

dc\_894\_14

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

---

**REVERZIBILIS FEHÉRJE FOSZFORILÁCIÓ ÉS FEHÉRJE-FEHÉRJE  
KÖLCSÖNHATÁSOK TÜDŐ ARTÉRIA ENDOTÉL SEJTEKBEN**

**CSORTOS CSILLA**



**DEBRECENI EGYETEM  
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR**

**ORVOSI VEGYTANI INTÉZET**

**DEBRECEN, 2014**

dc\_894\_14

## 1. BEVEZETÉS

### 1.1 Az endotél barrier

Az endotél sejtek (EC) az erek belső falán egy dinamikus, szemiszelektív réteget, „monolayer” képeznek, és szabályozzák a folyadék és a makromolekulák átjutását a véráram és a környező szövetek között, ezért az EC barrier fenntartása a szervek működésében rendkívül fontos. Az endotél sejtek heterogének, makro- és mikrokörnyezetüknek megfelelően morfológiájuk, egymáshoz való illeszkedésük és élettani funkciójuk különbözhet. Az érpermeabilitás szabályozásán túl számos fiziológiás és patológiás folyamatban ismerték fel jelentőségüket, mint például az angiogenezis, gyulladás, immunológiai folyamatok szabályozásában.

#### 1.1.1 Az endotél permeabilitás és mediátorai

Az EC permeabilitás lehet bazális, vagy valamilyen fizikai, gyulladásos vagy bioaktív stimulus által indukált folyamat. Normál fiziológiás körülmények között az endotélium szabályozza más sejtek, a folyadék és a makromolekulák/fehérjék áthaladását a monolayeren, ezzel homeosztázist tart fenn a vér és az interstitium között. A kisebb molekulák és ionok (<3 nm) passzív transzportja az EC monolayeren paracellulárisan történik, a makromolekulák/fehérjék pedig transzcelluláris úton transzportálódhatnak.

Külső vagy belső stimulus, mint pl. akut vagy krónikus gyulladás, angiogenezis vagy tumor metastasis esetén, illetve különböző bioaktív mediátorok (hisztamin, trombin, citokinek, növekedési faktorok) hatására a permeabilitás megnövekszik. Akut tüdőszindróma (ALI) és akut respirációs distressz szindróma (ARDS) esetén az endotél barrier funkció sérül, az endotél monolayer sejtjei összehúzódnak, a sejtkapcsolatok lazulnak, vagy időlegesen megszűnnek, és a sejtek között rések alakulnak ki, amelyeken keresztül a vérben oldott anyagok, plazmafehérjék és immunsejtek paracelluláris átjutása megtörténhet. ALI-val vagy ARDS-sel diagnosztizált betegekben a koagulációs útvonalak, a szerin proteáz trombin és proteáz aktivált receptora (PAR-1) patológiásan aktiválódnak, ezáltal a tüdő paracelluláris permeabilitása megnő. Ezért az EC barrier vizsgálataiban a trombin egy gyakran alkalmazott barrier diszfunkciót kiváltó ágens. A mikrotubulusokat destabilizáló szintetikus anyag, a nokodazol, ugyancsak növeli az EC permeabilitását. A lipid mediátor szfingozin 1-foszfát, az angiopoetin-1, a cAMP, az ATP és az adozin viszont erősítik az endotél barrieret. Az endotél permeabilitásban bekövetkező eltérések az ellentétesen ható endogén mediátorok aktuális egyensúlyát tükrözik.

### **1.1.2 Az EC citoszkeleton**

Az EC citoszkeleton elemei, a mikro-, intermedier és makrofilamentumok, biztosítják a sejtek alakját, mechanikai szilárdságát, polaritását és mozgását. Mindhárom fehérje monomerekből felépülő polimer, melyek szabályozott, gyors átalakulásra képesek. Az EC citoszkeleton stabilitása és dinamikus át/újrarendeződése befolyásolja az endotél sejtek alakját és mobilitását, ezzel a monolayer integritását, illetve különböző stressz hatásokra adott válaszát is.

Az aktin filamentumok és az EC permeabilitás közötti kapcsolatot már viszonylag korán felismerték. A mikrofilamentumok felbomlását okozó citokalazin D például az EC monolayer permeabilitását többszörösére növeli. Trombin kezelés következtében is átrendeződik az aktin citoszkeleton, a kortikális aktin mennyisége csökken és stresszkábelek alakulnak ki, ami együtt jár a monolayer permeabilitásának emelkedésével. Az endotél sejtek alakváltozásának (kontrahált-relaxált) és motilitásának egyik fő molekuláris motorja az aktinnal asszociálódó miozin II, ami két nehézláncból (200-204 kDa) és a nehézláncokhoz kapcsolódó két-két könnyűláncból (17 kDa és 20 kDa) álló komplex. Az intermedier filamentumok és a mikrotubulusok szerepe az endotél barrier funkciójában kevésbé ismert. Az EC permeabilitás a mikrotubulusok stabilitásával együtt változik: a mikrotubulus rendszer felbomlását kiváltó nokodazol vagy vinblastin kezeléseket követően az aktin citoszkeleton szerkezete megváltozik és nő a permeabilitás, amit a mikrotubulusokat stabilizáló paclitaxel mérsékel. A mikrotubulusok endotél barrierre kifejtett hatásának pontos mechanizmusa ugyan még nem ismert, de az eredmények a mikrofilamentumok és a mikrotubulusok közötti párbeszéd lehetőségére utalnak.

### **1.1.3 Az EC sejtkepcsoló struktúrái**

A vaszkuláris endotél sejtek közötti rés (gap), adherens és szoros sejtkepcsoló struktúrák működnek, melyek közül a paracelluláris permeabilitásban az utóbbi kettőnek van jelentősége. A szoros kapcsolatok partnerei a citoszolban többek között a ZO (zonula occludens) és a MAGUK (membrane-associated guanylate kinase) fehérjecsaldok tagjai. Az EC adherens kapcsolatainak transzmembrán fehérjéi további specifikus intracelluláris kölcsönható partnereken keresztül az aktin citoszkeletonhoz horgonyzódnak, ami stabilizálja a sejtkepcsolatokat, de azok nyitását-zárását is szabályozza. Az EC adherens kapcsolataiban egy specifikus kadherin, a VE (vascular endothelial)-kadherin transzmembrán fehérje található, ami minden ér- és endotél sejtípustban jelen van. A

molekula C-terminális, intracellulárisan elhelyezkedő része kötődik elsődleges intracelluláris partnereihez ( $\beta$ -katenin, plakoglobin és p120), amelyek további aktin-kötő fehérjékkel kapcsolódhatnak.

## **1.2 Reverzibilis fehérje foszforiláció az endotél barrier szabályozásában**

Az EC citoszkeletonja és sejtkapcsoló struktúrái fehérje-fehérje kölcsönhatásai révén számos jelátviteli útvonallal vannak szoros kapcsolatban, melyek kialakulásukat, stabilitásukat és dinamikus átrendeződésüket szabályozzák. Ezen jelátviteli pályák szerves része a reverzibilis fehérje foszforiláció Ser-, Thr-, illetve Tyr-oldalláncokon.

Az endotél sejtek barrier funkciója, a paracelluláris rések kialakulása függ az aktin citoszkeletonhoz köthető kontraktilis és adhéziós erők egyensúlyától. Ennek szabályozásában a simaizom kontrakcióhoz hasonlóan az aktinhoz asszociálódó fehérjék reverzibilis foszforilációját katalizáló protein kinázok és foszfatázok vesznek részt.

### **1.2.1 Az endotél miozin könnyűlánc kináz**

Az endotél sejtek migrációjában és az EC permeabilitásában az MLC foszforiláció és az MLCK aktivitás központi szerepét korán felismerték. Aktív MLCK fragmentum közvetlen EC-be való juttatása után, valamint gyulladáskeltő agonisták, trombin és hisztamin hatására az MLC gyorsan foszforilálódik és az EC monolayer permeabilitása megnő, amit az MLCK gátlása mérsékel.

Az endotél MLCK biokémiai vizsgálatával és klónozásával egy 214 kDa méretű fehérjét azonosítottak (EC MLCK). A simaizom MLCK-hoz (SM MLCK) hasonlítva az EC MLCK mérete nagyobb, N-terminálisán egy olyan 922 aminosavból álló szakasz van, ami a SM MLCK-ban nem található meg és funkcióját nem ismerték. A fehérje C-terminális részének domén szerkezete megegyezik a kisebb méretű kináz szerkezetével, és aminosav szinten is >90% az azonosság. Az EC MLCK több splice variáns formáját klónozták, melyek közül dominánsan az EC MLCK-1 és 2 expresszálódik. *Az EC MLCK szekvenciájában több potenciális Tyr-foszforilációs hely található, ami felveti annak lehetőségét, hogy az endotél barrier reverzibilis Tyr-foszforiláción keresztüli szabályozásában az EC MLCK kulcsszereplő lehet.*

### **1.2.2 Ser/Thr-specifikus protein foszfatázok**

A foszfo-Ser/Thr oldalláncokra (röviden Ser/Thr-) specifikus protein foszfatázok többsége több alegységből áll. A holoenzimekben a katalitikus aktivitásért felelős alegység mellett egy vagy több regulátor alegység is jelen van, melyek a megfelelő helyre és/vagy szubsztrátokhoz irányítva szabályozzák a foszfatázt. A Ser/Thr-specifikus

foszfatázok katalitikus alegységei két géncsalád termékei, eszerint megkülönböztetünk foszfoprotein foszfatázokat, PPP, és fémion-függő foszfatázokat, PPM. A korábbi, biokémiai tulajdonságokon alapuló osztályozás és elnevezés szerinti protein foszfatáz 1 (PP1) és protein foszfatáz 2A (PP2A) a PPP családkhoz tartozó enzimek.

### 1.2.3 *Miozin foszfatáz az endotél sejtekben*

A simaizom miozin foszfatáz a PP1  $\beta$  izoforma katalitikus- (PP1c $\beta$ ) és két regulátor alegységből áll, a nagyobb, ~130 kDa méretű MYPT1 (myosin phosphatase target subunit 1) és a 20 kDa-os M20 alegységekből. Specifikus protein foszfatáz gátlószerekkel végzett vizsgálatok az endotél MLC defoszforilációjában is a PP1 aktivitás domináns szerepére utaltak. *Az endotél miozin foszfatáz alegységeit és azok fehérje kölcsönhatásait azonban nem jellemezték.*

#### 1.2.3.1 *A MYPT fehérjecsalád*

A MYPT1 fehérjét egyetlen gén kódolja, az N-terminális részén található <sup>35</sup>KVKF<sup>38</sup> PP1c kötőmotívummal kapcsolódik elsődlegesen a PP1 katalitikus alegységhez, valamint két nukleáris lokalizációs szignált és hét ankirin ismétlődést is tartalmaz, utóbbiak a foszforilált miozin könnyűláncsal való kölcsönhatásban játszanak szerepet. A fehérje középső/C-terminális fele, amit autoinhibíciós doménnek is tartanak, több helyen foszforilálható. A Thr696 oldallánc foszforilációját több kináz, például Rho kináz is katalizálhatja, amely a miozin foszfatáz gátlását okozza. A gátló hely defoszforilációjáért a PP2A és PP2B foszfatázokat tartják felelősnek.

A MYPT1-et és a vele szerkezeti rokonságot mutató további fehérjéket, melyek eltérő gének termékei, az ún. MYPT fehérjecsaládba soroljuk. A MYPT2, MBS85, MYPT3 és a TIMAP feltételezhetően szintén a PP1 regulátoraiként funkcionálnak. A MYPT3 és a TIMAP mérete 58, illetve 64 kDa. Mindkét fehérjében megtalálható az N-terminálishoz közeli PP1c kötőmotívum és az azt követő ankirin ismétlődések, de a MYPT1 Thr696 gátló foszforilációs helyével ekvivalens aminosav oldalláncot nem azonosítottak. C-terminálisuk is eltér a család többi tagjától, prenilációs motívumot tartalmaznak, ami plazmamembránhoz való asszociációjukat teheti lehetővé.

