

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Király Nikolett

**A TIMAP, mint a protein foszfatáz 1 regulátor
szerepének vizsgálata tüdő artéria endotél sejtekben**

DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2022

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**A TIMAP, mint a protein foszfatáz 1 regulátor
szerepének vizsgálata tüdő artéria endotél sejtekben**

Király Nikolett

Témavezető: Dr. Boratkó Anita



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2022

1. Tartalomjegyzék

1. Tartalomjegyzék	3
2. Rövidítések	5
3. Bevezetés	9
4. Irodalmi áttekintés	10
4.1. Az endotél sejtek és fiziológiás funkciójuk	10
4.2. A fehérjék reverzibilis foszforilációs szabályozása	11
4.3. A protein foszfatáz 1	13
4.4. Protein foszfatáz 1 regulátor alegységek.....	15
4.5. A miozin foszfatáz regulátor alegység család	15
4.6. A TIMAP, a PP1 regulátor alegysége, az endotél sejtek fiziológiás folyamataiban	18
4.7. A TIMAP fehérje foszforilációs szabályozása.....	21
4.8. Annexin A2 szerkezete és fiziológiás szerepe	22
5. Célkitűzés	27
6. Anyagok és módszerek	28
6.1. Anyagok	28
Pufferek, oldatok	28
Alkalmazott markerek:	29
Sejtvonalak	29
Baktériumtörzsek.....	29
Felhasznált antitestek.....	29
6.2. Módszerek	30
Felhasznált plazmidok és polimeráz láncreakció (PCR)	30
Agaróz gélelektroforézis, DNS kinyerése agaróz gélből	32
Ligálás	32
E.coli sejtek transzformálása	32
Plazmid preparálás és DNS szekvenálás	33
GST fúziós fehérjék termeltetése	33
GST fúziós fehérjék tisztítása és pull-down assay	34
SDS-PAGE és Western blot	34
Sejtek tenyésztése	35
Transzfektálás és csendesítés, kezelések.....	36
Immunfluoreszcencia	37

Immunprecipitáció.....	37
Sejtfractionálás	38
<i>In vitro</i> protein kináz C assay	38
Electric Cell-substrate Impedance Sensing (ECIS) mérés	39
Sejtek életképességi vizsgálata (MTT assay)	40
LC/MS-MS	40
Statisztika	40
7. Eredmények.....	41
7.1. A TIMAP fehérje új kölcsönható partnerének azonosítása és a kölcsönhatás fiziológia jelentőségének a vizsgálata	41
Az ANXA2 fehérje azonosítása, mint a TIMAP új kölcsönható partnere endotél sejtekben	41
ANXA2 és TIMAP fehérjék kölcsönhatásának vizsgálata endotél sejtekben.....	42
A rekombináns GST-ANXA2 fehérje létrehozása és kölcsönhatása a TIMAP-PP1c- vel	45
Az ANXA2 Ser25-ös oldalláncát a PKC foszforilálja endotél sejtekben	48
Az ANXA2 fehérje a foszforiláció hatására a sejtmembránba transzportálódik	52
ANXA2 szerepet játszik a sejtek migrációjában és az endotél sejtek barrier funkciójának fenntartásában	55
A foszforilált ANXA2 és az S100A10 fehérje kölcsönhatásának vizsgálata	58
7.2. A TIMAP Ser69-es oldallánc foszforilációjának tanulmányozása	59
A rekombináns Ser69Asp és Ser69Ala TIMAP mutáns fehérjék létrehozása	59
A TIMAP Ser69 oldalláncának foszforiláltsága nem befolyásolja a PP1c, RACK1 és ERM fehérjékkel való kölcsönhatását.....	62
A TIMAP S69D mutációja a sejtmembránba irányítja a fehérjét	64
A TIMAP Ser69-es oldallánc foszforilációjában szerepet játszó kináz azonosítása	66
A TIMAP Ser69-es oldallánc foszforilációjának hatása a sejt migrációra.....	68
8. Megbeszélés	71
9. Összefoglalás.....	77
10. Summary.....	78
11. Irodalomjegyzék.....	79
13. Keywords	89
14. Köszönetnyilvánítás	90
15. Függelék.....	91

2. Rövidítések

aa - aminosav

ANXA2- annexin A2

ARDS - akut respirációs distressz szindróma

ATP - adenzin-trifoszfát

BHK - embrionális hörcsög vese sejtvonala

BPAEC - marha tüdő artéria endotél sejtvonala

BSA - borjú szérumban albumin

c-Nap1 - centroszomális Nek2 asszociált protein 1

CPI-17 - 17 kDa-os PKC aktivált PP1 inhibitor fehérje

DAPI - 4',6-diamidino-2-fenilindol

DARPP-32 - dopamin és cAMP által szabályzott foszfoprotein

DMSO - dimetil-szulfid

dNTP - dezoxinukleotid-trifoszfát

EDTA - etilén-diamin-tetraecetsav

ECIS - Electric Cell-substrate Impedance Sensing

ECL - megnövelt kemilumineszcencia (Enhanced Chemiluminescence)

ECM - extracelluláris mátrix

eEF1A1 - eukarióta elongációs faktor 1 alfa 1

EGFR - epidermális növekedési faktor receptor

ERM - ezrin-radixin-moezin

FCP - RNS-polimeráz II-es CTD-foszfátáz TFIIF-asszociáló komponense

GSK3 β - glikogén szintáz kináz 3 béta

GST - glutation-S-transzferáz

HCF - humán C1 faktor

HPAEC - humán tüdő artéria endotél sejtvonat

HUVEC - humán köldökvéna endotél sejtvonat

Inh-1 - inhibitor 1

IPTG - izopropil-béta-D-1-tiogalaktopiranozid

IRAK1 - interleukin-1 receptor asszociált kináz

LAMR1 - laminin receptor 1

LAP1 - lamina asszociált polipeptid 1

LMP1 - Epstein-Barr vírus által kódolt látens membránfehérje

LB - Luria-Bertani tápfolyadék

LC-MS/MS - folyadék kromatográfia-tandem tömegspektrometria

LNCaP - prosztata nyirokcsomó karcinóma sejtvonat

LPS - lipopoliszacharid

MEM - minimális esszenciális tápfolyadék

MBS - miozin kötő alegység

MDCK - Madin-Darby kutya vese sejtvonat

MLC - miozin könnyűlánc

MLCK - miozin könnyűlánc kináz

MLCP/MP - miozin foszfatáz

MRCKa - myotonikus dystrophia kinázzal kapcsolt Cdc42 kötő kináz-a

MYPT - miozin foszfatáz regulátor alegység

NES - nukleáris export szignál

Nek2 - Never in Mitosis (NIMA) kapcsolt kináz 2

NLS - nukleáris lokalizációs szignál

NO - nitrogén-monoxid

OA - okadánsav

PABP1 - poly A kötő fehérje 1

PBS - foszfáttal pufferelt sóoldat

PCR - polimeráz láncreakció

PDGF- vérlemezke eredetű növekedési faktor

PKA - protein kináz A

PKC - protein kináz C

PLK4 - Polo szerű kináz 4

PMA - forbol 12-mirisztát 13-acetát

PP1 - protein foszfatáz 1

PP2 - protein foszfatáz 2

PP1c - protein foszfatáz 1 katalitikus alegység

PP2A - protein foszfatáz 2A

PP2B - protein foszfatáz 2B, calcineurin

PP2C - protein foszfatáz 2C

PPM - fémoon-függő protein foszfatáz

PPP - foszfoprotein foszfatáz

Pp60src- Rous sarcoma vírus transzformáló fehérje

PTP - foszfortirozin specifikus foszfatáz

RACK1 - aktivált protein kináz C receptor

ROCK - Rho-asszociált kináz

SDS - nátrium-dodecil-szulfát

SDS-PAGE - SDS poliakrilamid-gélelektroforézis

SCP - kis CTD foszfatáz

SOC - 20mM glükóz tartalmú Super Optimal Broth

S-1-P - szfingozin-1-foszfat

TGF- β - transzformáló növekedési faktor β

TIMAP - TGF- β gátolt membrán asszociált fehérje

TM - Tautomocetin

VHL - von Hippel-Lindau fehérje

vWF - von Willebrand faktor

WT - vad típusú

3. Bevezetés

Az endotél sejtek szemipermeábilis barrierként választják el a keringő vért a környező szövetektől. A sejtek alakja és így az endotél barrier funkció nagymértékben függ a citoskeletális elemek változásaitól. A citoskeleton és a citoskeletonnal asszociálódó fehérjék foszforilációs szintjének szabályozása a protein kinázok és foszfatázok által fontos szerepet játszik a barrier funkció szabályozásában. Az endotél barrier funkció szabályozásában több protein foszfatáz szerepe ismert. Ilyen ismert foszfatáz a protein foszfatáz 1 (PP1) holoenzim, mely egy katalitikus és egy regulátor alegységből áll.

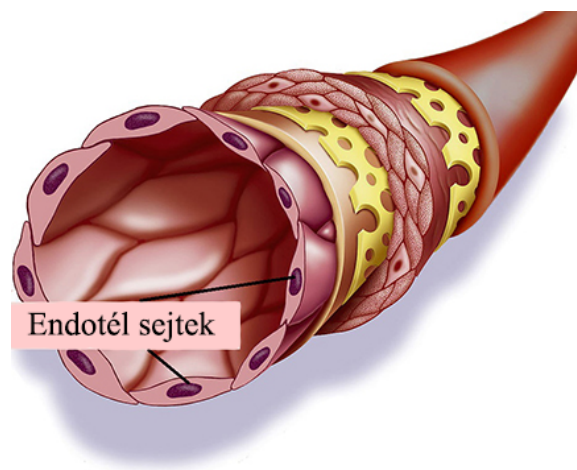
A TIMAP fehérje (TGF- β gátolt membrán asszociált fehérje) amellett, hogy legnagyobb mennyiségben az endotél sejtekben mutatható ki, a protein foszfatáz 1 katalitikus alegységének (PP1c) regulátoraként, az endotél sejtekben barrier szabályzó szerepet tölt be. A TIMAP fehérjén azonosított Ser331, Ser333 vagy Ser337 oldalláncok foszforilációja kitüntetett szerepet tölt be a TIMAP-PP1c komplex szabályozásában. A regulátor alegység foszforilációja nem csak a holoenzim lokalizációját befolyásolja, de szabályozza a katalitikus alegység szubsztrátok iránti affinitását is. Míg a TIMAP Ser333/337 foszforilációja fokozza a PP1 aktivitását a foszfo-ERM (ezrin-radixin-moezin) fehérjék felé, addig a Ser331 oldalláncon foszforilált TIMAP gátolja a foszfo-ERM szubsztrátok defoszforilációját. Munkacsoportunk a TIMAP-PP1c komplex számos kölcsönható partnerét és szubsztrát fehérjéjét azonosította endotél sejtekben, ezáltal megismerhettük a komplex szerepét a barrier funkció szabályozásában, az angiogenezisben, a sejtproliferációban és a sejtek kitapadásában.

A disszertációban összefoglalt munka a TIMAP fehérje egy eddig nem vizsgált foszforilációjának, valamint az enzimkomplex egy új szubsztrátjának és az ezekhez kapcsolódó jelátviteli útvonalak leírásával foglalkozik. Az újonnan kapott eredmények tovább bővítik ismereteinket a TIMAP-PP1c komplex endotél sejtekben betöltött szerepéről.

4. Irodalmi áttekintés

4.1. Az endotél sejtek és fiziológias funkciójuk

Az endotél sejtek egy rétegben borítják az erek lumen felőli oldalát és ép rétegük elengedhetetlen az érfal normális működéséhez. Az egymás mellett szorosan elhelyezkedő és összehangoltan működő sejtek olyan gátat képeznek, mely korlátozza a víz, a fehérjék és a vérsejtek mozgását a véráram és a szövetek között. Az endotél sejteket polarizált sejteknek nevezzük, hiszen a luminális membránjuk közvetlenül érintkezik a vér alkotóelemeivel és a keringő sejtekkel, míg a basolaterális felületet egy glikoprotein tartamú bazális membrán választja el a környező szövetektől, amelyet maguk az endotél sejtek szekretálnak és rögzítenek sejtmembránjukon. Az endotél sejtek alakja az érfal mentén változó, de általában vékonyak és kissé hosszúkásak, nagyjából 30–50µm hosszúak, 10–30µm szélesek és 0,1–10µm vastagságúak [1]. Összehangoltan, gyorsan képesek reagálni az éret érő fiziológias stresszhatásokra. Az endotélium fontos szerepet játszik a vaszkuláris integritás fenntartásában, az értónus és vaszkuláris permeabilitás szabályozásában, az érfal gyulladásos és trombotikus folyamatainak megelőzésében [2, 3].



1.ábra. Az endotél sejtréteg egy ér belső falán.

Forrás: <https://www.lifelinecelltech.com/searching-for-optimal-models-for-endothelial-cell-3d-culture/>

A plazmafehérjék, mint például az albumin, továbbá a keringő hidrofób anyagok, zsírsavak, hormon molekulák átjutása létfontosságú az alapvető sejtfunkciók fenntartásához egy adott szerv esetében [4]. Az endotél sejtréteg integritásának megtartásában a sejtek közötti szoros-, rés- és adherens kapcsolatok játszanak szerepet

[5]. Ezt a három csatlakozási struktúrát különálló transzmembrán fehérjék alkotják, amelyek elősegítik a sejtek közötti kölcsönhatásokat és az intracelluláris jelek továbbítását. Az endotél sejtek közötti kapcsolatok felépítése az erek mentén változik, hogy megfeleljen a különböző szervek funkcionális követelményeinek [6]. Az extracelluláris mátrix (ECM) kiemelt jelentőségű az érrendszer endotéliuma számára. Elsősorban az endotél sejtek felületén lévő integrinokkal való adhéziónak köszönhetően az ECM olyan állványt biztosít, amely elengedhetetlen a vaszkuláris endotél sejtek erekbe való szerveződéséhez. Ezenkívül az endotél sejtek adhéziója az ECM-hez szükséges a sejtek proliferációjához, migrációjához, morfogeneziséhez, túléléséhez és végső soron az erek stabilizálásához, amelyek mind kritikusak a neovaszkularizáció szempontjából [7]. A citoskeletot alkotó aktin filamentumok, intermedier filamentumok és mikrotubulusok fontos szerepet játszanak a sejtek alakjának meghatározásában és egy jól működő barrier létrehozásában és fenntartásában [8]. A különböző fizikai hatások, gyulladások és bioaktív ingerek megváltoztathatják az endotél sejtek között kialakuló barrieret, ami paracelluláris rések kialakulásához vezethet, növelve ezzel az erek permeabilitását, veszélyeztetve a szervek normál funkcióját. Az érrendszerben bekövetkező strukturális változások, a rendezetlen endotél sejtproliferáció és a megváltozott endoteliális vasoaktív mediátorok termelése, mint pl. a NO, prosztaciklin, endotelin-1, szerotonin és tromboxán, összefüggésbe hozhatók a magas vérnyomás kialakulásával, a koszorúér betegségekkel és a krónikus szívelégtelenséggel [9]. Az endotél sejtek barrier funkciójának szabályozásában a fehérjék foszforilációja és defoszforilációja egy alapvető szabályozási mechanizmus [10].

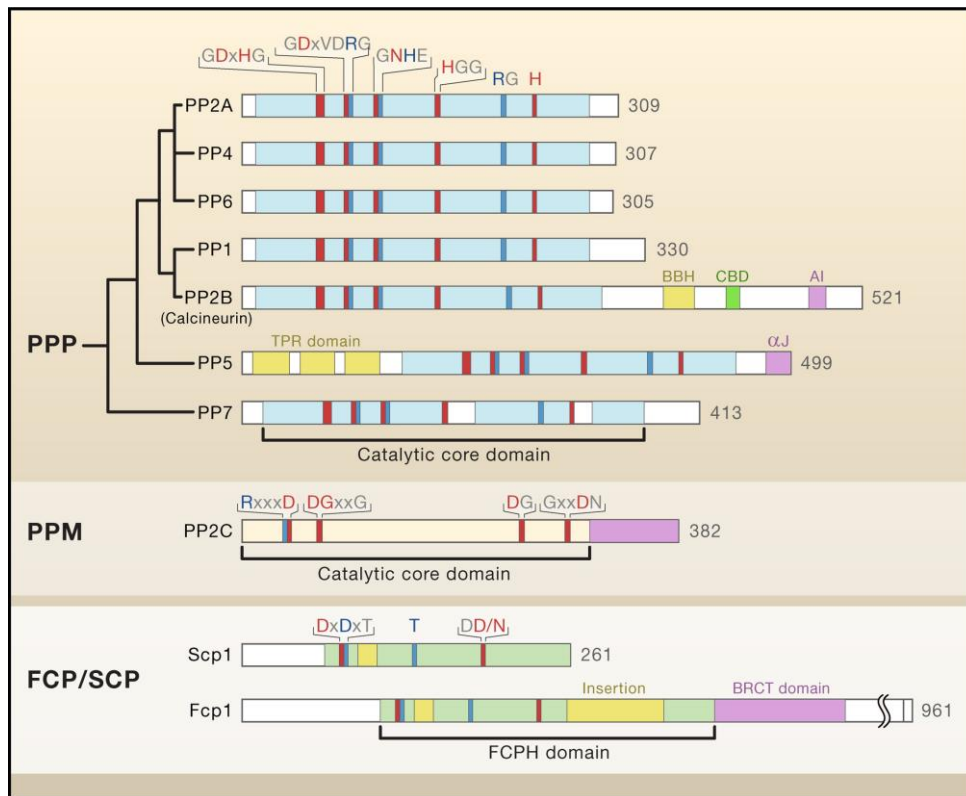
4.2. A fehérjék reverzibilis foszforilációs szabályozása

A fehérjék reverzibilis foszforilációja és defoszforilációja a jelátviteli folyamatok egyik legfontosabb mechanizmusa mellett az egyik leggyakoribb poszttranszlációs módosítás, melyben a protein foszfatázok és kinázok játszanak kulcsfontosságú szerepet. A fehérjék foszforilációja és defoszforilációja fontos szerepet játszik a fehérjeszintézisben, sejtsztódásban, szignáltranszdukcióban, sejtnövekedésben és az öregedésben, mivel számos enzim és receptor aktiválódik és inaktiválódik foszforilációs / defoszforilációs események révén. A fehérjék Ser, Thr vagy Tyr aminosav oldalláncán egy foszfát csoport jelenléte vagy hiánya megváltoztathatja a fehérje konformációját, így szabályozhatja aktivitását vagy más fehérjékkel való kölcsönhatását [10, 11]. Az emberi genom több

mint 500 protein kinázt és 150 protein foszfatázt kódol, amelyek szabályozzák a foszforilációs eseményeket [11]. A kinázok szinte minden, az élő sejtben előforduló jelátviteli útvonalban részt vesznek. Bár különböző típusú biológiai molekulák foszforilálhatók (fehérjék, nukleotidok, lipidek stb.), a kinázok legnagyobb csoportját a protein kinázok alkotják [12]. A protein kinázok, amelyek a foszfortranszferáz család tagjai, az adenzin-trifoszfát (ATP) γ -foszfátjának átvitelét katalizálják egy szubsztrát fehérje hidroxil csoportjára [13]. Foszforilezéssel aktiválódhatnak (vagy inaktiválódhatnak), melynek eredményeképpen különböző aminosavak foszforilációjához vezető kaszkádokat aktiválnak. A legtöbb kináz Ser/Thr specifikus, mások Tyr, illetve vannak kettős specificitású kinázok [14]. A kettős specificitású kinázok mind a Ser/Thr, mind a Tyr oldalláncon is képesek foszforilálni a célfehérjét [15].

A protein foszfatázok a kinázokkal ellentétes reakciókat katalizálnak. A foszfoproteinekről a foszfátcsoport eltávolítása során a foszforsav-monoésztereket foszfátcsoportokká és szabad hidroxil csoporttal rendelkező molekulává hidrolizálják [16]. A protein foszfatázokat három nagy csoportba sorolhatjuk, aszerint, hogy milyen aminosav oldalláncot képesek defoszforilálni. Ezek alapján megkülönböztetünk foszfo-Ser/Thr specifikus foszfatázokat, foszfo-Tyr specifikus foszfatázokat és kettős specificitású foszfatázokat, amelyek Ser/Thr és Tyr oldallánccról egyaránt képesek foszfát csoportot lehasítani [10]. A Ser/Thr-specifikus foszfatázokat kezdetben biokémiai aktivitásuk, vagy a szubsztrát specificitás alapján két csoportra osztották. Így 1-es (PP1) és 2-es típusú protein foszfatázokat (PP2) különböztettek meg [17]. A Ser/Thr specifikus foszfatázok klónozása során azonban kiderült, hogy két külön géncsaládról beszélhetünk, mint a foszfoprotein foszfatázok (PPP) és fémion-függő protein foszfatázok (PPM) [16, 18] (2. ábra). A Ser/Thr specifikus foszfatázok csoportjához sorolják még az aszpartát alapú foszfatázokat, mint például az RNS-polimeráz II-es CTD-foszfatáz TFIIIF-asszociáló komponense (FCP) és kis CTD foszfatáz (SCP). A PPP családba tartozik a protein-foszfatáz 1 (PP1), a PP2A, a PP2B (más néven kalcineurin), a PP4, a PP5, a PP6 és a PP7. A PPM család magában foglalja a mangán/magnézium ionoktól függő fehérje foszfatázokat (Mn^{2+}/Mg^{2+}), így a PP2C és a piruvát-dehidrogenáz foszfatázt. A PPP-vel ellentétben a PPM család tagjai nem rendelkeznek szabályozó alegységekkel, hanem több olyan domént és konzervált motívumot tartalmaznak, amelyek segíthetnek meghatározni

a szubsztrát specificitást. A Tyr-specifikus foszfatázok egy külön géncsaládba, az úgynevezett foszfo-Tyr specifikus foszfatázok családjába (PTP) tartoznak [19].



2.ábra. Ser/Thr specifikus foszfatázok csoportosítása (Shi, 2009) [19].

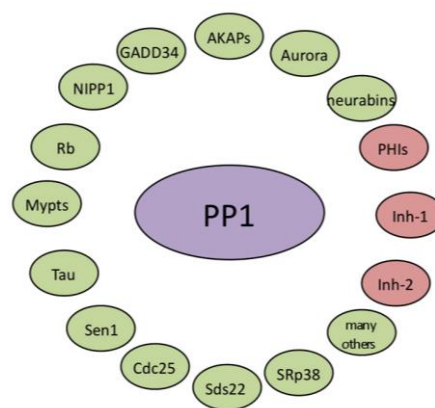
PPP: foszfoprotein foszfatázok; PPM: fémion-függő protein foszfatázok; FCP/SCP: aszpartát alapú foszfatázok

4.3. A protein foszfatáz 1

A PP1 a Ser/Thr specifikus foszfatázok csoportjába tartozik. Sokféle nélkülözhetetlen sejtszintű folyamatot szabályoz, például a sejtciklust, fehérjeszintézist, izom összehúzódást, szénhidrát anyagcserét és a transzkripciót [20, 21]. A PP1 szerepet játszik az endotél sejtek normál sejtfunciójának fenntartásában, a barrier funkció védelmében, vagy a citoskeletális rendszer szabályozásában [22, 23]. A PP1 holoenzimben az erősen konzervált katalitikus alegység (PP1c) egy vagy két regulátor alegységgel kapcsolódik [24]. A katalitikus alegységnek több izoformája fordul elő. Emlősökben megkülönböztethetünk PP1α, PP1cβ/δ (továbbiakban PP1cδ), PP1cγ katalitikus alegységeket, melyeket három gén a *PPP1CA*, *PPP1CB* és *PPP1CC* kódolnak [25-27]. A PP1c izoformák körülbelül 90% -ban azonosak aminosav-szekvenciájukban, a fő

különbségek az N- és a C-terminális régiókon találhatóak [24]. Az emlős PP1c izoformák különböző szöveti és sejten belüli eloszlást mutatnak. A PP1 α , PP1 δ és PP1 γ 1 minden szövetben megtalálható, míg a PP1 γ 2 a herékben fordul elő [21]. Sejten belüli lokalizációjukat tekintve a PP1 α , PP1 δ és PP1 γ mind a citoplazmában, mind a sejtmagban megtalálható. A mitózis során azonban a PP1 α a centroszómában lokalizálódik, a PP1 γ 1 a mitotikus orsó mikrotubulusaihoz kapcsolódik, a PP1 δ pedig a kromoszómákhoz [28].

Emlősökben több mint 100 fehérjét azonosítottak, amelyekről ismert, hogy a PP1c katalitikus alegységével specifikus dimer vagy trimer PP1-holoenzimeket képeznek. A kölcsönható fehérjék lehetnek a katalitikus aktivitás inhibitorai (inhibitorok), szubsztrát specificitást meghatározó alegységek (S-S alegységek), célzó (targeting) alegységek vagy szubsztrátok [29-31].



3.ábra. A protein foszfatáz 1 lehetséges kölcsönható partnerei (Virshup, 2009) [32].
Az ábrán a szabályzó kölcsönható fehérjéket zöld szín, míg az inhibitorokat piros szín jelöli.

A PP1c számos szubsztrátja a defoszforiláció eredményeképpen aktiválódik, mint például a fokális adhézis kináz, a lamina-asszociált-polipeptid 1 (LAP1), E3 ubiquitin ligáz és a kaszpáz 2 [26]. Ezzel szemben egyes szubsztrátok inaktív állapotba kerülnek a PP1c-el történő defoszforiláció után, mint például a Nek2, az Aurora A és a C-Nap1 [33]. A szubsztrátok egy része specifikusan egyetlen oldalláncon, míg mások több oldalláncon is foszforilálódnak és defoszforilálódnak [34]. Protein foszfatáz inhibitorok, mint az okadánsav, kalikulin A vagy trombin kezelése hatására a protein foszfatáz 1 aktivitásának jelentős része a miozin szálakhoz kapcsolódik, ami domináns szerepére utal

a miozin könnyűlánc kináz defoszforilációjában [35]. Egyes szubsztrát specifikáló alegységek, mint a miozin-foszfataz regulátor alegység 1 (MYPT1), befolyásolják a PP1c aktivitását a szubsztrátok irányába. A MYPT1 és a PP1c kölcsönhatása nemcsak elősegíti a miozin szabályozó könnyű láncának defoszforilációját, hanem csökkenti a PP1c aktivitását más szubsztrátok felé is. Az inhibitorok képesek blokkolni a PP1c aktív helyét és gátolni az összes szubsztrát defoszforilezését. Az inhibitor-1 (Inh-1) és a dopamin és cAMP által szabályozott foszfoprotein (DARPP-32) hatásosan gátolja a PP1c-t [29, 31].

4.4. Protein foszfataz 1 regulátor alegységek

A PP1c katalitikus alegységével nagyon sokféle regulátor alegység kapcsolódhat, melyek többsége (kivéve, ha izoformák) nem rendelkezik szignifikáns szekvencia hasonlóságokkal, így adatbázis kereséssel nem azonosíthatóak. A regulátor alegységek azonosítása a PP1 komplexek tisztításával, az élesztő kettős hibrid rendszerrel és az expressziós könyvtárak szűrésével lehetséges [20]. Több mint 50 féle regulátor alegységet azonosítottak, amelyek egyedi holoenzimeket hoznak létre a PP1c-vel és ezáltal számos sejtbeli folyamat szabályozásában vesznek részt [31]. A regulátor alegységek többsége egy rövid, konzervált PP1c-kötő motívummal rendelkezik: K/RVxF, ahol az X bármilyen aminosav maradék lehet a prolin kivételével. A különböző regulátor alegységek közvetlenül befolyásolhatják a PP1 holoenzim sejten belüli lokalizációját, illetve szubsztrát specifitását [20]. Vannak olyan kölcsönható fehérjék is, amelyek nem rendelkeznek ezzel a K/RVxF motívummal. Ilyen fehérje a humán C1 faktor (HCF, más néven host cell factor), mely nem tartalmazza a PP1c-kötő motívumot, de a K/RVxF-motívummal rendelkező fehérjék részben gátolják a HCF és a PP1c kapcsolatát [36]. A retinoblasztóma fehérje is képes kölcsönhatni a PP1c-vel egy KLRF motívumon keresztül, mely a retinoblasztóma 874–877 aminosav között található [37, 38].

4.5. A miozin foszfataz regulátor alegység család

A miozin könnyűlánc (MLC) Ser19 és Thr18-as oldalláncának Ca²⁺/kaldmodulin-függő miozin könnyűlánc kináz (MLCK) általi foszforilációja kulcsfontosságú szerepet játszik az aktin-miozin aktiválásában, a sejtek alakjának szabályozásában, a sejt mozgékonyságában és a citokinezisben [10, 39-41]. Az MLC foszforilációs állapotát két kulcs enzim kiegyensúlyozott aktivitása szabályozza: az MLC foszfataz (MLCP) és az

előbb említett MLCK kináz [42]. A megnövekedett MLCK aktivitás a sejtek lekerekedéséhez, paracelluláris rések kialakulásához és az endotél sejtek által létrehozott gát diszfunkciójához vezet [43]. Az MLCP az endotél barrier fenntartásának egyik kulcs eleme. Az MLCP egy heterotrimer, amely a PP1 δ izoformájából és két regulátor alegységből áll. Egy kb. 130 kDa-os miozin-foszfataz regulátor alegység (MYPT1) és egy kisebb, 20 kDa-os alegység (M20) szabályozza a holoenzimet [8, 44]. A MYPT1 a PP1 δ N-terminális és a M20 C-terminális részével kölcsönhatva képezi az MLCP holoenzimet. A miozin foszfataz különféle rövidítésekkel jelenik meg az irodalomban, például MP, MLCP vagy PP1M-ként is szokták rövidíteni. A MYPT1-et M110-nek, miozin kötő alegységnek (MBS) és M130 / M133-nak is nevezik [45-47]. A MP trimerben a PP1c felelős a katalitikus aktivitásért, a fő szabályzó alegység a MYPT1 a defoszforilációs folyamatokban a szubsztrát specifitásért felel, míg az M20 funkciójáról jelenleg keveset tudunk. A MYPT1 az emlős sejtekben mindenütt expresszálódik, az M20 a simaizmok mellett főleg a szívizmokban található [48].

A MP aktivitásának fő szabályozásaként a MYPT foszforilációját és defoszforilációját írták le. A Rho-asszociált kináz (ROCK), amely a Ser/Thr specifikus kinázok családjába tartozik és a GTP kötő RhoA aktiválja, a MYPT1-et a Thr696-os és Thr853-as oldalláncon képes foszforilálni [45, 49]. A MYPT1 foszforilációja akár Thr696, akár Thr853-on gátolja az MP aktivitást, és növeli a simaizomzat kontrakciójának érzékenységét a Ca²⁺ iránt [50]. A Thr696-os oldalláncot a ROCK kinázon kívül más kinázok is képesek foszforilálni, mint például a MYPT1-asszociált kináz (MYPT1K vagy ZIPK), myotonikus dystrophia protein kináz és integrinhez kapcsolt kináz [51-54]. A gátló foszforilációs helyek mellett, úgynevezett aktivációs helyekkel is rendelkezik a MYPT1 fehérje, ugyanis a MYPT1 3 szerin oldalláncot is tartalmaz, melyeket a protein kináz A (PKA) / protein kináz G (PKG) képes foszforilálni, ezek a Ser692, Ser695 és Ser852. A Ser695-ös oldallánc foszforilációjáról kimutatták, hogy gátolja a Thr696-os oldallánc ROCK általi foszforilációját, ezáltal a MP aktivitását segíti elő [55]. Az MP aktivitást a MYPT1 foszforilációja mellett, gátló fehérjék közvetett módon is elnyomhatják. A legismertebb MP inhibitor a 17 kDa-os C-kináz-függő foszfataz-inhibitor (CPI-17), amely a protein kináz C (PKC) által Thr38-on foszforilálódik és ezt követően aktiválódik [56].

