

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**A TIMAP FEHÉRJE SZEREPE A PROTEIN FOSZFATÁZ 1 ÉS AZ
ENDOTÉL BARRIER FUNKCIÓ SZABÁLYOZÁSÁBAN**

Czikora István

Témavezető: Dr. Csontos Csilla



DEBRECENI EGYETEM
Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2011

A TIMAP fehérje szerepe a protein foszfatáz 1 és az endotél barrier funkció szabályozásában

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
az Elméleti Orvostudományok tudományágban

Írta: Czikora István okleveles vegyész

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

Témavezető: Dr. Csontos Csilla

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora
tagok: Dr. Balla András, Ph.D.
Dr. Szatmári István, Ph.D.

A doktori szigorlat időpontja: 2011. július 6.

Az értekezés bírálói:

Dr. Sipeki Szabolcs, Ph.D.
Dr. Penyige András, Ph.D.

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora
tagok: Dr. Balla András, Ph.D.
Dr. Szatmári István, Ph.D.
Dr. Sipeki Szabolcs, Ph.D.
Dr. Penyige András, Ph.D.

Az értekezés védésének időpontja: 2011. július 6. 13:00

I. sz. Belgyógyászati Klinika tanterme

1. BEVEZETÉS

1.1. Fehérjék reverzibilis foszforilációja

A sejtek biokémiai folyamatainak egyik nagyon fontos szabályozása a fehérjék foszforilálódásán és defoszforilálódásán keresztül történik. A két egymással szoros kapcsolatban lévő, de ellentétes mechanizmusért a protein kinázok és protein foszfatázok a felelősek. A foszfátcsoport fehérjelánchoz történő kovalens kapcsolása, illetve lehasítása allosztérikusan regulálhatja az adott fehérje biológiai aktivitását, pl. enzimaktivitását, gátolhatja vagy aktiválhatja azok katalitikus centrumát, így egyes enzimek be- és kikapcsolhatók, fehérje komplexek keletkezhetnek, illetve bomolhatnak fel. A szubsztrát fehérjék foszforiláltsági fokát a kinázok és foszfatázok aktivitásának egymáshoz való viszonya határozza meg. A humán genomban közel 150 foszfatáz van kódolva és a csoportosításuk szubsztrát specificitásuk, reakciómechanizmusuk és aminosav szekvenciájuk alapján történhet.

1.2. A protein foszfatázok csoportosítása és jellemzésük

A protein foszfatázok csoportosíthatóak aszerint, hogy a foszfofehérjék milyen aminosav oldalláncát defoszforilálják. Eszerint a foszfatázok egy csoportja a fehérjék foszfoszerin és foszfortreonin oldalláncát defoszforilálja, külön csoportba tartoznak a fehérjék foszfortirozin oldalláncát defoszforilálók, valamint egy harmadik családba soroljuk a kettős specificitású foszfatázokat, amelyek a fehérjék Ser/Thr és Tyr oldalláncairól egyaránt képesek a foszfátot lehasítani. A szubsztrátspecificitás és a hőstabil inhibitor fehérjékkel szembeni érzékenységük alapján a Ser/Thr specifikus foszfatázok két nagy csoportba sorolhatóak, protein foszfatáz-1 (PP1) és -2 (PP2) típus.

A Ser/Thr specifikus foszfatázok szerkezete, szekvenciája és a katalitikus mechanizmus alapján történő felosztása szerint megkülönböztetünk foszfoprotein foszfatázokat (PPP) és fémion-függő protein foszfatázokat (PPM). A Tyr specifikus foszfatázok illetve kettős specificitású foszfatázok egy külön géncsaládot alkotnak (PTP).

A Ser/Thr oldalláncokra specifikus foszfatázok funkciójának betöltéséhez a katalitikus alegységekhez további regulátor alegység(ek), illetve más kölcsönható fehérjék kapcsolódhatnak, hogy a megfelelő helyre és/vagy szubsztrátokhoz irányítsák azokat és szabályozzák aktivitásukat. A sejtekben a PP1 és PP2A, valamint a PP2B foszfatázok a legelterjedtebb és leginkább vizsgált Ser/Thr specifikus foszfatázok.

1.3. Protein foszfatáz 1

A PP1 a Ser/Thr foszfatázok egyik legjelentősebb képviselője, amely az eukarióta sejtekben szinte mindenütt jelentős mértékben expresszálódik. A PP1 a foszforiláz kináz α és β alegységei közül a β alegységet (míg a PP2 foszfatázok a foszforiláz kináz α alegységet) defoszforilálja specifikusan, aktivitása I-1 és I-2 hőstabil inhibitor fehérjékkel gátolható. Kiemelkedő szerepet tölt be a sejtekben végbemenő folyamatok nagy többségében, mint például a sejtciklusban, az apoptózisban, a fehérjeszintézisben, sejtranszformációban, a citoszkeleton újrarendeződésében, vagy a membrán receptorok és csatornák szabályozásában. A nagyszámú biológiai folyamat szabályozásában való részvétellel összhangban van a PP1 széles szubsztrát specifitása. A humán PP1 katalitikus alegységének három izoformája ismert: PP1 α , PP1 β és PP1 γ . A γ izoformának további két splice variánsa van: γ 1 és γ 2. A különféle regulátor alegységek a holoenzimet a sejtek alkotóelemeihez irányíthatják, szabályozhatják a szubsztrát specifitást, fokozva vagy éppen gátolva a PP1 enzim aktivitását, de akár szubsztrátként is viselkedhetnek. A katalitikus és regulátor alegység közötti kölcsönhatás ezért kulcsszerepet tölt be a PP1 működésében. A funkcionális PP1 holoenzimek általában dimer felépítésűek - egy katalitikus alegységből és egy regulátor alegységből állnak. Az ismert PP1 regulátor alegységek aminosav szekvenciája nagyon eltérő, de mindegyik tartalmaz egy rövid (R/K)VxF motívumot. Ezt a konzervált motívumot elsődlegesnek tartják a PP1 katalitikus alegységhez (PP1c) való kötődésben, habár a szomszédos szekvencia részletek is jelentősen befolyásolják az affinitást. Ezen kívül további PP1c kötő doméneket is leírtak, amelyek segítségével egyetlen PP1 katalitikus alegység nemcsak egy, de több regulátor alegységhez is képes egyszerre kötődni, így heterotrimer szerkezetű holoenzimek is kialakulhatnak.