A TIMAP (TGF- $\beta$ 1 inhibited membrane associated protein) fehérjét glomerulális endotél sejtekben azonosították reprezentációs differenciál analízis során. TGF- $\beta$ 1 jelentősen csökkenti a TIMAP mRNS szintjét, ezért feltételezhető, hogy a TIMAP-nak fontos szerepe lehet az endotéliumban történt TGF- $\beta$ 1 okozta változások helyreállításában. Más sejt típusokkal összehasonlítva a TIMAP expressziós szintje az

endotél és hematopoetikus sejtekben igen magas. Patkány szövetek immunhisztokémiás festése alapján a TIMAP a vaszkuláris endotéliumban található meg a legnagyobb mennyiségben. *A MYPT fehérjékhez való hasonlóság alapján feltételezhető volt, hogy a TIMAP is szabályozhatja a PP1c-t, de lehetséges élettani szerepéről és kölcsönható partnereiről kevés információ áll rendelkezésre.*

#### **1.2.4 Protein foszfatáz 2A és a citoskeleton**

Az endotél sejteken PPP gátlószerekkel végzett korai kutatások arra hívták fel a figyelmet, hogy az EC citoskeleton és barrier funkció szabályozásában az MLC foszforilációjától független mechanizmusoknak is szerepük van, melyekben a PP2A-nak lehet funkciója. A PP2A az MLC defoszforilációjában *in vivo* nem vesz ugyan részt, de több, a citoskeletonhoz kapcsolódó fehérje defoszforilációját katalizálja. Aktin-kötő fehérjéket, kaldezmón, kofilin és HSP27, valamint a mikrotubulusokkal asszociálódó tau fehérjét is a PP2A citoskeletonális szubsztrátjaiként írtak le más sejt típusokban. Az elsősorban idegi sejtekben jellemzett tau fehérje foszforilációja befolyásolja a tau mikrotubulusokra kifejtett stabilizáló hatását. A tau több foszforilálható Ser oldallánca közül a Ser262-ről kimutatták, hogy annak foszforilációja gyakorlatilag megszünteti a tau mikrotubulusokhoz való kötődését. Endotél sejtekben a mikrotubulusok és a PP2A lokalizációját találták, ám karcinoma-eredetű angiogenetikus faktorok a PP2A eloszlását diffúzabbá tették, a mikrotubulusok pedig feloldódtak. Vaszkuláris endotél sejtekben oxidatív stressz következtében a p38 MAP-kináz útvonal aktiválódását, a HSP27 fehérje foszforilációját és F-aktin kialakulását figyelték meg. A fentiek alapján a folyamatot a PP2A teheti reverzibilissé. *Bár a jelátviteli folyamatok részletei még nem ismertek, mindezek azt sugallják, hogy a PP2A aktivitás az endotél citoskeleton szerkezetének szabályozásában esszenciális.*

#### **1.2.5 Sejtkapcsoló fehérjék és a PPP foszfatázok**

Az endotél sejtek adherens és szoros kapcsolatait alkotó fehérjék kapcsolódását/kölcsönhatását befolyásolja a résztvevők Ser/Thr és Tyr oldalláncainak foszforiláltsága. Akár ugyanazon fehérje Ser/Thr és Tyr foszforilációja is jelentős lehet a sejtkapcsoló struktúrák kialakulásában és átrendeződésében. *A sejtkapcsoló fehérjék defoszforilációjáról, a szabályozásban szerepet játszó protein foszfatázokról azonban keveset tudunk.*

### 1.3 Adaptor fehérjék

Az adaptor vagy állvány fehérjék specifikus fehérje kölcsönhatások, jelátviteli fehérje komplexek kialakulását segítik a sejt különböző, de meghatározott szubcelluláris régióiban. Enzimatisz aktivitással jellemzően nem rendelkeznek, ellenben lehetővé teszik a hozzájuk kötődő más fehérjék párbeszédét, és ezzel a jelátvitelt segítik.

#### 1.3.1 RACK1

A RACK1 (receptor for activated C kinase 1) adaptor fehérje elnevezése az aktív konformációban lévő PKC $\beta$ II-vel való kölcsönhatására utal, de ma már számos egyéb kölcsönható partnere ismert. A RACK1 mind a hét úgynevezett WD ismétlődő szerkezeti eleme ~40 aminosavból áll, melyek többnyire Trp-Asp (WD) dipeptiddel végződnek. A fehérje háromdimenziós szerkezetét ez a hét WD ismétlődés határozza meg, amelyek propeller-szerűen rendeződnek. A WD-ismétlődésekből álló fehérjék akár többszörös fehérje kölcsönhatásokra is képesek, így a *RACK1 is számos jelátviteli folyamat résztvevője*.

#### 1.3.2 NHERF1/EBP50 és NHERF2 fehérjék

Az NHERF (Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger regulatory factor) fehérjecsaládba négy adaptor fehérjét sorolnak, ezek az NHERF1/EBP50, az NHERF2/E3KARP, az NHERF3/PDZK1 és az NHERF4/IKEPP. A család tagjai kettő vagy négy PDZ fehérje interakciós domént tartalmaznak. Az NHERF fehérjéket elsődlegesen a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> cserélő-3 (NHE3) fehérjére kifejtett esszenciális szabályozó szerepük kapcsán tanulmányozták epitél sejtekben, de a sejt más jelátviteli folyamataiban is közreműködnek, erre utal többféle elnevezésük is. Az EBP50 és az NHERF2 elsődleges szekvenciája 57%-ban azonos, domén szerkezetük pedig egyforma.

Az EBP50 több kinázzal is foszforilálható, a foszforiláció pedig befolyásolhatja a fehérje kölcsönhatásait. A Ser337/Ser338 PKC általi foszforilációja elősegíti az adaptor fehérje oligomerizációját. Az EBP50 Ser279 és Ser301 oldalláncait a mitózis során a ciklin dependens kináz 1 (Cdk1) foszforilálja, ami a fehérje oligomerizációját gátolja, viszont elősegíti kölcsönhatását más fehérjékkel. *Az EBP50-et defoszforiláló protein foszfatázokat azonban még nem azonosították.* Az NHERF2 fehérjében az EBP50-nel homológ foszforilációs helyek nem találhatóak meg, foszforilációjáról nem tudunk.

Az EBP50 és az NHERF2 C-terminálisán ERM (ezrin-radixin-moezin)-kötő domén van. Az EBP50 (ERM-binding phosphoprotein 50) név is az ERM fehérjékkel való kölcsönhatásra utal.



### 1.3.3 Az ERM fehérjék

Az ERM fehérjék a plazmamembrán és az aktin citoskeleton közötti kapcsoló fehérjék, ezáltal a sejt-kortex stabilizálásában vesznek részt, de jelátviteli folyamatokat is koordinálnak. Közvetlenül kötődhetnek transzmembrán fehérjékhez, adhéziós molekulákhoz, de a membránnal való kölcsönhatásukban gyakran adaptor fehérjék is szerepet játszanak, mint például az EBP50 és az NHERF2. Az ezrin, radixin és moezin fehérjék elsődleges szerkezete nagyon hasonló, domén felépítésük megegyező, N-terminális végükön egy FERM/ N-ERMAD domén van, ezt egy  $\alpha$ -helikális domén követi, C-terminális részükön pedig C-ERMAD domén található. Ennek ellenére, szövetspecifikus megjelenésük és néhány egyéb eltérés alapján feltételezik, hogy élettani funkcióikban eltérések lehetnek. A N-ERMAD és C-ERMAD domének között intramolekuláris kölcsönhatás alakulhat ki, ami a kötődő felszíneket más fehérjékkel való kölcsönhatás elől elrejtí, az ERM fehérjéket inaktív formában tartja a citoplazmában. C-ERMAD részükön egy konzervált Thr oldalláncot tartalmaznak, melynek Rho kináz, PKC $\alpha$  vagy PKC $\theta$  általi foszforilációja konformáció változást okoz, az intramolekuláris kölcsönhatás megszűnik, a fehérje kinyílik és aktív, kölcsönhatásra képes formába kerül. A N-ERMAD transzmembrán fehérjék (pl. CD44, ICAM) citoplazmában lévő részéhez vagy állványfehérjékhez kötődhet a citoplazmában, a C-ERMAD pedig az F-aktinhoz kapcsolódik.

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

Az endotél barrier funkció mechanizmusának megismerésére irányuló eddigi kutatások annak összetett jelátviteli folyamatokon keresztül történő szabályozását igazolták. Bár ezekről a jelátviteli pályákról ismereteink még hiányosak, a reverzibilis fehérje foszforiláció jelentősége nem kétséges. Az értekezésben összefoglalt kísérletes munka során a miozin könnyűlánc kináz (MLCK), valamint a protein foszfatáz 1 és 2A (PP1 és PP2A) enzimek szabályozását, funkcióját, lehetséges szubsztrátjait, regulátor alegységeit és fehérje kölcsönható partnereit tanulmányoztuk tüdő artéria endotél sejtekben, hogy a vaszkuláris endotél sejtek fiziológiai működését jobban megérthessük.

***Vizsgálataink fő célkitűzései, megválaszolandó kérdései az alábbiak voltak:***

- Szerepe lehet-e az endotél miozin könnyűlánc kináz szabályozásában az enzim tirozin foszforilációjának?

- A miozin foszfatáz (PP1-MYPT1) jellemzése tüdő artéria endotél sejtekben; hogyan befolyásolja a PP1 katalitikus és MYPT1 regulátor alegység az endotél barrier funkciót.
- Az endotél sejtekben magas szinten expresszálandó TIMAP fehérje tanulmányozása:  
A TIMAP és a PP1 katalitikus alegysége közötti kölcsönhatás vizsgálata. Mi a TIMAP élettani funkciója a vaszkuláris endotéliumban?
- A PP2A enzim lehetséges szerepének tanulmányozása az endotél citoszkeleton, sejtkapcsoló struktúrák és barrier funkció szabályozásában. Milyen, a citoszkeleton szerkezetét és az endotél barrier befolyásoló fehérjék foszforilációs szintjének szabályozásában vesz részt a PP2A a vaszkuláris endotéliumban?
- A PP1 és PP2A fehérje-partnereinek vizsgálata tüdő endotél sejtekben és a kölcsönhatások jelentőségének feltárása. A TIMAP új kölcsönható fehérje-partnerének azonosítása. Hogyan befolyásolja a kölcsönható partner a PP1c aktivitását és az endotél barrier funkciót? NHERF adaptor fehérjék tanulmányozása endotél sejtekben. Melyik Ser/Thr-specifikus protein foszfatáz típus felelős az ERM fehérjékhez kötődő EBP50 fehérje defoszforilációjáért?

### 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A vizsgálataink során szükséges molekuláris biológiai technikákat (RNS, DNS izolálás, cDNS könyvtárszűrés, PCR, RT-PCR, vektor konstrukciók előállítása és transzformálás) a standard protokollok szerint végeztük. Rekombináns fehérjék baktériumban történő termeltetéséhez pGEX-4T (GE Healthcare Life Sciences) expressziós rendszert alkalmaztunk.

*Sejtek tenyésztése.* Kísérleteinkhez marha (BPAEC, ATCC) és humán (HPAEC, Lonza) tüdő artéria makrovaszkuláris illetve humán tüdő mikrovaszkuláris (HLMVEC, Lonza) endotél sejteket, valamint HEK 293T és AD-293 (Stratagene), MCF7 és HeLa (ECACC) sejteket használtunk, melyeket minden esetben a forgalmazó által ajánlott médiumban tenyésztettünk.

*Sejtek szinkronizálása.* A marha tüdő artéria endotél sejteket kettős timidin blokkal szinkronizáltuk G1/S fázisban. A sejteket 16 órán keresztül 2 mM timidin tartalmú tápoldatban tartottuk, majd médiumot cseréltünk és 8 órán keresztül komplett médiumban tenyésztettük. Az első blokk után a teljes G1/S blokkot 16 órán keresztül 2 mM timidin tartalmú tápoldatban való kezeléssel értük el. A sejteket a G2/M fázisban való szinkronizációhoz 80 ng/ml nokodazollal kezeltük 14-16 órán át.

*Transzfekció.* A sejteket 80% konfluencia elérésekor a megfelelő emlős expressziós vektor konstrukttal transzfektáltuk FuGENE HD (Roche) vagy Lipofectamine 2000 (Invitrogen) transzfekciós reagens jelenlétében a gyártó leírása szerint. A felhasználásig szükséges posztranszfekciós időt az egyes fehérjékre optimalizáltuk.

*Immunfluoreszcencia és mikroszkópia.* A sejteket 0,2% zselatinnal előkezelt üveg fedőlemezeken tenyésztettük és 3,7% paraformaldehidet tartalmazó PBS/TBS-sel fixáltuk. A mintákat 0,5% Triton X-100 tartalmú PBS/TBS oldattal permeabilizáltuk 15 percig, majd specifikus elsődleges, ezt követően fluoreszcens festékkel konjugált másodlagos antitestekkel inkubáltuk. A fedőlemezeket ProLong Gold Antifade médium segítségével tárgylemezekre rögzítettük. A képeket Carl Zeiss Axioskope-20 mikroszkóppal rögzítettük. A konfokális felvételeket Olympus Fluoview FV1000 konfokális mikroszkóppal vettük föl.

