

BRAF szerepe az endotél sejtek mechanikájában

Doktori Tézisek

Hollósi Anna

Semmelweis Egyetem
Elméleti és Transzlációs Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Matkovicsné Dr. Varga Andrea, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. Alexa Anita, Ph.D., tudományos munkatárs
Dr. Sipeki Szabolcs, Ph.D., egyetemi docens

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Losonczy György, DSc., egyetemi tanár

Tagok: Dr. Kulka Janina, DSc., egyetemi tanár

Dr. Géczi Lajos, Ph.D., osztályvezető főorvos

Budapest
2023

1. Bevezetés

Az endotél sejtek közötti kapcsolat dinamikus szabályozása elengedhetetlen a patogénekkal szembeni megfelelő immunválasz kialakításához, amely során a vérben utazó leukociták legtöbbször két endotél sejt között, a sejt-sejt kapcsolatok megbontásával jutnak ki a véréből a gyulladás helyére. Hasonló mechanizmussal jutnak el a vérben utazó rákos sejtek is a metasztázis képzés helyére. A túlzott gyulladással járó betegségek, illetve a metasztázis képzés lépésének szabályozása emiatt kulcsfontosságú lehet betegségek terápiás lehetőségeinek feltérképezése során. A sejt-sejt kapcsolatok dinamikus szabályozásában nagy szerepet játszik az endotél sejtek aktin citoskeletonja, amely nemcsak biokémiai, hanem mechanikai stimulusok hatására is át tud rendeződni. Az aktin citoskeleton átrendeződését a kis G-fehérjék aktivitása befolyásolja, amelyek közül a Rho fehérje szerepe a leginkább hangsúlyos a sejt-sejt kapcsolatok dinamikus átrendeződésében. Az endotél sejtek a biokémiai és mechanikai ingerekre jelátviteli folyamataik aktiválásával vagy gátlásával reagálnak. Például a tumor sejtek permeabilitást növelő ágenseket képesek termelni annak érdekében, hogy az endotél réteg fellazulásával könnyebben át tudjanak jutni azon és mechanikai erőt fejtenek ki az endotél sejtrétegre az érfalból történő kilépéskor, az extravazáció folyamata során.

PhD munkám alapját képezte az a megfigyelés, hogy egér endotél sejtekben a RAF fehérjecsalád egyik tagja, a BRAF a RAF1 fehérjével alkotott komplexén keresztül befolyásolja a citoskeletonális ROCKII lokalizációját és aktivitását, amely az aktin polimerizációját és az aktin kontrakcióját segíti elő. Feltehetőleg ezáltal hatással van az endotél sejtréteg permeabilitására és a rákos sejtek endotél sejtrétegen történő átjutásának hatékonyságára is.

2. Célkitűzés

PhD munkám során célul tűztem ki, hogy megértsem és feltérképezsem a BRAF fehérje szerepét az aktin citoskeleton dinamikájának szabályozásában humán endotél sejtekben. Munkám során megvizsgáltam, hogy az endotél réteg biokémiai (1), illetve mechanikai (2) stimulációjának hatására hogyan változik az aktin citoskeleton szerkezete és ez milyen hatással van az endotél sejt-sejt kapcsolatok dinamikus átrendeződésére, azaz a sejtréteg barrier funkciójára.

(1) Az endotél sejtréteg biokémiai stimulációjának vizsgálata során az alábbi specifikus kérdések megválaszolását tűztem ki célul:

1.1. A BRAF hasonló szereppel bír-e humán endotél sejtek esetén is a sejtréteg permeabilitásának változásában, illetve a melanoma sejtek transzmigrációjában, mint egér sejtekben?

1.2. Hogyan befolyásolja a BRAF a trombin stimulációval indukált aktin citoskeleton átrendeződését, illetve az ebben szerepet játszó fehérjék foszforilációját és lokalizációját?

1.3. A BRAF aktin citoskeleton átrendeződésében betöltött szerepe mennyiben köthető a RAF1-en keresztül történő ROCK, illetve a MEK/ERK útvonalbeli funkciójához?

(2) Az endotél sejtréteg mechanikai stimulációjának vizsgálata során az alábbi specifikus kérdések megválaszolását tűztem ki célul:

2.1. A sejtréteg megnyújtása során hogyan változik az aktin citoskeleton szabályozó fehérjék foszforilációja, milyen (izoformaszpecifikus) szerepe van ebben a ROCK fehérjéknek? Hogyan változik a foszforilációs mintázat BRAF hiányában?