1.4. A miozin foszfatáz enzim felépítése és regulátor alegységei

A miozin foszfatáz (MP) holoenzim egy katalitikus alegységből (PP1c β) és két regulátor alegységből épül fel, a nagyobb, ~110 kDa-os miozinhoz is kötődő regulátor alegységből (MYPT1), valamint egy kisebb, 20 kDa alegységből (M20). A MYPT1 az N-terminális végén a PP1c katalitikus alegységgel, a C-terminális végén az M20 regulátor alegységgel van kölcsönhatásban, ily módon hozva létre a holoenzimet. A MYPT1 izoformák szerkezetében alapvető jelentőségű a hét ankirinszerű ismétlődés, amely a MYPT1 izoformák N-terminális részének legkonzerváltabb szekvenciariészlete, valamint a PP1c kötő motívum az ankirinszerű ismétlődések N-terminális szélén. Fontos megemlíteni a MYPT1 foszforilációs helyeit, amelyek egyaránt eredményezhetnek MP aktiválódást, vagy gátlást.

A MYPT1 számos szövetben kifejeződik, bár a legtöbb a simaizomban expresszálódik. A MYPT1 klónozása elsőként csirke zúzából és patkány aortából történt. Több izoformáját azonosították, de az izoformákat egyetlen gén kódolja.

1.4.1. A MYPT fehérjecsald

A MYPT családkhoz sorolnak még további négy másik fehérjét is, amelyek szerkezete különböző mértékben hasonlít a MYPT1-hez. Ezek a MYPT2, MBS85 (myosin binding subunit 85), MYPT3 és a TIMAP (TGF- β -inhibited membrane associated protein). A négy különböző molekula közül a legjobban a MYPT2 (61%) és az MBS85 (39%) hasonlítanak a MYPT1-hez aminosav szinten. Minden MYPT család fehérje tartalmazza a PP1c kötő motívumot. Ezen kívül szekvenciájukban több konzervált régió található, ezek az N-terminális ankirinszerű ismétlődések, a szekvencia középső részét lefedő gátló foszforilációs helyek, és a C-terminálison található leucin-cipzár motívum. A MYPT1 és -2-től eltérően a MYPT3 és TIMAP fehérjék C-terminális végén egy prenilációs felismerőhely (CAAX motívum) van, amely lehetővé teszi a membránhoz való kötődésüket.

1.4.2. A TIMAP fehérje

A TIMAP-ot (TGF β -inhibited membrane associated protein) reprezentációs differenciál-analízis (RDA) során detektálták először, miközben glomerulus endotél sejtek választ vizsgálták a transzformáló növekedési faktor-bétára (TGF- β 1). A TGF- β 1 jelentősen lecsökkenti a TIMAP mRNS szintézisét, ezért feltételezhető, hogy a TIMAP-nak fontos szerepe van az endotéliumban történt TGF- β 1 okozta változások helyreállításában, mint például apoptózis, kapilláris morfogenezis és barrier diszfunkció. A TIMAP egy 64 kDa méretű fehérje, expressziós szintje az endotél sejtekben igen magas. A már korábban említett szerkezeti elemek közül a TIMAP szekvenciájában megtalálható a PP1c kötőmotívum, a jellegzetes ankirin ismétlődések, és a membránhoz való lokalizációért felelős prenilációs motívum is. A MYPT fehérjékhez való hasonlóság alapján feltételezhető volt, hogy a TIMAP is a PP1 regulátora. Élesztő és bakteriális két-hibrid rendszer segítségével korábban néhány lehetséges fehérje partnert valószínűsítettek, ezek közül a TIMAP-pal kölcsönható 37/67-kDa méretű laminin receptorról (LAMR1) közvetett bizonyítékok alapján feltételezték, hogy egy TIMAP-függő PP1c szubsztrát lehet.

1.5. Foszfátok szerepe az endotél barrier funkcióban

Az endotél sejtek az erek belső falát borító konfluens monolayeret alkotó sejtek. A sejtek közötti kommunikációt az adherens kapcsolatok, a szoros kapcsolatok és a rés kapcsolatok biztosítják. Fő szerepük, hogy egy úgynevezett barrieret alkossanak a véredények belső tere és az azt körülvevő szövetek között, ily módon szabályozva az intersticiális folyadék és a vérplazma között a makromolekulák áramlását/átjárását. Az endotél sejtek egymáshoz való tapadását a homofil sejt-sejt kapcsolatokért felelős transzmembrán adhéziós fehérjéken keresztül a különböző sejt-kapcsoló struktúrák alakítják ki. Ezen transzmembrán fehérjék olyan intracelluláris partnerekhez kötődnek, amelyek elősegítik annak a citoszkeletonhoz való horgonyzását, következésképpen stabilizálják a sejt-sejt közötti kapcsolatokat. Az endotél sejtek alakja és ily módon a vaszkuláris permeabilitás is nagymértékben függ tehát a citoszkeleton elemeinek változásaitól. Az aktin mikrofilamentumok, valamint a foszforiláció/defoszforiláció által szabályzott aktin-miozin kölcsönhatások nagymértékben hozzájárulnak a vaszkuláris permeabilitás növekedéséhez, de a citoszkeletonhoz asszociálódó fehérjék foszforilációja/defoszforilációja is fontos szerepet tölt be az endotél barrier funkció szabályozásában. Hasonlóan a már részletesen tanulmányozott simaizomhoz az ATP, Ca^{2+} -ion, kalmodulin és az EC MLCK fontos elemei az endotélium szabályozásának. Az EC MLCK aktivitásának növekedése MLC foszforilációt vált ki, amelynek következtében az endotél sejtek összehúzódnak, a sejtek között rések alakulnak ki, ezzel együtt nő a permeabilitás. Két jelátviteli útvonal is szerepet játszhat a MP gátlása révén a gátfunkció szabályozásában. Az egyik a vazoaktív ágensek által indukált, főként a ROK által szabályzott RhoA/Rho-kináz útvonal. Pontosabban a ROK által gátló (Thr696 és Thr853) oldalláncokon foszforilált MYPT és az így gátolt MP eredményezi az endotél permeabilitás megnövekedését, mert a difoszfo-MLC akkumulálódik és kontrahálnak a sejtek. A másik útvonal pedig a CPI-17 általi MP aktivitás gátlás, melynél a PKC enzim foszforilálja az inhibitor fehérjét. Ez egyrészt magára a PP1c-re lehet hatással, vagy a MP holoenzimet szabályozhatja anélkül, hogy az disszociálna. Akut gyulladás következtében a kibocsájtott ATP mennyiségének növekedését tapasztalták, ami a barrier funkció megerősödését okozza. Az ATP által kiváltott gátfunkció erősítés mechanizmusának egyik kulcsmomentuma a MP aktiválódása, ami azt igazolja, hogy a MP aktivitás barrieret védő hatású. A sejtek között rések keletkezhetnek, barrier diszfunkció alakulhat ki a sejt-váz átszerveződésének következtében, melyet különféle bioaktív ágensek (pl. trombin) válthatnak ki. A gyulladást kiváltó trombin és hisztamin ágensek gyors MLC foszforilációt váltanak ki, megemelik az aktin-miozin kölcsönhatást, ezáltal növekszik az endotélium permeabilitása is.

