

**Doktori (PhD) értekezés tézisei**

**A protein foszfatáz 2A B55 $\alpha$  holoenzim új kölcsönható partnerei és szerepük az angiogenezisben**

Thalwieser Zsófia

Témavezető: Dr. Boratkó Anita



**DEBRECENI EGYETEM**  
Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2025

**A protein foszfatáz 2A B55 $\alpha$  holoenzim új kölcsönható partnerei és szerepük az angiogenezisben**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében  
az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: Thalwieser Zsófia okleveles biotechnológus

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

Témavezető: Dr. Boratkó Anita

Az értekezés bírálói:

Dr. Köröskényi Krisztina, PhD  
Dr. Sipeki Szabolcs, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Dr. Csernoch László, MTA doktora  
tagok: Dr. Balla András, PhD  
Dr. Kristóf Endre Károly, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK,  
Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme  
2025. június 24. 12:00 óra

## 1. Irodalmi áttekintés

### 1. 1. Az endotél sejtek és élettani szerepük

Az endotél sejtek (EC) az érrendszer egyik legfontosabb szabályozó elemei, ugyanis egy félig átteresztő monolayer sejtréteget (endotéliumot) alkotva választják el a keringő vért a környező szövetektől. Szabályozzák az erek rugalmasságát, a vérerek átteresztőképességét, a véralvadás és a gyulladási folyamatokat. Az endotéliumot alkotó sejtek szerkezete, illetve funkcionális integritása kitüntetett szereppel bír az érfal és a megfelelő keringés fenntartásában. Az extracelluláris mátrix (ECM) elengedhetetlen az EC érképzési folyamataiban, sejtmigrációjában, proliferációjában, morfogenezisében, valamint a sejtek stabilitásának fenntartásában. Az EC-k a keringésen belüli fizikai, illetve kémiai ingerekre reagálnak, ezáltal szabályozzák többek között a véralvadást, a vazomotoros tónust, valamint az immun-, és gyulladási válaszokat. Kulcsfontosságúak a vaszkulogenezis és angiogenezis folyamataiban.

### 1.2. Az angiogenezis folyamata

A kezdeti vérerek az embrióban az ún. vaszkulogenezis révén képződnek, mely során a prekursor sejtek (angioblasztok) EC-ké differenciálódnak és vaszkuláris labirintust alkotnak. Ezzel szemben az angiogenezis során új erek keletkeznek a meglévő érrendszerből, amely az érhálózat bővítéséért és kialakulásáért felelős. Az angiogenezis számos élettani folyamatban játszik fontos szerepet, például fejlődésben, szaporodásban és sebgyógyulásban, ugyanakkor patológiás folyamatokban, például daganatos megbetegedésekben is kiemelt jelentőséggel bír. Az angiogenezis egy erősen szabályozott folyamat, amelyben számos oldható és membránhoz kötött molekula, valamint egyéb faktorok vesznek részt. Ezt a folyamatot különböző citokinek, növekedési faktorok és mátrixfehérjék irányítják. Ilyen szabályozó molekula például az vaszkuláris endotél növekedési faktor (VEGF), az angiopoietinek és Tie receptorok, transzformáló növekedési faktor béta (TGF- $\beta$ ) és a fibroblaszt növekedési faktor (FGF) család tagjai. Az angiogenezis első lépése az aktiváció, amelynek fő modulátorai az alacsony oxigén- és tápanyagellátás, valamint a gyulladás. Ezen fiziológiás állapotok különböző folyamatok révén fokozzák a citokinek és egyéb növekedési faktorok expresszióját. Krónikus gyulladás következtében az EC-k aktiválódnak, amely tovább serkenti az érrendszeri csírázást, rendellenes érszerkezetet és funkciót eredményezve.

### 1.3. Protein foszfatázok

A fehérjék reverzibilis foszforilációja számos sejt folyamat szabályozásának alapját képezi. Eukarióta sejtekben a fehérjék Ser, Thr és Tyr oldalláncokon foszforilálódhatnak. A fehérjék foszforilációs állapota az élettani szükséglettől függően változik, melyet a protein kinázok, illetve protein foszfatázok szabályoznak. A protein foszfatázok a foszoproteinekről foszfát csoportot távolítanak el, miközben foszforsav-monoésztereket hidrolizálnak foszfátcsoporttá és szabad hidroxil csoportot tartalmazó molekulává. Szubsztrátspecificitásuk alapján a protein foszfatázokat három csoportba sorolják: Ser/Thr specifikus foszfatázok, Tyr specifikus foszfatázok, illetve vannak kettős specificitással rendelkező protein foszfatázok. A Ser/Thr specifikus protein foszfatázok szerkezetük alapján lehetnek foszoprotein foszfatázok (PPP), fémion függő protein foszfatázok (PPM), valamint CTD-foszfatázok (FCP/SCP). A PPP-ket további hét alcsoportba lehet sorolni: PP1, PP2A, PP2B (kalcineurin), PP4, PP5, PP6, PP7.

### 1.4. A protein foszfatáz 2A (PP2A) szerkezete

A PP2A egy széles körben tanulmányozott Ser/Thr specifikus protein foszfatáz, számos sejt típusban expresszálódik, illetve több biológiai folyamatban is fontos szerepet játszik. A sejtekben a PP2A heterodimer és heterotrimer formában is előfordulhat. A szerkezeti A alegységből (PP2A A/ PPP2AR1/PR65) és katalitikus C alegységből (PP2A C/PPP2C) álló heterodimer formához (core dimer) kötődhet a regulátor B alegység, kialakítva a heterotrimer formát. Mind a szerkezeti A alegység, mind a katalitikus C alegység két közel azonos nukleinsav szekvenciájú izoformával rendelkezik. Heterotrimer formában a szerkezeti funkcióval bíró PP2A A alegységéhez először a katalitikus C alegység kötődik, megkönnyítve ezzel a regulátor alegység, illetve az egyéb szubsztrátokkal történő kölcsönhatás kialakítását. A regulátor B alegység családnak négy, szerkezetileg eltérő fehérje alcsoportja van (B/B55/PR55, B'/B56/PR61, B''/B72/PR72, B'''/PR93(SG2NA)/PR110(Striatin). Az alcsoportok tagjai nem mutatnak szerkezeti hasonlóságot, valamint a változatosságot tovább fokozza az alcsoportokon belül előforduló több izoforma. A regulátor alegységek alcsoporttól és izoformától függetlenül a szerkezeti A alegység ugyanazon szekvenciáját ismerik fel és kötődnek hozzá. Genetikai és biokémiai vizsgálatok is igazolták, hogy a különböző B regulátor alegységek határozzák meg a holoenzim sejtben belüli lokalizációját és szubsztrátspecificitását. A lehetséges A-B-C

alegységekből felépülő holoenzimek számát 96-ra becsülik, azonban a valóban létező komplexek pontos száma nem ismert.