A MYPT1 az úgy nevezett MYPT család tagja, amelybe a MYPT2, MBS85, MYPT3 és TIMAP fehérjék is beletartoznak [57-60] (4.ábra). Számos konzervált domént

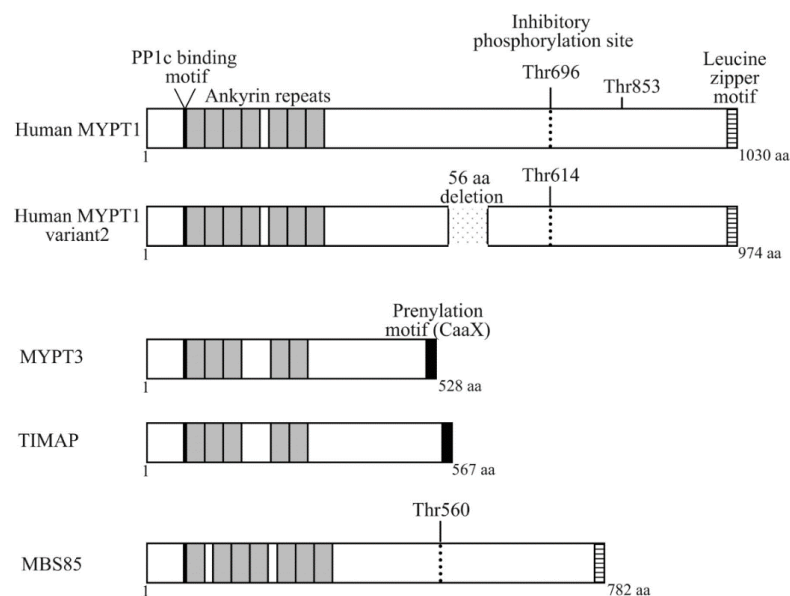
tartalmaznak, mint a PP1c kötésért felelős K/RVxF motívum és az ankyrin ismétlődések, amelyek a fehérje-fehérje kölcsönhatásokban játszanak szerepet [45]. Az ankyrin ismétlődéseket egy központi régió követi, amely elsősorban a MYPT funkció szabályozásához kapcsolódik. A konzervált doméneken kívül a MYPT1, MYPT2 és MBS85 számos foszforilációs helyet és leucin cipzár domént is tartalmaznak, amelyek részt vesznek a dimerizációban és a fehérje–fehérje kölcsönhatásban [61]. A család másik két tagja, a MYPT3 és a TIMAP nem rendelkezik leucin-cipzár doménnel, de C-terminális részükön egy CAAX-boxot (prenilációs hely; ahol az „a” alifás aminosavat jelöl) tartalmaznak, amely a fehérjék membránhoz való irányításában vesz részt [62]. A MYPT1 esetében azonosított ROCK általi Thr696 és Thr853 foszforilációs hely megtalálható a MYPT2-ben, az MBS85-ben csak a Thr696, még a TIMAP-ban vagy az MYPT3-ban egyik foszforilációs hely sem fordul elő [62, 63]. A MYPT1-et és splicing variánsát (MYPT2) a humán 12-es kromoszóma rövid karjának 15-21-es régiója kódolja [64]. Míg a MYPT1 leginkább simaizom sejtekben és a legtöbb nem izom eredetű sejtben kifejeződik, addig a MYPT2 váz- és simaizomban jellemző [58, 65]. A MYPT3, amely elsősorban a szívben, az agyban és a vesében fejeződik ki, az N-terminálisan elhelyezkedő ankyrin ismétlődésekben és a PP1c-kötő motívumában hasonlít a MYPT1 és MYPT2-höz, azonban mérete jóval kisebb [59].

A MBS85 (vagy p85) fehérje hasonlóan a család többi tagjához, tartalmazza a konzervált doméneket, mint a PP1c kötő motívumot, az ankyrin ismétlődéseket, leucin cipzár domént és a MYPT1 esetében azonosított gátló foszforilációs helyet (Thr696). Az MBS85 szekvenciájában leginkább MYPT2-höz hasonlít. Az MBS85 egy 85 kDa méretű mindenütt expresszálódó fehérje, amelyet a myotonikus dystrophia kinázzal kapcsolatos Cdc42 kötő kináz-a (MRCKa) szubsztrátjaként fedeztek fel, amely közvetíti a Cdc42 által kiváltott aktin átszerveződést [66].

A MYPT családra jellemző szerkezeti tulajdonságok a TGF- β gátolt membrán asszociált fehérjén (TIMAP) is megtalálhatóak, ezért a TIMAP fehérjét is ehhez a családhoz sorolják. A 64 kDa-os TIMAP N-terminális régiója egy nuklárius lokalizációs szignál szekvenciát (NLS) és PP1c kötő motívumot tartalmaz, amelyet öt ankyrin ismétlődés követ, valamint a MYPT3-hoz hasonlóan C-terminálisan egy CAAX-box motívumot tartalmaz. A MYPT családon belül szerkezetileg hasonlító MYPT3-mal aminosav szinten 44,7 %-os homológiát mutat [60]. A TGF- β 1 jelátvitelének vizsgálata során fedezték fel a TIMAP fehérjét az endotél sejtekben, melynek expressziós szintje a TGF- β 1 hatására

csökken. A TIMAP fehérje endotél és hematopoetikus sejtekben magas szinten expresszálódik, míg szöveti szinten megtalálható a vesében, mellékvesében, tüdőben, lépben, központi idegrendszerben és a herékben [60, 67]. A teljes hosszúságú humán TIMAP 567 aminosavból áll, mely szekvenciája 97% -ban megegyezik a marha TIMAP aminosav szekvenciájával [60].

A MYPT család tagjai több szabályozási folyamatban részt vesznek, így számos megbetegedéssel hozták kapcsolatba őket, mint például a magas vérnyomás, a Parkinson-kór, rákos megbetegedések és a *Helicobacter pylori* által kiváltott krónikus gastritisben [62, 68].



4.ábra. A miozin foszfataz regulátor alegység család tagjainak vázlatos szerkezete (Csontos Cs, 2007) [10].

4.6. A TIMAP, a PP1 regulátor alegysége, az endotél sejtek fiziológias folyamataiban

A MYPT családhoz való szerkezeti hasonlóságok, mint pl. a PP1c-kötő motívum jelenléte a TIMAP szekvenciájában, arra utalnak, hogy a PP1c regulátor alegysége. A TIMAP és PP1c kölcsönhatásának vizsgálata során kiderült, hogy a TIMAP a PP1c izoformák közül a PP1c δ izoformát köti specifikusan, amellyel holoenzimet alkotva szerepet játszik egyes fehérjék defoszforilációjában. A humán tüdő artéria endotél sejtekben (HPAEC) az endogén TIMAP jelenlétét mind a sejtmagban, mind a plazmamembránban kimutatták, ahol barrier szabályzó szerepet tölt be. Endotél sejtekben szfingozin-1-foszfát (S-1-P) kezelés után a TIMAP membrán lokalizációjának növekedését figyelték meg [22, 69].

TIMAP csendesített endotél sejtekben ismert barrier funkciót erősítő anyagok, S-1-P és ATP csökkent hatását tapasztalták. A trombin és nokodazol, melyek csökkentik az endotél barriert, hatásának felerősödését detektálták a TIMAP depletált sejteken. Ezen eredmények bizonyítják a TIMAP endotél sejtekben betöltött barrier védő szerepét [22, 43]. *In vivo* kísérletek is alátámasztják a TIMAP barrier védő szerepét. A lipopoliszacharid (LPS), a Gram-negatív baktériumok sejtfaalainak fő alkotóeleme, csökkenti az endotél sejtek által kialakított gátfunkciót és fontos szerepet játszik a szepszis kialakulásában [70]. TIMAP csendesített egerekben a LPS súlyosbította a vaszkuláris szivárgást az egerek tüdejében [71].

TIMAP fehérje más fehérjékkel való kölcsönhatásának vizsgálata során élesztő kettős hibrid módszerrel kimutatták, hogy a TIMAP képes kötni a 37/67 kDa-os laminin receptort (LAMR1). A két fehérje közötti kölcsönhatás a TIMAP negyedik ankyrin ismétlődése és a LAMR1 N-terminális régiója között jön létre. Kezdetben a LAMR1 fehérjét a TIMAP-PP1c komplex szubsztrátjaként azonosították, amely elősegíti a LAMR1 defoszforilációját [72]. Későbbi vizsgálatok során azonban kiderült, hogy a TIMAP-PP1c komplex csak korlátozza a kinázok általi foszforilációt a LAMR1 fehérjén [73]. A legfrissebb LAMR1 fehérjéhez kapcsolódó eredmények alapján a TIMAP-PP1c komplex kötődése a LAMR1-hez aktiválja a PP1c foszfataz aktivitását és szabályozta a LAMR1 Thr125-es oldalláncának a foszforilációját [74]. A TIMAP fehérje C-terminálisan részén elhelyezkedő CAAX-box prenilációja ezt a régiót erőteljesen hidrofóbbá teszi, így ennek köszönhetően képes kölcsönhatásba lépni a membrán kettős foszfolipid rétegével [60, 75]. A RACK1 (aktivált protein kináz C receptora 1) fehérjét szintén a TIMAP kölcsönható partnereként azonosították. A fehérje szerkezetéből adódóan egyidejűleg több fehérjével is képes kölcsönhatásba lépni, így a RACK1 fehérjéhez a TIMAP fehérje és a farnezil transzferáz enzim egyidejűleg képes kötődni, mely a TIMAP prenilációjához szükséges. Endotél sejteken végzett RACK1 csendesítés hatására a TIMAP fehérje lokalizációja a sejtek plazmamembránjában csökkent, ami arra utal, hogy a RACK1 kulcsszerepet játszik a TIMAP prenilációjában, és az azt követő membrán lokalizációjában. Emellett a TIMAP foszforilációja is kulcs fontosságú, ugyanis PKA és glikogén szintetáz kináz 3 β (GSK3 β) általi foszforilációját követően válik hozzáférhetővé a farnezil transzferáz enzim számára [76].

A TIMAP szerkezetében jelenlévő NLS szignál szekvencia lehetővé teszi a sejtmagban való megjelenését, bár itt betöltött funkciójáról jelenleg még keveset tudunk [60]. Pull-

down, LC-MS/MS és immunprecipitációs módszerekkel a TIMAP és az eukarióta elongációs faktor 1 A (eEF1A1) kölcsönhatását igazolták [77]. Az eEF1A1 szerepet játszik a fehérjék magi exportjában, ugyanis a fehérjével végzett kísérletek során kimutatták, hogy segíti a poly A-kötő fehérje 1 (PABP1) és a von Hippel-Lindau (VHL) fehérjék citoplazmából sejtmagba való transzportját anélkül, hogy az eEF1A1 a sejtmagba jutna. A fehérjéken egy transzkripciótól függő nukleáris exportmotívumot (TD-NEM) azonosítottak, amely szerepet játszik az eEF1A1-gyel való kölcsönhatásban és a magi transzportban [78]. A TIMAP és eEF1A1 kölcsönhatásának vizsgálata során a potenciális nukleáris export motívum jelenléte a TIMAP szekvenciájában is megtalálták, amely az egyik ankyrin ismétlődésnek a része és szerepet játszik az eEF1A1-gyel való kölcsönhatásban. A TIMAP fehérje nukleáris exportjában azonban nem kizárólagosan az eEF1A1 felelős. A ROCK által Tyr oldalláncon foszforilált eEF1A1 fehérjét azonban a TIMAP-PP1c komplex szubsztrátjaként azonosították, valamint kimutatták, hogy a TIMAP szabályozza a eEF1A1 lokalizációját, ugyanis az eEF1A1 a TIMAP-al együtt az endotél sejtek membránjában lokalizálódik [77].

Az ezrin, radixin, moezin fehérjék (ERM) szerkezetüket és funkciójukat tekintve nagyfokú homológiát mutatnak [79]. Az ERM fehérjék az aktin filamentum és a plazmamembrán fehérjék közötti kölcsönhatásban játszanak szerepet, ezáltal részt vesznek a barrier szabályozásban. A fehérjék N-terminális része erősen konzervált, amely a plazmamembránhoz való kapcsolódásért felelős, míg a fehérjék C-terminális régiója képes kölcsönhatásba lépni a citoskeletális elemekkel [80, 81]. A fehérjék konformációja és kötődési képessége a C-terminális régióban levő Thr oldallánc foszforilációjával szabályozódik. Az ERM fehérjék foszforilációja a RhoA/Rho-kináz útvonalon keresztül történik, ennek következtében a foszforilált fehérje konformáció változáson megy keresztül és aktív állapotba kerül [82]. A foszforilált ERM fehérjék Thr oldalláncának defoszforilációjában a TIMAP-PP1c komplex játszik szerepet az endotél sejtekben, melynek következtében a citoskeleton és membrán kölcsönhatása és a sejtek alakja is megváltozik [82-84].

Az ERM fehérjékkel rokon merlin fehérjét szintén a TIMAP-PP1c szubsztrátjaként azonosították. A merlin a 2-es típusú neurofibromatosis tumorszuppresszor gén terméke. N-terminálisan egy FERM domént tartalmaz, melyet egy α -helikális domén követ. A fehérje C-terminális részén egy C-terminális szabályozó domén található [85]. A kölcsönhatás vizsgálata során kiderült, hogy a TIMAP N-terminális régiója a merlin

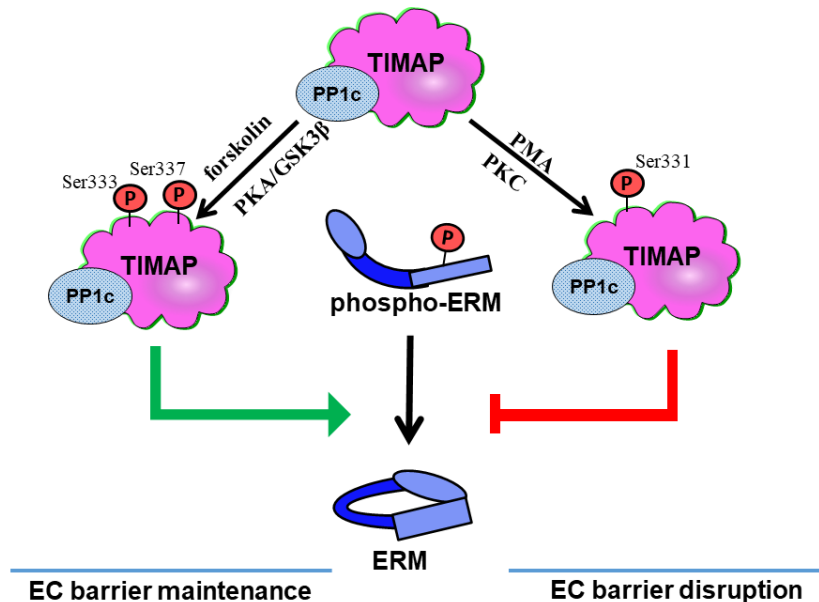
FERM doménjével képes kölcsönhatni [86]. A merlin fehérje a Ser518-as oldalláncon PKA által foszforilálódik [87]. A PP1 gátlása, vagy a TIMAP csendesítés hatására megnövekedett a merlin-Ser518 oldallánc foszforilációs szintje, ezzel egyidejűleg a sejtmembránban dúsult fel. A foszforiláció hatására fokozódott a marha tüdő artéria endotél sejtek (BPAEC) migrációja és proliferációja. Ezek az eredmények azt bizonyítják, hogy a merlin Ser518-as oldalláncának defoszforilációjában a TIMAP-PP1c komplex játszik szerepet. [86].

4.7. A TIMAP fehérje foszforilációs szabályozása

A MYPT1 esetében azonosított szabályzó foszforilációs helyek (Thr696, Thr853) a TIMAP fehérje esetében nincsenek jelen, ellenben a Ser331, Ser333 vagy Ser337 oldalláncának foszforilációja kitüntetett szerepet tölt be a TIMAP-PP1c komplex szabályozásában [84, 88, 89] (5.ábra). A TIMAP Ser337-es oldallánc foszforilációjában PKA játszik szerepet, mely segíti a Ser333-es oldallánc glikogén szintáz kináz 3 béta (GSK3 β) általi foszforilációt. A TIMAP a Ser333/Ser337 helyén történő foszforilációja nem, vagy csak mérsékelten módosítja TIMAP és a PP1c kapcsolódását, azonban a PP1c aktivitására hatással van [88].

A kölcsönhatás vizsgálatához PKA-val, valamint PKA és GSK3 β -val kétszeresen tiofoszforilált fehérjéket használtak fel. A felületi plazma rezonancia vizsgálatokkal azt tapasztalják, hogy a TIMAP-PP1c kölcsönhatás erőssége a kétszeresen foszforilált TIMAP esetében nem változott. Az egyszeresen foszforilált TIMAP esetében azonban erőteljesebb kölcsönhatást mutatott a PP1c-vel. Endotél sejtek trombinnal történő kezelésének hatására a TIMAP és PP1c mellett a foszfo-ERM fehérjék erőteljes membránban való lokalizációját detektálták, valamint a sejtek között rések alakultak ki, amely a barrier diszfunkciójának a jele. Immunfluoreszenciás festéssel a foszfo-ERM fehérjék mennyisége forskolin kezelést követően csökkent a membránban és a sejtek relaxált állapotba kerültek. Forskolin kezelés hatására aktiválódik a PKA, amely foszforilálja a TIMAP fehérjét. GSK3 β inhibitor alkalmazásával bizonyították, hogy a forskolin kezelés hatására bekövetkező változásokban a GSK3 β általi foszforiláció is szerepet játszik. Ezen eredmények igazolják, hogy a PKA és GSK3 β általi TIMAP foszforiláció részt vesz az ERM fehérjék foszforilációs szintjének szabályozásában és egyben a sejtek barrier funkciójának szabályozásában [22, 89].

A TIMAP Ser331-es oldalláncon a PKC által foszforilálódik. Endotél sejteken végzett kísérlet során kimutatták, hogy a PKC általi TIMAP foszforiláció a PKA/GSK3 β útvonaltól függetlenül működik, valamint a PMA kezelést követő PKC aktiváció hatására a TIMAP a sejtmembránban lokalizálódik. TIMAP rekombináns vad típusú és foszfo-mutáns formáinak létrehozását követően, kölcsönhatási vizsgálatok során a foszforilációt utánozó TIMAP ERM/foszfo-ERM fehérjékkel nem mutatott kölcsönhatást. A PKC aktiválása után a TIMAP-PP1c nem tudta defoszforilálni a foszfo-ERM fehérjét, és ennek következtében a szintje emelkedett a sejtek membránjában. ECIS méréssel a foszforilációt utánozó TIMAP mutánst expresszáló sejtek barrier diszfunkcióját detektálták. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a TIMAP Ser331-es oldalláncon PKC általi foszforilációja egy gátló hatású foszforiláció, amely csökkenti a foszfo-ERM defoszforilációját és így a barrier diszfunkcióját eredményezi [84].



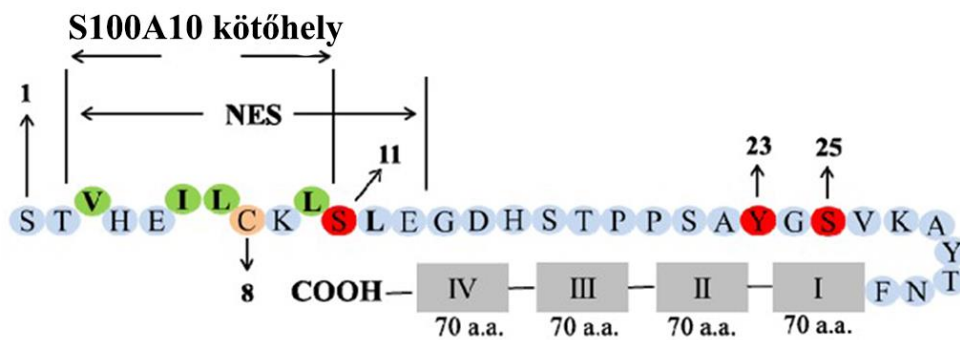
5.ábra. A TIMAP foszforilációs állapota (Boratkó, 2016) [84].

4.8. Annexin A2 szerkezete és fiziológiai szerepe

Az annexin egy nagy fehérje család, amely több mint 160 taggal rendelkezik [90]. Gerincesekben (ANXA), gerinctelenekben (ANXB), gombákban, protozoonokban (ANXC), növényekben (ANXD) és protisztákban (ANXE) expresszálódnak. Emlőszövetekben összesen 12 különböző annexin A fehérjét azonosítottak, amelyet annexin A1-től A11-ig, valamint az annexin A13-nak neveztek el, az annexin A12-öt azonban a nevezéktanból kihagyták [91, 92]. A család legszélesebb körben vizsgált tagja az annexin

A2 (ANXA2), amely a sejtek és szövetek többségében, egyes daganatokban expresszálódik és több ligandumhoz is képes kötődni [93]. Elsőként kromaffin sejtekből felszabaduló katekolaminok exocitotikus helyén azonosították [94]. Az irodalomban számos néven megtalálható, például annexin II, Calpactin I nehézlánc, Chromobindin 8, Lipocortin II, p36 vagy placenta anti-koaguláns IV. A fehérjét kódoló gén a 15-ös kromoszóma hosszú karjának 22.2 régióján helyezkedik el [95, 96]. A 36 kDa molekulatömegű ANXA2 lokalizációját tekintve a sejtmembránban, a citoplazmában, a magban és az extracelluláris mátrixban is megtalálható [97, 98]. Két fő doménből épül fel, egy nagyon változatos amino terminális részből, melyet „feji régió” is hívnak, valamint egy karboxil terminális „core” doménből. A fehérje N-terminális régiója számos poszttranszlációs módosítási helyet tartalmaz, például Ser, Tyr foszforilációs helyeket, Ser1-acetilézési helyet, ezen kívül nukleáris export szekvenciát (NES) és S100A10 kötő helyét, valamint számos ligandum és fehérje számára kölcsönhatási helyként szolgál (6.ábra). A karboxi-terminális régió tartalmazza a kalcium, foszfolipid, heparin és F-aktin kötőhelyeket [91, 99]. A karboxi-terminális régiót négy úgynevezett „annexin” ismétlődés építi fel, melyek mindegyike 70 aminosavból áll [100]. Az ANXA2 nem tartalmaz NLS-t és a magba történő transzportjának mechanizmusa még nem ismert, de a NES szekvenciának köszönhetően az exportin-1-gyel való kölcsönhatás során a magból a citoplazmába transzportálódik [101]. Az ANXA2 azáltal, hogy megjelenik a magban, részt vesz a DNS replikációjában és megvédi a DNS-t a károsító hatásoktól. Kimutatták, hogy szerepet játszik mind a transzkripció, mind a transzláció szabályozásában [97, 102-104]. A fehérje monomerként vagy heterotetramer komplexként fordulhat elő, melynek aránya sejtípustól függ. A heterotetramer forma két monomer ANXA2-ből és S100A10 homodimerből áll. Az ANXA2 szerkezetében az S100A10 kötőhely a fehérje N-terminális részén az amfipatikus α -hélixen található, ahol a hidrofób oldalláncok, Val3, Ile6, Leu7 és Leu10 aminosavak kapcsolódnak az S100A10 fehérjével [105]. Az S100A10 az S100 fehérje család tagja. Az S100A10 mellett az S100A6, az S100A4 és az S100A11 is képes kötődni az ANXA2-höz. A klasszikus ANXA2-S100A10-et 30 évvel ezelőtt azonosították, mely számos sejtbeli folyamatban játszik szerepet [93, 98, 106]. Az ANXA2 az S100A10 fehérjével való kölcsönhatása során védi az S100A10 fehérjét az ubiquitinációtól és a proteozomális lebomlástól [107]. Bár az ANXA2 önmagában is képes a sejtek membránjához kapcsolódnia, azonban az S100A10-el való kötődése növeli az ANXA2 Ca^{2+} érzékenységet és így a membrán és F-aktin megkötő képességét [108-110]. Az ANXA2-S100A10 komplex jelenlétét mutatták ki a von Willebrand faktor

(vWF) szekréciójában, vagy a plazmin regulációjában [111]. Számos, némileg ellentmondó modell létezik, amelyek megmagyarázzák a fehérjéknek a pontos szerepét a plazmin aktiválási folyamatokban [98, 112, 113]. Az ANXA2-S100A10-el alkotott komplex jelenlétét nem csak egészséges, hanem daganatos sejtek esetében is leírták. Az ANXA2 kötődése az S100A10-hez a sejtek felszínén hozzájárul a heterotípusos sejt-sejt kölcsönhatásokhoz, például emlődaganatok és a mikrovaszkuláris endotél sejtek között [114].



6.ábra. ANXA2 doménszerkezete és poszttranszlációs módosítása (Liu, 2009). *Ser-1: Acetilációs hely. Val3, Ile6, Leu7, és Leu10: S100A10 kötésért felelős hidrofób oldalláncok. Ser11 és Ser25: potenciális PKC foszforilációs helyek. NES: nukleáris export szekvencia. Tyr 23: pp60Src foszforilációs hely. Cys8: redox érzékeny cisztein oldallánc. Karboxi-terminális annexin domének(I-IV.): kalcium, foszfolipid, membrán, F-aktin, heparin kötőhelyeket tartalmaz [98].*

Az ANXA2 számos foszforilációs helyet tartalmaz, melyek többsége az N-terminális doménben található, azonban az annexin doméneken is találunk potenciális foszforilációs helyeket. Sajnos a legtöbb foszforilációs helyet csak tömegspektrometriás méréssel azonosították és további biokémiai, molekuláris biológiai kísérletekkel nem vizsgálták [93]. Az ANXA2 fehérje esetében korábban három foszforilációs helyet azonosítottak, a Ser11 és Ser25 és a Tyr23-as oldalláncokon [115-118]. A Ser25 és Tyr23 oldallánc foszforilációját *in vitro* és *in vivo* kísérletek is valószínűsítik, míg a Ser11 oldallánc foszforilációjával csak *in vitro* kísérletekben foglalkoztak [93]. A legtöbb Ser11 oldallánc foszforilációjára irányuló kísérlet az ANXA2-S100A10 közötti kölcsönhatásra összpontosított. Ennek oka az, hogy az S100A10 kötőhely és a Ser11-es foszforilációs hely nagyon közel vannak egymáshoz és az ANXA2 első 12 aminosava játszik szerepet a kölcsönhatásban [119]. Számos kísérleti eredmény azt bizonyítja, hogy a Ser11-es oldallánc foszforilációja csökkenti az S100A10 fehérjével való kölcsönhatást [111, 120,

121]. A Ser11 oldallánc foszforilációját csak *in vitro* tanulmányozták. Egyes irodalmi adatok arra utalnak, hogy a PKC felelős ezen oldallánc foszforilációjáért, míg más kutatócsoportok szerint a cAMP kináz és a kalmodulin kináz nagyobb affinitást mutat, mint a PKC [119, 122]. HUVEC sejteken végzett forskolin kezelés hatására az ANXA2 defoszforilálódott, amelyet egy kalcineurin-szerű foszfatáz közvetít. Ez stabilizálta az ANXA2-S100A10 komplexe létrejöttét és segítette a von Willebrand faktor (vWF) felszabadulását a Weibel-Palade testekből [111].

A Ser25-ös oldallánc potenciális PKC általi foszforilációját *in vivo* és *in vitro* eredmények is egyaránt alátámasztják, azonban ezen oldallánc defoszforilációjában szerepet játszó foszfatázt még nem sikerült azonosítani [121]. Funkcionális proteomikai vizsgálatok során kimutatták, hogy Epstein-Barr vírus által kódolt látens membránfehérje (LMP1) a PKC-n keresztül a fehérje foszforilációját idézi elő, ami a sejtmagban való megjelenését indukálja [123, 124]. A foszforilációt utánzó Ser25 foszfoformotások alkalmazásával fehérje sejtmagi megjelenését detektálták, ezzel ellentétben a foszfo-Ser25 ANXA2 specifikus antitesttel végzett immunfestéssel bebizonyították, hogy a Ser25-ös oldalláncon foszforilált ANXA2 nincs jelen a PC12 sejtek sejtmagjában [125, 126]. További eredmények arra utalnak, hogy az ANXA2 Ser25-ös oldalláncának foszforilációja indukálhatja a Ser11-es oldallánc foszforilációját, úgynevezett hierarchikus foszforilációs mechanizmussal [121]. Hasonló hipotézist vetettek fel Kai-Li He és munkatársai, akik megfigyelték, hogy ha a Ser11-es vagy Ser25-ös oldalláncon a Ser aminosavat Ala-ra mutálták, az megakadályozta a másik helyen lévő oldallánc foszforilációját [122].

Az ANXA2 fehérjéket a pp60src (Rous sarcoma vírus transzformáló fehérje) szubsztrátjaként azonosították, ami a Tyr23 oldalláncot foszforilálja [127]. Ezenkívül számos receptor aktivációjának eredményeként képes foszforilálódni ez az oldallánc, mint például az inzulinreceptor, az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) vagy a vérelezke eredetű növekedési faktor (PDGF) [128-131]. Tyr23 oldallánc foszforilációja a citoskeletális rendszer megváltozását eredményezte, ami a sejt alakjának és mozgékonyságának változását okozta, valamint a fehérje fokozott lokalizációját mutatta a sejtek membránjában [128, 132]. Embriónális hörcsög vese (BHK) sejteken végzett kutatások során kimutatták, hogy inzulinnal történő stimulálás után az ANXA2 Tyr oldalláncon foszforilálódik és aktiválja a Rho/ROCK jelátviteli útvonalat, kiváltva a perifériás aktin felhalmozódását, ami a sejtek lekerekítéséhez vezet [129]. A HUVEC sejteken végzett kísérleti eredmények a Tyr oldalláncon

foszforilálódott ANXA2 membránban való lokalizáció növekedését mutatták ki hő okozta stressz eredményeként [130]. A Tyr23 oldallánc defoszforilációjában szerepet játszó foszfatázt szintén nem sikerült még azonosítani.

5. Célkitűzés

A PP1 regulátora, a TIMAP fehérje magas expressziós szintje endotél sejtekben a fehérje kiemelt szerepére hívja fel a figyelmünket. Munkacsoportunk az elmúlt évtizedben a TIMAP-PP1c komplex számos szubsztrátját és kölcsönható partnerét azonosította, amelyeken keresztül olyan sejt folyamatok szabályozását írta le, mint a barrier fenntartása, az angiogenezis, valamint a sejtproliferáció.

Munkánk során ezért célul tűztük ki:

- I. A TIMAP fehérje további új kölcsönható partnerének azonosítását és a kölcsönhatás fiziológia jelentőségének a vizsgálatát.
 - Rekombináns GST- N-terminális és C-terminális TIMAP fehérjék felhasználásával új kölcsönható partner keresése BPAEC sejtekben pull-down módszerrel.
 - Az új kölcsönható partner és TIMAP-PP1c fehérjék közötti kölcsönhatás vizsgálata pull-down, Western blot, immunprecipitációs kísérletekkel és immunfluoreszcens festéssel.
 - A TIMAP-PP1c komplex szerepének vizsgálata az új kölcsönható partner defoszforilációjában.
 - Az új kölcsönható partner endotél sejtekben betöltött szerepének vizsgálata.

Foszfoprotein analízis eredmények adatai alapján a TIMAP Ser69-es oldallánca egy olyan potenciális foszforilációs hely, amely a PP1c kötő motívum és a nukleáris lokalizációs szignál szekvencia közelében található. Ez arra utal, hogy a foszforiláció befolyásolhatja a PP1c aktivitását és affinitását, valamint hatással lehet a lokalizációjára. Ezért további célunk volt:

- II. A TIMAP Ser69-es oldallánc foszforilációjának tanulmányozása:
 - Foszforilációt utánzó Ser69Asp és a foszfonull Ser69Ala mutáns TIMAP fehérjék létrehozása bakteriális és emlős expressziós rendszerekben.
 - A TIMAP mutánsok és a PP1c, ERM és foszfo-ERM fehérjék közötti kölcsönhatás vizsgálata pull-down és Western blot módszerrel.
 - A TIMAP mutánsok endotél sejten belüli lokalizációjának vizsgálata.
 - A Ser69-es oldallánc foszforilációjáért felelős kináz azonosítása.
 - A TIMAP mutánsok hatásának vizsgálata az endotél sejtek barrier funkciójára és a sejt migrációra.

