

**DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

**Thalwieser Zsófia**

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

**DEBRECENI EGYETEM**

**MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA**

**Debrecen, 2025**

**DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

**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**

# 1. Tartalomjegyzék

1. Tartalomjegyzék.....	2
2. Rövidítések.....	5
3. Bevezetés.....	9
4. Irodalmi áttekintés.....	10
4.1. Az endotél sejtek és élettani szerepük.....	10
4.2. Az angiogenezis folyamata.....	11
4.3. Protein foszfatázok.....	13
4.4. A PP2A szerkezete.....	14
4.5. A PP2A biológiai funkciói.....	16
4.6. A flotillin-1 fehérje.....	17
4.7. A thrombospondin-1 (TSP1) fehérje.....	18
5. Célkitűzés.....	20
6. Anyagok és módszerek.....	21
6.1 Anyagok.....	21
6.1.1. Pufferek, oldatok.....	21
6.1.2. Sejtvonala.....	22
6.1.3. Baktérium törzsek.....	22
6.1.4. Felhasznált vektorok.....	22
6.1.5. Alkalmazott antitestek.....	22
6.2. Módszerek.....	23
6.2.1. Polimeráz láncreakció (PCR).....	23
6.2.2. RT-PCR és kvantitatív valós idejű PCR (qPCR).....	28
6.2.3. Agaróz gélelektroforézis és DNS tisztítás gélből.....	30
6.2.4. Restriktációs emésztés.....	30
6.2.5. Ligálás.....	31
6.2.6. Transzformálás.....	31
6.2.7. Plazmid tisztítás és DNS szekvenáltatás.....	31
6.2.8. Bakteriális fehérje expresszió optimalizálása, GST-fúziós fehérjék termeltetése.....	32
6.2.9. A rekombináns fehérjék tisztítása.....	33
6.2.10. Tüdő artéria endotél sejtek tenyésztése.....	34
6.2.11. Transzfektálás, géncsendesítés és kezelések.....	34
6.2.12. Pull down (PD).....	35
6.2.13. SDS-PAGE, Western blot (WB) és Far Western blot.....	36
6.2.14. Proteome Profiler Angiogenesis Array.....	37
6.2.15. Immunprecipitáció (IP).....	37

6.2.16. Immunfluoreszcencia (IF) és konfokális mikroszkópia .....	37
6.2.17. Proximity Ligation Assay (PLA).....	38
6.2.18. <i>In vitro</i> PKC foszforiláció és <i>in vitro</i> defoszforiláció .....	38
6.2.19. Sejtfractionálás .....	39
6.2.20. NanoBiT rendszer.....	40
6.2.21. ECIS mérések (electric cell-substrate impedance sensing) .....	40
6.2.22. Scratch assay .....	41
6.2.23. <i>In vitro</i> angiogenezis .....	41
6.2.24. 3D mágneses sejtenyésztés.....	41
6.2.25. Anti-V5-agaróz affinitás gél.....	42
6.2.25. Tandem tömegspektrometria (LC-MS/MS) .....	42
6.2.26. Statisztikai analízis .....	42
7. Eredmények.....	43
<b>7.1. A PP2A egy új kölcsönható partnerének azonosítása és ezen kölcsönhatás fiziológiás jelentőségének feltárása .....</b>	<b>43</b>
7.1.1. A flotillin-1 fehérje azonosítása, mint a PP2A B55 $\alpha$ új kölcsönható partnere endotél sejtekben.....	43
7.1.2. A rekombináns GST-flotillin-1 fehérje létrehozása .....	44
7.1.3. A PP2A B55 $\alpha$ és flotillin-1 fehérje kolokalizál az endotél sejtekben .....	49
7.1.4. A PP2A aktivitásának hatása a flotillin-1 fehérje sejten belüli lokalizációjára.....	51
7.1.5. Foszfomutáns flotillin-1 fehérjék létrehozása pontmutációval.....	54
7.1.6. A flotillin-1 Ser <sup>315</sup> oldalláncának foszforilációja hatással van a PP2A fehérjével való kölcsönhatására .....	58
7.1.7. A PP2A defoszforilálja a flotillin-1 fehérjét endotél sejtekben.....	61
7.1.8. A foszfonull flotillin-1 forma megnövekedett membrán lokalizációt mutat, továbbá szerepet játszik a sejt migrációban és az angiogenezisben.....	64
<b>7.2. PP2A B55<math>\alpha</math> szerepének vizsgálata az angiogenezishez kapcsolódó jelátviteli útvonalakban .....</b>	<b>69</b>
7.2.1. A PP2A B55 $\alpha$ depléciónak hatása a TSP1 expressziójára endotél sejtekben .....	69
7.2.2. A PP2A B55 $\alpha$ és a TSP1 fehérjék közti kölcsönhatása kimutatása .....	71
7.2.3. A TSP1 fehérje a PKC enzim szubsztrátja .....	73
7.2.4. Bakteriális expresszióra alkalmas rekombináns TSP1 konstrukciók létrehozása .....	75
7.2.5. Rekombináns TSP1 fehérje fragmentumok létrehozása.....	77
7.2.6. A TSP1 a Ser <sup>93</sup> oldalláncon szabályozódik a PKC/PP2A B55 $\alpha$ által.....	78
7.2.7. A PP2A B55 $\alpha$ nélkülözhetetlen a TSP1 szabályozásához a sebgyógyulás során .....	81
7.2.8. A PP2A B55 $\alpha$ részt vesz a 3D szferoidok stabilitásában és az endotél sejtek érékezésében .....	83
7.2.9. A TSP1 Ser <sup>93</sup> Asp foszforilációt utánzó mutánsa gátolja az angiogenezist endotél sejtekben .....	85

8. Megbeszélés .....	90
9. Összefoglalás.....	95
10. Summary .....	96
11. Irodalomjegyzék.....	97
11.1. A PhD értekezésben hivatkozott közlemények listája.....	97
11.2. A PhD értekezés alapját képező saját és további közlemények jegyzéke .....	104
12. Tárgyszavak .....	106
13. Keywords .....	106
14. Köszönetnyilvánítás .....	107

## 2. Rövidítések

aa - aminosav

AMP - adenzin-monofoszfát

AMPK - AMP-függő kináz

ATP - adenzin-trifoszfát

Bcl-2 - B sejt limfóma 2

bp - bázispár

BPAEC - marha tüdő artéria endotél sejt vonal

BSA - borjú szérum albumin

Cdc2 - ciklin-függő kináz 2

COMP - porc oligomer mátrix fehérje

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

dNTP - dezoxinukleotid-trifoszfát

EC - endotél sejt

ECIS - Electric Cell-substrate Impedance Sensing

ECL - megnövelt kemilumineszcencia (Enhanced Chemiluminescence)

ECM - extracelluláris mátrix

EDTA - etilén-diamin-tetraecetsav

EG-VEGF - belső elválasztású mirigy eredetű vaszkuláris endoteliális növekedési faktor

ES - endosztatin

FCP - RNS-polimeráz II-es CTD-foszfataz TFIIIF-asszociáló komponense

FGF - fibroblaszt növekedési faktor

FRSK - forskolin

GST - glutation-S-transzferáz

HEAT motívum - huntigin/elongation/A subunit/TOR motívum

HeLa - immortalizált méhnyakrák daganat sejtvonala

HepG2 - hepatoblasztóma sejtvonala

HIF - hipoxia-indukálható faktor

HPAEC - humán tüdő artéria endotél sejtvonala

IAP - integrin-asszociált fehérje

IP - immunprecipitáció

IPTG - izopropil-béta-D-1-tiogalaktopiranozid

kDa - kilodalton

LC-MS/MS - folyadék kromatográfia-tandem tömegspektrometria

LP - lízis puffer

MEM - minimális esszenciális tápfolyadék

MDCK - Madin-Darby kutya vesesejt

MMP - metalloproteáz

NO - nitrogén-monoxid

OA - okadánsav

PBS - foszfáttal pufferelt sóoldat

PC - prokollagén

PCR - polimeráz láncreakció

PD - pull down

PF4 - vérlemezke faktor 4

PHB - prohibitin

PHD - prolil hidroxiláz domén

PK - protein kináz

PLA - Proximity Ligation Assay

PMA - phorbol 12-mirisztát 13-acetát

PP - protein foszfatáz

PSPN - persephin

SPFH domén - stomatin, prohibitin, flotillin és HflK/C vagy más néven PHB domén

PPM - fémion-függő protein foszfatáz

PPP - foszfoprotein foszfatáz

PTP - foszfortirozin specifikus foszfatáz

qPCR - kvantitatív PCR

S1P - szfingozin-1-foszfat

SCP - kis CTD foszfatáz

SDS - nátrium-dodecil-szulfát

SDS-PAGE - SDS poliakrilamid-gélelektroforézis

SOC - 20mM glükóz tartalmú szuper optimális tápközeg

PHB - prohibitin homológ domén

TGF- $\beta$  - transzformáló növekedési faktor  $\beta$

T<sub>m</sub> - olvadási hőmérséklet

TM - tautomocetin

TNF $\alpha$  - tumor nekrozis faktor  $\alpha$

TSP- thrombospondin

TSR - thrombospondin ismétlődő szekvencia

VEGF - vaszkuláris endotél növekedési faktor

vWC - von Willebrand C

WB - Western blot

WT - vad típusú

### 3. Bevezetés

Az endotél sejtek alkotják az erek belső falát félig átteresztő barriert létrehozva a vér és a környező szövetek között. Az sejtek által kialakított endotéliumnak számos élettani funkciója van, ezért több folyamatban meghatározó szerepet tölt be, beleértve az angiogenezist is. Az angiogenezis egy szigorúan szabályozott mechanizmus, amely során meglévő erekből új erek képződnek. Minden sejt folyamat szabályozásában a fehérjék reverzibilis foszforilációja kulcsfontosságú szerepet játszik. Míg a protein kinázok foszfát csoportot kapcsolnak a fehérjék szerin (Ser), treonin (Thr) vagy tirozin (Tyr) oldalláncához, addig a protein foszfatázok ezeket a csoportokat hidrolízissel távolítják el.

A protein foszfatáz 2A (PP2A) egy foszfo-Ser foszfo-Thr specifikus protein foszfatáz, mely a sejt folyamatok széles skáláját szabályozza. Szerkezetét tekintve egy szerkezeti „A” alegységből, egy katalitikus „C” alegységből, valamint egy célra irányító regulátor „B” alegységből áll. A különféle regulátor „B” alegységek határozzák meg az enzim szubsztrátspecifitását és sejten belüli lokalizációját. Ezen szerkezeti változatosságból adódik a fehérje széles körű funkciója.

A flotillin-1 fehérje számos sejt típusban megtalálható, de lokalizációja sejt típus függően változik. A flotillin fehérjecsaldót két, aminosavszekvenciájukban 50%-ban homológ fehérje, a flotillin-1 és flotillin-2 alkotja. Ezek a fehérjék fontos szerepet töltenek be a sejt felszíni receptorok és a citoskeleton közti kapcsolat létrehozásában, valamint a jelátviteli folyamatok irányításában. Korábbi kutatások többféle poszttranszlációs módosításukat is feltárták, azonban a Ser/Thr foszfatázokkal való kölcsönhatásukat nem tárták még fel.

A thrombospondin-1 (TSP1) egy matricelluláris glikoprotein, amelyet először természetes angiogenezis gátló fehérjeként azonosítottak. Szerkezeti felépítéséből adódóan számos sejt folyamatban vesz részt, többek között szabályozza a sejtek migrációját, illetve részt vesz a sejt proliferációban és az apoptózisban is. Bár a TSP1 poszttranszlációs módosításai és azok hatása a fehérje által szabályozott folyamatokra kevésbé ismertek, a fehérje szekvenciája számos potenciális poszttranszlációs módosításra alkalmas helyet tartalmaz.

Jelen disszertáció a PP2A enzim flotillin-1 és TSP1 fehérjéken keresztüli szerepét mutatja be az angiogenezis folyamatában. A vizsgálatok során kapott eredmények tovább bővítik az ismereteinket a PP2A biológiai funkcióiról és az angiogenezisben betöltött szerepéről.

## 4. Irodalmi áttekintés

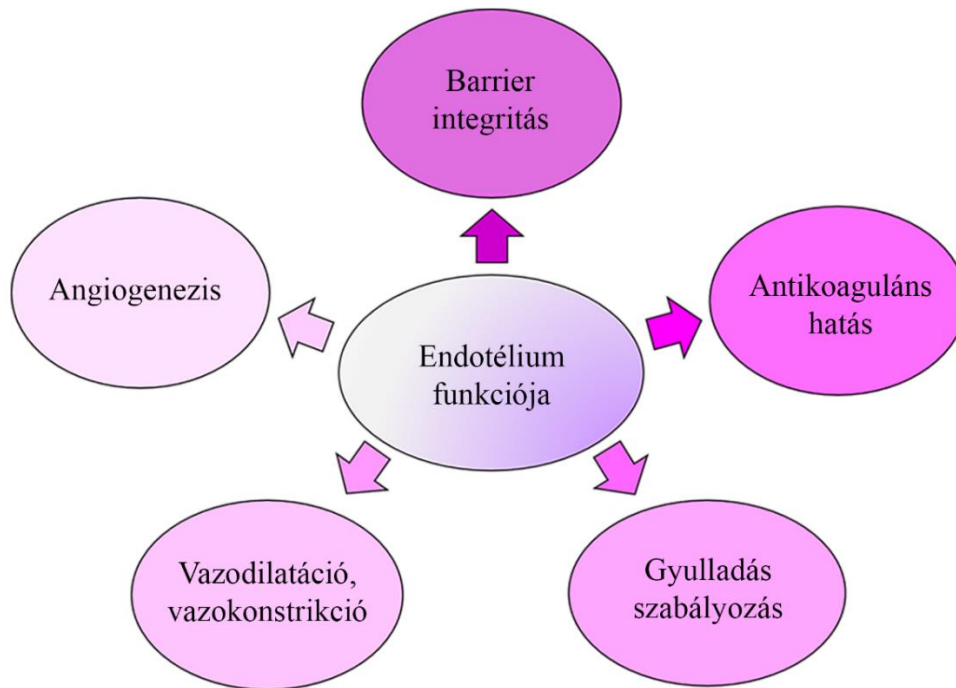
### 4. 1. Az endotél sejtek és élettani szerepük

Az endotél sejtek (EC-k) az érrendszer egyik legfontosabb szabályozó elemei (1. ábra). Heterogén populációt alkotva számos élettani folyamatban elengedhetetlen a szerepük. Az EC-k monolayer sejtréteget, más néven endotéliumot alkotnak, amely az érrendszert és a nyirokrendszert szegélyezi. Az endotéliumot egy celofán típusú barrierként írták le először, mely elválasztja a vért a környező szövetektől. Ezek a sejtek hozzájárulnak az erek rugalmasságához, a vérerek áteresztőképességének, a véralvadás és a gyulladási folyamatok szabályozásához is. Az endotél sejtszerkezet és funkcionális integritás fontos az érfal és a megfelelő keringés fenntartásában, ugyanis az endotélium félig áteresztő gátként szabályozza a kis és nagy molekulák átjutását. Habár maga az endotélium kevesebb, mint  $0,2 \mu\text{m}$  vastagságú, mégis  $1-6 \times 10^{13}$  endotél sejtből áll, melyek tömege egy átlagos emberben meghaladja az 1kg-ot [1]. Mindemellett, felszínének teljes területe becslések szerint körülbelül  $350\text{m}^2$  [2]. Az EC-k különböző típusú adhéziós struktúrákkal és sejt-sejt kapcsolatokkal hozzák létre a monolayer endotéliumot. A morfológiai és funkcionális jellemzésük alapján háromféle kapcsolódási típust írtak le az endotél sejteknél: szoros kapcsolat (tight junction), adherens kapcsolat (adherens junction), illetve a réskapcsolódás (gap junction) [3, 4]. Ezt a három kapcsolódási formát különféle transzmembrán fehérjék alkotják, melyek szerepet játszanak a sejtek közti kölcsönhatás kialakításában, továbbá elősegítik az intracelluláris jelátvitelt. A különböző szervekben funkciófüggő módon az endotél rétegben található sejtkapcsolatok felépítése eltérő [5], valamint az EC-k nem csak morfológiailag térnek el egymástól, de fehérje- és felületi marker expressziójuk tekintetében is heterogének [6, 7]. Ezen heterogenitás hozzájárul a sejtfunkciók sokféleségéhez.

Az EC-k erekbe való szerveződésében, a sejtek migrációjában, proliferációjában, morfogenezisében, illetve a sejtek stabilitásának biztosításához és a túlélésükhöz is elengedhetetlen az extracelluláris mátrix (ECM) [8]. A citoszkeletont kialakító aktin- és intermedier filamentumok, valamint a mikrotubulusok közrejátszanak az EC-k morfológiai megjelenésében, így a barrier megfelelő kialakításában és fenntartásában [9]. További sejten belüli alapvető szabályozási mechanizmus a fehérjék foszforilációja, illetve defoszforilációja, mely az EC-k minden fiziológiai funkciójában kitüntetett szereppel bír [10].

Az EC-k a keringésen belüli fizikai, illetve kémiai ingerekre reagálnak, ezáltal szabályozzák többek között a véralvadást, a vazomotoros tónust, valamint az immun-, és

gyulladásos válaszokat. Kulcsfontosságúak a vaszkulogenezis és angiogenezis folyamataiban. Az EC-k sérülése, aktiválódása vagy diszfunkciója számos kóros állapot jellemzője, beleértve az ateroszklerózist, a félig átérésztő membrán funkció vesztesét, valamint a trombózist [11].

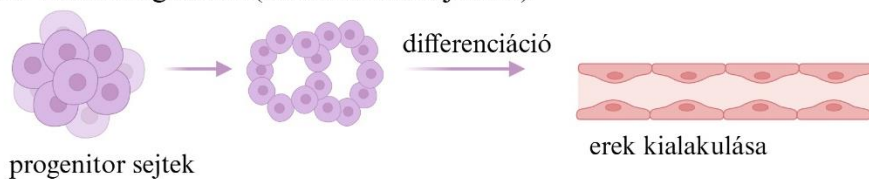


*1. ábra Az endotél sejtek által felépített endotélium élettani szerepe*

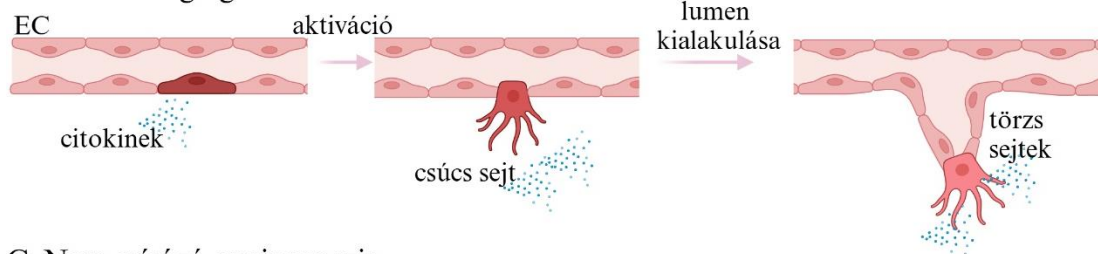
#### 4.2. Az angiogenezis folyamata

Az embrióban megjelenő kezdeti vérerek a vaszkulogenezis révén képződnek, mely folyamat magába foglalja a prekursor sejtek (angioblasztok) EC-ké történő differenciálódását, melyek ezt követően vaszkuláris labirintussá állnak össze (2.A ábra) [12]. Az angiogenezis során ezzel szemben egy már létező érrendszerből új erek alakulnak ki, ezáltal ez a folyamat felelős az érhálózat bővítéséért, illetve kialakításáért [13]. A klasszikus angiogenezisnek három típusát írták le: a leggyakrabban vizsgált csírázó angiogenezis (2.B ábra), a nem-csírázó (intussuszceptív) mikrovaskuláris növekedés (2.C ábra) [14], valamint a glomeruloid vaszkuláris proliferáció [15], mely a rákos szövetek egyik jellemzője is lehet. Alapvető fontosságúak a fejlődésben, szaporodásban, valamint a sebgyógyulás folyamatában.

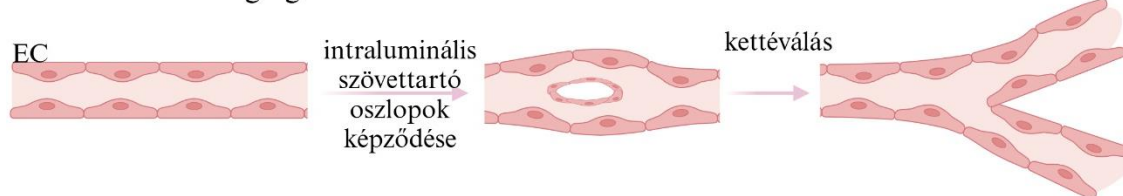
### A. Vaszkulogenezis (embrionális fejlődés)



### B. Csírázó angiogenezis



### C. Nem csírázó angiogenezis



2. ábra Főbb érképződési mechanizmusok

A fiziológias körülmények között lejátszódó angiogenezis mellett, számos betegség esetén is fontos szerepet játszanak, mint például rákos megbetegedések, diabéteszes retinopátia, valamint reumatoid arthritisz során [12]. Ezen funkciókat tekintve az angiogenezis egy erősen szabályozott folyamat, melyet specifikus angiogén molekulák indítanak el és állíthatják is meg [16]. Számos oldható, illetve membránhoz kötött molekula, valamint egyéb faktorok vesznek részt az angiogenezis szabályozásában [17]. Az angiogenezis folyamatát számos citokin, növekedési faktor, mátrix fehérje és egyéb fontos közvetítő közötti egyensúly segíti elő. Ilyen szabályozó molekulák például a vaszkuláris endotél növekedési faktor (VEGF) család tagjai [18-22], az angiopoietinek és Tie receptorok [23, 24], transzformáló növekedési faktor béta (TGF- $\beta$ ) [25] és a fibroblaszt növekedési faktor (FGF) tagjai [26-29].

A hipoxia az angiogenezis egyik legerősebb serkentője. A hipoxia-indukálható faktor (HIF) és a prolin hidroxiláz domént (PHD-t) tartalmazó enzim expressziója lehetővé teszi a sejtek számára az oxigénszint érzékelését. Alacsony oxigénszint esetén a PHD inaktív marad és nem hidroxilálja a HIF-et, amely így a VEGF transzkripciója révén fokozza az angiogenezist [30, 31]. Az alacsony oxigénszintet gyakran alacsony tápanyagellátás kíséri, ami szintén modulálja az angiogenezist. A hipoxiával és glükózmegvonással járó energia kimerülés aktiválja az adenzin-monofoszfát (AMP)-függő kinázt (AMPK-t) és stimulálja a katabolikus

útvonalakat, annak érdekében hogy ATP-t generáljon [32], ami szintén fokozza a VEGF expresszióját [33]. Az oxigén- és tápanyag ellátáson túl a gyulladás is az angiogenezis egyik fő modulátora. A gyulladásos sejtek, mint például neutrofilek, monociták és makrofágok, számos vasoaktív citokint és növekedési faktort választanak ki. Akut gyulladás esetén a citokinek ér dilatációt indukálnak a véráramlás és az érrendszer permeabilitásának növelése érdekében, mely lehetővé teszi, hogy több sejt jusson be és javítsa a szövetkárosodást [34, 35]. Krónikus gyulladás során az EC-k aktiválódnak és „proangiogén kapcsolón” mennek keresztül (amikor a pro- és antiangiogén tényezők egyensúlya a proangiogén irányba tolódik el [36]), ahol az interleukinek és a tumor nekrosis faktor (TNF $\alpha$ ) serkentik az érképződést. Ezen kívül a makrofágok klasszikus proangiogén faktorokat, VEGF-et szekretálhatnak, tovább fokozva az érrendszeri csírázást, mely gyakran koordinálatlan módon történik, ami rendellenes érszerkezetet és funkciót eredményez [37].

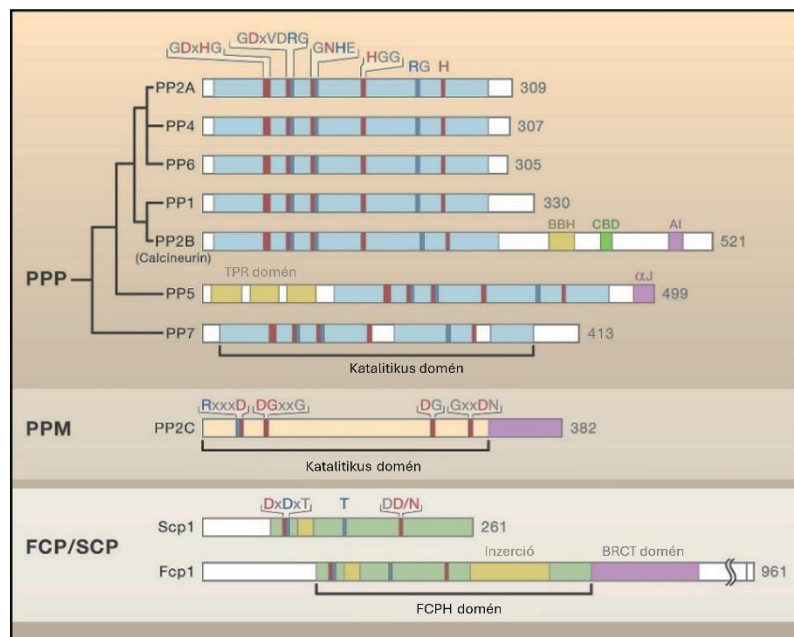
#### 4.3. Protein foszfatázok

A reverzibilis fehérje foszforiláció számos sejt folyamat szabályozásának az alapja, amelyek extracelluláris ingerekre, például hormonokra, mitogénekre, citokinekre és idegi impulzusokra adott válaszként aktiválódnak [38]. Eukarióta sejtekben a fehérjék a Ser, Thr és Tyr oldalláncon foszforilálódhatnak. A sejt fiziológiai szükségletétől függően a fehérjék átmenetileg foszforilált és defoszforilált állapotok között változnak, melyet a protein kinázok (PK) és protein foszfatázok (PP) szabályoznak [39]. A protein kinázok és foszfatázok működésének zavara számos betegség kialakulásához vezethet.

A PP-ok a fehérjék egy igen változatos csoportja, melyek a foszfoproteinekről foszfát csoportot távolítanak el, mely során a foszforsav-monoésztereket foszfátcsoportokká és szabad hidroxil csoporttal rendelkező molekulává hidrolizálják [40]. A PP-okat a szubsztrát specifitásuk szerint három nagy csoportba sorolják: Ser/Thr specifikus PP, Tyr specifikus PP, illetve kettős specifitású foszfatázokat, melyek mind Ser/Thr, mind Tyr oldallánccról egyaránt képesek a foszfát csoportot lehasítani [10]. Míg a foszforilációs folyamatok közel 96%-a Ser/Thr oldalláncon megy végbe, addig a Tyr oldalláncon történő foszforiláció körülbelül 2% [41-43].

A Ser/Thr specifikus foszfatázok szerkezetük alapján további három családba sorolhatók: foszfoprotein foszfatázok (PPP-k), fémion függő protein foszfatázok (PPM-k) és a CTD-foszfatázok (RNS-polimeráz II CTD-foszfatáz TFIIIF-hez asszociáló komponense; FCP/SCP) (3.ábra) [41, 44-46]. A PPP családot további alcsoportokra osztották: PP1, PP2A,

PP2B (kalcineurin), PP4, PP5, PP6, PP7 [41]. A PPM családba tartoznak a mangán/magnézium ionoktól függő PP-ok, mint például a PP2C és a piruvát-dehidrogenáz foszfatáz. A PPP családdal ellentétben a PPM család tagjai nem rendelkeznek szabályozó alegységgel, hanem különböző doméneket és konzervált motívumokat tartalmaznak, melyek segíthetnek meghatározni a szubsztrátspecifitást [47, 48]. A CTD-foszfatázok aszpartát alapú foszfatázok, amelyeket az FCP/SCP (RNS-polimeráz II CTD-foszfatáz TFIIIF-hez asszociáló komponense) képvisel [49].

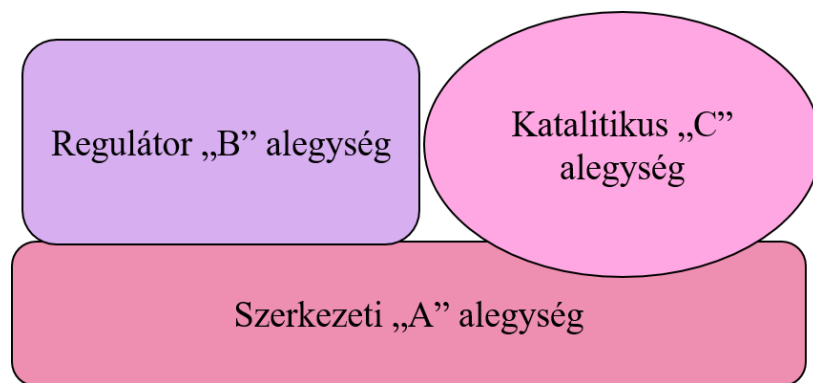


3. ábra A Ser/Thr specifikus protein foszfatázok csoportosításának sematikus ábrázolása - Yigong Shi; *Serine/Threonine Phosphatases Mechanism through Structure* (2009) [41]

#### 4.4. A PP2A szerkezete

A PP2A egy Ser/Thr specifikus protein foszfatáz, mely több biológiai folyamatban is fontos szerepet játszik. A számos szövettípus által expresszált holoenzimet széleskörűen tanulmányozzák biológiai szerepe miatt. A sejtekben a PP2A heterodimer és heterotrimer formában is előfordulhat. Heterodimer formában két alegységből épül fel, egy 65 kDa-os szerkezeti alegységből (PP2A A/PPP2AR1/PR65) valamint egy 36 kDa méretű katalitikus alegységből (PP2A C/PPP2C). Ez a heterodimer forma (core dimer) képes kötni egy harmadik regulátor alegységet (PP2A B), ezzel kialakítva a heterotrimer formát (4.ábra). A PP2A A szerkezeti alegység két izoformával rendelkezik ( $\alpha$  és  $\beta$ ), melyeket a *PPP2R1A* és *PPP2R1B*

gének kódolnak [50]. A két izoforma nukleinsav szinten 86%-os azonosságot mutatnak, azonban regulátor alegységet kötő képességük eltér egymástól [51]. A holoenzimek többségében (~90%) az A $\alpha$  izoformát tartalmazzák, ugyanis az A $\beta$  izoforma az embrionális fejlődés során detektálható igen magas szinten, azonban felnőtt szövetekben csak ritkán fordul elő [52]. Az embriogenezist követően az A $\beta$  izoforma mennyiségi csökkenésével párhuzamosan az A $\alpha$  izoforma mennyisége fokozatosan nő [53]. Heterotrimer formában a szerkezeti funkcióval bíró PP2A A alegységéhez először a katalitikus alegység kötődik, megkönnyítve a regulátor alegység, illetve az egyéb szubsztrátokkal történő kölcsönhatás kialakítását [54]. Az A alegység aminosav szekvenciájában 15 db 39-39 aminosavból álló tandem ismétlődő részt tartalmaz, melyet HEAT (huntigtin/elongation/A subunit/TOR) motívumnak neveztek el [55]. A B regulátor alegység az A alegység N-terminális végén lévő 1-10. HEAT ismétlődő egységekhez, míg a katalitikus alegység a C-terminális végen a 11-15. ismétlődő egységekhez kötődnek.



4. ábra A PP2A holoenzim sematikus heterotrimer szerkezete mely egy katalitikus C alegységből, egy szerkezeti A alegységből és egy variábilis B alegységből áll

A katalitikus C alegységnek szintén két izoformája van ( $\alpha$  és  $\beta$ ), amelyek nukleotid szekvenciájukban 97%-ban homológok [56]. A katalitikus alegységre globuláris szerkezet jellemző és expresszióját tekintve szinte minden szövettípusban megtalálható, azonban legnagyobb mennyiségben az agyban, illetve a szívben expresszálódik. Míg a C $\alpha$  izoforma a korai embrionális fejlődési szakaszban a plazmamembránban lokalizálódik, addig a C $\beta$  izoforma a citoplazmában és a sejtmagban [54]. Az izoformák ugyan expressziós szintjükben különböznek egymástól, de katalitikus aktivitásuk azonos, így az izoformák eltérő funkcióiért nem az enzimaktivitás és nem az alegységek közötti kötődés felelős [57].

A regulátor B alegységnek minimum 26 különböző altípusa van az emberi genomban, melyeket legalább 15 gén kódol. A regulátor alegységnek négy, szerkezetileg eltérő fehérje alcsaládja van (B/B55/PR55, B'/B56/PR61, B''/B72/PR72,

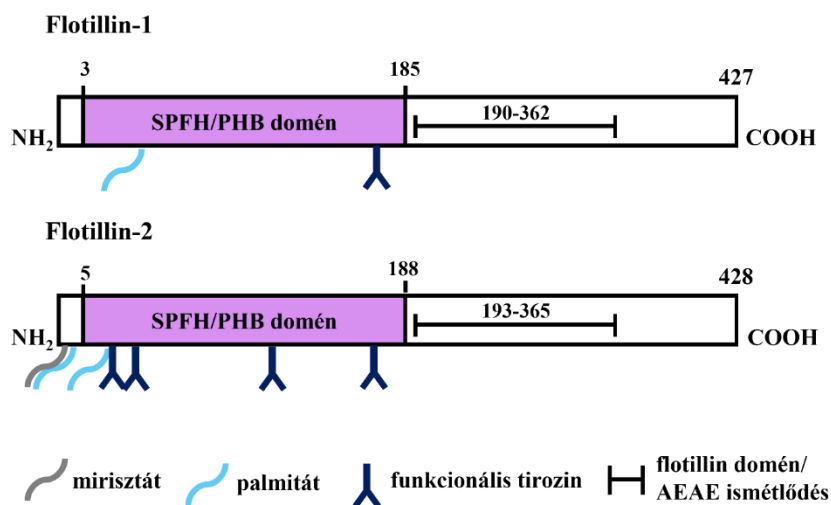
B<sup>γ</sup>/PR93(SG2NA)/PR110(Striatin). Ezek a fehérjék nem mutatnak szerkezeti hasonlóságot, valamint ezt a változatosságot tovább fokozza az alcsaládokon belül előforduló több izoforma. A regulátor alegységek alcsaládtól és izoformától függetlenül a szerkezeti A alegység ugyanazon szekvenciáját ismerik fel és kötődnek hozzá [54]. Genetikai és biokémiai vizsgálatok igazolták, hogy a különböző B regulátor alegységek határozzák meg a holoenzimek sejten belüli lokalizációját és szubsztrátspecificitását [58, 59]. A lehetséges A-B-C alegységekből felépülő holoenzimek számát 96-ra becsülik, azonban a valóban létező komplexek pontos száma nem ismert [60].

#### 4.5. A PP2A biológiai funkciói

A holoenzim sokféleségéből adódóan a PP2A számos funkcióval rendelkezik, többek között különböző enzimek aktivitásának szabályozásával irányítja a sejtek metabolizmusát, mint például a glikolízist, a lipid anyagcserét és a katekolamin szintézist [61]. Szerepe van több biológiai folyamatban is, így a sejtciklusban, a DNS replikációban, a transzkripcióban és translációban, a jelátvitelben, a sejtproliferációban, a citoszkeleton dinamikájában, a sejtek mozgásában, valamint az apoptózisban is. A PP2A virális fehérjékkel való kölcsönhatása befolyásolja a sejtranszformációt és számos közlemény számolt be tumorszupresszor hatásáról is [62-65]. A sejtciklus során a G2/M átmenet egyik kulcsenzimeként képes inaktív formában tartani a ciklin dependens kináz 1 (Cdc2)/ciklin-B komplexet, mellyel megakadályozza, hogy a sejtek G2 fázisból M fázisba lépjenek [66, 67]. Az apoptózisban kettős szabályozó szerepe van, elősegítheti mind a pro-, mind az anti-apoptotikus jelátvitelt a holoenzim szerkezetétől és a célzott jelátviteli útvonaltól függően [54, 68]. A kaszpáz-3-mal, B-sejtek limfóma 2-vel (Bcl-2) és adenovírus E4orf4-gyel való kölcsönhatása is a foszfatáz fontos szerepére utal az apoptózis során. Ezen felül a PP2A számos citoszkeletális és mikrotubulushoz kötődött fehérje defoszforilációján keresztül részt vesz a citoszkeleton szerkezetének szabályozásában is. Vastagbél daganatos sejtekben a B55 $\alpha$  alegységet tartalmazó PP2A a Wnt-jelátvitel során defoszforilálja a  $\beta$ -katenint [69], ezáltal a PP2A szerepet játszik a tumorképződés szabályozásában. Emellett a PP2A katalitikus alegysége fontos szerepet játszik a plazma membránban lévő E-kadherin és  $\beta$ -katenin stabilizálásában is [70].

#### 4.6. A flotillin-1 fehérje

A membrán asszociált fehérjék családjába tartozó flotillin családot két fehérje alkotja, a flotillin-1 (reggie-2) és a flotillin-2 (reggie-1), melyek aminosav szekvenciájukban 50%-os homológiát mutatnak (5.ábra) [71]. Mindkét flotillin fehérje az eddig tanulmányozott összes sejttypusban megtalálható [72-74]. A flotillin fehérjék közös szerkezeti jellemzője az N-terminális végen található SPFH (stomatatin, prohibitin, flotillin és HflK/C) vagy más néven PHB (prohibitin) domén [75, 76], valamint a C-terminális régió található alaninban és glutamátban gazdag rövid ismétlődő motívumok (flotillin ismétlődések) [71], melyek fontos szerepet játszanak a homo- és heterooligomerek kialakításában [77].



5. ábra A flotillin fehérje családot alkotó flotillin-1 és flotillin-2 fehérje szerkezete

A flotillin-1 legmagasabb szinten az agyban, szívben, tüdőben, placentában és a hematopoetikus sejtekben expresszálódik [78, 79]. Bár a flotillin-1 tutaj fehérjeként ismert [80], sejttypus függő módon leírják már a membránban, az endoszómában, a Golgiban és a sejtmagban is [81-84]. Bizonyos sejt vonalakban, mint a HepG2 (hepatoblasztóma sejt vonal) és a HeLa (immortalizált méhnyakrák daganat sejt vonal), a flotillin-1 a plazmamembránban helyezkedik el, míg másokban, mint például a MDCK (Madin-Darby kutya vesesejtek) sejtekben intracelluláris lokalizáció jellemző [76]. A flotillin-1-et először aranyhalakban azonosították, ahol a retina idegdúcsejtjeinek sérülése utáni regenerációjában játszott szerepet, ezért eredetileg reggie-2-nek nevezték [85]. A flotillin-1 és -2 fehérjék olyan nem-kaveoláris mikrodoménekben található membránfehérjék, amelyek a sejtfelszíni receptorok és a citoszkeleton közti kapcsolat létrehozásában, illetve a jelátviteli folyamatok kialakításában

játszanak szerepet. Bár topológiailag hasonlítanak egymásra, szekvenciájukban nem mutatnak rokonságot a kaveolinekkel [86].

