

Egyetemi Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**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**

BEVEZETÉS

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. A foszfátcsoport fehérjelánchoz 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 fiziológias szerepének megismerésében alapvető fontosságú volt a foszfatázok aktivitását gátló természetes vagy szintetikus eredetű toxinok felfedezése. Ezek a toxinok a sejtmembránon áthatolva a defoszforilációs folyamatokat gátolják, megváltozik a protein kinázok és protein foszfatázok aktivitásának aránya, ami a célfehérjék magasabb foszforiláltsági állapotát eredményezi, miközben a protein kináz aktivitása nem változik meg. A fehérjék ezen az úton megnövekedett foszforilációs állapota kóros sejtválaszokhoz illetve transzformációhoz vezetett. Ezek a megfigyelések támasztották alá a foszfatázok alapvető szerepét a sejt belüli szabályozási folyamatokban.

A protein foszfatázokat a célfehérjék foszfo-szeril és foszfo-treonil oldalláncát defoszforiláló szerin-treonin specifikus protein foszfatázokra, illetve a célfehérjék foszfo-tirozil oldalláncához kapcsolódó foszfátcsoport lehasítását végző tirozin-specifikus protein foszfatázokra oszthatjuk.

A Ser/Thr specifikus foszfatázokat biokémiai vizsgálatok alapján, az inhibitorok és aktivátorok iránti eltérő érzékenységük szerint

csoportosíthatjuk. Megkülönböztethetünk PP1 és PP2 típust, a PP2 típuson belül PP2A, PP2B és PP2C alcsoportokat. A PP1 a foszforiláz-kináz β alegységére specifikus és gátlható I-1 és I-2 hőstabil inhibitor fehérjékkel. A PP2 család tagjai a foszforiláz-kináz α alegységére 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 osztályozás 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. 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 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. 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.

A katalitikus alegység két, α és β izoformáját klónozták emlős szövetekből. Northern blot eredmények bizonyítják, hogy mindkét forma detektálható különböző emlős szövetekben, de az α izoforma mRNS-e

mindenütt nagyobb mennyiségben van jelen. Alacsonyabbrendű szervezeteket is megvizsgálva kimutatták, hogy az egyik legkonzerváltabb enzim az eddig ismert enzimek között.

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. A fehérje kristályszerkezetéről nyert adatok megerősítik azt a 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.

A három alegységes holoenzim harmadik komponense többféle molekulatömegű formában előforduló polipeptid, melyet 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 legújabb terminológia szerint a PR (regulátor fehérje) rövidítés után a jóslott molekulatömeg értéket tüntetik fel kDa-ban. 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.

A PP2A biológiai szerepe

A PP2A-ról megjelent számos közlemény arra utal, hogy egy igen változatos felépítésű enzimről van szó, mely alapvető szerepét a fehérjék defoszforilálásában tölti be. A holoenzim legváltozatosabb régiója a B alegység, melynek több családját is ismerjük. Ez a sokféleség arra enged következtetni, hogy a PP2A sokféle biológiai

folyamatban vesz részt, többek között a sejtciklusban, a növekedésben, a hősokk folyamatában, a jelátvitelben, a sejtttranszformációban, a DNS replikációban vagy például az apoptózisban.

A sejtciklus során nélkülözhetetlen a G_2/M fázis átmenethez a Cdc2/cyclinB komplex (MPF) jelenléte. A PP2A-nak azt a funkciót tulajdonítják, hogy az MPF-et inaktív prekursor formában tartva megakadályozza a sejtek G_2 -ből M fázisba lépését. 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 PP2A holoenzim, tartalmazva a PR 48-at kötődve a Cdc6-hoz G_1 -blokkot okoz.

A PP2A kölcsönhatásba léphet virális fehérjékkel, mint például polyoma kis t és közepes T vagy az SV40 kis t antigénekkal, befolyásolva a sejtttranszformációt. A HIV-1 vpr fehérjeje a B/PR55-el kapcsolódva a Cdc25 defoszforilációját okozza.

A hősokk fehérjék családjának egyik tagja a HSF2, a PP2A A alegységével kapcsolódva megakadályozza a katalitikus alegység kapcsolódását, így a PP2A aktivitásának csökkenését okozza. 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 stresszkábeleké történő összerendeződése követi, vagyis a HSP27 részt vesz az aktin filamentumok szerkezetének szabályozásában foszforilációs és defoszforilációs útvonalon keresztül. A HSP27 nemcsak az aktin filamentumokkal, de a mikrotubulusokkal is asszociál HeLa sejtekben.