### 1.5. A PP2A biológiai funkciója

A PP2A holoenzim változatos szerkezetéből adódóan több biológiai folyamatban is szerepet játszik, mint például a sejtciklusban, a DNS replikációban, a transzkripcióban és translációban, a jelátvitelben, a sejtproliferációban, a citoszkeleton dinamikájában, a sejtek mozgásában, valamint az apoptózisban is. Virális fehérjékkel történő kölcsönhatása révén befolyásolja a sejtranszfomációt, valamint tumorszuperszor hatását is kimutatták. A holoenzim szerkezetétől függően képes elősegíteni, mind a pro-, mind az anti-apoptotikus jelátviteli folyamatokat. A citoszkeleton szerkezetének szabályozásában a különböző citoskeletális és mikrotubulushoz kötött fehérjék defoszforilációja révén játszik szerepet.

### 1.6. A flotillin-1 fehérje

A flotillin fehérje családod a flotillin-1 (reggie-2) és a flotillin-2 (reggie-1) fehérjék alkotják. Ezen fehérjék számos sejttypusban megtalálhatóak, bár a fehérjék lokalizációja sejttypusonként változó. A flotillin fehérjék szerkezeti jellemzője az N-terminális végen található SPFH (stomatin, prohibitin, flotillin és HflK/C) vagy más néven PHB (prohibitin) domén, valamint a C-terminális régióon található alaninban és glutamátban gazdag rövid ismétlődő motívumok (flotillin ismétlődések). Ezen fehérjék olyan membránfehérjék, melyek a sejt felszíni receptorok és a citoszkeleton közti kapcsolatok kialakításában, illetve a jelátviteli folyamatokban játszanak szerepet. A flotillin-1 poszttranszlációs módosításait tekintve, egyetlen palmitoilációs hely (Cys<sup>34</sup>) ismert, valamint a Fyn kináz a fehérjét a Tyr<sup>160</sup> oldalláncon foszforilálja.

### 1.7. A thrombospondin-1 (TSP1) fehérje

A thrombospondinok (TSP-k) mátricelluláris glikoproteinek, melyek számos sejttypusban expresszálódnak. Fiziológias körülmények között alacsony szinten vannak jelen az ECM-ben, azonban szövetkárosodás vagy kóros állapotok esetén expressziós szintjük szignifikánsan megemelkedik. A TSP fehérjecsáladot öt fehérje alkotja (TSP1, TSP2, TSP3M TSP4 és TSP5/COMP). A TSP fehérjék kulcsfontosságú szerepet játszanak a sejt-sejt és sejt-

mátrix közti kommunikáció kialakításában. A TSP1 fehérjét először, mint „thrombin-érzékeny” fehérje azonosították. Számos sejttípus szekretálja, többek között az EC-k is. Szerkezetét tekintve a TSP1 egy amino-terminális (N-terminális) és egy karboxil-terminális (C-terminális) globuláris doménből, egy homológ prokollagén (PC) régióból (más néven von Willebrand C ismétlődésből (vWC)) áll, melyet három specifikus ismétlődő szekvencia követ: az 1-es, 2-es és 3-as típusú ismétlődő szekvencia (TSR). A domének több különböző molekula megkötésére képesek, ebből adódóan a fehérje széleskörű funkcióval rendelkezik. Az integrinokkal való kölcsönhatása révén szerepet játszik a sejttapadásban, migrációban, proliferációban és terjedésben, ezáltal befolyásolva az EC-k biológiai funkcióját. Sokféle szabályozó szerepet tölt be a sejtfolyamatokban, de legjelentősebb feladata, hogy különböző kölcsönhatások révén képes gátolni az angiogenezis folyamatát. A TSP1 poszttranszlációs módosításairól keveset tudunk, azonban a fehérje szekvenciája számos potenciális helyet tartalmaz.

## 2. Célkitűzés

Munkacsoportunk egyik kiemelt kutatási területe a PP2A enzim szerepének részletesebb feltárása EC-kben. A Ser/Thr specifikus protein foszfatázok családjába tartozó PP2A számos fontos sejtfunkciót szabályoz. Korábbi kutatásainkban kimutattuk, hogy a B55 $\alpha$  regulátor alegységet tartalmazó PP2A holoenzim kulcsszerepet játszik az endotél barrier funkció szabályozásában, valamint a  $\beta$ -catenin defoszforilációjában. Jelenlegi munkánk célja volt, hogy további ismereteket szerezzünk a PP2A holoenzim szubsztrát fehérjéről, illetve az EC-k fiziológiai folyamataiban betöltött szerepéről. Ennek érdekében a PP2A egy új kölcsönható partnerének azonosítását és a kölcsönhatás fiziológias jelentőségének feltárását terveztük. Ehhez alábbi kutatási célokat tűztük ki:

- ❖ Korábban létrehozott rekombináns GST-PP2A B55 $\alpha$  fehérje felhasználásával új kölcsönható partner azonosítása EC-kben.
- ❖ Az újonnan felfedezett kölcsönható partner és a PP2A B55 $\alpha$  fehérjék közötti kölcsönhatás igazolása pull down, Western blot, Far Western blot, immunprecipitációs, illetve immunfluoreszcens technikákkal.
- ❖ A PP2A és a kölcsönható partner enzim-szubsztrát kapcsolatának feltérképezése, különös tekintettel az esetleges defoszforiláció szerepére az EC-k működésében

A PP2A számos biológiai folyamatban játszik fontos szerepet, mint például a sejtosztódás, a citoszkeleton dinamikája és a sejtmobilitás. Ezen kívül tumorszuppressorként is működik és foszfatáz aktivitásán keresztül az EC-k angiogenezisére is hatással lehet. Ezek alapján szeretnénk volna a PP2A B55 $\alpha$  szerepét megvizsgálni az angiogenezishez kapcsolódó jelátviteli útvonalakban, az alábbi célkitűzéseken keresztül:

- ❖ A PP2A B55 $\alpha$  fehérje depléciójának hatásának vizsgálata az angiogenezishez kapcsolódó fehérjékre Proteome profiler angiogenezis array felhasználásával.
- ❖ A kölcsönhatás feltérképezése molekuláris biológiai technikákkal.
- ❖ A PP2A B55 $\alpha$  és a célfehérjéi közötti kapcsolat tanulmányozása, beleértve az enzim-szubsztrát viszonyt.
- ❖ A PP2A B55 $\alpha$  szerepének vizsgálata az angiogenezis során az új kölcsönható partner szabályozásán keresztül.

### 3. Anyagok és módszerek

*Polimeráz láncreakció (PCR).* A PP2A B55 $\alpha$ , a flotillin-1 és a TSP1 kódoló szekvenciájának cDNS-ből, vagy templát szekvenciából történő felszorzásához specifikus primer párokat alkalmaztunk. A létrehozott DNS szekvenciákat bakteriális vagy emlős expresszióra alkalmas vektorba klónoztuk.