A TGF- β szintén MLC foszforilációt okoz az endotéliumban és megemeli annak permeabilitását. A PP1-gyel összehasonlítva sokkal kevesebb tényről ismerünk a PP2A aktivitásának az endotél sejtek citoszkeleton szerkezetének szabályozásában betöltött szerepéről. *In vitro* kísérletek azt mutatták, hogy a PP2A felelős a CPI-17 defoszforilálásáért sima izomban. Ezen felül az okadánsav indukált foszforilációja és transzlokálódása a MYPT1-nek is PP2A és változó mértékben ROK kináz függő folyamat HEPG2 sejtekben. Ezen adatok szolgáltatnak bizonyítékot arra, hogy a PP2A részt vesz a MP szabályozásában. A PP2B, más néven kalcineurin, mindhárom izoformája expresszálódik a humán endotéliumban, és trombin kezelés hatására az aktivitása is növekszik, amely egyben a katalitikus alegység foszforilációjával jár együtt. További megfigyelések támasztják alá a citoszkeletonban, barrier funkcióban betöltött szerepét, mint például a kalcineurin gátlása csökkenti a trombin kezelés következtében foszforilálódott citoszkeletonális fehérjék defoszforilációját.

1.6. Az ERM fehérjecsald

Ismert, hogy a MP elsődleges szerepe a miozin defoszforilációja, de számos más folyamat szabályozásában is részt vehet. A MP regulátor alegysége, a MYPT1 ugyanis közvetlenül képes kötődni az F-aktinhez kötő fehérjékhez, mint például az ERM fehérjecsald tagjaihoz. Az ide tartozó fehérjék (ezrin, radixin, moezin) egyik fontos szerepe a plazmamembrán és az aktin filamentumok közötti keresztkötés biztosítása. Az ERM fehérjék N-terminális FERM (Fourpoint-one ERM) doménje közvetlenül vagy közvetve kötődik valamilyen nélkülözhetetlen membránfehérjéhez, a C-terminális domén pedig közvetlenül az aktinnal lép kölcsönhatásba. Részt vesznek tehát a membrán struktúrák morfogenezisében és a sejt adhéziós folyamatokban is, amelyek molekuláris mechanizmusa még nem teljesen jellemzett. A C-terminális régió aktin kötő doménje mindhárom fehérje esetében tartalmaz egy foszforilációs helyet, melyek proteinkináz C theta (PKC θ) vagy Rho kináz által foszforilálhatóak. Foszforilálatlan formáik „head to tail” dimereket valamint oligomereket alkotnak egymással. A foszforiláció konformáció változással jár, amely lehetővé teszi a fehérjék transzlokálódását, oldható formából „membrán-sejtváz asszociált” formára váltanak *in vivo*. A legtöbb kísérletes sejt- és szövet rendszerben az ERM-ek kölcsönhatása a membránnal és a sejtvázzal mindig szorosan összefügg a fehérjék fokozott foszforilációs szintjével.

2. CÉLKITŰZÉSEK

A TIMAP a MYPT család tagja, szerkezetéből adódóan is feltételezhető, hogy a PP1c regulátor alegysége, de ahogy az irodalmi összefoglalóban is utaltam erre, a TIMAP PP1 regulátor szerepe még feltáratlan terület.

A TIMAP asszociációja a plazmamembránhoz, valamint feltételezett PP1 regulátor funkciója egyaránt arra utal, hogy a TIMAP, amely az endotél sejtekben más sejtekhez viszonyítva jelentősen expresszálódik, feltehetően membrán/membránhoz asszociálódó fehérjék foszforiláltsági szintjének szabályozásával részt vehet az endotél barrier funkció szabályozásában.

Ezek alapján fogalmaztuk meg a következő célkitűzéseket:

- TIMAP és PP1c fehérjék kölcsönhatásának vizsgálata különböző vizsgálati módszerek felhasználásával.
- A TIMAP PP1c aktivitást reguláló szerepének igazolása, szubsztrátok azonosítása.
- A TIMAP lehetséges foszforilációs helyeinek és szerepük vizsgálata a TIMAP-PP1c közötti kölcsönhatásban, illetve a PP1c enzim aktivitásának szabályozásában.
- A TIMAP endotél barrier funkcióban betöltött szerepének tanulmányozása

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Reverz transzkriptáz (RT) reakció és polimeráz lánreakció (PCR)

Az endotél sejtekből totál RNS-t izoláltunk, majd a reverz transzkriptáz reakció után az átíródott RNS-t PCR reakcióban használtuk fel templátként.

A szubklónozáshoz szükséges hasítási helyeket tartalmazó primerekkel szintetizáltattuk a különböző gének szekvenciáit polimeráz lánreakcióval. A kapott termékeket agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük 1-1,2%-os gélben.

Restrikciós hasítás

Minden restrikciós hasítást az enzimet gyártó cég adott enzimekre vonatkozó előírásai szerint hajtottunk végre, az enzimnek megfelelő pufferben. A restrikciós enzim mennyisége sohasem haladta meg a teljes hasítási közeg 10%-át.