*Immunprecipitáció.* A sejteket mosás után immunprecipitációs (IP) pufferben (20 mM Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM nátrium vanadát, 1% NP-40) tártuk fel. Centrifugálás után a felülúszóhoz a nem specifikus kötődés megelőzésére protein G Sepharose-t (GE Healthcare) adtunk és 4°C-on 3 órán keresztül finoman kevertettük, majd centrifugálással eltávolítottuk. Az így előtisztított sejtlizátumot a megfelelő antitesttel inkubáltuk 4°C-on 1 óráig, majd az elegyhez friss protein G Sepharose-t adtunk és egy éjszakán át 4°C-on inkubáltuk. A mintákat háromszor mostuk IP pufferrel, majd 1xSDS mintapufferben főztük 5 percig, centrifugáltuk és a felülúszót SDS-PAGE, Western blot kísérletekben használtuk fel.

*Sejtfractionálás.* A sejtek citoplazma és sejtmag frakcióinak előállítását a ProteoJET™ Cytoplasmic and Nuclear Protein Extraction Kit (Thermo Scientific) felhasználásával, a protokollban leírtak szerint végeztük. A frakcionálás hatékonyságát immunoblottal ellenőriztük,  $\beta$ -tubulin antitestet használtunk citoplazma markerként, míg lamin A/C antitestet magi markerként. A membrán frakció kinyeréséhez a ProteoJET™ Membrane Protein Extraction Kit-et (Thermo Scientific) használtuk a gyártó által ajánlott leírásnak megfelelően. A membrán frakció tisztaságát CD31 antitesttel ellenőriztük.

*siRNS transzfekció.* A csendesíteni kívánt fehérjére specifikus SMARTpool siRNS-t illetve a kontroll siRNS-t (ON-TARGETplus siCONTROL nontargeting pool) DharmaFECT-4 (Thermo Fisher Scientific, Inc) transzfekciós reagenssel mértük össze a gyártó ajánlása szerint. A felhasználásig szükséges posztranszfekciós időt az egyes fehérjékre optimalizáltuk.

*SDS-PAGE és Western blot.* A sejtek molekulatömeg szerinti elválasztását 10-15% SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel végeztük. Az elektroforézist követően az elválasztott fehérjéket 0,45 µm pórusméretű Hybond ECL nitrocellulóz membránra (GE Healthcare,) transzferáltuk. A membrán szabad kötőhelyeit 5% tejport tartalmazó TBST oldattal blokkoltuk, majd a primer és szekunder antitesttel 1 órán keresztül inkubáltuk. A kötődött antitesteket kemilumineszcenciás módszerrel detektáltuk röntgenfilmen vagy FluorChem FC2 Imager rendszer segítségével.

*GST-pull down.* A GST-taggel fúzionált fehérjéket tartalmazó baktériumokat hideg lízis pufferben (50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,1% Tween 20, 0,2% 2-mercaptoetanol, proteáz inhibitorok) szonikáltuk. A lizátumot centrifugáltuk, majd a felülúszóhoz glutation Sepharose 4B-t adtunk, és 4°C-on lassú forgatás mellett immobilizáltuk a fehérjéket. A nem kötődő fehérjéket mosással eltávolítottuk. Az endotél sejteket hideg lízis pufferben feltártuk, szonikáltuk, majd centrifugáltuk. A felülúszót a Sepharose-on immobilizált fehérjékhez adtuk, majd 2-6 órán át hidegben forgattuk. Ezután a Sepharose-t háromszor mostuk PBS-sel, majd 1xSDS mintapufferrel főzve eluáltuk a kötődött fehérjéket.

*Rekombináns adenovírus előállítás* az AdEasy Adenoviral Vector System (Stratagene) felhasználásával történt a gyártó protokollja szerint.

*In vitro protein foszfatáz aktivitás mérés.* A protein foszfatáz aktivitást [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP-vel foszforilált miozin könnyű lánc illetve moezin szubsztráttal mértük. A rekombináns moezin fehérjét Rho-kinázzal (0,4 U/ml) foszforiláltuk Rho kináz puffer jelenlétében (20 mM MOPS (pH 7,2), 25 mM glicerofoszfát, 0,5 mM EGTA and 0,5 mM DTT 1 µM mikrocisztin LR, 5 mM MgCl<sub>2</sub> és 0,2 mM ATP).

*TIMAP in vitro foszforilációja.* A rekombináns vad típusú GST-TIMAP-ot először a PKA katalitikus alegységével (200 U PKA/1 mg fehérje) foszforiláltuk, majd a kétszer foszforilált GST-TIMAP előállításához GSK3β (500 U GSK/1 mg fehérje) kinázt alkalmaztunk.

*ECIS mérések és in vitro sebgyógyulási assay.* Az endotél sejtek barrier funkciójának, sebgyógyulási képességének illetve a sejtek migratórikus képességének mérésére nagy érzékenységgű, nem invazív biofizikai módszert alkalmaztunk (Electric cell substrate impedance sensing system, model Z0, Applied BioPhysics Inc.). A transzendotél elektromos ellenállás (TER) növekedése a barrier funkció stabilizálódását, míg csökkenése a barrier funkció gyengülését jelzi.

*Felületi plazmon rezonancia.* A TIMAP különböző formái és a PP1c közötti kölcsönhatást felületi plazmon rezonancia (SPR) mérésekkel vizsgáltuk Biacore 3000 készülékkel. CM5 szenzor chip felületére anti-GST antitesten keresztül GST-taggel expresszált fehérjét kötöttünk ki. A fehérje-fehérje kölcsönhatás kinetikai paramétereinek meghatározására rekombináns PP1c-t injektáltunk a felszínre. Az idő függvényében ábrázolva az immobilizált fehérjékhez kötődött PP1c mennyiségének (RU) növekedését, görbéket (szenzogramokat) kaptunk, amelyek kiértékelését a BIAevaluation 3.1 szoftver (Biacore) segítségével végeztük.

*Matrigel vizsgálat.* Az endotél sejtek érképző tulajdonságát BD Matrigel™ Basement Membrane Matrix (BD Biosciences) segítségével vizsgáltuk a gyártó utasításainak megfelelően. A kontroll és siRNS-sel transzfektált BPAEC-t ( $\sim 1 \times 10^3$  sejt/minta) Matrigel-lel borított  $\mu$ -Slide (Ibidi) lemezekre helyeztük, majd CO<sub>2</sub> termosztátban tenyésztettük 8 órán át. A tenyésztés ideje alatt a mintákat óránként fénymikroszkóppal ellenőriztük. Az öt órán át tenyésztett mintákat 2% paraformaldehiddel fixáltunk, 0,5% Triton-X-el permeabilizáltuk a sejteket, és blokkolás után CF594 konjugált falloidinnel festettük az aktin filamentumokat. Western blot-hoz a sejteket tartalmazó Matrigel-t 2xSDS mintapufferben főztük 10 percre, centrifugáltuk és a felülúszót vizsgáltuk.

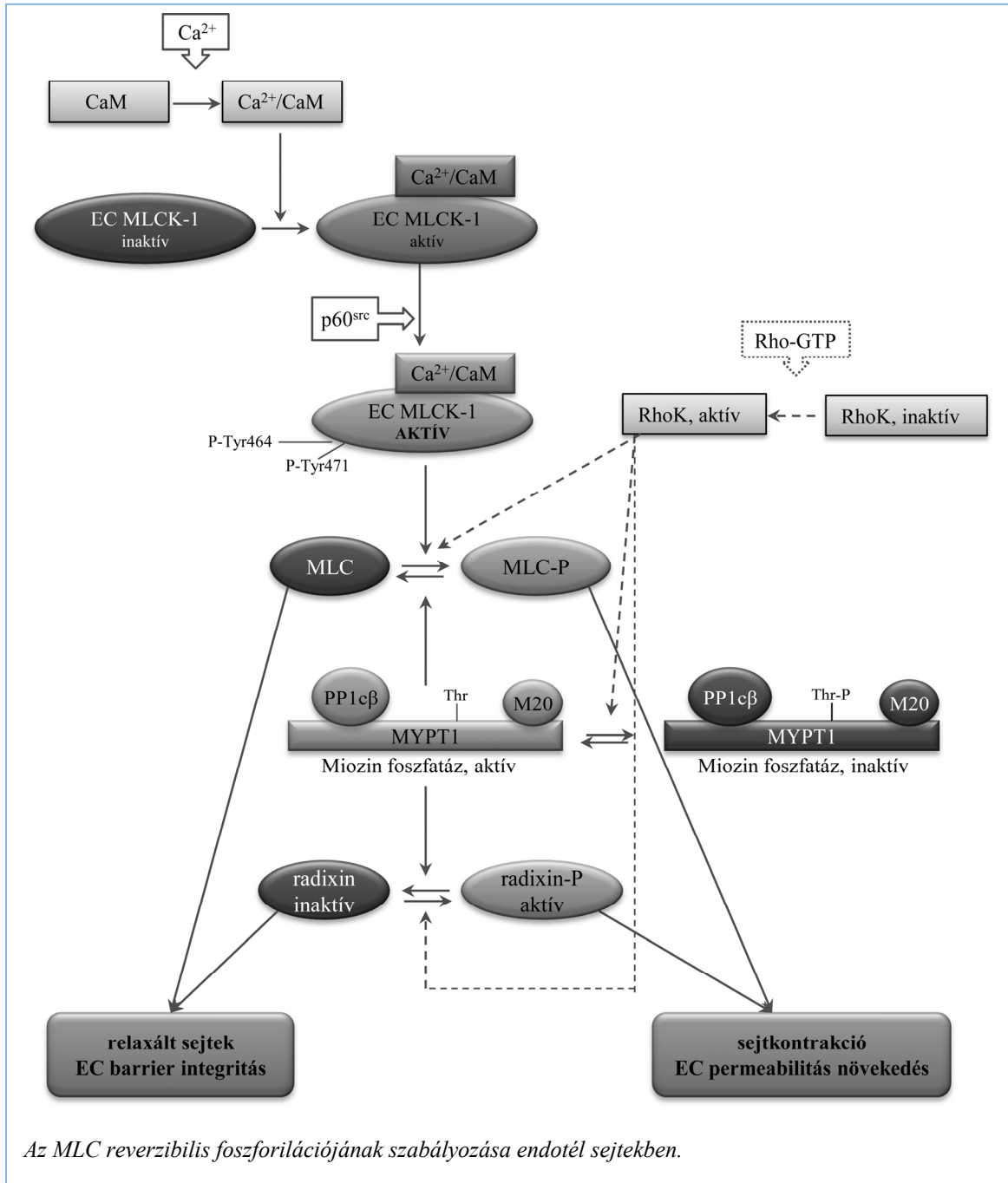
*Statisztikai analízis.* Az eredmények átlagának, illetve szórásának meghatározásához az Excel programot (Microsoft Corporation) használtuk. A statisztikai elemzést szintén az Excel program segítségével, a kísérleti körülményektől függően kétmintás, illetve önkontrollos t-próbával végeztük. A Western blotok értékelésekor az autoradiogramokat egyszerű szkenneléssel digitalizáltuk, illetve már eleve digitalizált formában nyertük FluorChem FC2 multi-imager berendezéssel és ImageJ 1.42q programmal értékeltük ki.

## 4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

### 4.1 Az MLC reverzibilis foszforilációja az EC-ben

Az endotél sejtkontrakció és barrier (gát) funkció szabályozásában központi szerepet játszik az aktin-miozin kölcsönhatás és az MLC Ca<sup>2+</sup>/kalmodulin függő MLCK általi foszforilációja. A trombin receptorához való kötődése a sejten belül megemeli az inozitol triszfoszfát szintjét, ami a Ca<sup>2+</sup> koncentráció növekedéséhez, ezzel az MLCK aktiválódásához, MLC foszforilációhoz vezet. Aktin-miozin kölcsönhatás jön létre, a sejtek kontrahálnak, közöttük rések jelennek meg, és az EC monolayer permeabilitása megnő. A folyamatot a miozin foszfatáz teszi reverzibilissé, ami az MLC

defoszforilációjáért felelős. A trombin a RhoA/Rho kináz útvonal aktiválásával a miozin foszfatáz oldaláról is az MLC foszforiláció szint növekedését segíti. A Rho kináz a miozin foszfatáz regulátor alegységét foszforilálja, ezzel gátolja az MLC defoszforilációját, ugyanakkor a MLC foszforilációját is katalizálhatja.