*Kvantitatív Real-Time PCR (qPCR).* A reakcióhoz Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mixet (Thermo Scientific) alkalmaztunk a gyártó által ajánlott protokoll alapján. A mérésekhez a LightCycler 480 Thermocycler (Roche, Basel, Svájc) műszert használtuk.

*Agaróz gélelektroforézis és DNS tisztítás gélből.* A vizsgálandó DNS méretétől függően 0,9%-1,2% agarózt, illetve 2000x hígításban GelRed (Biotium Inc) nukleinsav festéket tartalmazó géleket használtunk fel. A fragmentumok méretének ellenőrzésére 1kb DNS létrát (Thermo Fischer Scientific) alkalmaztunk. A futtatást 60-80 V-on végeztük 1xTAE pufferben. A gélből UV megvilágítás mellett, steril szikével vágtuk ki a DNS sávokat, majd Thermo GeneJET Gel Extraction (Thermo Fischer Scientific) kit segítségével, a gyártó által leírt protokoll alapján a DNS-t kinyertük a gélből. A DNS eluálását 50-55°C-os vízfürdőben nukleázmentes vízben végeztük. Az izolált DNS tisztaságát és koncentrációját NanoDrop 2000 spektrofotométer segítségével mértük le.

*Restriktív emésztés.* A klónozáshoz használt inzerteket és vektorokat, valamint a back-to-back PCR során felszorzított terméket a megfelelő restriktív endonukleázokat tartalmazó reakció közegben emésztettük 1 órán keresztül, 37°C-os vízfürdőben. A felhasznált FastDigest restriktív endonukleázok mindegyike a Thermo Scientific<sup>TM</sup>-től származott.

*Ligálás.* Az előzőleg restriktív enzimekkel előkészített vektort és inzertet, illetve a lineáris back-to-back foszfomutáns plazmidokat steril körülmények között, T4 DNS ligáz enzim (Thermo Fischer Scientific) jelenlétében 1 órán keresztül szobahőmérsékleten, vagy egy éjszakán keresztül 4°C-on inkubáltuk, majd a ligálási elegyeket JM109 *E.coli* kompetens sejtekbe transzformáltuk.

*Transzformálás.* A ligálási elegyet 100 $\mu$ l JM109 *E.coli* kompetens sejthez mértük és 20 percen keresztül jégen inkubáltuk. Ezt követően a mintákat 45 másodpercig 42°C-os vízfürdőbe helyeztük, majd újra 2 percig jégen inkubáltuk. Ezután 20mM glükóz tartalmú SOC oldatot adtunk a sejtekhez és 45 percen keresztül, 37°C-on 180rpm fordulatszámon rázattuk, hogy

kialakuljon az antibiotikum rezisztencia. A transzformált sejtekből antibiotikum tartalmú LB-agar plate-re szélesztettünk, melyeket egy éjszakán keresztül 37°C-os inkubátorba helyeztünk.

*Plazmid tisztítás és DNS szekvenáltatás.* A felnőtt telepeket antibiotikum tartalmú LB tápoldatba oltottunk és 16-18 órán keresztül 37°C-on, 180rpm-en ráztuk. A baktérium sejtszuszpenzió mennyiségétől függően Thermo GeneJET Plazmid Miniprep Kittel (Thermo Fischer Scientific), vagy GeneJET plazmid Maxiprep kittel (Thermo Fischer Scientific) tisztítottuk a DNS-t. Az izolált DNS-t NanoDrop 2000 műszerrel és restriktációs emésztéssel ellenőriztük. A létrehozott pontmutációkat és a klónozás sikerességét szekvenáltatással validáltuk, amelyet a BIOMI Kft. (Gödöllő) végzett.

*Bakteriális fehérje expresszió optimalizálása, GST-fúziós fehérjék termeltetése.* A GST-címkével ellátott fehérjéket kódoló plazmidokat BL21(DE3) *E.coli* kompetens sejtekbe transzformáltuk. A leoltott telep 16-18 órás rázatását követően a sejtszuszpenziót 1:1000 arányban hígítottuk 2xYT oldatban és OD<sub>600</sub>: 0,5-ig növesztettük a sejteket, 37°C-on, 180rpm-en. A fehérje termeltetés optimalizálását különböző koncentrációjú izopropil-1-tio-β-D-galaktozid (IPTG) és különböző hőmérsékleten (13°C, 25°C és 37°C) optimalizáltuk.

*Rekombináns fehérjék tisztítása.* A baktérium sejteket proteáz inhibitor koktélt (1:1000) tartalmazó lízis pufferben szuszpendáltuk, majd Branson Sonifer (AMS Materials) műszerrel homogenizáltuk. Ultrahangos kezelést követően mintát vettünk (totál), majd a maradék feltárt lizátumot 12000 rpm-en, 4°C-on, 20 percen keresztül centrifugáltuk. Ezt követően újabb mintát vettünk (feltárt minta), majd a felülúszót előzőleg 1x PBS-sel átmosott glutathion Sepharose 4B gyantára mértük és 4°C-on forgattuk.

*Tüdő artéria endotél sejtek tenyésztése.* Kísérleteinkhez marha tüdő artéria EC-eket (BPAEC) használtunk. A sejteket 10% hőinaktivált FBS-t (Sigma Aldrich), 1% nem esszenciális aminosavat (Lonza), 1% Na-piruvát-ot (Lonza) és 2mM L-glutamint tartalmazó komplett médiumban (Minimum Essential Media, Lonza) tenyésztettük 37°C-on, 5% CO<sub>2</sub> tartalmú és 95% páratartalmú inkubátorban. A BPAEC sejteket a 16.-21. passzási szám között használtuk.

*Transzfektálás, géncsendesítés és kezelések.* A 80%-os konfluenciával rendelkező BPAEC sejteket Lipofectamine 3000 és P-reagens felhasználásával (Invitrogen™; #L3000015) transzfektáltuk a rekombináns plazmidokkal, a gyártó protokollja alapján. A géncsendesítés során fehérje specifikus siRNS-t használtunk Lipofectamine RNAiMAX transzfekciós reagenssel (Invitrogen™). A kezeléseket követő poszttranszfekciós időtartamot optimalizáltuk.

*Pull down technika.* A glutathione Sepharose 4B gyantán immobilizált rekombináns fehérjékhez endotél sejtlizátumot adtunk és a mintákat 16-18 órán keresztül 4°C-on forgattuk.

