

Egyetemi Doktori (Ph.D.) értekezés

**A PROTEIN FOSZFATÁZ 2A (PP2A) SZEREPE TÜDŐ
ARTÉRIA ENDOTHEL SEJTEK CITOSZKELETON
SZERKEZETÉNEK SZABÁLYOZÁSÁBAN**

TAR KRISZTINA

Témavezető: Dr. Csontos Csilla
egyetemi docens

DEBRECENI EGYETEM
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
ORVOSI VEGYTANI INTÉZET
DEBRECEN, 2005

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
BEVEZETÉS	6
IRODALMI ÁTTEKINTÉS	8
<i>Fehérje foszforiláció/defoszforiláció jelentősége</i>	8
<i>A protein foszfatáz 2A</i>	9
<i>A katalitikus alegység</i>	10
<i>Az A regulátor alegység (PR 65)</i>	11
<i>A B alegység</i>	12
<i>A PP2A mint foszfortirozil specifikus foszfatáz</i>	13
<i>A PP2A szabályozása</i>	14
<i>A PP2A biológiai szerepe</i>	15
<i>Az endothel sejtek citoszkeletonja és a barrier funkció</i>	18
<i>A protein foszfatáz 2A és a citoszkeleton</i>	19
CÉLKITŰZÉS	22
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	23
<i>Anyagok</i>	23
<i>Sejtenyésztés</i>	23
<i>HUVEC cDNS könyvtár szűrése</i>	24
<i>Emlős expressziós plazmidok</i>	24
<i>Transzfekció</i>	25
<i>In vitro foszfatáz aktivitás meghatározása transzfectált sejtekben</i>	25
<i>Adenovírus plazmidok</i>	25
<i>Rekombináns adenovírus sokszorozítása és tisztítása</i>	26
<i>Endothel sejtek fertőzése tisztított rekombináns adenovírral</i>	27
<i>Transzendothel elektromos ellenállásmérés (TER)</i>	27
<i>Endothel sejtek frakcionálása</i>	28
<i>Western-blot</i>	29
<i>Immunofluoreszcencia</i>	29
EREDMÉNYEK	30
<i>A PP2A aktivitás gátlás hatása az endothel monolayer elektromos ellenállására és az F-aktin szerkezetre</i>	30
<i>Szeril/Treonil specifikus protein foszfatázok lokalizációja endothel sejtek szubcelluláris frakcióiban</i>	32
<i>A PP2A lokalizációja HPAE sejtekben</i>	33
<i>A PP2A alegységek klónozása és overexpressziója</i>	34

<i>A protein foszfatáz 2A overexpresszió hatása az endothel sejtek aktin citoszkeleton szerkezetére</i>	36
<i>PP2Ac overexpresszió hatása a trombin vagy nokodazol által kiváltott EC citoszkeleton átrendeződésre</i>	40
<i>Az overexpresszált PP2A stabilizálja az MT szerkezetét HPAEC-ben</i>	42
<i>PP2A rekombináns adenovirus infekció hatása agonisták által kiváltott EC permeabilitására</i>	43
<i>A PP2A overexpresszió hatása a nokodazol által kiváltott citoszkeleton fehérjék foszforilációjára</i>	46
<i>A PP2A gátlás hatása a Tau foszforilációjára és sejten belüli lokalizációjára</i>	47
EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE	50
ÖSSZEFOGLALÁS	57
SUMMARY	59
IRODALOMJEGYZÉK	61
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	83
FÜGGELÉK	84

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE:

2-ME:	2-merkaptoetanol
A:	aktin
BPAEC:	marha tüdő artéria endothel sejt
BSA:	borjú szérum albumin
CAK:	Cdk-t aktiváló kináz
CPI17:	17 kDa PKC-vel aktivált inhibitor
CSK:	citoszkeleton frakció
CSL:	citoszól frakció
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle médium
DMSO:	dimetil-szulfoxid
DTT:	dithiothreitol
EBM:	endothel bazális médium
EDTA:	etiléndiamin-tetraacetát
EGF:	epidermális növekedési faktor
EGTA:	etilénglikol-bisz-(2-aminometiléter)-tetraacetát
ERK:	extracelluláris szignál által szabályozott kináz
FGF-B:	fibroblaszt növekedési faktor
GFP:	zöld fluoreszcens fehérje
GTP:	guanozin 5'- trifoszfát
HA-tag:	hemagglutinin tag
HEK293:	humán embrionális vesesejtek
HLMVEC:	humán tüdő mikrovaszkuláris sejtek
HPAEC:	humán tüdő artéria endothel sejtek
HSP27:	heat shock protein 27/ hősokk fehérje 27
HUVEC:	humán köldökvéna endothel sejtek
I-1:	inhbitor-1fehérje
I-2:	inhbitor-2 fehérje
IGF-1:	inzulinszerű növekedési faktor
MAP:	mikrotubulushoz asszociálódó fehérjék
MAPK:	mitogén aktivált protein kináz
MLC:	miozin könnyűlánc
MLCK:	miozin könnyűlánc kináz
MP:	miozin foszfatáz
MPF:	Cdc2/ciklin B komplex
MT:	mikrotubulus
ND:	nokodazol
OA:	okadánsav
PAGE:	poliakrilamid gélelektroforézis
PBS:	10 mM KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ , 2.7 mM KCl, 137 mM NaCl, pH 7.4
P _i :	anorganikus foszfát
Pipes:	piperazin-NN'-bisz-etán-szulfonsav
PMSF:	fenil-metil-szulfonil fluorid
PP1:	protein foszfatáz-1
PP2A:	protein foszfatáz-2A
PP2Aa:	protein foszfatáz-2A regulátor alegység
PP2Aa _N :	protein foszfatáz-2A regulátor alegység trunkált mutánsa
PP2Ac:	protein foszfatáz-2A katalitikus alegység
PP2B:	protein foszfatáz-2B
PTPA:	foszfotirozil specifikus foszfatáz aktivátor

Rho:	Ras fehérjével homológiát mutató onkoprotein
SDS:	nátrium-dodecilszulfát
T:	tubulin
TER:	transzendothel elektromos ellenállásmérés
V:	vimentin
VEGF:	vaszkuláris endothel növekedési faktor

BEVEZETÉS

A vaszkuláris endothelium jól működő barrier funkciója az endothel sejtekben fellépő kontraktilis és feszítő erők egyensúlyát jelzi. Ha az egyensúly a kontraktilis erők irányába tolódik el valamilyen bioaktív ágens, mint például trombin hatására, akkor az a sejtek közötti rések kialakulását eredményezi, az érfal homeosztázis megbomlik, ezáltal az adott szerv működése módosul. Számos citoszkeleton fehérje foszforiláltsági állapota befolyásolja a citoszkeleton elemeinek szerveződését, ennek következtében az endothel sejtek kontrakciós állapotát, az endothelium barrier funkcióját. Az intermedier filamentumban például, a vimentin reverzibilis foszforilációja kulcsfontosságú az intermedier filamentumok dinamikus átrendeződésében. Részletesen tanulmányozták tüdő artéria endothel sejtekben az aktin-miozin kölcsönhatáson alapuló kontrakcióban a miozin könnyűlánc szabályozását és bizonyították szerepét a barrier funkcióban. A miozin könnyű lánc (MLC) foszforilációj Ser19-en a sejtek kontrakcióját és sejtek közötti rések kialakulását okozza. A foszforilációt egy nagy molekulatömegű (210 kDa) miozin könnyű lánc kináz, defoszforilációját pedig a protein foszfatáz 1 (PP1) katalizálja az endothel sejtekben. A PP1 katalitikus alegység δ izoformájáról több úton is bizonyították, hogy specifikusan asszociál az akto-miozin komplexszel az endotheliumban.

A mikrotubulus stabilitása ugyancsak feltétele annak, hogy az endothelium hatásos sorompóként működjön. Számos citoszkeleton fehérje mellett a protein foszfatáz 2A kötődése is ismert a mikrotubulushoz. Az eukarióta sejtekben a protein foszfatáz 2A (PP2A) az egyik legfontosabb és legváltozatosabb képviselője a foszfoszeril/foszfotreonil specifikus protein foszfatázok családjának. Az alegységek különböző di- és heterotrimer holoenzimformákat hoznak létre.

A PP2A heterotrimer formáinak eltérő funkciója a különböző B-alegységeknek köszönhető. Ezek a fehérjék legalább három, egymástól teljesen különböző géncsalád termékei. Feltételezhető, hogy a B-alegységeknek elsődleges szerepe van mind a szubsztrátspecifitás, mind a sejten belüli lokalizáció szabályozásában.

Több kísérleti eredmény utal arra, hogy a PP2A több citoszkeleton és a citoszkeletonhoz asszociálódó fehérjét is defoszforilál, ezáltal feltételezhető, hogy a citoszkeleton szerkezetének szabályozásában szerepe lehet. A mikrotubulusok létrejöttéhez, a tubulinok asszociációjához például feltételezik a β_{III} -tubulin foszforilációjának szükségességét és *in vitro* kimutatták, hogy csak a PP2A képes

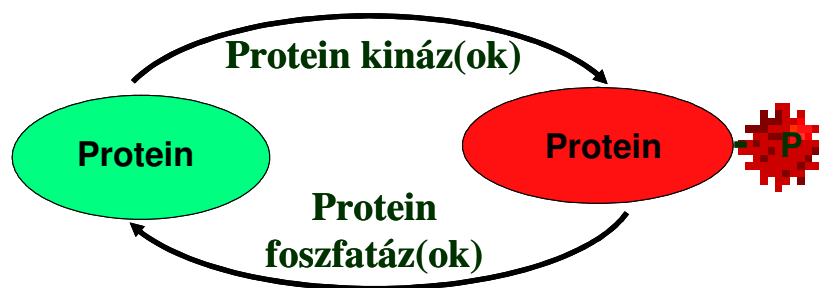
defoszforilálni ezt a fehérjét. A PP2A feltehetően kötődik a tubulinokhoz és a mikrotubulusokhoz asszociálódó fehérjékhez is, mint például tau és a különböző MAP (microtubule-associated protein) fehérjék. A HSP27 hősokk fehérjéről, ami a p38 mitogén aktivált protein kináz kaszkád egy terminális szubsztrátja, kimutatták, hogy a citoskeletonhoz kötődik és HeLa sejtekben a mikrotubulussal való asszociációját is felismerték, valamint a HSP27 a PP2A szubsztrátja *in vitro*.

A PP2A regulátor alegységeinek szerkezetében megtalálható fehérje-fehérje kölcsönhatásokért felelős motívumok és immunprecipitációs kísérleti eredmények alapján feltételezhető, hogy a PP2A-nak szerepe lehet nagyobb citoskeleton fehérje asszociátumok kialakításában, és egyúttal ezen fehérjék működését defoszforilációval szabályozhatja. A PP2A lehetséges szerepének tanulmányozása az endothel sejtek citoskeleton szerkezetének szabályozásában, elősegítheti az endothel barrier funkció jobb megértését.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Fehérje foszforiláció/defoszforiláció jelentősége

A sejtek biokémiai folyamatainak egyik alapvető szabályozását jelenti a résztvevő fehérjék foszforilálása és defoszforilálása. A két egymással szoros kapcsolatban lévő, de ellentétes mechanizmusért a protein kinázok és protein foszfatázok a felelősek (1. ábra)



1. ábra A fehérjék foszforilálása és defoszforilálása protein kinázok és protein foszfatázok által.

A foszfátcsoport fehérjéjéhez történő kapcsolása illetve lehasítása vagy allosztérikusan regulálja az enzimaktivitást, vagy gátolja annak katalitikus centrumát.

Kezdetben a protein kinázoknak tulajdonítottak nagyobb jelentőséget, mint például az extracelluláris jelek intracelluláris jelekké történő átalakítását, ellentétben a protein foszfatázokkal, melyekről azt gondolták, hogy aspecifikus módon a foszforilációs módosítások reverzibilitását biztosítják. A protein foszfatázok fiziológiás szerepének megismerésében alapvető fontosságú volt a foszfatázok aktivitását gátló toxinok felfedezése. Ezek a toxinok természetes vagy szintetikus eredetű molekulák, melyek a sejtmembránon áthatolva a defoszforilációs folyamatokat gátolták. Ezen folyamatok által megváltozott a protein kinázok és protein foszfatázok aktivitásának aránya, ami a célfehérjék magasabb foszforiláltsági állapotát eredményezte úgy, hogy közben a protein kináz aktivitása nem változott meg. A fehérjék ezen az úton megnövekedett foszforilációs állapota kóros sejtválaszokhoz, illetve transzformációhoz vezetett. Ezek a megfigyelések támasztották alá a foszfatázok alapvető szerepét a sejtben belüli szabályozási folyamatokban.

A protein foszfatázok két klasszikus osztályozás szerinti csoportja a célfehérjék foszfo-seril és foszfo-treonil oldalláncát defoszforiláló seril-treonil specifikus protein foszfatázok, illetve a célfehérjék foszfo-tirozil oldalláncához kapcsolódó foszfátcsoport lehasítását katalizáló tirozin-specifikus protein foszfatázok (Pot és Dixon, 1992).

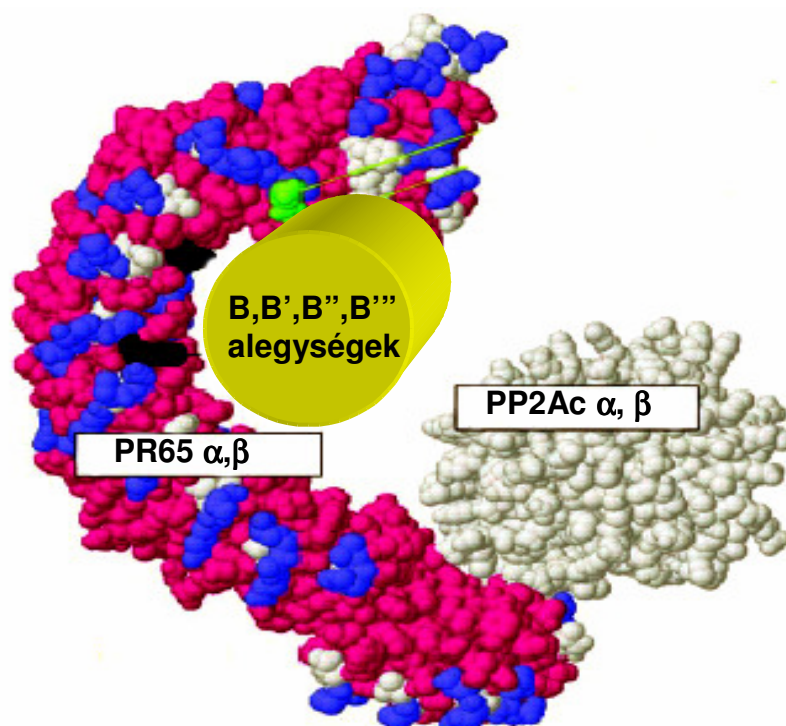
A Ser/Thr specifikus foszfatázokat biokémiai vizsgálatok alapján, az inhibitorok és aktivátorok iránti eltérő érzékenységük szerint csoportosíthatjuk (Ingebritsen és Cohen, 1983). Megkülönböztethetünk PP1 és PP2 típust, a PP2 típuson belül PP2A, PP2B és PP2C alcsaládokat. A PP1 elsősorban a foszforiláz-kináz β alegységét defoszforilálja és gátolható I-1 és I-2 hőstabil inhibitor fehérjékkel. A PP2 család tagjai a foszforiláz-kináz α alegységre specifikusak és nem érzékenyek I-1 és I-2 fehérjékre. A PP2A aktivitásához nem szükséges fémion és hatékony gátlószere az okadánsav. A PP2B-t a kalcium-kalmodulin stimulálja, a PP2C pedig egy fémion függő enzim.

A Ser/Thr specifikus protein foszfatázok katalitikus alegységének szerkezete alapján, molekuláris biológiai eredményeken alapuló osztályozása az előbbi osztályozástól eltér. Ezek szerint megkülönböztetnek PPP-csoportot, amelybe a PP1, PP2A, és PP2B tartozik, míg a másik csoportot a PP2C képezi, mely katalitikus alegységének szerkezete teljesen eltér az előző csoportétól (Cohen, 1997). Az endothelium barrier funkciójának fenntartásában, illetve a kontrakció megszüntetésében a Ser/Thr-specifikus protein foszfatázok közül a protein foszfatáz 1 és a protein foszfatáz 2B (Lum, H. és mtsai, 2001 és Verin, A.D. és mtsai, 1998) részvételét írták le, a PP2A lehetséges szerepét nem tanulmányozták.

A protein foszfatáz 2A

A PP2A a Ser/Thr specifikus foszfatázokhoz tartozó igen konzervált enzim. A holoenzimet számos szövetből izolálták, és széleskörűen tanulmányozták (Janssens és Goris, 2001). Az enzim vázát egy 36 kDa-os katalitikus alegység (PP2Ac) és egy 65 kDa tömegű regulátor alegység (A alegység vagy PR 65) alkotja. Ehhez a dimerhez egy harmadik alegység is kapcsolódik, melyet B alegységnek nevezünk, de több, egymástól nagyon különböző formáját ismerjük (Janssens és Goris, 2001). A holoenzimet a 2. ábra mutatja be. A B regulátor alegységek kristályszerkezete még nem tisztázott, ezért csak sematikusan tüntettük fel az ábrán. A B γ jóslott szerkezete alapján pl. elmondható, hogy a B alegység hét ismétlődő WD szekvenciát tartalmaz, melyek β -propeller szerkezetté rendeződhetnek össze (Strack és mtsai, 2002).

Mind a holoenzim, mind az AC dimer forma megtalálható a sejtekben, míg szabadon a katalitikus C alegységet eddig nem sikerült azonosítani (Kremmer és mtsai, 1997).



2. ábra A protein foszfatáz 2A szerkezete a B alegységek szerkezetének feltüntetése nélkül (Stefan Strack és mtsai alapján, JBC, Vol.277, No.23, 20750-20755, 2002).

A katalitikus alegység

A katalitikus alegység két, α és β izoformáját klónozták emlős szövetekből (Stone és mtsai, 1987). Northern blot eredmények bizonyítják, hogy mindkét forma detektálható különböző emlős szövetekben, de az α izoforma mRNS-e mindenütt nagyobb mennyiségben van jelen. A korai embrionális fejlődési szakaszban a két izoforma mind sejten belüli lokalizációjában, mind expressziós szinten különbözik egymástól, ami arra utal, hogy a két izoforma funkciója eltér. Azonban a két izoforma azonos katalitikus aktivitással rendelkezik, amikor kötődnek az A és B alegységekkel, és a kötődési helyben sem mutattak ki különbséget, amiből arra lehet következtetni, hogy az izoformák eltérő funkciója nem az enzimaktivitás, és nem az alegységek közötti kötődés különbségéből ered (Zhou és mtsai, 2003). Alacsonyabbrendű szervezeteket is megvizsgálva kimutatták, hogy az egyik legkonzerváltabb enzim az eddig ismert enzimek között (Cohen, P.T. és mtsai, 1990), és az enzim overexpressziója sokáig nem tűnt megoldottnak. Az N-terminális vég módosításával-

influenza hemagglutinin, 9 aminosavmaradékból álló peptidszekvencia hozzáadásával-azonban lehetővé vált overexpresszálni a fehérjét (Wadzinski és mtsai, 1992). A katalitikus alegység expressziója autoregulációval szabályozott folyamat, ami a fehérje mennyiségét állandó szinten tartja. Az autoregulációs kontroll a transláció szintjén valósul meg és nem befolyásolja a transzkripció folyamatokat (Baharians és Schonthal 1998).

Az A regulátor alegység (PR 65)

A PR 65 vagy A alegység szerkezeti funkcióval bír, erősen kötődik a katalitikus alegységhez, formálva az enzim vázát, amelyhez kapcsolódik a változatos harmadik alegység. Emlősökben két izoformáját azonosították, amelyek 86%-ban homológok. A 65 kDa-os A alegység aminosav szekvenciájában 15 darab 39-39 aminosavból álló ismétlődő egységet azonosítottak, melyet HEAT motívumnak neveznek (Groves és mtsai, 1999). A fehérje kristályszerkezetéről nyert adatok megerősítik azt a korábbi feltételezést, hogy az ismétlődő egységekben 2-2 α -hélix struktúra található, amelyek úgy rendeződnek, hogy a fehérje harmadlagos szerkezete aszimmetrikus és elnyújtott C betűre hasonlít (2. ábra, Starck és mtsai, 2002). A regulátor alegységek és a virális antigének az N-terminális végen az 1-10. ismétlődő egységekhez kapcsolódnak, a katalitikus C alegység pedig a C-terminális végen a 11-15. ismétlődő egységekhez (Ruediger és mtsai, 1992, 1994).

Az A alegységnek szintén két izoformája, α és β ismert. Az A β izoforma alacsonyabb expressziós szinttel rendelkezik, mint az A α (Hemmings és mtsai, 1990). Az A β -ról kimutatták, hogy számos humán daganatos megbetegedésben mutálódik (Wang és mtsai, 1998). A daganatos megbetegedésekhez köthető mutáns A β nem képes kötni sem a B, sem a C alegységet (Ruediger és mtsai, 2001). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az A β izoformának sajátos szerepe van a növekedés szabályozásában. Dokumentálták azt is, hogy az A β a testis kivételével kis mennyiségben expresszálódik, míg az A α -nak egyformán magas az expressziós szintje minden humán szövetben (Zhou és mtsai, 2003). Az A alegység kettős szerepet tölthet be. Először is szerkezeti bázis, melyen kötődhet a B és C alegység. Az A alegység ezen kívül kapcsolódhat más sejtfehérjékkel is, ami a PP2A-t speciális jelátviteli útvonalak szabályozásába vonja be (Ruediger és mtsai, 1992, 1994, Janssens és Goris 2001).

A másik lehetséges funkciója, hogy a B alegység hiányában szabályozó szerepet tölt be a katalitikus alegység szubsztrátspecifitásának módosításával (Yang és mtsai, 1991, Price és Mumby 2000).

A B alegység

A három alegységű holoenzim harmadik komponense többféle molekulatömegű formában előforduló polipeptid, melyet általánosan B alegységnek neveznek. A B alegységen belül 4 alcsaládot különítettek el, melyeket B, B', B'', B'''-kel jelöltek. Az egyes alcsaládok nem mutatnak egymással sem szerkezeti, sem pedig funkcióbeli hasonlóságot. A változatosságot tovább növeli, hogy az alcsaládokon belül több izoforma is található. A különféle B alegységek a PP2A holoenzimek szubsztrátspecifitását és a sejten belüli lokalizációját határozzák meg. Az 55 kDa-os B vagy PR55 alcsaládot emlőseinkben négy gén kódolja, így ennek az alcsaládnak négy izoformája α , β , γ , és δ ismert. A PR55 α és PR55 δ izoformák a legtöbb szövetben, míg a PR55 β és PR55 γ elsősorban az agyban található. PR55 α és PR55 β főként a citoszólban megtalálható fehérjék, a PR55 γ és a PR55 δ pedig a citoskeletonban lokalizálódnak (Mayer és mtsai, 1991, Healy és mtsai, 1991, Zolnierowicz és mtsai, 1994, Strack és mtsai 1999).

A B' vagy PR61 alcsaládnak legalább öt különböző génterméke ismert, melyeket α , β , γ , δ , és ϵ nevekkkel jeleztek (McCright és mtsai, 1995, Csontos és mtsai, 1996, Tehrani és mtsai, 1996, Tanabe és mtsai, 1996, McCright és mtsai, 1996, Zolnierowicz és mtsai, 1996, Nagase és mtsai, 1997). A humán B' β gén két izoformát $\beta 1$ -et és $\beta 2$ -t kódol, míg a B' γ -nak legalább három különböző splice variánsa létezik. Minden egyes B' alcsaládba tartozó fehérje tartalmaz egy erősen konzervatív régiót (80% azonosság), ami a fehérje középső részére esik, míg a C- és N- végződésük különbözőek, amiből arra következtethetünk, hogy a konzervatív régiók az A és C alegységgel való kötődésben játszanak szerepet, míg a különböző végek a funkcióbeli változatosságot növelik. A PR61 α , a PR61 β és a PR61 ϵ a citoplazmában, a PR61 $\gamma 1$, PR61 $\gamma 2$ és a PR61 $\gamma 3$ a sejtmagban, a PR61 δ pedig megtalálható mind a sejtmagban, mind a citoplazmában. A PR61 $\gamma 1$ kivételével valamennyi fehérje foszfoprotein (McCright és mtsai, 1996). Northern-blot eredmények alapján elmondható, hogy a PR61 α és a PR61 $\gamma 1$ - $\gamma 3$ nagy mennyiségben fordul elő a szívben és a vázizomban (McCright és mtsai, 1995,

Tehrani és mtsai, 1996), a PR61 β és a PR61 δ pedig elsősorban az agyban (McCright és mtsai, 1995, Csontos és mtsai, 1996).

A B'' alcsalád egyik tagját, a PR72-t nyúl vázizomból tisztították elsőként, majd humán szívizom cDNS könyvtárából klónozták (Hendrix és mtsai, 1993). Szintén a B'' alcsaládhoz tartozó PR130-at elsőként humán agy cDNS könyvtárából szűrték és klónozták. Valószínűleg mindkét fehérje ugyanannak a génnek a terméke, a PR130 alternatív splicing során keletkezik. A PR72 szívben és vázizomban expresszálódik, míg a PR130 majdnem minden szövetben kimutatható, de főként a szívben és az izmokban (Hendrix és mtsai, 1993).

Szintén ehhez az alcsaládhoz tartoznak a PR59 és a PR48 fehérjék is. A PR59-ről kimutatták, hogy a retinoblasztomával kötődő p107 fehérjéhez kapcsolódik (Voorhoeve és mtsai, 1999) és főként a vesében, az agyban, a szívben, a tüdőben és a testisben mutatható ki, a vázizomban azonban nem. A PR48-ről kimutatták, hogy egy a Cdc6 fehérjével kapcsolódó fehérje és szükséges a DNS replikáció iniciációs szakaszához (Yan, Z. és mtsai, 2000). A PR48 a sejtmagban található, és a Cdc6-ről feltételezik, hogy a szelektív szubsztátja a PR48 alegységet tartalmazó PP2A heterotrimernek. A PR48 overexpressziója a sejtosztódás során a G₁ fázisban blokkot okoz, valamint a PP2A a Cdc6-ot defoszforilált formában tartja.

A B' alcsaláddal azonos konzervatív epitóp alapján a striatint (PR110) és egy S/G₂ sejtmagi autoantigént, a PR93-at szintén a B alegység alcsaládjához sorolják, és B''' névvel jelölik (Moreno és mtsai, 2000). Mindkét fehérje kötődik a kalmodulinhoz, Ca-függő módon. A striatin idegsejtek posztszinaptikus végződéseiben található, míg a PR93 magi lokalizációjú. Feltételezik, hogy a Ca²⁺-függő jelátviteli útvonalakban vesznek részt, mint szerkezeti funkciót betöltő elemek (Moreno és mtsai, 2000).

A PP2A mint foszfortirozil specifikus foszfatáz

A PP2A *in vitro* körülmények között, rendelkezik alacsony, de detektálható foszfortirozil (PTPáz) aktivitással is (Chernoff és mtsai, 1983, Silberman és mtsai, 1984). Ez a PTPáz aktivitás a Ser/Thr specifikus aktivitástól függetlenül szabályozható. A PP2A kettős specificitásának *in vitro* jellemzése alapján elmondható, hogy a foszfoszerin és a foszfortirozin foszfatáz aktivitás különböző katalitikus sajátságokkal rendelkezik (Chernoff és mtsai, 1983, Silberman és mtsai, 1984). A két eltérő aktivitás, vagy kölcsönösen ATP, vagy pirofoszfát függő (Hermann és mtsai, 1988, Goris és mtsai, 1988), vagy egyidejűleg tubulin által stimulált (Jesus és mtsai, 1989). Egy harmadik PTPáz szabályozó folyamat

specifikus fehérje faktort a PTPáz aktivátort (PTPA) igényli. A PTPA-t néhány évvel ezelőtt izolálták nyúl vázizomból, és más állati szövetből. (Cayla és mtsai, 1990, 1994, Van Hoof és mtsai, 1994, 1998, Janssens és mtsai, 1998.). A PTPA a PP2A dimer PTPáz aktivitását stimulálja, anélkül, hogy a Ser/Thr specifikus foszfatáz aktivitásra hatással lenne. A PTPA hatása az ABⁿC és az ABC trimer enzimekre kisebb mint a dimerre, vagy egyáltalán nincs hatása. A pontos mechanizmus még nem ismert, de a PTPA működéséhez ATP/Mg²⁺-t igényel.