#### 4.1.1 Az endotél miozin könnyűlánc kináz

Sejt-permeabilis diperoxovanadát alkalmazásával EC MLCK aktivitásnövekedést és az EC MLCK tirozin oldalláncon történő foszforilációját, valamint a kináz asszociációját találtak kortaktin és p60<sup>Src</sup> fehérjékkel. A kortaktin egy aktin-kötő fehérje, amely szintén

foszforilálható a p60<sup>Src</sup> kinázzal. *In vitro* kötődési vizsgálatokkal is kimutatták a kortaktin és az EC MLCK kölcsönhatását, amit a két fehérje p60<sup>Src</sup> foszforilációja fokozott [1]. A szerzők feltételezik, hogy a kortaktin-EC MLCK kölcsönhatás a kortikális aktin szerkezet kialakulásában/átrendeződésében lehet jelentős. A Src-kortaktin-MLCK komplexet egy hepatóma sejtvonalon is igazolták, ahol a sejttérfogat szabályozásában vesznek részt [2]. Eredményeink szerint az EC MLCK N-terminális, 922 aminosavból álló, csak erre a sejt típusra jellemző szakasza a fehérje kináz aktivitásának szabályozásában játszik szerepet. *In vitro* vizsgálatokkal kimutattuk, hogy az EC MLCK-1 p60<sup>Src</sup> általi foszforilációja növelte annak aktivitását. A foszfo- és defoszfo EC MLCK-1 Ca<sup>2+</sup> koncentráció függését hasonlónak találtuk, a fél-maximális aktiváláshoz szükséges pCa értéke 6,56, illetve 6,50. A p60<sup>Src</sup>-kal kezelt, foszforilált EC MLCK-1 aktivitása az MLC szubsztráttal szemben a vizsgált Ca<sup>2+</sup> koncentráció tartományban azonban közel kétszer nagyobb volt, mint a nem foszforilált EC MLCK-1 aktivitása. Az EC MLCK-1 splice variáns formáját a p60<sup>Src</sup> két olyan Tyr oldalláncon (Tyr464 és Tyr471) foszforilálta, amelyek a másik, az EC-ben szintén dominánsan expresszáldó, 2-es variánsból hiányoznak. Eredményeink az EC-ben dominánsan expresszáldó két EC MLCK splice variáns eltérő szabályozására utalnak.

Újabb eredmények szerint az EC MLCK c-Abl kinázzal is foszforilálódik négy Tyr oldalláncon, ami szintén növeli a kináz aktivitását. A négy foszforilációs hely az endotél MLCK-ra jellemző N-terminális szakaszon van, és közülük egy, a Tyr464, megegyezik az általunk azonosított egyik Src foszforilációs hellyel, ami csak az 1-es variánsban van jelen [3, 4]. Úgy tűnik, hogy a p60<sup>Src</sup> kizárólag az EC MLCK-1, míg a c-Abl kináz mindkét EC MLCK variáns aktivitását befolyásolja. Az újabb eredmények arra is utalnak, hogy az EC MLCK sejten belüli specifikus lokalizációja és szabályozása/kölcsönható partnerei révén az endotél sejtréteg permeabilitását növelő hatása mellett a barriert erősítő folyamatokban is részt vesz.

#### **4.1.2 Az endotél miozin foszfatáz**

Az MLC defoszforilációját katalizáló endotél miozin foszfatáz vizsgálata során megállapítottuk, hogy a PP1c  $\beta$  izoformája asszociál az EC kontraktilis fehérjéivel, a miozinnal és az aktinnal. A PP1c különböző izoformáinak kapcsolódását a MYPT1 regulátor fehérjével korábban simaizomban vizsgálva az izoformák nagyfokú hasonlósága ellenére azt találták, hogy a miozin foszfatázban a MYPT1 kizárólag a PP1c $\beta$ -hoz kötődik

[5], ami összhangban van az általunk találtakkal. EC-ben a MYPT1 két variánsának kifejeződését mutattuk ki, mindkettő kölcsönhat a PP1c $\beta$ -val. A két variánst ugyanaz a gén kódolja, a V2 formából hiányzó 56 aminosavból álló, az exon15-nek megfelelő szakasz a fehérje középső részére esik. A hiány nem érinti az ankirin ismétlődéseket és a gátló, Thr696-os oldalláncot, sőt a PP1c kötőmotívumot sem. Mégis, a V2 forma immunprecipitációs vizsgálataink alapján valamivel kisebb mértékben kötődött a PP1c $\beta$ -val, ami a két MYPT1 forma eltérő konformációjára utalhat.

Az EC miozin foszfatáz mindkét alegységéről kimutattuk, hogy részt vesznek az EC permeabilitás szabályozásában. A MYPT1 autoinhibíciós doménjét nem tartalmazó mutánsával, ami a PP1c-vel egy folyamatosan aktív miozin foszfatáz formát képezhet, a trombin EC permeabilitást növelő hatását jelentősen mérsékelni tudtuk. Ez egyrészt megerősíti a miozin foszfatáz központi szerepét az EC barrier szabályozásában, másrészt a miozin foszfatáz aktivitás MYPT1-en keresztül történő szabályozását is igazolja.

Az ATP és az adenzin extracelluláris koncentrációja metabolikus stressz vagy a sejtek sérülése következtében nő [6]. Ezzel összhangban, a tüdő gyulladása vagy traumája során a nukleotid bontó CD39 és CD73 enzimek expressziós szintje is emelkedik [7, 8]. Tüdő EC-n végzett vizsgálatok szerint az ATP és az adenzin a barrier funkciót erősíti, többek között MLC foszforiláció szint csökkenést és a miozin foszfatáz szerepére utaló eredményeket írtak le [9, 10]. TER méréseink szerint a PP1c $\beta$ , vagy a MYPT1 hiányában mind az ATP, mind az adenzin barrier erősítő hatása jelentősen mérséklődött, alátámasztva a miozin foszfatáz és a PP1c $\beta$  izoforma esszenciális szerepét az EC kontraktilitás szabályozásában.

A miozin foszfatáz MYPT1 alegysége ankirin ismétlődései és C-terminális régiója révén számos fehérjével létesíthet kölcsönhatást, így az MLC-n kívül más reverzibilis foszforilációval szabályozott fehérjékhez is kötődik, és szabályozza azok foszforilációs szintjét. A MYPT1 variánsai és az ERM család tagjai kötődésében eltéréseket tapasztaltunk, ami az ERM fehérjék és a MYPT1 variánsok sejten belüli eltérő szerepére utal. Az ERM fehérjék aktív konformációjukat konzervált Thr oldalláncuk foszforilációjával érik el, amit a Rho kináz katalizálhat. Így a Rho kináz az MLC, az ERM és a MYPT1 fehérjék foszforilációjával egyaránt a sejtkontrakciót és az ezzel együttjáró permeabilitás növekedést segíti elő, míg eredményeink szerint a miozin foszfatáz az MLC és az ERM fehérjék defoszforilációjával az EC barrier integritás fenntartását/helyreállítását biztosíthatja.



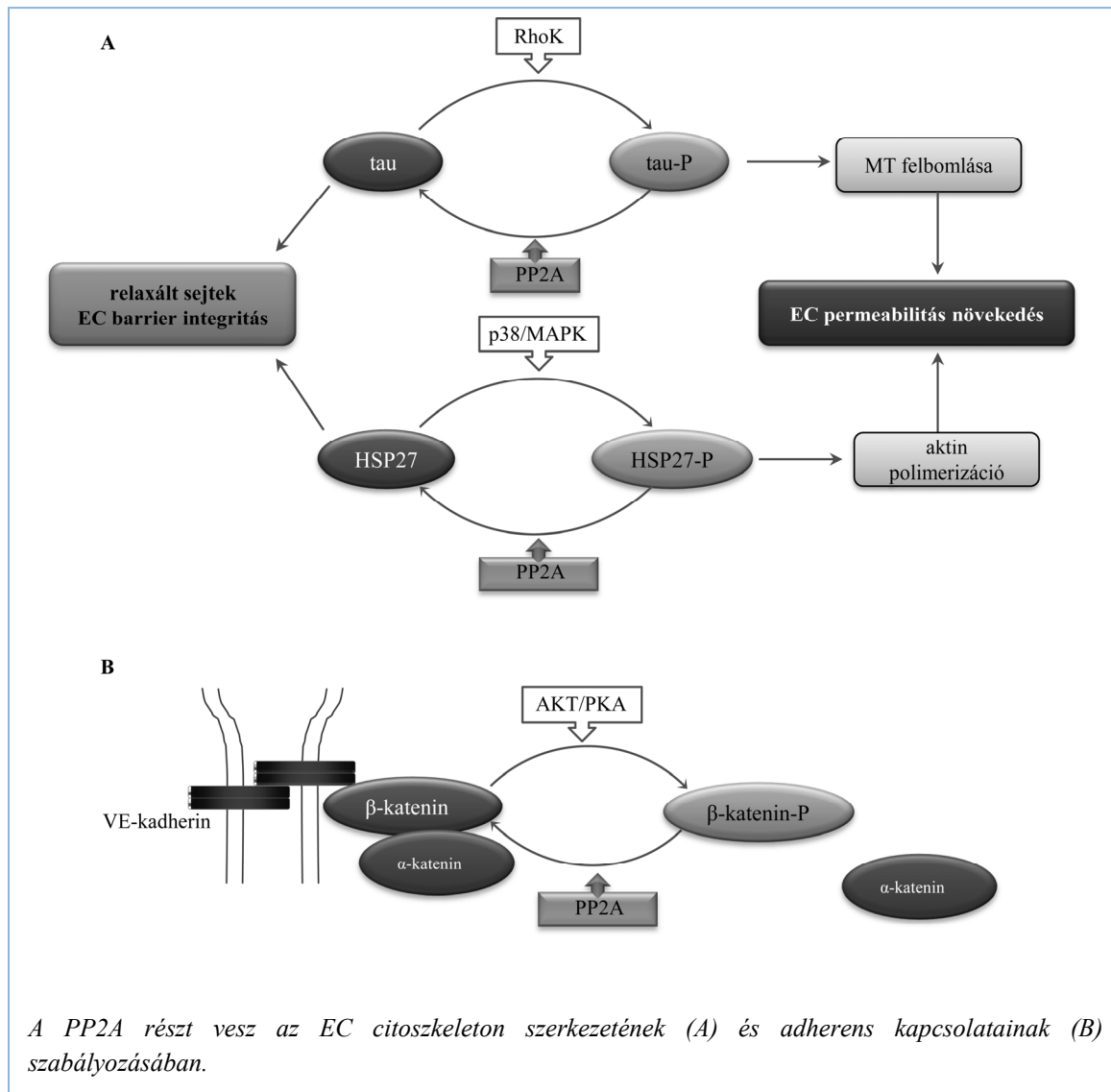
#### 4.2 A protein foszfatáz 2A szerepe az endotél barrier szabályozásában

Endotél sejteken és más sejtípusokon végzett vizsgálatok is a PP2A és a citoskeleton fehérjéi közötti kapcsolatra utaltak. A PP2A specifikus gátlásával igazoltuk, hogy az endotél permeabilitás szabályozásában a miozin foszfatáz mellett a PP2A is részt vesz. A PP2A gátlása az EC kontrakcióját, az F-aktin és a mikrotubulusok átrendeződését váltotta ki. A PP2A-t aktiváló jelátviteli pályákról kevés információ áll rendelkezésre. Ke és mtsai [11] például a Pak1 (P21-activated kinase-1) hatását vizsgálták trombin indukált EC barrier diszfunkcióban, és kimutatták, hogy az aktív Pak1 a barrier diszfunkciót a PP2A aktivitás fokozásával gátolja. A PP2A-t tranziens emlős és adenovírus expressziós rendszerrel over-expresszálva igazoltuk a PP2A aktív szerepét az EC citoskeleton szerkezetének és barrier funkciójának fenntartásában. A mikrotubulusok és a PP2A közötti asszociációt is sikerült igazolnunk. A mikrotubulusok felbomlása együtt jár az MLC foszforilációs szintjének és az F-aktin mennyiségének emelkedésével [12], vagyis a sejtkontrakció/barrier diszfunkció és a mikrotubulusok stabilitása korrelálnak. A PP2A B regulátor alegységeinek családjába tartozó B $\alpha$  csendesítésével kapott eredményeinkből arra következtettünk, hogy a PP2A AB $\alpha$ C holoenzim formája vesz részt a citoskeletonális szubsztrátok defoszforilációjában.