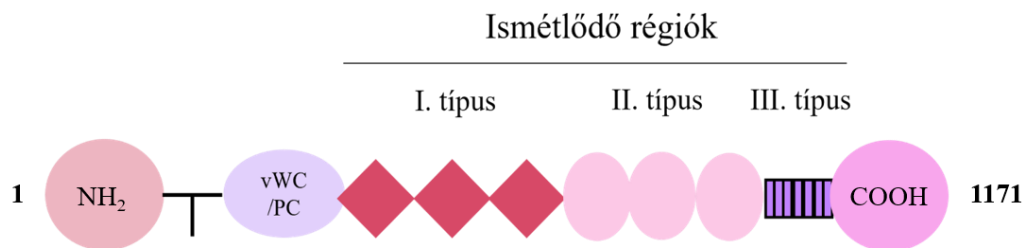
Több poszttranszlációs módosítást is azonosítottak a flotillin fehérjéken. A flotillin-2 membránhoz való kötődését mirisztoilációs (Gly<sup>2</sup>) és palmitoilációs helyek (Cys<sup>4</sup>, Cys<sup>19</sup>, Cys<sup>20</sup>) biztosítják [87, 88], míg a flotillin-1 fehérjében egyetlen palmitoilációs hely (Cys<sup>34</sup>) ismert [89]. A Cys<sup>34</sup> módosítása a vesesejtekben elengedhetetlen a flotillin-1 membrán lokalizációjához, addig a zsírsjtekben nem ez a módosítás felelős érte [76]. Az SPFH domén hidrofób szakaszai (10-36 és 134-141 aminosavak) szintén hozzájárulnak a fehérje membránhoz való kötődéséhez. A flotillin fehérjék foszforilációs poszttranszlációs módosításairól keveset tudunk. A Fyn kináz a flotillin-1 fehérjét a Tyr<sup>160</sup> oldalláncon, míg a flotillin-2 fehérjét a Tyr<sup>163</sup> oldalláncon foszforilálja [90]. A flotillin-2 Tyr<sup>163</sup> oldallánca és a flotillin domén fontos szerepet játszanak a homo- és hetero-oligomerek kialakításában [87, 91].

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

A thrombospondinok (TSP-k) számos sejttypusban expresszálódó kalciumkötő matricelluláris glikoproteinek. Ezek a nem strukturális fehérjék fiziológias körülmények között alacsony koncentrációban vannak jelen az ECM-ben, azonban szövetkárosodás vagy bizonyos kóros állapotok esetén expressziós szintjük jelentősen megnövekedhet [92]. A TSP fehérjecsalád öt tagból áll, melyeket szerkezetük alapján további két alcsaládba sorolnak. Az „A” alcsaládba a trimer TSP1 és TSP2 tartozik, míg a „B” alcsaládba a pentamer szerkezetű TSP3, TSP4 és TSP5/COMP (porc oligomer matrix protein) [93-95]. A TSP1-et és TSP2-öt a thrombospondin ismétlődő szekvencia (TSR) szupergén családba is besorolják, mivel szerkezetükben több thrombospondin ismétlődést tartalmaznak [96]. A TSP fehérjék fontos szerepet játszanak a sejt-sejt és a sejt-mátrix kommunikációban. A TSP1 volt az első fehérje a TSP-k közül, melyet „thrombin-érzékeny” fehérjeként azonosítottak, mivel thrombin-stimulált vérlemezkék  $\alpha$ -granulumából izolálták [92], de számos más sejttypus is szekretálja, például endotél sejtek [97, 98], fibroblasztok [99, 100], simaizom sejtek [99], pneumociták [101], makrofágok, monociták [102] valamint különböző tumorsejtek [103-105]. A TSP1 extra- és intracelluláris kölcsönhatásokat is képes kialakítani különféle fehérjékkel, receptorokkal vagy ligandumokkal [106-108].

A TSP1 funkciói széleskörűek, szerkezeti felépítése és az adott kölcsönható partnere határozza meg hogyan működik egy adott környezetben. Mindegyik TSP1 alegység egy aminosav-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 (TSR1-3) (6.ábra). A szerkezeti alegységeken belül több kötőhely található, melyek heparint, heparán-szulfát proteoglikánt, dekorint, különféle integrineket, proteázokat, citokineket és növekedési faktorokat ismernek fel. Az N-terminális domén integrinokkal ( $\alpha3\beta1$ ;  $\alpha4\beta1$ ;  $\alpha6\beta1$ ;  $\alpha9\beta1$ ) való kölcsönhatása révén szerepet játszik a sejttapadásban, terjedésben, proliferációban és migrációban, valamint a fibrinogénhez, illetve heparinhoz való kötődésen keresztül a vérlemezke aggregációban [109-111]. A TSR domének kölcsönható partnerei révén a TSP1 további sejtfunkciókat is ellát és kölcsönhatásba lép például a CD36 [112], CD47 és integrin-asszociált fehérjékkel (IAP) [113], ezáltal befolyásolva az EC-k viselkedését és biológiai funkcióját [114].



6. ábra A TSP1 fehérje sematikus szerkezete - N-terminális globuláris domén, vWC/PC domén, TSR ismétlődő szekvenciák, C-terminális globuláris domén

A TSP1 szabályozza a sejtek adhézióját, migrációját, és szerepet játszik a sejtproliferációban és az apoptózisban [95, 115], legfontosabb funkciója azonban, hogy az elsőként azonosított természetesen előforduló angiogenezist gátló fehérje [116]. Az 1-es típusú ismétlődések FGF-2 és VEGF-el való asszociációjával az angiogenezis gátlását indukálja és CD36-tól független módon gátolja az EC migrációt és proliferációt [117], miközben apoptózis-indukciót is okoz [95]. A leginkább tanulmányozott kölcsönhatás a TSP1 C-terminális régiója és a CD47 közötti kapcsolat. A TSP1 kötődése a CD47-hez szabályozza a nitrogén-monoxid (NO) jelátvitelt, ezáltal hatással van az értónusra és az olyan biológiai folyamatokra, mint az adhézió, migráció, apoptózis és proliferáció.

Bár a TSP1 poszttranszlációs módosításairól keveset tudunk, szekvenciája számos potenciális helyet tartalmaz. A Lys<sup>173</sup>, Lys<sup>262</sup>, Lys<sup>306</sup> és a Lys<sup>472</sup> oldalláncokat potenciális ubikvitinációs helyként írták le [118, 119], azonban a TSP1 fehérje Ser/Thr oldalláncon történő foszforilációját még nem írták le.

## 5. 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  $\beta$ -katenin 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(ek) azonosítása EC-kben.
- ❖ Az újonnan felfedezett kölcsönható partner(ek) 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(ek) 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 sejt mobilitás. Ezen kívül tumorszuppresszorként 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(ok) 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(ek) szabályozásán keresztül.

## 6. Anyagok és módszerek

### 6.1 Anyagok

#### 6.1.1. Pufferek, oldatok

- ❖ 1x TAE puffer - 0,114% ecetsav, 0,1 mM EDTA, 4 mM Tris, pH 8,5
- ❖ 2xYT - 5 g/l NaCl, 16 g/l tripton, 10 g/l élesztőkivonat, pH 7,0
- ❖ 5X mintapuffer - 0,01% brómfenolkék, 10% nátrium-dodecil-szulfát (SDS), 50% glicerin, 100 mM dithiothreitol (DTT), 310 mM Tris, 5% 2-merkaptoetanol használat előtt frissen hozzáadva
- ❖ Coomassie Blue gélfesték - 10v/v% ecetsav, 50v/v% metanol, 1 g/l Coomassie Brilliant Blue R-250
- ❖ Frakcionáló puffer - 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM KCl, 0,1 mM etilén-diamin-tetraecetsav (EDTA), 1% NP-40, (proteáz inhibitor koktél közvetlenül használat előtt hozzáadva)
- ❖ Immunprecipitációs puffer - 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 2 mM nátrium vanadát, 2 mM EDTA, 1% NP-40, (proteáz inhibitor koktél közvetlenül használat előtt hozzáadva)
- ❖ Kináz assay puffer - 2 mM EDTA, 5 mM egtazinsav (EGTA), 12,5 mM  $\beta$ -glicerolfoszfát, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM MOPS, pH 7,2
- ❖ LB-agar táptalaj - 5 g/l élesztő kivonat, 10 g/l NaCl, 10 g/l trypton, 1,5% agar, pH 7,0
- ❖ LB tápoldat - 5 g/l élesztő kivonat, 10 g/l NaCl, 10 g/l trypton, pH 7,0
- ❖ Lízis puffer - 0,1% Tween-20, 0,2% 2-merkaptoetanol, 50 mM Tris, pH 7,5 (proteáz inhibitor koktél közvetlenül használat előtt hozzáadva)
- ❖ PBS - 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 115 mM NaCl, pH 7,4
- ❖ PKC lipid aktivátor - 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 20 mM MOPS, pH 7,2
- ❖ SDS elektroforézis puffer - 25 mM Tris, 192 mM glicin, 0,25 mM SDS
- ❖ SDS gélfesték - 2,5 g/l Coomassie Brilliant Blue R-250, 10 v/v% cc. ecetsav, 90 v/v% metanol
- ❖ SDS-gélmosó oldat - 12 v/v% metanol, 7 v/v% jégecet
- ❖ SOC - 20 g/l tripton, 2 g/l élesztő, 0,6 g/l NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM glükóz, pH 7,0
- ❖ TBS - 150 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl, pH 7,5

- ❖ TBST - 150 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl, 0,1% Tween-20, pH 7,5
- ❖ Transzfer puffer - 20 v/v% metanol, 40 mM glicin, 120 mM Tris-HCl

#### 6.1.2. Sejtvonal

- ❖ Marha tüdő artéria endotél sejtvonal, BPAEC: Bovine Pulmonary Artery Endothelial Cells, (American Type Tissue Culture Collection, CCL-209)

#### 6.1.3. Baktérium törzsek

- ❖ *Escherichia coli* BL21 (DE3) - Thermo Fischer Scientific
- ❖ *Escherichia coli* JM109 - Thermo Fischer Scientific

#### 6.1.4. Felhasznált vektorok

- ❖ pGEX-4T-2 vektor - Clontech Laboratories Inc.
- ❖ pcDNA 3.1/myc-His (-) A vektor - Life Technologies
- ❖ pBiT1.1-C TK/LgBiT vektor - Promega
- ❖ pBiT2.1-C-TK/SmBiT vektor - Promega
- ❖ pGEM T-Easy vector - Promega

#### 6.1.5. Alkalmazott antitestek

- ❖ aktin (anti-nyúl poliklonális antitest) - Sigma Aldrich (#A5060)
- ❖ anti-egér IgG tormaperoxidáz (HRP)-konjugált antitest - Cell Signaling Technology, Inc. (#7076)
- ❖ anti-nyúl IgG HRP-konjugált antitest - Cell Signaling Technology, Inc. (#7074)
- ❖ CD31 - Cell Signaling Technology, Inc. (#3528S)
- ❖ c-myc (anti-egér monoklonális antitest) - Invitrogen (#13-2500)
- ❖ flotillin-1 (anti-egér monoklonális antitest) - LifeSpan BioSciences (LS-C307575)
- ❖ flotillin-1 (anti-nyúl poliklonális antitest) - Cell Signaling Technology, Inc. (#3253S)
- ❖ foszfo-Ser PKC szubsztrát (anti-nyúl poliklonális antitest) - Cell Signaling Technology, Inc. (#2261S)
- ❖ PP2A A (anti-nyúl poliklonális antitest) - Cell Signaling Technology, Inc. (#2039S)
- ❖ PP2A B55 $\alpha$  (anti-nyúl poliklonális antitest) - Cell Signaling Technology, Inc. (#2290S)
- ❖ PP2A B55 $\alpha$  (anti-egér monoklonális antitest) - Cell Signaling Technology, Inc. (#5689S)

- ❖ PP2A C (anti-nyúl poliklonális antitest) - Cell Signaling Technology, Inc. (#2038S)
- ❖ thrombospondin-1 (anti-nyúl poliklonális antitest) - Cell Signaling Technology, Inc. (#14778)
- ❖ thrombospondin-1 (anti-egér monoklonális antitest) - Santa Cruz Biotechnology (sc-393504)
- ❖ V5 (anti-egér monoklonális antitest) - Thermo Scientific (R960-25)
- ❖ V5 (anti-egér monoklonális antitest) - Cell Signaling Technology, Inc. (#13202)

## 6.2. Módszerek

### 6.2.1. Polimeráz láncreakció (PCR)

A flotillin-1 kódoló szekvenciáját a laborunkban már korábban előállított humán tüdő artéria endotél sejtekből (HPAEC) származó cDNS felhasználásával sokszorosítottuk. Az amplifikáció során a pGEX-4T-2 vektorba való klónozáshoz szükséges hasítóhelyeket (lila színnel jelölve) tartalmazó primereket alkalmaztuk.

#### Primerek szekvenciája:

Forward: 5' - TGG AAATCC TAT GTT TTT CAC TTG TGG CCC A -3' ( $T_{m1}$ : 56,4°C /  $T_{m2}$ : 69,7°C)

Reverse: 5' - ATG CTCGAG TCA GGC TGT TCT CAA AGG C - 3' ( $T_{m1}$ : 57,5°C /  $T_{m2}$ : 71,8°C)

*1. táblázat: PCR során alkalmazott hőmérsékleti profil*

Lépés	Hőmérséklet	Időtartam	Ciklusszám
<b>I.</b>	98°C	1 perc	1 x
<b>II.</b>	98°C	10 másodperc	5x
	54°C	10 másodperc	
	72°C	15 másodperc	
<b>III.</b>	98°C	10 másodperc	30x
	66°C	10 másodperc	
	72°C	15 másodperc	
<b>IV.</b>	72°C	1 perc	1x
<b>V.</b>	4°C	∞	

A foszfomutáns pGEX-4T-2-flotillin-1 Ser315Ala (foszfonull) és Ser315Asp (foszforilációt utánzó) plazmidok létrehozásához back-to-back PCR technikát alkalmaztunk, mely során a már meglévő vad típusú pGEX-4T-2-flotillin-1 plazmidot használtuk templátként. A mutációhoz szükséges nukleotidcserét a PCR során felhasznált forward primerek tartalmazták (piros színnel jelölve a kicserélt nukleotidokat).

Primerek szekvenciája:

Ser315Ala forward: 5'/Phos/ - GAA GCC GCG **G**CT GTG CGG ATG C - 3' ( $T_m$ : 71,6°C)

Ser315Asp forward: 5'/Phos/ - GAA GCC GCG **G**AT GTG CGG ATG C - 3' ( $T_m$ : 69,5°C)

Ser315 reverse: 5'/Phos/ - TGC CTC CGC CTG CAT AAT TAG TTG GG - 3' ( $T_m$ : 69,5°C)

2. táblázat: A flotillin-1 mutánsok létrehozásához használt PCR profil

Lépés	Hőmérséklet	Időtartam	Ciklusszám		
I.	98°C	1 perc	1x		
II.	98°C	5 másodperc	30x		
	65°C	66°C		67°C	5 másodperc
	72°C			90 másodperc	
III.	72°C	1 perc	1x		
IV.	4°C	∞			

Az emlős expresszióra alkalmas pcDNA 3.1/myc-His (-) A vektorba való klónozáshoz a flotillin-1 kódoló szekvenciáját a korábban előállított pGEX-4T-2 vektorba klónozott flotillin-1 inzert felhasználásával sokszorosítottuk. Az amplifikációhoz alkalmazott primerek tartalmazták a klónozáshoz szükséges hasítóhelyeket (lila színnel jelölve).

Primerek szekvenciája:

Forward: 5' - TGG **AA**TCC TAT GTT TTT CAC TTG TGG CCC A - 3' ( $T_{m1}$ : 56,4°C /  $T_{m2}$ : 69,7°C)

Reverse: 5' - ATA **AA**GCT TGG CTG TCC TCA AAG GCT TGT G - 3' ( $T_{m1}$ : 63,2°C /  $T_{m2}$ : 70,9°C)

3. táblázat: Alkalmazott PCR profil

Lépés	Hőmérséklet	Időtartam	Ciklusszám
<b>I.</b>	98°C	1 perc	1 x
<b>II.</b>	98°C	10 másodperc	5x
	58°C	10 másodperc	
	72°C	13 másodperc	
<b>III.</b>	98°C	10 másodperc	30x
	66,5°C	10 másodperc	
	72°C	13 másodperc	
<b>IV.</b>	72°C	1 perc	1x
<b>V.</b>	4°C	∞	

A NanoBiT rendszerhez a PP2A B55 $\alpha$  és flotillin-1 kódoló szekvenciáját a következő primerekkel amplifikáltuk PCR technikával. A felsokszorosított szekvenciákat a pBiT1.1-C-TK/LgBiT illetve a pBiT2.1-C-TK/SmBiT vektorokba szubklónoztuk.

PP2A B55 $\alpha$  esetében használt primerek:

Forward: 5' - TAG AAT TCC ATG GCA GGA GCT GGA G - 3' ( $T_m$ : 67,4°C)

Reverse: 5' - ATA CTC GAG GCA TTC ACT TTG TCT TGA AAT ATA TA - 3' (68,2°C)

flotillin-1 esetében használt primerek:

Forward: 5' - GCG AAT TCC ATG TTT TTC ACT TGT GGC CCA - 3' ( $T_m$ : 70,8°C)

Reverse: 5' - TAT CTC GAG ATG GCT GTT CTC AAA GGC TTG - 3' ( $T_m$ : 70,8°C)

A TSP1 kódoló szekvenciáját HeLa sejtekből származó cDNS-ből amplifikáltuk fészek primerek felhasználásával, így egy 4017 bázispár hosszúságú szekvenciát kaptunk, amely tartalmazza a TSP1 fehérje 3513 bázispár hosszú kódoló szekvenciáját.

Primerek szekvenciája:

Forward: 5' - GGC AAG CTT GGG ATC TCT ACA TTC GTA TTT -3' ( $T_m$ : 69,2°C)

Reverse: 5' - CCT TAG TGC TTT GGC CTC TGC TCC - 3' ( $T_m$ : 68,5°C)

4. táblázat: Fészek-PCR során alkalmazott hőmérsékleti profil

Lépés	Hőmérséklet	Időtartam	Ciklusszám
I.	98°C	2 perc	1x
II.	98°C	7 másodperc	30x
	71°C	7 másodperc	
	72°C	1 perc	
III.	72°C	1 perc	1x
IV.	4°C	∞	

Ezt a PCR terméket templátként használunk a TSP1 kódoló szekvenciájának felsokszorozásához. Az emlős expresszióra alkalmas pcDNA 3.1/myc-His (-) A vektorba való klónozáshoz az amplifikációhoz felhasznált primerek tartalmazták a klónozáshoz szükséges hasítóhelyeket (lila színnel jelölve).

Primerek szekvenciája (pcDNA 3.1/myc-His (-) A vektorba való klónozáshoz):

Forward: 5' - TAC TCG AGT AAT GGG GCT GGC CTG G -3' ( $T_{m1}$ : 54,2°C /  $T_{m2}$ : 70,7°C)

Reverse: 5' - GGC AAG CTT GGG ATC TCT ACA TTC GTA TTT -3' ( $T_{m1}$ : 55,4°C /  $T_{m2}$ : 69,2°C)

pGEX-4T-2 vektorba történő klónozáshoz a TSP1 kódoló régióját GoTaq G2 Flexi Polymerase-t (Promega, #M7801) felhasználásával amplifikáltuk. A PCR-hez használt primerek a bakteriális expresszióra alkalmas pGEX-4T-2 vektorba való klónozáshoz szükséges hasítóhelyeket tartalmazták (lila színnel jelölve).

Primerek szekvenciája (pGEX-4T-2 vektorba való klónozáshoz)

Forward: 5' - TAT GTC GAC CAT GGG GCT GGC CTG GG - 3' ( $T_{m1}$ : 58,4°C /  $T_{m2}$ : 74°C)

Reverse: 5' - ACT ACG GTA CCT TAG GGA TCT CTA CAT TCG TAT TTC -3' ( $T_{m1}$ : 58,4°C /  $T_{m2}$ : 73,3°C)

5. táblázat: A TSP1 kódoló szekvenciájának felszorzósításához használt PCR profil

Lépés	Hőmérséklet	Időtartam	Ciklusszám
I.	95°C	2 perc	1x
II.	95°C	15 másodperc	5x
	53,4-62°C	15 másodperc	
	72°C	3 perc 40 másodperc	
III.	95°C	15 másodperc	30x
	68,3-72°C	15 másodperc	
	72°C	3 perc 40 másodperc	
IV.	75°C	5 perc	1x
	4°C	∞	

A PCR terméket 1% agaróz gélen választottuk el, majd a Gel Extraction Kit segítségével tisztítottuk ki a gyártó által leírt protokoll alapján. A tisztított DNS-t ezt követően pGEM T-Easy Vector System (Promega, #A1360) felhasználásával ligáltuk.

A TSP1 szekvenciáját lefedő, rövidebb fragmentjeinek létrehozásához használt primereket a 6. táblázat tartalmazza. A fragmentek létrehozásához templat DNS-ként a teljes hosszúságú pGEX-4T-2-TSP1 plazmidot használtuk. A pGEX-4T-2 vektorba való klónozáshoz szükséges hasítóhelyeket lila szín jelöli.

6. táblázat: TSP1 fragmentek létrehozásához felhasznált primerek

Konstrukt	Forward primer	Reverse primer
pGEX-4T-2-TSP1 (1-221aa)	5'- TTA <b>GGA TCC</b> ATG GGG CTG GCC TGG GG - 3' ( $Tm_1$ : 61,8°C / $Tm_2$ : 74°C)	5'- GTA <b>CTC GAG</b> TCA GGT TCC AAA GAC AAA CCT CAC - 3' ( $Tm_1$ : 59,8°C / $Tm_2$ : 73,7°C)
pGEX-4T-2-TSP1 (222-314aa)	5'- TGA <b>ATT CCC</b> ACA CCA GAA GAC ATC CTC AGG - 3' ( $Tm_1$ : 61,2°C / $Tm_2$ : 72,1°C)	5'- GTT <b>CTC GAG</b> CTA CCG CCT CAG CTC ATT G - 3' ( $Tm_1$ : 53,5°C / $Tm_2$ : 73°C)
pGEX-4T-2-TSP1 (315-697aa)	5'- TAT <b>CCC GGG</b> CCT CCC CTA TGC TAT CAC AA - 3' ( $Tm_1$ : 58,4°C / $Tm_2$ : 73,2°C)	5'- TAT <b>CTC GAG</b> CTA TCA TCC AGG TCT GTG TCC TC - 3' ( $Tm_1$ : 59,5°C / $Tm_2$ : 73,8°C)
pGEX-4T-2-TSP1 (698-1171aa)	5'- GTT <b>GGA TCC</b> GAG GAC ACA GAC CTG GAT G - 3' ( $Tm_1$ : 59,5°C / $Tm_2$ : 73°C)	5'- GAC <b>CTC GAG</b> TTA GGG ATC TCT ACA TTC GTA TTT C - 3' ( $Tm_1$ : 60,9°C / $Tm_2$ : 72,8°C)

A pcDNA 3.1/myc-His (-) A -TSP1 foszforilációt utánzó, illetve foszfonull mutánsainak létrehozására helyspecifikus mutagenézist alkalmaztunk, mely során a vad típusú pcDNA 3.1/myc-His (-) A - TSP1 plazmidot használtuk templátként. A foszforilációt utánzó mutáns esetében a potenciális Ser oldalláncot aszparaginsavra, míg foszfonull mutáns esetében alaninra cseréltük. A pontmutációt okozó nukleinsavcseréket a PCR során használt forward primerek tartalmazták (piros színnel jelölve).

Primerek szekvenciája Ser44 esetében:

Ser44Ala forward: 5' -/Phos/ CGC AAG CGG **G**CT GGG CGC CGA - 3' (*T<sub>m</sub>*: 73,1°C)

Ser44 reverse: 5' -/Phos/ CGC AAG GGG GAT GGG CGC CGA - 3' (*T<sub>m</sub>*: 71°C)

Primerek szekvenciája Ser93 esetében:

Ser93Ala forward: 5' -/Phos/ TTC TGG CAG **G**CCC TGA GGC AGA - 3' (*T<sub>m</sub>*: 65,3°C)

Ser93Asp forward: 5' -/Phos/ TTC TGG CAG **A**CC TGA GGC AGA - 3' (*T<sub>m</sub>*: 63,2°C)

Ser93 reverse: 5' -/Phos/ CGT GCC CCG GGT CTT CTT CA - 3' (*T<sub>m</sub>*: 64,6°C)

A pGEX-4T-2-TSP1<sup>1-221aa</sup> Ser44Ala/Ser93Ala duplamutáns létrehozásánál az Ser93Ala forward - Ser93 reverse nukleotidsav cseréhez szükséges primerpárt alkalmaztuk a pGEX-4T-2-TSP1<sup>1-221aa</sup> Ser44Ala konstruktot felhasználva templátként.

## 6.2.2. RT-PCR és kvantitatív valós idejű PCR (qPCR)

Az RT-PCR során EC-kből GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Scientific; #K0732) felhasználásával először totál RNS-t izolálunk. 500ng totál RNS-ből oligo-dT primerek, illetve RevertAid reverz transzkriptáz enzim (Thermo Scientific; #EP0441) segítségével cDNS-t szintetizáltunk.

A qPCR során az EC-kből származó cDNS-t alkalmaztuk templátként. A reakcióhoz Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mixet (Thermo Scientific; #K0221) alkalmaztunk a gyártó által ajánlott protokoll alapján. A mérésekhez a LightCycler 480 Thermocycler (Roche, Basel, Svájc) műszert használtuk a 7. táblázatban található PCR profilt alkalmazva. A mérések során a 8. táblázatban látható génspecifikus primerpárokat alkalmaztuk. Minden biológiai ismétlés során három technikai párhuzamossal dolgoztunk. Az eredmények kiértékelése során a kapott értékeket (Ct érték)  $\beta$ -aktinra és/vagy GAPDH-ra normalizáltuk, ezt követően a normalizált értékeket  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  képlet alapján számoltuk ki.

7.táblázat: A qPCR során használt PCR profil

Lépés	Ciklus neve	Hőmérséklet	Időtartam	Ciklusszám
I.	UDG-előkezelés	50°C	2 perc	1x
II.	Pre-inkubáció	95°C	10 perc	1x
III.	Amplifikálás	95°C	15 másodperc	40x
		60°C	1 perc	
IV.	Olvadási görbe analízis	95°C	5 másodperc	1x
		60°C	1 perc	
		97°C	10 másodperc	
V.	Hűtés	40°C	30 másodperc	1x

8.táblázat: A qPCR során használt specifikus primer párok

Gén	Forward primer	Reverse primer
TSP1	5'- CCT GGA CTT GCT GTA GGT TAT G - 3'	5' - CCT CTC GGT GTT GAT GAA GAA G - 3'
PP2A A	5'- GCT GGC CAT CAT CGA GTA TAT G - 3'	5'- CCA TGC ACA AGG AGT TGA GT - 3'
PP2A C	5'- GAT GGG CAG ATC TTC TGT CTA C - 3'	5'- GTC ACA CAT TGG ACC CTC AT - 3'
PP2A B55 $\alpha$	5'- CAA CCG GAG ATA AAG GTG GTA G - 3'	5'- GGC TCT GAA AGG TGC TGT AA - 3'
PP2A B $\beta$	5'- GAC TTA CCA GGT TCA CGA CTA C - 3'	5'- ATG ACA CTG TCT GAC CCA TTC - 3'
PP2A B $\gamma$	5'- ATG ACG TCT ACA GCA CTT TCC - 3'	5'- GGG AGC CAC TTG ATC TTG TT - 3'
PP2A B $\delta$	5'- TGG ACA TCA AGC CTG CTA AC - 3'	5'- GCT ACT GCT GTA GAC GAA CAC - 3'
GAPDH	5'- GAT GCT GGT GCT GAG TAT GT - 3'	5'- GCA GAA GGT GCA GAG ATG AT - 3'
$\beta$ -aktin	5'- GCA AGT ACT CCG TGT GGA TT - 3'	5'- GAC TCA TCG TAC TCC TGC TTG - 3'

### 6.2.3. Agaróz gélelektroforézis és DNS tisztítás gélből

A DNS méret szerinti elválasztására alkalmazott agaróz gélelektroforézishez használt agarózt 1xTAE pufferben melegítéssel oldottunk fel, majd a DNS fragmentumok detektálásának érdekében 20000x hígításban GelRed (Biotium Inc.; #41003) nukleinsav festéket adtunk az oldathoz. A vizsgálandó DNS elválasztásához méretétől függően 0,9%-1,2% agaróz tartalmú géleket használtunk fel. Az oldatot buborékmentesen futtató tálcába öntöttük, majd hagytuk megszilárdulni. A fragmentek méretének ellenőrzésére 1kb DNS létrát (Thermo Fischer Scientific; #SM0311) alkalmaztunk. A futtatást 60-80 V-on végeztük 1xTAE pufferben. A gélből steril szikével jól körbehatároltan a megfelelő méretnél megjelenő DNS sávokat kivágtuk UV megvilágításnál, majd Thermo GeneJET Gel Extraction (Thermo Fischer Scientific; #K0692) 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. A gélből izolált DNS tisztaságát és koncentrációját NanoDrop 2000 spektrofotométer segítségével mértük le. Az izolált DNS-t a  $A_{260/280} = 1,8-2,0$  értéke között tekintettük tisztának.

### 6.2.4. Restriktív emésztés

A klónozáshoz használt inzerteket és a pGEM T-Easy, pGEX-4T-2-, illetve pcDNA 3.1/myc-His (-) A vektorokat a jelölt restriktív enzimekkel emésztettük 37°C-os vízfürdőben 1 órán keresztül, ezáltal kialakítva a kompatibilis tapadós DNS végeket. Back-to-back PCR során felszorzosított vektor-inzert termékeket, futtatást és tisztítást követően DpnI restriktív enzimmel emésztettük, mely metiláció alapján a templát DNS-ként használt DNS-t hasítja el, ezáltal meghagyva a tiszta, PCR által amplifikált terméket. DpnI enzimmel való emésztés során szintelen 10x Fast Digest puffert alkalmaztunk, majd gél extrakciós kittel tisztítottuk.

Felhasznált FastDigest restriktív endonukleázok mindegyike a Thermo Scientific<sup>TM</sup>-től származik:

- ❖ BamHI - 5'...GGATCC...3' (#FD0054)
- ❖ EcoRI - 5'...GGATTC...3' (#FD0274)
- ❖ HindIII - 5'...AAGCTT...3' (#FD0504)
- ❖ KpnI - 5'...GGTACC...3' (#FD0524)
- ❖ NotI - 5'...GCGGCCCGC...3' (#FD0596)
- ❖ SalI - 5'...GTCGAC...3' (#FD0644)

- ❖ ScaI - 5'...AGTACT...3' (#FD0434)
- ❖ XhoI - 5'...CTCGAG...3' (#FD0695)
- ❖ XmaI - 5'...CCCGGG...3' (#ER0171)

#### 6.2.5. Ligálás

A ligálási elegyet steril körülmények között mértük össze, 1,5 ml-s mikrocentrifuga csövekbe. Az előzőleg restriktációs enzimekkel előkészített pGEX-4T-2 vektort és flotillin-1 vagy TSP1 inzertet (1:3, 1:5 vagy 1:7 inzert:vektor moláris arányban), illetve a lineáris back-to-back foszfomutáns plazmidokat T4 DNS ligáz enzim (Thermo Fischer Scientific, #15224025) jelenlétében 1 órán keresztül szobahőmérsékleten, vagy egy éjszakán keresztül 4°C-on inkubáltuk, majd a ligálási elegyeket JM109 *E.coli* kompetens sejtekbe transzformáltuk.

#### 6.2.6. Transzformálás

A JM109 *E.coli* kompetens sejteket jégen felolvasztottuk majd egy 15 ml-s centrifuga csőbe 100µl kompetens sejtet mértünk, melyhez hozzáadtuk a ligálási elegyeket és 20 percen keresztül jégen inkubáltuk. A kontrollként használt kompetens sejthez nem adtunk DNS-t. Az inkubációs idő lejártá után a mintákat 45 másodpercig 42°C-os vízfürdőbe helyeztük, majd újra 2 percig jégen inkubáltuk. Ezután 20 mM glükóz tartalmú szuper optimális tápközeg (SOC) oldatot adtunk a sejtekhez és 45 percen keresztül, 37°C-on 180 rpm fordulatszámra rázattuk őket, hogy kialakuljon az antibiotikum rezisztencia. A rázatást követően a transzformált mintákból 50 µl-t ampicillin tartalmú LB-agar plate-re szélesztettünk, míg a kontroll mintákat LB-agarra és antibiotikumot is tartalmazó LB plate-re kentük ki, amelyeket egy éjszakán keresztül 37°C-os inkubátorban helyeztük.

#### 6.2.7. Plazmid tisztítás és DNS szekvenálás

Az antibiotikumtartalmú LB táptalajon felnőtt telepek közül 2-4 darabot 3 ml antibiotikumtartalmú LB tápoldatba oltottunk és 16-18 órán keresztül 37°C-on, 180 rpm-en rázattuk. Az inkubáció után a baktérium sejtuszpenzióból Thermo GeneJET Plazmid Miniprep Kittel (Thermo Fischer Scientific; #K0503) a gyártó protokollja alapján tisztítottuk a

DNS-t. Nagyobb mennyiségű plazmid DNS kinyeréséhez a 16-18 órán keresztül rázatott mintákat 1:1000 hígításban antibiotikum tartalmú LB tápoldatba mértük és az előzőekben leírt paramétereknek megfelelően ráztuk. Ezen plazmidok tisztításához GeneJET plazmid Maxiprep kitet (Thermo Fischer Scientific; #K0492) használtunk. Az izolált DNS tisztaságát és koncentrációját NanoDrop 2000 spektrofotométer segítségével mértük meg, továbbá a plazmidokat restrikciós emésztéssel is ellenőriztük. A létrehozott pontmutációkat és a klónozás sikerességét szekvenálással validáltuk, amelyet a BIOMI Kft. (Gödöllő) végzett.

#### 6.2.8. Bakteriális fehérje expresszió optimalizálása, GST-fúziós fehérjék termeltetése

A glutation S-transzferáz (GST) címkével ellátott rekombináns fehérjék expressziójának optimalizálásához a kitisztított rekombináns plazmidokat BL21(DE3) *E. coli* kompetens sejtekbe transzformáltuk. Az optimalizálás első lépéseként egy telepet leoltottunk, amelyet 16-18 órán keresztül 37°C-on, 180 rpm-en ráztunk. Következő nap 1:1000 arányban hígítottuk a baktériumokat 2xYT oldatban és OD<sub>600</sub>: 0,5-ig növesztettük a sejteket, 37°C-on, 180 rpm-en. Ezt követően a sejtuszpenziót 7db 50 ml-s falkoncsőbe porcióztuk majd különböző koncentrációban izopropil-1-tio-β-D-galaktózidot (IPTG) adtunk hozzájuk, és különböző hőmérsékleten (13°C, 25°C és 37°C) ráztuk a mintákat. A kontroll mintához nem adtunk IPTG-t. A mintákból 100 μl-t 5x SDS mintapufferrel denaturáltunk, majd a fehérje termeltetés sikerességét SDS-PAGE-en ellenőriztük. A csövekben maradt baktériumokat centrifugálással összegyűjtöttük (3750 rpm, 5 perc, 4°C), majd a pelletet 1x PBS-sel mostuk és felhasználásig -70°C-on tároltuk. A 9. táblázat tartalmazza az optimalizálás eredményeként kapott, továbbiakban felhasznált termelési körülményeket.

9. táblázat: A rekombináns fehérjék termeltetésének indukálásához használt paraméterek

Fehérje	IPTG koncentráció	Hőmérséklet	Indukálási idő
GST	0,5mM	37°C	3 óra
GST-flotillin-1 GST-flotillin-1 Ser315Ala GST-flotillin-1 Ser315Asp	0,1mM	25°C	3 óra
GST-TSP1 <sup>1-221</sup> , GST-TSP1 <sup>1-221</sup> Ser44Ala GST-TSP1 <sup>1-221</sup> Ser93Ala, GST-TSP1 <sup>1-221</sup> Ser93Asp, GST-TSP1 <sup>1-221</sup> Ser44Ala/Ser93Ala	0,1mM	13°C	16-18 óra
GST-TSP1 <sup>222-314</sup>	1mM	37°C	3 óra
GST-TSP1 <sup>315-697</sup>	0,1mM	25°C	16-18 óra
GST-TSP1 <sup>698-1171</sup>	0,5mM	25°C	3 óra

#### 6.2.9. A rekombináns fehérjék tisztítása

A baktérium sejteket proteáz inhibitor koktélt (1:1000) tartalmazó lízis pufferben szuszpendáltuk, majd Branson Sonifer (AMS Materials) homogenizálóval 30% duty cycle és 3-as output kontrol beállítással a GST-flotillin-1 vad típusú és foszfomutáns fehérjék esetében 2x45 másodpercen keresztül jégen tártuk fel. Az ultrahangos kezelést követően 50 µl mintát 2x SDS mintapufferrel forraltuk (totál minta), míg a maradék feltárt lizátumot 12000 rpm-en, 4°C-on, 20 percen keresztül centrifugáltuk. Ezt követően újabb mintát vettünk (feltárt minta), majd a maradék felülúszót előzőleg 1x PBS-sel mosott 20 µl glutathion Sepharose 4B gyantára (GE Healthcare) mértük és 2 órán keresztül 4°C-on forgattuk. A nem kötődött fehérjék eltávolítása érdekében a gyantát 3x mostuk 1x TBST oldattal, majd a kötődött fehérjéket 60 µl 2x SDS mintapufferrel főzéssel eluáltuk. A fehérje tisztítás sikerességét 10%-os poliakrilamid gélelválasztással ellenőriztük.

A TSP1 fehérje fragmentek tisztítása hasonló módhoz zajlott, de a GST-TSP1<sup>1-221aa</sup> fragmentek esetében (vad típusú vagy foszfomutáns) a feltáráshoz 1%-os Na-lauril-szarkozint használtunk, amely alkalmas a zárványtestek szolubilizálására. A feltárást követően a sejtlizátum Na-lauril-szarkozin tartalmát 0,008%-ra hígítottuk és Triton-X detergenssel (1:200)

egészítettük ki [120]. Ezenkívül a TSP1 fragmentek immobilizálásához eltérő időintervallumot használtunk (10. táblázat). A GST-TSP1<sup>222-314aa</sup> rekombináns fehérje nagy mennyiségben termelődött az indukció hatására, így az immobilizáláshoz 16-szoros hígítást alkalmaztunk.