2.2. A sejtréteg megnyújtása során hogyan rendeződik át a sejtek aktin citoskeletonja, illetve az aktin citoskeleton szabályozó fehérjék és milyen szerepe van ebben a folyamatban a BRAF-nak?

2.3. A nyújtás hatására a sejtek között kialakuló rések mennyiségében van-e különbség BRAF jelenlétében és hiányában és ez milyen összefüggésben állhat az aktin citoskeleton átrendeződésével?

3. Módszerek

3.1. Géncsendesítés RNS interferenciával

SiRNS transzfekeció segítségével vizsgáltam a BRAF, a ROCKI és a ROCKII szerepét a HUVEC sejtek biokémiai és mechanikai stimulációja során. A sejtekben a BRAF génjének csendesítését shRNS technika segítségével is vizsgáltam. Az shRNS-t tartalmazó plazmidot vírusinfekcióval juttattam be a HUVEC sejtekbe, amely kezelés előnye volt, hogy az shRNS mellett a plazmid tartalmazta az EGFP génjét is, így azok a sejtek, amelyekben a csendesítés valóban megtörtént fluoreszcens mikroszkóppal az EGFP expresszió alapján azonosíthatóak voltak.

3.2. Az endotél sejtek kezelése trombinnal és inhibitorokkal

Az endotél sejtek siRNS/shRNS kezelését trombin kezeléssel együtt is elvégeztem. A sejteket az siRNS/shRNS kísérletek során 48 órát inkubáltam, majd 1 U/ml trombinnal 0, 2, 5, illetve 15 percig kezeltem. A trombin stimulációt ROCK inhibitor (Y27632, 10 μ M), illetve MEK inhibitor (U0126, 10 μ M) kezeléssel kombinálva is elvégeztem.

3.3. Western blot analízis

A különböző fehérjék foszforilációjának időbeli változásait, illetve a géncsendesítések hatékonyságát western blot analízis segítségével ellenőriztem. A sejtek lízisét követően a mintákban lévő fehérjéket 12%-os SDS-PAGE segítségével választottam szét, majd PVDF membránra blottoltam. A különböző fehérjéket specifikus antitestekkel, fényérzékeny film segítségével detektáltam. A denzitometriás analízist az ImageJ

programban végeztem el, az adatokat a Prism4 v4.01 (GraphPad Software) szoftverrel dolgoztam fel.

3.4. A fixált sejtek immunfluoreszcenciás jelölése

Az immunfluoreszcens festések során a fixált sejteket elsődleges ellenanyaggal (VE-Cadherin, pMLC, PECAM-1, p-cofilin, cofilin) és Alexa-488, illetve Alexa-546 -jelölt másodlagos ellenanyaggal kezeltem, valamint Hoechst festékkel és Alexa647-jelölt falloidinnel inkubáltam. Immunfluoreszcens festést követően konfokális mikroszkóp segítségével felvételeket készítettem a fixált endotél sejtrétegről.

3.5. A sejtek nyújtása

Az endotél sejtek megnyújtását egy speciális eszköz, Cytostretcher LV (Curi Bio) segítségével végeztem el. A sejtek nyújtásának sebességét 0,5%/másodpercre állítottam be. A sejteket a megnyújtást követően különböző ideig (0-tól 30 percig) tartottuk nyújtva a készülék segítségével. Kísérleteink során 15-30%-kal nyújtottam meg a sejteket és ezt követően vagy lízáltam és western blot segítségével analizáltam bizonyos fehérjék foszforilációs állapotát, vagy pedig konfokális mikroszkóp (Nikon Eclipse Ti2) segítségével vizsgáltam meg az aktin citoskeleton, illetve szabályozó fehérjéinek lokalizáció-változásait.

3.6. AFM/Epifluoreszcens mikroszkóp

A fluoreszcensen jelölt HUVEC sejtek mechanikai vizsgálatát epifluoreszcens mikroszkóp (Olympus, IX81) és AFM (MFP-3D, Asylum Research, Santa Barbara, CA) kombinációjával végeztük el. A mintát egy speciális tárgyasztalra helyeztük, amely lehetővé teszi az AFM és a fluoreszcencia térbeli szinkronizálását. Az AFM képalkotás minden esetben kontakt módban történt. Az AFM mérések során 100 erőgörbét vettünk fel az endotél sejtek perifériás részéről, illetve a sejt központi részéről is. Az

erőgörbékét a piramidális tú alkalmazása miatt a Rico által kidolgozott modellel illesztettük.