A defoszforilált tau elősegíti a mikrotubulusok kialakulását és stabilizáló hatása is van. A tau foszforilációjában több kináz szerepét is leírták, aminek fontosságát az jelzi, hogy a foszforiláció csökkenti a fehérje mikrotubulusokhoz való kötődési és stabilizáló képességét [13]. A HSP27 a stressz-aktivált p38 MAP kináz kaszkád egyik terminális szubsztrátja, ami foszforilált formájában elősegíti az aktin polimerizációt. Tüdő artéria EC vizsgálatával közvetlen kapcsolatot találtak a p38 MAPK aktiváció és a mikrotubulusok átrendeződése, valamint az EC barrier szabályozás között [14]. EC frakcionálás során mindkét fehérjét a PP2A-val azonos, tubulinban gazdag frakcióban találtuk. Eredményeink szerint a PP2A a tau defoszforilációjával elősegíti a mikrotubulusok stabilitását, másrészt a HSP27 defoszforilációjával mérsékli az F-aktin kialakulását, azaz mindkét folyamat által az EC barrier fenntartását segíti. PP2A nagyszámú B regulátor alegysége révén változatos holoenzim formában fordul elő a sejtekben, ezért számos fehérje partnere között a tau és a HSP27 fehérjéken túl még további, az EC citoskeletonot és permeabilitást befolyásoló fehérje szubsztrátja lehet.

A B $\alpha$  alegység és ezzel együtt a PP2A, az EC adherens kapcsolatok szabályozásában is részt vesz. A PP2A specifikus gátlása és a B $\alpha$  csendesítése egyaránt

az EC adherens sejtkapcsoló fehérjéinek lokalizáció változását váltotta ki, jelezve a sejtkapcsoló struktúrák felbomlását. Hasonlóan, humán keratinociták okadánsavas kezelését követően Serres és mtsai [15] az E-kadherin, Beckers és mtsai [16] HUVEC trombin kezelése után pedig a  $\beta$ -katenin transzlokációját találták a membránból a citoplazmába.



Fehérjekölcsönhatást mutattunk ki a rekombináns  $\beta\alpha$  és az EC VE-kadherin, illetve a  $\beta$ -katenin között. A két vizsgált sejtkapcsoló fehérje kölcsönhatását számos oldalláncuk (Ser/Thr és Tyr) foszforilációja befolyásolja, melyek gátolják vagy stabilizálják kötődésüket [17, 18]. Ezért a sejtkapcsoló struktúrák felbomlása is a protein kináz és foszfatáz aktivitások eltolódott egyensúlyával, a VE-kadherin és/vagy a  $\beta$ -katenin megváltozott foszforilációs szintjével indokolható. A  $\beta$ -katenin Ser552 oldallánc foszforilációja az EC PP2A gátlószerrel való kezelése vagy a  $\beta\alpha$  csendesítést követően az

alacsony kontroll érték többszörösére nőtt és a foszforilált formát döntően a citoplazmában detektáltuk. Karcinoma és simaizom sejtekben a Ser552 foszforilációja és a  $\beta$ -katenin adherens sejtkapcsolatokban való jelenléte közötti kapcsolatot mások is leírták [19, 20]. A PP2A a  $\beta$ -katenin Ser552 oldalláncának defoszforilációjával részt vehet az EC adherens sejtkapcsolatok fenntartásában, ezzel is hozzájárulva a jól működő endotél barrierhez.

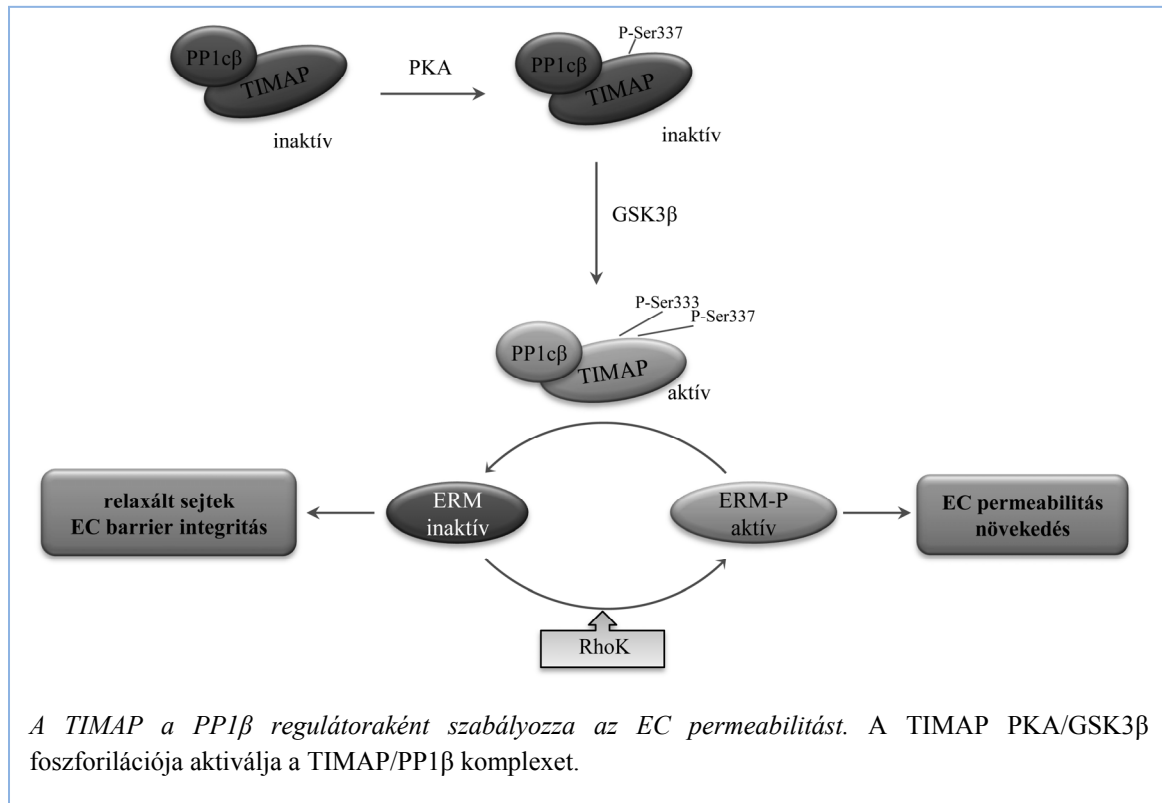
### 4.3 A TIMAP fehérje segíti az EC barrier fenntartását

A TIMAP fehérje expressziós szintje az endotél sejtekben más sejtípusokhoz hasonlítva magas, ám az endotél sejtekben betöltött fiziológiai funkciója és kölcsönható fehérje partnerei tekintetében ismereteink nagyon hiányosak. Tüdő artéria EC-ben a TIMAP-ot elsősorban a sejtmagban és annak közelében a citoplazmában, valamint a plazmamembránban detektáltuk.

A TIMAP MYPT1-gyel mutatott szerkezeti hasonlósága alapján feltételezhető volt, hogy a TIMAP a PP1c regulátora. Ezt endogén fehérjékkel bizonyítottuk, továbbá kimutattuk, hogy a MYPT1-hez hasonlóan a TIMAP a PP1c $\beta$ -val van kölcsönhatásban. A kölcsönhatás erősségét jellemző asszociációs állandó értéke,  $K_a = 1,8 \times 10^6$ , a TIMAP és a PP1c $\beta$  specifikus kölcsönhatását igazolja. A TIMAP PKA és GSK3 $\beta$  kinázokkal foszforilálható [21]. A TIMAP *in vitro* foszforilált formái és a PP1c $\beta$  kötődésének erőssége a nem foszforilált TIMAP-hoz viszonyítva nem változott, és az EC különböző ágensekkel történő kezelése sem befolyásolták a kölcsönhatást. Ezért úgy gondoljuk, hogy a TIMAP a sejten belül a PP1c $\beta$ -val alkotott komplexben lehet jelen, és szabályozza annak aktivitását. *In vitro* foszfatáz aktivitás méréseink során a TIMAP/PP1c $\beta$  csak akkor volt aktív, ha a TIMAP-ot előzetesen PKA-val, majd GSK3 $\beta$ -val is foszforiláltuk, egyébként a TIMAP gátló hatását tapasztaltuk. A MYPT1-PP1c $\beta$  kristályszerkezete alapján modellezték a PP1c $\beta$  és a TIMAP N-terminális részének (51-322 aminosavak) kölcsönhatását [22]. A modellezéshez használt TIMAP szekvencia a két foszforilálható Ser oldalláncot (333 és 337) nem tartalmazza, így azok PP1c $\beta$ -hoz viszonyított elhelyezkedéséről a modell nem ad felvilágosítást.

TER méréseink során azt tapasztaltuk, hogy a TIMAP csendesített sejtek érzékenyebben reagáltak az EC permeabilitást növelő ágensekre, a barriert erősítő szerek hatása pedig mérséklődött a kontrollhoz viszonyítva. A TIMAP tehát az EC barrier fenntartását elősegíti. A TIMAP barriert erősítő hatását az EC lipopoliszacharid indukálta diszfunkciójának vizsgálatával is megerősítették [23]. Az ERM fehérjék foszforilációs

szintjének a TIMAP/PP1c $\beta$  általi szabályozása része lehet a TIMAP barriert védő/erősítő funkciójának. Kölcsönhatást mutattunk ki a moezin és a TIMAP között, és több eredményünk is igazolja, hogy a TIMAP jelenléte és foszforilációja az EC ERM defoszforilációjában esszenciális.

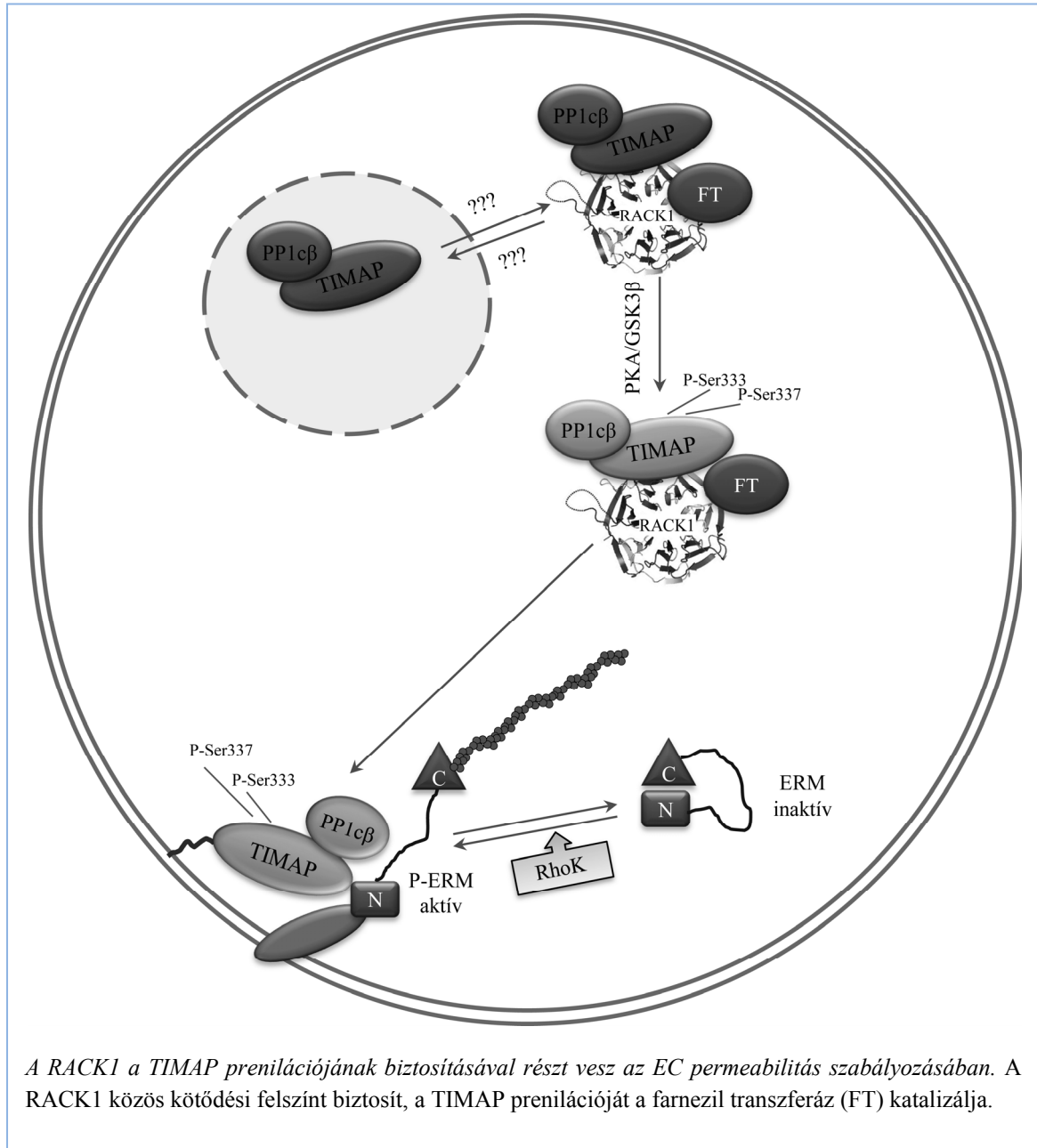


A MYPT1/miozin foszfatáz ugyancsak kölcsönhat az ERM fehérjékkel. A két foszfatáz holoenzim forma között sejtspecifikus, sejten belüli lokalizációbeli, vagy az egyes ERM fehérjékre specializálódott munkamegosztás is elképzelhető, de ennek tisztázása további szisztematikus kísérletes munkát igényel.

