™ ECL Western Blotting-Substrat – Thermo Scientific™ #32106

Ponceau S – Sigma #P3504-10G

Resazurin Sodium Salt – Sigma #R7017

SMTNL1 peptid – GeneCopoeia

Tripsin – Sigma #T3924-100ML

5.2 Sejtkultúrák fenntartása, kezelése és lízise

Az Ishikawa sejtkultúra fenntartásához a sejteket 5% FBS, 500 ng/mL Streptomycin/Penicillin, 500 ng/mL nem-esszenciális aminosavak, 500 ng/mL L-glutamint tartalmazó Dulbecco's modified Eagle's tápfolyadékban (DMEM) tenyésztettük alacsony glükóz tartalommal (továbbiakban: teljes DMEM médium). A sejteket időközönként, legfeljebb 10 naponta passzáltuk tripszinnel, melyet előzetesen PBS pufferrel mostunk. A sejttenyésztése 37 ^{o}C-on, 5 % CO_2 és 95% levegő vízgőzzel telített inkubátorban történt.

Sejtek passzálása során első lépésként az inkubátorból kivett, flaskában lévő sejtekről steril fülkében leszívtuk az elhasznált médiumot Pasteur pipettával. Ezt követően PBS-sel mostuk, majd hozzáadtunk térfogat arányosan tripszint (ez T75-ös flaska esetén 1,5 mL). Tripszines emésztés során az inkubátorba helyeztük pár percre a flaskát, majd mikroszkóppal ellenőriztük, hogy a tripszines kezelés hatására felváltak-e a sejtek. Amennyiben felváltak, morfológiai változás következik be, amely mikroszkópban jól látható; úszó gömbökként jelennek meg a sejtek. A tripszin térfogatának 6-szorosával hígítottuk a tenyésztőedény tartalmát médiummal, majd új flaskába transzferáltuk a sejteket, amelyeket teljes DMEM médiumban tenyésztettük tovább. Amennyiben a passzálás után kísérletre szerettük volna használni a sejteket, 6- illetve 96 well plate-ekre raktuk a sejteket.

A hormonok az alábbiak szerint kerültek a MPA és GDB körülményekhez. Először MPA körülmény esetén alacsony glükóztartalmú médiummal, GDB körülmény esetén magas glükóztartalmú médiummal pótoltuk fel (fenolvörös mentes) a welleket, amely 6x1000 µL = 6000 µL – 6x400 µL = 3600 µL-t jelent. Ez egészült ki az alábbi három hormonnal:

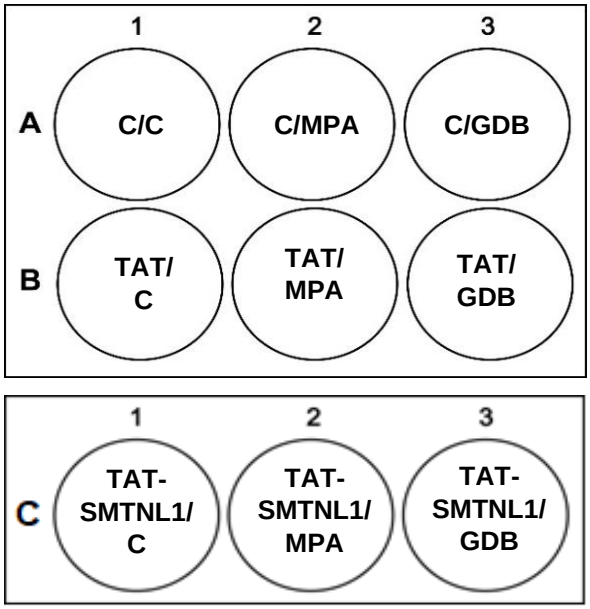
- 1mM medroxiprogeszteron-acetáttal (2 mM stock) 3 µL,
- 10 nM 17-β-ösztradiollal (17 µM stock) 6 µL,
- 0,5 mM 8-bromo-cAMP-vel (123 mM stock) 24,4 µL.

A GDB körülmény kiegészült 100 nM high insulinnal (2 µM stock), ami 150 µL volt, és 4,5 g/L (ami 0,025 mol/dm^3) high glucose-zal (médiumban 3,5 g/L, ami 0,0175 mol/dm^3) és v_1=5,28x10^{-5} mol (0,0175 dm^3), valamint v_1=7,5x10^{-5} mol (0,025 dm^3), így n_1=5,28x10^{-5} mol, n_2=7,5x10^{-5} mol, Δ_n=n_2-n_1 → 2,25x10^{-5} mol/dm^3, így 22,5 µL glükózra volt szükségünk. Ezeket a számolásokat a $\frac{c_2 \cdot V_2}{c_1} = V_1$ és a $c = \frac{n}{V}$ egyenletek szerint végeztünk.

A kezeléshez szintetikus SMTNL1-mimikáló peptidet (továbbiakban TAT-SMTNL1) és annak TAT-biotin peptid kontrollját (továbbiakban TAT) használtuk. A TAT információt nem hordozó peptid, mely a TAT-SMTNL1-hez hasonlóan egy TAT szekvenciát tartalmaz a HIV-1 vírusból, amely a membránpenetrációhoz szükséges, valamint biotin jelölőt a

vizualizáció érdekében. Előzetesen történt optimalizációt követően a megfelelő mennyiség 5 µM-nak bizonyult, ezt alkalmaztuk. A TAT-SMTNL1 az SMTNL1 egy olyan szekvenciáját tartalmazza, amely a progeszteron receptorral képes kölcsönhatást kialakítani. Ezen szekvencián kívül tartalmazza a TAT szekvenciát is, valamint a biotint is. Ebből 10 µM mennyiséget alkalmaztunk.

A kísérleti elrendezés két tenyészedényre (3. ábra):



3. ábra: a 6 well plate-k kezelésének kiosztása, 9 körülmény esetén, melyekből később a lizátum készült. C: kontroll; TAT: TAT-biotin peptid; TAT-SMTNL1: SMTNL1 mimikáló peptid; MPA: kontroll terhes; GDB: gesztációnális diabetes.
Az ábra saját készítésű.

A sejtek lízise során 50% trikarbonsavas (TCA) precipitációt alkalmaztunk. Ekkor az Ishikawa sejteket a rajtuk lévő médiummal együtt (V=1,5 mL) centrifugáltuk 5 percig Eppendorf csövekben, 16000 rpm-en, 4 °C-on. Ezután a pelletről eltávolítottuk a médiumot, majd jégen hozzáadtunk 150 µL TCA-t és szuszpendáltuk. Ezután újabb centrifugálás következett 5 percig, 16000 rpm-en, 4 °C-on. A TCA-t leszívtuk a centrifugálás után a pelletről, majd 150 µL acetonnal mostuk, ezután egy újabb centrifugálás következett 5 percig, 16000 rpm-en, 4 °C-on. A centrifugálás végén az acetont is eltávolítottuk a pelletről, majd hozzáadtuk a 6x SDS loading mintapuffert (pH:6,8; 300mM Tris, 12% SDS, 20% glicerol, brómfenolkék, 100 nM és β-merkaptoetanol, utóbbi mindig frissen került bele), és 100 °C-on inkubáltuk 5 percig.