3.7. Kinepict szoftver

Kísérleteimben az aktin reorganizációs kinetikában mutatkozó különbségek vizuális ábrázolását Kinepict szoftver segítségével a megnyújtás után készült felvételek felhasználásával készítettük el. Kísérleteink során meghatároztuk azt az időt, amikor a nyújtás által kiváltott fluoreszcencia-intenzitás növekedés minden egyes pixelben elérte az adott pixel maximális változásának felét, amit effektív félidőnek nevezünk. Az effektív félidők ezután szinkódolt képek formájában jelennek meg, a pixelek színei a pirostól (gyorsabb változások) a kékig (lassabb változások) terjednek.

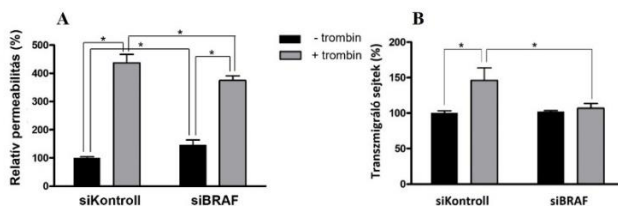
4. Eredmények

4.1. BRAF szerepe az endotél sejtek trombin általi szabályozásában

4.1.1. BRAF szabályozza az endotél sejtréteg permeabilitását és a melanoma sejtek transzmigrációját

Megvizsgáltuk a BRAF hatását a humán endotél réteg permeabilitására és a melanoma sejtek transzmigrációjára. Megfigyeltük, hogy a trombin stimuláció BRAF hiányában kisebb mértékben növeli meg az endotél réteg permeabilitását a kontroll sejtekhez viszonyítva (1. ábra). Humán A375 melanoma sejtek transzmigrációja során trombin kezelés

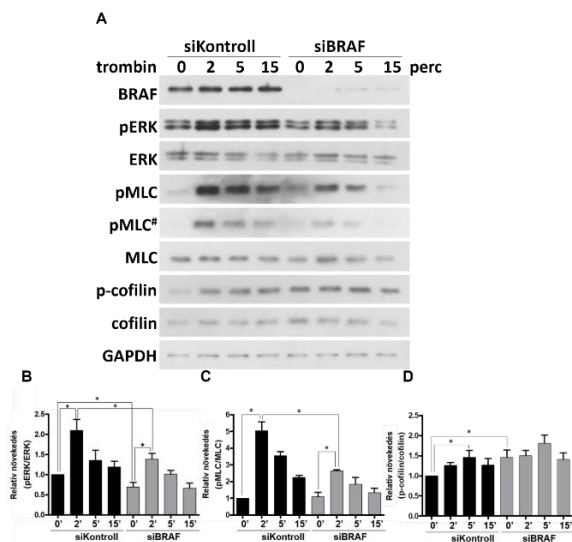
hatására több melanóma sejt volt képes átjutni a kontroll endotél sejtrétegen, mint ahol hiányzott a BRAF fehérje.



1. ábra. BRAF hatása az endotél sejtek permeabilitására és az A375 melanoma sejtek transzmigrációjára.

4.1.2. BRAF hatása az ERK, az MLC és a cofilin foszforilációjára

Az ERK trombin kezelés hatására foszforilálódik (2. ábra), amelynek mértéke BRAF hiányában szignifikánsan csökken, alátámasztva a BRAF szerepét a trombin-indukált ERK foszforilációban.



2. ábra. Trombin stimuláció hatása az aktin citoskeletont szabályozó fehérjék foszforilációs mintázatára.

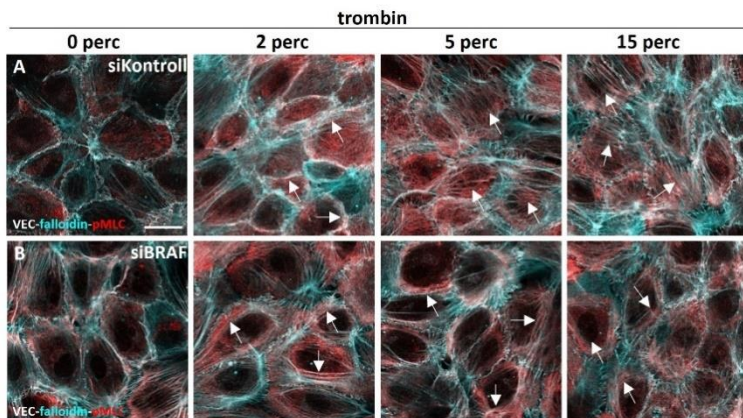
Trombin kezelés hatására kontroll sejtekben megemelkedik az MLC foszforilációja és kisebb mértékben, de a cofilin foszforilációja is. BRAF

hiányában az MLC foszforilációja kevésbé emelkedik meg trombin kezelés hatására, a cofilin foszforilációja azonban már kezelés nélkül is szignifikánsan magasabb.