DNS kinyerése agaróz gélből

Az agaróz gélelektroforézis után a megfelelő sávokat kivágtuk és a kinyeréshez a QIAquick gélextrakciós kitet használtuk fel. A tisztítást a gyártó cég által mellékelt protokoll szerint végeztük.

Ligálás

A ligálást T4 DNS ligázzal végeztük (*Promega*). A ligálási közeg összeállításánál 1:1 molarányt alkalmaztunk a gyártó cég által biztosított ligáz pufferben.

E. coli transzformáció

Frissen tenyésztett (OD= 0,4) DH5 α és BL21 *E. coli* sejteket kalcium-kloriddal kezelve tettünk kompetenssé, majd egyenlő részekre osztottuk. 10 percig jégen inkubáltuk a sejtuszuspenziót, majd az egyik részlethez hozzáadtuk a DNS-t. 45 perc újabb inkubálás következett jégen, majd 50 másodperc 42° C-os hősokk, amit 2 perces jégen való inkubálás követett, majd a sejtekhez SOC tenyésztő oldatot adtunk és 1 órán át 37° C-on rázattuk. Ezután a transzformált sejteket antibiotikumtartalmú LB agar lemezre oltottuk ki. Az LB agar lemezeket 16 órán át 37° C-on inkubáltuk.

Plazmid preparálás

A plazmidokat Novagen és Qiagene mini, midi vagy maxi plazmid izoláló kit segítségével izoláltuk a cég leírása szerint. A beépült DNS méretét a plazmid megfelelő restrikciós enzimmel történő emésztését követően agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük 1 %-os gélen.

DNS szekvenálás

A klónok ellenőrzésére a beépült DNS-t szekvenáltattuk az MTA SZBK Szegedi Biológiai Kutató Központ DNS Szekvenáló Laboratóriumában, illetve Chicago-ban (Sequencing Facility, Cancer Research Center, University of Chicago, Chicago, IL) vektorspecifikus pGEX primerek felhasználásával.

GST-fúziós fehérjék előállítása és tisztítása

A vad típusú- és mutáns TIMAP ($\Delta 1-71$ aminosav) valamint a vad típusú moezin fehérjéket *Escherichia coli* BL21(DE3) sejtekben, pGEX-4T expressziós rendszert használva állítottuk elő glutation-S-transzferáz (GST) fúziós fehérjékként.

A fehérje tisztítását GST SpinTrap Purification Module kit (GE Healthcare) segítségével végeztük úgy, hogy a lizátum oldható frakcióját centrifugálással választottuk el, és a felülúszóban levő fehérjét glutation-Sepharose 4B MicroSpin oszlopon történő inkubálással immobilizáltuk. A mátrixot mostuk és a kötődött rekombináns fehérjét 10 mM glutation tartalmazó 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) pufferrel eluáltuk. A moezinről a glutation S-transzferáz tag eltávolítását trombin proteáz segítségével proteolitikus hasítással végeztük a gyártó cég által mellékelt leírás szerint. A hasítást követően a trombin proteáz eltávolítása az oldatból p-aminobenzamidin-agarózzal történt. Az eluált GST tag nélküli moezin fehérjét SDS-PAGE-sel ellenőriztük.

Sejtkultúra

A marha tüdő artéria endotél sejteket (BPAEC) és a humán tüdő artéria endotél sejteket (HPAEC) 20% (v/v) borjú szérumot tartalmazó MEM médiumban illetve 10% FBS-t tartalmazó EBM-2 médiumban tenyésztettük.

TIMAP csendesítése siRNS technikával

HPAEC sejteken siRNS technikával TIMAP géncsendesítést hajtottunk végre. SMARTselection-designed TIMAP-specifikus és nonspecifikus siRNS-oligonukleotidokat

(SMARTpool reagens) használtunk. A sejteket 70%-os konfluencia elérése után DharmaFECTI transzfekciós reagenssel transzfektáltuk 50 nM végkoncentrációjú siRNS-sel és a 48 órás poszttranszfekciós idő elteltével további kísérletekben használtuk fel.

In vitro GST Pull-Down Assay

HPAEC sejteket 100% konfluencia eléréséig tenyésztettük, mostuk, majd feltártuk. Az 1-1 μmol GST és GST-TIMAP valamint GST-TIMAP mutáns fúziós fehérjéket glutation-Sepharose mátrixon immobilizáltuk, majd a HPAEC sejtlyúzattal inkubáltuk egy órán át 4°C-on. Az oszlopokat 3x mostuk PBS oldattal és 1x SDS mintapufferrel főztük. Centrifugálással elválasztottuk a mátrixot és a felülúszót Western blot analízissel vizsgáltuk.

Immunprecipitáció

A HPAEC ill. BPAEC sejtek monolayerét mostuk, majd immunprecipitációs pufferben tártuk fel. A centrifugálással nyert felülúszót előtisztítottuk Protein G-Sepharose-zal 3 órán át, 4 °C-on történő kevertetéssel, majd centrifugáltuk. Az így előtisztított felülúszót specifikus antitesttel inkubáltuk 1 órán át 4 °C-on, majd Protein G-Sepharose-zal egy éjszakán keresztül állandó keverés mellett. Mosást követően a gyantát centrifugálással gyűjtöttük össze, majd 1x SDS-mintapufferrel főztük 10 percig. Az így kapott mintákat Western blottal analizáltuk.

Immunofluoreszcencia

A HPAEC és BPAEC sejteket fedőlemezekten tenyésztettük, PBS-sel mostuk és 3.7 % paraformaldehidet tartalmazó PBS-ben fixáltuk. A permeabilizálás (0.25 % Triton-X 100/TBST) után a sejteket blokkoltuk 2 % BSA/TBST-vel. Az elsődleges antitestekkel (blokkoló oldatban 1:100 arányban hígított), majd ezután a másodlagos antitestekkel is inkubáltuk a sejteket. A fedőlemezeket ProLong Gold Antifade médiummal tárgylemezekre rögzítettük és 60x nagyítás mellett Nikon Eclipse TE300 mikroszkóppal, vagy Olympus Fluoview FV1000 mikroszkóppal elemeztük a mintákat.