A PP2A szabályozása

A holoenzim aktivitásának szabályozásában fontos szerepet játszik az alegységösszetétel. Annak ellenére, hogy csak kétféle katalitikus alegység vehet részt a PP2A trimer felépítésében, a különböző A és B alegységek igen nagy variációs lehetőséget biztosítanak a holoenzim kialakításában, lehetővé téve a sokféle működésbeli funkció végrehajtását. Ezen holoenzimek száma elméletileg meghaladhatja akár a hetvenet is. A különböző regulátor alegységek meghatározzák a szubsztrátspecifitást, így például a PR55 jelenléte nélkülözhetetlen az intermedier filamentumok hatékony defoszforilálásához mind *in vitro*, mind *in situ* (Turowski és mtsai, 1999). Az alegységekkel kölcsönható fehérjék jelenléte vagy hiánya megváltoztatja a PP2A aktivitását. Így például a virális proteinek egy része komplexet képezhet a PP2A-val megváltoztatva annak aktivitását és szubsztrátspecifitását (Kamibayashi és mtsai, 1994).

Regulációs lehetőséget jelent a PP2A katalitikus alegységének foszforilálása is. A folyamat létrejöhet tirozin kinázok (pp60^{v-src}, pp56^{lck}) által a ³⁰⁷Tyr oldalláncon, mely a PP2Ac C-terminálisához közel található és az enzim inaktiválását eredményezi (Chen és mtsai, 1992). Ezt fokozza a PP2A inhibitorának, az okadánsavnak a jelenléte, ami arra utal, hogy a gátlószer nélkül a PP2Ac autodefoszforilációval reaktiválja önmagát. A sejtek stimulációja epidermális növekedési faktor, interleukin-1, tumor nekrosis faktor- α (TNF α) (Guy és mtsai, 1995), vagy inzulin hatására (Srinivasan és Begum, 1994) szintén a PP2Ac tirozin foszforilációjával, azaz az enzim inaktivációjával jár. A folyamat visszafordítható, az enzim képes gyors autodefoszforilálódásra, azaz foszfortirozin-foszfatázként (PTPase) is működhet.

Azonban nemcsak a PP2A katalitikus alegysége, hanem a B' család is foszforilálható. A PR61 δ foszforilációja szabályozhatja a PP2A aktivitást *in vivo*, mivel a foszforiláció megváltoztatja a holoenzim szubsztrátspecifitását anélkül, hogy a B' alegység disszociálna a trimerből (Usui és mtsai, 1998).

További poszttranszlációs szabályozási lehetőség a metiláció. A PP2Ac C-terminálisán található a ³⁰⁴TPDYFL³⁰⁹ motívum, mely felismerési helyként szolgál a karboxil-metiltranszferáz általi karboximetilációhoz. A metiláció a leucin karboxilcsoportján történik. A folyamat reverzibilis, melyet egy specifikus metilészteráz jelenléte biztosít. A metilációt az okadánsav gátolja. Ennek feltehetően az az oka, hogy az okadánsav szintén a C-terminális részhez kötődik, ezáltal az a metiltranszferáz számára nem elérhető. A PP2Ac metilációjának szintje változik a sejtciklus során. Ideiglenesen csökkent a metiláció a G₀/G₁ határon a citoplazmában, illetve szintén csökkent a G₁/S fázis átmenetben a sejtmagban (Turowski és mtsai, 1995). A metiláció hatása a PP2A katalitikus aktivitására még nem tisztázott. Egyes kutatócsoportok megfigyelése szerint a metiláció jelentős aktivitásnövekedést eredményez (Favre és mtsai, 1994), mások a metiláció közvetlen hatását nem tudták kimutatni a PP2A aktivitására (DeBaere és mtsai, 1999), megint mások pedig a PP2A aktivitásának csökkenését mutatták ki metiláció hatására (Zhu és mtsai, 1997). Azt viszont igazolták *in vivo* eredményekkel, hogy a metiláció befolyásolja a PP2A holoenzim összetételét a retinsav által indukált granulocita differenciáció során (Zhu és mtsai, 1997).

Az okadánsav mellett több vegyületről is kimutatták, hogy a PP2A inhibitorai. Sem az okadánsav, sem a calyculin A (sejtpermeábilis gátlószer) nem gátolja sem az alkalikus foszfatázokat, sem a foszfortirozin specifikus foszfatázokat. Mindkét vegyület kiváló gátlószere azonban a PP2A-nak (IC₅₀ érték 0.5-1 nM). A calyculin A (2 nM) jobb gátlószere a PP1-nek, mint az okadánsav (60-500 nM) (Ishihara és mtsai, 1989). A microcystin (Honkanen és mtsai, 1990) szintén kiváló gátlószere mind a PP1-nek, mind a PP2A-nak de amíg a PP2A-t már 0.5 nM koncentrációban gátolja, addig a PP1-re ebben a koncentrációban alig van hatással. A tautomycin (MacKintosh és mtsai, 1990) a PP1 enzimet gátolja a legjobban, majd a PP2B-t, míg a PP2A-t a legkevésbé. A nodularin (Honkanen és mtsai, 1991), ami egy cianobaktériumból izolált hepatotoxin, mind a PP1-et (IC=0.026 nM), mind a PP2A-t (IC=1.8 nM) erősen gátolja, míg a PP2B-t kevésbé (IC=8.7 μM).

A PP2A biológiai szerepe

A PP2A szerkezetileg egy igen változatos felépítésű enzim, mely alapvető szerepét a fehérjék defoszforilálásában tölti be. A holoenzim variábilisabb régiója a B alegység, melynek több családját is ismerjük. A sokféleség következménye, hogy a PP2A sokféle biológiai folyamatban vesz részt, többek között a sejtciklusban, a

növekedésben, a hősök folyamatában, a jelátvitelben, a sejtttranszformációban, a DNS replikációban vagy például az apoptózisban.

A sejtciklus során nélkülözhetetlen a G₂/M fázis átmenetéhez a Cdc2/ciklinB komplex (MPF) jelenléte. Az MPF a p34^{cdc2} kinázból, valamint ciklin B-ből áll és részt vesz G₂/M fázis átmenetben (Dunphy, 1994). A G₂ fázisban a három helyen foszforilált Cdc2 kötődik a frissen szintetizált ciklin B-hez. A Cdc2 a következő helyeken foszforilált: Thr¹⁶¹, ahol a foszforilációt a CAK (Cdk-t aktiváló kináz) végzi, Thr¹⁴ oldalláncon melynek foszforilációját a kettős specificitású Myt1 kináz végzi, valamint a Tyr¹⁵ oldalláncon, melynek a foszforilációját vagy a Wee1 kináz vagy/és a Myt1 végzi. Ez a három helyen foszforilált komplex inaktív, a neve pre-MPF. A pre-MPF aktivációja akkor következik be, amikor a gátló Thr¹⁴ és Tyr¹⁵ oldalláncok defoszforilálódnak. A defoszforilációt a kettős specificitású foszfatáz aktivitással rendelkező Cdc25 végzi. A Cdc25 aktivitása szintén foszforilációval/defoszforilációval szabályozott folyamat. Az enzim foszforilált formában aktív. Az MPF komplex olyan szubsztrátokat foszforilál, mint a hiszton H1, laminok, a vimentin, ciklinek, mikrotubulusokkal asszociálódó fehérjék, ami a mitózis kezdeti folyamatait, mint a kromoszóma kondenzációt vagy a mitotikus orsó kialakulását megmagyarázza. A mitózis végén, az MPF inaktiválódik, a ciklin B szétszerelődésével és a Thr¹⁶¹ oldallánc defoszforilációjával. A mitózisból való kilépést szintén elősegíti az MPF szubsztrátok defoszforilációja (Dunphy, 1994). A PP2A-nak azt a funkciót tulajdonítják, hogy az MPF-et inaktív prekursor formában tartva megakadályozza a sejtek G₂-ből M fázisba lépését (Lee és mtsai, 1991). *In vitro* a PP2A képes defoszforilálni a Cdc2 Thr¹⁶¹ oldalláncát ezzel inaktív állapotban tartani a Cdc2-t (Gould és mtsai, 1991). Később azonban kimutatták, hogy a PP2A a Thr¹⁶¹ oldalláncnak nem a direkt defoszforilációjában vesz részt, hanem a defoszforilációhoz vezető jelátviteli folyamatban (Lee és mtsai, 1994). Továbbá a PP2A-nak szerepe lehet a CAK aktivitás ellenőrzésében is, hiszen a CAK felelős a Thr¹⁶¹ oldallánc foszforilációjáért. A PP2A továbbá résztvehet a Wee1 kináz aktivitásának szabályozásában is, annak direkt foszforilációján keresztül (Kinoshita és mtsai, 1993). Ezzel ellentétben kimutatták azt is, hogy a PP2A *in vitro* defoszforilálhatja a Thr¹⁴ oldalláncot, a Tyr¹⁵ oldallánc defoszforilációja nélkül, ami a Cdc2 részleges aktivációjához vezet (Borgne és Meijer 1996).

Szintén a sejtciklus egyik kulcseleme a Cdc6, mely funkciójáról keveset tudnak, viszont a Cdc6 mutánsokkal végzett kísérletek arra utalnak, hogy az élesztősejtek sejtciklusa megáll az S fázis előtt. A Cdc6-ról feltételezhető, hogy a PR48-nak- ami a

B" alcsalád egyik tagja- szelektív szubsztrátja. A PR48 overexpressziója kötődve a Cdc6-hoz, G₁-blokkot okoz. Feltételezik, hogy a PP2A a Cdc6-ot defoszforilált állapotban tartja (Yan és mtsai, 2000).

A *Schizosaccharomyces pombe*-ban a PP2Ac-t két gén kódolja, melyek kiiktatása letális. Ha csak az egyik gént ütötték ki, retardált növekedést, csökkent sejtszámot, és korai belépést okozott a mitózisba (Kinoshita és mtsai, 1990). A B/PR55 homológ génszintű változása hibát okozott a sejtfalszintézisben, spóráképzésben, redukált növekedéssel, és a citokinézis késésével járt (Kinoshita és mtsai, 1996). *Saccharomyces cerevisiae*-ben 2 gén felelős a PP2A kódolásáért (*PPH21* és *PPH22*), melyek mutációja a vad típushoz képest abnormális morfológiájú sejteket eredményezett, amely valószínűleg a megváltozott citoskeletonnak tulajdonítható (Ronne és mtsai, 1991). A B/PR55 mutációja a citokinézis elhúzódását eredményezte (Helay és mtsai, 1991). A B'/PR61 homológ delécioja az élesztő ozmotikus és hőmérséklettel szembeni érzékenységében mutatkozott meg (Evangelista és mtsai, 1996).

A PP2A kölcsönhatásba léphet virális fehérjékkel, mint például polyoma kis t és közepes T vagy az SV40 kis t antigénekkkel, befolyásolva a sejtranszformációt. A HIV-1 vpr fehérjéje a B/PR55-el kapcsolódva a Cdc25 defoszforilációját okozza (Hrimec és mtsai, 2000).

A hősokk fehérjék családjának egyik tagja a HSF2, a PP2A A alegységével kapcsolódva megakadályozza a katalitikus alegység kapcsolódását, így a PP2A aktivitásának csökkenését okozza (Hong és mtsai, 1999). Kimutatták továbbá azt is, hogy a PP2A képes defoszforilálni *in vitro* a kis molekulatömegű hősokkfehérjét a HSP27-et is. Amikor a HSP27 alegységeire disszociál és a p38 MAPK jelátviteli útvonalon keresztül foszforilálódik, ezt az aktin filamentumok stresszkábelekké történő összerendeződése követi, vagyis a HSP27 részt vesz az aktin filamentumok szerkezetének szabályozásában foszforilációs és defoszforilációs útvonalon keresztül (Hout és mtsai, 1997, Lavoie és mtsai, 1995., Guay és mtsai, 1997, Clerk és mtsai, 1998, Gusev és mtsai, 2002). A HSP27 nemcsak az aktin filamentumokkal, de a mikrotubulusokkal is asszociál HeLa sejtekben (Hino és mtsai, 2000).

A PP2A apoptózisban (programozott sejthalálban) betöltött szerepére utal a kaszpáz-3-mal (Santoro és mtsai, 1998), a Bcl-2-vel (Ruvolo és mtsai, 1999, Deng és mtsai, 1998) és az adenovírus E4orf4-el (Kleinberger és Shenk 1993, Shtrichman és mtsai, 1999, Shtrichman és mtsai, 2000, Marcellus és mtsai, 2000) való kapcsolata. Két hibrid rendszerrel kimutatták, hogy a kaszpáz-3-nak az A/PR65 alegység egyik

lehetséges szubsztrátja. Jurkat sejtekben apoptózist indukálva a kaspáz-3 aktiválódik és hasítja az A/PR65-öt, ami által a PP2Ac aktivitás megnő, amit a MAPK foszforilációs szintjének csökkenésével mértek (Santoro és mtsai, 1998). A Bcl-2, ami egy potenciális anti-apoptotikus faktor, Ser⁷⁰ oldalláncon történő foszforilációval szabályozódik. Foszforilált állapotban a Bcl-2 képes gátolni az apoptózist. A defoszforilációt a PP2A enzim végzi (Deng és mtsai, 1998). Az adenovírus E4orf4 számos biológiai funkcióján kívül, képes apoptózist indukálni daganatos sejtekben. Az adenovírus E4orf4-ről kimutatták, hogy képes kötődni a PP2A-val (Kleinberger és Shenk 1993) vagy a B α , vagy a B' alegységeken keresztül (Shtrichman és mtsai, 1999, 2000)

Két hibrid rendszert alkalmazva kimutatták, hogy a PP2A B'/PR61 α és B'/PR61 δ alegységei kapcsolódva a ciklin G-vel szerepet játszik a DNS degradációban is (Okamoto és mtsai, 1996).

A PP2A enzim defoszforiláló működése következtében általában az egyes fehérjék inaktiválódnak. Számos protein kináz is defoszforilálódik a PP2A hatására *in vitro* és *in vivo*, így pl. a foszforiláz kináz (Ramachandran és mtsai, 1987), az ERK/MAPK-ok, protein kináz- A, B, -C, a Ca²⁺-kalmodulin-függő kináz is mind szubsztrátjai az enzimnek. A PKB-t pl. *in vitro* a PP2A inaktiválja (Andjelkovic és mtsai, 1996). A PP2A B/PR55 alegységet tartalmazó trimer a PKC α -t inaktiválja *in vitro* (Ricciarelli és Azzi, 1998), valamint sejt-kivonatban is kimutatták, hogy a PKC α defoszforilációjáért felelős enzim nem más, mint egy membránhoz kötött, B/PR55 alegységet tartalmazó PP2A (Hansra és mtsai, 1996). *In vitro* a PP2A defoszforilálja és inaktiválja a MEK1 kinázt és az ERK családkhoz tartozó kinázokat, okadánsav kezelés után viszont mindkét kináz aktiválódik (Haccard és mtsai, 1990, Anderson és mtsai, 1990, Gomez és Cohen, 1991, Gause és mtsai, 1993, Sonoda és mtsai, 1997).

Ezekkel a kiragadott példákkal szerettem volna tükrözni a PP2A biológiai szerepének sokrétűségét, ami korántsem fedi le az összes funkciót, illetve az alegységek szerepét a különféle folyamatokban.

Az endothel sejtek citoszkeletonja és a barrier funkció

Az endothel sejtek konfluens monolayer képeznek az erek belső falán és számos patológiás, és élettani folyamatban töltenek be szabályozó szerepet. Egyik fő feladatuk, hogy elválasztják a keringő vért a szövetektől, és csak bizonyos makromolekuláknak és sejteknek biztosítják az átjárást a véráram és a szövetek

között. Az endothel sejtek integritásának megtartásában-, ami védelmet nyújt az erek permeabilitásának megnövekedése és egyes gyulladásos folyamatok kialakulása ellen- fontos szerepet játszik a sejt-sejt kapcsolatok koordinált működése és a szállító vezikulumok sejtek közötti szabályozott mozgása (Dejana 2004).

A vaszkuláris endothelium jól működő barrier funkciója az endothel sejtekben fellépő kontraktilis és feszítő erők egyensúlyát jelzi. Ha az egyensúly a kontraktilis erők irányába tolódik el, akkor az a sejtek közötti rések kialakulását eredményezi. Az endothel monolayer integritása, az endothel sejtek kölcsönhatása a szomszédos sejtekkel és az extracelluláris mátrixszal a barrier funkció betöltésében alapvető jelentőségű. A citoszkeleton elemeinek átszerveződése megváltoztatja az endothel sejtek alakját és a vaszkuláris permeabilitást. A különböző bioaktív ágensek, mint pl. trombin hatására kialakuló barrier diszfunkciót a sejtek közötti rések megjelenése és ezáltal megnövekedett vaszkuláris permeabilitás jellemzi. Ebben a folyamatban bizonyítottan szerepet játszanak a citoszkeletonban az aktin mikrofilamentumok, az aktin-miozin kölcsönhatás, amely foszforilációval/defoszforilációval szabályozott folyamat. A miozin könnyűlánc (MLC) Ser19-es oldalláncán történő foszforilációja a sejtek kontrakcióját és sejtek közötti rések kialakulását okozza. A foszforilációt elsősorban a nagy molekulatömegű (210 kDa) Ca^{2+} -kalmodulin függő miozin könnyűlánc kináz (MLCK) katalizálja, ami nagymértékben homológ a simaizom MLCK-val (130-150 kDa). Az MLC defoszforilációját az endothel sejtekben a protein foszfatáz 1 (miozin foszfatáz, MP) katalizálja (Verin, A.D., és mtsai, 2000 és Hirano M., és mtsai, 1999) Az MP 130 kDa-os miozin kötő alegységét a Rho-kináz foszforilálja és ezáltal az MP aktivitás gátlódik (Kimura, K., és mtsai, 1996). Simaizomban kimutatták, hogy az MP aktivitását egy kisméretű, CPI17 nevű fehérje is gátolja, amelynek gátló képességét a PKC enzim potenciózza (Eto, M., és mtsai, 1995). A defoszforilált CPI17 képtelen gátolni az MLC foszfatázokat simaizomban. Specifikus inhibitorokat használva kimutatták, hogy a CPI17-et a PP2A defoszforilálja *in vitro* (Takizawa, N., és mtsai, 2002). A CPI17 jelenlétét endothel sejtekben is leírták (Kolosova és mtsai, 2004).

A protein foszfatáz 2A és a citoszkeleton

Több kísérleti eredmény utal arra, hogy a PP2A számos citoszkeleton- és a citoszkeletonhoz asszociálódó fehérjét defoszforilál. Az intermedier filamentumban például a vimentin reverzibilis foszforilációja kulcsfontosságú az intermedier filamentumok dinamikus átrendeződésében. Neuroblastoma sejtekben a Rho-kináz

foszforilálja a vimentint és ennek következtében a vimentin filamentumok felbomlanak, a folyamatot a PP2A reverzibilissé teszi (Nakamura, Y., és mtsai, 2000). Fibroblaszt sejteket ugyancsak specifikus PP2A gátlószerral kezelve az intracelluláris vimentin foszforilációs szintjének emelkedését találták és kimutatták a PP2Ac, az A és B/PR55 alegységek asszociációját a vimentinnel (Usui, T., és mtsai, 1999).

A PP2A a mikrotubulusokkal és mikrotubulushoz asszociálódó fehérjékkel MAP (**M**ikrotubules–**A**ssociated–**P**roteins), pl. a tau-val is kolokalizálható (Sontag és mtsai, 1995, 1996, 1999, Gong és mtsai, 2000a,b, Hiraga és Tamura 2000, Kobayashi és mtsai, 2001). A mikrotubulusok létrejöttéhez, a tubulinok asszociációjához feltételezik a β_{III} -tubulin foszforilációjának szükségességét és *in vitro* kimutatták, hogy csak a PP2A képes defoszforilálni ezt a fehérjét (Khan, I.A., és Luduena 1996). A MAP tau – tehát a PP2A szubsztrátja- defoszforilált állapotban elősegíti a mikrotubulusok összerendeződését (Drewes és mtsai, 1998, Cassimeris és Spittle, 2001). A különböző PP2A heterotrimerek közül a B/PR55 regulátor alegységet tartalmazó PP2A kötődése látszik bizonyítottan a mikrotubulushoz (Sontag és mtsai, 1995, Evans és mtsai, 2000a, Jackson és mtsai, 1997 és Hiraga és Tamura, 2000). A mikrotubulusok és a PP2A ko-lokalizációját is kimutatták kezeletlen, nem stimulált endothel sejtekben, valamint dokumentálták azt is, hogy a PP2A az endothel sejtek motilitását az adhéziós komplex foszforilációján keresztül szabályozza: a PP2A gátlása a paxillin fehérje hiperfoszforilációját eredményezi a szerin oldalláncon, valamint a tirozin oldalláncon defoszforilációját, a FAK/Src/paxillin komplex szétválását és az Src aktivitás növekedését (Young és mtsai, 2002, Kolosova és mtsai, 2003) Az irodalmi adatok arra utalnak, hogy a mikrotubulusok stabilitásának fenntartásához szükséges a PP2A aktivitás (Kobayashi, N., és mtsai, 2001 és Merrick és mtsai, 1996) és a megfelelő alegység összetétel. *S. cerevisiae*-ben például a C-terminális leucint, ami szükséges a B alegység kötődéséhez, alaninra cserélve megnövekedett az élesztősejtek érzékenysége a mikrotubulust destabilizáló hatásokra (Evans és Hemmings 2000b).

A PP2A a MAP fehérjéken kívül a citoszkeleton más fehérjéivel is asszociál és képes azokat defoszforilálni. Ambach és mtsai (2000) kimutatták, hogy egy, az aktinhoz kötődő fehérje a kofilin, humán T limfocita sejtekben asszociál a PP1 és PP2A fehérjékkel. A kofilin egy aktint depolimerizáló fehérje, ami elengedhetetlenül fontos az aktin citoszkeleton dinamikájának fenntartásához és a sejtek életben

maradásához. Kimutatták, hogy a PP1 és a PP2A nemcsak kötődik a kofilinhez, de defoszforilálja is ezt a 19 kDa nagyságú fehérjét és defoszforilációval aktiválja azt. A PP2A holoenzim forma nagyszámú variációjának előfordulása feltételezi olyan lehetséges szubsztrátok jelenlétét, melyek szerepet játszanak a barrier funkció szabályozásában, akár a mikrofilamentumokon, vagy a mikrotubulusokon keresztül. Lee és mtsai (2003) és Petrache és mtsai (2003) kimutatták, hogy a mikrofilamentumok és a mikrotubulusok hasonlóan fontos szerepet töltenek be a citoszkeleton szerkezetének megtartásában endothel sejtek barrier funkciójában, ezért lenne értékes azonosítani azokat a fehérjéket, melyek szubsztrátjai a PP2A-nak és tisztázni, hogy milyen jelátviteli útvonalon keresztül történik a szabályozás.

CÉLKITŰZÉS

Az endothel sejtek kölcsönhatása a szomszédos sejtekkel és az extracelluláris mátrixszal fiziológias funkciójuk betöltésében alapvető jelentőségű.

A protein foszfatáz 2A (PP2A) szerepe az endothel sejtek barrier funkciójában és a citoskeleton szerkezetének szabályozásában még pontosan nem ismert. A PP1 szerepét már részletesen tanulmányozták, és kimutatták, hogy a miozin könnyűlánc (MLC) defoszforilációját végzi, valamint a katalitikus alegység δ izoformája asszociál az akto-miozin komplexszel. A PP2A-nak közvetlen katalitikus szerepét ugyan nem mutatták ki az MLC foszforilációs szintjének kialakításában, de számos irodalmi adat utal arra, hogy endothel sejtek citoskeleton szerkezetének szabályozásában a PP2A több szinten résztvehet. Ezért munkánk célja az volt, hogy endothel modell rendszerben tanulmányozzuk a PP2A, a barrier funkció és a citoskeleton szabályozása közötti kapcsolatot. Kísérleteink hozzájárulhatnak az endothel barrier funkció szabályozásának jobb megértéséhez. Ezért az alábbi kísérleti stratégiát állítottuk össze:

1. A PP2A aktivitás gátlás hatásának tanulmányozása az endothel monolayerre és az akto-miozin szerkezetre.

2. A PP2A lokalizációjának vizsgálata endothel sejtekben, a mikrotubulussal asszociáló fehérjék kimutatása.

3. A PP2A aktivitás gátlás hatásának tanulmányozása a PP2A lokalizációjára, a mikrotubulusok szerkezetére.

4. A PP2A alegységek emlős expresszióra alkalmas vektor konstruktjainak és a PP2A alegységek rekombináns adenovírus plazmidjainak előállítás, a PP2A alegységek overexpressziója marha endothel sejtvonalban (BPAEC) és humán endothel sejtvonalban (HPAEC).

5. Az overexpresszált fehérjék lokalizációja; az overexpresszált fehérjék hatásának tanulmányozása a tüdő artéria endothel sejtek aktin citoskeleton és mikrotubulus szerkezetére valamint a barrier funkcióra.

6. Az overexpresszált PP2A aktivitás gátlása és a gátlás utáni hatás tanulmányozása a tüdő artéria endothel sejtek citoskeleton szerkezetére és a barrier funkcióra.

7. Az overexpresszált fehérjék hatásának tanulmányozása a PP2A olyan lehetséges szubsztrátjainak (mint például HSP27 és tau) foszforiláltságára, amelyeknek szerepe lehet a barrier funkcióban.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Anyagok A kísérletekhez használt analitikai minőségű vegyszerek a Sigmától származnak. A következőkben felsorolt anyagokat a nevek mellett feltüntetett cégektől szereztük be: okadánsav (Calbiochem), β -tubulin ellen termeltetett monoklonális antitest, HSP27 ellen termeltetett monoklonális antitest (Covance Research Products), BD Living Colors A.v. peptid poliklonális GFP elleni antitest (Clontech), c-myc specifikus monoklonális, HA-tag specifikus poliklonális antitest (Santa Cruz Biotechnology), foszfo-HSP27 (Ser82) poliklonális antitest (Cell Signaling Technology), foszfo-tau (pS262) specifikus poliklonális antitest (Biosource International), Texas Red-phalloidin, Alexa 350-, Alexa 488- és Alexa 594- konjugált második antitest, fade mounting medium (Molecular Probe), pCMV-HA emlős expressziós vektor (3.8 kb) (Clontech), pCDNA 3.1/Myc-His A verzió (5.5 kb) (Invitrogen), AdEasyTM Adenovirus vektor kit (Stratagene), FuGene 6 transzfekciós reagens (Roche), Proteáz Inhibitor Koktél Set III (Calbiochem), Rneasy kit (Qiagen).

Sejtenyésztés A marha tüdő artéria endothel sejteket (BPAEC) a 8. passzálásnál szereztük be az American Type Tissue Culture Collectiontól (sejtvonal CCI-209), és 15-24 passzálásig használtuk az irodalmi hivatkozásban leírtaknak megfelelően (Stasek és mtsai, 1992). A sejteket Medium 199-ben (Gibco BRL) tenyésztettük. A médium 20% (v/v) magzati borjú szérumot (Irvine Scientific), 15 μ g/ml endothel sejt növekedési faktort (Collaborative Research), 1% antibiotikumot- antimikotikumot (10,000 units/ml penicillin; 10 μ g/ml streptomycin; 25 μ g/ml amphotericin B (K. C. Biologicals), és 0.1 mM nem-esszenciális aminosavakat (Gibco BRL) tartalmazott. A humán tüdő artéria endothel sejteket (HPAEC) a Cloneticstől rendeltük. A HPAEC-t a 6-10 passzálásig használtuk. A sejteket EBM-2 médiumban tenyésztettük. 500 ml medium tartalmazott 10 % magzati borjú szérumot, 0.2 ml hydrocortizont, 2ml humán FGF-B-t, 0.5 ml VEGF-et, 0.5 ml R³- IGF-1-et, 0.5 ml aszkorbinsavat, 0.5 ml humán epidermális növekedési faktort (EGF), 0.5 ml GA-1000-et, 0.5 ml heparint (Clonetics).

Az AD-293 sejtvonalat a Stratagenetől rendeltük, amit a HEK293 (humán embrionális vesesejtek) sejtvonalból fejlesztettek tovább. Az AD-293 sejtek a HEK293 sejtekhez képest jobb sejtheadhéziós tulajdonságokkal rendelkeznek, hatékonyabb termelését biztosítva ezzel a rekombináns adenovírus részecskéknek. Az AD-293 sejtek a HEK293 sejtekhez hasonlóan rendelkeznek az E1 adenovírus génnel (a vírusrészecskék összerendeződéséért felelős), így abban az esetben

amikor a sejteket olyan adenovírus vektorral transzfektálják, melyekből hiányzik az E1 gén, a sejtek képesek előállítani a fertőző vírusrészecskéket. A sejteket DMEM médiumban tenyésztették. A médium tartalmazott 4.5 g/L glükózt, 110 mg/L Na-piruvátot, 2 mM L-glutamint, 10 % magzati borjú szérumot. A sejteket felhasználásig 37°C-on, 5%-os CO₂ termosztátban tartottuk.