*SDS-PAGE, Western blot és Far Western blot.* A fehérjék molekulatömeg szerinti elválasztását 8-12% akrilamidot tartalmazó poliakrilamid gélen végeztük. Az elválasztott fehérjéket 0,45µm pórusú nitrocellulóz membránra (Advantec MFS Inc.) transzferáltuk át. Ezután a membránt 5%-os sovány tejporban (TBST-ben oldva) inkubáltuk 1 órán keresztül, majd 16-18 órán keresztül, 4°C-on 0,1% BSA-t és elsődleges fehérje-specifikus antitest tartalmú TBST oldattal inkubáltuk. Másnap a membránt 1 órán keresztül szobahőmérsékleten anti-egér/anti-nyúl IgG, HRP-konjugált másodlagos antitesttel inkubáltuk. A fehérjéket Chemidoc Touch (Bio-Rad) műszerrel detektáltuk. Far Western blot esetében a GST-címkével ellátott fehérjéket SDS-PAGE gélen választottuk el, majd nitrocellulóz membránra transzferáltuk. A membránt 1 órán keresztül 5%-os BSA-ban blokkoltuk 1 órán keresztül, majd endotél sejtlizátummal inkubáltuk 16-18 órán keresztül 4°C-on. Következő nap a membránt 4 órán keresztül 4°C-on specifikus elsődleges antitesttel (0,1% BSA, TBST), majd anti-nyúl/anti-egér IgG, HRP konjugált másodlagos antitesttel inkubáltuk. A kemilumineszcenciás jeleket Chemidoc Touch műszerrel detektáltuk.

*Proteome Profiler Angiogenesis Array.* A Proteome Profiler Human Angiogenesis Array Kit (Bio-Techne R&D System Kft) speciális membránjára, amely 55 humán angiogenezishez kapcsolódó fehérjét képes egyidejűleg felismerni, nem targetáló-, és siRNS-sel transzfektált sejtlizátumot mértünk a gyártó protokolljának megfelelően. A membránokat egyidejűleg 30 másodperces expozícióval fotóztuk. Az eredmények kiértékeléséhez ImageJ szoftvert használtunk.

*Immunprecipitáció (IP).* Az EC-eket szonikálással feltártuk majd centrifugáltuk. Előtisztítási lépésben a nem specifikusan kötődő fehérjéket eltávolítottuk, majd az immunprecipitálni kívánt fehérjére specifikus antitestet és protein G-Sepharose-t (GE Healthcare) adtunk a felülúszóhoz és 16-18 órán keresztül 4°C-on forgattuk. Másnap a mintákat mostuk és 2x SDS mintapufferrel főzéssel eluáltuk.

*Immunfluoreszcencia (IF) és konfokális mikroszkópia.* A fedőlemezekben tenyésztett sejteket 3,7% paraformaldehid tartalmú PBS oldattal fixáltuk, 0,5% Triton X-100 tartalmú TBS oldattal permeabilizáltuk, majd 2% BSA-val blokkoltuk. Ezt követően a sejteket 1 órán keresztül fehérje specifikus elsődleges antitesttel, majd 1 órán keresztül, fénytől elzárva fényérzékeny másodlagos antitesttel inkubáltuk. SlowFade Gold antifade reagens (Molecular Probes)

segítségével rögzítettük a fedőlemezeket tárgylemezekre. Az immunfluoreszcens képeket Leica TCS SP8 konfokális mikroszkóppal, HC PL APO CS2 63x 1.40NA immerziós objektívvel készítettük. Az immunfluoreszcens felvételeket a Las AF szoftverrel értékeltük ki.

*Proximity Ligation Assay (PLA).* Az EC-k fixálását, permeabilizálását és blokkolását követően, a fehérjékre specifikus elsődleges antitestekkel inkubáltuk egyszerre 1 órán keresztül. A PLA-t a Duolink In Situ Kit-tel (Sigma-Aldrich) a gyártó utasítási szerint végeztük. A sejtekről Leica TCS SP8 konfokális mikroszkóppal készítettünk felvételeket.

*In vitro PKC foszforiláció és in vitro defoszforiláció.* *In vitro* foszforiláció esetén a tisztított rekombináns fehérjét aktív PKC enzimmel inkubáltuk 30°C-on 2 órán keresztül a gyártó által javasolt pufferben. A foszforiláció sikerességét Western blot technikával, foszfo-specifikus antitest felhasználásával ellenőriztük. *In vitro* defoszforiláció során glutathion Sepharose gyantán immobilizált és foszforilált rekombináns fehérjéhez különböző kezelt EC-k lizátumát adtuk. A fehérjék defoszforilációját foszfo-specifikus antitest felhasználásával Western blottal ellenőriztük.

*Sejtfractionálás.* A sejtek membrán és citoplazma frakcióinak izolálásra ProteoJET Membrane Protein Extraction Kit-et (Thermo Scientific) alkalmaztunk a gyártó által leírt protokoll alapján. A frakciók tisztaságát membrán, citoplazma és magi markerekkel ellenőriztük.

*NanoBIT rendszer.* Pozitív kontrollként a gyártó által létrehozott SmBiT-PRKACA és LgBiT-PRKAR2A plazmidokat alkalmaztunk, melyek a protein kináz A (PKA) katalitikus, illetve regulátor alegységeit kódolják. Negatív kontrollként a HaloTag-SmBiT-et kódoló NanoBiT negatív kontroll vektort ko-transzfectáltuk az általunk előállított LgBiT-PP2A B55 $\alpha$  plazmiddal. A kölcsönhatásból származó lumineszcenciás jeleket Tecan Spark multimode microplate reader (Tecan Group) segítségével detektáltuk.

*ECIS mérések (electric cell-substrate impedance sensing).* A sejtek letapadását, migrációját és sebgyógyulását nagy érzékenységű, nem invazív biofizikai módszerrel vizsgáltuk az irodalmi hivatkozásoknak megfelelően. Sebgyógyulási kísérletek során egyszeri magas impulzussal előidézett sebzés gyógyulását valós időben követtük nyomon.

*Scratch assay.* Az endotél sejtrétegen egyenletes mozdulattal karcolást végeztünk. A sejtek sebgyógyulási képességét óránként fotóztuk Leica MC 120 HD mikroszkóppal, 5x nagyítású objektív használatával. A sebzáródás mértékét az ImageJ szoftver segítségével értékeltük ki.

*In vitro angiogenesis.* Az EC-eket kondicionált médium jelenlétében Matrigel-t tartalmazó  $\mu$ -Slide plate-be (Ibidi) mértük. A sejtek érképzési képességét óránkénti fotózással követtük nyomon, Leica MC 120 HD mikroszkóp felhasználásával. Az érképzés kiértékelését ImageJ szoftverrel végeztük el.

*3D mágneses sejttenyésztés.* Az EC-eket NanoShuttle-PL mágneses gyöngyökkel magnetizáltuk a gyártó leírása alapján. A magnetizált sejteket sejttaszító edénybe mértük, majd az edény alá speciális mágneses modult helyeztünk, amely által 16-18 óra inkubálás során a mágnesezett sejtek egy pontba tömörülve 3D szferoidokat képeztek. A modul eltávolítását követően meghatározott időpontokban készített felvételekkel követtük nyomon a szferoidok változásait. A készített fotókat ImageJ programmal értékeltük ki.

