

dc_894_14

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

**REVERZIBILIS FEHÉRJE FOSZFORILÁCIÓ ÉS FEHÉRJE-FEHÉRJE
KÖLCSÖNHATÁSOK TÜDŐ ARTÉRIA ENDOTÉL SEJTEKBEN**

CSORTOS CSILLA



**DEBRECENI EGYETEM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR**

ORVOSI VEGYTANI INTÉZET

DEBRECEN, 2014

dc_894_14

TARTALOMJEGYZÉK

BEVEZETÉS	9
1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	10
1.1 Az endotél barrier	10
1.1.1 <i>Az endotél permeabilitás és mediátorai</i>	<i>11</i>
1.1.2 <i>Az EC citoszkeleton</i>	<i>12</i>
1.1.3 <i>Az EC sejtkapcsoló struktúrái</i>	<i>13</i>
1.2 Fehérjék reverzibilis foszforilációja	15
1.2.1 <i>Protein kinázok</i>	<i>16</i>
1.2.2 <i>Protein foszfatázok</i>	<i>17</i>
1.2.2.1 <i>Ser/Thr-specifikus protein foszfatázok</i>	<i>18</i>
1.2.2.1.1 <i>Protein foszfatáz 1</i>	<i>19</i>
1.2.2.1.2 <i>Protein foszfatáz 2A</i>	<i>20</i>
1.2.2.1.3 <i>Protein foszfatáz 2B</i>	<i>22</i>
1.3 Reverzibilis fehérje foszforiláció az endotél barrier szabályozásában	22
1.3.1 <i>Az endotél miozin könnyűlánc kináz</i>	<i>23</i>
1.3.2 <i>Miozin foszfatáz az endotél sejtekben</i>	<i>24</i>
1.3.2.1 <i>A MYPT fehérjecsald</i>	<i>25</i>
1.3.3 <i>Protein foszfatáz 2A és a citoszkeleton</i>	<i>27</i>
1.3.4 <i>Sejtkapcsoló fehérjék és a PPP foszfatázok</i>	<i>28</i>
1.4 Adaptor fehérjék	29
1.4.1 <i>RACK1</i>	<i>29</i>
1.4.2 <i>NHERF1/EBP50 és NHERF2 fehérjék</i>	<i>30</i>
1.4.3 <i>Az ERM fehérjék</i>	<i>32</i>
2. CÉLKITŰZÉSEK	33
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	35
3.1 Pufferek, oldatok	35
3.2 Sejtvonalak	35
3.2.1 <i>Sejtek szinkronizálása</i>	<i>36</i>
3.3 DNS könyvtárszűrés	36
3.4 DNS konstruktok előállítása	36
3.5 Rekombináns fehérjék termeltetése	36
3.5.1 <i>Rekombináns fehérjék előállítása baktériumban</i>	<i>36</i>
3.5.2 <i>Rekombináns fehérjék tranziens overexpressziója emlős sejtekben</i>	<i>37</i>
3.5.3 <i>Bakulovírus és adenovírus expressziós rendszerek</i>	<i>37</i>
3.5.3.1 <i>MLC és MLCK bakulovírus expressziója</i>	<i>37</i>

3.5.3.2	<i>PP2A alegységek és aktív MYPT1 expressziója adenovírus expressziós rendszerrel</i>	38
3.6	Fehérjék sejten belüli lokalizációjának vizsgálata	38
3.6.1	Immunfluoreszcens vizsgálatok	38
3.6.2	Immunhisztokémia	39
3.6.3	Sejtfractionálás	39
3.7	In vitro kináz és foszfatáz reakciók	40
3.7.1	MLCK aktivitás mérése	40
3.7.2	Foszforilált fehérjék előállítása	40
3.7.3	Protein foszfatázok aktivitás mérése	41
3.7.3.1	<i>Protein foszfatáz 2A</i>	41
3.7.3.2	<i>TIMAP-PP1c</i>	41
3.8	Fehérje elválasztás és detektálás	41
3.8.1	Urea gélelektroforézis	41
3.8.2	SDS-PAGE és Western blot	41
3.9	Fehérje csendesítés	42
3.10	Fehérje kölcsönhatások tanulmányozása	42
3.10.1	GST pull-down	42
3.10.2	Anti-V5 agaróz affinitás kromatográfia	43
3.10.3	Immunprecipitáció	43
3.10.4	Felületi plazmon rezonancia	43
3.10.5	LC-MS/MS analízis	44
3.11	Endotél sejtek ECIS vizsgálatai	45
3.12	Matrigel vizsgálat	45
3.13	Statisztikai analízis	46
4.	EREDMÉNYEK	47
4.1	Reverzibilis fehérje foszforiláció az endotél sejtek citoszkeleton szerkezetének és barrier funkciójának szabályozásában	47
4.1.1	Az endotél miozin könnyűlánc kináz	47
4.1.1.1	<i>Az endotél miozin könnyűlánc kináz tirozin oldalláncon foszforilálódik</i>	47
4.1.1.2	<i>Az MLCK variánsok szabályozása eltérő</i>	49
4.1.2	Protein foszfatázok az endotéliumban	52
4.1.2.1	<i>Az endotél miozin foszfatáz</i>	52
4.1.2.1.1	<i>Protein foszfatáz 1 katalitikus alegység az endotél sejtekben</i>	53
4.1.2.1.2	<i>A MYPT1 két variánsa tüdő artéria EC-ben</i>	54
4.1.2.1.3	<i>A miozin foszfatáz részvétele az EC permeabilitás szabályozásában</i> ..	57
4.1.2.2	<i>TIMAP, a protein foszfatáz 1 új regulátor alegysége</i>	60
4.1.2.2.1	<i>A PP1cβ és a TIMAP fehérje kölcsönhatása</i>	60
4.1.2.2.2	<i>A TIMAP részt vesz az EC gátfunkció szabályozásában</i>	64
4.1.2.2.3	<i>Az ERM fehérjék a PP1cβ-TIMAP szubsztrátjai</i>	64
4.1.2.3	<i>Protein foszfatáz 2A tüdő EC-ben</i>	73
4.1.2.3.1	<i>PP2A és az EC citoszkeleton</i>	73

4.1.2.3.2	<i>PP2A és az EC adherens kapcsolatok</i>	85
4.2	A protein foszfatázok és kinázok kölcsönhatásai	
	állványfehérjékkel az endotél sejtekben	87
4.2.1	<i>A RACK1 állványfehérje szerepe az EC permeabilitás szabályozásában</i>	87
4.2.1.1	<i>A RACK1 és TIMAP fehérjék kölcsönhatása</i>	87
4.2.1.2	<i>A RACK1 szerepe a TIMAP plazmamembrán lokalizációjában</i>	92
4.2.2	<i>NHERF fehérjék vizsgálata EC-ben</i>	97
4.2.2.1	<i>EBP50</i>	97
4.2.2.1.1	<i>Az EBP50 sejtciklus függő lokalizációja EC-ben</i>	97
4.2.2.1.2	<i>A PP2A és az EBP50 kölcsönhatása</i>	101
4.2.2.2	<i>NHERF2</i>	103
4.2.2.2.1	<i>Az ERM kölcsönhatása az NHERF fehérjékkel EC-ben</i>	103
4.2.2.2.2	<i>Az NHERF2 szerepe az ERM foszforilációjában</i>	104
4.2.2.2.3	<i>Az NHERF2 segíti az EC szétterülését (spreading) és az angiogenezist</i>	108
5.	MEGBESZÉLÉS	111
5.1	Az MLC reverzibilis foszforilációja az EC-ben	111
5.2	A protein foszfatáz 2A szerepe az endotél barrier szabályozásában	114
5.3	A TIMAP fehérje az EC barrier fenntartását segíti	118
5.4	NHERF fehérjék az EC-ben	123
5.5	Az eredmények lehetséges hasznosítása	127
6.	ÖSSZEFOGLALÁS	129
7.	IRODALOMJEGYZÉK	131
8.	KÖZLEMÉNYEK	146
8.1	Az értekezés alapjául szolgáló közlemények	146
8.1.1	<i>Az értekezést megalapozó összefoglaló közlemény</i>	146
8.1.2	<i>Az értekezést megalapozó kísérletes közlemények</i>	146
8.2	További publikációk	148
	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	151

RÖVIDÍTÉSEK

ALI	acute lung injury/akut tüdő sérülés
ANK	ankyrin
ARDS	acute respiratory distress syndrome/akut respirációs distressz szindróma
ATCC	American Type Culture Collection
BPAEC	bovine pulmonary artery endothelial cells/marha tüdő artéria endotél sejt
Cdk1	cyclin dependent kinase 1/ciklin függő kináz 1
CPI-17	PKC potentiated inhibitory protein of 17 kDa/PKC-vel aktiválódó 17 kDa-os inhibitor fehérje
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole/4',6-diamidino-2-fenil-indol
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium/Dulbecco-féle módosított Eagle médium
DMSO	dimethyl sulfoxide/dimetil szulfoxid
EBP50	ERM binding phosphoprotein of 50 kDa/ERM-hez kötődő 50 kDa-os foszfofehérje
EC	endothelial cell/endotél sejt
ECACC	European Collection of Cell Cultures
ECIS	Electric Cell-substrate Impedance Sensing
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid/etilén-diamin-tetraacetát
EGTA	ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid/etilén-glikol-bisz-(2-amino-etil-éter)-N,N,N',N'-tetraacetsav
ERM	ezrin-radixin-moesin/ezrin-radixin-moezin
FBS	fetal bovine serum/magzati borjúsérum
FT	farnesyl transferase/farnezil transzferáz
GFP	green fluorescent protein/zölden fluoreszkáló fehérje
GSK3 β	glycogen synthase kinase 3 β /glikogén szintetáz kináz 3 β
GST	glutathione S-transferase/glutathion S-transzferáz
HA-tag	hemagglutinin tag

dc_894_14

HEAT	Huntingtin, elongation factor 3, protein phosphatase 2A, yeast kinase TOR1
HEK	human embrionic kidney/humán embrionális vese
His-tag	polyhistidine tag/polihisztidin tag
HLMVEC	human lung microvascular endothelial cells/humán tüdő mikrovaszkuláris endotél sejt
HSP	heat shock protein/hősokk fehérje
HPAEC	human pulmonary artery endothelial cells/humán tüdő artéria endotél sejt
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells/humán köldökvéna endotél sejt
LAMR1	non-integrin laminin receptor 1
LC-MS/MS	liquid chromatography-tandem mass spectrometry/folyadék kromatográfia-tandem tömegspektrometria
MAPK	mitogen-activated protein kinase/mitogén-aktivált protein kináz
MEM	minimum essential medium/Eagle-féle médium
MLC	myosin light chain/miozin könnyűlánc
MLCK	myosin light chain kinase/miozin könnyűlánc kináz
myc	myconcogene
MYPT	myosin phosphatase target subunit/miozin foszfatáz regulátor alegység
ND	nokodazol
NHERF	Na ⁺ /H ⁺ exchanger regulatory factor/ Na ⁺ /H ⁺ cserélő (NHE3) szabályozó faktora
NLS	nuclear localization signal/magi lokalizációs szignál
OA	okadaic acid/okadánsav
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis/poliakrilamid gélelektroforézis
PBS	phosphate buffered saline/foszfáttal pufferolt sóoldat
PDZ	PSD-95 (post-synaptic density protein 95 kDa)-Dlg (Drosophila discs large protein)-ZO1 (zonula occludens 1)
PKA	protein kinase A/protein kináz A (cAMP függő protein kináz)
PKC	protein kinase C/protein kináz C

dc_894_14

PMA	phorbol 12-myristate 13-acetate/forbol-12-mirisztát-13-acetát
PMSF	phenylmethylsulphonyl fluoride/fenil-metil-szulfonil-fluorid
PP1	protein phosphatase 1/protein foszfatáz 1
PP1c	protein foszfatáz 1 enzim C, katalitikus alegysége
PP2A	protein phosphatase 2A/protein foszfatáz 2A
PP2Ac	protein foszfatáz 2A C, katalitikus alegysége
PP2Aa	protein foszfatáz 2A A, szerkezeti alegysége
PP2Ab	protein foszfatáz 2A B, regulátor alegysége
PP2B	protein phosphatase 2B/protein foszfatáz 2B
PPP	phosphoprotein phosphatase/foszfoprotein foszfatáz
RACK1	receptor for activated C kinase 1/aktivált protein kináz C receptora
ROCK	Rho-associated protein kináz/Rho-asszociált protein kináz
RU	response unit/SPR válasz egység
SPR	surface plasmon resonance/felületi plazmon rezonancia
SDS	sodium dodecil sulfate/nátrium-dodecil-szulfát
TER	transendothelial electrical resistance/transzendentél elektromos ellenállás
TGF- β 1	transforming growth factor β 1/transzformáló növekedési factor β 1
TIMAP	TGF- β 1 inhibited membrane associated protein/ TGF- β 1gátolt membrán-asszociált fehérje
TBS	Tris buffered saline/Tris-szel pufferolt sóoldat
Tris	tris-(hydroxymethyl)-aminomethane/trisz-(hidroximetil)-amino-metán
VEGF	vascular endothelial growth factor/vaszkuláris endoteliális növekedési faktor
WD	triptofán-aszpartát
WT	wild type/vad típusú

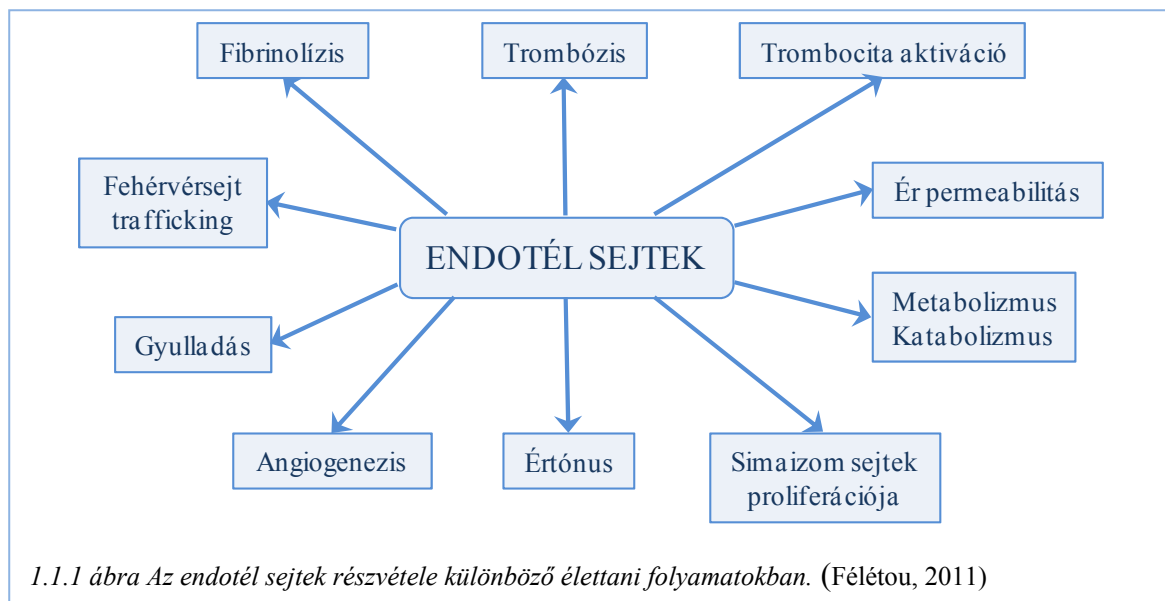
BEVEZETÉS

A vaszkuláris tüdő endotélium a keringő vér és a környező szövetek közötti szelektív gátként (barrier) működik. Számos betegségben megfigyelhető az endotél barrier sérülése, illetve a gátfunkció működési zavara, mint például gyulladásos folyamatok, trauma, szepszis, diabetes mellitus, trombózis, vagy metasztatikus tumorok képződése során. A tüdő érrendszerének rendkívül nagy felülete miatt a tüdő endotélium által fenntartott egyensúly a lumen és az interstícium között nagyon érzékeny az endotél permeabilitás dinamikus változásaira. Így például akut tüdőszindróma (ALI) és akut respirációs distressz szindróma (ARDS) kialakulásakor az endotélium sérülése következtében az alveolusok nem képesek az oxigén-széndioxid cserére, valamint a kapillárisok és szövetek közötti folyadékcsere zavara miatt ödéma alakul ki. Az erek szivárgása a szerv funkció vesztese/csökkenése mellett farmakokinetikai szempontból is negatív hatású. A terápiás célra alkalmazott gyógyszerek a megnövekedett érpermeabilitás miatt felhalmozódnak az intersticiális térben, ezzel egyrészt toxicitásuk emelkedhet, másrészt hatékonyságuk viszont csökken. Az endotél sejtek barrier formáló és az endotél permeabilitást szabályozó képessége függ a sejtek alakjától, egymáshoz és az extracelluláris mátrixhoz való kapcsolódásuktól. A vaszkuláris endotélium jól működő barrier funkciója az endotél sejtekben fellépő kontraktilis és feszítő erők egyensúlyát jelzi. A funkció sérülése, az egyensúly eltolódása a kontraktilis erők irányába az endotél sejtek közötti rések kialakulásához, az endotélium permeabilitásának megnövekedéséhez vezet. A citoszkeleton három fő komponensének - F-aktin, mikrotubulusok és intermedier filamentumok - dinamikus változásokra képes szerkezete az endotél permeabilitás szabályozásának egyik kulcsfaktora, mivel az EC citoszkeleton szerkezete és fehérje kölcsönhatásai fontos szerepet játszanak az endotél sejtek integritásának megtartásában. A citoszkeletonnal asszociálódó fehérjék protein kinázok és protein foszfatázok által történő reverzibilis foszforilációja a citoszkeleton szerkezetét és fehérje-fehérje kölcsönhatásait befolyásolja, ezzel az endotél sejtek barrier funkciójának szabályozásában is kitüntetett szerepe van. Az értekezésben összefoglalt munka alap kutatás, melynek során tüdő artéria endotél sejt modell rendszeren tanulmányoztuk a reverzibilis fehérje foszforilációt katalizáló néhány kináz és foszfatáz tulajdonságait, azok regulációját és fehérje kölcsönhatásait, hogy az endotél sejtek egyik legfontosabb élettani funkciója, az endotél barrier/gát funkció szabályozási lehetőségeiről új ismereteket szerezzünk.

1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1.1 Az endotél barrier

Az endotél sejtek (EC) az erek belső falán egy dinamikus, szemiszelektív réteget, „monolayer” képeznek, és szabályozzák a folyadék és a makromolekulák átjutását a véráram és a környező szövetek között, ezért az EC barrier fenntartása a szervek megfelelő működésében rendkívül fontos [1]. Az endotél sejtek heterogének, makro- és mikrokörnyezetüknek megfelelően morfológiájuk, egymáshoz való illeszkedésük és élettani funkciójuk különbözhet [2, 3]. A vaszkuláris endotélium heterogenitását *in vivo* fág bemutató módszerrel molekuláris szinten is igazolták, de annak funkcionális jelentősége még sok kérdésben tisztázatlan [4]. Az érpermeabilitás szabályozásán túl számos fiziológiás és patológiás folyamatban ismerték fel jelentőségüket, mint például az angiogenezis és a gyulladás, de immunológiai folyamatok szabályozásában is részt vesznek (1.1.1 ábra) [3, 5].

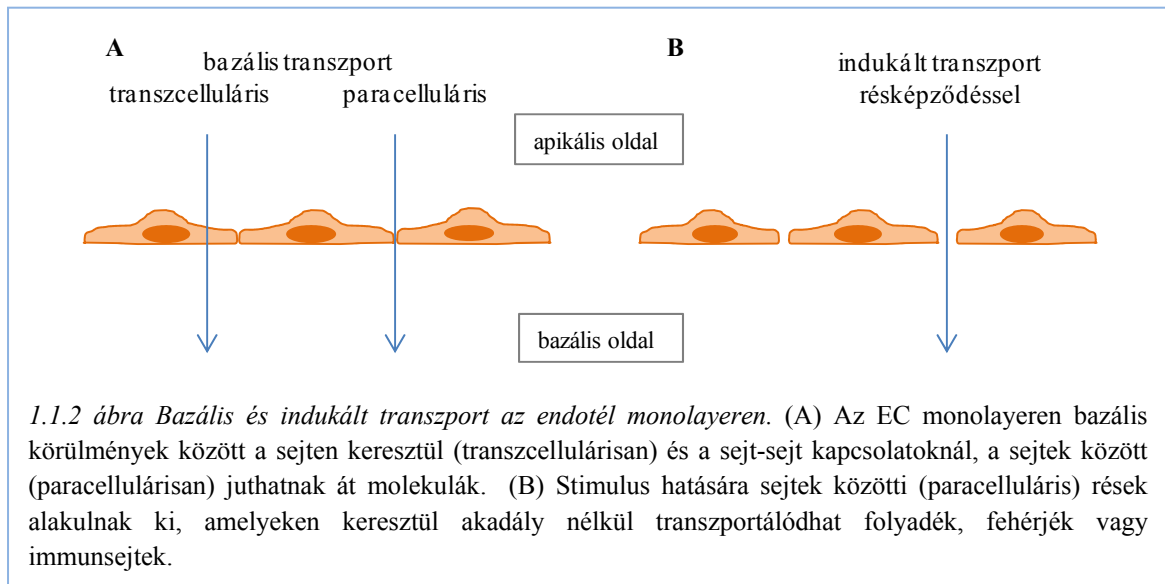


A különböző szervekben és szövetekben, sőt még azonos szervben belül is, az érrendszer egyes szakaszain az endotélium barrier integritása és helyspecifikus funkciója eltérő lehet [6, 7]. A tüdő endotélium permeabilitása, például albuminra vagy szacharózra a kisebb átmérőjű erekben (<30 μ m) kisebb, mint az artériákban. A mikrovaszkuláris EC szorosabb sejt kapcsolatai és az azokhoz köthető membrán adhéziós helyek száma is nagyobb [8, 9]. Az EC monolayer transzendotél elektromos ellenállás (TER) értéke fordítottan arányos a monolayer permeabilitásával, nagyobb TER kisebb permeabilitást jelez. Az előzőekkel összhangban, primer mikrovaszkuláris EC monolayer TER értéke

~10-szer nagyobb, mint a makrovaszkuláris sejteké [10]. A mikrovaszkuláris EC izolálásának és tenyésztésének technikai nehézségei miatt azonban az EC barrier *in vitro* vizsgálatai túlnyomóan makrovaszkuláris EC-n folytak/folynak.

1.1.1 Az endotél permeabilitás és mediátorai

Az EC permeabilitás lehet bazális, vagy valamilyen fizikai, gyulladásos vagy bioaktív stimulus által indukált folyamat. Normál fiziológias körülmények között az endotélium szabályozza más sejtek (pl. leukociták), a folyadék és a makromolekulák/fehérjék áthaladását a monolayeren, ezzel homeosztázist tart fenn a vér és az interstitium között. A kisebb molekulák és ionok (<3 nm) passzív transzportja az EC monolayeren paracellulárisan történik, a makromolekulák/fehérjék pedig transzcéluláris úton transzportálódhatnak (1.1.2 ábra, A) [1]. A 3 nm-nél nagyobb molekulák, albumin és más plazmafehérjék szállítása a vérből az interstitiumba kaveolák, vezikuláris szállítók, révén történik az EC monolayeren keresztül [1]. A kaveolák szerkezetének elsődleges fehérje összetevője a kaveolin-1, amelynek Tyr oldalláncon történő, Src-függő foszforilációja szabályozza a kaveolák kialakulását és ezzel magát a transzportot is [11]. A folytonos és fenesztrált endotélium szelektív barrier funkcióval rendelkezik a makromolekulák transzportjára, a diszkontinuus endotélium nem [11].



Külső vagy belső stimulus, mint pl. akut vagy krónikus gyulladás, angiogenezis vagy tumor metastasis esetén, illetve különböző bioaktív mediátorok (hisztamin, trombin, citokinek, növekedési faktorok) hatására a permeabilitás megnövekszik. Akut tüdőszérülés (ALI) és akut respirációs distressz szindróma (ARDS) esetén az endotél barrier funkció

sérül, az endotél monolayer sejtjei összehúzódnak, a sejtkapcsolatok lazulnak, vagy időlegesen megszűnnek, és a sejtek között rések alakulnak ki, amelyeken keresztül a vérben oldott anyagok, plazmafehérjék és immunsejtek paracelluláris átjutása megtörténhet (1.1.2 ábra, B) [1, 12]. ALI-val vagy ARDS-sel diagnosztizált betegekben a koagulációs útvonalak, a szerin proteáz trombin és proteáz aktivált receptora (PAR-1) patológiásan aktiválódnak, ezáltal a tüdő paracelluláris permeabilitása megnő [13]. Ezért az EC barrier vizsgálataiban a trombin egy gyakran alkalmazott barrier diszfunkciót kiváltó ágens. A mikrotubulusokat destabilizáló szintetikus anyagról, a nokodazolról ugyancsak kimutatták, hogy az EC permeabilitását növeli [14]. A lipid mediátor szfingozin 1-foszfát, az angiopoetin-1, a cAMP, az ATP és az adozin viszont erősítik az endotél barriert [15]. Ezért feltételezhető, hogy az endotél permeabilitásában bekövetkező eltérések az ellentétesen ható endogén mediátorok aktuális egyensúlyát tükrözik.

Az endotél sejtek citoszkeleton szerkezete és a sejtek közötti kapcsoló régiók fontos szerepet játszanak az endotél barrier kialakulásában és fenntartásában, valamint a paracelluláris permeabilitás szabályozásában [16].

1.1.2 Az EC citoszkeleton

A mikro- és intermedier filamentumok és a mikrotubulusok - az EC citoszkeleton elemei - biztosítják a sejtek alakját, mechanikai szilárdságát, polaritását és mozgását. Mindhárom fehérje monomerekből felépülő polimer, melyek szabályozott, gyors átalakulásra képesek. Az EC citoszkeleton stabilitása és dinamikus át/újrarendeződése befolyásolja az endotél sejtek alakját és mobilitását, ezzel a monolayer integritását, illetve különböző stressz hatásokra adott válaszát is.

Az aktin filamentumok és az EC permeabilitás közötti kapcsolatot már viszonylag korán felismerték [16]. Endotél sejt-kultúra kezelése az aktin citoszkeleton szerkezetét módosító ágensekkel megváltoztatta a permeabilitást. A mikrofilamentumok felbomlását okozó citokalazin D az EC monolayer permeabilitását többszörösére növelte [17]. Trombin kezelés következtében is átrendeződik az aktin citoszkeleton, a kortikális aktin mennyisége csökken és stresszkábelek alakulnak ki, ami együtt jár a monolayer permeabilitásának emelkedésével. Az F-aktint stabilizáló fallacidinnel előkezelt EC-n azonban mérsékeltebb trombin hatást mutattak ki [18, 19]. Az endotél sejtek alakváltozásának (kontrahált-relaxált) és motilitásának egyik fő molekuláris motorja az aktinnal asszociálódó miozin II, ami két nehézláncból (200-204 kDa) és a

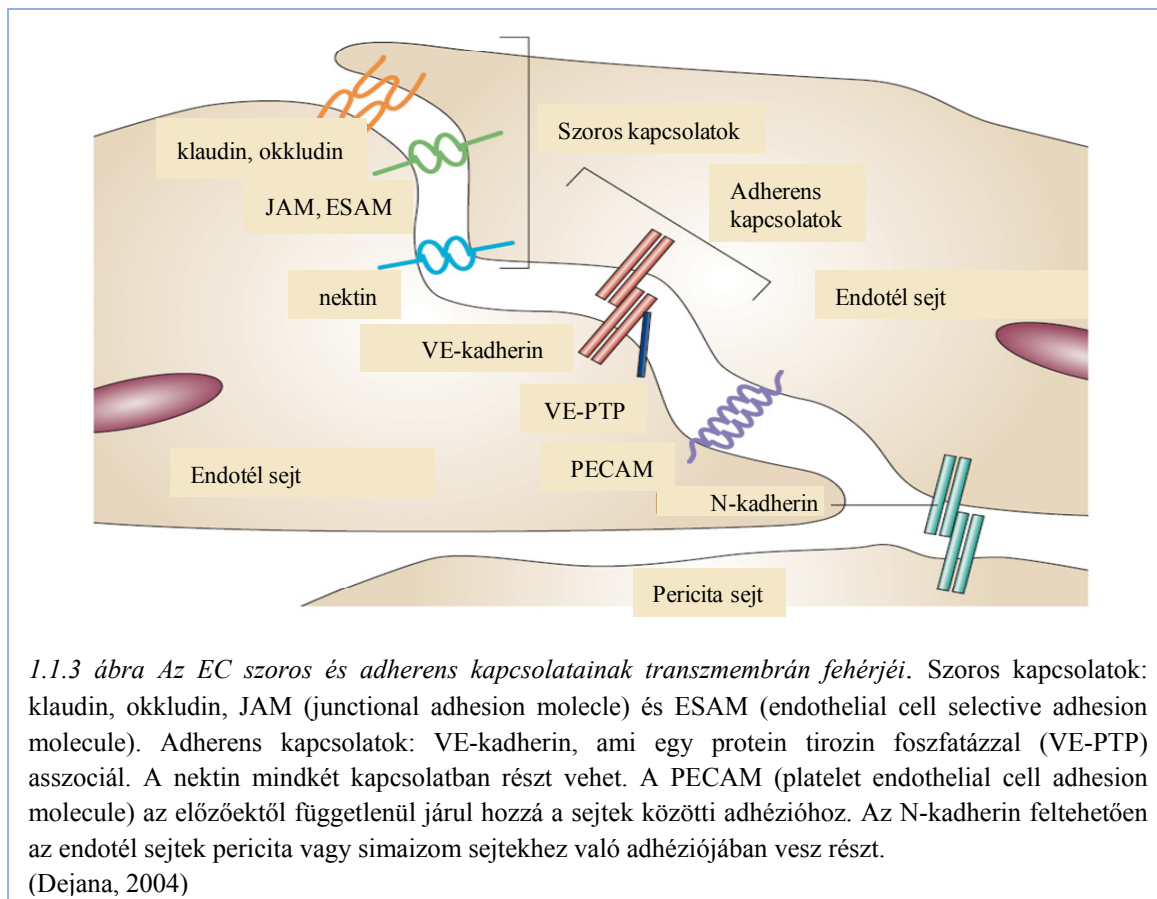
nehézláncokhoz kapcsolódó két-két könnyűláncból (17 kDa és 20 kDa) álló komplex. Az aktin citoszkeleton szerkezetének fenntartásában, illetve átrendeződéseiben még számos további szabályozott fehérje-fehérje kölcsönhatás is szerepet játszik [12].

Az intermedier filamentumok és a mikrotubulusok szerepe az endotél barrier funkciójában kevésbé ismert [12, 16]. Az intermedier filamentumok fehérjei polimerizációjuk során először dimereket képeznek. Endotél sejtekben elsődleges fehérje komponensük a vimentin, ami egy foszforilálható fehérje. Az EC permeabilitás a mikrotubulusok stabilitásával együtt változik: a mikrotubulus rendszer felbomlását kiváltó nokodazol vagy vinblastin kezelések következtében az aktin citoszkeleton szerkezete megváltozik és nő a permeabilitás, amit a mikrotubulusokat stabilizáló paclitaxel mérsékel [14, 20]. A mikrotubulusok endotél barrierre kifejtett hatásának pontos mechanizmusa ugyan még nem ismert, de az eredmények a mikrofilamentumok és a mikrotubulusok közötti párbeszéd lehetőségére utalnak.

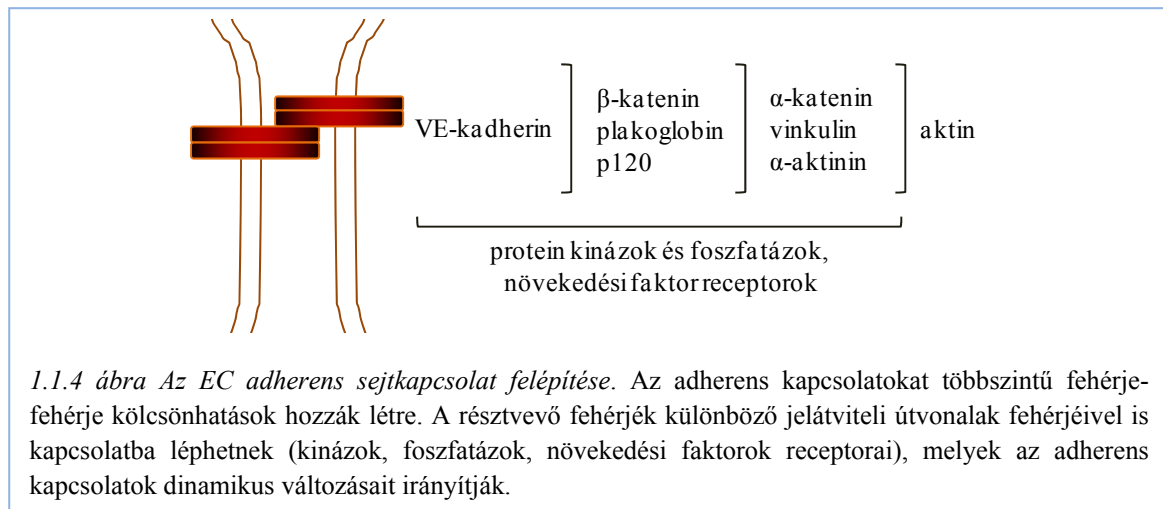
1.1.3 Az EC sejtkepcsoló struktúrái

A vaszkuláris endotél sejtek közötti rés (gap), adherens és szoros sejtkepcsoló struktúrák működnek, melyek közül a paracelluláris permeabilitásban az utóbbi kettőnek van jelentősége, a réskapcsolatok pedig ionok és kisméretű molekulák endotél sejtek közötti átjutását segítő csatornák. Míg az epitél sejtek között a szoros-, az endotél sejtekben az adherens kapcsolatok túlsúlyban, de arányuk a szervezeten belül helyspecifikusan változó lehet [1, 21]. A kepcsoló struktúrák transzmembrán és citoplazmatikus összetevőkből állnak, de a különböző kepcsolatokat felépítő fehérjék eltérőek. A szomszédos sejtek transzmembrán fehérjei homofil, cipzárszerű kepcsolatokat alakítanak ki (1.1.3 ábra).

Az EC adherens kepcsolatait elsősorban a sejtek kepcsolódásának kialakulásáért és fenntartásáért tartják felelősnek, a szoros kepcsolatok pedig a makromolekulák és a fehérjék szabad mozgásával szemben képeznek gátat [22]. A transzmembrán fehérjék további specifikus intracelluláris kölcsönható partnereken keresztül az aktin citoszkeletonhoz horgonyzódnak, ami stabilizálja a sejtkepcsolatokat, de azok nyitását-zárását is szabályozza [23, 24]. A szoros kepcsolatok partnerei a citoszolban többek között a ZO (zonula occludens) és a MAGUK (membrane associated guanylate kinase) fehérjecsaládok tagjai.



Az EC adherens kapcsolataiban egy specifikus kadherin, a VE (vascular endothelial)-kadherin transzmembrán fehérje található, ami minden ér- és endotél sejttípusban jelen van [23, 25]. A VE-kadherin extracelluláris részén öt egymást követő kadherin-domén van, melyek Ca^{2+} -ion megkötése után a sejt-sejt kontaktus kialakításában vesznek részt [26]. A molekula C-terminális, intracellulárisan elhelyezkedő része kötődik elsődleges intracelluláris partnereihez (β -katenin, plakoglobin és p120), amelyek további aktin-kötő fehérjékkel kapcsolódhatnak (1.1.4 ábra) [22]. A VE-kadherin mutáns formáival végzett vizsgálatok igazolták esszenciális szerepét nemcsak az adherens kapcsolatok, de a megfelelő EC barrier funkció kialakításában is [27, 28]. A kateninek is fontos szerepet játszanak az adherens kapcsolatokban. A β -katenin kondicionális inaktiválása EC-ben például jelentősen csökkentette a sejtkapcsolatok kialakulását [29], a β -katenin kötésében jelentős citoszolikus részén rövidített (trunkált) VE-kadherin gén kifejeződése egérben pedig letális volt [30].



1.2 Fehérjék reverzibilis foszforilációja

Az EC citoskeletonja és sejt kapcsoló struktúrái fehérje-fehérje kölcsönhatásai révén számos jelátviteli útvonallal vannak szoros kapcsolatban, melyek kialakulásukat, stabilitásukat és dinamikus átrendeződésüket szabályozzák. Ezen jelátviteli pályák szerves része a reverzibilis fehérje foszforiláció Ser-, Thr-, illetve Tyr-oldalláncokon, ami az eukarióta sejtekben lezajló biokémiai folyamatok szabályozásában egy alapvető jelentőségű poszttranszlációs fehérje módosítás. A protein kinázok az ATP γ -foszfát-csoportját a fehérje specifikus aminosav oldalláncjaihoz kapcsolják kovalens kötéssel. A foszfát csoport eltávolítását a protein foszfatázok katalizálják. Ez a reverzibilis fehérje módosítás befolyásolja a fehérjék biológiai aktivitását, a negatív töltésű foszfát csoport jelenléte vagy hiánya ki-bekapcsoló szignálként működik. A fehérjék foszforiláltsági szintjét az adott fehérjére specifikus kináz(ok) és foszfatáz(ok) aktivitásának aránya határozza meg, amelyeket különböző jelátviteli pályák szabályoznak, sok esetben további kinázok és foszfatázok részvételével.

A humán genom mintegy ~500 protein kinázt kódol, amelyek közül ~400 Ser/Thr-oldalláncokra specifikus vagy kettős specifitású (Ser/Thr- és Tyr-oldalláncokat is foszforilál), míg a maradék ~90-100 kináz pedig Tyr-oldalláncokra specifikus. A protein foszfatázok száma jelentősen alacsonyabb (~100), amiből a foszfo-Ser/Thr-oldalláncokra specifikus katalitikus alegységek száma mindössze 15 [31]. A Ser/Thr-specifikus enzimek számában mutatkozó jelentős eltérés a két enzimes család között a kinázok és foszfatázok különböző szerkezeti felépítésével és az ebből fakadó eltérő szabályozásukkal magyarázható. Míg a protein kinázok szerkezeti felépítése, aktív centruma és működési

mechanizmusuk meglehetősen hasonló, a különböző protein foszfatáz típusok egymástól eltérő szerkezettel és aktív centrummal bírnak, valamint számos esetben szabályozó alegységekkel kombinálódnak, ennek megfelelően a hidrolízis mechanizmusa is különbözik [32, 33].

1.2.1 Protein kinázok

A protein kinázok gyakran monomer enzimek, amelyek szerkezetében az aktivitásért felelős katalitikus domén mellett további, a kináz működését szabályozó domének vannak jelen. A katalitikus domén 250-300 aminosavból áll, ezen belül további 12 konzervált szub-domént azonosítottak. Elnevezésük gyakran szubsztrátjukra vagy aktiválási mechanizmusukra utal. A protein kinázokat csoportosíthatjuk aszerint, hogy a foszfátcsoportot a szubsztrát fehérje alkoholos, fenolos vagy mindkét típusú hidroxil csoportjához képesek hozzáilleszteni. Így megkülönböztetünk Ser/Thr-, Tyr- és kettős specificitású protein kinázokat. Továbbá megkülönböztetünk receptor kinázokat és nem receptor kinázokat. Másik osztályozásuk a katalitikus domének aminosav szekvenciájának összehasonlításán alapul (1.2.1 táblázat) [34]. Újabb, szintén szekvencia-homológián alapuló osztályozás a katalitikus doménon kívüli további kináz domének közötti homológiát is vizsgálja a humán genom 518 fehérje kináz gén szekvenciáját felhasználva [35].

1.2.1 táblázat. A protein kinázok klasszikus felosztása

Csoport	Néhány alcsoport	Képviselők
1. AGC	ciklikus nukleotid függő protein kináz	PKA, PKG
	protein kináz C	PKC (klasszikus és új)
	G-fehérjéhez kötött receptorok kinázai	β ARK, GRK5,6
2. CaMK	Ca ²⁺ /kalmodulin szabályozott és rokon kinázok	Ca ²⁺ /kalmodulin függő kináz, foszforiláz kináz miozin könnyűlánc kináz
3. CMGC	ciklin dependens kinázok	Cdk1-6
	Erk (MAP) kinázok	Erk1-3
	glikogén szintetáz kináz 3	GSK3 α és β
4. konvencionális tirozin kinázok	Src	Src, Yes, Lyn, Lck
	Abl	Abl, Arg
	Jak	Jak1-3

Az alcsoportok és képviselők tekintetében jelentősen redukált csoportosítás Hanks és Hunt (1995) 1. táblázata alapján készült.

Az 1.2.1 táblázatban felsorolt négy kinázcsoportból mindössze néhány, az értekezésben jelentőséggel bíró kináz kerül említésre.

Az AGC csoport neve két ciklikus nukleotid függő enzim, a PKA és PKG, valamint a PKC család jelentős képviselőire utal. Tagjai jellemzően olyan Ser/Thr-oldalláncokat foszforilálnak, amelyek bázikus aminosavak, Arg és Lys, közelében találhatóak a szubsztrát szekvenciájában. A PKA két katalitikus és két gátló regulátor alegységből álló tetramer. Ha az intracelluláris cAMP szintje megnő, a cAMP kötődik a regulátor alegységekhez, ezáltal az enzimkomplexből a katalitikus alegység disszociál és felszabadul a gátlás alól.

A Ca^{2+} /kaldmodulin függő protein kinázok (CaMK) szintén bázikus aminosavak közelében foszforilálják szubsztrátjukat. Ezeket a kinázokat a Ca^{2+} /kaldmodulin kötődése aktiválja egy, a katalitikus domén C-terminális oldalán elhelyezkedő kisméretű doménhez. A csoporthoz tartozó miozin könnyűlánc kináz katalizálja a miozin II 20 kDa-os könnyűláncának foszforilációját.

A CMGC családra jellemző, hogy Pro közelében foszforilálnak. A glikogén szintetáz kináz 3β (GSK 3β) legtöbb szubsztrátja előfoszforilált fehérje. Ez az úgynevezett „priming” hely a foszforilálandó aminosavtól 4-5 aminosav távolságban, a C-terminális irányában helyezkedik el [36].

A konvencionális Tyr kinázok családjába tartozik a Src kináz, ami egy nem-receptor tirozin kináz. Szerkezeti felépítésére jellemző, hogy a katalitikus doménjétől N-terminális irányban SH2 és SH3 domének találhatóak, melyek a kináz fehérje-fehérje kölcsönhatásaiban játszanak szerepet. Az SH2 domén pY-E-E-I motívumhoz kötődik, az SH3 esetében van variabilitás, de legjellemzőbben a PxxP motívumhoz kapcsolódik [37].

1.2.2 *Protein foszfatázok*

A protein foszfatázok három nagy csoportja eltérő géncsaládokat reprezentál [16]. A PPP (foszfoprotein foszfatáz) és PPM (fémion-függő foszfatáz) család tagjai foszfo-Ser és foszfo-Thr oldalláncokat defoszforiláló Ser/Thr-specifikus foszfatázok. A PTP, foszfo-Tyr-specifikus foszfatázok foszfo-Tyr oldalláncot defoszforilálnak. A PTP családon belüli alcsoportokhoz tartoznak a kettős specificitású protein foszfatázok is, melyek mind a foszfo-Ser/foszfo-Thr, mind a foszfo-Tyr fehérje oldalláncok defoszforilációját katalizálják [38].

1.2.2.1 Ser/Thr-specifikus protein foszfatázok

A PPP és PPM család klasszikus képviselőinek elnevezése még a Ser/Thr-specifikus protein foszfatázok biokémiai tulajdonságain alapuló osztályozásukat tükrözi. Szubsztrátspecifitásuk és inhibitor fehérjékkel való gátolhatóságuk alapján protein foszfatáz 1 (PP1) és protein foszfatáz 2 (PP2) típusokat különböztettek meg [39]. A PP2 enzimek fémion függés alapján PP2A, PP2B és PP2C altípusokat képviselnek. A PP1, PP2A és PP2B foszfatázok a PPP családba tartoznak, erősen konzervált katalitikus doménjük 40-60% azonosságot mutat. Ugyancsak ide sorolhatóak a PP4, -5, -6 és -7 protein foszfatázok. Érdekes módon a másik, PPM géncsaládhoz tartozó PP2C szekvenciája ugyan eltérő, de három-dimenziós szerkezete figyelemre méltóan hasonló a PPP család tagjainak szerkezetéhez [40].

A PPP foszfatázok sokoldalúsága több alegységből álló szerkezetüknek köszönhető. A katalitikus aktivitásért felelős alegység mellett a regulátor alegységek (R) nagyszámú, változatos méretű és szekvenciájú fehérje arzenáljából is jelen van egy vagy több a holoenzimekben. A regulátor alegységek a megfelelő helyre és/vagy szubsztrátokhoz irányítják a foszfatázt és szabályozzák aktivitásukat. Az 1.2.2 táblázat a klasszikus PPP foszfatázokról ad áttekintést [16].

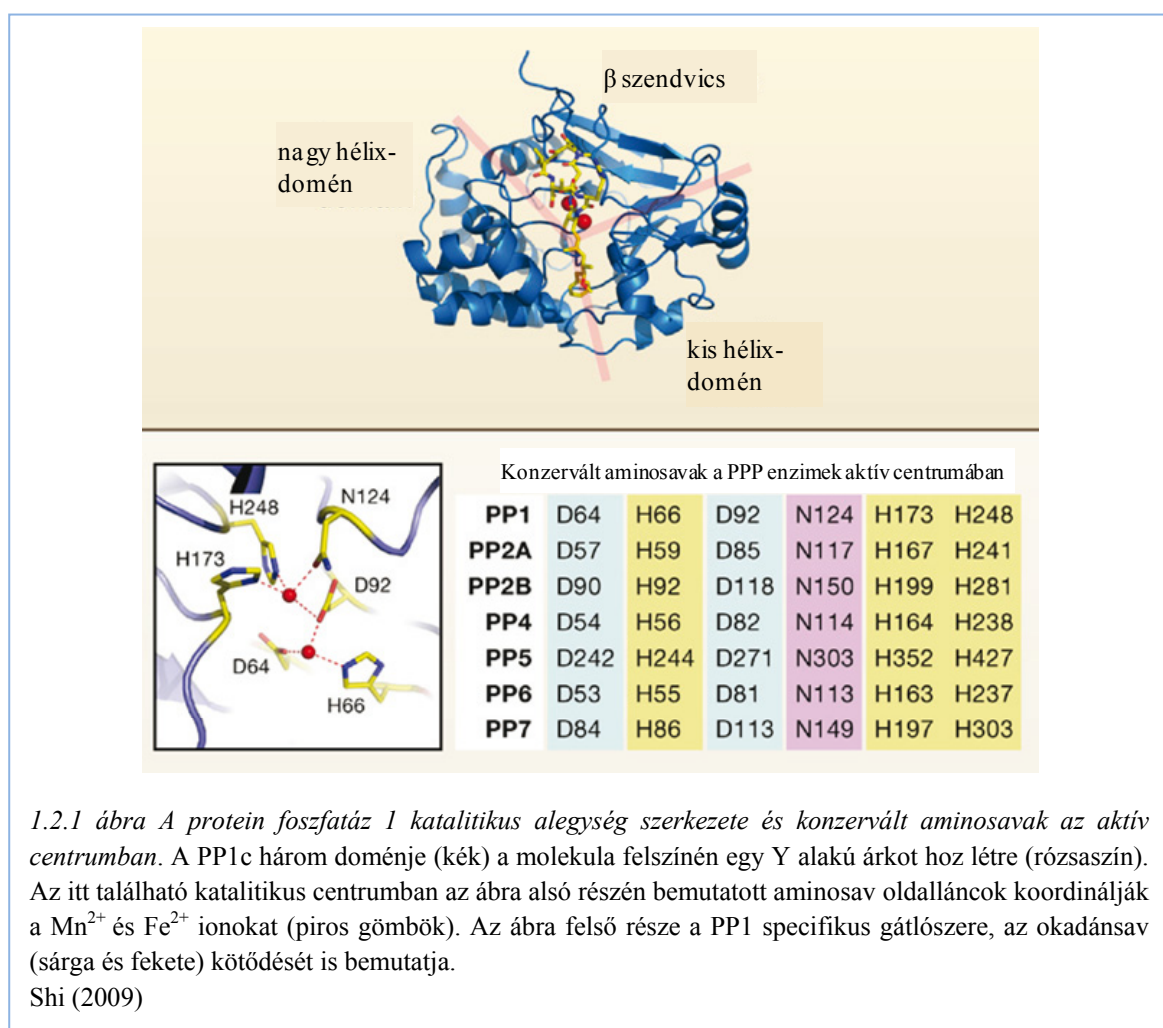
1.2.2 táblázat. A PPP foszfatázok klasszikus képviselői: alegységek, izoformák, elnevezés

	Rövidített név	Alternatív név	Izoformák	Gén (HUGO)
Protein foszfatáz 1	PP1			
<i>Katalitikus C alegység</i>	PP1c		$\alpha, \beta, \gamma 1, -2$	PPP1CA, -B, -C
<i>Regulátor alegységek (válogatás)</i>	R			
Miozin foszfatáz targeting alegység	MYPT	MBS	MYPT1, -2	PPP1R12A, -B
Miozin kötő alegység 85	MBS85	p85		PPP1R12C
Miozin foszfatáz targeting alegység	MYPT3			PPP1R16A
TGF β -gátolt membránhoz kötődő fehérje	TIMAP			PPP1R16B
Protein foszfatáz 2A	PP2A			
<i>Katalitikus C alegység</i>	PP2Ac		α, β	PPP2CA, -B
<i>A-regulátor alegység</i>	PP2Aa	PR65	α, β	PPP2R1A, -B
<i>B-regulátor alegységek</i>				
B alegység		PR52	$\alpha, \beta, \gamma, \delta$	PPP2R2A-D
B' alegység		B56	$\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon$	PPP2R5A-E
B'' alegység		PR72, PR130	α, β	PPP2R3A, -B
Protein foszfatáz 2B	PP2B			
<i>Katalitikus A alegység</i>		Kalcineurin A	α, β, γ	PPP3CA, -B, -C
<i>B regulátor alegység</i>		Kalcineurin B	α, β	PPP3R1, -2

Csontos és mtsai (2007) 1. táblázat alapján.

Az egyes PPP foszfatáz típusok *in vivo* és *in vitro* szubsztrátspecificitása különbözik, az utóbbi többnyire szélesebb, ami az enzimaktivitások vizsgálatát, megkülönböztetését megnehezíti. Az *in vitro* mérések során a foszfatáz típusok elkülönítésére specifikus gátló toxinokat alkalmaznak. Az okadánsav és a calyculin A például a PP1 és PP2A hatékony gátlószere nanomólos koncentrációban. Az okadánsav a PP2B-t csak nagyobb koncentrációban ($IC_{50}=5\mu M$) gátolja, a PP2C aktivitása pedig nem érzékeny erre a toxinra [41]. További előny, hogy az okadánsav a PP1-re ($IC_{50}=20nM$) és PP2A-ra ($IC_{50}=0,2nM$) kifejtett gátló hatása is eltérő.

1.2.2.1.1 Protein foszfatáz 1



A PP1 az egyik legkonzerváltabb eukarióta fehérje, a Ser/Thr specifikus foszfatázok egyik legjelentősebb képviselője, mely szinte valamennyi eddig vizsgált sejttípusban expresszálódik. Két α -hélix és egy β -redő találkozásánál, egy Y alakú árokban helyezkedik el az aktív centrum, amelyben két fémion, Mn^{2+} és Fe^{2+} jelenlétét detektálták.

A fémionok koordinálásában esszenciális három His, két Asp és egy Asn aminosavak a PPP család tagjaiban konzerváltak (1.2.1 ábra) [42-45].

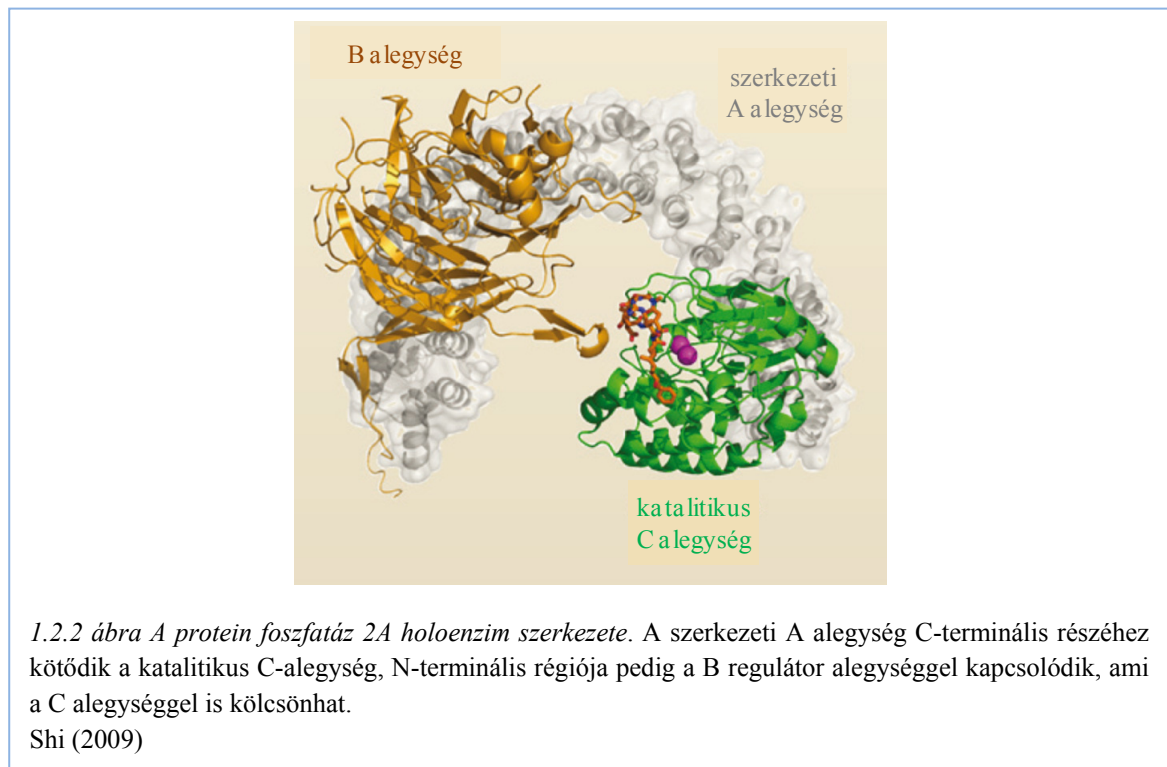
A katalitikus alegység négy izoformája (α , β vagy δ , γ_1 és γ_2 ; a β vagy δ jelölés ugyanarra az izoformára vonatkozik, a szakirodalomban mindkét jelölés használatos) [46, 47] a regulátor alegységek egy-egy csoportjához köthető. A PP1 holoenzimek többsége két alegységből álló dimer. Az egyes holoenzimekben a katalitikus és regulátor alegység közötti kölcsönhatás fontos szerepet játszik a PP1 működésében, a katalitikus aktivitás szabályozásán túl meghatározza a holoenzim más fehérjékkel való kölcsönhatását, specificitását és lokalizációját. A PP1 R alegységeinek becsült száma 50 és 100 között van. Méretük és aminosav szekvenciájuk nagyon eltérő lehet, de csaknem mindegyik szerkezetében megtalálható egy rövid motívum, (R/K)VxF, amit PP1c kötőmotívumnak nevezünk [48]. A PP1 különböző holoenzim formáinak köszönhető széles szubsztrát-specificitása révén kiemelkedően fontos szerepet játszik számos élettani folyamatban, mint például a sejtciklusban, fehérje szintézisben és apoptózisban.

1.2.2.1.2 Protein foszfatáz 2A

A Ser/Thr-specifikus foszfatázok másik legjelentősebb képviselője a PP2A, bizonyos szövetekben a sejtek teljes fehérjetartalmának akár 1%-át ez a fehérje teszi ki. A katalitikus alegység (PP2Ac) két izoformája (α és β) ismert emlős szövetekben [49]. A PP2Ac expressziója autoregulációval szabályozott folyamat, ami a fehérje mennyiségét állandó szinten tartja [50]. A PP2A a katalitikus alegység és két regulátor - A (vagy PR65) és egy B - alegység komplexéből áll. Az A alegység szerkezeti funkcióval bír, erősen kötődik a katalitikus alegységhez. Ehhez a dimerhez kapcsolódik a változatos harmadik, B alegység (1.2.2 táblázat, 1.2.2 ábra).