HUVEC cDNS könyvtár szűrése A HUVEC cDNS könyvtár szűrését az irodalmi hivatkozásban leírtak szerint végeztük el (Csontos és mtsai,1999). Random hexamer és oligo dT primerekkel készült HUVEC λ gt 11 cDNS könyvtár (Dr. David Ginsburg, Ann Arbor, USA) 10⁶ klónját szűrtük a PP2A katalitikus (C) és regulátor (A) alegységére. Az RT-PCR reakcióban előállított PP2Ac, illetve a 850 bp-os növényi A alegység homológ (Dr. Dombrádi Viktor, DE OEC, Debrecen) DNS próbát random primerekkel radioaktívan jelöltük, és 55°C-on hibridizáltuk a nylon membránon immobilizált könyvtár klónokkal (1-2x10⁶ cpm/ml hibridizációs puffer). Az aspecifikusan kötődött próbát 2x SSC-vel távolítottuk el 60 °C-on. A pozitív jeleket autoradiográfiával detektáltuk. Háromszoros szűréssel tíz PP2Ac és két A alegység fág-klónt izoláltunk. A klónokat szekvenálással ellenőriztük és a hibátlan PP2Ac és PP2Aa cDNS kódoló szekvenciákat emlős expressziós vektorokba szubklónoztuk.

Emlős expressziós plazmidok HUVEC lambda fág preparátum templáttal a PP2Ac-t (930 bp), a PP2Aa-t (1770 bp) és a PP2Aa_N-t (as 1-385, 1185 bp) a kódoló szekvenciákra specifikus primerpárok felhasználásával PCR reakcióban sokszorozítottuk. A specifikus oligonukleotid primerpárok 5' vége a következő restrikciós hasítási helyeket tartalmazta a **PP2Ac** esetében:

Sal I (5'-TTGGTCGACCATGGACGAGAAGGTG-3'),

Kpn I (5'-GGGCGGTACCTTACAGGAAGTAGTCTG-3'); a **PP2Aa** esetén:

Kpn I (5'-AAGCATGGTACCATGGCGGCGGCCGAC-3'),

Xba I (5'-GGGCTCTAGAGGCGAGAGACAGAACAG-3'); a **PP2Aa_N** esetén:

Kpn I (5'-AAGCATGGTACCATGGCGGCGGCCGAC-3'),

Xba I (5'-AGGGCCCTCTAGAAATCACCTCGTTCACACA-3').

A PCR termékeket a pCMV-HA (3.8 kb) és a pcDNA3.1/Myc-His(+) A verzió (5.5 kb) emlős expressziós vektorokba szubklónoztuk. A konstruktok szekvenciáit és a nyitott olvasási keret helyességét szekvenálással ellenőriztük. A vad típusú c-Cbl expressziós konstruktot Dr. Y. Yarden (Weitzmann Institute, Rehovot, Izrael) bocsátotta rendelkezésünkre.

Transzfekció A sejteket 70 % konfluencia eléréséig szövettenyésztő edényekben tenyésztettük, majd inkubáltuk a PP2Ac vagy a PP2Aa alegységek, vagy mindkét alegység konstruktjával FuGene 6 transzfekciós reagens (Roche) jelenlétében követve a termékre vonatkozó leírást. Transzfekció után a sejteket 24 órán vagy 48 órán keresztül inkubáltuk (37°C, 5% CO₂ termosztát), majd mostuk háromszor 1x PBS-sel (10 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄, 2.7 mM KCl, 137 mM NaCl, pH 7.4), és további kísérleteinkhez használtuk fel.

In vitro foszfatáz aktivitás meghatározása transzfectált sejtekben A 24 vagy 48 órás poszttranszfekciós inkubálási idő lejártá után a sejteket háromszor mostuk 1x PBS-sel, majd a sejtekhez lízis puffert adtunk (50 mM Tris, pH=7.5, 0.1mM EDTA, 28 mM 2-ME, használat előtt csak a felhasznált térfogathoz adtunk 0.5 mM PMSF-t és 2 mM bezamidint), majd a sejteket szonikálással feltártuk. Feltárás után a foszfatáz aktivitás meghatározásához a mintákat húszszorosára hígítottuk a 20 mM Tris-HCl-t (pH=7.4), 0.1% 2-ME-t és 1 mg/ml BSA-t tartalmazó pufferrel. A foszfatáz aktivitást 5 µM [³²P]-MLC20 szubsztráttal határoztuk meg. *In vitro* körülmények között az MLC20 mind a protein foszfatáz 1 (PP1), mind a protein foszfatáz 2A (PP2A) szubsztrátja. Ahhoz, hogy a két enzim aktivitását elkülöníthessük 1 nM okadánsavat (specifikus protein foszfatáz gátlószer) használtunk, ami ebben a koncentrációban csak a PP2A-t gátolta. A reakciót a szubsztát hozzáadásával indítottuk és 10 percig 30°C-on inkubáltunk. A foszfatáz reakciót (50 µl reakcióelegy) 200 µl 10% TCA hozzáadásával állítottuk le és a fehérjék kicsapásának elősegítésére az elegyhez 200 µl 6 mg/ml BSA oldatot is adtunk. A kihalászott ³²P_i-ot a kicsapódott fehérjék centrifugálással történő elválasztása után 400 µl felülúszóból határoztuk meg szcintillációs számlálóban. A foszfatáz aktivitás változását a kontroll mintákhoz hasonlítva (a kontrollt 100%-nak véve) százalékosan adtuk meg.

Adenovírus plazmidok Plazmid templáttal a PP2Ac-t (930 bp), a PP2Aa-t (1769 bp) a kódoló szekvenciára specifikus primerpárok felhasználásával PCR reakcióban sokszorozítottuk. A specifikus oligonukleotid primerpárok 5' vége a következő restrikciós hasítási helyeket tartalmazta:

a **PP2Ac** esetében

Eco RV (5'-TGATATCCGATGTACCCATACGAT-3')

Sal I (5'-GCGTCGACCTTACAGGAAGTAGTC -3'),

a **PP2Aa** esetén

Eco RV (5'-ATTGATATCCGATGGCGGCGGCC-3')

Xho I (5'-GCTCTCGAGGGCGAGAGACAG-3').

A PCR termékeket a pShuttle-lres-hrGFP-2-HA adenovírus vektorba szubklónoztuk. A plazmidokat szekvenálással ellenőriztük. A rekombináns adenovírus plazmidokat homológ rekombinációval hoztuk létre a fenti plazmidok és a pAdEasy-1 vírus DNS plazmid felhasználásával követve a termékre vonatkozó leírást (Stratagene). A rekombináns adenovírus konstruktokat restrikciós hasítással ellenőriztük. Kontrollként pShuttle-CMV-lacZ-pAdEasy-1 konstruktot használtunk, amit a fenti rekombináns plazmidokhoz hasonlóan állítottunk elő.

Rekombináns adenovírus sokszorosítása és tisztítása A rekombináns adenovírus sokszorosítását és tisztítását az irodalmi hivatkozásban (He és mtsai, 1997), valamint az AdEasyTM Adenovírus vektor kit-ben (Stratagene) leírtaknak megfelelően végeztük kevés módosítással. A tisztított rekombináns plazmidokat *Pac I* restrikciós enzimmal linearizáltuk, etanollal precipitáltuk, majd transzfektáltuk 50-70% konfluenciájú AD293 sejtekbe (2×10^6 sejt/ T-25 flaska). A transzekcióhoz Lipofectamine vagy FuGene 6 transzekciós reagenst használtunk OptiMEM transzekciós médiumban, a termékre vonatkozó leírás alapján. A transzekció sikerességéről a GFP expressziójának ellenőrzésével győződünk meg, amihez Nikon fáziskontraszt mikroszkópot használtunk. A transzekció utáni 7-10. napon a sejteket felkapartuk, centrifugálással összegyűjtöttük és 2 ml steril 1x PBS-ben vettük fel. Majd a sejteket lizáltuk, négyszer ismételve a fagyasztást (szárázjég/methanol), olvasztást (37°C-os vízfürdő) és a vortexelést (15 másodperc, szobahőn). Centrifugálással (1000 rpm, 5-10 perc, 4°C) eltávolítottuk a sejtörmeléket, és a felülúszót- ami a rekombináns adenovírust tartalmazta- használtuk a továbbiakban. Az így nyert vírusszuspenziónak 30-50%-val újra AD293 sejteket fertőztünk meg. A sejteket 2-3 nappal a fertőzés után gyűjtöttük össze és a fenti módszert követve tisztítottuk az ún. elsődleges vírusszuspenziót. Az elsődleges vírusszuspenzió titere 10^7 - 10^8 pfu/ml volt. Minden egyes sokszorosítással a vírustitert tízszeresével növelhetjük. Ahhoz, hogy a vírusszámot tovább növeljük a továbbiakban a T-25-ös flaska helyett T-75-ös flaskát használtunk. Kétszer ismételve a vírusfertőzést T-75-ös flaskákat használva, magas titerű tisztított vírust állítottunk elő a következőképpen: a flaskákból a sejteket centrifugálással összegyűjtöttük (5 perc, 500 g), majd az összegyűjtött sejteket 8 ml steril 1x PBS-ben vettük fel és négyszer ismételtük a fagyasztást (szárázjég/methanol), olvasztást (37°C-os vízfürdő) és a vortexelést (15

másodperc, szobahőn). Centrifugálással (6000 rpm, 5 perc, 4°C) eltávolítottuk a sejttörmeléket, és a felülúszóhoz- ami a rekombináns adenovírust tartalmazta- 4.4 g CsCl₂-ot adtunk és gradiens ultracentrifugálással (32 000 rpm, 10°C, 7 óra) nyertük a tisztított vírust. Ultracentrifugálás után elkülönítettük a tisztított vírust és dializáltuk háromszor három órán keresztül TD pufferrel szemben (137 mM NaCl, 6 mM KCl, 0.7 mM Na₂HPO₄, 25 mM Tris-HCl Ph 7.5, ami tartalmazott 1mM CaCl₂-ot és 1mM MgCl₂-ot). A tisztított vírust 10 mM Tris-t, pH 8.0, 100 mM NaCl-ot, 0.1% BSA-t, és 50% glicerolt tartalmazó steril pufferben vettük fel és -20°C vagy -70°C-on tároltuk. A végleges vírustiter 10¹⁰-10¹¹ pfu/ml volt.

Endothel sejtek fertőzése tisztított rekombináns adenovírossal A tisztított vírust különböző hígításokban használtuk, hogy ellenőrizzük a fertőzés hatékonyságát. A vírust szérummentes médiumban hígítottuk. A HPAE vagy BPAE sejteket 90%-os konfluencia elérése után fertőztük meg, majd inkubáltuk egy órán keresztül 37°C-on, 5 % CO₂ termosztátban. Az inkubálás után a szérummentes médiumot komplett médiummal egészítettük ki (lásd: Anyagok és Módszerek/Sejtenyésztés) és egy éjszakán keresztül inkubáltuk (37°C, 5 % CO₂ termosztát) a sejteket a vírussal. Majd újra cseréltük a médiumot, amit egy 24 órás inkubálás (37°C, 5 % CO₂ termosztát) követett az általunk vizsgálni kívánt fehérjék expressziójának eléréséhez. A PP2Ac és PP2Aa expressziójáról Western blot és immunofluoreszcencia segítségével győződünk meg.

Transzendothel elektromos ellenállásmérés (TER) A sejtek barrier funkciójának tanulmányozására, nagy érzékenységű biofizikai mérést (Applied Biophysics, Troy, NY, USA) használtunk az irodalmi hivatkozásokban leírtaknak megfelelően (Garcia és mtsai, 1997, Schaphorst és mtsai, 1997). A sejteket arany elektróddal (10⁻⁴ cm²) ellátott szövettenyésztő edényekben tenyésztettük és elektrolitként a tenyésztő médiumot használtuk. A totál elektromos ellenállást a teljes monolayeren keresztül mértük, a meghatározását úgy végeztük, hogy mértük a sejtek bazális felszíne és az arany elektródok közötti ellenállást figyelembe véve a fokális adhéziót és a sejtek egymás közötti ellenállását. Amikor a sejtek kitapadnak a mikroelektrodra a TER megnövekszik, ellenben amikor a sejtek lekerekednek, elválnak a felszíntől, vagy csökken az adhéziós készségük, a TER lecsökken (Giaever és Keese 1993). Az arany elektródok és a nagyobb mérőelektród (1 cm²) egy erősítőhöz (5301A; EG&G Instruments, Princeton, NJ, USA) ill. egy előerősítőhöz csatlakozik (5316A; EG&G

Instruments). A beérkezett jeleket egy Pentium 100 MHz-es számítógép alakította át és dolgozta fel. Csak azoknak a tenyésztőedényeknek az eredménye került feldolgozásra, melyekben a sejtek ellenállása nem érte el az 1000 Ω -ot. Az ellenállásértékeket normalizáltuk, az irodalmi hivatkozásban leírtaknak megfelelően (Garcia és mtsai, 1997).

Endothel sejtek frakcionálása A frakcionálást kétféle módszert követve valósítottuk meg. Az első módszer lehetővé teszi, hogy elkülöníthessük a mikrotubulusban gazdag (MT), citoszkeleton (F-aktin gazdag), és a citoszól frakciókat, melyet az irodalmi leírásnak megfelelően végeztünk (Verin és mtsai, 1998, da Costa és mtsai, 2000). Az EC monolayert 1x PBS-sel mostuk, majd a sejteket 30 percig jégen inkubáltuk, hogy elősegítsük a polimerizált tubulin kicsapódását. Az inkubálás után a sejteket felkapartuk, és reszuszpendáltuk lízis pufferben, ami tartalmazott PEM-et (35 mM Pipes pH 7.4, 1 mM EGTA, 5 mM MgSO_4), 50 mM NaF-t, 0.4 mM Na_3VO_4 -t, 1 mM DTT-t és proteáz inhibitor koktélt (Protease Inhibitor Cocktail Set III, Calbiochem). A sejtízátumot 26 G fecskendővel homogenizáltuk. A sejtörmelékot centrifugálással távolítottuk el (800g 10 perc, 4°C). A felülúszót tovább centrifugáltuk 30 percig 92,000g-n, 4°C-on. A centrifugálás után nyert pellet a citoszkeleton frakció (CSK). Az MT frakciót a felülúszóból nyertük ki, 20 μM taxol és 1 mM GTP jelenlétében 37°C-on, 1 órán keresztül polimerizáltuk, majd 20 % szacharózt, 1 mM DTT-t, proteáz inhibitor koktélt 0.4 mM Na_3VO_4 -t és 20 μM taxolt tartalmazó PEM-et adtunk és centrifugálással (92 000g, 30 perc, szobahőmérséklet) összegyűjtöttük az MT frakciót.

A másik módszerrel a citoszól, a tubulin, az aktin és az intermedier filamentum (vimentin) gazdag frakciókat különítettük el (Ding és mtsai, 1996). A sejteket EGTA-t és 2 mM bisz-etilén glikolt tartalmazó 1x PBS-ben 10 percig 37°C-on inkubáltuk. Majd a sejteket centrifugálással (800g, 5 perc) összegyűjtöttük és citoszkeleton-stabilizáló pufferben (CSK), (10 mM Pipes, pH 6.8, 250 mM szukróz, 3 mM MgCl_2 , 150 mM KCl, 1mM EGTA, 1mM fenil-metil-szulfonil fluorid (PMSF) reszuszpendáltuk. A citoszól frakciót centrifugálással különítettük el (14,000g, 10 perc, szobahő) miután 5 percig szobahőn inkubáltuk lízis pufferben, ami 0.15 % Tritont tartalmazó CSK puffer volt. Centrifugálás után a nyert felülúszó tartalmazta a citoszól frakciót. A pelletet háromszor mostuk lízis pufferben 37°C-on, majd a tubulint depolimerizáltuk úgy, hogy a mosott pelletet 4°C-ra hűtöttük le 20 percig lízis pufferben. A mintát centrifugáltuk 4°C-on 10 percig 14,000g-n, majd további

kísérleteinkhez a tubulinban (T) gazdag felülúszót használtuk. Az aktinban gazdag pelletet kétszer mostuk hideg lízis pufferrel, majd szollubilizáltuk CSK pufferrel, ami tartalmazott 0.6 mM KCl-t, 0.2 mg/ml DNázt és 10 mM $MgCl_2$ -t. Az aktinban gazdag frakciót (A) (a centrifugálás után a pellet tartalmazta) az intermedier filamentumokban gazdag régiótól (vimentin, V) (a centrifugálás után a felülúszó tartalmazta) centrifugálással választottuk el (14,000g, 20 perc, 4°C).

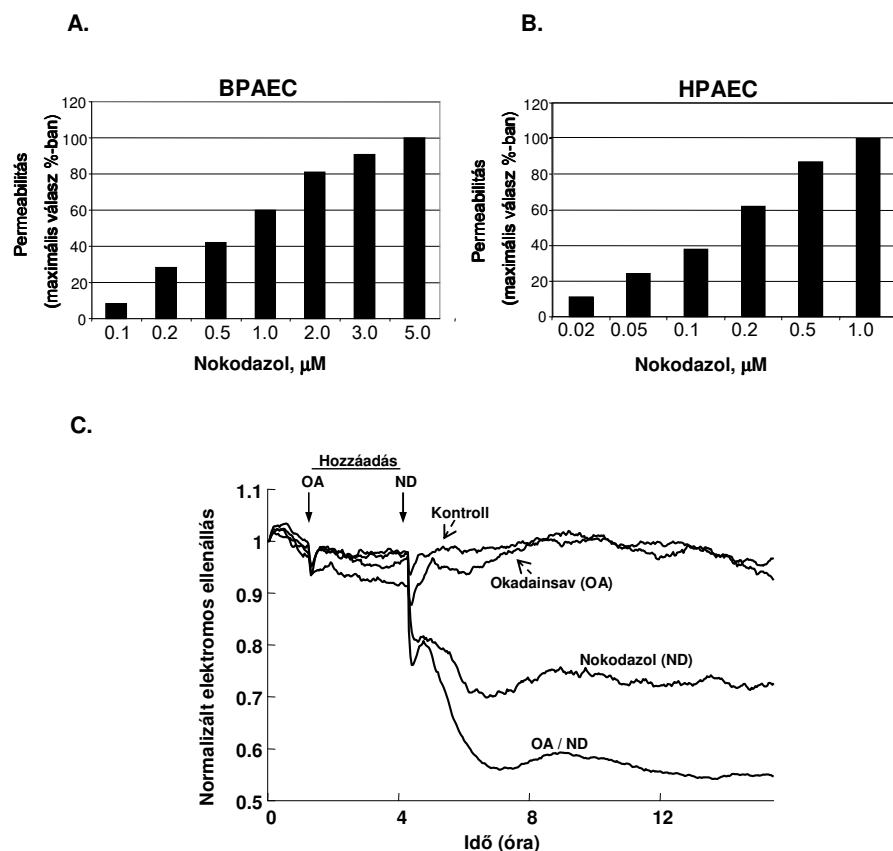
Western-blot SDS-PAGE-t 10 % akrilamid koncentrációjú géleken végeztünk (Laemmli, 1970). A sejteket 1x PBS-sel mostuk, majd kétszeres töménységű SDS mintapufferben felkapartuk és összegyűjtöttük. A sejteket a kétszeres töménységű SDS mintapufferben 5 percig 100°C-ra hevítettük, majd a gélre 20-25 µl fehérje mintát vittünk fel. A fehérjéket a gélből nitrocellulóz membránra blotoltuk 250mA áramerősséggel, 90 percig, folyamatos hűtést alkalmazva. A membrán nem specifikus kötőhelyeinek blokkolására 5 % sovány tejport és 0.1 % Tween 20-at tartalmazó TBS-t (25 mM Tris-HCl (pH=8), 136 mM NaCl, 2 mM KCl) használtunk. Az elsődleges antitestekkel a membránt 120-180 percig, a másodlagos antitestekkel 60 percig inkubáltuk. Az antitesteket 1 % sovány tejport és 0.1 % Tween 20-at tartalmazó TBS-ben oldottuk. Az elsődleges antitestek kimutatására peroxidázzal kapcsolt másodlagos antitesteket, a keresztreakciók detektálására kemilumineszcencián alapuló (ECL) reagenst használtunk.

Immunofluoreszcencia A 12 lyukú szövettenyésztő edényben, fedőlemezekben tenyésztett sejteket 1x PBS-ben 3.7%-os formaldehiddel fixáltuk 10 percig 4°C-on, majd háromszor mostuk 1x PBS-sel és 0.2 % Triton X-100-at tartalmazó PBST-ben permeabilizáltuk 30-60 percig szobahőn. Permeabilizálás után 2 % BSA-t tartalmazó PBST-ben blokkoltuk 30 percig szobahőn. Az elsődleges antitestekkel a sejteket 60 percig inkubáltuk szobahőn blokkoló oldatban. Immunodetektálásra Alexa 350-, Alexa 488- és Alexa 594- konjugált másodlagos antitesteket használtunk. Az F-aktin kimutatására Texas Red-phalloidint alkalmaztunk. A metszeteket Nikon fáziskontraszt inverz mikroszkóppal és Zeiss LSM 410 konfokális lézermikroszkóppal vizsgáltuk.

EREDMÉNYEK

A PP2A aktivitás gátlás hatása az endothel monolayer elektromos ellenállására és az F-aktin szerkezetére

Számos munkacsoport dokumentálta a PP2A és a mikrotubulusok kötődését. Sontag és mtsai immunofluoreszcens kísérletekben kimutatták a PP2A jelenlétét a mikrotubulusokon mind ideg-, mind nem ideg sejtekben. A PP2A *in vitro* reverzibilisen kötődik a mikrotubulusokhoz, és a citoszól kivonatban található PP2A kb. 75 %-a kapcsolódik az MT-hez.



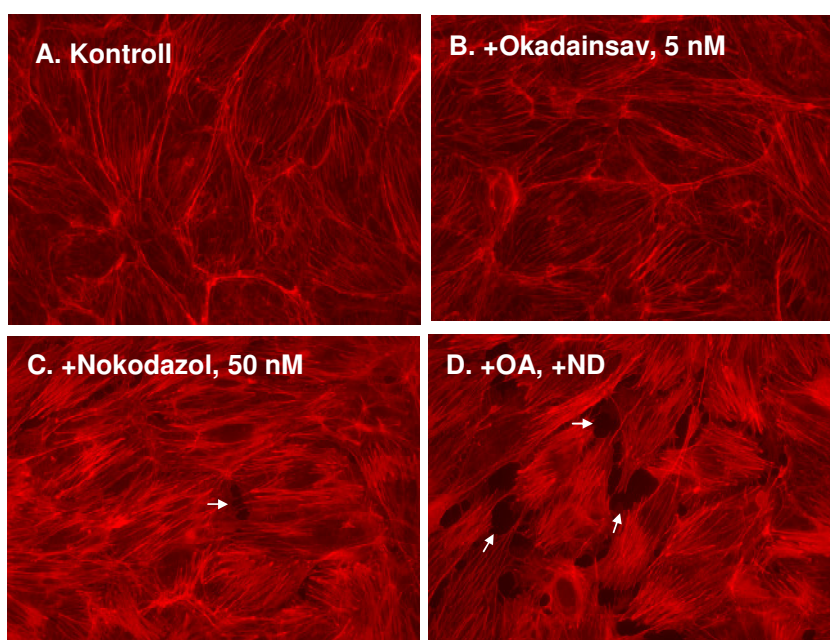
3. ábra. A PP2A aktivitás gátlás és/vagy a mikrotubulus (MT) destabilizáció hatása az endothel monolayer elektromos ellenállására (TER).

Koncentráció függő permeabilitásváltozás marha tüdő artéria (BPAEC) és humán tüdő artéria (HPAEC) endothel monolayeren. A permeabilitást a maximális válasz %-ban adtuk meg (**A és B panel**). **C panel**: A BPAEC monolayert 0.1 % DMSO-val (kontroll), vagy 5 nM okadánsavval előkezeltük komplett médiumban, majd 0.2 μM nokodazolt (ND) adtunk a sejtekhez. A TER-t 16 órán keresztül mértük az Anyagok és Módszerek fejezetben leírtak szerint. A nyilak az agonisták hozzáadását jelölik.

Bár a mikrotubulusok (MT) szerepe a sejtek kontrakciójában kevésbé tisztázott, ismert, hogy mind simaizomban, mind endotheliumban a mikrotubulus destabilizálása olyan jelátviteli pályát indít el, amely magában foglalja a Rho- kinázt és a mikrofilamentumokkal kapcsolatot teremtve kontrakciót vált ki (Verin és mtsai,

2001). Megvizsgáltuk, hogy a PP2A gátlása, hogyan befolyásolja a mikrotubulusok nokodazol (MT depolimerizációt kiváltó vegyület) által kiváltott destabilizációját.

A 3. ábra azt mutatja be, hogy a nokodazol dóziszfüggően, mind marha (BPAEC), mind humán (HPAEC) tüdő artéria endothel sejtekben jelentősen megnövelte a sejtek permeabilitását (csökkentette a monolayer elektromos ellenállását). A transzendothel elektromos ellenállásmérést arany elektródokkal ellátott tenyésztőedényekben végeztük. A sejtek kitapadása, a monolayer kialakulása után, a monolayer ellenállásának változását az arany elektródok segítségével, számítógépen rögzítettük.



4. ábra **A PP2A aktivitás gátlás fokozza a nokodazol hatását a sejtek közötti rések kialakulására endothel monolayeren.**

A HPAEC monolayert 0.1% DMSO-val (**A, C panel**), vagy 5 nM okadánsavval (**B, D panel**) előkezeltük 1,5 órán keresztül, majd 50 nM nokodazolt adtunk a sejtekhez (**C, D panel**). A kezelés után a sejteket fixáltuk és F-aktinra festettük az Anyagok és Módszerek fejezetben leírtak szerint. A nyilak a sejtek közötti réseket jelölik.

Abban az esetben, ha a sejtek permeabilitása megnőtt, a monolayer elektromos ellenállása lecsökkent, amit a számítógép regisztrált. A maximális választ BPAEC-ben 5 μ M-nál (3A ábra), HPAEC-ben 1 μ M-nál (3B ábra) kaptuk. Okadánsav, a PP2A specifikus gátlószere (Cohen és mtsai, 1990), 5 nM koncentrációban nem befolyásolta az endothel sejtek barrier funkcióját, viszont a nokodazol (1 μ M) hatását fokozta (3C ábra).

Eredményeinket immunfluoreszcens vizsgálatokkal is szeretnénk volna alátámasztani. A metszeteket előzetes kezelések után az Anyagok és Módszerek című fejezetben leírtaknak megfelelően készítettük. A 4B ábrán jól látható, hogy 5 nM okadánsav (OA) kezelést (Wera és Hemmings, 1995) követően a sejtek a kontroll

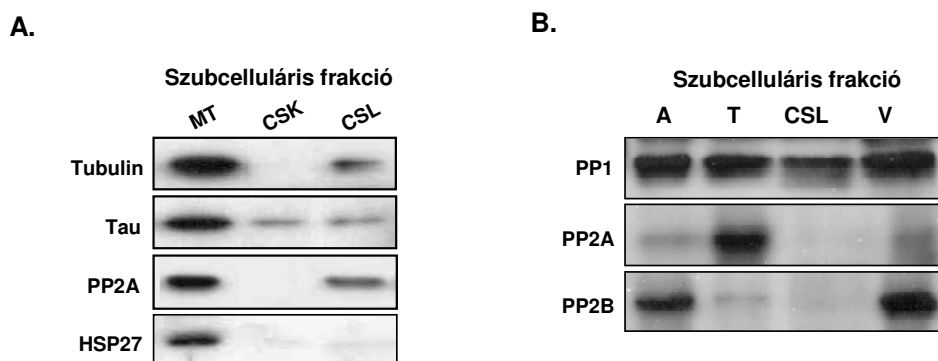
sejtekhez (4A ábra) hasonló F-aktin szerkezetet mutattak, és sejtek közötti rések kialakulása sem figyelhető meg. Nokodazol kezelés (4C ábra) (50 nM) hatására azonban, a sejtek közötti rések megjelenése és stresszkábelek kialakulása figyelhető meg.

Ha a sejteket nokodazol kezelés előtt okadánsavval előkezeltük (4D ábra) megfigyelhettük, hogy az okadánsav fokozta a nokodazol hatását a sejtek közötti rések és a stresszkábelek kialakulásában.

Ezek az eredmények a PP2A részvételére utalnak az endothel sejtek mikrotubulus-mediált barrier funkció szabályozásában és a citoszkeleton újrendeződésében.

Szeril/Treonil specifikus protein foszfatázok lokalizációja endothel sejtek szubcelluláris frakcióiban

Annak megerősítésére, hogy a PP2A endothel sejtekben is kötődik a mikrotubulusokhoz sejtfractionálást végeztünk az Anyagok és Módszerek/Endothel sejtek frakcionálása című fejezetben leírtaknak megfelelően, amit Western blot követett. Citoszól (CSL), mikrotubulusban gazdag (MT), és citoszkeleton (CSK) F-aktin gazdag frakciókat különítettünk el. Ahhoz, hogy meggyőződjünk a módszer helyességéről először β -tubulin és tau elleni specifikus antitesteket használtunk az MT frakció vizsgálatakor. Western-blottal kimutattuk (5A ábra), hogy az MT frakció gazdag mind β -tubulinban, mind tau fehérjében, megerősítve ezzel a frakcionálási módszer hitelességét.



