

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**A PROTEIN FOSZFATÁZ 2A SZEREPE A TŰDŐ ENDOTÉL BARRIER  
SZABÁLYOZÁSÁBAN**

Kása Anita

Témavezető: Dr. Csontos Csilla



DEBRECENI EGYETEM  
Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2013

# **A protein foszfatáz 2A szerepe a tüdő endotél barrier szabályozásában**

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

Írta: Kása Anita okleveles molekuláris biológus

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

Témavezető: Dr. Csontos Csilla

A doktori szigorlati bizottság:

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

A doktori szigorlat időpontja:

2013. december 16.

Az értekezés bírálói:

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

A bírálóbizottság:

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

Az értekezés védésének helye és időpontja:

DE OEC Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme  
2013. december 16. 13:00 óra

## **1. BEVEZETŐ**

### **1.1. A vaszkuláris endotélium barrier funkciója**

#### **1.1.1. Az endotél sejtek heterogenitása**

Az erek belső falát borító endotél sejtek egy félig-áteresztő gátat alkotnak, mely dinamikusan szabályozza a folyadék és makromolekulák mozgását a vér és az intersticiális tér között. Az érhálózat különböző részein heterogén endotél populációk találhatóak. A tüdő artéria endotél sejtek (makrovaszkuláris sejtek) fontos fiziológiai és pathofiziológiai szerepet játszanak az emberi szervezetben. Részt vesznek a vér homeosztázisban, de hozzájárulnak bizonyos pathológiás állapotokhoz is. A makrovaszkuláris endotél sejtek fizikai tulajdonságaikban sok hasonlóságot mutatnak a mikrovaszkuláris endotél sejtekkel. Ennek ellenére *in vivo* tüdő ödémás modellek vizsgálata alapján kimutatták, hogy az ödémás folyadék filtrációja többnyire a mikrovaszkuláris keringéshez köthető. Nagyrészt technikai korlátoknak és a mikrovaszkuláris sejtek izolálási nehézségeinek köszönhetően az endotél barrier funkcióval kapcsolatos megfigyelések többségét makrovaszkuláris sejtekben írták le.

#### **1.1.2. A tüdő endotél barrier klinikai és fiziológiás jelentősége**

Gyulladást keltő vagy mérgező anyagok direkt vagy indirekt sérüléseket okozhatnak a tüdőben, melyek pathofiziológiás tünetekhez vezetnek, mint például a súlyos tüdőgyulladás, akut tüdőelégelenség (ALI), vagy ennek még súlyosabb formája a heveny légzési elégtelenség szindróma (ARDS). Az ALI és az ARDS akut fázisában megnövekedett endotél permeabilitás figyelhető meg, aminek a következtében erőteljes és gyors fehérjében gazdag ödéma folyadék beáramlás történik a tüdő alveolusokba. Széles körben elfogadott tény, hogy az ezekre a klinikai tünetekre jellemző endotél barrier diszfunkció szorosan köthető az agonisták által kiváltott citoskeletális átrendeződéshez, mely a sejt-sejt kapcsolatok felbomlásához és paracelluláris rések kialakulásához vezet.

### **1.2. Az endotél permeabilitást szabályozó mechanizmusok**

#### **1.2.1. Az endotél permeabilitás különböző útvonalai**

Az endotél permeabilitás esetén beszélhetünk bazális és indukált permeabilitásról. Az első a mikrovaszkuláris endotél sejtek szintjén történik, míg az utóbbi gyulladással kapcsolható össze és makrovaszkuláris endotél sejtekre jellemző. Számos fizikai, gyulladással és bioaktív tényező megváltoztathatja az endotél sejtek barrier funkcióját, ezáltal rések kialakulásához, az erek megnövekedett áteresztő képességéhez és a szervek működésének a leállításához vezethet. Az endotél sejtek permeabilitása transz- vagy paracelluláris útvonalon valósul meg, de előfordulhat a kettő kombinációja is. A transzportfolyamatok többsége azonban paracelluláris úton megy végbe. Ezeket az

útvonalakat a citoskeletális és sejtkapcsoló elemek szabályozzák, melyek elengedhetetlen szerepet játszanak az endotél barrier épségének fenntartásában.

### **1.2.2. Permeabilitást fokozó anyagok**

A gyulladáshoz vezető folyamatok során az endotélium számos mechanikai változáson megy keresztül, melyeket agonisták (trombin, hisztamin,  $\text{TNF}\alpha$  vagy reaktív oxigén gyökök) által kiváltott stimulusok okoznak. A trombin egy szerin proteáz, melyet a sérült endotélium termel a vérben keringő protrombin hasításával. A trombin receptorához (PAR-1, PAR-2, PAR-3) való kötődését követően számos sejtválaszban vesz részt. Bizonyítottan egyik fontos tényezője az ALI és az ARDS kialakulásának.

### **1.2.3. A paracelluláris rések kialakulásának szabályozása az endotéliumban**

Az endotél barrier épségének fenntartása nagymértékben függ az aktin-miozin kontrakciós erők és a sejtadhéziós erők precíz egyensúlyától. Ez a két ellentétes erő szorosan köthető a citoskeletonhoz, mely magába foglalja az aktin mikrofilamentumokat, mikrotubulusokat és az intermedier filamentumokat. Az endotél sejtek kontrakciója és barrier funkciója nagymértékben függ a protein kinázok és a protein foszfatázok működésétől. Köztudott, hogy a sejtkapcsolatok illetve a citoskeletális és a citoskeletonhoz kapcsolódó fehérjék foszforilációs és defoszforilációs folyamatok által szabályozottak. Nyugalmi körülmények között a sejtekben egy vastag kortikális aktin figyelhető meg, mely helyet biztosít a szoros sejt-sejt és sejt-extracelluláris mátrix közötti kapcsolatok kialakulásának. Gyulladást keltő anyagok, mint például a trombin hatására a kontrakciós erők kerülnek előtérbe. A trombin megnöveli a sejten belüli kalcium szintet, és aktiválja a  $\text{Ca}^{2+}$ /kalmodulin függő miozin könnyű lánc kinázt (MLCK), mely foszforilálja a miozin könnyű láncot, ezáltal a sejt összehúzódásához vezet. Emellett a trombin képes aktiválni a GTPáz Rho jelátviteli útvonalat, ami szintén barrier diszfunkciót okoz.

### **1.3. Sejtkapcsolatok és az endotélium**

Az endotél sejtekben a leggyakrabban előforduló sejtkapcsoló struktúrák az adherens sejtkapcsolatok (AJ), melyek biztosítják a megfelelő kommunikációt az endotél sejtek között és ezáltal részt vesznek az endotél permeabilitás szabályozásában. A VE-cadherin a vaszkuláris endotélre jellemző transzmembrán fehérje, mely a szomszédos sejtek közötti kapcsolatok fenntartásáért felelős. A VE-cadherin intracelluláris részén köti a p120 catenin-t,  $\beta$ -catenin-t vagy a plakoglobint, melyek az  $\alpha$ -catenin fehérjén keresztül kapcsolatban vannak az aktin citoskeletonnal. A VE-cadherin szerepe elengedhetetlen a normál AJ komplex kialakulásában és az endotél barrier funkcióban.

A  $\beta$ -catenin kettős szerepet tölt be a sejtekben. Először az AJ-ok komponenseként fedezték fel a 80-as években. Később genetikai és embrionális kutatások igazolták a  $\beta$ -catenin részvételét a Wnt jelátviteli útvonalban. A plakoglobin jelentős szekvencia homológiát mutat a  $\beta$ -cateninrel (80%) és képes a klasszikus cadherineknél citoplazmatikus végeihez kötődni. Mind a  $\beta$ -cateninről, mind a plakoglobinról kimutatták, hogy képesek stabilizálni a VE-cadherin és a citoszkeleton kapcsolatát.

