

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**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

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

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az Elméleti Orvostudományok tudományágban

Írta: Király Nikolett okleveles molekuláris biológus

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

Témavezető: Dr. Boratkó Anita, PhD

Az értekezés bírálói:

Dr. Telbisz Ágnes, PhD
Dr. Hajdu Péter Béla, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora
tagok: Dr. Telbisz Ágnes, PhD
Dr. Hajdu Péter Béla, PhD
Dr. Mádi András, PhD
Dr. Veréb Zoltán János, PhD.

Az értekezés védésének (online formátumban) időpontja: 2022. április 8. 12:00 óra.

A nyilvánosságot online módon biztosítjuk. Amennyiben részt kíván venni, úgy jelezze a kiraly.nikolett@med.unideb.hu e-mail címre küldött üzenetben a vitát megelőző nap (2022. április 7.) 16 óráig. A határidő lejártát követően technikai okok miatt már nincs lehetőség a védéshez kapcsolódni.

MEGHÍVÓ

A Debreceni Egyetem Orvostudományi Doktori Tanácsa meghívja Önt

Király Nikolett

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

című egyetemi doktori (PhD) értekezésének

2022. április 8-án, 12 órakor tartandó nyilvános vitájára.

A nyilvánosságot online módon biztosítjuk. Amennyiben részt kíván venni, úgy jelezze a kiraly.nikolett@med.unideb.hu e-mail címre küldött üzenetben a vitát megelőző nap (2022. április 7.) 16 óráig. A határidő lejártát követően technikai okok miatt már nincs lehetőség a védéshez kapcsolódni.

A vitát vezeti: Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora
Hivatalos bírálók: Dr. Telbisz Ágnes, PhD
Dr. Hajdu Péter Béla, PhD

Az értekezés megtekinthető a DE Kenézy Élettudományi Könyvtárban. A nyilvános vitában minden jelenlevő részt vehet és írásban előzetesen észrevételt tehet.

A DE Orvostudományi Doktori Tanácsa

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

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. Összehangoltan, gyorsan képesek reagálni az eret érő fiziológias stresszhatásokra. Az endotél sejtréteg integritásának megtartásában a sejtek közötti szoros-, rés- és adherens kapcsolatok játszanak szerepet. A különböző fizikai hatások, gyulladások és bioaktív ingerek megváltoztathatják az endotél sejtek között kialakuló barriert, ami paracelluláris rések kialakulásához vezethet, növelve ezzel az erek permeabilitását, veszélyeztetve a szervek normális funkcióját. A citoskeletonot alkotó aktin filamentumok, intermedier filamentumok és mikrotubulusok fontos szerepet játszanak a sejtek alakjának meghatározásában és egy jól működő barrier létrehozásában és fenntartásában. Az endotél sejtek barrier funkciójának szabályozásában a fehérjék foszforilációja és defoszforilációja egy alapvető szabályozási mechanizmus.

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 Ser, Thr vagy Tyr aminosav oldalláncán egy foszfát csoport jelenléte vagy hiánya megváltoztathatja a fehérje konformációját, így szabályozhatja aktivitását vagy más fehérjékkel való kölcsönhatását. A kinázok legnagyobb csoportját alkotó protein kinázok, az adenzin-trifoszfát (ATP) γ -foszfátjának átvitelét katalizálják egy szubsztrát fehérje hidroxil csoportjára. 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. A protein foszfatázokat három nagy csoportba sorolhatjuk. Megkülönböztetünk foszfo-Ser/Thr specifikus foszfatázokat, foszfo-Tyr specifikus foszfatázokat és kettős specificitású foszfatázokat, amelyek Ser/Thr és Tyr oldalláncról egyaránt képesek foszfát csoportot lehasítani. A Ser/Thr specifikus foszfatázok családjába tartoznak a foszfoprotein foszfatázok (PPP), a fémion-függő protein foszfatázok

(PPM), valamint az aszpartát alapú foszfatázok (FCP/ SCP). A protein-foszfatáz 1 (PP1), a PP2A, a PP2B (más néven calcineurin), a PP4, a PP5, a PP6 és a PP7 a PPP családot alkotják.