Emlős szövetekben az A alegység két izoformája, α és β , fordul elő, melyek elsődleges szekvenciája 86%-ban megegyezik. Northern blot vizsgálatok alapján megállapították, hogy a β izoforma expressziós szintje alacsony [51]. Humán daganatokban az A β mutáns formái jelentek meg, melyek nem tudnak kapcsolódni a PP2A C és B alegységeivel [52, 53]. Az A alegység 15 egymást követő HEAT (huntingtin-elongation-A alegység-TOR) ismétlődésből áll, a fehérje harmadlagos szerkezete aszimmetrikus és elnyújtott C betűre hasonlít [54]. Mindegyik HEAT ismétlődés két α hélixből áll. A katalitikus alegység az A alegység C-terminális végén a

11-15-ös HEAT ismétlődésekhez erősen kapcsolódik és feltételezik, hogy a katalitikus alegység a sejtekben csak az A alegységhez kötődve fordul elő (1.2.2 ábra).



A PP2A holoenzim harmadik komponense többféle molekulatömegű formában előforduló polipeptid, melyet általánosan B alegységnek neveznek. A B alegységek négy alcshaládba - B, B', B'', B''' – tartoznak, melyek képviselői különböző izoformákkal rendelkeznek, ami a lehetséges holoenzim formák számát tovább növeli [55]. Az 55 kDa-os B alegységet például eukariótákban négy gén kódolja. Az α és δ izoformák minden szövetben előfordulnak, a β és γ izoformák elsősorban az agyban találhatóak meg [56-59]. A hasonló méretű B' alegység esetében öt izoformát és számos splice variánst ismerünk emlős szövetekben [60, 61]. Míg az A alegységet a holoenzim összetartásáért tartják felelősnek, a különféle B alegységek a PP2A holoenzimek szubsztrátspecifitását és a sejten belüli lokalizációját határozzák meg. Az azonos B alcshaládba tartozó fehérjék középső része, ami az A és C alegységgel való kötődésben játszik szerepet ~80% azonosságot mutat. Az N- és C-terminális végződésük azonban jelentősen különböznek, ami a holoenzimek funkcióbeli változatosságát növeli. A sokféleség következményeként a PP2A a sejtekben nagyszámú fehérjével lép kölcsönhatásba és számos biológiai folyamatban vesz részt, többek között a sejtciklusban, a növekedésben, a hőshock válaszban, a sejtranszformációban, a DNS replikációban vagy az apoptózisban.

1.2.2.1.3 Protein foszfatáz 2B

A PP2B, vagy kalcineurin, egy Ca^{2+} /kalmodulin-függő fehérje foszfatáz, a PPP család legkevésbé variábilis tagja (1.2.2 táblázat). A PP2B az egymáshoz szorosan kapcsolódó katalitikus A alegységből (kalcineurin A) és az erősen konzervált Ca^{2+} -kötő B regulátor alegységből (kalcineurin B) áll, aminek két izoformája ugyanannak a génnek a terméke [62, 63]. A katalitikus alegység három izoformáját három különböző gén kódolja [64].

A katalitikus alegység N-terminális részén található a katalitikus domén. Ezt követi a B alegység kötéséért felelős domén, majd a kalmodulin-kötő és autoinhibitor domének. Ca^{2+} hiányában az autoinhibitor domén a katalitikus felszínhez kötődve gátolja az enzim aktivitását. A Ca^{2+} koncentráció megemelkedésével az ionok kötődnek a kalmodulinhoz és a B alegységhez, a Ca^{2+} /kalmodulin kapcsolódhat az A alegységhez, ami konformáció változást okoz, az autoinhibíció megszűnik, a foszfatáz aktiválódik [65]. A kalcineurin esszenciális a T-sejt aktivációban, az idegrendszer kifejlődésében és megfelelő működésében, de más élettani folyamatokban is leírták részvételét.

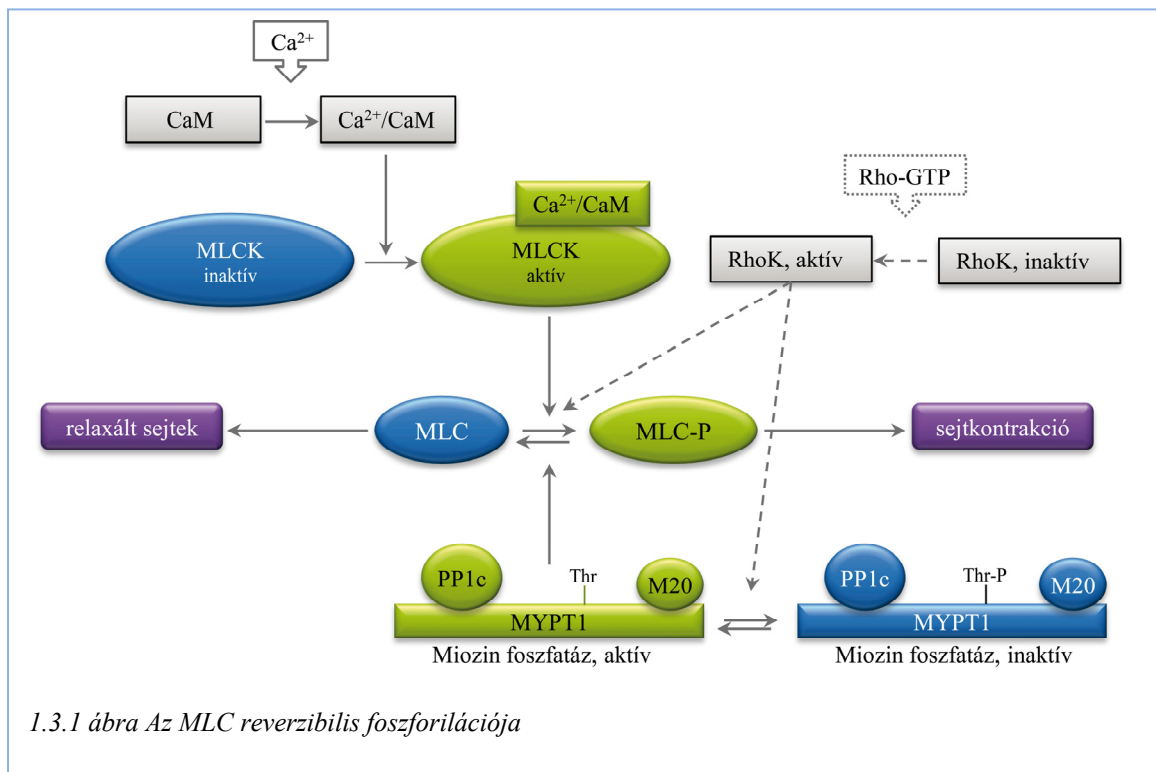
1.3 Reverzibilis fehérje foszforiláció az endotél barrier szabályozásában

A simaizom kontrakció klasszikus elmélete szerint az izomösszehúzó-dét-relaxáció a miozin II 20 kDa-os könnyűláncában (MLC) a Ser19 és Thr18 aminosavak Ca^{2+} -függő reverzibilis foszforilációjától függ. Az MLC-t a Ca^{2+} /kalmodulin (CaM)-függő miozin könnyűlánc kináz (MLCK) foszforilálja, ami aktin-miozin kölcsönhatást és sejtkontrakciót indukál nemizom és simaizom sejtekben. A Ca^{2+} -koncentráció csökkenésével a kináz-foszfatáz aktivitás arány a foszfatáz oldalára billen, az MLC-t a PP1 típusú miozin foszfatáz defoszforilálja, a sejtek relaxálnak (1.3.1 ábra).

A simaizom kontrakció a Ca^{2+} -koncentráció növekedése nélkül, ún. Ca^{2+} -érzékenyítéssel is bekövetkezhet a RhoA/Rho-kináz útvonal aktiválásával. A Rho kináz egyrészt az MLC-t, másrészt a miozin foszfatáz MYPT1 regulátor alegységének Thr696 oldalláncát foszforilálja. Ez utóbbit gátló foszforilációs helynek is nevezik, ugyanis foszforilációja a miozin foszfatáz gátlását okozza, és ezzel indirekt módon segíti az MLC foszforilációs szintjének emelkedését (1.3.1 ábra) [66-68].

Az endotél sejtek barrier funkciója, a paracelluláris rések kialakulása függ az aktin citoskeletonhoz köthető kontraktilis és adhéziós erők egyensúlyától. Ennek

szabályozásában a simaizom kontrakcióhoz hasonlóan az aktinhez asszociálódó fehérjék reverzibilis foszforilációját katalizáló protein kinázok és foszfatázok vesznek részt.

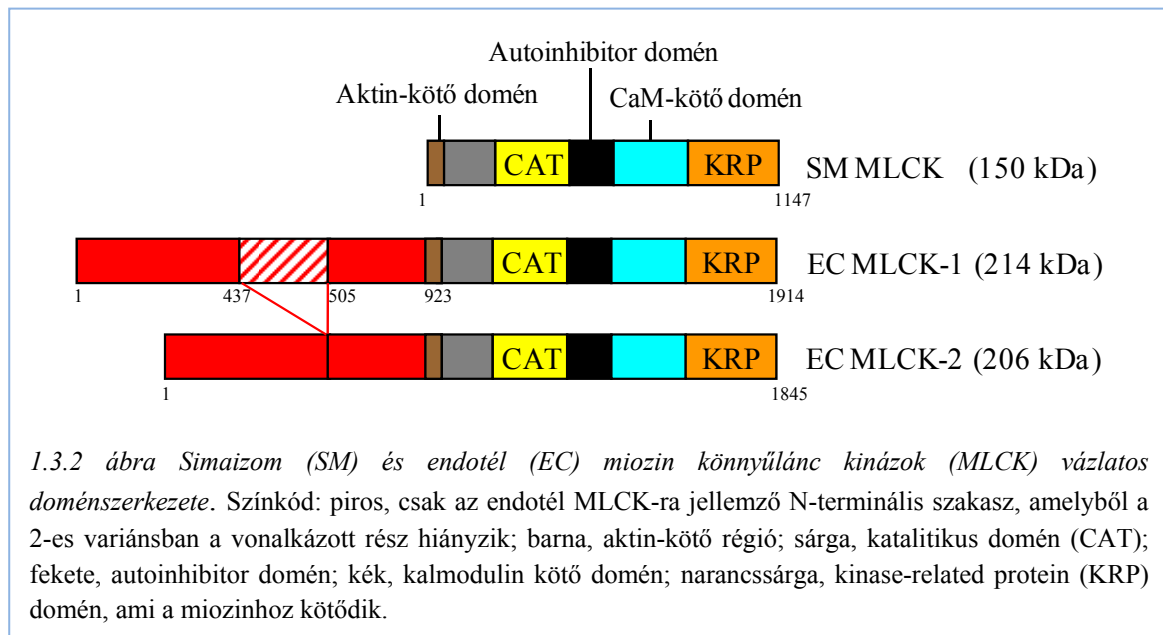


1.3.1 Az endotél miozin könnyűlánc kináz

Az endotél sejtek migrációjában, összehúzódásában és az EC permeabilitásában az MLC foszforiláció és az MLCK aktivitás központi szerepét korán felismerték [69-71]. Az MLC gyors foszforilációját és az EC monolayer megnövekedett permeabilitását mutatták ki aktív MLCK fragmentum közvetlen EC-be való juttatása után, valamint gyulladáskeltő agonisták, trombin és hisztamin hatására, amit az MLCK gátlása mérsékelte [72-76].

Az endotél MLCK biokémiai vizsgálatával és klónozásával egy 214 kDa méretű fehérjét azonosítottak (EC MLCK) [77-79]. Simaizom MLCK-hoz (SM MLCK) hasonlítva az EC MLCK mérete nagyobb, az N-terminálisán egy olyan 922 aminosavból álló szakasz van, ami a SM MLCK-ban nem található meg. A fehérje C-terminális részének domén szerkezete megegyezik a kisebb méretű kináz szerkezetével, és aminosav szinten is >90% az azonosítás (1.3.2 ábra). Az EC MLCK több splice variáns formáját klónozták, melyek közül dominánsan az EC MLCK-1 és 2 expresszálódnak [80]. Az EC MLCK N-terminálisán a 922 aminosavból álló szakasz, mely a simaizom és más

nemizom sejt MLCK enzimekkel nem mutat homológiát, biológiai funkciója munkánk kezdetén ismeretlen volt.



Az EC MLCK biokémiai vizsgálatai arra utaltak, hogy az enzim aktivitása nemcsak a Ca^{2+} /kalmodulin koncentrációjától függ, de maga a kináz Ser/Thr foszforilációja is befolyásolja azt [74, 77, 79]. Tyr-kináz és Tyr-foszfátáz gátlószerekkel végzett vizsgálatokból arra lehetett következtetni, hogy Tyr-foszforiláció is szerepet játszik az EC barrier szabályozásában. Tyr-kináz gátlással ugyanis mérsékelni tudták a trombin-indukált MLC foszforilációt és barrier diszfunkciót [81], illetve Tyr-foszfátáz gátlószert növelte az MLC foszforiláció szintjét EC-ben [82]. Nem azonosították azonban az érintett Tyr-kináz/foszfátáz enzimeket és célpontjaikat.

Az EC MLCK szekvenciájában több potenciális Tyr-foszforilációs hely található, ami felveti annak lehetőségét, hogy az endotél barrier reverzibilis Tyr-foszforiláción keresztüli szabályozásában az EC MLCK kulcsszereplő lehet.

1.3.2 Miozin foszfátáz az endotél sejtekben

A simaizom miozin foszfátáz a PP1c β katalitikus- és két regulátor alegységből áll. A nagyobb, ~130 kDa méretű regulátor alegység, a MYPT1 (myosin phosphatase target subunit 1) szerkezetét és részvételét a miozin foszfátáz szabályozásában részletesen leírták (lásd 1.3.2.1 fejezet), a másik 20 kDa-os regulátor alegység (M20) funkciója nem ismert [83, 84].

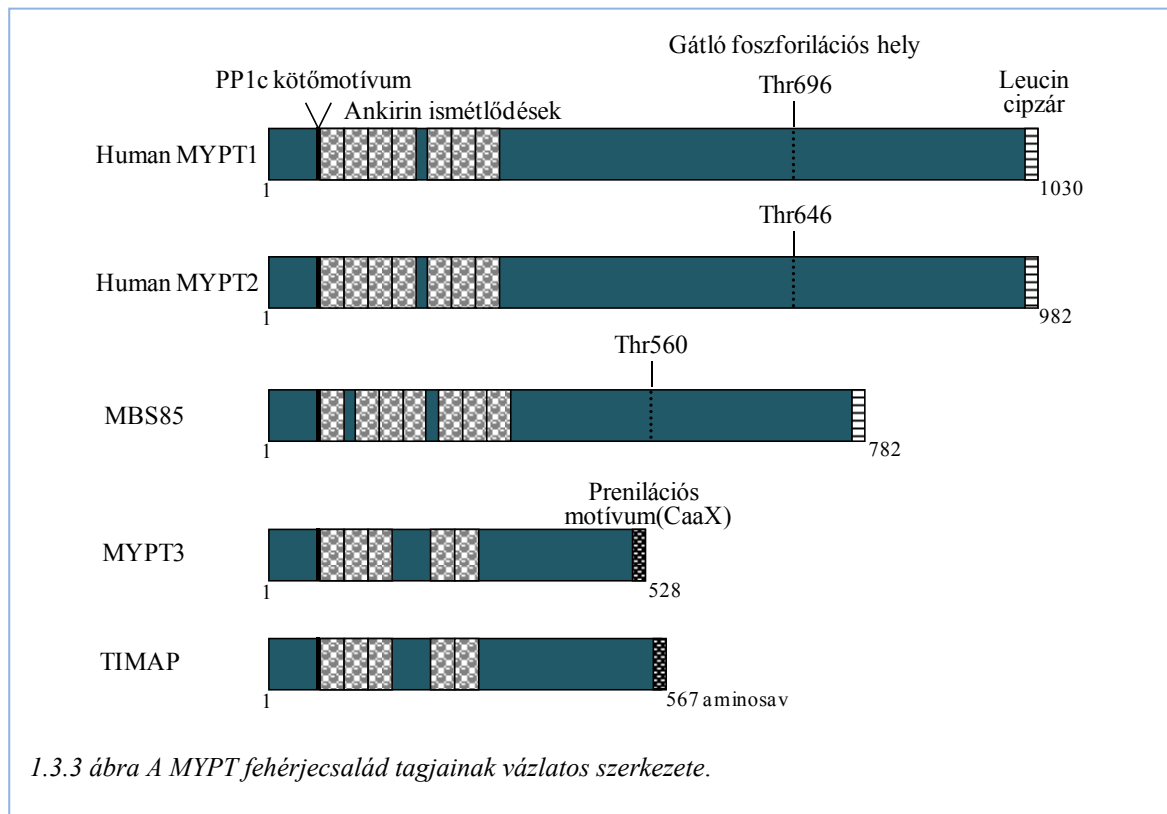
Specifikus PPP gátlószerekkel (okadánsav és calyculin A) végzett vizsgálatok a PP1 aktivitás domináns szerepére utaltak az endotél MLC defoszforilációjában [16, 85, 86]. A PP1 gátlás hatására megnőtt az MLC foszforilációs szintje és EC frakcionálással a miozin és a PP1 aktivitás asszociációját detektálták. Az EC permeabilitás növekedést és EC kontrakciót kiváltó trombin kezelés következtében viszont a PP1 aktivitás gátlódott és a miozinban gazdag sejtfrakcióban detektálható PP1 mennyisége lecsökkent [86, 87]. *Az endotél miozin foszfatáz alegységeit és azok fehérje kölcsönhatásait azonban nem jellemezték.*

1.3.2.1 A MYPT fehérjecsalád

A MYPT1 számos szövetben expresszálódik, legnagyobb mennyiségben a simaizomban mutatták ki [88]. Egyetlen gén kódolja, de a szövetekben eltérő alternatív splicing eredményeként különböző formái jelenhetnek meg. Az N-terminális részén található $^{35}\text{KVKF}^{38}$ PP1c kötőmotívummal kapcsolódik elsődlegesen a PP1 katalitikus alegység β izoformájához és a C-terminálishoz közeli részén köti az M20 alegységet, C-terminálisán pedig egy leucin cipzár motívum van. A MYPT1 két nukleáris lokalizációs szignált és hét ankirin ismétlődést is tartalmaz [89], utóbbiak a foszforilált miozin könnyűláncal való kölcsönhatásban játszanak szerepet (1.3.3 ábra). A fehérje középső/C-terminális fele, amit autoinhibíciós doménnek is tartanak [90], több helyen foszforilálható. A leginkább jellemzett „gátló” Thr696 oldallánc foszforilációját több kináz, például Rho kináz is katalizálhatja, és ez a miozin foszfatáz gátlását okozza [91-93]. A gátló hely defoszforilációjaért a PP2A és PP2B foszfatázokat tartják felelősnek [94, 95]. A miozin foszfatázt olyan kisméretű inhibitor fehérjék is gátolhatják, mint például a CPI-17, amelynek gátló hatását a Thr38 oldallancán történő, PKC kináz általi foszforilációja jelentősen növeli [96].

A MYPT1-et és a vele jelentős szerkezeti rokonságot mutató további fehérjéket, melyek nem a MYPT1 splice variánsai, hanem eltérő gének termékei, az úgynevezett MYPT fehérjecsaládba soroljuk (1.3.3 ábra) [16]. A MYPT2, MBS85, MYPT3 és a TIMAP feltételezhetően szintén a PP1 regulátoraiként funkcionálnak. Méretben és szekvenciában is hasonló a MYPT1-hez a 110 kDa-os MYPT2 [97]. A MYPT1 simaizomban és nemizom sejtekben, a MYPT2 pedig váz- és szívizomban, valamint az agyban expresszálódik dominánsan. Az MBS85 a MYPT1-nél kisebb méretű fehérje, amit humán genomi könyvtárból klónoztak. A MYPT1-re jellemző szerkezeti elemeken

túl, melyek a PP1c β -hoz való kötődéséhez szükségesek, a Thr696 gátló foszforilációs helyhellyel ekvivalens Thr oldalláncot is tartalmazza [98].



A MYPT3 és a TIMAP mérete 58, illetve 64 kDa. Mindkét fehérjében megtalálható az N-terminális közeli PP1c kötőmotívum és az azt követő ankirin ismétlődések [99, 100]. A MYPT1 Thr696 gátló foszforilációs helyével ekvivalens aminosav oldalláncot nem azonosítottak egyik fehérjében sem. C-terminálisuk is eltér a család többi tagjától, prenilációs motívumot tartalmaznak, ami plazmamembránhoz való asszociációjukat teheti lehetővé. A MYPT3 és a PP1c kölcsönhatását 3T3-L1 adipocita sejtizátumokban mutatták ki [99].

A TIMAP (TGF- β 1 inhibited membrane associated protein) fehérjét glomerulális endotél sejtekben azonosították reprezentációs differenciál analízis során [100]. TGF- β 1 jelentősen csökkenti a TIMAP mRNS szintjét, ezért feltételezhető, hogy a TIMAP-nak fontos szerepe lehet az endotéliumban történt TGF- β 1 okozta változások helyreállításában. Más sejtípusokkal összehasonlítva a TIMAP expressziós szintje az endotél és hematopoetikus sejtekben igen magas. Patkány szövetek immunhisztokémiás festése alapján a TIMAP a vaszkuláris endotéliumban található meg a legnagyobb mennyiségben [100].

A MYPT fehérjékhez való hasonlóság alapján feltételezhető volt, hogy a TIMAP is szabályozhatja a PP1c-t, de lehetséges élettani szerepéről és kölcsönható partnereiről kevés információ áll rendelkezésre. Élesztő és bakteriális két-hibrid rendszer segítségével néhány lehetséges fehérje partnerét azonosították. A 37/67-kDa méretű laminin receptorról (LAMR1), ami az extracelluláris mátrix glikoproteinek családjába tartozó lamin fehérjékkel áll kölcsönhatásban, közvetett bizonyítékok alapján feltételezték, hogy egy TIMAP-függő PP1c szubsztrát lehet [101]. A TIMAP potenciális fehérje kölcsönhatásainak fiziológiás jelentőségét azonban nem tanulmányozták.

1.3.3 Protein foszfatáz 2A és a citoszkeleton

Az endotél sejteken PPP gátlószerekkel végzett korai kutatások arra hívták fel a figyelmet, hogy az EC citoszkeleton és barrier funkció szabályozásában az MLC foszforilációjától független mechanizmusoknak is szerepük van, melyekben a PP2A-nak lehet funkciója [85, 102]. A PP2A az MLC defoszforilációjában *in vivo* nem vesz ugyan részt, de több, a citoszkeletonhoz kapcsolódó fehérje defoszforilációját katalizálja [16].

Neuroblastoma sejtekben a vimentin Rho kináz általi foszforilációja következtében az intermedier filamentumok felbomlanak, ezt a folyamatot a PP2A teszi reverzibilissé [103]. Fibroblaszt sejteket PP2A inhibitorral kezelve ugyancsak vimentin foszforilációs szint emelkedést tapasztaltak [104]. Aktin-kötő fehérjéket, kaldezmon, kofilin és HSP27, valamint a mikrotubulusokkal asszociálódó tau fehérjét is a PP2A citoszkeletonális szubsztrátjaiként írtak le más sejtípusokban [105-109]. Az elsősorban idegi sejtekben jellemzett tau fehérje foszforilációja befolyásolja a tau mikrotubulusokra kifejtett stabilizáló hatását. A tau több foszforilálható Ser oldallánca közül a Ser262-ről kimutatták, hogy annak foszforilációja gyakorlatilag megszünteti a tau mikrotubulusokhoz való kötődését [110, 111]. A mikrotubulusok és a PP2A közötti asszociációt és a PP2A mikrotubulusokat stabilizáló hatását, továbbá ebben a PP2A alegység összetételének jelentőségét több munka igazolja [112-115].

Endotél sejtekben a mikrotubulusok és a PP2A ko-lokalizációját találták, ám karcinoma-eredetű angiogenetikus faktorok a PP2A eloszlását diffúzabbá tették, a mikrotubulusok pedig feloldódtak [116]. Vaszkuláris endotél sejtekben oxidatív stressz következtében a p38 MAP-kináz útvonal aktiválódását, a HSP27 fehérje foszforilációját és F-aktin kialakulását figyelték meg [117]. Az előzőekben leírtak alapján a folyamatot a PP2A teheti reverzibilissé. *Bár a jelátviteli folyamatok részletei még nem ismertek,*

mindezek azt sugallják, hogy a PP2A aktivitás az endotél citoskeleton szerkezetének szabályozásában esszenciális.

1.3.4 Sejtkapcsoló fehérjék és a PPP foszfatázok

Az endotél sejtek adherens és szoros kapcsolatait alkotó fehérjék kapcsolódását/kölcsönhatását befolyásolja a résztvevők Ser/Thr és Tyr oldalláncainak foszforiláltsága. Akár ugyanazon fehérje Ser/Thr és Tyr foszforilációja is jelentős lehet a sejtkapcsoló struktúrák kialakulásában és átrendeződésében. Rekombináns E(epitél)-kadherin és β -katenin adherens sejtkapcsoló fehérjék felhasználásával kötődési vizsgálatokat végeztek. A β -katenin Tyr foszforilációja csökkentette kötődését a kadherinhez, ami arra utal, hogy a két fehérje kölcsönhatása foszforilációval szabályozott. Mutánsokkal végzett transzfekciós kísérletek eredményeiből továbbá arra következtettek, hogy a β -katenin Tyr654 foszforilációja az adherens kapcsolatok felbomlásakor következik be [118]. A β -katenin szerkezetében az N- és C-terminális doménjei között helyezkedik el egy 12 armadillo ismétlődésből álló központi domén, amely a β -katenin fehérje kölcsönhatásaiért felelős [119], és tartalmazza a Tyr654-es oldalláncot is. A kadherin fehérje több Ser oldalláncon is foszforilálható kazein kináz II és GSK3 β kinázokkal [120]. E-kadherin és β -katenin komplex kristályszerkezeti vizsgálatával megállapították, hogy az E-kadherin Ser foszforilációja elősegíti a stabil komplex kialakulását [121]. A β -katenin fehérjén is számos Ser/Thr foszforilációs helyet azonosítottak, melyek a fehérje degradációjában és nukleáris transzportjában játszanak szerepet [122]. Kazein kináz I és GSK3 β általi foszforilációja a fehérje ubiquitinálásához és lebomlásához vezet [123, 124]. PKA és Akt kinázok a β -katenin Ser552 és -675 oldalláncait foszforilálják, amelynek következtében a fehérje megemelkedett transzkripció aktivitását tapasztalták [125, 126].

A sejtkapcsoló fehérjék defoszforilációjáról, a szabályozásban szerepet játszó protein foszfatázokról azonban keveset tudunk. Okadánsav és calyculin A bőrsejtek sejtkapcsolatait felbontotta és a β -katenin Ser/Thr foszforilációs szintje is megnőtt [127]. Az alkalmazott PPP toxin inhibitorok koncentrációja azonban nem teszi lehetővé a PP1 és a PP2A aktivitások elkülönítését.

1.4 Adaptor fehérjék

A sejtek összetett jelátviteli útvonalai a fehérjék poszttranszlációs módosításán alapulnak, ami számos fehérje integrált kölcsönhatását követeli meg. Az adaptor vagy állvány fehérjék specifikus fehérje kölcsönhatások, jelátviteli fehérje komplexek kialakulását segítik a sejt különböző, de meghatározott szubcelluláris régióiban. Enzimatisz aktivitással jellemzően nem rendelkeznek, ellenben lehetővé teszik a hozzájuk kötődő más fehérjék párbeszédét, és ezzel a jelátvitelt segítik. A különböző adaptor fehérjék előfordulása lehet szövetfüggő, de széles körben is expresszálódhat ugyanaz az adaptor. Az adaptor fehérjék domén szerkezete jó összhangban van funkciójukkal, különböző fehérje-kötő doméneket tartalmaznak, amelyek a fehérje-fehérje kölcsönhatásokért felelősek. Ezek a domének specifikus partnerekkel kapcsolódhatnak, ezáltal a domén típusa befolyásolja azt is, hogy milyen jelátviteli útvonalban vehet részt egy adott állvány fehérje.

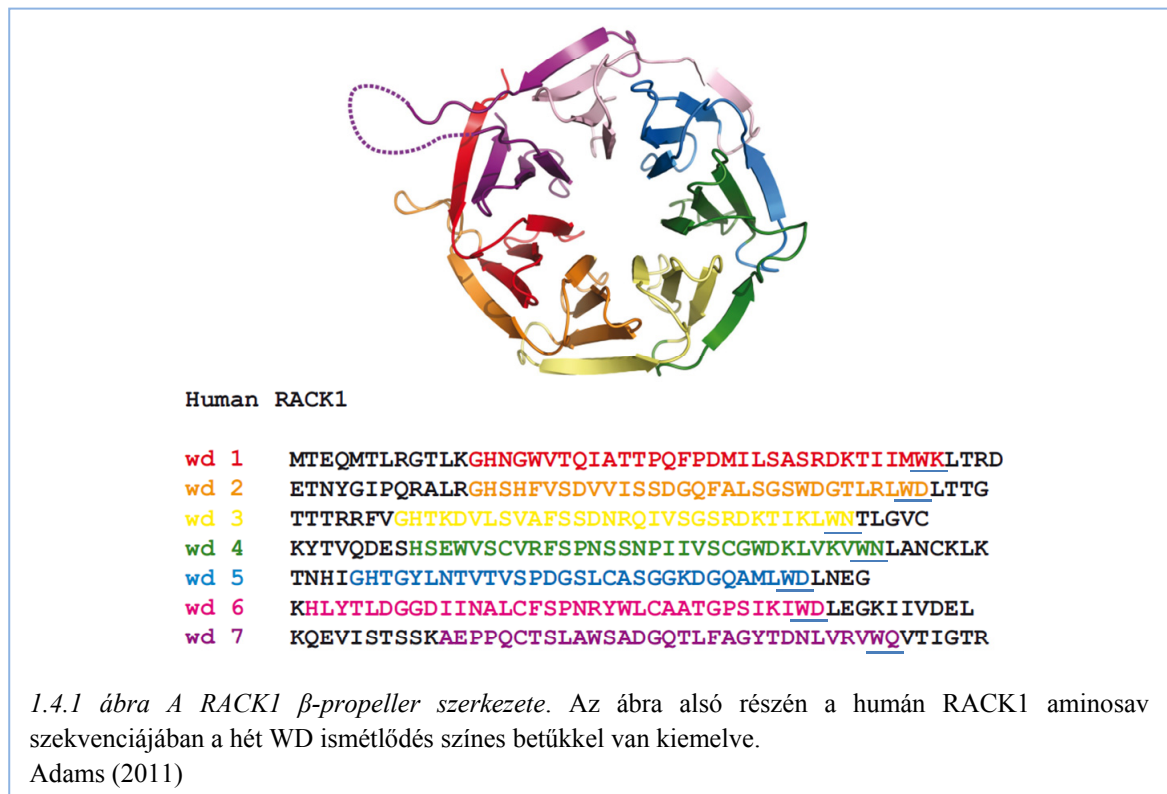
A fejezet az értekezés alapját képező vizsgálatainkban jelentőséggel bíró adaptor fehérjék jellemző tulajdonságait foglalja össze.

1.4.1 RACK1

Az erősen konzervált RACK1 (receptor for activated C kinase 1) adaptor fehérje elnevezése az aktív konformációban lévő PKC β II-vel való kölcsönhatására utal [128-130], de ma már számos egyéb kölcsönható partnere ismert [131-135]. A humán RACK1 fehérjét a GNB2L1 gén kódolja [136, 137]. A RACK1 mind a hét úgynevezett WD ismétlődő szerkezeti eleme ~40 aminosavból áll, melyek többnyire Trp-Asp (WD) dipeptiddel végződnek. A fehérje háromdimenziós szerkezetét ez a hét WD ismétlődés határozza meg, amelyek propeller-szerűen rendeződnek (1.4.1 ábra) [138]. A WD-ismétlődésekből álló fehérjék különböző jelátviteli folyamatokban játszanak szerepet, és akár többszörös fehérje kölcsönhatásokra is képesek [139].

A RACK1 is számos jelátviteli folyamat résztvevője. PKC aktiválás során például a Src tirozin kinázzal ko-lokalizál a plazmamembránnál. Egyrészt szubsztrátja, másrészt kötődik is a Src-hoz és gátolja annak aktivitását [135, 140, 141]. Stressz hatására a RACK1 stressz szemcsékben koncentrálnak és a MAPK útvonalon keresztül gátolja az apoptózist [142], de a cAMP/PKA jelátviteli pályával is kapcsolatban áll [143-146]. A RACK1 több transzmembrán receptorttal is kölcsönhat, mint például az androgén receptor

[131], a β -integrin receptor [147], vagy az inzulin-szerű növekedési faktor receptor (IGF-1) [148], továbbá ioncsatornához is kötődik [149, 150].

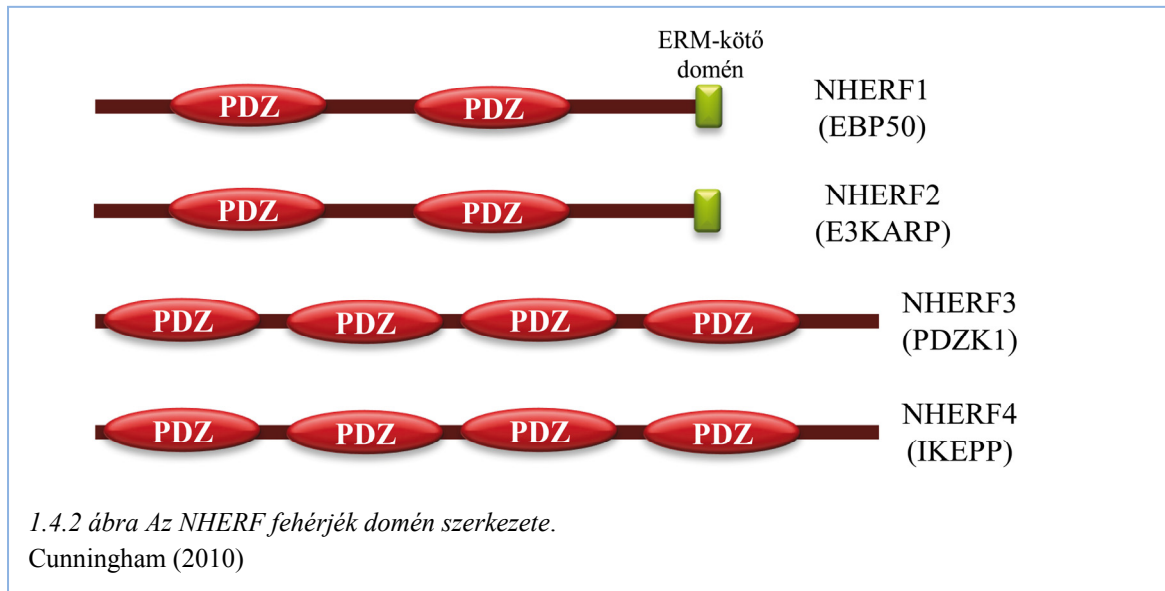


1.4.2 NHERF1/EBP50 és NHERF2 fehérjék

Az NHERF (Na^+/H^+ exchanger regulatory factor) fehérjecsaládba négy adaptor fehérjét sorolnak, ezek az NHERF1/EBP50, az NHERF2/E3KARP, az NHERF3/PDZK1 és az NHERF4/IKEPP. A család tagjai kettő vagy négy PDZ fehérje interakciós domént tartalmaznak (1.4.2 ábra) [151, 152]. A domén elnevezése arra a három fehérjére utal, amelyekben először azonosították: PSD-95 (post-synaptic density protein of 95 kDa), Dlg (*Drosophila* discs large protein) és ZO1 (zonula occludens 1). Ez a ~90 aminosavból álló domén szekvencia-függő módon kötődhet célfehérjéi C-terminális részéhez és összekötő kapocsként működik a fehérje-fehérje kölcsönhatásokban, de homodimerizációra is képes [153-155]. Az NHERF fehérjéket elsődlegesen az Na^+/H^+ cserélő-3 (NHE3) fehérjére kifejtett esszenciális szabályozó szerepük kapcsán tanulmányozták epitél sejtekben [156, 157]. Egyre inkább elfogadott az a nézet, hogy a sejt más jelátviteli folyamataiban is közreműködnek, erre utal többféle elnevezésük is [158-160].

Az EBP50 és az NHERF2 elsődleges szekvenciája 57%-ban azonos, domén szerkezetük pedig egyforma (1.4.2 ábra) [161, 162]. Az EBP50 és az NHERF2 is

esszenciális komponense az NHE3/ezrin/cAMP függő protein kináz II multifehérje komplexnek, amely az iontranszportot az NHE3 foszforilációjával gátolja [163, 164]. Valószínűnek tartják, hogy az EBP50 és az NHERF2 szerepe az NHE3 szabályozásában szerv- és szövetspecifikus [165].

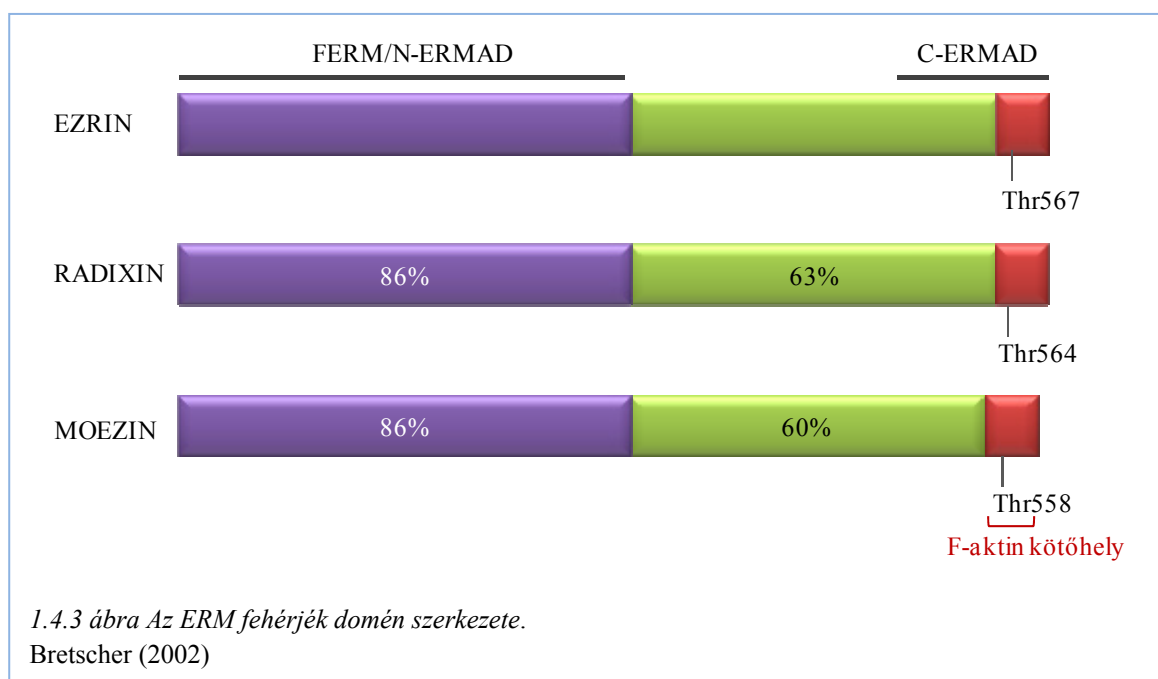


Az EBP50 fehérje több kinázzal is foszforilálható, a foszforiláció pedig befolyásolhatja a fehérje kölcsönhatásait. A Ser337/Ser338 PKC általi foszforilációja elősegíti az adaptor fehérje oligomerizációját [166]. A G-fehérjéhez kötött receptor kináz 6A pedig a Ser289 foszforilációjáért felelős, ami a PDZ domének kölcsönhatásait segíti [167, 168]. Az EBP50 Ser279 és Ser301 oldaláncait a mitózis során a ciklin dependens kináz 1 (Cdk1) foszforilálja, ami a fehérje oligomerizációját gátolja, viszont elősegíti kölcsönhatását más fehérjékkel [169]. Az EBP50 foszforiláltsága és a mikrovillusok kialakulása/átrendeződése között is találtak kapcsolatot [170]. *Az EBP50-et defoszforiláló protein foszfatázokat azonban még nem azonosították.* Az NHERF2 fehérjében az EBP50-nel homológ foszforilációs helyek nem találhatóak meg, foszforilációjáról nem tudunk.

Az EBP50 és az NHERF2 azonos abban, hogy C-terminális ERM (ezrin-radixin-moezin)-kötő doménjük van (1.4.2 ábra), ami az NHERF család többi tagjától eltérő szerkezeti elem [152, 171]. Az EBP50 (ERM-binding phosphoprotein 50) név is az ERM fehérjékkel való kölcsönhatásra utal [172]. Az EBP50, NHERF2 és ERM fehérjék sejttypustól függő eltérő expressziós szintje alapján feltételezhető, hogy az NHERF és az ERM fehérjecsaládok interakcióiban az egyes fehérjék preferált kölcsönhatásokban vesznek részt [173].

1.4.3 Az ERM fehérjék

Az ERM fehérjék a plazmamembrán és az aktin citoskeleton közötti kapcsoló fehérjék, ezáltal a sejt-kortex stabilizálásában vesznek részt, de jelátviteli folyamatokat is koordinálnak [171]. Közvetlenül kötődhetnek transzmembrán fehérjékhez, adhéziós molekulákhoz, de a membránnal való kölcsönhatásukban gyakran adaptor fehérjék is szerepet játszanak, mint például az EBP50 és az NHERF2 [174]. Emlősökben az ezrin, radixin és moezin fehérjét három különböző gén kódolja. A fehérjék elsődleges szerkezete nagyon hasonló, domén felépítésük megegyező (1.4.3 ábra) [175]. Ennek ellenére, szövetspecifikus megjelenésük és néhány egyéb eltérés alapján feltételezik, hogy



életteni funkcióikban eltérések lehetnek [171]. N-terminális végükön egy FERM/ N-ERMAD (Four-point-one, Ezrin, Radixin, Moezin/amino-ERM association domain) domén van, ezt egy α -helikális domén követi, aminek a PKA-val való kölcsönhatásban van jelentősége [176], végül C-terminális részükön található a C-ERMAD (carboxy-ERM association domain) domén. A N-ERMAD és C-ERMAD domének között intramolekuláris kölcsönhatás alakulhat ki, ami a kötődő felszíneket más fehérjékkel való kölcsönhatás elől elrejtí, így az ERM fehérjéket inaktív formában tartja a citoplazmában. Az ERM fehérjék C-ERMAD részükön egy konzervált Thr oldalláncot tartalmaznak (ezrin: Thr576, radixin: Thr564, moezin: Thr558) [171]. Ennek a Thr oldalláncnak a foszforilációja például Rho kináz, PKC α vagy PKC θ által konformáció változást okoz, az intramolekuláris kölcsönhatás megszűnik, a fehérje kinyílik és aktív, kölcsönhatásra

képes formába kerül. A N-ERMAD transzmembrán fehérjék (pl. CD44, ICAM) intracelluláris részéhez vagy állványfehérjékhez kötődhet a citoplazmában, a C-ERMAD pedig az F-aktinhoz kapcsolódik [175].

2. CÉLKITŰZÉSEK

A tüdő működésében meghatározó jelentőségű a vaszkuláris endotél sejtek citoszkeleton szerkezete és az endotél barrier/gát funkció. A tüdő érrendszerének rendkívül nagy felülete az EC barrier különösen érzékeny szabályozottságát igényli. A vaszkuláris permeabilitás szignifikáns és hosszan tartó megemelkedése a gyulladós betegségek egyik legfőbb tünete.

Az endotél barrier funkció mechanizmusának megismerésére irányuló eddigi kutatások annak összetett jelátviteli folyamatokon keresztül történő szabályozását igazolták. Bár ezekről a jelátviteli pályákról ismereteink még hiányosak, a reverzibilis fehérje foszforiláció jelentősége nem kétséges. Az értekezésben összefoglalt kísérletes munka során a miozin könnyűlánc kináz (MLCK), valamint a protein foszfatáz 1 és 2A (PP1 és PP2A) enzimek szabályozását, funkcióját, lehetséges szubsztrátjait, regulátor alegységeit és fehérje kölcsönható partnereit tanulmányoztuk tüdő artéria endotél sejtekben, hogy a vaszkuláris endotél sejtek fiziológiai működését jobban megérthessük.

Vizsgálataink fő célkitűzései, megválaszolendő kérdései az alábbiak voltak:

- Szerepe lehet-e az endotél miozin könnyűlánc kináz szabályozásában az enzim tirozin foszforilációjának?
- A miozin foszfatáz (PP1-MYPT1) jellemzése tüdő artéria endotél sejtekben:
 - Hogyan befolyásolja a PP1 katalitikus és MYPT1 regulátor alegység az endotél barrier funkciót?
 - A MYPT1 milyen izoformái vannak jelen az endotél sejtekben?
- Az endotél sejtekben magas szinten expresszálandó TIMAP fehérje tanulmányozása:
 - A TIMAP fehérje a PP1 enzim regulátor alegysége? A TIMAP és a PP1 katalitikus alegysége közötti kölcsönhatás vizsgálata.
 - Mi a TIMAP élettani funkciója a vaszkuláris endotéliumban?

- A PP2A enzim lehetséges szerepének tanulmányozása az endotél citoszkeleton, sejtkapcsoló struktúrák és barrier funkció szabályozásában.
 - Milyen, a citoszkeleton szerkezetét és az endotél barrieret befolyásoló fehérjék foszforilációs szintjének szabályozásában vesz részt a PP2A a vaszkuláris endotéliumban?
- A PP1 és PP2A fehérje-partnereinek vizsgálata tüdő endotél sejtekben és a kölcsönhatások jelentőségének feltárása.
 - A TIMAP új kölcsönható fehérje-partnerének azonosítása. Hogyan befolyásolja a kölcsönható partner a PP1c aktivitását és az endotél barrier funkciót?
 - NHERF adaptor fehérjék tanulmányozása endotél sejtekben. Melyik Ser/Thr-specifikus protein foszfatáz típus felelős az ERM fehérjékhez kötődő EBP50 fehérje defoszforilációjáért?

A felhasznált társszerzős közleményekből kizárólag olyan eredmények szerepelnek az értekezésben, melyek tervezéséhez és kivitelezéséhez a szerző jelentősen hozzájárult. A korábbi és újabb közlemények eredményei a logikai összefüggések miatt eredeti üzenetük megtartásával néhány helyen átcsoportosításra kerültek.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A kísérletekhez használt anyagok, vegyszerek, antitestek, gátlószerek és oligonukleotid primerek részletes listája az értekezés alapját képező vonatkozó közleményekben megtalálható. Hasonlóan, az adott kísérletekhez alkalmazott módszerek részletes leírása is fellelhető a közleményekben. Az alábbiakban összegyűjtött kísérleti metodika az alkalmazott módszereket általánosan mutatja be. A megadott térfogat, koncentráció és egyéb adatok a konkrét kísérlet jellegétől függően némileg változhattak, egyrészt a kiindulási minta mennyisége, másrészt optimalizálás következtében.

3.1 Pufferek, oldatok

1xPBS: 20 mM Na₂HPO₄, 115 mM NaCl, pH 7,4

1xPBST: 20 mM Na₂HPO₄, 115 mM NaCl, 0,1% Tween-20, pH 7,4

1xTBS: 25 mM Tris-HCl, 0,15 M NaCl, pH 7,5

1xTBST: 25 mM Tris-HCl, 0,15 M NaCl, 0,1% Tween-20, pH 7,5

SDS-PAGE futtató puffer: 25 mM Tris, 192 mM glicin, 0,25 mM SDS

5xSDS mintapuffer: 50% glicerin, 10% SDS, 310 mM Tris, 100 mM DTT, 0,01% brómfenolkék

Transzfer puffer: 120 mM Tris-HCl, 40 mM glicin, 20 v/v% metanol

3.2 Sejtvonalak

A kísérleteinkhez felhasznált marha tüdő artéria endotél sejteket (BPAEC) a 8. illetve a 16. passzálásnál szereztük be az American Type Culture Collection-től (ATCC, sejtvonal CCL-209) és 15-22 passzálásig használtuk fel. A sejteket 10, illetve 20% hőinaktivált FBS tartalmú, a forgalmazó által javasolt médiumban tenyésztettük.

A humán tüdő artéria endotél sejteket (HPAEC) (sejtvonal: CC-2530) és a humán tüdő mikrovaskuláris sejteket (HLMVEC) a 3. passzálásnál szereztük be (Lonza), és a forgalmazó által javasolt EGM-2 SingleQuots növekedési faktorokkal komplettált EGM-2 Endothelial Cell Growth médiumban tenyésztettük és a 8. passzálásig használtuk fel.

Az MCF7 sejteket a European Collection of Cell Cultures (ECACC) cégtől vásároltuk, és komplett MEM médiumban tenyésztettük. A Cos-7, HeLa és HEK 293T sejteket az ATCC-től és az ECACC-től szereztük be, és 10% hőinaktivált FBS és 1% nem esszenciális aminosavat tartalmazó DMEM médiumban tenyésztettük.

3.2.1 *Sejtek szinkronizálása*

A marha tüdő artéria endotél sejteket kettős timidin blokkal szinkronizáltuk G1/S fázisban. A sejteket 16 órán keresztül 2 mM timidin tartalmú tápoldatban tartottuk, majd médiumot cseréltünk és 8 órán keresztül komplett médiumban tenyésztettük. Az első blokk után a teljes G1/S blokkot 16 órán keresztül 2 mM timidin tartalmú tápoldatban való kezeléssel kaptuk. A sejteket a G2/M fázisban való szinkronizációhoz 80 ng/ml nokodazollal kezeltük 14-16 órán át.

3.3 DNS könyvtárszűrés

Random hexamer és oligo-(dT) primerekkel készült HUVEC λ gt11 cDNS könyvtárból (Dr. David Ginsburg, University of Michigan) az adott génre specifikus radioaktívan jelzett DNS fragmentumok felhasználásával háromszoros szűrés után izoláltunk klónokat [177], melyeket plazmid vektorokba szubklónoztunk.

3.4 DNS konstruktok előállítása

Bakteriális és emlős fehérje expresszióhoz a DNS konstruktok előállítása HPAEC-ből vagy HUVEC-ből izolált totál RNS mintából RT-PCR-rel, illetve a rendelkezésre álló kódoló DNS szakaszokból PCR-rel előállított DNS fragmentumok megfelelő expressziós vektorokba való szubklónozásával történt. A reverz transzkripcióhoz oligo-(dT) vagy a sokszorosítandó DNS szekvenciája alapján tervezett primert alkalmaztunk. A PCR-hoz szintén az adott DNS-re specifikus primereket használtunk, melyek 5' végére a szubklónozáshoz szükséges restriktációs hasítási helyeket terveztünk. A kódoló DNS fragmentumok és a megfelelő vektor restriktációs hasítása, majd ligálást követően a rekombináns vektorokat JM109 plazmidfenntartó *E. coli*-ba transzformáltuk.

3.5 Rekombináns fehérjék termeltetése

3.5.1 *Rekombináns fehérjék előállítása baktériumban*

Az adott fehérjét kódoló DNS inzertet tartalmazó pGEX-4T rekombináns plazmidot *E. coli*-ba (BL21 (DE3)) transzformáltuk és az expresszió körülményeit (hőmérséklet, IPTG indukció) optimalizáltuk. A fehérje termeltetése után az összegyűjtött baktériumot lízis pufferben (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,1% Tween 20, 0,2% 2-merkaptoetanol és proteáz inhibitorok) szonikálással tártuk fel, majd affinitás kromatográfiával izoláltuk a

rekombinánsok fúziós GST tag részét felhasználva glutation Sepharose 4B-vel (GE Healthcare, Piscataway, NJ) a gyártó utasításait követve. A kötődő fúziós fehérjét 10 mM glutationt tartalmazó 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 pufferrel eluáltuk.

A GST-moezinről a GST-tag eltávolítását proteolitikus hasítással végeztük a gyártó cég leírása szerint. 100 µg GST-moezin fúziós fehérjét glutation Sepharose-hoz kötöttünk és szobahőmérsékleten 16 órán át 1x PBS-ben oldott 1 U trombin proteázzal inkubáltuk. A hasítást követően a mintát centrifugáltuk, a felülúszóból a moezin mellől a trombin eltávolítása *p*-aminobenzamidin-agarózzal történt.

3.5.2 *Rekombináns fehérjék tranzien্স overexpressziója emlős sejtekben*

A megfelelő rekombináns emlős expressziós plazmidokat FuGene, PEI vagy Lipofectamine transzfekciós reagensekkel juttattuk a sejtekbe a gyártók ajánlása szerinti optimalizált körülményeket alkalmazva. A sejteket a transzfekció után 24-72 órában használtuk fel.

3.5.3 *Bakulovírus és adenovírus expressziós rendszerek*

3.5.3.1 *MLC és MLCK bakulovírus expressziója*

Az MLC, EC MLCK-1, -2 és SM MLCK fehérjéket Bac-To-Bac bakulovírus expressziós rendszerrel (Life Technologies) termeltettük a gyártó leírása szerint. A kódoló DNS szakaszokat pFastBac Hta bakulovírus donor plazmidba szubklónoztuk, ami olyan Tn7 elemeket tartalmaz, amelyek lehetővé teszik a közjük inzertált gén irányított transzpozícióját a bakulovírus genomba. A rekombináns donor plazmidot DH10Bac *E. coli*-ba transzformáltuk, mely tartalmazta a bakmidot és a transzpozícióhoz szükséges fehérjét kódoló segéd plazmidot. Ezt követően az expresszálandó fehérjék kódoló szekvenciáját tartalmazó bakmiddal Sf9, illetve Hi5 rovarsejteket transzfektáltunk, majd 48-72 órával később a tenyésztő folyadékba került rekombináns bakulovírust összegyűjtöttük. A fehérjék termeltetéséhez 2×10^6 rovarsejt/ml szuszpenziós kultúrát infektáltunk a bakulovírusal. Az optimális MOI (multiplicity of infection, 0,1-10) és a fertőzést követő tenyésztési idő (2-4 nap) a fehérjéktől függően változó volt. Ezután a rovarsejteket centrifugálással összegyűjtöttük, és felhasználásig -80 °C-on tároltuk. A feltárt és centrifugálással előtisztított mintákból a His-taggal ellátott rekombináns fehérjéket affinitás kromatográfiával izoláltuk Ni-NTA oszlopon (Qiagen).

3.5.3.2 PP2A alegységek és aktív MYPT1 expressziója adenovírus expressziós rendszerrel

A PP2A C katalitikus és A regulátor alegységének endotél sejtekben történő overexpressziójához AdEasy adenovírus expressziós rendszert (Stratagene) alkalmaztunk a gyártó leírása szerint. A fehérjéket kódoló DNS-eket pShuttle-Ires-hrGFP-2-HA plazmidba szubklónoztuk, majd azokból homológ rekombinációval pAdEasy-1 virális plazmid vektor felhasználásával adenovirális rekombináns plazmidokat hoztunk létre. A linearizált plazmidokkal AD-293 (Stratagene) sejteket transzfektáltunk és a 10 napos tenyésztést követően nyers vírus preparátumot készítettünk, amellyel AD-293 sejteket infektáltunk. A kinyert vírusokat két egymást követő infekcióval tovább szaporítottuk, majd a gyártó leírása szerint tisztítottuk a vírust, a vírustiter 10^{10} - 10^{11} pfu/ml volt. Az endotél sejteket ~90%-os konfluencia elérése után fertőztük (MOI \approx 10) és a tápoldat kétszeri cseréjével 48 órán át tenyésztettük, majd ECIS mérésekben (3.11 fejezet) használtuk fel. Kontroll kísérletekben Western blot és immunfluoreszcencia segítségével ellenőriztük a fehérjék expresszióját.

A konstitutívan aktív MYPT1 mutáns (1-300 aminosavak) endotél sejtekben történő termeltetésére alkalmas adenovírust (MOI \approx 20) Dr. Fulton (Georgia Health Sciences University) bocsátotta rendelkezésünkre.