10. táblázat: GST-TSP1 fragmentek tisztítási, immobilizálási körülményei

Rekombináns fehérje	Na-lauril-szarkozin	Feltárás (másodperc)	Immobilizálás
GST-TSP1 <sup>1-221aa</sup>	1%	2 x 45''	16-18 óra, 4°C
GST-TSP1 <sup>222-314aa</sup>	-	45''	3-4 óra, 4°C
GST-TSP1 <sup>315-697aa</sup>	-	2 x 45''	16-18 óra, 4°C
GST-TSP1 <sup>698-1171aa</sup>	-	60''	16-18 óra, 4°C

#### 6.2.10. Tüdő artéria endotél sejtek tenyésztése

Kísérleteinkhez marha tüdő artéria endotél sejteket (BPAEC) használtunk. A sejteket 10% hőinaktivált főtális marha szérumot (FBS) (Sigma Aldrich; #F9665), 1% nem esszenciális aminosavat (Lonza; #13-114E), 1% Na-piruvát-ot (Lonza; #BE13-115E) és 2mM L-glutamint tartalmazó komplett médiumban (Minimum Essential Media (MEM), Lonza; #12-611F) tenyésztettük 37°C-on, 5% CO<sub>2</sub> tartalmú és 95% páratartalmú inkubátorban. A BPAEC sejteket a 16.-21. passzálási szám között használtuk. Amikor a sejtek elérték a 100%-os konfluenciát, a tápoldatot steril körülmények között leszívtuk, majd a letapadt sejteket 10 ml PBS oldattal mostuk. Ezt követően 2 ml Tripszin-EDTA-t (Lonza; BE17-141E) adtunk a sejtekhez, 2 percre az inkubátorba tettük, hogy a sejtek a flaska aljától felváljanak. A tripszint friss, komplett médium hozzáadásával inaktiváltuk, a sejteket szuszpendáltuk, majd 1:3 arányban hígítottuk és felhasználásig/következő passzálásig visszahelyeztük az inkubátorba.

#### 6.2.11. Transzfektálás, géncsendesítés és kezelések

A BPAEC sejteket Lipofectamine 3000 reagens felhasználásával (Invitrogen<sup>TM</sup>; #L3000015) transzfektáltuk a rekombináns plazmidokkal (pcDNA3.1/myc-His (-) A - flotillin-1 vad típus, - flotillin-1 Ser315Ala, - flotillin-1 Ser315Asp illetve pcDNA3.1/myc-His (-) A - TSP1 vad típus, TSP1 Ser93Ala, TSP1 Ser93Asp). A gyártó protokollja alapján a DNS-hez P-reagenst adtunk, míg a Lipofectamine reagens szérummentes médiumban hígítottuk. A lipid-DNS komplexet óvatosan cseppenként adtuk a szérummentes médiumban lévő sejtekhez, majd

4 órára inkubátorba helyeztük. Az inkubációs után a szérumentes médiumot komplett MEM-re cseréltük és további 24 órán keresztül tenyésztettük a sejteket.

Az EC-k PP2A B55 $\alpha$  génjének csendesítéséhez 50nM PP2A B55 $\alpha$  specifikus SMARTpool siRNS-t (GE Healthcare Dharmacon, Inc.; L-004824-00) vagy PP2A B55 $\alpha$  specifikus siRNS-t (Santa Cruz Biotechnology; sc-39185) használtunk Lipofectamine RNAiMAX transzfekciós reagenssel (Invitrogen<sup>TM</sup>; #3778-150). Az siRNS-t és a Lipofectamine RNAiMAX mixet tartalmazó szérumentes médiumot 5 percig inkubáltuk, majd óvatosan a komplett médiumban lévő sejtekhez adtuk és 48 órán keresztül tenyésztettük a sejteket. Kontrollként ON-TARGETplus siCONTROL nem targetáló pool siRNS-t (Thermo Fisher Scientific; D-001810-10-01-05) használtunk.

Az EC-ken alkalmazott kezelések koncentrációját és időtartamát a *11. táblázat* tartalmazza.

*11. táblázat: Endotél sejteken használt kezelések*

<b>Kezelés</b>	<b>Hatás</b>	<b>Kezelési koncentráció</b>	<b>Időtartam</b>
phorbol 12-mirisztát 13-acetát (PMA)	PKC aktivátor	1 $\mu$ M	30 perc
Gö6976	PKC inhibitor	1 $\mu$ M	30 perc
Okadánsav (OA)	foszfatáz inhibitor (PP2A)	5nM	30 perc
Tautomycin (TM)	foszfatáz inhibitor (PP1)	1 $\mu$ M	10 perc

#### 6.2.12. Pull down (PD)

A T75-ös tenyésztő flaskában lévő, 100% konfluenciájú BPAEC sejteket 1x PBS oldattal mostuk, majd proteáz inhibitor tartalmú (1:1000) lízis pufferben jégen tártuk fel. A sejtlizátumot 25 másodperces szonikálással tártuk fel, majd 12000 rpm-en, 4°C-on, 20 percen keresztül centrifugáltuk. A centrifugálás után a felülúszóból mintát vettünk, melyet 2x SDS mintapufferrel főztünk meg (totál sejtlizátum). A glutathion Sepharose 4B gyantán immobilizált GST és GST-fúzionált rekombináns fehérjékhez adjuk a feltárt sejtlizátumot és a mintákat 16-18 órán keresztül 4°C-on forgattuk. Másnap a pull down mintákat háromszor

mostuk 1x TBST oldattal és a kötődött fehérjéket 100µl 2x SDS mintapufferrel főzéssel eluáltuk a gyantáról. A pull down mintákat SDS-PAGE gélfestéssel és Western blot technikával vizsgáltuk.

### 6.2.13. SDS-PAGE, Western blot (WB) és Far Western blot

A fehérjék molekulatömeg szerinti elválasztását a vizsgált fehérje méretétől függően 8-12% akrilamidot tartalmazó poliakrilamid gélen végeztük. A gélfestéshez használt mintákból 10 µl-t vittünk fel, 0,75 mm vastag SDS-PAGE géltre, amelyet 120 V-on futtattunk 1,5 órán keresztül. Az elektroforézist követően a fehérjék detektálásának érdekében a gélt 15 percig Coomassie Brilliant Blue festéssel festettük, majd SDS gélmosó folyadékkal mostuk míg láthatóvá váltak.

A Western blothoz használt mintákból 20 µl-t vittünk fel 1,5 mm vastag SDS-PAGE géltre, amelyet szintén 120 V-on futtattunk. Az elválasztott fehérjéket transzfer pufferben 0,45 µm pórusú nitrocellulóz membránra (Advantec MFS Inc.) transzferáltuk át (100 V, 1,5 óra). Ezután a membránt 5%-os sovány tejporban (TBST oldva) inkubáltuk 1 órán keresztül, hogy a membrán szabad kötőhelyeit blokkoljuk. Blokkolást követően a membránt TBST-vel mostuk, majd 16-18 órán keresztül, 4°C-on inkubáltuk 0,1% BSA-t és elsődleges fehérje-specifikus antitest tartalmú TBST oldattal. Másnap a membránt 3x 5 percig mostuk TBST oldattal, majd 1 órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk anti-egér/anti-nyúl IgG, HRP-konjugált másodlagos antitesttel (0,1% BSA tartalmú TBST oldatban 1:5000 hígítva). A membránt 2x5 percig TBST-vel és 1x5 percig TBS-sel mostuk. A fehérjéket Chemidoc Touch (Bio-Rad) műszerrel detektáltuk Western Bright megnövelt kemilumineszcencia (ECL)-HRP substrate reagent (Advansta MFS Inc.) felhasználva, kemilumineszcenciás módon.

A Far Western blot esetében a bakteriálisan termeltetett, tisztított GST, GST-flotillin-1 és GST-flotillin-2 fehérjéket SDS-PAGE gélen elválasztottuk, majd nitrocellulóz membránra transzferáltuk. A membránt 5% szarvasmarha-szérumalbumin (BSA) tartalmú TBST oldatban 1 órán keresztül blokkoltuk szobahőmérsékleten, majd 5 percen keresztül TBS oldattal mostuk. A BPAEC sejteket PBS-sel átmostuk, majd proteáz inhibitor tartalmú (1:1000) lízis pufferben szonikálással feltártuk. Centrifugálást (12000 rpm, 20 percen, 4°C) követően a felülúszót a membránra mértük és 16-18 órán keresztül 4°C-on inkubáltuk. Negatív kontrollként a membránt lízis pufferrel inkubáltuk. A következő napon a membránt 5 perces TBS mosás után 1:1000 hígítású PP2A B55α specifikus elsődleges antitesttel (0,1% BSA, TBST) inkubáltuk 4

órán át, 4°C-on. A membránt TBS-sel mostuk, majd 1:5000 arányban hígított anti-nyúl/anti-egér IgG, HRP konjugált másodlagos antitesttel inkubáltuk. A kemilumineszcenciás jeleket Chemidoc Touch műszerrel detektáltuk.

#### 6.2.14. Proteome Profiler Angiogenesis Array

A Proteome Profiler Human Angiogenesis Array Kit (Bio-Techne R&D System Kft., ARY007) egy membrán alapú szendvics immunoassay. Kísérleteink során a nem targetáló-, illetve PP2A B55 $\alpha$  specifikus siRNS-sel transzfektált sejtek azonos fehérjetartalmú sejtlyázátumát használtuk a gyártó protokolljának megfelelően. A membránokat egyidejűleg 30 másodperces expozícióval fotóztuk. Az eredmények kiértékeléséhez ImageJ szoftvert használtunk.

#### 6.2.15. Immunprecipitáció (IP)

A T75-ös flaskában tenyésztett BPAEC sejteket PBS-sel történő mosás után proteáz inhibitor tartalmú IP pufferben kapartuk fel. A sejtlyázátumot 25 másodperces szonikálással tártuk fel és 12000 rpm-en, 4°C-on 20 percig centrifugáltuk. A centrifugálást követően a felülúszóból mintát vettünk, amit 5x SDS mintapufferrel főztünk meg (totál IP minta). A maradék felülúszót 20  $\mu$ l előmosott protein G- Sepharose gyantára (GE Healthcare) mértük és 3 órán keresztül 4°C-on forgattuk (előtisztítási lépés). A gyantát centrifugálással (12000rpm, 4°C, 20 perc) eltávolítottuk, így megszabadulva az aspecifikusan kötődött fehérjéktől. Az előtisztított felülúszót 20  $\mu$ l előmosott protein G gyantához mértük és az antitest hozzáadását követően 16 órán keresztül forgattuk 4°C-on. Másnap a mintákat centrifugáltuk (3000rpm, 3 perc, 4°C) és mostuk háromszor TBST-vel, majd a kötődött fehérjéket 2x SDS mintapufferrel főzéssel eluáltuk.

#### 6.2.16. Immunfluoreszcencia (IF) és konfokális mikroszkópia

A BPAEC sejteket 12 lyukú sejttenyésztő edényben steril üveg fedőlemezekben tenyésztettük. A médium leszívása után a sejteket TBS-sel mostuk, majd 3,7% paraformaldehid tartalmú PBS-oldattal fixáltuk, 10 percig szobahőmérsékleten. A fixálást követően a sejteket TBS-sel mostuk, majd 20 percig 0,5% Triton X-100 tartalmú TBS oldattal permeabilizáltuk. Mosás után 2% BSA tartalmú TBS-sel blokkoltuk 30 percen keresztül. A sejteket 1:100

arányban blokkoló oldatban hígított fehérje specifikus elsődleges antitesttel 1 órán keresztül, nedveskamrában inkubáltuk. Mosást követően a mintákat 1 órán keresztül, fénytől elzárva, nedves kamrában inkubáltuk 1:300 arányban blokkoló oldatban hígított fényérzékeny másodlagos antitesttel. Az aktin filamentumokat Texas Red Phalloidin- vagy Phalloidin 633 festékekkel jelöltük. A sejtek mosása után TO-PRO-3 Iodide vagy 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) nukleinsav festéket alkalmaztunk a sejtmagok jelölésére. A magi festés után a mintákat kétszer mostuk TBS-oldattal, majd 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.

#### 6.2.17. Proximity Ligation Assay (PLA)

A PLA Duolink In Situ kit-et (Sigma-Aldrich) a fehérjék közti kölcsönhatás kimutatására használtuk. A BPAEC sejteket az immunfluoreszcens festéshez hasonlóan üveg fedőlemezen fixáltuk, permeabilizáltuk és blokkoltuk. Blokkolást követően a sejteket anti-flotillin-1 vagy anti-TSP1 és anti-PP2A B55 $\alpha$  elsődleges antitestekkel egyszerre inkubáltuk 1 órán keresztül nedves kamrában. A sejteket 2x5 percig mostuk, majd 1:5 arányban hígított oligonukleotidokkal ellátott másodlagos antitestekkel (PLA próbák) inkubáltuk 1 órán keresztül a nedves kamrában. A sejteket 1x mosó puffer A-val (DUO82047) mostuk 2x5 percig. Az 5x ligációs puffert nukleázmentes vízben hígítottuk, melyhez a ligáz enzimet 1:40 arányban adtuk és a mintákat 30 percen keresztül nedves kamrában inkubáltuk. A sejteket 2x2 percig mostuk mosó puffer A-val, majd az amplifikációs pufferben 1:80 arányban hígított polimeráz enzimmel inkubáltuk 100 percen keresztül nedves kamrában 37°C-on. Az amplifikáció után a mintákat 2x10 percig 1x mosó puffer B-vel (DUO82048) majd 1 percig 0,01x Mosó puffer B-vel mostuk. A mintákat DAPI nukleinsav festéket tartalmazó Duolink In Situ Mounting Medium felhasználásával ragasztottuk tárgylemezekre. 15 perc elteltével a sejtekről Leica TCS SP8 konfokális mikroszkóppal készítettünk felvételeket, melyeket Las AF szoftver felhasználásával értékeltünk ki.

#### 6.2.18. *In vitro* PKC foszforiláció és *in vitro* defoszforiláció

A rekombináns fehérjéket glutathion Sepharose 4B gyantán immobilizáltuk. A gyantát centrifugáltuk (3000 rpm, 3 perc, 4°C) és háromszor mostuk TBST-vel, majd az immobilizált

fehérjét tartalmazó gyantát nukleáz mentes vízben szuszpendáltuk, amely szubsztrát mintaként szolgált. Az *in vitro* PKC foszforilációt kináz pufferben hígított aktív PKC $\alpha$  (Signal Chem) hozzáadásával végeztük, PKC aktivátor és ATP jelenlétében. A negatív kontroll minták nem tartalmaztak aktív PKC $\alpha$  enzimet. A mintákat 2 órán keresztül 30°C-os vízfürdőben inkubáltuk, majd centrifugáltuk (3000 rpm, 3 perc, szobahőmérsékleten). A felülúszó eltávolítását követően a fehérjéket 2x SDS mintapufferrel főzéssel eluáltuk. A foszforiláció sikerességét Western blot technikával vizsgáltuk.

12. táblázat: Az *in vitro* PKC foszforilációhoz használt reakció elegyek

Reagens	Foszforilálatlan minták	Foszforilált minták
Szubsztrát	30 $\mu$ l	30 $\mu$ l
PKC aktivátor (1M CaCl <sub>2</sub> )	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l
ATP assay koktél	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l
Aktív PKC (1U)	-	40 $\mu$ l
Kináz puffer	40 $\mu$ l	-

A fehérjék *in vitro* defoszforilációs vizsgálatához tisztított, glutathion Sepharose gyantán immobilizált foszforilált rekombináns fehérjét használtunk, melyekhez lízis puffert, sejlizátumot, okadánsavval vagy tautomicitinnel kezelt sejlizátumot, nem targetáló siRNS-sel illetve PP2A B55 $\alpha$  specifikus siRNS-sel transzfektált sejlizátumot adtunk. A fehérje defoszforilációt foszfo-specifikus antitest felhasználásával Western blottal ellenőriztük, amely során a membrán aspecifikus kötőhelyeit 5% BSA oldattal blokkoltuk.

#### 6.2.19. Sejtfractionálás

A sejtek membrán és citoplazma frakcióinak izolálásra ProteoJET Membrane Protein Extraction Kit-et (Thermo Scientific) alkalmaztunk. A 6 lyukú sejtenyésző edényben lévő sejteket 1 ml PBS-sel mostuk, majd 500  $\mu$ l PBS-ben óvatosan felkapartuk és centrifugálással (300 g, 5 perc) gyűjtöttük össze. A pellethez mosó oldatot adtunk és ismét centrifugáltuk (500 g, 5 perc). A sejtperlethez proteáz inhibitor tartalmú (1:1000) permeabilizáló puffert adtunk, vortexeltük, majd 10 percen keresztül jégen inkubáltuk. Ezt követően mintát vettünk és 5x SDS mintapufferrel főztük (totál frakció). A permeabilizált sejteket 16000 g-n, 15 percig centrifugáltuk 4°C-on, majd a felülúszóból mintát vettünk és 5x SDS mintapufferrel főztük (citoplazma frakció). A pelletet proteáz inhibitor tartalmú szolubilizáló pufferrel

szuszpendáltuk és 30 percen keresztül, 4°C-on egyenletesen kevertettük. A mintákat 16000 g-n 15 percen keresztül 4°C-on centrifugáltuk, majd a felülúszóból mintát vettünk és 5x SDS mintapufferrel főztük (membrán frakció). A sejtfractionálás sikerességét Western blottal ellenőriztük.

#### 6.2.20. NanoBiT rendszer

A BPAEC sejteket pBiT1.1-C TK/LgBiT-PP2A B55 $\alpha$  és pBiT2.1-C-TK/SmBiT flotillin-1 vad típusú; Ser315Ala és Ser315Asp konstrukciókkal kotranszfektáltuk. Pozitív kontrollként a gyártó által létrehozott SmBiT-PRKACA és LgBiT-PRKAR2A plazmidokat alkalmaztuk, melyek a PKA katalitikus, illetve regulátor alegységeit kódolják. Negatív kontrollként a HaloTag-SmBiT-et kódoló NanoBiT negatív kontroll vektort kotranszfektáltuk az általunk előállított LgBiT-PP2A B55 $\alpha$  plazmiddal. A PP2A B55 $\alpha$  és flotillin-1 fehérjék között kialakult kölcsönhatásból származó lumineszcenciás jelet Tecan Spark multimode microplate reader (Tecan Group) segítségével detektáltuk.

#### 6.2.21. ECIS mérések (electric cell-substrate impedance sensing)

A kontroll és pcDNA3.1/myc-His (-) A flotillin-1 WT, Ser315Ala, Ser315Asp transzfektált BPAEC sejtek letapadásának és elterülését a transzfekció utáni 24 órával vizsgáltuk. A transzfektált sejteket speciális, 8 elektródás 8W10E plate-ekbe helyeztük és a sejtek impedanciájának változásait folyamatosan mértük. A sejtek migrációját a kontroll és különböző flotillin-1 formákat overexpresszáló konfluens BPAEC sejteken vizsgáltuk *in vitro* sebzési módszerrel. A konfluens sejtek impedancia értékei 1000-1300  $\Omega$  között voltak. A sebzést 5 mA erősségű, 60 kHz frekvenciájú árammal végeztük 30 másodpercig, amellyel az elektróda felszínén kiégettük a sejteket, így egységes méretű „sebet” hoztunk létre. Ezután 10 órán át mértük a sejtek impedancia változását a seb bezáródásáig. A sejtek migrációs sebességét a következő képlet alapján számítottuk:  $v=r/t$ , ahol r az elektróda átmérője (125  $\mu$ m), t pedig a sebzáródás ideje. A sejtletapadási és elterülési kísérleteknél az impedanciát 64 kHz-en, míg a sejt migrációs vizsgálatokban 4 kHz-en mértük.

#### 6.2.22. Scratch assay

A 24 lyukú sejtenyésztő plate-ben lévő BPAEC sejteket pcDNA3.1/myc-His (-) A rekombináns plazmidokkal transzfektáltuk. 24 óra elteltével a médiumot steril 1,5 ml-s eppendorf csövekbe gyűjtöttük (kondicionált médium), majd a sejtekre 500 µl PBS oldatot mértünk. Egy steril 1 ml-s pipettaheggyel egyenletes mozdulattal karcolást végeztünk a sejtrétegen. A PBS eltávolítása után a kondicionált médiumot visszaadtuk a sejtekre. A karcolást, valamint a sejtek sebgyógyulási képességét óránként fotóztuk Leica MC 120 HD mikroszkóppal, 5x nagyítású objektív használatával. A sebzáródás mértékét az ImageJ szoftver segítségével értékeltük ki.

#### 6.2.23. *In vitro* angiogenezis

Az érképződési képesség vizsgálatához Matrigel extracelluláris mátrixot használtunk. A µ-Slide plate-be (Ibidi) jégen, buborékmentesen, 10 µl/lyuk Matrigel-t mértünk ki, majd 30 percre inkubátorba helyeztük. Eközben a kontroll és pcDNA3.1/myc-His (-) A rekombináns plazmidokkal transzfektált BPAEC sejtek kondicionált médiumát összegyűjtöttük. A sejteket tripszinezéssel felválasztottuk a szövettenyésztő edényből és megszámloltuk. Mintánként  $3 \times 10^4$  sejtet felfuszpendáltunk a kondicionált médiumban, majd 50 µl-t mértünk a Matrigelt tartalmazó lyukakba. Maradék sejteket Western blot analízisre készítettük elő. A sejtek érképzési képességét óránkénti fotózással követtük nyomon. A felvételeket Leica MC 120 HD mikroszkóppal készítettük. Az F-aktin festést 5 órával a sejt kirakás után végeztük, a képeket a Leica TCS SP8 konfokális mikroszkóppal készítettük. Az érképzés kiértékelését ImageJ szoftverrel végeztük el.

#### 6.2.24. 3D mágneses sejtenyésztés

A 3D mágneses sejtenyésztés során az EC-eket magnetizáljuk NanoShuttle-PL mágneses gyöngyökkel, amelyek a sejtmembránhoz kötődnek, így mágneses erő hatására 3D szferoidokat képeznek, amelyek utánozzák a natív szöveti környezetet. A géncsendesített és transzfektált sejtek magnetizálása a gyártó leírása alapján történt. Röviden, a 100%-os konfluenciájú EC-eket NanoShuttle-PL gyöngyökkel (1µl/10000 sejt) inkubáltuk egy éjszakán át. Az optimalizált sejtszámú mágnesezett sejteket 96 lyukú sejttaszító edénybe helyeztük és 20 percre az inkubátorba helyeztük. A szferoidok kialakításához speciális mágnes modul

használtuk, amelyet a sejttaszító edény alá helyeztünk és egy éjszakán át együtt inkubáltuk, hogy a mágnesezett sejtek egy pontba gyűlve 3D szferoidokat képezzenek. A mágnes modul eltávolítása után a képződött szferoidokról különböző időpontokban fotókat készítettünk, hogy nyomon követhessük a szferoidok változásait. A készített fotókat ImageJ programmal értékeltük ki.

#### 6.2.25. Anti-V5-agaróz affinitás gél

A BPAEC sejteket a munkacsoportunk által korábban létrehozott pcDNA3.1 V5-His PP2A B55 $\alpha$  és pcDNA3.1 V5-His PP2A B' $\gamma$  konstrukciókkal transzfektáltuk. 24 óra elteltével a sejteket PBS-sel mostuk, majd 600  $\mu$ l proteáz inhibitor tartalmú lízis pufferben szonikálással feltártuk. A sejt-lizátumot 10000 g-n, 10 percig 4°C-on centrifugáltuk és a felülúszóhoz 50  $\mu$ l anti-V5 agaróz gyantát (Sigma Aldrich, A7345) adtuk és 5 órán keresztül 4°C-on forgattuk. A gyantát háromszor mostuk 1x PBS oldattal majd 1x SDS mintapufferrel főztük meg és Western blot-tal vizsgáltuk.

#### 6.2.25. Tandem tömegspektrometria (LC-MS/MS)

Az új kölcsönható partner azonosításához a pull-down kísérletét követően az elválasztást SDS-PAGE módszerrel végeztük, majd a fehérjéket Coomassie Brilliant Blue festéssel tettük láthatóvá. Az extra sávot kivágtuk a gélből, és tömegspektrometriás analízis céljából Dr. Janáky Tamásnak küldtük el a Szegedi Tudományegyetemre.

#### 6.2.26. Statisztikai analízis

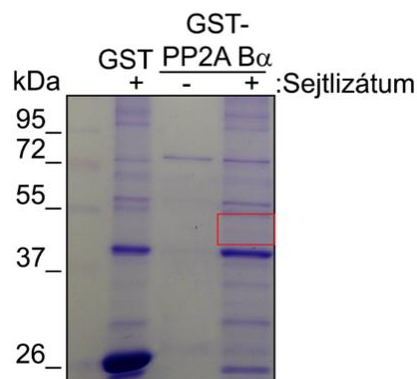
Az eredményeket átlag  $\pm$  SD formában adtuk meg. A statisztikai analízist GraphPad Prism (8.0.1-es verzió) szoftverrel végeztük a megjelölt tesztek alapján. A szignifikáns különbségek csillaggal (\*) jelöltük ( $p < 0.05$  (\*);  $p < 0.01$  (\*\*);  $p < 0,001$  (\*\*\*)). Az immunblottok denzitometrállását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

## 7. Eredmények

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

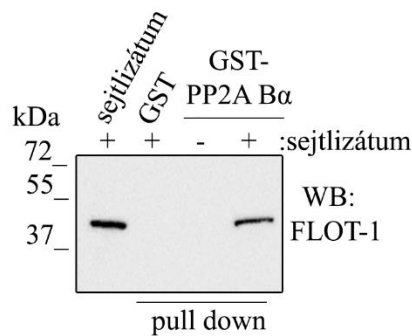
#### 7.1.1. A flotillin-1 fehérje azonosítása, mint a PP2A B55 $\alpha$ új kölcsönható partnere endotél sejtekben

A PP2A B55 $\alpha$  alegység új kölcsönható partnerének azonosításához létrehoztuk a pGEX-4T-2-PP2A B55 $\alpha$  rekombináns plazmidot, melyet GST címkével jelölt fehérje termeléshez és tisztításhoz használtunk fel. Az *E.coli* baktériumban jól expresszálható GST egy 26kDa molekulatömegű fehérje, amely glutationt tartalmazó affinitás oszlopon (Glutathion Sepharose) könnyen tisztítható. A GST és GST-PP2A B55 $\alpha$  fehérje glutation Sepharose 4B gyantán történő tisztítását követően, az immobilizált fehérjéket BPAEC sejt-lizátummal inkubáltuk. Negatív kontrollként a gyantán kikötött fehérjéhez az EC-k feltárásához használt lízis puffert adtuk. A pull down mintákat ezt követően SDS-PAGE-n választottuk el, majd Coomassie Brilliant Blue-val festettük. Az EC sejt-lizátummal 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 (7. ábra).



7. ábra **PP2A B55 $\alpha$  fehérje új kölcsönható partnerének azonosítása** - Bakteriálisan expresszált GST és GST-PP2A B55 $\alpha$  rekombináns fehérjét Glutathion Sepharose 4B gyantán immobilizáltuk, majd tüdő artéria endotél sejt-lizátummal (+), illetve lízis pufferral inkubáltuk (-). A 2x mintapufferben főzéssel eluált pull down mintákat SDS-PAGE-n választottuk el, majd Coomassie Blue Brilliant festékkel detektáltuk. A piros négyzet a PP2A B55 $\alpha$  fehérjének egy lehetséges új kölcsönható partnerét jelöli, melyet LC-MS/MS tömegspektrometriás méréssel a flotillin-1 fehérjeként azonosítottak.

A PP2A B55 $\alpha$  és flotillin-1 fehérjék közti kölcsönhatás kimutatását a pull down minták Western blot analízisével is igazoltuk, ahol pozitív kontrollként sejtlizátumot használtunk. A mintákat 11%-os SDS-PAGE gélen választottuk el, majd a fehérjéket nitrocellulóz membránra transzferáltuk. A membránt blokkoltuk, majd flotillin-1 elleni antitesttel és HRP-konjugált másodlagos antitestekkel inkubáltuk. A sejtlizátumban a flotillin-1 fehérje ~47kDa-nál látható. A PP2A B55 $\alpha$  fehérjével való kölcsönhatást a sejtlizátummal inkubált GST- PP2A B55 $\alpha$  mintánál megjelenő flotillin-1 jel igazolja (8. ábra).

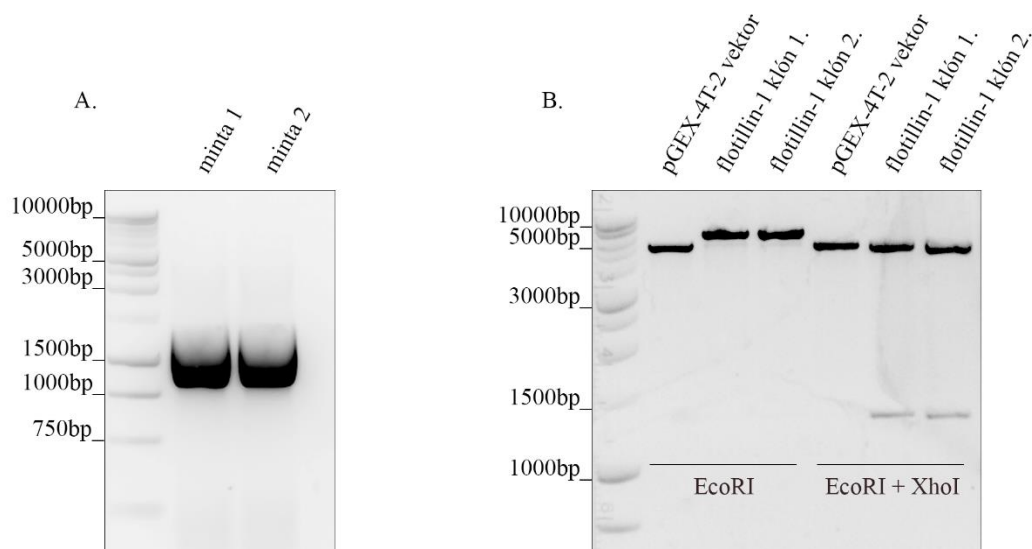


8. ábra A PP2A B55 $\alpha$  és flotillin-1 fehérjék közti kölcsönhatás igazolása - Bakteriálisan expresszált GST és GST-PP2A B55 $\alpha$  fehérjéket Glutathion Sepharose 4B gyantán immobilizáltuk, majd a mintákat lízis pufferrel, illetve BPAEC sejtlizátummal inkubáltuk 16 órán keresztül, 4°C-on. Pull downt követően a mintákat SDS-PAGE-n választottuk el és flotillin-1 specifikus antitesttel vizsgáltuk Western blottal.

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

A kölcsönhatás további vizsgálatához szeretnénk volna létrehozni a rekombináns GST-flotillin-1 fehérjét. A flotillin-1 kódoló szekvenciáját PCR technikával sokszoroztunk fel HPAEC-ből származó cDNS felhasználásával. A felhasznált primereket úgy terveztük meg, hogy a PCR termék alkalmas legyen a pGEX-4T-2 vektorba való klónozáshoz. Az amplifikáláshoz használt hőmérsékleti profil (Anyagok és módszerek 1. táblázat) megtervezésében figyelembe vettük a primerek olvadási hőmérsékletét (T<sub>m</sub>). A folyamat első öt ciklusában a flotillin-1 szekvenciájára illeszkedő T<sub>m</sub> értéket alkalmaztuk, míg a további harminc ciklusban a klónozáshoz szükséges teljes hosszúságú primerek T<sub>m</sub> értékét vettük figyelembe, mellyen kialakítottuk a vektorba való illesztéshez szükséges EcoRI illetve XhoI hasítóhelyeket. A Phusion DNS polimeráz nagy szöveghűségű, hőstabil enzim, ezáltal a reakció során a DNS denaturálása 98°C történt, míg az elongáció 72°C-on. A PCR termékeket (két

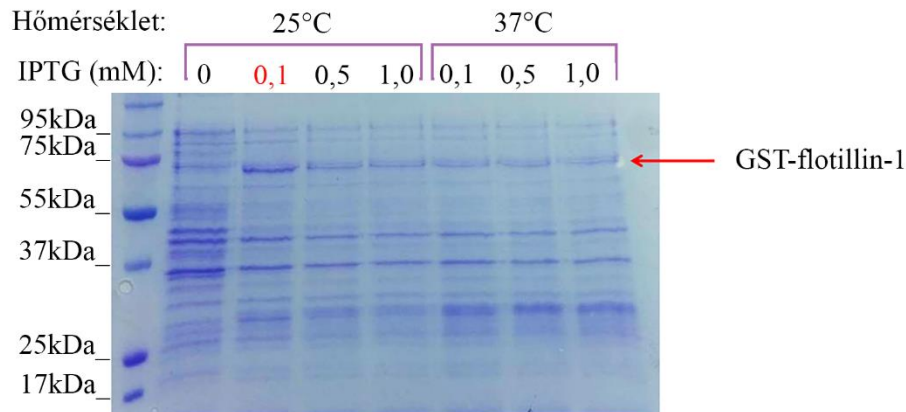
párhuzamos minta) 1,2% agaróz gélen választottuk el. A flotillin-1 szekvenciájának megfelelően, a várt méretnél, 1284 bázispárnál kaptunk jelet (9.A ábra), amelyet UV megvilágítás mellett steril szikével kivágtunk a gélből, majd GelExtraction Kit segítségével izoláltuk a gélből a DNS-t. Az így kapott inzertet EcoRI és XhoI restriktációs enzimekkel emésztettük, majd a pGEX-4T-2 vektorba ligáltuk. A ligálási elegyet *E.coli* JM109 sejtekbe transzformáltuk. A felnőtt telepekből DNS-t izoláltuk, majd a pGEX-4T-2 vektort és a pGEX-4T-2-flotillin-1 rekombináns plazmidokat EcoRI illetve EcoRI/XhoI restriktációs enzimekkel megemésztettük és 1,2%-os agaróz gélen futtattuk. Az üres vektor esetében mindkét emésztési közegben a vektor méretében (4970 bázispár) kaptunk sávot, míg a rekombináns plazmidnál EcoRI enzimmel való emésztésnél 6200 bázispár méretnél jelent meg sáv, EcoRI és XhoI emésztésnél pedig a pGEX-4T-2 vektor valamint a flotillin-1 méretében kaptunk sávot (9.B ábra). A restriktációs analízis eredményeként megállapítottuk, hogy a plazmidok tartalmazzák a flotillin-1 szekvenciáját, melyet a BIOMI Kft. által történt szekvenálás is megerősített.



9. ábra **Bakteriális expresszióra alkalmas flotillin-1 rekombinánsok létrehozása** - A) A flotillin-1 kódoló szekvenciáját HPAEC cDNS felhasználásával PCR technika segítségével felszorosítottuk, majd a két párhuzamos PCR terméket (minta 1, minta 2) agaróz gélen elválasztottuk. B) A pGEX-4T-2 vektort, valamint a két párhuzamos pGEX-4T-2-flotillin-1 rekombináns plazmidot (klón 1; klón 2) EcoRI illetve EcoRI és XhoI restriktációs enzimekkel emésztettük, majd 1,2%-os agaróz gélen választottuk el. A pGEX-4T-2 vektor mérete 4970 bp, a flotillin-1 kódoló szekvenciáé 1284bp.

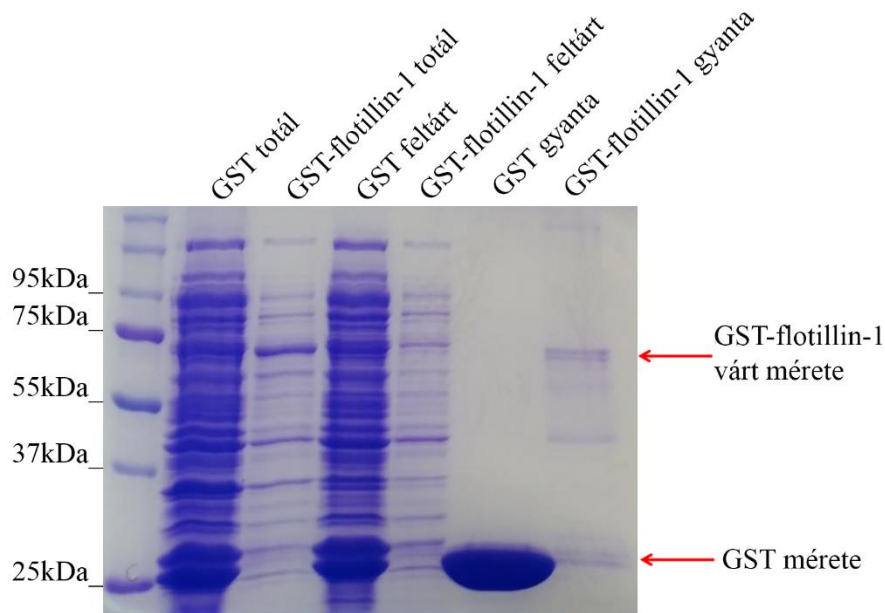
A rekombináns GST-flotillin-1 fehérje előállításának első lépéseként a rekombináns plazmidokat fehérje expresszióra alkalmas BL21 (DE3) *E. coli* kompetens sejtekbe transzformáltuk. A rekombináns GST-flotillin-1 fehérje termeltetéséhez szükséges

legoptimálisabb körülmények megtalálása érdekében a pGEX-4T-2-flotillin-1 plazmidot hordozó kompetens sejteket különböző hőmérsékleten (25°C; 37°C) és IPTG koncentrációkkal (0,1 mM; 0,5 mM; 1 mM) indukáltuk. Kontrollként indukálatlan mintát is használtunk mindkét hőmérsékleten. A mintákat az indukciót követően 3 órával vettük, melyeket SDS-PAGE gélen választottunk el. Az optimalizálás során a legerősebb jelet a 0,1mM IPTG koncentrációjú, 25°C-on inkubált mintában kaptuk a GST-flotillin-1 fehérje méretében (71kDa) (10. ábra).



10. ábra A **GST-flotillin-1** fehérje expressziójának optimalizálása - A rekombináns fehérje overexpressziójának ellenőrzésére indukciót követően a tenyészetekből mintát vettünk és SDS-PAGE-en választottuk el. A fehérjéket Coomassie Blue Brilliant festékkel detektáltuk. A piros nyíl a GST-flotillin-1 fehérje méretét jelöli.

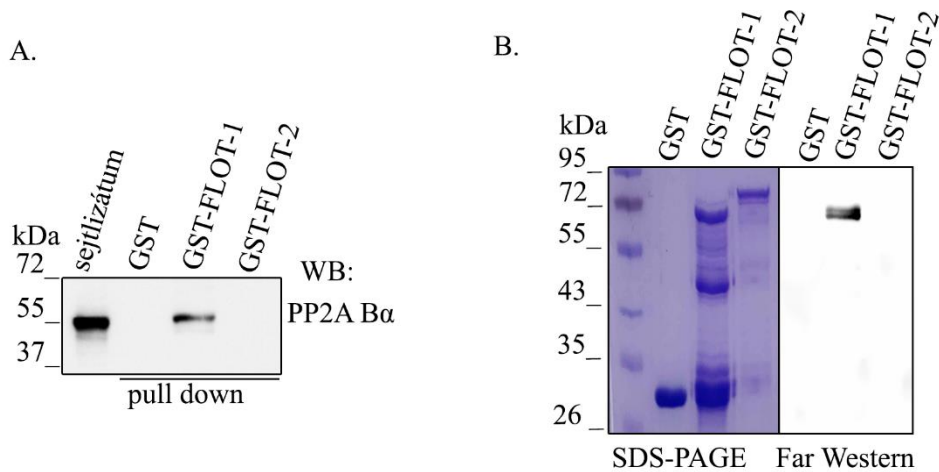
A GST-címke lehetővé teszi a fehérje affinitás kromatográfiás tisztítását, ezért a GST-flotillin-1 fehérjét szolubilizáltuk és glutathion Sepharose 4B gyantán tisztítottuk. A tisztítás sikerességének ellenőrzése érdekében mintát vettünk a szonikálást követő lizátumból (totál), a centrifugálás utáni felülúszóból (feltárt minta), valamint a glutathion Sepharose 4B gyantán immobilizált fehérjékből. Kontrollként GST-t alkalmaztunk. A mintákat 11%-os SDS-PAGE gélen választottuk el, majd a fehérjéket Coomassie Blue Brilliant festékkel detektáltuk. A GST és a GST-flotillin-1 fehérjék esetében is a vártan megfelelően kaptunk sávot, mely a tisztítás sikerességét igazolja (11. ábra). A GST-flotillin-1 esetében a gélfestésen megjelenő extra sávok a fehérje degradációs termékei.