6. Anyagok és módszerek

6.1. Anyagok

Pufferek, oldatok

- 2xYT táptalaj: 16 g/l, 10 g/l élesztőkivonat, 5 g/l NaCl, pH 7.0
- 5xSDS mintapuffer: 50% glicerin, 10 % SDS, 310 mM Tris, 100 mM DTT, 0,01% brómfenolkék, 5% 2-ME használat előtt frissen hozzáadva
- Coomassie Blue gélfesték: 50% metanol, 10% ecetsav, 1 g/l Coomassie Brilliant Blue R-250
- ELFO puffer: 25 mM Tris, 192 mM glicin, 0,25 mM SDS
- Frakcionáló puffer: 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1% NP-40, használat előtt frissen hozzáadott proteáz inhibitor
- Immunprecipitációs puffer: 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM Na₃VO₄, 1% NP-40, proteáz inhibitor koktél frissen használat előtt hozzáadva
- Kináz assay puffer: 25mM MOPS, pH 7.2, 12,5mM β-glicerol-foszfát, 25mM MgCl₂, 5mM EGTA, 2mM EDTA
- LB (Luria-Bertani) táptalaj: 10 g/l tripton, 5 g/l élesztőkivonat, 10 g/l NaCl, pH 7.0
- LB agar táptalaj: 10 g/l tripton, 5 g/l élesztőkivonat, 10 g/l NaCl, 1,5% agar, pH 7.0
- Lízis puffer: 50 mM Tris, pH 7.5, 0,1% Tween-20, 0,2% 2-ME, proteáz inhibitor koktél frissen használat előtt az oldathoz adva
- PBS: 20 mM Na₂HPO₄, 115 mM NaCl, pH 7.4
- PKC lipid aktivátor: 20mM MOPS-ban, 1mM CaCl₂, pH 7.2
- SDS-gélmosó folyadék: 7% jégecet, 12% metanol
- SOC táptalaj: 20 g/l tripton, 2 g/l élesztőkivonat, 0,5g NaCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glükóz (pH 7.0) használat előtt frissen hozzáadva
- TAE: 4 mM Tris, 0,1 mM EDTA, 0,114% ecetsav, pH 8.5
- TBS: 25 mM Tris-HCl, 0,15 M NaCl, pH 7.5
- TBST: 25 mM Tris-HCl, 0,15 M NaCl, 0,1% Tween-20, pH 7.5
- Transzfer puffer: 120 mM Tris-HCl, 40 mM glicin, 20% metanol

Alkalmazott markerek:

- DNS létra: GeneRuler 1 kb DNA Ladder, mérettartomány 250 bp és 10000 bp (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA)
- Fehérje létra: PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 14kDa-tól 250kDa-ig (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA)

Sejtvonalak

- Marha tüdő artéria endotél sejtvonal, BPAEC: Bovine Pulmonary Artery Endothelial Cells, (American Type Tissue Culture Collection, CCL-209, Manassas, VA, USA)
- Humán tüdő artéria endotél sejtvonal, HPAEC: Human Pulmonary Artery Endothelial Cells (Lonza Group Ltd, Bázél, Svájc, #CC-2530)

Baktériumtörzsek

- *Escherichia coli* BL21 (DE3) (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA)
- *Escherichia coli* JM109 (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA)

Felhasznált antitestek

1. táblázat. *A Western blot kísérletekhez felhasznált antitestek.*

<i>Antitest</i>	<i>Hígítás</i>	<i>Gyártó</i>
aktin	1:1000	Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA; A5060)
ANXA2	1:500	Abgent Inc. (San Diego, CA, USA; AP7420a)
anti-nyúl IgG, HRP kapcsolt antitest	1:5000	Cell Signaling (Beverly, MA, USA; #7074)
anti-egér IgG, HRP kapcsolt antitest	1:5000	Cell Signaling (Beverly, MA, USA; #7074)
β-tubulin	1:2000	Millipore (Burlington, MA; USA; #05-661)
CD31 monoklonális antitest (HEC7)	1:1000	Thermo Fischer Scientific (Waltham, MA, USA; MA3100)
c-myc	1:1000	Thermo Fischer Scientific (Waltham, MA, USA; #13-2500)
ERM	1:1000	Cell Signaling (Beverly, MA, USA; #3142)

foszfo-ERM	1:1000	Cell Signaling (Beverly, MA, USA; #3149)
foszfo-Ser25 ANXA2 (Ser25) antitest	1:1000	Thermo Fischer Scientific (Waltham, MA, USA; PA5-37474)
foszfo-Ser-PKC szubsztrát antitest	1:1000	Cell Signaling (Beverly, MA, USA; 2261S)
IRAK1	1:500	Santa Cruz (Santa Cruz, CA, USA; sc-5288)
lamin A/C (H-110)	1:2000	Santa Cruz (Santa Cruz, CA, USA; sc20681)
PLK4	1:1000	Santa Cruz (Santa Cruz, CA, USA; sc-100413;)
PP1c δ	1:1000	Millipore (Burlington, MA; USA; #07-270)
PKC α poliklonális antitest	1:1000	Proteintech (Manchester, Egyesült Királyság; 21991-AD)
PPP1R16B (TIMAP)	1:1000	Abgent Inc. (San Diego, CA, USA; AP17590c)
RACK1	1:2000	Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA; R2030)
S100A10	1:500	Abgent Inc. (San Diego, CA, USA; AP909c)

6.2.Módszerek

Felhasznált plazmidok és polimeráz láncreakció (PCR)

A teljes hosszúságú pGEX-4T-3-TIMAP (1-567aa), pGEX-4T-3-N-terminális TIMAP (1-290aa), pGEX-4T-3-C-terminális TIMAP (291-567aa), pGEX-4T-3-TIMAP S331A, valamint pGEX-4T-3-TIMAP S331D plazmidokat munkacsoportunk már korábban létrehozta [22, 76, 133].

2.táblázat. A PCR reakcióhoz felhasznált primerek szekvenciája.

<i>Kódolt szekvencia</i>	<i>Primerek</i>	<i>Primer szekvenciák</i>
Annexin A2	forward	5'- TATAGGATCCATGTCTACTGTTACGAAATCC - 3'
	reverse	5'-TATCTCGAGCTAGTCATCTCCACCACACA-3'
TIMAP	S69A forward	5'/P/-TCCTTCGAGGCCGCCGTGGCC -3'
	S69D forward	5'/P/- TCCTTCGAGGCCGCCGTGGCC -3'
	S69 reverse	: 5'/P/- CACTTTCTTGCGGCCGCCGCC -3'

A pGEX-4T-3-Ser69Ala (S69A) és Ser69Asp (S69D) TIMAP mutáns plazmidok létrehozásához a PCR reakció során templátként a teljes hosszúságú pGEX-4T-3-TIMAP plazmidot és a 2.táblázatban lévő oligonukleotidokat használtuk primerként, amelyek saját tervezésű primerek. A pirossal jelölt nukleotidok a tervezett aminosav cserét kódoló nukleotidokat jelölik.

3.táblázat. A TIMAP mutánsok esetén alkalmazott PCR hőmérsékleti profil.

1.fázis	1.lépés	98°C	1 min
2.fázis (30x ciklusszám)	1.lépés	98°C	7 sec
	2.lépés (gradiens)	70°C	7 sec
		71°C	
		72°C	
	3.lépés	72°C	100 sec
3.fázis	1.lépés	72°C	1 min

Az ANXA2 kódoló szekvenciáját HeLa sejtekből származó humán cDNS-ből specifikus primerek segítségével szaporítottuk. A primerek BamHI és XhoI restriktions hasítási helyeket tartalmaznak. Az oligonukleotidok szekvenciáját a 2.táblázat tartalmazza. A lila színnel jelölt nukleotidok a restriktions hasítási helyeket kódoló szekvenciákat jelölik.

4.táblázat. Az ANXA2 amplifikációjához alkalmazott PCR hőmérsékleti profil.

1.fázis	1.lépés	98°C	1 min
2.fázis (5 ciklus)	1.lépés	98°C	5 sec
	2.lépés	55,5°C	5 sec
	3.lépés	72°C	11 sec
3.fázis (30 ciklus)	1.lépés	98°C	5 sec
	2.lépés	66,5°C	5 sec
	3.lépés	72°C	11 sec
4.fázis	1.lépés	72°C	1min

Agaróz gélelektroforézis, DNS kinyerése agaróz gélből

A DNS fragmentumok elválasztása mérettől függően 1-1,2%-os agaróz gélelektroforézissel történt. Az agarózt 1xTAE pufferben melegítéssel oldottuk fel. A DNS láthatóvá tétele érdekében 10000x hígításban GelRed (Biotium Inc.; Fremont, Ca, USA.; #41003) nukleinsav festéket adtunk az oldathoz, majd hűtés után a gélt a futtató tálcába öntöttük. Standardként 1kb-os DNS létrát (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA; #SM0311) használtunk. A futtatást 60 V feszültségen 1xTAE pufferben végeztük. A gél detektálása Chemidoc Touch műszerrel (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) történt. Az agaróz gélelektroforézis során kapott megfelelő méretű sávokat UV asztal felett kivágtuk és a Thermo GeneJET Gel Extraction (Thermo Fischer Scientific; #K0692; Waltham, MA, USA) kit segítségével, a gyártó által mellékelte protokoll alapján végeztük el a tisztítást. Az elúciót 55 °C-on 50 µl nukleáz mentes vízzel végeztük. A DNS tisztaságát és koncentrációját NanoDrop 2000 spektrofotométer (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) segítségével határoztuk meg.

Ligálás

A back-to-back PCR során kapott pGEX-4T-3-TIMAP S69A és S69D linarizált mutáns plazmidok ligálásához DNS T4 ligáz enzimet (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA; #15224025) alkalmaztuk. A ligálás elegyet egy éjszakán át, 4°C-on inkubáltuk. Az ANXA2 pGEX-4T-2 vektorba történő ligálásához 1:3 inzert:vektor moláris arányt alkalmaztunk. A ligálást szintén DNS T4 ligáz enzimmel végeztük 1 órán keresztül szobahőmérsékleten történő inkubálással.

E.coli sejtek transzformálása

A ligálási elegyeket jégen kiolvasztott 100 µl kompetens sejthez mértük, majd 20 percig jégen inkubáltuk. Kontrollként olyan kompetens sejteket használtunk, amelyhez DNS-t nem adtunk. A mintákat 45 másodpercig 42 °C-os vízfürdőben inkubáltuk majd 2 percre jégre helyeztük. A sejtekhez 900 µl 20 mM glükóz tartalmú SOC oldatot adtunk és 180 rpm-en 45 percig rázattuk az antibiotikum rezisztencia kifejlődése érdekében. Az inkubálási idő lejárta után a transzformált sejteket 100 µg/ml ampicillin tartalmú LB-agar táptalajra szélesztettük, valamint a kontroll mintákat LB-agar és ampicillin tartalmú LB-agar táptalajra is.

Plazmid preparálás és DNS szekvenálás

Az izolálás első lépéseként kiskultúrát indítottunk, amely során a kiválasztott telepeket ampicillin tartalmú folyékony LB oldatba helyezve 16 órán át 37 °C-on 180 rpm-en inkubáltuk. A következő nap a plazmidokat a Thermo GeneJET Plazmid Miniprep (Thermo Fischer Scientific; Waltham, MA, USA; #K0503) kit segítségével a gyártó által megadott protokoll alapján izoláltuk. Nagyobb mennyiségű plazmid előállításához, a 16 órán át tenyésztett kis kultúrákat ampicillin tartalmú folyékony LB oldatban 1:100-ban hígítva további 16 órán keresztül 37 °C-on 180 rpm-en inkubáltuk. A plazmidok tisztítását GeneJET plazmid Maxiprep kit (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA; #K0492) segítségével végeztük. A plazmid DNS koncentrációját és a tisztaságát NanoDrop 2000 spektrofotométer készülékkel ellenőriztük. A klónozás sikerességét és a mutációk jelenlétét szekvenáltatással is ellenőriztük, melyet a BIOMI Kft. végzett el.

GST fúziós fehérjék termeltetése

A glutation-S-transzferázzal (GST) fuzionált fehérjék létrahozásához, a pGEX-4T-3 vad típusú, mutáns (S69A, S69D) TIMAP, valamint ANXA2 plazmidokat *E.coli* BL21 (DE3) baktérium sejtekbe transzformáltuk. A fehérje termeltetés első lépéseként kiskultúrát indítottunk. Másnap 1000 ml-es lombikokba 150 ml ampicillin tartalmú 2xYT oldatba, 1:100 arányban hígítottuk a sejteket, majd 2 órán keresztül 37 °C-on ráztattuk (O.D.₆₀₀= 0.3-0.4). 2 óra elteltével mindegyik lombikból 500 µl mintát vettünk (indukálatlan), majd mindegyik lombikhoz izopropil-1-tio-β-D-galaktózidot (IPTG) mértünk a 5.táblázatban leírt végkoncentrációknak megfelelően és további 3 órán keresztül folytattuk a tenyésztést. Az GST-ANXA2 rekombináns fehérje expressziójának optimalizálásához különböző hőmérsékletet és különböző IPTG koncentrációkat is kipróbáltunk. A 3 órás inkubációs idő eltelté után mindegyik lombikból újabb 500 µl mintát vettünk (indukált). A sejteket 1300 g-n 5 percig 4 °C-on centrifugálva gyűjtöttük össze. A pelletet 5 ml 1xPBS-sel kétszer mostuk, majd -70 °C-on tároltuk. A mintavételből származó indukált és indukálatlan mintákat 1700 g-n 5 percig centrifugáltuk, majd a felülúszó eltávolítása után 100 µl 2x minta pufferben 10 percig főztük. A fehérjetermelés hatékonyságát 10-12 %-os SDS-poliakrilamid gélen ellenőriztük.

5.táblázat. A rekombináns fehérjék indukációjához használt körülmények.

<i>Rekombináns fehérje</i>	<i>IPTG koncentráció</i>	<i>Hőmérséklet</i>
GST-Annexin A2	0,1 mM, 0,5mM, 1mM	25 °C, 37 °C
GST-TIMAP WT	0,5 mM	25 °C
GST-TIMAP S69D	0,5 mM	25 °C
GST-TIMAP S69A	0,5 mM	25 °C

GST fúziós fehérjék tisztítása és pull-down assay

A fehérjék tisztítása során a fagyasztott sejteket 600 µl lízis pufferben felszuszpendálva Branson Sonifer (AMS Materials, LLC, Jacksonville, FL, USA) homogenizáló készülékkel 30% duty cycle és 3-as output control beállítások mellett 60 mp-en keresztül, szonikálással tártuk fel. A szonikálás után mindegyik elegyből 50 µl mintát vettünk, amit 50 µl 2x minta pufferben 10 percig főztünk (totál minta). A szonikálás után a lizátumot 13 500 g-n 4 °C-on 20 percig centrifugáltuk. A centrifugálás után is történt mintavétel a felülúszóból vett minta lett a feltárt minta. A centrifugálás után kapott felülúszót 20 µl Glutathione Sepharose 4B gyantán (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) 3 órán keresztül 4 °C-on forgattuk. 3 óra elteltével a nem kötődött fehérjék eltávolítása érdekében a gyantát kétszer mostuk 1xTBST-vel. A kötődött rekombináns fehérjéket 70 µl 2x minta pufferben 10 percig főzve eluáltuk a gyantáról. A fehérje tisztítás hatékonyságát 10 %-os SDS-PAGE-el ellenőriztük.

A pull-down assay-hez a fent leírt módon tisztítottuk a rekombináns fehérjéket. A BPAEC sejteket T75 flaskában tenyésztettük 100 %-os konfluencia eléréséig, majd mostuk 1xPBS-sel. Az endotél sejteket 1 ml lízis pufferben felkapartuk, majd 25 mp-ig szonikáltuk és 20 percig maximális fordulatszámon, 4 °C-on centrifugáltuk. Az így kapott felülúszót a Glutathione Sepharose 4B gyantán immobilizált fehérjékhez adtuk, majd egy éjszakán át 4 °C-on forgattuk. Az inkubálás után 3x mostuk az elegyet 1x PBS-sel, végül 120 µl 2x minta pufferrel 10 percig főztük a mintákat. A kapott mintákat SDS-gélen választottuk el, majd Western blot kísérletben vizsgáltuk.

SDS-PAGE és Western blot

A fehérjék méretét figyelembe véve, az elválasztásukhoz 10-12 %-os SDS poliakrilamid gélen, gélelektroforézist végeztünk.

A pull-down során nyert mintákból 10-10 µl-t vittünk fel 0,75mm 10 %-os SDS géltre. A futtatást 15 percig 120 V-on kezdtük majd 150 V-on 1x ELFO pufferben végeztük. A futtatás után a sávok láthatóvá tétele érdekében Coomassie Brilliant Blue festéket alkalmaztunk 10 percig, majd 1-2 órán keresztül gél mosó folyadékban tisztítottuk a gélét. A Western blot első lépéseként a fehérjéket méret szerint SDS-PAGE segítségével választottuk el. Az elválasztott fehérjéket nitrocellulóz membránra (Advantec MFS Inc., Dublin, CA, USA) transzfer pufferben elektromos áram segítségével transzferáltuk át (1,5 óra, 100 V). A membrán szabad kötőhelyeinek blokkolásához 5%-os sovány tejport tartalmazó 1xTBST-t alkalmaztunk 1 órán keresztül szobahőmérsékleten. A fehérjék azonosítására először 1xTBST és 0,1% BSA tartalmú oldatban, az 1.táblázatban megadott hígítású elsődleges antitesttel egy éjszakán át hideg szobában inkubáltuk (a hideg szobában beállított hőmérséklet 4°C). A szintén 1xTBST 0,1% BSA-oldatban 1:5000 arányban oldott anti-egér/anti-nyúl IgG, HRP-konjugált másodlagos antitesttel szobahőmérsékleten 1 órán keresztül inkubáltuk a membránt. Az egyes lépések között 3x 5 percig 1xTBST-vel mostuk a membránt, majd utolsó mosási lépésként 1x 5percig 1xTBS-t használtunk. A kötődött antitesteket kemilumineszcenciás detektálással 1:1 arányú Western Bright ECL-HRP substrate reagenssel (Advansta MFS Inc., Dublin, CA, USA) tettük láthatóvá. A kapott sávok detektálása Chemidoc Touch műszerrel történt. A Western blot eredmények denzitometrállását Image J szoftver segítségével értékeltük ki.

Sejtek tenyésztése

Kísérleteinkhez marha tüdő artéria endotél sejteket (BPAEC) 16-22 passzálási számig használtunk fel. A sejteket 10% hőinaktivált FBS (Sigma Aldrich; San Diego, CA, USA; #F9665), 1% nem esszenciális aminosav (Lonza; Bazel, Svájc; #13-114E), 1% nátrium-piruvát (Lonza, Bazel, Svájc; #BE13-115E;) és 2 mM L-glutamint tartalmazó MEM (Minimum Essential Media, Lonza, Bazel, Svájc #12-611F) médiumban tenyésztettük. A T75-ös flaskában tenyésztett sejteket 100 %-os konfluencia elérése után passzáltuk. Leszívtuk az elhasznált médiumot, majd 10 ml 1xPBS-sel mostuk a sejteket. A PBS eltávolítása után 2 ml tripszint (Lonza, Bazel, Svájc; BE17-141E) adtunk a sejtekhez és 1-2 percig 37 °C-on inkubáltuk. Friss médium hozzáadása után a sejteket szuszpendáltuk, 1:3 arányban hígítottuk, majd 37 °C-on 5 %-os CO₂ tartalom mellett tenyésztettük tovább. A humán tüdő artéria endotél sejteket (HPAEC) 10 % hőinaktivált FBS és EGM-2

SingleQuots növekedési faktor tartalmú EGM-2 (Endothelial Cell Growth Medium 2) médiumban tenyésztettük. A HPAEC sejteket 5-7 passzálási számig használtuk fel.

Transzfektálás és csendesítés, kezelések

BPAEC sejtekbe a pCMV-myc TIMAP, pCMV-myc S69D TIMAP, pCMV-myc S69A TIMAP plazmid DNS-eket Lipofectamine 3000 (Invitrogen™; Carlsbad, CA, USA; #L3000015) transzfekciós reagenssel vittük be. Az 500 ng plazmid DNS-t és 1 µl P3000™ reagenst tartalmazó szérum mentes médiumot 15 percig inkubáltuk 1 µl Lipofectamine™ 3000 reagenst tartalmazó szérum mentes médiumban. A DNS-lipid komplexet tartalmazó mixet ezután cseppenként a szérum mentes médiumban lévő sejtekhez adtuk, majd 4 órán keresztül a sejteket sejtenyészítő inkubátorban tenyésztettük tovább. A 4 óra elteltével a sejteken lecseréltük a médiumot komplett MEM-re és egy éjszakán keresztül tenyésztettük tovább. Másnap, a sejtek mikroszkóp alatt történő ellenőrzése után, a médiumot leszívtuk, majd a sejteket 1 ml PBS-sel mostuk. Ezt követően a sejteket 2x mintapufferben vettük fel és főztük.

A TIMAP, ANXA2, PKC fehérjék csendesítéséhez 80 %-os konfluenciájú HPAEC sejteket specifikus siRNS-el transzfektáltuk Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen™; Carlsbad, CA, USA; #3778-150) reagens segítségével a gyártó által javasolt protokoll alapján. Az siRNS-t tartalmazó szérum mentes médiumot 5 percig inkubáltuk Lipofectamine RNAiMAX reagenst tartalmazó szérum mentes médiumban. Az siRNS-lipid komplexet tartalmazó mixet cseppenként a komplett médiumban lévő sejtekhez adtuk, majd a sejteket inkubátorban tenyésztettük tovább. A TIMAP esetében 50 nM-os végkoncentrációjú TIMAP specifikus siRNS-el (ON-TARGET plus SMARTpool siRNA (Dharmacon Inc, Lafayette, CO, USA; L-004065-00-0,) 72 óráig végeztük a csendesítést. Az ANXA2 esetében 10 nM-os ANXA2 specifikus siRNS-el (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; #sc-270151) 48 óráig történő inkubálással csendesítettünk. A PKC α -t 25 nM-os végkoncentrációjú PKC α - specifikus siRNS-el (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; #sc-36243) 72 óráig történő inkubálással csendesítettük. Kontrollként ON-TARGETplus siCONTROL nontargeting pool siRNS-t (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA; D-001810-10-01-05) használtunk.

Az endotél sejteken végzett kísérleteink során a kezelésekhez használt anyagokat és koncentrációkat a 6.táblázat foglalja össze.

6.táblázat. *Endotél sejteken alkalmazott kezelések.*

<i>Kezelések</i>	<i>Alkalmazott végkoncentrációk</i>	<i>Idő (min)</i>
PMA	1 μ M	30
Gö6983	1 μ M	30
Okadánsav (OA)	0,5 nM	30
Tautomycin (TM)	1 μ M	30
Szfingozin-1-foszfát (S-1-P)	1 μ M	30
YLT-11	0,5 μ M	30

Immunfluoreszcencia

Az immunfluoreszcenciás vizsgálatokhoz, a BPAEC és HPAEC sejteket fedőlemezen tenyésztettük. A sejteket 3,7 % formaldehid tartalmú fixáló oldattal fixáltuk. A médium leszívása után 1xTBS-sel mostuk a sejteket, majd fixáló oldatban 10 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten. A fixáló oldat leszívása után mostuk a sejteket 1xTBS-sel, majd 0,5 %-os Triton-X tartalmú permeabilizáló oldatban 20 percig inkubáltuk. Az inkubálás után mosás következett, majd 2% BSA tartalmú 1xTBS oldatban fél órán keresztül inkubáltuk a fedőlemezeket. Az elsődleges (1:100) és másodlagos (1:300) antitesteket blokkoló oldatban hígítottuk és nedves kamrában egy órán keresztül inkubáltuk szobahőmérsékleten. A másodlagos antitestek fényérzékenyek, ezért ez az inkubációs lépés sötétben történt. Az aktin filamentumokat Texas Red Phalloiddinnel, a sejtmagot DAPI (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) festékekkel tettük láthatóvá. A festett fedőlemezeket SlowFade Gold antifade reagent (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) ragasztó anyaggal rögzítettük a tárgylemezekre. Az immunfluoreszcens felvételeket Leica TCS SP8 konfokális mikroszkóppal (Leica Microsystems, Wetzlar, Németország) HC PL APO CS2 63 x 1,40 NA immerziós objektívvel készítettük. A képeket Las AF szoftver segítségével dolgoztuk fel.

Immunprecipitáció

A médium leszívása után a sejteket 1x PBS-el mostuk, majd 600 μ l immunprecipitációs pufferrel kapartuk fel. A sejteket Branson Sonifer (AMS Materials, LLC, Jacksonville, FL, USA) homogenizáló készülékkel 30% duty cycle és 3-as output control beállítások

mellett 25 mp-en keresztül szonikáltuk, melyet egy centrifugálási lépés követett 13500 g-n 20 percig 4 °C-on. A centrifugálás után kapott felülúszóból mintát vettünk, melyet 5x SDS mintapufferben főztük, ez adta a totál mintát. Az aspecifikus kötőhelyek eltávolítása érdekében 50 µl immunprecipitációs pufferrel előmosott protein G Sepharose gyantához (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) mértük a centrifugálás után kapott felülúszót, majd 4 °C-on 2 órán keresztül forgattuk. A protein G Sepharose gyantát 4 °C-on 10 percig 13500 g-n történő centrifugálással távolítottuk el, majd a felülúszót 50 µl friss protein G Sepharose gyantára mértük. Az antitest hozzáadása után 16 órán keresztül 4 °C-on forgattuk. Az inkubációs lépés után 3x mostuk a gyantát immunprecipitációs pufferrel, majd 120 µl 2x SDS mintapufferben 10 percig főztük.

Sejtfractionálás

A citoplazma és a sejtmagi frakció létrehozásához a konfluens endotél sejteket 1xPBS-el óvatos kaparással szobahőmérsékleten gyűjtöttük össze. A PBS-t 200 g-n szobahőmérsékleten 3 percig tartó centrifugálással távolítottuk el. A pellethez 10 térfogat egységnyi frakcionáló puffert adtunk, majd vortexeltük 10 másodpercig és 18-22 G-s injekciós tűvel ellátott fecskendővel 20x óvatosan áthúztuk. 10 percig jégen való inkubálás után mintát vettünk, melyet 5x SDS mintapufferrel főztünk (totál frakció). A mintákat ezt követően újra vortexeltük, majd 500 g-n 7 percig centrifugáltuk 4 °C-on. A centrifugálás után kapott felülúszó adja a citoplazma frakciót, melyet 5x SDS mintapufferrel főztünk. A kapott pelletet pár percre jégre tettük, majd frakcionáló pufferrel mostuk, vortexeltük és 2 percig jégen inkubáltuk. Az 500 g 7 percig 4 °C-on történő centrifugálás után kapott pelletet 100 µl 2x SDS mintapufferrel főztük (sejtmagi frakció). A membrán frakciót ProteoJET™ Membrane Protein Extraction kit (Thermo Fischer Scientific; Waltham, MA, USA; #89842) felhasználásával a gyártó által mellékelt protokoll alapján végeztük el. A szubcelluláris sejtfractionálás hatékonyságának ellenőrzésére membrán markerként CD31 specifikus antitestet, citoplazma markerként β-tubulin, sejtmagi markerként lamin A/C antitesteket használtunk a Western blot során.

In vitro protein kináz C assay

A fehérjék foszforilációjának vizsgálatához *in vitro* PKC assay-t végeztünk. A GST, GST-TIMAP és GST-ANXA2 fehérjéket Glutathion-Sepharose 4B gyantán tisztítottuk. A gyantával történő forgatás után 600 g-n 3 percig 4°C-on centrifugáltuk a mintákat és

3x 1x TBST-vel mosást végeztünk. A TBST leszívása után a gyantához kötődött tisztított fehérjéket nukleáz mentes vízben szuszpendáltuk, amely a szubsztrát mintát adta. Az *in vitro* PKC foszforilációt aktív PKC α (SignalChem Biotech Inc, Richmons, BC, Kanada; # P94-10G) hozzáadásával végeztük, negatív kontrollként aktív PKC α -vel nem foszforilált fehérjéket használtunk. Az *in vitro* foszforilációhoz a 7.táblázat alapján állítottuk össze a reakció közeget.

7.táblázat. *In vitro* PKC foszforilációhoz összeállított elegyek.

Minta/ Reagensek	Foszforilálatlan minták	Foszforilált minták
Szubsztrát	30 μ l	30 μ l
PKC aktivátor	10 μ l	10 μ l
ATP assay koktél	20 μ l	20 μ l
Hígított PKC (0,1μg/ μl)	-	40 μ l
Kináz dilution puffer	40 μ l	-

A mintákat 30 °C-os vízfürdőben 1 órán át inkubáltuk, majd 3 percig 600 g-n szobahőmérsékleten centrifugáltuk. A felülúszó eltávolítása után 2x SDS mintapufferben való főzéssel eluáltunk. Az *in vitro* foszforiláció sikerességét Western blot kísérlettel ellenőriztük.

Electric Cell-substrate Impedance Sensing (ECIS) mérés

Az ECIS (Electric Cell-substrate Impedance Sensing, Applied Biophysics Inc, Troy, NY, USA) egy valós idejű, impedancia alapú módszer, mely lehetővé teszi a sejt kultúrában növesztett sejtek tanulmányozását, mint a morfológiai változások, a sejtek mozgásának és citoskeletális rendszer által irányított viselkedések tanulmányozását [134]. Kísérleteink során az endotél sejtek barrier funkciójának, a sejtek letapadásának és a sebgyógyulási folyamatok tanulmányozására alkalmaztuk. A TIMAP kölcsönható partnerének vizsgálata során az ECIS 8W10E 8 elektródás tenyésztő edényben tenyésztett endotél sejteket nonsiRNS-el és ANXA2 specifikus RNS-el csendesítettük, majd 24 óra elteltével 1 μ M-os PMA-val kezeltük és mértük az idő függvényében a rezisztencia értékeket. A sebgyógyulási folyamatok vizsgálatához az ECIS tenyésztő edényben tenyésztett endotél sejtek ANXA2 deplécióját követően 30 másodpercig 5 mA erősségű

60 kHz frekvenciájú árammal az elektródok felületén kiégettük a sejteket, ezáltal egy meghatározott méretű „sebet” hoztunk léte, majd követtük az impedancia érték változását a sebzés bezáródásáig. A TIMAP foszforilációs helyének vizsgálata során ECIS tenyésztő edényben tenyésztett sejteket pCMV-myc TIMAP, pCMV-myc TIMAP S69D, pCMV-myc TIMAP S69A plazmid DNS-el transzfektáltuk, majd 24 óra elteltével mértük a rezisztencia értékeket. A sebgyógyulási vizsgálatok során a plazmid DNS-el történő transzfektálás után 24 órával végeztük el a sebzés ECIS tenyésztő edényben tenyésztett endotél sejteken. Ezzel egy időben 1 μM S-1-P kezelést, valamint 1 μM S-1-P kezelést követő 0,5 μM YTL-11 kezelést hajtottunk végre a sejteken és a seb bezáródásáig követtük az impedancia értékeket. A sejt migrációs sebesség meghatározásához a következő képletet használtuk: $v = r/t$, ahol az „r” az elektród átmérője (125 μm), a „t” a seb bezáródásáig eltelt idő.

Sejtek életképességi vizsgálata (MTT assay)

96 lyukú tenyésztő edényben lévő HPAEC sejteket nonsi és ANXA2 specifikus siRNS-el transzfektáltuk. A mintákat transzfektálást követően 24, 48 és 72 órával vizsgáltuk. Minden lyukba 10 μl (5 mg/ml) MTT-t (3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolium bromid PBS-ben oldva) mértünk, majd 37 °C-on 2 órán keresztül inkubáltuk. A médium leszívása után a keletkezett formazán kristályokat 100 μl DMSO hozzáadásával feloldottuk. Az abszorbancia értékeket 540 nm-es hullámhosszon LabSystems Multiskan Ms spektrofotométer segítségével detektáltuk.