3.6 Fehérjék sejten belüli lokalizációjának vizsgálata

3.6.1 Immunfluoreszcens vizsgálatok

A 0,2% zselatinnal borított üveg fedőlemezeken tenyésztett sejteket 1x PBS oldattal mostuk, majd 3,7% formaldehidet tartalmazó 1xPBS-ben fixáltuk 10-15 percig. A fedőlemezeket minden lépést követően háromszor mostuk 1xPBS-sel (foszfo-specifikus antitestek esetében PBS helyett TBS puffert alkalmaztunk) és az egész folyamat szobahőmérsékleten történt. A sejteket 0,25-0,5% Triton X-100 tartalmú 1xPBS/TBS-sel permeabilizáltuk, azután 2% BSA-t tartalmazó 1xTBST-vel blokkoltuk 30 percig. Az elsődleges és másodlagos antitestekkel, melyeket a blokkoló oldatban hígítottunk, 1 órán át inkubáltuk a sejteket. Mosást követően a fedőlemezeket ProLong Gold Antifade (Molecular Probes) médiummal tárgylemezekre rögzítettük. A másodlagos antitestek aspecifikus kötődését kontroll kísérletekben ellenőriztük.

Felvételek készítéséhez Nikon Eclipse TE300 és Carl Zeiss Axiolab-20 mikroszkópot, illetve Olympus Fluoview FV1000 és Leica TCS SP8 konfokális mikroszkópokat alkalmaztunk. Kettős jelölés esetén a felvételek páronként, a minták azonos részletéről készültek.

EBP50 és PP2Ac fehérjék immunfluoreszcenciával vizsgált ko-lokalizációját a Pearson-féle kereszt-korrelációs faktor meghatározásával értékeltük [178].

3.6.2 Immunhisztokémia

Paraffinba ágyazott humán bőr szeletekből (5 μ m) xilénnel kivontuk a paraffint, majd az újra hidratált mintákat PBS-ben tartottuk 10 percig. Ezután 15 percig 3% H₂O₂ tartalmú metanolban blokkoltuk a peroxidáz aktivitást, és mosás után kuktában 0,01 M nátrium-citrátban (pH 6,0) hevítettük két percig, majd 1% BSA tartalmú PBS pufferrel blokkoltuk a mintákat 1 órán keresztül. Az EBP50-re specifikus antitesttel egy éjszakán át 4 °C-on, a másodlagos antitesttel pedig 2 óráig szobahőmérsékleten inkubáltuk a mintákat. Mosást követően a fedőlemezeket DAPI-t tartalmazó ProLong Gold Antifade (Molecular Probes) médiummal tárgylemezekre rögzítettük.

3.6.3 Sejtfractionálás

A sejtek citoplazma és sejtmag frakcióinak előállítását ProteoJET™ Cytoplasmic and Nuclear Protein Extraction Kit (Thermo Scientific) felhasználásával, a gyártó ajánlása szerint végeztük. A frakcionálás hatékonyságát immunoblottal ellenőriztük, β -tubulin elleni antitestet használtunk citoplazma markerként és lamin A/C elleni antitestet magi markerként.

A membrán frakció kinyeréséhez ProteoJET™ Membrane Protein Extraction Kit-et (Thermo Scientific) használtunk a gyártó által ajánlott leírásnak megfelelően. A membrán frakció tisztaságát CD31 elleni antitesttel ellenőriztük.

Endotél sejtek mikrotubulusban gazdag, citoszkeleton (F-aktinban gazdag) és citoszól frakcióit, illetve miozinban gazdag és miozinra depletált frakcióit Verin és mtsai módszerével állítottuk elő [86, 179]. A citoszól, tubulin, aktin és intermedier filamentumokban (vimentin) gazdag frakciókat Ding és mtsai módszerével [180] választottuk el az endotél sejtekből.

3.7 *In vitro* kináz és foszfatáz reakciók

3.7.1 *MLCK aktivitás mérése*

Az MLCK immunprecipitátumot vagy a tisztított rekombináns MLCK-t 50 mM MOPS, pH 7,4, 10 mM magnézium-acetát, 8 mM 2-merkaptoetanol és 1 mg/ml BSA összetételű pufferben hígítottuk. Szubsztrátként rekombináns MLC-t és 0,1 mM [γ - ^{32}P]ATP-t alkalmaztunk 25 °C-on az előző pufferben, melyet 0,3 mM CaCl_2 -dal és 1 mM kalmodulinnal egészítettünk ki. A kináz aktivitását az MLC szubsztrátba beépült ^{32}P alapján, a kinetikai paramétereket pedig SigmaPlot alkalmazásával határoztuk meg. A szabad Ca^{2+} -ion koncentrációt Imai és Takeda [181] szerint a következő egyenlettel számítottuk:

$$p[\text{Ca}^{2+}] = 2\text{pH} - 7,28 + \log([\text{EGTA}]_{\text{bemérési}} / [\text{CaCl}_2]_{\text{bemérési}} - 1)$$

3.7.2 *Foszforilált fehérjék előállítása*

Az MLCK (0,1mg/ml) tirozin foszforilációját 75 U/ml p60^{Src} (Upstate) kinázzal végeztük [γ - ^{32}P]ATP-vel, Mg^{2+} jelenlétében a gyártó leírása szerint. A p60^{Src} gátlására 500 nM PP-2 (Calbiochem) gátlószert alkalmaztunk a mérési közegben.

^{32}P -vel jelölt foszfo-MLC szubsztrátot Kiss és mtsai [182] módszerét követve állítottunk elő.

A moezin foszforilációja (0,5 mg/ml) 0,2 mM ATP jelenlétében Rho kinázzal (0,4 U/ml, Upstate) történt a gyártó által javasoltak szerint 25 mM glicerofoszfát, 0,5 mM EGTA, 0,5 mM DTT, 1 μM mikrocisztin LR és 5 mM MgCl_2 tartalmú 20 mM MOPS pufferben, pH 7,2.

Vad típusú GST-TIMAP *in vitro* tiofoszforilációja során a PKA katalitikus alegységével (200 U/mg szubsztrát) foszforiláltunk 50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM benzamidin, 1 mM PMSF, 2 mM DTT, 1 mM EGTA, 10 mM NaF, 0,05 mM Na-vanadát, 25 mM MgCl_2 és 0,5 mM ATP- γ -S összetételű pufferben a forgalmazó leírása szerint. A kétszeresen tiofoszforilált GST-TIMAP előállításához a már PKA-val tiofoszforilált GST-TIMAP-ot GSK3 β kinázzal (500 U/mg szubsztrát) tiofoszforiláltuk 20 mM Tris-HCl-ot pH 7,5, 10 mM MgCl_2 -ot, 5 mM DTT-t és 0,2 mM ATP- γ -S-t tartalmazó pufferben. A GST-TIMAP tiofoszforilált formáit felületi plazmon rezonancia és foszfatáz aktivitás mérésekben használtuk fel.

3.7.3 *Protein foszfatázok aktivitás mérése*

3.7.3.1 *Protein foszfatáz 2A*

PP2A katalitikus és/vagy A alegységét overexpresszáló endotél sejtekhez lízis puffert (50 mM Tris, pH=7,5, 0,1 mM EDTA, 28 mM 2-merkaptoetanol) adtunk és szonikáltuk a mintákat. A foszfatáz aktivitást 5 μ M [32 P]-MLC szubsztráttal határoztuk meg [86]. A PP1 és PP2A enzimek aktivitásának elkülönítéséhez a méréseket 1 nM okadánsav jelenlétében és távollétében is elvégeztük, ami ebben a koncentrációban csak a PP2A-t gátolta. A PP2A aktivitását a két mérés különbségéből számítottuk ki, és a kontroll mintákhoz viszonyítva, százalékosan adtuk meg.

3.7.3.2 *TIMAP-PP1c*

10 pmol rekombináns PP1c β -t 10 percen át 30°C-on előinkubáltunk 50 mM Tris, pH=7,5, 0,1 mM EDTA, 28 mM 2-merkaptoetanol pufferben 10 pmol vad típusú vagy mutáns GST-TIMAP, továbbá egyszeresen vagy kétszeresen tiofoszforilált GST-TIMAP, valamint GST fehérje jelenlétében és távollétében. A foszfatáz reakciót a P-moezin szubsztrát hozzáadásával indítottuk, amit 30 perc után forró 5xSDS mintapufferrel állítottunk le, és a mintákat 10 percig forraltuk. Ezt követően a P-moezin foszforilációs szintjét Western blot kísérletben ellenőriztük foszfo-ERM-re specifikus antitesttel. Az eredmények értékelése ImageJ 1.42q programmal történt.

3.8 *Fehérje elválasztás és detektálás*

3.8.1 *Urea gélelektroforézis*

Az MLC foszforilálatlan, egyszeresen, illetve kétszeresen foszforilált formáit EC lizátumból Garcia és mtsai [74] módszere szerint urea-PAGE módszerrel választottuk el a foszforilált formák nagyobb mozgékonyága, látszólagosan kisebb molekulatömege alapján, majd Western blottal, az MLC elleni specifikus antitest felhasználásával tettük a fehérjesávokat láthatóvá.

3.8.2 *SDS-PAGE és Western blot*

A fehérjék méret szerinti elválasztását 7-12%-os SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE), Bio-Rad készülékkel végeztük [183]. A gélek

töménységét a vizsgálni kívánt fehérje mérete alapján határoztuk meg. A géleken a fehérje sávokat Coomassie Brilliant Blue vagy Blue Silver festéssel tettük láthatóvá.

Az SDS-PAGE-vel elválasztott fehérjéket nitrocellulóz membránra blottoltuk Bio-Rad készülékkel. A membrán kötőhelyeinek blokkolása (5% sovány tejport vagy 1% BSA-t tartalmazó PBST vagy TBST pufferben, 2 h) után a vizsgált fehérje elleni specifikus antitesttel, majd a megfelelő peroxidázzal jelzett másodlagos antitesttel inkubáltunk a gyártó által ajánlott hígításban PBST pufferben, illetve foszfo-specifikus antitestek esetében TBST-ben. Az immunreaktivitást mutató fehérjesávokat kemilumineszcencián alapuló ECL reagenssel hívtuk elő, az eredményt röntgenfilmen, vagy Alpha Innotech FluorChem® FC2 Imager segítségével rögzítettük.

3.9 Fehérje csendesítés

PP2A B α , TIMAP, RACK1 és NHERF2 csendesítéséhez az endotél sejtekben az adott fehérjére specifikus siRNS-eket (optimalizált koncentrációban), kontrollként ON-TARGETplus siCONTROL nontargeting pool-t alkalmaztunk. A transzfekcióhoz DharmaFECT-4 (Thermo Fisher Scientific) reagenst használtunk szérumentes tenyésztőfolyadékban, melyet 6 óra elteltével komplett médiumra cseréltünk. A sejteket 48-72 órás további tenyésztés után használtuk fel.

3.10 Fehérje kölcsönhatások tanulmányozása

3.10.1 GST pull-down

A GST-taggel fúzionált fehérjéket tartalmazó baktériumokat 600 μ l hideg lízis pufferben (50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,1% Tween 20, 0,2% 2-merkaptoetanol, proteáz inhibitorok) szonikáltuk (2x45s). A lizátumot 12 000 g-n, 15 percig centrifugáltuk, majd a felülúszóhoz 50 μ l glutation Sepharose 4B-t adtunk, és 4°C-on lassú forgatás mellett immobilizáltuk a fehérjéket. A nem, vagy aspecifikusan kötődő fehérjéket mosással eltávolítottuk. Az endotél sejteket 600 μ l hideg lízis pufferben felkapartuk, szonikáltuk, majd centrifugáltuk. A felülúszót a Sepharose-on immobilizált fehérjékhez adtuk, majd 2-6 órán át hidegben forgattuk. Újabb mosások után a mintákat 1xSDS mintapufferrel főztük.

3.10.2 *Anti-V5 agaróz affinitás kromatográfia*

BPAEC vagy HEK sejteket a vizsgálni kívánt fehérjék pcDNA3.1 V5-His konstrukcjaival transzfektáltunk. A transzfekció után 24-48 órával a sejteket kétszer mostuk jéghideg PBS-sel, majd 600 µl lízis pufferben szonikáltuk. Centrifugálás után a felülúszóhoz 50 µl anti-V5 konjugált agarózt adtunk, és a V5-fúziós rekombináns fehérjét 5 óra 4°C-on történő inkubálással immobilizáltuk. Mosások után 1xSDS mintapufferrel történő főzéssel eluáltuk a kötődő fehérjéket. HEK-ben történt overexpresszió esetén az immobilizált rekombináns pull-down kísérletben BPAEC lizátummal inkubáltuk, majd mosások után szintén SDS mintapufferrel való főzéssel eluáltuk a fehérjéket.

3.10.3 *Immunprecipitáció*

100 mm átmérőjű sejtenyésző edényekben tenyésztett endotél sejteket háromszor mostuk 1x PBS-sel, majd 600 µl immunprecipitációs pufferben (20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM nátrium-vanadát, 1% NP-40) tártuk fel. A lizátumot centrifugáltuk (10 000g, 15 perc, 4°C), majd a felülúszóhoz 50 µl Protein G Sepharose-t (GE Healthcare) adtunk és 3 órán át, 4 °C-on kevertettük, hogy az aspecifikusan kötődő fehérjéket eltávolítsuk. A Protein G Sepharose-t centrifugálással eltávolítottuk, és az előtisztított felülúszót 10-15 µg specifikus antitesttel inkubáltuk 1 órán át 4 °C-on, majd 50 µl friss Protein G Sepharose-zal egy éjszakán keresztül, állandó keverés mellett. Mosást követően a Sepharose-hoz 150 µl 1xSDS mintapuffert adtunk, főztük 10 percig és centrifugáltuk. A felülúszót Western blottal vizsgáltuk.

Az MLCK immunprecipitációja során Protein G helyett Pansorbint használtunk, továbbá kétféle immunprecipitációs puffert alkalmaztunk. Nem-denaturáló körülmények esetén: 1% NP-40, 20 mM MOPS, pH 7,0, 25 mM MgCl₂, 10% glicerin, 0,5 mM EGTA; míg denaturáló körülmények esetén: 1% SDS, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 50 mM NaF, 10 mM nátrium-pirofoszfát, 0,2 mM nárium-vanadát, 14 mM 2-merkaptoetanol PBS-ben.

3.10.4 *Felületi plazmon rezonancia*

A TIMAP különböző formái és a PP1c közötti kölcsönhatást felületi plazmon rezonancia (SPR) mérésekkel vizsgáltuk Biacore 3000 készülékkel. A karboxi-metil dextrans típusú CM5 szenzor chip felületét 200 mM 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-karbiimid és 50 mM N-hidroxi-szukcinimid összetételű oldat injektálásával aktiváltuk, majd 10 mM Na-acetát (pH 5,0) pufferben oldott 30 µg/ml végkoncentrációjú anti-GST

antitestet kötöttünk hozzá az antitest aminocsoportokat tartalmazó oldalláncainak kapcsolásával. A fennmaradó reaktív csoportokat 1 mM etanolamin (pH 8,5) injektálásával blokkoltuk. A felület előkészítése és a mérések kivitelezése során egyaránt 10 µl/perc áramlási sebességet alkalmaztunk. Ezt követően immobilizáltuk a GST, illetve a GST-fúziós TIMAP (vad típusú nem foszforilált-, egyszer foszforilált (S337)-, kétszeresen foszforilált (S333, S337), valamint mutáns, Δ 1-71 as) fehérjéket 25 mM Tris-HCl (pH 7,4), 0,15 M NaCl, 1 mM DTT, 2 mM MnCl₂ és 0,05 % Surfactant P20 összetételű pufferben. A kötődött fehérjék mennyiségét a rezonancia jel (SPR válasz egység, RU) növekedésének mértékéből becsültük meg. A vad típusú és mutáns GST-TIMAP-ból körülbelül 1400-1500 RU immobilizálása történt, ami ~1,5 ng fehérjének felel meg. A másik mérési sorozatban a TIMAP és foszforilált formáinak immobilizált mennyiségei a következők voltak: GST-TIMAP 420-550 RU, egyszer foszforilált GST-TIMAP 330-400 RU, kétszer foszforilált GST-TIMAP 300-370 RU.

A kölcsönhatás kinetikai paramétereinek (asszociációs és disszociációs sebességi állandók) meghatározására rekombináns PP1c-t injektáltunk a felszínre növekvő koncentrációban, az immobilizált fehérjék feloldására használt pufferben. A fehérjék asszociációját 7 percig követtük, a disszociációs fázisban pedig csak puffert injektáltunk 5 percig. Az azonos módon kezelt kontroll (csak GST-t tartalmazó) felületekre kapott jelet kivontuk a GST-TIMAP ligandumokkal borított felszíneken kapott értékekből. Az idő függvényeként ábrázoltuk az immobilizált fehérjékhez kötődött PP1c mennyiségét (RU). A növekedési görbék (szenzogrammok) kiértékelését BIAevaluation 3.1 szoftver (Biacore) segítségével végeztük egyszerű 1:1 arányú Langmuir kölcsönhatási modell alkalmazásával [184].

3.10.5 LC-MS/MS analízis

A GST pull-down során nyert fehérjéket SDS-PAGE-vel elválasztottuk, majd nagy érzékenységű, Coomassie típusú, Blue Silver oldattal festettük. A vizsgálni kívánt fehérjesávokat tartalmazó géldarabot kivágtuk, és tömegspektrometriás analízis céljából elküldtük Dr. Janáky Tamásnak (Szegedi Tudományegyetem). Az eredményeket ProteinLynx GlobalServer 2.4 és Mascot 2.04 szoftverrel értékelték ki.

3.11 Endotél sejtek ECIS vizsgálatai

ECIS (Electric Cell-substrate Impedance Sensing, Applied Biophysics, www.biophysics.com/ecis-theory.php) berendezés alkalmazásával az endotél sejtek barrier funkcióját, sebgyógyulási képességét, a sejtek migrációját és kitapadását, illetve egymáshoz való adhéziójukat vizsgálhatjuk valós időben nagy érzékenységgű, nem invazív mérésrel. A módszer alapjainak kidolgozása Giaever és Keese nevéhez fűződik [185]. A sejteket speciális aranyelektróddal ellátott szövettenyésztő edényekben (8W10E array) tenyésztjük, a mérésekhez gyenge váltóáramot használunk. Az áram vezetéséhez a tenyésztő folyadék szolgál elektrolitként, a készülék a váltóáramú áramkör impedanciáját méri. Az elektródra helyezett sejtek megtapadnak és szétterülnek, ezzel szigetelő plazmamembránjuknak köszönhetően nő az áramkör impedanciája. Az áramvezetés kis frekvencia (<2000Hz) alkalmazásával a sejtek alatti és sejtek közötti réseken keresztül valósul meg. A sejtek számától, illetve azonos sejtszámmal indított mérésekben a sejtek migrációs és adhéziós képességétől függően rövidebb-hosszabb idő után, miközben az impedanciát a készülék folyamatosan méri és rögzíti, a konfluencia elérésével az impedancia/transzendotél ellenállás/rezisztencia (TER) állandósul. Különböző ágensekkel kezelve a konfluens endotél sejtréteget a TER növekedése a barrier funkció stabilizálódását, míg csökkenése a barrier funkció gyengülését jelzi. A berendezés ugyancsak alkalmas sebgyógyulás (wound-healing) vizsgálatára. A mérőelektród felületén nagy frekvenciájú váltóárammal, egyszeri magas elektromos impulzussal (5 mA, 60 kHz, 30 sec) pontosan meghatározott méretű sebeket hozunk létre az endotél sejtrétegben. A sejtek az adott területen elhalnak, ezáltal az ellenállás lecsökken. Megindul a környező sejtek vándorlása a sérült területre, valamint a sejtosztódás, míg az új sejtréteg ki nem alakul. A műszer segítségével a valós időben detektált impedancia mérésével követhető a sebgyógyulás.

3.12 Matrigel vizsgálat

Az endotél sejtek érzékszű tulajdonságát BD Matrigel™ Basement Membrane Matrix (BD Biosciences) segítségével vizsgáltuk a gyártó utasításainak megfelelően. A kontroll és siRNS-sel transzfektált BPAEC-t (~ 1×10^3 sejt/minta) Matrigel-lel borított μ -Slide (Ibidi) lemezekre helyeztük, majd CO₂ termosztátban tenyésztettük 8 órán át. A tenyésztés ideje alatt a mintákat óránként fénymikroszkóppal ellenőriztük. Az öt órán át tenyésztett mintákat 2% paraformaldehiddel fixáltunk, 0,5% Triton-X-el permeabilizáltuk

a sejteket, és blokkolás után CF594 konjugált falloidinnel festettük az aktin filamentumokat. Western blot-hoz a sejteket tartalmazó Matrigel-t 2xSDS mintapufferben főztük 10 percig, centrifugáltuk és a felülúszót vizsgáltuk.

3.13 Statisztikai analízis

Az eredmények átlagának, illetve szórásának meghatározásához az Excel programot (Microsoft Corporation) használtuk. A statisztikai elemzést szintén az Excel program segítségével, a kísérleti körülményektől függően kétmintás, illetve önkontrollos t-próbával végeztük.

A Western blotok értékelésekor az autoradiogramokat egyszerű szkenneléssel digitalizáltuk, illetve már eleve digitalizált formában nyertük FluorChem FC2 multi-imager berendezéssel és a fehérjesávok intenzitását ImageJ 1.42q programmal értékeltük ki.

4. EREDMÉNYEK

4.1 Reverzibilis fehérje foszforiláció az endotél sejtek citoskeleton szerkezetének és barrier funkciójának szabályozásában

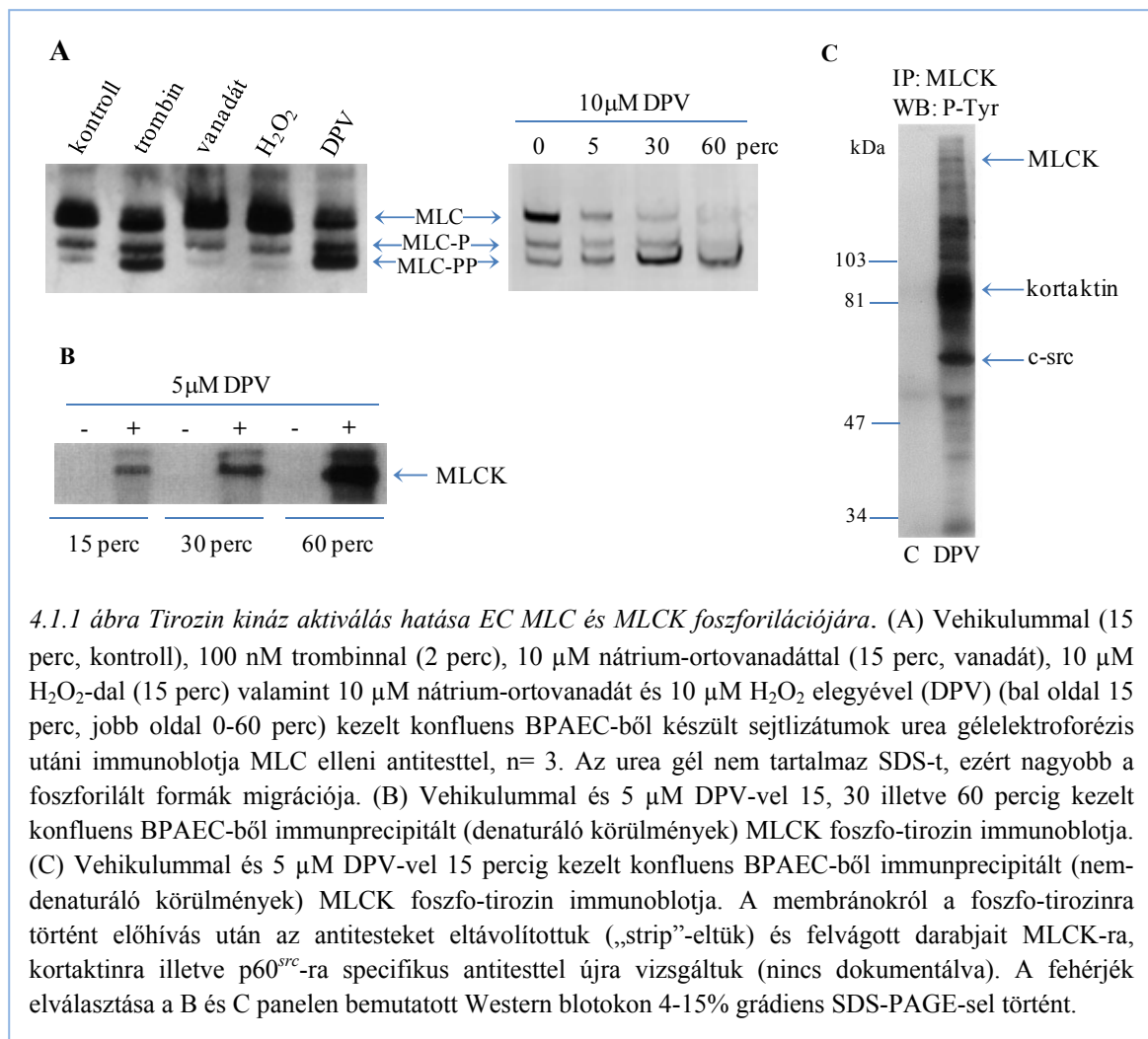
4.1.1 Az endotél miozin könnyűlánc kináz

A miozin könnyűlánc kináz (MLCK) a miozin könnyűlánc (MLC) Ser19/Thr18 oldalláncokon történő foszforilációját katalizálja nemizom és simaizom sejtekben. A foszforiláció eredményeként kialakul az aktin-miozin kölcsönhatás, stressz kábelek képződnek és a sejtek kontrahálódnak, ami egy endotél sejtréteg esetében a sejtek közötti rések kialakulásához és a barrier/gát funkció sérüléséhez vezet. Korábbi eredmények utaltak arra, hogy az endotél barrier (gát) funkció és az MLC Ser19/Thr18 foszforilációja szabályozásában tirozin kináz aktivitás is szerepet játszhat [81, 82].

4.1.1.1 Az endotél miozin könnyűlánc kináz tirozin oldalláncon foszforilálódik

Konfluens BPAEC-t sejtpermeábilis tirozin kináz aktivátorként és tirozin foszfatáz inhibitoroként is számon tartott diperoxovanadáttal (DPV) kezeltünk [186, 187]. A sejtek lizátumából a fehérjéket urea gélen elektroforézissel elválasztottuk, és immunoblot után vizsgáltuk az MLC különböző, nem foszforilált és egyszeresen vagy kétszeresen foszforilált formáit (4.1.1 ábra, A). A kezeletlen, kontroll mintához képest $10\ \mu\text{M}$ H_2O_2 vagy $10\ \mu\text{M}$ nátrium-ortovanadát nem módosította az MLC foszforilációját, elsősorban a nem foszforilált forma jelent meg (4.1.1 ábra, A). A $10\ \mu\text{M}$ H_2O_2 és $10\ \mu\text{M}$ nátrium-ortovanadát elegyítésével keletkező DPV viszont a pozitív kontrollként alkalmazott trombin kezeléshez hasonlóan jelentős MLC foszforilációt váltott ki, ami az MLCK aktiválódására utal.

A lizátumokból MLCK elleni specifikus antitesttel készített immunprecipitált mintákat Western blot kísérletben vizsgáltuk. Foszfó-tirozinra specifikus antitesttel a kináz időfüggő tirozin foszforilációját tapasztaltuk (4.1.1 ábra, B). Nem-denaturáló körülmények között készített MLCK immunprecipitátum mintákban ugyancsak megmértük a kináz aktivitását MLC szubsztráttal (4.1.1 táblázat). A DPV kezelés már 10 perc után szignifikánsan, mintegy 30%-kal növelte az MLCK aktivitását, ami azt sugallja, hogy a DPV kezelést követően az MLC foszforilációs szintjének növekedése az MLCK tirozin oldalláncon való foszforilációjának és aktivációjának lehet a következménye.



4.1.1 táblázat. DPV hatása az MLCK aktivitásra

Kezelés	MLCK aktivitás, % (átlag ± SD a kontrol százalékában)
vehikulum, 2-60 perc	100
trombin, 2 perc	180 ± 29*
DPV, 5 perc	111 ± 13,5
DPV, 10 perc	130 ± 8,7*
DPV, 20 perc	121 ± 10,3
DPV, 30 perc	95 ± 9,4
DPV, 60 perc	129 ± 6*

Kezeletlen és 100 nM trombinnal illetve 5 μM DPV-vel kezelt BPAEC-ből nem-denaturáló körülmények között immunprecipitált 1:10 hígítású MLCK mintákban mértük a kináz aktivitását 5 μM MLC és 0,1 mM [γ-³²P]ATP szubsztráttal. * Szignifikáns eltérés a kontrolltól, p<0,05.

Az MLCK nem-denaturált immunprecipitátumában a foszfo-tirozin immunoblot eredményéből kiindulva (4.1.1 ábra, C) kimutattuk, hogy a DPV kezelést követően a kináz mellett a kortaktin fehérje és p60^{Src} tirozin kináz is jelen van.

4.1.1.2 Az MLCK variánsok szabályozása eltérő

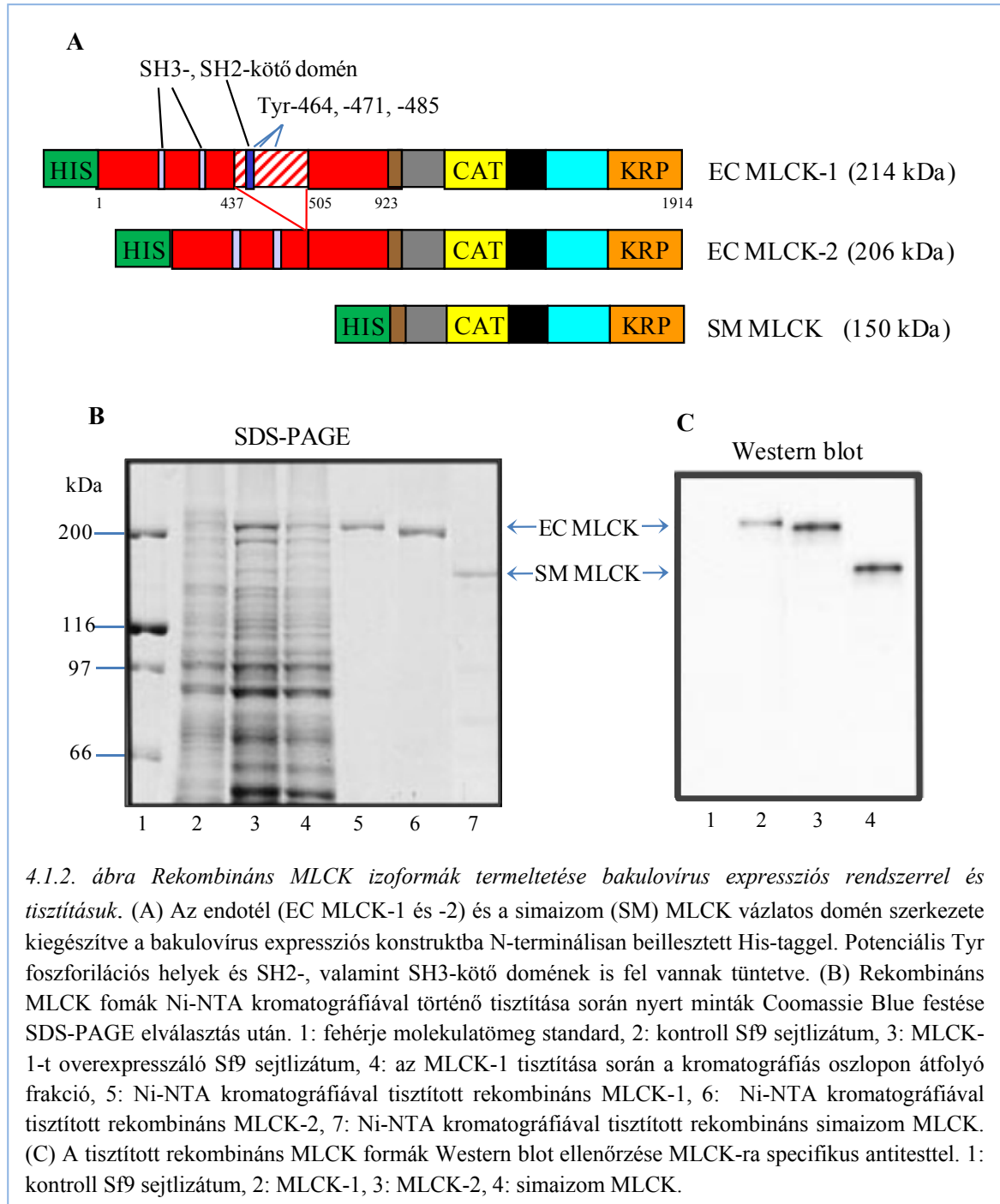
Az MLCK tirozin foszforilációjának további vizsgálatához a fehérje különböző formáit bakulovírus expressziós rendszerben állítottuk elő. Humán endotél sejtekből az MLCK két nagy molekulatömegű formáját klónozták. Mindkettő C-terminális része >90%-ban azonos a kisebb méretű, simaizom MLCK-val, N-terminálisukon azonban jelen van egy 922 aminosavból álló rész, ami a simaizom MLCK-ban nem található meg [79, 80]. Az MLCK-1 expressziós szintje magasabb, mint az MLCK-2 splice variánsé, amelynek szekvenciájából az endotél formára jellemző N-terminális szakaszból egy 69 aminosavból álló rész hiányzik (4.1.2 ábra, A). A simaizom és a két endotél MLCK formát N-terminális His-taggal láttuk el, ami a rekombinánsok igen hatékony tisztítását tette lehetővé Ni-NTA affinitás kromatográfiával (4.1.2 ábra, B-C).

In vitro mérésekkel meghatároztuk a tisztított kinázok kinetikai paramétereit, amelyek az MLCK mások által közölt kinetikai értékeivel jó egyezést mutattak [188-190] (4.1.2 táblázat). A foszforilációs helyeken mutált (Thr¹⁸/Ala¹⁹ és Ala¹⁸/Ala¹⁹) MLC szubsztráttal kapott eredmények is összhangban vannak a simaizom MLC foszforilációjáról korábban leírtakkal [191], miszerint a Thr18 oldallánc foszforilációja csak a preferált Ser19 hely foszforilációja után zajlik le (4.1.2 táblázat).

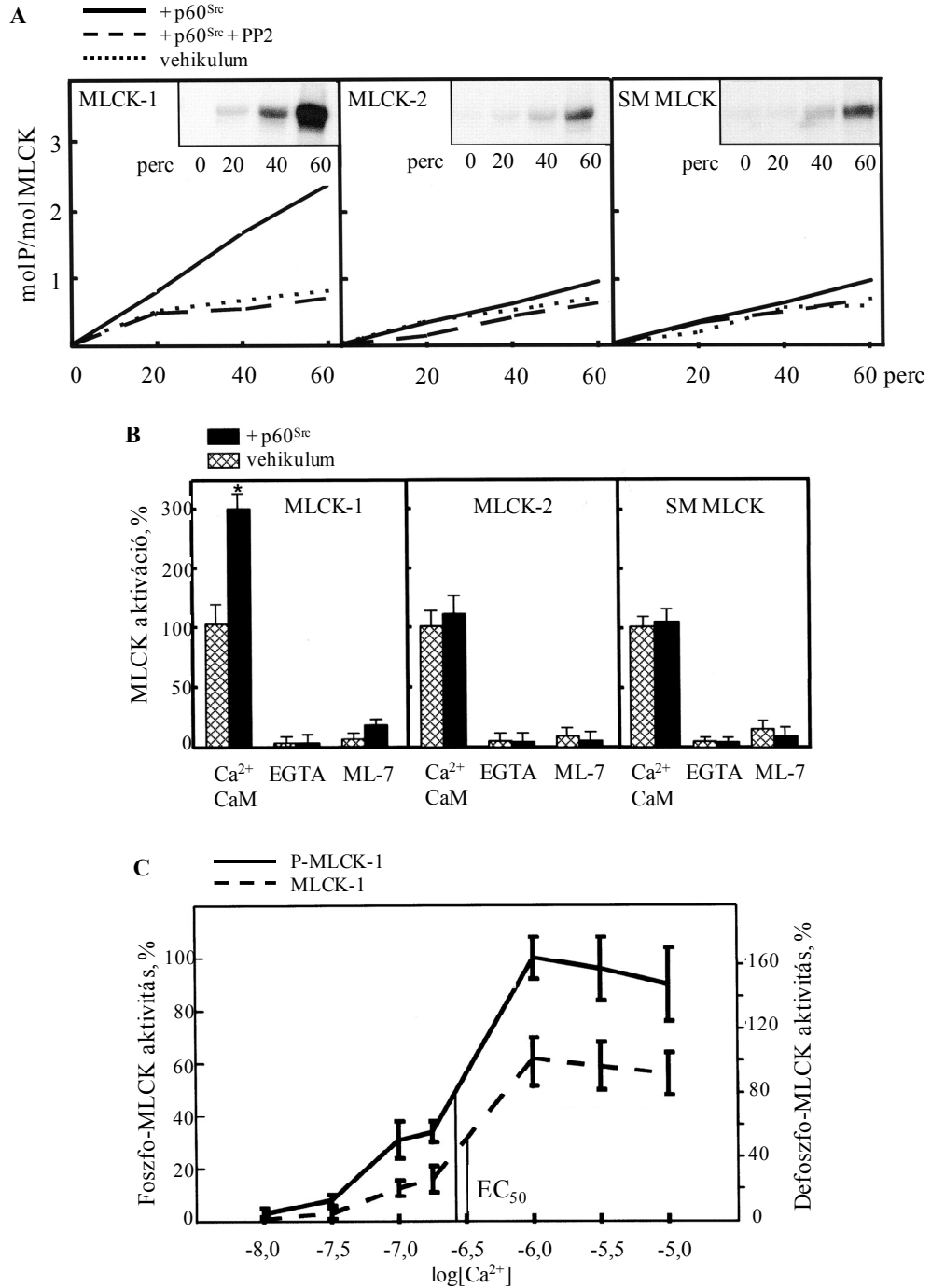
4.1.2 táblázat. Rekombináns MLCK enzimek kinetikai jellemzői

MLCK forma	V_{max} μmol/mg/perc	K_M μM MLCK	$K_{0,5}$ nM kal-modulin	Kináz aktivitás, μmol/mg/perc		
				Thr ¹⁸ /Ser ¹⁹	Thr ¹⁸ /Ala ¹⁹	Ala ¹⁸ /Ala ¹⁹ MLC
MLCK-1	11,9 ± 3,2	6,5 ± 2,2	0,49	3,30 ± 0,08	0,038 ± 0,007	0,004 ± 0,002
MLCK-2	10,9 ± 1,8	7,2 ± 2,8	0,43	3,61 ± 0,08	0,037 ± 0,010	0,006 ± 0,005
SM-MLCK	17,0 ± 2,5	5,2 ± 0,4	0,21	8,59 ± 0,25	0,098 ± 0,032	0,026 ± 0,009

Az Anyagok és módszerek fejezetben leírtak szerint mértük a rekombináns MLCK enzimek ($1,25 \times 10^{-11}$ M) aktivitását vad típusú és mutáns MLC szubsztrátokkal (5 μM). A V_{max} és K_M értékeket telítési kalcium koncentrációnál, 1,25-15 μM MLC koncentráció tartományban határoztuk meg.



Megkíséreltük a tisztított rekombináns MLCK minták *in vitro* foszforilációját $p60^{Src}$ tirozin kinázzal (4.1.3 ábra, A). Az MLCK-1 esetében >2 mol foszfát/mol MLCK beépülést tapasztaltunk, ami a tirozin kináz inhibitora ($0,5 \mu\text{M}$ PP-2) jelenlétében az MLCK-2 és a simaizom MLCK esetében tapasztalt <1 mol foszfát/mol MLCK értékre csökkent. Ebből arra következtettünk, hogy a $p60^{Src}$ foszforilációs helye az MLCK-1 olyan régiójában van jelen, amely a másik két MLCK-ból hiányzik. A $p60^{Src}$ gátlása vagy teljes hiánya során mindhárom MLCK esetében egy kisebb mértékű foszfát beépülést detektáltunk, ami az MLCK autofoszforilációjával indokolható [192].



4.1.3. ábra Rekombináns endothél MLCK-1 *in vitro* tirozin foszforilációja. (A) Rekombináns MLCK-1, -2 és simaizom (SM) MLCK foszforilációja p60^{Src} kinázzal az Anyagok és módszerek fejezetben leírtak szerint történt [γ -³²P]ATP szubszttráttal. A grafikonok jobb felső sarkában látható autoradiogramok a ³²P beépülését mutatják az MLCK-ba a p60^{Src} hozzáadása után. (B) Kontroll és p60^{Src}-kal 60 percig kezelt MLCK minták kináz aktivitása MLC szubszttráttal szemben az Anyagok és módszerek fejezetben leírtak szerint 0,3 mM CaCl₂ és 1 μ M kalmodulin (Ca²⁺-CaM), 2 mM EGTA, illetve 5 μ M ML-7 MLCK inhibitor jelenlétében. A kináz aktivitások a Ca²⁺-CaM jelenlétében mért kontroll minták %-ában vannak kifejezve, \pm SE, n=3, * szignifikáns eltérés, p<0,005. (C) Kezeletlen (defoszfó-MLCK, szaggatott vonal) és p60^{Src}-kal kezelt (foszfo-MLCK, folyamos vonal) rekombináns MLCK-1 kináz aktivitása 0,5 μ M kalmodulin és 10⁻⁸-10⁻⁵ M Ca²⁺ koncentráció mellett. Az aktivitások a foszfo-MLCK 1 μ M Ca²⁺ koncentrációnál detektált maximális aktivitásának %-ában vannak kifejezve, \pm SE, n=3, * szignifikáns eltérés, p<0,005.

Az MLCK-1 elsődleges szekvenciájának elemzésével több potenciális tirozin foszforilációs helyet azonosítottunk abban a 69 aminosavból álló régióban, ami kizárólag az MLCK-1-ben van jelen, az MLCK-2-ből és a simaizom MLCK-ből is hiányzik (4.1.2 ábra, A). Továbbá potenciális SH2- és SH3 kötő régiókat is találtunk. A p60^{Src} kinázzal foszforilált és tripszinnel emésztett MLCK-1 fragmentumok tömegspektrometriás elemzése szerint valóban ebben a 69 aminosavból álló régióban foszforilálódtak a Tyr464 és Tyr471 oldalláncok.

Az endotél sejtek DPV (tirozin kináz aktivátor) kezelése után az MLC foszforilációs szintjének emelkedését és az MLCK tirozin oldalláncon történő foszforilációját tapasztaltuk (4.1.1 ábra, A-B). Feltételeztük, hogy az MLCK tirozin foszforilációja növelte annak aktivitását, és ezért emelkedett az MLC foszforilációja. Ezt a feltevést *in vitro* méréseink is igazolták, a p60^{Src}-kal kezelt endotél MLCK-1 MLC szubsztráttal szembeni aktivitása kétszeres volt a kezeletlen MLCK-1 aktivitásához hasonlítva. A tirozinon foszforilált enzim csak Ca²⁺-CaM jelenlétében volt aktív és az MLCK specifikus inhibitora (ML-7) is gátolta. A tirozin kináz kezelés a tirozinon nem foszforilálódó MLCK-2 és simaizom MLCK aktivitását nem befolyásolta (4.1.3 ábra, B). A foszfo- és defoszfo MLCK-1 Ca²⁺ koncentráció függése hasonló, a fél-maximális aktiváláshoz szükséges pCa értéke 6,56, illetve 6,50 (4.1.3 ábra, C). A foszfo-MLCK-1 aktivitása az MLC szubsztráttal szemben a vizsgált Ca²⁺ koncentráció tartományban azonban közel kétszer nagyobb, mint a nem foszforilált MLCK-1 aktivitása.

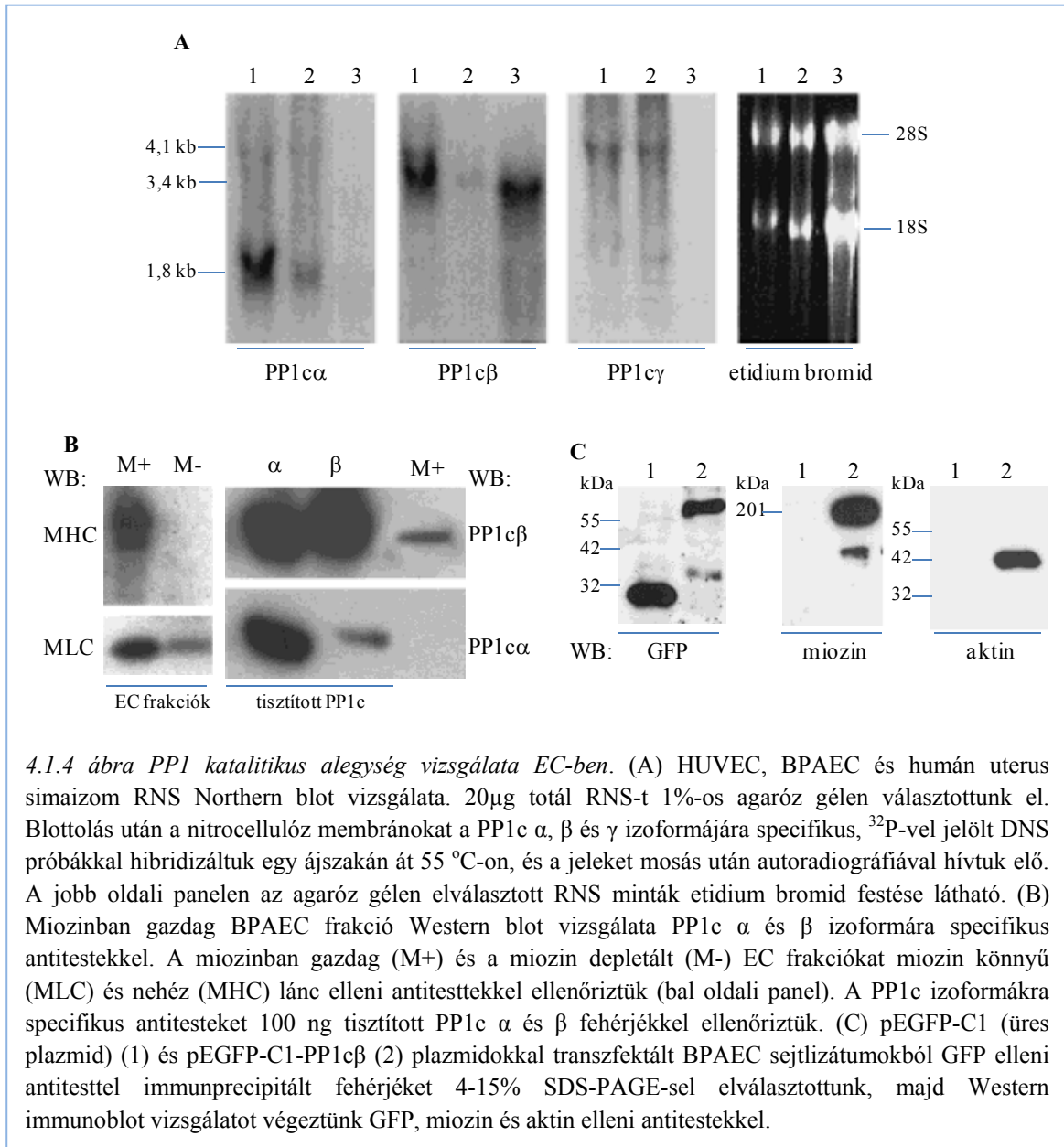
4.1.2 *Protein foszfatázok az endotéliumban*

4.1.2.1 *Az endotél miozin foszfatáz*

Az endotél gátfunkció szabályozásában az MLC Thr18/Ser19 reverzibilis foszforilációjának fontos szerepe van, amit az MLCK mellett az MLC defoszforilációját katalizáló protein foszfatáz is befolyásol. Specifikus Ser/Thr protein foszfatáz gátlószerek alkalmazásával kimutatták, hogy az MLC defoszforilációjáért a simaizom sejtekhez hasonlóan az endotél sejtekben is a miozin foszfatáz felelős, ami egy PP1 típusú protein foszfatáz holoenzim [16, 86]. A PP1 jellemzően dimer formában fordul elő, ám a simaizom miozin foszfatázban a katalitikus alegység (PP1c) és a MYPT1 regulátor alegység mellett még egy kisebb, 20 kDa méretű alegység is jelen van.

4.1.2.1.1 *Protein foszfatáz I katalitikus alegység az endotél sejtekben*

HUVEC-ből izolált totál RNS mintából RT-PCR-ral ~230 bp méretű DNS fragmentumokat állítottunk elő a PP1c α , β és γ izoformájára specifikus primerekkel. Az RT-PCR eredményessége arra utalt, hogy a HUVEC-ben a PP1c mindhárom izoformája jelen van. Ezeket a DNS fragmentumokat próbaként használtuk HUVEC, BPAEC és humán uterus simaizom RNS Northern blot vizsgálatában (4.1.4 ábra, A).

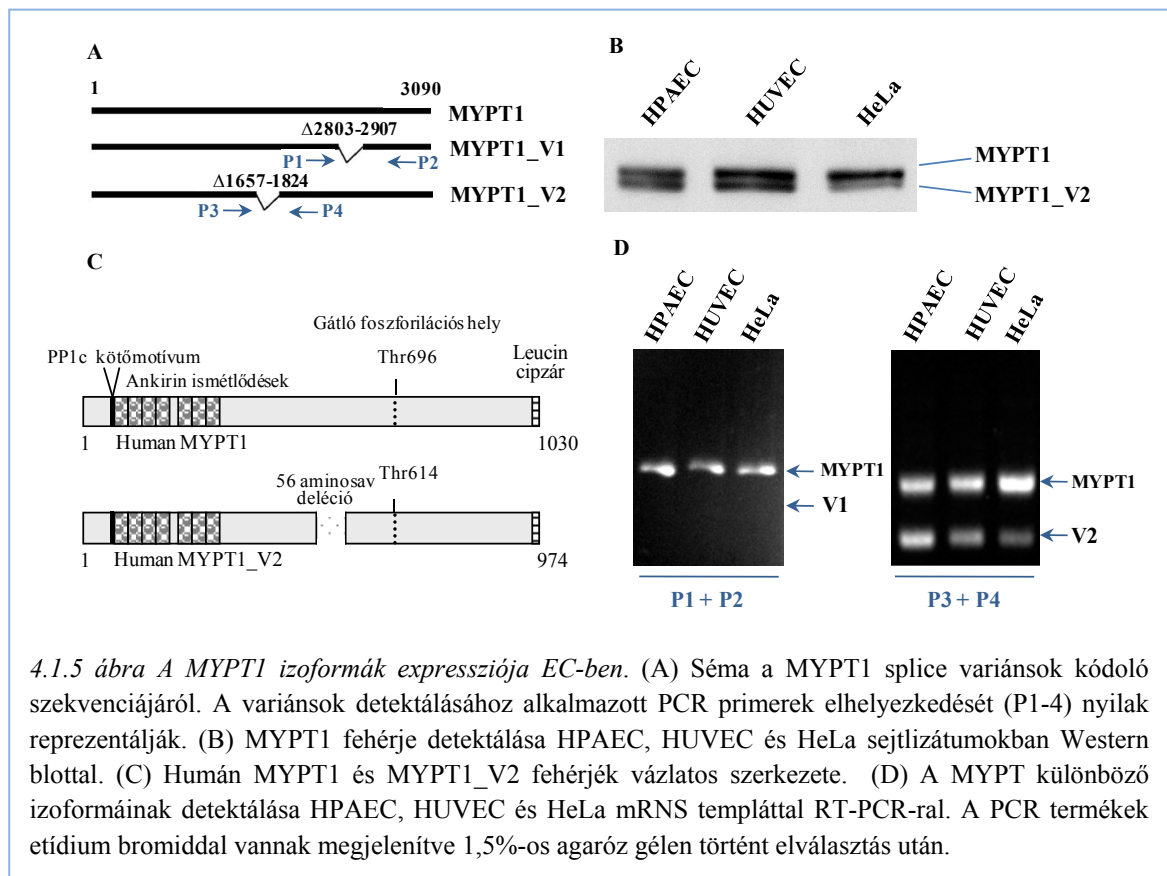


Míg a simaizomban döntően a PP1c β izoforma expresszálódik, a két endotél sejtvonalon mindhárom izoformát detektáltuk. Annak eldöntésére, hogy az EC-ben a PP1c melyik izoformája van kölcsönhatásban a miozinnal és defoszforilálhatja az MLC-t, BPAEC-ből miozinban gazdag frakciót állítottunk elő, amelyben Western blottal

vizsgáltuk a PP1c α és β izoformákat (4.1.4 ábra, B). Az antitestek specificitását tisztított PP1c α és PP1c β fehérjékkel teszteltük. Míg a β izoformára „specifikus” antitest a PP1c α izoformáját is felismerte, a PP1c α elleni antitest a PP1c β fehérjével jelentősen kisebb jelet adott. A miozinban gazdag frakcióban csak a β izoformára specifikus antitesttel kaptunk jelet, ami megerősítette azt a feltételezésünket, hogy az EC miozin foszfatázban a PP1c β izoformája található meg. BPAEC-ben GFP-taggal ellátott PP1c β -t overexpresszáltunk. A sejtek lizátumából GFP elleni antitesttel készített immunprecipitátumban a rekombináns PP1c β mellett miozint és aktint is kimutattunk, ami a kontraktilis fehérjék és a PP1c β stabil asszociációjára utal (4.1.4 ábra, C).

4.1.2.1.2 A MYPT1 két variánsa tüdő artéria EC-ben

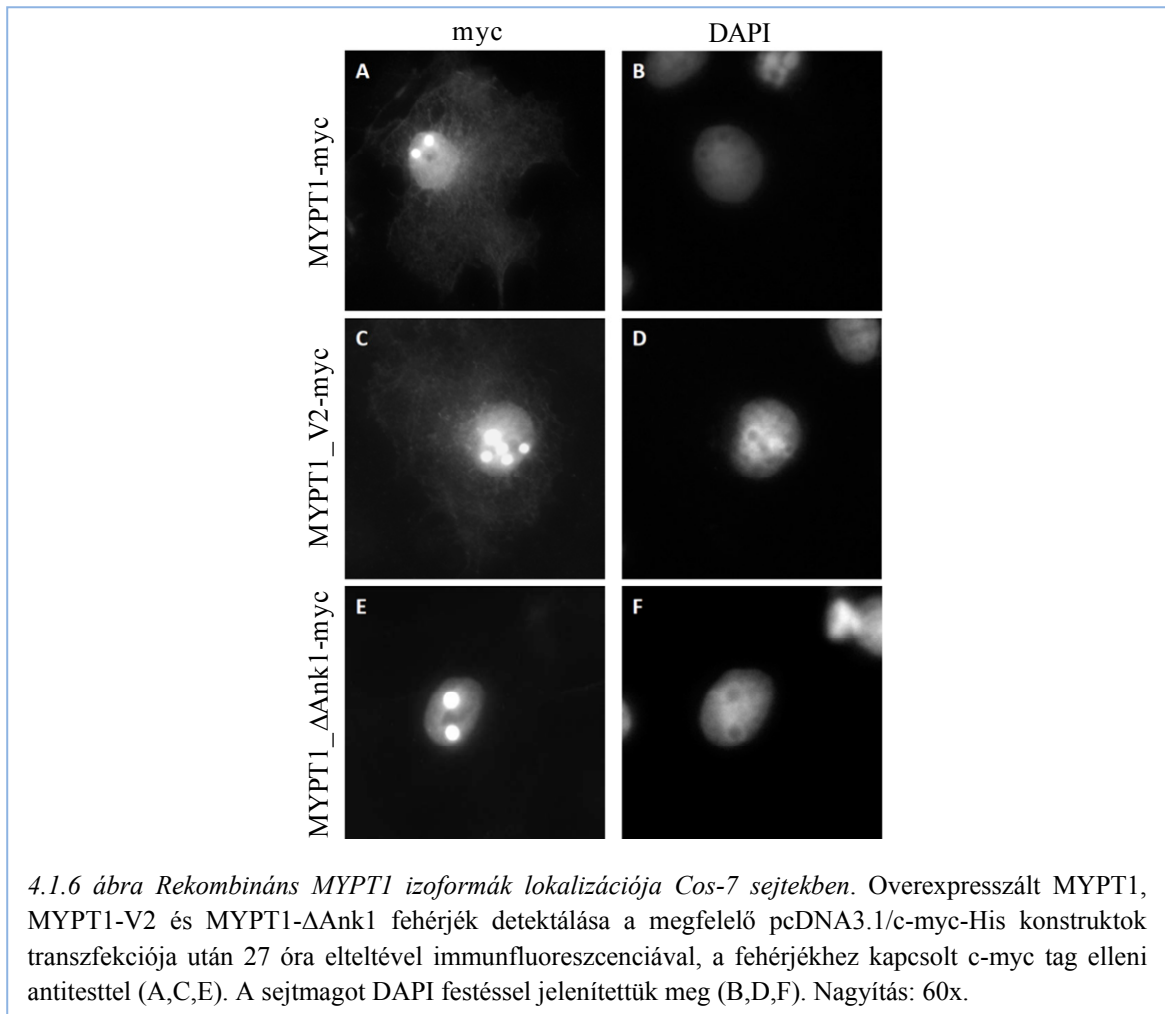
A miozin foszfatáz MYPT1 regulátor alegységének több izoformáját is leírták különböző szövetekben, amelyek ugyanazon gén alternatív splicing-jának eredményeként jönnek létre [88, 193]. HPAEC totál RNS-ből RT-PCR-ral klónoztuk a MYPT1 teljes kódoló régióját az Anyagok és módszerek fejezetben leírtak szerint.