Jelenleg a TIMAP/PP1c $\beta$  más, lehetséges szubsztrátjairól keveset tudunk. A LAMR1 laminin receptor egy foszforilálható fehérje, amiről leírták, hogy a TIMAP kölcsönható partnere, továbbá feltételezték, hogy a TIMAP/PP1c szubsztrátja [24]. *In vitro* foszfatáz mérésekre alapozva azonban ugyanaz a munkacsoport legfrissebb munkájában ezt a lehetőséget elvetette [22].

A TIMAP funkciójának további felderítésére végzett vizsgálataink során új kölcsönható partnereként azonosítottuk a RACK1 fehérjét, ami hét WD-domén ismétlődést tartalmazó állványfehérje. A TIMAP-RACK1 komplexekben a PP1c $\beta$ -t is detektáltuk, de igazoltuk, hogy a PP1c $\beta$  és a RACK1 között nincs közvetlen kölcsönhatás.

Kezeletlen sejtekben, ahol a TIMAP a magban, a mag körüli régióban és a plazmamembránban található, a mag körüli citoplazma régióban a két fehérje lokalizációját figyeltük meg. A cAMP/PKA jelátviteli pálya aktiválása után a RACK1 lokalizációja nem változott, a foszforilált TIMAP viszont kiürült a sejtmagból és feldúsult a plazmamembránban, ami összhangban van a TIMAP és a cAMP EC barriert védő hatásával. Hasonlóan, PKA aktiválás hatására a Fyn kináz leválik a RACK1-ről, és foszforilálja az NMDA (N-metil-D-aszpartát) receptort a neuronokban [25].



A RACK1 új kölcsönható partnereként azonosítottuk a farnezil transzferázt. A RACK1 szükséges a farnezil transzferáz és a TIMAP közötti kölcsönhatáshoz. Az adaptor egymáshoz közeli kötődési felszín biztosít az enzim és szubsztrátja számára. A RACK1 a

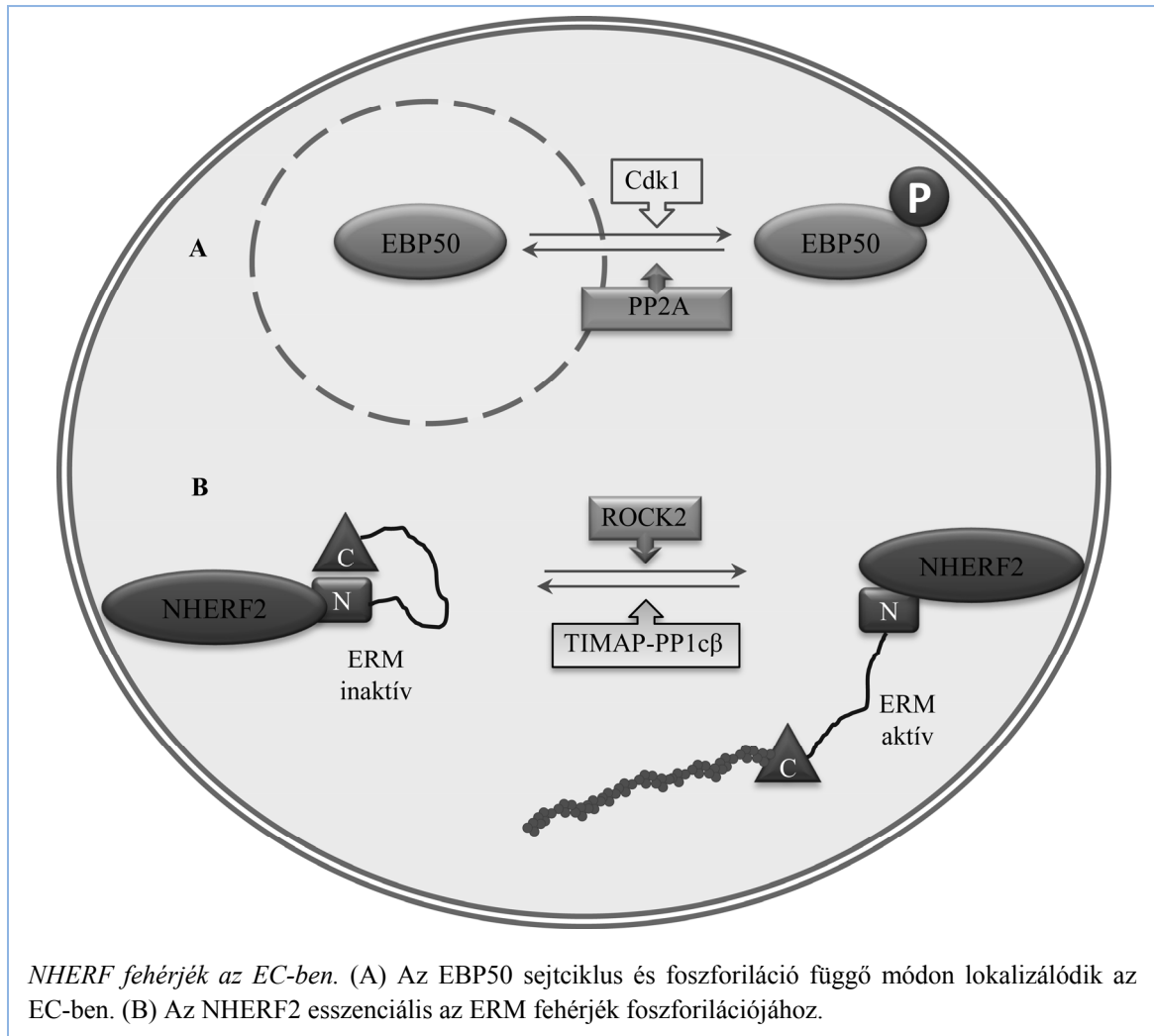
TIMAP prenilációjának és membránhoz való kötődésének biztosításával az EC barrier integritás fenntartásának fontos eleme. A RACK1 csendesített sejtek letapadási és barrier formáló képessége gyengült, a barriert erősítő bioaktív ágensekkel (forskolin és szfingozin 1-foszfát) történő kezelések során a maximális hatás mérséklődött a normál sejtek válaszához képest. Feltételezzük, hogy a RACK1-hoz kötődő TIMAP/PP1c $\beta$  komplexben a TIMAP konformációja foszforilációja következtében változik, és a farnezil transferáz számára a CAAX box elérhetővé válik, és prenilációja lejátszódhat. A módosított TIMAP ezután a PP1c $\beta$ -val együtt a plazmamembránhoz transzlokálódik, ahol a barrier integritásának fenntartásáért felelős szubsztrátjait, például az ERM fehérjéket defoszforilálhatja. A TIMAP magból való kiürülését magyarázhatjuk azzal, hogy a prenilált TIMAP/PP1c $\beta$  távozásával a RACK1 felszínén felszabaduló kötőhelyen a TIMAP/PP1c $\beta$  a magból folyamatosan pótlódhat. A TIMAP magi importjának/exportjának részleteit még nem ismerjük, és az EC sejtmagjában található TIMAP/PP1c $\beta$  esetleges funkcióját/szubsztrátjait sem vizsgáltuk még.

#### 4.4 NHERF fehérjék az EC-ben

Az NHERF1/EBP50 és az NHERF2 C-terminális ERM-kötő doménjük révén kölcsönhatásba léphetnek az ERM fehérjékkel, ezért az az elfogadott nézet, hogy az ERM és membránfehérjék közötti adaptorként funkcionálhatnak citoskeleton-ERM-plazmamembrán fehérje komplexekben.

Az epitél sejtekkel ellentétben, ahol az EBP50-et a citoplazmában detektáltuk, BPAEC-ben és HUVEC-ben interfázisban elsősorban a magban találtuk, az osztódó sejtekben azonban elhagyta a sejtmagot. A profázisban elkezdődött a fehérje citoplazmában való megjelenése és a mitózis további szakaszaiban a citoplazmában volt jelen, majd a citokinézisben visszatért a magba. EC-ben tehát az EBP50 lokalizációja sejtciklus függő. Az EBP50 eltérő lokalizációja az endotél és epitél sejtekben feltehetően más fehérje partnerekkel függhet össze, ami a két sejtípusban eltérő funkciót is sejtet. A mitózis során tapasztalt transzlokációja összefügg a fehérje foszforilációjával. HeLa sejtekben az EBP50 a mitózisban foszforilálódik, amit a Cdk1 katalizál két Ser oldalláncon, és a foszforilációt leíró munkacsoport javaslata szerint a defoszforilációt a PP1 és PP2A foszfatázok katalizálhatják [26]. Specifikus gátlószerek alkalmazásával a PP2A részvételét valószínűsítettük, a PP1 lehetséges szerepét azonban kizártuk. Kimutattuk a PP2A AB $\alpha$ C holoenzim és az EBP50 kötődését, továbbá a PP2Ac és az

EBP50 ko-lokalizációját a mitotikus sejtekben. A Cdk1 szubsztrátjainak defoszforilációja a mitózisból való kilépés feltétele, ezért az EBP50 PP2A általi defoszforilációja is szükséges lehet az EC metafázisból a citokinézisbe való átmenete során. Eredményeink tehát arra utalnak, hogy az EBP50 az EC sejtciklus és proliferáció szabályozásában játszik fontos szerepet.



Az EBP50 szekvenciájában a PDZ és ERM-kötő doménekben számos génmutációkat azonosítottak humán emlő tumoros sejtvonalakban [27], az eredmények arra utalnak, hogy az EBP50 maga is egy tumor szupresszor lehet. További vizsgálatokkal kimutatták, hogy EBP50 csendesített emlő tumoros sejtekben megemelkedett a sejtproliferáció szintje, alátámasztva az EBP50 tumor szupresszor szerepét [28]. Mindezeket összevetve saját eredményeinkkel felmerülhet annak lehetősége, hogy a daganatos sejtek osztódásában az EBP50 foszforilációja is módosulhat.

Az EBP50 ERM-kötő motívuma alapján kézenfekvőnek tűnt az ERM fehérjékkel való kölcsönhatás vizsgálata. Ez azonban az EBP50 tekintetében zsákutcának bizonyult,

mivel tüdő artéria EC-ben az ERM fehérjék preferált NHERF partnere az NHERF2. Az ERM-NHERF2 kölcsönhatásnak az ERM foszforilációjában van jelentősége. Bizonyítottuk, hogy az NHERF2 az ERM aktiválásához elengedhetetlen, amit eredményeinkre alapozva azzal indokolhatunk, hogy az adaptor biztosítja az ERM és a foszforilációt katalizáló ROCK2 közötti kölcsönhatást. Az ERM közvetlenül kapcsolódhat az NHERF2 C-terminális ERM kötő doménjéhez. A kináz és az NHERF2 közötti kölcsönhatás sem feltétlenül indirekt, de ennek megerősítése további vizsgálatokat igényel.

Az NHERF2 ERM foszforilációra gyakorolt hatásán keresztül szabályozhatja az EC citoszkeletonjának átrendeződését. Az NHERF2 csendesítése vagy overexpressziója a filopódiumok kialakulását ellentétesen befolyásolta, a depletált sejteken nem, vagy alig láttunk filopódiumot, az adaptor fehérjét túltermelő EC-n viszont nagyszámban detektáltuk. Ez az EC barrier kialakulását, a sejtek adhézis és migrációs képességét is befolyásolta. Mutáns PDZ domént tartalmazó NHERF2-t expresszáló fibrosarcoma sejtvonalon csökkent lamellopódium képződést és migrációt detektáltak [29].

