

PROTEIN FOSZFATÁZ 2A SZEREPE A HUMAN ENDOTHELIUM BARRIER FUNKCIÓJÁNAK SZABÁLYOZÁSÁBAN

BEVEZETÉS

Az érpermeabilitás megnövekedése különböző bioaktív ágensek, gyulladás hatására az endothel sejtek között kialakuló rések következménye. Az endothelium jól működő barrier funkciója a 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 (3). Számos citoskeletális fehérje foszforiláltsági állapota befolyásolja az endothel sejtek aktuális alakját, egymáshoz való illeszkedését, illetve kontrakciójukat, vagyis az endothelium barrier funkcióját. A kontrakció létrejöttében az akto-miozin kölcsönhatás és a miozin könnyűlánc foszforilációja az endotheliumban is részletesen jellemzett (2, 7). Az MLC defoszforilációját az endothel sejtekben is, hasonlóan a nem-izom sejtekhez, a protein foszfatáz 1 (PP1) miozin foszfatáz holoenzim formája (PP1 katalitikus alegység MYPT regulátor alegységgel) katalizálja (10). A citoskeleton további elemei (intermedier filamentumok, mikrotubulus) és a hozzájuk kapcsolódó fehérjék foszforilációs szintjének szabályozása, valamint a PP1 más holoenzim formáinak és a másik jelentős Ser/Thr-specifikus foszfatáz, a protein foszfatáz 2A (PP2A) szerepe kevésbé ismert.

CÉLKITŰZÉSEK

A pályázatban a PP2A és az endothel barrier reguláció közötti kapcsolat feltárása érdekében az alábbi kísérleti stratégiát állítottuk össze:

1. PP2A és alegységeinek jellemezése az endotheliumban.
2. PP2A alegységek emlős expresszióra alkalmas vektor konstrukcióinak előállítás.
3. Marha és human tüdő artéria endothel sejtvonalban (BPAEC, HPAEC) a PP2A alegységek overexpressziója és az overexpresszált fehérjék lokalizációjának tanulmányozása, hatásuk az endothel barrier funkcióra.
4. Citoskeletális kölcsönható és célfehérjék azonosítása a PP2A alegységeket overexpresszálo sejtekben.
5. Az endogén PP2A gének expressziójának gátlása RNS interferenciával.

A kutatási támogatást a szerződéshez képest csökkentették a kutatási periódus alatt. Ennek ellenére, a tervezett munka nagyobb hányadát, becslésünk szerint 70-80%-át, elvégeztük, nem került még sor az RNS interferencia kísérletek kivitelezésére. Másrészt kutatásunkat kiterjesztettük a PP1 egyik potenciális regulátorának, a TIMAP nevű fehérjének a tanulmányozására is, melyet az eredeti pályázatban nem terveztünk.

Külföldi kollaborációs partnerünk, Dr. Alexander Verin anyagi támogatása, valamint az, hogy a laboratóriumában használhattuk a transzendothel elektromos ellenállást mérő ECIS berendezést, jelentősen hozzájárult munkánkhoz.

EREDMÉNYEK

I. PP2A

1. PP2A és alegységeinek jellemezése az endotheliumban.

Nokodazol (0,5 μ M) hatására, amely a mikrotubulusokat destabilizálja, az endothel monolayerben a sejtek között rések alakulnak ki. A sejtek fluoreszcens aktin festésével, valamint a monolayereken mért transzendothel elektromos ellenállás mérésével kimutattuk, hogy a PP2A aktivitás gátlása okadánsavval jelentősen fokozza a nokodazol hatását, a rések megnövekednek, illetve az elektromos ellenállás csökken, ami szintén a rések megjelenését jelzi. Ezek az eredmények a PP2A részvételére utaltak az endothel sejtek *mikrotubulus-mediált* barrier funkciójának szabályozásában. Endothel sejttenyészetből elválasztott tubulinban gazdag frakcióban jelentős mennyiségű PP2A katalitikus alegységet mutattunk ki Western blottal. Immunfluoreszcenciás festéssel pedig a mikrotubulusok és az endogén PP2A kolokalizációját igazoltuk, amit a PP2A gátlószere, az okadánsav megszüntetett.