11. ábra **Rekombináns GST-flotillin-1 fehérje tisztítása** - A GST és GST-flotillin-1 fehérjék tisztításához glutathion Sepharose 4B gyantát használtunk. Indukciót követően mintát vettünk a totál lizátumokból (totál minták), a szonikálással történő feltárt mintákból (feltárt minták) és végül a gyantán immobilizált mintákból (gyanta minták). A GST fehérje mérete 26kDa, míg a GST-flotillin-1 esetében a vártnak megfelelően 75kDa alatt kaptunk sávot (a piros nyilak jelölik a fehérjéket).

Mivel a flotillin-1 és flotillin-2 fehérjék aminosav szekvenciája 50%-ban hasonlóságot mutat [71], ezért a flotillin-1 fehérjéhez hasonlóan előállítottuk a pGEX-4T-2 flotillin-2 rekombináns plazmidot és optimalizáltuk a GST-flotillin-2 fehérje termelődését is. A PP2A B55 $\alpha$  és flotillin fehérjék közötti kölcsönhatás vizsgálatához pull down módszert alkalmaztunk. A GST-flotillin-1, illetve GST-flotillin-2 rekombináns fehérjéket immobilizáltuk, majd EC sejtlyizátummal inkubáltuk. A pull down mintákat Western blot analízissel vizsgáltuk PP2A B55 $\alpha$  specifikus antitest felhasználásával (12.A ábra). Eredményeink alapján a PP2A B55 $\alpha$  csak a flotillin-1 fehérjével lép kölcsönhatásba. A PP2A B55 $\alpha$  és flotillin fehérjék közti kölcsönhatást Far Western blot technikával is megvizsgáltuk. A GST-flotillin-1 és GST-flotillin-2 rekombináns fehérjék affinitás kromatográfiával tisztítottuk. A fehérjék tisztaságának ellenőrzésére a mintákat SDS-PAGE-n választottuk el, majd a fehérjéket Coomassie Blue Brilliant festékkel detektáltuk. Ezzel párhuzamosan a tisztított fehérjéket 11%-os poliakrilamid gélen választottuk el, majd nitrocellulóz membránra transzferáltuk. Blokkolás után a membránt 4 órán keresztül EC sejtlyizátummal inkubáltuk. Mosási lépéseket követően a membránt PP2A B55 $\alpha$  specifikus elsődleges antitesttel inkubáltuk, majd HRP konjugált másodlagos antitesttel. A kemilumineszcens jeleket Chemidoc Touch műszerrel detektáltuk. (12.B ábra). A pull down

követő Western blot illetve a Far Western blot eredményei alapján kijelenthetjük, hogy a PP2A B55 $\alpha$  specifikusan csak a flotillin-1 fehérjével lép kölcsönhatásba, míg a flotillin-2 fehérjével nem alakul ki kölcsönhatás.



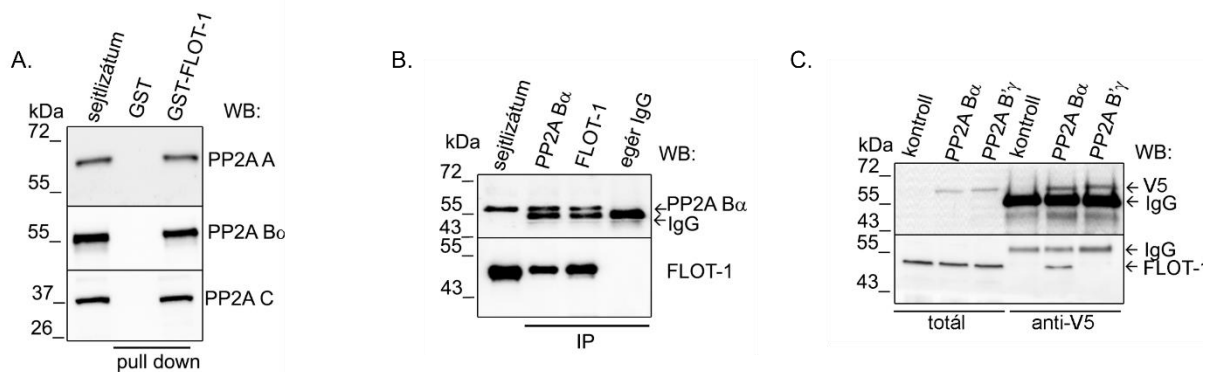
12. ábra A PP2A B55 $\alpha$  és a flotillin fehérjék közötti kölcsönhatás vizsgálata -A) Glutathion Sepharose 4B gyantán immobilizált GST, GST-flotillin-1 és GST-flotillin-2 rekombináns fehérjéket endotél sejtlyzátummal inkubáltuk. A fehérjék közti kölcsönhatást PP2A B55 $\alpha$  specifikus antitest felhasználásával ellenőriztük Western blot kísérletben. B) A kölcsönhatás vizsgálatához GST, GST-flotillin-1 és GST-flotillin-2 fehérjéket Far Western blot technikával vizsgáltuk. A rekombináns fehérjék tisztaságának ellenőrzésére a mintákat SDS-PAGE-n választottuk el és a tisztított fehérjéket Coomassie Blue Brilliant festékkel tettük detektálhatóvá.

Annak érdekében, hogy igazoljuk, hogy a flotillin-1 kölcsönhatásba lép az egész PP2A holoenzimmel, a pull down mintákat a PP2A alegységeire is megvizsgáltuk. Eredményeink alapján a flotillin-1 fehérje a PP2A holoenzim A (szerkezeti), B55 $\alpha$  (regulátor), illetve C (katalitikus) alegységével közvetlen vagy közvetett módon kölcsönhat (13.A ábra).

A kölcsönhatás további vizsgálatához BPAEC sejtekből immunprecipitáltunk a flotillin-1 és PP2A B55 $\alpha$  fehérjéket specifikus antitestek felhasználásával. Az immunkomplexeket Western blot technikával vizsgáltuk, pozitív kontrollként sejtlyzátumot, negatív kontrollként egér IgG-t használva (13.B ábra). A fehérje-specifikus antitestek képesek voltak megkötni az endogén fehérjéket, továbbá a PP2A B55 $\alpha$  jelen volt a flotillin-1 immunprecipitátumában, míg a flotillin-1 fehérjét sikeresen detektáltuk a PP2A B55 $\alpha$  immunprecipitátumában. A negatív kontrollként használt egér IgG mintában nem detektáltuk a fehérjéket.

A következő lépésben azt szeretnénk volna igazolni, hogy a flotillin-1 fehérje specifikusan a PP2A B55 $\alpha$  izoformájához kötődik. Ehhez olyan a laborunkban korábban előállított plazmidokat használtunk fel, melyek a B55 $\alpha$  és egy másik B regulátor alegységet a

B $\gamma$ -t kódolják, valamint a fehérjék expressziójakor V5 címkével látják el őket. Endotél sejteket pcDNA V5-His PP2A B55 $\alpha$ , valamint pcDNA V5-His PP2A B $\gamma$  konstrukttal transzfektáltak, majd a sejteket 24 óra múlva feltárták. A V5-címkét tartalmazó PP2A B55 $\alpha$  és PP2A B $\gamma$  fehérjéket anti-V5 affinitás gélen tisztították. A transzfekció sikerességét és a kölcsönhatást Western blot technikával mutattuk ki V5 antitest felhasználásával (13.C ábra). Eredményeink alapján a flotillin-1 fehérje izoformaspecifikusan csak a B55 $\alpha$  regulátor alegységhez kötődött.

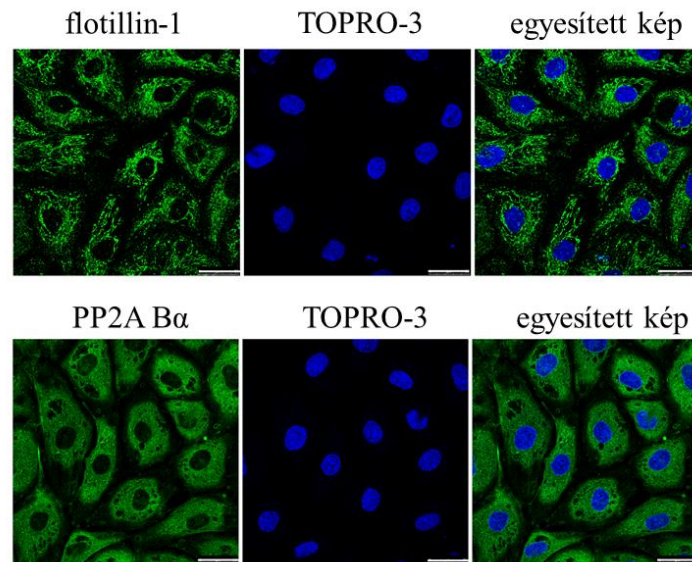


**13. ábra A flotillin-1 kölcsönhatása a PP2A B55 $\alpha$  holoenzimmel** - A) A glutathion Sepharose 4B gyantán immobilizált GST és GST-flotillin-1 fehérjéhez BPAEC sejtlizátumot adtunk. A pull down mintákat Western blot analízissel vizsgáltunk a PP2A holoenzim alegységeire specifikus antitestek felhasználásával. B) Endotél sejtlizátumból immunprecipitáltuk a PP2A B55 $\alpha$  és a flotillin-1 fehérjéket, majd az immunkomplexeket SDS-PAGE-n választottuk el és a fehérjékre specifikus antitestek felhasználásával Western blottal vizsgáltuk. A kontrollként használt mintához egérből származó IgG-t adtunk az immunprecipitáció során. C) pcDNA3.1 V5-His PP2A B55 $\alpha$  és pcDNA3.1 V5-His PP2A B $\gamma$  plazmidokkal transzfektált sejtlizátumokat anti-V5 agaróz affinitás géllal inkubáltuk. A totál sejtlizátumokat és az immobilizált mintákat SDS gélen választottuk el, majd Western blot technikával vizsgáltuk, PP2A B55 $\alpha$  és flotillin-1 specifikus antitestek felhasználásával.

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

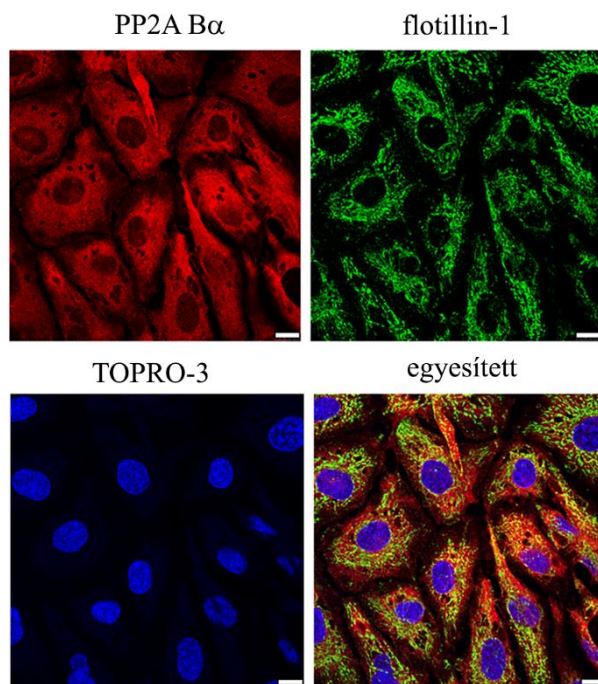
A két fehérje sejtben belüli kölcsönhatásának vizsgálatához először az endogén fehérjék lokalizációját vizsgáltuk meg immunfluoreszcens technikával. Ehhez a BPAEC sejteket üveg fedőlemezekre tenyésztettük, majd fixáltuk, permeabilizáltuk és blokkoltuk őket. Ezután PP2A B55 $\alpha$  vagy flotillin-1 fehérjékre specifikus elsődleges antitestekkel inkubáltuk a sejteket. Az inkubálás után a sejteket az elsődleges antitestre specifikus Alexa488 konjugált anti-nyúl IgG és anti-egér IgG másodlagos antitesttel inkubáltuk. A sejtmagokat TO-PRO-3 Iodide festékkel tettük detektálhatóvá. Az immunfluoreszcens festés 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 (14. ábra).



*14. ábra Az endogén PP2A B55 $\alpha$  és flotillin-1 fehérjék lokalizációjának vizsgálata - A BPAEC sejteket PP2A B55 $\alpha$  (nyúl), valamint flotillin-1 (egér) specifikus elsődleges antitestekkel inkubáltuk, majd Alexa488 konjugált másodlagos antitestekkel (zöld). A sejtmagot TO-PRO-3 Iodide nukleinsav festékkel tettük detektálhatóvá (kék). Skála: 20 $\mu$ m*

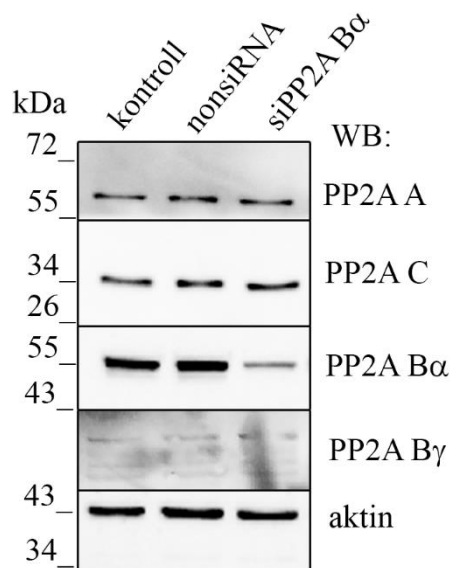
A két fehérje ko-lokalizációját is immunfluoreszcens technikával vizsgáltuk, mely során az EC-eket egyszerre inkubáltuk anti-egér flotillin-1 illetve anti-nyúl PP2A B55 $\alpha$  elleni elsődleges antitestekkel. Ezt követően a mintákat Alexa488 konjugált anti-egér IgG és Alexa546 konjugált anti-nyúl IgG másodlagos antitestekkel inkubáltuk. A sejtmagot szintén TO-PRO-3 Iodide festékkel festettük. Az immunfestés egyesített képe alapján a két fehérje a sejtek citoplazmájában, jellemzően a sejtmag körül mutatott ko-lokalizációt (sárga) (15. ábra).



**15. ábra PP2A B55 $\alpha$  és flotillin-1 fehérjék ko-lokalizációjának vizsgálata endothél sejtekben -** Az endothél sejteket a fehérjékre specifikus elsődleges antitestekkel egyszerre inkubáltuk, majd az ezekre specifikus A488- (zöld, flotillin-1) és A546- (piros, PP2A B55 $\alpha$ ) másodlagos antitesteket használtuk fel. A sejtmagok detektálásához TO-PRO-3 Iodide nukleinsav festéket használtunk (kék). Skála: 20 $\mu$ m

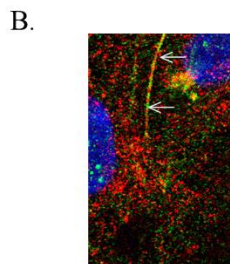
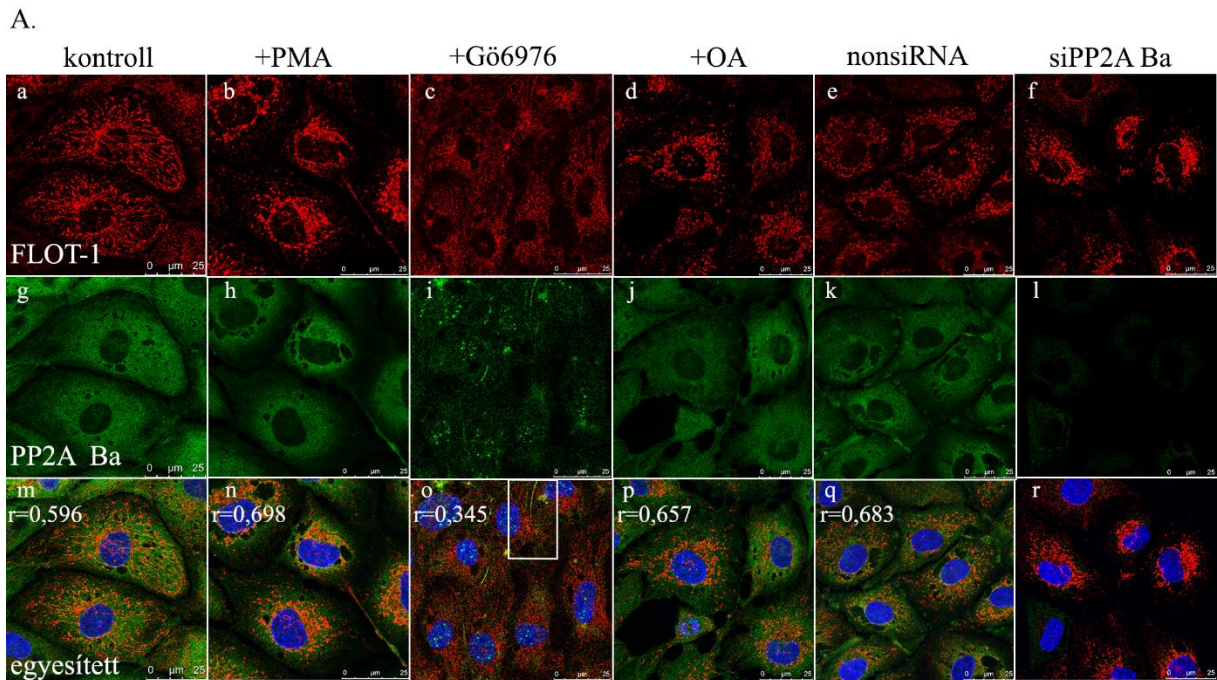
#### 7.1.4. A PP2A aktivitásának hatása a flotillin-1 fehérje sejten belüli lokalizációjára

A következőkben a két fehérje közti kölcsönhatás fiziológiai szerepét vizsgáltuk. Irodalmi adatokból ismert, hogy a flotillin-1 a Tyr<sup>160</sup> oldalláncon foszforilálható a Fyn kináz és a Ser<sup>315</sup> oldalláncon a PKC által [90, 121]. Mivel a PP2A egy foszfo-Ser /Thr specifikus protein foszfatáz, ezért feltételeztük, hogy a PP2A részt vehet a flotillin-1 Ser<sup>315</sup> defoszforilációjában. A PP2A aktivitását a célra irányító B55 $\alpha$  alegység siRNS mediált depléciójával gátoltuk, ugyanis ennek hiányában a PP2A nem tud a szubsztrátjához kötődni. A B55 $\alpha$  alegység csendesítése sikeres volt, továbbá nem volt hatással a holoenzim szerkezeti-, illetve katalitikus alegységének, valamint a PP2A B' $\gamma$  alegység expressziójára sem (16. ábra).



16. ábra **B55 $\alpha$  regulátor alegység depléciójának hatása** - Kontroll, nem targetáló RNS és PP2A B55 $\alpha$  specifikus RNS kezelt sejteket PP2A A, PP2A C, PP2A B55 $\alpha$ , PP2A B $\gamma$  és aktin specifikus antitestek felhasználásával Western blot kísérletben vizsgáltuk.

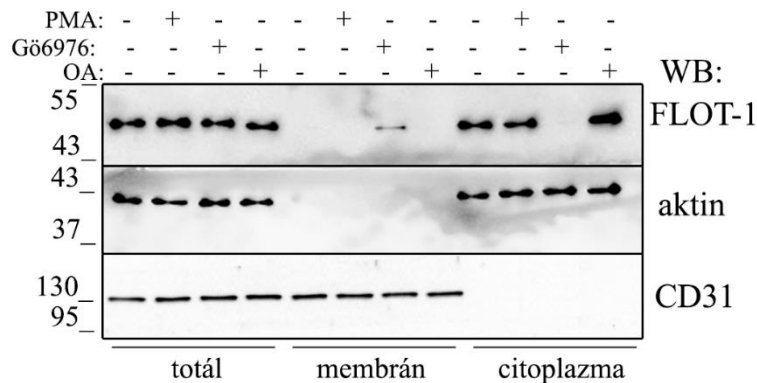
Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk a PP2A lehetséges szerepét a flotillin-1 defoszforilációjában, immunfestést megelőzően a sejteken különböző kezeléseket alkalmaztunk, melyek a PP2A, valamint a PKC aktivitására voltak hatással. A PKC enzimet PMA hozzáadásával aktiváltuk és Gö6976 kezeléssel gátoltuk. A PP2A enzim aktivitását okadánsavval gátoltuk, valamint a B55 $\alpha$  csendesített sejteken is elvégeztük az immunfestést. A kezeletlen, kontroll sejtekben az endogén PP2A homogén elrendeződést mutatott a korábban leírtakhoz hasonlóan, a flotillin-1 pedig az EC-k citoplazmájában lokalizálódott. A PP2A lokalizációjában se az okadánsav, se a PMA kezelés hatására sem történt szignifikáns változás. A fehérjék kolokalizációjának mértékét a Pearson-féle koefficiens kiszámolásával elemeztük. A konfokális képek egyesített ábráján a Pearson-féle koefficiens magas értéke demonstrálja a két fehérje ko-lokalizációját. A PP2A aktivitásának gátlása okadánsavval vagy a regulátor B55 $\alpha$  alegység depléciójával a flotillin-1 fehérje sejtmag körüli feldúsulását okozta. A PKC PMA-val történő aktivációja hasonló lokalizációs változást idéz elő a flotillin-1 esetében, valamint a Pearson-féle koefficiensre magasabb értékeket kaptunk, ami a fehérjék kifejezettebb kolokalizációjára utalt (17.A ábra). A PKC aktivitásának gátlására azonban a Pearson-féle koefficiens is kisebb volt, melyet a flotillin-1 fehérje sejtmembránba történő transzlokációja okozott (17.B ábra).



**17. ábra A PP2A B55a és a flotillin-1 fehérjék sejten belüli kolokalizációjának változásai -** A) Kontroll, PMA (1  $\mu$ M, 30 perc), Gö6976 (1  $\mu$ M, 30 perc), okadánsav (OA, 5 nM, 30 perc), nem targetáló siRNS és PP2A B55a specifikus siRNS (50 nm) kezelt sejteket inkubáltuk flotillin-1 (piros) és PP2A B55a (zöld) specifikus elsődleges antitestekkel, majd specifikus másodlagos antitestekkel. A sejtmagot DAPI festéssel festettük. Skála: 25 $\mu$ m. B) A kinagyított rész (fehér négyzettel bekeretezve) a Gö6976 kezelt sejteket mutatja. A fehér nyilak jelzik a flotillin-1 fehérje lokalizációját a membrán régióban.

Az immunfestés során kapott eredményeinket sejtfractionálással is alátámasztottuk, amit kontroll és kezelt sejtekből végeztünk. A sejtfractionálást megelőzően a sejteket PMA-val, okadánsavval és Gö6976-tal kezeltük, majd membrán és citoplazma frakciókat állítottunk elő. A kapott mintákat Western blot technikával vizsgáltuk, flotillin-1 specifikus elsődleges antitest felhasználásával. A frakciók tisztaságát anti-aktin (citoplazma), illetve anti-CD31 (membrán) markerekkel ellenőriztük. Eredményeink alapján a kontroll, valamint az okadánsavval vagy PMA-val kezelt sejtekben a flotillin-1 a citoplazmában lokalizálódik, míg a Gö6976 kezelés hatására a fehérje a sejtmembránba transzlokálódik (18. ábra). A PKC

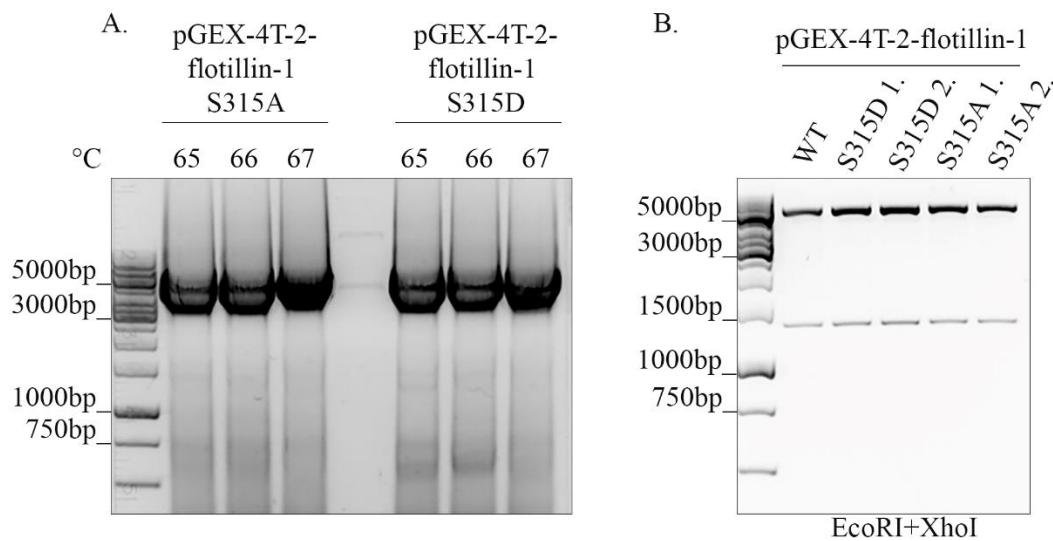
aktivitásának gátlása a flotillin-1 fehérje sejten belüli lokalizáció változását eredményezte, mely arra utal, hogy a flotillin-1 lokalizációjának változása összefügghet a fehérje reverzibilis foszforilációjával.



18. ábra A *flotillin-1* fehérje sejten belüli lokalizáció változásának vizsgálata sejtfractionálással - Kezeletlen, PMA, Gö6976 és okadánsav kezelt sejtek totál lizátumát, citoplazma és membrán frakcióit vizsgáltunk Western blottal, *flotillin-1* specifikus antitest felhasználásával. CD31 antitestet membrán markerként, míg az aktin specifikus antitestet citoplazma markerként használtuk.

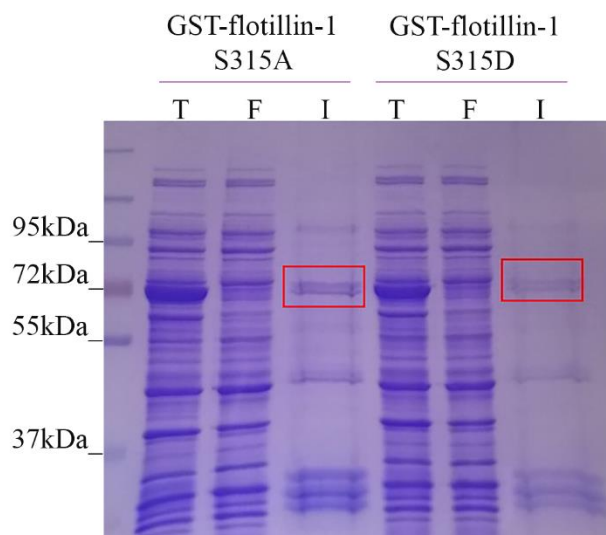
#### 7.1.5. Foszfomutáns *flotillin-1* fehérjék létrehozása pontmutációval

Korábbi kutatások már kimutatták, hogy a *flotillin-1* foszforilálódik a Ser<sup>315</sup> oldalláncon [121]. Eddigi eredményeinkből azt tapasztaltuk, hogy a PKC aktivitás gátlása megváltoztatja a fehérje lokalizációját, továbbá kimutattuk, hogy a PKC aktiválása és a PP2A gátlása erősebb ko-lokalizációt eredményez a *flotillin-1* és PP2A között. Ezek alapján feltételeztük, hogy a *flotillin-1* Ser<sup>315</sup> oldalláncon történő reverzibilis foszforilációjában a PP2A is érintett. Ennek vizsgálatához pontmutációval olyan mutánsok létrehozását terveztük, amelyekben a Ser<sup>315</sup> oldalláncot alaninra (foszfonull) vagy aszparaginsavra (foszforilációt utánzó) módosítottuk. Először a foszfomutánsok létrehozását végeztük el a bakteriális expresszióhoz alkalmas pGEX-4T-2 vektorban, a pGEX-4T-2-*flotillin-1* vad típusú rekombináns plazmidot használva templátként. Az amplifikáció során olyan primereket használtuk, amelyek kódolják a kívánt aminosavcserét, az Anyagok és módszerek rész 2. táblázatában leírt back-to-back PCR profil alapján. A PCR termékeket agaróz gélen választottuk el és a pGEX-4T-2-*flotillin-1* Ser315Ala/Ser315Asp méretében (6254 bázispár) megjelenő sávot UV megvilágításnál kivágtuk, majd tisztítottuk (19.A ábra). A ligálás, transzformálás és szelekció után a klónokat restriktív emésztéssel (EcoRI és XhoI) ellenőriztük (19.B ábra). A rekombináns plazmidot szekvenáltatással igazoltuk, hogy tartalmazza a mutációhoz szükséges nukleotid cseréket.



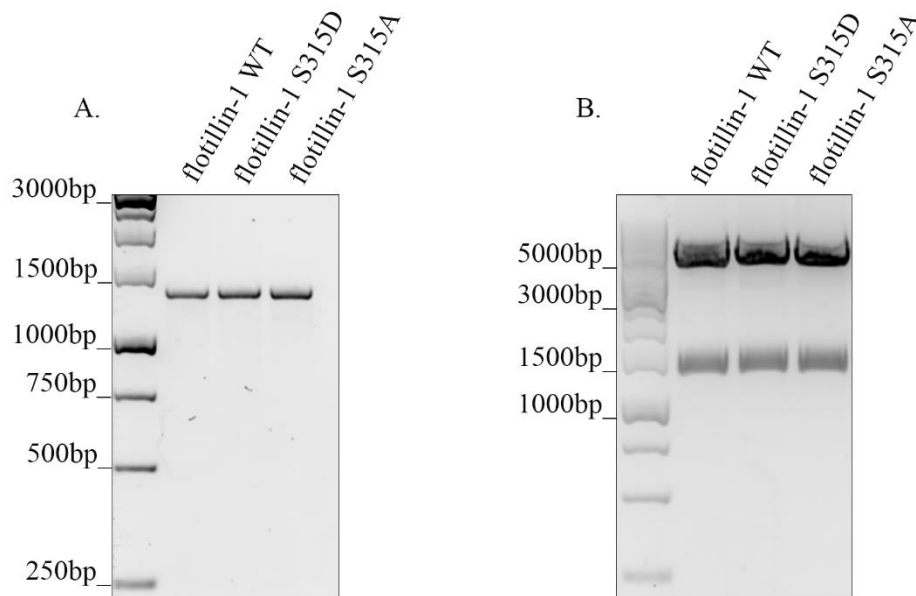
19. ábra **Pontmutációt tartalmazó flotillin-1 rekombináns plazmidok létrehozása** - A) A pontmutációt tartalmazó pGEX-4T-2-flotillin-1 plazmidokat back-to-back PCR technikával hoztuk létre a forward primerbe tervezett nukleotid cserékkel. A PCR termékeket 1,2%-os agaróz gélen választottuk el. B) A vad típusú, illetve foszfomutáns rekombináns plazmidokat EcoRI és XhoI enzimekkel emésztettük. A kontrollként használt vad típusú rekombináns plazmidhoz viszonyítva, mind a foszforilációt utánzó (Ser315Asp), mind a foszfonull mutáns (Ser315Ala) esetében is a vártan megfelelően a vektor méretében (4970 bázispár) és a flotillin-1 méretében (1284 bázispár) kaptunk jelet.

A rekombináns plazmidok létrehozása után a foszfomutáns pGEX-4T-2-flotillin-1 rekombináns plazmidokat BL21 (DE3) *E.coli* kompetens sejtekbe transzformáltuk a GST-flotillin-1 Ser315Ala/Ser315Asp fehérjék termeltetéséhez és tisztításához. A rekombináns fehérjék termeltetéséhez, a vad típusú GST-flotillin-1 fehérje termeltetésénél már optimalizált 0,1mM IPTG indukciót használtuk 25°C-on. A termeltetés után a GST-flotillin-1 Ser315Ala/Ser315Asp fehérjéket glutathion Sepharose 4B gyantán tisztítottuk, majd a totál, feltárt és immobilizált mintákat SDS-PAGE segítségével választottuk el. A foszfomutáns fehérjék méretét a vad típusú GST-flotillin-1 fehérjéhez hasonlóan 75kDa alatt vártuk (20. ábra).



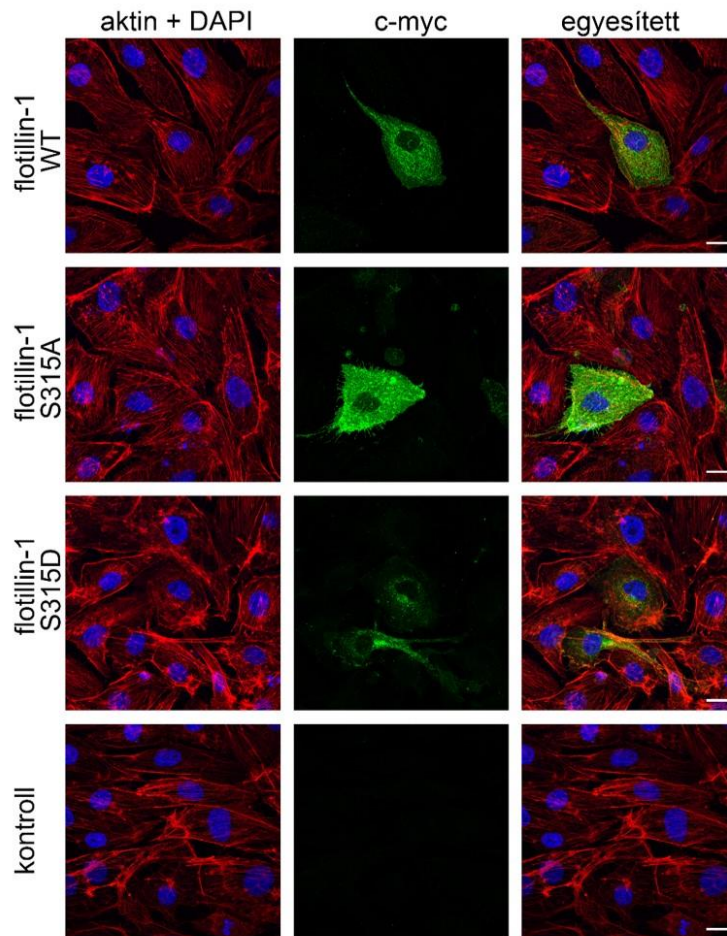
20. ábra **Rekombináns GST-flotillin-1 fehérjék tisztítása** - A rekombináns GST-flotillin-1 fehérjék tisztítása glutathion Sepharose 4B gyantán történt. Mintát vettünk az indukciót követő totál lizátumból (T), a szonikálással feltárt lizátumból (F) valamint a gyantán immobilizált, kitisztított mintából (I). A mintákat SDS-PAGE-en választottuk el. Mind a foszfonull (pGEX-4T-2-flotillin-1 Ser315Ala), mind a foszforilációt utánozó (pGEX-4T-2-flotillin-1 Ser315Asp) rekombináns fehérje a várt méretnél, 75kDa alatt adott jelet (pirossal bekeretezett).

Következő lépésként a foszfomutáns flotillin-1 Ser315Ala és Ser315Asp inzerteket emlős sejtekben való expresszióra alkalmas pcDNA3.1 myc/His A (-) vektorba klónoztuk. Az amplifikálást követően a PCR termékeket agaróz gélen választottuk el, majd a sávokat UV megvilágításnál kivágtuk (21.A ábra). A tisztított termékeket és a pcDNA3.1 myc/His A (-) vektort XhoI és HindIII restrikciós enzimekkel hasítottuk, így kialakítva a ligáláshoz szükséges tapadós végeket. A ligálást, transzformálást és szelekciót követően a rekombináns plazmidokat restrikciós hasítással ellenőriztük (21.B ábra). A pozitív klónokat szekvenáltatással is megerősítettük, hogy tartalmazzák a megfelelő nukleotid cseréket az aminosav mutációkhoz.



21. ábra **Emlős expresszióra alkalmas flotillin-1 plazmidok létrehozása** - A) *pGEX-4T-2-flotillin-1* rekombinánsok felhasználásával PCR technikával felszorzosítottuk a *pcDNA3.1 myc-His A (-)* vektorba való klónozáshoz szükséges *flotillin-1* szekvenciákat. A PCR termékeket 1,2%-os agaróz gélen választottuk el. A *flotillin-1* méretének megfelelően 1284 bázispárnál kaptunk jelet. B) A *pcDNA3.1 myc-His flotillin-1* rekombináns plazmidokat *EcoRI* és *HindIII* restriktív enzimekkel emésztettük. A kapott sávok megfelelnek mind a vektor méretének (550 bázispár) és a *flotillin-1* kódoló szekvenciájának (1284 bázispár).

Ezután a foszfomutáns flotillin-1 fehérjék fiziológiás szerepét vizsgáltuk, különösen a fehérjék lokalizációs változását immunfluoreszcens festéssel. Az EC-eket vad típusú, foszfonull (Ser315Ala) és foszforilációt utánzó (Ser315Asp) *pcDNA3.1 myc/His A (-)* - flotillin-1 plazmidokkal transzfektáltuk. Másnap immunfestést végeztünk a transzfektált sejteken. Mivel a rekombináns flotillin-1 fehérjék a vektornak köszönhetően hordoznak egy c-myc címként, az immunfestés során anti-c-myc antitestet alkalmaztunk a rekombináns fehérjék detektálására. Az eredmények alapján a vad típusú- és a foszfonull Ser315Ala flotillin-1 fehérjék homogén elrendeződést mutattak a citoplazmában, míg a foszforilációt utánzó flotillin-1 Ser315Asp a sejtmag körül halmozódott fel. Ez összhangban van az endogén fehérje lokalizációs változásaival. A kontroll sejteket üres *pcDNA3.1 myc/His A (-)* plazmiddal transzfektáltuk, amelyben a start kodon hiánya miatt nem keletkezett c-myc jel (22. ábra).