SDS-PAGE, Western-blot

A fehérjék molekulatömeg szerinti elválasztását SDS-poliakrilamid gélelektrofórezissel (SDS-PAGE) végeztük. Az elektroforézist követően az elválasztott fehérjéket nitrocellulóz membránra transzferáltuk. A blokkolást követően a primer antitesttel, utána pedig a szekunder, peroxidáz jelzett antitesttel inkubáltuk a membránt. A kötődött

antitesteket kemilumineszcenciás módszerrel detektáltuk, ECL reagenssel, és az eredményt röntgenfilmen rögzítettük.

Protein foszfatáz aktivitás meghatározása

Foszfatáz aktivitásméréshez rekombináns moezin fehérjét Rho-kinázzal foszforiláltunk, majd 30 percen át 30°C-on különböző effektorok jelenlétében és távollétében (vad típusú, mutáns GST-TIMAP, egyszer foszforilált GST-TIMAP, kétszer foszforilált GST-TIMAP és kontrollként GST fehérje) rekombináns PP1c β -val defoszforiláltuk. A reakciót a szubsztrát hozzáadásával indítottuk, majd forró, 5x SDS mintapufferrel állítottuk le és Western Blot kísérletben ellenőriztük foszfo-ERM antitesttel.

A foszfatáz aktivitást [γ -³²P]-ATP-vel foszforilált miozin könnyű lánc szubsztráttal is mértük. A mérési közeg 1/3-át alkotta az enzimet tartalmazó kivonat, 1/3-át a megfelelő effektor, vagy TM puffer. A reakciót 1/3 ösztérfogatnyi szubsztráttal indítottuk. Az elegyet 10 percen át 30 °C-on inkubáltuk, 10%-os TCA-val állítottuk le, centrifugálással üleptítettük, majd a felülúszóból szcintillációs számlálóban mértük a szubsztrátból felszabadított ³²P_i mennyiségét.

Transzendentél elektromos ellenállás (TER)

A sejtek barrier funkciójának tanulmányozására ECIS (electrical cell-substrate impedance sensing system) mérési módszert használtunk. A sejteket arany elektróddal (10⁻⁴ cm²) ellátott speciális szövettenyésztő edényekben tenyésztettük és elektrolitként a tenyésztő médiumot használtuk.

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 fehérjéket kötöttünk ki. A fehérje-fehérje kölcsönhatás kinetikai paramétereinek (asszociációs és disszociációs sebességi állandók) 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.

In vitro fehérje foszforiláció

A rekombináns vad típusú GST-TIMAP *in vitro* foszforilációja során a PKA katalitikus alegységével tiofoszforiláltunk ATP- γ -S szubsztráttal. A reakciót protein kináz hozzáadásával indítottuk. A reakcióelegyet 30 °C-on inkubáltuk egy órán át. A kétszer foszforilált GST-TIMAP előállításához a már egyszeresen tiofoszforilált GST-TIMAP-ból indultunk ki, amelyet GSK3 β kinázzal tiofoszforiláltunk szintén 30 °C-on 30 percig. A további kísérleteinkben (Plazmon rezonancia és aktivitásmérés) a TIMAP ezen foszforilált formáit használtuk fel.

Adatok elemzése, kiértékelése

Az amplifikációhoz felhasznált oligonukleotid primereket a DNASTAR program [URL: <http://www.dnastar.com/>] segítségével terveztük. A DNS szekvencia adatok összehasonlítását az NCBI honlapján található align funkció [URL: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>] segítségével végeztük el.

Az immunfluoreszcenciás felvételek szerkesztése az Adobe Photoshop CS5 képszerkesztő programmal történt.

Az eredmények statisztikai értékeléséhez (szórás-SD, t-próba) az Excel szoftvert (Microsoft Corporation) használtuk.

A Western blot eredmények értékelésekor a fehérjesávok intenzitását ImageJ 1.42q szoftver (<http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>) segítségével denzitometrálassal határoztuk meg.

4. EREDMÉNYEK

4.1. TIMAP és a PP1c közötti fehérje-fehérje kölcsönhatás vizsgálata tüdő artéria endotél sejtekben

A fehérjék közötti kölcsönhatást különböző módszerek segítségével tanulmányoztuk. Immunfluoreszcenciával a két fehérje részleges kolokalizációját tapasztaltuk humán illetve marha tüdő artéria endotél sejtekben, különösen trombin kezelést követően. Az endogén TIMAP és PP1c közötti kölcsönhatást endotél sejt-lizátumban immunprecipitációval is megvizsgáltuk. Az anti-PP1c (α, β) antitesttel kapott immunprecipitátumban TIMAP antitesttel kimutatható a 64 kDa-os fehérje, míg fordított immunprecipitációs kísérletben, a TIMAP antitest immunkomplexében detektálható a PP1c fehérje jelenléte. Az endothel sejtek barrier funkcióját befolyásoló kezelések (ATP, S1P, nokodazol és trombin) hatására az immunprecipitátumban a fehérjék mennyisége nem mutat jelentős mennyiségi változást. Mindezen eredmények a natív TIMAP és PP1c fehérjék közötti fehérje-fehérje kölcsönhatást igazolták endotél sejtek lizátumában. Rekombináns TIMAP fehérjével pull-down kísérletben vizsgáltuk, hogy egy endotél sejt-lizátumból a natív PP1c mely izoformáját köti meg. Azt találtuk, hogy a kötődés izoforma specifikus, a PP1c β izoformája kötődött a vad típusú GST-TIMAP-hoz, az α izoforma azonban nem.

Az immunfluoreszcenciás, az immunprecipitációs és pull-down kísérletek eredményei egyaránt igazolták a fehérje-fehérje kölcsönhatást. A TIMAP és PP1c fehérjék kölcsönhatásának további jellemzése céljából felületi plazmon rezonancián (SPR) alapuló kötődési kísérleteket végeztünk. Meghatároztuk a TIMAP és PP1c kölcsönhatására jellemző asszociációs állandót ($K_A = 1,8 \times 10^6$ 1/M), valamint az asszociációs és disszociációs sebességi állandókat, amelyek értéke a TIMAP és a PP1c közötti specifikus kölcsönhatást bizonyítja.