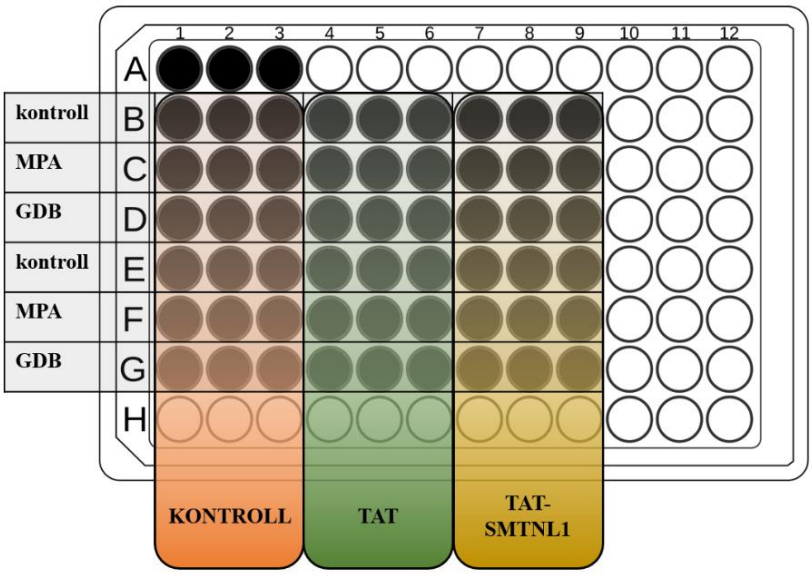
5.3 Gélelektroforézis (SDS-PAGE) és Western Blot analízis

Gélelektroforézis során a mintáinkból 15 µL mintát vittünk fel a 10%-os poliakrilamind gél minden welljébe (Criterion™). A gélt 200V konstans feszültségen 40 percig elektroforetizáltuk, mely során a mintáink fehérjetartalma molekulatömeg szerint szétvált, és az így kapott sávokat az első wellbe, valamint az utolsó 2 wellbe alkalmazott 2 µl molekulasúly standard sorhoz viszonyítani tudtuk a későbbiekben. A gélelektroforézis befejeztével a gélt nitrocellulóz membránra transzferáltuk, 400 mA konstans feszültséget alkalmazva. A transzfer időtartalmát a poliakrilamid gél vastagságához igazítottuk. A transzfer minőségét Ponceau reverzibilis kötődésű festékkel ellenőriztük, melyet miután megbizonyosodtunk a transzfer minőségéről, desztillált vízzel mostunk addig, amíg ki nem tisztult a membrán és az azt körülvevő folyadék. Ezután a membránt legalább másfél óráig blokkoltattuk 5%-os BSA/TBST oldatban, melyet frissen készítettünk el minden alkalommal.

Az elsődleges antitestet az optimalizált hígításban a membránra helyezve egy éjszakán át inkubáltuk 4 °C-on. Másnap a membránt háromszor 10 percig mostuk TBST oldatban, majd 1:1000 hígításban, 5% BSA/TBST oldatban került rá a másodlagos antitest. Szobahőmérsékleten inkubáltuk legalább egy órán át a másodlagos antitestekkel a membránt. Az inkubációs idő letelte után kétszer 10 percig TBST-vel, majd egyszer 10 percig TBS oldattal mostuk a membránt, végül Western Bright előhívóval és a ChemiDoc műszer segítségével vizualizáltuk az antigén jelét.

5.4 Immunfluoreszcenciás festés

Az eljárás során a frissen passzált sejtekből (T75-ös flaska) 4 mL sejtet kimértünk, majd 80%-os konfluencia esetén erre 13,6 mL friss teljes DMEM médiumot tettünk. A maradék térfogatból 2 mL-t kimértünk, és új flaskába helyeztünk, majd felpótoltuk teljes DMEM médiummal 10 mL-re, a sejtvonal fenntartása végett. A kezelésre szánt sejteket steril fülke alatt 8 soros pipetta segítségével két Perkin Elmer Cell Carrier Ultra 96 well plate-en szélesztettük, összesen 114 wellbe. Ezt 24 órára inkubátorba helyeztük, majd ennek letelte után elvégeztük a kezelést. Minden kezeléshez három biológiai párhuzamost használtunk, és kontroll, MPA és GDB körülményeket alkalmaztunk, valamint kezeletlen kontroll (KONTROLL), kontroll TAT (TAT), és TAT-SMTNL1 kezeléseket végeztünk. A plate-k kezelésének kiosztása az alábbi ábrán látható (4. ábra).



4. ábra: a 96 well plate-k kezelésének kiosztása, elrendezése. Nem feliratozott (A1-A3): autofluoreszcencia kontroll; KONTROLL: kezeletlen kontroll; MPA: kontroll terhes körülmény; GDB: gesztációnális diabetes körülmény; TAT: TAT-biotin peptid; TAT-SMTNL1: SMTNL1 mimikáló peptid. Felhasznált antitestek: MYPT1, MYPT1 Thr853 foszforilációja, MLC, MLC Ser19 foszforilációja
Az ábra saját készítésű.

Kezelést követően 72 órával festettük a sejteket. Mivel a fluoreszcens festékek fényérzékenyek, sötétben végeztünk minden festési eljárást, majd az inkubációs idő alatt alufóliával takartuk le a plate-ket.

Első lépésként óvatosan leszívtuk a transzfekciós reagenseket és a peptideket tartalmazó médiumot a sejtekről, majd háromszor mostuk 1%-os PBS-sel (V=200 µL). Ezután a sejteket 4%-os paraformaldehid (PFA) oldattal fixáltuk 1 órán át szobahőmérsékleten. Ezt ismét mosás követett 5 percenként 1%-os PBS-sel. A sejtmembrán permeabilizációjához 0,2% Triton-X/PBS oldattal kezeltük a sejteket fél órán át. Ezt ismételt 1% PBS-sel történő mosás követett. Következő lépésként 1% BSA/PBS-ben (pH 7,5) inkubáltuk a sejteket egy órán át, mellyel blokkoltuk az antitestek aspecifikus kötődését. A primer antitesteket (MYPT1, MYPT1 Thr853 foszforilációja, MLC, MLC Ser19 foszforilációja) 200x higítottuk 1% BSA/PBS oldatban és a mintákat éjszakán át inkubáltuk 4°C-on. Ezt egy újabb mosási lépés követett, 0,1% BSA/PBS-sel (pH 7,5) öt percenként háromszor, majd a másodlagos antitestekkel és a Texas Red fényérzékeny, citoszkeletont festő ágenssel történő inkubálás következett. Ezzel egyidőben a fluoreszcens festéket is hozzáadtuk (Alexa-488), ezt az autofluoreszcencia kontrollt tartalmazó első 3 wellbe (A1-A3) is tettünk. A másodlagos antitesteket 1:1000 higításban alkalmaztuk. Ezután 1 óra inkubáció következett, majd háromszor mostuk 10 percen át 1% PBS-sel a welleket.

Végső lépésként DAPI/PBS-ben festettük a sejtmagokat, ezt 1:1000 higítási arányban alkalmaztuk, melyet 2 percig hagytunk a sejteken, majd háromszor 5 percen át mostuk PBS-sel. Az utolsó mosás után a PBS nem került leszívásra, ezzel együtt történt a vizualizálás high-content screening (HCS) mikroszkóp segítségével.

5.5 High-Content Screening (HCS) mikroszkópia

Az 5.4 bekezdésben részletezett immunfluoreszcens festés eredményeit az Opera Phenix™ High-Content Screening System (PerkinElmer) készülékkel elemeztük ki. Ezzel a műszerrel egyszerre több sejtbéli paramétert is tudunk vizsgálni, többek között a citoszkeleton, a sejtmag és a különböző sejtalkotókhoz kötődő antitestek fluoreszcens jelét. Ez a készülék egy automatizált fluoreszcens mikroszkóp, amelyhez egy képelemző szoftver (PerkinElmer - Harmony 4.8) van kapcsolva, emiatt alkalmas akár sokmintás (96; 384; és akár 1536 well) vizsgálatok kvalitatív és kvantitatív elemzésére is.

Kísérleteink során a háromszorosan festett (Alexa-488 + Texas Red + DAPI) sejtek fluoreszcenciaintenzitás értékeit mértük 554 nm-es excitációs és 568 nm-es emissziós hullámhosszon. Az autofluoreszcencia kontrolljaként az egyszeresen festett (Alexa-488) sejtek fluoreszcenciaintenzitás értékeit használtuk.