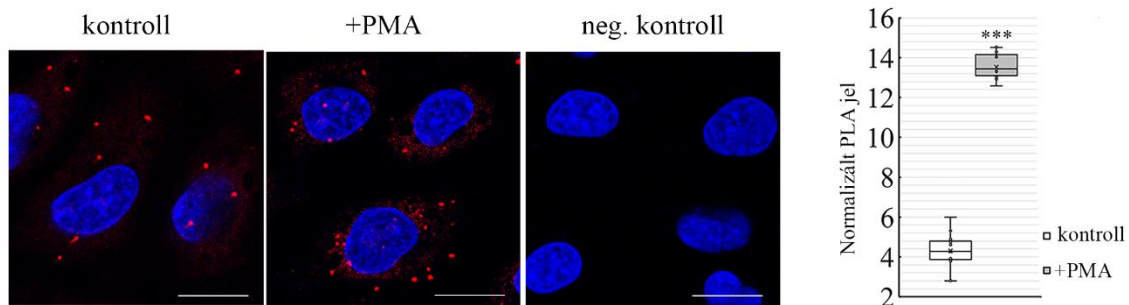


22. ábra A foszfomutáns *flotillin-1* fehérjék lokalizációja endotél sejtekben - A *pcDNA3.1 myc/His A (-)* - *flotillin-1* rekombinánsokkal transzfektált endotél sejteket *c-myc* specifikus elsődleges antitesttel inkubáltuk, majd az erre specifikus Alexa488 konjugált másodlagos antitestet alkalmaztunk (zöld). Az aktint Texas Red Phalloidinnal (piros), a sejtmagot DAPI-val (kék) festettük. Skála: 10 $\mu$ m

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

A flotillin-1 és PP2A fehérjék közötti kölcsönhatást korábban immunprecipitációs és pull down kísérletekkel igazoltuk. A további vizsgálatokhoz kontroll és PMA-val kezelt sejtekkel PLA módszert végeztünk. A PLA egy hatékony módszer a sejten belüli endogén fehérje-fehérje kölcsönhatások vizsgálatára, ahol az interakciók fluoreszcens pontokként jelennek meg [122]. Az üveg fedőlemezen tenyésztett EC-eket 1  $\mu$ M PMA-val kezeltük 30 percig, majd az immunfluoreszcenciához hasonló módon fixáltuk, permeabilizáltuk és 2%-os BSA oldattal blokkoltuk. A PLA további lépéseit az Anyagok és módszerek részben leírtak alapján végeztük. A kontroll és PMA kezelt mintákat flotillin-1 és PP2A B55 $\alpha$  specifikus

elsődleges antitestekkel inkubáltuk. A kezeletlen kontroll mintához nem adtunk PMA-t, míg a negatív kontroll mintákhoz csak a flotillin-1 fehérjére specifikus elsődleges antitestet használtunk. A fluoreszcens pontokat sejtenként megszámloltuk és statisztikai próbát végeztünk az eredmények alapján. A kezeletlen sejtekben is detektáltunk kölcsönhatást, de PMA kezelés hatására szignifikánsan több fluoreszcens jel jelent meg, mely arra utal, hogy a foszforilált flotillin-1 és PP2A között erősebb a kölcsönhatás (23. ábra).

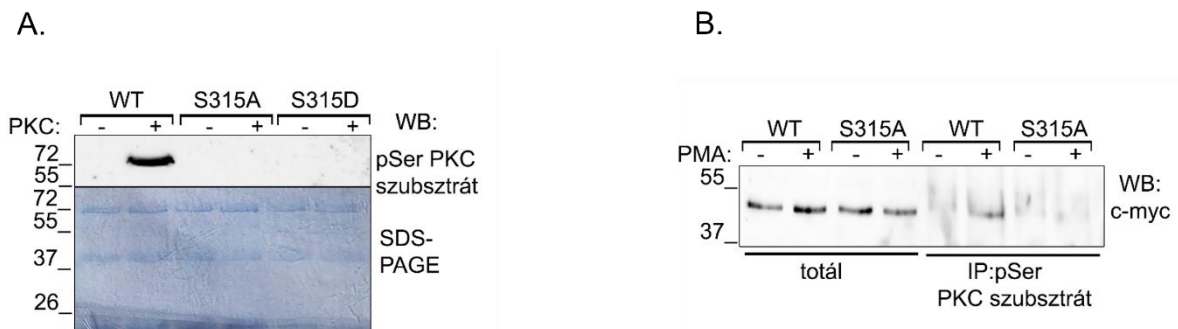


**23. ábra A PP2A B55 $\alpha$  és a flotillin-1 fehérjék közti kölcsönhatás vizsgálata PLA módszerrel** - Kontroll és PMA (1 $\mu$ M, 30min) kezelt sejteket PP2A B55 $\alpha$  és flotillin-1 specifikus elsődleges antitesttel inkubáltuk. A negatív kontrollként használt sejteket csak flotillin-1 specifikus antitesttel kezeltük. A sejtmagokat DAPI nukleinsav festékkel festettük (kék). A PLA jelek (piros pont) jel/sejt alapján lettek megszámlolva és kiértékelve. A statisztikai analízist t-tesztel végeztük (n=10). Skála: 50 $\mu$ m

Irodalmi adatok és eddig eredményeink alapján feltételeztük, hogy a flotillin-1 fehérjét a PKC enzim foszforilálja a Ser<sup>315</sup> oldalláncon. Ennek további vizsgálatához *in vitro* PKC foszforilációs kísérletet végeztünk a glutathion Sepharose 4B gyantán tisztított vad típusú, Ser315Ala és Ser315Asp GST-flotillin-1 fehérjékkel. A rekombináns fehérjék foszforilációját Western blot technikával vizsgáltuk, foszfo-Ser PKC szubsztrát specifikus antitesttel, amely felismeri a PKC által foszforilált szerin oldalláncozat a konszenzus szekvencia alapján. Az *in vitro* foszforilációs kísérletben a fehérjék azonos mennyiségét SDS-PAGE-t követő Coomassie Brilliant gélfestéssel ellenőriztük (24.A ábra). 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> oldalláncozat foszforilálja a flotillin-1 fehérjén.

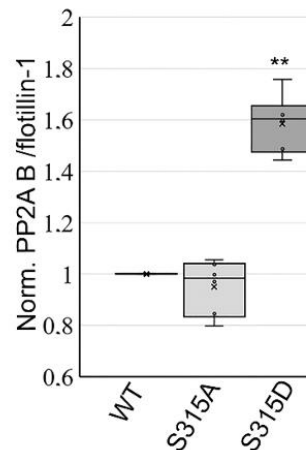
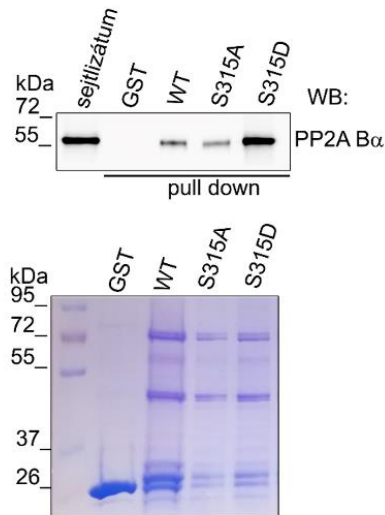
A foszforiláció sejten belüli igazolására az EC-ket pcDNA3.1 myc/His A (-) - flotillin-1 WT és Ser315Ala konstrukciókkal transzfektáltuk, majd PMA-val kezeltük őket. A kontroll és PMA kezelt vad típusú és foszfonull flotillin-1-et expresszáló sejtekből foszfo-Ser PKC szubsztrát

specifikus antitesttel immunprecipitáltuk a fehérjéket. A totál lizátumokat és immunkomplexeket Western blot technikával, c-myc specifikus antitest felhasználásával detektáltuk. Az expresszió mindkét fehérjénél azonos volt a totál mintákban, de hasonlóan az *in vitro* PKC foszforilációs kísérlethez, csak a PMA-val kezelt vad típusú flotillin-1 fehérje mutatott jelet az immunprecipitált mintákban. Eredményeink azt igazolják, hogy a PKC enzim a Ser<sup>315</sup> oldalláncot foszforilálja EC-kben (24. B ábra).



**24. ábra A flotillin-1 fehérje PKC foszforilációja** - A) Vad típusú (WT), foszfonull (Ser315Ala) és foszforilációt utánzó (Ser315Asp) GST-flotillin-1 fehérjéket glutathion Sepharose gyantán tisztítottuk, majd *in vitro* PKC assay-t végeztük. A flotillin-1 fehérje foszforilációját Western blottal ellenőriztük foszfo-szerin PKC szubsztrát specifikus antitest felhasználásával. A fehérje mennyiségeket Coomassie Blue Brilliant festékkel ellenőriztük. B) pcDNA3.1 myc-His (A)-flotillin-1 vad típusú és pcDNA3.1 myc-His (A)-flotillin-1 foszfonull mutánsokat overexpresszáló sejteket PMA-val kezeltük (1 $\mu$ M, 30perc). A kezelt és kezeletlen transzfektált sejtekből foszfo-szerin PKC szubsztrát specifikus antitesttel immunprecipitáltunk. A totál sejt-lizátumokat és az immunkomplexeket c-myc specifikus antitest felhasználásával Western blot analízissel vizsgáltuk.

A rekombináns flotillin-1 fehérjék és a PP2A B55 $\alpha$  közti kölcsönhatást pull down módszerrel is megvizsgáltuk. A glutathion Sepharose 4B gyantán immobilizált fehérjékkel végzett kísérletekben a pull down minták Western blot analízisével, PP2A B55 $\alpha$  specifikus antitesttel detektáltuk a kölcsönhatást. A foszforilációt utánzó (Ser315Asp) flotillin-1 nagyobb mennyiségben kötötte a PP2A B55 $\alpha$ -t, mint a vad típusú-, vagy a foszfonull (Ser315Ala) flotillin-1 fehérje. Ez az eredmény összhangban áll a PLA kísérlet eredményeivel és arra utal, hogy a flotillin-1 foszforilációja konformációs változásokat idézhet elő, amelyek fokozzák a fehérje-fehérje kölcsönhatásokat (25. ábra).



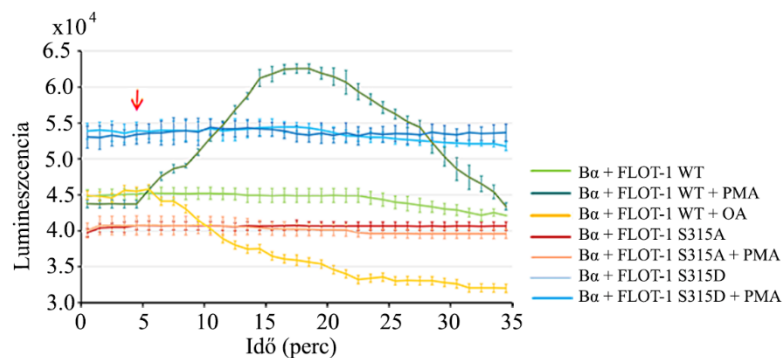
25. ábra A *flotillin-1* foszfoformátusok és a PP2A B5 $\alpha$  fehérjék kölcsönhatása - A bakteriálisan expresszált GST és GST-*flotillin-1* vad típusú és foszfoformátus fehérjéket glutathion Sepharose 4B gyantán immobilizáltuk, majd BPAEC sejtlizátummal inkubáltuk 16 órán keresztül 4°C-on. Az endotél sejtlizátumot, valamint az eluált pull down mintákat Western blot technikával vizsgáltuk, PP2A B5 $\alpha$  specifikus antitest felhasználásával. A tisztított fehérjék mennyiségét gélfestéssel ellenőriztük. Az eredmények kiértékeléséhez *t*-teszt statisztikai analízist használtunk ( $n=3$ ).

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

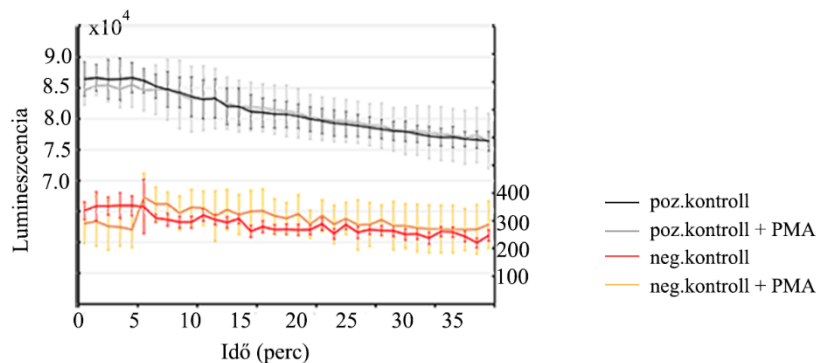
A következő lépésben a PP2A B5 $\alpha$  és flotillin-1 fehérjék kölcsönhatásának dinamikáját úgynevezett NanoBiT rendszerrel vizsgáltuk. A NanoBiT egy lumineszcencia alapú módszer, amely fehérje-fehérje kölcsönhatás valós idejű követésére alkalmas [123]. A rendszer két alegységből az LgBiT-ből (17,6 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 pBiT1.1-C TK/LgBiT-PP2A B5 $\alpha$ , pBiT2.1-C-TK/SmBiT-*flotillin-1* WT, Ser315Ala és Ser315Asp konstruktokat klónozással állítottuk elő, majd az EC-eket ko-transzfectáltuk az LgBiT-PP2A B5 $\alpha$  és SmBiT-*flotillin-1* vad típusú, illetve foszfoformátus konstruktokkal. Pozitív kontrollként az EC-eket SmBiT-PRKACA (PKA katalitikus alegysége) és LgBiT-PRKAR2A (PKA regulátor alegysége) plazmidokkal ko-transzfectáltuk. Negatív kontrollként az SmBiT-Halotag és LgBiT-PP2A B5 $\alpha$  konstruktokat használtuk. A lumineszcens jel igazolta a PP2A B5 $\alpha$ , illetve a flotillin-1 mindhárom formája közötti kölcsönhatást. A legerősebb lumineszcencia jelet a PP2A B5 $\alpha$  és a foszforilációt utánzó

flotillin-1 Ser315Asp kölcsönhatása okozta. A PKC enzim PMA általi aktiválása a foszfomutáns formáknál nem változtatta meg a fehérjék közti kölcsönhatás erősségét. Azonban a vad típusú flotillin-1 és a PP2A B55 $\alpha$  közötti kölcsönhatás PMA hatására erősödött és 10 perc elteltével a jel elérte a maximumát, ezután csökkeni kezdett, ami a fehérjék közti kölcsönhatás gyengülését jelezte. Abban az esetben, ha a vad típusú flotillin-1 és a PP2A B55 $\alpha$ -t koexpresszáló sejteket okadánsavval kezeltük, a két fehérje kölcsönhatása gyengülni kezdett. Ez a változás összefüggésbe hozható a flotillin-1 reverzibilis foszforilációjával (26.A ábra). A kísérleteink során a kapott lumineszcens jeleket a kontroll minták által kapott jelerősségekhez viszonyítva értékeltük ki (26.B ábra).

A.

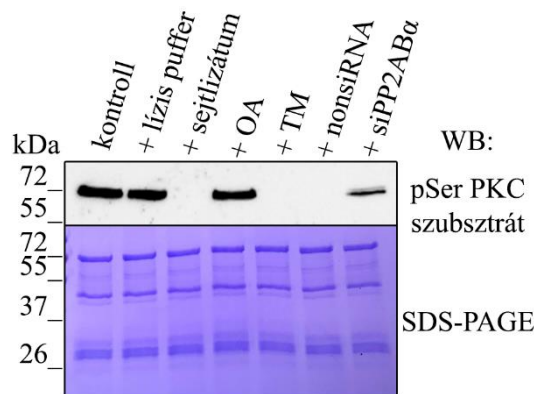


B.



26. ábra A *flotillin-1* Ser315 oldalláncának foszforilációja fokozza a kölcsönhatást a PP2A B55 $\alpha$  fehérjével - A) Endotél sejteket LgBiT-PP2A B55 $\alpha$  és SmBiT-flotillin-1 vad típusú, -foszfonull, -foszforilációt utánzó konstruktokkal ko-transzfektáltuk. A fehérjék közti kölcsönhatás eredményeként létrejövő lumineszcens jelet 35 percen keresztül nyomon követtük. Az ötödik percben a ko-transzfektált sejteket PMA-val (1 $\mu$ M) vagy okadánsavval (5nM) kezeltük (a kezelés időpontját a piros nyíl jelöli). B) Pozitív kontrollként endotél sejteket ko-transzfektáltuk SmBiT-PRKACA, illetve LgBiT-PRKAR2A plazmidokkal, míg negatív kontrollként a sejteket SmBiT-Halotag és LgBiT-PP2A B55 $\alpha$  plazmidokkal ko-transzfektáltuk.

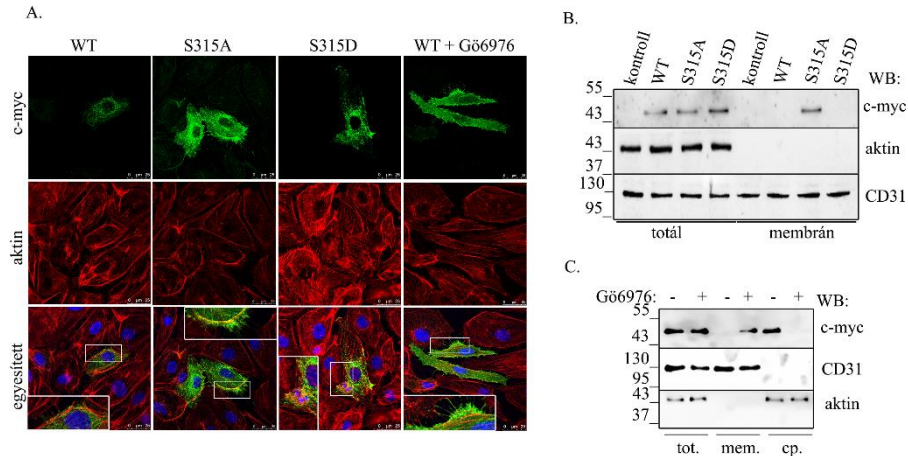
A flotillin-1 defoszforilációjának vizsgálatához *in vitro* defoszforilációs kísérletet végeztünk a foszforilált flotillin-1 fehérje felhasználásával. Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk a PP2A B55 $\alpha$  szerepét a flotillin-1 defoszforilációjában első lépésben a glutathion Sepharose 4B gyantán immobilizált GST-flotillin-1 fehérjét foszforiláltuk PKC enzimmel. A foszforilált flotillin-1 fehérjét lízis pufferrel, sejtlyázattal, okadánsavval, tautomicitinnel (TM, PP1 inhibítor), nem targetáló siRNS-sel illetve PP2A B55 $\alpha$  specifikus siRNS-sel előkezelt sejtlyázattal inkubáltuk. Az *in vitro* defoszforilációt követően a mintákat Western blot technikával vizsgáltuk, foszfo-Ser PKC szubsztrát specifikus antitestet felhasználva. A kísérletben felhasznált fehérjemennyiséget Coomassie Blue Brilliant festéssel ellenőriztük. A nem kezelt, TM-t tartalmazó és nonsiRNS-sel kezelt sejtlyázum defoszforilálta a rekombináns fehérjét, de az okadánsavval (OA) vagy PP2A B55 $\alpha$  specifikus siRNS-sel kezelt sejtlyázum esetében a defoszforiláció gátolt volt, így a fehérje foszforilált állapotban maradt. Mivel a PP1 gátlása nem, csak a PP2A gátlása hatására nem defoszforilálódott a fehérje, eredményeink alapján kijelenthetjük, hogy a flotillin-1 fehérje a PP2A B55 $\alpha$  szubsztrátja (27. ábra).



27. ábra **A flotillin-1 fehérje defoszforilációja** - A flotillin-1 defoszforilációjának vizsgálatához a foszfo-flotillin-1 fehérjét (kontroll) lízis pufferrel, kezeletlen sejtlyázattal, OA vagy TM előkezelt sejtlyázattal, valamint nem targetáló RNS, illetve PP2A B55 $\alpha$  specifikus siRNS-sel kezelt BPAEC sejtlyázatokkal inkubáltuk. A mintákat Western blottal ellenőriztük foszfo-szerin PKC szubsztrát specifikus antitest felhasználásával. A felhasznált minták fehérje mennyiségének ellenőrzésére Coomassie Blue festéket használtunk.

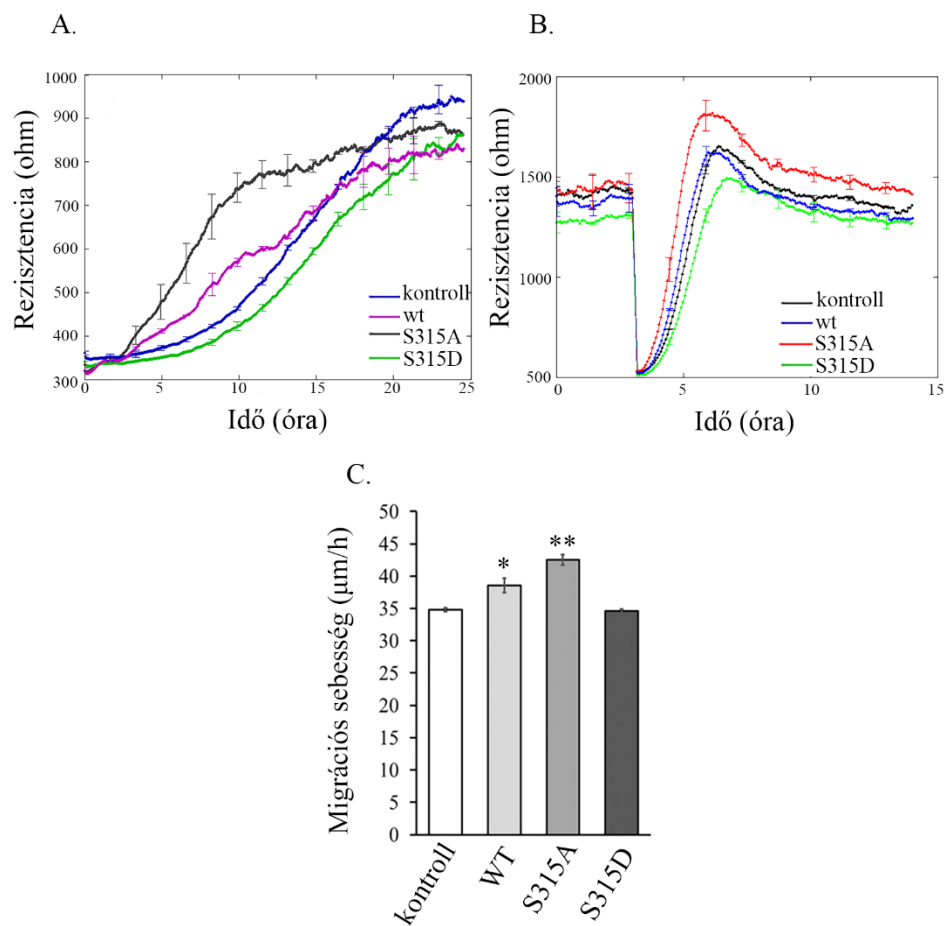
7.1.8. A foszfonull flotillin-1 forma megnövekedett membrán lokalizációt mutat, továbbá szerepet játszik a sejtmigrációban és az angiogenezisben

A következő lépésben megvizsgáltuk a rekombináns flotillin-1 fehérjék sejten belüli lokalizációját. Az EC-eket vad típusú-, Ser315Ala-, illetve Ser315Asp flotillin-1 fehérjét kódoló plazmidokkal transzfektáltuk, majd immunfluoreszcens technikával festettük meg. A vad típusú flotillin-1 a sejtek citoplazmájában lokalizálódott, hasonlóan az endogén flotillin-1 fehérjéhez. A foszforilációt utánzó flotillin-1 Ser315Asp 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 (28.A ábra). A rekombináns fehérjék sejten belüli lokalizációját a transzfektált sejtek membrán és citoplazma frakcióinak vizsgálatával is megerősítettük. A rekombináns flotillin-1 fehérjét c-myc specifikus antitesttel detektáltuk, valamint a frakciók tisztaságát anti-CD31 (membrán marker) és anti-aktin (citoplazma marker) antitestekkel detektáltuk. A rekombináns fehérjék közül, csak a foszfonull flotillin-1 fehérje volt jelen a membrán frakcióban (28.B ábra). Amennyiben a vad típusú flotillin-1 rekombinánsal transzfektált sejteket Gö6976-tal kezeltük, a PKC aktivitás gátlásának hatására, a vad típusú flotillin-1 fehérje szintén megjelent a sejtek membrán frakciójában (28.C ábra).



28. ábra **A foszfonutáns flotillin-1 fehérjék sejten belüli lokalizációja** - A) Immunfluoreszcensen festettük a pcDNA3.1 myc-His (A) - flotillin-1 vad típusú (kezeletlen és Gö6976 kezelt), -Ser315Ala, -Ser315Asp overexpresszáló BPAEC sejteket. A festés során c-myc specifikus elsődleges antitestet használtunk (zöld). Az aktint Texas Red Phalloidinnal (piros), míg a sejtmagot DAPI nukleinsav festékekkel (kék) festettük. Skála: 25 μm. B) Kontroll, vad típusú, Ser315Ala és Ser315Asp flotillin-1 konstrukciókkal transzfektált sejtek totál sejt-lizátumát és membrán frakcióját vizsgáltuk Western blot analízissel anti-c-myc, anti-aktin (citoplazma marker) és anti-CD31 (membrán marker) antitestek felhasználásával. C) BPAEC sejteket pcDNA3.1 myc-His (A) - flotillin-1 vad típusú rekombinánsal transzfektáltuk, majd Gö6976-tal kezeltük. A kezelt és kezeletlen transzfektált sejtekből származó totál -, membrán - és citoplazma frakciót Western blottal ellenőriztük.

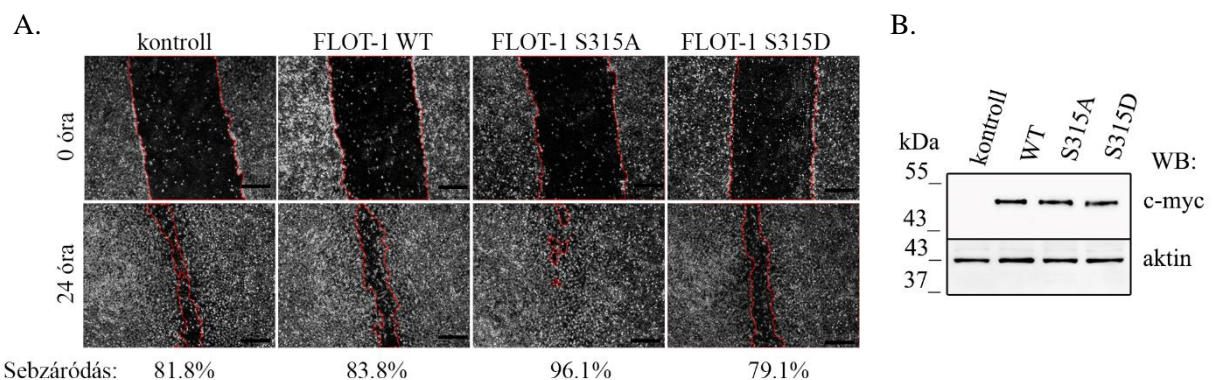
Ezek után azt vizsgáltuk, hogy a PKC által foszforilált, illetve PP2A B55 $\alpha$  által defoszforilált flotillin-1 hogyan befolyásolja a sejtek élettani folyamatait. ECIS mérésekkel valós időben nyomon követtük a sejtek adhézióját és migrációját. Magasabb frekvencián az ECIS kizárólag a sejt-mátrix kölcsönhatást méri, így képesek voltunk összehasonlítani a különböző flotillin-1 formákat overexpresszáló sejtek letapadását és elterülési képességét. 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 sejtek (29.A ábra).



29. ábra A **flotillin-1** rekombinánsok hatása a sejtek letapadására és migrációjára - A) Kontroll, illetve pcDNA3.1 myc-His (A) - flotillin-1 vad típusú, -foszfonull, és -foszforilációt utánzó plazmidokkal transzfektált sejtek letapadását és szétterülését követtük nyomon ECIS méréssel. Az ábrán négy-négy független mérés eredményei látható. B) Az *in vitro* sebgyógyulssalt a kontroll, illetve vad típusú, Ser315Ala és Ser315Asp flotillin-1 fehérjét overexpresszáló sejtek migrációs képességét ECIS készülékkel vizsgáltuk. C) Az *in vitro* sebgyógyulás statisztikai kiértékelését *t*-teszt alkalmazásával végeztük el ( $n=9$ ).

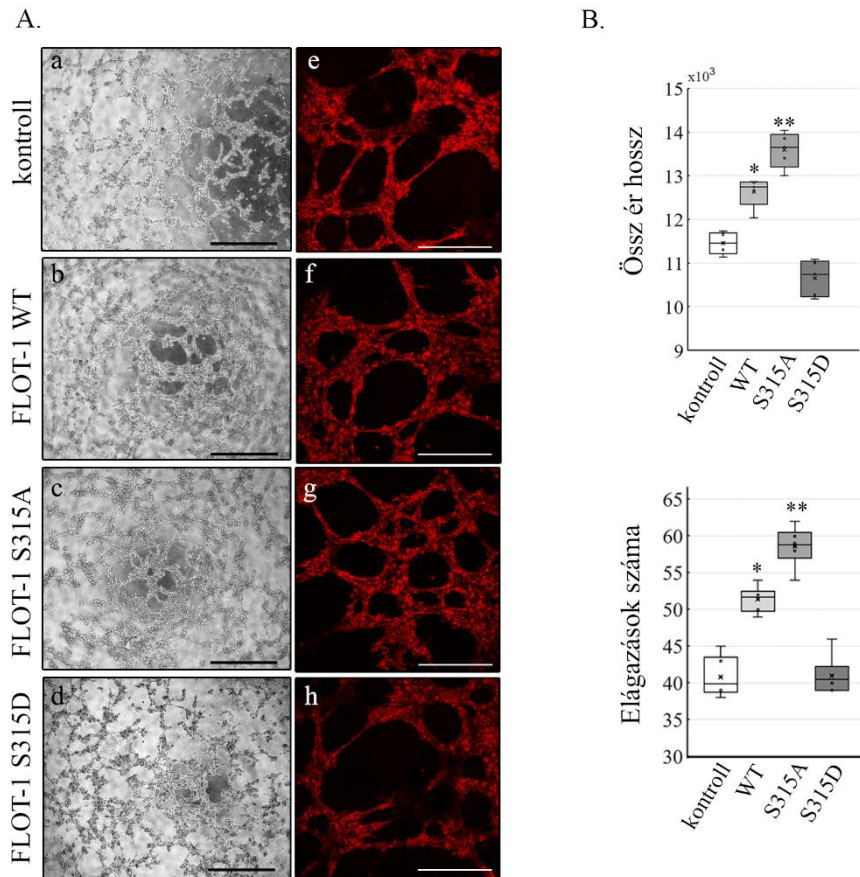
Ezután *in vitro* sebgyógyulási assay-t végeztünk ECIS segítségével, hogy meghatározzuk a különböző flotillin-1 formákkal transzfektált sejtek migrációs képességét. Miután a sejtek konfluens monolayeret alkottak (1200-1400 ohm), 5 mA erősségű és 60 kHz frekvenciájú áramot alkalmazva 30 másodpercen keresztül „kiégettük” a sejteket az elektród felületén, ezzel létrehozva egy „sebet” a sejtrétegben. A seb körül elhelyezkedő sejtek a halott sejtek helyére migrálnak, ezzel elindítva a sebgyógyulás folyamatát, melyet az emelkedő impedancia érték mutat. A vad típusú és a foszfonull Ser315Ala flotillin-1 fehérjét expresszáló sejtek migrációs sebessége szignifikánsan nagyobb volt, mint a kontroll, illetve a foszforilációt utánzó Ser315Asp flotillin-1 mutáns expresszáló sejteké (29.B és C ábra).

Az ECIS sebgyógyulási eredményeit karcolásos „scratch assay”-vel is megerősítettük a kontroll, valamint a vad típusú-, Ser315Ala-, és Ser315Asp rekombináns flotillin-1 fehérjét expresszáló sejteken. 24 órával a transzfekció után a sejtek konfluens monolayerén egy 1 ml-s steril pipettaheggyel karcolást ejtettük a sejtrétegen, ezzel létrehozva egy „sebet”. A sejtek migrációját 24 óráig követtük nyomon. A készített képeket ImageJ programmal értékeltük ki, hogy meghatározzuk a sebzáródás mértékét. A scratch assay eredményei megegyeztek az ECIS mérések során kapott adatokkal. Az Ser315Ala flotillin-1 mutáns expresszáló sejtek migrációs sebessége szignifikánsan magasabb volt, mint a kontroll, a vad típusú-, illetve az Ser315Asp mutánst expresszáló sejteké (30.A ábra). A scratch assay után a sejteket Western blottal vizsgáltuk, hogy megbizonyosodjunk a transzfekció sikerességéről és az azonos mennyiségű flotillin-1 expresszióról (30.B ábra).



30. ábra A **flotillin-1 rekombinánsok hatása a sejt migrációra** - A) Kontroll, vad típusú-, Ser315Ala-, Ser315Asp flotillin-1 transzfektált sejtek migrációs képességét reprezentatív sebgyógyulási scratch assay alkalmazásával vizsgáltuk. A képek a karcolást követő nulladik percben, illetve 24 óra elteltével készültek. Skála: 250µm. B) A scratch assay során felhasznált sejtek transzfekciójának sikerességét Western blottal ellenőriztük c-myc antitest felhasználásával, belső kontrollként aktin specifikus antitestet használtunk.

A sejtek angiogenikus tulajdonságait endotél érképződési kísérlet során vizsgáltuk, Matrigel extracelluláris mátrix felhasználásával. A kontroll, valamint a pcDNA3.1 myc/His A (-) - flotillin-1 vad típusú-, Ser315Ala és Ser315Asp plazmiddal transzfektált sejteket Matrigel-re mértük, majd a sejtek érképződési folyamatát fény mikroszkóppal követtük nyomon (31. ábra).



31. ábra A **flotillin-1** fehérje szerepe az angiogenesisben - A) Kontroll és a különböző flotillin-1 foszfoformákat overexpresszáló sejtek angiogenikus tulajdonságának vizsgálatához a sejteket Matrigel-lel bevont  $\mu$ -Slide Angiogenesis plate-be helyeztük. Az endotél sejtek ér formálását a plate-be helyezést követő ötödik órában fotóztuk le Leica MC 120 HD mikroszkóppal (a-d) valamint Leica TCS SP8 konfokális mikroszkóppal (e-h). Az aktin mikrofilamentumot Texas Red Phalloidin festékekkel festettük meg (piros). Skála: 250  $\mu$ m (a-d) és 100  $\mu$ m (e-h). B) A kontroll és a flotillin-1 foszfoformákkal transzfektált sejtekről készült képek statisztikai kiértékelését t-teszt alkalmazásával végeztük el (n=6).

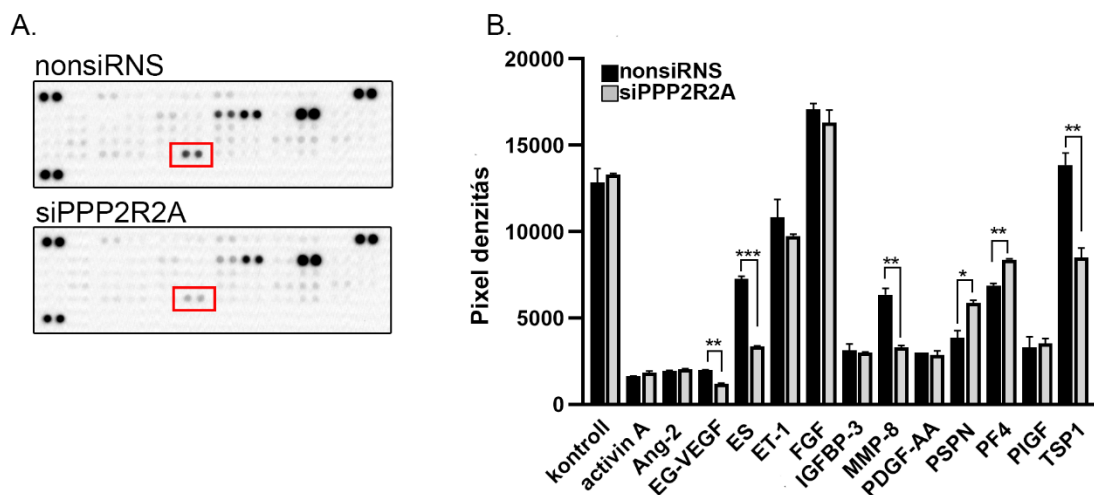
A konfokális mikroszkóppal készült felvételekhez az aktin filamentumokat Texas Red Phalloidinnal festettük meg. Az ötödik órában értékeltük ki a sejtek által kialakított kapilláris hálózatot. Az értékelés során a különböző flotillin-1 formákat expresszáló sejtek által kialakított erek hosszát és az elágazási pontok számát hasonlítottuk össze. Mind az össz ér hossz és az elágazások száma szignifikánsan nagyobb volt a vad típusú, illetve a foszforilált flotillin-1 fehérjét expresszáló sejtek esetében. Eredményeink igazolják a nem foszforilált flotillin-1

szabályozó szerepét az EC-k élettani folyamataiban, beleértve a sejtek mozgását és az angiogenezist.

## 7.2. PP2A B55 $\alpha$ szerepének vizsgálata az angiogenesishez kapcsolódó jelátviteli útvonalakban

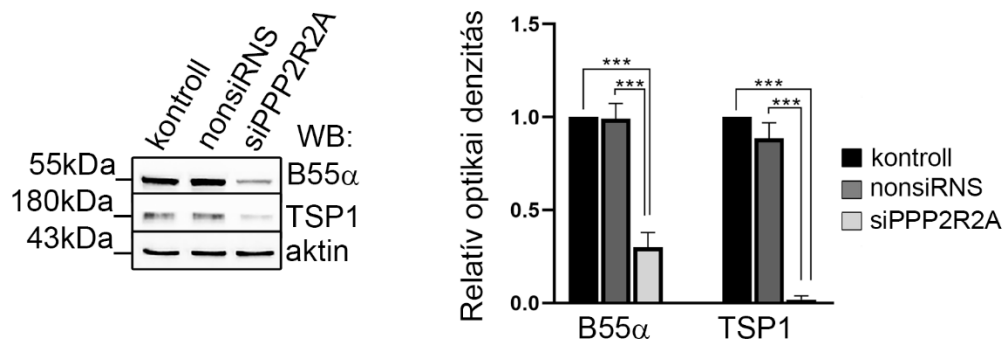
### 7.2.1. A PP2A B55 $\alpha$ depléciónak hatása a TSP1 expressziójára endotél sejtekben

A PP2A B55 $\alpha$  angiogenesisben betöltött szerepének feltérképezése érdekében a BPAEC sejteket PP2A B55 $\alpha$ -ra specifikus siRNS-sel (siPPP2R2A) transzfektáltuk. A transzfekciót követő 72 óra elteltével mind a nem targetáló siRNS-sel, mind a B55 $\alpha$  specifikus siRNS-sel kezelt sejt-lizátumokat megvizsgáltuk egy Proteome Profiler Angiogenesis Array Kit segítségével, amely 55 angiogenesishez kötött fehérje egyidejű detektálására alkalmas (32.A ábra). A vizsgált 55 fehérje közül 13 mutatott magas expressziós szintet a kezeltlen EC-kben. A PP2A B55 $\alpha$  depléciónak több fehérje szintjére is hatással volt, beleértve az endokrin eredetű vaszkuláris endoteliális növekedési faktort (EG-VEGF), endosztatint (ES), mátrix metalloproteáz (MMP)-8-at, persepint (PSPN), vérlemezke faktor 4-et (PF4) és a TSP1-et. A TSP1 estében szignifikáns csökkenést figyeltünk meg a PP2A B55 $\alpha$  csendesítés hatására, összehasonlítva a nem targetáló siRNS-sel kezelt sejt-lizátummal (32.B ábra).