### **1.3.1. Az adherens sejtkapcsolatok reverzibilis foszforilációval történő szabályozása**

Az AJ sejtkapcsolatok dinamikus összerendeződése és szétesése nagymértékben függ a kapcsoló struktúrákat felépítő fehérjék reverzibilis foszforilációjától. Nemrég kimutatták, hogy az AJ regulációjában a tirozin oldalláncok foszforilációja mellett a szerin/treonin foszforiláció is jelentős szerepet tölt be és egyre növekvő számú bizonyíték igazolja, hogy ezen oldalláncok foszforilációja szabályozza a cadherin-catenin komplexek stabilitását. A  $\beta$ -catenin a Wnt jelátviteli útvonal részeként közvetlen kapcsolatban van a kazein kináz I (CKI) and GSK-3 $\beta$  Ser/Thr kinázokkal. Ezen enzimek foszforilálják a Ser45, Ser33/37 és Thr41 oldalláncokat, ami a fehérje ubikvitinálódásához és proteozómális lebomlásához vezet. A PKA enzimmről szintén kimutatták, hogy foszforilálja a  $\beta$ -catenint a Ser552 és Ser675 oldalláncokon, melyek a fehérje transzkripciós aktivitását növelik meg. Annak ellenére, hogy a foszforiláció jelentős szerepet tölt be ezeknek a fehérjéknek a szabályozásában, a folyamat megfordíthatóságát biztosító protein foszfatázok szerepe még nem tisztázott.

### **1.4. Reverzibilis fehérje foszforiláció**

A fehérjék reverzibilis foszforilációja fontos szerepet tölt be az élő sejtekben végbemenő jelátviteli útvonalakban és ezáltal számos biológiai folyamat szabályozásában vesz részt, mint például sejtciklus, apoptózis, növekedés, differenciáció. A fehérjék reverzibilis foszforilációja a protein kinázok és protein foszfatázok ellentétes irányú aktivitásának az eredménye. A protein kinázok katalizálják az ATP  $\gamma$ -foszfát csoportjának átvitelét hidroxil- csoportot tartalmazó aminosavakra (szerin, treonin, tirozin). Ezzel szemben a foszfatázok lehasítják a foszfát csoportokat a fehérjék foszfo-Ser-, Thr- vagy Tyr-oldalláncairól.

### **1.5. A protein foszfatázok csoportosítása**

A protein foszfatázoknak két csoportját azonosították az alapján, hogy milyen aminosav oldalláncokat képesek defoszforilálni. A Ser/Thr protein foszfatázok (PP) a foszfoszerin/foszfotreonin foszfoésztereket képesek hidrolizálni, míg a Tyr foszfatázok a foszfortirozin oldalláncokról távolítják el a foszfát csoportokat. A Tyr specifikus foszfatázokat

további két csoportra oszthatjuk. Ezek a foszfortirozin foszfatázok (PTP) és kettős specificitású foszfatázok (DS-PTP), melyek a fehérjék Ser/Thr és Tyr oldalláncairól is egyaránt képesek a foszfátot lehasítani. Kezdetben a szubsztrát-specificitás és a hőstabil inhibitor fehérjékkel szembeni érzékenység alapján a Ser/Thr specifikus foszfatázokat 1-es és 2-es típusú alcsaládokba sorolták. A 2-es típusú foszfatázok fémoon függőségük alapján tovább tagolhatóak. A PP2A nem igényel fémiot a működéséhez, míg a PP2B (későbbi  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin függő foszfatáz vagy calcineurin) működéséhez  $\text{Ca}^{2+}$  szükséges. A PP2C-ről kimutatták, hogy  $\text{Mg}^{2+}$  függő és későbbi szekvencia analízisek az mutatták, hogy egy külön családot, a fémoon függő foszfatázok (PPM) családját képezi. A legújabb besorolás szerint a Ser/Thr specifikus foszfatázok szerkezet, szekvencia és katalitikus mechanizmus alapján három csoportba sorolhatóak. Ezek a foszfoprotein foszfatázok (PPP), fémoon függő foszfatázok (PPM) és a FCP/SCP aszpartát foszfatázok. A PPP család tagjai: PP1, PP2A, PP2B (calcineurin) és az új típusú foszfatázok, PP4, PP5, PP6 és PP7. A PP1 és PP2A a leggyakrabban előforduló foszfatázok, amelyek számos sejtben zajló jelátviteli folyamatot szabályoznak.

### **1.6. A protein foszfatáz 1 jellemzése**

A protein foszfatáz 1 jelentős mértékben expresszálódik az eukarióta sejtekben, és kiemelkedő szerepet tölt be a sejtekben végbemenő folyamatok nagy többségében, mint például a sejtosztódásban, apoptózisban, metabolizmusban és a citoszkeleton szabályozásában. Ez az enzim nagymértékben (~70 %) konzerválódott az emlősökben az evolúció során. A PP1 egy regulátor és egy katalitikus alegységből áll, az utóbbinak három izoformáját különböztetjük meg: PP1 $\alpha$ , PP1 $\beta/\delta$  és PP1 $\gamma$ . A PP1 különböző kölcsönható partnerei, illetve regulátor alegységei szabályozzák az enzim aktivitását és szubsztrátspecificitását. Mostanáig több mint 100 lehetséges PP1 regulátor alegységet azonosítottak, ami összhangban van a PP1 által szabályozott nagyszámú biológiai funkcióval. Ezek a PP1 kötő alegységek egyetlen közös szerkezeti tulajdonsága a rövid konzervált PP1 kötő motívum (RVxF/W).

#### **1.6.1. A miozin foszfatáz (MP)**

Az endotél sejtkontrakció meghatározó lépése a 20 kDa méretű miozin könnyű lánc Ser19 és Thr18 aminosav oldalláncon történő foszforilációja, mely szorosan kötődik az aktin citoszkeleton újrendeződéséhez. A miozin könnyű lánc foszforilációs szintjének szabályozásában résztvevő két kulcsfontosságú enzim a miozin könnyű lánc kináz és a miozin foszfatáz. A miozin foszfatáz az 1-es típusú foszfatázokhoz sorolható, egy katalitikus (PP1 C $\delta$ ) és két regulátor alegységből épül fel, a nagyobb, 110-130 kDa-os miozinhoz kötődő

regulátor alegységből (MYPT1), valamint egy kisebb, 20 kDa-os regulátor alegységből (M20), melynek a biológiai funkciója jelenleg még nem tisztázott. Számos kutatócsoport igazolta, hogy a PP1 közvetlenül szabályozza az akto-miozin kontrakciót, ezáltal az endotél barrier funkciót.

### **1.6.2. A miozin foszfatáz szabályozása**

A miozin foszfatáz működése az enzim aktiválásával vagy gátlásával szabályozott folyamat. Az aktiválási lépések nem teljes egészében ismertek, míg a gátló mechanizmusok jól jellemzettek. Az egyik legfontosabb szabályzó mechanizmus a MYPT1 foszforilációja. Emellett sokféle gátló fehérje képes szabályozni a miozin foszfatázt, melyek biztosítják a MP széleskörű regulációját. Az egyik jelentős MP gátló fehérje, a CPI-17 nem csak a PP1 katalitikus alegységének blokkolására képes, hanem gátolja a MYPT1 regulátor alegységet tartalmazó holoenzimet is anélkül, hogy az enzim disszociációjához vezetne. Ezt a 147 aminosavból álló szolubilis globuláris fehérjét simaizom szövetben mutatták ki először, majd vérlemezkékben és az agyban is megtalálták. Ismert, hogy a CPI-17 jelentősen konzerválódott fehérje és gátló hatása foszforilációval szabályozott. PKC hatására a Thr38-as oldalláncon foszforilálódik, ami a CPI-17 miozin foszfatázzal szembeni gátló hatását 1000-szeresére növeli. Korábbi kísérletekben kimutatták, hogy a CPI-17 expresszálódik humán tüdő mikrovaskuláris endotél sejtekben (HLMVEC), továbbá igazolták részvételét az endotél citoszkeleton szabályozásában, és a barrier funkcióban is.