A protein foszfatáz 1

A PP1 szerepet játszik az endotél sejtek normális működésének fenntartásában, a barrier funkció védelmében, továbbá a citoskeletális rendszer szabályozásában. A PP1 holoenzimben az erősen konzervált katalitikus alegység (PP1c) egy vagy két regulátor alegységgel kapcsolódik. A katalitikus alegységnek több izoformája fordul elő. Emlősökben megkülönböztethetünk PP1 α , PP1c β/δ (továbbiakban PP1c δ), PP1c γ katalitikus alegységeket, melyeket három gén a *PPP1CA*, *PPP1CB* és *PPP1CC* kódolnak. A PP1c izoformák körülbelül 90% -ban azonosak aminosav-szekvenciájukban, a fő különbségek az N- és a C-terminális régiókon találhatóak. Az emlős PP1c izoformák különböző szöveti és sejten belüli eloszlást mutatnak. 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.

Protein foszfatáz 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. Több mint 50 féle regulátor alegységet azonosítottak, amelyek egyedi holoenzimeket hoznak létre a PP1c-vel és ezáltal számos sejtbeli folyamat szabályozásában vesznek részt. A regulátor alegységek többsége egy rövid, konzervált PP1c-kötő motívummal rendelkezik: K/RVxF, ahol az X bármilyen aminosav maradék lehet a prolin kivételével. 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), vagy a retinoblasztóma fehérje. A különböző regulátor alegységek közvetlenül befolyásolhatják a PP1 holoenzim sejten belüli lokalizációját, illetve szubsztrát specificitását.

A MYPT család

A miozin foszfatáz (MP) az endotél barrier fenntartásának egyik kulcs eleme. Szerkezetét tekintve heterotrimer, amelyben a PP1c δ felelős a katalitikus aktivitásért, a fő szabályzó

alegység a miozin-foszfataz regulátor alegység (MYPT1) a defoszorilációs folyamatokban a szubsztrát specificitásért felel, míg az M20 funkciójáról jelenleg keveset tudunk.

A MYPT1 az úgy nevezett MYPT család tagja, amelybe a MYPT2, MBS85, MYPT3 és TIMAP fehérjék is beletartoznak. Számos konzervált domént tartalmaznak, mint a PP1c kötésért felelős K/RVxF motívum és az ankyrin ismétlődések, amelyek a fehérje-fehérje kölcsönhatásokban játszanak szerepet. 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. 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. 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.

A TIMAP, a PP1 regulátor alegysége, az endotél sejtek fiziológiás folyamataiban

A MYPT családhoz tartozó TGF β -gátolt membrán asszociált fehérjét (TIMAP) glomeruláris endotél sejtekben azonosították differenciál analízis során, ahol TGF- β 1 hatására a TIMAP expressziós szintje csökkent. Humán tüdő artéria endotél sejtekben (HPAEC) az endogén TIMAP jelenlétét mind a sejtmagban, mind a plazmamembránban kimutatták, ahol a PP1c regulátor alegységeként a barrier szabályozásában játszik szerepet. 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. TIMAP fehérje más fehérjékkel való kölcsönhatásának vizsgálata során kimutatták, hogy a TIMAP képes kötni a 37/67 kDa-os laminin receptort (LAMR1). A legfrissebb LAMR1 fehérjéhez kapcsolódó eredmények alapján a TIMAP-PP1c komplex kötődése a LAMR1-hez aktiválja a PP1c foszfataz aktivitását és szabályozza a LAMR1 Thr125-es oldalláncának a foszforilációját. 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. Pull-down, LC-MS/MS és immunprecipitációs módszerekkel a