LC/MS-MS

Az új kölcsönható partner azonosítása LC-MS/MS tömegspektrometriás méréssel történt. A GST-TIMAP minták pull-down kísérletét követően a fehérjéket SDS-PAGE segítségével választottuk el és a sávokat Coomassie Brilliant Blue festéssel tettük láthatóvá. Az extra sávot kivágtuk a gélből és tömegspektrometriás mérésre küldtük Dr. Janáky Tamásnak és Dr. Szabó Zoltánnak a Szegedi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Orvosi Vegytani Intézetébe.

Statisztika

Az ábrákon a szórás értékek a minták átlagából származik (\pm SD). A statisztikai elemzést GraphPad Prism program segítségével Student t teszttel vagy ANOVA (egy- és

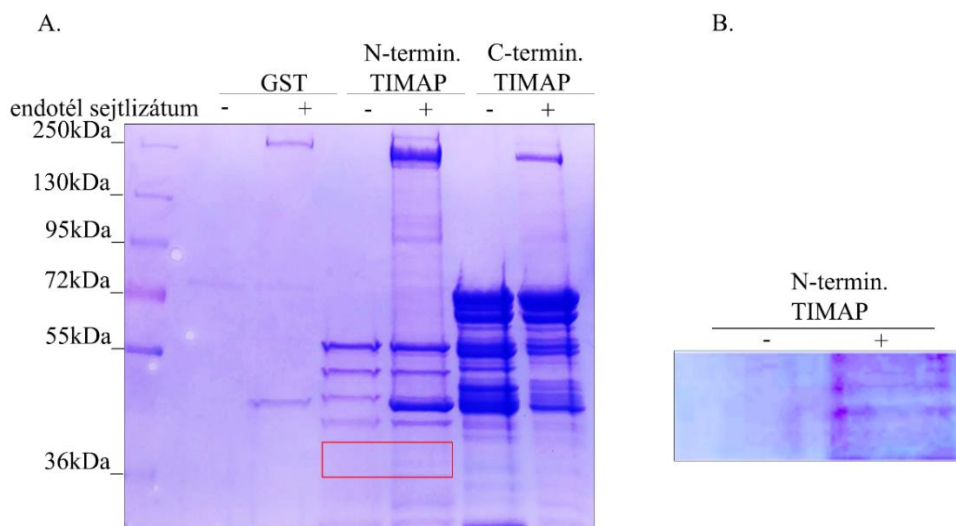
többszemponyos) analízissel végeztük. A szignifikancia szinteket csillaggal (*) jelöltük. $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***)).

7. Eredmények

7.1. A TIMAP fehérje új kölcsönható partnerének azonosítása és a kölcsönhatás fiziológia jelentőségének a vizsgálata

Az ANXA2 fehérje azonosítása, mint a TIMAP új kölcsönható partnere endotél sejtekben

Az endotél sejtekben nagy mennyiségben expresszáldó TIMAP fehérje számos kölcsönható partnerét és szubsztrát fehérjét azonosították, melyek segítségével a sejtekben betöltött fiziológias szerepét jobban megérthettük. Korábban munkacsoportunk sikeresen alkalmazta új kölcsönható partner kereséséhez a rekombináns GST-TIMAP fehérjét pull-down kísérletben, amely során az aktivált protein kináz C receptor 1 (RACK1) és eukarióta elongációs faktor 1 A 1 (eEF1A1) fehérjéket azonosították a TIMAP kölcsönható partnereként [76, 77]. A teljes hosszúságú rekombináns TIMAP fehérje sajnos könnyen fragmentáldó, ezért további új kölcsönható partnerének kereséséhez, pGEX-4T-3 vektorba klónozott N-terminális és C-terminális TIMAP fragmentumokat használtunk fel. Az alkalmazott N-terminális fragmentum 290 aminosavból áll és az NLS szekvenciát, a PP1c kötő motívumot és az 5 ankyrin ismétlődést tartalmazza. A TIMAP C-terminális része (291-567aa) rendezetlen régiókat és CAAX prenilációs szignál szekvenciát tartalmaz. A fehérjék bakteriális expressziója és affinitás kromatográfiával történő tisztítása után a rekombináns fehérjéket *in vitro* pull-down kísérletben használtuk fel. A tisztított rekombináns fehérjéket marha tüdő artéria endotél (BPEAC) sejtízátummal, negatív kontrollként lízis pufferrel inkubáltuk. A szükséges mosási lépések után az eluált fehérjéket SDS-PAGE segítségével választottuk el (7.ábra).

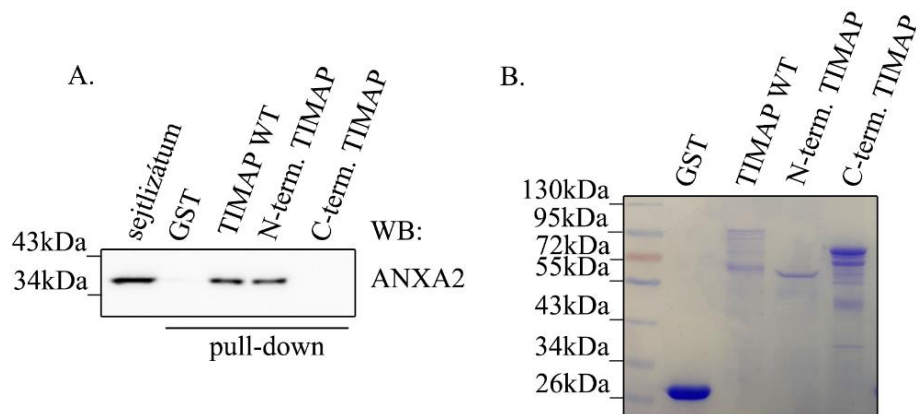


7.ábra. A TIMAP új kölcsönható partnerének keresése. A) A *Glutathione Sepharose 4B* gyantán immobilizált *GST*, *GST-N-terminális* (1-290aa) és *GST-C-terminális* (291-567aa) *TIMAP* fehérjét *BPAEC* sejtlizátummal (+), valamint kontrollként lízis pufferrel inkubáltuk (-). Az eluált fehérjéket 12%-os *SDS* gélen elválasztottuk és *Coomassie Brilliant Blue* oldattal tettük láthatóvá. B) A piros négyzettel jelölt nagyított ábra az újonnan megjelenő sávot mutatja a *GST-N-terminális TIMAP* fehérjével inkubált endotél sejtlizátum mintában.

Az endotél sejtlizátummal inkubált *GST-N-terminális TIMAP* mintában a kontroll mintákhoz viszonyítva (*GST* és lízis pufferrel inkubált minta) a 36 kDa-nál újonnan megjelenő sávot a gélből kivágtuk és tömegspektrometriás azonosításra küldtük (7.B.ábra). *LC-MS/MS* méréssel az *ANXA2*, *RACK1*, *eEF1A1* és *PP1cδ* fehérjéket azonosították. A *RACK1*, *eEF1A1* és *PP1cδ* fehérjék már ismert *TIMAP* kölcsönható partnerek, ezért lehetséges új kölcsönható partnerként az *ANXA2* fehérjére fókuszáltunk.

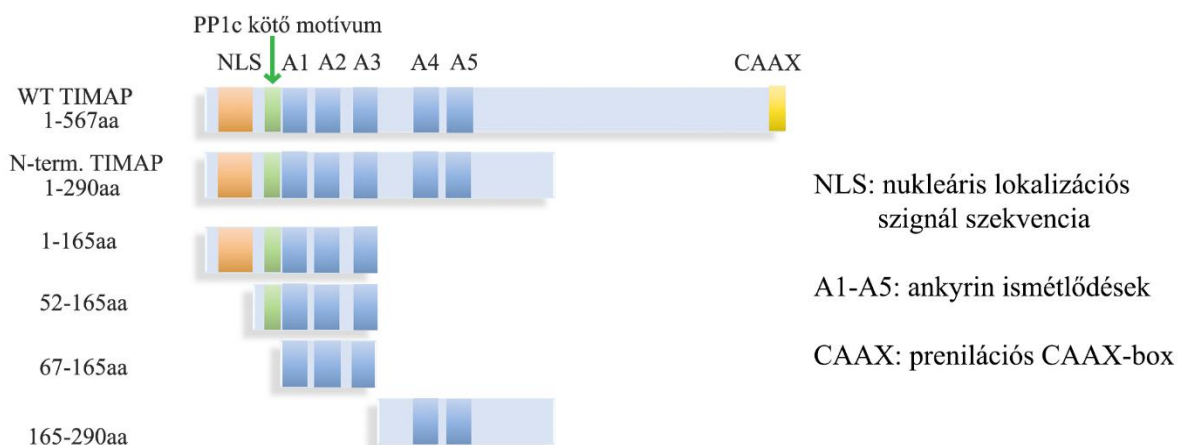
***ANXA2* és *TIMAP* fehérjék kölcsönhatásának vizsgálata endotél sejtekben**

A rekombináns *N-terminális*, valamint vad típusú teljes hosszúságú *TIMAP* fehérje *ANXA2*-vel való kölcsönhatását a pull-down minták *Western blot* analízisével erősítettük meg (8.A.ábra). A rekombináns *GST-C-terminális TIMAP* fragmentum és *ANXA2* fehérje között kölcsönhatást nem detektáltunk annak ellenére sem, hogy a *Coomassie Brilliant Blue*-val festett *SDS*-poliakrilamid gélen nagyobb mennyiségű rekombináns *C-terminális TIMAP* fehérje látható (8.B.ábra).



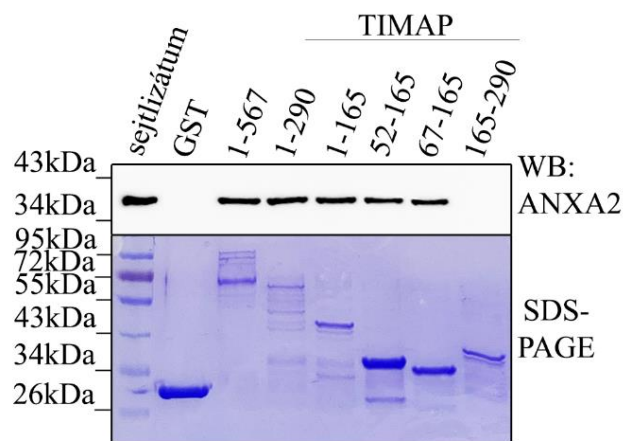
8.ábra. A TIMAP és ANXA2 kölcsönhatásának megerősítése. A) A rekombináns GST, GST-TIMAP WT(1-567aa), GST-N-terminális TIMAP (1-290aa), valamint GST-C-terminális TIMAP (291-567aa) fehérjéket pull-down kísérletet követően Western blottal vizsgáltuk. A kölcsönhatást ANXA2 specifikus antitest segítségével detektáltuk. (B) A rekombináns fehérjék tisztaságát és mennyiségét a pull-down minták SDS-PAGE elválasztását követő Coomassie Brilliant Blue festéssel vizsgáltuk.

Az ANXA2 fehérje a TIMAP N-terminális régiójával mutat kölcsönhatást, ezért annak vizsgálatára, hogy melyik TIMAP domén játszik szerepet a kölcsönhatásban, az N-terminális TIMAP régió rövidebb GST-fúziós fragmentumait használtuk fel további pull-down kísérletekben. A TIMAP 1-165 aminosav hosszúságú fragmentuma az NLS-t, a PP1c kötő motívumot, valamint az 1. 2. és 3. ankyrin ismétlődéseket tartalmazza. Az 52-165aa fragmentum már csak a PP1c kötő motívumot és az 1. 2. 3. ankyrin ismétlődést, a 67-165aa fragmentum az 1. 2. és 3. ankyrin ismétlődést, míg a 165-290aa fragmentum csak a 4. és 5. ankyrin ismétlődést tartalmazza (9.ábra).



9.ábra. A kölcsönhatás kimutatásához felhasznált TIMAP fragmentumok.

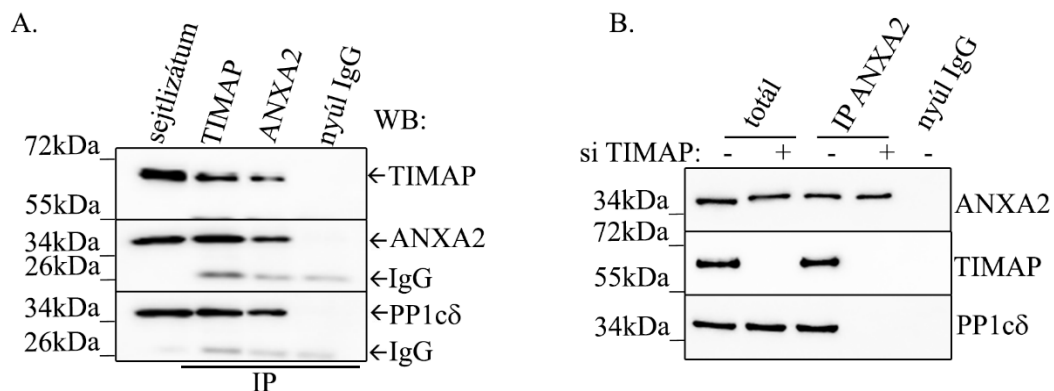
A teljes hosszúságú (1-567aa) GST-TIMAP WT, valamint a 165 aminosav hosszúságú GST-TIMAP (1-165aa) rekombináns fragmentumok mellett, az NLS-t (GST-TIMAP 52-165aa) vagy a PP1c kötőhelyet (GST-TIMAP 67-165aa) nem tartalmazó fragmentumok esetében is kimutatható volt az ANXA2-vel való kölcsönhatás, ezért arra a következtetésre jutottunk, hogy az 1-3. ankyrin ismétlődések játszhatnak szerepet a TIMAP ANXA2-vel való kölcsönhatásában (10.ábra). A GST-TIMAP 165-290aa fragmentuma, mely a 4. és 5. ankyrin ismétlődést kódolja, nem mutatott kölcsönhatást az ANXA2 fehérjével a pull-down kísérletben, így feltételeztük, hogy ezek az ismétlődő régiók nem játszanak szerepet a két fehérje kölcsönhatásában (10.ábra).



10.ábra. A TIMAP fehérjével való kölcsönhatás feltérképezése. A GST és a rekombináns GST-TIMAP (teljes hosszúságú vad típusú, 1-567 aminosav) fehérjéket, valamint a GST-TIMAP fragmentumokat Glutathione Sepharose 4B gyantán immobilizáltuk és BPAEC sejtlizátummal inkubáltuk (pull down). A teljes sejtlizátumot és a pull down mintákat Western blot kísérletben, ANXA2 specifikus antitesttel vizsgáltuk (WB:ANXA2). A rekombináns fehérjék mennyiségét a pull-down minták SDS-PAGE elválasztását követő Coomassie Brilliant Blue festéssel vizsgáltuk (SDS-PAGE).

Következő lépésként az endogén fehérjék közötti kölcsönhatást vizsgáltuk immunprecipitációs kísérlettel TIMAP és ANXA2 specifikus antitestek felhasználásával (11.A.ábra). A TIMAP antitesttel immunprecipitált mintában kimutattuk az ANXA2-t, az ANXA2 specifikus antitesttel kezelt mintában pedig a TIMAP fehérjét. A TIMAP a PP1c regulátor alegysége és a TIMAP-PP1c komplex számos szubsztrát defoszforilációjában részt vesz, ezért megvizsgáltuk a PP1c δ jelenlétét is az immunkomplexekben. A PP1c δ mind a TIMAP, mind az ANXA2 elleni antitesttel készített immunprecipitációs mintában

jelen volt. Annak eldöntésére, hogy a PP1c δ közvetlenül kapcsolódik-e az ANXA2 fehérjéhez, vagy a TIMAP fehérjén keresztül, TIMAP specifikus siRNS-el csendesített és kontroll endotél sejtekkel megismételtük az immunprecipitációt (11.B.ábra). Az ANXA2 antitesttel végzett immunprecipitáció során csak a kontroll, nem csendesített mintában detektáltuk a kölcsönhatást a PP1c δ -val és a TIMAP fehérjével, ami arra enged következtetni, hogy az ANXA2 és a PP1c δ között nincs közvetlen kölcsönhatás, csak a TIMAP fehérjén keresztül.

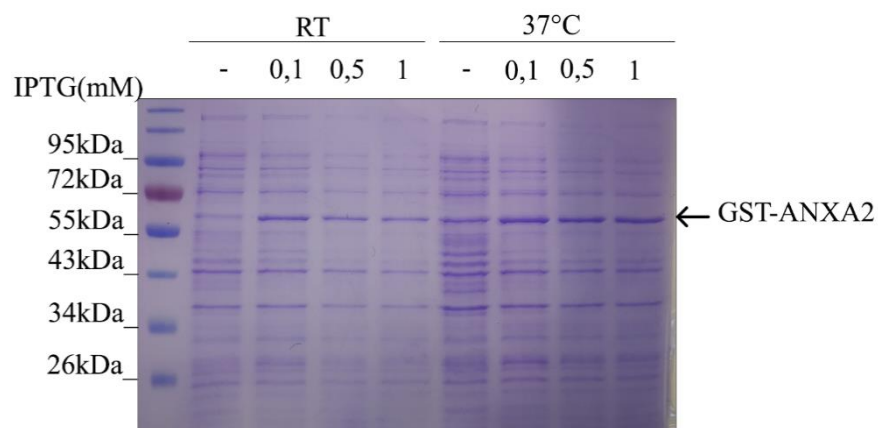


11.ábra. A TIMAP és ANXA2 közötti kölcsönhatás vizsgálata endotél sejtekben. A) TIMAP és ANXA2 specifikus antitest felhasználásával BPAEC sejtlizátumból immunprecipitációt végeztünk. A kapott IP komplexek fehérjéit SDS-PAGE segítségével választottuk el, majd a fehérjék jelenlétét Western blot kísérletben TIMAP, ANXA2 és PP1c δ specifikus antitestekkel teszteltük. Kontrollként nyúl szérumot használtunk. B) ANXA2 specifikus antitest felhasználásával kontroll (-) és TIMAP specifikus siRNS-el csendesített (+) BPAEC sejtlizátumból végeztünk immunprecipitációt, majd SDS-PAGE-t követő Western blottal vizsgáltuk az immunkomplexek fehérjéit.

A rekombináns GST-ANXA2 fehérje létrehozása és kölcsönhatása a TIMAP-PP1c-vel

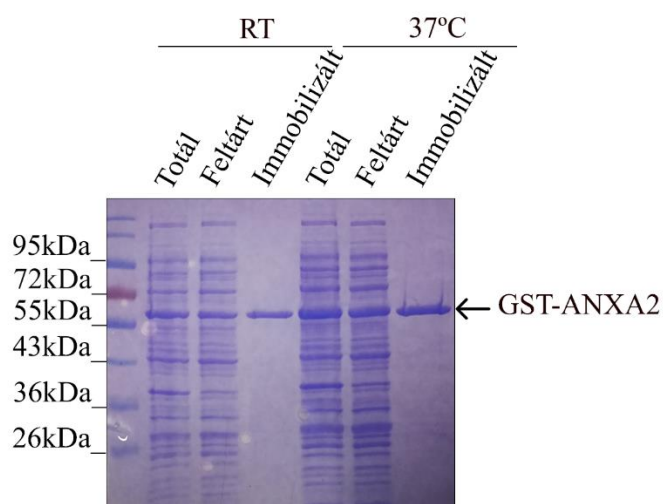
A TIMAP ANXA2 fehérjével való kölcsönhatásának további vizsgálatához pGEX-4T-2-ANXA2 rekombináns plazmidot hoztunk létre. PCR reakcióval, specifikus primerek segítségével sokszorosítottuk az ANXA2 kódoló szekvenciáját, melyet pGEX-4T-2 vektorba szubklónoztunk. A ligálást követően a plazmidokat JM109 *E. coli* sejtekbe transzformáltuk, szelektáltuk és a klónokat restriktív emésztéssel ellenőriztük. A kiválasztott rekombináns plazmid szekvenálásával meggyőződünk arról, hogy a pGEX-4T-2-ANXA2 vektor valóban az ANXA2 fehérjét kódoló DNS-t tartalmazza a

megfelelő olvasási keretben. A rekombináns fehérje termeltetéséhez a rekombináns plazmidot BL21(DE3) *E.coli* kompetens sejtekbe transzformáltuk, majd optimalizáltuk a rekombináns fehérjék termeltetését. A termeltetés hatékonyságának ellenőrzése érdekében az indukció nélküli és az IPTG-vel indukált mintákat SDS-PAGE segítségével vizsgáltuk (12.ábra). Az ANXA2 egy 36 kDa méretű fehérje, mely a 26 kDa-os GST-vel történő fúzió eredményeképpen 62 kDa molekulatömegnél jelenik meg várhatóan. Az indukálatlan mintához képest a várt molekulatömegű sávban indukció hatására egy megnövekedett intenzitású sáv jelent meg, amely a rekombináns fúziós fehérje termeltetésének sikerességét jelzi.



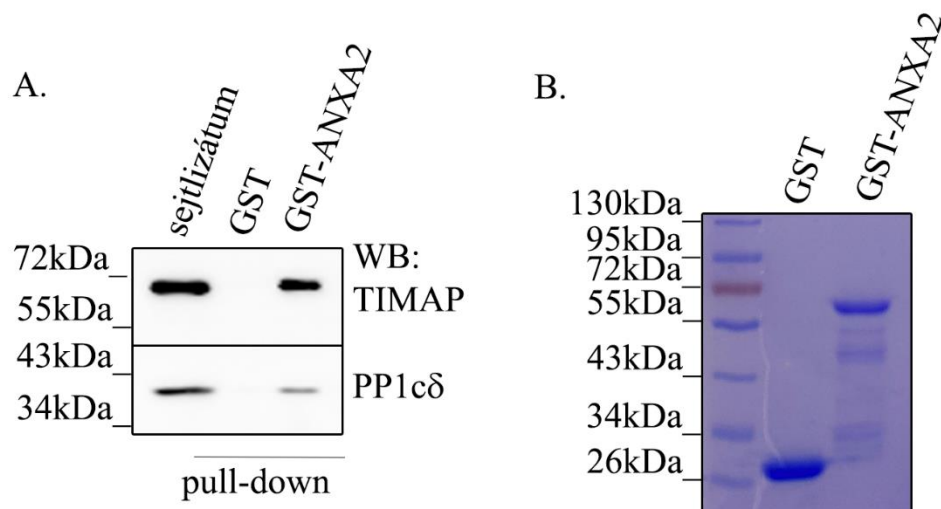
12.ábra. A GST-ANXA2 rekombináns fehérje expressziójának optimalizálása BL21(DE3) *E.coli* sejtekben. A rekombináns GST-ANXA2 fehérje expressziójához a rekombináns plazmidot BL21(DE3) *E.coli* sejtekbe transzformáltuk. A fehérje termeltetés optimalizálása során 25°C-ot (RT) és 37°C-ot, valamint többféle (0,1mM, 0,5mM és 1mM) IPTG koncentrációt is alkalmaztunk. A kontroll mintákhoz (-) IPTG-t nem adtunk. A fehérje termelés hatékonyságát SDS-PAGE-et követő Coomassie Brilliant Blue festéssel ellenőriztük.

A fehérje termeltetést követően optimalizáltuk a rekombináns GST-ANXA2 fehérje tisztítását (13.ábra). A rekombináns GST címkével ellátott szobahőmérsékleten, illetve 37°C-on 0,1mM IPTG-vel indukált mintákból végeztük a fehérje affinitás kromatográfiával való tisztítását. A tisztítás hatékonyságának ellenőrzéséhez, a totál, a feltárt, valamint a gyantáról elutált rekombináns fehérjéket SDS-PAGE-t követő festéssel vizsgáltuk. A sikeres tisztítás eredményeképpen az immobilizált mintákban egyetlen intenzív sávot kaptunk, a GST-ANXA2 méretének megfelelő molekulatömegnél.



13.ábra. A GST-ANXA2 rekombináns fehérje tisztításának optimalizálása. A fehérjetisztítás során mintát vettünk a szonikálással nyert teljes lizátumból (totál), az annak centrifugálásával kapott felülúszóból (feltárt), valamint a Glutathione Sepharose 4B gyantán immobilizált fehérjékből (immobilizált). Az így kapott mintákat SDS-poliakrilamid gélen választottuk el, majd Coomassie Brilliant Blue festéssel tettük láthatóvá.

A TIMAP és a rekombináns GST-ANXA2 kölcsönhatását pull-down kísérletben vizsgáltuk (14.ábra). A bakteriálisan expresszált és tisztított, a Glutathione Sepharose-on immobilizált GST, valamint GST-ANXA2 fehérjéket BPAEC endotél sejtlyúzattal inkubáltuk. A nem kötődött fehérjék mosási lépéssel történő eltávolítása után a fehérjéket mintapufferben való főzéssel eluáltuk a gyantáról, majd TIMAP és PP1c δ specifikus antitestek felhasználásával vizsgáltuk a kölcsönhatást. A pull-downt követő Western blot a rekombináns GST-ANXA2 fehérje TIMAP és PP1c δ -val való kölcsönhatását bizonyítja (14.ábra).

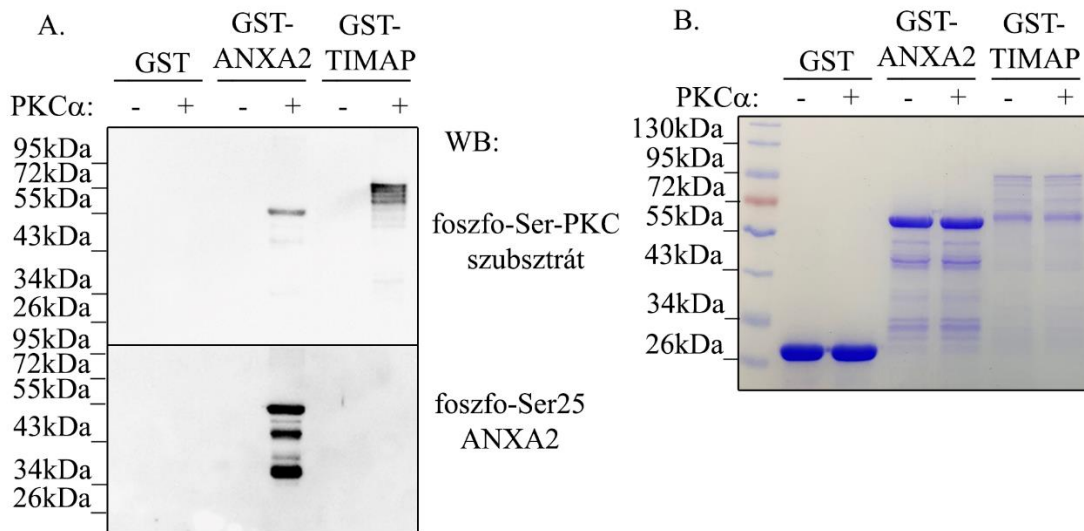


14.ábra. A TIMAP- PP1c δ és a rekombináns GST-ANXA2 közötti kölcsönhatás vizsgálata. A) A *Glutathione Sepharose 4B* gyantán immobilizált GST, GST-ANXA2 rekombináns fehérjékhez szonikálással feltárt BPAEC sejtlyzátumot adtunk. A 16 órás 4°C-on történő inkubálás és mosási lépések után 2x SDS mintapufferrel való főzéssel eluáltuk a gyantáról a specifikusan kötődött fehérjéket. A GST-ANXA2 és TIMAP-pal, valamint PP1c δ -val való kölcsönhatását Western blot analízissel vizsgáltuk. A pull-down során negatív kontrollként a GST-t használtuk, míg a Western blot során pozitív kontrollként BPAEC sejtlyzátumot. B) A rekombináns fehérjék tisztaságát és mennyiségét a pull-down minták SDS-PAGE elválasztását követő Coomassie Brilliant Blue festéssel vizsgáltuk.

Az ANXA2 Ser25-ös oldalláncát a PKC foszforilálja endotél sejtekben

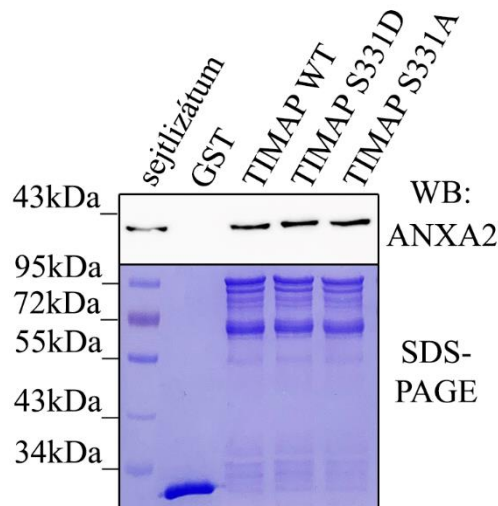
Az ANXA2 fehérje esetében három foszforilációs helyet azonosítottak korábban a Ser11, Ser25 és Tyr23-as oldalláncokon. Irodalmi adatok arra utalnak, hogy a Ser25-ös oldallánc egy potenciális PKC általi foszforilációs hely. Annak vizsgálatára, hogy az ANXA2 fehérjét valóban a PKC foszforilálja, *in vitro* PKC foszforilációt végeztünk (15.ábra). A GST, GST-ANXA2 és GST-TIMAP fehérjék mennyiségét és tisztaságát SDS-PAGE-t követő Coomassie Brilliant Blue festéssel igazoltuk (15.B.ábra). A kísérletben a TIMAP fehérjét pozitív kontrollként használtuk fel, ugyanis a TIMAP-ról már korábban kimutatták, hogy a Ser331-es oldalláncon PKC által foszforilálódik. A foszforiláció sikerességét Western blot kísérletben a konszenzus PKC foszforilációs helyre specifikus (foszfo-Ser PKC szubsztrát antitest), illetve foszfo-Ser25 ANXA2 specifikus antitestek felhasználásával vizsgáltuk. A PKC enzimmal történt inkubálás után a foszfo-Ser PKC szubsztrát antitest mind a GST-TIMAP, mind a GST-ANXA2 fehérjék foszforilációját igazolta (15.A.ábra). A másik antitest, amely specifikusan az ANXA2 Ser25

oldalláncának foszforilált formáját ismeri fel azt bizonyította, hogy a PKC α az ANXA2 fehérjét a Ser25-ös oldalláncon foszforilálja (15.A.ábra). Az ábra ezen részén azonban jelentős degradáció figyelhető meg.