4.2. A TIMAP szerepet játszik az EC barrier funkcióban

A TIMAP barrier funkcióban betöltött szerepének igazolására TIMAP specifikus siRNS-sel csendesítettük HPAEC sejtekben a fehérjét és mértük a transzendentél elektromos ellenállás (TER) változását a monolayeren különböző kezelések után. Az ellenállás növekedése a barrier funkció stabilizálódását, míg csökkenése a barrier funkció gyengülését jelzi. A TER mérések során azt tapasztaltuk, hogy a barrier funkciót erősítő S1P és ATP hatása csökkent, másrészt a barrier diszfunkciót kiváltó trombin és nokodazol hatása pedig fokozódott azokban a sejtekben, amelyekben a TIMAP-ot csendesítettük, a kontroll sejtekhez képest. Ebből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a TIMAP fehérje valóban szabályozó

szerepet tölt be az endotél sejtek barrier funkciójában, eredményeink azt sugallják, hogy a TIMAP-nak gátfunkciót védő szerepet tulajdoníthatunk.

4.3. Moezin/ERM, mint a TIMAP lehetséges célpontjai

Ismert, hogy az ERM (ezrin, radixin, moezin) fehérjék az F-aktin filamentumokat a plazmamembrán fehérjékhez irányítják, ezáltal a citoszkeleton stabilizálják. Ez a folyamat foszforiláció/defoszforiláció által szabályozott.

Immunprecipitációval és pull-down kísérletekkel igazoltuk a HPAEC lizátumokban a natív PP1c és moezin, illetve a TIMAP és moezin egymáshoz való kötődését, majd pull-down kísérletekben a rekombináns TIMAP és natív moezin, illetve az ERM fehérjék foszforilált formái közötti kölcsönhatását. Immunfluoreszcenciával kezeltlen sejtek esetében nem látható kolokalizáció a moezin és a TIMAP között, ezzel ellentétben trombin kezelés után a fehérjék kolokalizációját tapasztaltuk a sejtmembránál, amiből szintén a TIMAP és moezin közötti kölcsönhatásra következtetünk. A trombin kezelés jelentősen megemelte a foszfo-moezin szintjét az HPAEC sejtekben és a membránhoz lokalizálódó moezin is foszfo formába kerül. Eredményeink igazolják annak a lehetőségét, hogy a TIMAP a PP1c-t az ERM fehérjékhez irányíthatja és ezáltal szabályozhatja azok defoszforilációját.

4.4. TIMAP foszforiláció hatása az ERM foszforiláció szintjére és az endotél barrier funkcióra

A TIMAP nem tartalmazza a MYPT családra jellemző gátló foszforilációs helyet. Ellenben a TIMAP fehérjével legnagyobb homológiát mutató MYPT3 foszforilációja növeli a PP1c aktivitását. *In vitro* kísérletben kimutattuk, hogy a TIMAP fehérje PKA-val és GSK3 β -val foszforilálható. Ezért HPAEC sejteket egy adenilát-cikláz aktiváló ágenssel, forskolinnal kezeltünk, hogy PKA aktivitásnövekedést indukáljunk és ezzel TIMAP foszforilációt váltsunk ki. A forskolin kezelés (feltételezésünk szerint a TIMAP foszforilációja) következtében az ERM fehérjék foszforilált formáinak eloszlásában nem tapasztaltunk jelentős változást a kontrollhoz képest. Trombin kezelés megnövelte a sejtekben a foszfo-ERM forma mennyiségét, amelynek jelentős része a membránba transzlokálódott. Forskolin előkezelés viszont megakadályozta a trombin okozta stresszkábelek és sejtek közötti rések kialakulását, és megszüntette a foszfo-ERM festődést a sejt-sejt kapcsolatok mentén. TIMAP csendesített HPAEC sejteken viszont immunfluoreszcenciával azt tapasztaltuk, hogy a forskolin a trombin hatását nem tudta csökkenteni, a sejt-sejt kapcsolatok mentén a csak trombinnal kezelt sejtekhez hasonlóan a foszforilált ERM fehérje feldúsulását figyeltük meg. Kontroll és

TIMAP siRNS-sel kezelt sejtek transzendentél ellenállását megmérve a csendesített sejtekben a forskolin védő hatása a trombin kezeléssel szemben szintén szignifikánsan kisebbnek bizonyult, mint a kontroll sejtekben. Eredményeink azt bizonyítják, hogy az ERM foszforilációs szint – és ezen keresztül a barrier funkció szabályozásában a TIMAP fehérje jelenléte (szerepe) és foszforilációja esszenciális.

4.5. A TIMAP foszforiláció hatása a protein foszfatáz 1 aktivitására

Bakteriális expresszióval rekombináns moezint állítottunk elő, amelyet Rho kinázzal foszforiláltunk és foszfatáz mérésekhez szubsztrátként használtunk. A vad típusú TIMAP-ot (GST-TIMAP) tiofoszforiláltuk PKA-val (GST-TIMAP-P, Ser337), majd a minta egy részét tovább tiofoszforiláltuk GSK3 β -val (GST-TIMAP-PP, Ser333) és az *in vitro* foszfatáz aktivitás mérésekben vizsgáltuk hatásukat. A GST-TIMAP és a GST-TIMAP-P jelentősen (~60% és ~50%) csökkentette a PP1c aktivitását, ezzel ellentétben a GST-TIMAP-PP esetében nem tapasztaltuk ugyanezt (<10%). Hasonló eredményeket kaptunk a P-MLC szubsztráttal is, így megállapíthatjuk, hogy a vad típusú TIMAP gátló hatása a PP1c aktivitásra nem szubsztrát specifikus, de függ a TIMAP foszforiláltságától.