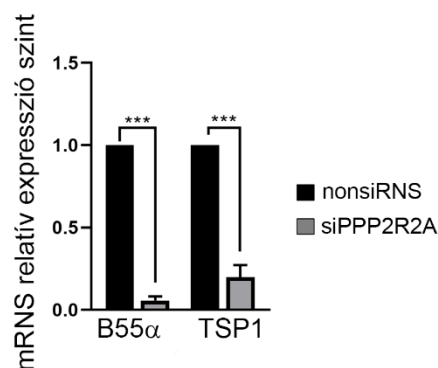
32. ábra A B55 $\alpha$  regulátor alegység depléciónak hatása az angiogenesishez köthető fehérjék expressziójára - A. BPAEC sejteket nem targetáló-, illetve B55 $\alpha$  specifikus siRNS-sel (siPPP2R2A) kezeltük. Az Angiogenesis Proteome Profiler Arrayben található membránokat a transzfektált sejt-lizátumával inkubáltuk. A membránokat a kitben lévő antitest koktél segítségével detektáltuk. A piros négyzetek a TSP1 fehérje jelét jelzi. B. A kiértékelést ImageJ szoftverrel végeztük az oszlopok a duplikált pontok átlagát  $\pm$  SD jelzik. A statisztikai analízist páratlan t-tesztel végeztük (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,0001$ ).

A TSP1 szintjének csökkenését kezeletlen, nem targetáló-, és PP2A B55 $\alpha$  specifikus siRNS-sel transzfektált sejtek felhasználásával Western blot technikával is igazoltuk, amely során B55 $\alpha$ , TSP1, illetve aktin specifikus elsődleges antitestet használtunk. A PP2A B55 $\alpha$  fehérjeszintje a depletálás után megközelítőleg 70%-kal csökkent, emellett a TSP1 fehérje szintje is jelentősen csökkent (33. ábra).



33. ábra A PP2A B55 $\alpha$  hiánya befolyásolja a TSP1 fehérje szintjét - Kontroll, nem targetáló és specifikus B55 $\alpha$  specifikus siRNS-sel kezelt endotél sejteklizátumokat Western blot segítségével teszteltük, B55 $\alpha$ , TSP1 és aktin specifikus antitestek felhasználásával. A kvantitatív analízist a membránon detektált jelek denzitometriálásával végeztük, az aktin jeleket használva a normalizáláshoz. A statisztikai elemzést ANOVA Tukey-tesztel végeztük ( $n=3$ ; \*\*\*  $p<0,001$ ).

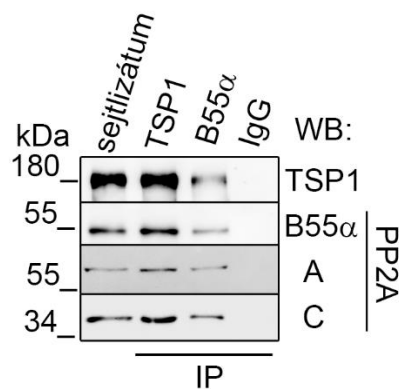
A PP2A B55 $\alpha$  deplécio hatásának további vizsgálatához a nem targetáló-, és specifikus B55 $\alpha$  siRNS kezelt sejtekből totál RNS-t izoláltunk és kvantitatív PCR-rel megvizsgáltuk a PP2A B55 $\alpha$  és TSP1 expressziós változásait. Az EC-kben a B55 $\alpha$  hiánya nemcsak fehérje, hanem mRNS szinten is jelentős TSP1 csökkenést eredményezett (34. ábra).



34. ábra A B55 $\alpha$  deplécio mRNS szinten is csökkenti a TSP1 expresszióját - A qPCR méréseket nonsiRNS és B55 $\alpha$  depletált (siPPP2R2A) endotél sejtekből származó mRNS felhasználásával végeztük. Az eredmények kiértékelése során GAPDH belső kontroll gént használtunk. A szignifikáns változásokat páratlan  $t$ -tesztel határoztuk meg ( $n=3$ ; \*\*\*  $p<0,001$ ).

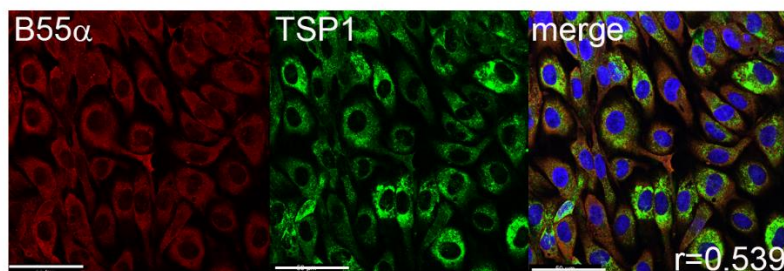
### 7.2.2. A PP2A B55 $\alpha$ és a TSP1 fehérjék közti kölcsönhatása kimutatása

A következő lépésben a B55 $\alpha$  regulátor alegységet tartalmazó PP2A holoenzim és a TSP1 fehérje közti kölcsönhatást vizsgáltuk EC-kben. Ehhez immunprecipitációs kísérletet végeztünk BPAEC sejtekből PP2A B55 $\alpha$  és TSP1 specifikus antitestek felhasználásával, nyúl IgG-t használva kontrollként. Az immunkomplexekeket ezt követően Western blot technikával vizsgáltuk TSP1, illetve a PP2A holoenzim alegységeire specifikus antitestek felhasználásával (35. ábra). Kimutattuk, hogy a B55 $\alpha$  regulátor alegység és a TSP1 fehérje kölcsönhatásba lépnek egymással, továbbá a PP2A szerkezeti A-, illetve katalitikus C alegységeket is detektáltuk az immunprecipitátumokban. Ez azt jelezte, hogy a TSP1 fehérje közvetlenül vagy közvetve kölcsönhatásba lép a PP2A holoenzim mindegyik alegységével.



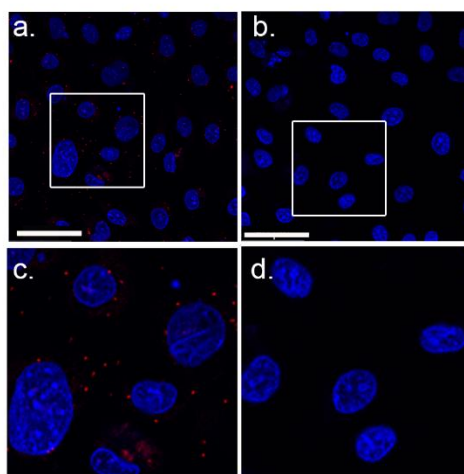
35. ábra A kölcsönhatás kimutatása a PP2A holoenzim és a TSP1 fehérjék között - Immunprecipitáltuk a TSP1 és PP2A B55 $\alpha$  fehérjéket endotél sejtekből. A totál lizátumokat és az immunkomplexekeket Western blot analízissel vizsgáltuk TSP1 és a PP2A A-, B55 $\alpha$ - és C alegységeire specifikus antitestekkel. Kontrollként nyúl IgG-t használtunk.

A PP2A B55 $\alpha$  és TSP1 ko-lokalizációját EC-kben immunfluoreszcens festéssel vizsgáltuk meg. A sejtek fixálása, permeabilizálása és blokkolása után anti-egér TSP1 és anti-nyúl PP2A B55 $\alpha$  elleni elsődleges antitestekkel inkubáltuk a fedőlemezekben lévő endotél sejteket. Az elsődleges antitestekre specifikus Alexa488 konjugált anti-nyúl IgG és Alexa546 konjugált anti-egér IgG másodlagos antitestekkel kezeltük a mintákat. A sejtmagot DAPI festékkel jelöltük. A PP2A B55 $\alpha$  és a TSP1 kolokalizációja a sejtek citoplazmájában volt megfigyelhető, mely kölcsönhatást a Pearson's koefficiens ( $r=0,4-0,59$ ) is megerősített (36. ábra).



36. ábra **PP2A B55α és a TSP1 fehérjék sejteken belüli kolokalizációjának vizsgálata endotél sejtekben** - A BPAEC sejteket anti-TSP1 (zöld) és anti-PP2A B55α (piros) antitestekkel jelöltük és immunfluoreszcens festést végeztünk. A sejtmagot DAPI-val (kék) festettük. Skála: 50μm.

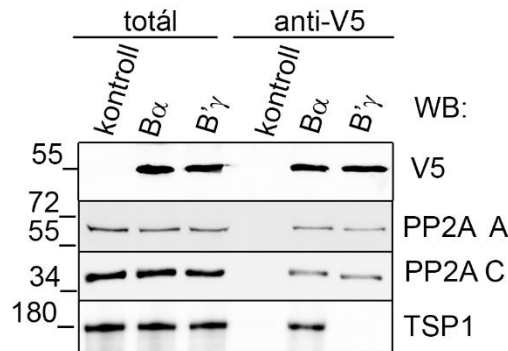
Az endogén fehérjék kölcsönhatásának további igazolására PLA-t végeztünk. A fluoreszcens pontokként megjelenő PLA jelek tovább igazolták a TSP1 és a PP2A B55α kölcsönhatását az EC-kben (37. ábra). A negatív kontroll mintában, melyhez nem adtunk elsődleges antitestet, nem detektáltunk jelet.



37. ábra **PP2A B55α és a TSP1 fehérjék közti kölcsönhatás vizsgálata Proximity Ligation Assay (PLA) módszerrel** - A Duolink in situ PLA vizsgálatot anti-B55α és anti-TSP1 elsődleges antitestek felhasználásával végeztük (a.). Negatív kontrollként (b.) a sejteket csak másodlagos antitestekkel festettük meg. A sejtmagot DAPI-val (kék) tettük detektálhatóvá. Skála: 50μm. Az a. és b. panel fehér téglalappal keretezett területe a c. és d. panelen látható nagytá.

A kölcsönhatás izoformaspecificitásának igazolására anti-V5 agaróz affinitás gélt használtunk. Az EC-eket a korábban is használt pcDNA3.1-His PP2A B55α vagy pcDNA3.1-

His PP2A B'γ plazmidokkal transzfektáltuk, majd a V5 címkével rendelkező fehérjéket anti-V5 affinitás gélen tisztítottuk. A totál mintákat, valamint a tisztított mintákat Western blottal elemeztük, V5-címke, PP2A A, PP2A C és TSP1 specifikus antitestek felhasználásával (38. ábra).

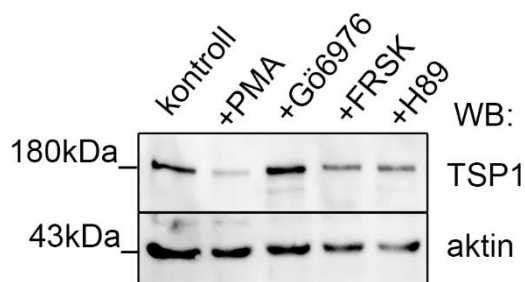


**38. ábra** *Kölcsönhatás izoforma specificitásának igazolása a PP2A B55 $\alpha$  és TSP1 fehérjék között* - pcDNA3.1 V5-His PP2A B55 $\alpha$  és pcDNA3.1 V5-His PP2A B' $\gamma$  transzfektált sejtek lizátumát anti-V5 affinitás géllal inkubáltuk. A totál sejt-lizátumot és az affinitás gélről eluált mintákat Western blot segítségével teszteltük V5-címke, TSP1, PP2A A és C alegységekre specifikus antitestek felhasználásával.

A B55 $\alpha$ , illetve a B' $\gamma$  alegységek overexpressziója és tisztítása sikeres volt. Mindkét alegység kölcsönhatásba lépett a PP2A A és C alegységével is, azonban csak a B55 $\alpha$  regulátor alegység esetében detektáltuk a TSP1 fehérje jelét. Ezek az eredmények azt bizonyítják, hogy a TSP1 izoforma specifikusan kizárólag a B55 $\alpha$  regulátor alegységet tartalmazó PP2A holoenzimmel lép kölcsönhatásba.

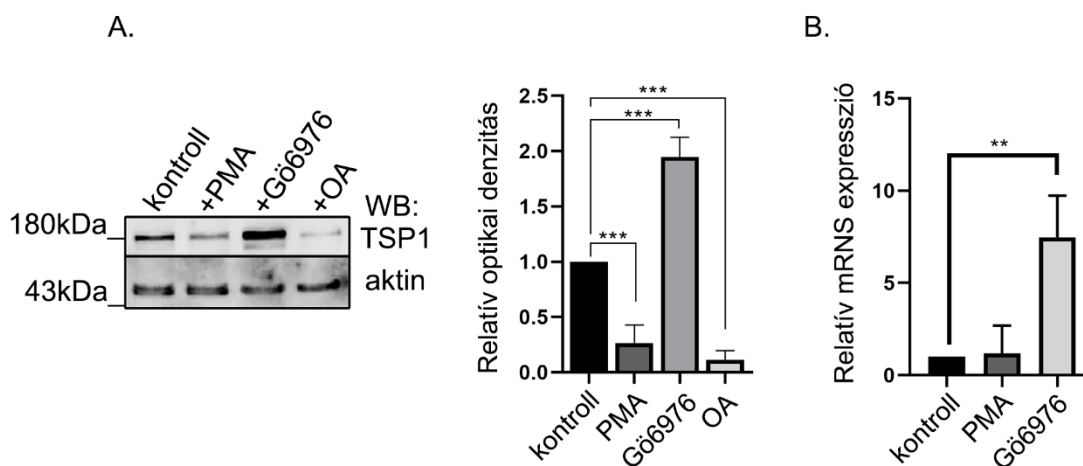
### 7.2.3. A TSP1 fehérje a PKC enzim szubsztrátja

A TSP1 és PP2A közti specifikus kölcsönhatás a fehérje reverzibilis foszforilációjára utalt, ezért megvizsgáltuk a PKA és PKC aktivitásának és gátlásának hatását a TSP1 fehérje szintjére. A forskolin (FRSK, PKA aktivátor) és a H89 (PKA inhibítor) kezelések nem befolyásolták a TSP1 fehérje expresszióját az EC-kben. Azonban a PKC aktivitásának gátlása Gö6976 kezeléssel, illetve aktiválása PMA-val jelentősen megváltoztatta a TSP1 fehérje szintjét (39. ábra). Ez arra utal, hogy a TSP1 fehérje szintje összefügg a PKC aktivitásával.



39. ábra A PKA és PKC aktivitásának hatása a TSP1 fehérje szintre - Az endothél sejteket 12 órán keresztül kezeltük 50nM PKC aktivátorral (PMA), 1 $\mu$ M PKC inhibitorral (Gö6976) valamint PKA aktivátor forskolinnal (FRSK) és H89-cel amely PKA inhibitor. Ezt követően a sejteket összegyűjtöttük és 2x mintapufferrel főztük, majd a TSP1 fehérje szintjének változásait Western blot technikával elemeztük, specifikus TSP1 és aktin antitestek felhasználásával.

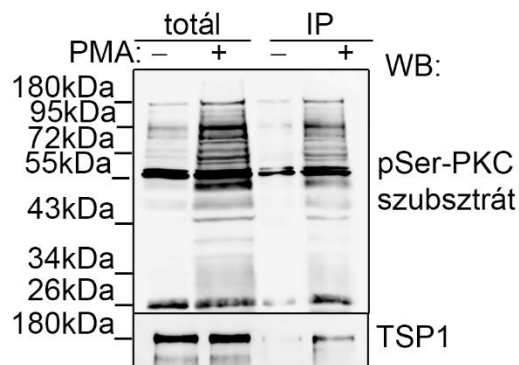
A PMA, Gö6976 és OA kezelt mintákat tovább vizsgáltuk Western blottal, specifikus TSP1 és aktin antitestek felhasználásával, majd statisztikai analízist végeztünk (40.A ábra). Míg a PKC aktiválása csökkentette a TSP1 fehérje mennyiségét, addig a Gö6976 kezelés szignifikánsan megemelte annak szintjét. A PP2A gátlása OA-val, hasonlóan a PP2A deplációhoz, csökkentette a TSP1 fehérje expresszióját.



40. ábra A PKC és PP2A aktivitása hatással van a TSP1 expressziós szintjére - A. BPAEC sejteket 50nM PMA-val, 1 $\mu$ M Gö6976 vagy 5nM OA-val kezeltük 12 órán keresztül. A sejtlyúzatumokat Western blottal teszteltük TSP1 és aktin specifikus antitestekkel. A TSP1 jelek kiértékelése során az aktin jelére történt a normalizálás. A statisztikai elemzést ANOVA Dunnett-tesztel végeztük (n=3; \*\*\* p<0,001). B. A qPCR kísérleteket, kontroll, PMA, valamint Gö6976 kezelt sejtekből izolált mRNS felhasználásával végeztük. Az adatok kiértékeléséhez a GAPDH jelére normalizáltunk. A statisztikai analízist ANOVA Dunnett-tesztel végeztük el (n=3; \*\* p<0,01).

A kezelt sejtekben a TSP1 expresszióját mRNA szinten is megvizsgáltuk qPCR segítségével. A Gö6976 kezelés hatására a TSP1 mRNA szintje megemelkedett, azonban a PMA kezelés nem okozott szignifikáns változást a TSP1 mRNA szintjében a kontrollhoz képest (40.B ábra). Ezen eredmények arra utalnak, hogy a TSP1 PKC foszforilációja szerepet játszhat a fehérje mennyiségi szabályozásában is.

Annak igazolására, hogy a PKC valóban foszforilálja a TSP1 fehérjét, kontroll és PMA-val kezelt EC-kből immunprecipitációt végeztünk foszfo-szerin-PKC szubsztrátra (pSer-PKC szubsztrát) specifikus antitesttel (41. ábra). A totál lizátumokat és az immunkomplexeket foszfo-szerin-PKC szubsztrát és TSP1 specifikus antitestekkel Western blottal vizsgáltuk. A kontroll mintában is detektáltunk TSP1 jelet, amely a fehérje alacsony foszforilációs szintű formájának jelenlétére utal, PKC aktiválás nélkül. A PMA-val kezelt mintában erős TSP1 jelet detektáltunk, ami igazolja, hogy a PKC enzim a TSP1 fehérjét Ser oldallánco(ko)n foszforilálja.

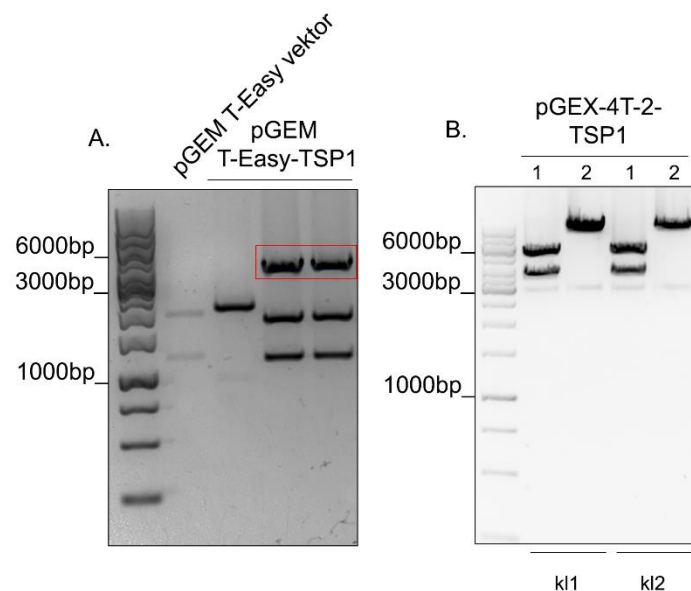


41. ábra **A TSP1 fehérje PKC általi foszforilációjának igazolása** - Kontroll és PMA kezelt endotél sejtekből immunprecipitáltunk foszfo-szerin-PKC szubsztrát specifikus elsődleges antitest felhasználásával. A totál lizátumokat és az immunkomplexeket Western blottal vizsgáltuk, foszfo-szerin-PKC szubsztrát, illetve TSP1 specifikus antitestek felhasználásával.

#### 7.2.4. Bakteriális expresszióra alkalmas rekombináns TSP1 konstruktok létrehozása

A TSP1 kódoló szekvenciájának felszorzosításához HeLa sejtekből származó cDNS-használtunk. Az alkalmazott primereket „fészek primereknek” nevezzük, mivel a TSP1 fehérje kódoló szekvenciájánál (3513bp) hosszabb, mintegy 4017bp hosszú szekvenciát amplifikálnak, amely tartalmazza a TSP1 kódoló szekvenciát is. Az amplifikáláshoz az Anyagok és módszerekben lévő 4. táblázatban leírt hőmérsékleti profilt alkalmaztuk. A pGEX-4T-2 vektorokba történő klónozáshoz a 4017bp hosszúságú PCR terméket GoTaq G2 flexi

Polymerase enzim felhasználásával sokszorosítottuk, amely olyan AAA túlnyúló véget alakít ki a PCR terméken, amely komplementere a pGEM T-Easy vektor által hordozott TTT túlnyúló végnek. Ezért ebben az esetben a felhasznált primerek tartalmaztak olyan restriktív hasítóhelyeket, melyek szükségesek voltak a bakteriális expresszióra alkalmas pGEX-4T-2 vektorokba való klónozáshoz. A pGEM T-Easy vektor T7 és SP6 RNS polimerázt tartalmaz, melyek egy többszörös klónozó régiót határolnak a  $\beta$ -galaktozidáz enzim  $\alpha$ -peptidjét kódoló régióban. A ligálást követően a plazmidokat JM109 *E.coli* kompetens sejtekbe transzformáltuk, majd a transzformált sejteket X-gal tartalmú LB táptalajra szélesztettük. A vektorban lévő  $\alpha$ -peptid inszerciós inaktiválása lehetővé tette a rekombinánsok kék/fehér szelekción alapuló azonosítását. A rekombináns plazmidokat tartalmazó telepekből DNS-t izoláltunk, majd ScaI, KpnI, Sall restriktív enzim mixszel hasítottunk, kivágva a TSP1 kódoló szekvenciáját a pGEM T-Easy vektorból (42.A ábra).



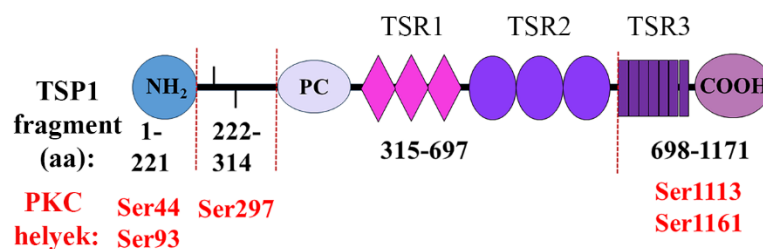
42. ábra A **pGEX-4T-2-TSP1 rekombináns plazmidok létrehozása** - A. PCR, ligálás és transzformálást követően a kitisztított pGEM T-Easy-TSP1 plazmid DNS-eket ScaI+KpnI+Sall restriktív endonukleázokkal emésztettük. Kontrollként a pGEM T-Easy vektort ScaI enzimmel emésztettük. A pirossal bekeretezett sávok a TSP1 inzertek (3513bp), melyeket a további klónozási lépésben haszáltunk fel. B. A pGEX-4T-2-TSP1 klónokat Sall+KpnI, illetve csak Sall enzimmel emésztettük (linearizáltuk), a vártan megfelelően a két enzimmel történő emésztés esetében a vektor (4970bp) és a TSP1 (3513bp) méretében kaptunk jelet.

A gélből való tisztítást követően az TSP1 inzertet és a NotI enzimmel hasított pGEX-4T-2 vektort Klenow enzimmel kezeltük, amely a hasítást követő tapadós végeket tompává alakította. Ezzel a vektort és inzertet is Sall enzimmel emésztettük. A tisztítási lépés után a vektort tovább kezeltük FastAP Thermosensitive Alkalikus Foszfátáz (Thermo Fisher)

enzimmel, az önzáródás elkerülése végett. Végül a ligálást és transzfomálást követően a rekombináns pGEX-4T-2-TSP1 plazmidokat restriktációs emésztéssel ellenőriztük (42.B ábra). A rekombináns plazmidok szekvenciáját a BIOMI Kft. általi szekvenáltatás is megerősítette.

#### 7.2.5. Rekombináns TSP1 fehérje fragmentumok létrehozása

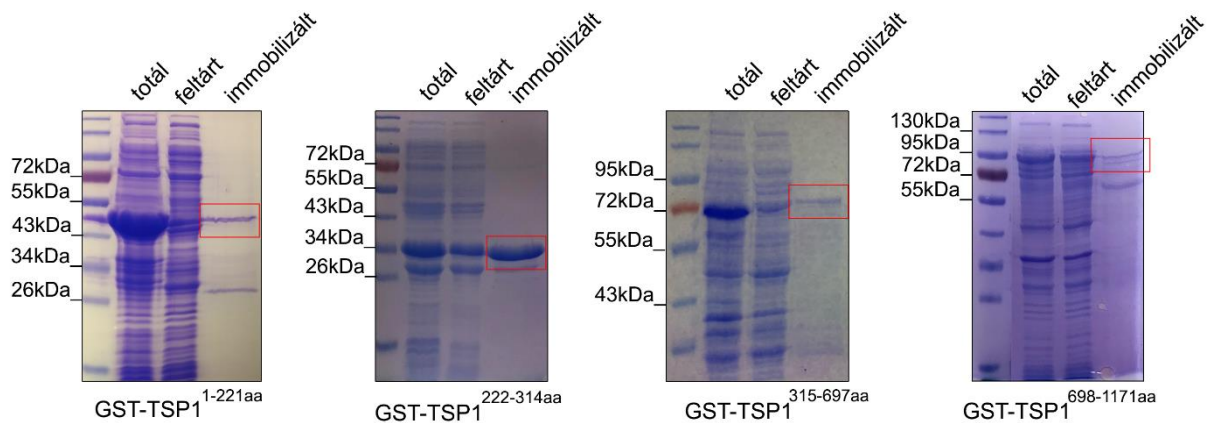
A PKC által foszforilálható potenciális oldallánc(ok) azonosításához GPS5.0 foszforilációs predikciós szoftvert használtunk, amely öt potenciális szerin oldalláncot talált a teljes hosszúságú TSP1 szekvenciájában: Ser<sup>44</sup>, Ser<sup>93</sup>, Ser<sup>297</sup>, Ser<sup>1113</sup> és Ser<sup>1163</sup>. A TSP1 domén szerkezetét figyelembe véve, több rövidebb fragmentet klónoztunk a pGEX-4T-2 vektorba, hogy GST címkével ellátott rekombináns TSP1 fehérje fragmentumokat hozzunk létre (43. ábra).



43. ábra A TSP1 fehérje sematikus domén szerkezete - A lehetséges PKCα foszforilációs helyek (piros) sematikus ábrázolása a TSP1 fehérjén (GPS5.0 szoftver általi adatok alapján). A TSP1 domén szerkezetét figyelembe véve rövid fragmenteket hoztunk létre a jelzett aminosavak szerint.

A fragmentumok létrehozásához az Anyagok és módszerek részben leírt primereket és PCR profilokat alkalmaztunk. Mindegyik fragment amplifikálásánál a teljes hosszúságú pGEX-4T-2-TSP1 plazmidot használtuk templátként. A PCR termékeket agaróz gélelektroforézissel választottuk el, tisztítás és ligálás után pedig a rekombináns plazmidokat BL21 (DE3) *E.coli* kompetens sejtekbe transzformáltuk. A rekombináns GST-TSP1<sup>1-221aa</sup>, GST-TSP1<sup>222-314aa</sup>, GST-TSP1<sup>315-697aa</sup> és a GST-TSP1<sup>698-1171aa</sup> fehérjék termeltetési körülményeit optimalizáltuk többféle IPTG koncentrációt, hőmérsékletet és termeltetési időintervallumot kipróbálva. A legideálisabb termelési feltételek a következők voltak: GST-TSP1<sup>1-221aa</sup>: 0,1 mM IPTG/13°C/16-18 óra; GST-TSP1<sup>222-314aa</sup>: 1 mM IPTG/37°C/3 óra; GST-TSP1<sup>315-697aa</sup>: 0,1 mM IPTG/25°C/16-18 óra; GST-TSP1<sup>698-1171aa</sup>: 0,5 mM IPTG/25°C/3 óra. A fehérjék affinitás

kromatográfias oszlopon történő tisztítását optimalizálást követően az Anyagok és módszerek 10. táblázata alapján végeztük el. A tisztítás sikerességének ellenőrzésére mintát vettünk a teljes lizátumból, a feltárt mintából, valamint a glutathion Sepharose 4B gyantán immobilizált fehérjékből. A mintákat SDS-PAGE gélen választottuk el, majd Coomassie Blue festékkel detektáltuk a fehérjéket (44. ábra).

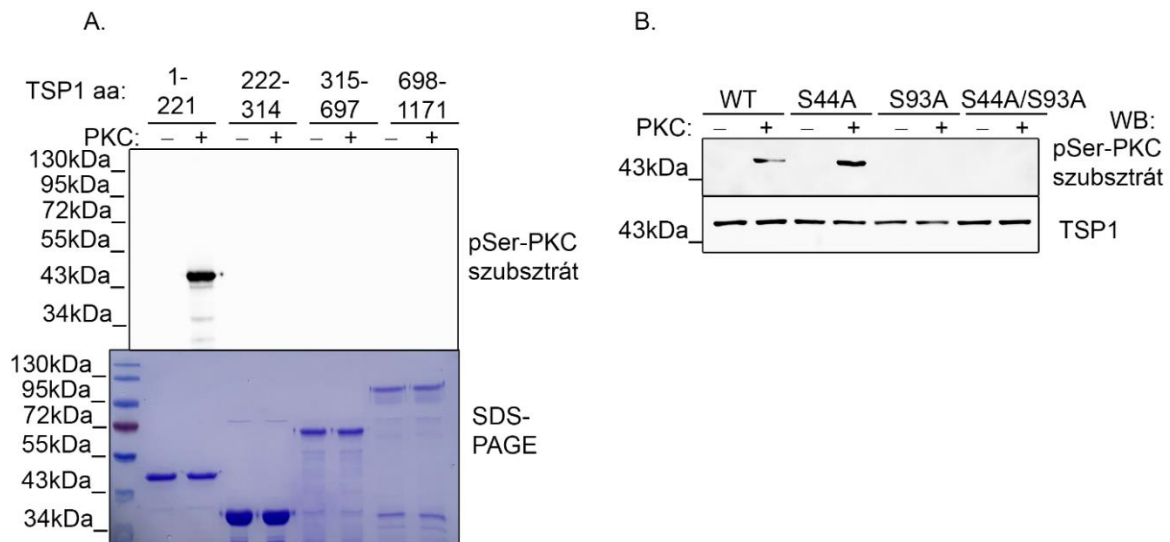


44. ábra **A rekombináns TSP1 fragment fehérjék affinitás kromatográfias tisztítása** - A rekombináns GST-TSP1 fragment fehérjék tisztítása Glutathion Sepharose 4B gyantán történt. Mintát vettünk az indukciót követő totál lizátumból, a szonikálással feltárt valamint a gyantán immobilizált, tisztított mintából. A mintákat SDS-PAGE-en választottuk el. A piros négyzetek jelölik a kitisztított fehérjéket. GST-TSP1<sup>1-221aa</sup> 50kDa; GST-TSP1<sup>222-314aa</sup> 34kDa; GST-TSP1<sup>315-697aa</sup> 72kDa; GST-TSP1<sup>698-1171aa</sup> 95kDa.

#### 7.2.6. 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 fragmentumokat 2 órán át inkubáltuk aktív PKC enzimmal, míg a negatív kontroll minták nem tartalmaztak aktív PKC enzimet. A mintákat foszfo-szerin-PKC szubsztrát specifikus antitest felhasználásával vizsgáltuk Western blot technikával (45.A ábra). Az eredmények azt mutatták, hogy a PKC kizárólag az első fragmentumot (1-221aa) foszforilálta, ami azt sugallta, hogy a TSP1 potenciális foszforilációs helye a Ser<sup>44</sup> és/vagy a Ser<sup>93</sup> lehet. A GST-TSP1<sup>1-221aa</sup> fragmentumból pontmutációval szimpla (Ser44Ala vagy Ser93Ala) és dupla (Ser44Ala és Ser93Ala) foszfonull mutánsokat hoztunk létre, ahol a potenciális szerin oldallánco(ka)t alaninra cseréltük. A mutagenézis sikerességét szekvenáltatással igazoltuk. Az újonnan létrehozott rekombináns foszfonull mutáns

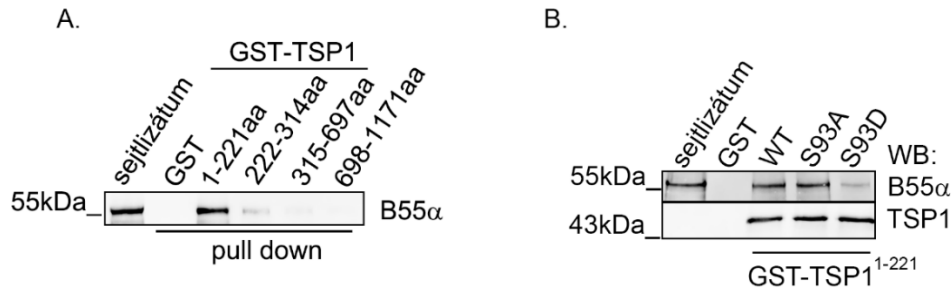
fragmentumokkal megismételtük az *in vitro* PKC foszforilációs kísérletet, a vad típusú GST-TSP1<sup>1-221aa</sup> rekombináns fragmentumot felhasználva kontrollként. A Western blot analízis eredményei alapján a vad típusú, illetve az Ser44Ala GST-TSP1<sup>1-221aa</sup> fragmentumok foszforilálódtak, míg az Ser93Ala és a duplamutáns Ser44Ala/Ser93Ala GST-TSP1<sup>1-221aa</sup> fragmentumok nem (45.B ábra). Ebből arra következtettünk, hogy a TSP1 fehérje a PKC enzim által csak a Ser<sup>93</sup> oldalláncon foszforilálódik.



45. ábra **A PKCa foszforilációs helyének azonosítása a TSP1 fehérjén** - A. A GST-TSP1 fragment fehérjét Glutathione Sepharose 4B gyöngyökön tisztítottuk és aktív PKCa enzimmel, vagy enzim nélkül inkubáltuk 2 órán keresztül 30°C-on. A mintákat Western blot technikával ellenőriztük foszfo-szerin-PKC szubsztrát specifikus antitest felhasználásával. Az SDS-PAGE gélen az elválasztott fehérjét Coomassie Blue festéssel tettük detektálhatóvá. B. A rekombináns GST-TSP1<sup>1-221aa</sup> WT, GST-TSP1<sup>1-221aa</sup> Ser44Ala, GST-TSP1<sup>1-221aa</sup> Ser93Ala és a GST-TSP1<sup>1-221aa</sup> Ser44Ala/Ser93Ala fehérjéket gyantán tisztítottuk és aktív PKC-val, vagy nélküle inkubáltuk. A fehérjék foszforilációját foszfo-szerin-PKC szubsztrát antitesttel vizsgáltuk, Western blot technikával.

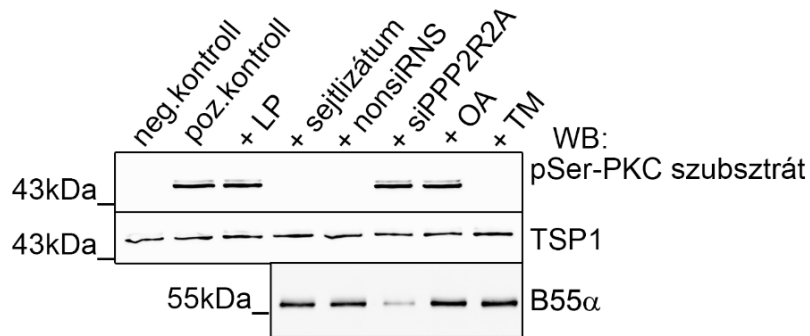
Ezt követően a PP2A B55 $\alpha$  és a rekombináns GST-TSP1 fragmentumok közti kölcsönhatást pull down technikával vizsgáltuk. Az immobilizált fehérje fragmentumokat BPAEC lizátummal inkubáltuk egy éjszakán át, majd a mintákat Western blot segítségével B55 $\alpha$  specifikus antitesttel analizáltuk. Az eredmények alapján a B55 $\alpha$  kölcsönhatásba lépett a PKC foszforilációs helyet tartalmazó (GST-TSP1<sup>1-221aa</sup>) N-terminális fragmentummal (46.A ábra). Annak tesztelésére, hogy a Ser<sup>93</sup> foszforilációs állapota befolyásolja-e a TSP1 és PP2A B55 $\alpha$  közti kölcsönhatást, létrehoztuk a GST-TSP1<sup>1-221aa</sup> Ser93Asp foszforilációt utánzó mutánst. Pull down kísérletet végeztünk a GST-TSP1<sup>1-221aa</sup> - WT, Ser93Ala és Ser93Asp fehérjékkel. A Western blot analízis alapján a B55 $\alpha$  mindhárom fragmentummal

kölcsönhatásba lépett, de a leggyengébb kölcsönhatás a GST-TSP1<sup>1-221aa</sup> Ser93Asp foszforilációt utánzó mutánsnál volt megfigyelhető a vad típusú és a foszfonull mutánshoz képest (46.B ábra).



46. ábra A TSP1 N-terminális fragmentum és a PP2A B55α közti kölcsönhatás kimutatása - A. BPAEC sejtlyázattal pull down kísérletet végeztünk bakteriálisan expresszált és gyantán tisztított GST és GST-TSP1 fragmentek felhasználásával. Az eluált mintákat B55α specifikus antitesttel ellenőriztük Western blottal. B. Immobilizált GST-TSP1<sup>1-221aa</sup> WT, - Ser93Ala, - Ser93Asp rekombináns fehérjéket BPAEC sejtlyázattal inkubáltuk. A pull down minták Western blot analízisét B55α és TSP1 specifikus antitestekkel végeztük.

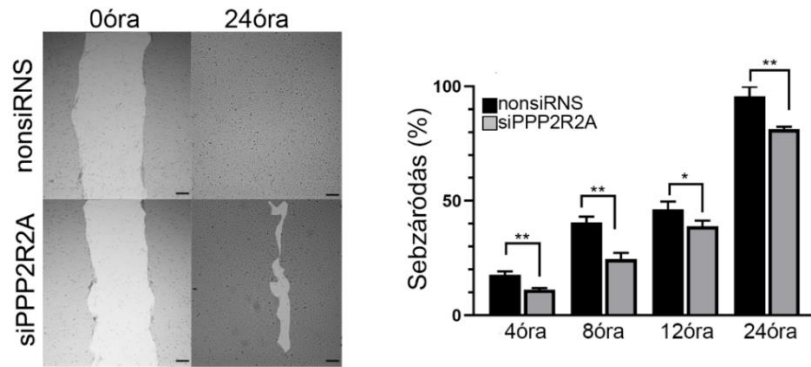
Ezt követően megvizsgáltuk, hogy a PP2A foszfatáz szerepet játszik-e a foszfo-TSP1 defoszforilációjában. A vizsgálathoz az *in vitro* PKC által foszforilált GST-TSP1<sup>1-221aa</sup> fragmentumot használtuk szubsztrátként és a foszforilációs szintjét Western blot segítségével elemeztük (47. ábra). A defoszforilációs kísérlet során a foszforilált TSP1 fragmentumot BPAEC sejtlyázattal, nem targetáló vagy B55α specifikus siRNS-sel kezelt sejtlyázattal, illetve PP1 vagy PP2A inhibitorral kezelt sejtlyázattal inkubáltuk. A sejtlyátum, a nem specifikus siRNS-sel kezelt sejtlyátum, valamint a PP1 gátolt tautomicetinnel kezelt sejtlyátum defoszforilálta a TSP1 fehérjét. A defoszforiláció a PP2A regulátor B55α alegységének hiányában és a PP2A okadánsavval történő gátlásakor nem valósult meg. Ezek az eredmények arra utaltak, hogy a PP2A B55α holoenzim felelős a Ser<sup>93</sup> oldalláncon foszforilált TSP1 defoszforilációjáért.