15.ábra. GST-ANXA2 fehérje *in vitro* foszforilációja. A) A tisztított rekombináns GST, GST-ANXA2 és GST-TIMAP fehérjéket 30 percig inkubáltuk aktív PKC α -val (+). Negatív kontrollként a fehérjékhez nem adtunk kinázt.. A Western blot során anti-foszfo-Ser PKC szubsztrát és foszfo-Ser25 ANXA2-specifikus antitestek alkalmazásával vizsgáltuk a fehérjék foszforilációját. A foszfo-Ser PKC szubsztrát antitest a PKC által foszforilált szerin oldalláncokat ismeri fel. B) A fehérjék mennyiségét SDS-PAGE-t követő Coomassie Brilliant Blue festéssel vizsgáltuk

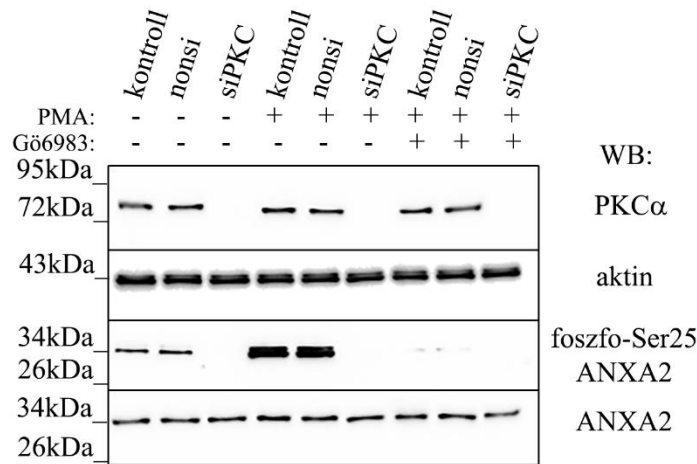
A TIMAP is a PKC enzim szubsztrátja, ezért megvizsgáltuk, hogy a PKC által Ser331-es oldalláncon foszforilált TIMAP hatással van-e az ANXA2 fehérjével való kölcsönhatásra (16.ábra). A pull-down kísérletben vad típusú, a Ser331-es oldalláncon foszforilációt utánzó és foszfonull rekombináns TIMAP fehérjéket használtunk fel. A foszforilációt utánzó GST-S331D rekombináns TIMAP fehérjén a 331-es szerin aminosav aszparaginsavra van kicserélve. A foszfonull GST-S331A rekombináns TIMAP fehérjén pedig a szerin alaninra van mutálva. A kölcsönhatás vizsgálata során nem találtunk különbséget a TIMAP S331D vagy az S331A fehérjék ANXA2-vel való kölcsönhatásában a vad típusú TIMAP-hoz képest, amely arra utal, hogy a TIMAP PKC általi foszforilációja nem befolyásolja az ANXA2-vel való kölcsönhatását (16.ábra).



16.ábra. Vad típusú és foszfomutáns TIMAP fehérjék kölcsönhatása az ANXA2 fehérjével. A rekombináns tisztított GST, GST-vad típusú TIMAP (WT), GST-TIMAP S331D és TIMAP S331A fehérjéket BPAEC sejtlizátummal végzett pull-down kísérletben használtuk fel. A fehérjék kölcsönhatását ANXA2 specifikus antitesttel detektáltuk (WB:ANXA2). A TIMAP fehérjék mennyiségét SDS-PAGE-t követő Coomassie- Brilliant Blue festéssel vizsgáltuk. (SDS-PAGE)

A TIMAP fehérje új kölcsönható partnerét az ANXA2 fehérjét BPAEC sejtek felhasználásával mutattuk ki, amelyekben a „konvencionális” PKC közül csak a PKC α fordul elő [84], valamint az előzőekben bemutatott *in vitro* PKC foszforilációs eredményeink alapján az ANXA2 a PKC α által foszforilálódik. Az ANXA2 Ser25-ös oldallánca sejten belüli foszforilációjának további vizsgálatához PKC α csendesített endotél sejteket használtunk. Az endotél sejteket nem specifikus siRNS-el (nonsiRNS) és PKC α -ra specifikus siRNS-el csendesítettük. A csendesítés sikerességét Western blot kísérlettel PKC α és aktin specifikus antitest felhasználásával vizsgáltuk (17.ábra). A PKC α csendesített mintákban PKC α jelet nem detektáltuk, amely a csendesítés sikerességét mutatja (17.ábra). A PKC α csendesített mintákban az ANXA2 mennyiségében nem tapasztaltunk változást, azonban a foszfo-Ser25 ANXA2 a csendesített (siPKC α) mintákban nem adott jelet, amely igazolja a PKC szerepét az oldallánc foszforilációjában az endotél sejtekben. A PKC aktiválásához PMA, míg gátlásához Gö6983 kezelést alkalmaztunk [135, 136]. A PKC α csendesített endotél sejtekben a PMA kezelést követően nem volt kimutatható az ANXA2 foszforilációja a Ser25-ös oldalláncon, hasonlóan a PMA kezelés nélküli PKC α csendesített mintához, azonban a nonsiRNS-el transzfektált, valamint a kontroll sejtekben a Western blot a foszforilációt igazoló intenzív jelet mutatott. A kontroll, a nonsiRNS és az siPKC α

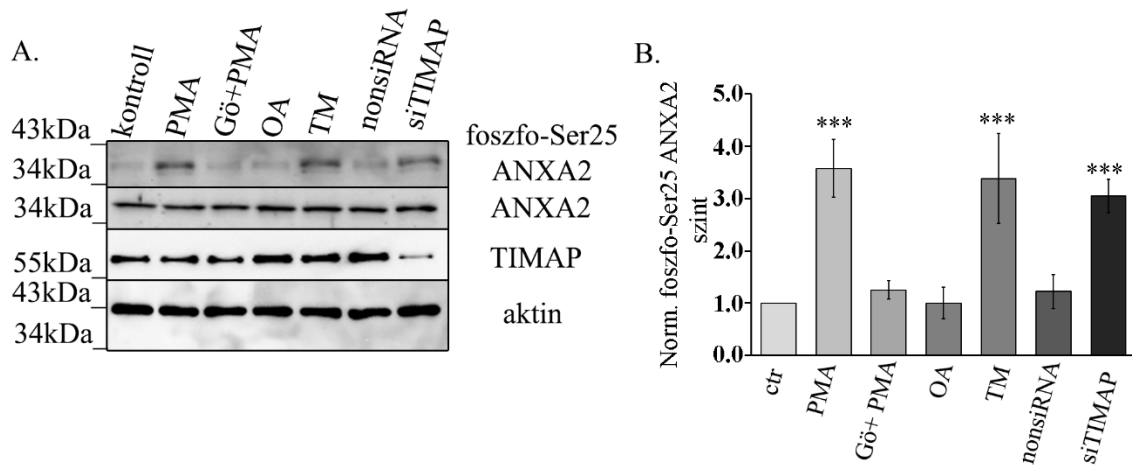
csendesített sejtekben a PKC inhibitorával (Gö6983) történt előkezelés után a PMA nem indukált detektálható foszforilációt az ANXA2 Ser25 oldalláncán (17.ábra). Ezek az eredmények tovább bizonyítják, hogy az ANXA2 Ser25-ös oldalláncának foszforilációjáért a PKC α enzim felelős az endotél sejtekben.



17.ábra. A PKC α csendesítés hatása az ANXA2 fehérje foszforilációjára endotél sejtekben. Kontroll, nonsiRNS-el és PKC specifikus siRNS-el transzfektált HPAEC sejteken Gö6983(1 μ M, 30 perc) előkezelés után PMA (1 μ M, 30 perc) kezelést végeztünk. A totál sejtizátumokat PKC α , aktin, ANXA2 és foszfo-Ser25 ANXA2 specifikus antitestek felhasználásával Western blot kísérletben vizsgáltuk.

A TIMAP-PP1c komplex ANXA2-vel való kölcsönhatása felveti azt a kérdést, hogy a TIMAP-PP1c komplex részt vesz-e az ANXA2 Ser25 oldalláncának defoszforilációjában. Ezért összehasonlítottuk a foszfo-Ser25 ANXA2 szintjének változását HPAEC sejtekben PKC aktivátor és inhibitor, valamint foszfatáz inhibitorokkal való kezeléseket követően (18.ábra). A fentebb leírt eredményeinkhez hasonlóan a PMA kezelés hatására a foszfo-Ser25 ANXA2 szintje szignifikánsan megnőtt a kontroll sejtekhez képest, amit a PKC inhibitorral történt előkezelés megakadályozott. A defoszforilációban szerepet játszó foszfatázok vizsgálatához az endotél sejtekben a PP1 aktivitását tautomicitinnel, míg a PP2A-t okadánsavas kezeléssel gátoltuk. A tautomicitinnel történő kezelés szignifikánsan megemelte, míg az okadánsavas kezelés nem befolyásolta a foszfo-Ser25 ANXA2 mennyiségét. Ebből arra a következtetésre jutottunk, hogy a PP1 valóban szerepet játszhat a Ser25-ös oldallánc defoszforilációjában. A TIMAP fehérjének, mint a PP1c regulátor alegységének csendesítése szignifikánsan megemelte a foszfo-Ser25 ANXA2 mennyiségét, hasonlóan a PP1 tautomicitinnel

történő gátlásához, megerősítve azt a feltételezésünket, hogy az ANXA2 Ser25-ös oldalláncának defoszforilációjában a TIMAP-PP1c komplex vesz részt (18.ábra).

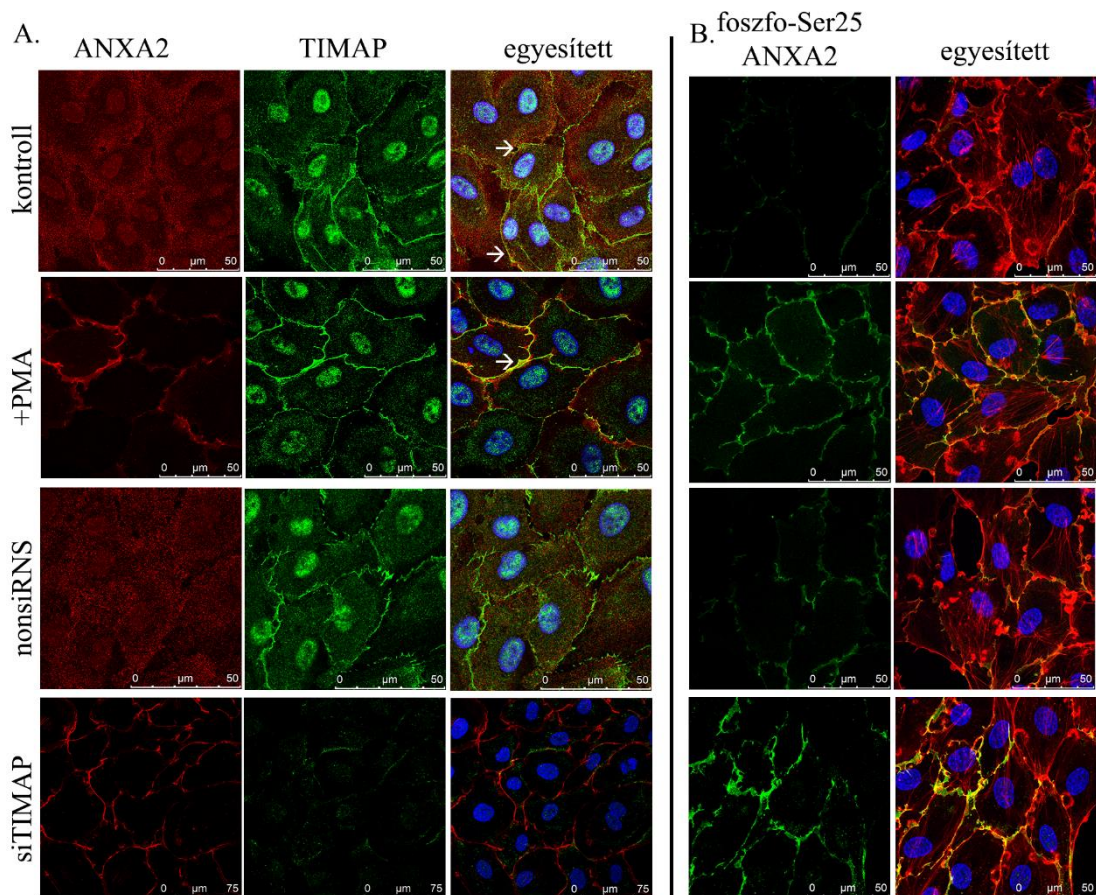


18.ábra. A foszfatáz gátló és PKC aktiváló kezelések hatása az ANXA2 Ser25-ös oldalláncának foszforilációs szintjére. A) HPAEC sejtekben a PKC enzimet PMA kezeléssel aktiváltuk, kontrollként a PMA (1 μ M, 30 perc) hozzáadása előtt Gö6983 (1 μ M, 30perc) előkezelést alkalmaztunk. A PP2A foszfatáz gátlásához okadánsavas (OA; 0,5nM, 30perc), míg a PP1 foszfatáz gátlásához tautomicetin (TM; 1 μ M, 30 perc) kezelést végeztünk. A TIMAP fehérje mennyiségét TIMAP specifikus siRNS-el történő transzfektálással csökkentettük, melyhez kontrollként nonsiRNS-el történő transzfektálást is végeztünk. A sejtlizátumokat Western blot kísérletben ANXA2, foszfo-Ser25 ANXA2, TIMAP, valamint aktin specifikus antitestekkel vizsgáltuk. B) A foszfo-Ser25 ANXA2 sávok intenzitását denzitometrállal határoztunk meg. A foszfo-Ser25 ANXA2 mennyiségét az ANXA2 fehérje mennyiségére normalizáltuk. A szignifikancia szinteket *-al jelöltük. ***: $p < 0,001$

Az ANXA2 fehérje a foszforiláció hatására a sejtmembránba transzportálódik

Az endogén ANXA2 sejten belüli lokalizációjának vizsgálatához endotél sejteken immunfluoreszcens festést végeztünk ANXA2 és TIMAP specifikus antitestek használatával (19.ábra). A TIMAP fehérje főleg a sejt membránjában és a sejtmagban mutatott erőteljes festődést, illetve halványabban a sejtek citoplazmájában. Az ANXA2 fehérje a sejtmembránban, a citoplazmában, valamint a sejtmagban is megjelent, mely megegyezik más sejt típusokban leírt irodalmi adatokkal [97, 98]. A TIMAP és ANXA2 együttes előfordulását a sejtek membránjában tudtuk detektálni, amelyet az ábrán fehér nyíllal jelöltünk az egyesített képeken (19.A.ábra). A PMA kezelés hatására, a TIMAP fehérjéhez hasonlóan, az ANXA2 a sejtmembránban dúsult fel. Megvizsgáltuk az ANXA2 lokalizációját TIMAP csendesített endotél sejtekben is. A TIMAP specifikus

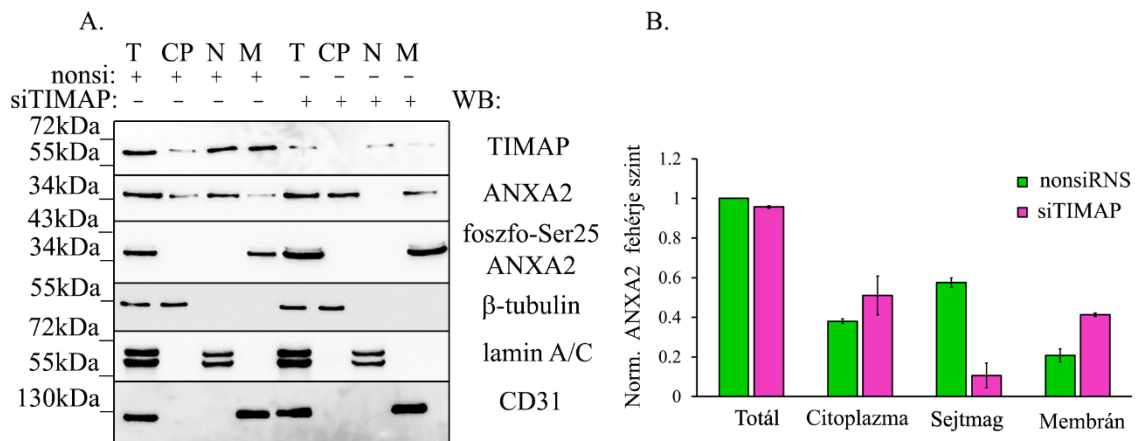
siRNS-el történő transzfektálást követően ugyanolyan festődést tapasztaltunk az ANXA2 esetében, mint a PMA kezelést követő PKC aktiváció hatására. Az a tény, hogy a PKC aktiválás és a TIMAP csendesítés egyaránt az ANXA2 membránban való dúsulását váltotta ki arra utal, hogy az ANXA2 lokalizációja foszforiláció függően változik. A foszfo-Ser25 ANXA2 specifikus antitest és a TIMAP specifikus antitest is nyúlban termelt IgG izotípusú, így nem teszi lehetővé együttes használatukat, ezért külön immunfluoreszcens kísérletben vizsgáltuk a foszfo-Ser25 ANXA2 lokalizációját (19.B.ábra). A foszfo-Ser25 ANXA2 specifikus antitesttel történő immunfluoreszcens festés során a nonsiRNS-el transzfektált és kontroll sejtekben gyenge festődést tapasztaltunk, amely a PMA kezelés, valamint a TIMAP csendesítés hatására jelentősen erősödött a sejtek membránjában, mely közvetetten tovább bizonyítja a TIMAP szerepét az ANXA2 Ser25-ös oldalláncának defoszforilációjában.



19.ábra. Az ANXA2, foszfo-Ser25 ANXA2 és TIMAP fehérjék lokalizációjának vizsgálata endotél sejtekben. *Kontroll, PMA (1 μ M, 30 perc) kezelt, nonsiRNS-el, valamint TIMAP specifikus siRNS-el transzfektált HPAEC sejteken immunfluoreszcens festést végeztünk el. A) Az ANXA2 (piros) és a TIMAP (zöld) fehérjék jelöléséhez specifikus elsődleges antitesteket alkalmaztunk. A sejtmagot DAPI festéssel tettük láthatóvá. A fehér nyilak a membránban való dúsulást mutatják. B) A foszforilált ANXA2*

fehérjét (zöld) foszfo-Ser25 ANXA2 specifikus elsődleges antitesttel jelöltük, az aktin filamentumot Texas-Red Phalloidinnel (piros) tettük láthatóvá.

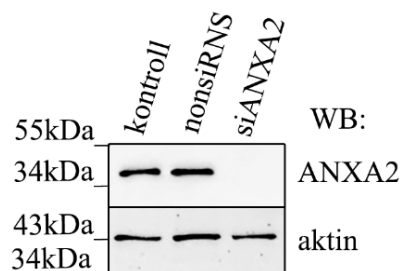
Az ANXA2 sejten belüli lokalizációjának további vizsgálatához nonsi- és TIMAP specifikus siRNS-el transzfektált sejtek sejtfractionálását végeztük el (20.ábra). A fehérjék lokalizációját az egyes frakciókban ANXA2, foszfo-Ser25 ANXA2 és TIMAP specifikus antitesttel Western blot kísérlettel vizsgáltuk. A sejtfractionálás ellenőrzésére citoplazma markerként β -tubulin, sejtmagi markerként lamin A/C, míg membrán markerként CD31 specifikus antitestet használtunk. A kontroll nonsiRNS-el transzfektált sejtekben az immunfluoreszcens festés során tapasztaltakhoz hasonlóan a foszfo-Ser25 ANXA2 membránban való lokalizációt mutattunk ki, ugyanis a Western blot során a totál és membrán frakciókban tudtuk detektálni a foszfo-Ser25 ANXA2-t. A TIMAP fehérje főként a sejtmagi és membrán frakciókban adott intenzívebb jelet, még az ANXA2 fehérje a sejtmagi frakcióban, azonban mind a két fehérje a festéshez hasonlóan a többi frakcióban is jelen volt. A TIMAP csendesítés hatására az ANXA2 a sejtmagi frakcióban nem adott jelet, míg a foszfo-Ser25 ANXA2 mennyisége mind a totál, mind sejtmembrán frakcióban jelentősen megnőtt csendesítés hatására a kontrollhoz képest (20.A.ábra). Eredményeink tehát azt mutatják, hogy a TIMAP csendesítés hatására növekszik az ANXA2 Ser25-ös oldalláncának foszforilációs szintje, valamint az ANXA2 fehérje lokalizációja is változik, ugyanis a TIMAP depletált sejtekben az ANXA2 sejtmagban mérhető szintje csökkent, a membránban való lokalizációja viszont fokozódott (20.B.ábra). Mindezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy az ANXA2 defoszforilációjában a TIMAP-PP1c komplex fontos szerepet játszik, valamint az ANXA2 foszforilációja a fehérje sejten belüli lokalizációját szabályozza.



20.ábra. Az ANXA2 lokalizációjának változás TIMAP depléció hatására. A) NonsiRNS-el és TIMAP specifikus siRNS-el transzfektált endotél sejtekből végeztük el a sejtfractionálást. A totál (T), citoplazma (CP), sejtmagi (N) és membrán frakciókat (M) Western blot kísérletben TIMAP, ANXA2 és foszfo-Ser-25 ANXA2 specifikus antitestek felhasználásával vizsgáltuk. Az egyes frakciók tisztaságának ellenőrzésére membrán markerként CD31 specifikus antitestet, citoplazma markerként β -tubulin és sejtmagi markerként lamin A/C specifikus antitesteket használtunk a Western blot során. B) A különböző sejtfrakciókban az ANXA2 szintjét a Western blottok denzitometráálásával elemeztük. Az ANXA2 sávokat a megfelelő sejtfrakciós marker sávokra normalizáltuk.

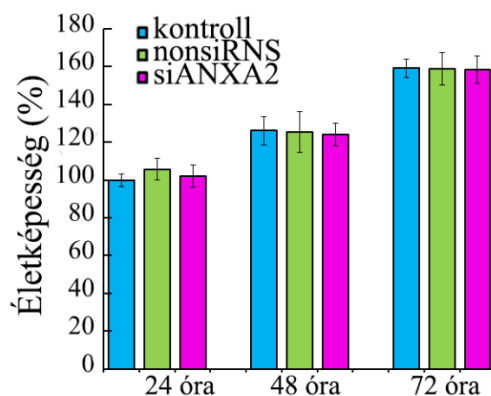
ANXA2 szerepet játszik a sejtek migrációjában és az endotél sejtek barrier funkciójának fenntartásában

Az ANXA2 endotél sejtekben betöltött élettani funkciójának tanulmányozásához a fehérjét siRNS-sel depletáltuk. Az ANXA2 specifikus siRNS-el 48 órás inkubáció után nagy hatékonysággal sikerült csendesíteni a fehérjét endotél sejtekben, miközben a nonsiRNS-el történő transzfektálás nem befolyásolta a fehérje mennyiségét (21.ábra).



21.ábra. ANXA2 csendesítése endotél sejtekben. HPAEC sejteket nonsiRNS-el és ANXA2 specifikus siRNS-el transzfektáltunk. A kontroll és transzfektált sejteket Western blot kísérletben vizsgáltuk ANXA2 és aktin specifikus antitestek felhasználásával.

Ellenőriztük az ANXA2 csendesítés hatását a sejtek életképességére. Endotél sejtek ANXA2 specifikus siRNS-el, valamint kontrollként nonsiRNS-el történő transzfektálása után 24, 48, valamint 72 órával MTT assay-t végeztünk. A csendesítés hatására szignifikáns változást nem tapasztaltunk a sejtek életképességében a kontroll sejtekhez képest (22.ábra).



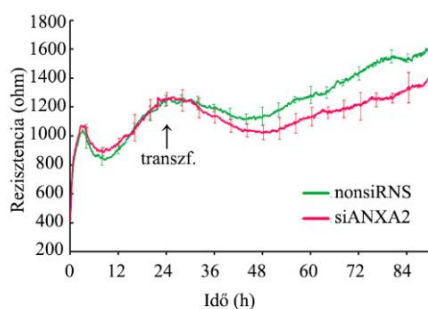
22.ábra. ANXA2 csendesítés hatása a sejtek életképességére. A kontroll, valamint a nonsiRNS-el és ANXA2 specifikus siRNS-el transzfektált HPAEC sejtek életképességét MTT assay-vel vizsgáltuk a transzfekciót követő 24óra, 48óra és 72óra elteltével. A sejtek életképességét százalékos arányban adtuk meg a 24órás kontroll sejtekhez viszonyítva.

A TIMAP és az ANXA2 kolokalizációja és a foszfo-Ser25 ANXA2 jelenléte a sejtmembránban, valamint TIMAP csendesítés hatására az ANXA2 membránban való feldúsulása mind arra utal, hogy az ANXA2 szerepet játszhat az endotél sejtek barrier funkciójában. Ezért ECIS (Electric Cell-substrate Impedance Sensing) méréssel összehasonlítottuk a kontroll és az ANXA2 csendesített endotél sejtek barrier funkcióját (23.ábra). Az ECIS egy valós idejű, elektromos impedancia alapú mérés, amely lehetővé teszi *in vitro* körülmények között az élő sejtek barrier funkciójának tanulmányozását. A sejtmembrán szigetelő tulajdonságának köszönhetően a sejtek ellenállást hoznak létre az elektromos árammal szemben, így a mért rezisztencia értékekben bekövetkezett változásokból a barrier változásáról kapunk információt. A kezelések hatására csökkenő rezisztencia érték a barrier funkció gyengülésére, míg a növekedése a barrier funkciók erősödésére utal [137]. A sejteket elektródát tartalmazó tenyésztő edényben (ECIS plate) ANXA2 specifikus siRNS-el, valamint kontrollként nonsiRNS-el transzfektáltuk, majd mértük 84 órán át mértük a rezisztencia értékeket. A csendesítés hatására (rózsaszín

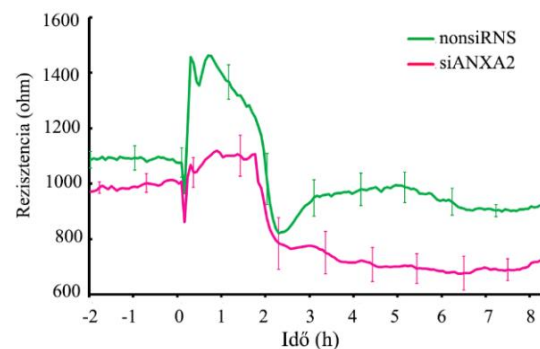
vonallal) alacsonyabb rezisztencia értékeket mértünk a kontrollhoz (zöld vonal) képest, amely a barrier funkció gyengülésére utal (23.A.ábra).

ECIS méréssel megvizsgáltuk a PMA kezelés hatását ANXA2 csendesített sejtek barrier funkciójára (23.B.ábra). A nonsiRNS-el transzfektált sejtek (zöld vonal) a PMA hozzáadása után először a rezisztencia jelentős növekedésével reagáltak, amely 2-3 óra elteltével a kezdeti rezisztencia szint alá esett, majd fokozatosan visszaállt a normál kb. 1000 Ohm értékre. Ezzel szemben az ANXA2 depletált sejtek esetében (rózsaszín vonal) a PMA hozzáadásakor a rezisztencia szignifikánsan mérsékeltebb növekedését tapasztaltunk és 2-3 órával később a sejtek ellenállása a kiindulási szint alá csökkent és sokkal alacsonyabb maradt, mint a kontroll (zöld vonal) sejtek ellenállása (23.B.ábra). Ezek az eredmények azt igazolják, hogy az ANXA2 fehérje szerepet játszik az endotél sejtek gát funkciójának fenntartásában.

A.



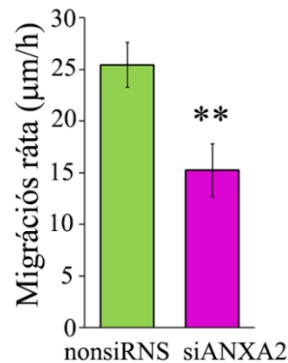
B.



23.ábra. ANXA2 hatása endotél sejtek barrier funkciójára. A) HPAEC sejteket 8W10E ECIS edényekben tenyésztettük, majd nonsiRNS-el és ANXA2 specifikus siRNS-el végeztünk transzfektálást (fekete nyíllal jelölt transzf.). A rezisztencia értékeket az idő függvényében követtük. B) nonsiRNS-el és ANXA2 specifikus siRNS-el transzfektált HPAEC sejtek rezisztencia értékeit követtük ECIS méréssel. Az ábrán jelölt 0 időpontban PMA ($1\mu\text{M}$, 30 perc) kezelést végeztünk, és követtük tovább a rezisztencia értékeket. Az ábrán három-három független kísérletből származó mérés szórása és átlaga látható. ($n=3$)

Megvizsgáltuk a kontroll és az ANXA2 csendesített sejtek migrációs sebességét *in vitro* sebgyógyulási kísérletben, amelyet szintén ECIS méréssel végeztünk el (24.ábra). A sejt migráció vizsgálatához ECIS tenyésztő edényben endotél sejtek nonsiRNS-el és ANXA2 specifikus siRNS-el történő transzfektálás után váltakozó árammal az elektródok felületén a konfluens réteget kiegészítettük. A sebzés után követtük a rezisztencia érték változását a sebzés begyógyulásáig, majd meghatároztuk a sejt migrációs sebességét

(24.ábra). Az ANXA2 csendesített sejtek szignifikánsan alacsonyabb sejtmigrációs sebességet mutattak a kontroll sejtekhez képest, amely arra utal, hogy az ANXA2 fehérje nemcsak az endotél sejtek barrier funkciójának fenntartásában, hanem a sejtek migrációjában is fontos szerepet játszik.

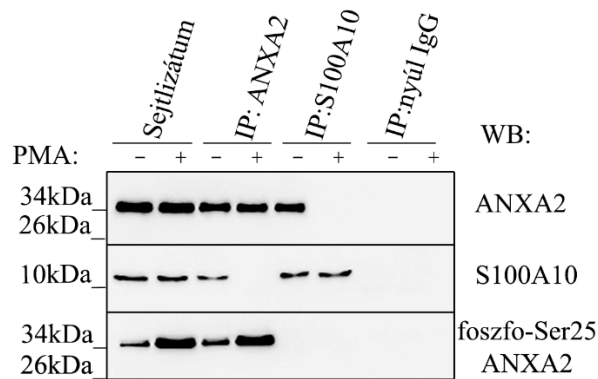


24.ábra. ANXA2 csendesített sejtek sebgyógyulási vizsgálata. A sejtmigráció vizsgálatához nonsiRNS-el, valamint ANXA2 specifikus siRNS-el transzfektált HPAEC sejteket használtunk az ECIS mérés során. A konfluencia szint elérését követően 30 másodpercig 5 mA erősségű 60 kHz frekvenciájú árammal az elektródok meghatározott területén kiégettük a sejteket és követtük az impedancia értékek változását a sebzés begyógyulásáig, majd meghatároztuk a sejtmigráció sebességét. Az ábra három reprezentatív mérés eredményét mutatja. (n=3) A szignifikancia szinteket *-al jelöltük. $p < 0.01$ (**).

A foszforilált ANXA2 és az S100A10 fehérje kölcsönhatásának vizsgálata

Az ANXA2 fehérje legismertebb kölcsönható partnerei az S100A fehérjecsald tagjai, amelyekkel úgynevezett heterotetramer komplexeket hoz létre. A klasszikus ANXA2 kötő S100 fehérje az S100A10, komplexük szerepet játszik a sejt-sejt kölcsönhatásokban és a sejt adhéziós folyamatokban [98]. Immunprecipitációs kísérlettel megvizsgáltuk endotél sejtekben az S100A10 és ANXA2 fehérjék kölcsönhatását (25.ábra). Az ANXA2 specifikus antitesttel immunprecipitált mintában az S100A10 fehérje jelenlétét a vártnak megfelelően kimutattuk és fordítva, az S100A10 specifikus antitesttel immunprecipitált mintában pedig az ANXA2-t (25.ábra). Megvizsgáltuk, hogy az ANXA2 Ser25-ös oldalláncának foszforilációja milyen hatással van az S100A10 fehérjével való kölcsönhatásra. PMA kezelt endotél sejtekből készült immunprecipitált mintákban az endogén ANXA2 és S100A10 között nem volt kimutatható kölcsönhatás. A PMA-val nem kezelt sejtek esetében az S100A10 antitesttel immunprecipitált mintában a foszfo-Ser25 ANXA2 jelenléte sem volt detektálható (25.ábra). Mivel a kontroll sejtekben az

ANXA2 és S100A10 kölcsönhatását mindkét oldalról kimutattuk, viszont PMA kezelés után már nem volt detektálható a kölcsönhatás, ezért arra a következtetésre jutottunk, hogy az ANXA2 Ser25-ös oldalláncán történő foszforiláció hatására megszűnik az S100A10 fehérjével való kölcsönhatása.