4.6. A TIMAP Ser333 és Ser337 oldalláncok foszforilációjának hatása a PP1c-vel való kölcsönhatásra

Felületi plazmon rezonanciás kísérletekben megvizsgáltuk a GST-TIMAP különböző nem foszforilált és foszforilált formáinak kölcsönhatását a PP1c-vel. A komplex képződésének sebességi állandóját (k_a) a PKA-val történt foszforiláció nem változtatta meg, de a disszociációs sebességi állandó (k_d) csökkent a nem foszforilált TIMAP-hoz képest. Az egyszeresen foszforilált TIMAP-PP1c asszociációs állandó körülbelül négyszeres értéke ($K_A = 7,39 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) mérsékelten erősebb kölcsönhatásra utal. A kétszeresen foszforilált TIMAP (PKA és GSK3 β foszforilált) esetében mindkét érték, k_a és k_d is csökkent. Az asszociációs állandó értéke pedig azt mutatja, hogy a kétszeresen foszforilált TIMAP-PP1c ($K_A = 1,93 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) esetén a kötődés közel azonos erősségű, mint a nem foszforilált TIMAP-PP1c ($K_A = 1,28 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) esetében. A TIMAP foszforilációja tehát hatással van a TIMAP és PP1c közötti kölcsönhatás kinetikájára, viszont jelentősen nem befolyásolja a fehérje-fehérje kölcsönhatást, a fehérje komplex nem disszociál.

4.7. GSK3 β gátlása csökkenti a forskolin HPAEC sejtekre kifejtett védő hatását trombinnal szemben

A foszfatáz aktivitás mérések során a PKA illetve PKA és GSK3 β -val egyszeresen, illetve kétszeresen foszforilált TIMAP hatása eltérő PP1c aktivitást eredményezett a foszfo moezin szubsztráttal szemben. Ezért megvizsgáltuk, hogy az endotél sejtekben az ERM defoszforilációjában a PKA-val foszforilált TIMAP, vagy a PKA-val és GSK3 β -val együttesen foszforilált TIMAP játszik inkább szerepet. Immunfluoreszcenciával tanulmányoztuk a foszforilált ERM mennyiségét és eloszlását BPAEC sejtekben kontroll, forskolin, trombin valamint forskolin és trombin kezelések után GSK3 β gátlószer jelenlétében és távollétében. A GSK3 β inhibitor jelenléte a foszfo-ERM szintjében csekély növekedést okozott a kontroll és a forskolinnal kezelt BPAEC sejtek plazmamembránjában. A forskolin, ahogyan már korábban is tapasztaltuk, megszüntette a lazán érintkező sejtek felületén látható tüskéket. A GSK3 β inhibitor és forskolin kezelés után a sejtek morfológiája a kezeletlen sejtekre hasonlít a legjobban, amely bizonyíték lehet arra, hogy a forskolin által indukált PKA aktiválódás után a GSK3 β is aktiválódik. Ugyancsak erre utal, hogy a GSK3 β gátlása a trombin hatását fokozta és a GSK3 β inhibitor jelenlétében a forskolin nem tudta kifejteni trombinnal szembeni védő hatását, rések alakultak ki a sejtek között és az ERM is foszforilálódott. Mindezek alapján arra következtethetünk, hogy az ERM fehérjék foszforilációs szintjének szabályozásában a TIMAP PKA és GSK3 β általi foszforilációja egyaránt fontos. A sejtek ugyanezen kezelése után Western blot-tal is hasonló tendenciát találtunk a foszfo-ERM szint változásában. Továbbá transzendotél ellenállás mérésekkel azt találtuk, hogy a GSK3 β inhibitor jelenléte a forskolinnal előkezelt, majd trombinnal kezelt sejteknél számottevő ellenállás csökkenést okozott, tehát a GSK3 β aktivitás gátlása jelentősen csökkentette a forskolin védő hatását a trombinnal szemben. Következésképpen a TIMAP GSK3 β általi foszforilációja is szükséges ahhoz, hogy a TIMAP ki tudja fejteni hatását a trombinnal indukált barrier diszfunkcióval szemben.

Összegésképpen a TIMAP és PP1c β fehérjék közötti specifikus kölcsönhatást több módszerrel (immunprecipitáció, pull-down és felületi plazmon rezonancia) is sikerült igazolnunk, valamint meghatároztuk a kölcsönhatás asszociációs állandóját. Elsőként kimutattuk, hogy a TIMAP különböző foszforilált formáinak PP1c aktivitást reguláló szerepe van, valamint a TIMAP pozitív szerepet tölt be az endotélium barrier funkciójának szabályozásában.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

A fehérjék foszfo-Ser/Thr oldalláncainak defoszforilációjával a protein foszfatáz 1 (PP1) számos sejt folyamat szabályozásában vesz részt. Kísérleteink során a 64 kDa méretű TIMAP fehérjét vizsgáltuk, amely a PP1c katalitikus alegység egyik lehetséges regulátor alegysége, a MYPT család tagja. Célunk volt a TIMAP és PP1c közötti kölcsönhatás, valamint a TIMAP Ser333 és Ser337 oldalláncai foszforilációja hatásának vizsgálata. A TIMAP expressziós szintje az endotél sejtekben más sejt típusokhoz viszonyítva magas és a fehérje a plazmamembránhoz asszociálódik. Ezért kísérleteinkkel a TIMAP humán illetve marha tüdő artéria endotél sejtek barrier funkciójának szabályozásában betöltött szerepét is igyekeztünk feltárni.

Különböző módszerek alkalmazásával igazoltuk a TIMAP és a PP1 katalitikus alegysége közötti fehérje-fehérje kölcsönhatást. Eredményeink szerint a PP1c β izoformája kötődik specifikusan a TIMAP-hoz ($K_a=1.8 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$). A TIMAP tiofoszforilációja PKA-val illetve PKA- és GSK3 β enzimekkel alig vagy csak kis mértékben módosította a TIMAP és PP1c közötti kölcsönhatásra jellemző asszociációs konstans értékeit. Viszont a nem-, az egyszeresen- illetve a kétszeresen foszforilált TIMAP különböző mértékben gátolja PP1c β aktivitását.