2. PP2A alegységek emlős expresszióra alkalmas vektor konstruktjainak előállítás.

A PP2A egy heterotrimer, a 36 kDa-os katalitikus alegység (PP2Ac) és a 65 kDa-os A (PP2Aa) szerkezeti alegység alkotja adja minden holoenzim forma vázát. A trimer forma harmadik tagja a B-alegység, amelyről feltételezik, hogy a szubsztrát-specifitásért és a sejten belüli lokalizációért lehet felelős. A PP2A heterotrimer formáinak eltérő funkciója a különböző B-alegységeknek köszönhető. A B fehérjék legalább három, egymástól teljesen különböző géncsalád termékei.

cDNS könyvtárszűréssel korábban izoláltuk a PP2Ac és PP2Aa alegységek kódoló szekvenciáját. Ezeket először EGFP fúzióra alkalmas emlős expressziós vektorokba szubklónoztuk, de ezekkel a konstrukttal nem tudtuk a nehezen transzfektálható endothel sejtekben a fehérjéket overexpresszálni. Ezért újabb, pCMV-HA (C alegység), illetve pcDNA3.1 (A alegység) emlős expressziós vektorokat alkalmaztunk.

A B alegységnek eddig két különböző formáját klónoztuk RT-PCR-ral HPAEC-ből izolált RNS-ből.

3. Marha és human tüdő artéria endothel sejtvonalban (BPAEC, HPAEC) a PP2A alegységek overexpressziója és az overexpresszált fehérjék lokalizációjának tanulmányozása, hatásuk az endothel barrier funkcióra.

A PP2Ac és PP2Aa konstrukciókkal human és marha tüdő artéria endothel sejteket (HPAEC és BPAEC) transzfektáltunk és overexpresszáltuk a PP2A alegységeit. A transzfekció követően a sejtenyészetekből kivonatot készítettünk és *in vitro* foszfatáz aktivitásméréssel (³²P-MLC szubsztráttal, specifikus PP1 és PP2A gátlószerekkel) kimutattuk, hogy az overexpresszált PP2A katalitikus aktivitással rendelkezik.

Immunfluoreszcens kísérletekben azt találtuk, hogy a két alegység együttes expressziója az endothel sejtek kortikális aktinjának feldúsulásához és az aktinfilamentumok eltűnéséhez vezet. *A PP2Ac-t megkötni nem képes PP2Aa trunkált mutáns és a PP2Ac ko-expressziójának nincs ilyen hatása. A csak PP2Aa-t overexpresszálo sejtekben a natív PP2Ac és a B alegység mennyisége is megnőtt. Ez arra utal, hogy a rekombinánsok egymással és a natív alegységekkel heterotrimert hozhatnak létre. Pull-down kísérlettel kimutattuk a rekombináns PP2Aa kölcsönhatását a PP2Ac rekombináns és natív formájával. A trunkált PP2Aa mutáns viszont a PP2Ac egyik formáját sem köti.*

Thrombin kezelést követően a nem overexpresszálo sejtekben feldúsulnak a stresszfilamentumok, a sejtek kontrahálnak. Ezzel szemben a PP2Ac és PP2Aa alegységeket overexpresszálo sejtekben a thrombinnak ilyen hatása nem figyelhető meg, a PP2A aktivitás hatására a sejtek megőrzik alakjukat. Az overexpresszió látszólag nem okozott változást a sejtek mikrotubuláris szerkezetében. Akár a PP2Ac alegység önmagában, akár a PP2Ac és a PP2Aa együttes expressziója megszünteti viszont a nokodazol (0,5 μM) mikrotubulust destabilizáló hatását, amiből a PP2A mikrotubuláris rendszert védő szerepére következtethetünk. A PP2A gátlása 5 nM okadainsavval megszünteti/mérsékli az overexpresszált alegységek citoszkeletonra kifejtett hatását, jelezve a PP2A aktivitásának szerepét az endothel sejtek citoszkeleton szerkezetének szabályozásában.