47. ábra **A foszfo-Ser93 TSP1 fehérjét a PP2A B55α defoszforilálja** - Az immobilizált és *in vitro* PKC foszforilált GST-TSP1<sup>1-221aa</sup> fehérje fragmentek defoszforilációjának vizsgálatát lizispuffer (LP, mint defoszforilációs negatív kontroll), BPAEC sejtlyizátum, nem-targetáló (nonsi-), valamint siPPP2R2A siRNS-sel transzfektált sejtlyizátum, továbbá 5nM okadánsavval (OA) és 1  $\mu$ M tautomicitinnel (TM) előkezelt sejtlyizátum hozzáadásával végeztük. Pozitív kontrollként *in vitro* PKC foszforilált GST-TSP1<sup>1-221aa</sup>, míg negatív kontrollként PKC enzimmel nem kezelt GST-TSP1<sup>1-221aa</sup> alkalmaztunk. A B55α csendesítésének sikerességét a minták B55α fehérje szintjének ellenőrzésével igazoltuk. A foszforilált rekombináns fehérje fragmentumok foszforilációs szintjét TSP1 és foszfo-szerin-PKC szubsztrát antitest felhasználásával ellenőriztük, Western blot technikával.

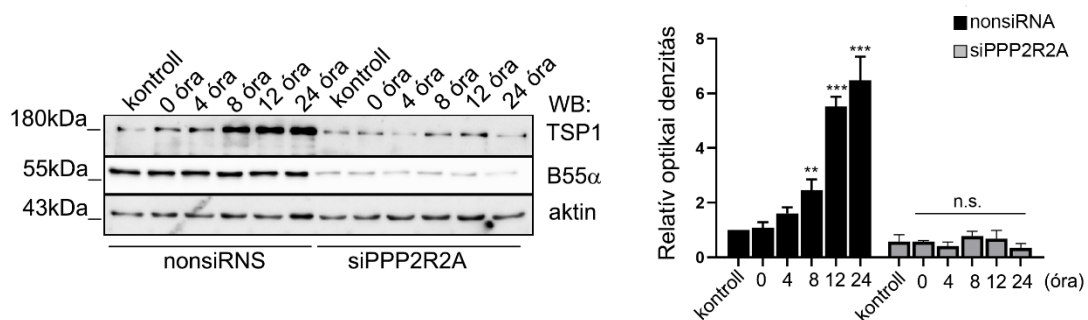
#### 7.2.7. A PP2A B55α nélkülözhetetlen a TSP1 szabályozásához a sebgyógyulás során

A PP2A B55α regulátor alegység élettani szerepének vizsgálatához először scratch assay módszerrel elemeztük az EC-k sebgyógyulási képességét, összehasonlítva a nem-targetáló siRNS-sel transzfektált és B55α depletált sejteket (48. ábra). A karcolás után a sebgyógyulás folyamatát meghatározott időközönként készült fotókkal követtük nyomon, melyeket az ImageJ szoftverrel értékeltük ki. Az eredmények azt mutatták, hogy a B55α depletált sejtek sebzáródási képessége lassabb volt, mint a kontroll sejteké.



48. ábra **A PP2A B55 $\alpha$  hiánya csökkenti az endotél sejtek sebgyógyulási képességét** - A 12 lyukű plateben lévő endotél sejteket nem targetáló-, és B55 $\alpha$  specifikus siRNS-sel transzfektáltuk. Transzfekciót követően 48 órával a monolayer sejtréteget 1ml-s pipettahegygel megkarcoltuk. A sejtek sebgyógyulási folyamatát a jelzett időpontokban (4 óra, 8 óra, 12 óra, 24 óra) fotózással követtük nyomon. Skála: 250  $\mu$ m. A sebzáródást ImageJ szoftverrel értékeltük ki. A statisztikai elemzést t-tesztel végeztük el ( $n=3$ , \*  $p<0,05$ ; \*\*  $p<0,01$ ).

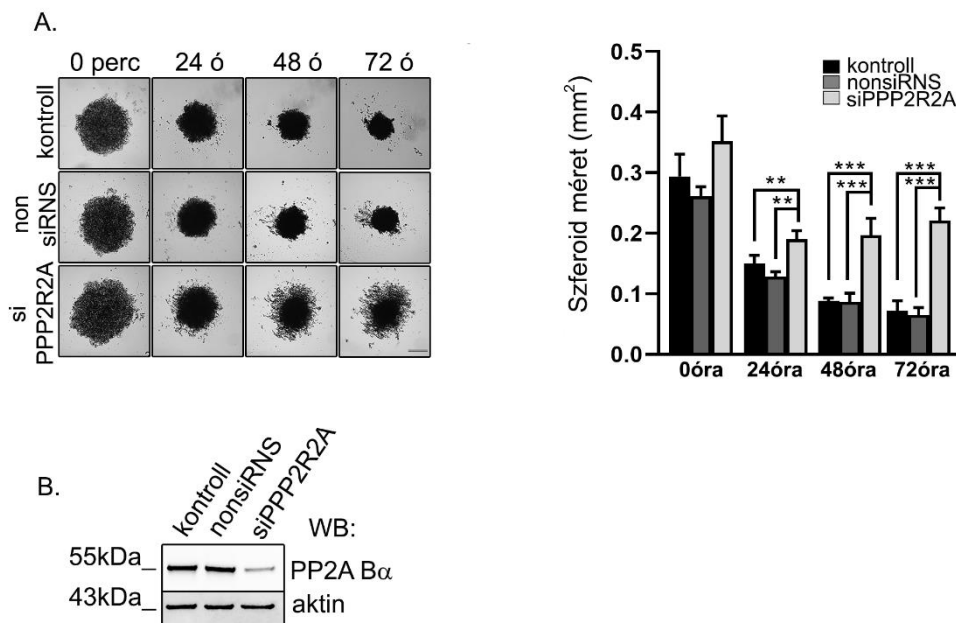
A sebgyógyulás alatt a TSP1 és PP2A B55 $\alpha$  fehérjék expressziós szintjét is nyomon követtük. A karcolt, nem-targetáló- és a PP2A B55 $\alpha$  siRNS-sel kezelt sejteket különböző időpontokban összegyűjtöttük, majd a mintákat Western blot során aktin, TSP1 és PP2A B55 $\alpha$  specifikus antitesttel detektáltuk (49. ábra). A TSP1 fehérje szintje megemelkedett a sebzáródás során a nem targetáló siRNS-sel kezelt sejtek esetében, mely összhangban áll az irodalmi adatokkal [124]. Ezzel szemben a B55 $\alpha$  depletált sejtekben ez az emelkedés nem volt tapasztalható. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a TSP1 fehérje szabályozásához a PP2A B55 $\alpha$  hozzájárul a sebgyógyulási folyamatokban.



49. ábra **A TSP1 fehérje expressziós változása sebgyógyulás során** - A karcolatlan (kontroll) és karcolt, nem targetáló siRNS-sel transzfektált és B55 $\alpha$  depletált sejteket mostuk 1x PBS-sel, majd proteáz inhibitor koktélt tartalmazó lizispufferben összegyűjtöttük a jelölt időpontokban (0, 4, 8, 12, 24 óra). A mintákat Western blot módszerrel teszteltük TSP1, B55 $\alpha$  és aktin specifikus antitestek segítségével. A denzitometriás kiértékelés során az aktin jelére történt a normalizálás. A statisztikai analízis ANOVA Tukey-tesztel történt ( $n=3$ , \*\*  $p<0,01$ ; \*\*\*  $p<0,001$ ).

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

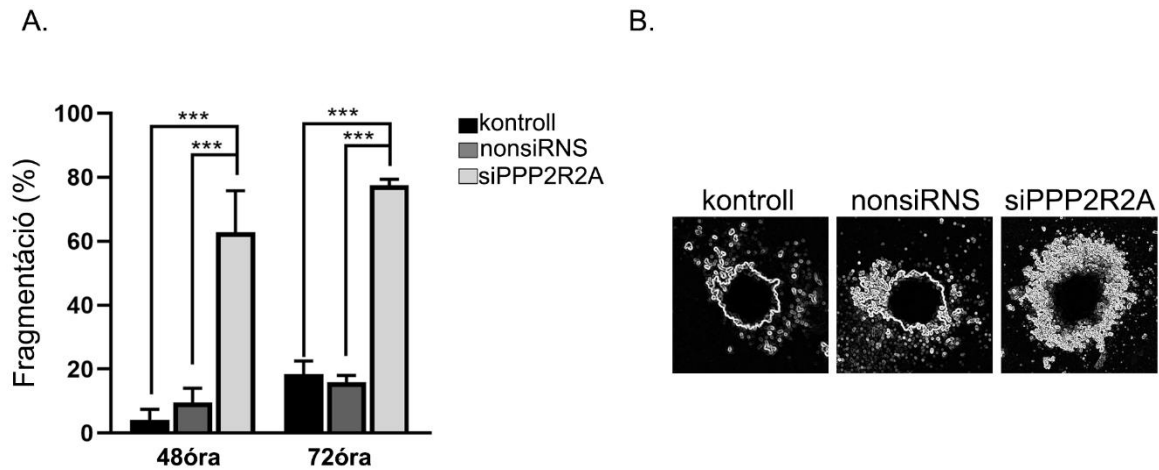
Következő lépésként megvizsgáltuk a PP2A B55 $\alpha$  depléció hatását az EC-k angiogenetikus tulajdonságaira, mint a szferoid-, illetve érképző képességükre. A 3D szferoid sejttenyésztéshez speciális Bioprinting Kit-et használtunk. A sejteket NanoShuttle-PL mágneses gyöngyökkel kezeltük. A szferoidok változásait a mágneses közegből történő eltávolítást követően (0 perc) különböző időpontokban készített fényképekkel dokumentáltuk (50.A ábra). A szferoidok méretét az ImageJ szoftver segítségével mértük meg és elemeztük. A depléció sikerességét a mágnesezett sejtek Western blot analízisével ellenőriztük (50.B ábra).



50. ábra A PP2A B55 $\alpha$  depléciója hatással van az endotél sejtek 3D szferoid formáló képességére - A. A kontroll, nonsiRNS és siPPP2R2A-valkezelt sejteket NanoShuttle-PL mágneses gyöngyökkel inkubáltuk egy éjszakán keresztül. A mágnesezett sejteket sejttaszító plate-be tettük át, majd speciális mágneses lemezen inkubáltuk további 24 órán keresztül a szferoid képzés inicializálásának érdekében. A szferoid kialakulását követően a mágneses lemezt eltávolítottuk (0 perc) és a feltüntetett időpontokban képeket készítettünk. A szferoidok méretét ImageJ segítségével értékeltük ki. A statisztikai elemzést ANOVA Tukey-tesztel végeztük ( $n=3$ , \*\*  $p<0,01$ ; \*\*\*  $p<0,001$ ). Skála: 500  $\mu\text{m}$  B. A szferoidképzéshez használt sejtek ellenőrzése Western blot analízissel.

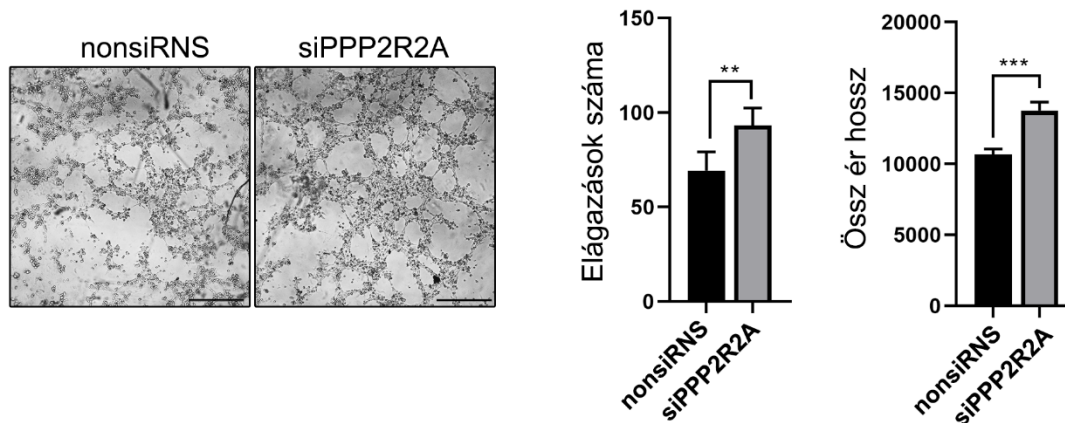
A kapott eredmények alapján a B55 $\alpha$  hiánya befolyásolta a sejtek szferoidképző képességét. A B55 $\alpha$  depletált sejtekből képződött szferoidok kezdetben nagyobb méretűek voltak és 48 óra elteltével a szferoidok fragmentálódtak és elkezdtek szétesni. A fragmentálód

mértékét a 48 és 72 órás szferoidminták esetében kiértékeljük és számszerűsítettük (51.A ábra). A fragmentáció mértéke a B55 $\alpha$  depletált sejtek szferoidjaiban szignifikánsan nagyobb volt, mint a kontroll, illetve nem-targetáló siRNS-sel kezelt sejtek esetében (51.B ábra).



51. ábra A PP2A B55 $\alpha$  hiányának további hatása a 3D szferoid struktúrákra - A. A szferoidok szétesését (%) a leszakadt sejtek vagy sejtcsoportok/a szferoid teljes területe  $\times 100$  képlet alapján számítottuk ki. B. Reprezentatív ábra a leszakadt sejtekről (fehér) és a szferoidok magszerkezetéről. Skála: 500  $\mu$ m

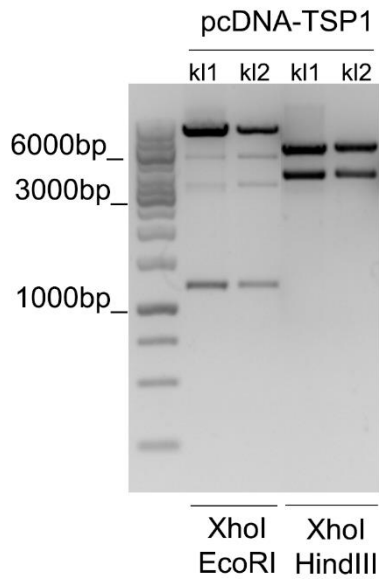
A sejtek érképzési képességét Matrigel 3D mátrix segítségével vizsgáltuk. Kontroll, nem-targetáló és B55 $\alpha$  siRNS-sel kezelt sejteket helyeztünk Matrigellel bevont  $\mu$ -Slide angiogenesis plate-ekbe, majd időközönként készített fényképekkel követtük nyomon a sejtek érképzési folyamatát. A B55 $\alpha$  csendesített sejtek már 3 órával a Matrigel-re helyezést követően érszerű struktúrákat alakítottak ki. Az így kialakult erek hosszát és az elágazások számát összehasonlítottuk a kontroll és a depletált sejtekben. Az eredmények alapján a B55 $\alpha$  regulátor aegység hiányában a sejtek szignifikánsan több elágazási pontot és hosszabb ér szegmensekkel rendelkeztek, mint a kontroll sejtek (52. ábra).



52. ábra A *PP2A B55α* hatása az endotél sejtek érképzési képességére - A nonsiRNS-sel és *B55α* (*PPP2R2A*) siRNS-sel transzfectált sejteket Matrigel bevonatú  $\mu$ -Slide angiogenesis lemezre tettük és követtük a sejtek érképzését. A reprezentatív képek a sejtirakást követően 3 óra elteltével készültek. Skála: 500 $\mu$ m. Az érképzésről készült képeket az ImageJ szoftver *Angiogenesis Analyzer* programjával értékeltük ki. Az érképzés statisztikai elemzését páratlan *t*-teszt próbával végeztük ( $n=3$ , \*\*  $p<0,01$ ; \*\*\*  $p<0,001$ ).

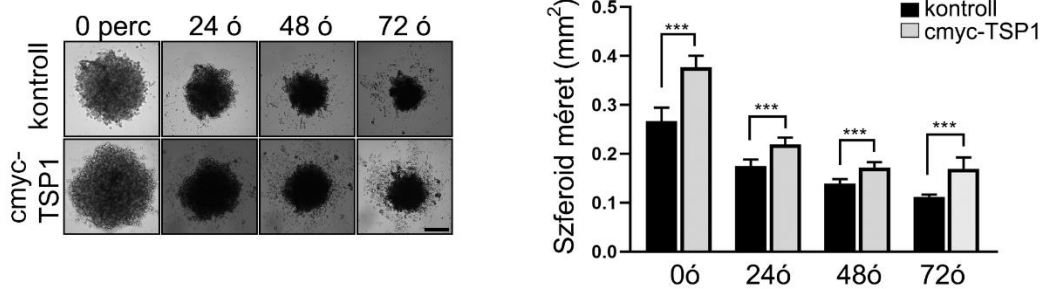
#### 7.2.9. A TSP1 Ser93Asp foszforilációt utánzó mutánsa gátolja az angiogenezist endotél sejtekben

Kísérleteink folytatásához szükség volt a TSP1 emlős expressziójához alkalmas rekombináns vektorra, ezért létrehoztuk a pcDNA3.1 myc-His-TSP1 rekombináns plazmidot, a bakteriális expresszióra alkalmas plazmidok létrehozásánál is alkalmazott fészek primerek felhasználásával. A primerekkel amplifikált, majd gélből visszanyert 4017bp hosszúságú terméket templátként használva, újra amplifikáltuk a TSP1 kódoló szekvenciáját olyan primerekkel, amelyek tartalmazzák a klónozáshoz szükséges hasítóhelyeket az emlős expresszióra alkalmas pcDNA3.1 myc-His A (-) vektorba. A ligálás és JM109 *E.coli* sejtekbe történő transzformálás és tisztítás után a rekombináns plazmidokat restriktív emésztésekkel ellenőriztük (53. ábra).



53. ábra A *pcDNA3.1 myc-His-TSP1* plazmid létrehozása - Tisztítást, ligálást és transzformálást követően a két darab *pcDNA-TSP1* klón ellenőrzéséhez restriktív emésztést alkalmaztunk. Az *XhoI+EcoRI* enzimekkel történő emésztésnél a klónok a vártak megfelelően 1193bp-nál, illetve 7813bp-nál adtak sávot. Továbbá *XhoI+HindIII* enzimek esetében a plazmidot 5500bp, míg az inzertet 3513bp méretnél detektáltuk.

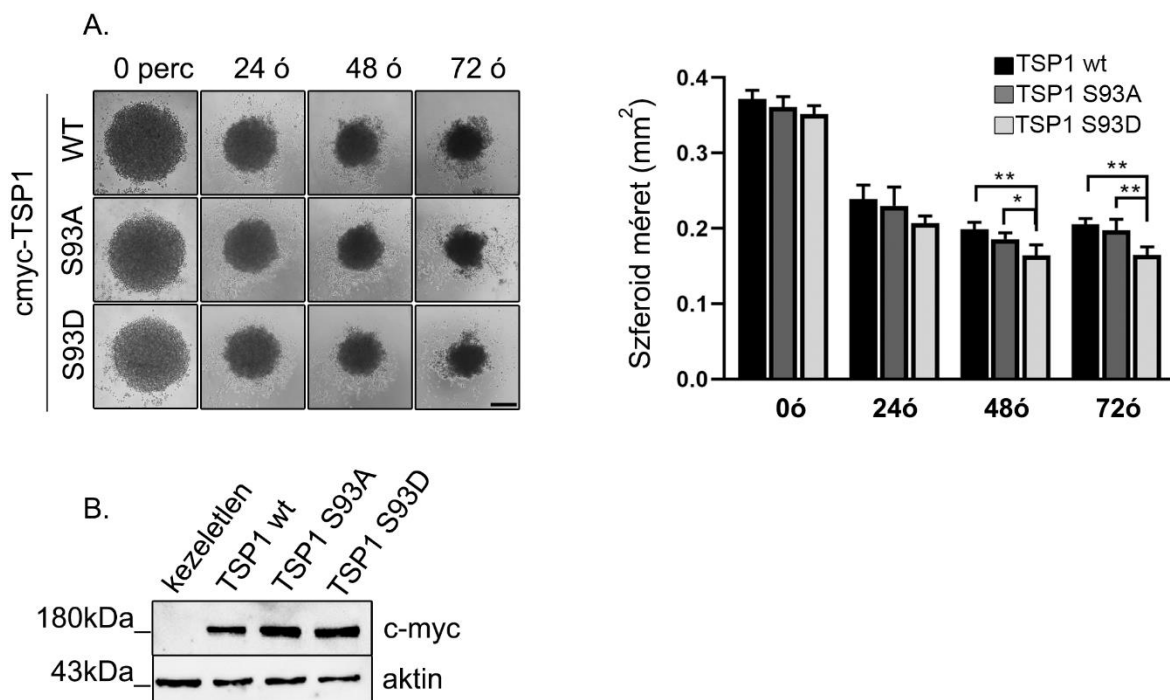
A következőkben a TSP1 fehérje overexpressziójának hatását vizsgáltuk a sejtek szferoid formáló képességére. Az endotél sejteket *pcDNA3.1 myc-His-TSP1* plazmiddal transzfektáltuk, majd a transzfekció után 24 órával megkezdtük a sejtek szferoid képzését a fentebb leírt módon. A kapott eredmények azt mutatták, hogy a c-myc címkével ellátott TSP1 fehérjét overexpresszáló sejtek már a kiindulási időpontban (0 perc) nagyobb méretű szferoidokat képeztek, mint a kontroll sejtek, annak ellenére, hogy minden mintához azonos számú sejtet használtunk fel (54. ábra). Ez a méretkülönbség 72 órán keresztül fennmaradt.



54. ábra **A TSP1 overexpressziója növeli a szferoidok méretét** - Lipofectamine kontroll és pcDNA3.1myc-His A TSP1 transzfektált sejtekhez NanoShuttle-PL mágneses gyöngyöket adtunk és egy éjszakán át inkubáltuk. A kialakult szferoidokat fotózással követtük nyomon. Méretüket ImageJ szoftver segítségével értékeltük ki. A statisztikai analízist ANOVA Tukey-teszt használatával végeztük el ( $n=3$ , \*\*  $p<0,01$ ; \*\*\*  $p<0,001$ ).

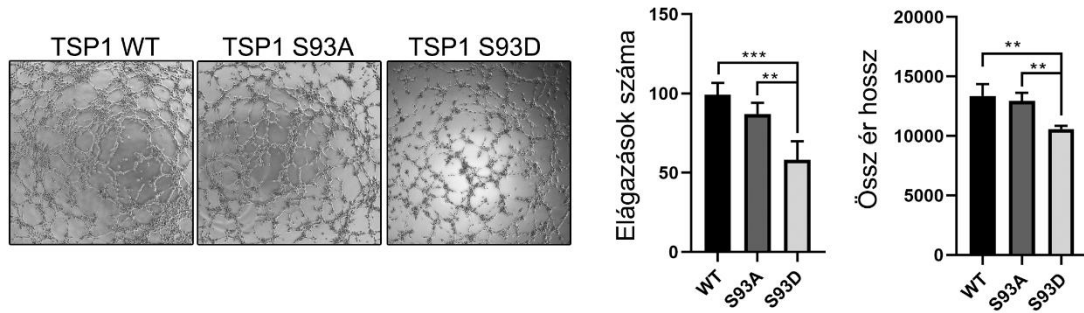
Ezt követően pontmutációval foszforilációt utánzó (Ser93Asp) és foszfonull (Ser93Ala) teljes hosszúságú TSP1 konstruktokat hoztunk létre, mely során a teljes hosszúságú pcDNA3.1myc-His A-TSP1 plazmidot használtuk templátként. A pontmutációk sikerességét szekvenáltatással ellenőriztük.

A sejteket transzfektáltuk a pcDNA3.1 myc-His-TSP1 WT, Ser93Ala és Ser93Asp plazmidokkal. Ezt követően megvizsgáltuk a TSP1 foszforilációs állapotának lehetséges hatását a sejtek szferoidformáló képességére. A különböző TSP1 formákat overexpresszáló sejteket mágneses gyöngyökkel kezeltük és a képződött szferoidokat különböző időpontokban készített felvételekkel követtük nyomon (55.A ábra). A transzfekció sikerességét Western blottal ellenőriztük, c-myc és aktin specifikus antitestek felhasználásával (55.B ábra). Eredményeink szerint a foszforilációt utánzó TSP1 Ser93Asp-t expresszáló sejtek kisebb, de kompaktabb szferoidokat képeztek a 48 és 72 órás időpontokra, összehasonlítva a vad típusú vagy a foszfonull TSP1 formát expresszáló sejtekkel.



55. ábra **A TSP1 fehérje foszforilációs állapota hatással van a sejtek szferoid formálási képességére** - A. BPAEC sejteket pcDNA-TSP1 WT; Ser93Ala és Ser93Asp plazmidokkal transzfektáltuk. A kialakult szferoidok méretét megadott időpontokban készült felvételekkel követtük nyomon. A szferoidok méretének kiértékelése ANOVA Tukey-teszt segítségével történt ( $n=3$ , \*  $p<0,05$ ; \*\*  $p<0,01$ ). B. A szferoidképzéshez használt sejtek ellenőrzése Western blot analízissel.

Megvizsgáltuk továbbá a TSP1 foszfoformák hatásait az EC-k érkezői képességére is. A sejteket a TSP1 vad típusú és különböző foszfoformákat tartalmazó plazmidokkal transzfektáltuk, majd Matrigelre helyeztük (56. ábra). A foszforilációt utánzó TSP1 Ser93Asp fehérjét overexpresszáló sejtek által létrehozott kapillaris hálózatban szignifikánsan kevesebb volt az elágazások száma, valamint az erek hossza, mint a vad típusú, vagy a foszfonull formákat expresszáló sejteké. Eredményeink arra utalnak, hogy a PKC foszforilációs hely módosítása, így feltételezhetően a TSP1 PKC foszforilációja is, szabályozza az EC-k angiogenikus tulajdonságait.



56. ábra Az endotél sejtek érképzési képességét befolyásolja a TSP1 foszforilációs állapota - pcDNA-TSP1 WT, Ser93Ala és Ser93Asp transzfektált sejteket Matrigel bevonatú  $\mu$ -Slide angiogenesis plate-be tettük. A reprezentatív képek a kitevést követően 5 órával készültek. A sejtek érképző képesség szignifikáns változásait ANOVA Tukey-teszttel elemeztük ( $n=3$ , \*\*  $p<0,01$ ; \*\*\*  $p<0,001$ ). Skála:  $500\mu\text{m}$ .

## 8. Megbeszélés

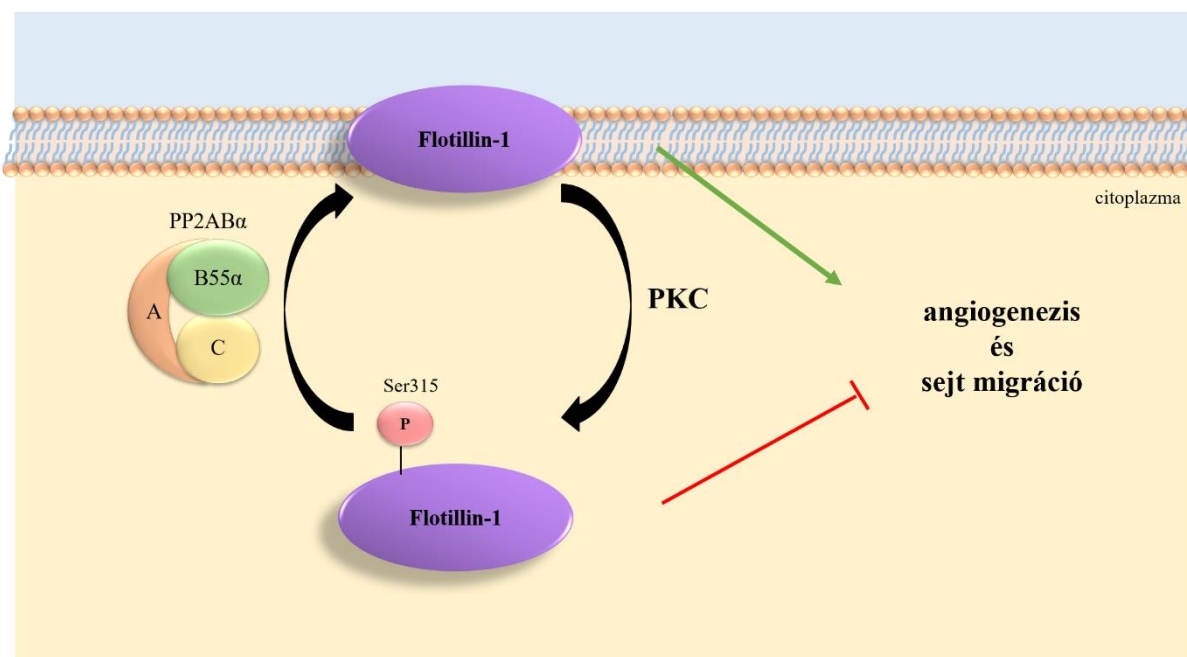
A fehérjék Ser,Thr vagy Tyr oldalláncon történő foszforilációja az egyik legfontosabb és leggyakrabban előforduló poszttranszlációs módosítás, amelyet a protein kinázok és protein foszfatázok összehangolt működése tesz reverzibilissé [125]. A foszforiláció megváltoztathatja a fehérje konformációját, szabályozza annak funkcióját, lokalizációját, enzimaktivitást és a molekuláris kölcsönhatásokat [126].

Az emlősökben a PP1 mellett a PP2A az egyik legfontosabb intracelluláris protein foszfatáz, amelynek szerepe folyamatosan bővül az újonnan azonosított szubsztrát fehérjék révén. Ezek a felfedezések egyre több, korábban nem ismert sejtfolyamatban világítanak rá ennek az enzimnek a jelentőségére, kiegészítve az eddig ismert funkciót [127]. A PP2A holoenzim szerkezetében a regulátor „B” alegység az, amely célzó modulátorként működik, biztosítva a szubsztrátspecifitást és szubcelluláris lokalizációt [59,128].

Munkacsoportunk korábban kimutatta, hogy a PP2A B55 $\alpha$  regulátor alegységet tartalmazó holoenzim szabályozza a BPAEC-k barrier funkcióját a citoskeletális és a sejt kapcsolatok fehérjéinek foszforilációján keresztül [129-131]. A PP2A további szerepének feltárása érdekében a rekombináns B55 $\alpha$  alegység felhasználásával, új kölcsönható partnereket, esetleges szubsztrát fehérjéket kerestünk az EC-kben. Kísérleteink során egy 47 kDa molekulaméretű fehérjét, a flotillin-1 (reggie-2) fehérjét azonosítottuk. A flotillin fehérjecsalád két tagja, a flotillin-1 és a flotillin-2, 90%-os hasonlóságot mutat és a legtöbb sejtípusban jelen van [72-74]. A flotillin-1 szerepét kimutatták már a sejt adhézióban [132, 133] és a jelátviteli folyamatokban is [134], mely összhangban áll korábbi eredményeinkkel a PP2A szerepéről az endotél sejt kapcsolatokban. A PP2A holoenzim és a flotillin-1 fehérjék közti kölcsönhatást számos módszerrel igazoltuk, többek között pull down kísérlettel, immunprecipitációval, PLA-val és NanoBit rendszerrel történő mérésekkel is. Míg a flotillin-1 kölcsönhatásba lépett a PP2A holoenzimmel, addig a flotillin-2 nem, mely tovább igazolta a PP2A és flotillin-1 közötti kölcsönhatás specifikusságát. Bár a flotillineket membrán asszociált fehérjéknek tartják [135, 136], a sejten belüli eloszlásuk nagyban függ a sejt típusától és állapotától [75, 90, 137]. Az EC-kben a flotillin-1 fehérjét a sejtek citoplazmájában detektáltuk. Azonban, a PP2A vagy a PKC gátlása, vagy a PKC enzim aktiválásának hatására a flotillin-1 fehérje sejten belüli lokalizációja megváltozott, mely a flotillin-1 foszforiláció függő szabályozására utalt. Igazoltunk, hogy a PKC a flotillin-1 Ser<sup>315</sup> oldalláncát foszforilálja, melynek megfelelő homológ hely nem található meg a flotillin-2 fehérjében. A PP2A B55 $\alpha$  és a flotillin-1 fehérjék

közi kölcsönhatás PKC aktiválás hatására megerősödött, valamint a flotillin-1 Ser315Asp foszfomutáns nagyobb mértékben kötötte a B55 $\alpha$  regulátor alegységet. A lokalizációs vizsgálatok eredményei szerint csak a foszfonull Ser315Ala flotillin-1 forma jelenik meg a sejtmembránban, mellyel összhangban a PKC aktivitásának gátlására a vad típusú flotillin-1 fehérje is a membránba transzlokálódott. Több PP2A szubsztrát esetében is ismert a foszforiláció függő lokalizáció változás, például a hiszton-deacetiláz [138], valamint a KSR (kinase suppressor of Ras), vagy Raf-1 fehérjéknél [139]. Korábban HEK293 sejtek felhasználásával kimutatták, hogy a PKC a Ser<sup>315</sup> oldalláncon foszforilálja a flotillin-1 fehérjét [121], melyet az EC-kben is igazoltunk. NanoBit rendszer felhasználásával a flotillin-1 és a PP2A B55 $\alpha$  fehérjék közötti kölcsönhatást dinamikáját is leírtuk. Az EC-k megfelelő barrier funkciója és az érképző képességük jelentős mértékben függ a sejtek migrációjától, adhéziójától, valamint az EC-k közötti kapcsolatoktól. A PP2A B55 $\alpha$  jelenléte kifejezetten szükséges volt az EC-k angiogenikus tulajdonságaihoz, elősegítve a kialakult érhálózatok stabilitásának fenntartását [140]. A PKC aktiválása ezzel szemben részképződést és ezzel az EC-k csökkent adhézióját okozta [141]. Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a flotillin-1 elősegíti az endotél barrier kialakítását, valamint szerepet játszik az angiogenezisben. Ezen hatások a flotillin-1 PKC - PP2A B55 $\alpha$  általi Ser<sup>315</sup> oldallánc foszforilációján keresztül szabályozottak (57. ábra).

A flotillin-PP2A közti kölcsönhatás további lehetséges jelátviteli következménye a szfingozin-1-foszfáthoz (S1P) köthető. A PP2A „C” katalitikus alegysége deaktiválja a szfingozin kináz 1-et, ezáltal a szfingozin nem alakul át S1P-tá, azonban a releváns PP2A holoenzim formát még nem azonosították [142]. A flotillinek egyik alapvető szerepe a szfingozinek membránba történő visszaszorítása a S1P szintjének fenntartása érdekében [143]. Feltételezhetően a PP2A különböző formái együttesen irányítják a flotillin és a szfingozin kináz foszforilációs szintjét, ennek következtében a S1P koncentrációját a sejtekben, mely szabályozza az EC-k fiziológiai tulajdonságait, mint például az ér permeabilitását, gyulladást és az angiogenezist [144].



57. ábra **A flotillin-1 fehérje foszforilációs szabályozása** – A flotillin-1 fehérjét a PKC enzim foszforilálja a Ser<sup>315</sup> oldalláncon, melynek következtében a foszforilált fehérje a citoplazmába transzlokálódik. A fehérje defoszforilációjáért a PP2A B55 α a felelős, defoszforilációt követően a flotillin-1 visszajut a sejtmembránba ahol elősegíti az angienezist, illetve a sejt migrációt.

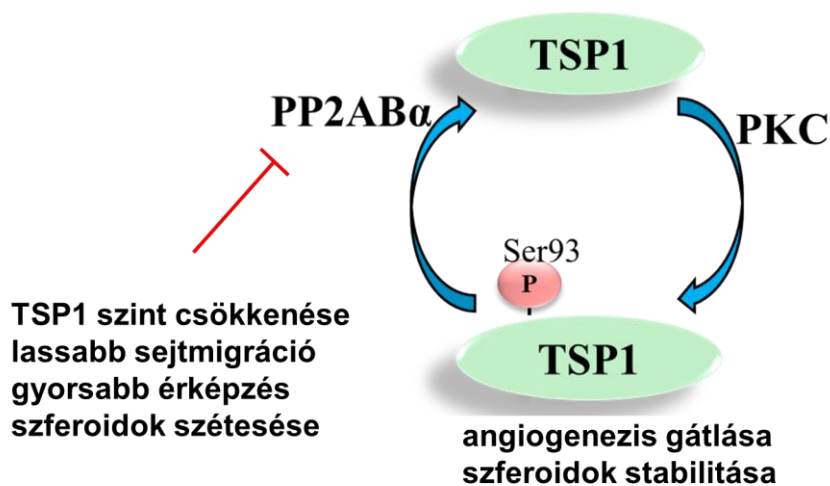
Az angiogenesis egy finoman szabályozott folyamat, amelyet a pro- és anti-angiogén jelek egyensúlya irányít. A Ser/Thr-specifikus foszfatázok számos jelátviteli útvonalban játszanak szerepet, amelyek meghatározzák az EC-k működését, migrációját, szaporodását és az érképződést - ez utóbbi az angiogenesis alapvető folyamata. Korábbi kutatások kimutatták, hogy a PP2A foszfatáz szubsztrát fehérjéi többek között az Akt [145] és az endoteliális nitrogén-monoxid-szintáz (eNOS) is [146, 147], amelyek kulcsszereplői az angiogén jelátvitelnek. Emellett a PP2A a VEGF-útvonal szabályozásában is részt vesz [148]. A PP2A foszfatáz szerepét számos tanulmány vizsgálja tumorszuppresszorként, hogy jobban megértsék jelentőségét a daganatok biológiájában. Az angiogenesis mértéket ugyanis gyakran használják diagnosztikai és prognosztikai markerként a tumorok esetében [149]. A daganatok oxigén- és tápanyagellátása szempontjából elengedhetetlen az új érhálózat kialakulása, amely elősegíti a tumor növekedését és progresszióját. Kutatásunk célja a PP2A B55α holoenzim további szerepének feltárása volt az angiogénikus útvonalakban. Az angiogenesishez kapcsolódó fehérjéket Proteome Profiler Angiogenesis Array alkalmazásával vizsgáltuk, amely során megállapítottuk, hogy a TSP1 fehérje szintje szignifikánsan csökkent a B55α regulátor alegység depléciójának hatására. A TSP1 egy kiemelkedően fontos angiogenesis-szabályozó fehérje, amely számos fiziológias és kóros folyamatban sokrétű szerepet tölt be, jelentős hatást

gyakorolva az érképződés mechanizmusaira [150]. A TSP1 egy olyan fehérje, amely mind pro, mind antiangiogén hatásokkal rendelkezik. Az EC-kel való kölcsönhatása során képes gátolni az angiogenezist, mivel visszafogja ezeknek a sejteknek a migrációját és proliferációját [151-153]. Másrészt a TSP1 képes közvetett módon elősegíteni az angiogenezist azáltal, hogy modulálja más növekedési faktorok aktivitását és jelátviteli útvonalait [154-156]. A TSP1 poszttranszlációs módosításai között megtalálható a glikoziláció és a diszulfid-hidak kialakulása, amelyek hozzájárulnak a fehérje szerkezeti és funkcionális sokféleségéhez [114, 157, 158]. Munkánk során kimutattuk, hogy közvetlen kölcsönhatás áll fenn a TSP1 és a PP2A között. Mivel a foszfatázok alapvető szerepet játszanak a kinázok aktivitásának ellensúlyozásában, vizsgálataink arra is kiterjedtek, hogy a kinázok hatása hogyan befolyásolja a TSP1-t. Kimutattuk, hogy a PKC aktivitásának serkentése vagy gátlása szignifikánsan megváltoztatta a TSP1 szintjét, ami alátámasztja a PKC szerepét a TSP1 szabályozásában. Immunprecipitációs kísérleteink igazolták, hogy a TSP1 szerin oldallánc(ok)on foszforilálódik a PKC által. Foszforilációs predikciós szoftverrel több potenciális foszforilációs helyet azonosítottunk a TSP1 fehérjén, majd *in vitro* kísérletekkel megerősítettük, hogy a PKC a TSP1 N-terminális doménjének 93-as szerin oldalláncát foszforilálja.