Az immunfluoreszenciás képek felvételeit 40-szeres „vizes" objektívvel készítettük, amely immerziós olaj helyett víz segítségével növeli az objektív felbontóképességét.

5.6 *In vitro* scratch assay

Az *in vitro* scratch assay egy egyszerű és gazdaságos módszer a sejtmigráció *in vitro* vizsgálatára. Ez a módszer azon a megfigyelésen alapul, hogy egy új mesterséges rés, úgynevezett „scratch" létrehozásakor egy konfluens sejt monorétegen az újonnan létrehozott rés szélén lévő sejtek a nyílás felé mozognak, hogy lezárják a karcolással létrehozott rést, amíg új sejt-sejt kapcsolatok létre nem jönnek. Az eljárás alapvető lépései közé tartozik egy „scratch" létrehozása az egyrétegű sejteken, a képek rögzítése a sejtmigráció elején és rendszeres időközönként a karcolás lezárása érdekében, valamint a képek összehasonlítása a sejtvándorlás sebességének meghatározásához.

Az Ishikawa sejtek migrációs potenciálját időfüggő módon vizsgáltuk High Content Screening Microscopy (HCS) segítségével. Mielőtt a sejteket 96 well plate-re helyeztük és kezeltük a peptidekkel az 5.1 alfejezetben leírt módon, a tenyészethez adtunk Vybrant™ DiD Cell-Labeling Solution-t (Invitrogen™, katalógusszám: V22887), a gyártó előírásai szerint. 48 órás kezelés után a 96 lyukú lemez felületét egy mikropipetta hegyével megkarcoltuk, majd

24 órán keresztül regisztráltuk a sebgyógyulási folyamatot konfokális mikroszkóppal az Opera Phoenix™ High Content Screening műszer segítségével.

Minden egyes lyuk szabad felületét és sejtszámát az Opera Phoenix™ High Content Screening mikroszkóp beépített intelligens szoftverrel elemezte. A szabadon maradt területet az alábbi képlettel számoltuk ki: $\frac{X_E}{X_B} = \frac{\text{végső terület}}{\text{kezdeti terület}}$, ahol, ha XE=XB, tehát a hányados 1, akkor a szabadon maradt terület maximális, így nem történt záródás. Amennyiben XE=0, tehát a hányados is 0, akkor nem maradt szabad terület, a karcot teljesen benőtték a sejtek. Ha 100% a teljesen benőtt felület, akkor ebből levonva a szabadon maradt terület arányát ($\frac{X_E}{X_B}$), megkapjuk az aktuálisan benőtt terület százalékos arányát, tehát a képlet: $1 - (\frac{X_E}{X_B}) * 100$. Az eredmények a kontroll csoport átlagára voltak normalizálva, majd oszlopdiagramon ábrázoltuk az eredményeket.

5.7 Statisztikai analízis

A Western Blot analízis során a ChemiDoc műszer által regisztrált jelintenzitást az ImageJ program segítségével numerizáltuk, majd az így kapott MYPT1 antitestet a GAPDH-ra, MYPT1 Thr853 foszforilációját MYPT1-re, MLC-t GAPDH-ra és MLC Ser19 foszforilációját MLC jelére normálva ábrázoltuk.

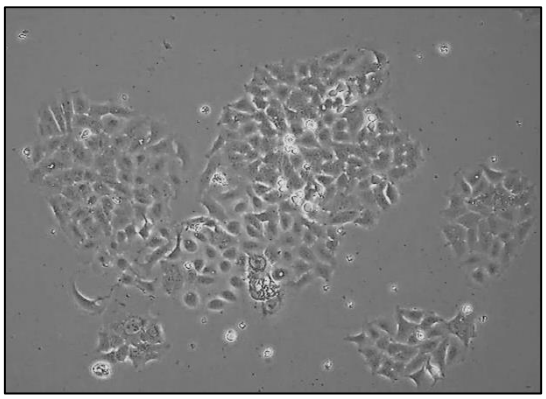
A normálás során kapott adatokat GraphPad Prism 9 program segítségével grafikonokként jelenítettük meg, és ezen belül alkalmaztuk a Student-féle páros t-próbát, mely során kapott eredményeket manuálisan helyeztünk az egyes oszlopok felé. Amennyiben a p kisebb, mint 0,05 volt, eredményünket statisztikailag szignifikáns különbségnek vettük.

In vitro scratch assay során egytényezős varianciaanalízissel (ANOVA) elemeztünk, a $p < 0,05$ statisztikailag szignifikáns különbségnek vettük.

6. Eredmények és értékelésük

6.1 Az SMTNL1-mimikáló peptid hatása a MYPT1 expressziójára

Sejtkultúráink kezelését legfeljebb 10 napos inkubáció után kezdtük meg. Az Ishikawa sejtekre jellemző az apró gömbszerű morfológia, valamint a csoportokba rendeződés (5. ábra).