Két hibrid rendszert alkalmazva kimutatták, hogy a PP2A B'/PR61 α és B'/PR61 δ alegységei kapcsolódva a cyclin G-vel szerepet játszanak a DNS degradációban.

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, az ERK/MAPK-ok, protein kináz- A, B, -C, a Ca^{2+} -kalmodulin-függő kináz is mind szubsztrátjai az enzimnek. A PKB-t pl. *in vitro* a PP2A inaktiválja.

Az endothel sejtek citoszkeletonja és a barrier funkció

Az endothel sejtek konfluens monolayert képeznek az erek belső falán és számos patológiás, és élettani folyamatban töltönek 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.

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. Az MP 130 kDa-os miozin kötő alegységét a Rho-kináz foszforilálja és ezáltal az MP aktivitás gátlódik. Simaizomban kimutatták, hogy az MP aktivitását egy kisméretű, CPI17 nevű fehérje is gátolja, amelynek gátló képességét a PKC enzim potenciózza. A CPI17-t a protein foszfatáz 2A defoszforilálhatja *in vitro*, valamint kimutatták a CPI17 jelenlétét nemcsak simaizomban, hanem endothel sejtekben is.

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. Fibroblaszt sejteket ugyancsak specifikus PP2A gátlószerrel kezelve az intracelluláris vimentin foszforilációs szintjének emelkedését találták és kimutatták a PP2Ac, az A és B/PR55 alegységek asszociációját a vimentinnel.

A PP2A a mikrotubulusokkal és mikrotubulushoz asszociálódó fehérjékkel, pl. a tau-val is kolokalizálható. 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. A különböző PP2A

heterotrimerek közül a B/PR55 regulátor alegységet tartalmazó PP2A kötődése látszik bizonyítottan a mikrotubulushoz. A mikrotubulusok stabilitásának fenntartásához az irodalmi adatok szerint úgy tűnik, hogy szükséges a PP2A aktivitás 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.

A PP2A a MAP fehérjéken kívül a citoszkeleton más fehérjével is asszociál és képes azokat defoszforilálni. 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.

Széles körűen dokumentálták, hogy a mikrofilamentumok és a mikrotubulusok hasonlóan fontos szerepet töltenek be a citoszkeleton szerkezetének megtartásában endothel sejtek barrier funkciójában, valamint a PP2A holoenzim forma nagyszámú variációjának előfordulása feltételezi olyan lehetséges szubsztrátok jelenlétét, melyek szintén szerepet játszanak a barrier funkció szabályozásában, akár a mikrofilamentumokon, vagy a mikrotubulusokon keresztül.

CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk célja az volt, hogy endothel modell rendszerben tanulmányozzuk a PP2A, a barrier funkció és a citoszkeleton szabályozása közötti kapcsolatot. 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 asszociálódó fehérjék kimutatása.

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

4. A PP2A alegységek emlős expresszióra alkalmas vektor konstrukcióinak és a PP2A alegységek rekombináns adenovírus plazmidjainak előállítása, 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 citoszkeleton és mikrotubulus szerkezetére valamint a barrier funkcióra.

6. Az overexpresszált fehérjék aktivitásának gátlása és a gátlás utáni hatás tanulmányozása a tüdő artéria endothel sejtek citoszkeleton és 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.

MÓDSZEREK

Sejtenyésztés A marha tüdő artéria endothel sejteket (BPAEC) a 15-24 passzálásig használtuk. A sejteket Medium 199-ben (Gibco BRL) tenyésztettük. A médium 20% (v/v) magzati borjú szérumot (Irvine Scientific), 15 µg/ml endothel sejt növekedési faktort (Collaborative Research), 1% antibiotikumot- antimikotikumot, és 0.1 mM nem-esszenciális aminosavakat (Gibco BRL) tartalmazott. A humán tüdő artéria endothel sejteket (HPAEC), a humán köldökvéna endothel sejteket (HUVEC), és a humán tüdő mikrovaskuláris endothel sejteket (HLMEC) a Cloneticstől rendeltük. A HPAEC-t a 6-10 passzálásig, a HUVEC-et a 2-3 passzálásig, a HLMEC-t a 4-8 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. A sejteket DMEM médiumban tenyésztettük. 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 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 fágklónt 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 sokszorosítottuk. 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.

Transzfekció A sejteket 70 % konfluencia eléréséig szövettényesztő 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, és további kísérleteinkhez használtuk fel.