4.1.3. BRAF hatása az aktin és a pMLC lokalizációjára

Felmerült a kérdés, hogy a fent megfigyelt foszforilációs változások hogyan járulnak hozzá az aktin citoszkeleton átrendeződéséhez, ezért analizáltam a pMLC, cofilin és a p-cofilin lokalizációját trombin kezelés hatására kontroll és BRAF-csendesített sejtekben.

Trombin stimuláció hatására megtörténik az aktin szálak átrendeződése (3. ábra). Kontroll sejtekben kezelés hatására 2 perc után perifériás aktin gyűrű alakul ki, majd vékonyabb aktin szálak futnak végig a sejten és a kezelést követő 15 perc után vastagabb stressz-szálak képződnek. BRAF-csendesített HUVEC sejtreteg esetén azonban a kezdetben megfigyelt vastagabb perifériás aktin gyűrű megmarad és nem alakulnak ki stressz-szálak a későbbi időpontokban sem.

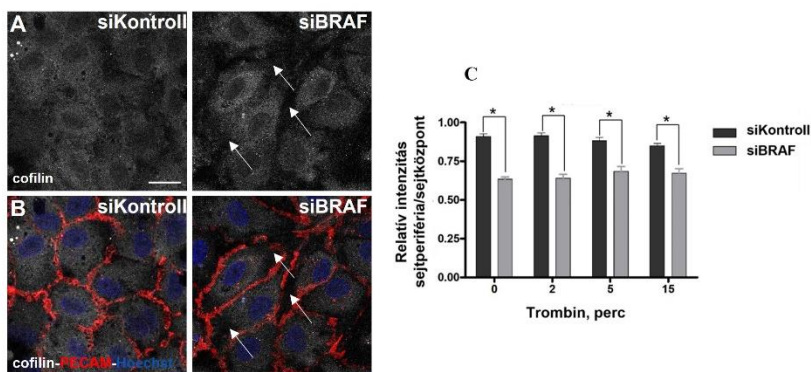


3. ábra. A trombin kezelést követően különböző időpillanatokban történő lokalizáció-változások követése konfokális mikroszkóppal. A fehér nyilak az aktin és a pMLC kolokalizációját jelölik, 2 perces kezelésnél a sejtek perifériáján, majd a későbbi időpontokban kontroll sejtek esetén a stressz-szálak mentén. A méretarányos vonal 25 μ m.

Az aktin kontrakcióját szabályozó pMLC mennyisége kontroll sejtekben 2 perc kezelés hatására megnő mind a periférián, mind a sejt belsejében. A pMLC a perifériás aktin gyűrű mentén, és a későbbi időpontoknál a sejt belsejében futó aktin szálak mentén helyezkedik el. A BRAF-csendesített HUVEC sejtréteg esetén 2 percnél megfigyelhetjük a pMLC mennyiségének a növekedését a sejt perifériáján, azonban a kezelés későbbi időpillanataiban a sejt belsejében nem jelentkezik a pMLC mennyiségi növekedése.

4.1.4. BRAF hatása a cofilin lokalizációjára

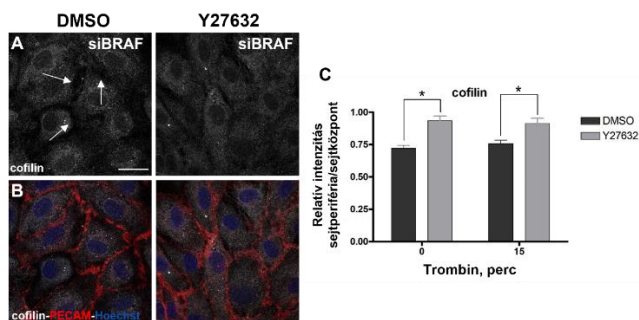
Felmerül a kérdés, hogy BRAF hiányában a cofilin fokozott foszforilációja összefügg-e a ROCK megnövekedett perifériás lokalizációjával és aktivitásával. Megfigyeltük, hogy BRAF hiányában a stimulustól függetlenül csökken a perifériás cofilin mennyisége (4. ábra).