## **1.7. A protein foszfatáz 2A**

### **1.7.1. A PP2A szerkezeti felépítése**

A PP2A az élő sejtekben előfordulhat heterodimer vagy heterotrimer holoenzim formában is. A dimer enzim (PP2A<sub>D</sub>) egy 65 kDa-os szerkezeti alegységből (A alegység vagy PR65) és egy 36 kDa-os katalitikus alegységből (PP2A C) épül fel. Ez a heterodimer forma képes kötödni egy harmadik variábilis regulátor fehérjével, a B alegységgel, így létrehozva a heterotrimer holoenzimet.

A katalitikus alegység két különböző izoformával rendelkezik, ezek a C $\alpha$  és a C $\beta$ , melyek 97 %-ban homológ fehérjék. A PP2A szerkezeti alegységének izoformáit (A $\alpha$  és A $\beta$ ) különböző gének kódolják. A holoenzimek többsége az A $\alpha$  izoformát tartalmazza, az A $\beta$  izoforma előfordulása kevésbé gyakori. A két különböző izoforma 87 % szekvencia homológiát mutat. A regulátor B alegység négy, egymástól szerkezetiileg eltérő fehérje családját szintén különböző gének kódolják. A fehérjék nagyszámú splice variánsa biztosítja az enzim diverzitását. A B alegységek esetén számos nomenklatura és izoforma létezik. A B alegység (PR55 vagy B55) négy izoformával rendelkezik:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  vagy  $\delta$ ; a B' alegység

(PR61, B56, vagy RTS1) izoformái:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma^{1-3}$ ,  $\delta^{1-3}$  és  $\epsilon$ ; a B'' alegység (PR48/PR72/PR130) szintén több izoformával rendelkezik:  $\alpha^{1,2}$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ . A negyedik alcsalád a B''' vagy más néven PR93/PR110. Biokémiai és genetikai vizsgálatok bizonyították, hogy a regulátor B alegység határozza meg az enzim szubsztrátspecificitását és az enzim sejten belüli lokalizációját. Az A alegység egy elnyújtott patkó alakú struktúra, mely meghatározott felszínén köti a C illetve B alegységeket. Továbbá a heterotrimer PP2A kristályszerkezete igazolta a B és a C alegység kölcsönhatását is. A B alegységek mindegyikéről kimutatták, hogy közvetlen kapcsolatban vannak a PP2A dimerrel, kivéve a B''' alcsaládot. Becslések alapján körülbelül 75 különböző holoenzimet alkothatnak az A-B-C alegységek, habár a valóban létező komplexek pontos száma nem ismert.

### **1.7.2. A PP2A szabályozása**

#### **A katalitikus alegység**

A PP2A katalitikus alegysége egy nagyméretű konzervált domén. Hasonlóan a PP1 katalitikus alegységéhez számos regulátor alegységgel képes asszociálódni, melyek különböző sejten belüli célfehérjékhez irányítják az enzimet. A PP2A C alegység reverzibilis karboxi-metilációval és demetilációval szabályozható a C terminális Leu309 aminosav oldalláncán, melyet a PP2A metiltranszferáz (PMT) és metilészteráz (PME-1) enzimek katalizálnak. A reverzibilis karboxi-metiláció egy igen konzervált mechanizmus az enzim működésének szabályozásában, ennek ellenére fiziológiai szerepéről az adatok ellentmondásosak. A karboxi-metiláció mellett a PP2A aktivitása tirozin kinázok, epidermális növekedési faktor és inzulin receptorok által is módosítható a PP2A gátlásán keresztül. Különböző toxinok, mint például az okadánsav, mikrocisztin és a calyculin A szintén a PP2A gátlását okozzák. A fosztricin egy foszfát észter antibiotikum, melyről szintén kimutatták, hogy specifikusan gátolja a PP2A aktivitását.

#### **A szerkezeti alegység**

A PR65 vagy A alegység alkotja az holoenzim szerkezeti vázát, amely szorosan kötődik a katalitikus alegységgel, kötőhelyet kialakítva a B alegységnek. Az A alegység aminosav szekvenciájában 15 darab 39 aminosavból álló ismétlődő HEAT motívumot azonosítottak. A HEAT ismétlődések erősen konzervált szekvenciák, melyek 2-2  $\alpha$ -hélixet tartalmaznak, és egy interhelikális hurkot a hélixek között. Az A alegységnek két különböző gén által kódolt izoformája van. Az  $A\alpha$  and  $A\beta$  nagymértékű szekvenciaomológiát mutat, habár a  $\beta$  egyedi szerkezete miatt nem képes helyettesíteni az  $\alpha$  izoformát PR65 $\alpha$  knockout egerekben.



## **A regulátor alegység**

A variábilis B szabályozó alegység négy különböző alcsaláddal rendelkezik, melyek a B, B', B'' és a B''''. Ezek a fehérjék nem mutatnak sem szerkezeti, sem funkcióbeli hasonlóságot. Az alcsaládok változatosságát tovább növeli a nagyszámú splice variánsok megléte. AB $\alpha$ C holoenzim a leggyakrabban előforduló PP2A forma, és a B $\alpha$  (B55) a PP2A legjelentősebb regulátor alegysége. Számos publikáció említi a B $\alpha$  alegység szerepét különböző sejtfolymatokban eltérő szubcelluláris környezetben. Kimutatták például a B $\alpha$  asszociálóját mikrotubulusokkal, neurofilamentumokkal, intermedier filamentumokkal, továbbá citoplazmatikus, membrán és nukleáris fehérjékkel. A B regulátor fehérjecsald erősen konzervált, négy-hét WD40 ismétlődést tartalmaz. Ezek körülbelül 40 aminosavból épülnek fel és tipikusan triptofán-aszpartát (WD) aminosavakra végződnek. Ezen ismétlődések felelősek a fehérje-fehérje kölcsönhatások kialakításáért. A B55 $\alpha$  alegység erőteljesen kötődik az A alegységhez és lazább kötődést mutat a C alegységgel.

### **1.7.3. A PP2A biológiai funkciója**

PP2A bizonyítottan fontos szerepet játszik a sejtciklus, a sejttranszformáció, a növekedés illetve az apoptózis szabályozásában. Néhány irodalmi adat említést tesz a PP2A tumorszuppresszor hatásáról is. A PP2A jelentős gátló hatást gyakorol a Wnt/ $\beta$ -catenin jelátviteli útvonalra, ezáltal részt vesz a fejlődés és a tumorképződés szabályozásában. Irodalmi adatok alapján tudjuk, hogy a PP2A B $\alpha$  közvetlenül kölcsönhat a  $\beta$ -cateninnel és regulálja annak defoszforilációját a Wnt-jelátvitel során vastagbél daganatos sejtekben. Továbbá kimutatták a  $\beta$ -catenin kötődését az Axin, GSK3- $\beta$  and APC fehérjékkel. Az utóbbiról bakteriális két hibrid szűréssel igazolták, hogy képes asszociálódni a PR61 $\delta$  regulátor alegységgel, ezáltal a  $\beta$ -catenint közvetlenül stabilizálni. Továbbá azt találták, hogy a PP2A komplexet képez az E-cadherin and  $\beta$ -catenin fehérjékkel a sejtmembránban, hozzájárulva a sejtek közötti kapcsolatok stabilizálásához.