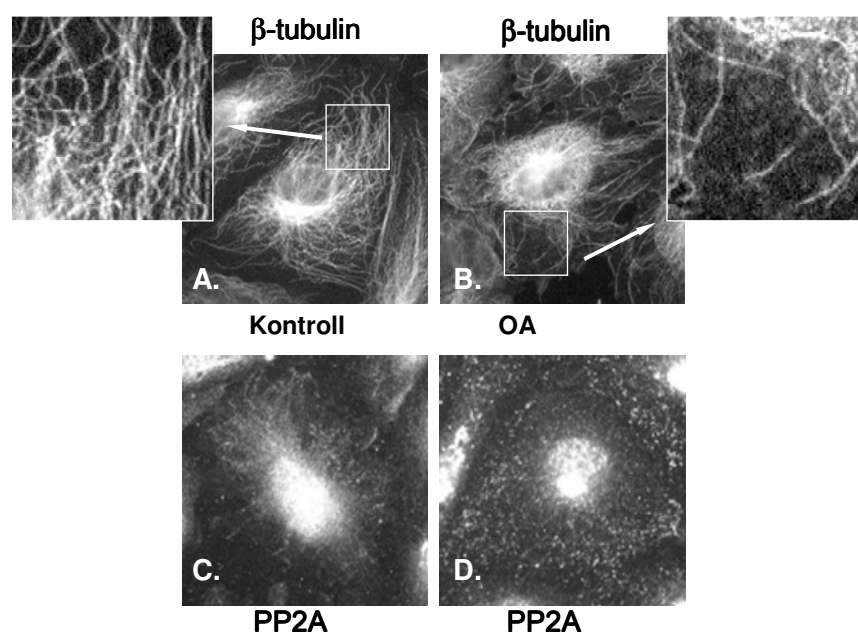
5. ábra Szeril/Treonil specifikus protein foszfatázok lokalizációja endothel sejtek szubcelluláris frakcióiban.

A panel: Az Anyagok és Módszerek fejezetben leírtaknak megfelelően preparált sejtfractionok (MT, F-aktin gazdag citoszkeleton CSK és citoszól CSL) fehérjéit 10%-os SDS-PAGE-sel elválasztottuk és nitrocellulóz membránra blotoltuk. A fehérjéket β -tubulin, tau-, PP2A- és HSP27- elleni specifikus antitestekkel detektáltuk. **B panel:** Az Anyagok és Módszerek fejezetben leírtaknak megfelelően preparált sejtfractionok (aktin gazdag, tubulin gazdag, citoszól CSL és intermediate filamentumok-vimentin gazdag) fehérjéit 10%-os SDS-PAGE-sel elválasztottuk és nitrocellulóz membránra blotoltuk. A fehérjéket PP1-, PP2A- és PP2B- elleni specifikus antitestekkel detektáltuk.

Az 5A ábra bemutatja azt is, hogy a PP2A jelentős része, és a HSP27-kis molekulatömegű hősokk fehérje, a PP2A egyik lehetséges szubsztrátja is jelen van az MT frakcióban, ami szintén ezen fehérjék szoros kapcsolatára utal a mikrotubulusokkal az endothel sejtekben. A másik frakcionálási módszert- ahol aktin (A), tubulin (T), vimentin (V) gazdag és citoszól (CSL) frakciókat választottunk el- követő Western blottal (5B ábra) újra igazoltuk azt, hogy a PP2A szorosan kötődik a tubulinhoz. Megvizsgáltuk másik két szeril/treonil specifikus protein foszfatáz a PP1 és PP2B megoszlását is. Az immunoblot kísérlet (5B ábra) azt mutatta, hogy a PP1 minden frakcióban előfordult, míg a PP2B az aktin (A) és vimentin (V) gazdag frakciókban volt nagy mennyiségben jelen. Ezek a kísérleti eredmények igazolták a PP2A specifikus és szoros kötődését a mikrotubulusokhoz és ezzel feltételezhetjük a PP2A szabályozó szerepét endothel sejtek citoszkeleton szerkezetének szabályozásában.

A PP2A lokalizációja HPAE sejtekben

Miután a fenti eredmények bizonyítják a PP2A aktivitás és az endothel sejtek citoszkeletonjának egyik eleme- a mikrotubulusok - közötti kapcsolatot, a következőkben megvizsgáltuk, hogyan hat a PP2A aktivitás gátlása (OA-val) a PP2A és az MT elrendeződésére. Immunofluoreszcens eredményeink a PP2A és az MT hasonló elrendeződését mutatták kezeletlen HPAEC-ben (6A,C ábrák).



6. ábra **A PP2A lokalizációja HPAE sejtekben.**

A HPAE sejteket 0.1% DMSO-val (kontroll, **A, C panel**), vagy 5 nM okadánsavval kezeltük (**B, D panel**) másfél órán keresztül. A sejteket kezelés után fixáltuk és az Anyagok és Módszerek fejezetben leírtak szerint immunofluoreszcens festést végeztünk. **A, B panel:** A sejteket β -tubulin elleni specifikus

monoklonális antitesttel inkubáltuk. **C, D panel:** A sejteket PP2A elleni specifikus monoklonális antitesttel inkubáltuk. A kinagyított felvételek az endothel sejtek perifériás régióit mutatják.

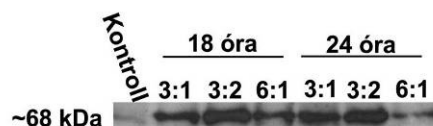
Ha gátoltuk a PP2A aktivitást okadánsavval (5 nM, 1,5 óra), megfigyelhettük a perifériás mikrotubulusok felbomlását, amit a PP2A szabálytalan eloszlása kísért (6B,D ábrák), amiből arra következtettünk, hogy a PP2A aktivitás gátlása után a PP2A disszociál a mikrotubulusokról.

Az okadánsav azáltal, hogy gátolja a PP2A aktivitását előidézi annak sejten belüli átrendeződését és a perifériás mikrotubulusokról való disszociációját, így valószínű, hogy a PP2A aktivitás részt vesz a mikrotubulusok szerkezetének stabilizálásában, feltehetően a tau fehérje defoszforilációján keresztül.

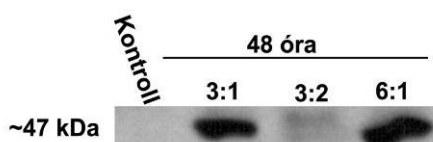
A PP2A alegységek klónozása és overexpressziója

Ahhoz, hogy a PP2A pontos szerepét tisztázhassuk az endothel sejtek barrier funkciójának, és a citoszkeleton elemeinek, mind a mikrotubulusok, mind az aktin elrendeződésének szabályozásában, a PP2A katalitikus és regulátor alegységeinek kódoló szekvenciáit emlős expressziós vektorokba szubklónoztuk, HUVEC cDNS könyvtár sikeres szűrése után az Anyagok és Módszerek című fejezetben leírtaknak megfelelően. A szekvenciát restriktációs elemzéssel és szekvenálással ellenőriztük. A PP2A A regulátor alegység klónban három nukleotid eltérést azonosítottunk a BC001537 emlős/humán nukleotidsorrendhez képest, ami egy aminosav (D helyett V) különbséget jelentett a fehérjeszekvenciában a 315. pozícióban (AAH01537). A PP2A C katalitikus alegység klónban két nukleotid eltérést azonosítottunk, összehasonlítva az NM002715 humán szekvenciával, ami az aminosavszekvenciában nem okozott eltérést (NP002706). Az emlős expressziós konstrukttal HPAEC-t tranziensen transzfektáltunk az Anyagok és Módszerek/Transzfekció fejezetben leírtaknak megfelelően és overexpresszáltuk a PP2Aa-t és PP2Ac-t. A Western blot (5. ábra) a transzfekció optimális körülményeit mutatja: az optimális transzfekciós arány a PP2Aa konstrukt esetén 3:2 volt (μ l transzfekciós reagens: μ g DNS) 24 órás poszttranszfekciós inkubálási idővel (7A ábra), a PP2Aa_N konstrukt esetén 3:1 vagy 6:1 arány, 48 órás inkubálási idővel (7B ábra), míg a PP2Ac konstrukt esetén a vizsgált arányok és inkubálási idő közül valamennyi vizsgált körülmény megfelelő volt a transzfekcióhoz (7C ábra). További kísérletekhez a 3:2 arányt és a 24 órás inkubálási időt használtuk a PP2Aa és a PP2Ac esetében, 48 órás inkubálási időt és 3:1 arányt a PP2Aa_N esetén.

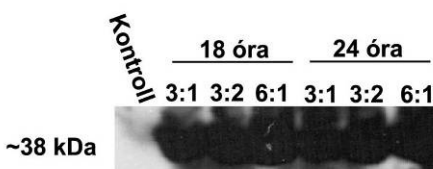
A.



B.



C.



7. ábra A PP2A alegységek transzfekciójának optimalizálása HPAEC-ben.

Western immunoblot a PP2Aa (A), a PP2A_N (B) és a PP2Ac (C) alegységek overexpressziója után HPAEC-ben. A transzfekciót az Anyagok és Módszerek fejezetben leírtak szerint végeztük.

A következő kísérletsorozatban azt kívántuk tisztázni, hogy az overexpresszált PP2A rendelkezik-e katalitikus aktivitással.

A foszfatáz aktivitásméréshez a PP2A katalitikus alegységével (C), az A alegységgel, a katalitikus és A alegységekkel együtt, valamint kontrollként az üres vektorokkal végeztük az endothel sejtek transzfekcióját. További kontrollként pedig nem transzfektált sejteket is használtunk. A transzfekciót és a 24 órás inkubálást követően a sejteket lizáltuk az Anyagok és Módszerek című fejezetben leírtak szerint és a teljes sejtkivonat foszfatáz aktivitását mértük. Az alkalmazott P-MLC szubsztrátot *in vitro* mind a PP1, mind a PP2A enzim képes defoszforilálni. Ezért a kétféle aktivitás megkülönböztetésére effektorként 1 nM okadánsavat (OA) használtunk. Az OA nanomólos koncentrációban gátolja a PP2A-t, a PP1 aktivitást viszont ebben a koncentrációban nem befolyásolja (Cohen és mtsai, 1990). Párhuzamos méréseket végeztünk úgy, hogy az egyik sorozatunkhoz nem adtunk gátlószert, a másik sorozathoz pedig igen. Effektor távollétében mértük a PP1 és PP2A együttes aktivitását. 1 nM okadánsav jelenlétében pedig csak a PP1 aktivitását mértük. Így a kapott eredmények különbségéből következtettünk a PP2A aktivitására. Az 1. táblázat eredményei azt mutatták, hogy a PP2A aktivitás 30-50%-

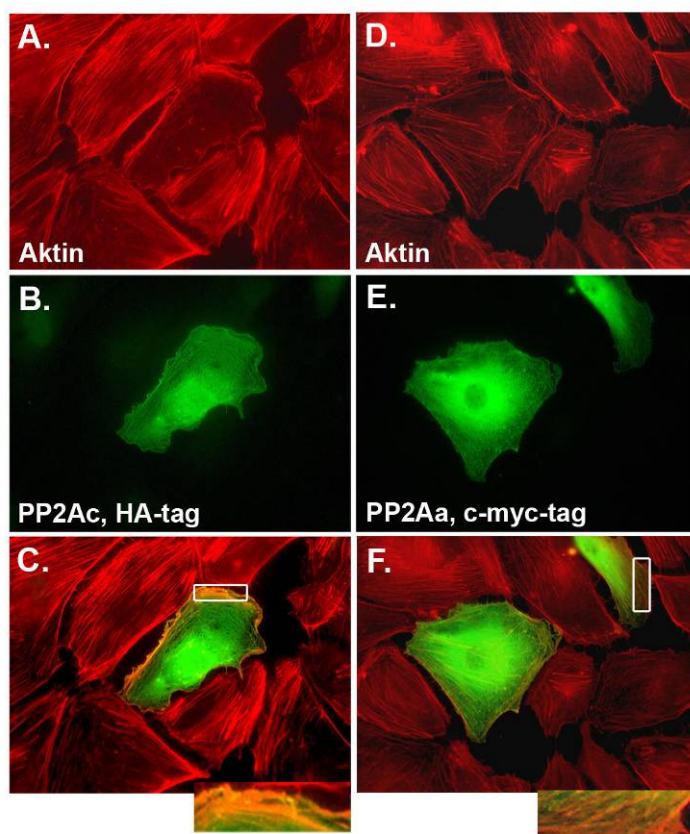
os emelkedése figyelhető meg a PP2Ac-vel transzfektált sejtek kivonatában, a kontrollhoz képest.

	PP2A % aktivitás
Kontroll	100 $\pm$ 16
Vektor	141 $\pm$ 10
PP2Ac	207 $\pm$ 14
PP2Aa	150 $\pm$ 11
PP2Aa+c	234 $\pm$ 18

1. táblázat PP2A aktivitás mérése az overexpresszált PP2A-t tartalmazó sejtek teljes lizátumában.

A protein foszfatáz 2A overexpresszió hatása az endothel sejtek aktin citoszkeleton szerkezetére

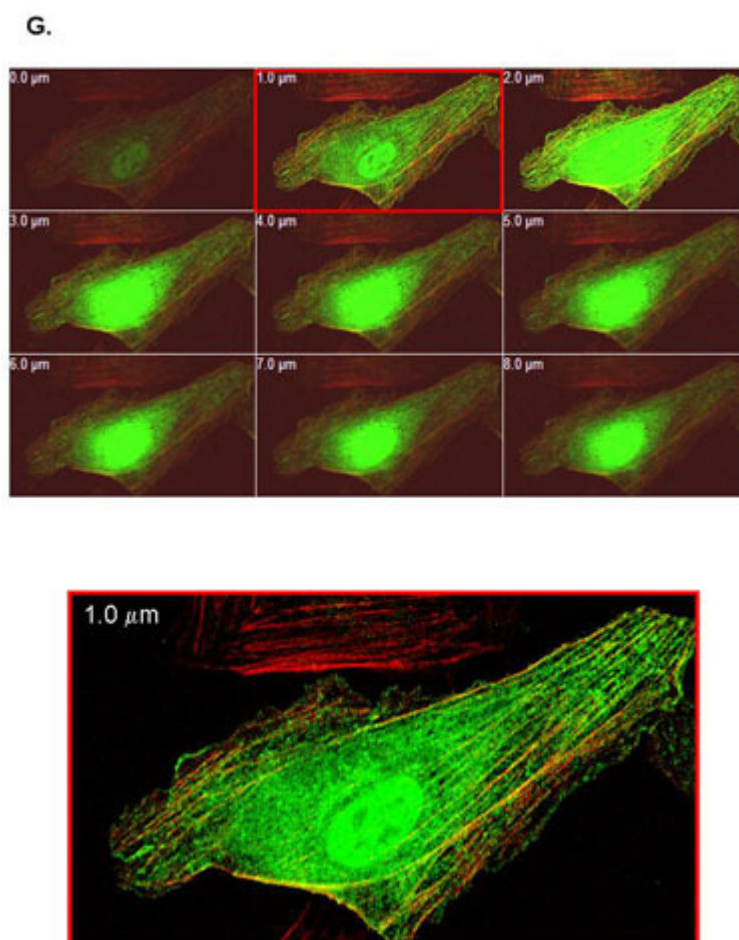
Jól ismert tény, hogy, az aktin citoszkeleton fontos szabályozó szerepet tölt be a barrier funkcióban és a citoszkeleton szerkezetének megtartásában.



8. ábra A PP2A alegységek overexpressziójának hatása endothel sejtek aktin citoszkeleton szerkezetére.

A HPAE sejteket PP2Ac/pCMV-HA (A-C, G) vagy PP2Aa/pcDNA3.1/Myc-His (D-F) plazmidokkal transzfektáltuk. A sejteket vagy HA-tag elleni poliklonális (PP2Ac kimutatására), vagy c-myc –tag elleni monoklonális (PP2Aa kimutatására) antitesttel inkubáltuk, az F-aktin kimutatására alkalmas Texas Red-phalloidinnel ugyanabban az időben, hogy mindkét fehérjét láthatóvá tegyük. **C:** A és B egyesített képe. **F:** D és E egyesített képe. A nagyított felvételek az endothel sejtek perifériás régióit mutatják. **G:** a PP2Ac alegységet overexpresszáló HPAE sejt konfokális felvétele.

Az aktin polimerizációja stresszkötegek létrejöttéhez vezet, ami a sejtek közötti rések kialakulását, ill. ebből következően barrier diszfunkciót, hiperpermeabilitást eredményez. Ezért megvizsgáltuk az overexpresszált PP2A alegységek hatását az F-aktin szerkezetére, belső kontrollt használva immunofluoreszcens kísérleteinkhez. A 8A-C ábrákon látható, hogy a PP2Ac overexpressziója az aktin citoszkeleton átrendeződéséhez vezetett, a sejteket behálózó stresszfilamentumok drámaian elvékonyodtak vagy teljesen eltűntek az endothel sejtekből, míg a kortikális aktinrégió a sejtek periferiáján megvastagodott. Ebből arra következtettünk, hogy a PP2Ac befolyásolja a sejtek stresszfilamentumainak depolimerizációját és a kortikális aktingyűrű összerendeződését. A katalitikus aktivitással nem rendelkező PP2Aa overexpressziója után a transzfektált sejtek F-aktin szerkezetében nem láttunk detektálható változást (8D-F ábrák). Mindkét alegység ko-lokalizált a perifériális F-aktinnal, ahogy azt a 8C és 8F ábrák és az azokból kinagyított részletek mutatják.

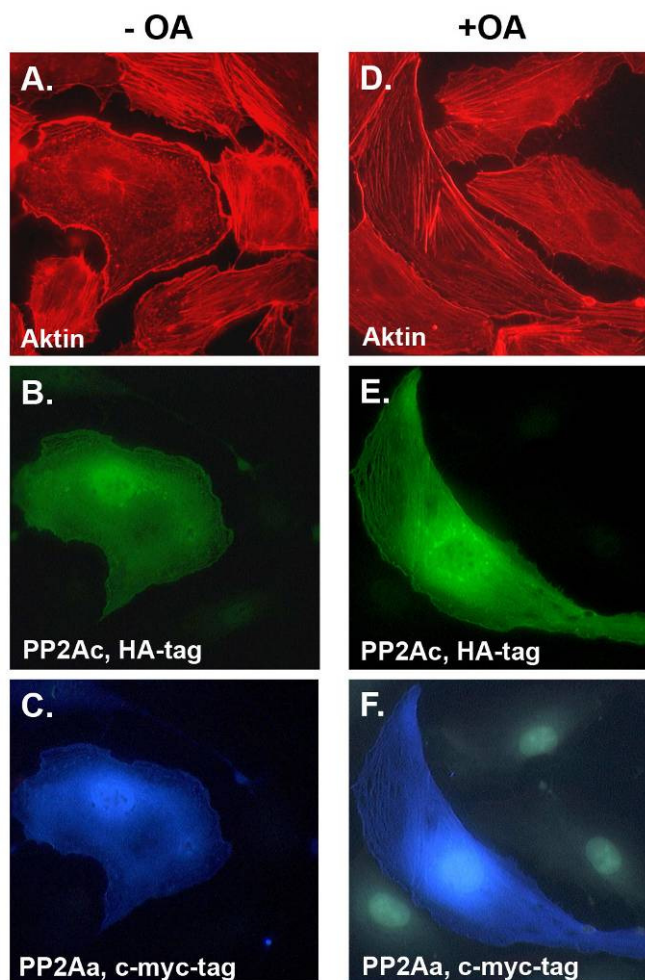


8. ábra (folyt.) **A PP2A alegységek overexpressziójának hatása endothel sejtek aktin citoszkeleton szerkezetére.**

Konfokális felvételeinken megfigyelhető, hogy míg az overexpresszált PP2Ac főként a sejtmagban, de a sejtmagtól a citoszolon keresztül a membránban is lokalizálódott, addig a ko-lokalizációt a PP2Ac és F-aktin között főként a sejtperiférián mutattuk ki

(8G ábra), mivel a citoszólban az aktin filamentumok eltűntek a PP2Ac-t overexpresszáló sejtekben.

Ugyanezt az eredményt, vagyis a stresszfilamentumok eltűnését és a kortikális aktinrégió feldúsulását kaptuk akkor is, amikor a PP2Ac-t és PP2Aa-t ko-expresszáltuk (9A-C ábrák).



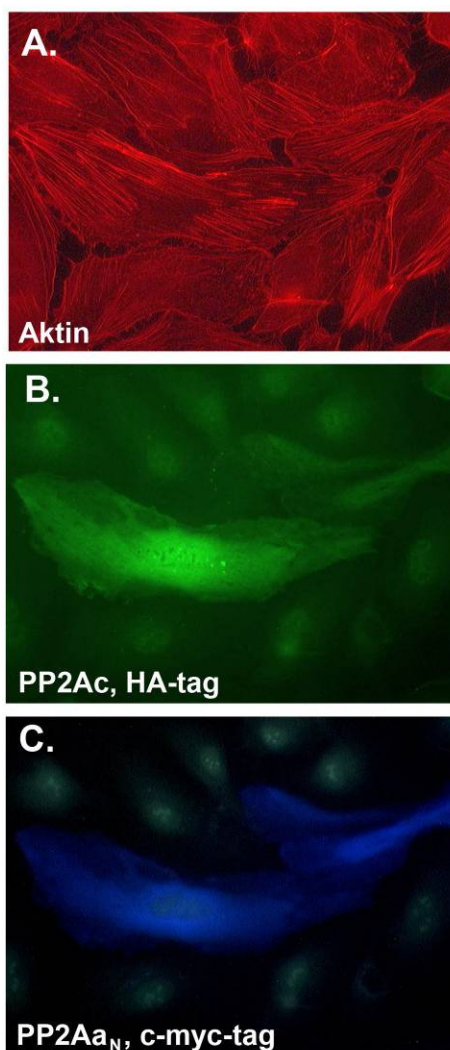
9. ábra Okadánsav (OA) kezelés megszünteti az overexpresszált PP2Aa+c aktin filamentumokra gyakorolt hatását.

A HPAE sejteket PP2Ac/pCMV-HA és PP2Aa/pcDNA3.1/Myc-His plazmidokkal ko- transzfektáltuk. A sejteket 0.1% DMSO-val (kontroll) (A-C) vagy 5 nM okadánsavval kezeltük másfél óráig (D- F). A kezelés után a sejteket HA-tag elleni poliklonális (PP2Ac kimutatására) (B, E), c-myc -tag elleni monoklonális (PP2Aa kimutatására) (C, F) antitesttel, és Texas Red-Phalloidinnel (aktin kimutatására) (A, D) inkubáltuk ugyanabban az időben, hogy mindhárom fehérjét láthatóvá tegyük.

A következőkben megvizsgáltuk, hogyan hat a PP2A aktivitás gátlása a citoszkeleton szerkezetére, a fehérjét overexpresszáló sejtekben. Másfél órás OA kezelés után (Wera és Hemmings, 1995) a PP2Ac és PP2Aa alegységeket ko-expresszáló sejtekben az F-aktin szerkezete nem mutatott szignifikáns eltérést sem a kontroll, sem a transzfektált sejtekhez képest (9D-F ábrák), ami azt jelzi, hogy az OA gátolta

az overexpresszált PP2A aktivitását, így az overexpresszált PP2A aktivitás nem képes kialakítani a jellegzetes aktin citoskeleton szerkezetet.

Feltételeztük, hogy a rekombináns A alegység nemcsak a rekombináns C alegységet kötheti, hanem az endogén B alegységet is. A PP2A holoenzimben a B regulátor alegység felelős az enzim szubsztrátspecifitásáért, a B alegység rendeli a holoenzimet a megfelelő szubsztráthoz.



10. ábra A PP2Aa alegység N-terminális mutánsa megakadályozza a rekombináns PP2Ac hatását.

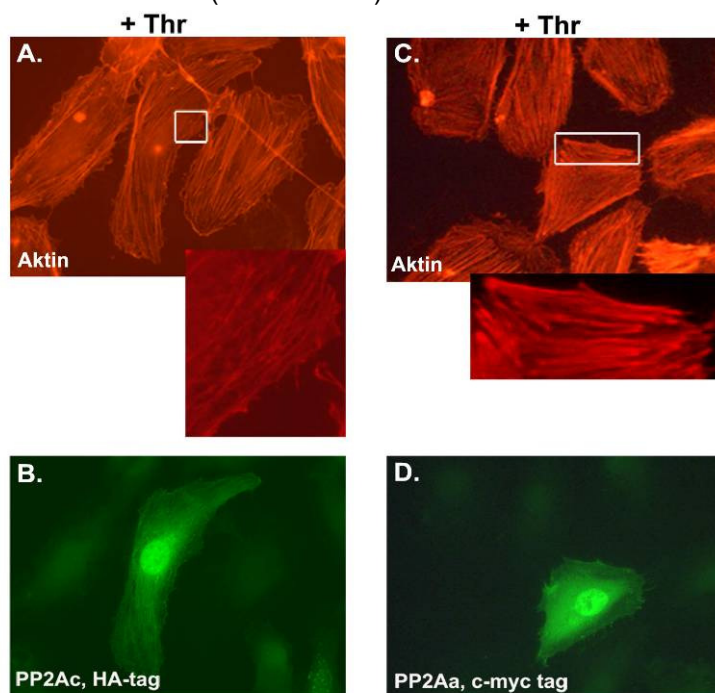
A HPAE sejteket PP2Ac/pCMV-HA és PP2Aa_N/pcDNA3.1/Myc-His plazmidokkal ko-transzfektáltuk. A sejteket HA-tag elleni poliklonális (PP2Ac kimutatására), c-myc –tag elleni monoklonális (PP2Aa_N kimutatására) antitesttel és F-aktin kimutatására alkalmas Texas Red-phalloidinnel inkubáltuk ugyanabban az időben, hogy mindhárom fehérjét láthatóvá tegyük.

Ahhoz, hogy ezt a feltételezésünket ellenőrizzük előállítottunk egy PP2A A alegység mutánst (PP2Aa_N), az Anyagok és Módszerek című fejezetben leírtak szerint. A mutáns nem tartalmazza a C alegység kötéséért felelős C-terminális régiót (Groves és mtsai, 1999). Amikor a katalitikus alegységet ko-expresszáltuk a PP2Aa_N

mutáns, az aktin szerkezete nem mutatott különbséget a környező, az overexpresszált fehérjét nem tartalmazó kontroll sejtekhez képest (10A-C ábrák). A fenti eredményből arra következtettünk, hogy a PP2A_N mutáns lekötheti és „eliminálhatja” a natív B alegységet és a katalitikus alegység ugyan asszociálódhat a natív A alegységgel, de ez a dimer, B alegység nélkül, nem rendelkezik olyan katalitikus aktivitással, ami befolyásolná az F-aktin szerkezetet.

PP2Ac overexpresszió hatása a trombin vagy nokodazol által kiváltott EC citoszkeleton átrendeződésre

Fenti eredményeink szoros kapcsolatra utalnak a mikrotubulusok (MT), az F-aktin és a PP2A között. A PP2A szerepének további tisztázásához a PP2A alegységekkel transzfektált HPAE sejteket trombinnal– ödémát előidéző ágens- (Garcia és mtsai, 1986, 1995) vagy nokodazollal (MT depolimerizációt kiváltó szintetikus szer) kezeltük, ami szintén stresszkötegek kialakulását eredményezi és veszélyezteti a barrier funkciót (Verin 2001).