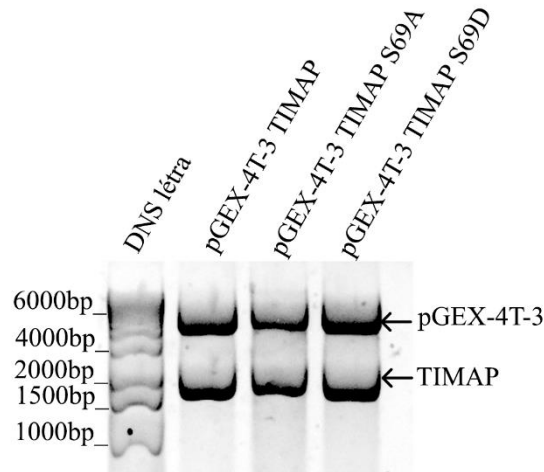
25.ábra. ANXA2 és S100A10 kölcsönhatása PKC foszforiláció hatására. *Kontroll és PMA (1µM, 30 perc) kezelt HPAEC sejtekből ANXA2 és S100A10 specifikus antitestek felhasználásával immunprecipitációt végeztünk. Az IP komplexeket ANXA2, S100A10 és foszfo-Ser25 ANXA2 specifikus antitestek felhasználásával Western blot kísérletben vizsgáltuk.*

7.2. A TIMAP Ser69-es oldallánc foszforilációjának tanulmányozása

A rekombináns Ser69Asp és Ser69Ala TIMAP mutáns fehérjék létrehozása

Néhány tanulmány a TIMAP Ser69-es oldalláncot potenciális foszforilációs helyként írja le [138, 139]. Ez az oldallánc a PP1c-kötő motívum és az NLS közelében található, ezért feltételeztük, hogy reverzibilis foszforilációja szabályozhatja a TIMAP és a PP1c közötti kölcsönhatást, és/vagy befolyásolhatja a TIMAP sejten belüli lokalizációját. A fehérje foszforilációjának vizsgálatához, létrehoztunk egy, a Ser69 oldallánc foszforilációját utánzó és egy foszfonull mutáns TIMAP fehérjét. A foszforilációt utánzó mutánshoz a 69. helyen lévő szerin aszparaginsavra cseréltük, amely egy negatív töltésű oldallánc, míg a foszfonull esetében alaninra módosítottuk, amely az apoláris aminosavak csoportjába tartozik. A szerin-aszparaginsavra vagy alaninra történő cseréje lehetővé teszi az adott fehérje reverzibilis foszforilációjával járó sejtszintű változások vizsgálatát [140]. Az aminosav csere érdekében olyan specifikus primereket terveztünk, amelyek az adott helyen tartalmazták az aminosavcsereinek megfelelő kodont, ezen kívül az 5' végükön

egy foszfát csoportot is. A „back-to-back” PCR során a már meglévő pGEX-4T-3-TIMAP templatot használtuk, illetve különböző hőmérsékleti profilokat is kipróbáltunk, hogy a lehető legkedvezőbb kitermelést érjük el (3.táblázat).

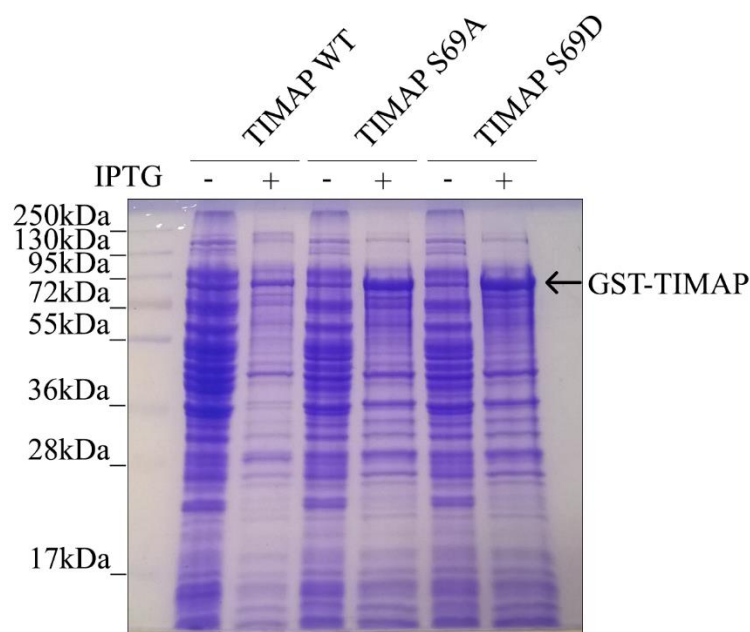


26.ábra. S69A és S69D aminosavcserét kódoló TIMAP mutáns plazmidok létrehozása. A rekombináns plazmidokat JM109 *E.coli* kompetens sejtekbe transzformáltuk, majd plazmid DNS-t izoláltunk. A rekombináns DNS-t BamHI és XhoI restrikciós enzimekkel emésztettük, majd 1%-os agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük.

A pGEX-4T-3 vektor 4900bp méretű, míg a TIMAP szekvenciák 1700bp, ezért kb. 6600bp-méretnél vártuk a mutáns rekombináns DNS-eket. A TIMAP S69D és S69A mutánsok esetében a várt egyetlen sávtól eltérően több aspecifikus sávot is detektáltunk agaróz gélelektroforézis után. Ezeket az aspecifikus sávokat a szekvencia G-C gazdagságával magyarázhatjuk, valamint, hogy a primerek esetlegesen több helyre is képesek voltak bekötődni. Az aspecifikus sávok csökkentése érdekében próbálkoztunk több hőmérsékleti profillal, DMSO hozzáadásával, illetve specifikus puffer alkalmazásával a PCR reakció során. A reakció végeredményeképpen kapott lináris plazmidokat ligálással gyűrűvé zártuk, JM109 *E.coli* sejtekbe transzformáltuk, majd restrikciós emésztést hajtottunk végre BamHI és XhoI enzimekkel (26.ábra). Kontrollként a pGEX-4T-3 TIMAP plazmidot használtuk fel. Az emésztés eredményeképpen az agaróz gélen megjelenő 5000bp körül sáv a pGEX-4T-3 vektor, míg az 1700bp méretű sáv pedig megfelel a TIMAP kódoló szekvenciájának. Annak ellenőrzésére, hogy valóban sikerült a mutánsok létrehozása, a DNS mintákat szekvenáltattuk. A kapott eredmények azt mutatták, hogy a tervezett nukleotid cserét sikeresen létrehoztuk, melynek köszönhetően a foszforilációt utánzó S69D esetében a 69-

es pozícióban lévő szerin aszparaginsavra, míg a foszfonull S69A esetében alaninra módosul a fehérje expressziója során.

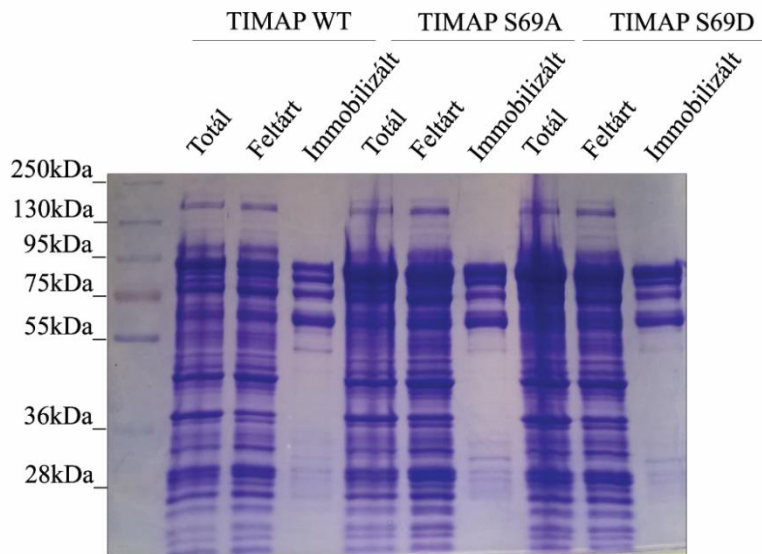
A GST fúzionált fehérjék termeltetéséhez a pGEX-4T-3 vad típusú és mutáns (S69A, S69D) TIMAP plazmidokat *E.coli* BL21(DE3) baktérium sejtekbe transzformáltuk, majd a rekombináns fehérjék expresszióját 0,5mM-os IPTG hozzáadásával indukáltuk, majd ezt követően 25°C-on 3 órán át tovább tenyésztettük a baktérium kultúrát. A TIMAP fehérje 64 kDa molekulatömegű, míg a GST 26 kDa, így a termeltetett fehérje várt mérete 90 kDa. Az indukálatlan mintához képest az IPTG hozzáadása után a rekombináns fehérje a várt méretnél jelent meg, a mely a fehérje termeltetés sikerességét mutatja (27.ábra).



27.ábra. A GST-fúziós vad típusú és mutáns TIMAP fehérjék termeltetése BL21(DE3) *E. coli* sejtekben. A fehérje termeltetéshez a rekombináns plazmidokat BL21(DE3) *E.coli* sejtekbe transzformáltuk, majd a TIMAP WT, valamint a két mutáns fehérje (TIMAP S69A, TIMAP S69D) expresszióját 0,5 mM-os IPTG-vel indukáltuk (+), kontrollként mintát vettünk az IPTG hozzáadása előtt (-) is. A fehérje termeltetés hatékonyságát SDS-PAGE elválasztás után Coomassie Brilliant Blue festéssel ellenőriztük.

A rekombináns fehérjéket Glutathione Sepharose 4B gyantán tisztítottuk (28.ábra). A GST-TIMAP WT, -S69A, valamint -S69D fehérjék tisztítása során nyert totál, feltárt és immobilizált mintákat SDS-PAGE segítségével ellenőriztük. A TIMAP mutáns fehérjék tisztításának sikerességét az immobilizált mintákban a várt 90 kDa-os méretben megjelenő sávok mutatják (28.ábra). A tisztított mintákban a kisebb méretű sávok

megjelenését az magyarázza, hogy a TIMAP C-terminális része rendezetlen régiókat tartalmaz, ami jelentős mértékben degradálódik.

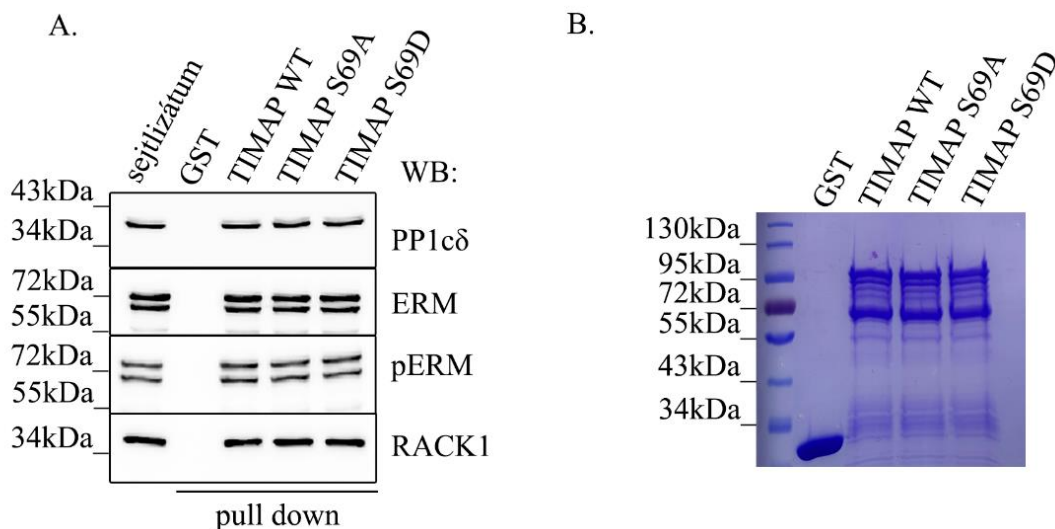


28.ábra. Rekombináns TIMAP WT, S69A, S69D fehérjék tisztítása. A fehérjék tisztításának ellenőrzésére mintát vettünk a szonikálást követő totál lizátumból (totál) és a centrifugálás utáni felülúszóból (feltárt). A Glutathione Sepharose 4B gyantán kötött fehérjéket mintapufferben való főzés után vizsgáltuk. A kapott mintákat SDS-poliakrilamid gélen választottuk el, majd Coomassie Brilliant Blue festéssel tettük láthatóvá.

A TIMAP Ser69 oldalláncának foszforiláltsága nem befolyásolja a PP1c, RACK1 és ERM fehérjékkel való kölcsönhatását

A Ser69-es oldallánc az 1. ankyrin ismétlődésen található és a PP1c-kötő motívum közelében helyezkedik el, ezért felmerülhet, hogy a Ser69 foszforilációs helyzete befolyásolhatja a PP1c regulátor alegység kötődését. Ezért pull-down kísérlettel vizsgáltuk a vad típusú és foszfomutáns rekombináns TIMAP fehérjék PP1c δ -val való kölcsönhatását (29.ábra). A kölcsönhatás vizsgálatához egyforma mennyiségű tisztított rekombináns fehérjét használtunk, amelyet a festett SDS-poliakrilamid gél szemléltet (29.B.ábra). Mind a mutáns, mind a vad típusú TIMAP fehérjék esetében kimutattuk a kölcsönhatást a PP1c δ -val, szignifikáns különbséget nem tapasztaltunk a kölcsönhatásokban (29.A.ábra). Korábban az ERM fehérjéket a TIMAP-PP1c komplex szubsztrátjaként azonosították, valamint kimutatták, hogy a TIMAP fehérjén történő Ser331/333/337-es oldalláncok foszforilációja szabályozza a foszfatáz aktivitását a foszfo-ERM fehérjék irányába [84, 89]. Következő lépésben megvizsgáltuk, hogy a

TIMAP Ser69-es oldallánc foszforilációja, az előzőekhez hasonlóan, hatással van-e a foszfo-ERM fehérjék defoszforilációjára a PP1c aktivitásának szabályozásával. A pull-down kísérletünk során a vad típusú TIMAP fehérjék mellett a Ser69-mutáns TIMAP fehérjék ERM és a foszfo-ERM fehérjékkel való kölcsönhatását kimutattuk, azonban szignifikáns különbségeket nem tapasztaltunk a kölcsönhatásokban (29.A.ábra). Ez alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a TIMAP Ser69-es oldalláncának foszforilációja nem befolyásolja a TIMAP-PP1c komplex aktivitását az ERM fehérjék irányában. A RACK1 fehérjét szintén a TIMAP kölcsönható partnereként azonosították, amely kapcsolódási felületet biztosít a TIMAP és a farnezil-transzferáz enzim számára, és ezáltal szerepet játszik a TIMAP membránban való megjelenésében. TIMAP mutánsok és a RACK1 közötti kölcsönhatások szintén azonos kötődést mutattak, ami arra utal, hogy a TIMAP Ser69 mutánsok is prenilálódhatnak. A kontrollként használt GST fehérjék esetében a várakozásnak megfelelően, kölcsönhatást nem detektáltunk (29.A.ábra). A pull-down kísérleteinkkel tehát kimutattuk, hogy a TIMAP Ser69-es oldallánc foszforilációja nincs hatással a PP1cδ-val és RACK1 fehérjével való kölcsönhatásra és nem befolyásolja a foszfatáz aktivitását a korábban azonosított szubsztrátok irányába.

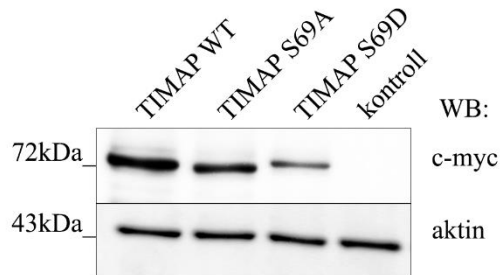


29.ábra. A vad típusú (WT) és mutáns TIMAP fehérjék kölcsönhatásának vizsgálata ismert TIMAP kölcsönható partnerekkel. A) A *Glutathione Sepharose 4B* gyantán immobilizált GST, GST-TIMAP WT, TIMAP S69A és TIMAP S69D rekombináns fehérjékhez szonikálással feltárt BPAEC sejtlyázátumotadtunk. A 16 órás 4°C-on történő inkubálás és mosási lépések után 2x SDS mintapufferrel való főzéssel eluáltuk a gyantáról a mintákat. A TIMAP mutánsok és PP1cδ, ERM, pERM valamint RACK1 fehérjékkel való kölcsönhatást Western blot analízissel vizsgáltuk. A pull-down során negatív kontrollként GST-t használtunk, míg a Western blot során pozitív kontrollként BPAEC sejtlyázátumot.

B) A pull-down minták tisztaságának és mennyiségének ellenőrzéséhez SDS-PAGE-t követő Coomassie Brilliant Blue festést alkalmaztunk.

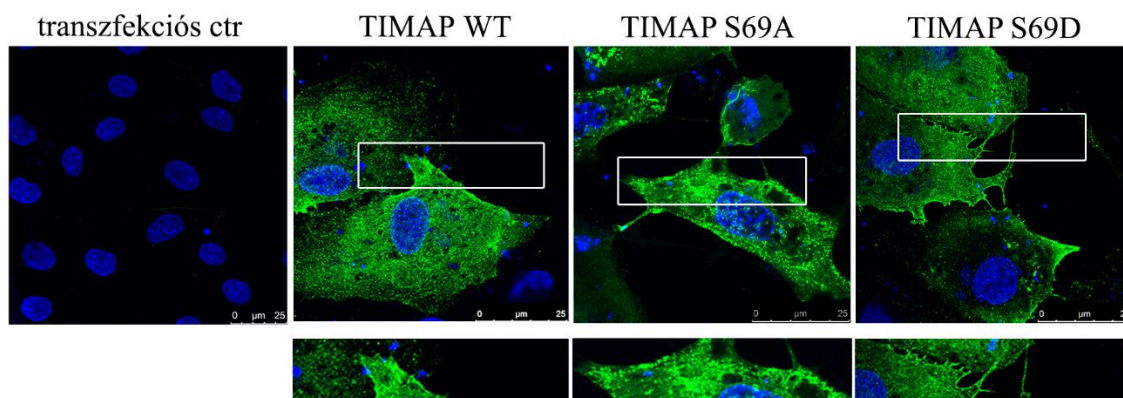
A TIMAP S69D mutációja a sejtmembránba irányítja a fehérjét

A mutánsok endotél sejteken belüli lokalizációjának vizsgálatához emlős expresszióra alkalmas pCMV-myc plazmidba szubklónoztuk a TIMAP mutánsokat kódoló szekvenciákat. Az endotél sejtek rekombináns vektorokkal történő transzfektálását követően, 24 óra elteltével a sejteket feltártuk és a fehérjék overexpresszióját Western blottal c-myc specifikus antitesttel vizsgáltuk (30.ábra). Belső fehérje kontrollként az aktint alkalmaztuk. A c-myc specifikus antitest felhasználásával mind a 3 fehérje sikeres overexpresszióját mutattuk ki. A kontroll, nem transzfektált sejtek esetében a vártnak megfelelően, c-myc jelet nem detektáltunk (30.ábra).



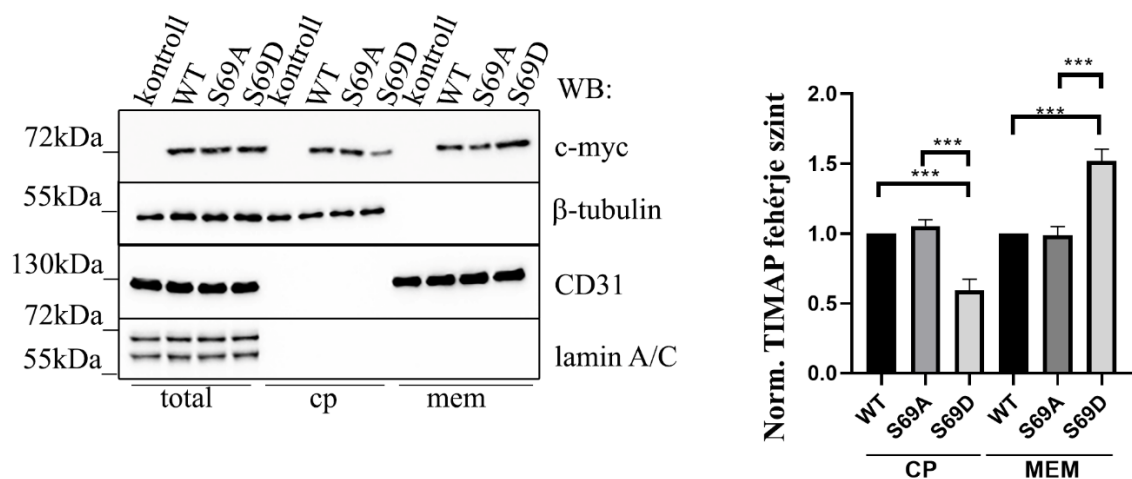
30.ábra. A TIMAP mutánsok expressziója endotél sejtekben. A TIMAP mutánsokat kódoló DNS szakaszokat pCMV-myc plazmidba szubklónoztuk, majd a rekombináns vektorokat BPAEC sejtekbe transzfektáltuk. A nem transzfektált (kontroll) és transzfektált sejteket 24 óra elteltével feltártuk és a fehérjék overexpresszióját Western blottal c-myc és aktin specifikus antitesttel vizsgáltuk.

A mutáns TIMAP fehérjék endotél sejtekben való lokalizációjának vizsgálatához transzfektálást követően immunfluoreszcens festést végeztünk (31.ábra). A fehérjék lokalizációját c-myc specifikus elsődleges antitesttel, majd erre specifikus Alexa 488-al konjugált másodlagos antitesttel mutattuk ki. A sikeresen transzfektált sejtek a mikroszkópos felvételeken zöld színnel jelentek meg. A transzfekciós kontroll esetében a c-myc elleni antitesttel jelet nem kaptunk, ugyanis ebben az esetben a transzfekció során pCMV-myc plazmidot nem alkalmaztunk, csak a transzfekciós reagenst. A foszfonull TIMAP S69A fehérje a vad típusú rekombináns TIMAP fehérjéhez hasonlóan az endotél sejtek citoplazmájában és a sejtmembránban is megjelent. A TIMAP S69D mutánst expresszáló sejtek esetében intenzívebb membrán festődést tapasztaltunk, és számos membrán kitüremkedést figyeltünk meg, a kontrollhoz képest (31.ábra).



31.ábra. A vad típusú (WT) és mutáns (S69A, S69D) TIMAP fehérjék lokalizációjának vizsgálata immunfluoreszcens festéssel. Az immunfluoreszcens festés során paraformaldehiddel fixált sejteken c-myc specifikus elsődleges antitestet, majd Alexa-488 konjugált másodlagos antitestet (zöld szín) használtunk. A sejtmagokat DAPI nukleinsav festékekkel (kék) tettük láthatóvá. Kontrollként (transzfekeció ctr) nem transzfekektált sejteket is festettünk. Skála: 25μm. A felvételek fehér kerettel jelölt részét tovább nagyítottuk. A nagyított ábrán megfigyelhető a membránban való erőteljesebb festődés.

Az immunfluoreszcens festésnél megfigyelt eredményeket sejtfractionálással is megerősítettük (32.ábra). A vad típusú és mutáns TIMAP transzfekektált endotél sejtekből sejtfractionálással citoplazma és membrán frakciót izoláltunk. A kapott totál, citoplazma és membrán frakciókban Western blot kísérlettel c-myc specifikus antitest felhasználásával vizsgáltuk a mutáns fehérjék lokalizációját. A citoplazma tisztaságának ellenőrzése érdekében, citoplazma markerként β -tubulint, a membrán frakció tisztaságának ellenőrzésére membrán markerként CD31 specifikus antitestet alkalmaztunk. A totál sejtlizátum a vad típusú, S69A- és S69D- TIMAP fehérjék sikeres expresszióját mutatja (32.ábra). Az S69A a vad típusú TIMAP fehérjéhez hasonlóan egyforma mértékben volt kimutatható a citoplazmában és a sejtmembránban, míg a TIMAP S69D esetében a fehérje nagyobb mennyiségben volt detektálható a membránban. Az immunfluoreszcens festéssel és a sejtfractionálással kapott eredményeink azt mutatják, hogy a Ser69-es oldalláncon történő foszforiláció hatására a TIMAP fehérje a sejtmembránban feldúsul.



32.ábra A pCMV-myc TIMAP (WT) és mutáns (S69A és S69D) fehérjék sejten belüli lokalizációjának vizsgálata sejtfractionálással. BPAEC sejteket pCMV-myc TIMAP WT, pCMV-myc TIMAP S69A és pCMV-myc TIMAP S69D plazmidokkal transzfektáltunk. A szubcelluláris fractionálást a transzfekció után 24 órával végeztük. A kapott totál, citoplazma (cp) és membrán frakciókat (mem) Western blot kísérlettel vizsgáltuk c-myc specifikus antitest felhasználásával. Citoplazma markerként β -tubulint, membrán markerként CD31 specifikus antitestet alkalmaztunk. A Western blot során kapott jeleket denzitometráltuk. A citoplazma frakcióban detektált c-myc jelet β -tubulinra, a membrán frakcióban kapott c-myc jelet CD31-re normalizáltuk. A mutánsokra kapott értékeket a vad típusú (WT) TIMAP-hoz viszonyítottuk. A szignifikancia szinteket *-al jelöltük. *** : $p < 0,001$

A TIMAP Ser69-es oldallánc foszforilációjában szerepet játszó kináz azonosítása

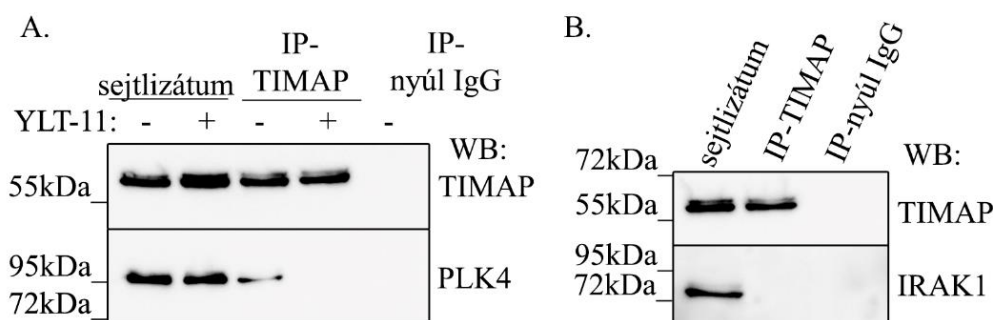
Irodalmi adatok nem állnak rendelkezésre arra vonatkozóan, hogy melyik kináz felelős a TIMAP Ser69-es oldalláncának foszforilációjáért, ezért a GPS 5.0 szoftver segítségével olyan potenciális kinázt kerestünk, mely szerepet játszhat ezen oldallánc foszforilációjában. A protein kinázok szubsztrátjaikat konszenzus szekvenciák / motívumok mentén foszforilálják, ezt kihasználva a predikciós szoftver a fehérje szekvenciájából képes megjósolni a kinázok foszforilációs helyeit. A GPS algoritmus minden találatra számol egy úgy nevezett „score” értéket, mely minél nagyobb, annál valószínűbb a foszforiláció [141, 142]. A szoftverrel történő keresés során a „KKVSFEASVALLEAS” TIMAP régióának a foszforilációjában szerepet játszó kinázt kerestük, ahol a vastaggal jelölt „S”, a potenciális Ser69-es oldalláncot jelöli. A keresés során kapott találati eredményeket a 8. táblázat tartalmazza, melyek közül a legmagasabb „score” értéket a Polo szerű kináz 4-re (PLK4) kaptuk. A NimA kapcsolt kinázra (NEK) kaptuk a második legnagyobb értéket, azonban a NEK-nek nagyon sok formája fordul elő

és a keresés eredménye nem adott specifikus eredményt, így a PLK4 mellett a 3. találati kinázt az interleukin-1 receptor asszociált kinázt (IRAK1) vizsgáltuk.

8.táblázat. A GPS5.0 szoftver segítségével azonosított protein kinázok.

<i>Rövidítés</i>	<i>Név</i>	<i>Score</i>
PLK4	Polo szerű kináz 4	516.61
NEK	NimA kapcsolt kináz	131.59
IRAK1	Interleukin-1 receptor asszociált kináz	91.236
MAPK13	Mitogen aktivált protein kináz 13	45.424
MAPKAPK5	MAPK aktivált protein kináz 5	27.422
PAK4	p21 (RAC1) aktivált kináz 4	19.81
QIK	Qin-indukált kináz	16.473
CAMK4	Kalcium/ kalmodulin függő protein kináz IV	12.037
GRK3	G-fehérje kapcsolt receptor kináz 3	11.744
PIM3	Proto-onkogén szerin/treonin protein kináz Pim-1	5.169
ULK2	unc-51- szerű autofágiát aktiváló kináz 2	4.583
TTBK2	Tau-tubulin kináz 2	4.559
MARK4	mikrotubulus-affinitás reguláló kináz 4	3.82

A lehetséges kinázokkal való kölcsönhatás vizsgálatához a BPAEC sejlizátumból TIMAP specifikus antitest felhasználásával immunprecipitációs kísérletet végeztünk (33.ábra). A kapott immunkomplexeket Western blot kísérlettel vizsgáltuk, TIMAP, IRAK1 és PLK4 specifikus antitestek felhasználásával.



33.ábra. A TIMAP fehérje kölcsönhatásának vizsgálata PLK4 és IRAK1 kinázzal.

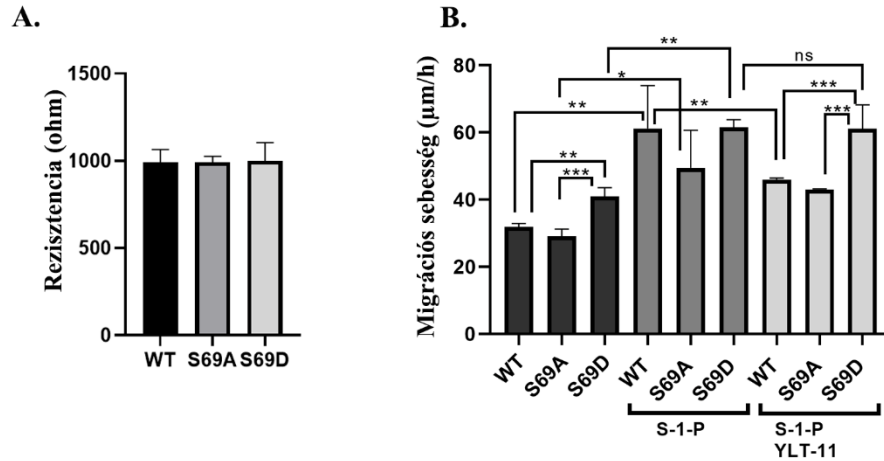
A) TIMAP specifikus antitest felhasználásával kezeletlen, illetve PLK4 specifikus inhibitorral kezelt (YLT-11) BPAEC sejtlizátumból immunprecipitációt végeztünk. A kapott IP komplexet SDS-PAGE segítségével választottuk el, majd a kölcsönhatásokat Western blot kísérlettel TIMAP, PLK4 és B) IRAK1 specifikus antitesttel vizsgáltuk. Kontrollként nyúl szérumot használtunk.

Eredményünk igazolta a TIMAP kölcsönhatását a PLK4 kinázzal (33.A.ábra). A kölcsönhatás további vizsgálatához a kezeletlen endotél sejtek mellett, specifikus PLK4 inhibitorral (YLT-11) kezelt endotél sejteket használtunk fel az immunprecipitációs kísérletben (33.A.ábra). Az inhibitorral kezelt sejtekben a PLK4 és TIMAP kölcsönhatása a kezeletlen sejtekkel ellentétben már nem volt kimutatható. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a PLK4 kináz feltehetően részt vehet a TIMAP Ser69 foszforilációjában. A TIMAP és IRAK1 fehérjék között nem detektáltunk kölcsönhatást az immunprecipitációs kísérlettel (33.B.ábra).