*Anti V5-agaróz affinitás gél.* A BPAEC sejteket V5-His-címkét tartalmazó rekombináns konstrukciókkal transzfektáltuk. Másnap a transzfektált sejteket szonikálással tártuk fel, majd a feltárt sejtlizátumhoz anti-V5 agaróz gyantát adtunk és 5 órán keresztül 4°C-on forgattuk. Mosást követően a mintákat 1x SDS mintapufferrel eluáltuk és Western blottal ellenőriztük.

*Statisztikai analízis.* Az eredményeket átlag  $\pm$  SD formában adtuk meg. A statisztikai analízist GraphPad Prism (8.0.1-es verzió) szoftverrel végeztük a megjelölt tesztek alapján. A szignifikáns különbségek csillaggal (\*) jelöltük ( $p < 0.05$  (\*);  $p < 0.01$  (\*\*);  $p < 0,001$  (\*\*\*)). Az immunblottok denzitometrálását ImageJ (1.54h verzió) szoftver segítségével végeztük.

## 4. Eredmények

### 4.1. A PP2A egy új kölcsönható partnerének azonosítása és ezen kölcsönhatás fiziológias jelentőségének feltárása

#### 4.1.1. A flotillin-1 fehérje azonosítása, mint a PP2A B55 $\alpha$ új kölcsönható partnere endotél sejtekben

A PP2A B55 $\alpha$  alegység új kölcsönható partnerének azonosításához létrehoztuk a pGEX-4T-2-PP2A B55 $\alpha$  rekombináns plazmidot. A GST és GST-PP2A B55 $\alpha$  fehérje glutation Sepharose 4B gyantán történő tisztítását követően, az immobilizált fehérjéket marha tüdő artéria EC sejtizátummal inkubáltuk. Az EC sejtizátummal inkubált mintánál a kontroll GST mintákhoz képest 45kDa-nál egy halvány extra sáv jelent meg, melyet a gélből kivágtuk és LC-MS/MS tömegspektrometriás azonosításra küldtük, ahol a flotillin-1 fehérjeként azonosították. A PP2A B55 $\alpha$  és flotillin-1 fehérjék közti kölcsönhatás kimutatását a pull down minták Western blot analízisével is igazoltuk.

#### 4.1.2. A rekombináns GST-flotillin-1 fehérje létrehozása

A flotillin-1 kódoló szekvenciáját PCR technikával sokszorozítottuk fel humán tüdő artéria EC-kból származó cDNS felhasználásával. A PCR terméket agaróz gélelektroforézissel választottuk el. Izolálást, ligálást, transzformálást és tisztítást követően a rekombináns plazmidokat restriktív emésztéssel ellenőriztük. A restriktív analízis eredményeként megállapítottuk, hogy a plazmidok tartalmazzák a flotillin-1 szekvenciáját, melyet a BIOMI Kft. által történt szekvenálás is megerősített.

A szekvenáltatott rekombináns plazmidokat BL21 (DE3) *E. coli* kompetens sejtekbe transzformáltuk, melyet különböző hőmérsékleten és IPTG koncentrációkkal indukáltuk. Az optimalizálást követően a GST-címkével ellátott flotillin-1 fehérjét glutathion Sepharose 4B gyantán tisztítottuk.

Pull down vizsgálattal és immunprecipitációval igazoltuk, hogy a flotillin-1 fehérje a PP2A holoenzim B55 $\alpha$  (regulátor) alegységével közvetlen vagy közvetett módon kölcsönhat. Továbbá anti V5-agaróz affinitás gél felhasználásával kimutattuk, hogy a flotillin-1 izoforma specifikusan csak a PP2A B55 $\alpha$  alegységgel lép kölcsönhatásba.

#### 4.1.3. A PP2A B55 $\alpha$ és flotillin-1 fehérje kolokalizál az endotél sejtekben

EC-kben az endogén fehérjék immunfluoreszcens festése alapján a PP2A B55 $\alpha$  fehérje egyenletesen oszlott el a citoplazmában, míg a flotillin-1 fehérje szintén a citoplazmában volt megtalálható, de szálas szerkezetet mutatott. A két fehérje a sejtek citoplazmájában, jellemzően a sejtmag körül mutatott ko-lokalizációt.

#### *4.1.4. A PP2A aktivitásának hatása a flotillin-1 fehérje sejtben belüli lokalizációjára*

A sejteken immunfluoreszcens festést megelőzően különböző kezeléseket alkalmaztunk, melyek a PP2A, valamint a PKC aktivitására voltak hatással. A PKC enzimet PMA hozzáadásával aktiváltuk és Gö6976 kezeléssel gátoltuk. A PP2A enzim aktivitását okadánsavval gátoltuk, valamint a B55 $\alpha$  csendesített sejteken is elvégeztük az immunfestést. A PP2A aktivitásának gátlása okadánsavval vagy a regulátor B55 $\alpha$  alegység depléciójával a flotillin-1 fehérje sejtmembrán körüli feldúsulását okozta. A PKC enzim PMA-val történő aktivációja hasonló lokalizációs változást idézett elő a flotillin-1 esetében. Azonban a PKC aktivitásának gátlása a flotillin-1 fehérje sejtmembránba történő transzlokációját okozta. Ezen eredményeket sejtfractionálást követő Western blot analízissel is alátámasztottuk.

#### *4.1.5. Foszfomutáns flotillin-1 fehérjék létrehozása pontmutációval*

Irodalmi adatok alapján a flotillin-1 fehérje a Ser<sup>315</sup> oldalláncon foszforilálódik. Ennek vizsgálatához PCR technika felhasználásával, pontmutációval Ser<sup>315</sup> foszfonull (S315A) és foszforilációt utánzó (S315D) flotillin-1 mutánsokat hoztunk létre. A rekombináns plazmidoknál szekvenáltatással igazoltuk, hogy tartalmazzák a mutációhoz szükséges nukleotid cseréket, majd létrehoztuk a GST-címkével ellátott flotillin-1 S315A és S315D rekombináns fehérjéket. A fehérjék lokalizációjának vizsgálata alapján a vad típusú- és a foszfonull S315A flotillin-1 fehérjék homogén elrendeződést mutattak a citoplazmában, míg a foszforilációt utánzó flotillin-1 S315D a sejtmag körül halmozódott fel, mely összhangban van az endogén fehérje lokalizációs változásaival.

#### *4.1.6. A flotillin-1 Ser<sup>315</sup> oldallánconak foszforilációja hatással van a PP2A fehérjével való kölcsönhatására*

Kontrol és PMA-val kezelt sejtekkel Proximity Ligation Assay (PLA) módszert végeztünk. A kezeletlen sejtekben is detektáltunk kölcsönhatást, azonban PMA kezelés hatására szignifikánsan több fluoreszcens jel jelent meg, mely arra utal, hogy a foszforilált flotillin-1 és PP2A között erősebb a kölcsönhatás.