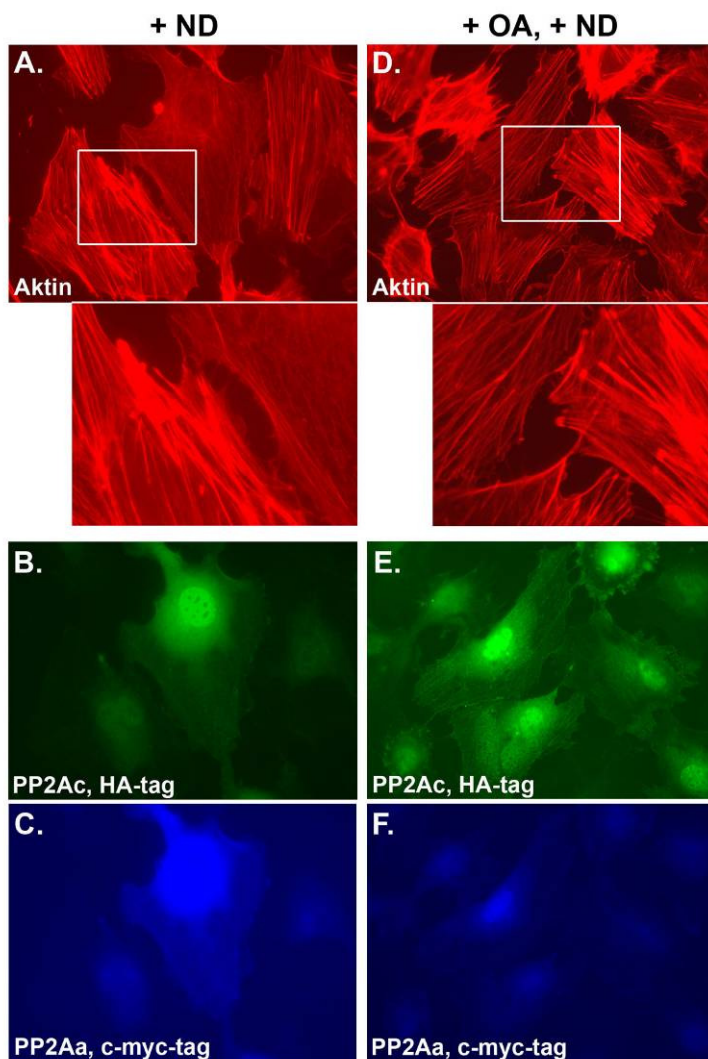
11. ábra A PP2Ac overexpressziója mérsékli a trombin hatását.

A HPAE sejteket PP2Ac/pCMV-HA (A, B) vagy PP2Aa/pcDNA3.1/Myc-His (C, D) plazmidokkal transzfektáltuk. A sejteket 30 percig 50 nM trombinnal kezeltük, majd a kezelés után vagy HA-tag elleni poliklonális (PP2Ac kimutatására), vagy c-myc –tag elleni monoklonális (PP2Aa kimutatására) antitesttel inkubáltuk, az F-aktin kimutatására alkalmas Texas Red-phalloidinnal ugyanabban az időben, hogy mindkét fehérjét láthatóvá tegyük.

A trombinnal kezelt PP2Ac-t overexpresszáló sejtekben a katalitikus alegység overexpressziója megszüntette, vagy mérsékelte a trombin (50 nM, 30 perc) által

előidézett stresszkötegek kialakulását (11A,B ábrák), míg az overexpresszált PP2Aa-nak ilyen hatása nem volt (11C,D ábrák).

Hasonló kísérletben megvizsgáltuk a PP2A alegységek overexpressziójának hatását nokodazollal kezelt sejtekre is. A nokodazol (200 nM, 30 perc) által kiváltott stressz kötegek kialakulását a ko-expresszált PP2A megszüntette, összehasonlítva a környező overexpresszált fehérjéket nem tartalmazó HPAE sejtekkel (12A-C ábrák). Okadánsavval történt előkezelés azonban a PP2A-nak ezt a hatását csökkentette (12D-F).



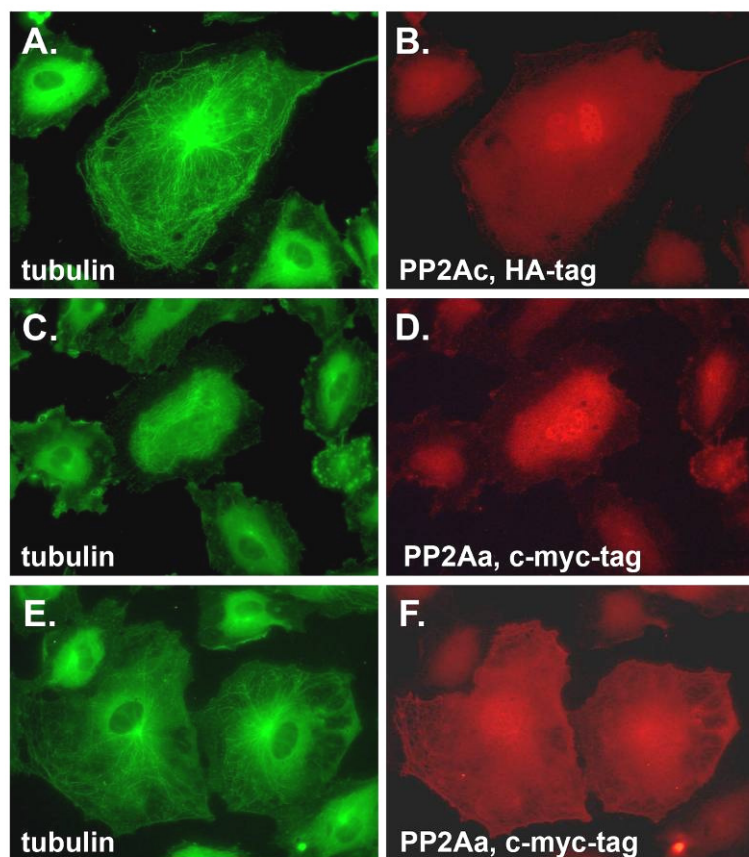
12. ábra **A PP2Ac overexpressziója mérsékli a nokodazol hatását.**

A HPAE sejteket PP2Ac/pCMV-HA és PP2Aa/pcDNA3.1/Myc-His plazmidokkal ko- transzfektáltuk. A sejteket 0.1% DMSO-val (kontroll) (**A-C**) vagy 5 nM okadánsavval előkezeltük másfél óráig (**D- F**), majd 30 percig kezeltük a sejteket 200 nM nokodazollal (**A-F**). A kezelés után a sejteket HA-tag elleni poliklonális (PP2Ac kimutatására), c-myc –tag elleni monoklonális (PP2Aa kimutatására) antitesttel és Texas Red-Phalloiddinnel (aktin kimutatására) inkubáltuk ugyanabban az időben, hogy mindhárom fehérjét láthatóvá tegyük.

Az overexpresszált PP2A stabilizálja az MT szerkezetét HPAEC-ben

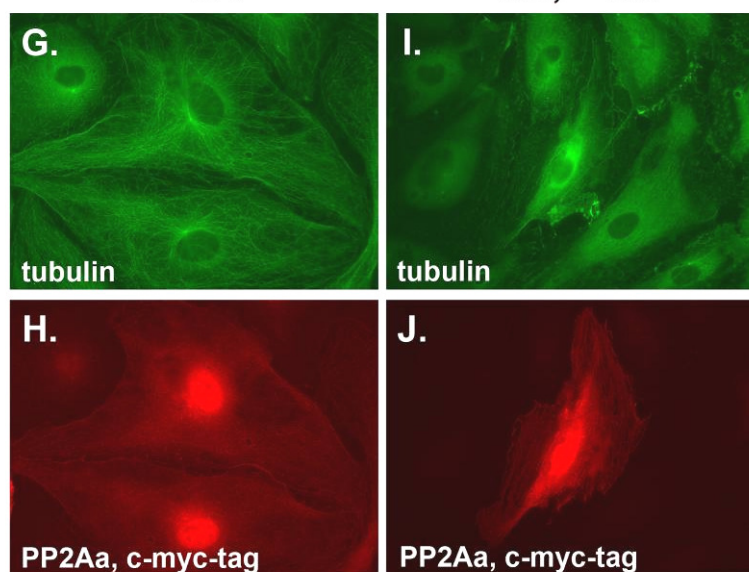
Immunofluoreszcens festést készítettünk a β -tubulin fehérjére a PP2A alegységekkel transzfektált HPAE sejtekben.

+ ND



+ OA

+ ND, + OA



13. ábra Az overexpresszált PP2A stabilizálja az MT szerkezetét HPAEC-ben.

A HPAE sejteket PP2Ac/pCMV-HA (A-B), PP2Aa/pcDNA3.1/Myc-His (C-D) plazmidokkal transzfektáltuk, vagy mindkét emlős expressziós plazmiddal ko-expresszáltuk (E-J). A-F: a sejteket 200 nM nokodazollal kezeltük 30 percig. G-J: a sejteket 5 nM okadánsavval előkezeltük másfél óráig, majd 30 percig vagy 0.1% DMSO-val (G, H), vagy 200 nM nokodazollal (I, J). A kezelés után a

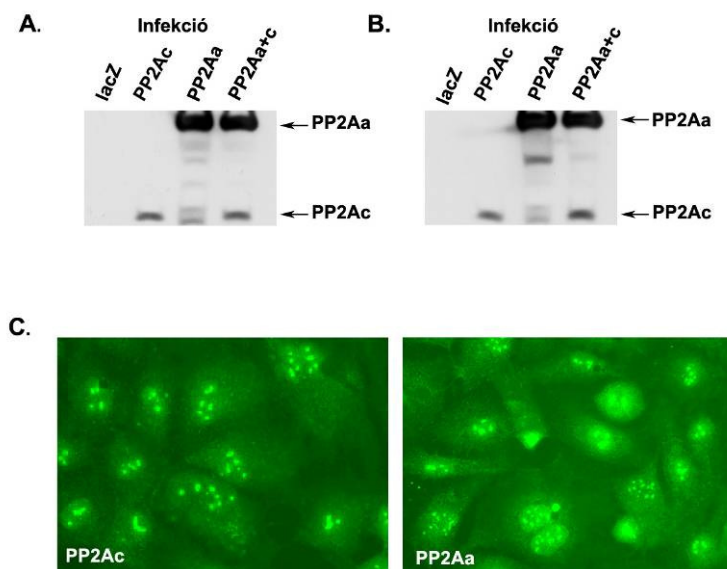
sejteket vagy HA-tag elleni poliklonális (PP2Ac kimutatására), vagy c-myc –tag elleni poliklonális (PP2Aa kimutatására) antitesttel inkubáltuk a β -tubulin elleni monoklonális antitesttel ugyanabban az időben, hogy mindkét fehérjét láthatóvá tegyük.

Kezeletlen, a PP2A alegységeket overexpresszáló sejtekben a belső kontroll sejtekkel összehasonlítva a mikrotubulusok szerkezetében nem láttunk jelentős változást (ábra nincs közölve).

Nokodazol kezelés (200 nM, 30 perc) után a nem transzfektált sejtekben a mikrotubulusok felbomlását tapasztaltuk, míg a PP2Ac alegységet egyedül (13A,B ábrák), vagy a PP2Aa+c ko-expresszáló sejtekben (13E,F ábrák) a mikrotubulusok megőrizték szerkezetüket. A PP2A aktivitás gátlása okadánsavval történt előkezeléssel (5 nM, 1,5 óra) teljesen megszüntette a PP2A overexpresszió hatását a nokodazol által kiváltott mikrotubulus destabilizációra, ebből arra következtettünk, hogy a PP2A aktivitás szükséges a mikrotubulusok szerkezetének megőrzéséhez (13G-J ábrák).

PP2A rekombináns adenovírus infekció hatása agonisták által kiváltott EC permeabilitására

Az endothel sejtek transzfekciós hatékonysága emlős expressziós konstrukttal rendszerint igen alacsony (10-20%) ahhoz, hogy a monolayer elektromos ellenállásának változását mérhessük (TER) (Tanner és mtsai, 1997).

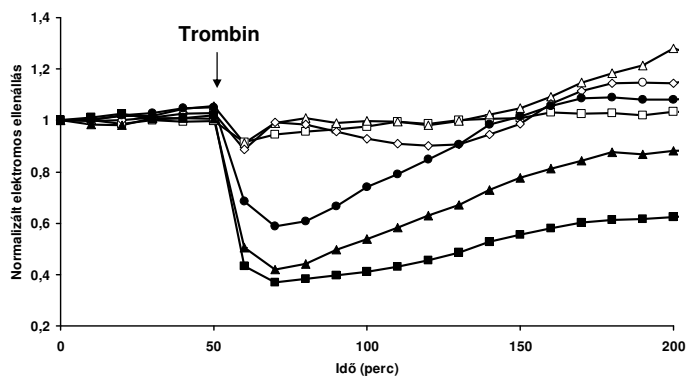


14. ábra HPAE sejtek infekciója PP2A rekombináns adenovírus konstrukttal.

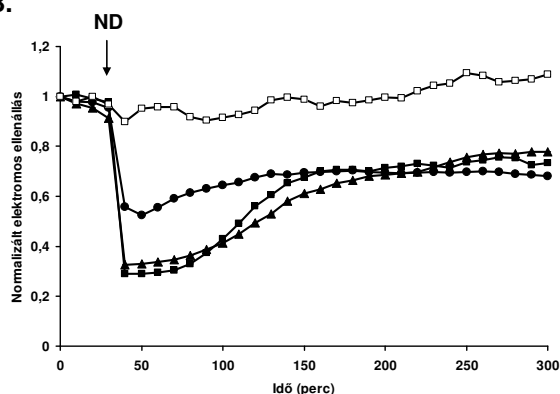
A HPAE sejteket 90 %-os konfluencia eléréséig növesztettük, majd PP2Ac, PP2Aa vagy mindkét konstrukttal fertőztük. 24 órás inkubálás után a fehérjéket SDS-PAGE-sel elválasztottuk, majd a fehérjéket nitrocellulóz membránra blotoltuk. **A:** A GFP-taget GFP elleni specifikus poliklonális antitesttel detektáltuk. **B:** A HA-taget HA-tag elleni specifikus poliklonális antitesttel detektáltuk. **C:** A fehérjék overexpresszióját immunofluoreszcens festéssel is azonosítottuk HA-tag elleni specifikus poliklonális antitestet használva.

Ezért PP2Ac és PP2Aa rekombináns adenovírus konstruktokat készítettünk az Anyagok és Módszerek című fejezetben leírtak szerint. Infekció után az overexpresszált fehérjék jelenlétét, sejtlizátumból Western blot kísérlettel igazoltuk (14A,B ábrák), HA-tag és GFP elleni antitesteket használva. Az infekció közel 100%-os hatékonyságát HA- tag elleni antitestet használva immunofluoreszcens kísérlettel támasztottuk alá (14C ábra). Az overexpresszált PP2A hatásának vizsgálatához, lacZ kontrollal vagy PP2Ac rekombináns adenovírral fertőzött (lásd Anyagok és Módszerek fejezet) HPAE sejteket használtunk. A sejtekhez vagy 0.1%-os DMSO-t (kontroll), vagy 20 nM trombint adtunk a TER mérés 60. percében, majd a mérést 5 órán keresztül tovább folytattuk.

A.



B.



15. ábra A PP2A overexpressziója csökkentette a trombin és a nokodazol által kiváltott permeabilitás növekedést (TER csökkenést).

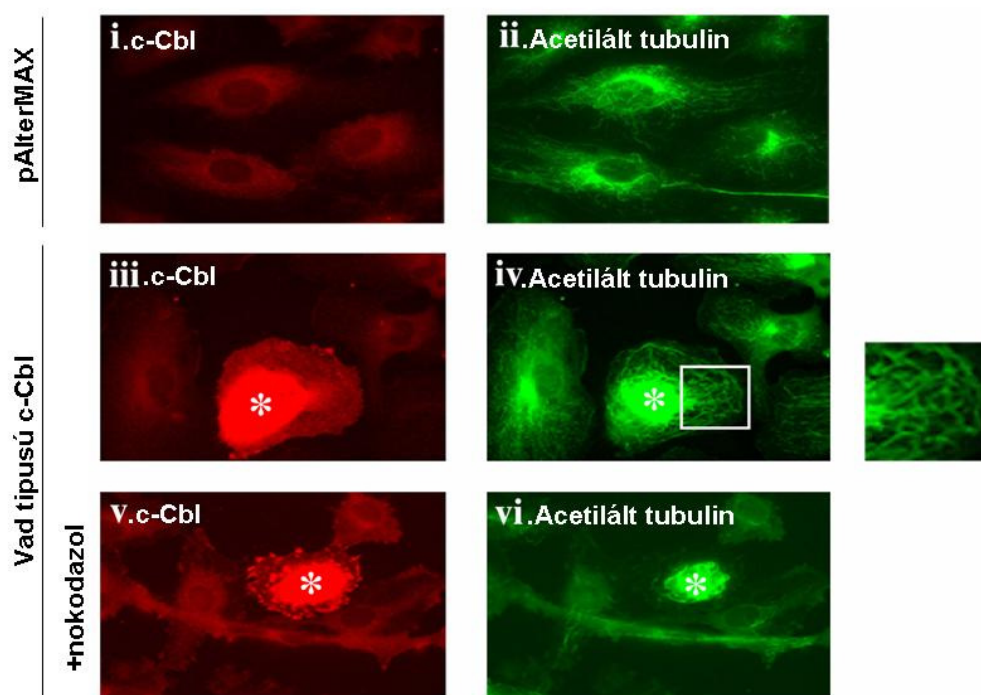
A HPAE sejteket PP2Aa-GFP, lacZ (mindkettőt kontrollként használtuk), PP2Ac-GFP vagy PP2Ac-GFP és PP2Aa-GFP konstruktokkal fertőztük az Anyagok és Módszerek fejezetben leírtaknak megfelelően. A sejteket vagy 0.1% DMSO-val, vagy 20 nM trombinnal (**A**), vagy 200 nM nokodazzal (**B**) kezeltük. A TER-t 5 órán keresztül mértük. A nyilak az agonisták hozzáadását jelölik.

A: □ 0.1 % DMSO-val kezelt kontroll, △ pShuttle-CMV-lacZ-pAdEasy-1-el fertőzött sejtek, ○ pShuttle-Ires-hrGFP-2-HA-PP2Aa + pShuttle-Ires-hrGFP-2-HA-PP2Ac-vel fertőzött sejtek, ■ 20 nM trombinnal kezelt sejtek, ▲ pShuttle-CMV-lacZ-pAdEasy-1-el fertőzött sejtek + 20 nM trombin, ● pShuttle-Ires-hrGFP-2-HA-PP2Aa + pShuttle-Ires-hrGFP-2-HA-PP2Ac-vel fertőzött sejtek + 20 nM trombin.

B: □ 0.1 % DMSO-val kezelt kontroll, ■ 200 nM nokodazollal kezelt sejtek, ▲ pShuttle-Ires-hrGFP-2-HA-PP2Aa-val fertőzött sejtek + 200 nM nokodazol, ● pShuttle-Ires-hrGFP-2-HA-PP2Aa + pShuttle-Ires-hrGFP-2-HA-PP2Ac-vel fertőzött sejtek + 200 nM nokodazol.

A 15A ábra bemutatja, hogy trombin hatására a PP2Ac-vel nem fertőzött és a lacZ kontrollal fertőzött endothel sejtekben az elektromos ellenállás lecsökkent, ami a permeabilitás megnövekedését jelenti, míg a PP2Ac rekombináns adenovírussal fertőzött sejtekben a PP2Ac jelentősen lecsökkentette a trombin által kiváltott permeabilitás növekedést (TER csökkenést). Hasonló eredményt kaptunk, amikor a sejteket nokodazollal kezeltük (200 nM, melyet a mérés 30. percében adtunk a sejtekhez 15B ábra), a PP2A overexpressziója csökkentette a nokodazol által kiváltott permeabilitás növekedést (TER csökkenést).

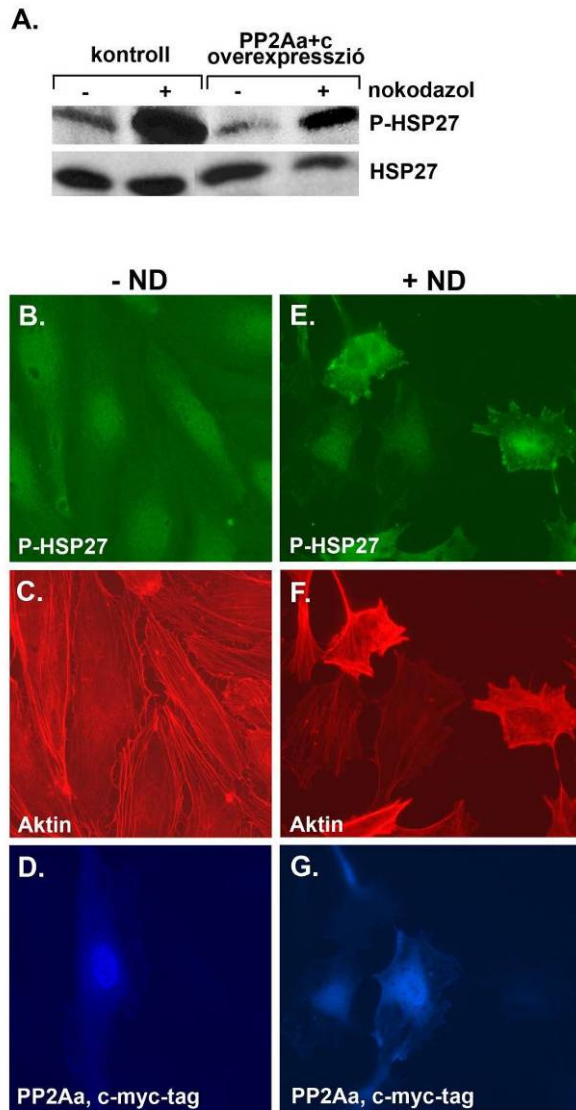
A mikrotubulusok szerkezetére ugyancsak védő hatást detektáltunk egy protoonkogén fehérje, a c-Cbl overexpressziója esetén is (16. ábra). A Cbl családba tartozó fehérjék tirozin kináz receptorok jelátviteli útvonalait szabályozzák; leírták a c-Cbl és a p38 kináz kapcsolatát (Zhang és mtsai, 2004), valamint a fehérje az aktin citoskeleton szabályozásában (Scaife és Langdon, 2000) is részt vesz. A c-Cbl és a PP2A aktivitás közötti lehetséges összefüggés feltárása további kísérleteket igényel.



16. ábra A c-Cbl fehérje overexpresszió hatása a mikrotubulus szerkezetének stabilitására. A HPAE sejteket üres pAlterMAX vektorral (i,ii) vagy c-Cbl expressziós konstrukttal (iii-vi) transzfektáltuk. A sejteket 0.1% DMSO-val (kontroll) (i-iv) vagy 200 nM nokodazollal kezeltük 30 percig (v,vi). A kezelés után a sejteket c-Cbl elleni specifikus poliklonális, és acetilált tubulin elleni specifikus monoklonális antitestekkel inkubáltuk ugyanabban az időben, hogy a fehérjéket láthatóvá tegyük. Csillaggal jelöltük a c-Cbl-t overexpresszáló sejteket. A nagyított felvétel a c-Cbl fehérjét overexpresszáló sejt periferiáján található finom mikrotubulus szerkezetet mutatja.

A PP2A overexpresszió hatása a nokodazol által kiváltott citoskeleton fehérjék foszforilációjára

Endothel sejtekben Western blottal kimutattuk a HSP27-nek és az MT frakciónak az asszociációját (5A ábra). Korábbi közlemények arra utalnak, hogy a HSP27 foszforilációs szintjének növekedése aktin polimerizációhoz vezet a p38 MAP-kináz szignálútvonalon keresztül (Larsen és mtsai, 1997, Hedges és mtsai, 1999, Schafer és mtsai, 1998). Ahhoz, hogy tisztázhassuk a kapcsolatot a HSP27 defoszforilációja és a PP2A aktivitása között, HPAE sejteket PP2Ac-vel és PP2Aa-vel ko-transzfectáltunk, majd a sejteket nokodazollal kezeltük (200 nM, 30 perc). Western blottal kimutattuk (17A ábra), hogy a PP2A alegységekkel transzfectált sejtekben nokodazol kezelés után a foszforilált HSP27 mennyisége kevesebb, mint a nem transzfectált kontroll sejtekben. A Western blot eredményét erősíti meg az immunofluoreszcens kísérlet, ahol a sejteket foszfo-HSP27-re, F-aktinra, és PP2Aa (c-myc tagre) festettük meg. Mivel a PP2Ac overexpressziója megváltoztatja az endothel sejtek aktin citoskeleton szerkezetét, de a PP2Aa overexpressziója nem (17A,D ábra), ezért azokban a sejtekben, ahol a fehérjéket ko-expresszáltuk, a PP2A fehérjét a c-myc fúziós tag segítségével mutattuk ki. Azokat a sejteket, melyek a PP2Ac-t is tartalmazták, a jellegzetes aktin festődésről azonosítottuk. A **B-D** ábrákon látható, hogy a PP2A alegységek ko-expressziója nem változtatta meg a HSP27 foszforilációs szintjét, viszont a stresszrostok eltűnéséhez vezetett a kezeletlen HPAE sejtekben. A HSP27 foszforilációs szintjének növekedését figyelhattuk meg nokodazol kezelés után a nem transzfectált, kontroll sejtekben, de nem a PP2A-t overexpresszáló sejtekben (17E,G ábrák). A PP2A alegységek overexpressziója, a nokodazol kezelés ellenére is a sejtek aktin citoskeleton szerkezetének megtartását eredményezte (17F).



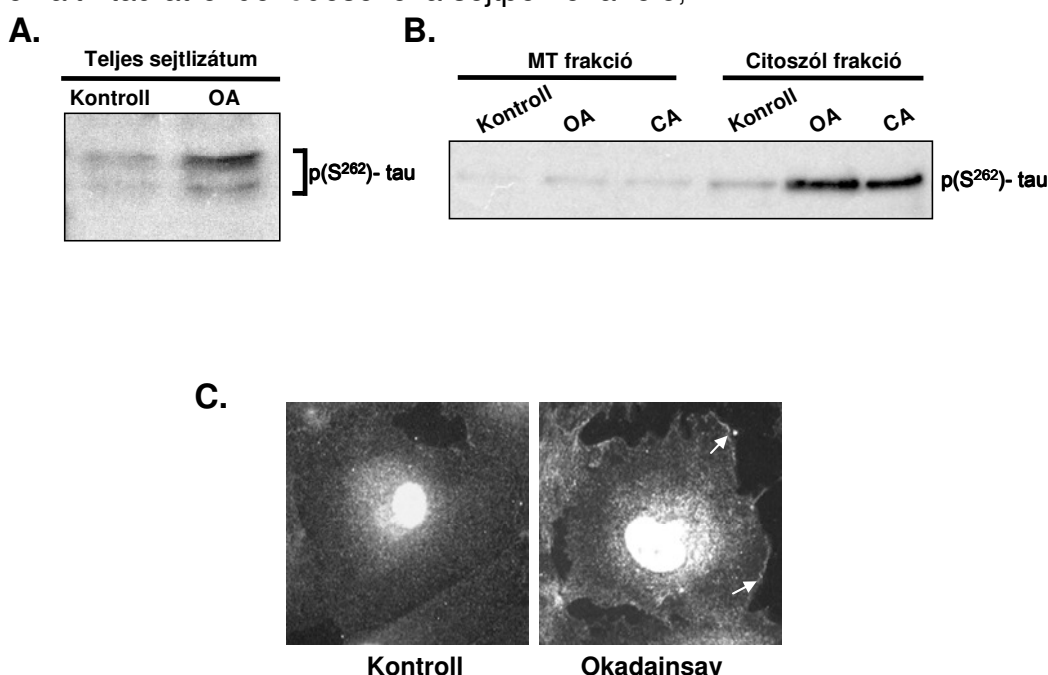
17. ábra **A PP2Ac overexpressziója mérsékli a nokodazol által előidézett HSP27 foszforilációt.**

A: Western- blot kísérlettel kimutattuk a foszfo-HSP27 és a HSP27 mennyiségét PP2A-t overexpresszáló és kontroll sejtekben nokodazol kezeléssel és nokodazol kezelés nélkül. A HPAE sejteket PP2Ac/pCMV-HA és PP2Aa/pcDNA3.1/Myc-His konstrukttal ko- transzfektáltuk. A sejteket 0.1% DMSO-val (kontroll) (**B, C, D**) vagy 200 nM nokodazollal kezeltük 30 percig (**E, F, G**). A kezelés után a sejteket foszfo-HSP27 (pS82) elleni specifikus poliklonális, c-myc –tag elleni monoklonális (PP2Aa kimutatására) antitesttel és Texas Red-Phalloiddinnel (aktin kimutatására) inkubáltuk ugyanabban az időben, hogy mindhárom fehérjét láthatóvá tegyük.