A klónok restriktív és szekvencia analízisével a MYPT1 két, méretben eltérő izoformáját azonosítottuk, a teljes szekvenciát tartalmazó 3090 bp-ból álló MYPT1-et

(D87930) és egy 168 bp-ral rövidebb splice variánst, amit Xia és mtsai [193] variant 2-nek (V2) nevezett el (4.1.5.ábra, A).

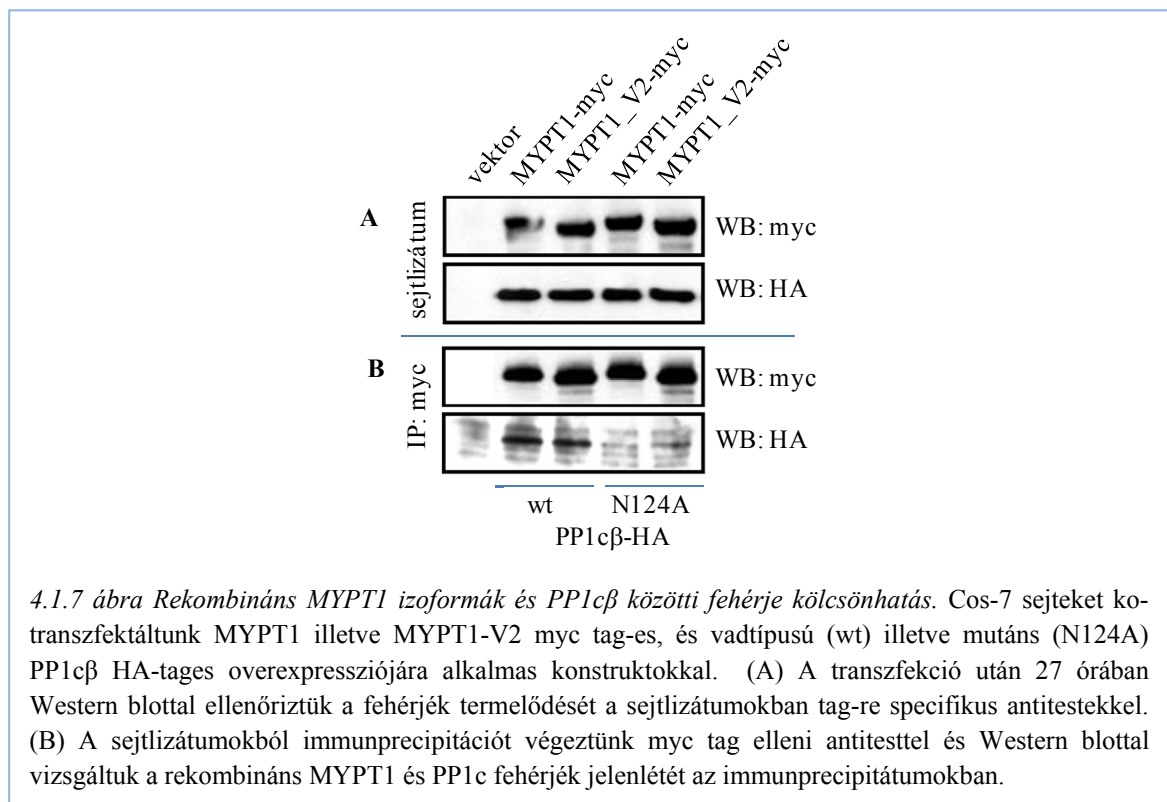
Ez összhangban van a HPAEC, HUVEC és HeLa sejtizátumok Western blot eredményével, ahol ~130 kDa méretnél két sávot detektáltunk (4.1.5 ábra, B). Az endotél sejtvonalakban a két sáv intenzitása nem mutat jelentős eltérést, ami az izoformák azonos szintű expressziójára utal. A HeLa sejtizátumban a nagyobb méretű izoforma expressziós szintje magasabb, amit korábban mások is leírtak [193]. A MYPT-V2-höz méretben nagyon hasonló másik splice variáns formát is kimutattak, amit MYPT1-V1-nek neveztek el (AF458589). HPAEC, HUVEC és HeLa mRNS templát felhasználásával, RT-PCR-ral ellenőriztük a MYPT1 és variánsai jelenlétét ezekben a sejtípusokban. Olyan PCR primer párokat terveztünk, amelyek a V1, illetve a V2 formából hiányzó szakaszokat 5' és 3' oldalról fogják közre és ~300-500 bp méretű termékeket eredményezhettek (4.1.5 ábra, A). Ebben a mérettartományban a MYPT1 és két variánsa közötti 100-200 bp-nyi különbség a PCR termékek agaróz gélen való elválasztása után jól detektálható. A P1-P2 primer párral csak egyféle terméket kaptunk, ami a MYPT1-nek felel meg, de a V1 splice



4.1.6 ábra Rekombináns MYPT1 izoformák lokalizációja Cos-7 sejtekben. Overexpresszált MYPT1, MYPT1-V2 és MYPT1- Δ Ank1 fehérjék detektálása a megfelelő pcDNA3.1/c-myc-His konstruktok transzfekciója után 27 óra elteltével immunfluoreszcenciával, a fehérjékhez kapcsolt c-myc tag elleni antitesttel (A,C,E). A sejtmagot DAPI festéssel jelenítettük meg (B,D,F). Nagyítás: 60x.

variánsnak megfelelő méretű termék nem keletkezett. A P3-P4 primer párral a MYPT1 és V2 splice variánsa egyaránt kimutatható volt (4.1.5 ábra, D). Ezek az eredmények azt igazolták, hogy a vizsgált endotél sejtekben (HPAEC, HUVEC és BPAEC, az utóbbira vonatkozó eredmények az ábrán nem szerepelnek) a MYPT teljes (D87930) és V2 formája (AY380574) expresszálódik.

A MYPT1-et és V2 variánsát c-myc taggel ellátva termeltettük Cos-7 sejtekben és vizsgáltuk a rekombinánsok sejten belüli lokalizációját. Eloszlásuk hasonlóan mutatkozott, mind a sejtmagban, mind a citoszolban megjelentek. Azonban a MYPT1 első ankirin ismétlődésén mutált formája (szekvenciájából a PP1c kötő motívum utáni 39-64 aminosavak hiányoznak) csak a sejtmagban koncentrált (4.1.6 ábra).

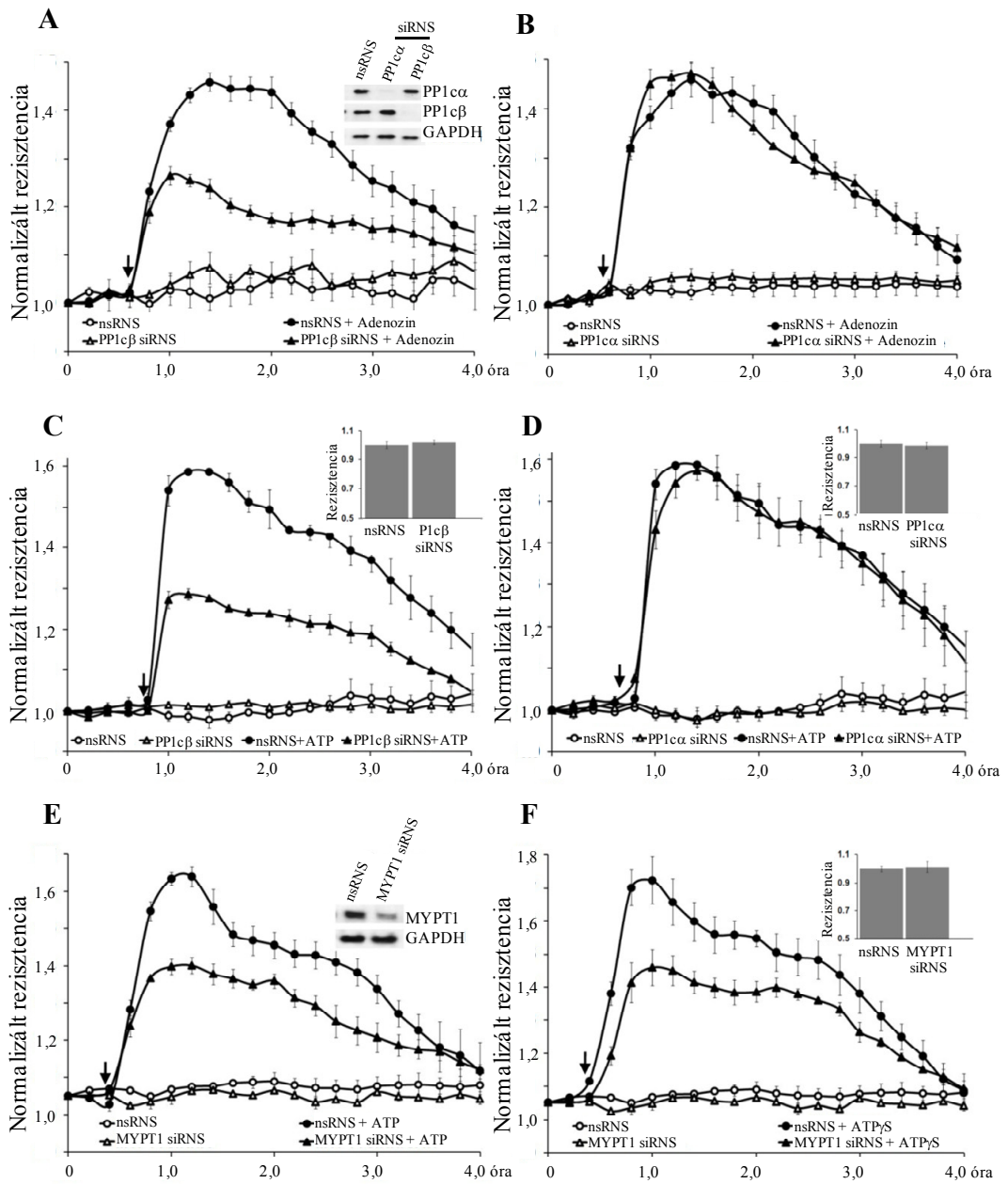


Megvizsgáltuk a PP1cβ kötődését a MYPT1 és MYPT1-V2 fehérjékhez. Cos-7 sejtekben myc taggel ellátott MYPT1, illetve MYPT1-V2 és HA taggel ellátott PP1cβ fehérjéket ko-expresszáltattunk. Ezután a sejtlizátumokból myc tag elleni antitesttel végzett immunprecipitációval fehérje kölcsönhatást mutattunk ki a két MYPT variáns és a PP1cβ között (4.1.7 ábra). A PP1cβ N124A aminosav cserét tartalmazó mutáns formájának overexpressziójára alkalmas konstrukció is előállítottunk. A PP1cβ aktivitásához esszenciális katalitikus centrumának fémion kötő képessége, amelyben a kiválasztott aminosavnak központi szerepet tulajdonítanak [44]. Ez a katalitikusan inaktív mutáns PP1cβ a MYPT1 egyik formájához sem kötődött (4.1.7 ábra).

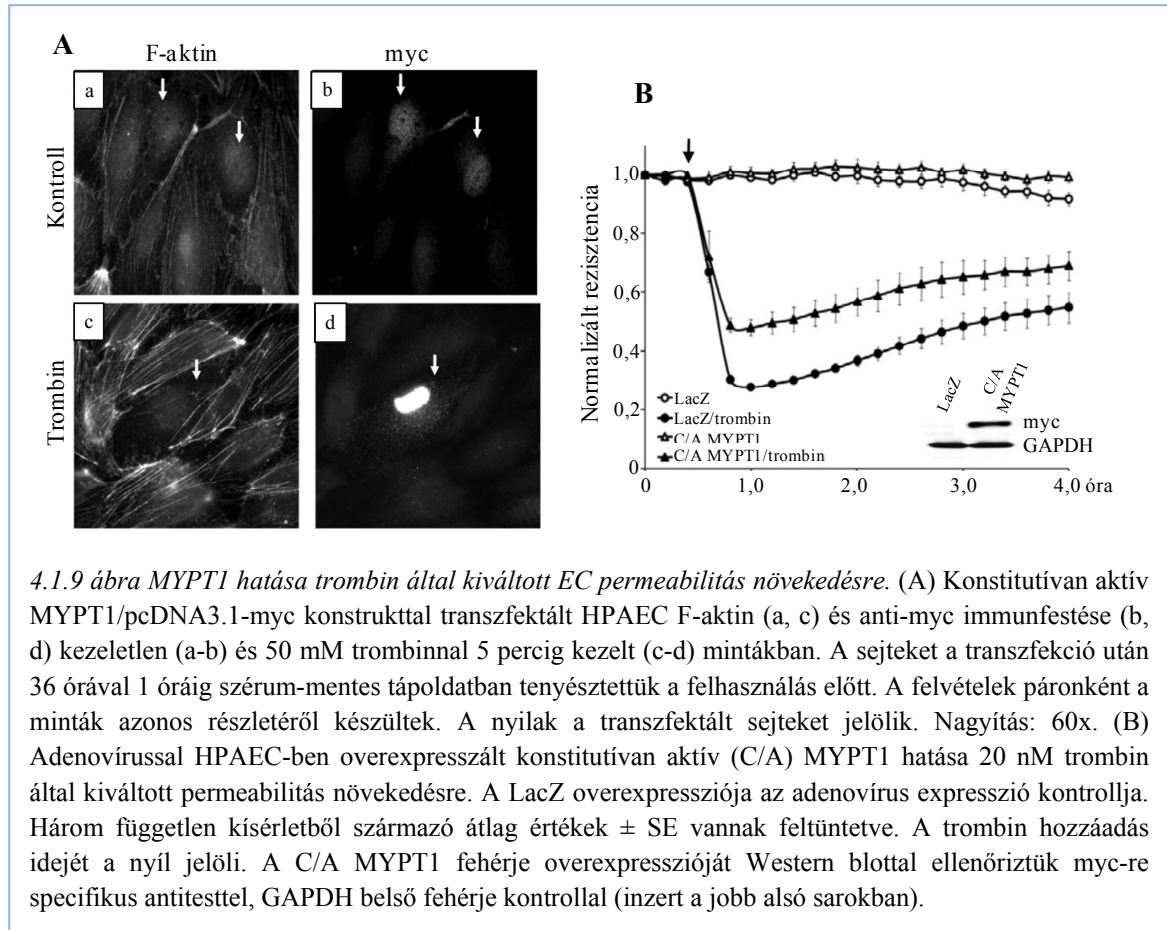
4.1.2.1.3 A miozin foszfatáz részvétele az EC permeabilitás szabályozásában

Az EC monolayer barrier funkciója és annak különböző ágensek hatására bekövetkező változása jól követhető ECIS méréssel. Ismert volt az ATP gátfunkciót erősítő hatása, továbbá az ATP-vel kezelt EC miozinban gazdag frakciójában megemelkedett PP1 aktivitást is detektáltak [194]. Megvizsgáltuk az ATP és bomlásterméke, az adenzin hatását olyan HPAEC mintákon, amelyekben a PP1c α vagy β izoformáját, illetve a MYPT1-et csendesítettük. A specifikus siRNS transzfekciója nem okozott változást a nem-specifikus (ns) RNS-sel transzfektált sejtek bazális rezisztencia értékéhez képest (4.1.8 ábra, *C,D,F* panelek jobb felső sarkában bemutatva). A PP1c α csendesítése nem befolyásolta az ATP és az adenzin barriert erősítő hatását (4.1.8 ábra, *B,D*). A gátfunkció erősödésének mérséklődését tapasztaltuk viszont a PP1c β és a MYPT1 csendesítése után, a normalizált rezisztencia értékek az ATP vagy adenzin hozzáadása után a nem csendesített mintában tapasztalt 50-60%-os növekedéssel szemben mindössze 25-40%-kal emelkedtek (4.1.8 ábra, *A,C,E*). Ugyanezt tapasztaltuk akkor is, amikor a MYPT1 csendesített sejteket az ATP nem hidrolizálódó változatával, ATP γ S-sel kezeltük (4.1.8 ábra, *F*). Ezek az eredmények azt bizonyítják, hogy az extracelluláris purin származékkal kiváltott EC gátfunkció erősödésben a miozin foszfatáz szerepet játszik.

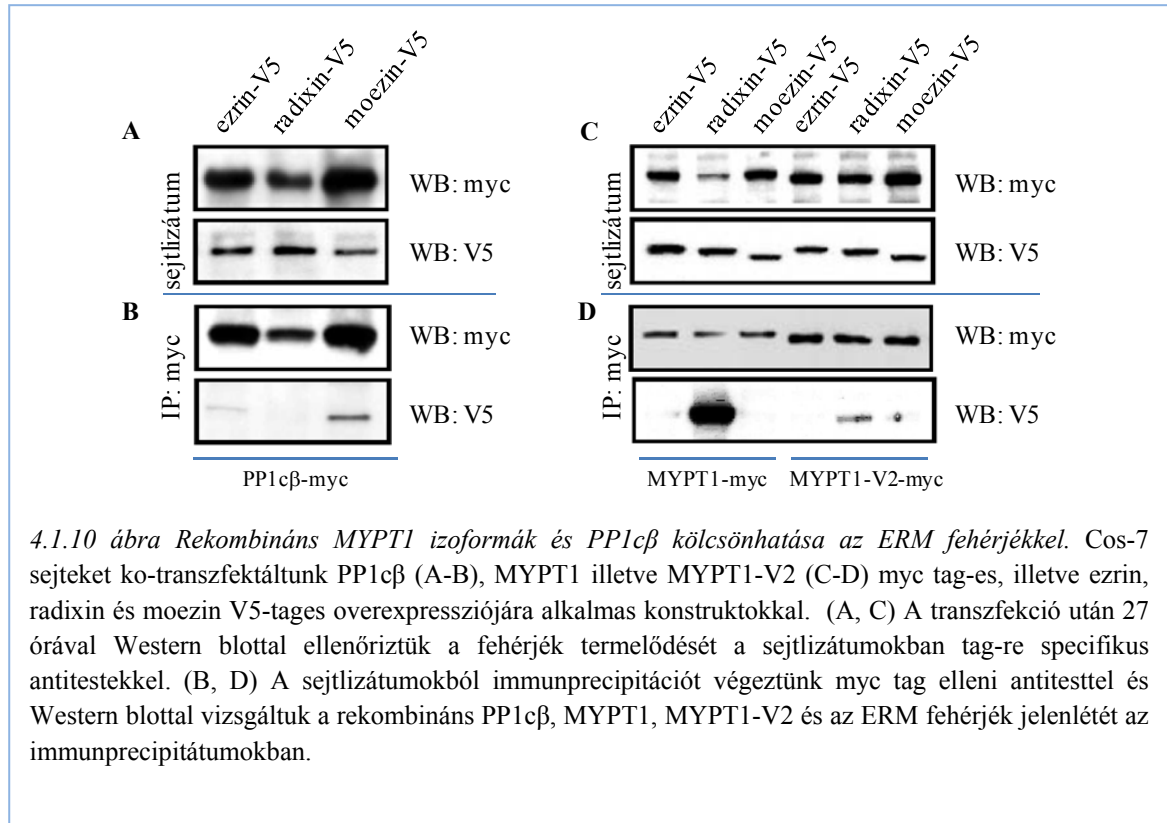
A MYPT1 C-terminális régióját autoinhibíciós doménnek tartják [90]. A C-terminális részén trunkált, a gátló foszforilációs helyet (Thr696) nem tartalmazó MYPT1 mutáns (1-300 aminosavak) overexpressziója HPAEC-ben jelentősen mérsékelte a trombin indukált stressz kábel kialakulást a környező, a rekombináns fehérjét nem termelő sejtekhez viszonyítva (4.1.9 ábra, *A:c-d*). Hasonló eredményt kaptunk a MYPT1 trunkált formájának adenovírus expressziós rendszerrel való termeltetése után végzett transzendentél rezisztencia mérésekkel (4.1.9 ábra, *B*). A trombin kezelés hatására kialakuló rezisztencia csökkenés a mutánst overexpresszáló HPAEC esetében 30-40%-kal mérséklődött a kontroll, LacZ-t overexpresszáló mintához viszonyítva. Mindezek arra utalnak, hogy tüdő artéria EC-ben a miozin foszfatáz az endotél barrier fenntartását elősegíti.



4.1.8 ábra A miozin foszfatáz mindkét alegysége szerepet játszik az EC gátfunkció szabályozásában. ECIS mikroelektródokon tenyésztett HPAEC-t transzfektáltunk nem specifikus (nsRNS), PP1c α (B,D) vagy β (A,C) és MYPT1 (E,F) fehérjére specifikus siRNS-sel és 48 óra elteltével mértük 50-50 μ M ATP (C,D,E), adenozin (A-B) vagy ATP γ S (F) hatását a transzendentél ellenállásra az Anyagok és módszerek fejezetben leírtak szerint. A nyilak az ágensek tenyésztő médiumhoz való hozzáadásának időpontját jelölik. Három független kísérletből származó átlag értékek \pm SE vannak feltüntetve. A csendesített sejtek bazális rezisztenciáját a nsRNS-sel kezelt kontrollokhoz viszonyítva adjuk meg a C, D és F panelek jobb felső részén (átlag \pm). A csendesítés hatékonyságát Western blottal ellenőriztük, amit az A és E panel jobb felső sarkában mutatunk be. Belső fehérje kontrollként a GAPDH jelét használtuk.



Megvizsgáltuk a miozin foszfatáz alegységeinek kölcsönhatását az aktin filamentumok és a plazmamembrán fehérjéi között kapcsolatot teremtő ezrin, radixin és moezin (ERM) fehérjékkel, melyek funkciója foszforiláció függő módon változik [195]. A myc (PP1c β , illetve MYPT1, -V2) és V5 (ERM) tag-gel ellátott fehérjéket Cos-7 sejtekben páronként ko-expresszáltuk. Ezután myc tag elleni antitesttel immunprecipitációt végeztünk és Western blottal detektáltuk az immunprecipitátumban jelen lévő overexpresszált fehérjéket a megfelelő tag elleni antitestekkel (4.1.10 ábra). A moezin és a PP1c β kölcsönhatása a másik két ERM fehérjéhez viszonyítva sokkal erőteljesebb volt, az ezrin alig, a radixin pedig nem volt detektálható az PP1c β immunprecipitátumában (4.1.10 ábra, A-B). A radixin erős kölcsönhatást mutatott a MYPT1-myc fehérjével és jelentősen kisebb mértékben a MYPT1-V2-vel is (4.1.10 ábra, C-D). A miozin foszfatáz tehát mindhárom ERM fehérjével kölcsönhat, de úgy tűnik az ERM fehérjék hasonlósága ellenére a kölcsönhatásokban, mind annak erősségében, mind a kölcsönható miozin foszfatáz alegység partner tekintetében jelentős a különbség.

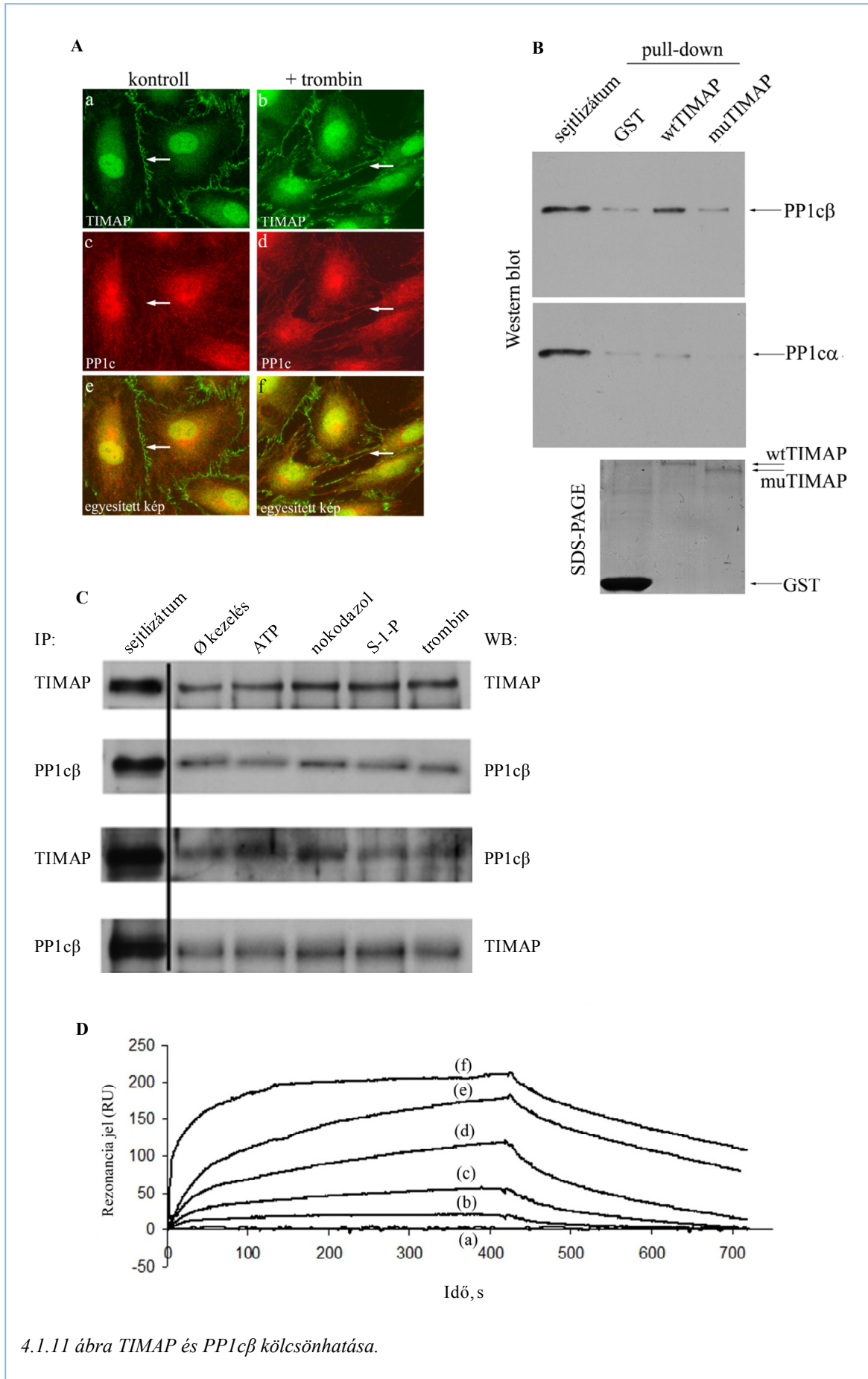


4.1.2.2 TIMAP, a protein foszfatáz 1 új regulátor alegysége

A MYPT1-hez aminosav szekvenciában és szerkezeti felépítésben hasonló fehérjéket azonosítottak, amelyeket a MYPT1-gyel együtt az ún. MYPT fehérjecsaládhoz sorolnak [16, 84]. A család mindegyik tagjában jelen van a négy aminosavból álló PP1c-kötő motívum. Ezért a TIMAP (TGF- β 1 inhibited membrane associated protein) fehérjéről, melyet először glomerulális endotél sejtekben írtak le [100], is feltételezték, hogy a PP1c regulátor alegységeként működhet az EC-ben, ahol expressziós szintje más sejttípusokhoz viszonyítva igen magas. A PP1c és a TIMAP közötti kölcsönhatást különböző módszerek segítségével tanulmányoztuk humán, illetve marha tüdő artéria endotél sejtekben.

4.1.2.2.1 A PP1c β és a TIMAP fehérje kölcsönhatása

A PP1 katalitikus alegysége és a TIMAP esetleges ko-lokalizációját TIMAP és PP1c α + β izoformák elleni antitestekkel vizsgáltuk HPAEC-ben (4.1.11 ábra, A). A TIMAP főleg a sejtmembránban és a magban festődött, valamint megfigyelhető volt a perinukleáris térben a citoszolban (4.1.11 ábra, A:a). A PP1c homogén eloszlást mutatott



(A) Endogén TIMAP és PP1c lokalizációja endotél sejtekben. Kezeletlen (a,c,e) és trombinnal kezelt (20 nM, 30 perc) (b,d,f) HPAEC sejtek monolayer-ében immunfluoreszcens festéssel jelöltük a fehérjéket anti-TIMAP (a,b; zöld) és anti-PP1c (c,d; piros) elsődleges antitesteket használva. A felvételek páronként a minták azonos részletéről készültek. Nyilakkal azonos területeket emeltünk ki az összetartozó (a,c,e illetve b,d,f) képeken. A másodlagos antitestek aspecifikus kötődését kontroll kísérletekben nem tapasztaltuk. Nagyítás: 60x. (B) A TIMAP és a PP1c különböző izoformái közötti kölcsönhatás specificitásának tanulmányozása. Bakteriális expresszióval előállított GST fúziós fehérjével kapcsolt vad típusú (wt) TIMAP-ot, mutáns (mu) TIMAP-ot és GST fehérjét immobilizáltunk glutation-Sepharose 4B-n, majd HPAEC sejtlyizátummal inkubáltuk. Többszöri mosás után eluáltuk a fehérje komplexeket, majd Western blot kísérletben PP1c β illetve PP1c α elleni antitesttel detektáltuk a foszfatáz jelenlétét. Pozitív kontrollként HPAEC sejtlyizátumot használtunk. Alul a glutation-Sepharose oszlopról eluált GST, wtTIMAP és muTIMAP rekombináns fehérjék Coomassie kék festése látható. (C) Endogén TIMAP és PP1c kölcsönhatása. TIMAP- illetve PP1c-re specifikus antitesttel végeztünk immunprecipitációt kezeletlen (\emptyset kezelés), illetve ATP-vel (10 μ M, 30min), nokodazzal (0,1 μ M, 30 min), szfingozin 1-foszfáttal (S-1-P; 1 μ M, 3h) vagy trombinnal (20 nM, 30min) kezelt HPAEC lizátumokból az Anyagok és módszerek részben leírtak szerint. A kötődött TIMAP illetve PP1c β fehérjéket az immunprecipitátumokban specifikus antitestekkel detektáltuk. Pozitív kontrollként HPAEC sejtlyizátumot használtunk. (D) TIMAP-PP1c β kölcsönhatás jellemzése felületi plazmon rezonancia módszer segítségével. Mutáns GST-TIMAP (a) és vad típusú GST-TIMAP fehérjéket (b,c,d,e,f) immobilizáltunk CM5 szenzor chip felületére, majd rekombináns PP1c β -t injektáltunk a felületre különböző koncentrációkban: 0,2 μ M (b), 0,5 μ M (c), 1,0 μ M (d), 2,0 μ M (e), és 3,0 μ M (a, f). Biacore 3000 készülék segítségével szenzogramokat vettünk fel, melyek a kölcsönhatás következtében fellépő rezonanciajel változásokat mutatják az idő függvényében.

a sejten belül, helyenként kihangsúlyozva a filamentum struktúra elrendeződését (4.1.11 ábra, A:c). Trombin kezelés (b,d,f) hatására a TIMAP eloszlása nem változott, úgy tűnt viszont, hogy a PP1c koncentrációja a sejtmembránban. Az egyesített képen a két fehérje részleges ko-lokalizációját figyelhetjük meg, különösen trombin kezelést követően (4.1.11 ábra, A:e,f). Mindkét fehérje expressziós szintje magas az EC-ben, ezért bár az immunfluoreszcens festés lehetséges ko-lokalizációt sugallt, nem tudtuk kizárni, hogy ez csak véletlen egybeesés lehet.

Rekombináns TIMAP fehérjével pull-down kísérletben megvizsgáltuk, hogy endotél sejtlyizátumból kötődik-e a natív PP1c a TIMAP-hoz, továbbá a PP1c melyik izoformájával mutat kölcsönhatást. Baktériumban termeltettünk GST fúziós fehérjével kapcsolt vad típusú TIMAP-ot és a TIMAP egy olyan mutánsát (Δ 1-71), amely nem tartalmazza a PP1c-kötő motívumot és az első ankirin ismétlődés egy részét, ezért a PP1c-hez várhatóan nem tud kötődni. A rekombináns vad típusú és mutáns TIMAP-ot, valamint a GST kontrollt glutation Sepharose 4B-n immobilizáltuk, majd HPAEC sejtlyizátummal inkubáltuk. A nem kötődő vagy aspecifikusan kötődő fehérjéket mosással eltávolítottuk. Ezután az immobilizált rekombináns és velük specifikusan kölcsönható fehérjéket SDS mintapufferrel eluáltuk. Western blot analízissel kimutattuk, hogy a vad típusú GST-

TIMAP-hoz a sejtizátumból a PP1c β izoformája kötődött, míg a PP1c α izoformájával nem jött létre kölcsönhatás (4.1.11 ábra, *B*). Várakozásunknak megfelelően a mutáns GST-TIMAP és a PP1c kötődése elhanyagolható volt és a rekombináns GST fehérje kontroll sem adott specifikus jelet.

Az endogén PP1c-TIMAP komplex kialakulását EC sejtizátumban is kimutattuk immunprecipitációs kísérletekben anti-TIMAP és anti-PP1c (α,β) antitesteket alkalmazva. A PP1c (α,β) elleni antitesttel kapott immunprecipitátumban TIMAP elleni antitesttel kimutattuk a 64 kDa méretű TIMAP fehérjét, valamint fordított immunprecipitációs kísérletben a TIMAP antitest immunkomplexében detektálható volt a 37 kDa méretű PP1c jelenléte (4.1.11 ábra, *C*), megerősítve a TIMAP és PP1c fehérjék között feltételezett kölcsönhatást. Megvizsgáltuk továbbá, hogy különböző, az EC barrier funkcióját befolyásoló kezelések hatására változik-e a fehérjék mennyisége az immunprecipitátumokban. A sejteket a gátfunkciót erősítő (ATP és szfingozin 1-foszfát, S-1-P), valamint gátló (nokodazol és trombin) ágensekkel kezeltük és immunprecipitáció után Western blot módszerrel detektáltuk a TIMAP, illetve PP1c fehérjéket (4.1.11 ábra, *C*). A denzitométriált eredmények analízise nem mutatott szignifikáns mennyiségi változást a különböző kezelések hatására, ami azt sugallja, hogy ezek az ágensek a TIMAP-PP1c kölcsönhatást nem befolyásolják.

Biacore készülékkel végzett felületi plazmon rezonancián (SPR) alapuló kötődési kísérletek alkalmasak a szenzor chip felületén immobilizált fehérje és az e fölött átfolyó mintában lévő molekulák közötti kölcsönhatás erősségének és specificitásának vizsgálatára. A kapott szenzogramok kiértékelésével a kölcsönhatás kinetikájáról kaphatunk további információkat, így például meghatározhatóak az asszociáció és disszociáció sebességi állandói, illetve a kölcsönhatásra jellemző asszociációs/disszociációs állandó. A TIMAP-PP1c β kölcsönhatás SPR módszerrel történő igazolásához teljes hosszúságú GST-TIMAP-ot, kontrollként pedig mutáns GST-TIMAP-ot (Δ 1-71) valamint GST-t immobilizáltunk anti-GST antitesttel kapcsolt CM5 chip felszínére, majd vizsgáltuk a felületre növekvő koncentrációban injektált PP1c kötődését. Az eredmények a PP1c β és GST-TIMAP koncentrációfüggő kölcsönhatását igazolják (4.1.11 ábra, *D:b-f*). A szenzogramok alapján a BIAevaluation 3.1 szoftver segítségével meghatároztuk az asszociációs ($k_a= 6,4 \times 10^3$ 1/Ms) és disszociációs ($k_d= 2,7 \times 10^{-3}$ 1/s) sebességi állandókat, valamint a kölcsönhatásra jellemző asszociációs állandót ($K_A=1,8 \times 10^6$ 1/M), ez utóbbi stabil fehérje-fehérje kölcsönhatásra utalt. A PP1c

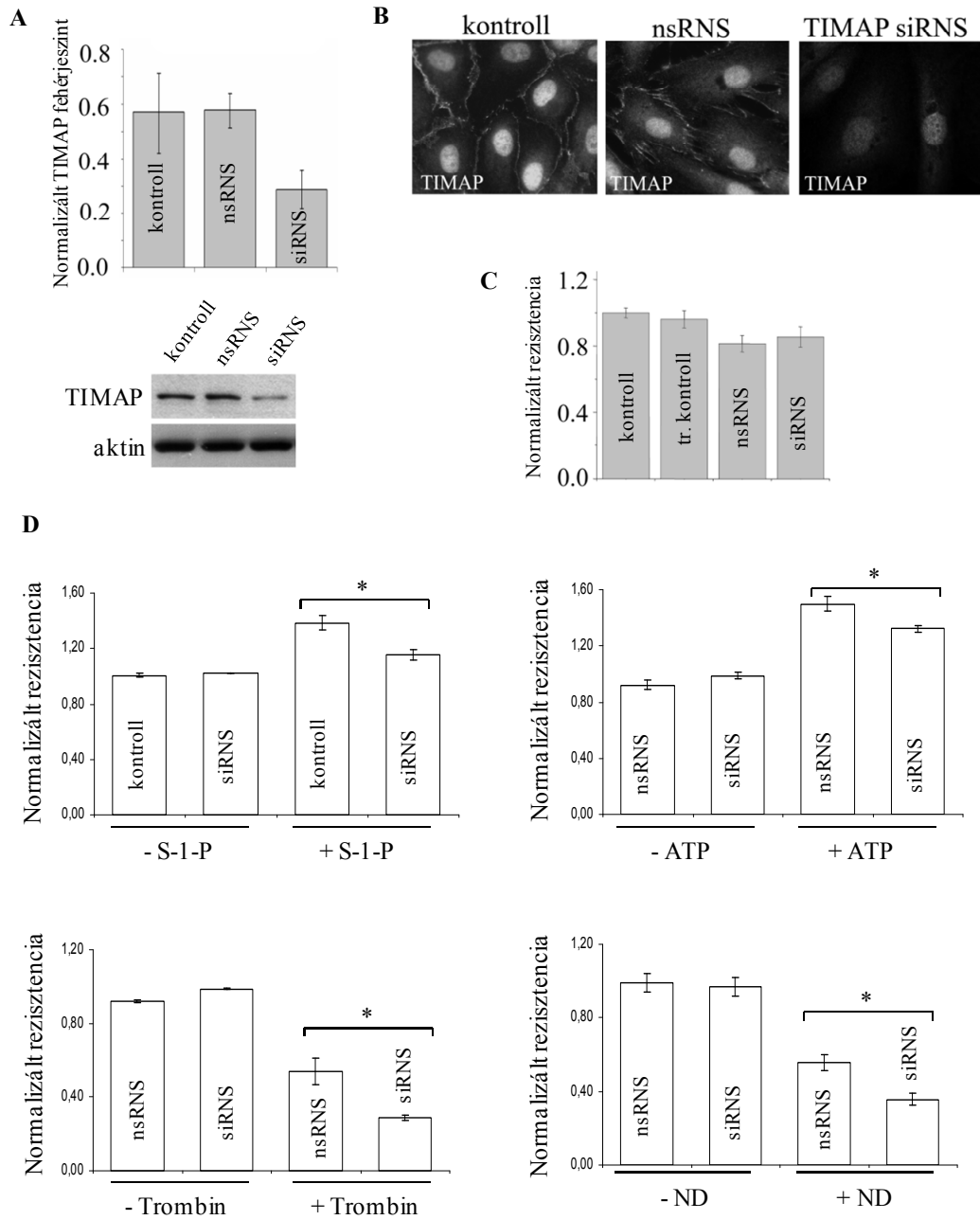
kötőmotívumot nem tartalmazó mutáns GST-TIMAP és a PP1c β között viszont nem volt detektálható kölcsönhatás (4.1.11 ábra, *D:a*).

4.1.2.2.2 *A TIMAP részt vesz az EC gátfunkció szabályozásában*

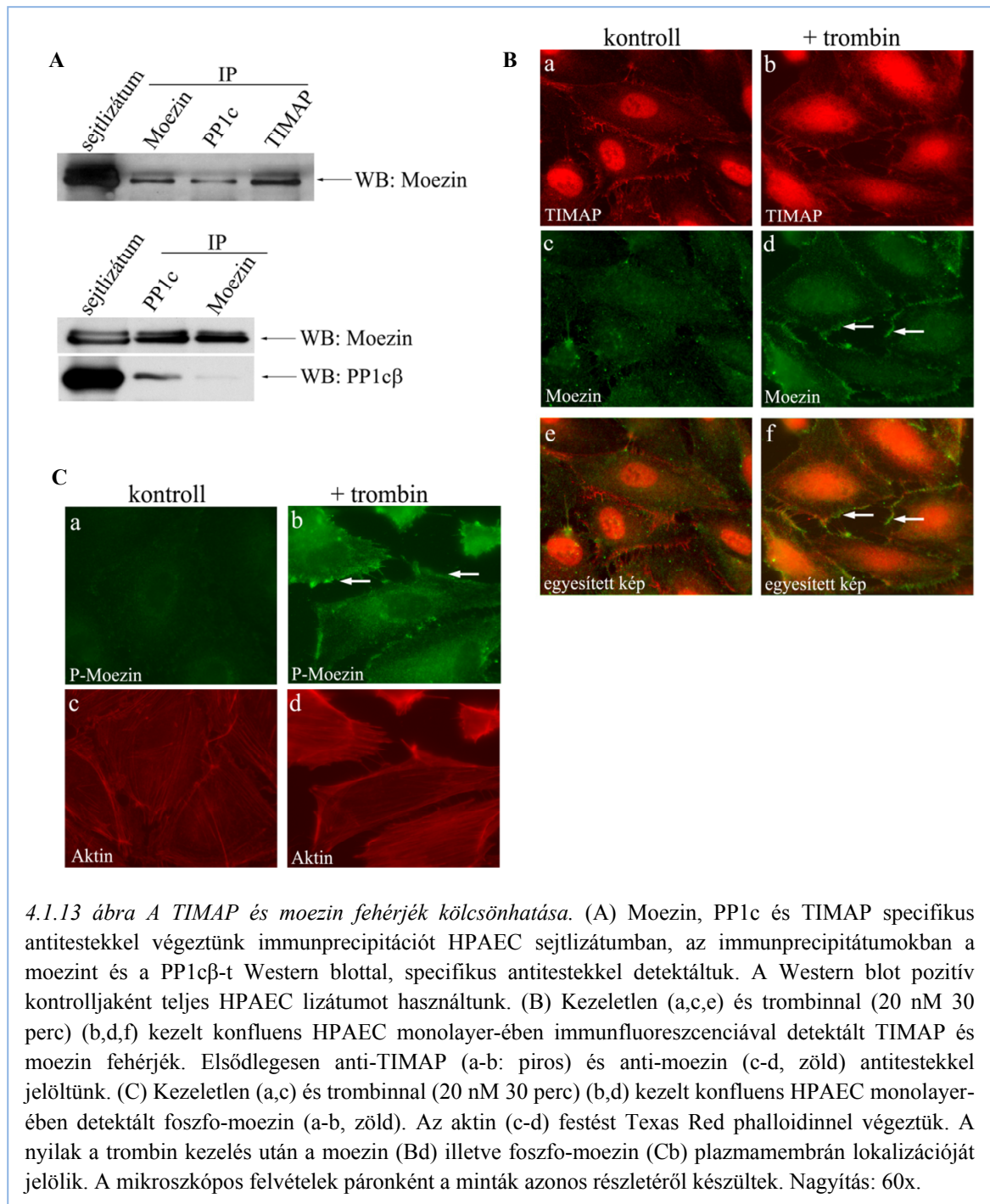
A TIMAP-ot jelentős mennyiségben detektáltuk a plazmamembránban, ezért feltételeztük, hogy ott a PP1c regulátoraként szabályozhatja a membránhoz asszociálódó fehérjé(k) foszforilációs szintjét, és ezáltal befolyásolja az EC gátfunkciót. Ennek igazolására a TIMAP-ot specifikus siRNS-sel csendesítettük HPAEC sejtekben, aminek hatékonyságát Western blottal és immunfluoreszcenciával ellenőriztük (4.1.12 ábra, *A-B*). A fehérje csendesítése, illetve a csendesítéshez alkalmazott reagensek nem befolyásolták az EC monolayer bazális ellenállását, amiről ECIS méréssel győződünk meg (4.1.12 ábra, *C*). Ezután mértük a transzendentél elektromos ellenállás (TER) változását különböző kezelések hatására. Ismert, hogy az ellenállás növekedése a barrier funkció stabilizálódását, míg csökkenése a barrier funkció gyengülését jelzi. A kontrollhoz képest az S-1-P és ATP barrier funkciót erősítő hatása mérséklődött, míg a barrier diszfunkciót kiváltó trombin és nokodazol hatása fokozódott azokban a mintákban, amelyekben a TIMAP-ot csendesítettük (4.1.12 ábra, *D*). Ebből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a TIMAP fehérje részt vesz az EC gátfunkció szabályozásában, feltehetően a barrier kialakításában és fenntartásában jelentős fehérjék PP1c β -TIMAP komplex általi defoszforilációjával.

4.1.2.2.3 *Az ERM fehérjék a PP1c β -TIMAP szubsztrátjai*

A TIMAP plazmamembrán lokalizációja alapján feltételeztük, hogy az ERM fehérjék a PP1c β -TIMAP komplex lehetséges szubsztrátjai EC-ben. MDCK sejtekben, ahol a TIMAP nem expresszálódik, kimutatták, hogy a moezint a miozin foszfatáz defoszforilálja [196]. Megvizsgáltuk, találunk-e kölcsönhatást a TIMAP és a moezin fehérje között HPAEC-ben. HPAEC lizátumokkal moezin, PP1c és TIMAP elleni antitestekkel immunprecipitációt végeztünk. A Western blot eredménye szerint a moezin valóban kölcsönhatásban lehet a TIMAP és PP1c fehérjékkel (4.1.13 ábra, *A*). Immunfluoreszcenciával a TIMAP és a moezin ko-lokalizációját detektáltuk a trombinnal kezelt, kontraháló HPAEC plazmamembránjában (4.1.13 ábra, *B*), valamint a trombin kezelés hatására a moezin foszforilált formája is feldúsul a plazmamembránban (4.1.13 ábra, *C*).



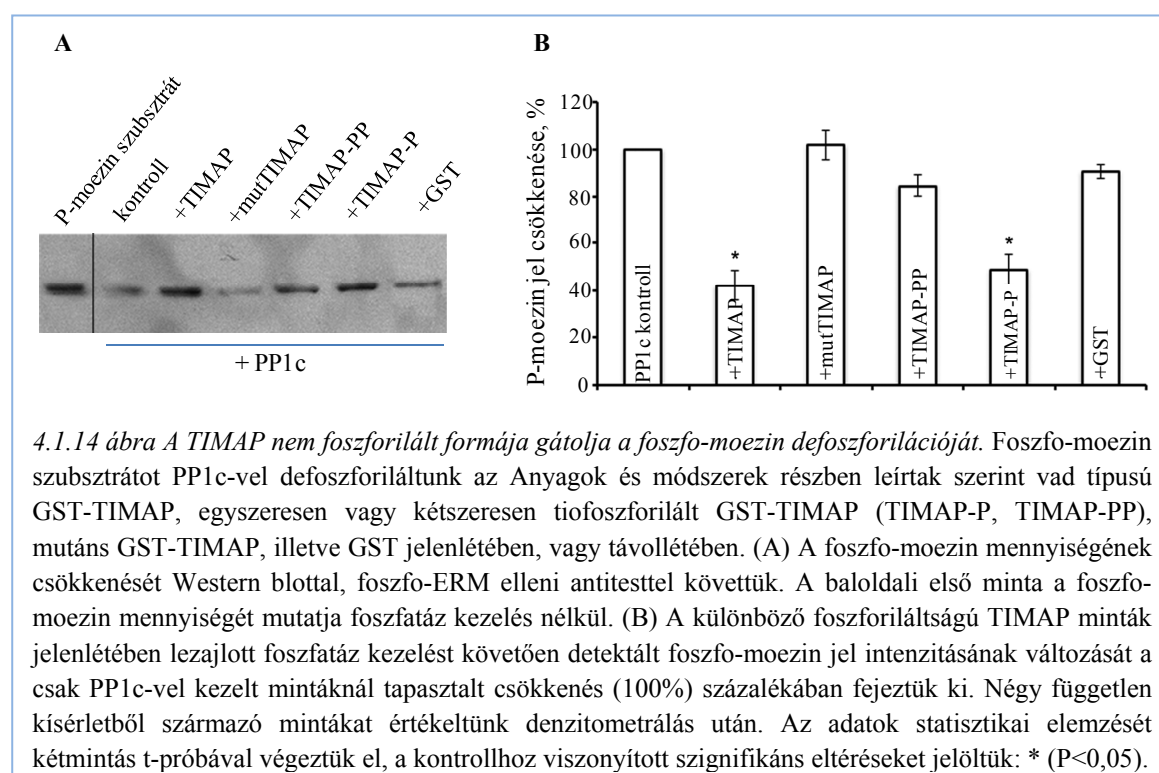
4.1.12 ábra TIMAP csendesítés hatása az EC gátfunkcióra. Kezelés nélküli (transzfekeiós kontroll), valamint az Anyagok és módszerek részben leírtak szerint, nem specifikus (ns) RNS-el transzfekeált illetve TIMAP-ra csendesített HPAEC-ben Western blot kísérletben (A) és immunfluoreszcenciával (B) (nagyítás: 60x) ellenőriztük a TIMAP fehérje expressziós szintjét. A Western blot eredmények denzitometrlása után a TIMAP mennyiségét az aktin kontrollra normalizáltuk (n=4). (C) Nem transzfekeált (kontroll), transzfekeiós kontroll, nsRNS-sel valamint a TIMAP-ra specifikus siRNS-sel transzfekeált sejtek bazális transzendentél ellenállása a kontrollra normalizálva. (D) Nem transzfekeált (kontroll), nem specifikus (ns) RNS-sel, illetve TIMAP specifikus siRNS-sel transzfekeált sejteket kezeltünk +/- 1 μ M S-1-P-tal, 10 μ M ATP-tal, 20 nM trombinnal vagy 0,1 μ M nokodazollal (ND), majd három órán át mértük a TER-t. A kiindulási ellenállás 800 és 1200 Ω között mozgott. A kezelések következtében kialakult maximális TER csökkenés vagy növekedéskor mért relatív ellenállást \pm SE (n=3) ábrázoltuk. A szignifikancia szintet (*, P<0.01) kétmintás T-próbával határoztuk meg.



A TIMAP fehérjével rokon MYPT3-ról leírták, hogy PKA-val foszforilálható. Ez a foszforiláció megnöveli a MYPT3-PP1c komplex foszfatáz aktivitását foszfo-MLC szubsztráttal szemben [197]. A feltételezett foszforilációs helyet tartalmazó szekvencia részlet nagyon hasonló a két fehérjében (MYPT3: ³³⁶RRRTSSAGSRGKVVRRVSL³⁵⁴; TIMAP: ³³³SRRTSSAGSRGKVVRRASL³⁵¹). Ezért *in vitro* elegyben megkíséreltük a rekombináns GST-TIMAP foszforilációját PKA-val [γ -³²P]-ATP szubsztrát

felhasználásával. A GST-TIMAP valóban foszforilálódott, $\sim 0,8$ mol/mol foszfát beépülést detektáltunk. Időközben egy másik munkacsoport rekombináns TIMAP lehetséges foszforilációs helyeit vizsgálva kimutatta, hogy a PKA a TIMAP Ser337-es oldalláncát foszforilálja és valószínűsítették, hogy ezt az előfoszforilációt követi a Ser333 GSK3 β általi foszforilációja [198].

Bakteriális expresszióval GST-moezint állítottunk elő, amelyet glutation-Sepharose 4B oszlopon affinitás kromatográfiával tisztítottunk, majd a GST fúziós fehérjerészt trombin proteázzal eltávolítottuk. Ezt a rekombináns moezint Rho kinázzal foszforiláltuk és foszfatáz aktivitás mérésekhez használtuk foszfo-szubsztrátként. A vad típusú GST-TIMAP-ot tiofoszforiláltuk PKA-val (GST-TIMAP-P, Ser337), majd a minta egy részét tovább tiofoszforiláltuk GSK3 β -val (GST-TIMAP-PP, Ser337/333). A foszforilációhoz azért alkalmaztunk ATP γ S szubsztrátot, hogy a TIMAP nem hidrolizálható tiofoszforilált formáit kapjuk. A PP1c β -t előinkubáltuk a nem foszforilált- és tiofoszforilált fehérjékkel, majd a P-moezin szubsztrát hozzáadásával indítottuk a foszfatáz reakciót. 30 perc után a mintákat Western blot analízissel, specifikus P-ERM antitestet alkalmazva detektáltuk a P-moezin szubsztrát foszforilációs szintjének változását (4.1.14 ábra, A).



Az egyes mintákban a foszfatáz kezelés következtében a P-moezin jel különböző mértékben csökkent. A TIMAP nélküli, csak PP1c β -val kezelt P-moezinnek megfelelő jel intenzitását a foszfatáz nélküli kontrollhoz hasonlítottuk, és ezt a csökkenést tekintettük

100%-nak, a többi mintában detektált változást ennek %-ában fejeztük ki (4.1.14 ábra, B). A GST-TIMAP és a GST-TIMAP-P jelentősen csökkentette (~60% és ~50%) a PP1c β aktivitását. Ezzel szemben a GST-TIMAP-PP jelenlétében nem tapasztaltunk szignifikáns foszfatáz gátlást (4.1.14 ábra, B). A PP1c β -val kölcsönhatást nem létesítő kontroll fehérjék, a GST és a mutáns GST-TIMAP hatása szintén elhanyagolható volt. Hasonló eredményeket kaptunk P-MLC szubsztráttal is (nincs dokumentálva), ezért feltételezhető, hogy a vad típusú TIMAP gátló hatása a PP1c aktivitásra nem szubsztrát specifikus.

Felületi plazmon rezonancia vizsgálattal összehasonlítottuk a GST-TIMAP nem foszforilált és egy-, illetve kétszeresen foszforilált formájának kölcsönhatását a PP1c-vel. A nem foszforilált TIMAP és a PP1c β asszociációs állandója a korábbi kísérlet sorozatban (4.1.11 ábra, D) kapott értékkel közel azonos, $K_A = 1,28 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, illetve $K_A = 1,80 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$. A komplex képződésének sebességi állandóját (k_a) a PKA-val történt foszforiláció nem változtatta meg, de a disszociációs sebességi állandó (k_d) csökkent a nem foszforilált TIMAP-hoz képest. Az egyszeresen foszforilált TIMAP-PP1c β asszociációs állandó körülbelül négyszeres értéke ($K_A = 7,39 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) mérsékelten erősebb kölcsönhatásra utal. A kétszeresen foszforilált TIMAP (PKA és GSK3 β foszforilált) esetében mindkét érték, k_a és k_d is csökkent. Az asszociációs állandó értéke pedig azt mutatja, hogy a kétszeresen foszforilált TIMAP-PP1c β ($K_A = 1,93 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) esetén a kötődés közel azonos erősségű, mint a nem foszforilált TIMAP-PP1c β ($K_A = 1,28 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) esetében (4.1.3 táblázat). Eredményeink szerint a TIMAP foszforilációja PKA és GSK3 β kinázokkal nem befolyásolja a TIMAP és PP1c β fehérjék kötődését, de a TIMAP-PP1c β komplex aktivitását igen.