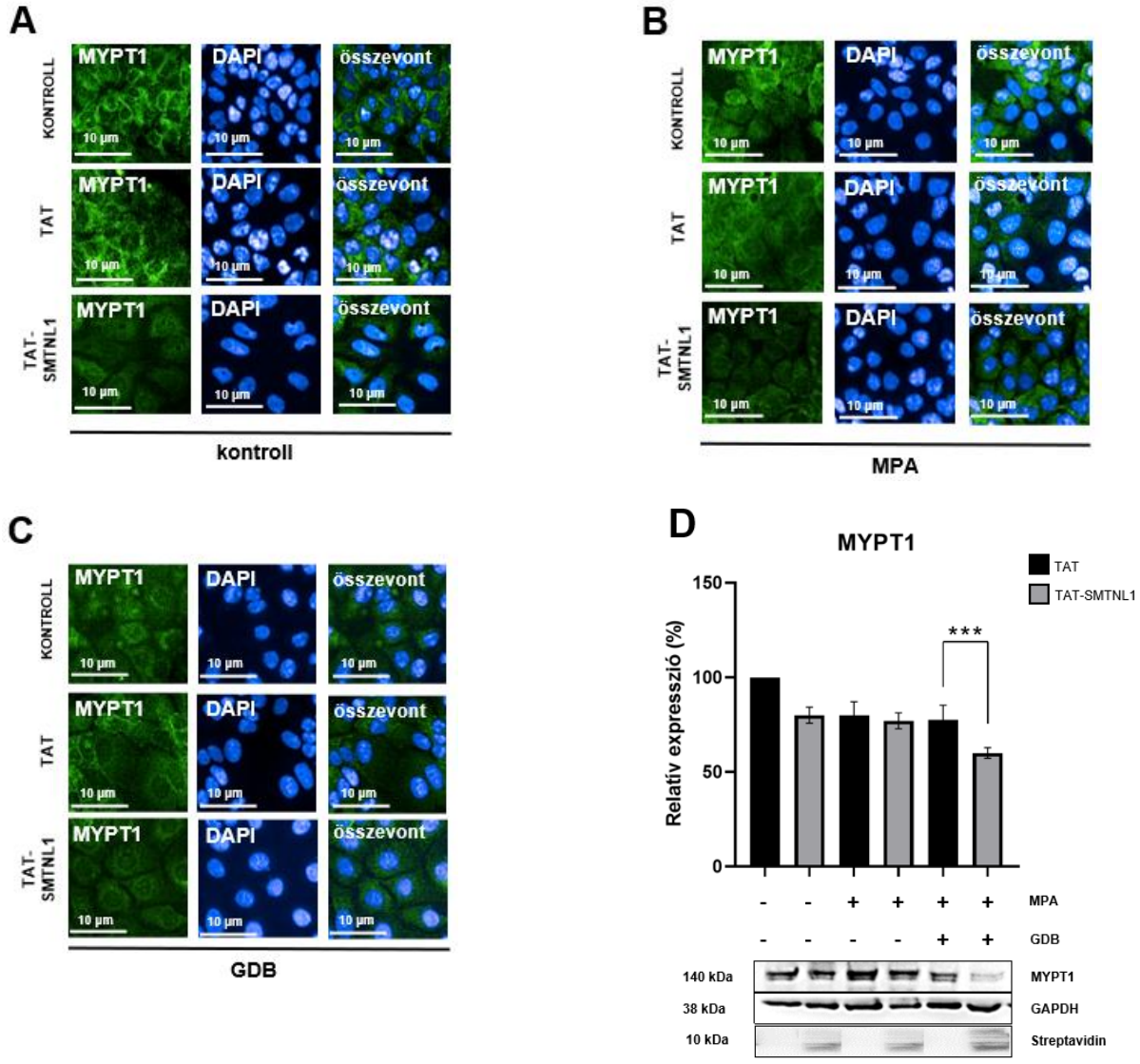


5. ábra: Az Ishikawa sejtek morfológiája 4 napos inkubációt követően, kontroll körülmények között, fenolvöröset tartalmazó teljes DMEM médiumban tartva, konfokális mikroszkóp alatt, 10x objektívvel. Jól látható, hogy a sejtek csoportokat alkotnak, közöttük sejtkapcsolatok alakulnak ki.
A kép saját készítésű.

Az immunfluoreszcenciás eljárással a MP MYPT1 szabályozó alegységének expressziós és foszforilációs szintű változásait követtük nyomon kontroll, MPA, illetve GDB állapotban. A MYPT1 ellen termeltetett antitest esetén kontroll körülmények között a sejtek kisebbek, nem differenciálódnak. A kontroll TAT esetében sem változik a morfológia, azonban TAT-SMTNL1 hozzáadása esetén a sejtek citoszkeletonja megnyúlik, köbös morfológiára váltanak a sejtek, továbbá a monolayer kultúrák elkezdenek glanduláris struktúrákat alkotni. Ezen morfológiai változások jól láthatóak MPA körülmények között is, itt az SMTNL1 fehérje szignifikánsan megváltoztatta a sejtek morfológiáját. GDB körülmények között látható leginkább a sejtek citoszkeletonjának kiterjedése, már kontroll körülmények esetén is, amelyet a TAT-SMTNL1 hozzáadása tovább fokoz (6. ábra).

Kontroll és TAT kontroll peptid kezelések hatására a MYPT1 expressziója közel megegyező szintet mutat. Ezen sem az MPA, sem a GDB kezelés megléte sem változtat. A sejten belüli lokalizációjára zömében a citoszolikus/citoszekeletális jelenlét kimutatható (6. ábra A és B). A sejtlizátumokat Western Blot analízissel is vizsgáltuk az adatok igazolására és azok kvantifikációjára. A semi-kvantitatív Western Blot alapján a belső kontrollként használt GAPDH expressziós szintje nem változott. A GAPDH szintjére korreláltatott MYPT1 expressziós szintjében nem találunk szignifikáns eltérést kontroll és MPA körülmények kontroll és TAT kontroll kezelései esetén. Azonban GDB körülmény esetén a MYPT1-nek

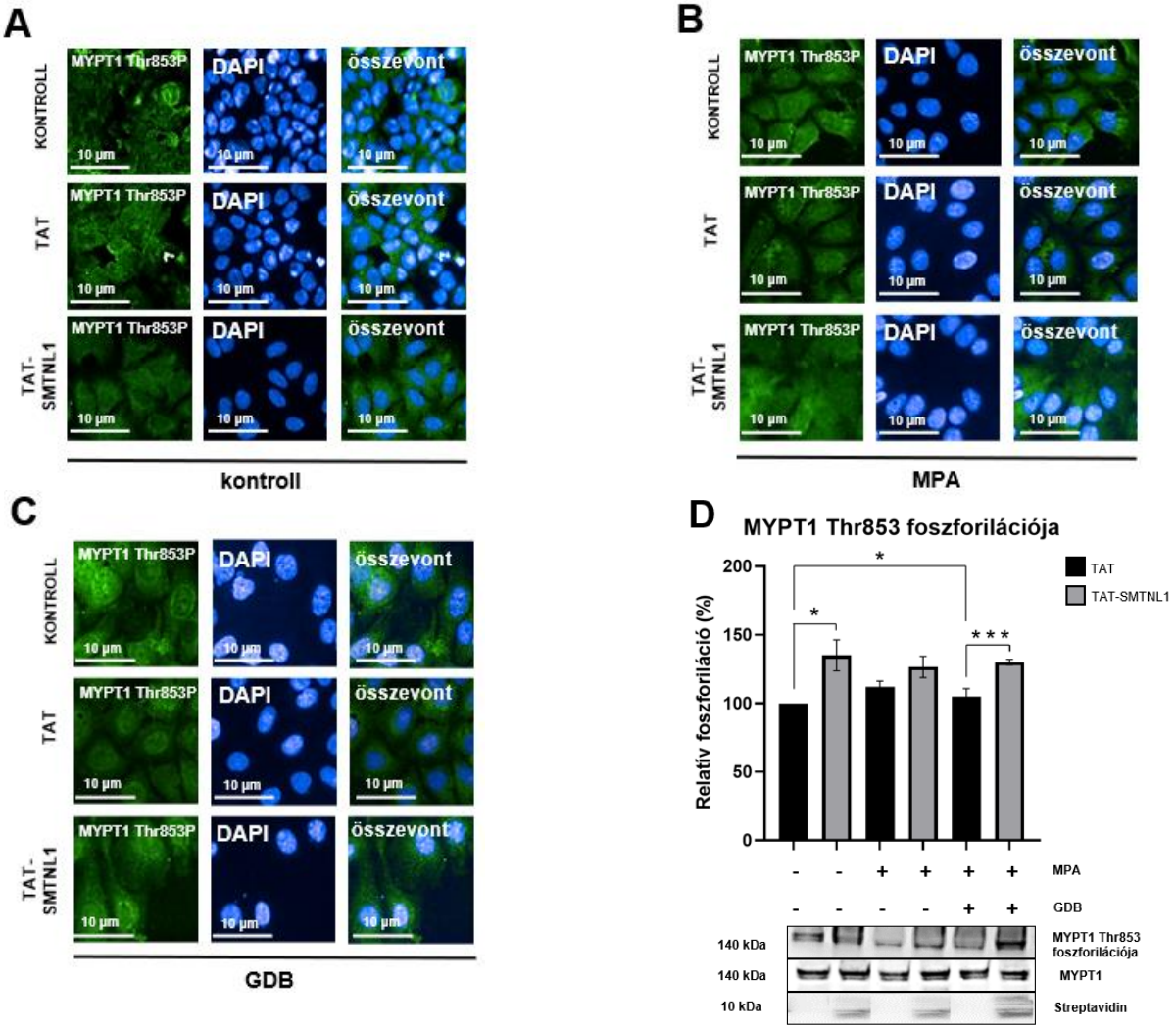
szignifikánsan csökkent az expressziója az SMTNL1 hatására, mely körülményben az SMTNL1 már foszforilált formában a sejtmagban képes a progeszteron receptor koaktivátoraként kifejteni génexpressziót befolyásoló hatását. Mivel az SMTNL1-nek miozin foszfatázt gátló hatása van, ezért ennek a szabályzó alegysége, vagyis a MYPT1 csökkent expresszióját vártuk a kísérlet során. A peptid jelenlétét Western Blot-tal, a biotint jelölni képes Streptavidin segítségével mutattuk ki (6. ábra).