A PP2A gátlás hatása a Tau foszforilációjára és sejtben belüli lokalizációjára

A MAP tau – a PP2A szubsztrátja- defoszforilált állapotban elősegíti a mikrotubulusok összerendeződését (Drewes és mtsai, 1998, Cassimeris és Spittle, 2001). Ezért a következőkben megvizsgáltuk, hogyan hat a PP2A gátlása a tau foszforiláltsági állapotára endothel sejtekben. 5 nM okadánsav vagy 1 nM calyculin A- ami 1 nM –os koncentrációban mind a PP1-nek, mind a PP2A-nak specifikus sejtpерmeábilis gátlószere- jelenlétében kezeletlen totál sejtizátumban, és a preparált sejtfrakcióban (Anyagok és Módszerek című fejezet) vizsgáltuk foszfo-tau elleni specifikus antitesttel a tau foszforiláltsági állapotát. A PP2A specifikus gátlásával- 5 nM okadánsavval történt kezelés után-, a tau foszforiláltsági szintjének

növekedését figyeltük meg totál sejtlizátumban (18A ábra), ami arra utalt, hogy a tau a PP2A szubsztrátja endothel sejtekben. Calyculin A-val történt kezelés után Western blot kísérleteink azt mutatták, hogy a PP1 gátlásával a tau foszforiláltsági állapotában további jelentős változás nem történt, amiből arra következtettünk, hogy a PP1 szerepe a tau defoszforilációjában korlátozott (18B ábra). A foszforilált tau fehérje alig mutatható ki az MT frakcióban, ami az irodalmi adatokkal is egyezően arra utal, hogy a tau foszforilált állapotban gyengébben kötődik a mikrotubulusokhoz (Drewes és mtsai, 1998, Cassimeris és Spittle, 2001). Immunofluoreszcens kísérletünk (18C ábra) szintén alátámasztotta azt, hogy a tau foszforilációs szintjében okadánsav kezelés hatására bekövetkezett növekedés összefügg a foszforilált –tau átrendeződésével a sejtperiféria felé,



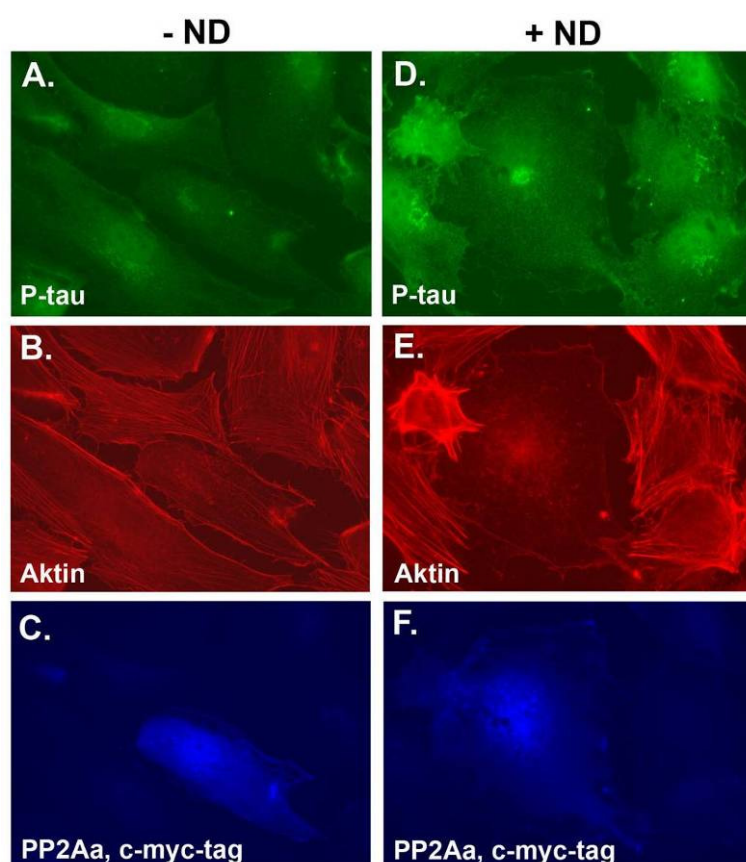
18. ábra A PP2A gátlás hatása a tau foszforilációra és sejtben belüli lokalizációjára.
A BPAE sejteket 0.1% DMSO-val (kontroll), 5 nM okadánsavval (OA), vagy 1nM calyculinnal (CA) kezeltük egy órán keresztül. **A:** A totál sejtlizátum fehérjét SDS-PAGE-sel elválasztottuk, majd a fehérjéket nitrocellulóz membránra blotoltuk. A foszfo(Ser262) –tau fehérjét specifikus antitesttel mutattuk ki kontroll és OA-val kezelt sejtekben. **B:** Foszfo(Ser262) -tau fehérje kimutatása western immunoblottal MT-gazdag, citoszol frakciókban kontroll, OA-val és CA-val kezelt sejtekben. **C:** Foszfo(Ser262) -tau fehérje kimutatása immunofluoreszcens festéssel kontroll és OA-val kezelt sejtekben.

valamint a perifériás mikrotubulusok destabilizálásával, amiből a PP2A-mediált tau defoszforiláció szerepére következtethettünk az endothel sejtek mikrotubulus szerkezetének stabilizálásában/destabilizálásában.

Fentiekben kimutattuk, hogy a PP2A szerepet játszhat egy MT-vel asszociálódó fehérje a tau foszforilációs szintjének és szubcelluláris lokalizációjának szabályozásában endothel sejtekben. A PP2A aktivitás gátlása okadánsavval a tau

foszforilációs szintjének növekedéséhez vezetett, valamint kimutattuk, hogy a foszfo-tau fehérje legnagyobb mennyiségben a sejtek citoszól frakciójában helyezkedett el.

Immunofloureszcens kísérleteinkben foszfo-tau elleni antitestet használva kimutattuk, hogy a foszfo-tau mennyisége egyenletesen alacsony mind a PP2A alegységeket overexpresszáló, mind a kontroll sejtekben (19A-C ábrák). A tau jelen volt a citoszólban és a sejtmagban, viszont nem mutattunk ki MT-szerű eloszlást, ami összhangban van egy korábbi közlemény eredményeivel (Birukova és mtsai, 2004). Nokodazol kezelés (200 nM, 30 perc) megemelte a tau foszforilációs szintjét a kontroll sejtekben, de a PP2A alegységeket overexpresszáló sejtekben nem (19D-F ábrák), ami arra utal, hogy a PP2A HPAE sejtekben defoszforilálja a tau fehérjét.



19. ábra A PP2Ac overexpressziója mérsékli a nokodazol által előidézett tau foszforilációt.
A HPAE sejteket PP2Ac/pCMV-HA és PP2Aa/pcDNA3.1/Myc-His ko- transzfektáltuk. A sejteket 0.1% DMSO-val (kontroll) (A, B, C) vagy 200 nM nokodazollal kezeltük 30 percig (D, E, F). A kezelés után a sejteket foszfo-tau (pS262) elleni specifikus poliklonális, c-myc –tag elleni monoklonális (PP2Aa kimutatására) antitesttel és Texas Red-Phalloidinnel (aktin kimutatására) inkubáltuk ugyanabban az időben, hogy mindhárom fehérjét láthatóvá tegyük.

EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE

A vaszkuláris endothel monolayer fő funkciója, hogy a plazma és az intersticiális folyadék között szemi-szelektív diffúziós sorompóként működik, és így szerepe van a sejttel homeosztázis fenntartásában. Az érpermeabilitás megnövekedése különböző bioaktív ágensek hatására az endothel sejtek között kialakuló rések következménye. Az endothel sejtek kölcsönhatása a szomszédos sejtekkel és az extracelluláris mátrixszal fiziológias funkciójuk betöltésében ezért alapvető jelentőségű. A vaszkuláris endothelium jól működő barrier funkciója az endothel sejtekben fellépő kontraktilis és feszítő erők egyensúlyát jelzi. Ha az egyensúly a kontraktilis erők irányába tolódik el, például trombin hatására, akkor az a sejtek közötti rések kialakulását eredményezi, a sejttel homeosztázis megbomlik, ezáltal az adott szerv működése módosul. Számos citoskeleton fehérje foszforiláltsági állapota befolyásolja a citoskeleton elemeinek szerveződését, ennek következtében az endothel sejtek kontrakciós állapotát, az endothelium barrier funkcióját. A citoskeleton elemei és egyes fehérjék közötti közvetlen vagy közvetett kapcsolaton kívül, (Lee és Gotlieb, 2003), korábbi eredmények bizonyítják, hogy a mikrotubulusok és mikrofilamentumok közötti kapcsolat elengedhetetlen az endothel sejtek citoskeleton szerkezetének összehangolt szabályozásához (Verin és mtsai, 2001, Niggli, 2003). Részletesen tanulmányozták tüdő artéria endothel sejtekben az aktin-miozin kölcsönhatáson alapuló kontrakcióban a miozin könnyűlánc foszforilációjának-defoszforilációjának szabályozását és bizonyították szerepét a barrier funkcióban.

Munkánk során a PP2A szerepét kívántuk meghatározni az endothel sejtek citoskeleton szerkezetének szabályozásában és a sejtek permeabilitás változásában farmakológiai inhibitorok és trombin felhasználásával. A nokodazol (ND) egy olyan szintetikus gátlószer, ami reverzibilisen gátolja a tubulinok összerendeződését és képes depolimerizálni a mikrotubulusokat (De Brabander és mtsai, 1981). Az okadánsav (OA) egy 38 szénatomból álló zsírsav poliéter származéka, ami képes a protein foszfatáz 1 és 2A aktivitásának hatékony gátlására (Haystead és mtsai, 1989). Az okadánsav a PP2A-t hatékonyabban gátolja ($K_i = 0.2$ nM), mint a PP1 enzimet ($K_i = 2$ μ M) (Cohen és mtsai, 1990). Az okadánsav élő sejtekben 1 μ M-ig a protein foszfatázok közül csak a PP2A-t gátolja, ezért használható a PP2A szerepének vizsgálatára (Wera és Hemmings, 1995).

Korábban kimutatták, hogy az OA 2-5 nM koncentrációban nem változtatta meg jelentősen borjú endothel sejtek permeabilitását és az MLC foszforilációját, amiből a PP2A korlátolt szerepére következtek az endothel sejtek barrier funkciójának és kontrakciójának közvetlen szabályozásában. Másrészt kimutatták azt is, hogy mikrotubulus szerkezetének, a nokodazol (2-5 μ M) által kiváltott destabilizációja jelentősen megnövelte az EC akto-miozin kontrakcióját és a sejtek permeabilitását, ami azt bizonyítja, hogy a mikrotubulusoknak is fontos szerep jut az EC barrier funkció megtartásában (Verin és mtsai, 2001). A PP2A-ról viszont ismert, hogy más sejtípusokban fehérje-fehérje kölcsönhatásba lépett néhány mikrotubulushoz asszociálódó fehérjével és defoszforilálja azokat, ilyen pl. a tau fehérje is, ami befolyásolhatja az MT stabilitását (Sontag és mtsai, 1995, 1996, 1999, Gong és mtsai, 2000a,b, Hiraga és Tamura, 2000, Kobayashi és mtsai, 2001). Ezért a PP2A lehetséges szerepét vizsgáltuk endothel sejtek nokodazol által kiváltott kontrakciós válaszában és a sejtek permeabilitásának változásában. Eredményeink azt mutatták, hogy az okadánsav (5 nM), jelentősen fokozta a szubmaximális tartományban alkalmazott nokodazol (50-200 nM) transzendothel elektromos ellenállásra (TER) és a paracelluláris rések kialakulására kifejtett hatását. Megnövelte a sejtek közötti rések számát és nagyságát; és ezzel összhangban a monolayer elektromos ellenállását csökkentette. Ezek az eredmények a PP2A aktivitás részvételére utalnak a citoszkeleton két eleme az aktin és a mikrotubulusok közötti kommunikáció megteremtésében.

Ahhoz, hogy megerősítsük a PP2A és a mikrotubulusok asszociációját, két különböző módszerrel sejtfractionálást végeztünk, melyet Western- blot követett. Mindkét frakcionálási módszerrel kimutattuk, hogy a PP2A legnagyobb mennyiségben a tubulin/MT gazdag frakcióban volt jelen. Korábban a PP2A fehérje ill. a PP2A aktivitás jelenlétét számos sejtfractionálási módszerrel tanulmányozták különböző sejtípusokban. Például patkány előagyból preparált citoszól és részecske frakciókban kimutatták, hogy a PP2A aktivitás a citoszól frakcióban volt a legmagasabb, de a részecske frakciókban is jelentős PP2A aktivitást detektáltak. Viszont a fehérje mennyisége az összes frakcióban hasonló volt (Sim és mtsai, 1994). A PP2A és a mikrotubulusok asszociációját is leírták már patkány és borjú agyszövetben. (Saito és mtsai, 1995, Strack és mtsai, 1997, Price és mtsai, 1999, Turowski és mtsai, 1999, Hiraga és Tamura, 2000). Ideg és nem ideg sejtekben, mind a mitotikus orsó, mind a centroszómák mikrotubulusai asszociálnak a PP2A-val. A PP2A *in vitro* reverzibilisen képes kötődni a mikrotubulusokhoz valamint

dokumentálták azt is, hogy a PP2A aktivitása a sejtosztódás egyes fázisaiban eltérő, amiből arra következtettek, hogy a PP2A aktivitásváltozása a sejtciklus során szabályozó tényező (Sontag és mtsai, 1995).

Hiraga és Tamura (2000) kimutatták, hogy a marha sejt kivonatban található heterotrimer PP2A, de a dimer PP2A nem, asszociál a tisztított mikrotubulusokkal, és a polimerizált tisztított tubulinnal is, melynek polimerizációját taxollal váltották ki.

Immunofluoreszcens felvételeink is a PP2A mikrotubulus-szerű eloszlását mutatták kezeletlen endothel sejtekben, amiből a mikrotubulusok és a PP2A asszociációjára következtettünk. A PP2A MT-szerű eloszlása azonban OA kezelés után teljesen megszűnt. A PP2A sejtben belüli lokalizációjának változása a PP2A gátlása után, egybeesik a perifériás mikrotubulusok eltűnésével, amiből arra következtettünk, hogy a PP2A aktivitás gátlása a PP2A mikrotubulusokról történő disszociációjához és a mikrotubulusok destabilizációjához vezet.

Ahhoz, hogy a PP2A pontos szerepét részletesebben tanulmányozhassuk endothel sejtekben a PP2A katalitikus C (PP2Ac), a regulátor A (PP2Aa) alegységeit, és az A alegység trunkált mutánsát (PP2Aa_N) HUVEC cDNS könyvtár sikeres szűrése után emlős expressziós vektorokba szubklónoztuk. A HPAEC-t ezekkel a rekombináns plazmidokkal tranziensen transzfektáltuk. Az overexpresszált PP2A aktivitását *in vitro* foszfatáz aktivitásméréssel igazoltuk, a protein foszfatázok egyik specifikus gátlószerét, az okadánsavat használva. Az endothel sejtek alacsony transzfekciós hatékonysággal rendelkeznek (Tanner és mtsai, 1997) és a mi megfigyelésünk is ez volt. Az immunofluoreszcens kísérletek eredményei azt mutatják, hogy a rekombináns fehérje nagy koncentrációban volt jelen azokban a sejtekben, melyek overexpresszálták a fehérjét, mégis az aktivitásnövekedés a teljes sejt kivonatban csak kb. 30-50 % volt a kontrollhoz képest. A rekombináns PP2Ac-t tartalmazó sejtek egészségesnek tűntek és állapotukat tekintve nem különböztek a szomszédos, kontroll sejtektől, ami azt feltételezi, hogy a rekombináns katalitikus alegység valószínűleg kötődik a natív, regulátor alegységekkel, vagy a rekombináns A alegységgel, ami kapcsolódva a natív B alegységekkel szabályozhatja a PP2A aktivitását. A PP2Ac overexpressziója és a PP2Ac és PP2Aa alegységek ko-expressziója, mint ahogyan azt immunofluoreszcens felvételeink bizonyítják, átrendezte az aktin citoszkeleton szerkezetét HPAE sejtekben; a stresszfilamentumok drámaian elvékonyodtak a sejtben, míg a perifériás aktinrégió megvastagodott. Mindkét alegység, úgy tűnik ko-lokalizál az F-aktinnal, fehérje-fehérje kölcsönhatást feltételezve a PP2A és az F-aktin vagy az aktinnal

asszociálódó fehérjék között. Tüdő és vese epithel sejtekben szintén kimutatták a PP2A, az aktin és más citoszkeleton fehérjék asszociációját (Nunbhakdi-Craig és mtsai, 2003).

A PP2A A alegysége egyaránt köti a katalitikus C alegységet és a regulátor B alegységet. Az A alegység szerkezetét részletesen leírták, a katalitikus C és az egyik B alegység a fehérje meghatározott régióihoz kötődnek (Groves és mtsai, 1999). Előállítottunk és overexpresszáltunk az A alegységnek egy olyan trunkált mutánsát (PP2A_{A_N}), ami csak a B alegység kötéséért felelős N-terminális régiót tartalmazza, de nem tartalmazza a katalitikus alegység kötéséért felelős C-terminális szakaszt (Groves és mtsai, 1999). Amikor ko-expresszáltuk a PP2Ac-t ezzel a mutánssal, a rekombináns PP2Ac-nek nem volt katalitikus aktivitása az aktinra/aktinkötő fehérjékre, amiből arra következtettünk, hogy a PP2Ac kötődése a PP2A_{A+b}-hez kritikus abban, hogy a PP2Ac a megfelelő szubsztrátokhoz kötődjön. Strack és mtsai (2004) fenti eredményünkkel összhangban kimutatták, hogy az A α alegység RNS interferenciája a teljes PP2A aktivitást, valamint a C, B, B' alegységek mennyiségét lecsökkenti. A C és B alegység monomerek a proteaszómák által kerültek lebontásra. Az A α alegység RNS interferenciája sejthalált idézett elő apoptotikus és nem- apoptotikus útvonalakon keresztül, mert az RNS interferenciához asszociálódó kaszpáz aktivitás gátlása nem akadályozta meg a sejthalál folyamatát. A PP2A holoenzim feltehetően pozitív módon szabályozza a sejtek túléléséhez szükséges kináz útvonalat, ugyanis Strack és mtsai kísérleteikben azt tapasztalták, hogy az RNS interferencia lecsökkentette a bazális és epidermális növekedési faktorok által stimulált Akt foszforilációt. Stabil PC12 sejtvonalon, melyben az A α alegység RNS interfenciát létrehozták, a vad típusú A β és mutáns A α alegységek- melyek képesek kötni legalább egy tagját a regulátor alegység családnak- képesek voltak késleltetni az A α RNS interferencia által előidézett sejthalált. De a teljes életképesség csak a vad típusú A α expressziója után állt vissza. A fentiek arra engedtek következtetni, hogy a heterotrimer PP2A holoenzim, ami tartalmazza az A α alegységet és a regulátor alegység számos családjának egyik tagját elengedhetetlen az emlős sejtek túléléséhez.

Korábbi eredmények igazolták, hogy a mikrotubulusok (MT) és a mikrofilamentumok közötti kapcsolat hatással van az endothel sejtek (EC) citoszkeleton szerkezetének változásaira (Verin és mtsai, 2001, Niggli, 2003). Verin és munkacsoportja (2001) kimutatta a mikrotubulusok szerkezetének felbomlása, a barrier diszfunkció, valamint a kontrakcióban szerepet játszó kaszkád (MLC foszforiláció, stressz kötegek

kialakulása) közötti szoros összefüggést. Kimutatták továbbá, hogy a mikrotubulusok felbomlása az MLC foszforilációjának növekedéséhez vezet, ami specifikus jelátviteli útvonalak elindítását feltételezi, ami végül a sejtek kontrakciójához és az endothel sejtek barrier funkciójának hibájához vezet. A miozin könnyűlánc (MLC) Ser19-es oldalláncán történő foszforilációja a sejtek kontrakcióját és sejtek közötti rések kialakulását okozza. A foszforilációt elsősorban a nagy molekulatömegű (210 kDa) Ca^{2+} -kalmodulin függő miozin könnyűlánc kináz (MLCK) katalizálja, ami nagymértékben homológ a simaizom MLCK-val (130-150 kDa). Az MLC defoszforilációját az endothel sejtekben a protein foszfatáz 1 (miozin foszfatáz, MP) katalizálja (Verin és mtsai, 2000 és Hirano M., és mtsai, 1999) Az MP 130 kDa-os miozin kötő alegységét a Rho-kináz foszforilálja és ezáltal az MP aktivitás gátlódik (Kimura, K., és mtsai, 1996).

Mind a nokodazol, mind a trombin barrier diszfunkciót idéz elő endothel sejtekben az F-aktin citoszkeleton és a mikrotubulusok szerkezetének megváltoztatásával (Kawkitinarong és mtsai, 2004, Verin és mtsai, 2001). A PP2A overexpressziója ezeknek az ágenseknek a hatását megszüntette vagy jelentősen mérsékelte. Az overexpresszált PP2A ugyan nem változtatta meg jelentősen a mikrotubulusok szerkezetét, de nokodazol kezelés során megvédi a mikrotubulusok szerkezetét a nokodazol destabilizáló hatásával szemben. A PP2A aktivitása tehát szükséges a mikrotubulusok stabilitásának megőrzésében. Azért, hogy közvetlenül vizsgálhassuk a PP2A aktivitás hatását az EC permeabilitására, az EC monolayer elektromos ellenállásának mérésével, rekombináns adenovírus konstruktokat készítettünk. A közel 100%-os hatékonyságú infekció után a fehérjék sikeres expresszióját Western blottal és immunofluoreszcens festéssel mutattuk ki specifikus antitesteket használva. A PP2Aa+c adenovírus konstruktokkal fertőzött HPAE sejtekben a trombin és nokodazol által kiváltott transzendothel elektromos ellenállás csökkenése jelentősen mérséklődött, ami bizonyítja azt, hogy a PP2A közvetlen szerepet játszik az endothel sejtek barrier funkciójának szabályozásában, valószínűleg specifikus citoszkeleton fehérjék defoszforilációján keresztül, ami az EC citoszkeleton védelmét eredményezi.

Miután megvizsgáltuk a PP2A overexpressziójának hatását endothel sejtek aktin citoszkeleton és mikrotubulus szerkezetére, valamint az endothel monolayer permeabilitására, feltételeztük, hogy mind az aktin, mind a mikrotubulusok szerkezetének változása olyan jelátviteli útvonalon keresztül mehet végbe, ahol a PP2A olyan szubsztrát(ka)t defoszforilálhat, amely fehérjé(k)nek a defoszforilációja

a citoskeleton mindkét elemének a szerkezetét megváltoztatja. A PP2A lehetséges szubsztrátjainak azonosítására EC-ben, két szabályozó, citoskeleton fehérjére, a HSP27-re és a tau-ra fókuszáltunk. Feltételezzük, hogy a PP2A ezen fehérjék defoszforilációjával teremthet kapcsolatot a citoskeleton két eleme- a mikrotubulusok és az aktin között. Kimutattuk, hogy a HSP27 és a tau nagy része a tubulinban gazdag frakcióban volt jelen, a PP2A-hoz hasonlóan. Mások is dokumentálták a HSP27- és a mitotikus orsó tubulinjának asszociációját HeLa sejtekben (Hino és mtsai, 2000), míg a HSP27 az EC barrier szabályozásában is részt vesz az aktin stresszfilamentumok kialakításán keresztül (Schneider és mtsai, 1998), valamint a citoskeleton szerkezetének kialakításában fontos szabályozó elem (Keezer és mtsai, 2003). Leírták azt is, hogy a HSP27 overexpressziója megnöveli az F-aktin stabilitását, olyan stresszhatásokra mint pl. a hipertermia, cytochalasin D vagy egyes oxidánsok (Lavoie és mtsai, 1993, Huot és mtsai, 1995, Guay és mtsai, 1997), de a pontos mechanizmus még nem ismert. A HSP27 foszforilációs állapota azonban meghatározza az aktin polimerizációra kifejtett hatását (Benndorf és mtsai, 1994, Gusev és mtsai, 2002). A nem foszforilált kis molekulatömegű HSP monomerek aktívak az aktin polimerizáció gátlásában, míg a foszforilált monomerek és a nem foszforilált oligomer forma inaktívak (Lavoie és mtsai, 1993, Benndorf és mtsai, 1994). Az irodalmi közlések többsége leírja, hogy normális körülmények között a HSP27 a citoplazmában diffúzan található (Schafer és mtsai, 1999, Miron és mtsai, 1991, Loktionova és mtsai, 1996, 1998 a,b, Wang és Bitar 1998), míg mások leírták, hogy az aktinnal ko-lokalizál (Ibitayo és mtsai, 1999). Hirano és mtsai, (2004) *in vivo* eredményei szintén kapcsolatot feltételeznek a lipopoliszacharidok által kiváltott EC barrier diszfunkció és a HSP27 foszforilációja között.

Western-blot és immunofluoreszcens kísérleteink igazolták, hogy nokodazzal kezelt, nem transzfektált sejtekben a HSP27 foszforilációja jelentősen megnő, míg a PP2A alegységek overexpressziója a nokodazol által kiváltott HSP27 foszforilációját szignifikánsan lecsökkenti, ami összhangban van a PP2A védő szerepével az EC barrier szabályozásában.

A mikrotubulusokkal asszociálódó tau fehérje, foszforilálatlan formában elősegíti a mikrotubulus összerendeződését és megakadályozza annak depolimerizációját (Drechsel és mtsai, 1992). Néhány kináz által pl. a Ca^{2+} /kalmodulin függő kináz II vagy a protein kináz A előidézett foszforiláció csökkenti a tau fehérje MT kötő és összerendező képességét (Drechsel és mtsai,

1992, Singh és mtsai, 1994, Gupta és Abou Donia, 1999). A hiperfoszforilált tau defoszforilációja azonban helyreállítja a tau fehérje MT összerendezéséért felelős tulajdonságát (Litersky és mtsai, 1996). Ezekből következik, hogy a tau fehérje foszforiláción/defoszforiláción keresztül szabályozott. Két hibrid rendszerrel kimutatták azt is, hogy az aktin citoskeleton szabályozásában résztvevő $G\alpha_{12/13}$ család kötődik a PP2A-val, és a PP2A a $G\alpha_{12}$ fehérjén keresztül vesz részt a tau fehérje defoszforilációjában COS sejtekben és neuronokban (Zhu D. és mtsai, 2004), megteremtve így a kapcsolatot a citoskeleton két eleme az aktin és a mikrotubulusok között a PP2A-n és a tau fehérjén keresztül. Dokumentálták továbbá a trombin által indukált EC barrier diszfunkcióban a mikrotubulusok szétesésének kritikus szerepét, valamint azt, hogy a trombin által indukált mikrotubulus szerkezetének változása G- fehérjétől függő folyamat (Birukova és mtsai, 2004)

Eredményeink bemutatták, hogy a tau a PP2A szubsztrátja lehet endothel sejtekben, ugyanis amikor a PP2A aktivitást okadánsavval gátoltuk a tau foszforilációja megnövekedett. Ha a PP1 és a PP2A aktivitást egyaránt gátoltuk calyculin A-val, az nem okozta a tau foszforilációjának szignifikáns növekedését, a PP2A aktivitás egyedüli gátlásával összehasonlítva. Ebből arra a következtetésre jutottunk, hogy a PP1 szerepe a tau defoszforilációjában korlátozott. A foszforilált tau vizsgálatára olyan foszfo-tau elleni specifikus antitestet használtunk, ami a Ser262 oldalláncon foszforilált. Ez a foszforilációs oldallánc a legnagyobb jelentőségű a tau mikrotubulusokhoz való kötődésében (Drewes és mtsai, 1998). A PP2A aktivitás gátlása a foszforilált tau sejtp periféria irányába történő transzlokációjához és a perifériás mikrotubulusok felbomlásához vezetett, ami a PP2A mediált tau defoszforiláció és a perifériás mikrotubulusok stabilitása közötti közvetlen kapcsolatra utal. A tau számos kináznak, köztük a p38 MAP kináznak is szubsztrátja *in vitro* (Reynolds és mtsai, 1997, Geschwind, 2003). Egyetlen génen történt alternatív mRNS splicing következtében a tau számos izoformával rendelkezik (Garcia és Cleveland, 2001). A tau főként neuronális sejtekben fordul elő, de leírták jelenlétét fibroblasztokban és limfocita sejtekben is (Thurston és mtsai, 1996, Cross és mtsai, 1996, Ingelson és mtsai, 1996). Kimutattuk, hogy a PP2A overexpressziója jelentősen lecsökkenti a nokodazol által előidézett tau foszforilációt HPAE sejtekben. Fenti eredményekből arra következtethetünk, hogy mind a HSP27, mind a tau fehérje szubsztrátjai lehetnek a PP2A-nak HPAE sejtekben, és ezek a szubsztrátok résztvehetnek a PP2A mediált EC barrier funkció védelmében a PP2A általi defoszforiláción keresztül.