A TIMAP Ser69-es oldallánc foszforilációjának hatása a sejt migrációra

A sejtfractionálási és immunfluoreszcenciás kísérleteink során a TIMAP S69D fehérjét nagy mennyiségben tudtuk kimutatni a sejtmembránban. Így felvetődött a kérdés, hogy ezen oldallánc foszforilációja hatással lehet-e az endotél sejtek barrier funkciójára, amit ECIS méréssel vizsgáltunk meg (34.ábra). A BPAEC sejteket ECIS tenyésztő edényben növesztettük, majd emlős expresszióra alkalmas vad típusú és mutáns TIMAP plazmidokkal transzfektáltuk és mértük a rezisztencia értékeket. A TIMAP különböző foszforilációs formáit utánzó rekombináns fehérjéket overexpresszáló sejtek ellenállásában nem találtunk szignifikáns különbségeket, ami arra utal, hogy a Ser69-es oldalláncon történő foszforiláció nincs hatással az endotél sejtek barrier funkciójára (34.A.ábra).

Korábbi irodalmi adatokból tudjuk, hogy a PLK4 szerepet játszik az oszteokarcinóma és embrionális vese sejtek motilitásában [143, 144]. Mivel kölcsönhatást mutattunk ki a TIMAP és a PLK4 között (33.A.ábra), indokoltnak tartottuk megvizsgálni a PLK4 hatását endotél sejtek migrációjára (34.B.ábra). Az ECIS mérés során vad típusú és mutáns TIMAP fehérjéket expresszáló endotél sejtek konfluens rétegén nagyfeszültségű elektromos árammal pontos és jól meghatározott méretű sebet hoztunk létre. A sebgyógyulás kinetikáját az idő függvényében az ellenállás mérésével határoztuk meg. A TIMAP S69D fehérjét expresszáló endotél sejtek esetében szignifikánsan gyorsabb sejtmigrációt detektáltunk, ezek a sejtek hamarabb nőttek be a sebzett területet a vad típusú, illetve a TIMAP S69A fehérjét expresszáló sejtekhez képest. A kapott eredmény arra utal, hogy a TIMAP Ser69-es oldalláncának foszforilációja fokozza a sejtek migrációs képességét (34.B.ábra). Ezt követően megvizsgáltuk a vad típusú és mutáns TIMAP fehérjéket expresszáló sejtek S-1-P kezelést követő a sebgyógyulási sebességét. A szfingozin-1-foszfát (S-1-P), a szfingozin metabolizmus során keletkező lipid mediátor, amely segíti az endotél sejtek szétterjedését, migrációját és növeli a barrier funkció stabilitását [145, 146]. Az S-1-P hatására a vártaknak megfelelően felgyorsult a sejtek sebgyógyulási folyamata a kezeletlen sejtekhez képest (34.B.ábra). Amikor a sebgyógyulási vizsgálat során a transzfektált endotél sejteken az S-1-P kezelést követően PLK4 inhibitor (YLT-11) is alkalmaztunk, a vad típusú illetve TIMAP S69A fehérjéket expresszáló sejteknek csökkent a sebgyógyulási sebessége, azonban a foszforilációt utánzó TIMAP S69D fehérjét expresszáló sejtekét nem befolyásolta az inhibitor kezelés (34.B.ábra). Ezek az eredmények azt bizonyítják, hogy a TIMAP Ser69-es oldalláncának foszforilációja fokozza a sejtek migrációs képességet és ezen oldallánc foszforilációjában a PLK4 kináz játszhat szerepet.



34.ábra. TIMAP Ser69-es oldallánc foszforilációjának hatása az endotél sejtek barrier funkciójára és a sejt migrációra. A) BPAEC sejteket 8W10E ECIS 8 elektródás tenyésztő edényben növesztettük, majd pCMV-myc TIMAP (WT), pCMV-myc TIMAP S69A és pCMV-myc TIMAP S69D plazmidokkal transzfektáltuk. A transzfekció után 24 órával 4000Hz-en mértük a rezisztencia értéket. Az ábra három reprezentatív mérés eredményét mutatja. (n=3) B) A sejt migráció vizsgálatához kezeletlen transzfektált sejteket, valamint transzfektálást követő S-1-P-vel (1µM, 30 perc) kezelt, illetve S-1-P kezelést követő YLT-11-el (0,5µM, 30 perc) kezelt transzfektált sejteket használtunk. A konfluencia szint elérését követő kezelések után 30 másodpercig 5 mA erősségű 60 kHz frekvenciájú árammal az elektródok felületén kiegészítettük a sejteket és követtük a rezisztencia értéket a sebzés begyógyulásáig, majd meghatároztuk a sejt migráció sebességét. Az ábra három reprezentatív mérés eredményét mutatja. (n=3) A szignifikancia szinteket *-al jelöltük. $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***)

8. Megbeszélés

A fehérjék reverzibilis foszforilációja és defoszforilációja az egyik leggyakoribb poszttranszlációs módosítás, mely fontos szerepet játszik a sejtekben zajló szignálútvonalak szabályozásában [147]. A fehérjék foszforilációs állapota a protein kinázok és protein foszfatázok aktivitásának egyensúlyától függ. A tüdő artéria endotél sejtek az erek lumen felőli oldalát bélelik egy rétegben, ahol féligáteresztő gátként funkcionálnak a vér és az interstitium között. Az érrendszerben bekövetkező strukturális változások, mint a fehérjék foszforilációja / defoszforilációja vagy a megváltozott vazoaktív anyagok termelődése olyan súlyos betegségek kialakulásához vezethet, mint az akut respirációs distressz szindróma (ARDS), a tüdőgyulladás vagy a tüdőödéma [148]. A protein foszfatáz 1 regulátor alegysége a TIMAP, magas szinten expresszálódik endotél sejtekben, ahol barrier szabályzó szerepet tölt be [22, 60]. Számos TIMAP fehérjével kölcsönható partnert és szubsztrát fehérjét azonosítottak, melyeken keresztül közelebb juthattunk az endotél sejtekben betöltött funkciójának megértéséhez.

A TIMAP új kölcsönható partnerének keresése során az ANXA2 fehérjét azonosítottuk endotél sejtekben, amely az annexin család egyik leginkább tanulmányozott tagja. A két fehérje közötti kölcsönhatást pull-down és immunprecipitációs kísérlettel is kimutattunk, valamint a kölcsönhatás közelebbi vizsgálata során igazoltuk, hogy az ANXA2 a TIMAP N-terminális részén található 1. 2. és 3. ankyrin ismétlődéseihez kötődik. Az eddig azonosított összes TIMAP szubsztrát és kölcsönható fehérje az N-terminális régióval lépett kölcsönhatásba (1-290aa), ami nem meglepő, hiszen ezen a régióban található a fehérje-fehérje interakciók kialakításában szerepet játszó ankyrin ismétlődéseket [149]. A fehérje C-terminális részével, amely rendezetlen régiókból áll, kölcsönható fehérjét még nem azonosítottak [133].

A TIMAP fehérje egy potenciális nukleáris lokalizációs szignál szekvenciát és egy prenilációs CAAX-box motívumot is tartalmaz, melynek köszönhetően tüdő artéria endotél sejtek plazmamembránjában és a sejtmagjában is megjelenik [133]. Az endotél sejtek membrán régiójában detektáltunk kolokalizációt az ANXA2 és TIMAP fehérjékre immunfluoreszcens festéssel. A fehérjék együttes megjelenése a membránban a PKC aktiváció hatására fokozódott. A PKC aktiválás és a TIMAP csendesítés egyaránt az ANXA2 membránban való dúsulását váltotta, ki utalva arra, hogy az ANXA2 lokalizációja foszforiláció függően változik. Számos poszttranszlációs módosítást

azonosítottak az ANXA2 fehérjén, amely befolyásolja működését, szubcelluláris lokalizációját és más fehérjékkel való kölcsönhatásait [91].

Számos irodalmi adat utal arra, hogy az ANXA2 a PKC szubsztrátja, mert kapcsolatot találtak a fehérje és a PKC ϵ , PKC α valamint PKC β között [122, 125, 150]. Az irodalomban az ANXA2 Ser25-ös oldalláncát potenciális PKC foszforilációs helyként írták le [125, 151]. *In vitro* PKC foszforilációs kísérletünkben kimutattuk az ANXA2 Ser25-ös oldallánc PKC α általi foszforilációját. A PKC α csendesített endotél sejtekben az ANXA2 mennyiségében nem tapasztaltunk változást, azonban a foszfo-Ser25 ANXA2 nem adott jelet, amely igazolta a PKC szerepét az oldallánc foszforilációjában az endotél sejtekben. Megjegyzendő, hogy a korábban azonosított TIMAP-PP1c komplex szubsztrátok, az endotelint konvertáló enzim-1 és az ERM fehérjék is a PKC-által foszforilálódnak [22, 35]. Emellett a PKC magát a TIMAP fehérjét is foszforilálja a Ser331-es oldalláncon [84], ezért megvizsgáltuk, hogy ezen oldallánc foszforilációja hatással van-e az ANXA2 fehérjével való kölcsönhatásra. Eredményeink szerint a TIMAP Ser331-es oldallánc foszforilációja nem befolyásolja az ANXA2 fehérjével való kölcsönhatását.

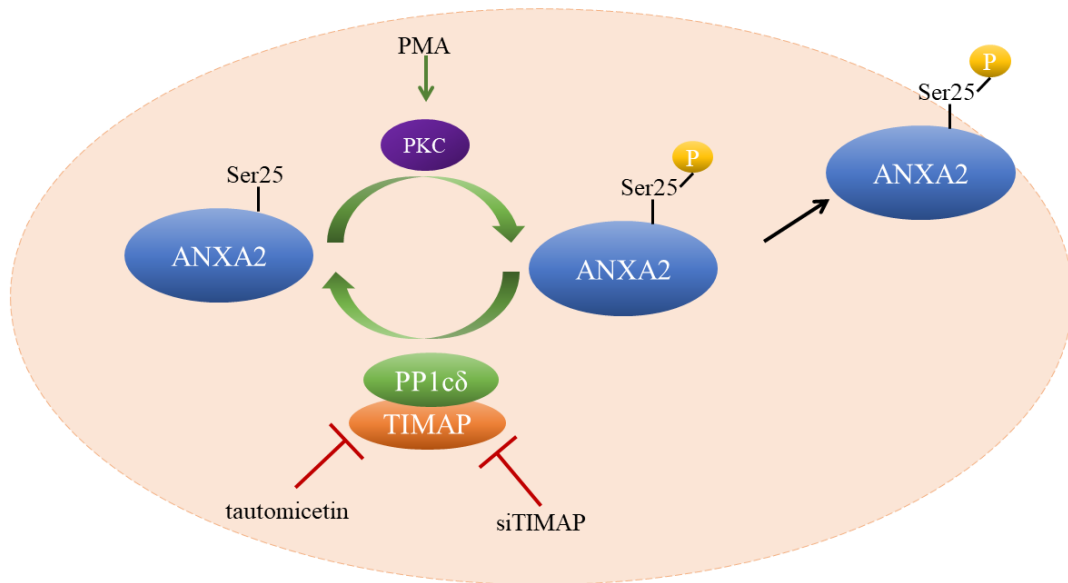
Bár az ANXA2 foszforilációjának élettani szerepe még mindig nem teljesen ismert, számos tanulmány azt sugallja, hogy a foszforiláció befolyásolhatja a fehérje sejten belüli lokalizációját és ezáltal szabályozza annak sejtben betöltött funkcióit [122, 152]. TIMAP csendesítést követően az ANXA2 transzlokációját detektáltuk a sejt-magból a sejt-membránba. Liu és munkatársai LNCaP sejteken végzett tanulmányában kimutatta, hogy az ANXA2 Ser11 és Ser25 oldallánc egyidejű foszforilációja hatással van a fehérje lokalizációjára, ugyanis mind a két oldallánc foszforilációja megakadályozta a fehérje sejt-magban való megjelenést [153]. Emellett kimutatták, hogy az endotél sejtekben az ANXA2 kölcsönhatásba lép a VE-kadherinnel, szabályozva a sejtek mozgékonyágát és az aktin dinamikáját [154]. MDCK sejtek esetében az ANXA2-S100A10 komplex az E-kadherin alapú adherens kapcsolatok kialakulásában való érintettségéről számoltak be [155]. Ezen eredményekkel összhangban az általunk is kimutatott foszfo-Ser25 ANXA2 membrán lokalizációja, hangsúlyozza szerepét a sejt-sejt kölcsönhatásokban és az endotél sejtek által kialakított gát szabályozásában. Ezzel összhangban az ANXA2 csendesítése nem volt szignifikáns hatással az endotél sejtek proliferációjára vagy életképességére, de csökkentette a sejtek bazális rezisztenciáját és migrációs sebességüket. Zhang és munkatársai kimutatták, hogy az ANXA2-specifikus siRNS-sel történő csendesítése

jelentősen gátolta a fibroblasztokkal együtt tenyésztett hepatocelluláris karcinóma sejtek migrációját és invázióját *in vitro* kísérletekben [156].

Az ANXA2 defoszforilációjáért felelős foszfatázzról a szakirodalomban nem található adat. A foszfatáz regulátor TIMAP fehérjével való kölcsönhatása alapján feltételeztük és sikeresen igazoltuk is, hogy az ANXA2 Ser25-ös oldalláncának defoszforilációjának szabályozásában részt vesz a TIMAP-PP1c komplex. A TIMAP fehérjének, mint a PP1c regulátor alegységének csendesítése hasonlóan a PP1 tautomycinellel történő gátlásához, szignifikánsan megemelte a foszfo-Ser25 ANXA2 mennyiségét endotél sejtekben, megerősítve azt a feltételezésünket, hogy az ANXA2 defoszforilációjában a TIMAP-PP1c komplex vesz részt.

Az ANXA2 S100A10 fehérjével alkotott komplexét számos kísérletben vizsgálták, ugyanis az S100A10 kötődése az ANXA2-höz az ANXA2 számos funkcióját szabályozza. A monomer ANXA2 és a heterotetramer ANXA2 biokémiai tulajdonságai jelentősen eltérnek [157]. Az S100A10 ANXA2-vel való kötődése csökkenti az ANXA2 membránban való megjelenést, valamint a kölcsönhatásnak köszönhetően az S100A10 fehérje védve van a proteozómális degradációtól [158, 159]. A PKC PMA-val történő aktiválása az ANXA2-S100A10 komplex disszociációját eredményezte, valamint nem találtunk kölcsönhatást a foszfo-Ser25 ANXA2 és az S100A10 fehérje között. Hasonló eredményt mutattak ki He és munkatársai, akik arról számoltak be, hogy az endotél sejtekben a plazmin indukálja a PKC aktiválását, amely foszforilálja az ANXA2 fehérjét a Ser11-es és Ser25-ös oldalláncon, melynek hatására az ANXA2-S100A10 komplex disszociál [122]. Az S100A10 az ANXA2 N-terminális régiójához kötődik, valamint a Ser25-ös oldallánc is ezen a régión helyezkedik el, ezért feltételezhető, hogy a Ser25-ös oldalláncon történő foszforiláció konformációs változást idéz elő a fehérje ezen részén, amely a komplex disszociációját eredményezi. Az ANXA2 és S100A10 kölcsönhatás jól tanulmányozott, de a komplex szabályozásáról nincs egységes vélemény [106]. Úgy tűnik, hogy az ANXA2 szabályozás sejtspecifikus, ami tovább tükrözi a sokféle jelátviteli út megismerésének fontosságát.

Eredményeink összességében kimutatták az ANXA2 és a TIMAP-PP1c komplex új kölcsönhatását, valamint egy foszforiláció függő szabályozást, amely befolyásolja az endotél sejtek migrációját és barrier funkcióját.



35.ábra. Az ANXA2 foszforilációja és defoszforilációja. Az ANXA2 fehérje PMA kezelés hatására a PKC α által Ser25-ös oldalláncon foszforilálódik, majd a sejtek membránjában dúsul fel. A PP1c tautomictinnel, vagy a regulátor alegységének csendesítésével történő gátlásával az ANXA2 Ser25-ös oldalláncon foszforilációs szintje nő, ezzel igazolja, hogy az ANXA2 Ser25-ös oldalláncon foszforilációjáért a TIMAP-PP1c komplex felelős.

Phosphosite Plus adatbázisban történő kereséssel során számos potenciális Ser/Thr és Tyr foszforilációs oldalláncon találunk a TIMAP fehérjén. A fehérjét a Ser337-es oldalláncon a PKA, míg a Ser333-as oldalláncon GSK3 β kináz képes foszforilálni [22, 88]. Munka csoportunk továbbá korábban kimutatta a TIMAP Ser331-es oldalláncon PKC által foszforilációját is [84]. A Ser69 foszforilációs hely a TIMAP elsődleges szekvenciájában a PP1-kötő motívumhoz és az NLS-hez való közelsége miatt, felveti a kérdést, hogy foszforilációs állapota befolyásolhatja-e a PP1 kötő képességét, vagy a TIMAP szubcelluláris lokalizációját.

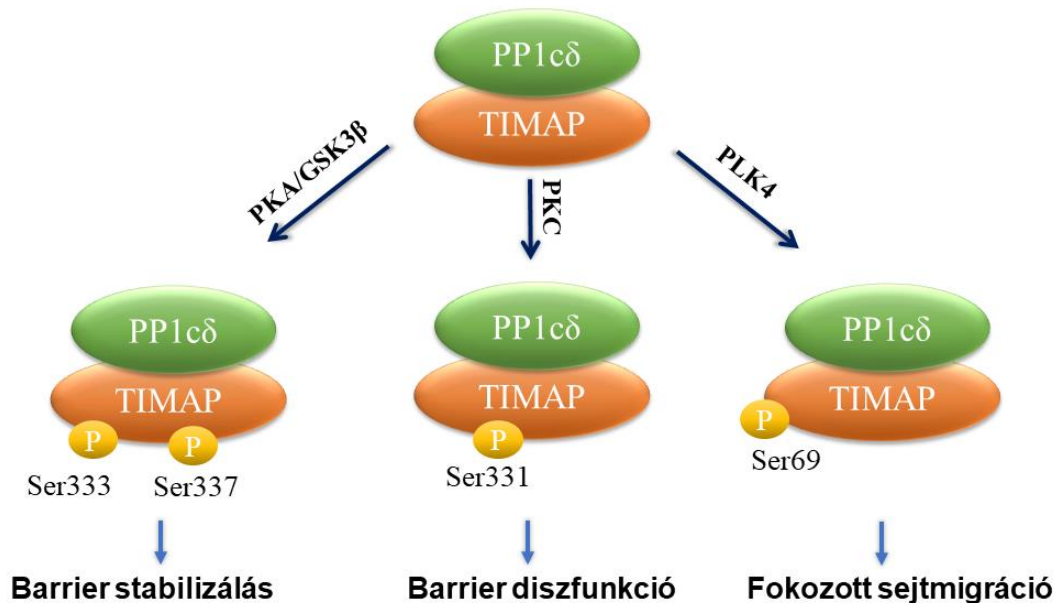
A foszforiláció tanulmányozáshoz foszforilációt utánozó S69D és nem foszforilálható S69A TIMAP rekombináns fehérjéket hoztunk létre, majd pull-down kísérletekkel kimutattuk, hogy a PP1c és a TIMAP fehérjék közötti kölcsönhatást nem befolyásolja a Ser69-es oldalláncon foszforilációja. A TIMAP Ser333/Ser337-es oldalláncon foszforilációja, ugyan nem változtatják meg a TIMAP-PP1c kötődését, de növelik a komplex aktivitását a foszfo-ERM szubsztrát felé és a barrier funkció szabályozásában barrier stabilizáló hatással rendelkeznek [22]. A TIMAP fehérje PKC általi foszforilációja

a Ser331-es oldalláncon egy gátló hatású foszforiláció, amely csökkenti a foszfo-ERM defoszforilációját és így a barrier diszfunkcióját eredményezi [84]. A vad típusú és a Ser69 foszfomutáns TIMAP fehérjék azonban azonos mértékben kötődtek az ERM és a foszfo-ERM fehérjékhez. Ennek ellenére nem zárható ki, hogy egy még nem azonosított TIMAP kölcsönható partnerrel való kölcsönhatást ezen foszforilációs hely befolyásolna. A TIMAP fehérje C-terminális részén lévő prenilációs motívum lehetővé teszi a fehérje sejtmembránjában való lokalizációját. A TIMAP kölcsönható partnereként azonosított RACK1 kötési felületet biztosít a TIMAP és a farnezil-transzferáz enzim számára, ami biztosítja a TIMAP prenilációját és az ezt követő membránban való megjelenését, ahol a PPI regulátor alegységeként betöltheti barrier védő szerepét [76]. Pull-down kísérleti eredményeink alapján a RACK1 egyaránt kötődik mind a foszforilációt utánzó, mind a foszfonull Ser69 TIMAP mutánsokhoz, ami azt sugallja, hogy a TIMAP membrán lokalizációja a Ser69 foszforiláltságtól független lehet. Immunfluoreszcens festéssel és sejtfrakcionálással ezt meg is erősítettük. A foszforilációt utánzó S69D TIMAP mutáns fehérje azonban jellemzően a sejtmembránban dúsul, és ezek a sejtek eltérő fenotípust mutattak a kontroll sejtekhez képest.

A Ser69-es oldallánc foszforilációjáért felelős potenciális protein-kinázokat kináz specifikus foszforilációs predikciós szoftver segítségével kerestük. A legmagasabb találati aránnyal a PLK4 rendelkezett, amelyről immunprecipitációs kísérlet során kimutattuk, hogy kölcsönhat az endogén TIMAP-al az endotél sejtekben. A PLK4-et először tumor szuppresszióban és a mitotikus folyamatokban mutatott funkciója alapján azonosították [160]. A centriole duplikációban betöltött szerepe mellett egyre több a bizonyíték arra, hogy a PLK4 kulcsfontosságú szerepet játszik a sejtek mozgékonyágában [143, 144]. Kimutatták, hogy a PLK4 nemcsak az egér embrionális fibroblasztjainak migrációját fokozza, hanem a sejtmembrán kitüremkedésekben is koncentrálódik [143]. A TIMAP S69D-t expresszáló sejtek immunfluoreszcens festése során hasonló fenotípust találtunk, a sejtek fokozott membrán nyúlványokat és filopódia képződést mutattak. Az endogén PLK4 a mozgó sejtek filopódiumaiban, lamellipódiumaiban lokalizálódik és a citoskeletális rendszer átszerveződését indítja el a sejtek migrációjának fokozása érdekében [143]. A TIMAP vad típusú és foszfomutáns formáját expresszáló endotél sejtek migrációját ECIS méréssel vizsgáltuk. A sebgyógyulási vizsgálatok során a S69D TIMAP fehérjét expresszáló sejtek migrációs sebessége szignifikánsan magasabb volt, mint a vad típusú vagy S69A TIMAP-ot expresszáló sejteké. Az S-1-P, amely fokozza a

sejtek migrációját, önmagában növelte a rekombináns fehérjéket expresszáló sejtek migrációs sebességét, de a YLT-11 hozzáadása, amely egy PLK4 inhibitor [161], blokkolta az S-1-P által előidézett sejtmigrációt a vad típusú és foszfonull TIMAP fehérjét expresszáló sejtekben.

Összességében eredményeink arra utalnak, hogy a TIMAP S69-es oldallánca reverzibilis foszforilációval módosulhat és a foszforilációt a PLK4 kináz szabályozhatja. Eredményeink bizonyítják, hogy a TIMAP S69 foszforilációja szerepet játszik az endotél sejtek migrációjában.



36.ábra. A TIMAP foszforilációs állapotainak élettani hatása. A TIMAP fehérje Ser337-es oldallánc foszforilációjáért a PKA, míg a Ser333-es hely esetében pedig a GSK3β felelős. Az így kétszeresen foszforilált TIMAP részt vesz a foszfo-ERM defoszforilációjában, amely a barrier stabilitását eredményezi. A Ser331-es oldallánc foszforilációjáért a PKC felelős. A Ser331-es oldallánc foszforilációja csökkenti a foszfo-ERM defoszforilációját és így a barrier diszfunkcióját eredményezi. A TIMAP Ser69-es oldalláncának foszforilációjáért a PLK4 kináz felelős. A foszforiláció nincs hatással az ERM fehérjék foszforilációjára, azonban a sejtek migrációját fokozza.

9. Összefoglalás

Endotél sejtekben a Ser/Thr specifikus foszfatázok közül az egyik legjelentősebb a PP1 enzim, mely egy katalitikus és egy regulátor alegységből áll. Ilyen regulátor alegység család a miozin foszfatáz regulátor alegység, azaz MYPT fehérje család, melynek tagja az endotél sejtekben magas expresszió szinttel rendelkező TIMAP fehérje.

A TIMAP endotél sejtekben betöltött funkciójának vizsgálatokor, új kölcsönható partnerének keresése során az ANXA2 fehérjét azonosítottuk. Kimutattuk, hogy az ANXA2 Ser25 oldalláncának foszforilációját az endotél sejtekben a PKC enzim katalizálja. Az ANXA2 foszforilációs szintje nagymértékben megnőtt a PP1 gátlása és a szabályozó alegysége, a TIMAP csendesítés hatására, ami arra utal, hogy TIMAP-PP1c holoenzimnek szerepe van az ANXA2 defoszforilációjában. Immunfluoreszcens kísérletekkel és szubcelluláris frakcionálással az endogén ANXA2 főleg a citoplazmában és sejtmagban volt kimutatható, míg a Ser25-ös oldalláncon foszforilált ANXA2-t elsősorban a membránban detektáltuk. Az ANXA2 TIMAP fehérjével való kolokalizációját szintén az endotél sejtek membránjában mutattuk ki. Az ANXA2 foszforilációjával párhuzamosan, a S100A10 fehérjével való kölcsönhatása megszűnt. Az ANXA2 csendesítés hatására gyengült a bazális endoteliális gát és a sejtmigráció, de a fehérje hiánya a sejtek proliferációját vagy életképességét nem befolyásolta. Eredményeink azt bizonyítják, hogy az ANXA2 PKC-vel és PP1-gyel történő szabályozása kulcsfontosságú szerepet játszhat az endotél sejtek jelátvitelében, különösen a barrier funkcióban és a sejtmigrációban.

A TIMAP fehérje Ser69-es oldallánc reverzibilis foszforilációjának vizsgálatához vad típusú foszforilációt utánzó S69D és nem foszforilálható S69A rekombináns TIMAP fehérjéket hoztunk létre. Kimutattuk, hogy a Ser69-es oldallánc foszforilációja nem befolyásolja a TIMAP PP1c-vel, ERM-el vagy RACK1 fehérjékkel való kölcsönhatását. A fehérjék lokalizációjának vizsgálatokor azonban a foszforilációt utánzó mutánst expresszáló sejtekben a TIMAP S69D fokozott membrán lokalizációt mutatott. A TIMAP S69D fehérjét expresszáló sejtek membránján ezen kívül megnövekedett számú membrán kitérkedést figyeltünk. ECIS méréseink azt igazolták, hogy az S69D mutánst expresszáló sejtek gyorsabb sebgyógyulási és migrációs sebességgel rendelkeztek. Immunprecipitációs kísérlettel a TIMAP és PLK4 kináz közötti kölcsönhatást mutattunk ki, amely feltehetően részt vehet a TIMAP Ser69-es oldalláncának foszforilációjában.

10. Summary

In endothelial cells, PP1 enzyme is one of the main Ser / Thr-specific phosphatases, consisting of a catalytic and a targeting regulatory subunit. One type of the regulatory subunit families is the myosin phosphatase regulatory subunit (MYPT) protein family and its member protein, TIMAP has high expression level in endothelial cells.

ANXA2 protein was identified in the study of TIMAP function in endothelial cells and in a search of its new interacting partners. We have shown that phosphorylation of Ser25 side chain of ANXA2 in endothelial cells is catalysed by the PKC enzyme. Phosphorylation level of ANXA2 at Ser25 increased greatly by inhibition of PP1 or by depletion of its regulatory subunit, TIMAP, implying the role of this PP1 holoenzyme form in the dephosphorylation of ANXA2. By immunofluorescence experiments and subcellular fractionation endogenous ANXA2 was revealed mainly in the cytoplasm and nucleus, whereas Ser25 phosphorylated ANXA2 was detected primarily in the membrane. Localization of ANXA2 with TIMAP protein was also detected in the membrane of endothelial cells. In parallel with the phosphorylation of ANXA2, the interaction with the S100A10 protein was abolished. ANXA2 depletion lowered the basal endothelial barrier and inhibited cell migration, but the lack of protein had no significant effect on cell proliferation or viability. Our results demonstrate that regulation of ANXA2 by PKC and PP1 may play a role in endothelial cell signaling, especially in barrier function and cell migration.

To study reversible phosphorylation of the Ser69 side chain of TIMAP protein, wild-type, phosphomimic S69D and phosphonull S69A recombinant TIMAP proteins were made. We have shown that phosphorylation of the Ser69 of TIMAP had no effect on the interaction with PP1c, ERM or RACK1 proteins. However, S69D TIMAP showed enhanced membrane localization in cells overexpressing this phosphomimic mutant form. In addition, an increased number of membrane protrusions were observed on the membrane of cells overexpressing TIMAP S69D protein. Significantly faster wound healing and migration rate of the S69D mutant overexpressing cells were detected by endothelial barrier resistance measurements (ECIS). By immunoprecipitation experiment, specific interaction was shown between TIMAP and polo-like kinase 4 (PLK4), which may be a potential kinase to phosphorylate Ser69.

11. Irodalomjegyzék

1. Kruger-Genge, A., et al., *Vascular Endothelial Cell Biology: An Update*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(18).
2. Hirase, T. and K. Node, *Endothelial dysfunction as a cellular mechanism for vascular failure*. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 2012. **302**(3): p. H499-H505.
3. Rodrigues, S.F. and D.N. Granger, *Blood cells and endothelial barrier function*. Tissue Barriers, 2015. **3**(1-2).
4. Mehta, D. and A.B. Malik, *Signaling mechanisms regulating endothelial permeability*. Physiol Rev, 2006. **86**(1): p. 279-367.
5. Nottet, H.S., *Interactions between macrophages and brain microvascular endothelial cells: role in pathogenesis of HIV-1 infection and blood - brain barrier function*. J Neurovirol, 1999. **5**(6): p. 659-69.
6. Dejana, E., et al., *Organization and signaling of endothelial cell-to-cell junctions in various regions of the blood and lymphatic vascular trees*. Cell and Tissue Research, 2009. **335**(1): p. 17-25.
7. Davis, G.E. and D.R. Senger, *Endothelial extracellular matrix - Biosynthesis, remodeling, and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization*. Circulation Research, 2005. **97**(11): p. 1093-1107.
8. Dudek, S.M. and J.G.N. Garcia, *Cytoskeletal regulation of pulmonary vascular permeability*. Journal of Applied Physiology, 2001. **91**(4): p. 1487-1500.
9. Budhiraja, R., R.M. Tuder, and P.M. Hassoun, *Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension*. Circulation, 2004. **109**(2): p. 159-165.
10. Csontos, C., I. Kolosova, and A.D. Verin, *Regulation of vascular endothelial cell barrier function and cytoskeleton structure by protein phosphatases of the PPP family*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007. **293**(4): p. L843-54.
11. Ardito, F., et al., *The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy*. International Journal of Molecular Medicine, 2017. **40**(2): p. 271-280.
12. Martin, J., K. Anamika, and N. Srinivasan, *Classification of Protein Kinases on the Basis of Both Kinase and Non-Kinase Regions*. Plos One, 2010. **5**(9).
13. Wang, Z. and P.A. Cole, *Catalytic mechanisms and regulation of protein kinases*. Methods Enzymol, 2014. **548**: p. 1-21.
14. Miller, M.L., et al., *Linear Motif Atlas for Phosphorylation-Dependent Signaling*. Science Signaling, 2008. **1**(35).
15. Hunter, T., *Tyrosine phosphorylation: thirty years and counting*. Curr Opin Cell Biol, 2009. **21**(2): p. 140-6.
16. Barford, D., *Molecular mechanisms of the protein serine/threonine phosphatases*. Trends Biochem Sci, 1996. **21**(11): p. 407-12.
17. Ingebritsen, T.S. and P. Cohen, *The Protein Phosphatases Involved in Cellular-Regulation .1. Classification and Substrate Specificities*. European Journal of Biochemistry, 1983. **132**(2): p. 255-261.