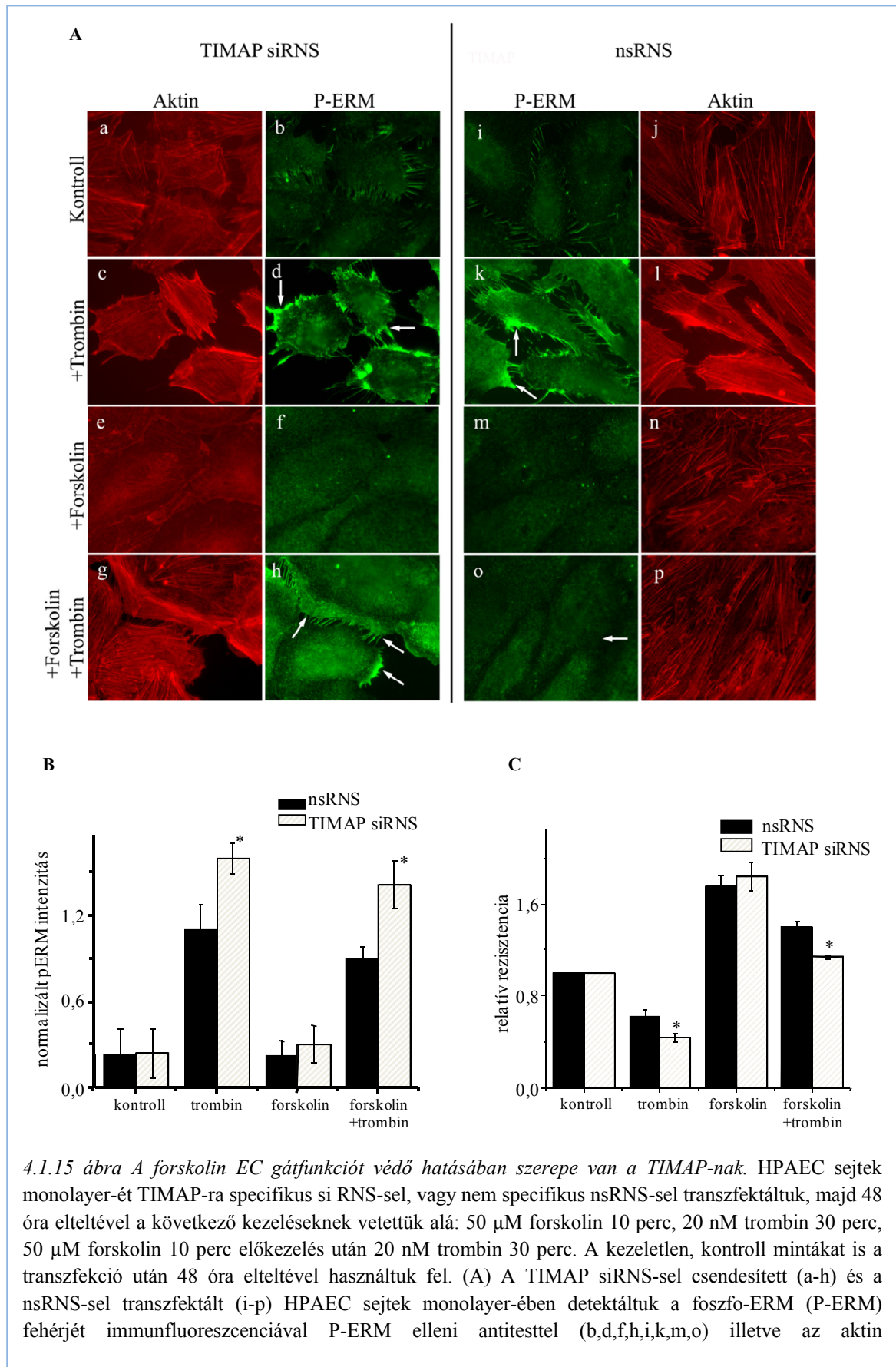
4.1.3 táblázat. PP1c β -TIMAP kölcsönhatás kinetikai paramétereit és egyensúlyi állandói

Ligandum	k_a 1/Ms	k_d 1/s	$K_A = k_a/k_d$ 1/M
GST-TIMAP	$4,68(\pm 1,32) \times 10^3$	$3,66(\pm 0,88) \times 10^{-3}$	$1,28 \times 10^6$
GST-TIMAP-P	$4,11(\pm 0,37) \times 10^3$	$5,56(\pm 1,12) \times 10^{-4}$	$7,39 \times 10^6$
GST-TIMAP-PP	$1,01(\pm 0,47) \times 10^3$	$5,22(\pm 0,57) \times 10^{-4}$	$1,93 \times 10^6$

Az Anyagok és módszerek fejezetben leírtak szerint a TIMAP különböző foszforilált formáit immobilizáltuk CM5 szenzor chip felületén, mint ligandumot, majd rekombináns PP1c β -t injektáltunk a felületre 1,0; 2,0 és 3,0 μM koncentrációban. A BIACORE készülékkel felvett szenzogramok alapján a BIAevaluation 3.1 szoftver segítségével meghatároztuk a kölcsönhatásokra jellemző asszociációs állandókat (K_A), valamint az asszociációs (k_a) és disszociációs (k_d) sebességi állandókat.

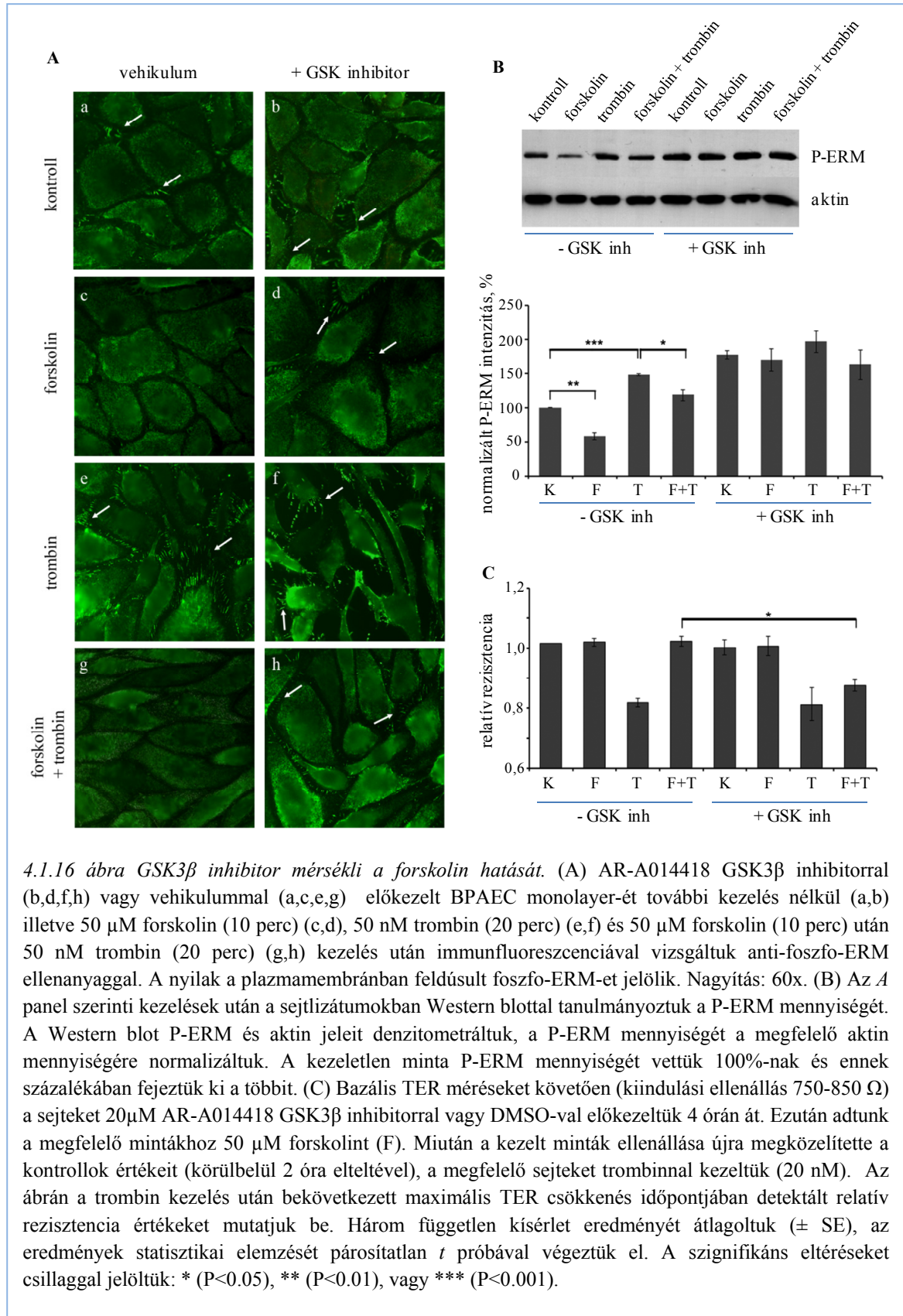
In vitro foszfatáz aktivitás méréseink szerint a kétszeresen foszforilált TIMAP-PP-PP1c β komplex aktív P-moezin szubsztráttal szemben (4.1.14 ábra). HPAEC forskolin kezelésével, ami a cAMP szintet növeli és a PKA-t aktiválja, a TIMAP fehérje foszforilációját, míg trombin kezeléssel az ERM foszforilációját kívántuk kiváltani a sejtekben. Feltételeztük, hogy ha a PKA (és GSK3 β) valóban foszforilálja a TIMAP-ot, akkor a megnövekvő foszfatáz aktivitás a P-moezin/P-ERM szintjét csökkenteni fogja. Mivel a TIMAP foszforilált formáira specifikus antitestekkel nem rendelkezünk, ezekben a vizsgálatokban nem specifikus (ns) és TIMAP-ra specifikus siRNS-sel transzfektált tüdő artéria EC-t hasonlítottunk össze trombin és forskolin kezelése után. Immunprecipitációval meggyőződünk arról, hogy a trombin, forskolin és a két ágens együttesen nem befolyásolja a TIMAP és PP1c β kötődését (nincs dokumentálva). Immunfluoreszcenciás kísérleteinkben (4.1.15 ábra, A) azt tapasztaltuk, hogy a forskolin kezeléssel a kontroll sejtek felszínén megfigyelhető, P-ERM-re pozitív jelet adó tüskék, filopódiumok eltűntek (b,i,f,m). A trombin kezelés sejtkontrakciót és a korábbiakkal összehangban (4.1.13 ábra, C) P-ERM szint emelkedést okozott a plazmamembrán régióban (d,k). A sejteket forskolinnal előkezelve a trombin hatása nem érvényesült azokban a sejtekben, amelyek tartalmazták a TIMAP-ot (o). A TIMAP csendesített sejteken azonban a forskolin előkezelés ellenére is nagyszámú filopódiumot láttunk, melyekben a P-ERM erősen festődött (h). A sejtek teljes lizátumában Western blottal is összehasonlítottuk a P-ERM szint változását ugyanilyen kezelése után (4.1.15 ábra, B). A foszforilált ERM fehérje szintjében ugyan csak mérsékelt csökkenést tapasztaltunk a sejtek forskolinnal és trombinnal történő együttes kezelése után, de a változás tendenciája megegyezett az immunfluoreszcencia eredményeivel.

Az immunfluoreszcens eredmények megerősítésére egy további, érzékenyebb módszert is alkalmaztunk. Megmértük a nsRNS és TIMAP-ra specifikus siRNS-sel transzfektált HPAEC transzendentél ellenállását (TER) (4.1.15 ábra, C). Csendesített sejtekben a forskolin védő hatása a trombin kezeléssel szemben szintén szignifikánsan kisebbnek bizonyult, mint a TIMAP-ot tartalmazó sejtekben. A TIMAP hiányában tapasztalt eltérő ERM foszforilációs szint és a TER mérések eredményei a sejtek különböző kezelése után megerősítette azt a feltételezésünket, hogy a TIMAP barrier funkcióra kifejtett pozitív hatásában (4.1.12 ábra, D) az ERM foszforilációs szintjének szabályozása egy fontos elem lehet.



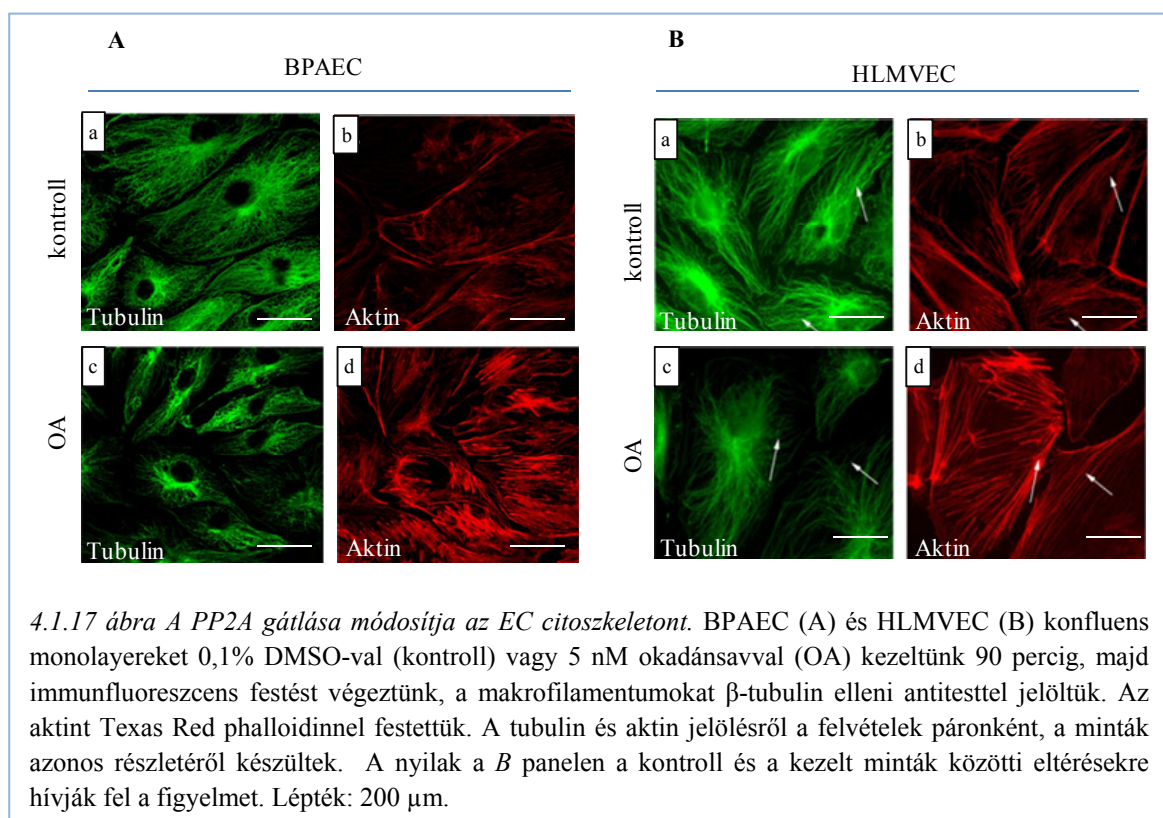
filamentumokat Texas Red phalloidinnel festettük (a,c,e,g,j,l,n,p). A felvételek páronként a minták azonos részletéről készültek. Nyilakkal jelöltük a plazmamembránban a P-ERM fehérje feldúsulását trombin kezelés után a csendesített sejtekben (d), illetve a nsRNS kontrollban (k), hasonlóan a forskolin és trombin együttes kezelése után a csendesített sejtekben (h) illetve a feldúsulás hiányát az nsRNS-sel transzfektált sejtekben (o). Nagyítás: 60x. (B) A kezelt és kezeletlen sejteket 20 mM NaF-ot tartalmazó SDS mintapufferben felkapartuk és Western blottal vizsgáltuk a P-ERM mennyiségét specifikus antitesttel. Belső fehérjekontrollként GAPDH-t alkalmaztunk, ehhez viszonyítottuk a P-ERM mennyiségét (n=3, átlag ± SE). (C) Bazális TER mérést követően a sejteket forskolinnal (50 μM) vagy DMSO-val előkezeltük. A maximális hatás elérése után (~30 perc) a megfelelő mintákat trombinnal kezeltük (100 nM). Három független transzfekció eredményeit (maximális növekedés vagy csökkenéskor mért relatív ellenállás) mutatjuk be. Az eredményeket a nem kezelt (kontroll), siRNS-sel transzfektált mintára normalizáltuk (átlag ± SE). *: szignifikáns eltérés a nsRNS és siRNS-sel transzfektált minták között (P<0,05).

Li és mtsai [198] eredményei szerint a TIMAP PKA-val a Ser337 oldalláncon foszforilálódik, ami a Ser333 GSK3β általi foszforilációját iniciálja. Továbbá saját foszfatáz aktivitás méréseink azt mutatták, hogy míg a csak PKA-val foszforilált TIMAP gátolta a PP1cβ-t, a PKA-val és GSK3β-val kétszeresen foszforilált TIMAP már nem (4.1.14 ábra), tehát egyedül a TIMAP-PP-PP1cβ komplex aktív a foszfo-moezin szubsztráttal szemben. Ezért a trombin és forskolin kezeléseket hatását BPAEC-re a GSK3β specifikus inhibitora, AR-A014418, jelenlétében és távollétében is megvizsgáltuk (4.1.16 ábra). Immunfluoreszcenciával és Western blottal is azt tapasztaltuk, hogy a GSK3β aktivitás gátlásával a sejtek P-ERM szintje a gátlószerrel nem kezelt sejtekhez hasonlítva a további kezelésektől függően változóan, de mindig magasabb volt. (4.1.16 ábra, A-B). A forskolin előkezelés nem védte ki a trombin hatását a GSK3β gátolt sejtekben (4.1.16 ábra, A:g,h, B), amit TER méréseink is megerősítettek (4.1.16 ábra, C). Eredményeink arra utalnak, hogy az endogén TIMAP-ot cAMP indukált PKA előfoszforilációja után a GSK3β kináz is foszforilálja.



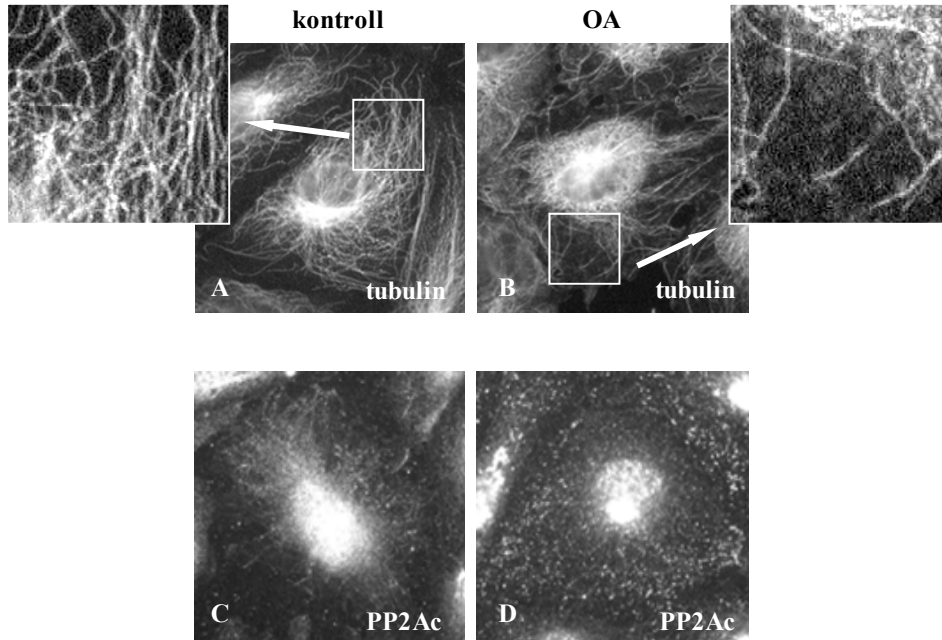
4.1.2.3 *Protein foszfatáz 2A tüdő EC-ben*4.1.2.3.1 *PP2A és az EC citoskeleton*

A Ser/Thr-specifikus protein foszfatázok másik, a sejtekben nagy mennyiségben expresszálódó típusa a protein foszfatáz 2A (PP2A). Marha, illetve humán tüdő makro- (BPA-) és mikrovaszkuláris (HLMV-) EC citoskeleton szerkezetét, a makro- és mikrofilamentumok elrendeződését a PP2A aktivitás specifikus gátlását okozó 5 nM okadánsavval való kezelés [199] jelentősen megváltoztatja (4.1.17 ábra). A mikrotubulusok részben feloldódnak, a kortikális aktin mennyisége csökken, és stresszkábelek alakulnak ki. Összességében ezek a kontrahált sejtekre jellemző változások a PP2A és az EC citoskeleton szerkezete/átrendeződése közötti kapcsolatot jelzik. HPAEC-ben a PP2A immunfestése a mikrotubulusokhoz hasonló elrendeződést mutat (4.1.18 ábra, *A,C*), ami a két fehérje közötti kölcsönhatásra utalhat. A sejtek okadánsav kezelése után ez a hasonlóság eltűnik, a perifériás mikrotubulusok pedig feloldódnak (4.1.18 ábra, *B,D*), a foszfatáz feltehetően disszociál a mikrotubulusokról.

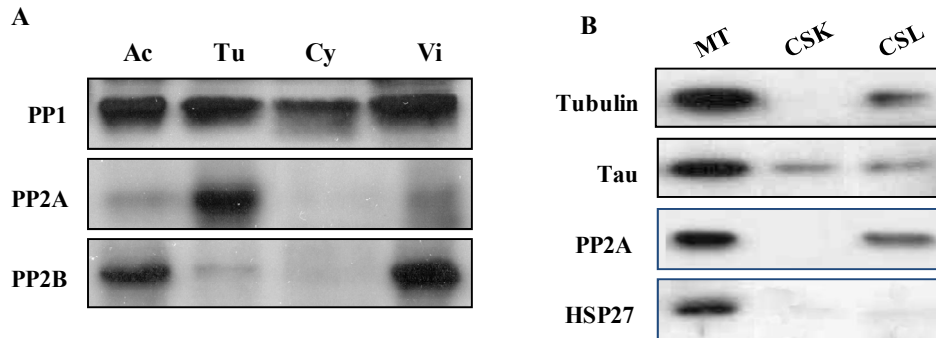


BPAEC-ből szubcelluláris frakciókat izoláltunk és azokban vizsgáltuk a PP1, PP2A és PP2B Ser/Thr specifikus protein foszfatázokat Western blottal (4.1.19 ábra, *A*). A PP1 minden frakcióban egyaránt kimutatható, a PP2B pedig az aktin és vimentin gazdag frakciókban található jelentős mennyiségben. Továbbá ezek a kísérleti eredmények is arra

utalnak, hogy a PP2A kötődik a mikrotubulusokhoz. A 4.1.19 ábra B részén a BPAEC mikrotubulusban gazdag, citoskeleton és citoszól frakcióinak Western blot eredményei láthatóak. A frakcionálási módszert igazolja, hogy a mikrotubulus frakcióban a tubulin és a mikrotubulusokhoz asszociáló tau fehérje is feldúsult. A PP2A blot ismét a



4.1.18 ábra PP2A lokalizációja HPAEC-ben. HPAEC-t 0,1% DMSO-val (kontroll), (A,C), vagy 5 nM okadánsavval kezeltük (B,D) 90 percig. A sejteket kezelés után fixáltuk és az Anyagok és módszerek fejezetben leírtak szerint immunfluoreszcens festést végeztünk β -tubulin (A,B) és PP2Ac (C,D) elleni specifikus monoklonális antitestekkel. A nagyított részletek az EC perifériás régióinak eltérő tubulin szerkezetét mutatják. Nagyítás: 100x.



4.1.19 ábra Ser/Thr specifikus protein foszfatázok az EC szubcelluláris frakcióiban. (A) Az Anyagok és módszerek fejezetben leírtaknak megfelelően preparált sejtfrakciók (aktin, Ac; tubulin, Tu; citoszól, Cy és intermedier filamentumokban/vimentin, Vi gazdag) fehérjéit 10%-os SDS-PAGE-sel elválasztottuk, és nitrocellulóz membránra blottoltuk. A fehérjéket PP1-, PP2A- és PP2B- elleni specifikus antitestekkel detektáltuk. (B) Az Anyagok és módszerek fejezetben leírtaknak megfelelően preparált sejtfrakciók (mikrotubulus, MT; F-aktin gazdag citoskeleton, CSK és citoszól, CSL) fehérjéit 10%-os SDS-PAGE-sel elválasztottuk, és nitrocellulóz membránra blottoltuk. A fehérjéket β -tubulin, tau-, PP2A- és HSP27-elleni specifikus antitestekkel detektáltuk.

foszfataz és a mikrotubulusok közötti kölcsönhatást igazolja. Az is érdekes, hogy a HSP27 fehérjét is ebben a frakcióban detektáltuk. Mindezek alapján feltételezhető, hogy a PP2A részt vehet a tau és HSP27 fehérjék foszforilációs szintjének szabályozásában és ezen keresztül fejti ki hatását az EC citoszkeleton szerkezetére.

HUVEC cDNS könyvtár sikeres szűrése után a PP2A C katalitikus (PP2Ac) és A szerkezeti regulátor (PP2Aa) alegységének kódoló szekvenciáit emlős expressziós vektorokba szubklónoztuk az Anyagok és módszerek című fejezetben leírtaknak megfelelően. A konstrukttal HPAEC-t tranziensen transzfektáltunk. Egy nap múlva a sejtlizátumokban *in vitro* foszfataz mérésel ellenőriztük, hogy az overexpresszált PP2A rendelkezik-e katalitikus aktivitással (4.1.4 táblázat). Az alkalmazott P-MLC szubsztátot *in vitro* mind a PP1, mind a PP2A enzim képes defoszforilálni. Ezért a kétféle aktivitás megkülönböztetésére 1 nM okadánsavat (OA) használtunk, mely ebben a koncentrációban gátolja a PP2A-t, a PP1 aktivitását viszont nem befolyásolja [200]. Párhuzamos méréseket végeztünk a gátlószer nélkül és annak jelenlétében. Az effektor távollétében mért aktivitás a PP1 és PP2A együttes aktivitásának felel meg. 1 nM okadánsav jelenlétében a PP2A gátlódik, a detektált aktivitás a PP1-nek tudható be. Így a kapott eredmények különbségéből következtettünk a PP2A aktivitására.

4.1.4 táblázat. PP2A aktivitás transzfektált HPAEC lizátumában

	PP2A aktivitás %
pCMV-HA	100 ± 11
PP2Ac/pCMV-HA	147 ± 14
PP2Aa/pcDNA3.1/Myc-His	106 ± 10
PP2Ac/pCMV-HA + PP2Aa/pcDNA3.1/Myc-His	166 ± 17

A transzfektált sejtek lizátumában a PP2A aktivitást az Anyagok és módszerek fejezetben megadott módszerrel határoztuk meg [³²P]-foszfo-MLC szubsztátal, és a vektor kontroll %-ában adtuk meg négy független kísérlet átlagát ± SD.

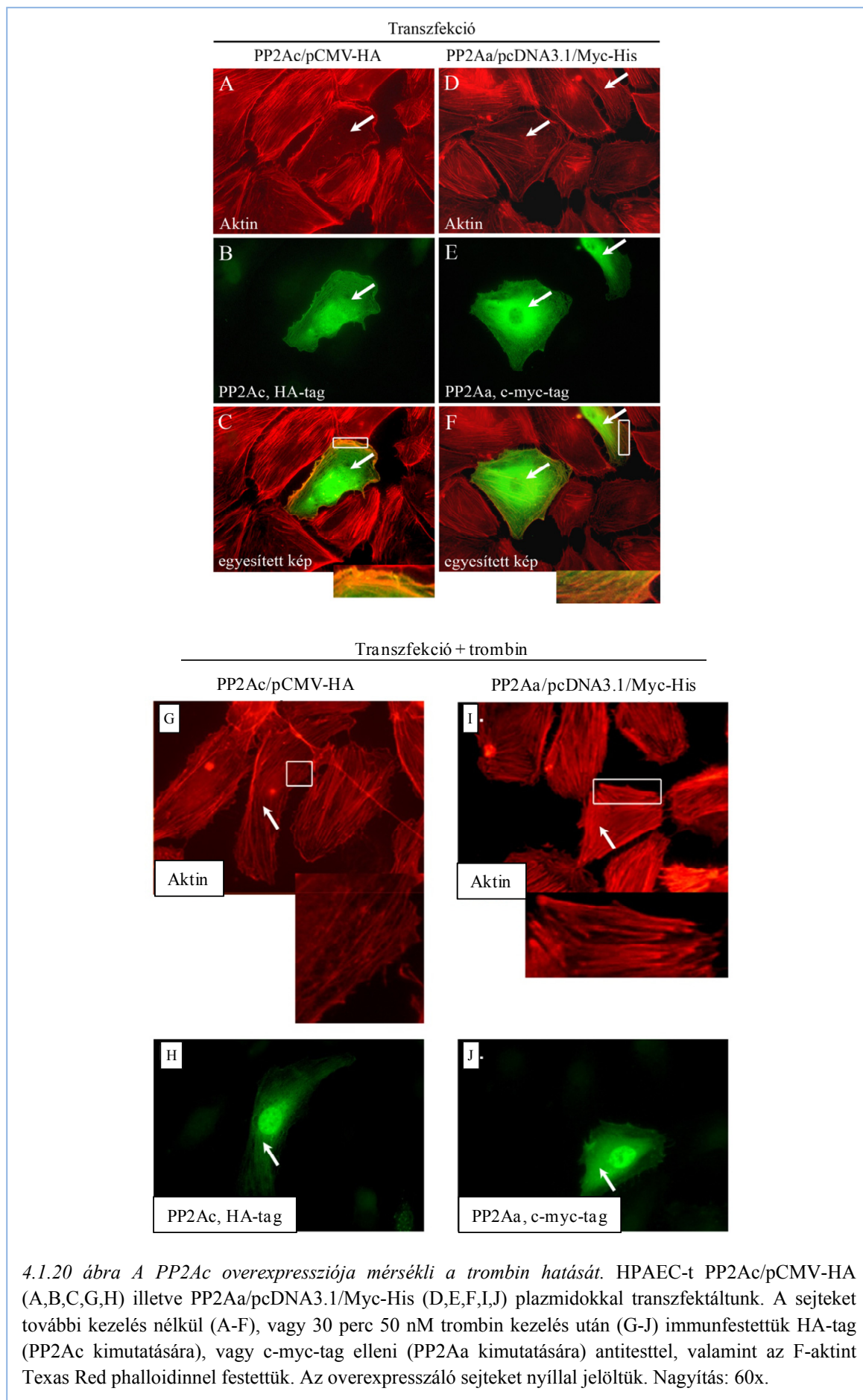
A várakozásnak megfelelően a szerkezeti PP2Aa alegység overexpressziója nem okozott változást, a PP2Ac katalitikus alegység viszont önmagában is és a PP2Aa-val ko-expresszálnva is 50-60%-os aktivitásnövekedést eredményezett (4.1.4 táblázat). Az endotél sejtek transzfekciójának alacsony hatékonyságát is figyelembe véve elmondható, hogy a rekombináns PP2Ac az HPAEC-ben katalitikusan aktív.

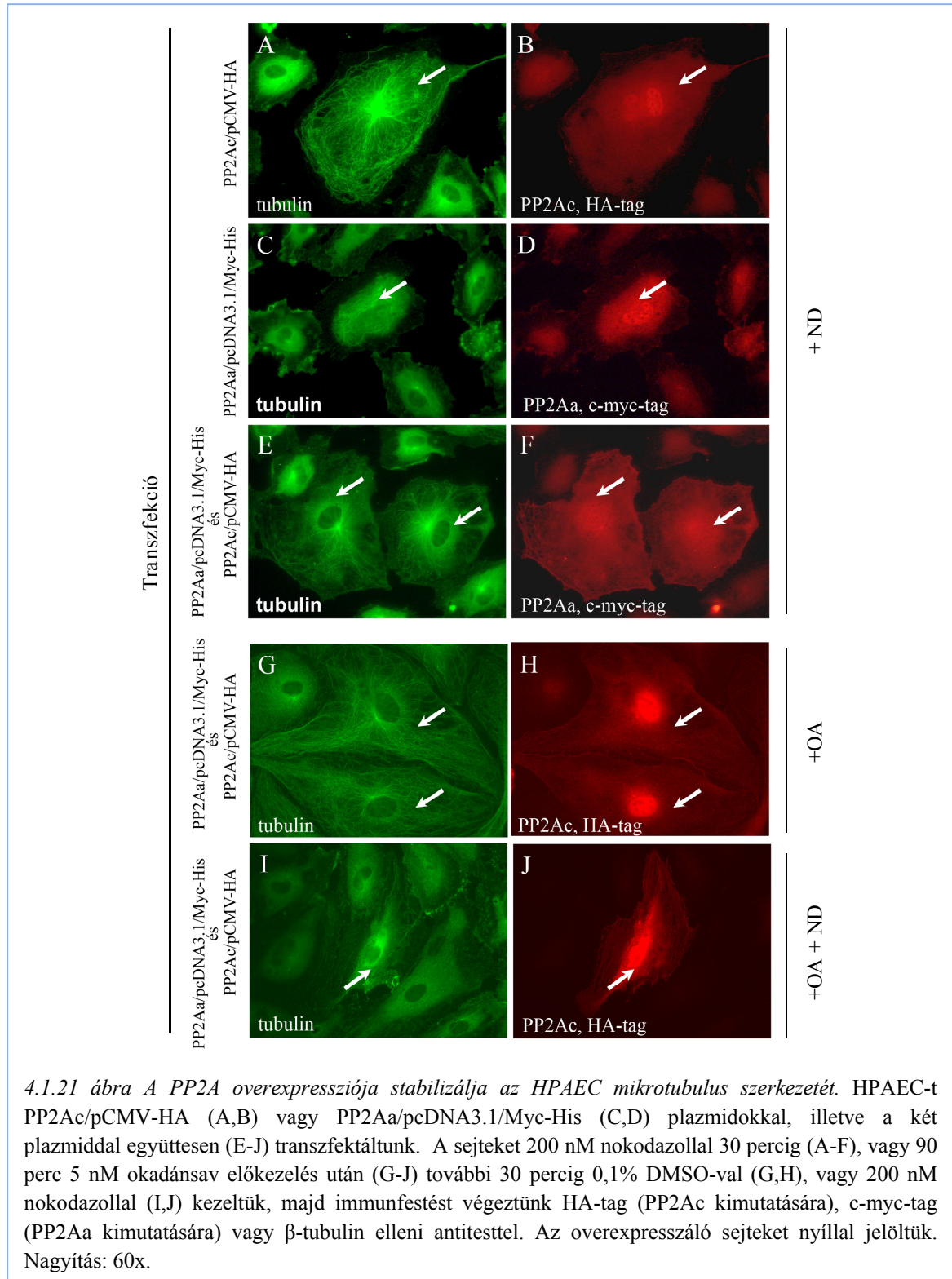
Ezután immunfluoreszcenciával vizsgáltuk a PP2Ac és PP2Aa alegységeket overexpresszáló HPAEC citoszkeleton szerkezetét (4.1.20 és 4.1.21 ábrák). Kettős jelölést alkalmaztunk, egyrészt a rekombináns PP2A alegységet HA- vagy c-myc-tag elleni antitesttel jelöltük, másrészt vagy az aktint festettük Texas Red phalloidinnel, vagy a tubulint jelöltük specifikus antitesttel. Így a PP2A-t nem overexpresszáló sejtek a mikroszkópos felvételeken könnyen azonosíthatóak és belső kontrollként szolgálnak.

A PP2Ac overexpressziója az HPAEC aktin citoszkeletonjának átrendeződését eredményezte (4.1.20 ábra, *A-C*), a stresszfilamentumok elvékonyodtak, a kortikális aktin réteg megvastagodott. A PP2Aa esetében nem tapasztaltunk változást az aktin citoszkeleton szerkezetében (4.1.20 ábra, *D-F*). Az egyesített képeken viszont megfigyelhető mindkét PP2A alegység ko-lokalizációja a perifériás F-aktinnal. Trombin kezelés (50 nM, 30 perc) jellemzően stresszkábelek kialakulását és EC kontrakciót vált ki. A PP2Ac-t overexpresszáló sejtekben azonban az ágens hatása mérsékelt volt akár a belső kontroll sejtekhez, akár a katalitikus aktivitással nem rendelkező PP2Aa-t overexpresszáló sejtekhez viszonyítva (4.1.20 ábra, *G-J*).

Kezeletlen, a PP2A alegységeket overexpresszáló sejtekben a belső kontroll sejtekkel összehasonlítva a mikrotubulusok szerkezetében nem láttunk jelentős változást (nincs dokumentálva). A trombin kezelésnél tapasztaltakhoz hasonlóan, a mikrotubulusok depolimerizációját előidéző nokodazol (200 nM, 30 perc) hatását is kivédte a PP2Ac túltermelése akár önmagában, akár a PP2Aa-val együtt (4.1.21 ábra, *A-F*). A ko-expresszió esetében a tubulinnal együtt a két foszfatáz alegység, a PP2Ac és PP2Aa együttes immunfestését nem tudtuk elvégezni. Viszont a csak PP2Ac-t (*A,B*) és a csak PP2Aa-t (*C,D*) overexpresszáló sejtek fenotípusa alapján meg tudtuk becsülni a ko-expresszió eredményességét az egyes sejteken. Míg a belső kontroll és PP2Aa-t túltermelő sejtek mikrotubulus rendszere a nokodazol kezelés következtében felbomlott, a PP2Ac-t overexpresszáló sejtekben épen maradt (4.1.21 ábra, *A-F*). Okadánsav előkezelés után, ami az overexpresszált PP2Ac aktivitását gátolja, nem találtunk olyan sejtet, amiben a nokodazol kezelést a túltermelő foszfatáz kivédte volna (4.1.21 ábra, *G-J*).

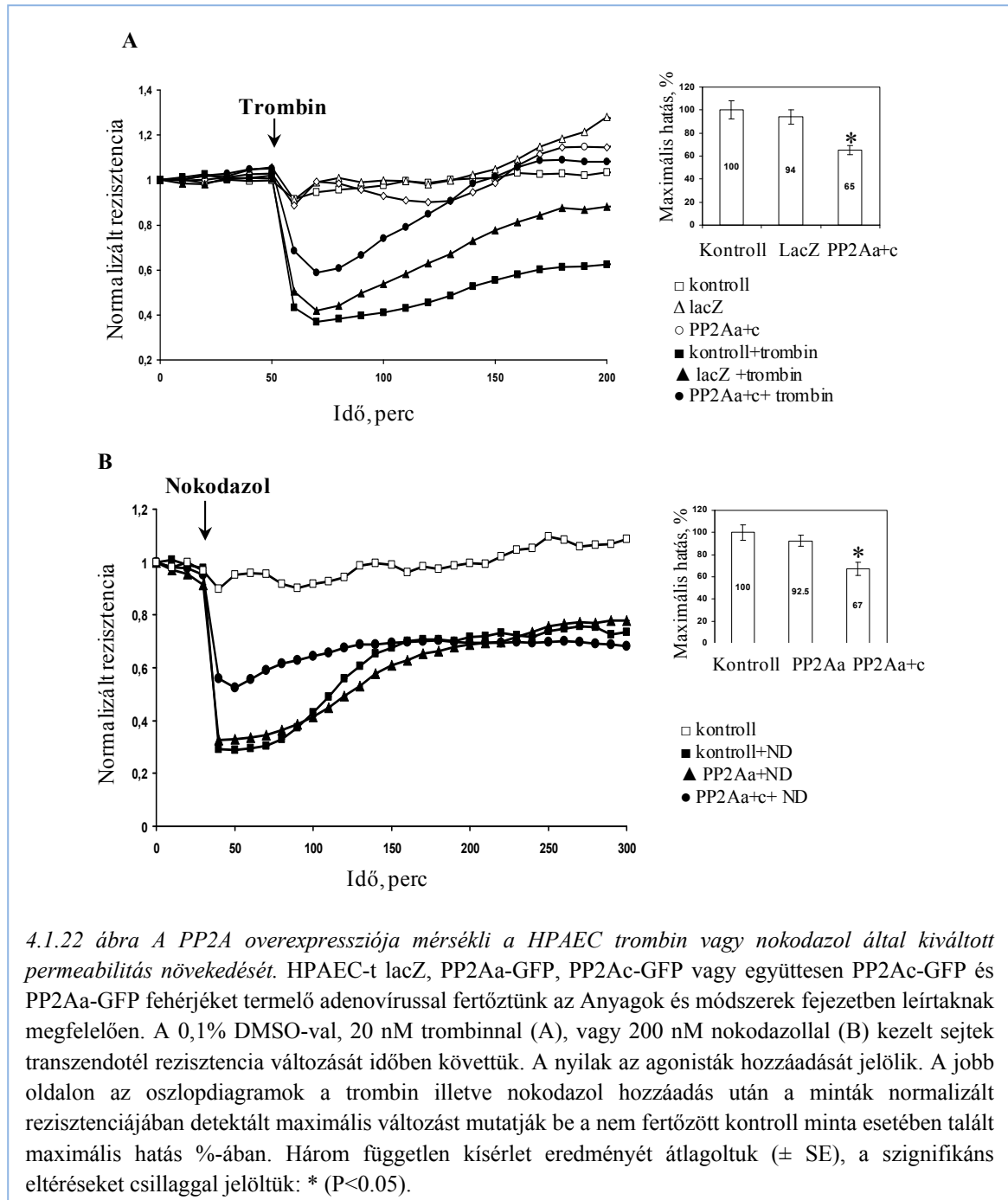
Ezek az eredmények is alátámasztják a PP2A foszfatáz és az endotél citoszkeleton közötti funkcionális kapcsolatot. A citoszkeleton szerkezete befolyásolja az EC gátfunkciót, ezért feltételezhető, hogy a PP2A aktivitás az EC gátfunkció szabályozásában is részt vesz, amit TER mérésrel tudtunk igazolni.



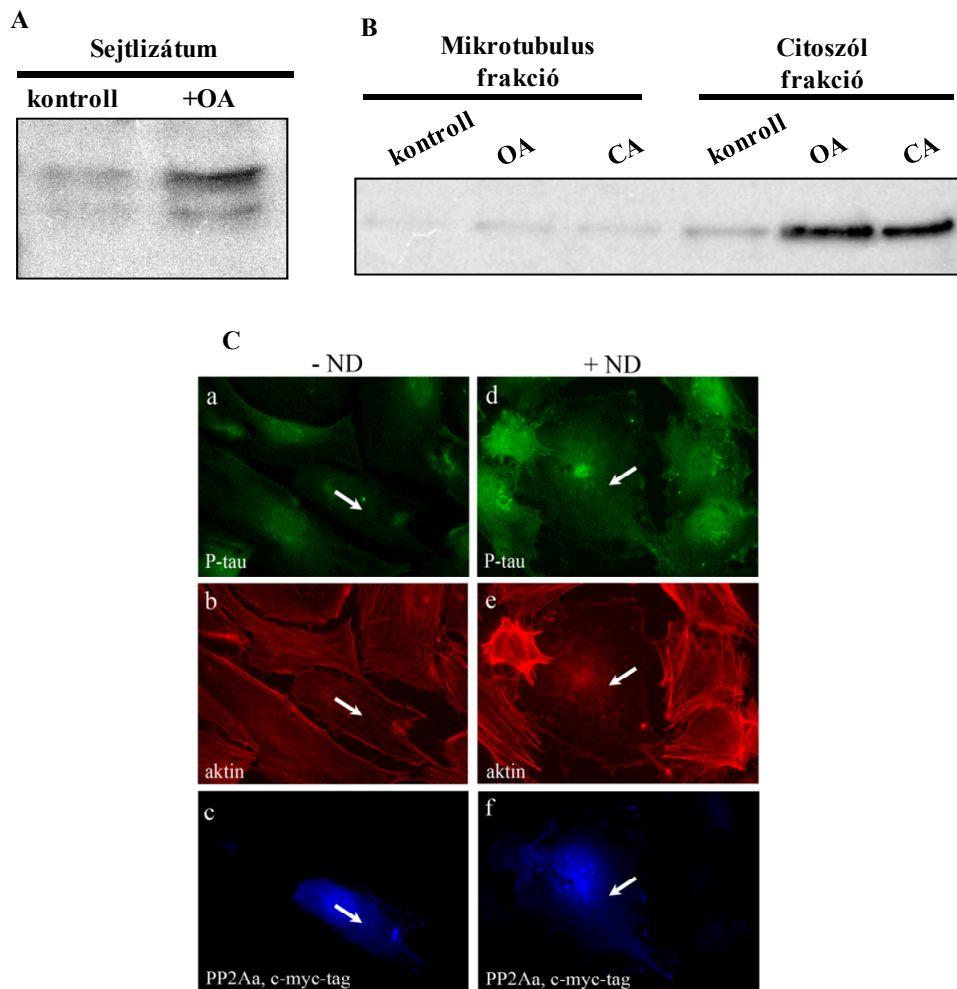


Az EC transzfekció alacsony hatékonysága miatt a barrier funkció tanulmányozásához a PP2Ac és PP2Aa alegységek overexpressziójához adenovírus expressziós rendszert alkalmaztunk. Infekció után a rekombináns fehérjék jelenlétét Western blottal, az infekció közel 100%-os hatékonyságát pedig immunfluoreszcens kísérlettel igazoltuk (nincs dokumentálva). Mértük az adenovíussal fertőzött, PP2A

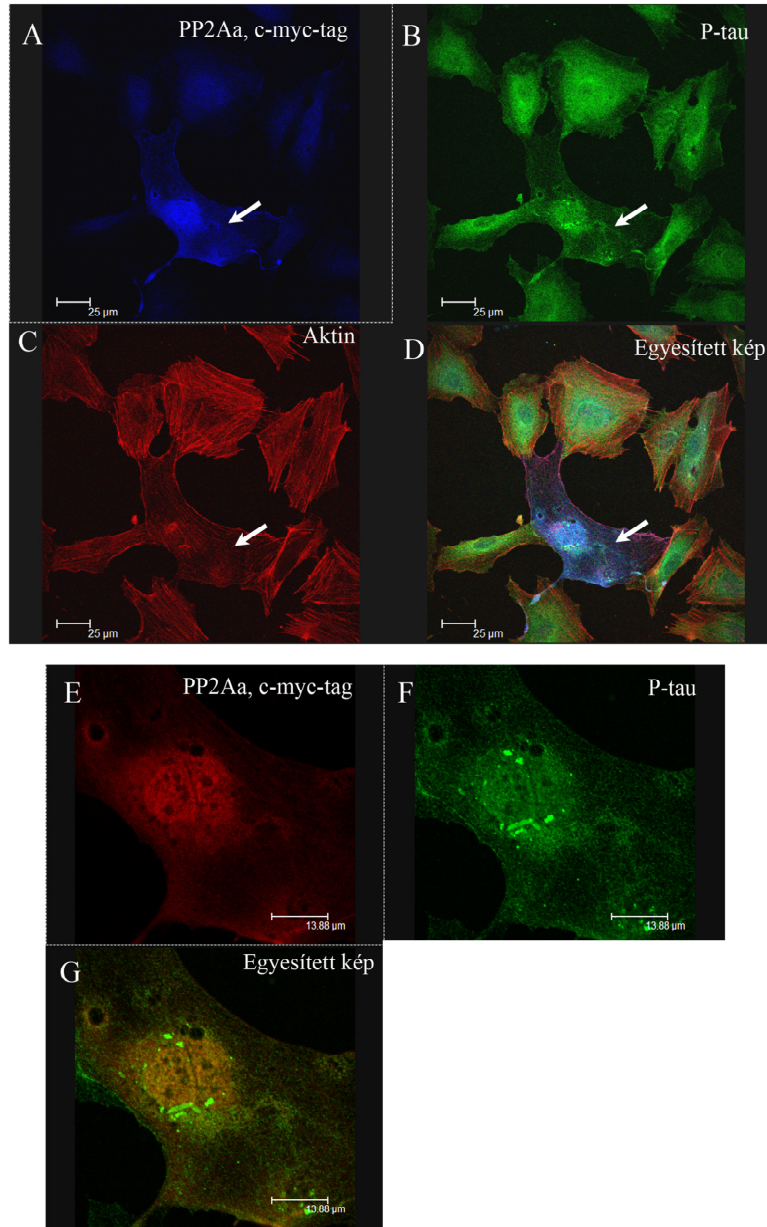
alegységeket, vagy a lacZ-t overexpresszáló HPAEC monolayer-ek rezisztenciáját agonista nélkül és trombin vagy nokodazol kezelés után (4.1.22 ábra). A kontroll és lacZ-t expresszáló minták rezisztenciája a trombin és a nokodazol hatására is jelentős, 60-70%-os csökkenést mutat. A PP2Ac overexpressziója mind a trombin (A), mind a nokodazol (B) által kiváltott rezisztencia csökkenést szignifikánsan mérsékelte, igazolva a PP2A enzim jelentőségét az EC gátfunkció szabályozásában.



A fentiekben leírt eredmények (4.1.19 ábra, B) alapján feltételeztük, hogy a PP2A EC citoskeletonra kifejtett védő hatása összefüggésben lehet a tau és HSP27 fehérjék defoszforilációjával. Kontroll és a PP2A gátlószerevel kezelt BPAEC lizátumában, valamint mikrotubulus és citoszól frakciójában Western blottal detektáltuk a tau Ser262 oldalláncon foszforilált formáját (4.1.23 ábra, A-B). A tau és a mikrotubulusok kölcsönhatását a tau foszforilációja csökkenti, amiben Drewes és mtsai [110] munkája szerint a tau Ser262 oldallánconak van a legnagyobb jelentősége. A PP2A gátlásával, az OA-val kezelt sejtek lizátumában a kontrollban detektált szinthez képest jelentősen



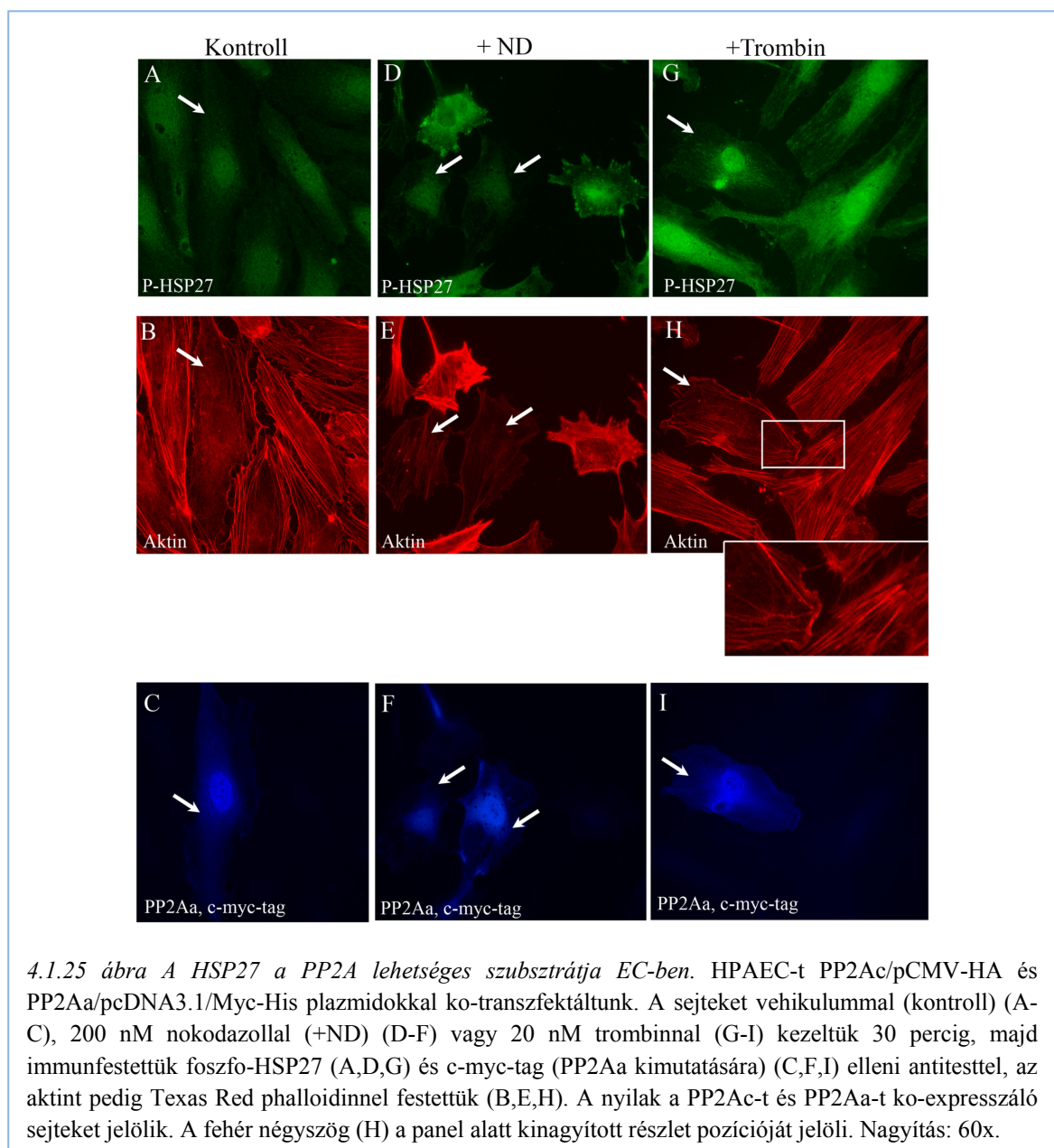
4.1.23 ábra A tau fehérje a PP2A szubsztrátja EC-ben I. (A) BPAEC-t 0,1% DMSO-val (kontroll), 5 nM okadánsavval 90 percig (OA), vagy 1 nM calyculin A-val 60 percig (CA) kezeltük. Az Anyagok és módszerekben leírtak szerint mikrotubulusban gazdag és citoszól frakciókat állítottunk elő. A teljes sejtlizátum (A) és a sejtfrakciók (B) fehérjéit SDS-PAGE-sel elválasztottuk, majd Western blottal, specifikus antitesttel kimutattuk a foszfo-tau (Ser262) fehérjét. (C) HPAEC-t PP2Ac/pCMV-HA és PP2Aa/pcDNA3.1/Myc-His plazmidokkal ko-transzfektáltunk. A sejteket 0,1% DMSO-val (-ND) (a-c) vagy 200 nM nokodazollal (+ND) kezeltük 30 percig (d-f), majd immunfestettük foszfo-tau (Ser262) (a,d) és c-myc-tag (PP2Aa kimutatására) (c,f) elleni antitesttel, az aktint pedig Texas Red phalloidinnel festettük (b,e). Nagyítás: 60x.