TIMAP és az eukarióta elongációs faktor 1 A (eEF1A1) kölcsönhatását igazolták. A ROCK által Tyr oldalláncon foszforilált eEF1A1 fehérjét a TIMAP-PP1c komplex szubsztrátjaként azonosították, valamint kimutatták, hogy a TIMAP szabályozza az eEF1A1 lokalizációját, ugyanis az eEF1A1 a TIMAP-al együtt az endotél sejtek membránjában lokalizálódik. Az ERM fehérjék az aktin filamentum és a plazmamembrán fehérjék közötti kölcsönhatásban játszanak szerepet, ezáltal részt vesznek a barrier szabályozásában. A foszforilált ERM fehérjék Thr oldalláncának defoszforilációjában a TIMAP-PP1c komplex játszik szerepet az endotél sejtekben, melynek következtében a citoszkeleton és membrán kölcsönhatása és a sejtek alakja is megváltozik. Az ERM fehérjékkel rokon merlin fehérjét szintén a TIMAP-PP1c szubsztrátjaként azonosították és bizonyították, hogy a merlin Ser518-as oldalláncának defoszforilációjában a TIMAP-PP1c komplex játszik szerepet.

A TIMAP fehérjén a Ser331, Ser333 vagy Ser337 oldalláncának foszforilációja kitüntetett szerepet tölt be a TIMAP-PP1c komplex szabályozásában. A TIMAP Ser337-es oldallánc foszforilációjában a protein kináz A (PKA) játszik szerepet, mely segíti a Ser333-es oldallánc glikogén szintáz kináz 3 béta (GSK3 β) általi foszforilációját. A TIMAP a Ser333/Ser337 helyén történő foszforilációja nem, vagy csak mérsékelten módosítja TIMAP és a PP1c kapcsolódását, azonban a PP1c aktivitására hatással van. A PKA és GSK3 β általi TIMAP foszforiláció részt vesz az ERM fehérjék foszforilációs szintjének szabályozásában és egyben a sejtek barrier funkciójának szabályozásában. A TIMAP a Ser331-es oldalláncon a protein kináz C (PKC) által foszforilálódik. A PKC aktiválása után a TIMAP-PP1c nem tudja defoszforilálni a foszfo-ERM fehérjéket és ennek következtében a szintjük megemelkedik a sejtek membránjában. A TIMAP Ser331-es oldallánc PKC általi foszforilációja egy gátló hatású foszforiláció, amely csökkenti a foszfo-ERM defoszforilációját és így a barrier diszfunkcióját eredményezi.

Annexin A2 szerkezete és fiziológias szerepe

Az annexin család legszélesebb körben vizsgált tagja az annexin A2 (ANXA2), amely a sejtek és szövetek többségében expresszálódik és több ligandumhoz is képes kötődni. Az ANXA2 lokalizációját tekintve a sejtmembránban, a citoplazmában, a magban és az extracelluláris mátrixban is megtalálható. Két fő doménből épül fel, egy nagyon változatos amino-terminális részből, melyet „feji régió” is hívnak, valamint egy karboxi-terminális „core” doménből. A fehérje N-terminális régiója számos poszttranszlációs módosítási helyet tartalmaz, például foszforilációs helyeket, Ser1-acetilézési helyet, ezen kívül nukleáris export szekvenciát (NES) valamint számos ligandum és fehérje számára kölcsönhatási helyként szolgál, mint például a

S100A10. A karboxi-terminális régió tartalmazza a kalcium, foszfolipid, heparin és F-aktin kötőhelyeket. A fehérje monomerként vagy heterotetramer komplexként fordulhat elő, melynek aránya sejttípustól függ. A heterotetramer forma két monomer ANXA2-ből és S100A10 homodimerből áll. Az ANXA2 az S100A10 fehérjével való kölcsönhatása során védi az S100A10 fehérjét az ubiquitinációtól és a proteozomális lebomlástól, növeli az ANXA2 Ca^{2+} érzékenységét és így a membrán és F-aktin megkötő képességét.

Az ANXA2 három azonosított foszforilációs helyet tartalmaz a Ser11, Ser25 és Tyr23 oldalláncokon. 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 átfed, mivel az ANXA2 első 12 aminosava játszik szerepet a kölcsönhatásban. 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.