In vitro foszfatáz aktivitás meghatározása transzfektált sejtekben A 24 vagy 48 órás poszttranszfekciós inkubálási idő lejárta 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 proteázgátlókat, 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. A kihasított 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 PCR termékeket a pShuttle-Ires-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 sokszorozítása és tisztítása A rekombináns adenovírus sokszorozását és tisztítását az irodalmi hivatkozásban (He et al., 1997), valamint az AdEasyTM Adenovírus vektor kit-ben (Stratagene) leírtaknak megfelelően végeztük kevés módosítással. A végleges vírustiter 10^{10} - 10^{11} pfu/ml volt.

Endothel sejtek fertőzése tisztított rekombináns adenovírral 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 37°C-on, 5 % CO₂ termosztátban. 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) használtunk.

Endothel sejtek frakcionálása A frakcionálást kétféle módszert követve valósítottuk meg, centrifugálási lépésekkel. Az első módszer lehetővé teszi, hogy elkülöníthessük a mikrotubulusban gazdag (MT), citoszkeleton (F-aktin gazdag), és a citoszól, míg a másik módszerrel a citoszól, a tubulin, az aktin és az intermedier filamentum (vimentin) gazdag frakciókat különítettük el.

Western-blot SDS-PAGE-t 10 % akrilamid koncentrációjú géleken végeztünk. A sejteket 1x PBS-sel mostuk, majd 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. 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 ÉS MEGBESZÉLÉS

A vaszkuláris endothel monolayer fő funkciója, hogy a plazma és az intersticiális folyadék között szemi-szelektív diffúziós sorompóként működik, és így szerepe van a sejtfal 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 sejtfal homeosztázis megbomlik, ezáltal az adott szerv működése módosul. Számos citoszkeleton fehérje foszforilációs állapota befolyásolja a citoszkeleton elemeinek szerveződését, ennek következtében az endothel sejtek kontrakciós állapotát, az endothelium barrier funkcióját. A citoszkeleton elemei és egyes fehérjék közötti közvetlen vagy közvetett kapcsolaton kívül, korábbi eredmények bizonyítják, hogy a mikrotubulusok és mikrofilamentumok közötti kapcsolat elengedhetetlen az endothel sejtek citoszkeleton szerkezetének összehangolt szabályozásához. 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 citoszkeleton 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. Az okadánsav (OA) egy 38 szénatomból álló zsírsav poliéter származéka, ami képes a protein foszfatáz 1 és 2A aktivitásának hatékony gátlására. Az okadánsav eltérő módon gátolja foszfatázokat: a PP2A-t hatékonyabban ($K_i = 0.2 \text{ nM}$), mint a PP1 enzimet ($K_i = 2 \text{ }\mu\text{M}$). Az okadánsav élő sejtekben $1 \text{ }\mu\text{M}$ -ig a protein foszfatázok közül csak a PP2A-t gátolja, ezért használható a PP2A szerepének vizsgálatára.

Korábban kimutatták, hogy az OA 2-5 nM koncentrációban nem változtatta meg jelentősen borjú endothel sejtek permeabilitását és az MLC foszforilációját, amiből a PP2A korlátozott szerepére következtek az endothel sejtek barrier funkciójának és kontrakciójának közvetlen szabályozásában. Másrészt kimutatták azt is, hogy mikrotubulus szerkezetének a nokodazol ($2\text{-}5 \text{ }\mu\text{M}$) 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. 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. 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 fractionálási 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 sejttípusokban. 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 aktivitást detektáltak. Viszont a fehérje mennyisége az összes frakcióban hasonló volt. A PP2A és a mikrotubulusok asszociációját is leírták már patkány és borjú agyszövetben. 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. 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), és a regulátor A (PP2Aa) alegységeit, valamint 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 és a mi megfigyelésünk is ez volt. Az immunofluoreszcens kísérleteink eredményei azt mutatják, hogy a rekombináns fehérje nagy koncentrációban volt jelen azokban a sejtekben, melyek overexpresszálták a fehérjét, mégis az aktivitásnövekedés a teljes sejtkivonatban 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.

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. Előállítottunk és overexpresszáltunk az A alegységnek egy olyan trunkált mutánsát (PP2Aa_N), ami csak a B alegység kötéséért felelős N-terminális régiót tartalmazza, de nem tartalmazza a katalitikus alegység kötéséért felelős C-terminális szakaszt. 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 PP2Aa+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.