A glutathion Sepharose 4B gyantán tisztított vad típusú, S315A és S315D GST-flotillin-1 fehérjékkel *in vitro* PKC foszforilációs kísérletet végeztünk. A rekombinánsok foszforilációját Western blot technikával vizsgáltuk, foszfo-Ser PKC szubsztrát specifikus antitest felhasználásával. A Western blot eredmények alapján, csak a vad típusú GST-flotillin-1 mutatta a PKC foszforiláció jelét, míg a foszfonull, illetve foszforilációt utánzó mutánsok nem. Ezek alapján a PKC enzim csak a Ser<sup>315</sup> oldalláncot foszforilálja a flotillin-1 fehérjét.

Az EC-ket pcDNA3.1 myc/His A (-) – flotillin-1 WT és S315A konstrukciókkal transzfektáltuk, majd PMA-val kezeltük őket és immunprecipitációs technikával kimutattuk, hogy a PKC enzim a Ser<sup>315</sup> oldalláncot foszforilálja.

#### *4.1.7. A PP2A defoszforilálja a flotillin-1 fehérjét endotél sejtekben*

A PP2A B55 $\alpha$  és flotillin-1 fehérjék kölcsönhatásának dinamikáját úgynevezett NanoBiT rendszerrel vizsgáltuk. A rendszer két alegységből az LgBiT-ből (17,6 kDa) és az SmBiT-ből (11 aminosav) áll, amelyeket rekombináns módon kapcsoltunk a vizsgálandó fehérjékhez. Amennyiben a fehérjék között kölcsönhatás alakul ki, az LgBiT és SmBiT alegységek összekapcsolódása lumineszcens jelet generál. A szükséges konstrukciókat klónozással állítottuk elő, majd az EC-ket ko-transzfektáltuk az LgBiT-PP2A B55 $\alpha$  és SmBiT-flotillin-1 vad típusú, illetve foszfo-mutáns konstrukciókkal. A lumineszcens jel igazolta a PP2A B55 $\alpha$ , illetve a flotillin-1 mindhárom formája közötti kölcsönhatást. A legerősebb lumineszcencia jelet a PP2A B55 $\alpha$  és a foszforilációt utánzó flotillin-1 S315D kölcsönhatása okozta. A vad típusú flotillin-1 és a PP2A B55 $\alpha$  közötti kölcsönhatás dinamikája összefüggésbe volt hozható a flotillin-1 reverzibilis foszforilációjával.

A flotillin-1 fehérje defoszforilációjának vizsgálatához glutathion Sepharose 4B gyantán immobilizált GST-flotillin-1 fehérjét foszforiláltuk PKC enzimmal, majd a foszforilált flotillin-1 fehérjét lízis pufferrel, sejtlyázattal, okadánsavval, tautomocetinnel (TM, PP1 inhibitor), nem targetáló siRNS-sel illetve PP2A B55 $\alpha$  specifikus siRNS-sel előkezelt sejtlyázattal inkubáltuk. A nem kezelt, TM-t tartalmazó és nonsiRNS-sel kezelt sejtlyázatum defoszforilálta a rekombináns fehérjét, de az okadánsavval (OA) vagy PP2A B55 $\alpha$  specifikus siRNS-sel kezelt sejtlyázatum esetében a defoszforiláció gátolt volt, így a fehérje foszforilált állapotban maradt, ezek alapján a flotillin-1 fehérje a PP2A B55 $\alpha$  szubsztrátja.

#### *4.1.8. A foszfonull flotillin-1 forma megnövekedett membrán lokalizációt mutat, továbbá szerepet játszik a sejt migrációban és az angiogenezisben.*

Az EC-eket vad típusú-, S315A-, illetve S315D flotillin-1 fehérjét kódoló plazmidokkal transzfektáltuk, majd immunfluoreszcens technikával festettük meg. A vad típusú flotillin-1 a sejtek citoplazmájában lokalizálódott. A foszforilációt utánzó flotillin-1 S315D a sejtmag körül dúsult fel, mint az endogén flotillin-1 fehérje PKC aktiválást vagy PP2A gátlást követően. A foszfonull flotillin-1 az egész sejtben jelen volt, kivéve a sejtmagot. A transzfektált sejtekből sejtfractionálást is végeztünk. A rekombináns fehérjék közül, csak a foszfonull flotillin-1 fehérje volt jelen a membrán frakcióban, illetve a PKC aktivitás gátlásának hatására a vad típusú flotillin-1 szintén megjelent a sejtek membrán frakciójában.

Ezt követően ECIS mérésekkel nyomon követtük, hogy a flotillin-1 fehérje foszforilációt utánzó alakjai milyen hatással vannak a sejtek adhéziójára és migrációjára. A vad típusú és a foszfonull flotillin-1 fehérjét expresszáló sejtek gyorsabban tapadtak le és terültek el, mint a kontroll vagy a foszforilációt utánzó flotillin-1 fehérjét overexpresszáló sejtekhez. Ezután *in vitro* sebgyógyulási assay-t és karcolásos „scratch assay”-t végeztünk a különböző flotillin-1 formákkal transzfektált sejtek felhasználásával. A vad típusú és a foszfonull S315A flotillin-1 fehérjét expresszáló sejtek migrációs sebessége szignifikánsan nagyobb volt, mint a kontroll, illetve a foszforilációt utánzó S315D flotillin-1 mutáns expresszáló sejtéké.

A különböző flotillin-1 foszfo-formákkal transzfektált sejtek angiogenikus tulajdonságának vizsgálatához Matrigel extracelluláris mátrixot használtunk. A sejtek érképzési képességének meghatározásához a sejtek által kialakított erek hosszát és az elágazási pontok számát hasonlítottuk össze. Mind az össz érhossz és az elágazások száma szignifikánsan nagyobb volt a vad típusú, illetve a foszfonull flotillin-1 fehérjét expresszáló sejtek esetében.

## **4.2. PP2A B55 $\alpha$ szerepének vizsgálata az angiogenezishez kapcsolódó jelátviteli útvonalakban**

### *4.2.1. A PP2A B55 $\alpha$ depléciónak hatása a TSP1 expressziójára endotél sejtekben*

A PP2A B55 $\alpha$  angiogenezisben betöltött szerepének feltérképezése érdekében a BPAEC sejteket PP2A B55 $\alpha$ -ra specifikus siRNS-sel (siPPP2R2A) transzfektáltuk. Ezt követően a sejtizátumokat Proteome Profiler Angiogenezis Array Kit segítségével vizsgáltuk meg, amely 55 angiogenezishez kötött fehérje egyidejű detektálására alkalmas. A PP2A B55 $\alpha$  csendesítés hatására szignifikáns csökkenést figyeltünk meg a TSP1 fehérje szintjében, összehasonlítva a nem targetáló siRNS-sel kezelt sejtizátummal. Ezen TSP1 fehérje szint csökkenést Western blot analízissel is megerősítettük. Továbbá qPCR technikával kimutattuk,

hogy a B55 $\alpha$  hiánya nem csak fehérje, hanem mRNS szinten is jelentős TSP1 csökkenést eredményez.