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. Az ANXA2 fő foszforilációs helye a Ser25-ös oldallánc, melynek foszforilációja indukálhatja a Ser11-es oldallánc foszforilációját, úgynevezett hierarchikus foszforilációs mechanizmussal. Az ANXA2 fehérjéket a pp60src (Rous sarcoma vírus transzformáló fehérje) szubsztrátjaként is azonosították, ami a Tyr23 oldalláncot foszforilálja. Ezenkívül számos receptor aktivációjának eredményeként foszforilálódhat ez az oldallánc, mint például az inzulinreceptor, az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) vagy a vérlemezke eredetű növekedési faktor (PDGF). Tyr23 oldallánc foszforilációja a citoskeletális rendszer megváltozását eredményezte, ami a sejt alakjának és mozgékonyágának változását okozta, valamint a fehérje fokozott lokalizációját mutatta a sejtek membránjában. A Tyr23 oldallánc defoszforilációjában szerepet játszó foszfatázt szintén nem sikerült még azonosítani.

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 sejtfolyamatok 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 sejtmigrációra.

EREDMÉNYEK, KÖVETKEZTETÉSEK

I. 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 expresszálandó TIMAP fehérje számos kölcsönható partnerét és szubsztrát fehérjéjét azonosították, melyek segítségével a sejtekben betöltött fiziológiai szerepét jobban megérthettük. Korábban munkacsoportunk sikeresen alkalmazta új kölcsönható partner kereséséhez a rekombináns GST-TIMAP fehérjét pull-down kísérletben, amely során a RACK1 és eEF1A1 fehérjéket azonosították a TIMAP kölcsönható partnereként. A teljes hosszúságú rekombináns TIMAP fehérje sajnos könnyen fragmentálódik, 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) sejtlyúzattal, negatív kontrollként lízis pufferrel inkubáltuk. A szükséges mosási lépések után az eluált fehérjéket SDS-PAGE segítségével választottuk el. Az endotél sejtlyúzattal 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. LC-MS/MS méréssel az ANXA2, RACK1, eEF1A1 és PP1c δ fehérjéket azonosították. A RACK1, eEF1A1 és PP1c δ 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. 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 volt

látható. 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 kölcsönhatás közelebbi vizsgálata során igazoltuk, hogy az ANXA2 a TIMAP N-terminális részén található 1. 2. és 3. ankyrin ismétlődéséhez kötődik. Az eddig azonosított összes TIMAP szubsztrát és kölcsönható fehérje az N-terminális régióval lépett kölcsönhatásba (1-290aa), ami nem meglepő, hiszen ezen a régióon található a fehérje-fehérje interakciók kialakításában szerepet játszó ankyrin ismétlődéseket.

Az endogén fehérjék közötti kölcsönhatást immunprecipitációs kísérlettel vizsgáltuk, amiben 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. Az ANXA2 antitesttel végzett immunprecipitáció során kimutattuk, hogy az ANXA2 és a PP1c δ között nincs közvetlen kölcsönhatás, csak a TIMAP fehérjén keresztül.

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. A rekombináns GST-ANXA2 fehérje felhasználásával pull-down kísérletben vizsgáltuk a TIMAP és a rekombináns GST-ANXA2 kölcsönhatását. A pull-downot követő Western blot a rekombináns GST-ANXA2 fehérje TIMAP és PP1c δ -val való kölcsönhatását bizonyította.

Az ANXA2 Ser25-ös oldalláncát a PKC foszforilálja endotél sejtekben

Az ANXA2 fehérje PKC általi foszforilációjának vizsgálatához, *in vitro* PKC foszforilációt végeztünk. A GST, GST-ANXA2 és GST-TIMAP fehérjék mennyiségét és tisztaságát SDS-PAGE-t követő Coomassie Brilliant Blue festéssel igazoltuk. A PKC enzimmel történt inkubálás után a foszfo-Ser PKC szubsztrát antitest mind a GST-TIMAP, mind a GST-ANXA2 fehérjék foszforilációját igazolta. Az ANXA2 Ser25 oldalláncának foszforilált formájára specifikus antitest pedig bizonyította, hogy a PKC α az ANXA2 fehérjét a Ser25-ös oldalláncon

foszforilálja. 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. 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.

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 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 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 a foszforilációt az ANXA2 Ser25 oldalláncán. Ezek az eredmények tovább bizonyítják, hogy az ANXA2 Ser25-ös oldalláncának foszforilációjáért a PKC α enzim felelős az endotél sejtekben.