Korábbi eredmények igazolták, hogy a mikrotubulusok (MT) és a mikrofilamentumok közötti kapcsolat hatással van az endothel sejtek (EC) citoszkeleton szerkezetének változásaira. 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) Ca²⁺-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. Az MP 130 kDa-os miozin kötő alegységét a Rho-kináz foszforilálja és ezáltal az MP aktivitás gátlódik.

Mind a nokodazol, mind a trombin barrier diszfunkciót idézett elő endothel sejtekben az F-aktin citoszkeleton és a mikrotubulusok szerkezetének megváltoztatásával. 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 hatákonyságú 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 szubsztráto(ka)t defoszforilálhat, amely fehérjé(k)nek a defoszforilációja a citoszkeleton mindkét elemének a szerkezetét megváltoztatja. A PP2A lehetséges szubsztrátjainak azonosítására EC-ben, két szabályozó, citoszkeleton fehérjére, a HSP27-re és a tau-ra fókuszáltunk. Feltételezzük, hogy a PP2A ezen fehérjék defoszforilációjával teremthet kapcsolatot a citoszkeleton 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 mitótikus orsó tubulinjának asszociációját HeLa sejtekben, míg a HSP27 az EC barrier szabályozásában is részt vesz az aktin stresszfilamentumok kialakításán keresztül, valamint a citoszkeleton szerkezetének kialakításában fontos szabályozó elem. Leírták azt is, hogy a HSP27 overexpressziója megnöveli az F-aktin stabilitását, olyan stresszhatásokra mint pl. a hipertermia, cytochalasin D vagy egyes oxidánsok, de a pontos mechanizmus még nem ismert. A HSP27 foszforilációs állapota azonban meghatározza az aktin polimerizációra kifejtett hatását. A nem foszforilált kis molekulatömegű HSP monomerek aktívak az aktin polimerizáció gátlásában, míg a foszforilált monomerek és a nem foszforilált oligomer forma inaktívak. Az irodalmi közlések többsége leírja, hogy normális körülmények között a HSP27 a citoplazmában diffúzan található, míg mások leírták, hogy az aktinnal kollokalizál. *in vivo* eredmények szintén kapcsolatot feltételeznek a lipopoliszacharidok által kiváltott EC barrier diszfunkció és a HSP27 foszforilációja között.

Western-blot és immunofluoreszcens kísérleteink igazolták, hogy nokodazollal 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. 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. A hiperfoszforilált tau defoszforilációja azonban helyreállítja a tau fehérje MT összerendezéséért felelős tulajdonságát. Ezekből következik, hogy a tau fehérje foszforiláción/defoszforiláción keresztül szabályozott. Két hibrid rendszerrel kimutatták azt is, hogy az aktin citoszkeleton 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, megteremtve így a kapcsolatot a citoszkeleton két eleme az aktin és a mikrotubulusok között a PP2A-n és a tau fehérjén keresztül.

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 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. 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*. Egyetlen génen történt alternatív mRNS splicing következtében a tau számos izoformával rendelkezik. A tau főként neuronális sejtekben fordul elő, de leírták jelenlétét fibroblasztokban és limfocita sejtekben is. Kimutattuk, hogy a PP2A overexpressziója jelentősen lecsökkenti a nokodazol által előidézett tau foszforilációt HPAE sejtekben. Fenti eredményekből arra következtethettünk, 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

Kísérleteink célja a protein foszfatáz 2A (PP2A), egy Ser/Thr specifikus foszfatáz szerepének vizsgálata humán és marha tüdő artéria endothel sejtek citoszkeleton szerkezetének szabályozásában. Kimutattuk, hogy a PP2A gátlása jelentősen megnöveli a nokodazolnak-egy mikrotubulus (MT) inhibitor- hatását; a sejtek közötti (intercelluláris) rések megnövekedésének, ami a PP2A részvételére utal az endothel sejtek mikrotubulus–mediált barrier funkciójának szabályozásában és a citoszkeleton újrendeződésében. Kimutattuk továbbá, a PP2A specifikus és szoros kötődését a mikrotubulusokkal. 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 konstrukciókkal 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, ill. jelentősen mérsékli 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 konstrukciókkal 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.

Sejtfrakcionálási módszereinkkel kimutattuk, hogy a HSP27 és a tau, melyek endothel sejtekben a PP2A feltételezett szubsztrátjai 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 citoszkeletont védő szerepére utal.

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

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 *Közlésre elfogadva 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 citoszkeleton 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 citoszkeleton 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