4. ábra. BRAF hiányában csökken a perifériás cofilin mennyisége. A fehér nyilak az siBRAF sejtek perifériáján illusztrálják a cofilin mennyiségének csökkenését. A C ábrán látható az immunfluoreszcenciás képek kvantitatív analízise, a sejtek perifériáját és a sejtközpontot egy skálafaktor segítségével definiáltuk az ImageJ programban, amely 1:2 arányban osztja fel a sejt területét. A méretarányos vonal 25 μm .

4.1.5. ROCK gátlásának hatása a cofilin perifériás lokalizációjára BRAF-csendesített sejtekben

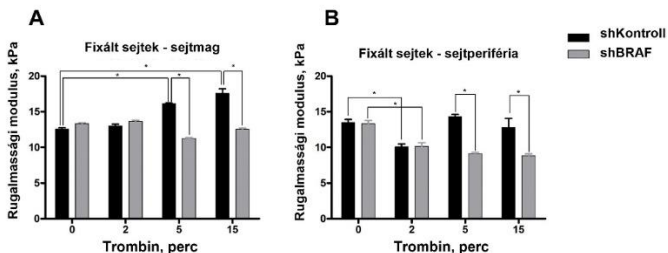
A következőkben arra kerestük a választ, hogy vajon a ROCK aktivitása húzódik-e a háttérben annak, hogy a cofilin lokalizációja csökken a BRAF-csendesített sejtek perifériáján. A BRAF-csendesített endotél sejteket ROCK inhibitorral (Y27632) kezeltem. Az eredmények azt mutatják, hogy BRAF hiányában az inhibitorral való kezelés hatására a cofilin mennyisége nőtt a sejtek perifériáján, míg a kontroll sejtekben a cofilin lokalizációja nem változott (5. ábra).



5. ábra. A cofilin mennyisége nő az siBRAF sejtek perifériáján Y27632 kezelés hatására. Az ábra jelöléseinek magyarázata megegyezik a 4. ábra aláírásával.

4.1.6. BRAF hatása az endotél sejtek mechanikai tulajdonságaira

A sejtek mechanikai tulajdonságainak vizsgálatára atomierő-mikroszkópos (AFM) méréseket végeztünk (6. ábra). A BRAF-csendesített sejtek rugalmassága nagyon hasonló volt a kontroll sejteken mért értékekhez mind a sejt központban, mind a sejtperiférián trombin kezelés nélkül és 2 perccel a trombin kezelést követően. Azonban 5 perc után a BRAF-hiányos sejtek nem mutattak változást a rugalmassági modulusban sem a sejt központban, sem a sejtperiférián. A BRAF-hiányos sejtek perifériáján és később a sejt központban megfigyelt fokozott merevség korrelál a stresszrostok megjelenésével.



6. ábra. Az shKontroll és shBRAF sejtek rugalmassági modulusának összehasonlítása.

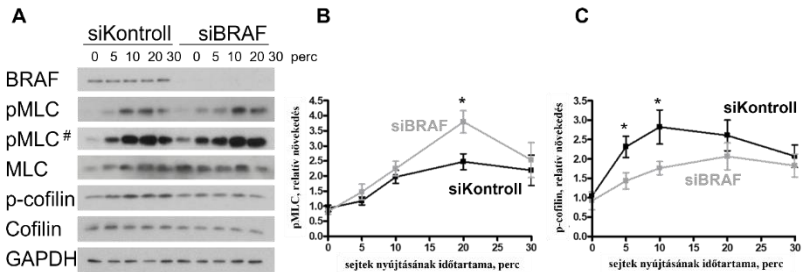
4.2. A sejt-sejt kapcsolatok mechanikai perturbációja az endotél sejtréteg nyújtásával

4.2.1. BRAF hatása az MLC és a cofilin foszforilációjára

A sejtréteg 30%-os megnyújtása során a foszforilált MLC mennyisége már 10 perc után megemelkedett, míg a cofilin foszforilációja még korábban, a nyújtást követő ötödik percben megnőtt. Az MLC foszforilációja mind a kontroll, mind a BRAF-csendesített sejtrétegekben megemelkedett és 20 percnél figyelhetjük meg a maximumát. Érdekes, hogy a BRAF-csendesített sejtréteg esetében a foszforilált MLC 20 percnél szignifikánsan nagyobb növekedést mutatott a kontroll sejtréteghez viszonyítva. A cofilin foszforilációja szintén megemelkedett a nyújtás hatására, a kontroll sejtekben ez gyorsabban bekövetkezett, mint BRAF hiányában (7. ábra).