18. Barford, D., A.K. Das, and M.P. Egloff, *The structure and mechanism of protein phosphatases: Insights into catalysis and regulation*. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure, 1998. **27**: p. 133-164.
19. Shi, Y.G., *Serine/Threonine Phosphatases: Mechanism through Structure*. Cell, 2009. **139**(3): p. 468-484.
20. Cohen, P.T., *Protein phosphatase 1--targeted in many directions*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 2): p. 241-56.
21. Peti, W., A.C. Nairn, and R. Page, *Structural basis for protein phosphatase 1 regulation and specificity*. FEBS J, 2013. **280**(2): p. 596-611.
22. Csontos, C., et al., *TIMAP is a positive regulator of pulmonary endothelial barrier function*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2008. **295**(3): p. L440-50.
23. Walsh, J.E. and M.R. Young, *Interrelationship between protein phosphatase 1 and TGF- β in regulating motility and cytoskeletal architecture of endothelial cells*. Anticancer Res, 2010. **30**(12): p. 4861-6.
24. Rebelo, S., et al., *Protein phosphatase 1 is a key player in nuclear events*. Cell Signal, 2015. **27**(12): p. 2589-98.
25. Barker, H.M., et al., *Three genes for protein phosphatase 1 map to different human chromosomes: sequence, expression and gene localisation of protein serine/threonine phosphatase 1 beta (PPP1CB)*. Biochim Biophys Acta, 1994. **1220**(2): p. 212-8.
26. Sasaki, K., et al., *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*. Jpn J Cancer Res, 1990. **81**(12): p. 1272-80.
27. Barker, H.M., et al., *Sequence of human protein serine/threonine phosphatase 1 gamma and localization of the gene (PPP1CC) encoding it to chromosome bands 12q24.1-q24.2*. Biochim Biophys Acta, 1993. **1178**(2): p. 228-33.
28. Andreassen, P.R., et al., *Differential subcellular localization of protein phosphatase-1 alpha, gamma1, and delta isoforms during both interphase and mitosis in mammalian cells*. J Cell Biol, 1998. **141**(5): p. 1207-15.
29. Bollen, M., *Combinatorial control of protein phosphatase-1*. Trends Biochem Sci, 2001. **26**(7): p. 426-31.
30. Boens, S., et al., *Interactor-guided dephosphorylation by protein phosphatase-1*. Methods Mol Biol, 2013. **1053**: p. 271-81.
31. Ceulemans, H. and M. Bollen, *Functional diversity of protein phosphatase-1, a cellular economizer and reset button*. Physiol Rev, 2004. **84**(1): p. 1-39.
32. Virshup, D.M. and S. Shenolikar, *From promiscuity to precision: protein phosphatases get a makeover*. Mol Cell, 2009. **33**(5): p. 537-45.
33. Kim, Y.M., et al., *PNUTS, a protein phosphatase 1 (PPI) nuclear targeting subunit. Characterization of its PPI- and RNA-binding domains and regulation by phosphorylation*. J Biol Chem, 2003. **278**(16): p. 13819-28.
34. Bollen, M., et al., *The extended PPI toolkit: designed to create specificity*. Trends Biochem Sci, 2010. **35**(8): p. 450-8.

35. Boratko, A., et al., *TIMAP-protein phosphatase 1-complex controls endothelin-1 production via ECE-1 dephosphorylation*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2016. **73**: p. 11-18.
36. Ajuh, P.M., et al., *Association of a protein phosphatase 1 activity with the human factor C1 (HCF) complex*. *Nucleic Acids Res*, 2000. **28**(3): p. 678-86.
37. Tamrakar, S., S. Mittnacht, and J.W. Ludlow, *Binding of select forms of pRB to protein phosphatase type 1 independent of catalytic activity*. *Oncogene*, 1999. **18**(54): p. 7803-9.
38. Hirschi, A., et al., *An overlapping kinase and phosphatase docking site regulates activity of the retinoblastoma protein*. *Nat Struct Mol Biol*, 2010. **17**(9): p. 1051-7.
39. Wilson, A.K., et al., *An increase or a decrease in myosin II phosphorylation inhibits macrophage motility*. *J Cell Biol*, 1991. **114**(2): p. 277-83.
40. Kamisoyama, H., Y. Araki, and M. Ikebe, *Mutagenesis of the phosphorylation site (serine 19) of smooth muscle myosin regulatory light chain and its effects on the properties of myosin*. *Biochemistry*, 1994. **33**(3): p. 840-7.
41. Murata-Hori, M., et al., *HeLa ZIP kinase induces diphosphorylation of myosin II regulatory light chain and reorganization of actin filaments in nonmuscle cells*. *Oncogene*, 2001. **20**(57): p. 8175-83.
42. Kamm, K.E. and J.T. Stull, *Dedicated myosin light chain kinases with diverse cellular functions*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(7): p. 4527-30.
43. Dudek, S.M. and J.G. Garcia, *Cytoskeletal regulation of pulmonary vascular permeability*. *J Appl Physiol* (1985), 2001. **91**(4): p. 1487-500.
44. Alessi, D., et al., *The control of protein phosphatase-1 by targeting subunits. The major myosin phosphatase in avian smooth muscle is a novel form of protein phosphatase-1*. *Eur J Biochem*, 1992. **210**(3): p. 1023-35.
45. Ito, M., et al., *Myosin phosphatase: structure, regulation and function*. *Mol Cell Biochem*, 2004. **259**(1-2): p. 197-209.
46. Kiss, A., F. Erdodi, and B. Lontay, *Myosin phosphatase: Unexpected functions of a long-known enzyme*. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2019. **1866**(1): p. 2-15.
47. Hartshorne, D.J., M. Ito, and F. Erdodi, *Myosin light chain phosphatase: subunit composition, interactions and regulation*. *J Muscle Res Cell Motil*, 1998. **19**(4): p. 325-41.
48. Shichi, D., et al., *Heart-specific small subunit of myosin light chain phosphatase activates rho-associated kinase and regulates phosphorylation of myosin phosphatase target subunit 1*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(44): p. 33680-90.
49. Feng, J., et al., *Inhibitory phosphorylation site for Rho-associated kinase on smooth muscle myosin phosphatase*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(52): p. 37385-90.
50. Khromov, A., et al., *Phosphorylation-dependent autoinhibition of myosin light chain phosphatase accounts for Ca²⁺ sensitization force of smooth muscle contraction*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(32): p. 21569-79.

51. Borman, M.A., et al., *Smooth muscle myosin phosphatase-associated kinase induces Ca²⁺ sensitization via myosin phosphatase inhibition*. J Biol Chem, 2002. **277**(26): p. 23441-6.
52. Muranyi, A., et al., *Myotonic dystrophy protein kinase phosphorylates the myosin phosphatase targeting subunit and inhibits myosin phosphatase activity*. FEBS Lett, 2001. **493**(2-3): p. 80-4.
53. Muranyi, A., et al., *Phosphorylation of the myosin phosphatase target subunit by integrin-linked kinase*. Biochem J, 2002. **366**(Pt 1): p. 211-6.
54. Deng, J.T., et al., *Ca²⁺-independent smooth muscle contraction. a novel function for integrin-linked kinase*. J Biol Chem, 2001. **276**(19): p. 16365-73.
55. Wooldridge, A.A., et al., *Smooth muscle phosphatase is regulated in vivo by exclusion of phosphorylation of threonine 696 of MYPT1 by phosphorylation of Serine 695 in response to cyclic nucleotides*. J Biol Chem, 2004. **279**(33): p. 34496-504.
56. Eto, M., et al., *Molecular cloning of a novel phosphorylation-dependent inhibitory protein of protein phosphatase-1 (CPII7) in smooth muscle: its specific localization in smooth muscle*. FEBS Lett, 1997. **410**(2-3): p. 356-60.
57. Shimizu, H., et al., *Characterization of the myosin-binding subunit of smooth muscle myosin phosphatase*. J Biol Chem, 1994. **269**(48): p. 30407-11.
58. Fujioka, M., et al., *A new isoform of human myosin phosphatase targeting/regulatory subunit (MYPT2): cDNA cloning, tissue expression, and chromosomal mapping*. Genomics, 1998. **49**(1): p. 59-68.
59. Skinner, J.A. and A.R. Saltiel, *Cloning and identification of MYPT3: a prenylatable myosin targeting subunit of protein phosphatase 1*. Biochem J, 2001. **356**(Pt 1): p. 257-67.
60. Cao, W., et al., *TIMAP, a novel CAAX box protein regulated by TGF-beta1 and expressed in endothelial cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2002. **283**(1): p. C327-37.
61. Terrak, M., et al., *Structural basis of protein phosphatase 1 regulation*. Nature, 2004. **429**(6993): p. 780-4.
62. Grassie, M.E., et al., *The myosin phosphatase targeting protein (MYPT) family: a regulated mechanism for achieving substrate specificity of the catalytic subunit of protein phosphatase type Idelta*. Arch Biochem Biophys, 2011. **510**(2): p. 147-59.
63. Kimura, K., et al., *Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase)*. Science, 1996. **273**(5272): p. 245-8.
64. Takahashi, N., et al., *Localization of the gene coding for myosin phosphatase, target subunit 1 (MYPT1) to human chromosome 12q15-q21*. Genomics, 1997. **44**(1): p. 150-2.
65. Qiao, Y.N., et al., *Myosin phosphatase target subunit 1 (MYPT1) regulates the contraction and relaxation of vascular smooth muscle and maintains blood pressure*. J Biol Chem, 2014. **289**(32): p. 22512-23.

66. Tan, I., et al., *Phosphorylation of a novel myosin binding subunit of protein phosphatase 1 reveals a conserved mechanism in the regulation of actin cytoskeleton*. J Biol Chem, 2001. **276**(24): p. 21209-16.
67. Magdaleno, S., et al., *mPPP1R16B is a novel mouse protein phosphatase 1 targeting subunit whose mRNA is located in cell bodies and dendrites of neurons in four distinct regions of the brain*. Brain Res Gene Expr Patterns, 2002. **1**(3-4): p. 143-9.
68. Fedwick, J.P., et al., *Helicobacter pylori activates myosin light-chain kinase to disrupt claudin-4 and claudin-5 and increase epithelial permeability*. Infect Immun, 2005. **73**(12): p. 7844-52.
69. Kerage, D., et al., *Sphingosine 1-phosphate-induced nitric oxide production simultaneously controls endothelial barrier function and vascular tone in resistance arteries*. Vascul Pharmacol, 2021: p. 106874.
70. Zheng, X., W. Zhang, and X.T. Hu, *Different concentrations of lipopolysaccharide regulate barrier function through the PI3K/Akt signalling pathway in human pulmonary microvascular endothelial cells*. Scientific Reports, 2018. **8**.
71. Poirier, C., et al., *TIMAP protects endothelial barrier from LPS-induced vascular leakage and is down-regulated by LPS*. Respir Physiol Neurobiol, 2011. **179**(2-3): p. 334-7.
72. Kim, K., et al., *The protein phosphatase-1 targeting subunit TIMAP regulates LAMRI phosphorylation*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **338**(3): p. 1327-34.
73. Shopik, M.J., et al., *Multi-directional function of the protein phosphatase 1 regulatory subunit TIMAP*. Biochem Biophys Res Commun, 2013. **435**(4): p. 567-73.
74. Quan, X., et al., *The role of LR-TIMAP/PP1c complex in the occurrence and development of no-reflow*. EBioMedicine, 2021. **65**: p. 103251.
75. Fu, H.W. and P.J. Casey, *Enzymology and biology of CaaX protein prenylation*. Recent Prog Horm Res, 1999. **54**: p. 315-42; discussion 342-3.
76. Boratko, A., P. Gergely, and C. Csontos, *RACK1 is involved in endothelial barrier regulation via its two novel interacting partners*. Cell Commun Signal, 2013. **11**(1): p. 2.
77. Boratko, A., et al., *Elongation factor-1A1 is a novel substrate of the protein phosphatase 1-TIMAP complex*. Int J Biochem Cell Biol, 2015. **69**: p. 105-13.
78. Khacho, M., et al., *eEF1A is a novel component of the mammalian nuclear protein export machinery*. Mol Biol Cell, 2008. **19**(12): p. 5296-308.
79. Bretscher, A., D. Recek, and M. Berryman, *Ezrin: a protein requiring conformational activation to link microfilaments to the plasma membrane in the assembly of cell surface structures*. J Cell Sci, 1997. **110** (Pt 24): p. 3011-8.
80. McClatchey, A.I., *ERM proteins at a glance*. J Cell Sci, 2014. **127**(Pt 15): p. 3199-204.

81. Algrain, M., et al., *Ezrin contains cytoskeleton and membrane binding domains accounting for its proposed role as a membrane-cytoskeletal linker*. J Cell Biol, 1993. **120**(1): p. 129-39.
82. Matsui, T., et al., *Rho-kinase phosphorylates COOH-terminal threonines of ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins and regulates their head-to-tail association*. J Cell Biol, 1998. **140**(3): p. 647-57.
83. Fukata, Y., et al., *Association of the myosin-binding subunit of myosin phosphatase and moesin: dual regulation of moesin phosphorylation by Rho-associated kinase and myosin phosphatase*. J Cell Biol, 1998. **141**(2): p. 409-18.
84. Boratko, A. and C. Csontos, *PKC mediated phosphorylation of TIMAP regulates PPIc activity and endothelial barrier function*. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, 2017. **1864**(2): p. 431-439.
85. Bretscher, A., K. Edwards, and R.G. Fehon, *ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(8): p. 586-99.
86. Boratko, A., M. Peter, and C. Csontos, *Regulation of merlin by protein phosphatase 1-TIMAP and EBP50 in endothelial cells*. Int J Biochem Cell Biol, 2017. **82**: p. 10-17.
87. Cooper, J. and F.G. Giancotti, *Molecular insights into NF2/Merlin tumor suppressor function*. FEBS Lett, 2014. **588**(16): p. 2743-52.
88. Li, L., et al., *Phosphorylation of TIMAP by glycogen synthase kinase-3beta activates its associated protein phosphatase 1*. J Biol Chem, 2007. **282**(35): p. 25960-9.
89. Czikora, I., et al., *Characterization of the effect of TIMAP phosphorylation on its interaction with protein phosphatase 1*. Biochimie, 2011. **93**(7): p. 1139-45.
90. Creutz, C.E., C.J. Pazoles, and H.B. Pollard, *Identification and purification of an adrenal medullary protein (synexin) that causes calcium-dependent aggregation of isolated chromaffin granules*. J Biol Chem, 1978. **253**(8): p. 2858-66.
91. Gerke, V. and S.E. Moss, *Annexins: from structure to function*. Physiol Rev, 2002. **82**(2): p. 331-71.
92. Moss, S.E. and R.O. Morgan, *The annexins*. Genome Biol, 2004. **5**(4): p. 219.
93. Grindheim, A.K., J. Saraste, and A. Vedeler, *Protein phosphorylation and its role in the regulation of Annexin A2 function*. Biochim Biophys Acta Gen Subj, 2017. **1861**(11 Pt A): p. 2515-2529.
94. Nakata, T., K. Sobue, and N. Hirokawa, *Conformational change and localization of calpactin I complex involved in exocytosis as revealed by quick-freeze, deep-etch electron microscopy and immunocytochemistry*. J Cell Biol, 1990. **110**(1): p. 13-25.
95. Hajjar, K.A. and S. Krishnan, *Annexin II: a mediator of the plasmin/plasminogen activator system*. Trends Cardiovasc Med, 1999. **9**(5): p. 128-38.
96. Huebner, K., et al., *Chromosomal localization of the human genes for lipocortin I and lipocortin II*. Oncogene Res, 1988. **2**(4): p. 299-310.
97. Hitchcock, J.K., A.A. Katz, and G. Schafer, *Dynamic reciprocity: the role of annexin A2 in tissue integrity*. J Cell Commun Signal, 2014. **8**(2): p. 125-33.

98. Liu, Y., H.K. Myrvang, and L.V. Dekker, *Annexin A2 complexes with S100 proteins: structure, function and pharmacological manipulation*. Br J Pharmacol, 2015. **172**(7): p. 1664-76.
99. Roth, D., A. Morgan, and R.D. Burgoyne, *Identification of a key domain in annexin and 14-3-3 proteins that stimulate calcium-dependent exocytosis in permeabilized adrenal chromaffin cells*. FEBS Lett, 1993. **320**(3): p. 207-10.
100. Liemann, S. and R. Huber, *Three-dimensional structure of annexins*. Cell Mol Life Sci, 1997. **53**(6): p. 516-21.
101. Eberhard, D.A., et al., *Control of the nuclear-cytoplasmic partitioning of annexin II by a nuclear export signal and by p11 binding*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 17): p. 3155-66.
102. Kumble, K.D., P.L. Iversen, and J.K. Vishwanatha, *The role of primer recognition proteins in DNA replication: inhibition of cellular proliferation by antisense oligodeoxyribonucleotides*. J Cell Sci, 1992. **101** (Pt 1): p. 35-41.
103. Vishwanatha, J.K. and S. Kumble, *Involvement of annexin II in DNA replication: evidence from cell-free extracts of Xenopus eggs*. J Cell Sci, 1993. **105** (Pt 2): p. 533-40.
104. Madureira, P.A., et al., *Genotoxic agents promote the nuclear accumulation of annexin A2: role of annexin A2 in mitigating DNA damage*. PLoS One, 2012. **7**(11): p. e50591.
105. Madureira, P.A., et al., *The biochemistry and regulation of S100A10: a multifunctional plasminogen receptor involved in oncogenesis*. J Biomed Biotechnol, 2012. **2012**: p. 353687.
106. Gerke, V. and K. Weber, *The regulatory chain in the p36-kd substrate complex of viral tyrosine-specific protein kinases is related in sequence to the S-100 protein of glial cells*. EMBO J, 1985. **4**(11): p. 2917-20.
107. He, K.L., et al., *Endothelial cell annexin A2 regulates polyubiquitination and degradation of its binding partner S100A10/p11*. J Biol Chem, 2008. **283**(28): p. 19192-200.
108. Zobiack, N., V. Gerke, and U. Rescher, *Complex formation and submembranous localization of annexin 2 and S100A10 in live HepG2 cells*. FEBS Lett, 2001. **500**(3): p. 137-40.
109. Filipenko, N.R. and D.M. Waisman, *The C terminus of annexin II mediates binding to F-actin*. J Biol Chem, 2001. **276**(7): p. 5310-5.
110. Harder, T. and V. Gerke, *The annexin II2p11(2) complex is the major protein component of the triton X-100-insoluble low-density fraction prepared from MDCK cells in the presence of Ca²⁺*. Biochim Biophys Acta, 1994. **1223**(3): p. 375-82.
111. Brandherm, I., et al., *cAMP-induced secretion of endothelial von Willebrand factor is regulated by a phosphorylation/dephosphorylation switch in annexin A2*. Blood, 2013. **122**(6): p. 1042-51.
112. Flood, E.C. and K.A. Hajjar, *The annexin A2 system and vascular homeostasis*. Vascul Pharmacol, 2011. **54**(3-6): p. 59-67.

113. MacLeod, T.J., et al., *Phospholipid-associated annexin A2-S100A10 heterotetramer and its subunits: characterization of the interaction with tissue plasminogen activator, plasminogen, and plasmin*. J Biol Chem, 2003. **278**(28): p. 25577-84.
114. Myrvang, H.K., et al., *Protein interactions between surface annexin A2 and S100A10 mediate adhesion of breast cancer cells to microvascular endothelial cells*. FEBS Lett, 2013. **587**(19): p. 3210-5.
115. Jost, M. and V. Gerke, *Mapping of a regulatory important site for protein kinase C phosphorylation in the N-terminal domain of annexin II*. Biochim Biophys Acta, 1996. **1313**(3): p. 283-9.
116. Gould, K.L., et al., *The protein-tyrosine kinase substrate p36 is also a substrate for protein kinase C in vitro and in vivo*. Mol Cell Biol, 1986. **6**(7): p. 2738-44.
117. Johnsson, N., et al., *Functionally distinct serine phosphorylation sites of p36, the cellular substrate of retroviral protein kinase; differential inhibition of reassociation with p11*. EMBO J, 1986. **5**(13): p. 3455-60.
118. Glenney, J.R., Jr. and B.F. Tack, *Amino-terminal sequence of p36 and associated p10: identification of the site of tyrosine phosphorylation and homology with S-100*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(23): p. 7884-8.
119. Johnsson, N., G. Marriott, and K. Weber, *p36, the major cytoplasmic substrate of src tyrosine protein kinase, binds to its p11 regulatory subunit via a short amino-terminal amphiphatic helix*. EMBO J, 1988. **7**(8): p. 2435-42.
120. Ayala-Sanmartin, J., P. Gouache, and J.P. Henry, *N-Terminal domain of annexin 2 regulates Ca(2+)-dependent membrane aggregation by the core domain: a site directed mutagenesis study*. Biochemistry, 2000. **39**(49): p. 15190-8.
121. Regnouf, F., et al., *"In vitro" phosphorylation of annexin 2 heterotetramer by protein kinase C. Comparative properties of the unphosphorylated and phosphorylated annexin 2 on the aggregation and fusion of chromaffin granule membranes*. J Biol Chem, 1995. **270**(45): p. 27143-50.
122. He, K.L., et al., *Feedback regulation of endothelial cell surface plasmin generation by PKC-dependent phosphorylation of annexin A2*. J Biol Chem, 2011. **286**(17): p. 15428-39.
123. Yan, G.R. and Q.Y. He, *Functional proteomics to identify critical proteins in signal transduction pathways*. Amino Acids, 2008. **35**(2): p. 267-74.
124. Yan, G., et al., *Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 mediates phosphorylation and nuclear translocation of annexin A2 by activating PKC pathway*. Cell Signal, 2007. **19**(2): p. 341-8.
125. Luo, W., et al., *Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 mediates serine 25 phosphorylation and nuclear entry of annexin A2 via PI-PLC-PKCalpha/PKCbeta pathway*. Mol Carcinog, 2008. **47**(12): p. 934-46.
126. Aukrust, I., et al., *Post-translational modifications of Annexin A2 are linked to its association with perinuclear nonpolysomal mRNP complexes*. FEBS Open Bio, 2017. **7**(2): p. 160-173.
127. Glenney, J.R., Jr., *Phosphorylation of p36 in vitro with pp60src. Regulation by Ca2+ and phospholipid*. FEBS Lett, 1985. **192**(1): p. 79-82.

128. Dziduszko, A. and M.A. Ozbun, *Annexin A2 and S100A10 regulate human papillomavirus type 16 entry and intracellular trafficking in human keratinocytes.* J Virol, 2013. **87**(13): p. 7502-15.
129. Rescher, U., et al., *Tyrosine phosphorylation of annexin A2 regulates Rho-mediated actin rearrangement and cell adhesion.* J Cell Sci, 2008. **121**(Pt 13): p. 2177-85.
130. Biener, Y., et al., *Annexin II is a novel player in insulin signal transduction. Possible association between annexin II phosphorylation and insulin receptor internalization.* J Biol Chem, 1996. **271**(46): p. 29489-96.
131. Brambilla, R., et al., *Characterization of the tyrosine phosphorylation of calpactin I (annexin II) induced by platelet-derived growth factor.* Biochem J, 1991. **278** (Pt 2): p. 447-52.
132. de Graauw, M., et al., *Annexin A2 phosphorylation mediates cell scattering and branching morphogenesis via cofilin Activation.* Mol Cell Biol, 2008. **28**(3): p. 1029-40.
133. Boratko, A. and C. Csontos, *TIMAP, the versatile protein phosphatase 1 regulator in endothelial cells.* IUBMB Life, 2017. **69**(12): p. 918-928.
134. Szulcek, R., H.J. Bogaard, and G.P. van Nieuw Amerongen, *Electric cell-substrate impedance sensing for the quantification of endothelial proliferation, barrier function, and motility.* J Vis Exp, 2014(85).
135. Way, K.J., E. Chou, and G.L. King, *Identification of PKC-isoform-specific biological actions using pharmacological approaches.* Trends Pharmacol Sci, 2000. **21**(5): p. 181-7.
136. Gschwendt, M., et al., *Inhibition of protein kinase C mu by various inhibitors. Differentiation from protein kinase c isoenzymes.* FEBS Lett, 1996. **392**(2): p. 77-80.
137. Giaever, I. and C.R. Keese, *A morphological biosensor for mammalian cells.* Nature, 1993. **366**(6455): p. 591-2.
138. Lundby, A., et al., *In vivo phosphoproteomics analysis reveals the cardiac targets of beta-adrenergic receptor signaling.* Sci Signal, 2013. **6**(278): p. rs11.
139. Huttlin, E.L., et al., *A tissue-specific atlas of mouse protein phosphorylation and expression.* Cell, 2010. **143**(7): p. 1174-89.
140. Leger, J., et al., *Conversion of serine to aspartate imitates phosphorylation-induced changes in the structure and function of microtubule-associated protein tau.* J Biol Chem, 1997. **272**(13): p. 8441-6.
141. Zhou, F.F., et al., *GPS: a novel group-based phosphorylation predicting and scoring method.* Biochem Biophys Res Commun, 2004. **325**(4): p. 1443-8.
142. Wang, C., et al., *GPS 5.0: An Update on the Prediction of Kinase-specific Phosphorylation Sites in Proteins.* Genomics Proteomics Bioinformatics, 2020. **18**(1): p. 72-80.
143. Rosario, C.O., et al., *A novel role for Plk4 in regulating cell spreading and motility.* Oncogene, 2015. **34**(26): p. 3441-51.
144. Liu, Y., et al., *Direct interaction between CEP85 and STIL mediates PLK4-driven directed cell migration.* J Cell Sci, 2020. **133**(8).

145. Xiong, Y. and T. Hla, *SIP control of endothelial integrity*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2014. **378**: p. 85-105.
146. Kimura, T., et al., *Sphingosine 1-phosphate stimulates proliferation and migration of human endothelial cells possibly through the lipid receptors, Edg-1 and Edg-3*. *Biochem J*, 2000. **348 Pt 1**: p. 71-6.
147. C, H.S.L., et al., *Current chemical biology tools for studying protein phosphorylation and dephosphorylation*. *Chemistry*, 2012. **18**(1): p. 28-39.
148. Kovacs-Kasa, A., et al., *Method for the Culture of Mouse Pulmonary Microvascular Endothelial Cells*. *Sci Pages Pulmonol*, 2017. **1**(1): p. 7-18.
149. Sedgwick, S.G. and S.J. Smerdon, *The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework*. *Trends Biochem Sci*, 1999. **24**(8): p. 311-6.
150. Xu, T.R. and M.G. Rumsby, *Phorbol ester-induced translocation of PKC epsilon to the nucleus in fibroblasts: identification of nuclear PKC epsilon-associating proteins*. *FEBS Lett*, 2004. **570**(1-3): p. 20-4.
151. Miller, R.P. and B.A. Becker, *Teratogenicity of oral diazepam and diphenylhydantoin in mice*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1975. **32**(1): p. 53-61.
152. Sagot, I., et al., *Translocation of cytosolic annexin 2 to a Triton-insoluble membrane subdomain upon nicotine stimulation of chromaffin cultured cells*. *FEBS Lett*, 1997. **410**(2-3): p. 229-34.
153. Liu, J., et al., *Nuclear annexin II negatively regulates growth of LNCaP cells and substitution of ser 11 and 25 to glu prevents nucleo-cytoplasmic shuttling of annexin II*. *BMC Biochem*, 2003. **4**: p. 10.
154. Heyraud, S., et al., *Contribution of annexin 2 to the architecture of mature endothelial adherens junctions*. *Mol Cell Biol*, 2008. **28**(5): p. 1657-68.
155. Yamada, A., et al., *Involvement of the annexin II-S100A10 complex in the formation of E-cadherin-based adherens junctions in Madin-Darby canine kidney cells*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(7): p. 6016-27.
156. Zhang, W., et al., *Annexin A2 promotes the migration and invasion of human hepatocellular carcinoma cells in vitro by regulating the shedding of CD147-harboring microvesicles from tumor cells*. *PLoS One*, 2013. **8**(8): p. e67268.
157. Waisman, D.M., *Annexin II tetramer: structure and function*. *Mol Cell Biochem*, 1995. **149-150**: p. 301-22.
158. Gladwin, M.T., et al., *Retinoic acid reduces p11 protein levels in bronchial epithelial cells by a posttranslational mechanism*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2000. **279**(6): p. L1103-9.
159. Hou, Y., et al., *Annexin A2 regulates the levels of plasmin, S100A10 and Fascin in L5178Y cells*. *Cancer Invest*, 2008. **26**(8): p. 809-15.
160. Ko, M.A., et al., *Plk4 haploinsufficiency causes mitotic infidelity and carcinogenesis*. *Nat Genet*, 2005. **37**(8): p. 883-8.
161. Lei, Q., et al., *YLT-11, a novel PLK4 inhibitor, inhibits human breast cancer growth via inducing maladjusted centriole duplication and mitotic defect*. *Cell Death Dis*, 2018. **9**(11): p. 1066.

12. Tárgyszavak

Endotél sejtek

Protein kináz C

Annexin A2

Foszfo-Ser25 Annexin A2

Reverzibilis fehérje foszforiláció

Protein foszfatáz 1

TIMAP

Sejt migráció

13. Keywords

Endothelial cells

Protein kinase C

Annexin A2

Phospho-Ser25 Annexin A2

Reversible protein phosphorylation

Protein phosphatase 1

TIMAP

Cell migration

14. Köszönetnyilvánítás

Először is szeretnék hálás köszönetet mondani témavezetőmnek Dr. Boratkó Anitának, aki támogatásával, útmutatásával és türelmével irányította PhD tanulmányaim az évek során és nagyban hozzájárult disszertációm elkészítéséhez.

Köszönettel tartozom Dr. Csontos Csillának a támogatásért és a segítő szakmai tanácsokért.

Köszönöm prof. Dr. Virág Lászlónak, az Orvosi Vegytani Intézet igazgatójának, hogy lehetővé tette számomra a munkámat az intézetben.

Szeretnék köszönetet mondani Thalwieser Zsófinak a barátságáért és támogatásáért, a laborban uralkodó jó hangulat fenntartásért és a kísérletes munkákban nyújtott segítségéért. Köszönöm a munkacsoportunk minden tagjának Fonódi Mártonnak, Dojcsák Dalmának és Barta Kittinek a sok segítséget. Köszönettel tartozom az Orvosi Vegytani Intézet minden dolgozójának a munkám során nyújtott segítségükért.

Végül de nem utolsó sorban köszönöm páromnak, családomnak és barátaimnak, hogy mindvégig segítették munkámat támogatásukkal és nyugodt, stabil hátteret biztosítottak számomra.

15. 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/415/2021.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Király Nikolett
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Király, N.**, Thalwieser, Z., Fonódi, M., Csontos, C., Boratkó, A.: Dephosphorylation of annexin A2 by protein phosphatase 1 regulates endothelial cell barrier. *IUBMB Life*. [Epub ahead of print], 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/iub.2538>
IF: 3.885 (2020)
2. **Király, N.**, Csontos, C., Boratkó, A.: Ser69 phosphorylation of TIMAP affects endothelial cell migration. *Exp. Lung Res*. [Epub ahead of print], 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/01902148.2021.1960651>
IF: 2.459 (2020)





További közlemények

3. Aladdin, A., Yao, Y., Yang, C., Kahlert, G., Ghani, M., **Király, N.**, Boratkó, A., Uray, K., Dittmar, G., Tar, K.: The Proteasome Activators Blm10/PA200 Enhance the Proteasomal Degradation of N-Terminal Huntingtin.
Biomolecules. 10 (11), 1-33, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/biom10111581>
IF: 4.879
4. Thalwieser, Z., **Király, N.**, Fonódi, M., Csontos, C., Boratkó, A.: Protein phosphatase 2A-mediated flotillin-1 dephosphorylation up-regulates endothelial cell migration and angiogenesis regulation.
J. Biol. Chem. 294 (52), 20196-20206, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.RA119.007980>
IF: 4.238

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 15,461

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 6,344

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

Debrecen, 2021.08.23.