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. A defoszforilációban szerepet játszó foszfatázok vizsgálatához az endotél sejtekben a PP1 aktivitását tautomocetinnel, míg a PP2A-t okadánsavas kezeléssel gátoltuk. A tautomocetinnel 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 tautomocetinnel történő gátlásához, megerősítve azt a feltételezésünket, hogy az ANXA2 Ser25-ös oldalláncának defoszforilációjában a TIMAP-PP1c komplex vesz részt.

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. A TIMAP és ANXA2 együttes előfordulását a sejtek membránjában tudtuk detektálni. A PKC aktiváló 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 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.

Az ANXA2 sejten belüli lokalizációjának további vizsgálatához nonsi- és TIMAP specifikus siRNS-el transzfektált sejtek sejtfrakcionálását végeztük el. A kontroll nonsiRNS-el transzfektált sejtekben az immunfluoreszcens festés során tapasztaltakhoz hasonlóan a foszfo-Ser25 ANXA2 membránban való lokalizációt mutattunk ki. A TIMAP fehérje főként a sejtmagi és membrán frakciókban adott intenzívebb jelet, míg 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 a sejtmembrán frakcióban jelentősen megnőtt a csendesítés hatására a kontrollhoz képest. 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. 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.

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. Először ellenőriztük az ANXA2 csendesítés hatását a sejtek életképességére, amely során szignifikáns változást nem tapasztaltunk a kontroll sejtekhez képest. Következő lépésként ECIS (Electric Cell-substrate Impedance Sensing) méréssel összehasonlítottuk a kontroll és az ANXA2 csendesített endotél sejtek barrier funkcióját. A csendesítés hatására alacsonyabb rezisztencia értékeket mértünk a kontrollhoz képest, amely a barrier funkció gyengülésére utalt. Szintén ECIS méréssel vizsgáltuk a PMA kezelés hatását ANXA2 csendesített sejtek barrier funkciójára. A nonsiRNS-el transzfektált sejtek 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 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 sejtek ellenállása. Ezek az eredmények azt igazolják, hogy az ANXA2 fehérje szerepet játszik az endotél sejtek gát funkciójának fenntartásában.

Végezetül pedig megvizsgáltuk a kontroll és az ANXA2 csendesített sejtek migrációs sebességét *in vitro* sebgyógyulási kísérletben, amelyet szintén ECIS méréssel végeztünk el. 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.

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. Az ANXA2 specifikus antitesttel immunprecipitált mintában az S100A10 fehérje jelenlétét a vártan megfelelően kimutattuk és fordítva, az S100A10 specifikus antitesttel immunprecipitált mintában pedig az ANXA2-t. 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. 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.

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.

II. A TIMAP Ser69-es oldallánc foszforilációjának tanulmányozása

A rekombináns Ser69Asp és Ser69Ala TIMAP mutáns fehérjék létrehozása

Phosphosite Plus adatbázisban történő kereséssel számos potenciális Ser/Thr és Tyr foszforilációs oldalláncot találtunk a TIMAP fehérjén. 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 TIMAP PP1 kötő képességét, vagy szubcelluláris lokalizációját. A fehérje foszforilációjának vizsgálatához létrehoztunk egy, a Ser69 oldallánc foszforilációját utánzó és egy foszfonull mutáns TIMAP fehérjét. A foszforilációt utánzó mutánsához a 69. helyen lévő szerint aszparaginsavra cseréltük, amely egy negatív töltésű oldallánc, míg a foszfonull esetében alaninra módosítottuk, amely az apoláris aminosavak csoportjába tartozik. Az aminosav csere érdekében olyan specifikus primereket terveztünk, amelyek az adott helyen tartalmazták az aminosavcserének megfelelő kodont, ezen kívül az 5' végükön egy foszfát csoportot is. A „back-to-back” PCR-t követően kapott lináris plazmidokat ligálással gyűrűvé zártuk, majd JM109 *E.coli* sejtekbe transzformáltuk. Annak ellenőrzésére, hogy valóban sikerült a mutánsok létrehozása, a DNS mintákat szekvenáltattuk. A GST fuzionált 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 IPTG hozzáadásával indukáltuk. A sikeresen termeltetett rekombináns fehérjéket Glutathione Sepharose 4B gyantán tisztítottuk. A GST-TIMAP WT, -S69A, valamint -S69D fehérjék tisztítása során nyert totál, feltárt és immobilizált mintákat SDS-PAGE segítségével ellenőriztük.