Az endothel sejtek transzfekciójának hatásfoka meglehetősen alacsony (~15-20%), ezért a PP2Ac és PP2Aa alegységek expressziójára rekombináns adenovirust hoztunk létre. Ezekkel szintén HPAEC és BPAEC sejteket infektáltunk (közel 100 %-os hatásfokkal) és vizsgáltuk a rekombináns fehérjék hatását az endothel monolayer elektromos ellenállására különböző bioaktív ágensekkel való kezelést követően. Az immunfluoreszcens kísérletek eredményeivel összhangban azt találtuk, hogy mind a thrombin, mind a nokodazol barrier diszfunkciót okozó hatását a rekombináns adenovírussal fertőzött sejtekben a PP2A aktivitás jelentősen mérsékelte.

Eredményeink a PP2A aktív részvételére utalnak az endothel sejtek citoszkeleton szerkezetének szabályozásában.

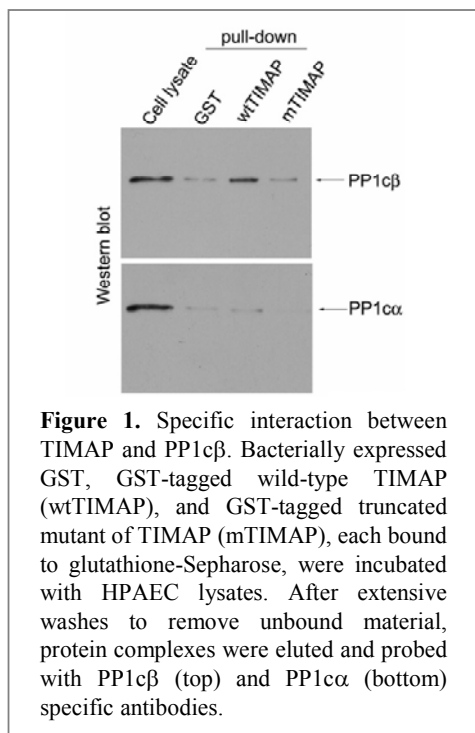
4. Citoszkeletális kölcsönható és célfehérjék azonosítása a PP2A alegységeket overexpresszáló sejtekben.

Annak érdekében, hogy a PP2A szabályozó szerepét jobban megismerjük olyan lehetséges PP2A-szubsztrátokat vizsgáltunk, amelyek kapcsolata a citoszkeletonnal jól ismert. A mikrotubulusokkal defoszforilált formájában asszociálódó tau fehérjéről ismert, hogy a mikrotubulusra stabilizáló hatással bír. A kis molekulatömegű hősokk fehérje, a HSP27, foszforilált formájában pedig aktin polimerizációt vált ki. Endothel sejt kivonat frakcionálását követően nemcsak a tau, de a HSP27 fehérjét is a tubulinban gazdag frakcióban mutattuk ki, ami arra utal, hogy ez a fehérje is kötődik a mikrotubulusokhoz. A PP2A alegységeket overexpresszáló sejtekben mind Western blottal, mind immunfluoreszcens kísérletekkel azt találtuk, hogy a vizsgált két fehérje, a tau és a HSP27 foszforiláltsági szintje thrombinnal illetve nokodazzal történő kezelés után nem növekedett. Ezzel szemben a nem overexpresszáló kontroll sejtekben, amelyek a kezelés hatására kontraháltak, mindkét fehérje jelentős mértékben foszforilálódott. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a PP2A aktivitás ezen fehérjék foszforilációs szintjének szabályozásával része lehet az endothel sejtek citoszkeletonjában a mikrotubulusok és a mikrofilamentumok közötti párbeszédnek és a barrier funkció szabályozásának.