6. ábra: HCS képek, Alexa-488 (zöld, MYPT1 expresszió) és DAPI (kék, sejtmag) festéssel;
A ábra: kontroll körülmények, kezeletlen kontroll, TAT-biotin peptid (TAT) és SMTNL1-mimikáló peptid (TAT-SMTNL1) kezeléssel;
B ábra: kontroll terhes körülmények (MPA), kontroll, TAT és TAT-SMTNL1 kezeléssel;
C ábra: gesztációnális diabetes körülmények (GDB), kontroll, TAT és TAT-SMTNL1 kezeléssel.
D ábra: Western blot analízis és a hozzá tartozó statisztikai analízis gráfja, normálás GAPDH-ra történt, n=3, SD, *** p‹0,05 a GDB/TAT – GDB/TAT-SMTNL1 között.
Az ábrák saját készítésűek.

6.2 Az SMTNL1-mimikáló peptid hatása a MYPT1 Thr853 foszforilációjára

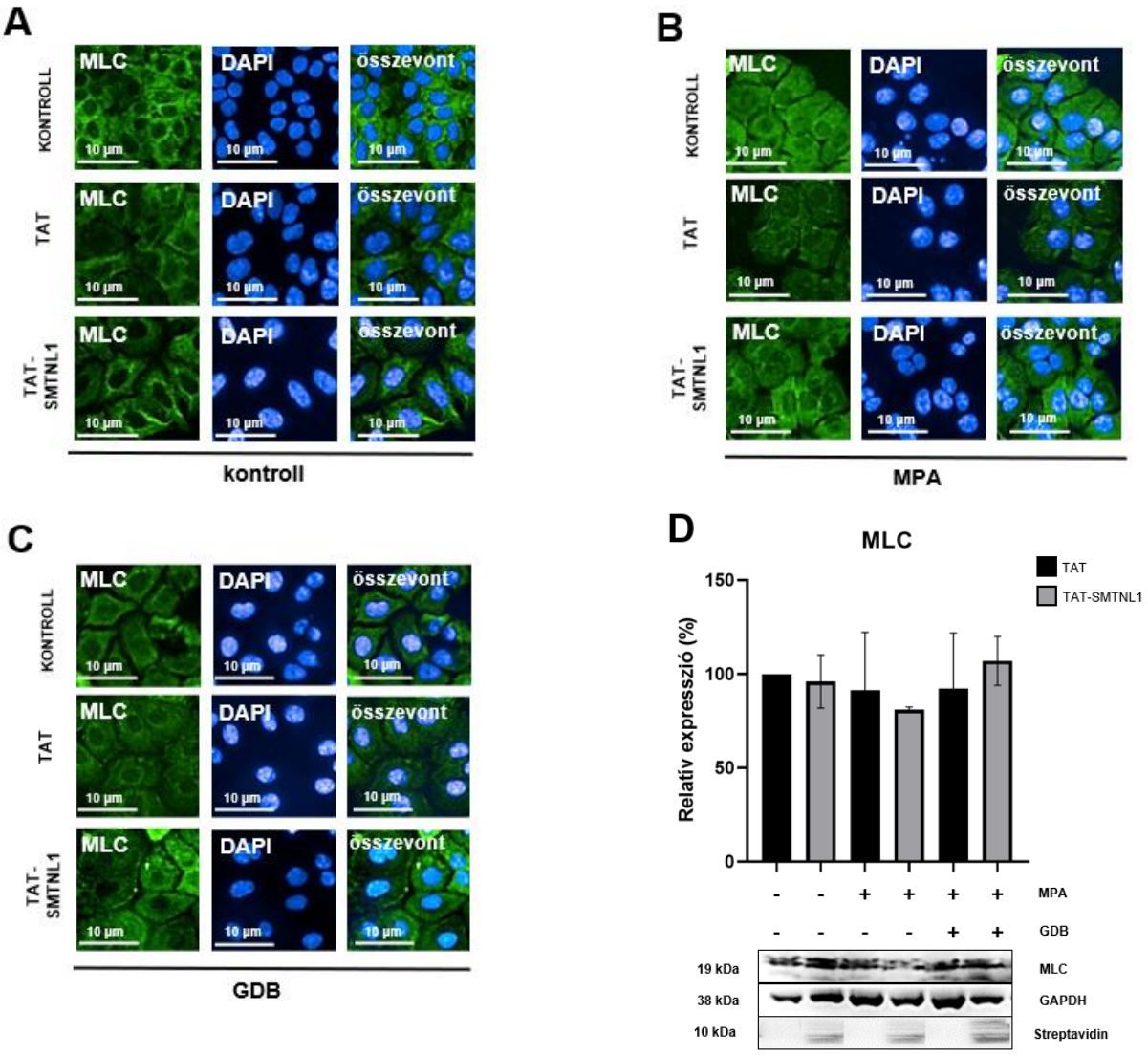
A MYPT1 Thr853 oldalláncon történő foszforilációja a miozin foszfatáz gátlásához vezet. A 7. ábrán jól látható, hogy a kezdetben apró, gömbszerű sejtek SMTNL1 hatására differenciálódnak, mely hatást az MPA és a GDB körülmények is tovább fokoznak. A TAT-SMTNL1 hatására a kontroll és GDB körülmények hatására is nő a MYPT1 gátló foszforilációs szintje. A gátló foszforiláció nem szignifikánsan, de tendenciájában növekszik MPA hatására, de a MYPT1 expressziós szintje csökken, tehát ezáltal kevesebb fehérje lesz gátló foszforiláció alatt. Ezt a semi-kvantitatív Western Blot során kapott eredményeink is alátámasztják. GDB körülmények esetén a gátló foszforiláció szintén növekszik. A peptid jelenléte kimutatható a biotinhoz konjugált Streptavidinnel Western Blot segítségével (7. ábra).



7. ábra: HCS képek, Alexa-488 (zöld, MYPT1 Thr853 foszforiláció) és DAPI (kék, sejtmag) festéssel;
A ábra: kontroll körülmények, kezeletlen kontroll, TAT-biotin peptid (TAT) és SMTNL1-mimikáló peptid (TAT-SMTNL1) kezeléssel;
B ábra: kontroll terhes körülmények (MPA), kontroll, TAT és TAT-SMTNL1 kezeléssel;
C ábra: gesztációnális diabetes körülmények (GDB), kontroll, TAT és TAT-SMTNL1 kezeléssel.
D ábra: Western Blot analízis és a hozzá tartozó statisztikai analízis gráfja, normálás MYPT1-re történt, n=3, SD, párosított t-teszt, * p‹0,05 a C/TAT – C/TAT-SMTNL1, C/TAT – MPA/TAT és C/TAT – GDB/TAT között, *** p‹0,05 a GDB/TAT – GDB/TAT-SMTNL1 között
Az ábrák saját készítésűek.