### **1.7.4. PP2A és a citoskeleton**

Az endotél sejtek citoskeletonja meghatározza a sejtek alakját. Több kísérleti eredmény utal arra, hogy a citoskeletonális és a citoskeletonhoz asszociálódott fehérjék reverzibilis foszforilációja kiemelkedő fontosságú az endotél barrier funkció szabályozásában. Ezen fehérjék defoszforilációjában a PP1 közvetlen szerepe bizonyított, míg a PP2A aktivitás szerepe kevésbé tanulmányozott folyamat. A citoskeleton elemeinek szabályozásában fontosak a különböző aktin-kötő fehérjék, mint például a plektin, spektrin, gelzolin, kaldesmon, kofilin vagy a HSP27, melyek az aktin polimerizációban/depolymerizációban fontosak. Ezek közül a fehérjék közül a kofilinról, a HSP27-ről és a kaldezmonról

bebizonyosodott, hogy a PP2A szabályozza a defoszforilációjukat. További irodalmi adat számolt be a CPI-17 PP2A általi defoszforilációjáról és inaktivációjáról simaizom sejtekben. Egyre növekvő számú bizonyíték utal a PP2A aktivitás fontosságára a mikrotubulusok stabilizálásában. Az AB $\alpha$ C holoenzimről kimutatták, hogy az agyi tau fehérje defoszforilációjáért is felelős. Ezt alátámasztja munkacsoportunk korábbi eredménye, miszerint tüdő artéria endotél sejtek mikrotubulusokban gazdag frakciójában jelentős mennyiségű PP2A enzim kötődését sikerült kimutatni a HSP27 és tau fehérjékkel. A nokodazol egy endotél barrier diszfunkciót okozó ágens, mely paracelluláris rések kialakulásához és permeabilitás növekedéséhez vezet. A PP2A specifikus gátlása tovább súlyosbította a nokodazol-indukálta endotél barrier diszfunkciót, ezzel utalva a PP2A szerepére a mikrotubulusok által szabályozott endotél barrier funkcióban. Ezen felül a katalitikus és regulátor alegységek overexpressziója jelentős mértékben csökkentette a trombin vagy nokodazol indukálta endotél barrier funkció károsodást.

## **2. CÉLKITŰZÉSEK**

Korábbi eredményeink a PP2A katalitikus és regulátor alegységének szabályozó szerepét bizonyították az endotél barrier funkció megőrzésében. Azonban a B regulátor alegység szerepéről igen kevés információ áll rendelkezésre. Az irodalmi adatok alapján ismert, hogy az adherens sejtkapcsolatok stabilizálásában a Ser/Thr foszforiláció kulcsszerepet játszik. A folyamatban résztvevő kinázokat már sikeresen jellemezték, ennek ellenére a foszfatázok szerepe még tisztázatlan. A foszforilált CPI-17 a miozin foszfatáz potenciális gátló fehérjéje. Meggátolja a miozin könnyű lánc defoszforilációját, ezáltal a sejtek relaxációját. A PP2A defoszforilálhatja a CPI-17 fehérjét, így közvetve részt vehet a MP aktivációjában és az endotél barrier funkció megőrzésében. A CPI-17 és a citoszkeleton közötti kapcsolat azonban még feltáratlan.

Ezen irodalmi adatok alapján a következő célokat fogalmaztuk meg munkánk során:

- PP2A B $\alpha$  szerepének tisztázása az endotél sejtek barrier funkciójának szabályozásában
- Új PP2A szubsztrátok/célfehérjék azonosítása endotél sejtekben.
- A CPI-17 és az endotél citoszkeleton mechanikai kapcsolatának vizsgálata
- CPI-17 kölcsönható fehérjék azonosítása human endotéliumban

### **3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK**

#### ***Sejtkultúra és kezelések***

A marha tüdő artéria endotél sejteket (BPAEC) 10% (v/v) borjú szérumot tartalmazó MEM médiumban, a humán tüdő artéria endotél sejteket (HPAEC) és humán tüdő mikrovaszkuláris sejteket 5 % FBS-t tartalmazó EBM-2 médiumban, a humán embrionális vese (HEK) sejteket 10 % FBS-t tartalmazó DMEM médiumban tenyésztettük. A kezelések előtt a sejteket 80-90 %-os konfluenciáig növesztettük. Az alkalmazott kezelések a következők voltak: 50 nM/0.5 nM trombin 30 perc, 5 nM okadánsav 90 perc, 100 nM fostriecin 90 perc és 0,1  $\mu$ M PMA 30 perc.

#### ***Immunfluoreszcencia***

A makro- és mikrovaszkuláris endotél sejteket 0,2 %-os zselatinnal bevont üveg fedőlemezekre tenyésztettük, PBS-sel mostuk és 3.7 % paraformaldehidet tartalmazó TBS-ben fixáltuk, majd TBS-sel mostuk. 5 percig permeabilizáltuk (0.2 % Triton-X 100/TBST), majd a sejteket 1 órán keresztül blokkoltuk 2 % BSA/TBST-vel. Ezután inkubáltuk a sejteket elsődleges antitestekkel, majd ezután a másodlagos antitestekkel 1 órán keresztül, szobahőmérsékleten. Az aktin mikrofilamentumokat Texas-Red Phalloidinnel jelöltük szintén 1 órán át, szobahőmérsékleten. TBS mosást követően a fedőlemezeket ProLong Gold Antifade médiummal tárgylemezekre rögzítettük.

#### ***Immunfluoreszcens mikroszkópia***

Az immunfluoreszcencia után a tárgylemezre rögzített sejteket egy fázis kontraszt, digitális kamerához csatlakoztatott Nikon Eclipse TE2000 mikroszkóppal vagy Zeiss Axiolab mikroszkóppal 63x vizsgáltunk. A konfokális felvételeket Olympus Fluoview FV1000 konfokális mikroszkóppal, UPLSAPO 60x 1.35 NA immerziós olajos objektívvel vizsgáltuk, és a képeket FV10-ASW v1.5 szoftverrel analizáltuk. A képek szerkesztéséhez PhotoShopCS5 programot használtunk.

#### ***Az aktin stresszkábelek kvantitatív elemzése***

Texas Red-falloidin jelölt endotél sejteket trombinnal kezeltünk, vagy PP2A B $\alpha$  siRNS-sel transzfektáltunk. A sejteket Zeiss Axiolab mikroszkóppal vizsgáltuk 63x immerziós olajos objektívvel. A 8 bit-es képeket Image J 1.46R programmal analizáltuk. Az aktin stresszkábelek mennyiségének meghatározásához kijelöltük az aktin filamentumokat, majd meghatároztuk a sejtekben található stresszkábelek és a teljes sejtfelszín arányát. Legalább 30 mikroszkópos területet analizáltunk minden egyes kezelés esetében. A kapott értékeket GraphPad Prism 5 szoftver segítségével elemeztük ki.