ÖSSZEFOGLALÁS

Az erek belső falát borító endothel sejtek számos fiziológiai folyamatban játszanak szerepet. Az érpermeabilitás megnövekedése különböző bioaktív ágensek hatására az endothel sejtek között kialakuló rések következménye. A sejtek közötti rések kialakulásában szerepe van az aktin-miozin kölcsönhatásnak, amely foszforilációval/defoszforilációval szabályozott folyamat. Az endothel sejtekben a miozin könnyű lánc kináz és protein foszfatáz 1 szerepe a miozin könnyű lánc foszforilációban illetve defoszforilációjában ismert. A másik alapvető Ser/Thr specifikus foszfatáz, a protein foszfatáz 2A (PP2A) gátlása jelentősen megnöveli a nokodazolnak-egy mikrotubulus (MT) inhibitor- hatását a sejtek közötti (intercelluláris) rések megnövekedésével, ami a PP2A részvételére utal endothel sejtek mikrotubulus –mediált barrier funkció szabályozásában és a citoszkeleton újrendeződésében. Ahhoz, hogy a PP2A pontos szerepét tisztázhassuk az endotheliumban, a PP2A katalitikus (PP2Ac), regulátor (PP2Aa) és a regulátor alegység trunkált mutáns (PP2Aa_N) kódoló szekvenciáit emlős expressziós vektorokba szubklónoztuk és a konstrukttal humán tüdő artéria endothel sejteket (HPAEC) transzfektáltunk és overexpresszáltuk a PP2A alegységeit. Immunofluoreszcens kísérletekkel kimutattuk, hogy a két alegység együttes expressziója az endothel sejtek kortikális aktinjának feldúsulásához és a stresszfilamentumok eltűnéséhez vezet. Akár a C alegység, akár a C és az A alegység együttes expressziója jelentősen mérsékli/megszünteti a nokodazol vagy trombin, mikrotubulust destabilizáló hatását, valamint átrendezi az aktin citoszkeleton szerkezetét, amiből a PP2A mikrotubulus rendszert védő szerepére és az aktin citoszkeletonon keresztül történő szabályozási folyamatokra következtettünk. A PP2A gátlása 5 nM okadánsavval megszünteti az overexpresszált alegységek EC citoszkeletonra kifejtett hatását, jelezve a PP2A aktivitásának szerepét endothel sejtek citoszkeleton szerkezetének szabályozásában. A PP2Ac ko-expressziója a trunkált mutánssal azt eredményezte, hogy a rekombináns PP2Ac-nek nem volt katalitikus aktivitása az aktinra/aktinkötő fehérjékre, amiből arra következtettünk, hogy a PP2Ac kötődése a PP2Aa+b-hez kritikus abban, hogy a PP2Ac a megfelelő szubsztrátokon kifejthesse hatását. Endothel sejtek fertőzése PP2A adenovírus konstrukttal szintén jelentősen gyengíti a nokodazol vagy a trombin transzendothel elektromos rezisztenciára kifejtett hatását, jelezve a PP2A közvetlen szerepét az endothel sejtek mikrotubulus és F aktin- mediált permeabilitásváltozásában.

Sejtfractionálási módszereinkkel kimutattuk, hogy a HSP27 és a tau, melyek endothel sejtekben a PP2A feltételezett szubsztátjai a citoszkeletonban, jelentős mennyiségben jelen vannak a PP2A mellett a sejt tubulin gazdag frakciójában. Kísérleteinkben igazoltuk, hogy a PP2A gátlása növeli a tau foszforilációt, valamint a PP2A overexpressziója jelentősen csökkenti a nokodazol által kiváltott HSP27 és tau foszforilációt, ami előző eredményeinkkel összhangban szintén a PP2A citoszkeletonot védő szerepére utal.

Összességében ezek az adatok a PP2A közvetlen részvételére utalnak az endothel sejtek citoszkeleton szerkezetének és permeabilitásának szabályozásában.

SUMMARY

Vascular endothelial cells (EC) have an important role in physiological processes. Increased endothelial cell permeability is the result of intercellular gap formation evoked by bioactive agents. The actin-myosin interaction is a key event of the control of EC contractility in the intercellular gap formation and is regulated via reversible phosphorylation of the regulatory myosin light chain (MLC). MLC phosphorylation on Ser19 induces actin redistribution, and filament formation, which is expedient to gap formation and cell contractility. MLC is phosphorylated by a large molecular weight (210 kDa) form of myosin light chain kinase. Protein phosphatase 1 catalytic subunit (PP1c) is responsible for dephosphorylation of MLC in endothelial cells. The role of protein phosphatase 2A catalytic subunit (PP2Ac) in the barrier function of endothelial cells is unexplored. We have shown that okadaic acid (2-5 nM), a powerful inhibitor of protein phosphatase 2A (PP2A), significantly potentiates the effect of submaximal concentrations of nocodazole (50-200 nM) on transendothelial electrical resistance (TER) suggesting the involvement of PP2A activity in the MT-mediated EC barrier regulation. In order to further elucidate the role of PP2A in the regulation of EC cytoskeleton and permeability, PP2A catalytic (PP2Ac), A regulatory (PP2Aa) subunits and an A subunit mutant (PP2Aa_N) were cloned and human pulmonary arterial EC (HPAEC) were transfected with PP2A mammalian expression constructs or infected with PP2A recombinant adenoviruses. Immunostaining of PP2Ac or PP2Aa+c overexpressing HPAEC indicated actin cytoskeleton rearrangement and co-localization of F-actin with PP2A subunits. PP2A overexpression prevented or dramatically reduced thrombin- or nocodazole-induced F-actin stress fiber formation and microtubule (MT) dissolution. It also attenuated thrombin- or nocodazole-induced decrease in transendothelial electrical resistance indicative of barrier protection. Inhibition of PP2A by okadaic acid abolished the effect of PP2A on agonist-induced changes in EC cytoskeleton indicating a critical role of PP2A activity in EC cytoskeletal maintenance. When the catalytic subunit was co-expressed with the PP2A_N mutant, the actin staining exhibited no difference from the neighbouring control cells which might suggest that the mutant A subunit binds and “eliminates” the native B subunits. The catalytic subunit still may associate with the native A subunit, but this dimer form without available B subunit can not exhibit activity on substrates affecting the F-actin structure.

We demonstrated that significant amounts of PP2A, HSP27 and tau, two cytoskeletal proteins, were present in MT-enriched BPAEC fractions indicating tight association of PP2A with MT in endothelium and with HSP27 and tau. Okadaic acid caused significant increases in tau phosphorylation confirming that tau is a substrate for PP2A in endothelium. PP2A overexpression significantly attenuated thrombin- or nocodazole-induced phosphorylation of HSP27 and tau, which potentially can be involved in agonist-induced cytoskeletal rearrangement and permeability increase. PP2A-mediated dephosphorylation of HSP27 and tau correlated with PP2A-induced preservation of HPAEC and BPAEC cytoskeleton and barrier maintenance. Collectively, our studies clearly demonstrate the crucial role of PP2A in EC barrier protection.

IRODALOMJEGYZÉK

- Ambach A, Saunus J, Konstandin M, Wesselborg S, Meuer SC, Samstag Y. (2000) The serine phosphatases PP1 and PP2A associate with and activate the actin-binding protein cofilin in human T lymphocytes. *Eur J Immunol.* Dec;30(12):3422-31.
- Anderson, N. G., Maller, J. L., Tonks, N. K. and Sturgill, T. W. (1990) Requirement for integration of signals from two distinct phosphorylation pathways for activation of MAP kinase. *Nature (London)* 343, 651–653.
- Andjelkovic, M., Jakubowicz, T., Cron, P., Ming, X. F., Han, J. W. and Hemmings, B. A. (1996) Activation and phosphorylation of a pleckstrin homology domain containing protein kinase (RAC-PK/PKB) promoted by serum and protein phosphatase inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 5699–5704.
- Baharians, A.H. Schonthal. (1998) Autoregulation of protein phosphatase type 2A expression, *J. Biol. Chem.* 273 19019-19024.
- Benndorf R., K. Hayess, S. Ryazantsev, M. Wieske, J. Behlke, G. Lutsch, Phosphorylation and supramolecular organization of murine small heat shock protein HSP25 abolish its actin polymerization-inhibiting activity, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 20780-20784.
- Birukova AA, Birukov KG, Smurova K, Adyshev D, Kaibuchi K, Alieva I, Garcia JG, Verin AD. (2004) Novel role of microtubules in thrombin-induced endothelial barrier dysfunction. *FASEB J.* Dec;18(15):1879-90.
- Borgne, A. and Meijer, L. (1996) Sequential dephosphorylation of p34^{cdc2} on Thr-14 and Tyr-15 at the prophase/metaphase transition. *J. Biol. Chem.* 271, 27847–27854.
- Cassimeris L, Spittle C. Regulation of microtubule-associated proteins. (2001) *Int Rev Cytol* 210:163-226.

- Cayla, X., Goris, J., Hermann, J., Hendrix, P., Ozon, R. and Merlevede, W. (1990) Isolation and characterization of a tyrosyl phosphatase activator from rabbit skeletal muscle and *Xenopus laevis* oocytes. *Biochemistry* 29, 658–667.
- Cayla, X., Van Hoof, C., Bosch, M., Waelkens, E., Vandekerckhove, J., Peeters, B., Merlevede, W. and Goris, J. (1994) Molecular cloning, expression, and characterization of PTPA, a protein that activates the tyrosyl phosphatase activity of protein phosphatase 2A. *J. Biol. Chem.* 269, 15668–15675.
- Chen, J., Martin, B.L. and Brautigan, D.L. (1992) Regulation of protein serine/threonine phosphatase type-2A tyrosine phosphorylation. *science* 257, 1261-1264.
- Chernoff, J., Li, H.-C., Cheng, Y.-S. E. and Chen, L. B. (1983) Characterization of a phosphotyrosyl protein phosphatase activity associated with a phosphoserine protein phosphatase of Mr = 95,000 from bovine heart. *J. Biol. Chem.* 258, 7852–7857.
- Clerk A., A. Michael, P.H. Sugden, (1998) Stimulation of multiple mitogen-activated protein kinase sub-families by oxidative stress and phosphorylation of the small heat shock protein, HSP25/27, in neonatal ventricular myocytes, *Biochem. J.* 333 581-589.
- Cohen P, Holmes CFB, Tsukitani Y. (1990) Okadaic acid: a new probe for the study of cellular regulation. *Trends Biochem Sci* 15: 98-102.
- Cohen PT, Brewis ND, Hughes V, Mann DJ. (1990) Protein serine/threonine phosphatases; an expanding family. *FEBS Lett.* Aug 1;268(2):355-9.
- Cohen PT. (1997) Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life. *Trends Biochem Sci.* Jul;22(7):245-51.
- Cross D., L. Tapia, J. Garrido, R.B. Maccioni, (1996) Tau-like proteins associated with centrosomes in cultured cells, *Exp. Cell Res.* 229 378-387.

- Csortos C., V. Lazar, J.G.N. Garcia (1999) Screening cDNA libraries using partial probes to isolate Full-Length cDNAs from Vascular Cells, *Methods in Mol. Med.* 30 Vascular Disease: Mol. Biol. And Gene Therapy Protocols.
- Csortos, C., Zolnierowicz, S., Bako, E., Durbin, S. D. and DePaoli-Roach, A. A. (1996) High complexity in the expression of the B' subunit of protein phosphatase 2A₀. Evidence for the existence of at least seven novel isoforms. *J. Biol. Chem.* 271, 2578–2588.
- da Costa, SR, Wang Y, Vilalta PM, Schonthal AH, Hamm-Alvarez SF. (2000) Changes in cytoskeletal organization in polyoma middle T antigen-transformed fibroblasts: Involvement of protein phosphatase 2A and *src* tyrosine kinases. *Cell Mot and the Cytoskeleton* 47: 253-268.
- De Baere, I., Derua, R., Janssens, V., Van Hoof, C., Waelkens, E., Merlevede, W. and Goris, J. (1999) Purification of porcine brain protein phosphatase 2A leucine carboxyl methyltransferase and cloning of the human homologue. *Biochemistry* 38, 16539–16547.
- De Brabander M, Geuens G, Nuydens R, Willebrords R, De Mey J. (1981) Microtubule assembly in living cells after release from nocodazole block: the effects of metabolic inhibitors, taxol and PH. *Cell Biol Int Rep* 5:913-920.
- Dejana E., (2004) Endothelial cell-cell junctions: happy together, *Nature reviews* 5 261-271.
- Deng, X., Ito, T., Carr, B., Mumby, M. and May Jr, S. (1998) Reversible phosphorylation of Bcl2 following interleukin 3 or bryostatin 1 is mediated by direct interaction with protein phosphatase 2A. *J. Biol. Chem.* 273, 34157–34163.
- Ding A, Chen B, Fuortes M, Blum M. (1996) Association of Mitogen-activated protein Kinases with Microtubules in Mouse Macrophages. *J Exp Med* 183:1899-1904.

- Drechsel DN, Hyman AA, Cobb MH, Kirschner MW. (1992) Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau. *Mol Biol Cell* 10:1141-1154.
- Drewes G, Ebneth A, Mandelkow EM. (1998) MAPs, MARKs and microtubule dynamics. *TIBS* 23:307-311.
- Dunphy, W. G. (1994) The decision to enter mitosis. *Trends Cell Biol.* 4, 202–207.
- Eto M, Senba S, Morita F, Yazawa M. (1997) Molecular cloning of a novel phosphorylation-dependent inhibitory protein of protein phosphatase-1 (CPI17) in smooth muscle: its specific localization in smooth muscle. *FEBS Lett.* Jun 30;410(2-3):356-60.
- Evangelista, Jr, C. C., Rodriguez Torres, A. M., Limbach, M. P. and Zitomer, R. S. (1996) Rox3 and Rts1 function in the global stress response pathway in baker's yeast. *Genetics* 142, 1083-1093.
- Evans DB, Rank KB, Bhattacharya K, Thomsen DR, Gurney ME, Sharma SK. (2000a) Tau phosphorylation at serine 396 and serine 404 by human recombinant tau protein kinase II inhibits tau's ability to promote microtubule assembly. *J Biol Chem.* Aug 11;275(32):24977-83.
- Evans, D. R. H. and Hemmings, B. A. (2000b) Important role for phylogenetically invariant PP2A α active site and C-terminal residues revealed by mutational analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 156, 21–29.
- Favre, B., Zolnierowicz, S., Turowski, P. and Hemmings, B. A. (1994) The catalytic subunit of protein phosphatase 2A is carboxyl-methylated *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 269, 16311–16317.
- Garcia JGN, Birnboim AS, Del Vecchio PJ, Fenton JW, Malik AB. (1986) Thrombin-induced increases in albumin clearance across cultured endothelial monolayers. *J Cell Physiol* 128: 96-104.

- Garcia JGN, Davis HW, Patterson CE. (1995) Regulation of endothelial cell gap formation and barrier dysfunction: role of myosin light chain phosphorylation. *J Cell Physiol* 163:510-522.
- Garcia JGN, Schaphorst KL, Shi S, Verin AD, Hart CM, Callahan KS, Patterson CE. (1997) Mechanisms of ionomycin-induced endothelial cell barrier dysfunction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 273:L172-184.
- Garcia M.L., D.W. Cleveland, (2003) Going new places using an old MAP: tau, microtubules and human neurodegenerative disease, *Curr. Opin. Cell Biol.* 13 (2001) 41-48.
- Gause, K. C., Homma, M. K., Licciardi, K. A., Seger, R., Ahn, N. G., Peterson, M. J., Krebs, E. G. and Meier, K. E. (1993) Effects of phorbol ester on mitogen-activated protein kinase activity in wild-type and phorbol ester-resistant EL4 thymoma cells. *J. Biol. Chem.* 268, 16124–16129.
- Geschwind D.H., (2003) Tau phosphorylation, tangles, and neurodegeneration: the chicken or the egg? *Neuron*. 40 457-460.
- Giaever I, Keese CR. (1993) A morphological biosensor for mammalian cells. *Nature* 366:591-592.
- Gomez, N. and Cohen, P. (1991) Dissection of the protein kinase cascade by which nerve growth factor activates MAP kinases. *Nature (London)* 353, 170–173.
- Gong CX, Lidsky T, Wegiel J, Zuck L, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. (2000b) Phosphorylation of microtubule-associated protein tau is regulated by protein phosphatase 2A in mammalian brain. *J Biol Chem* 275:5535-5544.
- Gong CX, Weigel J, Lidsky T, Zuck L, Avila J, Wisniewski HM, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. (2000a) Regulation of phosphorylation of neuronal microtubule-associated proteins MAP1b and MAP2 by protein phosphatase-2A and 2B in rat brain. *Brain Res* 853:299-309.

- Goris, J., Pallen, C. J., Parker, P. J., Hermann, J., Waterfield, M. D. and Merlevede, W. (1988) Conversion of a phosphoseryl/threonyl phosphatase into a phosphotyrosyl phosphatase. *Biochem. J.* 256, 1029–1034.
- Gould, K. L., Moreno, S., Owen, D. J., Sazer, S. and Nurse, P. (1991) Phosphorylation at Thr167 is required for *Schizosaccharomyces pombe* p34^{cdc2} function. *EMBO J.* 10, 3297–3309.
- Groves M.R., N. Hanlon, P. Turowski, B.A. Hemmings, D. Barford. (1999) The structure of the protein phosphatase 2A PR65/A subunit reveals the conformation of its 15 tandemly repeated HEAT motifs, *Cell.* 96 99-110.
- Guay J., H. Lambert, G. Gingras-Breton, J.N. Lavoie, J. Huot, J. Landry, (1997) Regulation of actin filament dynamics by p38 map kinase-mediated phosphorylation of heat shock protein 27, *J. Cell Sci.* 110 357-368.
- Gupta R.P., M.B. Abou-Donia, (1999) Tau phosphorylation by diisopropyl phosphorofluoridate (DFP)-treated hen brain supernatant inhibits its binding with microtubules: role of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in tau phosphorylation, *Arch. Biochem. Biophys.* 365 268-278.
- Gusev N.B., N.V. Bogatcheva, S.B. Marston, (2002) Structure and properties of small heat shock proteins (sHsp) and their interaction with cytoskeleton proteins, *Biochemistry (Mosc).* 67 511-519.
- Guy, G.R., Philp, R. and Tan, Y.H. (1995) Activation of protein kinases and the inactivation of protein phosphatase 2A in tumour necrosis factor and interleukin-1 signal-transduction pathways. *Eur. J. Biochem.* 229, 503-511.
- Haccard, O., Jesus, C., Cayla, X., Goris, J., Merlevede, W. and Ozon, R. (1990) *In vivo* activation of a microtubule-associated protein kinase during meiotic maturation of the *Xenopus* oocyte. *Eur. J. Biochem.* 192, 633–642.
- Hansra, G., Bornancin, F., Whelan, R., Hemmings, B. A. and Parker, P. J. (1996) 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced dephosphorylation of protein kinase Ca

- correlates with the presence of a membrane-associated protein phosphatase 2A heterotrimer. *J. Biol. Chem.* 271, 32785–32788.
- Haystead TA, Sim AT, Carling D, Honnor RC, Tsukitani Y, Cohen P, Hardie DG. (1989) Effects of the tumour promoter okadaic acid on intracellular protein phosphorylation and metabolism. *Nature* 337:78-81.
- He T.C., S. Zhou, L.T. da Costa, J. Yu, K.W. Kinzler, B. Vogelstein. (1998) A simplified system for generating recombinant adenoviruses, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95 2509-2514.
- Healy AM, Zolnierowicz S, Stapleton AE, Goebel M, DePaoli-Roach AA, Pringle JR. (1991) CDC55, a *Saccharomyces cerevisiae* gene involved in cellular morphogenesis: identification, characterization, and homology to the B subunit of mammalian type 2A protein phosphatase. *Mol Cell Biol.* Nov;11(11):5767-80.
- Hedges J.C., M.A. Dechert, I.A. Yamboliev, J.L. Martin, E. Hickey, L.A. Weber, W.T. Gerthoffer, (1999) A role for p38(MAPK)/HSP27 pathway in smooth muscle cell migration, *J. Biol. Chem.* 274 24211-24219.
- Hemmings BA, Adams-Pearson C, Maurer F, Muller P, Goris J, Merlevede W, Hofsteenge J, Stone SR. (1990) alpha- and beta-forms of the 65-kDa subunit of protein phosphatase 2A have a similar 39 amino acid repeating structure. *Biochemistry.* Apr 3;29(13):3166-73.
- Hendrix, P., Mayer-Jaekel, R. E., Cron, P., Goris, J., Hofsteenge, J., Merlevede, W. and Hemmings, B. A. (1993) Structure and expression of a 72-kDa regulatory subunit of protein phosphatase 2A. Evidence for different size forms produced by alternative splicing. *J. Biol. Chem.* 268, 15267–15276.
- Hermann, J., Cayla, X., Dumortier, K., Goris, J., Ozon, R. and Merlevede, W. (1988) Polycation-stimulated (PCS_L) protein phosphatase from *Xenopus laevis* oocytes. ATP-mediated regulation of alkaline phosphatase activity. *Eur. J. Biochem.* 173, 17–25.

- Hino M, Kurogi K, Okubo MA, Murata-Hori M, Hosoya H. (2000) Small heat shock protein 27 (HSP27) associates with tubulin/microtubules in HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 271:164-169.
- Hiraga A, Tamura S. (2000) Protein phosphatase 2A is associated in an inactive state with microtubules through 2A1-specific interaction with tubulin. *Biochem J* 346:433-439.
- Hirano M, Niino N, Hirano K, Nishimura J, Hartshorne DJ, Kanaide H. (1999) Expression, subcellular localization, and cloning of the 130-kDa regulatory subunit of myosin phosphatase in porcine aortic endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. Jan 19;254(2):490-6.
- Hirano S, Rees RS, Yancy SL, Welsh MJ, Remick DG, Yamada T, Hata J, Gilmont RR. (2004) Endothelial barrier dysfunction caused by LPS correlates with phosphorylation of HSP27 in vivo. *Cell Biol Toxicol*. Feb;20(1):1-14.
- Hong Y., K.D. Sarge, (1999) Regulation of protein phosphatase 2A activity by heat shock transcription factor 2, *J. Biol. Chem.* 274 12967-12970.
- Honkanen, R. E., Dukelow, M., Zwiller, J., Moore, R. E., Khatra, B. S. and Boynton, A. L. (1991) Cyanobacterial nodularin is a potent inhibitor of type 1 and type 2A protein phosphatases. *Cell. Pharmacol.* 40, 577–583.
- Honkanen, R. E., Zwiller, J., Moore, R. E., Daily, S. L., Khatra, B. S., Dukelow, M. and Boynton, A. L. (1990) Characterization of microcystin-LR, a potent inhibitor of type 1 and type 2A protein phosphatases. *J. Biol. Chem.* 265, 19401–19404.
- Hrimech, M., Yao, X. J., Branton, P. E., and Cohen, E. A. (2000) Human immunodeficiency virus type 1 Vpr-mediated G(2) cell cycle arrest: Vpr interferes with cell cycle signaling cascades by interacting with the B subunit of serine/threonine protein phosphatase 2A. *EMBO J.* 19, 3956-3967.

- Huot J., F. Houle, F. Marceau, J. Landry, (1997) Oxidative stress-induced actin reorganization mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase/heat shock protein 27 pathway in vascular endothelial cells, *Circ. Res.* 80(3) 383-392.
- Huot J., H. Lambert, J.N. Lavoie, A. Guimond, F.Houle, J. Landry, Characterization of 45-kDa/54-kDa HSP27 kinase, a stress-sensitive kinase which may activate the phosphorylation-dependent protective function of mammalian 27-kDa heat-shock protein HSP27, *Eur. J. Biochem.* 227 (1995) 416-427.
- Ibitayo A.L., J. Sladick, S. Tuteja, O. Louis-Jacques, H. Yamada, G. Groblewski, M. Welsh, K.N. Bitar, (1999) HSP27 in signal transduction and association with contractile proteins in smooth muscle cells, *Am. J. Physiol.* 277 G445-G454.
- Ingebritsen TS, Cohen P. (1983) The protein phosphatases involved in cellular regulation. 1. Classification and substrate specificities. *Eur J Biochem.* May 2;132(2):255-61.
- Ingelson M., E. Vanmechelen, L. Lannfelt, (1996) Microtubule-associated protein tau in human fibroblasts with the Swedish Alzheimer mutation, *Neurosci. Lett.* 220 9-12.
- Ishihara, H., Martin, B. L., Brautigan, D. L., Karaki, H., Ozaki, H., Kato, Y., Fusetani, N., Watabe, S., Hashimoto, K., Uemura, D. and Hartshorne, D. J. (1989) Calyculin A and okadaic acid: inhibitors of protein phosphatase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 159, 871–877.
- Jackson J, Meisinger J, Patel S, Lim ZC, Vellody K, Metz R, Young MR. (1997) Protein phosphatase-2A associates with the cytoskeleton to maintain cell spreading and reduced motility of nonmetastatic Lewis lung carcinoma cells: the loss of this regulatory control in metastatic cells. *Invasion Metastasis.*;17(4):199-209.
- Janssens V, Goris J. (2001) Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem J.* Feb 1;353(Pt 3):417-39.

- Janssens, V., Van Hoof, C., Merlevede, W. and Goris, J. (1998) PTPA regulating PP2A as a dual specificity phosphatase. *Methods Mol. Biol.* (Totowa, NJ) 93, 103–115.
- Jesus, C., Goris, J., Cayla, X., Hermann, J., Hendrix, P., Ozon, R. and Merlevede, W. (1989) Tubulin and MAP2 regulate the PCS_L phosphatase activity. A possible new role for microtubular proteins. *Eur. J. Biochem.* 180, 15–22.
- Kamibayashi, C., Estes, R., Licketing, R.L., Yang, S.-I., Craft, C. and Mumby, N.C. (1994) Comparison of heterotrimeric protein phosphatase 2A containing different B subunits. *J. Biol. Chem.* 269, 20139-20148.
- Kawkitinarong K., L. Linz-McGillem, K.G. Birukov, J.G. Garcia, (2004) Differential Regulation of Human Lung Epithelial and Endothelial Barrier Function by Thrombin, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* Am J Respir Cell Mol Biol. Nov;31(5):517-27. Epub 2004 Jul 29.
- Keezer S.M., S.E. Ivie, H.C. Krutzsch, A. Tandle, S.K. Libutti, D.D. Roberts, Angiogenesis inhibitors target the endothelial cell cytoskeleton through altered regulation of heat shock protein 27 and cofilin, *Cancer Research* 63 (2003) 6405-6412.
- Khan IA, Luduena RF. (1996) Phosphorylation of beta III-tubulin. *Biochemistry.* Mar 26;35(12):3704-11.
- Kimura K, Ito M, Amano M, Chihara K, Fukata Y, Nakafuku M, Yamamori B, Feng J, Nakano T, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K. (1996) Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase) *Science.* Jul 12;273(5272):245-8.
- Kinoshita, K., Nemoto, T., Nabeshima, K., Kondoh, H., Niwa, H. and Yanagida, M. (1996) The regulatory subunits of fission yeast protein phosphatase 2A (PP2A) affect cell morphogenesis, cell wall synthesis and cytokinesis. *Genes Cells* 1, 29–45.

- Kinoshita, N., Ohkura, H. and Yanagida, M. (1990) Distinct, essential roles of type 1 and 2A protein phosphatases in the control of the fission yeast cell division cycle. *Cell* 63, 405–415.
- Kinoshita, N., Yamano, H., Niwa, H., Yoshida, T. and Yanagida, M. (1993) Negative regulation of mitosis by the fission yeast protein phosphatase ppa2. *Genes Dev.* 7, 1059–1071.
- Kleinberger, T. and Shenk, T. (1993) Adenovirus E4orf4 protein binds to protein phosphatase 2A, and the complex down regulates E1A-enhanced junB transcription. *J. Virol.* 67, 7556–7560.
- Kobayashi N, Reiser J, Schwarz K, Sakai T, Kriz W, Mundel P. (2001) Process formation of podocytes: morphogenetic activity of microtubules and regulation by protein serine/threonine phosphatase PP2A. *Histochem Cell Biol* 115:255-266.
- Kolosova IA, Ma SF, Adyshev DM, Wang P, Ohba M, Natarajan V, Garcia JG, Verin AD. (2004) Role of CPI-17 in the regulation of endothelial cytoskeleton. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* Nov;287(5):L970-80. Epub 2004 Jul 02.
- Kolosova, I.A. C. Csontos, J.G.N. Garcia, A.D. Verin (2003), Role of Ser/Thr protein phosphatases in endothelial cytoskeletal organization and barrier function, *Recent Res. Devel. Physiol.* 1 385-400.
- Kremmer E, Ohst K, Kiefer J, Brewis N, Walter G. (1997) Separation of PP2A core enzyme and holoenzyme with monoclonal antibodies against the regulatory A subunit: abundant expression of both forms in cells. *Mol Cell Biol.* Mar;17(3):1692-701.
- Laemmli UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Larsen J.K., I.A. Yamboliev, L.A. Weber, W.T. Gerthoffer, (1997) Phosphorylation of the 27-kDa heat shock protein via p38 MAP kinase and MAPKAP kinase in smooth muscle, *Am. J. Physiol.* 273 L930-L940.