4.1.24 ábra A tau fehérje a PP2A szubsztrátja EC-ben 2. HPAEC-t PP2Ac/pCMV-HA és PP2Aa/pcDNA3.1/Myc-His plazmidokkal ko-transzfektáltunk. A sejteket 20 nM trombinnal kezeltük 30 percig, majd immunfestettük foszfo-tau (Ser262) (B,F) és c-myc-tag (PP2Aa kimutatására) (A,E) elleni antitesttel, az aktint pedig Texas Red phalloidinnel festettük (C). A nyilak a PP2Ac-t és PP2Aa-t ko-expresszáló sejtet jelölik (A-D), amelynek nagyobb nagyítású konfokális felvételén (E-G) a kollokalizáció pontosabb értékelése érdekében a PP2Aa festődését piros színnel mutatjuk.

megemelkedett a tau (Ser262) foszforilációja (4.1.23 ábra, A). A sejtfrakciókban a foszfo-tau jellemzően a citoszól frakcióban található és nem a mikrotubulusban gazdag frakcióban. A foszfatáz gátlószerekkel történő kezelések után a foszfo-tau mennyiségében nem találtunk eltérést az 5 nM OA (specifikusan a PP2A-t gátolja) és az 1 nM calyculin A (mind a PP1, mind a PP2A aktivitását gátolja) között (4.1.23 ábra, B). Ebből arra következtethetünk, hogy a tau (Ser262) oldalláncának defoszforilációját a PP2A

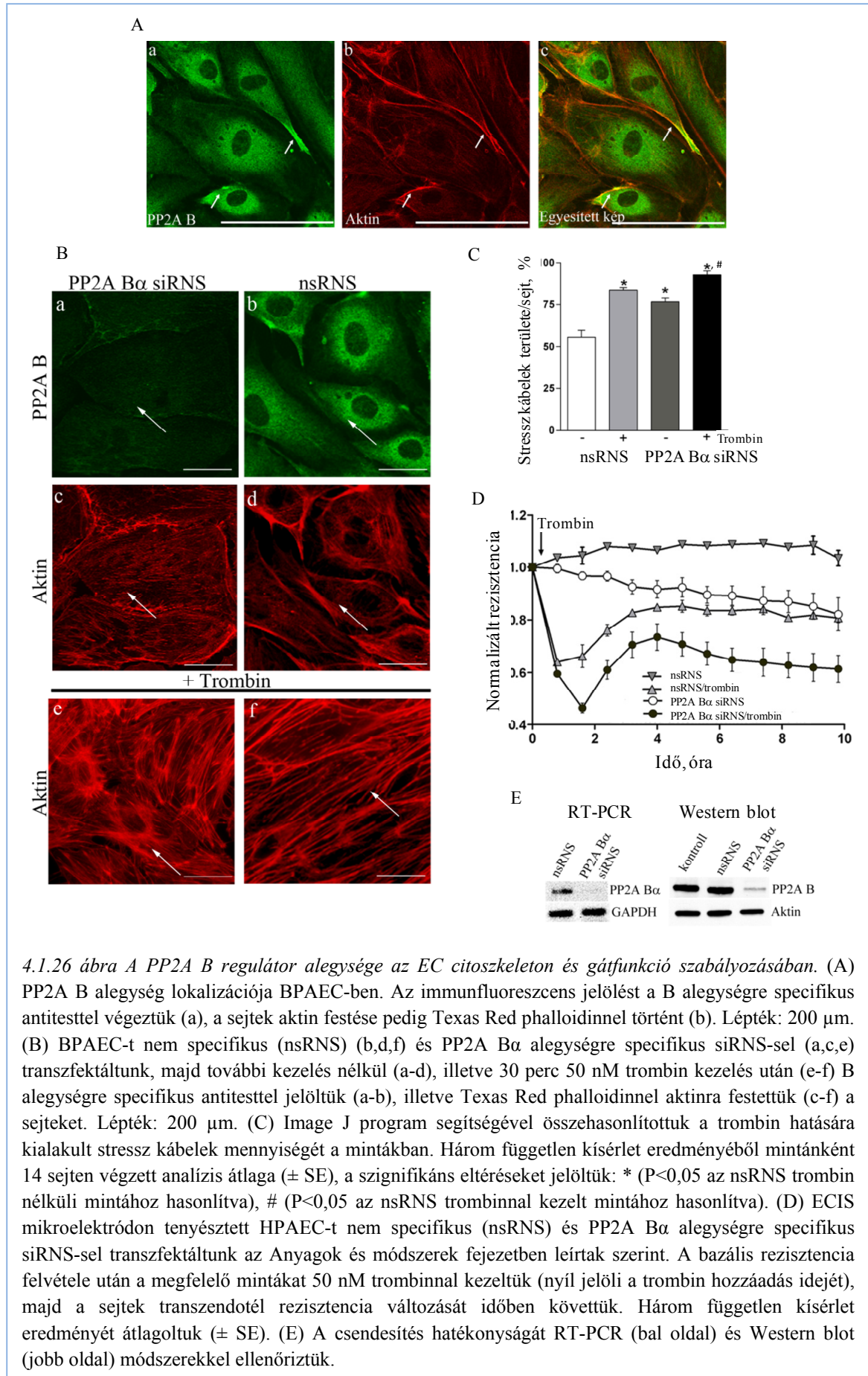
szabályozza. PP2Ac-t és PP2Aa-t ko-expresszáló HPAEC immunfluoreszcens vizsgálata is alátámasztotta ezt a következtetést (4.1.23 ábra, C és 4.1.24 ábra). Kezeletlen HPAEC-ben a foszfo-tau mennyisége alacsony, viszont nokodazol vagy trombin kezelés a belső kontroll sejtekben a foszfo-tau szintjének jelentős emelkedését váltotta ki. Ezzel szemben, a PP2A-t overexpresszáló sejtekben, amelyeket ezekben a kísérletekben is részben a PP2Aa immunfestése, részben a Texas Red phalloidin festés alapján azonosítottunk, és az ábrákon nyilakkal jelöltünk meg, a tau foszforiláció szintje nem emelkedett meg. A 4.1.24 ábra E-G paneljein bemutatott konfokális felvételek a PP2A és a foszfo-tau lokalizációját bizonyítják az HPAEC-ben.



Foszfo-HSP27 elleni antitestet alkalmazva megismételtük az immunfluoreszcens vizsgálatokat (4.1.25 ábra). A trombinnal vagy nokodazollal kezelt HPAEC belső kontroll sejtjeiben a HSP27 foszforilációs szintje megnőtt, a PP2A-t overexpresszáló sejtekben azonban nem. A PP2A-t overexpresszáló sejtekben a tau és a HSP27 fehérjék alacsonyabb foszforiláltságával párhuzamosan a sejtek aktin citoszkeletonja megőrzi eredeti szerkezetét és nem alakul ki a belső kontroll sejteken megfigyelhető változás a trombin és nokodazol hatására.

Összességében ezek az eredmények azt igazolják, hogy a PP2A részvétele az EC citoszkeleton átrendeződéseinek szabályozásában a citoszkeletonhoz asszociálódó fehérjék, mint a tau és HSP27, defoszforilációján keresztül történhet.

A PP2A három alegységből álló fehérje. Az A szerkezeti alegységhez (PP2Aa, A alegység) kötődik a katalitikus alegység (PP2Ac, C alegység) és a szubsztrát specificitást meghatározó regulátor alegység (PP2Ab, B-alegység). A PP2A holoenzimek a sejtekben számos folyamatot szabályoznak és ezt a B-alegység nagyfokú variabilitása teszi lehetővé, a B, B' és B'' fehérjecsaládok egymástól aminosav szekvenciájukban eltérő, különböző fehérjék számos izoformájából állnak. BPAEC immunfestésével a B alegységet elsősorban a citoplazmában detektáltuk (4.1.26 ábra, A). Az AB α C felépítésű holoenzim a PP2A egyik leggyakrabban előforduló formája. BPAEC-ben siRNS transzfekció segítségével csendesítettük a PP2A B α alegységét, a csendesítés hatékonyságát (70-80%) RT-PCR és Western blot kísérletekkel (4.1.26 ábra, E), valamint immunfestéssel is igazoltuk (4.1.26 ábra B). A csendesített sejtek (4.1.26 ábra, B:a,c) Texas Red phalloidin festése stresszkábelek kialakulását jelzi a nem specifikus RNS-sel transzfektált kontrollhoz (b,d) viszonyítva. A B α hiányos sejtekben trombin (50 nM, 30 perc) kezelést követően is erősebb az F-aktin festődése a megfelelő kontrollhoz hasonlítva (e,f). A felvételek kvantitatív elemzését is elvégeztük és az F-aktin mennyiségében megfigyelhető eltérések szignifikánsnak bizonyultak (4.1.26 ábra, C). A trombin hatását TER mérésekkel is összehasonlítottuk nem csendesített és B α depletált HPAEC-n. Míg a PP2Ac overexpressziója az HPAEC-ben mérsékelte a trombin kiváltotta rezisztencia csökkenést (4.1.22 ábra, A), a B α csendesítése, éppen ellenkezőleg, fokozta a trombin hatását (4.1.26 ábra, D). Ebből arra következtethetünk, hogy az EC citoszkeleton szabályozásában a PP2A AB α C holoenzim formája jelentős.



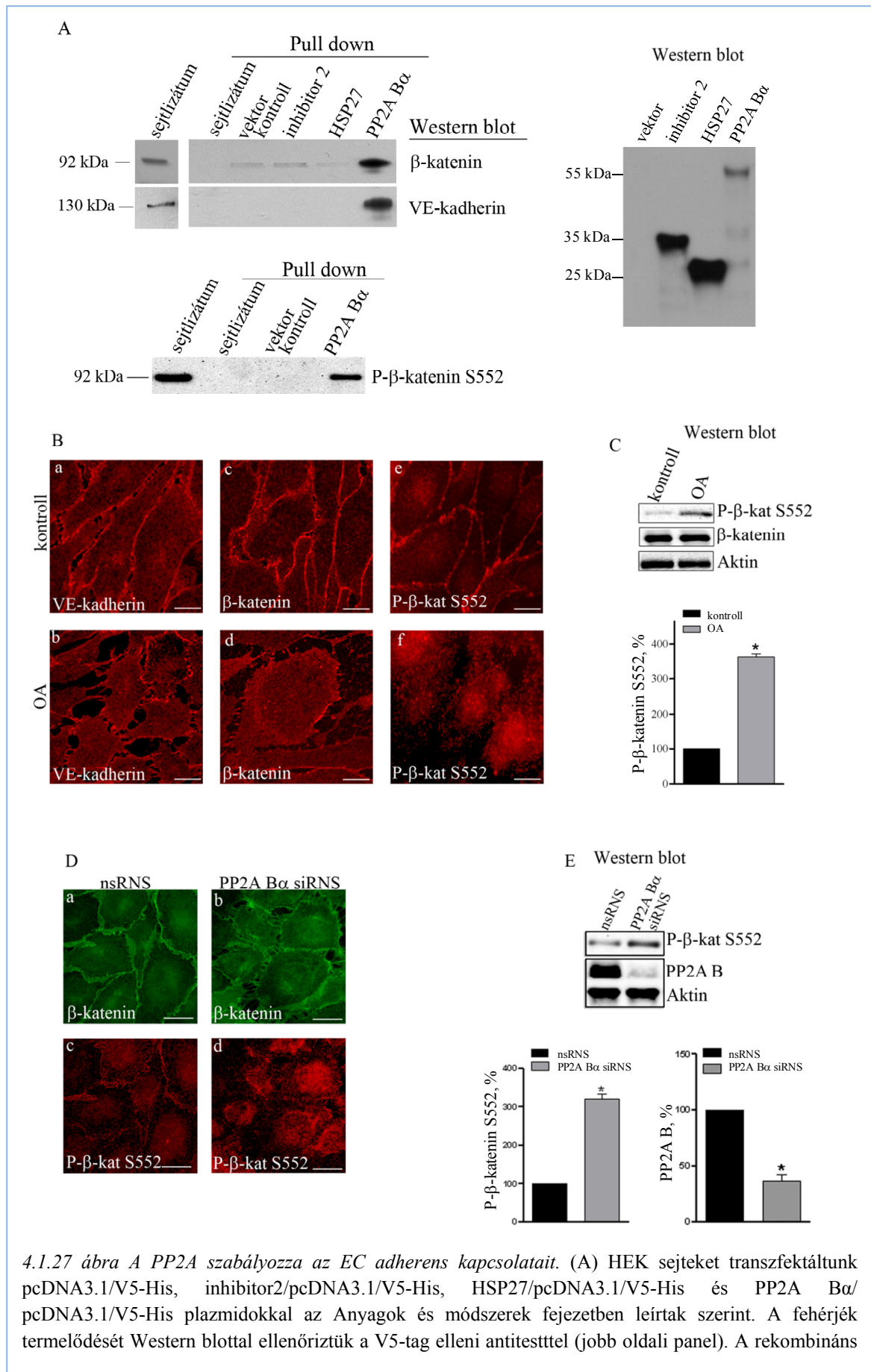
4.1.2.3.2 PP2A és az EC adherens kapcsolatok

A B alegység az immunfluoreszcens képeken a sejtek perifériás régióiban is megfigyelhető (4.1.26 ábra, A). Ezért felmerülhet annak a lehetősége, hogy a PP2A esetleg az endotél sejtkapcsolatok szabályozásában is fontos lehet, ami ugyancsak befolyásolhatja az EC gátfunkciót. Pull-down módszerrel vizsgáltuk az adherens kapcsolatok két fehérje alkotója, a β -katenin, illetve a VE-kadherin kölcsönhatását a β fehérjével (4.1.27 ábra, A). A HEK sejtekben overexpresszált β -t és a kontroll fehérjéket anti-V5 agarózon immobilizáltuk, majd BPAEC lizátummal inkubáltuk. Az eluált fehérjekomplexekben Western blottal detektáltuk az immobilizált fehérjékhez kötődő β -katenin, VE-kadherin és foszfo- β -katenin (Ser552) jelenlétét. A PP2A β mindhárommal kölcsönhatást mutatott, a kontroll mintákban viszont nem tapasztaltuk az adherens fehérjék kötődését, ami a PP2A enzim és az EC adherens kapcsolatok közötti specifikus kölcsönhatásra utal.

Tanulmányoztuk a VE-kadherin és a β -katenin lokalizációját BPAEC-ben a PP2A aktivitás gátlása után (4.1.27 ábra, B). Okadánsavval (5 nM, 90 perc) történt kezelés után a sejtek perifériáján a kezeletlen sejtekben látható folyamatos VE-kadherin réteg szakadozottá vált, illetve megszűnt (a,b). A β -katenin festődés is lecsökkent a sejtp periférián (c,d). Még szemetűnőbb a foszfo- β -katenin (Ser552) (e,f) lokalizációjának megváltozása, sőt a foszforiláció mértéke is növekedett. Ez utóbbiról Western blottal is meggyőződünk. Míg a β -katenin mennyisége az okadánsavval kezelt BPAEC lizátumában nem változott a kezeletlen mintához viszonyítva, a fehérje foszforiláltsága a Ser552 oldalláncon több mint háromszorosára emelkedett (4.1.27 ábra, C), és a citoplazmába transzlokálódott (4.1.27 ábra, B:f).

Hasonlóan, a PP2A β alegység csendesítése a β -katenin/foszfo- β -katenin transzlokációját okozta BPAEC-ben a membrán régióból a citoplazmába (4.1.27 ábra, D) és ez együtt járt a β -katenin foszforilációjával (4.1.27 ábra, E). A csendesítés következtében a β mennyisége 60-70%-kal csökkent, miközben a foszfo- β -katenin szintje megháromszorozódott.

Összességében az eredmények azt sugallják, hogy a PP2A nem csak az EC citoskeleton szerkezetének szabályozásában, de az adherens sejtkapcsolatok kialakulásában is részt vesz, és ezáltal az endotél barrier fenntartásában egy többszörösen fontos szabályozó faktor.



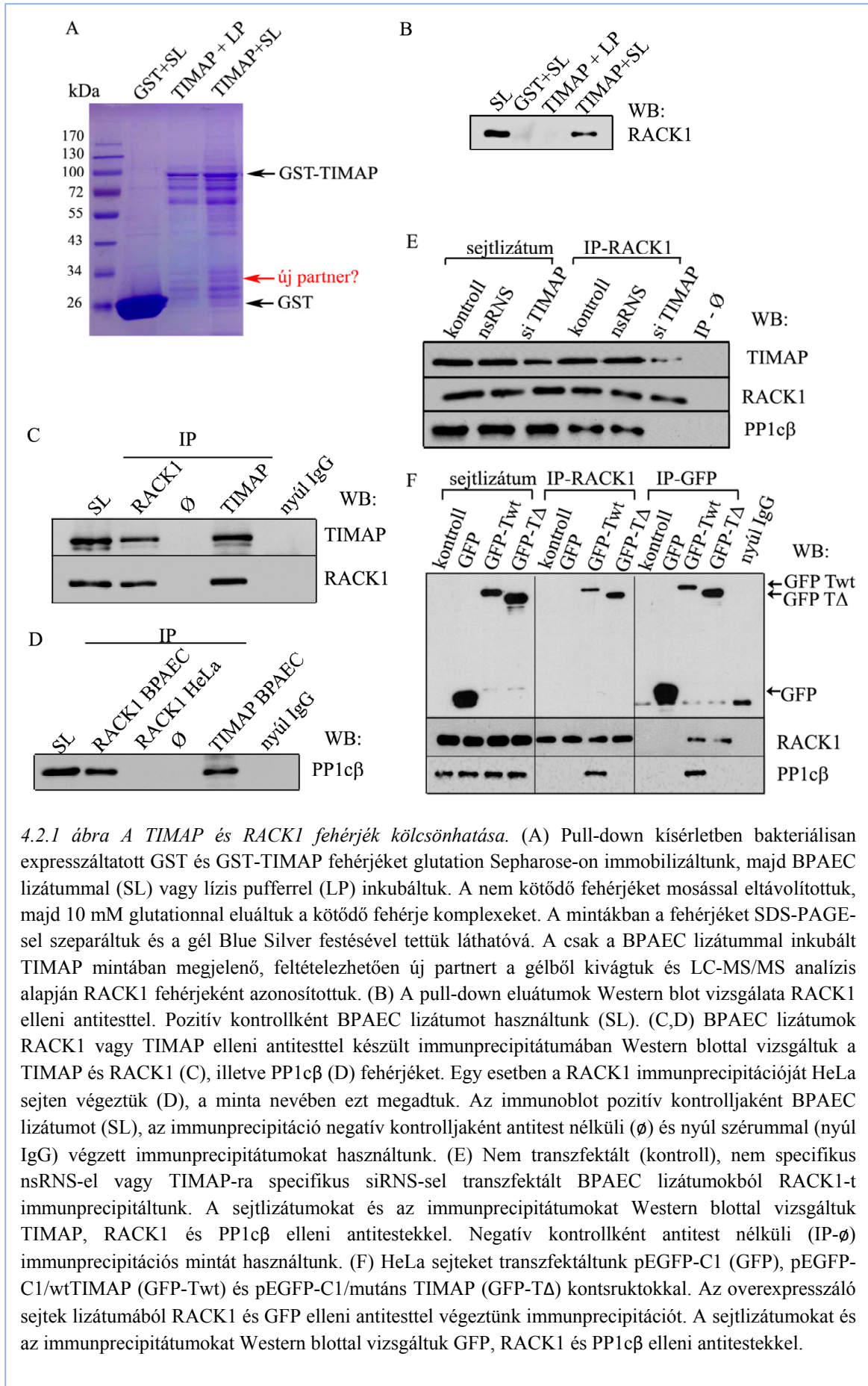
fehérjéket anti-V5 affinitás gélen immobilizátuk, amit mosás után BPAEC lizátummal inkubáltunk. Újabb mosási lépés után a rekombináns- és a hozzájuk kötődő fehérjéket 2xSDS mintapufferbe eluáltuk főzéssel, majd immunoblottal vizsgáltuk a mintákban a β -katenin, VE-kadherin és foszfo- β -katenin (S552) jelenlétét specifikus antitestekkel. A Western blot pozitív kontrolljaként BPAEC sejtlizátumot használtunk. A pull-down negatív kontrolljaként pedig a BPAEC lizátumot olyan anti-V5 affinitás géllal inkubáltuk, amelyhez előzőleg rekombináns fehérjét nem kötöttünk. (B) Kezeletlen (a,c,e) és 5 nM okadánsavval 90 percig kezelt (b,d,f) BPAEC immunfestése VE-kadherin (a,b), β -katenin (c,d) és foszfo- β -katenin (S552) (e,f) specifikus antitestekkel. Lépték: 200 μ m. (C) Kezeletlen (kontroll) és 5 nM okadánsavval 90 percig kezelt (OA) BPAEC lizátumában összehasonlítottuk a foszfo- β -katenin (S552) mennyiségét Western blottal. A felvitt fehérjemennyiség kontrolljaként a mintákat β -katenin és aktin elleni antitestekkel is vizsgáltuk. Oszlopdiagram: három független kísérlet eredményeit denzitometráls után β -kateninre normalizáltuk és átlagoltuk \pm SE. A szignifikáns eltérést csillaggal jelöltük: * ($P < 0.05$). (D) Nem specifikus (nsRNS) (a,c,) és PP2A B α alegységre specifikus siRNS-sel (b,d,) transzfektált BPAEC immunfestése β -katenin (a,b) és foszfo- β -katenin (S552) (c,d) specifikus antitestekkel. Lépték: 200 μ m. (E) Nem specifikus (nsRNS) és PP2A B α alegységre specifikus siRNS-sel transzfektált BPAEC lizátumában összehasonlítottuk a foszfo- β -katenin (S552) mennyiségét Western blottal. A csendesítés hatékonyságát PP2A B elleni antitesttel ellenőriztük, a felvitt fehérjemennyiség kontrolljaként pedig a mintákat aktin elleni antitesttel is vizsgáltuk. Három független kísérlet foszfo- β -katenin (bal oldali oszlopdiagram) és PP2A B (jobb oldali oszlopdiagram) eredményeit denzitometráls után β -kateninre normalizáltuk és átlagoltuk \pm SE. A szignifikáns eltéréseket csillaggal jelöltük: * ($P < 0.05$).

4.2 A protein foszfatázok és kinázok kölcsönhatásai állványfehérjékkel az endotél sejtekben

4.2.1 A RACK1 állványfehérje szerepe az EC permeabilitás szabályozásában

4.2.1.1 A RACK1 és TIMAP fehérjék kölcsönhatása

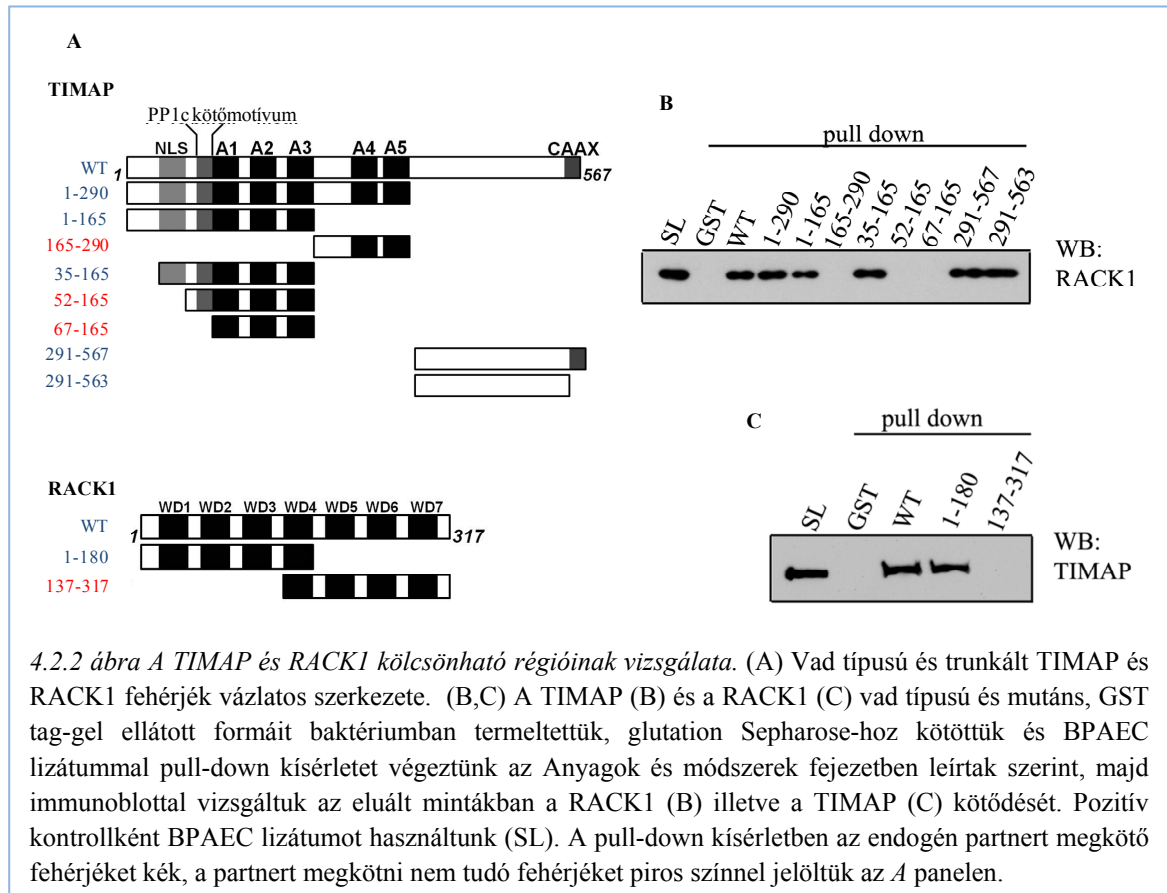
A TIMAP fehérjéről igazoltuk, hogy a PP1 regulátora, és foszforilációjától függő módon az ERM fehérjék defoszforilációját szabályozza (4.1.2.2 fejezet). Baktériumban expresszált GST-TIMAP csaliként való felhasználásával pull-down kísérlettel a TIMAP további, korábban nem azonosított fehérje partnereit kerestük (4.2.1 ábra, A). A BPAEC lizátummal inkubált glutation Sepharose-on immobilizált GST-TIMAP eluátumában SDS-PAGE után találtunk egy olyan ~ 34 kDa méretű fehérjesávot, aminek megfelelő sáv a két kontroll mintában (GST + BPAEC lizátum és GST-TIMAP + lízis puffer) nem volt jelen. Ezért feltételeztük, hogy a TIMAP-pal kölcsönható fehérje lehet. A fehérjét tartalmazó géldarabot kivágtuk, és LC-MS/MS analízisre küldtük (Dr. Janáky Tamás, SZTE, Orvosi Vegytani Intézet). Swissprot és Uniprot TREMBL adatbázisok alapján az új kölcsönható partner marha RACK1 (gén: GNB2L1, Accession number: P63243) fehérje. A kölcsönhatást a pull-down eluátumok Western blot vizsgálatával és immunprecipitációval is igazoltuk endogén BPAEC fehérjékkel (4.2.1 ábra, B-C).



4.2.1 ábra A TIMAP és RACK1 fehérjék kölcsönhatása. (A) Pull-down kísérletben bakteriálisan expresszált GST és GST-TIMAP fehérjéket glutation Sepharose-on immobilizáltunk, majd BPAEC lizátummal (SL) vagy lízis pufferrel (LP) inkubáltuk. A nem kötődő fehérjéket mosással eltávolítottuk, majd 10 mM glutationnal eluáltuk a kötődő fehérje komplexeket. A mintákban a fehérjéket SDS-PAGE-sel szeparáltuk és a gél Blue Silver festésével tettük láthatóvá. A csak a BPAEC lizátummal inkubált TIMAP mintában megjelenő, feltételezhetően új partnert a gélből kivágtuk és LC-MS/MS analízis alapján RACK1 fehérjéként azonosítottuk. (B) A pull-down eluátumok Western blot vizsgálata RACK1 elleni antitesttel. Pozitív kontrollként BPAEC lizátumot használtunk (SL). (C,D) BPAEC lizátumok RACK1 vagy TIMAP elleni antitesttel készült immunprecipitátumában Western blottal vizsgáltuk a TIMAP és RACK1 (C), illetve PP1cβ (D) fehérjéket. Egy esetben a RACK1 immunprecipitációját HeLa sejten végeztük (D), a minta nevében ezt megadtuk. Az immunoblot pozitív kontrolljaként BPAEC lizátumot (SL), az immunprecipitáció negatív kontrolljaként antitest nélküli (Ø) és nyúl szérummal (nyúl IgG) végzett immunprecipitátumokat használtunk. (E) Nem transzfektált (kontroll), nem specifikus nsRNS-el vagy TIMAP-ra specifikus siRNS-sel transzfektált BPAEC lizátumokból RACK1-t immunprecipitáltunk. A sejtlizátumokat és az immunprecipitátumokat Western blottal vizsgáltuk TIMAP, RACK1 és PP1cβ elleni antitestekkel. Negatív kontrollként antitest nélküli (IP-Ø) immunprecipitációs mintát használtunk. (F) HeLa sejteket transzfektáltunk pEGFP-C1 (GFP), pEGFP-C1/wtTIMAP (GFP-Twt) és pEGFP-C1/mutáns TIMAP (GFP-TΔ) kontsruktokkal. Az overexpresszálo sejtek lizátumából RACK1 és GFP elleni antitesttel végeztünk immunprecipitációt. A sejtlizátumokat és az immunprecipitátumokat Western blottal vizsgáltuk GFP, RACK1 és PP1cβ elleni antitestekkel.

Korábbi eredményeinkkel (4.1.2.2 fejezet) összhangban, a PP1c β jelen van a TIMAP és a RACK1 immunprecipitátumában is (4.2.1 ábra, *D*). Több módon is bizonyítottuk azonban, hogy a RACK1 és a PP1c β között nincs közvetlen fehérjekapcsolat. HeLa sejtekben, ahol a TIMAP nem expresszálódik és TIMAP depletált BPAEC-ben a RACK1 immunprecipitátumában nem mutatható ki a PP1c β (4.2.1 ábra, *D,E*). Továbbá vad típusú és a PP1c kötő motívumot nem tartalmazó mutáns (Δ 1-71) GFP-TIMAP HeLa-ban történő overexpressziója után akár a GFP-TIMAP tag részére specifikus, akár RACK1 elleni antitesttel végeztünk immunprecipitációt, a PP1c β csak akkor volt jelen, ha a minta a vad típusú TIMAP fehérjét overexpresszáló HeLa-ból származott (4.2.1 ábra, *F*). Mindezek azt igazolják, hogy a RACK1 és PP1c β csak a TIMAP-pal való kölcsönhatásuk révén vannak jelen azonos fehérje komplexekben, de egymáshoz nem kötődnek.

A TIMAP-RACK1 kölcsönhatásban jelentős domének feltárásához a két fehérje számos GST-taggel ellátott mutánsát (4.2.2 ábra, *A*) állítottuk elő baktériumban és BPAEC lizátumokkal végzett pull-down kísérlettel ellenőriztük az endogén RACK1, illetve TIMAP kötődését a csali fehérjékhez (4.2.2 ábra, *B-C*).



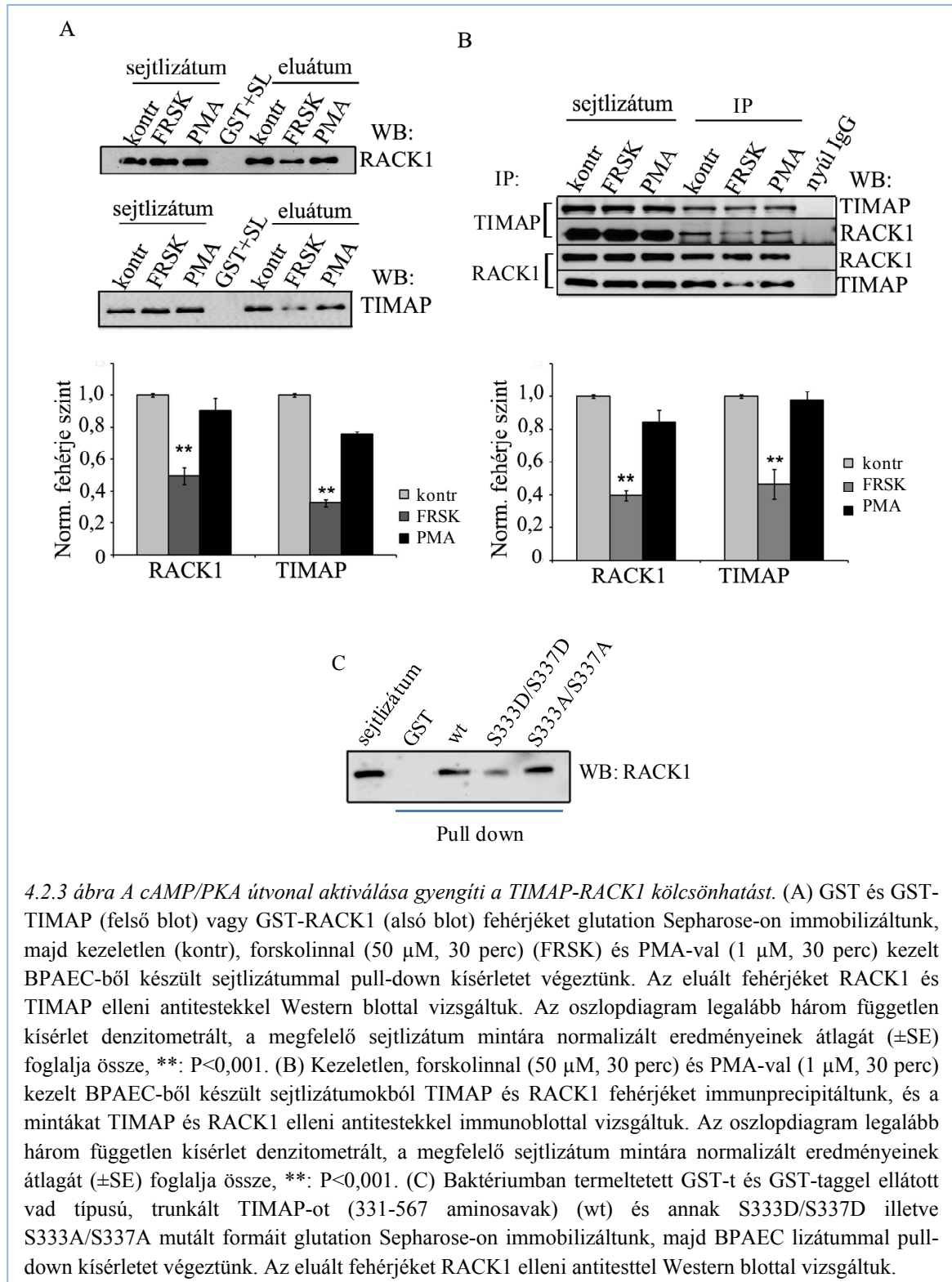
A RACK1 a TIMAP N- (1-290 aminosavak) és C-terminális (291-567 aminosavak) feléhez is kötődött. Az N-terminális rész tartalmazza a PP1c kötő motívumot és öt ankirin ismétlődő motívumot (A1-5), valamint egy nukleáris lokalizációs szignál motívumot (NLS). Az ankirin ismétlődések jellemzően fehérje kölcsönhatásokban játszanak szerepet, de az A4 és A5 ismétlődések nem bizonyultak esszenciálisnak a kötődésben. Ha ugyanis a TIMAP N-terminális feléről eltávolítottuk ezt a két ismétlődést, a mutáns (1-165) továbbra is kölcsönhatásba lépett a RACK1 fehérjével, továbbá az A4 és A5 ankirin ismétlődéseket tartalmazó rövid mutáns (165-290) az endogén RACK1-t nem kötötte. Az A1-A3 ankirin ismétlődéseket (67-165), vagy az A1-A3 és a PP1c kötő motívumot (52-165) tartalmazó mutánsokkal sem kaptunk pozitív jelet. Viszont a nukleáris lokalizációs szignállal kiegészített mutáns (35-165) már képes volt kötni a RACK1 fehérjét. A TIMAP C-terminális régiójában (291-567) találhatóak a PKA és GSK3 β foszforilációs helyek és a CAAX prenilációs motívum. Ez utóbbiról megállapítottuk, hogy a kölcsönhatásban nincs szerepe, hiszen ha eltávolítottuk (291-563), a kötődésben nem tapasztaltunk változást (4.2.2 ábra, B).

A RACK1 β -propeller szerkezete biztosítja fehérje kölcsönhatásait. A RACK1 WD4 doménje révén homodimert alakít ki [144], ezért Kiely és mtsai munkája [201] alapján olyan RACK1 rövidített/trunkált mutánsokat terveztünk, amelyek a WD4 domént tartalmazzák. Az N-terminális mutáns (1-180) megkötötte az endogén TIMAP-ot BPAEC lizátumból, a C-terminális mutáns (137-317) viszont nem (4.2.2 ábra, C).

Mások [198] és saját eredményeinkből (4.1.2.2 fejezet) tudtuk, hogy a TIMAP PKA/GSK3 β kinázokkal foszforilálódik a Ser337 (PKA), majd a Ser333 (GSK3 β) oldalláncokon. A RACK1 fehérje kapcsolata is ismert a PKC kinázokkal [131, 138, 202]. Ezért PMA-val és forskolinnal aktiváltuk BPAEC-ben a PKC, illetve PKA kinázokat, majd pull-down és immunprecipitáció segítségével vizsgáltuk a TIMAP és RACK1 kötődését (4.2.3 ábra, A-B). Mindkét módszerrel azt tapasztaltuk, hogy a PKC kináz aktiválása nem okozott szignifikáns eltérést a kötődésben. A forskolin kezelés viszont jelentősen, 50-60%-kal csökkentette a kötődő TIMAP vagy RACK1 mennyiségét, amit feltehetően a cAMP/PKA aktiválás következtében a TIMAP PKA (S337), majd GSK3 β (S333) foszforilációja okozhat.

A TIMAP ezen foszforilációs helyeit tartalmazó rövidített vad típusú formáját (331-567 aminosavak) és annak nem foszforilálható (S333A/S337A) valamint a foszforilációt utánzó (S333D/S337D) mutánsait termeltettük baktériumban, majd csaliként használtuk

BPAEC lizátummal történő pull-down kísérletben (4.2.3 ábra, C). A fenti eredményekkel összhangban, a foszforilációt utánzó TIMAP mutánsához kevesebb RACK1 fehérje kötődött az EC lizátumból.

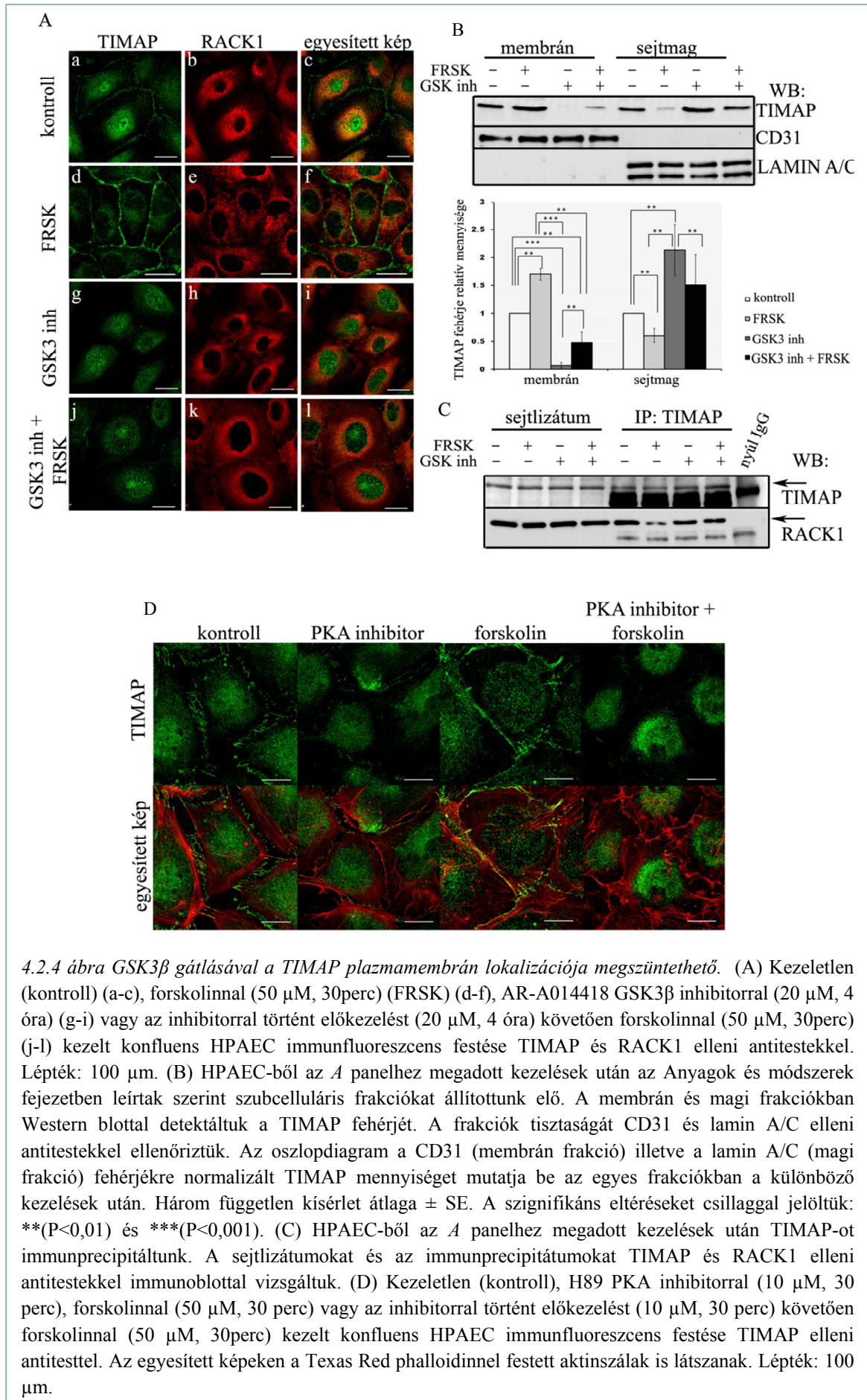


4.2.1.2 A RACK1 szerepe a TIMAP plazmamembrán lokalizációjában

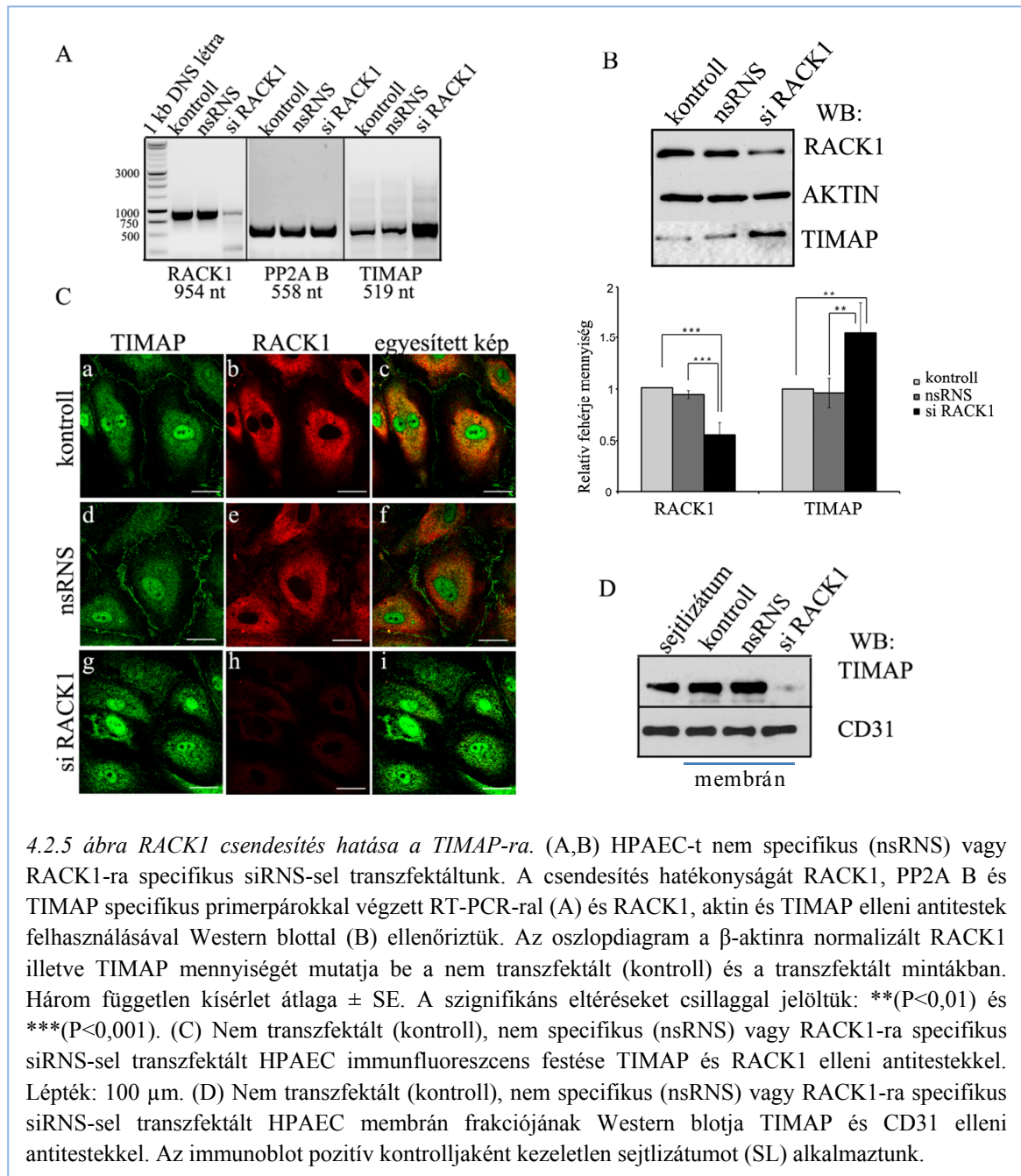
A TIMAP foszforilációját befolyásoló effektorokkal kezelt HPAEC-ben vizsgáltuk a TIMAP lokalizációját és kölcsönhatását a RACK1 fehérjével. Kezeletlen sejtekben, ahol a TIMAP a magban, a mag körüli régióban és a plazmamembránban található (4.1.11 ábra, *A:a* és 4.2.4 ábra, *A:a*), a mag körüli citoplazma régióban a két fehérje kollokalizációját figyeltük meg (4.2.4 ábra, *A:a-c*). A RACK1 lokalizációjában az effektorok alkalmazása nem okozott változást (4.2.4 ábra, *A:b,e,h,k*). A TIMAP viszont a forskolin kezelést követően a sejtmagból és részben a citoplazmából is a plazmamembránhoz transzlokálódott (4.2.4 ábra, *A:a,d*). Ha PKA inhibitorral (H89, 10 μ M) kezeltük a sejteket, a TIMAP festődése a plazmamembránban drasztikusan lecsökkent, sőt, az inhibitor előkezelés után alkalmazott forskolin hatására sem jelent meg ott (4.2.4 ábra, *D*). A TIMAP foszforilációja PKA-val a S337 oldalláncon előfeltétele további, GSK3 β általi foszforilációjának a S333 aminosav oldalláncon. Ha a GSK3 β specifikus inhibitorával (AR-A014418, 20 μ M) kezeltük a sejteket, a PKA gátláshoz hasonlóan a TIMAP nem jelent meg a plazmamembránban, és a GSK3 β inhibitor előkezelés a forskolin hatását is erősen csökkentette (4.2.4 ábra, *A:d,g,j*).

Kezeletlen és forskolinnal és/vagy GSK3 β inhibitorral kezelt HPAEC-ből előállított membrán és magi frakció Western blotja megerősítette az immunfluoreszcens vizsgálatok eredményeit (4.2.4 ábra, *B*). Forskolin kezelés után a membrán frakcióban a TIMAP mennyisége megnőtt, a GSK3 β inhibitora hatására pedig lecsökkent, továbbá a forskolin hatását a GSK3 β inhibitor előkezelés szignifikánsan csökkentette. Ezzel együtt, a magi frakciókban a TIMAP mennyiségében ellentétes előjelű változásokat detektáltunk. Az előző kísérletek eredményeivel összehangban, a forskolinnal kezelt HPAEC sejtlizátumából immunprecipitált TIMAP mellett a kontroll vagy a GSK3 β gátlószerével kezelt (+/- forskolin) sejtek TIMAP immunprecipitátumához viszonyítva kevesebb RACK1 fehérjét detektáltunk (4.2.4 ábra, *C*). Az immunprecipitált mintákban látható extra sáv az IgG-nek felel meg.

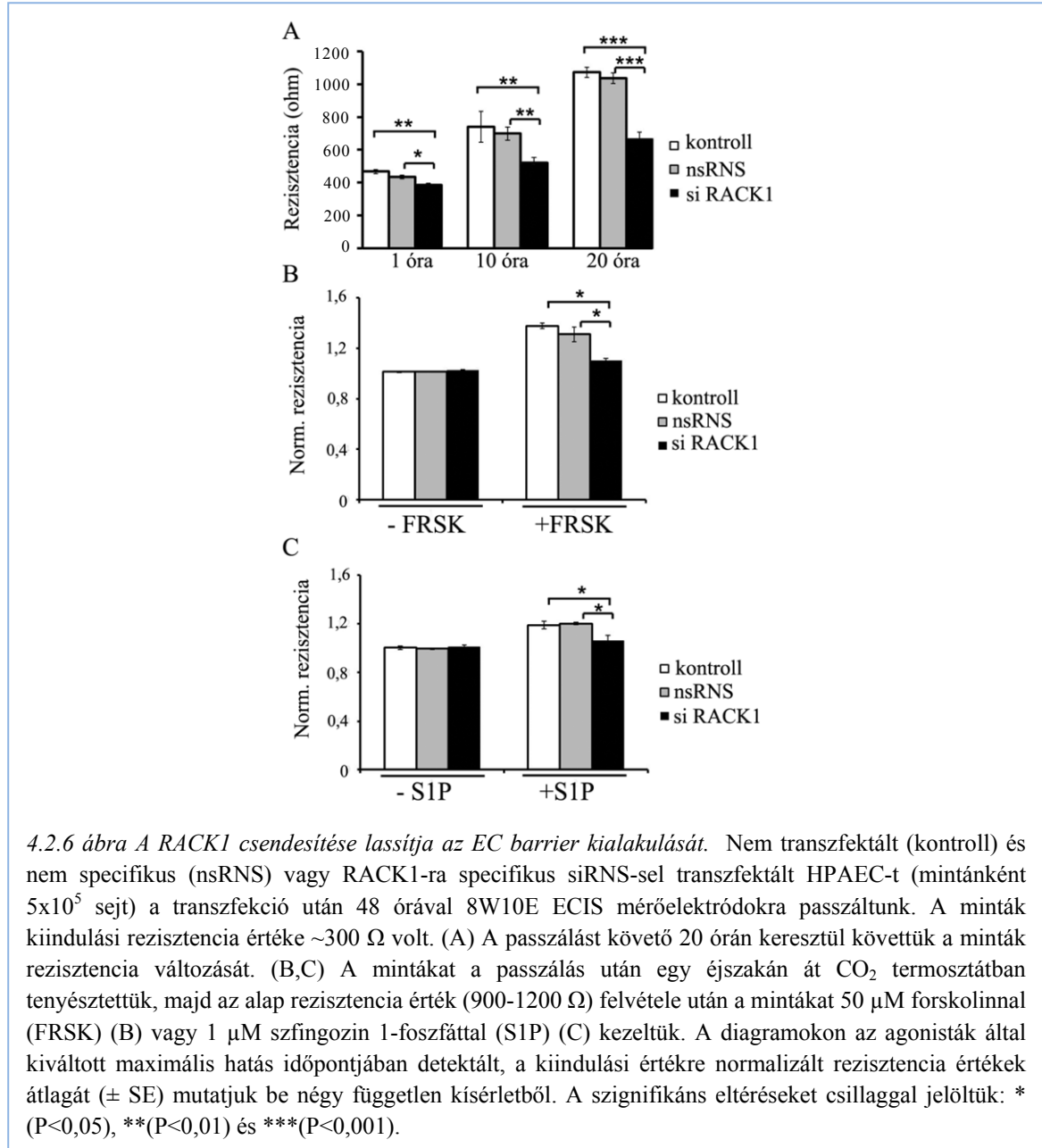
Mindezek alapján azt feltételezhetjük, hogy a TIMAP és a RACK1 között a citoplazmában van kölcsönhatás, amit a TIMAP PKA/GSK3 β foszforilációja befolyásol.



A RACK1 fehérjét eredményesen csendesítettük HPAEC-ben siRNS transzfekcióval. RT-PCR-ral mRNS szinten 70-80%, Western blottal fehérje szinten ~50% csökkenést detektáltunk (4.2.5 ábra, A-B). Érdekes módon a RACK1 csendesítésével párhuzamosan a TIMAP mRNS és fehérje szintje is megnőtt. A belső kontrollként használt PP2A B alegységre specifikus primerpárral végzett kísérletben ilyen jellegű eltérést nem tapasztaltunk. Elképzelhető, hogy a RACK1 befolyásolhatja a TIMAP transzkripcióját, de ezzel kapcsolatos további vizsgálatot még nem végeztünk.



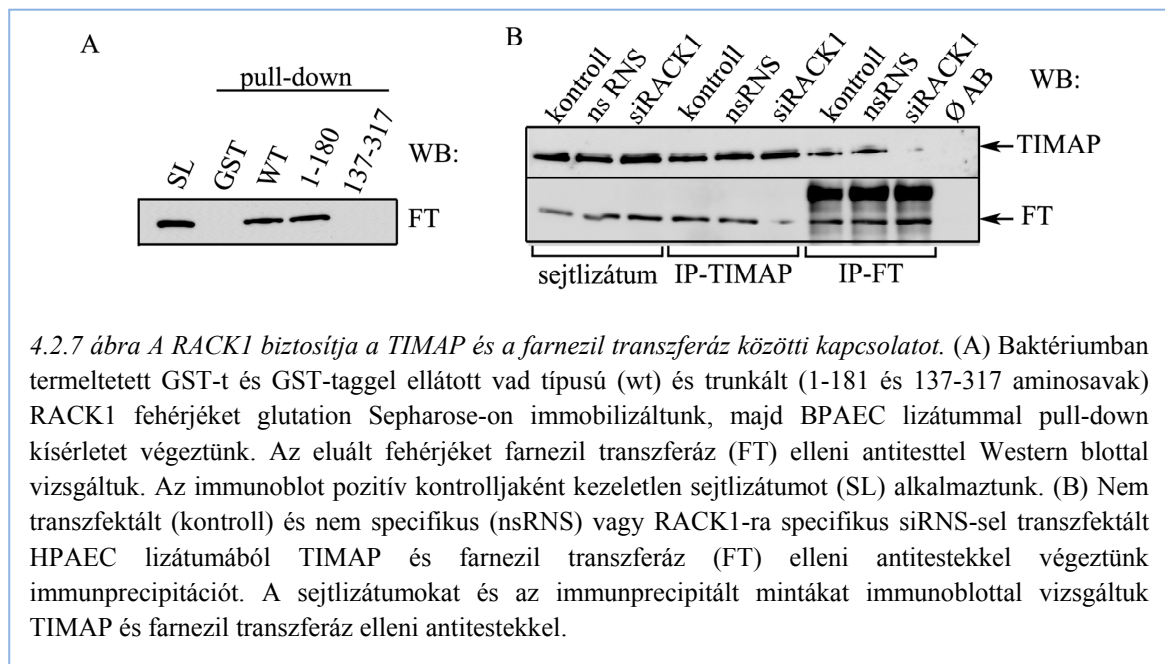
A TIMAP magasabb szintű expressziója ellenére is a RACK1 csendesített HPAEC plazmamembránjában és membrán frakciójában nem, vagy alig detektáltunk TIMAP-ot (4.2.5 ábra, C,D). Ezért feltételeztük, hogy emiatt a RACK1 hiányában az EC kitapadása és szétterülése, végső soron barrier formáló képessége is változhat, amit ECIS mérésekkel ellenőriztünk.



Azonos számú kontroll, nsRNS-sel és RACK1 specifikus siRNS-sel transzfektált HPAEC-t helyeztünk az ECIS elektródokra a transzfekció után 48 órával és mértük a sejtréteg rezisztenciáját, ami a mérés kezdetekor mindhárom mintában $\sim 300 \Omega$ volt (4.2.6 ábra, A). A RACK1 csendesített HPAEC rezisztenciája azonban már a mérés megkezdése után 1 órával szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a kontroll mintáké. Miközben a két

kontroll között nem alakult ki jelentős különbség, a RACK1 csendesített minta eltérése a mérés közben (0-20 óra) egyre fokozódott. Az EC barriert erősítő forskolin és szfingozin 1-foszfát hatását is szignifikánsan csökkentette a RACK1 csendesítése (4.2.6 ábra, B,C). Ez összhangban van feltételezésünkkel, miszerint a TIMAP mennyiségének a RACK1 hiányában tapasztalt csökkenése a plazmamembránban gyengíti az EC barrier formáló képességét.

Immunfluoreszcens vizsgálataink eredménye alapján nem feltételezhattuk, hogy a RACK1 direkt módon részt venne a TIMAP plazmamembránhoz történő transzportjában (4.2.4 ábra, A). A TIMAP membrán lokalizációjához szükséges C-terminálisának prenilációja, amit a farnezil transzferáz enzim katalizál [100]. Pull-down módszerrel a rekombináns RACK1 fehérje BPAEC lizátumából megkötötte a farnezil transzferázt. A TIMAP-hoz hasonlóan, a RACK1 N-terminális, WD1-4 régiója köti a transzferázt (4.2.7 ábra, A). A TIMAP és a farnezil transzferáz kölcsönösen detektálható a másikkra specifikus antitesttel kezeletlen, vagy nsRNS-sel transzfektált HPAEC-ből készített immunprecipitátumokban, ami a két fehérje közötti kölcsönhatásra utal. A RACK1 hiányában, a csendesített HPAEC mintákban, ez a kölcsönhatás azonban nem mutatható ki (4.2.7, B). Ebből arra következtethetünk, hogy a TIMAP és a farnezil transzferáz nem közvetlenül kötődik egymáshoz, hanem a RACK1 adaptor közeli felszínehez kapcsolódnak.