### ***Expressziós plazmidok és transzfekciós protokoll***

Kísérleteink során HSP27 pcDNA 3.1 V5/His, inhibitor 2 pcDNA 3.1 V5/His, CPI-17 pcDNA 3.1 myc/His és PP2A B $\alpha$  pcDNA 3.1 V5/His konstruktokat használtunk. A HLMV (CPI-17 expresszió) sejteket 80-90% konfluenciáig növesztettük. Ezután a sejteket a megfelelő mennyiségű DNS-t és X-tremeGENE HP transzfekciós reagenst tartalmazó OPTI-MEM médiumban inkubáltuk 6 órán keresztül CO<sub>2</sub> inkubátorban 37°C-on. A sejteket további 24-48 óráig tenyésztettük, majd immunprecipitációhoz használtuk fel. A HEK (PP2A B $\alpha$ , inhibitor-2, HSP27 expresszió) sejteket szintén 80-90% konfluencia elérésekor 10  $\mu$ g DNS: 20  $\mu$ l PEI arányt használva transzfectáltuk. 6 óra elteltével a sejteket további 24-48 óráig inkubáltuk, majd pull-down kísérlethez használtuk fel.

### ***In vitro Pull-Down Assay***

HEK sejteket a transzfekció után PBS-sel mostuk, majd feltártuk és centrifugáltuk (8200 g, 4°C). A felülúszót anti-V5-gyantához adtuk, majd az rekombináns B $\alpha$ , HSP27 és inhibitor-2 fehérjéket 4 órán keresztül 4°C-on kötöttük. A gyantát ismét centrifugáltuk, majd a mosási lépés után BPAE sejtlizátumokat vittünk fel a gyantára, és további 4 órán át inkubáltuk 4°C-on. A centrifugálási (8200 g, 30 sec) és mosási lépések után a mintákat 2x SDS-mintapufferrel főztük, majd Western blottal analizáltuk.

### ***Immunprecipitáció***

A CPI-17-t expresszáló HLMV sejteket 48 órával a transzfekció után PBS-sel mostuk, majd lízis pufferben feltártuk. Centrifugálás után a sejtlizátumokat Protein G-Sepharose-zal előtisztítottuk 3 órán át, 4 °C-on történő kevertetéssel, majd centrifugáltuk. Az így előtisztított felülúszót EZ-view Red Anti c-myc Affinity agarózzal inkubáltuk állandó kevertetés mellett 4°C egy éjszakán át. Mosást követően a gyantát centrifugálással gyűjtöttük össze, majd SDS-mintapufferrel főztük 5 percig. Az így kapott mintákat Western blottal analizáltuk.

### ***A PP2A B $\alpha$ csendesítése endotél sejtekben***

Az endogén PP2A B $\alpha$  szintjének lecsökkentéséhez endotél sejteket (HPAEC, BPAEC and HLMVEC) transzfectáltunk SMARTselection-designed PP2A B $\alpha$ -specifikus siRNS duplex oligonukleotidokkal, melyek a homológ mRNS szekvencia specifikus degradációját okozzák. Nemspecifikus siRNS-oligonukleotidokat (non-siRNS) használtunk kontrollként. A sejteket 70-80%-os konfluencia elérése után DharmaFECTI transzfekciós reagenssel transzfectáltuk 50 nM végkoncentrációjú siRNS-sel és a 48 órás poszttranszfekciós idő elteltével további kísérletekben használtuk fel.

### ***Reverz transzkriptáz (RT) reakció és polimeráz láncreakció (PCR)***

Az endotél sejtekből totál RNS-t izoláltunk, majd a reverz transzkriptáz reakció után az átíródott RNS-t PCR reakcióban használtuk fel templátként. A teljes hosszúságú PP2A B $\alpha$  pCR2.1-TOPO vectorból szubklónoztuk pcDNA3.1/V5-His konstrukta *EcoRI* hasítóhely segítségével.

### ***Transzendotél elektromos ellenállás (TER) mérés***

A sejtek barrier funkciójának tanulmányozására a nagy érzékenyséű biofizikai assay-t, ECIS (electrical cell-substrate impedance sensing system) mérési módszert használtunk. HPAE és HLMVE sejteket arany elektróddal ( $10^{-4}$  cm<sup>2</sup>) ellátott speciális szövettenyésztő edényekben tenyésztettük és elektrolitként a tenyésztő médiumot használtuk. A sejteket PP2A B $\alpha$  specifikus siRNS-sel transzfektáltuk. 72 órás inkubáció után transzendotél ellenállást mértünk trombin jelenlétében.

### ***SDS-PAGE, Western-blot***

A fehérjék molekulatömeg szerinti elválasztását SDS-poliakrilamid gélelektrofórezissel (SDS-PAGE) végeztük. Az elektroforézist követően az elválasztott fehérjéket nitrocellulóz vagy PVDF membránra transzferáltuk. A nem-specifikus kötőhelyeket 5 %-os tejporban 1 óráig blokkoltuk, majd a primer antitesttel, utána pedig a szekunder, peroxidázzal jelzett antitesttel inkubáltuk a membránt. A kötődött antitesteket kemilumineszcenciás módszerrel detektáltuk ECL reagenssel és az eredményt röntgenfilmen rögzítettük.

### ***Adatok elemzése, kiértékelése***

AxioVision LE64, Image J 1.46R és Photoshop CS6 programokat használtunk az immunfluoreszcens képek kiértékeléséhez. Az ECIS eredményeket Excel és GraphpadPrism szoftver (Microsoft Corporation) segítségével analizáltuk. A Western blot eredmények értékelésekor a fehérjesávok intenzitását ImageJ 1.42q szoftver segítségével denzitometrálással határoztuk meg. Az adatok legalább háromszor megismételt független eredmények átlaga és szórása alapján van feltüntetve. Két különböző csoport összehasonlítása esetén Student-t tesztet alkalmaztunk, míg az ECIS eredmények kiértékelésekor a különböző csoportok összehasonlításakor ANOVA tesztet használtunk. A különböző számú ismétléseket és a P értékeket a szövegben feltüntettük. A 0,05 alatti P értékeket tekintettük szignifikánsnak.

## 4. EREDMÉNYEK

### 4.1. A PP2A szerepe az endotél citoszkeleton szabályozásában

HLMVE és BPAE sejt monolayereket specifikus PP2A inhibitorokkal, okadánsavval vagy fosztriccinnel kezeltünk. A PP2A gátlása aktin stresszfilamentumok kialakulásához és a perifériás mikrotubulusok részleges feloldódásához vezetett. A PP2A inhibitorral kezelt sejtek esetén a Texas Red-falloidin festés egyértelműen mutatta az aktin citoszkeleton szerkezetének megváltozását illetve a kortikális F-aktin átrendeződését, ami a sejtek kontrakciós állapotára utalt. Emellett az okadánsav és fosztriein jelentős hatását figyeltük meg a mikrotubulusokon is, a kezelések a mikrotubulusok részleges disszociációjához vezettek.

Megvizsgáltuk az egyik leggyakrabban előforduló PP2A alegység, a B $\alpha$  regulátor fehérje csendesítésének aktin citoszkeletonra gyakorolt hatását. Az endogén PP2A B $\alpha$  szintjének lecsökkentéséhez siRNS technikát alkalmaztunk, a csendesítés hatékonyságát mRNS és fehérje szinten RT-PCR és Western blot segítségével igazoltuk. Az eredményeink statisztikai elemzése 70-80% csökkenést igazolt mindkét módszerrel az endogén PP2A B $\alpha$  szintjében a kontroll siRNS kezelt sejtekhez képest. A B alegység csendesítését emellett PP2A B $\alpha$  és kontroll siRNS transzfektált endotél sejtekben immunfluoreszcens kísérlettel is bizonyítottuk.