6.3 Az SMTNL1-mimikáló peptid nincs hatással az MLC expressziójára

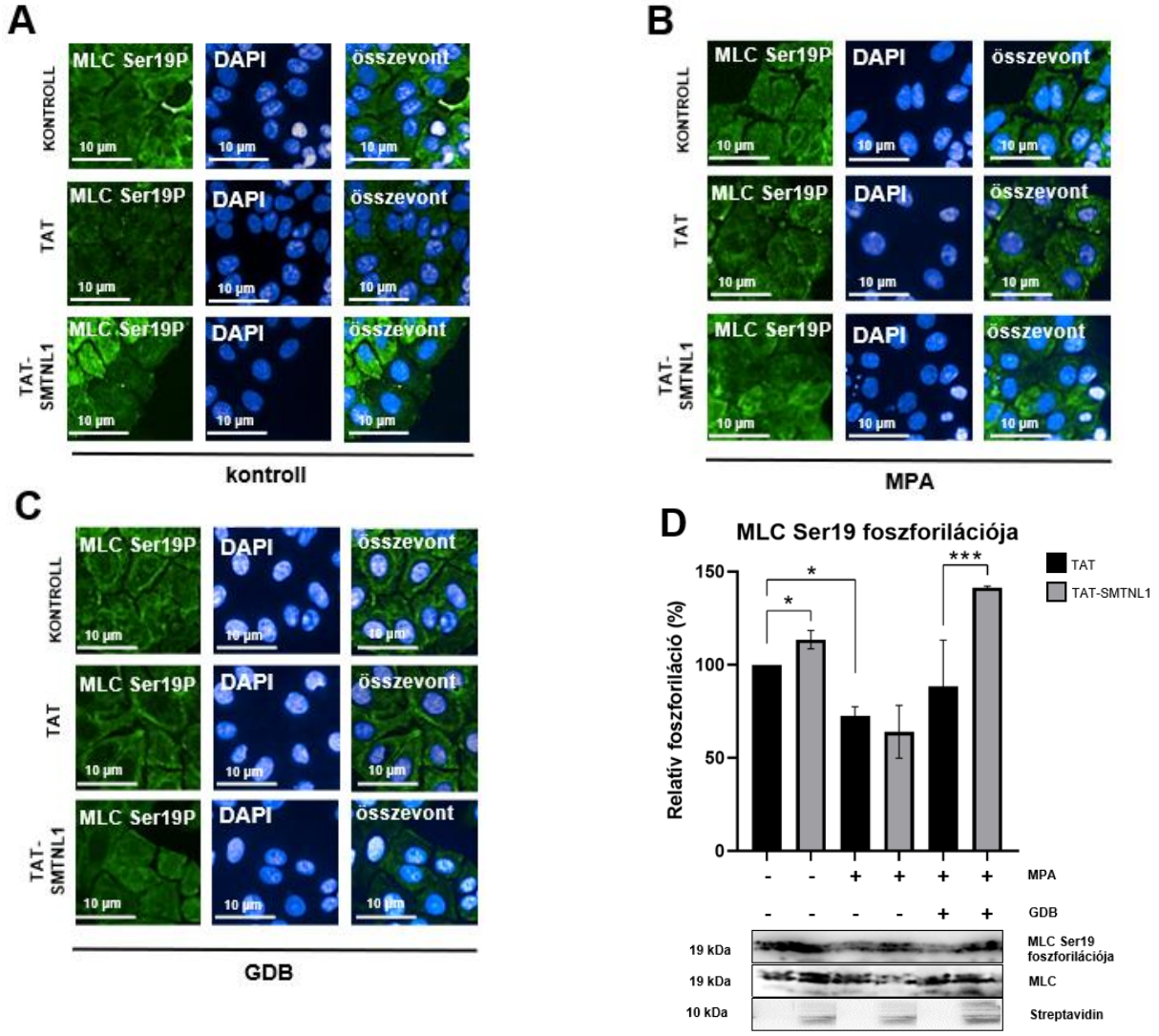
Az MLC az aktomiozin kontraktilitás szabályozásában vesz részt abban az esetben, ha defoszforilálódik a MP hatására, ezzel szabályozva a sejtek összhúzékony állapotát, barrier funkcióját és migrációs képességét. Ahogyan a 8. ábrán is látható, az SMTNL1 mimikáló peptidnek nincs szignifikáns hatása a MLC20 expressziójára sem Western Blot analízissel, sem immunofluoreszcenciás vizsgálattal. Erre sem a MPA, sem a GDB körülmény nincs további hatással. A peptid jelenlétét Streptavidinnel ellenőriztük Western Blot segítségével (8. ábra).



8. ábra: HCS képek, Alexa-488 (zöld, MLC expresszió) és DAPI (kék, sejtmag) festéssel;
A ábra: kontroll körülmények, kezeletlen kontroll, TAT-biotin peptid (TAT) és SMTNL1-mimikáló peptid (TAT-SMTNL1) kezeléssel;
B ábra: kontroll terhes körülmények (MPA), kontroll, TAT és TAT-SMTNL1 kezeléssel;
C ábra: gesztációnális diabetes körülmények (GDB), kontroll, TAT és TAT-SMTNL1 kezeléssel.
D ábra: Western Blot képek és a hozzá tartozó statisztikai analízis gráfja, normálás GAPDH-ra történt, n=3, SD
Az ábrák saját készítésűek.

6.4 Az SMTNL1-mimikáló peptid hatása a MLC Ser19 foszforilációjára

A MYPT1 gátló foszforilációs szintjének emelkedése a Thr853-as oldalláncon a szubsztrátjának, az MLC Ser19 oldalon történő foszforilációját fokozza. Az MPA TAT kontroll körülmények között az MLC Ser19 foszforilációja csökken, azonban ezt a TAT-SMTNL1 nem befolyásolja. Statisztikailag szignifikáns különbség látszik azonban a GDB körülmény TAT kontroll és TAT-SMTNL1 körülményei között a MLC foszforilációját illetően. GDB körülmény esetén a MYPT1 gátló foszforilációja növekszik, így a Western blottal és immunfluoreszcenciás festéssel is jól láthatóan növekvő MLC Ser19 foszforilációja korrelál ezzel az eredménnyel. A peptid jelenléte Streptavidinnel kimutatható (9. ábra).

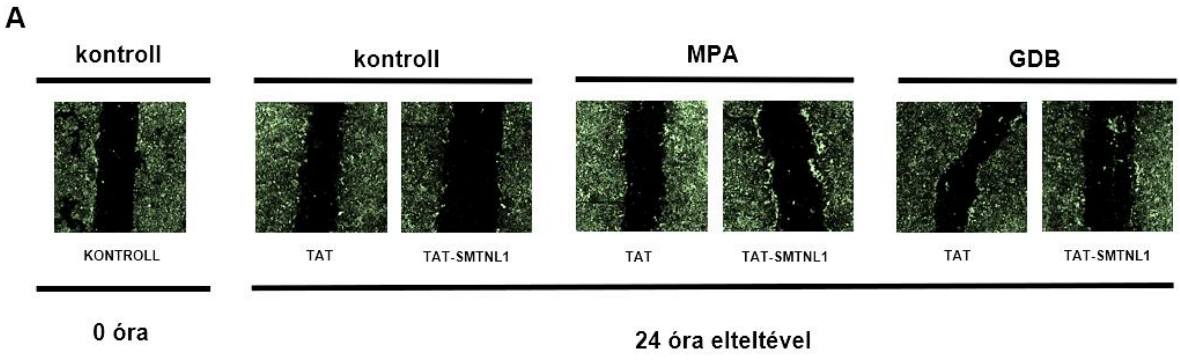


9. ábra: HCS képek, Alexa-488 (zöld, MLC Ser19 foszforiláció) és DAPI (kék, sejtmag) festéssel;
A ábra: kontroll körülmények, kezeletlen kontroll, TAT-biotin peptid (TAT) és SMTNL1-mimikáló peptid (TAT-SMTNL1) kezeléssel;
B ábra: kontroll terhes körülmények (MPA), kontroll, TAT és TAT-SMTNL1 kezeléssel;
C ábra: gesztációnális diabetes körülmények (GDB), kontroll, TAT és TAT-SMTNL1 kezeléssel.
D ábra: Western Blot analízis és a hozzá tartozó statisztikai analízis gráfja, normálás MLC-re történt, n=3, SD, párosított t-teszt, * p‹0,05 a C/TAT – C/TAT-SMTNL1 és C/TAT – MPA/TAT között, *** p‹0,05 a GDB/TAT – GDB/TAT-SMTNL1 között.
Az ábrák saját készítésűek.

6.5 Az SMTNL1-mimikáló peptid hatása az Ishikawa sejtek migrációjára

A migráció kulcsfontosságú lépés az implantáció során. Az embrió beágyazódása során a blasztociszták az epitéliumhoz tapadnak, majd behatolnak a hámba, hogy bejussanak az alatta lévő sztrómába. Ennek a folyamatnak a korai szakaszában az epithél sejtek által képzett barrier megszakad. Az embrió implantációjának elérése érdekében az epithél sejtek elvándorolnak az implantációs helyről, és ezen sejtek migrációja és inváziója elősegítheti a megszakadt méhnyálkahártya epitéliumának szerkezeti átalakulását (Chen *et al*., 2020).