- Lavoie J.N., G. Gingras-Breton, R.M. Tanguay, J. Landry, Induction of Chinese hamster HSP27 gene expression in mouse cells confers resistance to heat shock. HSP27 stabilization of the microfilament organization, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 3420-3429.
- Lavoie J.N., H. Lambert, E. Hickey, L.A. Weber, J. Landry, (1995) Modulation of cellular thermoresistance and actin filament stability accompanies phosphorylation-induced changes in the oligomeric structure of heat shock protein 27, *Mol. Cell Biol.* 15 505-516.
- Lee TJ, Gotlieb AI. (2003) Microfilaments and microtubules maintain endothelial integrity. *Microsc Res Tech* 60:115-127.
- Lee, T. H., Solomon, M. J., Mumby, M. C. and Kirschner, M. W. (1991) INH, a negative regulator of MPF, is a form of protein phosphatase 2A. *Cell* 64, 415–423.
- Lee, T. H., Turck, C. and Kirschner, M. W. (1994) Inhibition of cdc2 activation by INH/PP2A. *Mol. Biol. Cell* 5, 323–338.
- Litersky JM, Johnson GVW, Jakes R, Goedert M, Lee M, Seubert P. (1996) Tau protein is phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II within its microtubule-binding domains at Ser-262 and Ser-356. *Biochem J* 316:655-660.
- Loktionova S.A., A.E. Kabakov, (1998b) Protein phosphatase inhibitors and heat preconditioning prevent Hsp27 dephosphorylation, F-actin disruption and deterioration of morphology in ATP-depleted endothelial cells, *FEBS Lett.* 433 294-300.
- Loktionova S.A., O.P. Ilyinskaya, A.E. Kabakov, (1998a) Early and delayed tolerance to simulated ischemia in heat-preconditioned endothelial cells: a role for HSP27, *Am. J. Physiol.* 275 H2147-H2158.
- Loktionova S.A., O.P. Ilyinskaya, V.L. Gabai, A.E. Kabakov, (1996) Distinct effects of heat shock and ATP depletion on distribution and isoform patterns of human Hsp27 in endothelial cells, *FEBS Lett.* 392 100-104.

- Lum, H., Podolski, J.L., Gurnack, M.E., Schulz, I.T., Huang, F., Holian, O.: Protein phosphatase 2B inhibitor potentiates endothelial PKC activity and barrier dysfunction (2001) *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 281(3), L546-55.
- MacKintosh, C. and Klumpp, S. (1990) Tautomycin from the bacterium *Streptomyces verticillatus*. Another potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A. *FEBS Lett.* 277, 137–140.
- Marcellus, R. C., Chan, H., Paquette, D., Thirlwell, S., Boivin, D. and Branton, P. E. (2000) Induction of p53-independent apoptosis by the adenovirus E4orf4 protein requires binding to the Ba subunit of protein phosphatase 2A. *J. Virol.* 74, 7869–7877.
- Mayer RE, Hendrix P, Cron P, Matthies R, Stone SR, Goris J, Merlevede W, Hofsteenge J, Hemmings BA. (1991) Structure of the 55-kDa regulatory subunit of protein phosphatase 2A: evidence for a neuronal-specific isoform. *Biochemistry.* Apr 16;30(15):3589-97.
- McCright, B. and Virshup, D. M. (1995) Identification of a new family of protein phosphatase 2A regulatory subunits. *J. Biol. Chem.* 270, 26123–26128.
- McCright, B., Rivers, A. M., Audlin, S. and Virshup, D. M. (1996) The B56 family of protein phosphatase 2A (PP2A) regulatory subunits encodes differentiation-induced phosphoproteins that target PP2A to both nucleus and cytoplasm. *J. Biol. Chem.* 271, 22081–22089.
- Merrick, S.E., Demoise, D.C., Lee, V.M. (1996) Site-specific dephosphorylation of tau protein at Ser202/Thr205 in response to microtubule depolymerization in cultured human neurons involves protein phosphatase 2A *J. Biol. Chem.* 271(10), 5589-94.
- Miron T., K. Vancompernelle, J. Vandekerckhove, M. Wilchek, B. Geiger, (1991) A 25-kD inhibitor of actin polymerization is a low molecular mass heat shock protein, *J. Cell Biol.* 114 255-261.

- Moreno, C. S., Park, S., Nelson, K., Ashby, D., Hubalek, F., Lane, W. S. and Pallas, D. C. (2000) WD40 repeat proteins striatin and S/G2 nuclear autoantigen are members of a novel family of calmodulin-binding proteins that associate with protein phosphatase 2A. *J. Biol. Chem.* 275, 5257–5263.
- Nagase, T., Murakami, T., Nozaki, H., Inoue, R., Nishito, Y., Tanabe, O., Usui, H. and Takeda, M. (1997) Tissue and subcellular distributions, and characterization of rat brain protein phosphatase 2A containing a 72-kDa d/B' subunit. *J. Biochem. (Tokyo)* 122, 178–187.
- Nakamura Y, Hashimoto R, Amano M, Nagata K, Matsumoto N, Goto H, Fukusho E, Mori H, Kashiwagi Y, Kudo T, Inagaki M, Takeda M. (2000) Localized phosphorylation of vimentin by rho-kinase in neuroblastoma N2a cells. *Genes Cells.* Oct;5(10):823-37.
- Niggli V. (2003) Microtubule-disruption-induced and chemotactic-peptide-induced migration of human neutrophils: implications for differential sets of signalling pathways. *J Cell Sci* 116:813-822.
- Nunbhakdi-Craig V., L. Craig, T. Machleidt, E. Sontag, (2003) Simian virus 40 small tumor antigen induces deregulation of the actin cytoskeleton and tight junctions in kidney epithelial cells, *J. Virol.* 77 2807-2818.
- Okamoto, K., Kamibayashi, C., Serrano, M., Prives, C., Mumby, M. C. and Beach, D. (1996) p53-dependent association between cyclin G and the B1 subunit of protein phosphatase 2A. *Mol. Cell. Biol.* 16, 6593-6602.
- Petrache I., A. Birukova, S.I. Ramirez, J.G. Garcia, A.D. Verin (2003) The role of the microtubules in tumor necrosis factor-alpha-induced endothelial cell permeability, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 28 574-581.
- Pot DA, Dixon JE. (1992) A thousand and two protein tyrosine phosphatases. *Biochim Biophys Acta.* Jul 22;1136(1):35-43.

- Price NE, Mumby MC. (2000) Effects of regulatory subunits on the kinetics of protein phosphatase 2A. *Biochemistry*. Sep 19;39(37):11312-8.
- Price NE, Wadzinski B, Mumby MC. (1999) An anchoring factor targets protein phosphatase 2A to brain microtubules. *Brain Res* 73:68-77.
- Ramachandran, C., Goris, J., Waelkens, E., Merlevede, W. and Walsh, D. A (1987) The interrelationship between cAMP-dependent a and b subunit phosphorylation in the regulation of phosphorylase kinase activity: studies using subunit specific phosphatases. *J. Biol. Chem.* 262, 3210–3218.
- Reynolds C.H., A.R. Nebreda, G.M. Gibb, M.A. Utton, B.H. Anderton, (1997) Reactivating kinase/p38 phosphorylates tau protein in vitro, *J. Neurochem.* 69 191-198.
- Ricciarelli, R. and Azzi, A. (1998) Regulation of recombinant PKC alpha activity by protein phosphatase 1 and protein phosphatase 2A. *Arch. Biochem. Biophys.* 355, 197–200.
- Ronne, H., Carlberg, M., Hu, G.-Z. and Nehlin, J.O. (1991) Protein phosphatase 2A in *Saccharomyces cerevisiae*: effects on cell growth and bud morphogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 11, 4876-4884.
- Ruediger R, Hentz M, Fait J, Mumby M, Walter G. (1994) Molecular model of the A subunit of protein phosphatase 2A: interaction with other subunits and tumor antigens. *J Virol.* Jan;68(1):123-9.
- Ruediger R, Pham HT, Walter G. (2001) Alterations in protein phosphatase 2A subunit interaction in human carcinomas of the lung and colon with mutations in the A beta subunit gene. *Oncogene.* Apr 5;20(15):1892-9.
- Ruediger R, Roeckel D, Fait J, Bergqvist A, Magnusson G, Walter G. (1992) Identification of binding sites on the regulatory A subunit of protein phosphatase 2A for the catalytic C subunit and for tumor antigens of simian virus 40 and polyomavirus. *Mol Cell Biol.* Nov;12(11):4872-82.

- Ruvolo, P. P., Deng, X., Ito, T., Carr, B. K. and May, W. S. (1999) Ceramide induces Bcl2 dephosphorylation via a mechanism involving mitochondrial PP2A. *J. Biol. Chem.* 274, 20296–20300.
- Saito T, Shima H, Osawa Y, nagao M, Hemmings BA, Kishimoto T, Hisanaga S. (1995) Neurofilament-associated protein phosphatase 2A: its possible role in preserving neurofilaments in filamentous states. *Biochemistry* 34:7376-7384.
- Santoro, M. F., Annand, R. R., Robertson, M. M., Peng, Y.-W., Brady, M. J., Mankovich, J. A., Hackett, M. C., Ghayur, T., Walter, G., Wong, W. W. and Giegel, D. A. (1998) Regulation of protein phosphatase 2A activity by caspase-3 during apoptosis. *J. Biol. Chem.* 273, 13119–13128.
- Scaife RM és Langdon WY. (2000) C-Cbl localizes to actin lamellae and regulates lamellipodia formation and cell morphology. *J Cell Sci.* 2000 Jan Pt 2:215-26
- Schafer C., P. Clapp, M.J. Welsh, R. Benndorf, J.A. Williams, (1999) HSP27 expression regulates CCK-induced changes of the actin cytoskeleton in CHO-CCK-A cells, *Am. J. Physiol.* 277 C1032-C10343.
- Schafer C., S.E. Ross, M.J. Bragado, G.E. Groblewski, S.A. Ernst, J.A. Williams, (1998) A role for the p38 mitogen-activated protein kinase/Hsp 27 pathway in cholecystokinin-induced changes in the actin cytoskeleton in rat pancreatic acini, *J. Biol. Chem.* 273 24173-24180.
- Schaphorst KL, Pavalko FM, Patterson CE, Garcia JGN. (1997) Thrombin-mediated focal adhesion plaque reorganization in endothelium: role of protein phosphorylation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 17:443-455.
- Schneider G.B., H. Hamano, L.F. Cooper, (1998) In vivo evaluation of hsp27 as an inhibitor of actin polymerization: hsp27 limits actin stress fiber and focal adhesion formation after heat shock, *J. Cell Physiol.* 177 575-584.

- Shtrichman, R., Sharf, R. and Kleinberger, T. (2000) Adenovirus E4orf4 protein interacts with both Ba and B' subunits of protein phosphatase 2A, but E4orf4-induced apoptosis is mediated only by the interaction with Ba. *Oncogene* 19, 3757–3765.
- Shtrichman, R., Sharf, R., Barr, H., Dobner, T. and Kleinberger, T. (1999) Induction of apoptosis by adenovirus E4orf4 protein is specific to transformed cells and requires an interaction with protein phosphatase 2A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 10080–10085.
- Silberman, S. R., Speth, M., Nemani, R., Ganapathi, M. K., Dombradi, V., Paris, H. and Lee, E. Y. C. (1984) Isolation and characterization of rabbit skeletal muscle protein phosphatases C-I and C-II. *J. Biol. Chem.* 259, 2913–2922.
- Sim AT, Ratcliffe E, Mumby MC, Villa-Moruzzi E, Rostas JA. (1994) Differential activities of protein phosphatase types 1 and 2A in cytosolic and particulate fractions from rat forebrain. *J Neurochem* 62:1552-1559.
- Singh T.J., I. Grundke-Iqbal, B. McDonald, K. Iqbal, (1994) Comparison of the phosphorylation of microtubule-associated protein tau by non-proline dependent protein kinases, *Mol. Cell. Biochem.* 131 181-189.
- Sonoda, Y., Kasahara, T., Yamaguchi, Y., Kuno, K., Matsushima, K. and Mukaida, N. (1997) Stimulation of interleukin-8 production by okadaic acid and vanadate in a human promyelocyte cell line, an HL-60 subline. Possible role of mitogen-activated protein kinase on the okadaic acid-induced NF- κ B activation. *J. Biol. Chem.* 272, 15366–15372.
- Sontag E, Nunbhakdi-Craig V, Lee G, Brandt R, Kamibayashi C, Kuret J, White CL, Mumby MC, Bloom GS. (1999) Molecular interactions among protein phosphatase 2A, tau, and microtubules. Implications for the regulation of tau phosphorylation and development of taupathies. *J Biol Chem* 274:25490-25498.
- Sontag E, Nunbhakdi-Craig V, Bloom GS, Mumby MC. (1995) A novel pool of protein phosphatase 2A is associated with microtubules and is regulated during the cell cycle. *J Cell Biol* 128:1131-1144.

- Sontag E, Nunbhakdi-Craig V, Lee G, Bloom GS, Mumby MC. (1996) Regulation of the phosphorylation state and microtubule-binding activity of Tau by protein phosphatase 2A Neuron 17:1201-1207.
- Srinivasan M, Begum N. (1994) Regulation of protein phosphatase 1 and 2A activities by insulin during myogenesis in rat skeletal muscle cells in culture. J Biol Chem. Apr 29;269(17):12514-20.
- Stasek JE, Patterson CE, Garcia JGN. (1992) Protein kinase C phosphorylates caldesmon 77 and vimentin and enhances albumin permeability across cultured bovine pulmonary artery endothelial cell monolayer. J Cell Physiol 153:62-75.
- Stone SR, Hofsteenge J, Hemmings BA. (1987) Molecular cloning of cDNAs encoding two isoforms of the catalytic subunit of protein phosphatase 2A. Biochemistry. Nov 17;26(23):7215-20.
- Strack S, Chang D, Zaucha JA, Colbran RJ, Wadzinski BE. (1999) Cloning and characterization of B delta, a novel regulatory subunit of protein phosphatase 2A. FEBS Lett. Nov 5;460(3):462-6.
- Strack S, Cribbs JT, Gomez L. (2004) Critical role for protein phosphatase 2A heterotrimers in mammalian cell survival. J Biol Chem. Nov 12;279(46):47732-9. Epub 2004 Sep 09.
- Strack S, Ruediger R, Walter G, Dagda RK, Barwacz CA, Cribbs JT. (2002). Protein phosphatase 2A holoenzyme assembly: identification of contacts between B-family regulatory and scaffolding A subunits. J Biol Chem. Jun 7;277(23):20750-5.
- Strack S., Westphal RS, Colbran RJ, Ebner FF, Wadzinski BE. (1997) Protein serine/threonine phosphatase 1 and 2A associate with and dephosphorylate neurofilaments. Brain Res Mol Brain Res 49:15-28.

- Takizawa N, Niiro N, Ikebe M. (2002) Dephosphorylation of the two regulatory components of myosin phosphatase, MBS and CPI17. *FEBS Lett.* Mar 27;515(1-3):127-32.
- Tanabe, O., Nagase, T., Murakami, T., Nozaki, H., Usui, H., Nishito, Y., Hayashi, H., Kagamiyama, H. and Takeda, M. (1996) Molecular cloning of a 74-kDa regulatory subunit (B' or d) of human protein phosphatase 2A. *FEBS Lett.* 379, 107–111.
- Tanner F.C., D.P. Carr, G.J. Nabel, E.G. Nabel, (1997) Transfection of human endothelial cells, *Cardiovasc. Res.* 35 522-528.
- Tehrani, M. A., Mumby, M. C. and Kamibayashi, C. (1996) Identification of a novel protein phosphatase 2A regulatory subunit highly expressed in muscle. *J. Biol. Chem.* 271, 5164–5170.
- Thurston V.C., R.P. Zinkowski, L.I. Binder, (1996) Tau as a nucleolar protein in human nonneural cells in vitro and in vivo, *Chromosoma* 105 20-30.
- Turowski, P., Ferenandez, A., Favre, B., Lamb, N.J.C. and Hemmings, B.A. (1995) Differential methylation and altered conformation of cytoplasmic and nuclear forms of protein phosphatase 2A during cell cycle progression. *J. Cell. Biol.* 129, 397-410.
- Turowski, P., Myles, T., Hemmings, B.A., Fernandez, A. and Lamb, N.J.C. (1999) Vimentin dephosphorylation by protein phosphatase 2A is modulated by the targeting subunit B55. *Mol. Bil. Cell.* 10, 1997-2015.
- Usui T, Marriott G, Inagaki M, Swarup G, Osada H. J (1999) Protein phosphatase 2A inhibitors, phoslactomycins. Effects on the cytoskeleton in NIH/3T3 cells. *Biochem (Tokyo).* May;125(5):960-5.
- Usui, H., Inoue, R., Tanabe, O., Nishito, Y., Shimizu, M., Hayashi, H., Kagamiyama, H. and Takeda, M. (1998) Activation of protein phosphatase 2A by cAMP-dependent protein kinase-catalyzed phosphorylation of the 74-kDa B'' (δ) regulatory subunit in vitro and identification of the phosphorylation sites. *FEBS Lett.* 430, 312-316.

- Van Hoof, C., Cayla, X., Bosch, M., Merlevede, W. and Goris, J. (1994) The phosphotyrosyl phosphatase activator of protein phosphatase 2A. A novel purification method, immunological and enzymic characterization. *Eur. J. Biochem.* 226, 899–907.
- Van Hoof, C., Janssens, V., Dinisiotu, A., Merlevede, W. and Goris, J. (1998) Functional analysis of conserved domains in the phosphotyrosyl phosphatase activator. Molecular cloning of the homologues from *Drosophila melanogaster* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* 37, 12899–12908.
- Verin AD, Birukova A, Wang P, Birukov K, Liu F, Garcia JGN. (2001) Microtubule disassembly increases endothelial cell barrier dysfunction: role of myosin light chain phosphorylation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281:L565-574.
- Verin AD, Cooke C, Herenyiova M, Patterson CE, Garcia JGN. (1998) Role of Ca^{2+} /calmodulin-dependent phosphatase 2B in thrombin-induced endothelial cell contractile response. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 275:L788-799.
- Verin AD, Csontos C, Durbin SD, Aydanyan A, Wang P, Patterson CE, Garcia JG. (2000) Characterization of the protein phosphatase 1 catalytic subunit in endothelium: involvement in contractile responses. *J Cell Biochem* 79:113-125.
- Verin, A.D., Cooke, C., Herenyiova, M., Patterson, C.E., Garcia, J.G.: Role of Ca^{2+} /calmodulin-dependent phosphatase 2B in thrombin-induced endothelial cell contractile responses (1998) *Am. J. Physiol.* 275(4 Pt 1), L788-99.
- Voorhoeve, P. M., Hijmans, E. M. and Bernards, R. (1999) Functional interaction between a novel protein phosphatase 2A regulatory subunit, PR59, and the retinoblastoma-related p107 protein. *Oncogene* 18, 515–524.
- Wadzinski, B.J. Eisfelder, L.F. Peruski Jr, M.C. Mumby, G.L. Johnson. (1992) NH₂-terminal modification of the phosphatase 2A catalytic subunit allows functional expression in mammalian cells, *J. Biol. Chem.* 267 16883-16888.

- Wang P., K.N. Bitar, (1998) Rho A regulates sustained smooth muscle contraction through cytoskeletal reorganization of HSP27, *Am. J. Physiol.* 275 G1454-G1462.
- Wang SS, Esplin ED, Li JL, Huang L, Gazdar A, Minna J, Evans GA. (1998) Alterations of the PPP2R1B gene in human lung and colon cancer. *Science*. Oct 9;282(5387):284-7.
- Wera S and Hemmings BA. (1995) Serine/threonine protein phosphatases. *Biochem J* 311:17-29.
- Yan, Z., Federov, S. A., Mumby, M. C. and Williams, R. S. (2000) PR48, a novel regulatory subunit of protein phosphatase 2A, interacts with Cdc6 and modulates DNA replication in human cells. *Mol. Cell. Biol.* 20, 1021–1029.
- Yang SI, Lickteig RL, Estes R, Rundell K, Walter G, Mumby MC. (1991) Control of protein phosphatase 2A by simian virus 40 small-t antigen. *Mol Cell Biol.* Apr;11(4):1988-95.
- Young MR, Kolesiak K, Meisinger J. (2002) Protein phosphatase-2A regulates endothelial cell motility and both the phosphorylation and the stability of focal adhesion complexes. *Int J Cancer*. Jul 20;100(3):276-82.
- Zhang J, Chiang YJ, Hodes RJ, Siraganian RP. (2004) Inactivation of c-Cbl or Cbl-b differentially affects signaling from the high affinity IgE receptor. *J Immunol.* 173(3):1811-8
- Zhou J, Pham HT, Ruediger R, Walter G. (2003) Characterization of the Aalpha and Abeta subunit isoforms of protein phosphatase 2A: differences in expression, subunit interaction, and evolution. *Biochem J.* Jan 15;369(Pt 2):387-98.
- Zhou J, Pham HT, Walter G. (2003) The formation and activity of PP2A holoenzymes do not depend on the isoform of the catalytic subunit. *J Biol Chem.* Mar 7;278(10):8617-22. Epub 2002 Dec 26.

- Zhu D, Kosik KS, Meigs TE, Yanamadala V, Denker BM. (2004) Galpha12 directly interacts with PP2A: evidence FOR Galpha12-stimulated PP2A phosphatase activity and dephosphorylation of microtubule-associated protein, tau. J Biol Chem. Dec 31;279(53):54983-6. Epub 2004 Nov 03.
- Zhu, T., Matsuzawa, S., Mizuno, Y., Kamibayashi, C., Mumby, M. C., Andjelkovic, N., Hemmings, B. A., Onoé, K. and Kikuchi, K. (1997) The interconversion of protein phosphatase 2A between PP2A_i and PP2A_o during retinoic acid-induced granulocytic differentiation and a modification on the catalytic subunit in S phase of HL-60 cells. Arch. Biochem. Biophys. 339, 210–217.
- Zolnierowicz S, Csontos C, Bondor J, Verin A, Mumby MC, DePaoli-Roach AA. (1994) Diversity in the regulatory B-subunits of protein phosphatase 2A: identification of a novel isoform highly expressed in brain. Biochemistry. Oct 4;33(39):11858-67.
- Zolnierowicz, S., Van Hoof, C., Andjelkovic, N., Cron, P., Stevens, I., Merlevede, W., Goris, J. and Hemmings, B. A. (1996) The variable subunit associated with protein phosphatase 2A_o defines a novel multimember family of regulatory subunits. Biochem. J. 317, 187–194.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálás köszönetem szeretném kifejezni Dr. Csontos Csilla témavezetőmnek hozzáértő szakmai irányításáért, barátságáért, amit Ph. D. ösztöndíjam ideje alatt és a disszertációm írásához nyújtott, illetve, a lehetőséget, hogy két évet dolgozhattam az Amerikai Egyesült Államokban együttműködő partnerünk laboratóriumában.

Köszönöm Prof. Dr. Gergely Pálnak, hogy munkámat támogatta, lehetővé tette kísérleteim elvégzését a Debreceni Egyetem OEC Orvosi Vegytani Intézetében.

Köszönöm Dr. Alexander Verinnek a lehetőséget, hogy laboratóriumában, a Johns Hopkins Egyetemen két évet eltölthettem.

Külön szeretném megköszönni Prof. Dr. Erdődi Ferencnek, a munkám során kapott tanácsokat. Szeretném megköszönni Czikora István barátságát és a kísérletek kivitelezésében nyújtott segítségét. Köszönettel tartozom Dr. Lontay Beátának, Dr. Kiss Enikőnek, Kakuk Annamáriának, Erdélyi Katalinnak, Kiss Andreának és az Orvosi Vegytani Intézet minden dolgozójának, barátságukért, szakmai segítségükért, és hogy bármikor fordulhattam hozzájuk segítségért.

Végül, de nem utolsó sorban hálásan köszönöm férjem, Attila, édesanyám és húgom, Anikó szeretetét, végtelen türelmét, amivel teljes Ph. D ösztöndíjam ideje alatt nagyon sokat segítettek.

FÜGGELÉK

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

K. Tar, A.A. Birukova, Cs. Csontos, É.Bakó, J.G.N. Garcia, A.D. Verin:

Phosphatase 2A is involved in endothelial cell microtubule remodelling and barrier regulation *J Cell Biochem.* 2004 Jun 1;92(3):534-46.[IF:2,664]

A. M. Teckchandani, A.A. Birukova, **K.Tar**, A.D. Verin, A. Y. Tsygankov: The multidomain protooncogenic protein c-Cbl binds to tubulin and stabilizes microtubules (*in press*) *Experimental Cell Research* 2005 [IF:3,949]

K. Tar, Cs. Csontos, I. Czikora, Shwu-Fan Ma, R. Wadgaonkar, P. Gergely, J.G.N. Garcia, A.D. Verin:

The role of protein phosphatase 2A in the regulation of endothelial cell cytoskeleton structure (*Közlésre benyújtva*)

Előadások és poszterek az értekezés témájában

Előadások

Tar K.: A PP2A szerepe endothel sejtek citoszkeleton szerkezetének szabályozásában PhD konferencia, Debrecen, 2005

Tar K.: Protein foszfatáz 2A (PP2A) endotheliumban Magyar Tüdőgyógyász Társaság 53. Nagygyűlése 2004 jún 3-6, Debrecen

Tar, K.: Role of phosphatase 2A activity in microtubule-mediated endothelial cell cytoskeleton rearrangement. FASEB Experimental biology 2004 április Washington DC, „Graduate Student Highlights in Respiration Physiology”, FASEB Journal 18 (4): A716-717 March 23, 2004 [IF: 7,252]

Tar K.: A protein foszfatáz 2A (PP2A) szerepe endotheli sejtek citoszkeletonjának újrendeződésében PhD konferencia, Debrecen, 2004

Tar K.: A protein foszfatáz 2A (PP2A) szerepe endothelium citoszkeleton szabályozásában, Debreceni Akadémiai Bizottság, Debrecen 2003. február

Tar K.: A protein foszfatáz 2A (PP2A) szerepe endothelium citoszkeleton szabályozásában PhD konferencia, Debrecen, 2003

Poszterek

Czikora I., **Tar K.**, A.D. Verin, Gergely P, Csontos Cs.: Protein foszfatáz 2A alegységek overexpressziója endothel sejtekben, VI. Magyar Genetikai Kongresszus, XIII. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok 2005. április10-12. Eger

Tar K., Czikora I, A.D. Verin, Gergely P., Csontos Cs.: Protein foszfatáz 2A szerepe endothel sejtek citoszkeletonjának újrendeződésében A Magyar Biokémiai

Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztály Munkaértekezlete Sopron, 2004. május 14-17.

K. Tar, C. Csontos, A.A.Birukova, J.G.N.Garcia and A.D. Verin. : Role of phosphatase 2A activity in microtubule-mediated endothelial cell cytoskeleton rearrangement. FASEB Experimental biology 2004, Washington DC, FASEB Journal 18 (4): A716-717 March 23, 2004 [IF: 7,252]

K. Tar, Cs. Csontos, A.A. Birukova and A.D. Verin: The role of protein phosphatase 2A (PP2A) in endothelial cell (EC) cytoskeleton. ATS Seattle 2003, Am. J. Respir. Crit. Care Medicine, 2003, 167,7, p.A119 [IF: 6,567]

Tar K., A. Verin, Gergely P., Csontos Cs: A protein foszfatáz 2A szerepe endothel sejtek citoskeleton szerkezetének szabályozásában. 2003. okt. 10-12. Hőgyész A Magyar Biokémia Egyesület II. Jelátviteli Konferencia

Tar K. A.D. Verin, Gergely P, Csontos Cs.: Protein foszfatáz 2A szerepe endothel sejtek citoskeleton szerkezetének szabályozásában 2003. május 12-15. Tihany A Magyar Biokémiai Egyesület Mol. Biol. Szakosztálya 8. Munkaértekezlete

A.A. Birukova, **K. Tar**, Cs. Csontos, E. Bako, J.G.N. Garcia, and A.D. Verin: Role of phosphatase 2A (PP2A) in endothelial cell (EC) microtubule remodeling and barrier regulation. USA, 2002 [IF 2,527]

Tar K., Bakó É., Baranyi N., A. Verin, J.G.N. Garcia, Gergely P., Csontos Cs.: Protein foszfatáz 2A (PP2A) jellemzése endotheliumban Magyar Biokémiai Egyesület Jelátviteli Konferencia, Eger, 2001. október 11-13.

K. Tar, É. Bakó, N. Baranyi, A. Verin, J.G.N. Garcia, P. Gergely, Cs. Csontos: Characterization of protein phosphatase 2A in endothelium Protein Phosphorylation and Protein Phosphatases Marburg, Germany, 2001

Egyéb poszterek és előadások

T. Docsa, **K. Tar**, B. Toth, L. Somsak, P. Gergely: Regulation of hepatic glycogen metabolism by glycopyranosylidene-spyro-thiohydantoin. Conference of the Hungarian Physiological Society (Budapest, Hungary) 2000

T. Docsa, **K. Tar**, B. Toth, L. Somsak, P. Gergely: Regulation of hepatic glycogen metabolism by glycopyranosylidene-spyro-thiohydantoin in isolated hepatic cells. Conference of the Hungarian Biochemical Society (Sopron, Hungary) 2000

Tar K: Glikogén foszforiláz szabályozása izolált hepatocytában. TDK konferencia Debrecen, 2000