#### *4.2.2. A PP2A B55 $\alpha$ és a TSP1 fehérjék közti kölcsönhatása kimutatása*

A B55 $\alpha$  regulátor alegységet tartalmazó PP2A holoenzim és a TSP1 fehérje közti kölcsönhatás vizsgálatára immunprecipitációs kísérletet végeztünk BPAEC sejtekből. Kimutattuk, hogy a TSP1 fehérje közvetlenül, vagy közvetve kölcsönhatásba lép a PP2A holoenzim alegységeivel. A PP2A B55 $\alpha$  és TSP1 ko-lokalizációját EC-kben immunfluoreszcens festéssel, illetve PLA technikával is igazoltuk. Továbbá anti-V5 agaróz affinitás gél felhasználásával megállapítottuk, hogy a TSP1 izoforma specifikusan kizárólag a B55 $\alpha$  regulátor alegységet tartalmazó PP2A holoenzimmel lép kölcsönhatásba.

#### *4.2.3. A TSP1 fehérje a PKC enzim szubsztrátja*

A TSP1 és PP2A közti specifikus kölcsönhatás a fehérje reverzibilis foszforilációjára utalt, ezért megvizsgáltuk a protein kináz A (PKA) és protein kináz C (PKC) aktivitásának és gátlásának hatását a TSP1 fehérje szintjére. Ennek vizsgálatára különböző kezeléseket alkalmaztunk az EC-ken. A kezelt sejtek Western blot analízise, valamint a kezelt sejtekből végzett qPCR mérések eredményei arra utalnak, hogy a TSP1 PKC foszforilációja szerepet játszhat a fehérje mennyiségi szabályozásában.

Annak igazolására, hogy a PKC valóban foszforilálja a TSP1 fehérjét, kontroll és PMA-val kezelt EC-kből immunprecipitációt végeztünk foszfo-specifikus antitest felhasználásával. A totál lizátumok és az immunkomplexek Western blot analízisével kimutattuk, hogy a PKC enzim a TSP1 fehérjét Ser oldallánc(ko)n foszforilálja.

#### *4.2.4. Bakteriális expresszióra alkalmas rekombináns TSP1 konstruktok létrehozása*

A TSP1 kódoló szekvenciáját HeLa sejtekből származó cDNS-ből sokszorosítottuk fel, fészek primerek felhasználásával, mely eredményeként a kódoló szekvenciánál hosszabb méretű terméket kaptunk. Ezen hosszú szekvenciából amplifikáltuk a TSP1 kódoló szekvenciáját. A PCR terméket pGEM T-Easy vektorba ligáltuk, majd transzformálást és szelekciót követően, DNS-t izoláltuk. Restriktív emésztés során a vektorból kihalásztuk a TSP1 kódoló szekvenciáját, melyet tisztítást követően előkészítettük a pGEX-4T-2 vektorral történő ligálásra. A ligálást és transzformálást követően a rekombináns pGEX-4T-2-TSP1

plazmidokat restriktációs emésztéssel ellenőriztük. A rekombináns plazmidok szekvenciáját a BIOMI Kft. általi szekvenáltatás is megerősítette.

#### 4.2.5. Rekombináns TSP1 fehérje fragmentumok létrehozása

A PKC által foszforilálható potenciális oldallánc(ok) azonosításához GPS 5.0 foszforilációs predikciós szoftvert használtunk, amely öt potenciális szerin oldalláncot talált a teljes hosszúságú TSP1 szekvenciájában: Ser<sup>44</sup>, Ser<sup>93</sup>, Ser<sup>297</sup>, Ser<sup>1113</sup> és Ser<sup>1163</sup>. Ezen oldalláncoknak megfelelően, a teljes hosszúságú pGEX-4T-2-TSP1 plazmidból, rekombináns GST-címkét tartalmazó TSP1 fehérje fragmentumokat kódoló plazmidokat hoztunk létre. A rekombináns fehérje fragmentumok termeltetési körülményeit optimalizáltuk többféle IPTG koncentrációt, hőmérsékletet és termeltetési időintervallumot kipróbálva. A megfelelő termeltetési körülmények meghatározását követően a fehérjék affinitás kromatográfiás oszlopon történő tisztítását is optimalizáltuk.

#### 4.2.6. A TSP1 a Ser<sup>93</sup> oldalláncon szabályozódik a PKC/PP2A B55 $\alpha$ által

A PKC által foszforilált szerin oldallánc(ok) azonosításához *in vitro* PKC foszforilációs kísérletet végeztünk a glutathion Sepharose 4B oszlopon immobilizált rekombináns TSP1 fehérje fragmentumokkal. A mintákat foszfo-Ser-PKC szubsztrát specifikus antitest felhasználásával vizsgáltuk Western blot technikával. Az eredmények azt mutatták, hogy a TSP1 potenciális foszforilációs helye a Ser<sup>44</sup> és/vagy a Ser<sup>93</sup> lehet. Pontmutációval szimpla (S44A vagy S93A) és dupla (S44A és S93A) foszfonull mutánsokat hoztunk létre. Az újonnan létrehozott rekombináns foszfonull mutáns fragmentumokkal megismételtük az *in vitro* PKC foszforilációs kísérletet, mely alapján kimutattuk, hogy a PKC a TSP1 fehérjét a Ser<sup>93</sup> oldalláncon foszforilálja.

Ezt követően a PP2A B55 $\alpha$  és a rekombináns GST-TSP1 fragmentumok közti kölcsönhatást pull down technikával vizsgáltuk. Az eredmények alapján a B55 $\alpha$  kölcsönhatásba lépett a PKC foszforilációs helyet tartalmazó N-terminális fragmentummal. Továbbá pontmutációval létrehoztuk a GST-TSP1 S93D foszforilációt utánzó mutánst is, melyet pull down kísérletben felhasználva kimutattuk, hogy a PP2A B55 $\alpha$  a vad típusú és foszfonull mutánshoz képest, gyengébb kölcsönhatást alakít ki a foszforilációt utánzó mutánssal.

*In vitro* defoszforilációs kísérletben kimutattuk, hogy a PKC által foszforilált TSP1 Ser<sup>93</sup> oldallánc defoszforilációjáért a PP2A B55 $\alpha$  holoenzim a felelős.

#### *4.2.7. A PP2A B55 $\alpha$ nélkülözhetetlen a TSP1 szabályozásához a sebgyógyulás során*

A PP2A B55 $\alpha$  regulátor alegység élettani szerepének vizsgálatához scratch assay módszerrel elemeztük az EC-k sebgyógyulási képességét, összehasonlítva a nem-targetáló siRNS-sel transzfektált és B55 $\alpha$  depletált sejteket. Az eredmények azt mutatták, hogy a B55 $\alpha$  depletált sejtek sebzáródási képessége lassabb volt, mint a kontroll sejteké. A sebgyógyulás alatt a TSP1 és PP2A B55 $\alpha$  fehérjék expressziós szintjét Western blot technika segítségével nyomon követtük. Eredményeink arra utalnak, hogy a TSP1 fehérje szabályozásához a PP2A B55 $\alpha$  hozzájárul a sebgyógyulási folyamatokban.