A továbbiakban megvizsgáltuk a PP2A B $\alpha$  csendesítés hatását a citoszkeleton szerveződésének szabályozásában. Korábbi közölt eredményeink szerint a PP2A A és C alegységének overexpressziója jelentősen mérsékelte a trombin és nokodazol által indukált endotél barrier diszfunkciót. PP2A B $\alpha$  csendesített és kontroll siRNS transzfektált sejteket trombinnal kezeltünk, majd vizsgáltuk a trombin kezelés a PP2A B $\alpha$  csendesítés hatását az aktin citoszkeletonra. A hatás elsősorban a stresszkábelek kialakulásában mutatkozott meg, tovább erősítette a kontroll siRNS transzfektált sejtekhez képest. Elvégeztük a sejtekben kialakuló aktin stresszkábelek kvantitatív elemzését is Image J szoftver segítségével. Az analízis megerősítette a fokozott aktin stressz filamentumok képződését a PP2A B $\alpha$  depletált sejtekben valamint annak további erősödését trombin hatására. Összességében elmondható, hogy jelenlegi eredményeink alátámasztják a munkacsoportunk által korábban megfigyelteket, miszerint a PP2A jelentős szerepet játszik az endotél citoszkeleton szerveződésének szabályozásában, továbbá kimutattuk, hogy a B $\alpha$  regulátor alegység, feltehetően a PP2A szabályozása révén szerepet játszik a mikrofilamentumok regulációjában.

## **4.2. PP2A B $\alpha$ depléción jelentősen hozzájárul a trombin indukálta endotél barrier diszfunkció kialakulásához**

Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy trombin kezelés a transzendotél ellenállás jelentős csökkentését és ezzel párhuzamosan a barrier funkció sérülését okozta konfluens humán tüdő artéria endotél monolayeren. Munkacsoportunk által végzett korábbi vizsgálatok a PP2A aktivitás védő szerepét igazolták a barrier diszfunkciót kiváltó trombin és nokodazol hatásával szemben makrovaszkuláris endotél sejteken. Annak érdekében, hogy a B $\alpha$  regulátor alegység szerepét közvetlenül vizsgálni tudjuk, ECIS kísérletekkel vizsgáltuk a transzendotél ellenállást PP2A B $\alpha$  csendesített és kontroll siRNS transzfektált HPAE és HLMVE sejteken. Eredményeink szerint a PP2A B $\alpha$  csendesítés önmagában is csökkentette a TER-t a HPAE sejtekben, viszont a mikrovaszkuláris endotél sejtekben nem tapasztaltunk ilyen változást. A trombin kezelés megnövelte a permeabilitást mindkét sejtípus esetében, továbbá a PP2A B $\alpha$  hiánya jelentős mértékben erősítette a trombin okozta TER csökkenést, és késleltette vagy teljesen megszüntette a transzendotél ellenállás normál értékre történő visszaállását. Eredményeink igazolják a PP2A B $\alpha$  endotél barrier funkcióban betöltött védő szerepét az trombin-indukálta EC barrier csökkenéssel szemben.

## **4.3. PP2A B $\alpha$ és az adherens sejtkapcsolatok (AJ)**

A PP2A B $\alpha$  alegység szerepének további tisztázása érdekében immunfluoreszcens festést végeztünk a B alegység sejten belüli lokalizációjának azonosítására. A konfokális képek megerősítették, hogy a PP2A B nagy része a citoplazmában található, azonban a B alegység kortikális aktinnal történő kolokalizációja szintén megfigyelhető volt, ami a PP2A adherens sejtkapcsolatok szabályozásában betöltött lehetséges szerepére enged következtetni. Az endotél sejtkapcsolatok összerendeződése foszforiláció és defoszforiláció által szabályozott és szorosan kapcsolódik az endotél barrier funkcióhoz. Az adherens sejtkapcsoló fehérjék foszforilációjában részt vevő kinázokat már azonosították illetve az irodalmi adatok alapján tudjuk, hogy a  $\beta$ -catenin Ser/Thr foszforilációja stabilizálja a VE-cadherin- $\beta$ -catenin komplexet. Ennek ellenére a Ser/Thr foszfatázok szerepe még nem tisztázott. A PP2A AJ szabályozásában betöltött közvetlen szerepének vizsgálata érdekében pull down kísérletet végeztünk. Specifikus kölcsönhatást mutattunk ki a B $\alpha$  alegység és az adherens sejtkapcsoló fehérjék, a  $\beta$ -catenin, a VE-cadherin és a Ser552 oldalláncon foszforilált  $\beta$ -catenin fehérjék között, ami egyúttal az adherens kapcsoló fehérjék és a PP2A kapcsolatára is utal.

#### **4.4. PP2A B $\alpha$ szabályozza a $\beta$ -catenin defoszforilációját és az adherens sejtkapcsolatok összeépülését**

A PP2A sejtkapcsoló komplexek kialakulásában és stabilizálásában betöltött szerepének pontos megismerése érdekében okadánsavval és fosztriccinnel kezeltünk mikro-, és makrovaszkuláris endotél sejteket. A PP2A gátlók hatására a  $\beta$ -catenin megnövekedett foszforilációját figyeltük meg a Ser552 oldalláncon Western blot analízis során. A  $\beta$ -catenin, VE-cadherin és foszfo- $\beta$ -catenin immunfluoreszcens festése az adherens sejtkapcsolatok szétesését mutatta a PP2A gátlószerekkel kezelt sejteken. Ugyanakkor a  $\beta$ -catenin festődésének csökkenését tapasztaltuk az okadánsav kezelt sejtek membránjában, de a  $\beta$ -catenin összmenyisége nem változott, ami a fehérje sejten belüli átrendeződésére és nem lebomlására utal. Továbbá a foszfo- $\beta$ -catenin (Ser552) transzlokációját is megfigyeltük a sejtmembránból a citoplazmába a PP2A gátlását követően.

Eredményeink szerint a PP2A B $\alpha$  és az AJ fehérjék kölcsönhatnak, a PP2A gátlása kedvezőtlenül befolyásolja az adherens kapcsolatok kiépülését, valamint a PP2A aktivitásának hiánya a  $\beta$ -catenin foszforilációjának növekedését eredményezte. Megvizsgáltuk a PP2A B $\alpha$  specifikus depléciójának hatását is az adherens sejtkapcsoló fehérjékre, hogy lássuk, a sejtkapcsolatok szabályozásában valóban részt vesz-e ez a regulátor alegység. PP2A B $\alpha$  csendesített és kontroll siRNS transzfektált sejtekkel Western blot kísérletet végeztünk. Hasonlóan az okadánsav és fosztriccinnel kezeléshez, a B $\alpha$  regulátor alegység csendesítése jelentősen megemelte a  $\beta$ -catenin foszforilációs szintjét a Ser552-es oldalláncon. Továbbá megfigyeltük, hogy a B $\alpha$  fehérje szintje fordítottan arányos a foszfo- $\beta$ -catenin S552 szintjével. PP2A B $\alpha$  csendesített és kontroll siRNS transzfektált endotél monolayereket specifikus  $\beta$ -catenin és foszfo- $\beta$ -catenin Ser552 elleni antitestekkel jelöltünk immunfluoreszcens kísérletben. Azt találtuk, hogy a PP2A B $\alpha$  depléciója a  $\beta$ -catenin sejtmembránból a citoplazmába történő transzlokációjához és az adherens sejtkapcsolatok széteséséhez vezetett. A foszfo- $\beta$ -catenin Ser552 majdnem teljes mennyisége a citoplazmában lokalizálódott, míg a sejtmembránban jelentősen lecsökkent a mennyisége a PP2A B $\alpha$  csendesített sejtekben. Eredményeink azt sugallják, hogy a PP2A B $\alpha$  egy szükséges faktor az adherens sejtkapcsolatok stabilitásának szabályozásában és összhangban vannak a fent leírt TER mérések adataival is.