Összehasonlítva a kontroll és a BRAF-csendesített sejtrétegek nyújtásra adott válaszát azt láthatjuk, hogy ahol a BRAF fehérje hiányzik, ott kisebb mértékű a cofilin inaktivációja, ami több, aktív cofilin jelenléte miatt egy hosszabb időskálán zajló aktin átrendeződésre utalhat, és ez együtt jár egy nagyobb mértékű MLC foszforilációval. A BRAF jelenlétében gyorsabban bekövetkező cofilin foszforilációja az aktin szálak korábban bekövetkező stabilizálódására utal, míg BRAF hiányában ez lassabban zajlik,

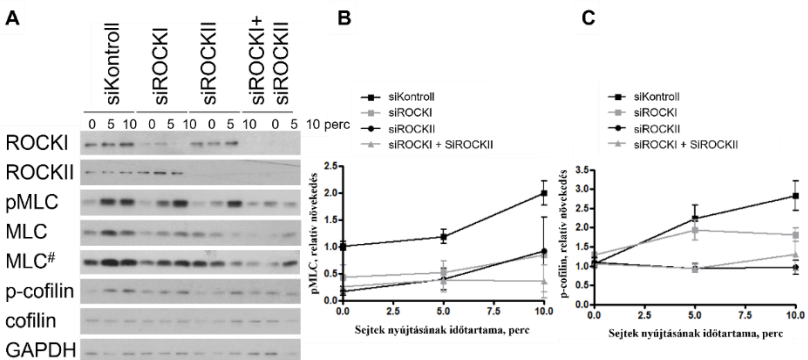
ami nagyobb mértékű aktin átrendeződést és késleltetett aktin-stabilizációt eredményezhet.



7. ábra. BRAF hatása az MLC és a cofilin foszforilációjára a sejtréteg nyújtása során.

4.2.2. ROCK izoformák szerepe a sejtek mechanikai nyújtásában

Amikor külön-külön csökkentettük a ROCKI és ROCKII izoformák mennyiségét (8. ábra), az MLC foszforilációja is csökkent, de a nyújtás hatására bekövetkező emelkedő MLC foszforiláció tendenciája megmaradt. Ahol mindkét izoforma expresszióját csökkentettük, ott a nyújtás hatására megszűnt teljesen a sejtválasz, elmaradt az MLC és a cofilin foszforilációja is.



8. ábra. A ROCKII nagyobb mértékben járul hozzá a cofilin foszforilációjához, mint a ROCKI az endotél sejtréteg nyújtásakor.

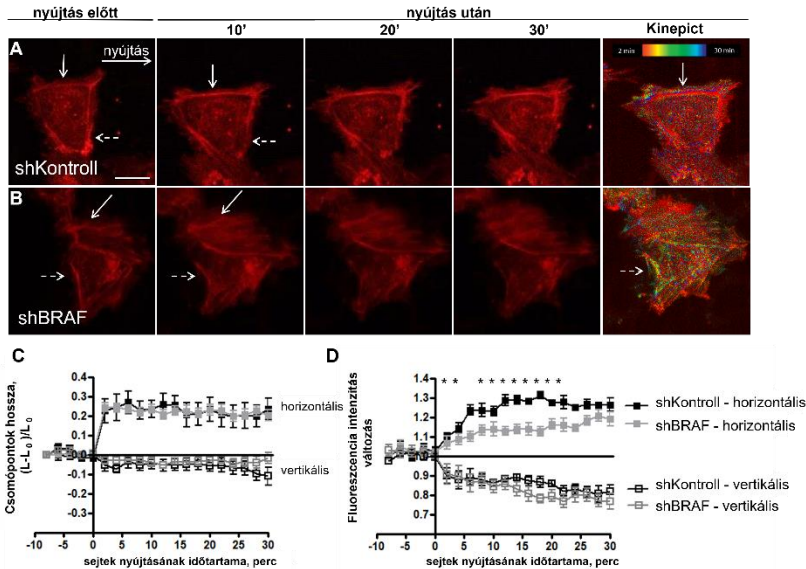
A cofilin foszforilációjában azonban a két ROCK izoforma eltérő szereppel bír, ugyanis ahol a ROCKI izoforma expresszióját csökkentettük, a meghúzás hatására a cofilin foszforilációja emelkedett, bár kisebb mértékben a kontroll sejtekhez képest. Ezzel szemben, ahol a ROCKII izoforma génjét csendesítettük, ott alig figyelhető meg a cofilin foszforilációjának emelkedése a meghúzás hatására.

Az eredmények arra utalnak, hogy a ROCKII izoforma hozzájárulása a HUVEC sejtek nyújtás által kiváltott cofilin foszforilációjához nagyobb mértékű, mint a ROCKI izoformának.