#### *4.2.8. A PP2A B55 $\alpha$ részt vesz a 3D szferoidok stabilitásában és az endotél sejtek érképzésében*

Következő lépésként megvizsgáltuk a PP2A B55 $\alpha$  depléció hatását az EC-k angiogenikus tulajdonságaira, mint a szferoid-, illetve érképző képesséjükre. A szferoidok változásait különböző időpontokban készített fényképekkel dokumentáltuk. A kapott eredmények alapján a B55 $\alpha$  hiánya befolyásolta a sejtek szferoidképző képességét. A B55 $\alpha$  depletált sejtekből képződött szferoidok kezdetben nagyobb méretűek voltak és 48 óra elteltével a szferoidok fragmentálódtak.

A sejtek érképzési képességét Matrigel 3D mátrix segítségével vizsgáltuk. A B55 $\alpha$  regulátor alegység hiányában a sejtek szignifikánsan több elágazási pontot és hosszabb ér szegmensekkel rendelkeztek, mint a kontroll sejtek.

#### *4.2.9. A TSP1 S93D foszforilációt utánzó mutánsa gátolja az angiogenezist endotél sejtekben*

A TSP1 Ser<sup>93</sup> oldalláncon történő foszforilációjának élettani szerepének vizsgálatához, emlős expresszióra alkalmas pcDNA3.1 myc-His-TSP1 rekombináns plazmidokat hoztunk létre. A rekombináns plazmidokkal transzfektált sejtek szferoid képzési képességét megvizsgáltuk. A kapott eredmények azt mutatták, hogy míg a c-myc címkével ellátott TSP1 fehérjét overexpresszáló sejtek már a kiindulási időpontban (0 perc) nagyobb méretű szferoidokat képeztek, mint a kontroll sejtek, addig a foszforilációt utánzó TSP1 S93D-t expresszáló sejtek kisebb, de kompaktabb szferoidokat hoztak létre.

A TSP1 foszfo mutánsok hatását az EC-k érképzési képességére is megvizsgáltuk. A kapott eredményeink arra utalnak, hogy a PKC foszforilációs hely módosítása, így feltételezhetően a TSP1 PKC foszforilációja is, szabályozza az EC-k angiogenikus tulajdonságait.

## 5. Összefoglalás

Az EC-k számos funkciót látnak el azáltal, hogy szemipermeabilis monolayer réteget (endotéliumot) alkotva elválasztják a vér keringését a környező szövetektől. Az EC-k vérerekbe való szerveződésében, illetve a barrier funkció szabályozásában elengedhetetlen mechanizmus a fehérjék foszforilációja, illetve defoszforilációja. Az EC-k funkcióinak és ezek molekuláris mechanizmusainak alaposabb megértése kulcsfontosságú az érrendszeri betegségek és egyéb kapcsolódó kórképek vizsgálata szempontjából. A PP2A az egyik legjelentősebb Ser/Thr specifikus protein foszfatáz, szerkezetéből adódóan számos funkcióval rendelkezik. A PP2A a B55 $\alpha$  regulátor alegysége révén részt vesz a barrier funkció kialakításában és fenntartásában, valamint az angiogenezis szabályozásában. Kutatásunk során azonosítottuk a flotillin-1 fehérjét mint a PP2A B55 $\alpha$  új kölcsönható partnerét. Megállapítottuk, hogy a két fehérje közötti interakció foszforilációfüggő, és a PKC enzim aktivitása jelentős hatással van rá. Kimutattuk, hogy a flotillin-1 foszforilációja és defoszforilációja befolyásolja annak sejten belüli lokalizációját, amely kulcsszerepet játszik az endotél barrier kialakításában és fenntartásában.

Munkánk továbbá feltárta, hogy a PP2A B55 $\alpha$  kiemelten fontos az angiogenezis folyamatában. Hiánya az EC-k érszerű struktúráinak instabilitásához vezetett, amit 3D extracelluláris mátrix kísérleteink is alátámasztottak. Megállapítottuk, hogy a B55 $\alpha$  hiányában a TSP1 fehérje szintje jelentősen csökkent, ami szintén hozzájárult a sejtek érrendszeri stabilitásának romlásához. Emellett kimutattuk, hogy a B55 $\alpha$  hiánya kedvezőtlenül befolyásolta a sebgyógyulást és a sejtek 3D struktúráinak fenntartását.

Kutatásunk eredményei rávilágítanak az EC-k komplex szabályozási hálózatára, és hangsúlyozzák a PP2A B55 $\alpha$  szerepét az érrendszeri stabilitás és regeneráció fenntartásában. Ezek az ismeretek hozzájárulhatnak új terápiás stratégiák kifejlesztéséhez érrendszeri betegségek kezelésére. Az EC-k működését érintő szabályozási mechanizmusok jobb megértése révén lehetőség nyílik olyan innovatív gyógyszerek kifejlesztésére, amelyek célzottan befolyásolják az érhálózatok stabilitását és regenerációját. Az új útvonalak feltárása emellett hozzájárulhat az érrendszeri betegségek diagnosztikájának javításához, lehetővé téve a korai beavatkozást.

## 6. Publikációs lista



**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//2024.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Thalwieser Zsófia  
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Thalwieser, Z.**, Fonódi, M., Király, N., Csontos, C., Boratkó, A.: PP2A Affects Angiogenesis via Its Interaction with a Novel Phosphorylation Site of TSP1.  
*Int. J. Mol. Sci.* 25 (3), 1-23, 2024.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms25031844>  
IF: 4.9 (2023)
2. **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

### További közlemények

3. Fonódi, M., **Thalwieser, Z.**, Csontos, C., Boratkó, A.: TIMAP, a Regulatory Subunit of Protein Phosphatase 1, Inhibits In Vitro Neuronal Differentiation.  
*Int. J. Mol. Sci.* 24 (24), 1-17, 2023.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms242417360>  
IF: 4.9
4. Király, N., **Thalwieser, Z.**, Fonódi, M., Csontos, C., Boratkó, A.: Dephosphorylation of annexin A2 by protein phosphatase 1 regulates endothelial cell barrier.  
*IUBMB Life.* 2021, 1-12, 2021.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/iub.2538>  
IF: 4.709



**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

---

5. Boratkó, A., Péter, M., **Thalwieser, Z.**, Kovács, E., Csontos, C.: Elongation factor-1A1 is a novel substrate of the protein phosphatase 1-TIMAP complex.

*Int. J. Biochem. Cell Biol.* 69, 105-113, 2015.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2015.10.021>

IF: 3.905

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 22,652**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):  
9,138**

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

Debrecen, 2024.12.14.