Összességében elmondható, hogy a PP2A B $\alpha$  regulátor alegységgel alkotott holoenzim formája az általunk vizsgált tüdő mikro- és makrovaszkuláris sejtekben



szabályozza azok citoszkeleton szerkezetét és adherens sejtkapcsolatait ezáltal befolyásolja az endotél permeabilitást és barrier funkciót.

#### **4.5. A PP2A egyik szubsztrátja, a CPI-17 szerepe az endotél barrier funkció szabályozásában**

##### ***Lehetséges CPI-17 kölcsönható partnerek azonosítása a humán endotéliumban***

Irodalmi adatok alapján ismert, hogy a CPI-17 a miozin foszfatáz (MP) specifikus inhibitora, melynek szerepe van az endotél citoszkeleton és barrier funkció szabályozásában. CPI-17 PKC által történő foszforilációja a Thr38-as aminosav oldalláncon 1000-szeresére növeli a fehérje gátló hatását a MP enzimmel szemben. Ismert, hogy a PP2A szerepet játszik a MP aktivációjában a CPI-17 defoszforilációja/inaktivációja révén, ezáltal képes az endotél sejt kontrakciót és az endotél permeabilitás növekedést visszafordítani. A CPI-17 expresszióját már korábban kimutatták humán tüdő mikrovaszkuláris endotél sejtekben illetve igazolták szerepét a citoszkeleton szabályozásában és az endotél barrier funkcióban. Ennek ellenére igen keveset tudunk a CPI-17 és a citoszkeleton vagy a citoszkeletonhoz kötődő fehérjék kapcsolatáról. Lehetséges CPI-17 kölcsönható fehérjéket azonosítottunk bakteriális két hibrid expresszióval humán tüdő endotéliumban. Humán cDNS könyvtár szűrése során 14 lehetséges CPI-17 kötő-fehérjét sikerült azonosítani. Ezek közül öt fehérjéről, a plektin 1-es izoformája, az alpha II spektrin, az OK/SW-CL.16, a gelzolin a izoformája és a sejtkapcsoló plakoglobin fehérje, ismert volt, hogy szerepet játszanak a citoszkeleton organizációjában és a sejtkapcsolatok kialakításában. HLMVE sejteket CPI-17 pcDNA myc/His konstrukttal transzfektáltunk, majd az overexpresszált fehérjét immunprecipitáltuk c-myc antitesttel. Az ezt követő Western blot kísérletekben c-myc antitestet használtunk, hogy bizonyítsuk az IP sikerességét, illetve specifikus antitesteket alkalmaztunk a plektin, spektrin, gelzolin és a plakoglobin fehérjék ellen, hogy azonosítsuk a bakteriális két hibrid expressziós szűréssel kapott lehetséges CPI-17 kölcsönható partnereket. A fennmaradó kilenc fehérjét nem ellenőriztük IP-vel, mivel ezek igen kis valószínűséggel vesznek részt az endotél citoszkeleton és barrier funkció szabályozásában. Kísérleteink során sikeresen igazoltuk a plakoglobin és az overexpresszált CPI-17 közötti kölcsönhatást. A plakoglobin egy adherens sejtkapcsoló fehérje, mely nagymértékű homológiát mutat a  $\beta$ -cateninnel és irodalmi adatok alapján fontos szerepet tölt be a cadherin/catenin komplex kialakításában és stabilizációjában. PMA kezelés aktiválja a PKC enzimet, mely a CPI-17 foszforilációját okozza a Thr38 aminosavoldalláncon. PMA kezelést követően csökkent kölcsönhatást találtunk a plakoglobin és a foszforilált CPI-17 között. A plakoglobin és CPI-17 közötti kölcsönhatás specifikusságának ellenőrzése érdekében további immunprecipitációs kísérleteket végeztünk.

A c-myc IP mintáinkat tovább analizáltuk a plakoglobin mellett specifikus  $\beta$ -catenin, VE-cadherin és p120 elleni antitestekkel is, azonban csak a plakoglobin specifikus kötődését tudtuk kimutatni az overexpresszált CPI-17-nel. Érdekes módon a MP regulátor MYPT1 alegységét a bakteriális két hibrid szűrés nem mutatta ki, IP-vel azonban sikerült az expresszált CPI-17 és a MYPT kölcsönhatását igazolni, ahogy az várható volt.

#### ***A plakoglobin és a CPI-17 kolokalizációja HLMVE sejtekben***

Az előzőekben felderített CPI-17-plakoglobin kölcsönhatás további vizsgálata érdekében immunfluoreszcens kísérletet végeztünk. CPI-17 pcDNA myc/His vagy üres pcDNA plazimdokkal HLMVE sejt monolayereket transzfektáltunk. A kezeltlen és PMA kezelt sejteket plakoglobin és c-myc antitestekkel jelöltük. A vizsgált két fehérje között kolokalizációt mutattunk ki a sejtmembránban, a szomszédos sejtek kapcsolódási felületén. A PMA kezelt sejtekben megerősödött plakoglobin festődést figyeltünk meg, míg a CPI-17 gyengébb festődést mutatott a sejtek membránjában.

Az immunfluoreszcens eredményeink további bizonyítékkal szolgálnak a plakoglobin és a CPI-17 kölcsönhatás meglétére nyugalmi állapotban lévő sejtekben, ahol a miozin foszfatáz aktív állapotban van és stabil adherens sejt kapcsolatokat találunk. Kimutattuk, hogy a PMA kezelés a CPI-17 foszforilációt/aktivációját okozza, ami a CPI-17 és a plakoglobin közötti kölcsönhatás megszűnéséhez vezet. Ez arra utal, hogy az aktivált CPI-17 más jelátviteli útvonalakban is részt vesz.

Különböző módszerek alkalmazásával sikeresen igazoltuk a plakoglobin tranziens kölcsönhatását a PP2A egyik szubsztrátjával, a CPI-17fehérjével endotél sejtekben.

## 5. ÖSSZEFOGLALÓ

A jól működő vaszkuláris endotél barrier funkció nagymértékben függ a citoskeletális és adherens sejtkapcsoló (AJ) fehérjék Ser/Thr oldalláncainak foszforilációjától. Irodalmi adatok alapján tudjuk, hogy a miozin foszfatáz (MP) szabályozó szerepet tölt be a sejtkontrakcióban. Munkacsoportunk korábban kimutatta, hogy a protein foszfatáz 2A (PP2A) katalitikus és szerkezeti alegysége jelentős szerepet játszik a barrier funkció fenntartásában. Munkánk során célul tűztük ki a PP2A B $\alpha$  regulátor alegység illetve a PP2A egyik szubsztrátja, a specifikus MP inhibitor, CPI-17 szerepének tisztázását a barrier funkció szabályozásában.

Makro- és mikrovaszkuláris endotél sejteket PP2A gátlószerekkel (okadánsav (OA) és fosztricin) kezelve az aktin filamentumok átrendeződését és a mikrotubulusok destabilizálóját figyeltük meg. Hasonlóképpen aktin stressz kábelek kialakulását tapasztaltuk a PP2A B $\alpha$  csendesítése során, ami trombin kezelés hatására fokozódott. Transzendotél ellenállás méréseink fokozott endotél permeabilitás növekedést mutattak a B $\alpha$  csendesített sejtekben trombin kezelés hatására a nonsi-RNS transzfektált sejtekhez képest. Pull-down kísérlettel továbbá specifikus kölcsönhatást mutattunk ki a B $\alpha$  és két adherens sejtkapcsoló fehérje, a VE-cadherin és  $\beta$ -catenin között. Az OA és fosztricin kezelés a VE-cadherin és  $\beta$ -catenin transzlokációját okozta sejtmembránból a citoplazmába, továbbá a  $\beta$ -catenin hiperfoszforilációját tapasztaltuk. Immunfloreszcens és Western blot kísérleteink azt mutatták, hogy a specifikus PP2A B $\alpha$  depléción negatívan befolyásolta az aktin filamentumok elrendeződését, és az adherens sejtkapcsolatok széteséséhez vezetett, ezzel párhuzamosan a  $\beta$ -catenin foszforilációját okozta az S552 oldalláncon.