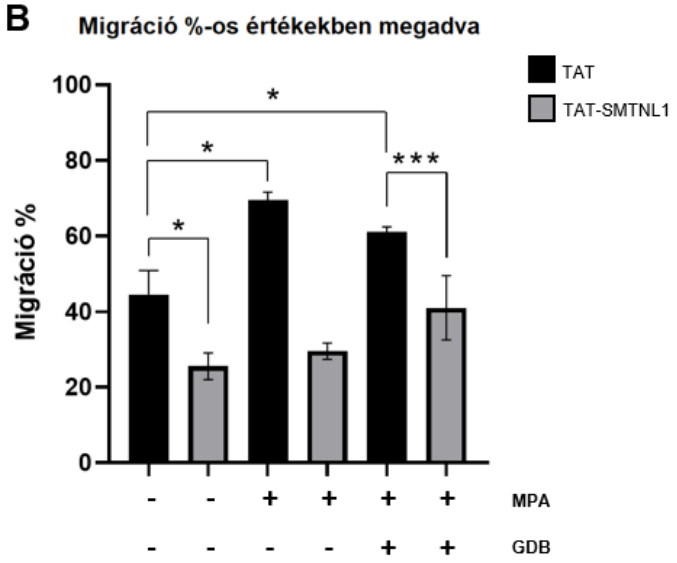
A 10/A ábrán látható az *in vitro* scratch assay alkalmazása az Ishikawa sejtek migrációjának nyomon követésére. A kontroll körülmény TAT kezelt csoportjához viszonyítva eredményeinket azt találtuk, hogy a TAT-SMTNL1 kezelt sejtek esetében MPA körülmények között láthatóan nő a migrációs kapacitás. GDB körülmények esetén a migráció kontroll körülményekhez képest nő, azonban a TAT kezelthez képest a TAT-SMTNL1 kezelt sejtek esetében migrációs gátlást tapasztaltunk (10/A ábra).



10/A ábra: Az *in vitro* scratch assay HCS mikroszkóppal kapott képei a 0. és 24. órában. 0h kontrollhoz, és minden csoport esetében TAT kontrollhoz viszonyítva.
Az ábra saját készítésű.

A 10/A ábrán kapott eredményeinket oszlopdiagramon, az 5.6 alfejezetben leírt módon ábrázoltuk, ahol azt az eredményt kaptuk a kontroll körülmény, TAT kezelt csoportjához viszonyítva, hogy a kontroll körülmények SMTNL1 kezelt sejtek esetében szignifikáns migrációs gátlást tapasztaltunk. Az SMTNL1 kezelt, MPA körülmény esetében bár az SMTNL1 nem ért el szignifikáns migrációs gátlást, a tendencia nyomon követhető. Ez az eredmény korrelál azzal, hogy a MYPT1 gátló foszforilációja tendenciájában növekszik MPA körülmények között, valamint azzal összefüggéssel, hogy terhesség során az embrió implantációjának elérése érdekében az epithél sejtek elvándorolnak az implantációs helyről, és ezen sejtek migrációja és inváziója elősegítheti a megszakadt méhnyálkahártya epitéliumának szerkezeti átalakulását. GDB körülmények esetén a migráció kontroll körülményekhez képest

nő, azonban a TAT kezelthez képest a SMTNL1 kezelt sejtek esetében szignifikáns migrációs gátlást tapasztaltunk. Ez korrelál azzal az eredménnyel, hogy GDB körülmények esetén a MYPT1 gátló foszforilációja szignifikánsan nő a Thr853 oldalláncon, amivel összhangban a MLC Ser19 foszforilációja nagymértékben megemelkedik, ez magyarázza a szignifikáns migrációs gátlást TAT és TAT-SMTNL1 kezelt csoportot összehasonlítva (10/B ábra).



10/B ábra: *In vitro* scratch assay eredményei oszlopdiagramon ábrázolva. Egytényezős varianciaanalízis (one-way ANOVA); n=9, SD, TAT-biotin peptid (TAT) és SMTNL1-mimikáló peptid (TAT-SMTNL1) kezeléssel.
* $p<0,05$ a C/TAT – C/TAT-SMTNL1, C/TAT – MPA/TAT és C/TAT – GDB/TAT között,
*** $p<0,05$ a GDB/TAT – GDB/TAT-SMTNL1 között.
Az ábra saját készítésű.

7. Összefoglalás

Előzetes kutatási eredmények alapján bebizonyosodott, hogy az SMTNL1 fehérje hiánya *smtnl1 null* egér modelleken csökkentette reproduktív képességet, valamint inzulinrezisztenciát és károsodott glikolízist eredményezett. Ezen előzetes megfigyelések alapján több figyelmet érdemel az SMTNL1 fehérje vizsgálata a humán reprodukció *in vitro* és későbbi *in vivo* vonatkozásában (Lontay *et al*., 2010).

Az SMTNL1 fontos szerepet játszik az adaptív válaszok közvetítésében mind a simaizomban, mind a harántcsíkolt izomzatban a fejlődés és a terhesség alatt, adatokkal alátámasztva a fehérje ezen szerepét a főbb nemi hormonok hatásainak közvetítésében. Ezzel a hipotézissel összhangban úgy tűnik, hogy az SMTNL1 a MYPT1 és a MLC expressziójára gyakorolt hatása alapján képes az Ishikawa sejtek migrációs képességének befolyásolására. Továbbá mind az SMTNL1, mind a MYPT1 fehérje expressziója szabályozott a szexuális fejlődés és a terhesség során, és olyan egységet alkotnak, amely adaptálja ezeket a szöveteket, hogy megváltoztassák kontraktilis tulajdonságaikat. A simaizomban ezek a terhesség által kiváltott adaptációk nagy valószínűséggel hozzájárulnak a szisztémás vérnyomás csökkenéséhez és a méh ellazulásához, amely normál terhesség alatt is bekövetkezik.

Kísérleteinkben Ishikawa sejteket használtunk a humán endometriális epithélium modellezésére. A már előzőleg igazolt permeabilitású, és az életképességet nem befolyásoló SMTNL1-mimikáló peptid alkalmazásával inzulinérzékenyítő, és a reprodukciós képességet növelő hatás elérése volt a célunk.

Eredményeink összegzéseként elmondható az, hogy az SMTNL1-mimikáló peptid a progeszteron jelenlétében fokozottan csökkentette a MYPT1 expresszióját, és egy eddig még nem jellemzett úton annak gátló foszforilációját emelte, gátolva ezzel a MP holoenzimet. Ez a MP szubsztrátjának, a MLC fokozott foszforilációját eredményezte a fehérje expressziós szintű változása nélkül. Így a sejtek citoszkeletális tulajdonságait módosítva a migrációs képesség csökkent, ezzel a migrációs kapacitás változásai összhangban vannak a molekuláris szinten zajló folyamatokkal. Tehát a fiziológiai jelenség alapján a migrációt kontroll körülmények esetén protein-protein interakcióval az SMTNL1 gátolja, illetve képes arra, hogy a MP expressziós szintjét csökkentse. Továbbá a MP SMTNL1 által gátolva a MLC Ser19 oldallánc foszforilációjának megváltozásán keresztül képes a migrációs kapacitást változtatni. Ezt a mechanizmust ezen kísérletünkben bizonyítottuk *in vitro* scratch assay segítségével, valamint ennek az eredménynek alátámasztásaként végzett immunfluoreszcenciás festési eljárással, majd ezt HCS mikroszkópiával analizálva kaptuk összefüggő eredményeinket.