4.2.3. Mechanikai erő hatására történő F-aktin átrendeződés

A HUVEC sejtreteg nyújtását valós időben követtük nyomon konfokális mikroszkóp segítségével. Az F-aktin-kötő LifeAct-mCherry fluoreszcencia intenzitásának kvantifikálása alapján a nyújtást követő néhány percen belül az aktin filamentumok mennyisége megnő a nyújtással párhuzamos sejtkapcsolatokban és a nyújtásra merőleges sejtkapcsolatokban pedig hasonló mértékben, de csökken (9. ábra). Kontroll sejtekben a nyújtás hatására gyorsabban átrendeződött az aktin citoskeleton és a nyújtás hatására kialakult stressz-szálak 10 perccel a nyújtás után már stabilizálódtak. BRAF hiányában az aktin átrendeződése lassabban történik meg, 30 perccel a nyújtást követően közelíti meg a kontroll sejtekben megfigyelt maximális aktin fluoreszcencia intenzitás értékét. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a cofilin foszforilációjának lassabb kinetikája BRAF hiányában az aktin lassabb stabilizálódásához vezet, csak 30 perc után éri el azt a szintet, amely a kontroll sejtekben már 10 percet követően megfigyelhető. Ezzel összhangban a Kinepiet program segítségével kapott effektív félidők (ld.

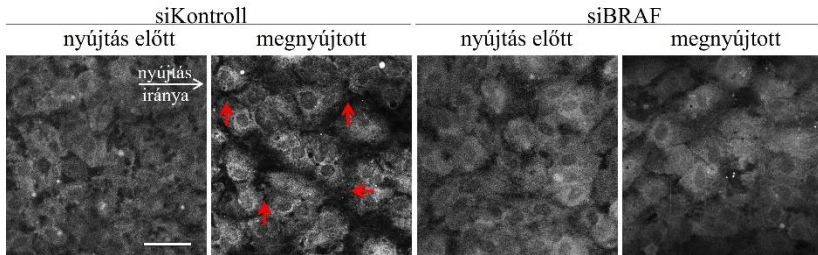
Módszerek, 3.7) is lassabb átrendeződésre utalnak az shBRAF sejtek esetén.



9. ábra. BRAF jelenléte felgyorsítja az újonnan képződött aktin stressz-rostok stabilizálódását a nyújtás után a megnyújtott (horizontális) csomópontokban. Az aktin citoskeleton átrendeződése kontroll (A) és BRAF-csendesített (B) sejtekben, az utolsó panel a Kinepict programmal számított effektív félidő vizuális ábrázolása. A sejtkapcsolatok hosszának változása a C, míg az aktin fluoreszcencia-változás analízise a D ábrán látható.

4.2.4. Cofilin lokalizációjának változása mechanikai erő hatására

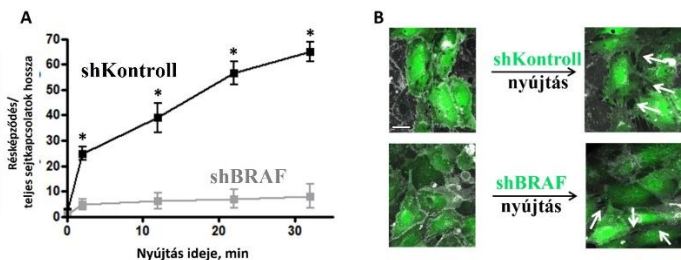
Nyújtás hatására a cofilin lokalizációja perinukleárisabb lett, és a fluoreszcens jel jelentősen csökkent a sejt-sejt kapcsolatoknál. A BRAF csendesített sejtekben a cofilin egyenletes eloszlást mutatott, és nem változott a nyújtás hatására. Ez összhangban van azzal a hipotézissel, hogy BRAF hiányában az aktin reorganizáció a sejt egészen belül történik, és nem korlátozódik a sejtkapcsolatokra (10. ábra).



10. ábra. BRAF hatása a cofilin lokalizációjára a HUVEC sejtréteg nyújtása során. A piros nyilak a kontroll sejtekben mutatják a cofilin elmozdulását a sejtek periferiájáról.