A CPI-17 fehérjét a PKC enzim foszforilálja és fokozza a CPI-17 gátló hatását a MP-al szemben. Korábbi vizsgálatok igazolták a CPI-17 expresszióját HLMVE sejtekben. A PP2A képes defoszforilálni és ezáltal inaktiválni a CPI-17 fehérjét, azonban nagyon keveset tudunk a CPI-17 és a citoskeleton kapcsolatáról. A bakteriális két-hibrid szűrés során talált lehetséges kölcsönható partnerek közül immunprecipitációval sikerült igazolnunk a plakoglobin és a CPI-17 kapcsolatát HLMVE sejtekben. PMA kezelés hatására azonban a két fehérje között csökkent kölcsönhatást tudtunk kimutatni, ami a kölcsönhatás tranzienst jellegre utal.

Eredményeink alapján arra következtetünk, hogy a PP2A B $\alpha$  regulátor alegységgel alkotott holoenzim formája szabályozza az endotél citoskeleton szerkezetet és részt vehet az AJ fehérjék defoszforilációjában. Kimutattuk, hogy a CPI-17 szerepe az AJ stabilizálásában és a barrier funkció szabályozásában foszforiláció függő folyamat, amelyben a PP2A ugyancsak szerepet játszhat.

## 6. FÜGGELÉK



DEBRECENI EGYETEM EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR  
KENÉZY ÉLETTUDOMÁNYI KÖNYVTÁRA

Iktatószám: DEENKÉTK/266/2013.  
Tételszám:  
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Kása Anita

Neptun kód: FJJQ0G

Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Kása, A.**, Czikora, I., Verin, A.D., Gergely, P., Csontos, C.: Protein phosphatase 2A activity is required for functional adherent junctions in endothelial cells.  
*Microvasc. Res. Epub ahead of print (2013)*  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mvr.2013.05.003>  
IF:2.929 (2012)
2. Kim, K., Adyshev, D.M., **Kása, A.**, Zemskov, E.A., Kolosova, I.A., Csontos, C., Verin, A.D.: Putative protein partners for the human CPI-17 protein revealed by bacterial two-hybrid screening.  
*Microvasc. Res. 88, -24, 2013.*  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mvr.2013.04.002>  
IF:2.929 (2012)

### További Közlemények

3. Adyshev, D.M., Dudek, S.M., Moldobaeva, N., Kim, K., Ma, S., **Kása, A.**, Garcia, J.G.N., Verin, A.D.: Ezrin/radixin/moesin proteins differentially regulate endothelial hyperpermeability after thrombin.  
*Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol. Article in press, 2013.*  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1152/ajplung.00355.2012>  
IF:3.523 (2012)



4. Czíkora, I., Kim, K., **Kása, A.**, Bécsi, B., Verin, A., Gergely, P., Erdődi, F., Csontos, C.:  
Characterization of the effect of TIMAP phosphorylation on its interaction with protein  
phosphatase 1.  
*Biochimie.* 93 (7), 1139-1145, 2011.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2011.03.011>  
IF:3.022
5. Kakuk, A., Friedländer, E., jr. Vereb, G., **Kása, A.**, Balla, A., Balla, T., jr. Heilmeyer, L.M.G., Gergely,  
P., Vereb, G.: Nucleolar localization of phosphatidylinositol 4-kinase PI4K230 in various  
mammalian cells.  
*Cytometry A.* 69 (12), 1174-1183, 2006.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.a.20347>  
IF:3.293

**Összesített impakt faktor: 15.696**

**Összesített impakt faktor: (értekezés alapjául szolgáló közlemények esetén): 5.858**

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

Debrecen, 2013.08.01



Az értekezéshez kapcsolódó előadások:

1. A. Kása: *Investigation of Protein phosphatase 2A regulatory subunits in vascular endothelial cells*

A Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola PhD szimóziuma, Debrecen, 2009

2. A. Kása: *The role of protein phosphatase 2A (PP2A) regulatory subunits in the regulation of pulmonary endothel cell (EC) cytoskeleton structure*

A Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola PhD szimóziuma, Debrecen, 2010

3. A. Kása: *Ser/Thr protein phosphatases in lung endothelial barrier regulation*

Vascular Biology Center Szeminárium 2013, Georgia Regents University, Augusta, GA, USA

### **Az értekezéshez kapcsolódó poszterek**

1. **Kása Anita**, Czikora István, Gergely Pál, Csontos Csilla: PP2A regulátor alegységeinek vizsgálata endotél sejtekben

38. Memrán –Transzport Konferencia, Sümeg, 2008

2. **Kása Anita**, Boratkó Anita, Czikora István, Gergely Pál, Csontos Csilla: A protein foszfatáz 2A regulator alegységek jellemzése tüdőartéria endotél sejtekben

A Magyar Biokémiai Egyesület 2008. évi vándorgyűlése, Szeged, 2008. augusztus 31-szeptember 03

3. **Kása Anita**, Czikora István, Gergely Pál, Csontos Csilla: A protein foszfatáz 2A regulátor alegységek szerepe az endothel sejtek citoszkeleton szerkezetének szabályozásában

39. Memrán –Transzport Konferencia, Sümeg, 2009

4. **Kása Anita**, Czikora István, Gergely Pál, Csontos Csilla: A PP2A B alegységek szerepe az a citoszkeleton szabályozásában tüdőartéria endotél sejtekben

A Magyar Biokémiai Egyesület 2009. évi vándorgyűlése, Budapest, 2009. augusztus 23-26

5. **Kása Anita**, Gergely Pál, Csontos Csilla: A protein foszfatáz 2A (PP2A) regulátor alegységek szerepének vizsgálata az endothel sejt-kapcsolatok szabályozásában

A Magyar Biokémiai Egyesület 2010. évi vándorgyűlése, Budapest, 2010

6. István Czikora, Kyung-mi Kim, **Anita Kása**, Bálint Bécsi, Alexander D. Verin, Pál Gergely, Ferenc Erdódi, Csilla Csontos: Characterization of the effect of TIMAP phosphorylation on its interaction with protein phosphatase 1

Europosphatases 2011, Baden near Vienna, Austria, 18 - 23 July, 2011

- 7. Anita Kása, Pál Gergely, Csilla Csontos: A protein foszfatáz 2A szerepe a  $\beta$ -catenin defoszforilációjában endotél sejtkeben**  
Magyar Biokémiai Egyesület 2011. évi vándorgyűlése, Pécs, 2011
- 8. Anita Kása, Pál Gergely, Csilla Csontos, Alexander D. Verin:  $\beta$  regulatory subunit targets PP2A to Adherens Junctions and regulates the dephosphorylation of  $\beta$ -catenin in endothelial cells**  
American Heart Association, Scientific Sessions 2012, Los Angeles.
- 9. Anita Kása, Pál Gergely, Alexander D. Verin, Csilla Csontos: Phosphatase 2A is involved in Adherens Junction Regulation in Endothelial Cells**  
Experimental Biology 2013, Boston.
- 10. Anita Kása, Kyung-mi Kim, Djanybek Adyshev, Evgeny A. Zemskov, Csilla Csontos, Alexander D. Verin: CPI-17 Associates With Adherens Junction Protein Plakoglobin And Regulates EC Permeability**  
American Thoracic Society, 2013, Philadelphia