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 aleggység kötődését. Ezért pull-down kísérlettel vizsgáltuk a vad típusú és foszfo mutáns rekombináns TIMAP fehérjék PP1c δ -val való kölcsönhatását. Mind a mutáns, mind a vad típusú TIMAP fehérjék esetében kimutattuk a kölcsönhatást a PP1c δ -val, a kölcsönhatásokban szignifikáns különbséget nem tapasztaltunk. 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. Pull-down kísérletünk során a vad típusú TIMAP fehérjék mellett a Ser69-mutáns TIMAP fehérjék ERM és a foszfo-ERM fehérjékkel való kölcsönhatását egyaránt kimutattuk és szignifikáns különbségeket nem tapasztaltunk a kölcsönhatásokban. 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 vizsgálatának eredményei szintén azonos kötődést mutattak, ami arra utal, hogy a TIMAP Ser69 mutánsok is prenilálódhatnak. A pull-down kísérleteinkkel tehát kimutattuk, hogy a TIMAP Ser69-es oldallánc foszforilációja nincs hatással a PP1c δ -val és RACK1 fehérjével való kölcsönhatásra és nem befolyásolja a foszfatáz aktivitását a korábban azonosított ERM szubsztrátok irányába.

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. A mutáns TIMAP fehérjék endotél sejteken való lokalizációjának vizsgálatához transzfektálást követően immunfluoreszcens festést végeztünk. 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. Az immunfluoreszcens festésnél megfigyelt eredményeket sejtfractionálással is megerősítettük. A vad típusú és mutáns TIMAP transzfektált endotél sejtekből sejtfractionálással citoplazma és membrán frakciót izoláltunk. 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 sejtfrakcionálással kapott eredményeink azt mutatják, hogy a Ser69-es oldalláncon történő foszforiláció hatására a TIMAP fehérje a sejtmembránban feldúsul.

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 szoftverrel történő keresés során a legmagasabb találati értéket a Polo szerű kináz 4-re (PLK4) kaptuk. A NimA kapcsolt kináz (NEK) adta 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. A lehetséges kinázokkal való kölcsönhatás vizsgálatához BPAEC sejllizátumból TIMAP specifikus antitest felhasználásával immunprecipitációs kísérletet végeztünk. Eredményünk igazolta a TIMAP kölcsönhatását a PLK4 kinázzal. A kölcsönhatás további vizsgálatához a kezeletlen endotél sejtek mellett, specifikus PLK4 inhibitorral (YLT-11) kezelt endotél sejteket használtunk fel az immunprecipitációs kísérletben. 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.

A TIMAP Ser69-es oldallánc foszforilációjának hatása a sejt migrációra

A sejtfrakcionálási 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. 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. A korábbi irodalmi adatokból tudjuk, hogy a PLK4 szerepet játszik az oszteokarcinóma és embrionális vese sejtek motilitásában. Mivel kölcsönhatást mutattunk ki a

TIMAP és a PLK4 között, indokoltnak tartottuk megvizsgálni a PLK4 hatását endotél sejtek migrációjára. A TIMAP S69D fehérjét expresszáló endotél sejtek esetében szignifikánsan gyorsabb sejt migrációt 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. 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. Az S-1-P hatására a vártaknak megfelelően felgyorsult a sejtek sebgyógyulási folyamata a kezeletlen sejtekhez képest. 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 sejteket nem befolyásolta az inhibitor kezelés. 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.

ÖSSZEFOGLALÁS

Endotél sejtekben a Ser/Thr specifikus foszfatázok közül az egyik legjelentősebb a PP1 enzim, mely egy katalitikus és egy célra irányító 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 vizsgálatakor, 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 vizsgálatakor 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 kitüremkedést 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



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 impact faktora: 15,461

A közlő folyóiratok összesített impact 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.