II. PP1: a TIMAP fehérje tanulmányozása.

A TIMAP (TGF- β -inhibited membrane associated protein) nevű 64 kDa-os fehérje endothel sejtekben más sejt típusokhoz képest nagymértékben kifejeződik. Szerkezeti rokonságot mutat a miozin foszfatáz MYPT regulátor alegységével, szerkezetében megtalálható a PP1c kötésért felelős kötőmotívum és a jellegzetes ankirin ismétlődések is, valamint egy prenilációs motívum, ami a membránhoz való lokalizációért lehet felelős (2). Ezért feltételezhető volt, hogy a TIMAP is egy PP1 regulátor lehet (1). Tanulmányoztuk a TIMAP-PP1c közötti kölcsönhatást, és a TIMAP szabályozó szerepét human tüdő artéria endothel sejtmodellben.

A TIMAP fehérjét és a PP1c kötő motívumot nem tartalmazó trunkált mutánsát GST-fúzióval bakteriális expresszióval előállítottuk és glutation-Sepharose-on immobilizáltuk. HPAEC sejt kivonatból a vad típusú TIMAP specifikusan a PP1c-nel csak egyik, beta izoformáját kötötte meg *in vitro* pull-down kísérletben (Fig. 1). HPAEC sejtekben a natív fehérjék közötti kölcsönhatást immunprecipitációval is kimutattuk. Immunfluoreszcenciával és konfokális



mikroszkópiával az HPAEC-ben is membrán asszociálva találtuk a TIMAP nagy részét, de ezen túl a sejtmagban és a perinukleáris régióban is megtalálható.

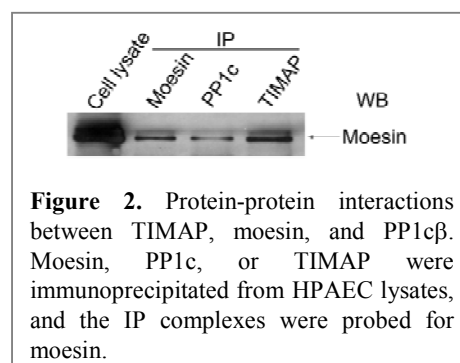
RNS interferencia segítségével a TIMAP-ot depletáltuk HPAEC-ben és vizsgáltuk a deplécio hatását a sejtek barrier funkciójára transzendothel elektromos ellenállás (ECIS) mérésével. Önmagában a deplécio nem befolyásolta az endothel monolayer elektromos ellenállását, viszont módosította annak különböző bioaktív ágensekkel való kezelésre adott válaszát. S1P és ATP, barrier funkciót erősítő ágensek, hatása szignifikánsan mérséklődött, míg a barrier diszfunkciót kiváltó thrombin és nokodazol hatása fokozódott. Ezek az eredmények a TIMAP endothel barrier funkciót védő