4.2.2 *NHERF fehérjék vizsgálata EC-ben*

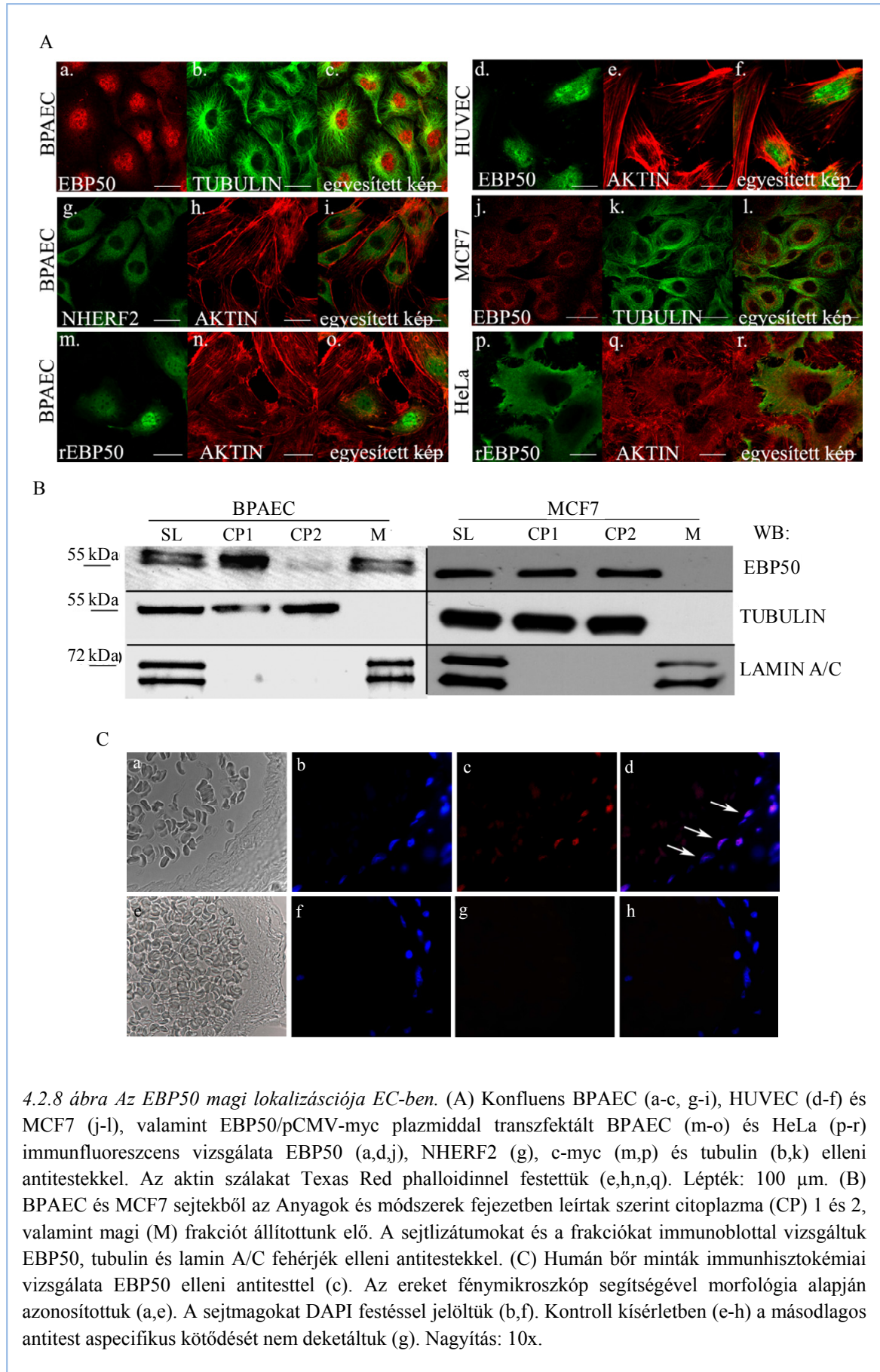
Az ERM fehérjék közvetlenül, vagy adaptor fehérjéken keresztül kapcsolják az F-aktint a plazmamembrán integráns fehérjeihez, ezáltal a kontrahált vagy relaxált EC és az EC barrier fenntartásában fontos szerepük van. Az NHERF fehérjecsalád két tagja, az NHERF1/EBP50 és az NHERF2 C-terminálisán ERM kötő régió található. Mivel korábban ezeket a fehérjéket döntően epitel sejtekben vizsgálták az NHE3 fehérje szabályozásában betöltött szerepük miatt, ezért célul tűztük ki az EBP50 és NHERF2 fehérjék tanulmányozását tüdő artéria EC-ben.

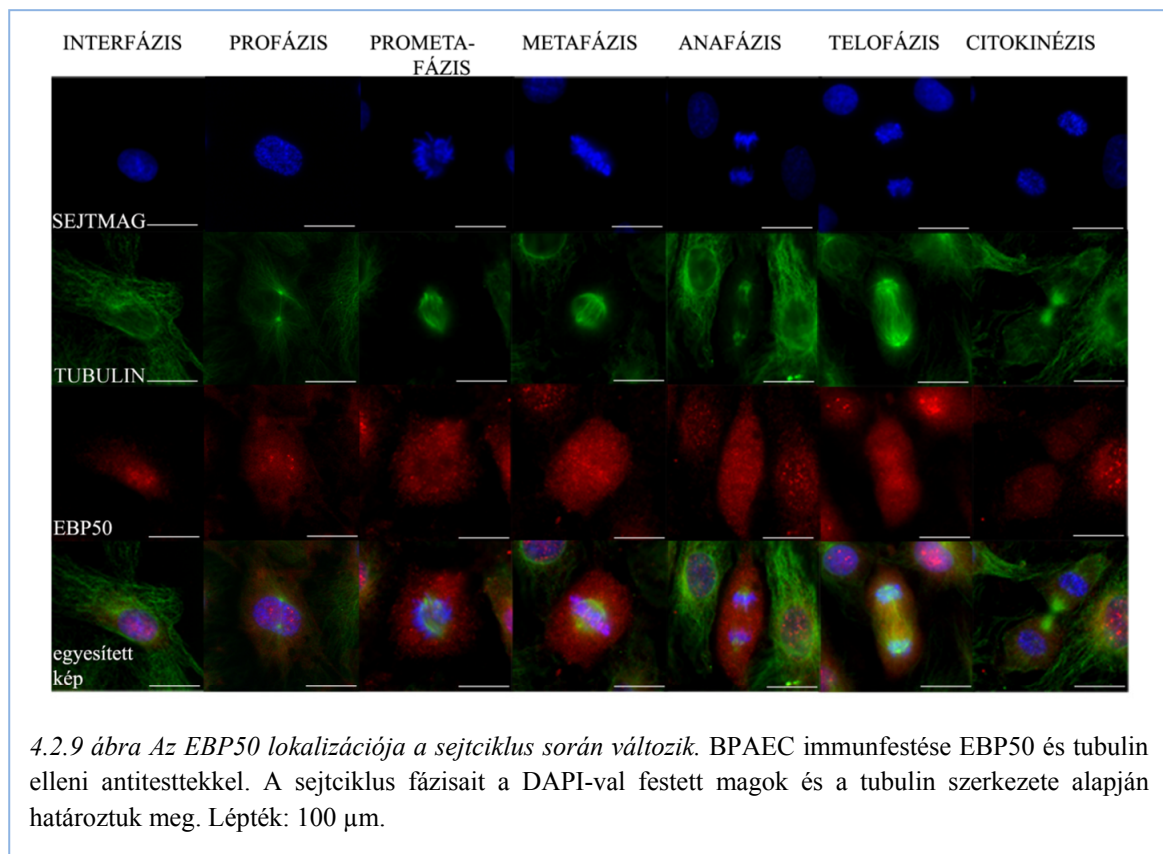
4.2.2.1 *EBP50*

4.2.2.1.1 *Az EBP50 sejtciklus függő lokalizációja EC-ben*

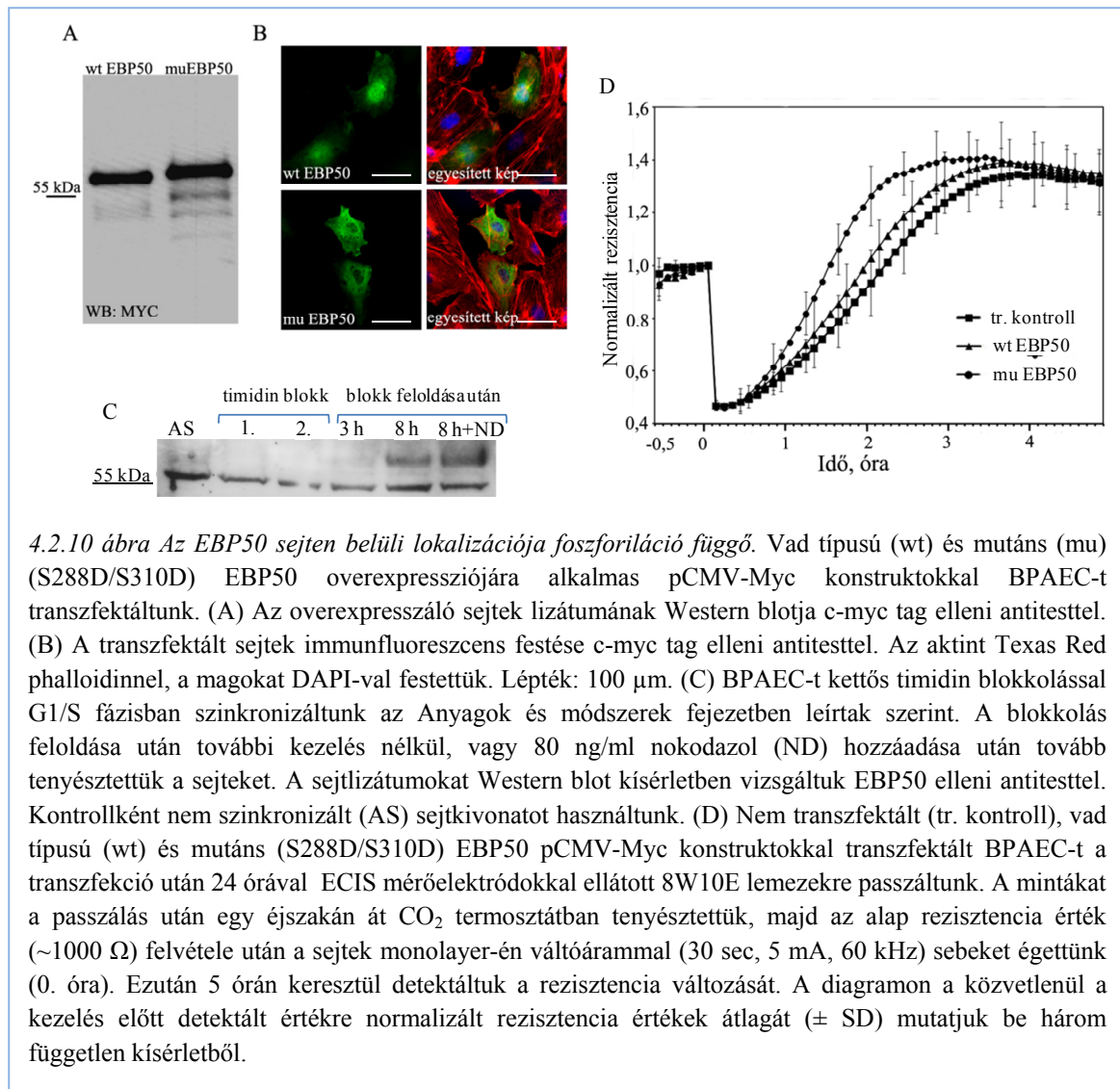
Az EBP50 sejten belüli lokalizációját immunfluoreszcenciával vizsgáltuk EC-ben (4.2.8 ábra, *A*). Az epitel sejtekkel ellentétben (*j-l*), ahol a citoplazmában detektáltuk, BPAEC-ben és HUVEC-ben elsősorban a magban és a mag körüli citoplazma régióban találtuk (*a-f*). Az NHERF2 fehérje a várakozásnak megfelelően a citoplazmában festődött (*g-i*). Az EBP50 immunfestését egy másik EBP50 elleni antitesttel is megismételtük, amellyel szintén a fehérje magi lokalizációját detektáltuk (nincs dokumentálva). Az overexpresszálatott EBP50 szintén eltérően lokalizálódott az endotél és epitel sejtekben, BPAEC-ben a magban (*m-o*), HeLa-ban a citoplazmában (*p-r*). BPAEC és MCF7 szubcelluláris frakcióival végzett Western blot eredményeink is alátámasztották a fehérje sejtípustól függő lokalizációját (4.2.8 ábra, *B*). A citoplazma és magi frakciók tisztaságát tubulin és lamin A/C elleni antitestekkel ellenőriztük. Az EBP50 fehérjét csak a BPAEC-magi frakciójában detektáltuk, az MCF7 magi frakciójában nem volt jelen. Immunhisztokémiai vizsgálatunk is azt igazolta, hogy az EBP50 az EC-ben a magban lokalizálódik (4.2.8 ábra, *C*).

Az immunfluoreszcensen jelölt BPAEC mintákon megfigyeltük, hogy az osztódó sejtekben az EBP50 elhagyta a sejtmagot. BPAEC-en EBP50 és tubulin elleni antitesttel immunfestést végeztünk, a sejtmagot pedig DAPI festéssel tettük láthatóvá (4.2.9 ábra). Ezzel azonosítani tudtuk, hogy az egyes sejtek a sejtciklus mely fázisában voltak a minta fixálásakor. Interfázisban az EBP50 a sejtek magjában található. A profázisban megfigyelhető, hogy elkezdődött a fehérje citoplazmában való megjelenése. A mitózis további szakaszaiban jelen van a citoplazmában, majd a citokinézisben visszatér a magba.





Korábban leírták, hogy HeLa sejtekben az EBP50 a mitózisban foszforilálódik, amit a Cdk1 katalizál két Ser oldalláncon [169]. Feltételeztük, hogy az EBP50 változó lokalizációja a BPAEC sejtciklusa során összefügghet foszforilációs állapotával. A Cdk1 foszforilációs helyeken mutáns EBP50 overexpressziójára alkalmas konstruktot hoztunk létre. A mutánsban a Cdk1 foszforilációs helyeit, a Ser288 és Ser310 aminosavakat savas jellegű Asp-ra cseréltük. BPAEC-t transzfektáltunk a vad típusú és mutáns EBP50/pCMV-myc konstrukttal, és összehasonlítottuk a foszforilált EBP50-t utánzó mutáns és a vad típusú rekombináns látszólagos molekulatömegét és sejten belüli lokalizációját. A Cdk1 általi foszforiláció az EBP50 mobilitását, ezzel látszólagos molekulatömegét SDS-PAGE-n megváltoztatta [169]. A foszfo-EBP50-et utánzó mutánsunk látszólagos molekulatömege is eltért a vad típusúétól (4.2.10 ábra, A). Az overexpresszáló BPAEC immunfluoreszcencia vizsgálata pedig azt mutatta, hogy míg a vad típusú rekombináns a magban, a mutáns EBP50 a citoplazmában lokalizálódott (4.2.10 ábra, B). Ez arra utal, hogy az EBP50 foszforilációja valóban befolyásolhatja lokalizációját az EC-ben.



BPAEC-t kettős timidin blokkal G1/S fázisban szinkronizáltunk, majd a blokk feloldása után 8 órán át tovább tenyésztettünk további adalék nélkül, illetve nokodazol (80 ng/ml) hozzáadásával G2/M fázisban szinkronizáltuk a sejteket. Az endogén EBP50 foszforilációját a különböző fázisokban és időpontokban készített sejtizátumok immunoblotján az EBP50 jel eltérő látszólagos molekulatömege bizonyítja (4.2.10 ábra, C). A nem szinkronizált BPAEC-ben az EBP50 elleni antitest ~55 kDa méretnél ismeri fel a fehérjét, de egy jól elkülöníthető halvány sáv is látható nagyobb méretnél, ami a G1/S-ben szinkronizált sejteknél eltűnt. A timidin blokk feloldása után 8 órával ez a látszólag magasabb molekulatömegű EBP50 jel kifejezetten megerősödött. A foszfo-EBP50-et utánzó mutánssal kapott eredményeink és mások korábbi közlése [169] alapján feltételezzük, hogy a nagyobb molekulatömegnek megfelelő sávban a mitózishoz közeli fázisban foszforilálódott EBP50 van jelen.

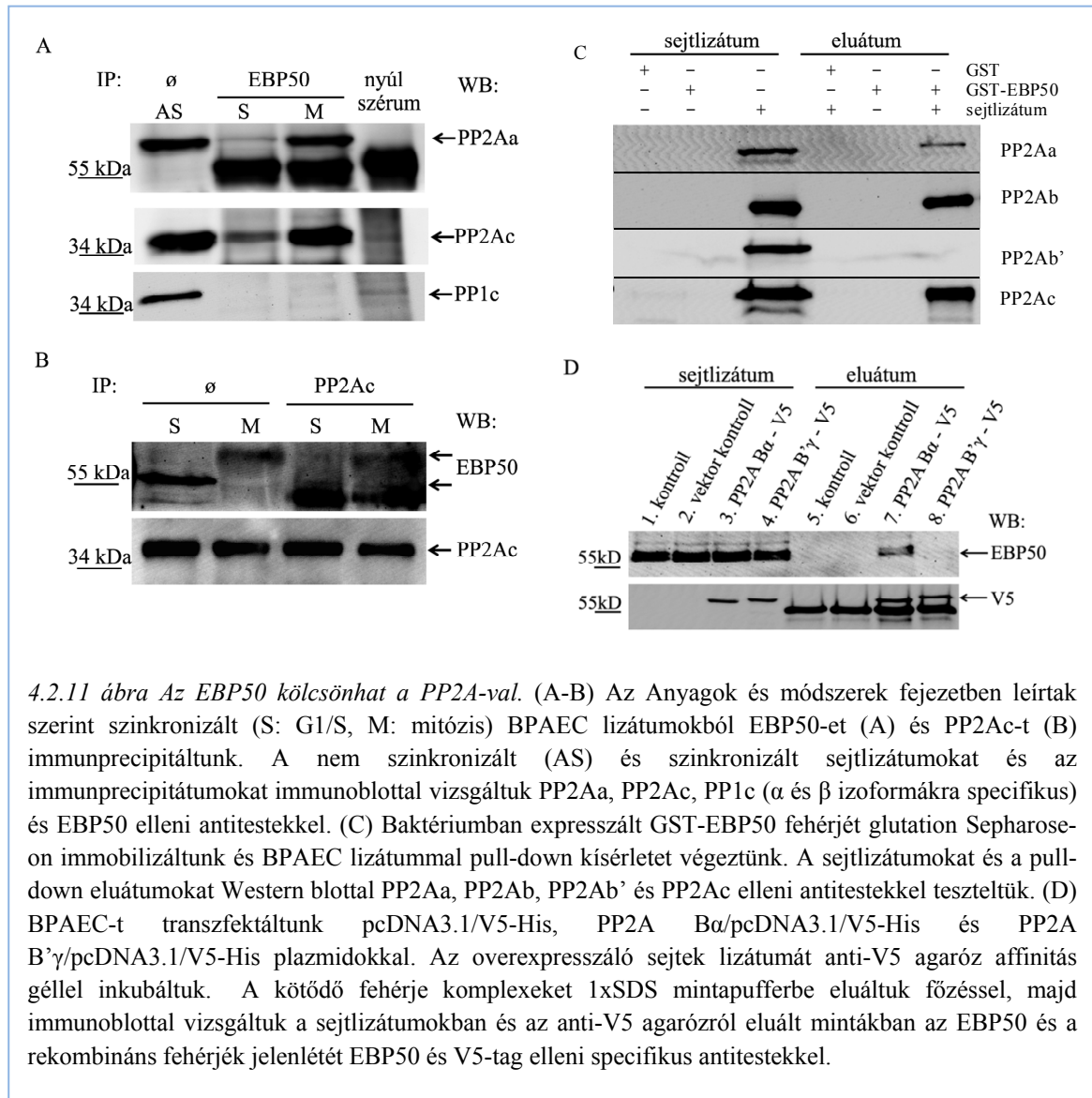
A sejtek osztódása befolyásolhatja a sebgyógyulást [203, 204]. Transzfekció után 24 órával vad típusú és a foszfo-formát utánzó mutáns EBP50-et overexpresszáló BPAEC-t ECIS mérőelektródokra passzáztunk. A monolayerek rezisztenciájának állandósulása után az elektródok felületén a sejtrétegben azonos, 250 μm átmérőjű „sebeket” hoztunk létre (30 sec, 5 mA, 60 kHz), ettől a rezisztencia egy üres elektródnak megfelelő értékre esett le. Ezután időben követtük a sebgyógyulást tükröző rezisztencia emelkedését (4.2.10 ábra, *D*). A mutáns EBP50-et termelő sejtekben a sebgyógyulás gyorsabban zajlott, a detektált maximális rezisztencia 50%-ának eléréséhez 1,5 órára volt szükség, míg a kontroll és a vad típust overexpresszáló minta esetében ez az idő átlagosan 1,8 óra volt.

4.2.2.1.2 A PP2A és az EBP50 kölcsönhatása

Az EBP50 reverzibilis foszforilációjában a defoszforilációt katalizáló protein foszfatáz azonosításához G1/S vagy G2/M fázisban szinkronizált BPAEC lizátumokból immunprecipitált EBP50 mintákban vizsgáltuk a PP1 és PP2A típusú foszfatázok jelenlétét Western blottal (4.2.11 ábra, *A*). Az EBP50 kölcsönhatását találtuk a PP2A C katalitikus (PP2Ac) és szerkezeti A alegységével (PP2Aa), de nem kaptunk jelet a PP1 katalitikus alegységének (PP1c) α és β izoformáját felismerő antitesttel az EBP50 immunprecipitátumában. A PP2A és az EBP50 közötti kölcsönhatást a PP2Ac immunprecipitátumával végzett Western blottal is kimutattuk, a G2/M fázisú sejtekből származó mintában határozottan több EBP50-t detektáltunk (4.2.11 ábra, *B*).

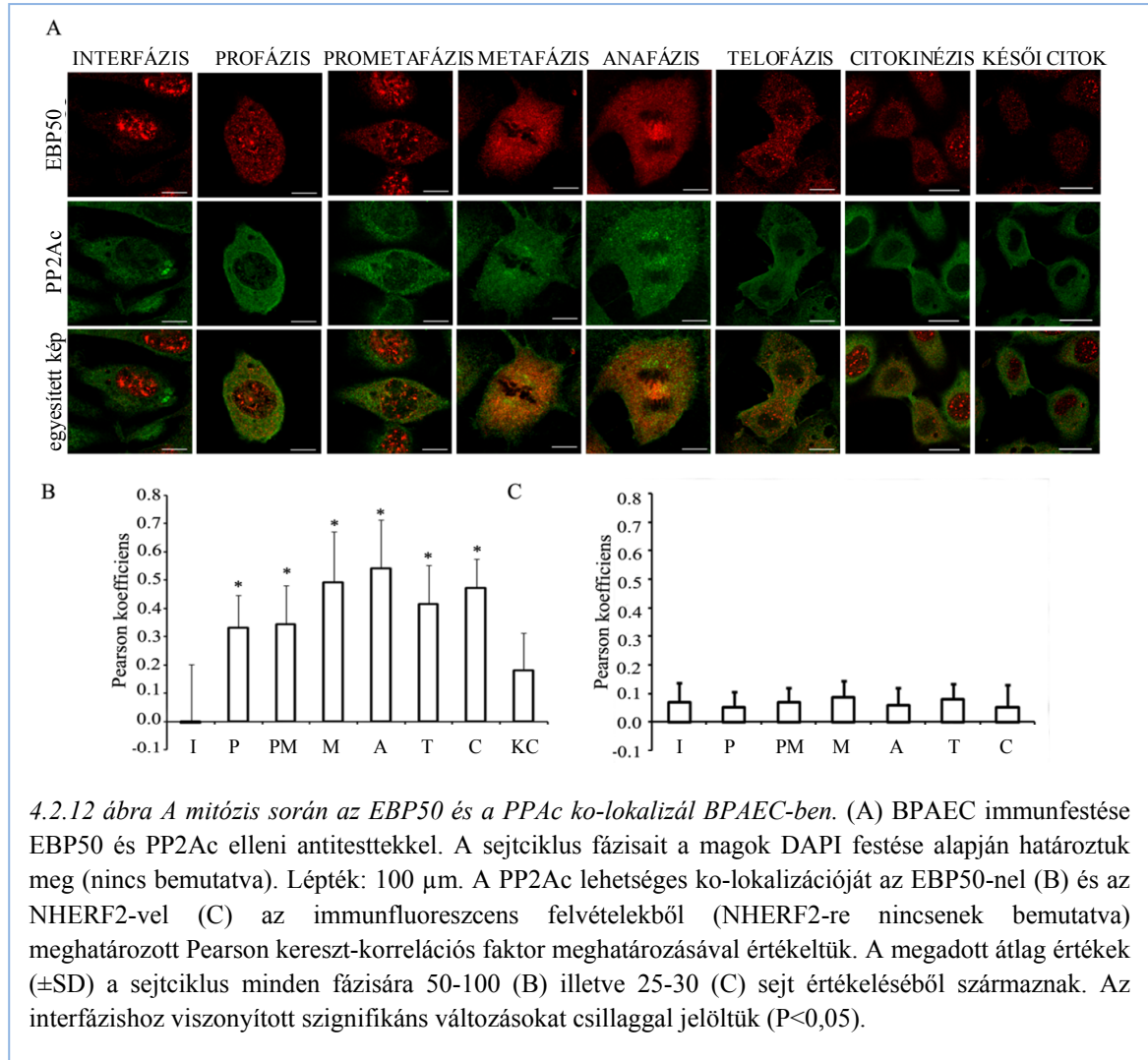
A PP2A B-alegységekkel való kölcsönhatás vizsgálatához, mivel azok mérete (~55 kDa) az IgG méretéhez közeli, pull-down módszert alkalmaztunk (4.2.11 ábra, *C-D*). Egyrészt bakteriálisan expresszált GST-EBP50-et immobilizáltunk glutation Sepharose-on, majd BPAEC lizátummal inkubáltuk és a GST-EBP50-hez kötődő fehérjéket Western blottal vizsgáltuk az eluált mintákban. A vártan megfelelően kimutattuk a PP2Ac és PP2Aa fehérjék kötődését, továbbá a PP2A B alegységét (PP2Ab), de a B'alegység (PP2Ab') nem volt kimutatható a pull-down fehérjekomplexben (4.2.11 ábra, *C*). Másrészt a B alegység α és a B' alegység γ izoformáját V5 taggal ellátva BPAEC-ben overexpresszáltuk, majd immobilizált anti-V5 antitesttel kikötöttük a sejtizátumból a rekombinánsokat és a hozzájuk kapcsolódó kölcsönható partnereiket. Annak ellenére, hogy a B α és B' γ hasonló mértékben termelődött és az anti-V5 agarószról is összemérhető mennyiségben eluáltuk, az EBP50-nel csak a PP2A B α alegységének kölcsönhatását

találtak, a B γ -val nem (4.2.11 ábra, D). Ezek az eredmények az EBP50 és a PP2A AB α C összetételű holoenzim formája közötti kölcsönhatást bizonyítják.



Az előző eredmények alapján feltételezhető volt, hogy az EBP50 és a PP2Ac a mitózis során ko-lokalizál (4.2.11 ábra, B). BPAEC immunfluoreszcencia festése a két fehérjére specifikus antitestekkel igazolta ezt (4.2.12 ábra, A). Interfázisban a lokalizáció eltérő, az EBP50 a magban, a PP2Ac a citoplazmában van. A profázistól a korai citokinézis szakaszáig a két fehérje ko-lokalizál, de a citokinézis késői szakaszában az EBP50 már visszatér a magba. A ko-lokalizáció pontosabb értékeléséhez meghatároztuk a Pearson-féle kereszt-korrelációs koefficiens, amelynek pozitív értékei a vizsgált fehérjék ko-lokalizációját/kölcsönhatását bizonyítják (4.2.12 ábra, B). Az EBP50-nel rokon NHERF2 a PP2Ac-hez hasonlóan az EC citoplazmában lokalizálódik (4.2.8 ábra, A:g). A Pearson-féle kereszt-korrelációs koefficiens értékei NHERF2 és PP2Ac antitestekkel

immunfestett BPAEC-n (az immunfluoreszcens képek nincsenek dokumentálva) sem interfázisú, sem a mitózis különböző szakaszaiban lévő sejtekben nem utaltak ko-lokalizációra, így ezt a mérési sorozatot negatív kontrollként alkalmaztuk.

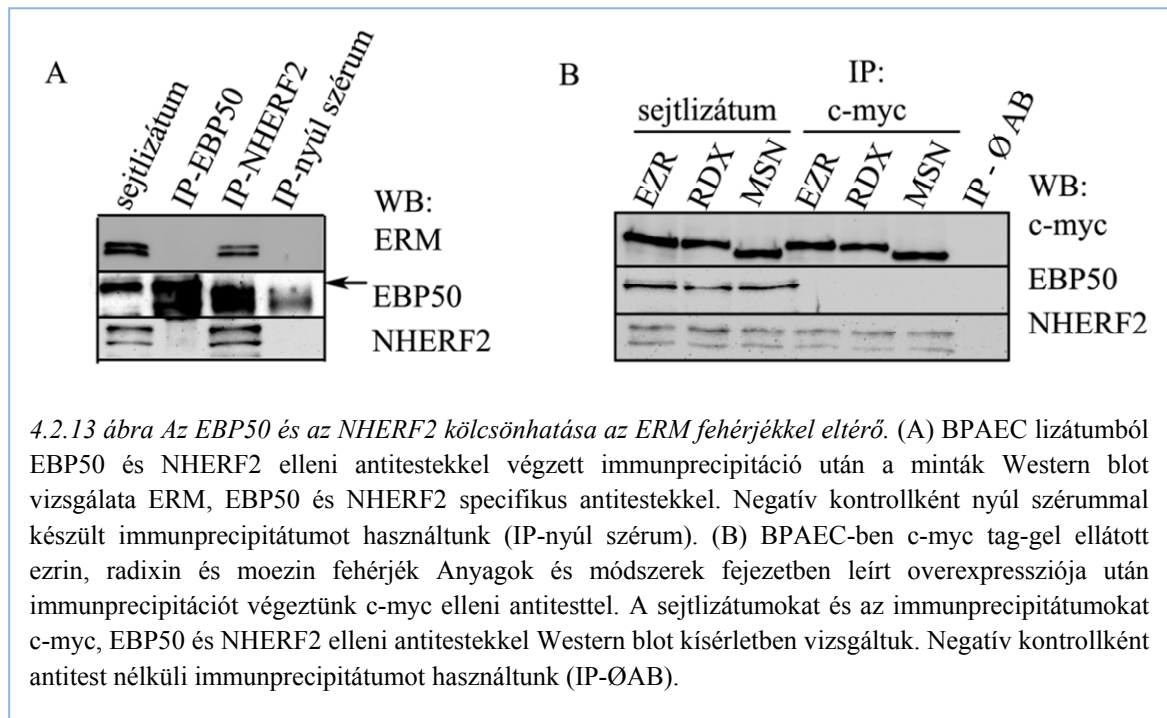


4.2.2.2 NHERF2

4.2.2.2.1 Az ERM kölcsönhatása az NHERF fehérjékkel EC-ben

Az EBP50 és az NHERF2 eltérő sejten belüli lokalizációját detektáltuk EC-ben interfázisban (4.2.8 ábra, A). Ez a két adaptor fehérje eltérő élettani funkciójára utalhat ebben a sejttypusban. Összehasonlítottuk az EBP50 és az NHERF2 ERM kötő képességét BPAEC-ben (4.2.13 ábra), hiszen mindkét fehérje C-terminálisán ERM kötő domén található. Az endogén fehérjék közötti kölcsönhatás vizsgálatához EBP50 és NHERF2 elleni antitestekkel végeztünk immunprecipitációt BPAEC lizátumokból (4.2.13 ábra, A).

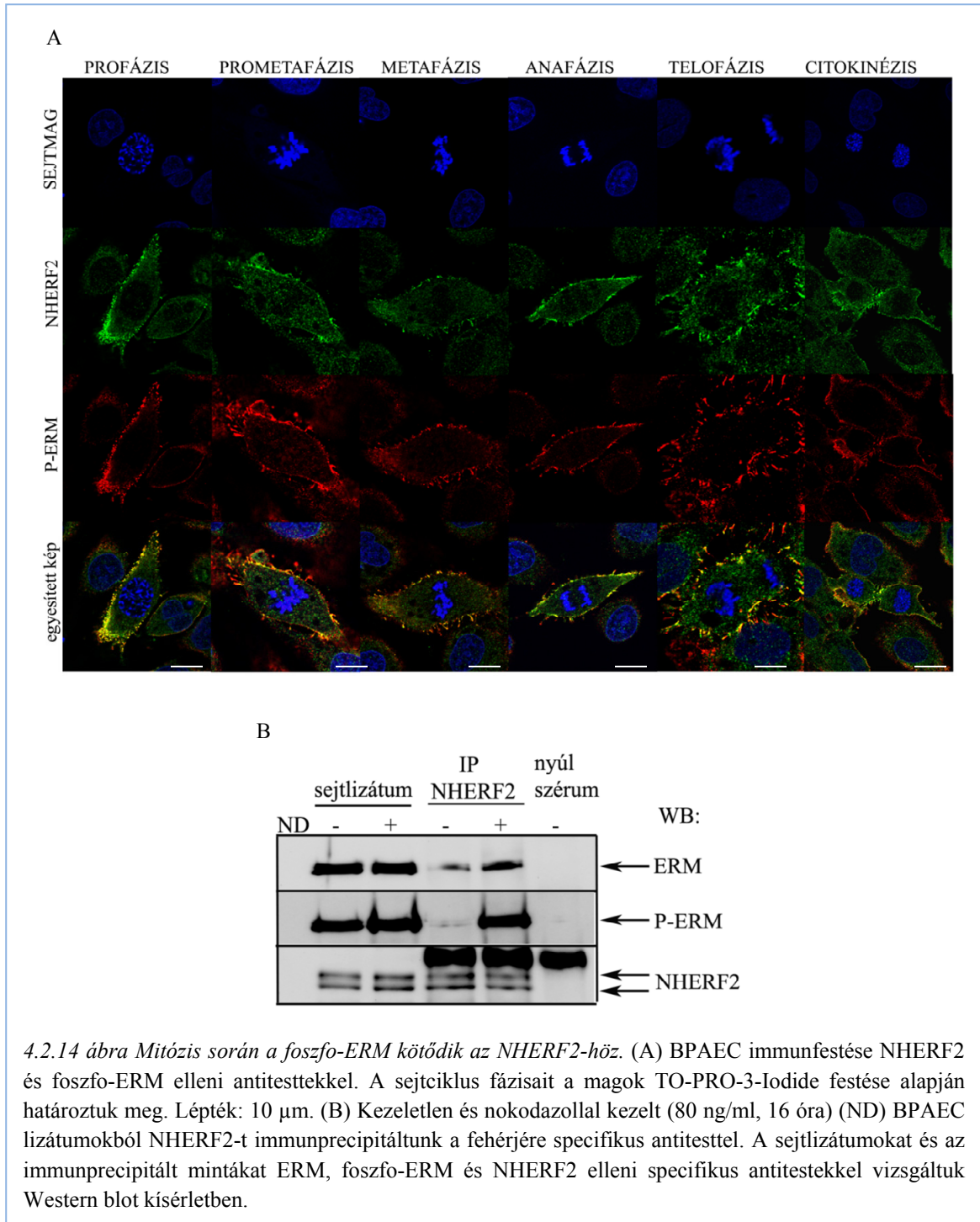
Az immunprecipitált fehérje komplexekben az ERM fehérjék jelenlétét Western blottal ellenőriztük egy olyan antitesttel, amely mindhárom ERM fehérjét felismeri. Az ERM fehérjék kötődtek az NHERF2-höz, az EBP50-nel való kölcsönhatásukat azonban nem tapasztaltuk. Az egyes ERM fehérjék kötődését külön-külön is megvizsgáltuk. Ehhez pCMV-myc emlős expressziós vektor felhasználásával az ERM fehérjéket egyenként overexpresszáltuk BPAEC-ben. A rekombináns fehérjéket a c-myc tag elleni antitesttel immunprecipitáltuk az overexpresszálo BPAEC lizátumából, és immunoblottal ellenőriztük az endogén EBP50 és NHERF2 kötődését (4.2.13 ábra, B). Az EBP50 egyik ERM fehérje immunkomplexében sem volt kimutatható, viszont az NHERF2 az ezrinhez, a radixinhez és a moezinhez is kötődött.



4.2.2.2.2 Az NHERF2 szerepe az ERM foszforilációjában

Az ERM fehérjék foszforilációval aktiválódó fehérje-linkerek. Az NHERF2 és a foszforilált ERM fehérjék közötti kölcsönhatást immunfluoreszcens kísérlettel, foszfo-ERM és NHERF2 fehérjékre specifikus antitestekkel vizsgáltuk BPAEC-ben. Osztódó sejteken a fehérjék ko-lokalizációját detektáltuk a plazmamembránban és a filopódiumokban a mitózis minden fázisában (4.2.14 ábra, A). BPAEC-t nokodazol kezeléssel (80 ng/ml, 16 h) G2/M fázisban blokkoltunk, majd NHERF2 elleni antitesttel immunprecipitációt végeztünk (4.2.14. ábra, B). A nem szinkronizált sejtekhez

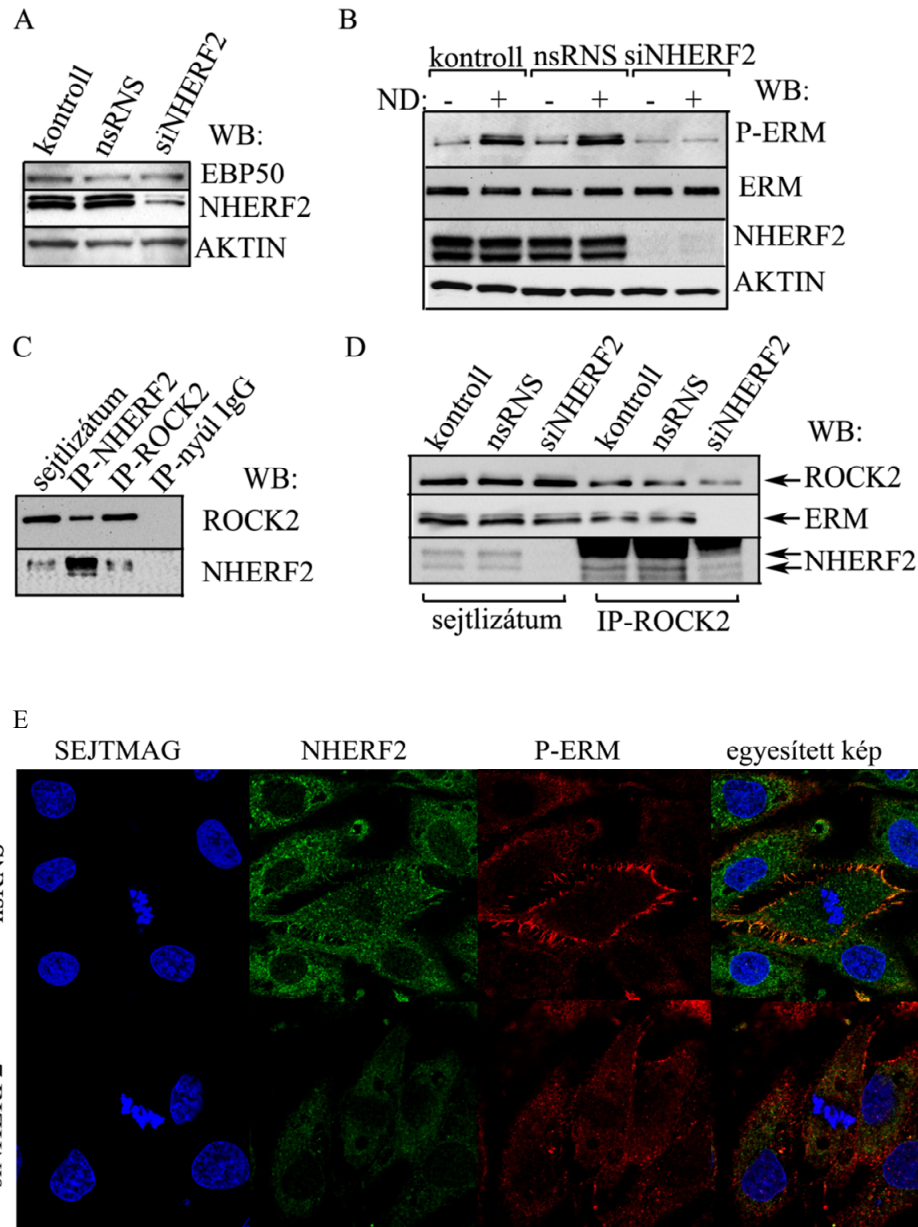
viszonyítva a nokodazollal kezelt sejtek lizátumában az immunfluoreszcens vizsgálatok alapján vártnak megfelelően a foszfo-ERM jel erősödött, továbbá az NHERF2 immunkomplexében a G2/M fázisban lévő sejtekből készült mintában szintén jelentősen nagyobb mennyiségű foszfo-ERM-et detektáltunk.



BPAEC-ben specifikus siRNS transzfekcióval csendesítettük az NHERF2 fehérjét, hogy ellenőrizzük, változik-e az ERM foszforilációja az előzőek alapján feltételezhetően szabályozó fehérje hiányában. A csendesítés hatékonyságát Western blottal ellenőriztük. Azt is megállapítottuk, hogy az NHERF2 depléciója az EBP50 fehérje szintjét nem befolyásolta (4.2.15 ábra, *A*). A kontroll és nsRNS-sel transzfektált minták esetében a nem szinkronizált sejtlizátumokban detektált alacsony foszfo-ERM szint a G2/M fázisban szinkronizált sejtekben azonos mértékben emelkedett (4.2.15 ábra, *B*). Az NHERF2 csendesített BPAEC lizátumokban azonban a nokodazol kezelés után is alacsony maradt az ERM foszforilációs szintje (4.2.15 ábra, *B*), amit immunfluoreszcens vizsgálattal is megfigyeltünk (4.2.15 ábra, *E*). Az egyesített képeken a magfestés alapján jól felismerhetőek a mitotikus sejtek. Míg az nsRNS transzfekció után a foszfo-ERM és NHERF2 ko-lokalizációja látható a filopódiumokban, az osztódó, NHERF2 depletált sejten sem ko-lokalizációt, sem a foszfo-ERM jel erősödését nem tapasztaltuk. Mindezekből azt a következtetést vontuk le, hogy az NHERF2 egy szükséges faktor az ERM foszforilációjában.

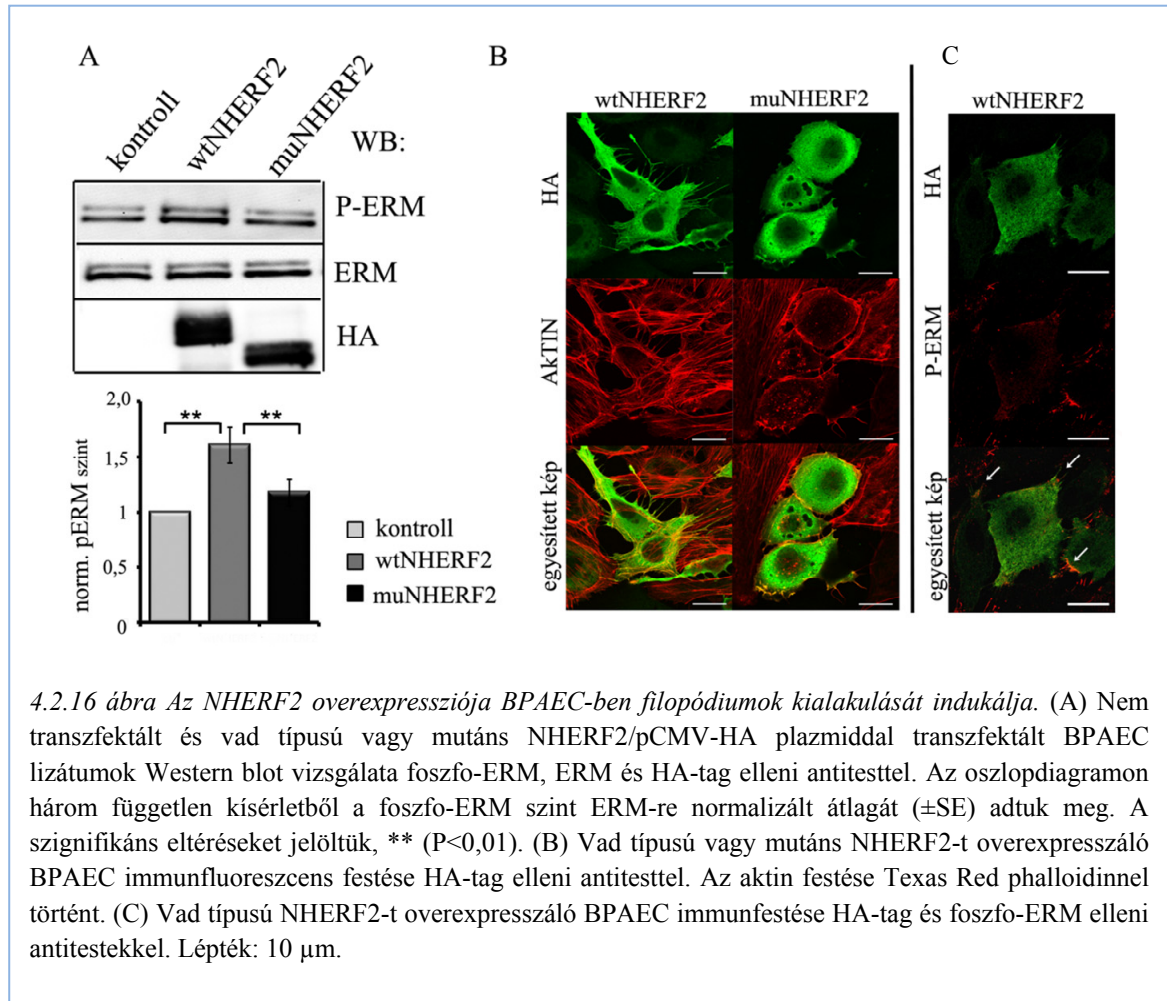
Feltételeztük, hogy az NHERF2 adaptor fehérje kötődési felületet biztosíthat az ERM és az ERM-t foszforiláló kináz számára. A Rho kináz egyike azoknak a kinázoknak, melyről ismert volt, hogy az ERM-t foszforilálhatja [195]. A ROCK2 kináz inhibitorával, H1152-vel előkezelt BPAEC-ben a nokodazol által kiváltott foszfo-ERM szint növekedés jelentősen lecsökkent a kontrollhoz viszonyítva (nincs dokumentálva), amiből arra következtettünk, hogy a ROCK2 lehet felelős az ERM foszforilációjáért az EC-ben. Tovább vizsgálva az NHERF2-ERM-ROCK2 kölcsönhatásokat azt találtuk, hogy az NHERF2 és a ROCK2 elleni BPAEC immunprecipitátumokban az adaptor és a kináz egyaránt jelen volt (4.2.15 ábra, *C*), és az ERM-t is detektáltuk kontroll és nsRNS-sel transzfektált BPAEC ROCK2 immunprecipitátumában (4.2.15 ábra, *D*). Bár az ERM fehérjeszint az NHERF2 depletált BPAEC lizátumában nem különbözött a két kontroll mintában talált mennyiségtől, a csendesített sejtekben az ERM ROCK2-höz való kötődése megszűnt (4.2.15 ábra, *D*), igazolva feltételezésünket.

A fenti eredményekkel összhangban, az NHERF2 overexpressziója a foszfo-ERM szint növekedését eredményezte (4.2.16 ábra, *A-B*). Vad típusú és mutáns NHERF2 overexpressziójára alkalmas pCMV-HA expressziós konstruktokat készítettünk. A mutáns forma C-terminálisáról az ERM kötő domént eltávolítottuk. A kontroll és overexpresszáló BPAEC minták lizátumában Western blottal összehasonlítottuk a foszfo-



4.2.15 ábra NHERF2 hiányában az ERM nem foszforilálódik a mitózis során. (A) Nem transzfektált (kontroll), nem specifikus (nsRNS) és NHERF2-re specifikus (sc-42522) siRNS-sel transzfektált BPAEC lizátumok Western blot vizsgálata EBP50, NHERF2 és aktin elleni antitestekkel. (B) Nem transzfektált (kontroll), nem specifikus (nsRNS) és NHERF2-re specifikus (sc-42522) siRNS-sel transzfektált BPAEC-ből további kezelés nélküli vagy nokodazol kezelést követően készült lizátumok Western blot vizsgálata foszfo-ERM, ERM, NHERF2 és aktin elleni antitestekkel. (C) BPAEC sejtlizátumokból NHERF2 és ROCK2 fehérjéket immunprecipitáltunk. A mintákat immunoblottal vizsgáltuk ROCK2 és NHERF2 elleni antitestekkel. (D) Nem transzfektált (kontroll), nem specifikus (nsRNS) és NHERF2-re specifikus (sc-42522) siRNS-sel transzfektált BPAEC lizátumokból ROCK2 fehérjét immunprecipitáltunk. A sejtlizátumokat és az immunprecipitált mintákat Western blottal ROCK2, ERM és NHERF2 elleni antitestekkel teszteltük. (E) Nem specifikus (nsRNS) és NHERF2-re specifikus siRNS-sel transzfektált BPAEC immunfestése NHERF2 és foszfo-ERM elleni antitestekkel. A sejtmagokat TO-PRO-3-Iodide festéssel tettük láthatóvá.

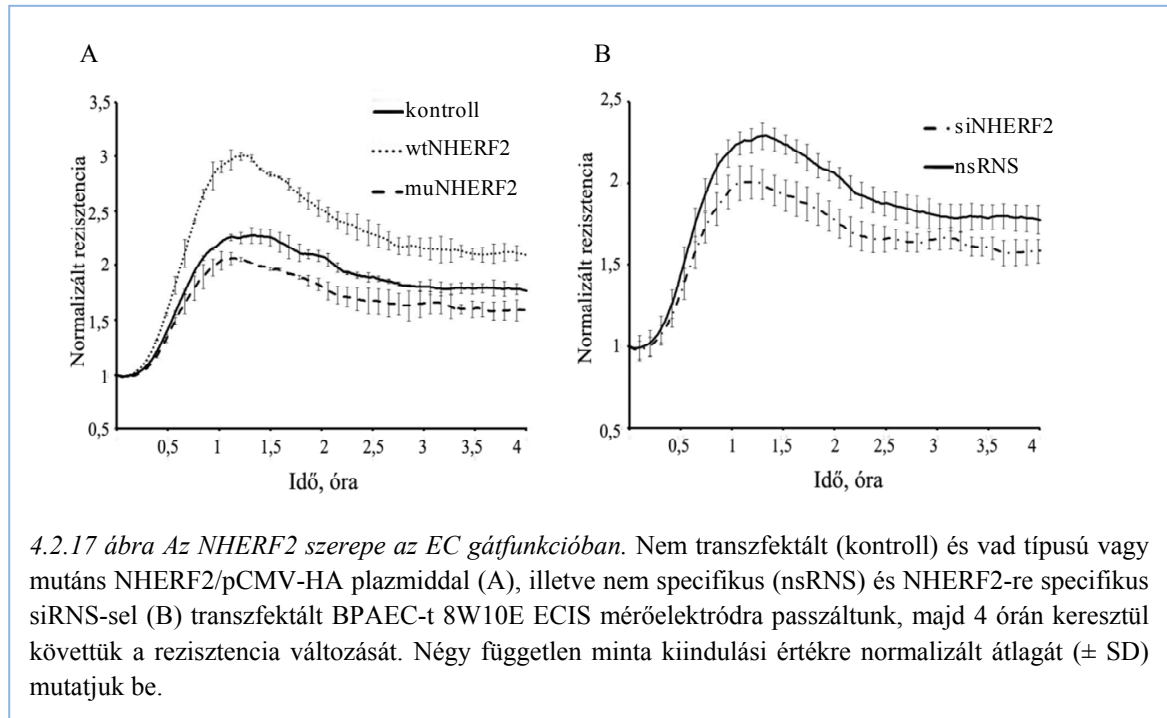
ERM mennyiségét. Míg a vad típusú NHERF2 rekombináns ~50%-os foszfo-ERM szint növekedést váltott ki, az ERM-mel kötödni nem képes mutáns overexpressziója a kontrollhoz viszonyítva nem okozott az ERM foszforilációjában eltérést (4.2.16 ábra, A). A vad típusú NHERF2-t overexpresszáló sejteken erős filopodium képződést figyeltünk meg a belső kontroll és a mutánst overexpresszáló BPAEC-hez hasonlítva (4.2.16 ábra, B), valamint a rekombináns NHERF2 ko-lokalizál a foszfo-ERM-mel (4.2.16 ábra, C).



4.2.2.2.3 Az NHERF2 segíti az EC szétterülését (spreading) és az angiogenezist

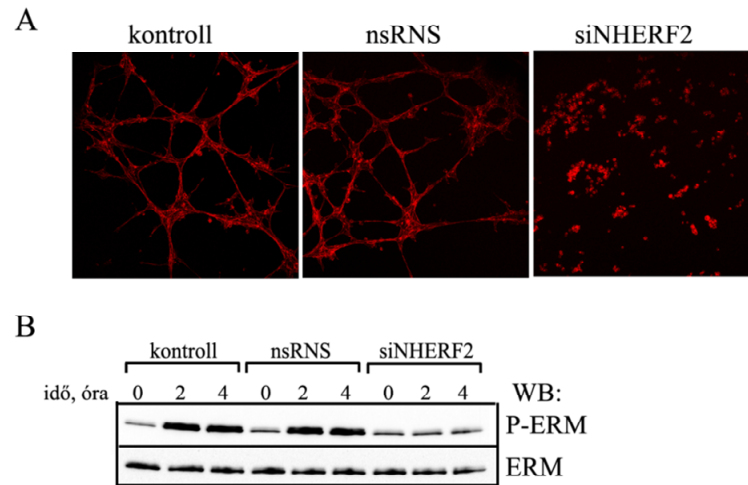
A filopodiumok a sejtek migrációjában és kitapadásában játszanak szerepet. ECIS mérőelektrodra frissen telepített, konfluens monolayer kialakulásához elegendő számú BPAEC szétterülését és kitapadását, az EC barrier kialakulását követtük 4 órán át a sejtréteg rezisztenciájának mérésével (4.2.17 ábra). A nem transzfektált vagy mutáns, ERM kötésre alkalmatlan NHERF2-t overexpresszáló mintákhoz hasonlítva a vad típusú NHERF2-t overexpresszáló sejtek rezisztencia növekedése gyorsabb kitapadást és

szétterülést tükröz (4.2.17 ábra, A). Ezzel összhangban, az NHERF2 csendesítése a sejtek barrier formáló képességét lassította (4.2.17 ábra, B). Ezek az eredmények azt igazolják, hogy az NHERF2 fehérjének szerepe van az EC barrier kialakulásában.



Az EC migrációja és proliferációja az angiogenezisben esszenciális. Ezért az előző eredmények alapján feltételeztük, hogy az NHERF2 az ERM fehérjék foszforilációjában játszott szerepe révén az angiogenezis szabályozásában is részt vesz. Bazális membránkivonattal, Matrigel-lel borított μ -slide lemezekon tenyésztett kontroll, vagy előzőleg nem specifikus, illetve NHERF2-re specifikus siRNS-sel transzfektált BPAEC „tube” formáló képességét monitoroztuk a tenyésztés megkezdésétől számított 8 órán keresztül fénymikroszkóppal. A kontroll és nsRNS-sel transzfektált tenyészetek a 3. órában sokszögű hálózat kialakítását kezdték el, ami az 5. órában tetőzött. Az NHERF2 depletált sejtek viszont csak aggregátumokban gyűltek össze a Matrigel-ben.

Az 5 órás minták F-aktin festéséről konfokális mikroszkóppal készítettünk felvételeket (4.2.18 ábra, A). A 0, 2 és 4 órás Matrigel mintákból készült lizátumokban pedig Western blottal vizsgáltuk az ERM és foszfo-ERM szintjét (4.2.18 ábra, B). Az ERM mennyisége az összes mintában közel azonos volt. A foszfo-ERM mennyisége a 2 és 4 órás kontroll mintákban jelentősen nagyobb volt a kiindulási értékhez viszonyítva. Az NHERF2 hiányában viszont az ERM foszforilációs szintje mindhárom vizsgált időpontban változatlanul alacsony volt, ami igazolja feltételezésünk helyességét az NHERF2 szerepéről az angiogenezisben.