A TSP1 N-terminális doménje képes kötődni sejtfelszíni receptorokhoz, például a CD36-hoz [159]. A CD36 kötődése a TSP1 1. típusú TSR ismétlődéséhez anti-angiogén jeleket indít el, amelyek az EC-k apoptózisához vezetnek [160, 161]. Ezenkívül a TSP1 N-terminális doménje integrinokkal is kölcsönhatásba léphet, ezáltal befolyásolva a sejtek adhézióját és migrációját [109]. Az integrin-mediált jelátvitel kulcsfontosságú az angiogenezis, a sebgyógyulás és a szöveti átalakulás szempontjából. A TSP1 N-terminális doménje azonban érzékeny a MMP-k proteolitikus hasítására [162]. Ezek a hasítások kisebb fragmentumok létrejöttéhez vezetnek, amelyek funkciója jelentősen eltérhet a teljes hosszúságú TSP1 molekuláétól. A TSP1 expresszióját számos tényező szabályozza, és a különböző élettani és kóros körülmények között zajló jelek összetett kölcsönhatása befolyásolja. Például hipoxiás környezetben a TSP1 expressziója megnövekedhet, miközben a TGF $\beta$  aktivitásának szabályozásában is részt vesz [163]. Kutatásunk eredményei azt mutatták, hogy a PP2A B55 $\alpha$  regulátor alegység hiánya EC-kben a TSP1 mRNS- és fehérjeszintjének csökkenését okozza. A B55 $\alpha$  depléciónak lassabb sebzarórást okozott és a sejtek megváltozott érszerű struktúrákat alakítottak ki, ami a PP2A B55 $\alpha$  jelentős szerepét hangsúlyozza az érhálózat stabilitásában. Ez alátámasztja azt, hogy a regulátor B alegység disszociációja a PP2A AC dimerjéről a PP2A inaktiválásához vezet, illetve elősegíti a sejtmigrációt és az angiogenezist [164]. A szferoidképződési kísérletek azt mutatták, hogy B55 $\alpha$  hiányában a szferoidok fokozott szétesést

mutattak a kontrollhoz képest. Ez a sejt-sejt kölcsönhatások destabilizálódására utalhat. Korábbi kutatások alátámasztják, hogy a B55 $\alpha$ -hiányos EC-k kezdetben stabilnak tűnő hálózatokat hoznak létre, amelyek azonban gyorsan instabillá válnak és összeomlanak [140]. Eredményeink a PP2A komplex szerepére utalnak, amely számos szubsztrátján keresztül befolyásolja az angiogenezist; azonban annak érdekében, hogy specifikusan vizsgálhassuk a TSP1 defoszforilációját, foszfo-TSP1 mutánsokat alkalmaztunk. A TSP1 Ser93Asp overexpresszáló sejtek kisebb és kompaktabb szferoidokat képeztek, valamint ezen sejtek gyenge kapilláris képződést mutattak, mely egy jobb angiogenezis gátló hatáshoz vezet. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a PKC által közvetített foszforiláció jelentősen befolyásolja a TSP1 funkcióját az angiogenezis szabályozásában (58. ábra).

Bár a TSP1 fehérjét főként extracelluláris szerepe miatt ismerték fel, egyre több bizonyíték utal arra, hogy intracellulárisan is fontos funkciókat tölt be, és közvetlenül befolyásolja a sejtek működését [150]. A TSP1 antiangiogén hatásai ígéretes célpontot jelentenek a rákterápiában, mivel az angiogenezis gátlásával csökkenthető a tumor vérellátása, ami akadályozza annak növekedését és metasztázisát.



58. ábra A **TSP1 reverzibilis foszforilációjának hatása** - A TSP1 fehérje Ser<sup>93</sup> oldalláncának foszforilációs szintjét a PKC és PP2A B55 $\alpha$  szabályozza. A PP2A B55 $\alpha$  alegység hiánya csökkenti a TSP1 fehérje és mRNS szintjét az endotél sejtekben. A foszforilációt utánzó Ser93Asp TSP1 fehérjét overexpresszáló sejteknél csökkent érékezés és kompaktabb szferoid formákat írtunk le, mely alapján a foszforilált TSP1 hatásosabb angiogenezis gátlónak tekinthető.

## 9. 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.

## 10. Summary

Endothelial cells perform numerous functions by forming a semipermeable monolayer (endothelium) that separates blood circulation from surrounding tissues. The phosphorylation and dephosphorylation of proteins are essential mechanisms in the organization of endothelial cells into blood vessels and the regulation of barrier function. Understanding the functions of endothelial cells and their molecular mechanisms in greater detail is critical for studying vascular diseases and other related conditions.

PP2A is one of the most significant Ser/Thr-specific protein phosphatases, with a wide range of functions due to its structure. Through its B55 $\alpha$  regulatory subunit, PP2A participates in the establishment and maintenance of barrier function, as well as in the regulation of angiogenesis. In our research, we identified flotillin-1 as a novel interacting partner of PP2A B55 $\alpha$ . We found that the interaction between these two proteins is phosphorylation-dependent and significantly influenced by the activity of the PKC enzyme. Furthermore, we demonstrated that the phosphorylation and dephosphorylation of flotillin-1 affect its intracellular localization, which plays a key role in the formation and maintenance of the endothelial barrier.

Our work also revealed that PP2A B55 $\alpha$  is critically important in the process of angiogenesis. Its absence led to the instability of vascular-like structures formed by endothelial cells, as supported by our 3D extracellular matrix experiments. We observed that the depletion of B55 $\alpha$  resulted in a significant reduction in the levels of TSP1 protein, which further contributed to the loss of vascular stability. Additionally, we showed that the absence of B55 $\alpha$  adversely affected wound healing and the maintenance of 3D cellular structures.

Our findings highlight the complex regulatory network of endothelial cells and emphasize the role of PP2A B55 $\alpha$  in maintaining vascular stability and regeneration. These insights may contribute to the development of new therapeutic strategies for the treatment of vascular diseases. By improving our understanding of the regulatory mechanisms affecting endothelial cell function, we can explore innovative drug development targeting vascular stability and regeneration. Moreover, uncovering new pathways can enhance the diagnostics of vascular diseases, enabling earlier interventions and improving patient outcomes.

## 11. Irodalomjegyzék

### 11.1. A PhD értekezésben hivatkozott közlemények listája

1. Wolinsky, H., *A proposal linking clearance of circulating lipoproteins to tissue metabolic activity as a basis for understanding atherogenesis*. Circ Res, 1980. **47**(3): p. 301-11.
2. Pries, A.R., T.W. Secomb, and P. Gaehtgens, *The endothelial surface layer*. Pflugers Arch, 2000. **440**(5): p. 653-66.
3. Schnittler, H.J., *Structural and functional aspects of intercellular junctions in vascular endothelium*. Basic Res Cardiol, 1998. **93 Suppl 3**: p. 30-9.
4. Dejana, E., M. Corada, and M.G. Lampugnani, *Endothelial cell-to-cell junctions*. FASEB J, 1995. **9**(10): p. 910-8.
5. 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.
6. Kumar, S., D.C. West, and A. Ager, *Heterogeneity in endothelial cells from large vessels and microvessels*. Differentiation, 1987. **36**(1): p. 57-70.
7. Augustin, H.G., D.H. Kozian, and R.C. Johnson, *Differentiation of endothelial cells: analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes*. Bioessays, 1994. **16**(12): p. 901-6.
8. 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.
9. Dudek, S.M. and J.G.N. Garcia, *Cytoskeletal regulation of pulmonary vascular permeability*. Journal of Applied Physiology, 2001. **91**(4): p. 1487-1500.
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. Sumpio, B.E., J.T. Riley, and A. Dardik, *Cells in focus: endothelial cell*. Int J Biochem Cell Biol, 2002. **34**(12): p. 1508-12.
12. Risau, W., *Mechanisms of angiogenesis*. Nature, 1997. **386**(6626): p. 671-4.
13. Folkman, J., *Fundamental concepts of the angiogenic process*. Curr Mol Med, 2003. **3**(7): p. 643-51.
14. Ribatti, D., *Genetic and epigenetic mechanisms in the early development of the vascular system*. J Anat, 2006. **208**(2): p. 139-52.
15. Sundberg, C., et al., *Glomeruloid microvascular proliferation follows adenoviral vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor-164 gene delivery*. Am J Pathol, 2001. **158**(3): p. 1145-60.
16. Folkman, J. and Y. Shing, *Angiogenesis*. J Biol Chem, 1992. **267**(16): p. 10931-4.
17. Otrrock, Z.K., et al., *Understanding the biology of angiogenesis: review of the most important molecular mechanisms*. Blood Cells Mol Dis, 2007. **39**(2): p. 212-20.
18. Rini, B.I. and E.J. Small, *Biology and clinical development of vascular endothelial growth factor-targeted therapy in renal cell carcinoma*. J Clin Oncol, 2005. **23**(5): p. 1028-43.
19. Pepper, M.S., et al., *Vascular endothelial growth factor (VEGF)-C synergizes with basic fibroblast growth factor and VEGF in the induction of angiogenesis in vitro and alters endothelial cell extracellular proteolytic activity*. J Cell Physiol, 1998. **177**(3): p. 439-52.
20. Marconcini, L., et al., *c-fos-induced growth factor/vascular endothelial growth factor D induces angiogenesis in vivo and in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(17): p. 9671-6.
21. Cao, Y., et al., *Vascular endothelial growth factor C induces angiogenesis in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(24): p. 14389-94.
22. Meyer, M., et al., *A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases*. EMBO J, 1999. **18**(2): p. 363-74.

23. Yancopoulos, G.D., M. Klagsbrun, and J. Folkman, *Vasculogenesis, angiogenesis, and growth factors: ephrins enter the fray at the border*. Cell, 1998. **93**(5): p. 661-4.
24. Puri, M.C., et al., *The receptor tyrosine kinase TIE is required for integrity and survival of vascular endothelial cells*. EMBO J, 1995. **14**(23): p. 5884-91.
25. Carmeliet, P., *Angiogenesis in health and disease*. Nat Med, 2003. **9**(6): p. 653-60.
26. Thomas, K.A., *Fibroblast growth factors*. FASEB J, 1987. **1**(6): p. 434-40.
27. Terranova, V.P., et al., *Human endothelial cells are chemotactic to endothelial cell growth factor and heparin*. J Cell Biol, 1985. **101**(6): p. 2330-4.
28. Millauer, B., et al., *High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis*. Cell, 1993. **72**(6): p. 835-46.
29. Gospodarowicz, D., J.A. Abraham, and J. Schilling, *Isolation and characterization of a vascular endothelial cell mitogen produced by pituitary-derived folliculo stellate cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(19): p. 7311-5.
30. Ivan, M., et al., *HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O2 sensing*. Science, 2001. **292**(5516): p. 464-8.
31. Aragones, J., et al., *Oxygen sensors at the crossroad of metabolism*. Cell Metab, 2009. **9**(1): p. 11-22.
32. Long, Y.C. and J.R. Zierath, *AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation*. J Clin Invest, 2006. **116**(7): p. 1776-83.
33. Ouchi, N., R. Shibata, and K. Walsh, *AMP-activated protein kinase signaling stimulates VEGF expression and angiogenesis in skeletal muscle*. Circ Res, 2005. **96**(8): p. 838-46.
34. Szade, A., et al., *Cellular and molecular mechanisms of inflammation-induced angiogenesis*. IUBMB Life, 2015. **67**(3): p. 145-59.
35. Muller, W.A., *Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response*. Trends Immunol, 2003. **24**(6): p. 327-34.
36. Baeriswyl, V. and G. Christofori, *The angiogenic switch in carcinogenesis*. Semin Cancer Biol, 2009. **19**(5): p. 329-37.
37. Jackson, J.R., et al., *The codependence of angiogenesis and chronic inflammation*. FASEB J, 1997. **11**(6): p. 457-65.
38. Barford, D., *Protein phosphatases*. Curr Opin Struct Biol, 1995. **5**(6): p. 728-34.
39. Mumby, M.C. and G. Walter, *Protein serine/threonine phosphatases: structure, regulation, and functions in cell growth*. Physiol Rev, 1993. **73**(4): p. 673-99.
40. Barford, D., *Molecular mechanisms of the protein serine/threonine phosphatases*. Trends Biochem Sci, 1996. **21**(11): p. 407-12.
41. Shi, Y., *Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure*. Cell, 2009. **139**(3): p. 468-84.
42. Olsen, J.V., et al., *Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks*. Cell, 2006. **127**(3): p. 635-48.
43. Hunter, T. and B.M. Sefton, *Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. **77**(3): p. 1311-5.
44. Cohen, P., *The structure and regulation of protein phosphatases*. Annu Rev Biochem, 1989. **58**: p. 453-508.
45. Sun, H. and Y. Wang, *Novel Ser/Thr protein phosphatases in cell death regulation*. Physiology (Bethesda), 2012. **27**(1): p. 43-52.
46. Andreeva, A.V. and M.A. Kutuzov, *PPP family of protein Ser/Thr phosphatases: two distinct branches?* Mol Biol Evol, 2001. **18**(3): p. 448-52.
47. Kamada, R., et al., *Metal-dependent Ser/Thr protein phosphatase PPM family: Evolution, structures, diseases and inhibitors*. Pharmacol Ther, 2020. **215**: p. 107622.
48. Moorhead, G.B., et al., *Evolution of protein phosphatases in plants and animals*. Biochem J, 2009. **417**(2): p. 401-9.
49. Kamenski, T., et al., *Structure and mechanism of RNA polymerase II CTD phosphatases*. Mol Cell, 2004. **15**(3): p. 399-407.
50. Hemmings, B.A., et al., *alpha- and beta-forms of the 65-kDa subunit of protein phosphatase 2A have a similar 39 amino acid repeating structure*. Biochemistry, 1990. **29**(13): p. 3166-73.

51. Zhou, J., et al., *Characterization of the Aalpha and Abeta subunit isoforms of protein phosphatase 2A: differences in expression, subunit interaction, and evolution.* Biochem J, 2003. **369**(Pt 2): p. 387-98.
52. Bosch, M., et al., *The PR55 and PR65 subunits of protein phosphatase 2A from Xenopus laevis. molecular cloning and developmental regulation of expression.* Eur J Biochem, 1995. **230**(3): p. 1037-45.
53. Hendrix, P., et al., *Analysis of subunit isoforms in protein phosphatase 2A holoenzymes from rabbit and Xenopus.* J Biol Chem, 1993. **268**(10): p. 7330-7.
54. Seshacharyulu, P., et al., *Phosphatase: PP2A structural importance, regulation and its aberrant expression in cancer.* Cancer Lett, 2013. **335**(1): p. 9-18.
55. Groves, M.R., et al., *The structure of the protein phosphatase 2A PR65/A subunit reveals the conformation of its 15 tandemly repeated HEAT motifs.* Cell, 1999. **96**(1): p. 99-110.
56. Stone, S.R., J. Hofsteenge, and B.A. Hemmings, *Molecular cloning of cDNAs encoding two isoforms of the catalytic subunit of protein phosphatase 2A.* Biochemistry, 1987. **26**(23): p. 7215-20.
57. Zhou, J., H.T. Pham, and G. Walter, *The formation and activity of PP2A holoenzymes do not depend on the isoform of the catalytic subunit.* J Biol Chem, 2003. **278**(10): p. 8617-22.
58. Mayer, R.E., et al., *Structure of the 55-kDa regulatory subunit of protein phosphatase 2A: evidence for a neuronal-specific isoform.* Biochemistry, 1991. **30**(15): p. 3589-97.
59. Zolnierowicz, S., et al., *Diversity in the regulatory B-subunits of protein phosphatase 2A: identification of a novel isoform highly expressed in brain.* Biochemistry, 1994. **33**(39): p. 11858-67.
60. Janssens, V., S. Longin, and J. Goris, *PP2A holoenzyme assembly: in cauda venenum (the sting is in the tail).* Trends Biochem Sci, 2008. **33**(3): p. 113-21.
61. Tung, H.Y., et al., *The protein phosphatases involved in cellular regulation. Influence of polyamines on the activities of protein phosphatase-1 and protein phosphatase-2A.* Eur J Biochem, 1985. **149**(2): p. 305-13.
62. Alberts, A.S., et al., *Regulation of cell cycle progression and nuclear affinity of the retinoblastoma protein by protein phosphatases.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(2): p. 388-92.
63. Glenn, G.M. and W. Eckhart, *Mutation of a cysteine residue in polyomavirus middle T antigen abolishes interactions with protein phosphatase 2A, pp60c-src, and phosphatidylinositol-3 kinase, activation of c-fos expression, and cellular transformation.* J Virol, 1993. **67**(4): p. 1945-52.
64. Ronne, H., et al., *Protein phosphatase 2A in Saccharomyces cerevisiae: effects on cell growth and bud morphogenesis.* Mol Cell Biol, 1991. **11**(10): p. 4876-84.
65. Schonthal, A.H., *Role of serine/threonine protein phosphatase 2A in cancer.* Cancer Lett, 2001. **170**(1): p. 1-13.
66. Lechward, K., et al., *Protein phosphatase 2A: variety of forms and diversity of functions.* Acta Biochim Pol, 2001. **48**(4): p. 921-33.
67. Lee, T.H., et al., *INH, a negative regulator of MPF, is a form of protein phosphatase 2A.* Cell, 1991. **64**(2): p. 415-23.
68. Westermarck, J. and W.C. Hahn, *Multiple pathways regulated by the tumor suppressor PP2A in transformation.* Trends Mol Med, 2008. **14**(4): p. 152-60.
69. Nusslein-Volhard, C. and E. Wieschaus, *Mutations affecting segment number and polarity in Drosophila.* Nature, 1980. **287**(5785): p. 795-801.
70. Gotz, J., et al., *Distinct role of protein phosphatase 2A subunit Calpha in the regulation of E-cadherin and beta-catenin during development.* Mech Dev, 2000. **93**(1-2): p. 83-93.
71. Rivera-Milla, E., C.A. Stuermer, and E. Malaga-Trillo, *Ancient origin of reggie (flotillin), reggie-like, and other lipid-raft proteins: convergent evolution of the SPFH domain.* Cell Mol Life Sci, 2006. **63**(3): p. 343-57.
72. Bickel, P.E., et al., *Flotillin and epidermal surface antigen define a new family of caveolae-associated integral membrane proteins.* J Biol Chem, 1997. **272**(21): p. 13793-802.
73. Volonte, D., et al., *Flotillins/cavatellins are differentially expressed in cells and tissues and form a hetero-oligomeric complex with caveolins in vivo. Characterization and epitope-*

- mapping of a novel flotillin-1 monoclonal antibody probe.* J Biol Chem, 1999. **274**(18): p. 12702-9.
74. von Philipsborn, A.C., et al., *Restricted expression of reggie genes and proteins during early zebrafish development.* J Comp Neurol, 2005. **482**(3): p. 257-72.
  75. Browman, D.T., M.B. Hoegg, and S.M. Robbins, *The SPFH domain-containing proteins: more than lipid raft markers.* Trends Cell Biol, 2007. **17**(8): p. 394-402.
  76. Liu, J., et al., *The stomatin/prohibitin/flotillin/HflK/C domain of flotillin-1 contains distinct sequences that direct plasma membrane localization and protein interactions in 3T3-L1 adipocytes.* J Biol Chem, 2005. **280**(16): p. 16125-34.
  77. Solis, G.P., et al., *Reggie/flotillin proteins are organized into stable tetramers in membrane microdomains.* Biochem J, 2007. **403**(2): p. 313-22.
  78. Rajendran, L., et al., *Asymmetric localization of flotillins/reggies in preassembled platforms confers inherent polarity to hematopoietic cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(14): p. 8241-6.
  79. Edgar, A.J. and J.M. Polak, *Flotillin-1: gene structure: cDNA cloning from human lung and the identification of alternative polyadenylation signals.* Int J Biochem Cell Biol, 2001. **33**(1): p. 53-64.
  80. Salzer, U. and R. Prohaska, *Stomatin, flotillin-1, and flotillin-2 are major integral proteins of erythrocyte lipid rafts.* Blood, 2001. **97**(4): p. 1141-3.
  81. Babuke, T. and R. Tikkanen, *Dissecting the molecular function of reggie/flotillin proteins.* Eur J Cell Biol, 2007. **86**(9): p. 525-32.
  82. Santamaria, A., et al., *PTOV-1, a novel protein overexpressed in prostate cancer, shuttles between the cytoplasm and the nucleus and promotes entry into the S phase of the cell division cycle.* Am J Pathol, 2003. **162**(3): p. 897-905.
  83. Gkantiragas, I., et al., *Sphingomyelin-enriched microdomains at the Golgi complex.* Mol Biol Cell, 2001. **12**(6): p. 1819-33.
  84. de Gassart, A., et al., *Lipid raft-associated protein sorting in exosomes.* Blood, 2003. **102**(13): p. 4336-44.
  85. Schulte, T., et al., *Reggie-1 and reggie-2, two cell surface proteins expressed by retinal ganglion cells during axon regeneration.* Development, 1997. **124**(2): p. 577-87.
  86. Bauer, M. and L. Pelkmans, *A new paradigm for membrane-organizing and -shaping scaffolds.* FEBS Lett, 2006. **580**(23): p. 5559-64.
  87. Neumann-Giesen, C., et al., *Membrane and raft association of reggie-1/flotillin-2: role of myristoylation, palmitoylation and oligomerization and induction of filopodia by overexpression.* Biochem J, 2004. **378**(Pt 2): p. 509-18.
  88. Li, Y., et al., *DHHC5 protein palmitoylates flotillin-2 and is rapidly degraded on induction of neuronal differentiation in cultured cells.* J Biol Chem, 2012. **287**(1): p. 523-530.
  89. Morrow, I.C., et al., *Flotillin-1/reggie-2 traffics to surface raft domains via a novel golgi-independent pathway. Identification of a novel membrane targeting domain and a role for palmitoylation.* J Biol Chem, 2002. **277**(50): p. 48834-41.
  90. Riento, K., et al., *Endocytosis of flotillin-1 and flotillin-2 is regulated by Fyn kinase.* J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 7): p. 912-8.
  91. Babuke, T., et al., *Hetero-oligomerization of reggie-1/flotillin-2 and reggie-2/flotillin-1 is required for their endocytosis.* Cell Signal, 2009. **21**(8): p. 1287-97.
  92. Baenziger, N.L., G.N. Brodie, and P.W. Majerus, *A thrombin-sensitive protein of human platelet membranes.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1971. **68**(1): p. 240-3.
  93. Adams, J.C., *Thrombospondins: multifunctional regulators of cell interactions.* Annu Rev Cell Dev Biol, 2001. **17**: p. 25-51.
  94. Bonnefoy, A., R. Moura, and M.F. Hoylaerts, *The evolving role of thrombospondin-1 in hemostasis and vascular biology.* Cell Mol Life Sci, 2008. **65**(5): p. 713-27.
  95. Jimenez, B., et al., *Signals leading to apoptosis-dependent inhibition of neovascularization by thrombospondin-1.* Nat Med, 2000. **6**(1): p. 41-8.
  96. Adams, J.C. and R.P. Tucker, *The thrombospondin type 1 repeat (TSR) superfamily: diverse proteins with related roles in neuronal development.* Dev Dyn, 2000. **218**(2): p. 280-99.

97. McPherson, J., H. Sage, and P. Bornstein, *Isolation and characterization of a glycoprotein secreted by aortic endothelial cells in culture. Apparent identity with platelet thrombospondin.* J Biol Chem, 1981. **256**(21): p. 11330-6.
98. Mosher, D.F., M.J. Doyle, and E.A. Jaffe, *Synthesis and secretion of thrombospondin by cultured human endothelial cells.* J Cell Biol, 1982. **93**(2): p. 343-8.
99. Raugi, G.J., et al., *Thrombospondin: synthesis and secretion by cells in culture.* J Cell Biol, 1982. **95**(1): p. 351-4.
100. Jaffe, E.A., et al., *Cultured human fibroblasts synthesize and secrete thrombospondin and incorporate it into extracellular matrix.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. **80**(4): p. 998-1002.
101. Sage, H., et al., *Granular pneumocytes in primary culture secrete several major components of the extracellular matrix.* Biochemistry, 1983. **22**(9): p. 2148-55.
102. Jaffe, E.A., J.T. Ruggiero, and D.J. Falcone, *Monocytes and macrophages synthesize and secrete thrombospondin.* Blood, 1985. **65**(1): p. 79-84.
103. Mosher, D.F., *Physiology of thrombospondin.* Annu Rev Med, 1990. **41**: p. 85-97.
104. Riser, B.L., et al., *Thrombospondin binding by human squamous carcinoma and melanoma cells: relationship to biological activity.* Exp Cell Res, 1988. **174**(2): p. 319-29.
105. Varani, J., et al., *Characterization of thrombospondin synthesis, secretion and cell surface expression by human tumor cells.* Clin Exp Metastasis, 1989. **7**(3): p. 265-76.
106. Resovi, A., et al., *Current understanding of the thrombospondin-1 interactome.* Matrix Biol, 2014. **37**: p. 83-91.
107. Hellewell, A.L. and J.C. Adams, *Insider trading: Extracellular matrix proteins and their non-canonical intracellular roles.* Bioessays, 2016. **38**(1): p. 77-88.
108. Baek, K.H., et al., *Thrombospondin-1 mediates oncogenic Ras-induced senescence in premalignant lung tumors.* J Clin Invest, 2013. **123**(10): p. 4375-89.
109. Roberts, D.D., *Regulation of tumor growth and metastasis by thrombospondin-1.* FASEB J, 1996. **10**(10): p. 1183-91.
110. Yabkowitz, R., et al., *Activated T-cell adhesion to thrombospondin is mediated by the alpha 4 beta 1 (VLA-4) and alpha 5 beta 1 (VLA-5) integrins.* J Immunol, 1993. **151**(1): p. 149-58.
111. Barazi, H.O., et al., *Regulation of integrin function by CD47 ligands. Differential effects on alpha v beta 3 and alpha 4 beta 1 integrin-mediated adhesion.* J Biol Chem, 2002. **277**(45): p. 42859-66.
112. Bull, H.A., P.M. Brickell, and P.M. Dowd, *Src-related protein tyrosine kinases are physically associated with the surface antigen CD36 in human dermal microvascular endothelial cells.* FEBS Lett, 1994. **351**(1): p. 41-4.
113. Gao, A.G., et al., *Thrombospondin modulates alpha v beta 3 function through integrin-associated protein.* J Cell Biol, 1996. **135**(2): p. 533-44.
114. Tan, K., et al., *Crystal structure of the TSP-1 type 1 repeats: a novel layered fold and its biological implication.* J Cell Biol, 2002. **159**(2): p. 373-82.
115. Chen, H., M.E. Herndon, and J. Lawler, *The cell biology of thrombospondin-1.* Matrix Biol, 2000. **19**(7): p. 597-614.
116. Good, D.J., et al., *A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(17): p. 6624-8.
117. Lawler, P.R. and J. Lawler, *Molecular basis for the regulation of angiogenesis by thrombospondin-1 and -2.* Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(5): p. a006627.
118. Dieude, M., et al., *The 20S proteasome core, active within apoptotic exosome-like vesicles, induces autoantibody production and accelerates rejection.* Sci Transl Med, 2015. **7**(318): p. 318ra200.
119. Akimov, V., et al., *UbiSite approach for comprehensive mapping of lysine and N-terminal ubiquitination sites.* Nat Struct Mol Biol, 2018. **25**(7): p. 631-640.
120. Park, D.W., et al., *Improved recovery of active GST-fusion proteins from insoluble aggregates: solubilization and purification conditions using PKM2 and HtrA2 as model proteins.* BMB Rep, 2011. **44**(4): p. 279-84.
121. Cremona, M.L., et al., *Flotillin-1 is essential for PKC-triggered endocytosis and membrane microdomain localization of DAT.* Nat Neurosci, 2011. **14**(4): p. 469-77.

122. Bagchi, S., R. Fredriksson, and A. Wallen-Mackenzie, *In Situ Proximity Ligation Assay (PLA)*. *Methods Mol Biol*, 2015. **1318**: p. 149-59.
123. Dixon, A.S., et al., *NanoLuc Complementation Reporter Optimized for Accurate Measurement of Protein Interactions in Cells*. *ACS Chem Biol*, 2016. **11**(2): p. 400-8.
124. Agah, A., et al., *The lack of thrombospondin-1 (TSP1) dictates the course of wound healing in double-TSP1/TSP2-null mice*. *Am J Pathol*, 2002. **161**(3): p. 831-9.
125. Ardito, F., et al., *The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy (Review)*. *Int J Mol Med*, 2017. **40**(2): p. 271-280.
126. Kanehisa, M., et al., *KEGG for representation and analysis of molecular networks involving diseases and drugs*. *Nucleic Acids Res*, 2010. **38**(Database issue): p. D355-60.
127. Janssens, V. and J. Goris, *Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling*. *Biochem J*, 2001. **353**(Pt 3): p. 417-39.
128. Sents, W., et al., *The biogenesis of active protein phosphatase 2A holoenzymes: a tightly regulated process creating phosphatase specificity*. *FEBS J*, 2013. **280**(2): p. 644-61.
129. Tar, K., et al., *Role of protein phosphatase 2A in the regulation of endothelial cell cytoskeleton structure*. *J Cell Biochem*, 2006. **98**(4): p. 931-53.
130. Tar, K., et al., *Phosphatase 2A is involved in endothelial cell microtubule remodeling and barrier regulation*. *J Cell Biochem*, 2004. **92**(3): p. 534-46.
131. Kasa, A., et al., *Protein phosphatase 2A activity is required for functional adherent junctions in endothelial cells*. *Microvasc Res*, 2013. **89**: p. 86-94.
132. Bodin, S., et al., *Flotillins in intercellular adhesion - from cellular physiology to human diseases*. *J Cell Sci*, 2014. **127**(Pt 24): p. 5139-47.
133. Banning, A., et al., *Flotillins Regulate Focal Adhesions by Interacting with alpha-Actinin and by Influencing the Activation of Focal Adhesion Kinase*. *Cells*, 2018. **7**(4).
134. Fork, C., et al., *Flotillin-1 facilitates toll-like receptor 3 signaling in human endothelial cells*. *Basic Res Cardiol*, 2014. **109**(6): p. 439.
135. Solis, G.P., et al., *Reggies/flotillins regulate E-cadherin-mediated cell contact formation by affecting EGFR trafficking*. *Mol Biol Cell*, 2012. **23**(10): p. 1812-25.
136. Otto, G.P. and B.J. Nichols, *The roles of flotillin microdomains--endocytosis and beyond*. *J Cell Sci*, 2011. **124**(Pt 23): p. 3933-40.
137. Neumann-Giesen, C., et al., *Role of EGF-induced tyrosine phosphorylation of reggie-1/flotillin-2 in cell spreading and signaling to the actin cytoskeleton*. *J Cell Sci*, 2007. **120**(Pt 3): p. 395-406.
138. Weeks, K.L., et al., *beta-Adrenergic Stimulation Induces Histone Deacetylase 5 (HDAC5) Nuclear Accumulation in Cardiomyocytes by B55alpha-PP2A-Mediated Dephosphorylation*. *J Am Heart Assoc*, 2017. **6**(4).
139. Ory, S., et al., *Protein phosphatase 2A positively regulates Ras signaling by dephosphorylating KSR1 and Raf-1 on critical 14-3-3 binding sites*. *Curr Biol*, 2003. **13**(16): p. 1356-64.
140. Martin, M., et al., *PP2A regulatory subunit Balpha controls endothelial contractility and vessel lumen integrity via regulation of HDAC7*. *EMBO J*, 2013. **32**(18): p. 2491-503.
141. Waschke, J., et al., *Protein kinase C-mediated endothelial barrier regulation is caveolin-1-dependent*. *Histochem Cell Biol*, 2006. **126**(1): p. 17-26.
142. Barr, R.K., et al., *Deactivation of sphingosine kinase 1 by protein phosphatase 2A*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(50): p. 34994-5002.
143. Riento, K., et al., *Flotillin proteins recruit sphingosine to membranes and maintain cellular sphingosine-1-phosphate levels*. *PLoS One*, 2018. **13**(5): p. e0197401.
144. Hannun, Y.A. and L.M. Obeid, *Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008. **9**(2): p. 139-50.
145. Kuo, Y.C., et al., *Regulation of phosphorylation of Thr-308 of Akt, cell proliferation, and survival by the B55alpha regulatory subunit targeting of the protein phosphatase 2A holoenzyme to Akt*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(4): p. 1882-92.
146. Greif, D.M., R. Kou, and T. Michel, *Site-specific dephosphorylation of endothelial nitric oxide synthase by protein phosphatase 2A: evidence for crosstalk between phosphorylation sites*. *Biochemistry*, 2002. **41**(52): p. 15845-53.

147. Luo, Y., et al., *Roles of I(2)(PP2A) in the downregulation of eNOS Ser1177 phosphorylation by angiotensin II-activated PP2A*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019. **516**(3): p. 613-618.
148. Jiang, X., et al., *Protein Phosphatase 2A Mediates YAP Activation in Endothelial Cells Upon VEGF Stimulation and Matrix Stiffness*. *Front Cell Dev Biol*, 2021. **9**: p. 675562.
149. Mazhar, S., et al., *Targeting PP2A in cancer: Combination therapies*. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2019. **1866**(1): p. 51-63.
150. Liu, B., et al., *Thrombospondin-1 in vascular development, vascular function, and vascular disease*. *Semin Cell Dev Biol*, 2024. **155**(Pt B): p. 32-44.
151. Dawson, D.W., et al., *CD36 mediates the In vitro inhibitory effects of thrombospondin-1 on endothelial cells*. *J Cell Biol*, 1997. **138**(3): p. 707-17.
152. Isenberg, J.S., et al., *CD47 is necessary for inhibition of nitric oxide-stimulated vascular cell responses by thrombospondin-1*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(36): p. 26069-80.
153. Tolsma, S.S., et al., *Peptides derived from two separate domains of the matrix protein thrombospondin-1 have anti-angiogenic activity*. *J Cell Biol*, 1993. **122**(2): p. 497-511.
154. Nicosia, R.F. and G.P. Tuszynski, *Matrix-bound thrombospondin promotes angiogenesis in vitro*. *J Cell Biol*, 1994. **124**(1-2): p. 183-93.
155. Qian, X., et al., *Thrombospondin-1 modulates angiogenesis in vitro by up-regulation of matrix metalloproteinase-9 in endothelial cells*. *Exp Cell Res*, 1997. **235**(2): p. 403-12.
156. Taraboletti, G., et al., *The heparin binding 25 kDa fragment of thrombospondin-1 promotes angiogenesis and modulates gelatinase and TIMP-2 production in endothelial cells*. *FASEB J*, 2000. **14**(12): p. 1674-6.
157. Hoffmann, B.R., Y. Liu, and D.F. Mosher, *Modification of EGF-like module 1 of thrombospondin-1, an animal extracellular protein, by O-linked N-acetylglucosamine*. *PLoS One*, 2012. **7**(3): p. e32762.
158. Hofsteenge, J., et al., *C-mannosylation and O-fucosylation of the thrombospondin type 1 module*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(9): p. 6485-98.
159. Shu, H., et al., *The role of CD36 in cardiovascular disease*. *Cardiovasc Res*, 2022. **118**(1): p. 115-129.
160. Isenberg, J.S., et al., *Regulation of nitric oxide signalling by thrombospondin 1: implications for anti-angiogenic therapies*. *Nat Rev Cancer*, 2009. **9**(3): p. 182-94.
161. Rege, T.A., et al., *Thrombospondin-1-induced apoptosis of brain microvascular endothelial cells can be mediated by TNF-R1*. *J Cell Physiol*, 2009. **218**(1): p. 94-103.
162. Lee, N.V., et al., *ADAMTS1 mediates the release of antiangiogenic polypeptides from TSP1 and 2*. *EMBO J*, 2006. **25**(22): p. 5270-83.
163. Schultz-Cherry, S. and J.E. Murphy-Ullrich, *Thrombospondin causes activation of latent transforming growth factor-beta secreted by endothelial cells by a novel mechanism*. *J Cell Biol*, 1993. **122**(4): p. 923-32.
164. Xie, F., et al., *Disruption and inactivation of the PP2A complex promotes the proliferation and angiogenesis of hemangioma endothelial cells through activating AKT and ERK*. *Oncotarget*, 2015. **6**(28): p. 25660-76.

## 11.2. A PhD értekezés alapját képező saját és további közlemények jegyzéke



**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



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 tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2024.12.14.

## 12. Tárgyszavak

Endotél sejtek

Protein foszfatáz 2A

Thrombospondin-1

Flotillin-1

Reverzibilis fehérje foszforiláció

Angiogenezis

Sebgyógyulás

## 13. Keywords

Endothelial cells

Protein phosphatase 2A

Thrombospondin-1

Flotillin-1

Reversible protein phosphorylation

Angiogenesis

Wound healing

## 14. Köszönetnyilvánítás

Szeretném kifejezeni hálás köszönetemet témavezetőmnek, Dr. Boratkó Anitának, aki türelmével és tudásával támogatta munkámat, nem csak a PhD tanulmányim során, hanem egyetemi pályafutásom kezdetétől egészen a végéig.

Köszönettel tartozom Dr. Csontos Csillának hozzáértő támogatásáért, illetve a számtalan tanácsáért, amelyekkel segítette a munkámat.

Köszönöm prof. Dr. Virág Lászlónak az Orvosi Vegytani Intézet igazgatójának a lehetőséget, amiért lehetőséget biztosított számomra, hogy az intézetben végezhessem tanulmányaimat.

Szeretnék köszönetet mondani munkacsoportom korábbi és jelenlegi tagjainak, Király Nikolettnek, Barta Kittinek és Fonódi Mártonnak, akik tanulmányaim során nemcsak a munkafolyamatokban nyújtottak segítő kezet, hanem jelentős szerepet játszottak abban is, hogy a labor mindennapjai barátságos, támogató légkörben teljenek.

Végül, de nem utolsó sorban hatalmas köszönettel tartozom vőlegényemnek és családomnak, hogy mindvégig támogattak és hittek bennem.