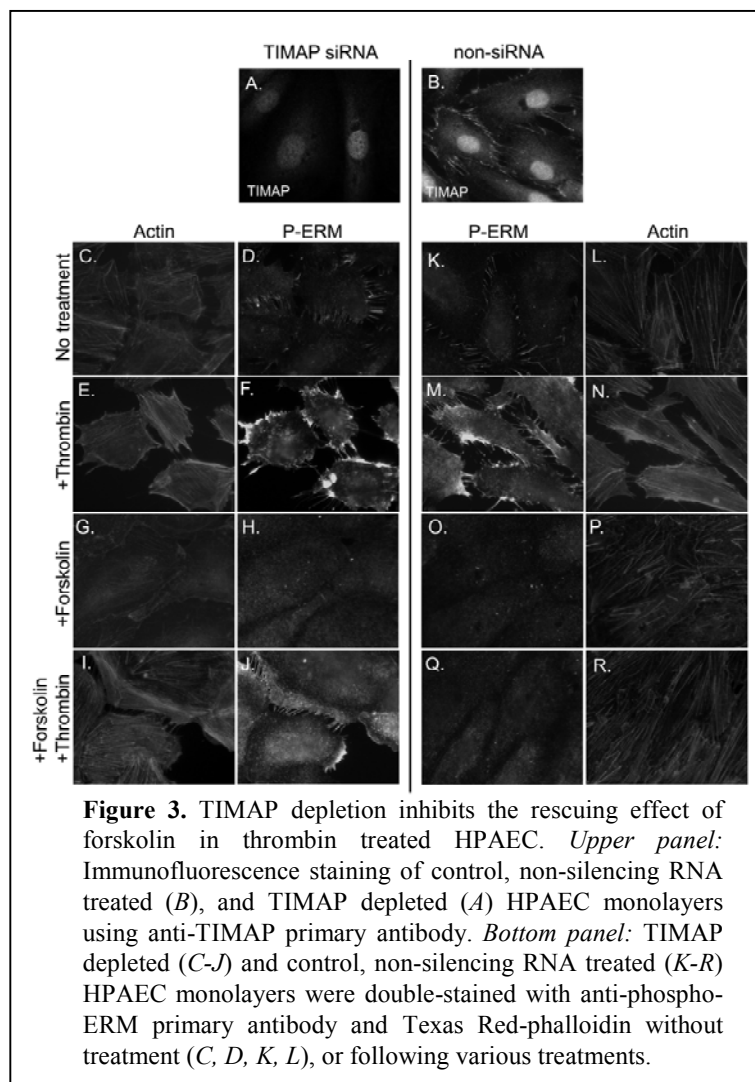
hatására utalnak.

Az ERM fehérjék foszforilált formájukban kölcsönhatnak az aktinnal és membránfehérjékkel (6). A TIMAP membrán-lokalizációja alapján feltételeztük, hogy részt vehet az ERM (ezrin-radixin-moezin) fehérjecsalád foszforilációs szintjének szabályozásában, mint a PP1c regulátora. Egy olyan sejttypusban, MDCK, amely TIMAP-ot nem tartalmaz, ugyanis korábban kimutatták, hogy az ERM PP1 általi defoszforilációját a TIMAP-pal rokon MYPT1 szabályozza (4).

Immunprecipitációval kimutattuk a PP1c és a TIMAP kölcsönhatását moezinnel (Fig. 2).

A TIMAP a MYPT3 fehérjéhez hasonlóan PKA-val foszforilálható (5, 11). Forskolinnal kezelve HPAEC-t növeltük a cAMP szintjét és ezáltal aktiváltuk a PKA-t. Immunfluoreszcenciával kimutattuk, hogy a forskolin kezelést követően az ERM defoszforilált formában van, továbbá forskolin előkezelés után trombin sem tudja annak foszforilációját kiváltani. Kontroll, forskolinnal nem kezelt, illetve RNS interferenciával TIMAP depletált, forskolinnal előkezelt HPAEC-ben a trombin az ERM foszforilációját váltotta ki (Fig. 3). Ezek az eredményeink a TIMAP szerepére utalnak az ERM fehérjék PKA indukált szabályozásában.





Az eredmények jelentősége, a közlemények felhasználása, nemzetközi együttműködés

Az endothel barrier funkció szabályozásában a fehérje foszforiláció-defoszforiláció szerepe jelentős. Az OTKA támogatásával végzett munkánk során kimutattuk, hogy nem csak a PP1, de a Ser/Thr-specifikus foszfatáz enzimes család másik jelentős képviselője, a PP2A is fontos az endothel citoskeleton szabályozásában. Eredményeinket több hazai és nemzetközi konferencián bemutattuk, valamint két megjelent közleményben leírtuk (8, 9). A közleményekben nem szereplő eredményeket a I. részben dőlt betűvel szedtük.

A PP1 egy kevésbé jellemzett regulátorát, a TIMAP fehérjét vizsgálva kimutattuk, hogy a barrier funkcióban pozitív szabályozó szerepet tölt be és valószínűsítettük, hogy részt vesz az ERM fehérjék foszforilációs szintjének szabályozásában is. Ezeket az eredményeinket szintén bemutattuk hazai és nemzetközi konferenciákon, az American Journal of Physiology-hoz beküldött kéziratunk pedig jelenleg átdolgozás alatt áll.