4.2.5. Az endotél sejt-kapcsolatoknál képződő intercelluláris rések

Elemeztük a sejtek közötti résképződést nyújtás hatására, amely a sejt-sejt kapcsolatok erősségéről ad információt. A résképződés a kontroll sejtrétegben körülbelül 15-szörösére nőtt közvetlenül a nyújtás után, és az idő múlásával tovább nőtt. BRAF-csendesített sejtréteg már a nyújtás előtt is valamivel kevesebb rést mutatott (körülbelül a kontroll felét). A rések területe közvetlenül a nyújtás után körülbelül ötszörösére nőtt, és az idő múlásával BRAF hiányában nem növekedett tovább jelentősen. Feltehetően a BRAF hiányos sejtek megnövekedett kontraktilitása miatt a sejtek képesek hatékonyabban alkalmazkodni a nyújtáshoz, és ezért képesek megerősíteni a sejt-sejt kapcsolatokat és minimalizálni a résképződést.



11. ábra. BRAF hiányában az endotél sejtek között a nyújtás hatására képződött rések mennyisége időben nem változik. A fehér nyilak a sejtek közötti résekre mutatnak.

5. Következtetések

Az endotél sejtréteg trombinnal történő biokémiai stimulációja során (1) megállapítottuk:

1.1. BRAF hiányában a humán endotél sejtek trombin-indukált permeabilitása csökken, továbbá az A375 melanoma sejtek transzmigrációja is, összhangban az egér modellben megfigyelt jelenségekkel.

1.2. BRAF hiányában trombin stimuláció hatására nem alakulnak ki stressz-szálak, hanem megmarad a perifériás aktin gyűrű. Ezzel összhangban az MLC foszforilációja csökken a kontroll sejtekhez viszonyítva, a pMLC lokalizációja pedig nem nő a sejt belsejében stimuláció hatására. A cofilin foszforilációja magasabb BRAF-hiányában, mennyisége pedig csökken a sejt perifériáján.

1.3. A BRAF aktin citoskeleton átrendeződésében betöltött szerepe a ROCK-on keresztüli szabályozáshoz köthető, mivel a ROCK inhibitor képes visszaállítani a cofilin perifériás lokalizációját siBRAF sejtekben, míg kontroll sejtekben a MEK/ERK útvonal gátlásával nem változik a cofilin perifériás lokalizációja.

Az endotél sejtréteg mechanikai stimulációja során (2) megállapítottuk:

2.1. A sejtréteg megnyújtása során mind az aktin citoskeletont szabályozó MLC, mind a cofilin foszforilálódik, de a cofilin foszforilációja időben korábban éri el a maximumát. BRAF hiányában az MLC foszforilációja nagyobb mértékű, a cofilin foszforilációjának mértéke nem változik, azonban lassabban következik be. Kontroll sejtekben az MLC foszforilációjához mindkét ROCK izoforma hozzájárul, azonban a cofilin foszforilációjában a ROCKII-nek nagyobb szerepe van.

2.2. A sejtréteg megnyújtása során a sejtek aktin citoskeletonja a megnyúlt sejt-sejt kapcsolatokba rendeződik, ahol a cofilin mennyisége csökken. BRAF hiányában egy nagyobb mértékű aktin átrendeződés történik,

amely nemcsak a sejt perifériájára korlátozódik. Ezzel összhangban a cofilin elmozdulása sem figyelhető meg.

2.3. BRAF hiányában kevesebb rés alakul ki a sejtek között és nyújtás hatására a sejtek között kialakuló rések területe jóval kevésbé nő a kontroll sejtekhez viszonyítva. A BRAF hiányában megfigyelt nagyobb mértékű aktin átrendeződés és kontrakció hatására a sejt-sejt kapcsolatok stabilitása nő.

6. Saját publikációk jegyzéke

- **Hollósi A.**, Pásztly K., Bunta B. L., Bozó T., Kellermayer M., Debreczeni M., Cervenak L., Baccharini M., Varga A. BRAF increases endothelial cell stiffness through reorganization of the actin cytoskeleton. The FASEB Journal. 2022. 36(9): e22478. DOI: 10.1096/fj.202200344R. (IF: 5.834)
- **Hollosi A.**, Pásztly K., Kellermayer M., Charras G., Varga A. BRAF Modulates Stretch-Induced Intercellular Gap Formation through Localized Actin Reorganization. 2021. Int J Mol Sci 22(16). DOI: 10.3390/ijms22168989. (IF: 6.208)

Az értekezés témájához nem kapcsolódó közlemény:

- Varga, K., **Hollósi A.**, Pásztly K., Hegedűs L., Szakács G., Tímár J., Papp B., Enyedi Á., Padányi R. Expression of calcium pumps is differentially regulated by histone deacetylase inhibitors and estrogen receptor alpha in breast cancer cells. 2018. BMC Cancer 18(1): 1029. (IF: 2.993)