Az NHERF2 az angiogenezis szabályozásában is részt vesz. Kontroll EC néhány óra alatt sejthálózatokat, csövecskéket hozott létre Matrigelen (bazális membránkivonat), miközben az ERM foszforiláció emelkedését detektáltuk. Az NHERF2 csendesített sejtek viszont aggregátumokban gyűltek össze, és az ERM foszforilációs szintje sem emelkedett, ami azt bizonyítja, hogy az NHERF2 hiányában a sejtek nem képesek az angiogenezisre. Májsejtes karcinoma sejtek (HCC) invazív jellege és az ezrin hiperfoszforilációja között korrelációt találtak, továbbá, ha a ROCK gátlásával csökkentették az ezrin foszforilációját, az blokkolta a HCC invazivitását [30]. Ezért lehetségesnek tartjuk, hogy az NHERF2 az ERM foszforiláció modulátoraként befolyásolhatja a daganatos sejtek invazív tulajdonságát.

Eredményeink szerint az EBP50 és az NHERF2 funkciója és kölcsönható partnerei az endotél sejtekben eltérőek. Az EBP50 a sejtciklus szabályozásában játszik szerepet. Az NHERF2 az ERM fehérjék preferált kölcsönható partnere, biztosítja azok foszforilációját és ezzel a plazmamembrán-ERM-aktin kölcsönhatást.



#### 4.5 Az eredmények lehetséges hasznosítása

Munkánk alapkutatási jellegéből fakadóan eredményeink közvetlen klinikai hasznosításra nem alkalmasak. A protein kinázok és foszfatázok működésének célzott befolyásolását ma már számos betegség gyógyításában felhasználják, illetve intenzív kutatások folynak új, specifikus aktivátoraik és gátlószereik felismerésére és terápiás céllal történő alkalmazására. A munkát nehezítik a kináz és foszfatáz családokon belüli hasonlóságok az egyes enzimek között, ezért az egyes sejtfolyamatok szabályozásában résztvevő konkrét kináz vagy foszfatáz enzimek típusának, izoformájának és kölcsönható fehérjepartnereinek azonosítása rendkívül fontos. Eredményeink ebben a tekintetben bírhatnak jelentőséggel. Az általunk vizsgált protein kinázok és foszfatázok, valamint kölcsönható fehérje partnereik a tüdő artéria EC esszenciális élettani funkciója, az érpermeabilitás sokoldalú, több jelátviteli pályán keresztül megvalósuló szabályozásának meghatározó résztvevői. Az EC barrier a sejt különböző részeihez köthető összetett szabályozó folyamataiban résztvevő, általunk jellemzett fehérjék ezért az endotél sejtek működési zavaraival kapcsolatos betegségek gyógyítására irányuló kutatásokban célfehérjékként szolgálhatnak. A vizsgált fehérjék szintjének up- illetve down-regulációja, vagy reverzibilis foszforilációval történő módosításuk az EC funkcióit módosítják, vagy szélsőséges esetben patológiásan megváltoztatják. Ezért eredményeink, további célzott vizsgálatok után, betegségek diagnosztikájában is felhasználhatóak lehetnek.

### 5. ÖSSZEFOGLALÁS

A vaszkuláris endotél sejtek integritása a tüdő működésében meghatározó jelentőségű. Az integritás sérülése, paracelluláris rések kialakulása, ezzel együtt a permeabilitás szignifikáns és hosszan tartó megemelkedése a tüdő gyulladási betegségeinek egyik legfőbb tünete, amelyek ma is magas halálozási rátával bírnak. A tüdő artéria endotél sejtek barrier funkciójával összefüggésben protein kinázokat és foszfatázokat tanulmányoztunk. Munkánk igazolja, hogy számos fehérje összehangolt, különböző jelátviteli folyamatokon keresztül megvalósuló reverzibilis foszforilációja bír nagy jelentőséggel az endotél barrier kialakulásában és fenntartásában. Kísérleteinkkel új fehérje-fehérje kölcsönhatásokat is azonosítottunk, amelyek többek között néhány adaptor fehérje részvételét is bizonyították az endotél permeabilitás és az angiogenesis szabályozásában.

**Az értekezésben bemutatott új eredmények:**

1. Az endotél sejtekben expresszálandó MLCK enzim egyedi, N-terminális régiója Tyr oldalláncokon foszforilálódik. Ezzel aktivitása fokozódik, ami az enzim egy új, korábban nem ismert szabályozási lehetőségére hívja fel a figyelmet.
2. Jellemeztük az endotél miozin foszfatáz PP1c $\beta$  katalitikus és MYPT1 regulátor alegységét és igazoltuk szabályozó szerepüket az endotél barrier funkcióban.
3. Bizonyítottuk egy másik jelentős Ser/Thr-oldalláncokra specifikus protein foszfatáz, a PP2A részvételét az endotél citoszkeleton szabályozásában és két, a citoszkeletonhoz kapcsolódó szubsztrát, a tau és a HSP27 fehérjék defoszforilációjában.
4. Az endotél sejtek jól működő adherens kapcsolataihoz szükséges a PP2A aktivitás, ezzel összhangban fehérje-fehérje kölcsönhatásokat azonosítottunk a foszfatáz B $\alpha$  regulátor alegysége és a VE-kadherin valamint a  $\beta$ -katenin között, ez utóbbi fehérje Ser552 oldalláncának defoszforilációjában valószínűsítettük a PP2A szerepét.
5. Igazoltuk, hogy az endotél sejtekben magas szinten expresszálandó TIMAP fehérje a PP1c $\beta$  regulátor alegysége és a TIMAP az endotél barriert védő funkciót tölt be a sejtekben. A TIMAP/PP1c $\beta$  holoenzim katalizálja az ERM fehérjék defoszforilációját, aktivitása a TIMAP foszforilációjával szabályozott.
6. Felismertük a RACK1 állványfehérje szerepét a TIMAP prenilációjában és plazmamembránhoz történő transzlokációjában, valamint a RACK1 új kölcsönható partnereiként azonosítottuk a TIMAP és farnezil transzferáz fehérjéket.
7. Az endotél sejtekben alig vizsgált NHERF fehérjecsald két tagjáról, az EBP50 és NHERF2 fehérjéről kimutattuk, hogy funkciójuk és fehérje partnereik különböznek. Az EBP50 minden bizonnyal az endotél sejtciklus szabályozásában vesz részt, míg az NHERF2 az ERM fehérjék foszforilációját segíti és ezzel az endotél sejtek barrier funkciójában és az angiogenezisben játszik szerepet.

## 6. IRODALOMJEGYZÉK

1. Dudek SM, Birukov KG, Zhan X, Garcia JG: **Novel interaction of cortactin with endothelial cell myosin light chain kinase.** *Biochem Biophys Res Commun* 2002, **298**:511-519.
2. Barfod ET, Moore AL, Van de Graaf BG, Lidofsky SD: **Myosin light chain kinase and Src control membrane dynamics in volume recovery from cell swelling.** *Mol Biol Cell* 2011, **22**:634-650.
3. Dudek SM, Chiang ET, Camp SM, Guo Y, Zhao J, Brown ME, Singleton PA, Wang L, Desai A, Arce FT, et al: **Abl tyrosine kinase phosphorylates nonmuscle Myosin light chain kinase to regulate endothelial barrier function.** *Mol Biol Cell* 2010, **21**:4042-4056.
4. Zhao J, Singleton PA, Brown ME, Dudek SM, Garcia JG: **Phosphotyrosine protein dynamics in cell membrane rafts of sphingosine-1-phosphate-stimulated human endothelium: role in barrier enhancement.** *Cell Signal* 2009, **21**:1945-1960.
5. Shimizu H, Ito M, Miyahara M, Ichikawa K, Okubo S, Konishi T, Naka M, Tanaka T, Hirano K, Hartshorne DJ, et al.: **Characterization of the myosin-binding subunit of smooth muscle myosin phosphatase.** *J Biol Chem* 1994, **269**:30407-30411.
6. Zimmermann H: **Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides.** *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2000, **362**:299-309.
7. Eckle T, Fullbier L, Wehrmann M, Khoury J, Mittelbronn M, Ibla J, Rosenberger P, Eltzschig HK: **Identification of ectonucleotidases CD39 and CD73 in innate protection during acute lung injury.** *J Immunol* 2007, **178**:8127-8137.
8. Reutershan J, Vollmer I, Stark S, Wagner R, Ngamsri KC, Eltzschig HK: **Adenosine and inflammation: CD39 and CD73 are critical mediators in LPS-induced PMN trafficking into the lungs.** *FASEB J* 2009, **23**:473-482.
9. Kolosova IA, Mirzapioazova T, Adyshev D, Usatyuk P, Romer LH, Jacobson JR, Natarajan V, Pearse DB, Garcia JG, Verin AD: **Signaling pathways involved in adenosine triphosphate-induced endothelial cell barrier enhancement.** *Circ Res* 2005, **97**:115-124.
10. Umapathy NS, Fan Z, Zemskov EA, Alieva IB, Black SM, Verin AD: **Molecular mechanisms involved in adenosine-induced endothelial cell barrier enhancement.** *Vascul Pharmacol* 2010, **52**:199-206.
11. Ke Y, Lum H, Solaro RJ: **Inhibition of endothelial barrier dysfunction by P21-activated kinase-1.** *Can J Physiol Pharmacol* 2007, **85**:281-288.
12. Verin AD, Birukova A, Wang P, Liu F, Becker P, Birukov K, Garcia JG: **Microtubule disassembly increases endothelial cell barrier dysfunction: role of MLC phosphorylation.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001, **281**:L565-574.
13. Biernat J, Gustke N, Drewes G, Mandelkow EM, Mandelkow E: **Phosphorylation of Ser262 strongly reduces binding of tau to microtubules: distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding.** *Neuron* 1993, **11**:153-163.
14. Birukova AA, Birukov KG, Gorshkov B, Liu F, Garcia JG, Verin AD: **MAP kinases in lung endothelial permeability induced by microtubule disassembly.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005, **289**:L75-84.
15. Serres M, Filhol O, Lickert H, Grangeasse C, Chambaz EM, Stappert J, Vincent C, Schmitt D: **The disruption of adherens junctions is associated with a decrease of E-cadherin phosphorylation by protein kinase CK2.** *Exp Cell Res* 2000, **257**:255-264.
16. Beckers CM, Garcia-Vallejo JJ, van Hinsbergh VW, van Nieuw Amerongen GP: **Nuclear targeting of beta-catenin and p120ctn during thrombin-induced endothelial barrier dysfunction.** *Cardiovasc Res* 2008, **79**:679-688.
17. Valenta T, Hausmann G, Basler K: **The many faces and functions of beta-catenin.** *EMBO J* 2012, **31**:2714-2736.
18. Bazzoni G, Dejana E: **Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis.** *Physiol Rev* 2004, **84**:869-901.

19. Fang D, Hawke D, Zheng Y, Xia Y, Meisenhelder J, Nika H, Mills GB, Kobayashi R, Hunter T, Lu Z: **Phosphorylation of beta-catenin by AKT promotes beta-catenin transcriptional activity.** *J Biol Chem* 2007, **282**:11221-11229.
20. Taurin S, Sandbo N, Yau DM, Sethakorn N, Dulin NO: **Phosphorylation of beta-catenin by PKA promotes ATP-induced proliferation of vascular smooth muscle cells.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2008, **294**:C1169-1174.
21. Li L, Kozlowski K, Wegner B, Rashid T, Yeung T, Holmes C, Ballermann BJ: **Phosphorylation of TIMAP by glycogen synthase kinase-3beta activates its associated protein phosphatase 1.** *J Biol Chem* 2007, **282**:25960-25969.
22. Shopik MJ, Li L, Luu HA, Obeidat M, Holmes CF, Ballermann BJ: **Multi-directional function of the protein phosphatase 1 regulatory subunit TIMAP.** *Biochem Biophys Res Commun* 2013, **435**:567-573.
23. Poirier C, Gorshkov BA, Zemskova MA, Bogatcheva NV, Verin AD: **TIMAP protects endothelial barrier from LPS-induced vascular leakage and is down-regulated by LPS.** *Respir Physiol Neurobiol* 2011, **179**:334-337.
24. Kim K, Li L, Kozlowski K, Suh HS, Cao W, Ballermann BJ: **The protein phosphatase-1 targeting subunit TIMAP regulates LAMR1 phosphorylation.** *Biochem Biophys Res Commun* 2005, **338**:1327-1334.
25. Yaka R, Thornton C, Vagts AJ, Phamluong K, Bonci A, Ron D: **NMDA receptor function is regulated by the inhibitory scaffolding protein, RACK1.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, **99**:5710-5715.
26. He J, Lau AG, Yaffe MB, Hall RA: **Phosphorylation and cell cycle-dependent regulation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger regulatory factor-1 by Cdc2 kinase.** *J Biol Chem* 2001, **276**:41559-41565.
27. Dai JL, Wang L, Sahin AA, Broemeling LD, Schutte M, Pan Y: **NHERF (Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger regulatory factor) gene mutations in human breast cancer.** *Oncogene* 2004, **23**:8681-8687.
28. Pan Y, Wang L, Dai JL: **Suppression of breast cancer cell growth by Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger regulatory factor 1 (NHERF1).** *Breast Cancer Res* 2006, **8**:R63.
29. Theisen CS, Wahl JK, 3rd, Johnson KR, Wheelock MJ: **NHERF links the N-cadherin/catenin complex to the platelet-derived growth factor receptor to modulate the actin cytoskeleton and regulate cell motility.** *Mol Biol Cell* 2007, **18**:1220-1232.
30. Chen Y, Wang D, Guo Z, Zhao J, Wu B, Deng H, Zhou T, Xiang H, Gao F, Yu X, et al: **Rho kinase phosphorylation promotes ezrin-mediated metastasis in hepatocellular carcinoma.** *Cancer Res* 2011, **71**:1721-1729.