Ezek alapján elmondható, hogy az izomsejtekhez hasonlóan az endometriális sejtek összhúzékony tulajdonságait is szabályozhatja egy potenciálisan terápiában is alkalmazható peptid, amely az SMTNL1 hatását mimikálja, ezzel befolyásolva az implantáció folyamatát.

Az *in vitro* scratch assay során kapott eredmény, miszerint az SMTNL1-mimikáló peptid csökkenti a migrációs kapacitást, bár fiziológiásan egy kedvezőtlen esemény, azonban a populációban egyre gyakoribbá váló, beágyazódási zavarokat is okozó endometriózis kezelésére alkalmas lehet. Ennek során az endometrium epithél és sztromális sejtjeinek fokozott migrációja miatt extrauterin területeken jelennek meg ezek a hormonreszponzív sejtek (Rolla, 2019). Ennek a fokozott a migrációs kapacitásnak kontroll értékekre történő csökkentése SMTNL1 kezelés által a betegségre potenciális terápiaként alkalmazható lehet.

8. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr Lontay Beátának a lehetőségért, hogy az Orvosi Vegytani Intézetben végezhettem a munkámat, amelyben rengeteg segítséget, támogatást és bíztatást kaptam tőle.

Köszönettel tartozom Dr Keller Ilka PhD hallgatónak és Ungvári Ádám PhD hallgatónak a kitartó munkájukért, hogy minden felmerülő kérdésemben segítettek, tanácsokkal láttak el. Továbbá köszönöm Kelemenné Szántó Ágota asszisztensnek a segítő munkáját és a sok éves tapasztalatából eredő szakmai tanácsait.

Végül szeretném megköszönni az Orvosi Vegytani Intézet összes munkatársának a segítőkészséget, amit végig a munkám során nyújtottak.

9. Függelék

Az önállóan végzett munkáim közé tartozik a sejtek fenntartása, kezelése és lízise, a sejtek 96 lyukú plate-n történő immunfluoreszcenciás festése és az SDS-PAGE gélelektroforézis, majd ezen gél transzferálása nitrocellulóz membránra.

Segítséggel végeztem a Western Blot analízist és a hozzá tartozó ChemiDoc műszer használatát, HCS mikroszkóp használatát, a statisztikai analízist, valamint az *in vitro* scratch assay-t.

10. Irodalomjegyzék

Andrea Kiss, Ferenc Erdődi, Beáta Lontay, Myosin phosphatase: Unexpected functions of a long-known enzyme, Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research, 2019, DOI: 10.1016/j.bbamcr.2018.07.023., PMID: 30076859

Beata Lontay, Khaldon Bodoor, Adrienn Sipos, Douglas H. Weitzel, David Loiselle, Rachid Safi, Donghai Zheng, James Devente Robert C. Hickner, Donald P. McDonnell, Thomas Ribar, Pregnancy and Smoothelin-like Protein 1 (SMTNL1) Deletion Promote the Switching of Skeletal Muscle to a Glycolytic Phenotype in Human and Mice, Journal of Biological Chemistry, 2015, DOI: 10.1074/jbc.M115.658120., PMID: 26048986

Beata Lontay, Khaldon Bodoor, Douglas H Weitzel, David Loiselle, Christopher Fortner, Szabolcs Lengyel, Donghai Zheng, James Devente, Robert Hickner, Timothy A J Haystead, Smoothelin-like 1 protein regulates myosin phosphatase-targeting subunit 1 expression during sexual development and pregnancy, Journal of Biological Chemistry, 2010, DOI: 10.1074/jbc.M110.143966., PMID: 20634291

Beverly G Reed, Bruce R Carr, Kenneth R Feingold, Bradley Anawalt, Alison Boyce, George Chrousos, Wouter W de Herder, Ketan Dhatariya, Kathleen Dungan, Jerome M Hershman, Johannes Hofland, Sanjay Kalra, Gregory Kaltsas, Christian Koch, Peter Kopp, Márta Korbonits, Christopher S Kovacs, Wendy Kuohung, Blandine Laferrère, Miles Levy, Elizabeth A McGee, Robert McLachlan, John E Morley, Maria New, Jonathan Purnell, Rakesh Sahay, Frederick Singer, Mark A Sperling, Constantine A Stratakis, Dace L Trence, Don P Wilson, The Normal Menstrual Cycle and the Control of Ovulation, South Dartmouth (MA), 2018, PMID: 25905282

Bruce A. Lessey, Endometrial receptivity and the window of implantation, Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology, 2000, DOI: 10.1053/beog.2000.0118., PMID: 11023799

Carla Bartosch, José Manuel Lopes, Jorge Beires, Mário Sousa, Human Endometrium Ultrastructure During the Implantation Window: A New Perspective of the Epithelium Cell Types, Reproductive Sciences, 2011, DOI: 10.1177/1933719110392055., PMID: 21421901

Carolyn L Dunn, Rodney W Kelly, Hilary O D Critchley, Decidualization of the human endometrial stromal cell: an enigmatic transformation, Reprod Biomed Online, 2003, doi: 10.1016/s1472-6483(10)61745-2., PMID: 14567882

Colin L. Stewart, Petr Kaspar, Lisa J. Brunet, Harshida Bhatt, Inder Gadi, Frank Köntgen, Susan J. Abbondanzo, Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor, Nature, 1992, DOI: 10.1038/359076a0., PMID: 1522892

Diedrich K, Fauser BC, Devroey P, Griesinger G, The role of the endometrium and embryo in human implantation, Human Reproduction Update, 2007, DOI: 10.1093/humupd/dmm011., PMID: 17548368

Edgardo Rolla, Endometriosis: advances and controversies in classification, pathogenesis, diagnosis, and treatment, F1000Research, 2019, DOI: 10.12688/f1000research.14817.1., PMID: 31069056

Fonyó Attila, Az orvosi élettan tankönyve, 2011

Julia T. Arnold, Bruce A. Lessey, Markku Seppälä, David G. Kaufman, Effect of Normal Endometrial Stroma on Growth and Differentiation in Ishikawa Endometrial Adenocarcinoma Cells, Cancer Research, 2002, PMID: 11782363

Linda A. Barbour, Carrie E. McCurdy, Teri L. Hernandez, John P. Kirwan, Patrick M. Catalano, Jacob E. Friedman, Cellular Mechanisms for Insulin Resistance in Normal Pregnancy and Gestational Diabetes, Diabetes Care, 2007, DOI: 10.2337/dc07-s202., PMID: 17596458

Lusine Aghajanova, Leukemia inhibitory factor and human embryo implantation, Annals of the New York Academy of Sciences, 2004, DOI: 10.1196/annals.1335.020., PMID: 15731310

Mustafa Kara, Seda Sabah Ozcan, Turhan Aran, Ozlem Kara, Neziha Yilmaz, Evaluation of Endometrial Receptivity by Measuring HOXA-10, HOXA-11, and Leukemia Inhibitory Factor Expression in Patients with Polycystic Ovary Syndrome, Gynecology and Minimally Invasive Therapy 8, 2019, DOI: 10.4103/GMIT.GMIT_112_18., PMID: 31544022

Qian Chen, Yong Fan, Xiaowei Zhou, Zheng Yan, Yanping Kuang, Aijun Zhang, Chen Xu, GnRH antagonist alters the migration of endometrial epithelial cells by reducing CKB, Reproduction, 2020, DOI: 10.1530/REP-19-0578., PMID: 32213653

Stephanie A. Michalski, Sangappa B. Chadchan, Emily S. Jungheim, Ramakrishna Kommagani, Isolation of Human Endometrial Stromal Cells for In Vitro Decidualization, Journal of Visualized Experiments, 2018, DOI: 10.3791/57684., PMID: 30222162

Szentágothai János, Réthelyi Miklós, Funkcionális anatómia, Medicina Kiadó, 1989