A TIMAP endotél barrier funkcióban betöltött szerepének vizsgálata során siRNS módszert használtunk és mértük a sejtek elektromos rezisztenciáját különböző effektorok jelenlétében. Kimutattuk, hogy a TIMAP csendesített sejtekben a kontrollhoz képest a barrier funkciót erősítő szfingozin-1 foszfát és ATP hatása lecsökkent, míg a barrier diszfunkciót kiváltó ágenseké, trombin és nokodazol, megemelkedett. Továbbá forskolin előkezelés (PKA aktiválás) a trombin által kiváltott ERM foszforilációt és barrier diszfunkciót a kontroll sejtekben kivédte, viszont az siRNS-sel kezelt sejteknél a forskolin ugyanezen hatását nem tapasztaltuk. GSK3 β inhibitor alkalmazásával igazoltuk, hogy endotél sejtekben a PKA aktiválást GSK3 β aktiválódás követi, és mindkét kináz aktiválása szükséges a forskolin endotél barrier funkciót védő hatásának kifejtéséhez. Mindezekből arra következtetünk, hogy a TIMAP részt vesz az ERM fehérjék foszforiláltsági szintjének szabályozásában és ez a funkciója PKA aktivitás által kontrollált, valamint a TIMAP a barrier funkciót pozitívan szabályozza.

6. FÜGGELÉK



DEBRECENI EGYETEM EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
KENÉZY ÉLETTUDOMÁNYI KÖNYVTÁRA

Iktatószám: DEENKÉTK /143/2011.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Czikora István

Neptun kód: JDABTQ

Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Czikora, I.**, Kim, K.m., Kása, A., Bécsi, B., Verin, A., Gergely, P., Erdődi, F., Csontos, C.:
Characterization of the effect of TIMAP phosphorylation on its interaction with protein phosphatase 1.
Biochimie. Epub ahead of print (2011)
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2011.03.011>
IF:3.897 (2009)
2. Csontos, C., **Czikora, I.**, Bogatheva, N.V., Adyshev, D.M., Poirier, C., Oláh, G., Verin, A.:
TIMAP is a positive regulator of pulmonary endothelial barrier function.
Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. 295 (3), L440-450, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1152/ajplung.00325.2007>
IF:3.924

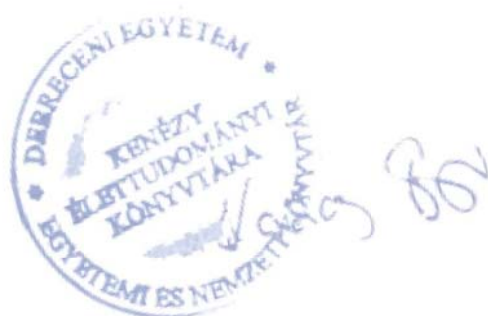


További Közlemények

3. Tar, K., Csontos, C., **Czikora, I.**, Oláh, G., Ma, S.F., Wadgaonkar, R., Gergely, P., Garcia, J.G.N., Verin, A.: Role of protein phosphatase 2A in the regulation of endothelial cell cytoskeleton structure.
J. Cell. Biochem. 98 (4), 931-953, 2006.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jcb.20829>
IF:3.409

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2011.05.20



Az értekezéshez kapcsolódó előadás:

1. I. Czikora: The role of TIMAP in the regulation of endothelial barrier function
A Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola PhD szimpóziuma, Debrecen, 2010.
május 31 - június 1

Az értekezéshez kapcsolódó poszterek:

1. Czikora I., Oláh G., Csontos Cs., Verin A.: Characterization of TIMAP, the potential regulatory subunit of protein phosphatase 1 in human endothelial cells
The American Society for Cell Biology 46th Annual Meeting 2006, San Diego, CA, December 9-13, 2006
2. Czikora I., Oláh G., Verin A., Csontos Cs.: TIMAP fehérje vizsgálata human tüdő artéria endothel sejtekben
VII. Magyar Genetikai Kongresszus, XIV. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Balatonfüred, 2007. április 15-17.
3. Czikora I., Oláh G., Verin A., Csontos Cs.: TIMAP fehérje és a PP1c közötti kölcsönhatás vizsgálata human tüdő artéria endothel sejtekben
37. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2007. május 22-25
4. Czikora I., Oláh G., Verin A., Csontos Cs.: A TIMAP fehérje a tüdőendotélium barrier funkcióját pozitívan szabályozza
A Magyar Biokémiai Egyesület 2007. évi vándorgyűlése, Debrecen, 2007. augusztus 26-29.
5. Csontos Cs., Czikora I., Adyshev, D., Oláh G., Verin A.: TIMAP is a positive regulator of pulmonary endothelial barrier function
The American Society for Cell Biology 47th Annual Meeting 2007, Washington, DC, December 1-5, 2007
6. Kása A., Boratkó A., Czikora I., Gergely P., Csontos Cs.: A protein foszfatáz 2A regulátor alegységeinek vizsgálata tüdőartéria endothel sejteken.
A Magyar Biokémiai Egyesület 2008. évi Vándorgyűlése, Szeged, 2008. augusztus 31- szeptember 03.
7. Kása A., Czikora I., Gergely P., Csontos Cs.: A protein foszfatáz 2A regulátor alegységeinek szerepe tüdőartéria endothel sejtek citoszkeleton szerkezetének szabályozásában.
Membrán-transzport konferencia, Sümeg, 2009. május 19-22.
8. Czikora I., Bécsi B., Erdődi F., Gergely P., Csontos Cs.: A TIMAP és az ERM a szerepe a tüdőendotélium gátfunkciójának szabályozásában
A Magyar Biokémiai Egyesület 2009. évi Vándorgyűlése, Budapest, 2009. augusztus 23-26.

9. Kása A., Czikora I., Gergely P., Csontos Cs.: A PP2AB regulátor alegységek szerepe tüdőartéria-endotél sejtek citoszkeleton szerkezetének szabályozásában.
A Magyar Biokémiai Egyesület 2009. évi Vándorgyűlése, Budapest, 2009. augusztus 23-26.
10. Czikora I., Bécsi B., Erdődi F., Gergely P., Csontos Cs.: TIMAP fehérje és a protein foszfatáz 1 kölcsönhatásának vizsgálata tüdő-endotélsejtekben
A Magyar Biokémiai Egyesület 2010. évi Vándorgyűlése, Budapest, 2010. augusztus 25- 28.
11. Boratkó A., Czikora I., Erdődi F., Gergely P., Csontos Cs.: A TIMAP és a protein foszfatáz-1 katalitikus alegységének vizsgálata daganatos sejtekben
A Magyar Biokémiai Egyesület 2010. évi Vándorgyűlése, Budapest, 2010. Augusztus 25- 28.