## KÖZLEMÉNYEK

**Az értekezés alapjául szolgáló közlemények*****Az értekezést megalapozó összefoglaló közlemény***

**Csortos C, Kolosova I, Verin AD:** Regulation of vascular endothelial cell barrier function and cytoskeleton structure by protein phosphatases of the PPP family  
AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY-LUNG CELLULAR AND MOLECULAR PHYSIOLOGY 293:(4) pp. L843-L854. (2007)  
IF: 4,214

***Az értekezést megalapozó kísérletes közlemények***

**Boratkó A, Csortos C:** NHERF2 is crucial in ERM phosphorylation in pulmonary endothelial cells  
CELL COMMUNICATION AND SIGNALING 11:(1), 99 (2013)  
IF: 5,093 (2012)

**Boratkó A, Gergely P, Csortos C:** RACK1 is involved in endothelial barrier regulation via its two novel interacting partners  
CELL COMMUNICATION AND SIGNALING 11:(2) pp. 1-14. (2013)  
IF: 5,093 (2012)

**Kása A, Czikora I, Verin AD, Gergely P, Csortos C:** Protein phosphatase 2A activity is required for functional adherent junctions in endothelial cells  
MICROVASCULAR RESEARCH 1: p. 1. (2013)  
IF: 2,929 (2012)

**Boratkó A, Gergely P, Csortos C:** Cell cycle dependent association of EBP50 with protein phosphatase 2A in endothelial cells  
PLOS ONE 7:(4 / e35595) pp. 1-10. (2012)  
IF: 3,73

**Kim K, Csortos C, Czikora I, Fulton D, Umaphathy NS, Olah G, Verin AD:** Molecular characterization of myosin phosphatase in endothelium  
JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY 227:(10) pp. 1701-1708. (2012)  
IF: 4,218

**Czikora I, Kim K, Kása A, Bécsi B, Verin AD, Gergely P, Erdődi F, Csortos C:** Characterization of the effect of TIMAP phosphorylation on its interaction with protein phosphatase 1  
BIOCHIMIE 93:(7) pp. 1139-1145. (2011)  
IF: 3,022

**Csortos C, Czikora I, Bogatcheva NV, Adyshev DM, Poirier C, Olah G, Verin AD:** TIMAP is a positive regulator of pulmonary endothelial barrier function  
AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY-LUNG CELLULAR AND MOLECULAR PHYSIOLOGY 295:(3) pp. L440-L450. (2008)  
IF: 3,924

Tar\* K, **Csortos\*** C, Czikora I, Oláh G, Ma SF, Wadgaonkar R, Gergely P, Garcia JGN, Verin AD: Role of Protein Phosphatase 2A in The Regulation of Endothelial Cell Cytoskeleton Structure

JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY 98:(4) pp. 931-953. (2006) (\*első szerzők)

IF: 3,409

Tar K, Birukova AA, **Csortos** C, Bakó É, Garcia JGN, Verin AD: Phosphatase 2A is involved in endothelial cell microtubule remodeling and barrier regulation

JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY 92:(3) pp. 534-546. (2004)

IF: 2,946

Birukov KG, **Csortos** C, Marzilli L, Dudek S, Ma SF, Bresnick AR, Verin AD, Cotter RJ, Garcia JGN: Differential regulation of alternatively spliced endothelial cell myosin light chain kinase isoforms by p60(Src)

JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 276:(11) pp. 8567-8573. (2001)

IF: 7,258

Verin AD, **Csortos** C, Durbin SD, Aydanyan A, Wang PY, Patterson CE, Garcia JGN: Characterization of the protein phosphatase 1 catalytic subunit in endothelium: Involvement in contractile responses

JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY 79:(1) pp. 113-125. (2000)

IF: 2,775

Garcia JGN, Verin AD, Schaphorst K, Siddiqui R, Patterson CE, **Csortos** C, Natarajan V: Regulation of endothelial cell myosin light chain kinase by Rho, cortactin, and p60(src)

AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY-LUNG CELLULAR AND MOLECULAR PHYSIOLOGY 276:(6) pp. L989-L998. (1999)

IF: 3,147

### **További publikációk**

Kim K, Adyshev DM, Kása A, Zemskov EA, Kolosova IA, **Csortos** C, Verin AD: Putative protein partners for the human CPI-17 protein revealed by bacterial two-hybrid screening

MICROVASCULAR RESEARCH 88:(1) pp. 19-24. (2013)

IF: 2,929 (2012)

Zákány R, Sziogyártó Z, Matta C, Juhász T, **Csortos** C, Szűcs K, Czifra G, Bíró T, Módis L, Gergely P: Hydrogen peroxide inhibits formation of cartilage in chicken micromass cultures and decreases the activity of clacineurin: implication of ERK1/2 and Sox9 pathways

EXPERIMENTAL CELL RESEARCH 305:(1) pp. 190-199. (2005)

IF: 4,148

Kiss E, Murányi A, **Csortos** C, Gergely P, Ito M, Hartshorne J, Erdódi F: Integrin-linked kinase phosphorylates the myosin phosphatase target subunit at the inhibitory site in platelet cytoskeleton

BIOCHEMICAL JOURNAL 365: pp. 79-87. (2002)

IF: 4,589

**Csortos C**, Lazar V, Garcia JG: Screening cDNA libraries using partial probes to isolate full-length cDNAs from vascular cells

In: Baker AH (szerk.) *Vascular Disease: Methods Molecular Medicine*, Vol. 30.

Totowa: Humana Press, 1999. pp. 59-72. (ISBN:978-0-89603-731-1)

**Csortos C**, Zolnierowicz S, Bakó É, Durbin SD, DePaoliRoach AA: High complexity in the expression of the B' subunit of protein phosphatase 2A(0) - Evidence for the existence of at least seven novel isoforms

*JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 271:(5) pp. 2578-2588. (1996)

IF: 7,452

Pitcher JA, Payne ES, **Csortos C**, DePaoli-Roach AA, Lefkowitz RJ: The G-protein-coupled receptor phosphatase - a protein phosphatase type 2a with a distinct subcellular-distribution and substrate-specificity

*PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA* 92:(18) pp. 8343-8347. (1995)

IF: 10,52

**Csortos C**, Tóth A, Erdódi F: Identification of serine/threonine protein phosphatase catalytic subunits by immunoblotting with type-specific antipeptide antibodies

In: Jenei A (szerk.)

*EMBO Practical Course Handbook on Signal Transduction and Cell Surface Structure*  
Debrecen: Debreceni Egyetem, 1995. pp. 31-36.

Zolnierowicz S, **Csortos C**, Bondor J, Verin A, Mumby MC, DePaoli-Roach AA: Diversity in the regulatory B-subunits of protein phosphatase 2A - identification of a novel isoform highly expressed in brain

*BIOCHEMISTRY* 33:(39) pp. 11858-11867. (1994)

IF: 5,234

DePaoli-Roach AA, Park IK, Cerovsky V, **Csortos C**, Durbin SD, Kuntz MJ, Sitikov A, Tang PM, Verin AD, Zolnierowicz S: Serine/threonine protein phosphatases in the control of cell function

*ADVANCES IN ENZYME REGULATION* 34: pp. 199-224. (1994)

IF: 2,268

Erdódi F, **Csortos C**, Sparks L, Murányi A, Gergely P: Purification and characterization of 3 distinct types of protein phosphatase catalytic subunits in bovine platelets

*ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS* 298:(2) pp. 682-687. (1992)

IF: 2,435

**Csortos C**, Farkas I, Sparks L, Bányasz T, Kovacs T, Gergely P: Phosphorylase-phosphatase activities of rat-liver in streptozotocin-diabetes

*BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA* 1052: pp. 235-241. (1990)

IF: 2,411

**Csortos C**, Matko J, Erdodi F, Gergely P: Interaction of the catalytic subunits of protein phosphatase-1 and phosphatase-2A with inhibitor-1 and inhibitor-2 - a fluorescent study with sulfhydryl-specific pyrene maleimide

*BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS* 169:(2) pp. 559-564. (1990)

IF: 3,606

Sipos A, **Csortos** C, Sipka S, Gergely P, Sonkoly I, Szegedi G: The antigen receptor specificity of antigranulocyte antibodies in patients with SLE  
IMMUNOLOGY LETTERS 19: pp. 329-334. (1988)  
IF: 1,137

Farkas I, Toth B, Vereb G, **Csortos** C, Gergely P: Activation-dephosphorylation of rabbit muscle glycogen-synthase by the catalytic subunits of protein phosphatase-1 and phosphatase-2A  
ACTA BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA HUNGARICA 23: pp. 231-246. (1988)  
IF: 0,431

Erdodi F, **Csortos** C, Bot G, Gergely P: Separation of rabbit liver latent and spontaneously active phosphorylase phosphatases by chromatography on heparin-sepharose  
BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS 128:(2) pp. 705-712. (1985)  
IF: 3,597

Erdodi F, **Csortos** C, Bot G, Gergely P: Effects of acidic and basic macromolecules on the activity of protein phosphatase-1  
BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA 827:(1) pp. 23-29. (1985)  
IF: 2,717

*Az értekezést megalapozó közleményeket közlő folyóiratok impakt faktora:* **51,758**  
*Független hivatkozások száma:* 228

*Az összes közleményre a közlő folyóiratok impakt faktora:* **105,2**  
*Független hivatkozások száma:* 813



### **Köszönetnyilvánítás**

Hálásan köszönöm Dr. Gergely Pál, Dr. Virág László, Dr. Erdódi Ferenc és Dr. Dombrádi Viktor, a Debreceni Egyetem Orvosi Vegytani Intézet professzorainak, hogy munkámat folyamatosan támogatták és segítették, példát mutattak az oktató- és kutatómunkában és bíztattak az értekezés elkészítésére. Iránymutatásukkal szerezhettem meg ismereteimet a protein kinázokról és foszfatázokról.

Az értekezés nem készülhetett volna el Dr. Tar Krisztina, Dr. Czikora István, Dr. Boratkó Anita és Dr. Kása Anita munkája nélkül, akiknek segítséget nyújthattam PhD fokozatuk megszerzésében és Boratkó Anitával továbbra is szerencsém van együtt dolgozni.

Köszönöm az Orvosi Vegytani Intézetben minden volt és jelenlegi kollégám, közülük is kiemelve Rónai Tamásné, Dr. Németh Árpádné, Kovács Éva, Dembrovszkiné Kovács Ella és Balogh István mindenkori segítségét, a jó munkahelyi légkört.

Sokat tanultam külföldi tanulmányútjaim során. Dr. Anna DePaoli-Roach laboratóriumában lehetőségem nyílt elsajátítani a molekuláris biológia alapjait. Dr. Joe Garcia és Dr. Alexander Verin laboratóriumában kezdtem el foglalkozni az endotél sejtek molekuláris szintű vizsgálatával, a velük folytatott eredményes kollaboráció nagyban segítette az értekezésben összefoglalt eredmények megszületését. Köszönet külföldi kollégáimnak, akik közül Dr. Anna Birukova, Dr. Konstantin Birukov és Dr. Kyung-Mi Kim nevét szeretném kiemelni.

Köszönöm Családom, szüleim és két lányom szeretetét, önzetlen támogatását és biztatását.