Az OTKA támogatás feltüntetésével a két fentebb említett közleményen kívül a témához szorosan kapcsolódva egy könyvrészlet és egy összefoglaló közlemény jelent meg (2).

A megjelent közlemények hozzájárultak Tar Krisztina Ph.D. fokozatának megszerzéséhez. A pályázati témában dolgozva Czikora István, jelenleg is a TIMAP témán dolgozó Ph.D. hallgató, molekuláris biológus, védte meg diplomamunkáját.

Kutatásunk során Dr. Alexander Verin (Department of Medicine, Division of Biological Sciences, University of Chicago, és Medical College of Georgia, Vascular Biology Center) lehetővé tette laboratóriumában az ECIS berendezés használatát, valamint rendelkezésünkre bocsátotta a TIMAP elleni antitestet és szponzorálta a TIMAP-depléciót. Az adenovírus alapú PP2A kísérleteket Tar Krisztina az ő laboratóriumában és szponzorálásával végezte el.

Egyik kutatási területet sem érezzük még lezártnak, további kísérleteket tervezünk a PP2A B regulátor alegységének vizsgálatára és szeretnénk mélyebben feltárni a TIMAP szerepét az ERM regulációjában.

IRODALOM

1. **Cao W, Mattagajasingh SN, Xu H, Kim K, Fierlbeck W, Deng J, Lowenstein CJ, and Ballermann BJ.** TIMAP, a novel CAAX box protein regulated by TGF-beta1 and expressed in endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 283: C327-337, 2002.
2. **Csontos C, Kolosova I, and Verin AD.** Regulation of vascular endothelial cell barrier function and cytoskeleton structure by protein phosphatases of the PPP family. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 293: L843-854, 2007.
3. **Dudek SM and Garcia JG.** Cytoskeletal regulation of pulmonary vascular permeability. *J Appl Physiol* 91: 1487-1500., 2001.
4. **Fukata Y, Kimura K, Oshiro N, Saya H, Matsuura Y, and Kaibuchi K.** Association of the myosin-binding subunit of myosin phosphatase and moesin: dual regulation of moesin phosphorylation by Rho-associated kinase and myosin phosphatase. *J Cell Biol* 141: 409-418., 1998.
5. **Li L, Kozlowski K, Wegner B, Rashid T, Yeung T, Holmes C, and Ballermann BJ.** Phosphorylation of TIMAP by glycogen synthase kinase-3beta activates its associated protein phosphatase 1. *J Biol Chem* 282: 25960-25969, 2007.
6. **Mangeat P, Roy C, and Martin M.** ERM proteins in cell adhesion and membrane dynamics. *Trends Cell Biol* 9: 187-192, 1999.
7. **Mehta D and Malik AB.** Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol Rev* 86: 279-367, 2006.
8. **Tar K, Birukova AA, Csontos C, Bako E, Garcia JG, and Verin AD.** Phosphatase 2A is involved in endothelial cell microtubule remodeling and barrier regulation. *J Cell Biochem* 92: 534-546, 2004.
9. **Tar K, Csontos C, Czikora I, Olah G, Ma SF, Wadgaonkar R, Gergely P, Garcia JG, and Verin AD.** Role of protein phosphatase 2A in the regulation of endothelial cell cytoskeleton structure. *J Cell Biochem* 98: 931-953, 2006.
10. **Verin AD, Csontos C, Durbin SD, Aydanyan A, Wang P, Patterson CE, and Garcia JG.** Characterization of the protein phosphatase 1 catalytic subunit in endothelium: involvement in contractile responses. *J Cell Biochem* 79: 113-125, 2000.
11. **Yong J, Tan I, Lim L, and Leung T.** Phosphorylation of Myosin Phosphatase Targeting Subunit 3 (MYPT3) and Regulation of Protein Phosphatase 1 by Protein Kinase A. *J Biol Chem* 281: 31202-31211, 2006.