4.2.18 ábra Az *NHERF2* szerepe az angiogenezisben. (A) Az Anyagok és módszerek fejezetben leírtak szerint nem transzfektált, nem specifikus (nsRNS) és *NHERF2*-re specifikus siRNS-sel transzfektált BPAEC-t Matrigel-lel borított μ -Slide lemezekre passzáltunk, majd 5 óra elteltével az F-aktint CF594-konjugált phalloidinnal festettük. (B) Az *A* pontban leírt 0, 2 és 4 órás Matrigel minták Western blot analízise foszfo-ERM és ERM specifikus antitestekkel.

5. MEGBESZÉLÉS

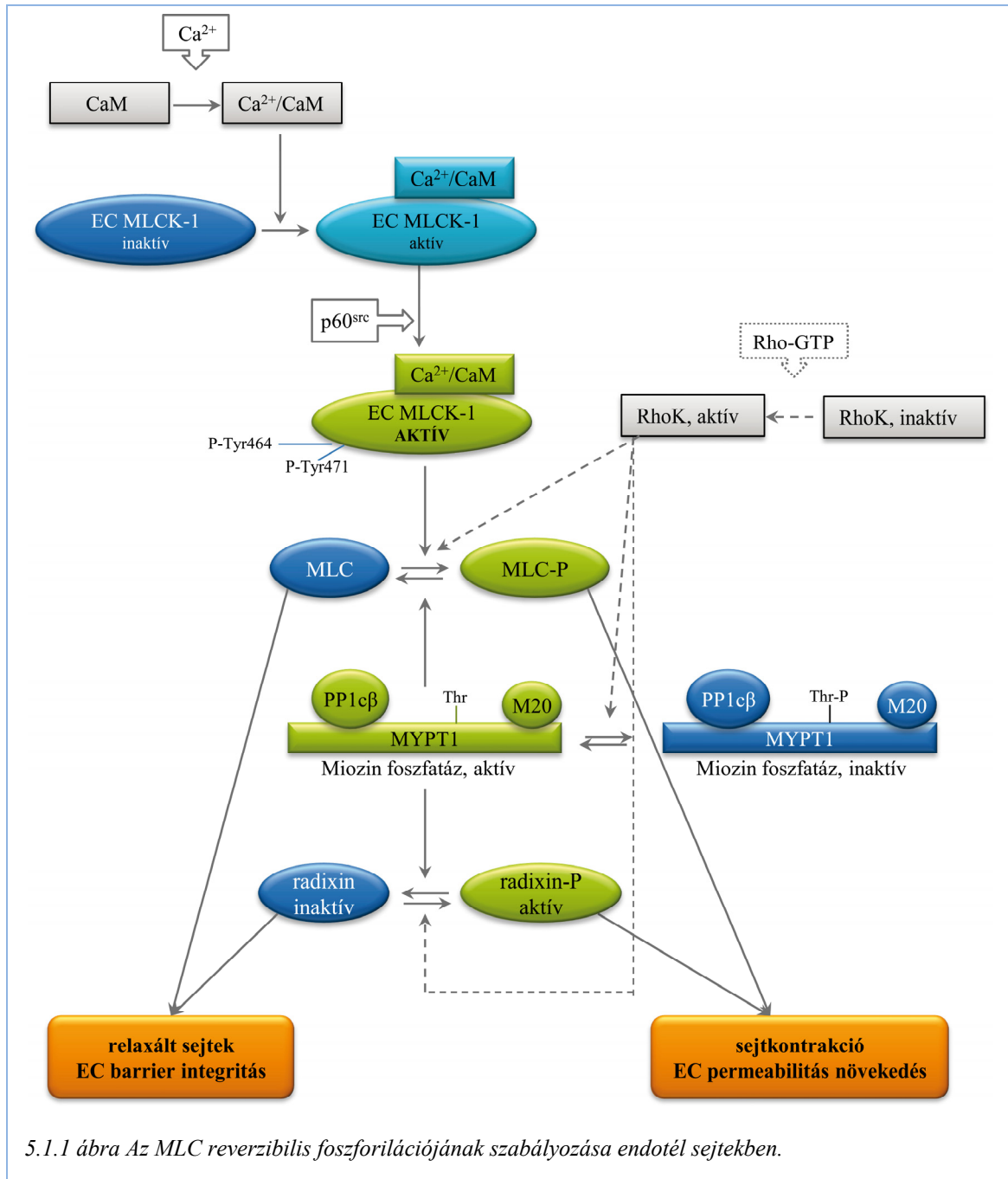
5.1 Az MLC reverzibilis foszforilációja az EC-ben

Az endotél sejtkontrakció és barrier (gát) funkció szabályozásában központi szerepet játszik az aktin-miozin kölcsönhatás és az MLC Ser19/Thr18 reverzibilis foszforilációja [74, 86]. Az MLC foszforilációját a Ca^{2+} /kaldmodulin függő MLCK katalizálja, ami aktiválódhat például trombin hatására. A trombin receptorához való kötődése a sejten belül megemeli az inozitol triszfoszfát (IP_3) szintjét, ami a Ca^{2+} koncentráció növekedéséhez, ezzel az MLCK aktiválásához, MLC foszforilációhoz vezet, aktin-miozin kölcsönhatás jön létre, a sejtek kontrahálódnak, közöttük rések jelennek meg, és az EC monolayer permeabilitása megnő. A folyamatot a miozin foszfátáz teszi reverzibilissé, ami az MLC defoszforilációjáért felelős. A trombin a miozin foszfátáz oldaláról is az MLC foszforiláció szint növekedését segíti, ugyanis a RhoA/Rho kináz útvonalat is aktiválja. A Rho kináz a miozin foszfátáz regulátor alegységét foszforilálja, ezzel gátolja az MLC defoszforilációját, ugyanakkor a MLC foszforilációját is katalizálhatja (5.1.1 ábra) [16].

Az EC MLCK szabályozásában eredményeink szerint a fehérje N-terminális, 922 aminosavból álló, csak erre a sejt típusra jellemző szakasza is részt vesz. Sejt-permeabilis diperoxovanadát alkalmazásával EC MLCK aktivitásnövekedést és az EC MLCK tirozin oldalláncon történő foszforilációját, valamint a kináz asszociációját találtuk kortaktin és p60^{Src} fehérjékkel. Ezek az eredmények összhangban vannak azokkal a korábbi megfigyelésekkel, melyek a Tyr foszforiláció és az endotél barrier közötti kapcsolatra utaltak [81, 82, 205]. *In vitro* vizsgálataink szerint az EC MLCK-1 splice variáns formája p60^{Src} által két Tyr oldalláncon (Tyr464 és Tyr471) foszforilálódott, és ez a foszforiláció az MLCK aktivitását növelte. Ez a két oldallánc az EC MLCK-1 N-terminális szakaszán található egy olyan 69 aminosavból álló részen, ami a másik, EC-ben szintén dominánsan expresszáldó, az 1-es variánssal egyébként teljesen megegyező 2-es variánsból hiányzik. Ez az eredményünk az EC-ben dominánsan expresszáldó két EC MLCK splice variáns eltérő szabályozására utal.

A Src-MLCK komplexben detektált kortaktin egy aktin-kötő fehérje, amely szintén foszforilálható a p60^{Src} kinázzal. A Src-kortaktin-MLCK komplexet a közelmúltban egy hepatóma sejt vonalon is kimutatták, ahol a sejtterfogot szabályozásában vesznek részt [206]. *In vitro* kötődési vizsgálatokkal is kimutatták a kortaktin és az EC MLCK

kölcsönhatását, amit a két fehérje p60^{Src} foszforilációja fokozott [207]. A szerzők feltételezik, hogy a kortaktin-EC MLCK kölcsönhatás a kortikális aktin szerkezet kialakulásában/átrendeződésében lehet jelentős. Ezt támasztja alá az is, hogy az EC barriert erősítő szfingozin 1-foszfát (S-1-P) kezelést követően a kortaktin és az EC MLCK a sejtp periférián ko-lokalizált [208]. Újabb eredmények szerint az EC MLCK



c-Abl kinázzal is foszforilálódik négy Tyr oldalláncon, ami szintén növeli a kináz aktivitását. A négy foszforilációs hely az endotél MLCK-ra jellemző N-terminális szakaszon van, és közülük egy, a Tyr464, megegyezik az általunk azonosított egyik Src

foszforilációs hellyel, ami csak az 1-es variánsban van jelen [209, 210]. Ebből arra következtethetünk, hogy míg a p60^{Src} kizárólag az EC MLCK-1, a c-Abl kináz mindkét EC MLCK variáns aktivitását befolyásolhatja. Ezek az újabb eredmények arra utalnak, hogy az EC MLCK sejten belüli specifikus lokalizációja és szabályozása/kölcsönható partnerei révén az endotél sejtréteg permeabilitását növelő hatása mellett a barriert erősítő folyamatokban is részt vesz.

Az MLC defoszforilációját katalizáló endotél miozin foszfatáz vizsgálata során megállapítottuk, hogy a PP1c β izoformája asszociál az EC kontraktilis fehérjéivel, a miozinnal és az aktinnal. A PP1c különböző izoformáinak kapcsolódását a MYPT1 regulátor fehérjével korábban simaizomban vizsgálták, és az izoformák nagyfokú hasonlósága [46] ellenére azt találták, hogy a miozin foszfatázban a MYPT1 kizárólag a PP1c β -hoz kötődik [83, 211], ami összhangban van a mi eredményünkkel. A PP1 specifikus gátlófehérjéjével, a PHI-1-gyel folytatott vizsgálatok is megerősítik a miozin foszfatáz részvételét endotél barrier funkció szabályozásában [212].

Eredményeink szerint az EC-ben a MYPT1 két variánsa expresszálódik és mindkettő kölcsönhat a PP1c β -val. A két variánst ugyanaz a gén kódolja, a V2 formából hiányzó 56 aminosavból álló, az exon15-nek megfelelő szakasz a fehérje középső részére esik. A hiány nem érinti az ankirin ismétlődéseket és a gátló, Thr696-os oldalláncot, sőt a PP1c kötőmotívumot sem. Mégis, a V2 forma immunprecipitációs vizsgálataink alapján valamivel kisebb mértékben kötődést mutatott a PP1c β -val, ami a két MYPT1 forma eltérő konformációjára utalhat. A MYPT1 és a PP1c β kristályszerkezeti elemzése szerint a két fehérje kölcsönhatásában a PP1c β Asn124 oldalláncának nincs kitüntetett szerepe [213], ennek ellenére a PP1c β katalitikusan inaktív N124A mutánsával a MYPT1 egyik formája sem mutatott kölcsönhatást, ami a PP1c mutáns módosult konformációjára, vagy katalitikus aktivitásának jelentőségére utalhat a MYPT1-gyel való kölcsönhatásában.

Az EC miozin foszfatáz mindkét alegységéről kimutattuk, hogy részt vesznek az EC permeabilitás szabályozásában (5.1.1 ábra). A MYPT1 N-terminális részének (1-300 aminosavak) túlermelletésével a trombin EC permeabilitást növelő hatását jelentősen mérsékelni tudtuk. Ez a MYPT1 mutáns nem tartalmazza azt a Thr696 oldalláncot, amelynek foszforilációja a miozin foszfatáz gátlását okozza, így a PP1c-vel egy folyamatosan aktív miozin foszfatáz formát képezhet. Ez az eredmény egyrészt megerősíti a miozin foszfatáz központi szerepét az EC barrier szabályozásában, másrészt a miozin foszfatáz aktivitás MYPT1-en keresztül történő szabályozását is igazolja. Az

ATP és az adenzin extracelluláris koncentrációja metabolikus stressz, vagy a sejtek sérülése következtében nő [214, 215], illetve ezzel összhangban, a tüdő gyulladása vagy traumája során a nukleotid bontó CD39 és CD73 enzimek expressziós szintje is emelkedik [216, 217]. Tüdő EC-n végzett vizsgálatok szerint az ATP és az adenzin a barrier funkciót erősíti, többek között MLC foszforiláció szint csökkenést és a miozin foszfatáz szerepére utaló eredményeket írtak le [194, 218]. Ezzel összhangban, TER vizsgálataink is alátámasztották a miozin foszfatáz részvételét az EC ATP/adenzin kezelésre adott válaszában. A PP1c β , vagy a MYPT1 hiányában ugyanis mind az ATP, mind az adenzin barrier erősítő hatása jelentősen mérséklődött, a PP1c α csendesítése viszont az adenzin hatását nem befolyásolta. Ezek az eredmények ismételt alátámasztják a PP1c β specificitását a MYPT1 iránt, valamint ezen PP1c izoforma esszenciális szerepét az EC kontraktilitás szabályozásában.

A miozin foszfatáz MYPT1 alegysége ankirin ismétlődései és C-terminális régiója révén számos fehérjével létesíthet kölcsönhatást, így az MLC-n kívül más reverzibilis foszforilációval szabályozott fehérjékhez is kötődik, és szabályozza azok foszforilációs szintjét [219]. Így például kimutatták, hogy az ERM fehérjecsaldba tartozó moezin asszociál a miozin foszfatáz regulátor alegységével MDCK sejtekben [196]. Overexpresszált fehérjékkel immunprecipitációs kísérletekben összehasonlítottuk a két MYPT1 variáns kötődését az ERM család egyes fehérjéivel, melyek közül a radixin esetében találtuk a legjelentősebb kötődést, a másik két ERM asszociációja alig, vagy nem volt detektálható. A radixin-MYPT1 kölcsönhatás a V2 forma esetében kisebb mértékűnek bizonyult. Ezek az eredmények az ERM fehérjék és a MYPT1 variánsok sejten belüli eltérő szerepére utalnak. Az ERM fehérjék aktív konformációjukat konzervált Thr oldalláncuk foszforilációjával érik el, amit a Rho kináz katalizálhat [220]. Így a Rho kináz az MLC, az ERM és a MYPT1 fehérjék foszforilációjával egyaránt a sejtkontrakciót és az ezzel együttjáró permeabilitás növekedést segíti elő, míg a miozin foszfatáz az MLC és -eredményeink szerint feltehetően- az ERM fehérjék defoszforilációjával az EC barrier integritás fenntartását/helyreállítását biztosíthatja (5.1.1 ábra).

5.2 A protein foszfatáz 2A szerepe az endotél barrier szabályozásában

Az endotél permeabilitás szabályozásában a miozin foszfatáz mellett a PP2A is részt vehet. Egyrészt más sejtípusokban végzett vizsgálatok igazolták a PP2A és a

citoszkeleton fehérjei közötti kapcsolatot [105, 107, 108, 112, 113], másrészt az endotél sejtek esetében is születtek olyan eredmények, amelyek a PP2A szerepére utaltak az EC citoszkeleton szerkezetének szabályozásában [85, 116, 117]. Kezdeti vizsgálataink során a PP2A specifikus gátlása következtében nem találtunk szembetűnő változást az EC F-aktin és mikrotubulus szerkezetében. Ha a tenyésztő folyadékban még optimális, de alacsonyabb szérum koncentrációt alkalmaztunk (20 helyett 10%), a PP2A specifikus gátlása a sejtek kontrakcióját, az F-aktin és a mikrotubulusok átrendeződését váltotta ki.

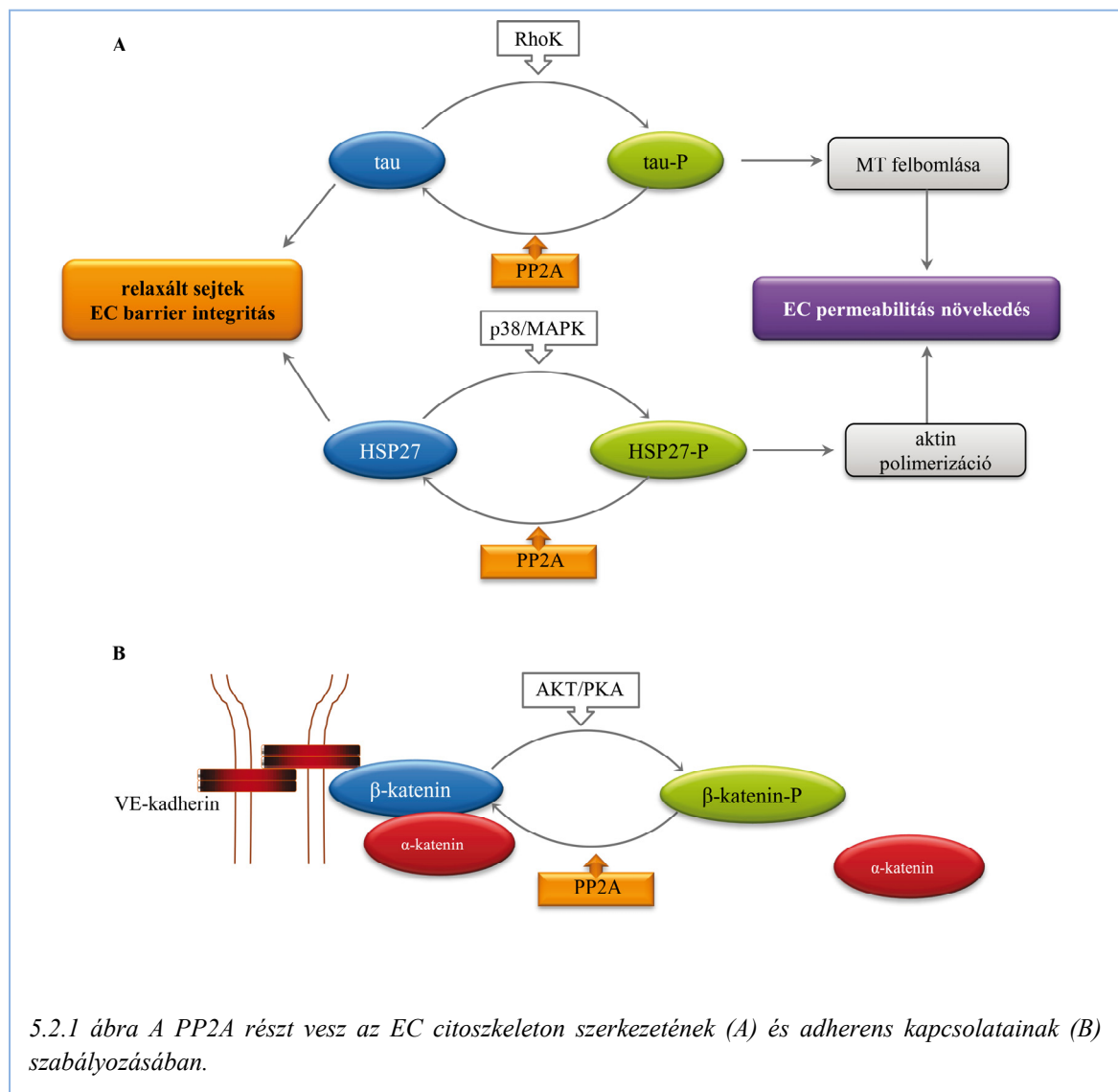
HPAEC immunfestése a PP2A és a mikrotubulusok kolokalizációját mutatta, valamint a mikrotubulusok és a PP2A közötti asszociációt, amit korábban endotél és epitel sejtekben is leírtak [112, 116], sikerült sejtfractionálással is igazolnunk. A mikrotubulusok felbomlása együtt jár az MLC foszforilációs szintjének és az F-aktin mennyiségének emelkedésével [14], vagyis a sejtkontrakció/barrier diszfunkció és a mikrotubulusok stabilitása korrelálnak. Okadánsavval, a PP2A gátlószerével előkezelt EC érzékenyebben reagált a mikrotubulusokat feloldó nokodazol kezelésre (nincs dokumentálva) TER mérések során, ami alapján arra következtettünk, hogy a PP2A a mikrotubulusok stabilitását biztosítja és ezzel az endotél barrier/gát funkció fenntartását segíti elő.

A PP2A-t aktiváló jelátviteli pályákról kevés információ áll rendelkezésre. Ke és mtsai [221] például a Pak1 (P21-activated kinase-1) hatását vizsgálták trombin indukált EC barrier diszfunkcióban, és kimutatták, hogy az aktív Pak1 a barrier diszfunkciót a PP2A aktivitás fokozásával gátolja. Transziens emlős és adenovírus expressziós rendszerrel over-expresszáva a PP2A-t különböző módszerek (immunfluoreszcencia és TER mérések) alkalmazásával is igazoltuk a PP2A aktív szerepét az EC citoszkeleton szerkezetének és barrier funkciójának fenntartásában.

A B regulátor család tagjai közül a sejtekben általánosan előforduló B α izoformát vizsgáltuk. A B α alegység csendesítése után humán és marha tüdő artéria EC immunfluoreszcens és TER vizsgálatai fenti eredményeinkkel összhangban ugyancsak a PP2A részvételét igazolták az EC citoszkeleton és barrier szabályozásában. Az alegység hiányában az F-aktin mennyisége nőtt a sejtekben, és a trombin kezelésre is érzékenyebben reagáltak, ami arra utal, hogy az AB α C holoenzim forma játszik szerepet a citoskeletonális szubsztrátok defoszforilációjában.

Reverzibilis foszforilációval szabályozott fehérjék, a mikrotubulusokhoz asszociálódó tau, valamint az aktin polimerizációban szerepet játszó HSP27

kölcsönhatását vizsgáltuk a PP2A-val. A defoszforilált tau elősegíti a mikrotubulusok kialakulását és stabilizálja is azokat. A tau foszforilációjában több kináz szerepét is leírták, aminek fontosságát az jelzi, hogy a foszforiláció csökkenti a fehérje mikrotubulusokhoz való kötődési és stabilizáló képességét [111, 222-224]. A HSP27 a stressz-aktivált p38 MAP kináz kaszkád egyik terminális szubsztrátja [225], ami foszforilált formájában elősegíti az aktin polimerizációt [117, 226]. Tüdő artéria EC vizsgálatával közvetlen kapcsolatot találtak a p38 MAPK aktiváció és a mikrotubulusok átrendeződése, valamint az EC barrier szabályozás között [227].



EC frakcionálás során mindkét fehérjét a PP2A-val azonos, a tubulinban gazdag frakcióban találtuk. Sejtkontrakciót kiváltó kezelések (nokodazol és trombin) következtében mindkét fehérje foszforilációs szintje megnőtt, azonban a PP2A-t overexpresszáló sejtekben a kezelés ellenére megőrzött maradt a citoszkeleton szerkezete,

miközben a tau és a HSP27 foszforilációs szintje is alacsony maradt. Ebből arra következtethetünk, hogy a PP2A a tau defoszforilációjával elősegíti a mikrotubulusok stabilitását, másrészt a HSP27 defoszforilációjával mérsékli az F-aktin kialakulását, azaz mindkét folyamat által az EC barrier fenntartását segíti (5.2.1 ábra, A). Újabb eredmények neuroendokrin PC12 sejtek citoszkeleton szerkezetének átrendeződésében a tau és a HSP27 foszforilációját, valamint a p38 MAPK és PP2A szerepét támasztják alá [228]. Annak eldöntésére, hogy a PP2A közvetlenül, vagy közvetve szabályozza a két fehérje defoszforilációját, további vizsgálatokra van szükség. A PP2A nagyszámú B regulátor alegysége révén változatos holoenzim formában fordul elő a sejtekben, ezért számos fehérje partnere között a tau és a HSP27 fehérjéken túl még további, az EC citoszkeleton és permeabilitást befolyásoló fehérje szubsztrátja lehet.

A $B\alpha$ alegység és ezzel együtt a PP2A, eredményeink szerint az EC adherens kapcsolatok szabályozásában is részt vesz. A PP2A specifikus gátlása és a $B\alpha$ csendesítése egyaránt az EC adherens sejtkapcsoló fehérjéinek lokalizáció változását váltotta ki, jelezve a sejtkapcsoló struktúrák felbomlását. Hasonlóan, humán keratinociták okadánsavas kezelését követően Serres és mtsai [229] az E-kadherin, Beckers és mtsai [230] HUVEC trombin kezelése után pedig a β -katenin transzlokációját találták a membránból a citoplazmába. Ezek a kezelések a citoszkeletont módosítják, a sejtek összehúzódnak, ami magyarázhatja a sejtkapcsoló struktúrák felbomlását.

A két vizsgált sejtkapcsoló fehérje kölcsönhatását számos oldalláncuk (Ser/Thr és Tyr) foszforilációja befolyásolja, melyek gátolják vagy stabilizálják kötődésüket [23, 122]. Ezért feltételezhető, hogy a sejtkapcsoló struktúrák felbomlása is a protein kináz és foszfatáz aktivitások eltolódott egyensúlyával, a VE-kadherin és/vagy a β -katenin megváltozott foszforilációs szintjével indokolható. Ezt a feltételezést támasztja alá az a korábbi eredmény is, ami a PP2A aktivitás jelentőségére hívja fel a figyelmet az E-kadherin/ β -katenin kölcsönhatás stabilizálásában [231]. Pull-down módszerrel fehérjekölcsönhatást mutattunk ki a rekombináns $B\alpha$ és az EC VE-kadherin, illetve a β -katenin között. Továbbá a β -katenin Ser552 oldallánc foszforilációja az EC PP2A gátlószerezrel való kezelése vagy a $B\alpha$ csendesítést követően jelentősen, az alacsony kontroll érték többszörösére nőtt. A Ser552 foszforilációja és a β -katenin adherens sejtkapcsolatokban való jelenléte közötti kapcsolatot mások is leírták karcinoma és simaizom sejteken [126, 232]. A PP2A gátlás/ $B\alpha$ csendesítés után a β -katenin foszforilált formáját döntően a citoplazmában detektáltuk. Ebből arra következtettünk, hogy a PP2A

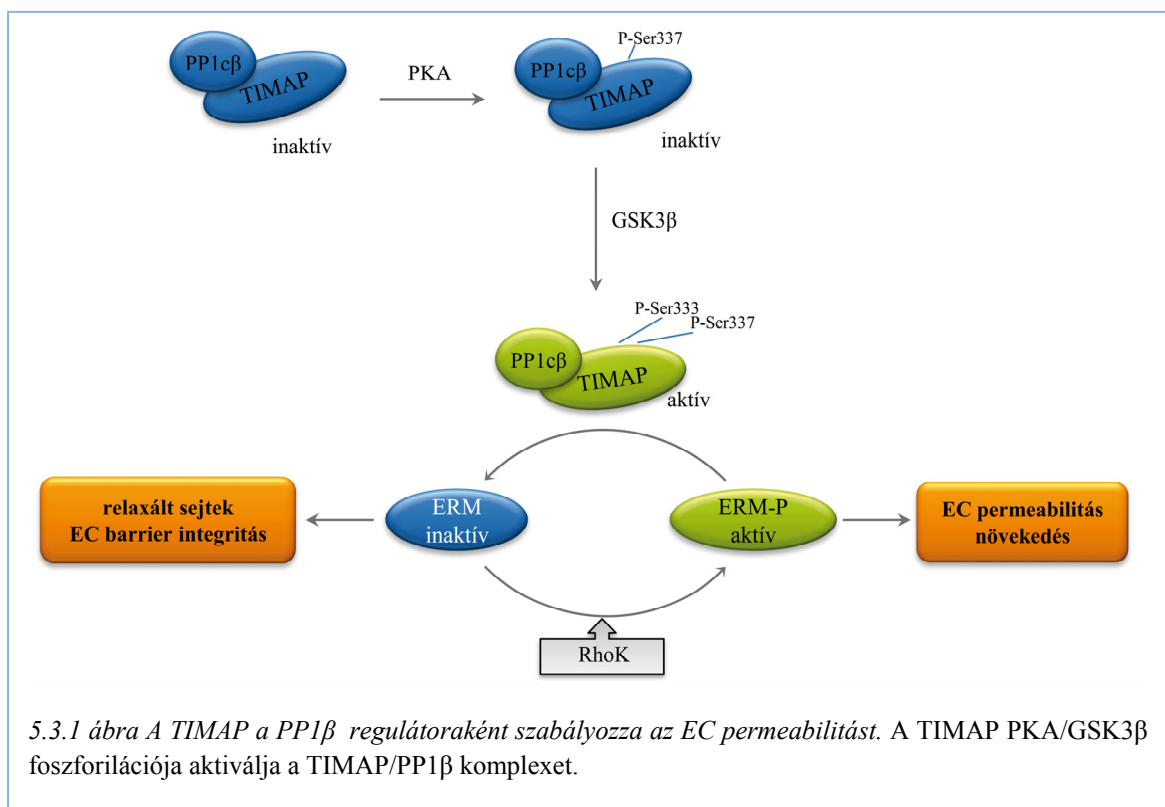
a β -katenin Ser552 oldalláncának defoszforilációjával részt vehet az EC adherens sejtkapcsolatok fenntartásában, ezzel is hozzájárulva a jól működő endotél barrierhez (5.2.1 ábra, B). Az agyban az EC integritásában a PP2A aktivitás jelentőségét egy másik munkacsoport közlése [233] is igazolja.

5.3 A TIMAP fehérje az EC barrier fenntartását segíti

A közelmúltban azonosított TIMAP fehérje expressziós szintje az endotél sejtekben más sejttípusokhoz hasonlítva magas [100], ám az endotél sejtekben betöltött fiziológiai funkciója és kölcsönható fehérje partnerei tekintetében ismereteink nagyon hiányosak. A fehérjét azonosító munkacsoport a TIMAP MYPT1-gyel mutatott szerkezeti hasonlósága alapján feltételezte, hogy a PP1c regulátora lehet, amit később overexpresszált TIMAP immunprecipitációjával igazoltak [101]. Ezt endogén fehérjékkel mi is megerősítettük, továbbá kimutattuk, hogy a MYPT1-hez hasonlóan a TIMAP a PP1c β -val van kölcsönhatásban, a PP1 α izoformához viszont nem kötődik. A kölcsönhatás erősségét és kinetikáját felületi plazmon rezonancián alapuló kötődési vizsgálatokkal is megvizsgáltuk, a kötődés erősségét jellemző asszociációs állandó értéke, $K_a = 1,8 \times 10^6$, a TIMAP és a PP1c β specifikus kölcsönhatását igazolja. A TIMAP PKA és GSK3 β kinázokkal foszforilálható [197, 198]. A PKA a TIMAP Ser337-es oldalláncát foszforilálja, és ezt az előfoszforilációt követi a Ser333 GSK3 β általi foszforilációja [198]. A TIMAP PKA-val, vagy PKA-val majd GSK3 β -val *in vitro* foszforilált formái és a PP1c β kötődésének erőssége a nem foszforilált TIMAP-hoz viszonyítva nem változott, és immunprecipitációs vizsgálataink szerint az EC különböző bioaktív ágensekkel való kezelése sem befolyásolták a kölcsönhatást. Ezért úgy gondoljuk, hogy a TIMAP a sejten belül a PP1c β -val alkotott komplexben lehet jelen, és szabályozza annak aktivitását. Foszfomoezin szubsztráttal végzett *in vitro* foszfatáz aktivitás méréseink során a TIMAP/PP1c β csak akkor volt aktív, ha a TIMAP-ot előzetesen PKA-val, majd GSK3 β -val is foszforiláltuk, egyébként a TIMAP gátló hatását tapasztaltuk (5.3.1 ábra). Shopik és mtsai [234] a MYPT1-PP1c β kristályszerkezetére alapozva [213] modellezték a PP1c β és a TIMAP N-terminális részének (51-322 aminosavak) kölcsönhatását. A modellezéshez használt TIMAP szekvencia a két foszforilálható Ser (333 és 337) oldalláncot nem tartalmazza, így azok PP1c β -hoz viszonyított elhelyezkedéséről a modell nem ad felvilágosítást.

TIMAP csendesített EC vizsgálatával kimutattuk, hogy a TIMAP az EC barrier fenntartását elősegíti. TER méréseink szerint ugyanis a csendesített sejtek érzékenyebben reagáltak az EC permeabilitást növelő ágensekre (trombin és nokodazol), míg a barrier erősítő szerek (ATP és S-1-P) hatása mérséklődött a kontrollhoz viszonyítva. A TIMAP barrier erősítő hatását az EC lipopoliszacharid indukálta diszfunkciójának vizsgálatával is megerősítették [235].

Tüdő artéria EC-ben a TIMAP-ot immunfluoreszcenciával elsősorban a sejtmagban és annak közelében a citoplazmában, valamint a plazmamembránban detektáltuk, ezt a megoszlást sejtfractionálást követő Western blottal is megerősítettük. A plazmamembránban lokalizálódó TIMAP mennyisége a barrier funkciót erősítő S-1-P [236] kezelést követően megemelkedett (az értekezésben nincs dokumentálva). Ezért arra következtettünk, hogy a TIMAP/PP1 β komplex szubsztátjai, melyek részt vesznek az EC barrier funkciójában, szintén a sejtmembránban vagy annak közelében lehetnek. Ezért tanulmányoztuk a TIMAP kölcsönhatását az ERM fehérjékkel, melyek kapcsoló funkciója a plazmamembrán fehérjei és az aktinszálak között reverzibilis foszforilációval szabályozott és szerepük lehet a sejtadhézióban, a mikrovillusok kialakulásában és a sejtmozgásban [175, 237]. Kimutattuk a TIMAP és a moezin/foszfo-moezin ko-lokalizációját, és a fehérjék kölcsönhatását immunprecipitációval is megerősítettük.



Az EC barriert gyengítő trombin kezelést követően a kontraháló EC-ben immunfluoreszcens festéssel a foszfo-ERM szint emelkedését láttuk, elsősorban a sejtmembránban és a filopódiumokban. A cAMP-t endotél barriert stabilizáló ágensként jellemezték [238, 239]. Forskolin előkezelés, a cAMP/PKA útvonal aktiválása, a trombin ERM foszforilációra gyakorolt hatását teljesen kivédte, és a sejtek relaxált állapotban maradtak. Ebből arra következtethetünk, hogy a PKA aktiválás következtében előfoszforilált TIMAP-ot a GSK3 β is foszforilálta, és az aktiválódott TIMAP/PP1c β komplex lehet felelős azért, hogy az ERM foszforilációs szintje nem emelkedett (5.3.1 ábra). Következtetésünk helyességét igazolta, hogy a GSK3 β specifikus gátlószere, illetve a TIMAP csendesítése a forskolin trombinnal szembeni védő hatását szignifikánsan mérsékelte, illetve megszüntette. Mindezek arra utalnak, hogy az ERM fehérjék foszforilációs szintjének szabályozása része lehet a TIMAP barriert védő/erősítő funkciójának.

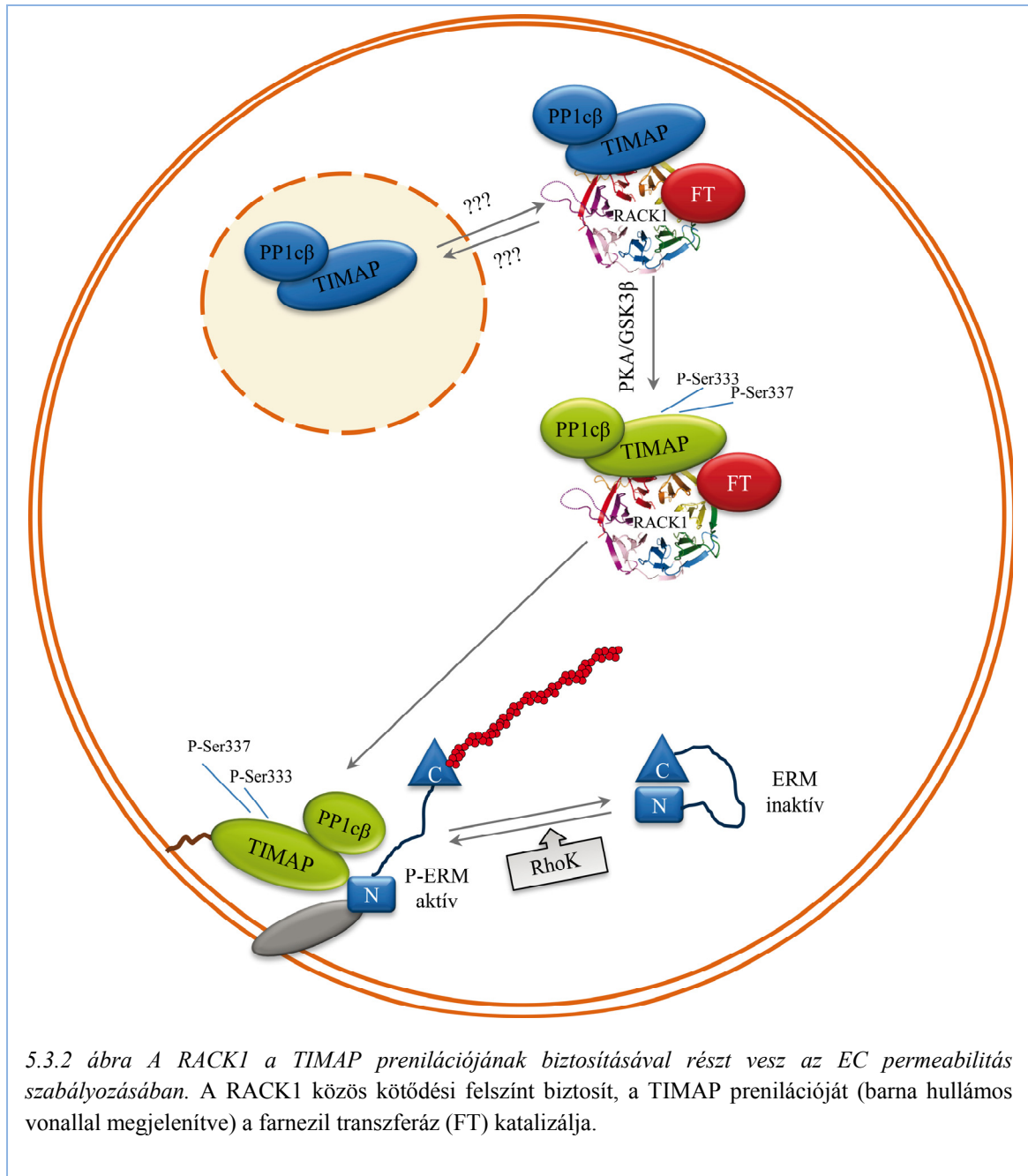
A MYPT1/miozin foszfatáz ugyancsak kölcsönhat az ERM fehérjékkel. A két foszfatáz holoenzim forma között sejtspecifikus, sejten belüli lokalizációbeli, vagy az egyes ERM fehérjékre specializálódott munkamegosztás is elképzelhető, de ennek tisztázása további szisztematikus kísérletes munkát igényel.

Jelenleg a TIMAP/PP1c β más, lehetséges szubsztrátjairól keveset tudunk. A LAMR1 laminin receptor egy foszforilálható fehérje, amiről leírták, hogy a TIMAP kölcsönható partnere, továbbá feltételezték, hogy a TIMAP/PP1c szubsztrátja [101]. *In vitro* foszfatáz mérésekre alapozva azonban ugyanaz a munkacsoport legfrissebb munkájában ezt a lehetőséget elvetette, és helyette az MLC-t javasolják szubsztrátként [234]. Továbbá a TIMAP foszforilációjának jelentőségét a foszfatáz aktivitás szabályozásában a foszfo-TIMAP formákat utánzó baktériumban termeltetett mutánsokra alapozott *in vitro*, foszforiláz *a* szubsztráttal folytatott méréseik alapján kizárták, és foszfo-LAMR1 szubsztráttal nem is vizsgálták. Valószínűnek tartjuk, hogy a mutánsokban a savas oldalláncok karboxil csoportjai a natív foszfo-TIMAP viselkedését kevésbé utánozhatták. A mi esetünkben a forskolin kezelés az EC endogén fehérjéit aktiválva válthatta ki a TIMAP foszforilációját és feltehetően konformációjának módosulását. A kötődési és *in vitro* aktivitásmérési vizsgálatainkhoz szintén ténylegesen foszforilált TIMAP formákat használtunk, igaz, az esetleges defoszforiláció elkerülésére tiofoszfát csoportot építettünk be. Ennek ellenére az *in vitro* és a sejtekkel végzett kísérleteink eredményei összhangban vannak. A MYPT családban a TIMAP-hoz

leginkább hasonlító MYPT3 esetében a homológ PKA foszforilációs hely foszforilációja után ugyancsak a MYPT3/PP1c aktiválódását írták le, amit a MYPT3 feltételezhető konformáció változásával magyaráztak [197].

A TIMAP funkciójának további felderítésére végzett vizsgálataink során új kölcsönható partnereként azonosítottuk a RACK1 fehérjét, ami hét WD-domén ismétlődést tartalmazó állványfehérje. A RACK1 kölcsönható fehérjepartnerei esetében a kötődést biztosító közös szerkezeti elemet, motívumot nem írtak le. A fehérjepartnerek kölcsönható doménjei változatosak, lehet Src homológ (SH2), C2, V5 vagy PDZ domén is [129, 130, 135, 240], de akár több domén együttes jelenléte is feltétele lehet a kölcsönhatásnak [241]. A TIMAP esetében a RACK1 az N-terminális nukleáris lokalizáció szignál körüli régióhoz kötődik, de a fehérje C-terminális felében (291-563 aminosavak) is van(nak) az asszociáció kialakulásához fontos szerkezeti rész(ek). Figyelemre méltó, hogy a PKA/GSK3 β foszforilációs helyek is a TIMAP C-terminális felén találhatóak. A foszforilációs helyeken mutált, rövidített TIMAP formák közül a foszforilációt utánzó mutánsok kötődése az adaptorhoz gyengébb volt. A RACK1 oldaláról a WD1-3 doménekre szűkítettük a fehérje kötődésben szerepet játszó lényeges részét. A WD4 domént azért zártuk ki, mert mindkét vizsgált mutánsunkban jelen volt, melyek közül az egyik nem kötődött a TIMAP-hoz. A PP1 gátló fehérjéje, a CPI17, valamint a PP2A A és C alegységekből álló dimer formájáról is ismert, hogy kötődnek a RACK1-hez [201, 242, 243]. A PP2A esetében nem tisztázott, hogy mindkét alegység kötődik-e a RACK1-hez. Bár a TIMAP-RACK1 komplexekben a PP1c β -t is detektáltuk, a PP1c β és a RACK1 között közvetlen kölcsönhatást nem találtunk.

A RACK1 fehérje-kölcsönhatásait ugyan a PKC befolyásolhatja [138], azonban a TIMAP-RACK1 kölcsönhatásra EC-ben a PKC aktiválása nem volt hatással. A cAMP/PKA aktiválása után a PKA, majd GSK3 β által foszforilált TIMAP sejten belüli lokalizációja megváltozott, a sejtmagból kiürült, a plazmamembránban viszont feldúsult, ami összhangban van a TIMAP és a cAMP EC barriert védő hatásával. A RACK1 lokalizációja nem változott, és ennek megfelelően a TIMAP-RACK1 komplex mennyisége lecsökkent. Neuronokban a PKA aktiválás hatására a Fyn kináz ugyancsak leválik a RACK1-ről, és foszforilálja az NMDA (N-metil-D-aszpartát) receptort [146]. Másféle sejtvonalakban viszont forskolinnal kiváltott PKA aktiválás következtében a RACK1 a sejtmagba transzlokálódott [145].



RACK1 csendesített EC plazmamembránjában a TIMAP nincs jelen, amiből arra következtethetünk, hogy a RACK1 hiányában a TIMAP prenilációja nem történik meg. A TIMAP C-terminálisán a CAAX box prenilációját a farnezil transferáz katalizálja [100], amelyről kimutattuk, hogy EC-ben a RACK1 N-terminális feléhez kötődik, hasonlóan a TIMAP-hoz. A RACK1 jelenlétének szükségessége a farnezil transferáz és a TIMAP közötti kölcsönhatáshoz azzal magyarázható, hogy az adaptor RACK1 biztosíthat egymáshoz közeli kötődési felszín az enzim és szubsztrátja számára. A RACK1 a TIMAP prenilációjának és ezzel membrán-lokalizációjának biztosításával az EC barrier integritás kialakulásának/fenntartásának fontos eleme lehet. Ezt támasztja alá, hogy

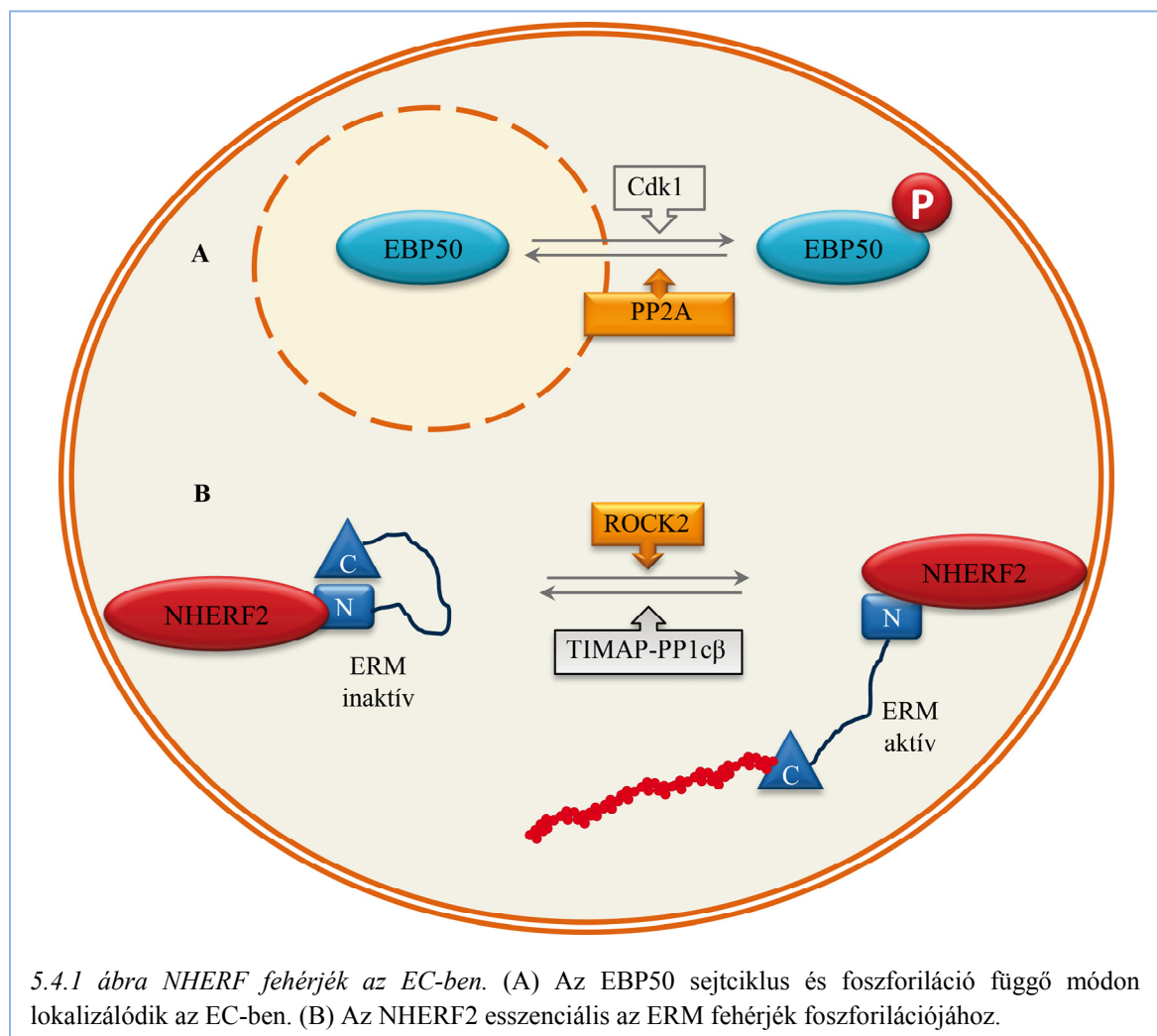
RACK1 csendesített EC esetében a barrier kialakulás lassulását és a barrier funkció mérsékelt működését detektáltuk. A RACK1 szerepét leírták a sejtadhézióban [244], valamint azt is kimutatták, hogy RACK1 csendesített karcinoma sejtek migrációja és kitapadása csökkent, proliferációja gátlódott [245]. Ezen kívül a RACK1-et az EC adherens kapcsolatok kialakulásában is fontosnak tartják [246]. Eredményeink alapján feltételezzük, hogy a RACK1-hoz kötődő TIMAP/PP1c β komplexben a TIMAP foszforilációja annak olyan konformáció változását indukálja, amelynek révén a farnezil transzferáz számára a CAAX box elérhetővé válik, és lejátszódik a TIMAP prenilációja. A módosított TIMAP ezután a PP1c β -val együtt a plazmamembránhoz transzlokálódik, ahol a barrier integritásának fenntartásáért felelős szubsztrátjait, például az ERM fehérjéket defoszforilálhatja. A TIMAP magból való kiürülését magyarázhatjuk azzal, hogy a prenilált TIMAP/PP1c β távozásával a RACK1 felszínén felszabaduló kötőhelyen a TIMAP/PP1c β a magból folyamatosan pótlódhat (5.3.2 ábra). Azonban a TIMAP magi importjának/exportjának részleteit még nem ismerjük, és az EC sejtmagjában található TIMAP/PP1c β esetleges funkcióját/szubsztrátjait sem vizsgáltuk még. A TIMAP további kölcsönható partnereit keresve egy olyan fehérjét azonosítottunk, amelyről feltételezzük, hogy szerepe lehet a TIMAP nukleáris exportjában, de ennek bizonyítása még folyamatban van.

5.4 NHERF fehérjék az EC-ben

Az NHERF fehérjecsald tagjait az epitél NHE3 Na⁺/H⁺-cserélő regulátoraiként jellemezték. Az NHERF1/EBP50 és az NHERF2 C-terminális ERM-kötő doménjük révén kölcsönhatásba léphetnek az ERM fehérjékkel [151, 172, 247], ezért az az elfogadott nézet, hogy citoskeleton-ERM-plazmamembrán fehérje komplexekben az ERM és membránfehérjék közötti adaptorként funkcionálhatnak [171].

EC-ben az EBP50 sejtciklus függő lokalizációját detektáltuk. Interfázisban, az epitél sejtektől eltérően az EBP50 a magban van, a mitózis során viszont a citoplazmában jelenik meg. A meglepő magi lokalizációt többféle módszerrel és más endotél sejtvonalon is megerősítettük. Az endotél EBP50 elsődleges szerkezete nem tér el az adatbázisban fellelhető EBP50 (NM_001077852) szekvenciájától, ezért az EBP50 különböző lokalizációja az endotél és epitél sejtekben feltehetően eltérő fehérje partnereivel függhet össze, ami a két sejttypusban más-más funkciót is sejtet. Korábban az EBP50 magi lokalizációját kizárólag néhány daganatos sejtvonalon tapasztalták [248, 249]. A

sejtmaghártya a mitózisban a profázisból a prometáfázisba való átmenet során esik szét [250]. Az EBP50-et azonban már a profázis korai szakaszában a citoplazmában láttuk, ezért nem tartjuk valószínűnek, hogy a lokalizáció változását csupán a sejtmaghártya eltűnése magyarázná. A mitózis során tapasztalt transzlokáció összefügg a fehérje foszforilációjával (5.4.1 ábra, A). A Cdk1 két Ser oldalláncot foszforilál az EBP50-en a mitózis kezdeti szakaszában [169]. Ezt közvetett módon bizonyítottuk, a G2/M fázisban blokkolt EC lizátumában az EBP50 SDS-PAGE/Western blot során detektált látszólagos molekulatömege megnőtt, ami a fehérjébe beépült foszfátcsoportok jelenlétével indokolható [169]. A lokalizáció változása és az EBP50 foszforilációja közötti összefüggést támasztja alá az is, hogy a foszforilációt utánozó EBP50 mutáns (S288D:S310D) az EC citoplazmájában lokalizálódott.



Az EBP50 foszforilációját leíró munkacsoport javaslata szerint a defoszforilációt a PP1 és PP2A foszfatázok katalizálhatják HeLa sejtekben [169]. Specifikus gátlószerek alkalmazásával a PP2A részvételét valószínűsítettük, a PP1 lehetséges szerepét azonban

kizártuk. Immunprecipitáció és pull-down módszerekkel az A β C összetételű PP2A holoenzim és az EBP50 kötődését mutattuk ki. Továbbá a PP2Ac és az EBP50 ko-lokalizációja a mitotikus sejtekben szintén alátámasztja, hogy az EBP50-et a PP2A defoszforilálhatja. A Cdk1 szubsztrátjainak defoszforilációját PP1 és PP2A foszfatázokkal a mitózisból való kilépés feltételeként írták le [251-253]. A PP2A és az EBP50 legnagyobb mértékű ko-lokalizációját a metafázisból a citokinézisbe való átmenet során tapasztaltuk és interfázisú sejtekben sem ko-lokalizációt, sem foszforilált EBP50-et nem detektáltunk (látszólagos molekulatömeg alapján), ezért úgy gondoljuk, hogy az EBP50 PP2A általi defoszforilációja szintén szükséges lehet ahhoz, hogy a sejtek kilépjenek a mitózisból. Eredményeink tehát arra utalnak, hogy az EBP50 az EC sejtciklus és proliferáció szabályozásában játszik fontos szerepet.

Az EBP50 szekvenciájában a PDZ és ERM-kötő doménekben számos génmutációt azonosítottak humán emlő tumoros sejtvonalakban [254]. A mutáns EBP50 formák fehérje-fehérje kölcsönhatása az emlő tumor szupresszorként ismert SYK (spleen tyrosine kinase) és a merlin (az ERM családdal rokon, neurofibromatosis 2 tumor szupresszor) fehérjékkel jelentősen csökkent, illetve megszűnt. Ez egyrészt arra utal, hogy az EBP50 maga is egy tumor szupresszor lehet, másrészt a SYK és a merlin szupresszor funkciójával hozható összefüggésbe. További vizsgálatokkal kimutatták, hogy EBP50 csendesített emlő tumoros sejtekben megemelkedett a sejtproliferáció szintje, alátámasztva az EBP50 tumor szupresszor szerepét [255]. Mindezeket összevetve saját eredményeinkkel felmerülhet annak lehetősége, hogy a daganatos sejtek osztódásában az EBP50 foszforilációja is módosulhat. Jelenleg keressük az EBP50 kölcsönható partnereit a sejtmagban és a citoplazmában, valamint vizsgáljuk, hogy a lokalizáció változás elősegíti-e fehérje partnerei transzlokációját.

Az EBP50 ERM-kötő motívuma alapján kézenfekvőnek tűnt az ERM fehérjékkel való kölcsönhatás vizsgálata. Ez azonban az EBP50 tekintetében zsákutcának bizonyult, mivel tüdő artéria EC-ben az ERM fehérjék preferált NHERF partnere az NHERF2. Más endotél sejttypusban (HUVEC) mások szerint az NHERF2 expressziós szintje az EBP50-hez hasonlítva jelentősen magasabb [159]. Ezt a különbséget azonban mi sem a HUVEC, sem a tüdő artéria EC-n nem tapasztaltuk szemi-kvantitatív RT-PCR vizsgálattal (az értekezésben nincs dokumentálva), ezért az EBP50 és az NHERF2 között talált eltérés az ERM fehérjékkel való kölcsönhatásban ezzel nem indokolható. Valószínűbbnek tartjuk, hogy a két NHERF fehérje funkciója az EC-ben eltérő, és ebből adódóan különböző

fehérjékhez kötődnek. Ezt sugallja az is, hogy az NHERF2 csendesítése után az EBP50 expressziós szintjében nem találtunk változást az EC-ben. Sejt és szövetspecifikus megjelenésüket és fiziológiai szerepüket több korábbi munka igazolja [156, 173].

Az NHERF2 adaptor fehérje az NHE3 szabályozásán túl más fehérjékkel, mint például az LPA2 receptor [256], β -katenin [257] vagy az EPI64 mikrovillus fehérje [258], mutatott kölcsönhatása révén számos sejtfolyamatban vehet részt. Az ERM-NHERF2 kölcsönhatásnak az EC-ben az ERM foszforilációjában van jelentősége (5.4.1 ábra, B). Bizonyítottuk, hogy az NHERF2 az ERM aktiválásához elengedhetetlen, amit eredményeinkre alapozva azzal indokolhatunk, hogy az adaptor biztosítja az ERM és a foszforilációt katalizáló ROCK2 közötti kölcsönhatást, hiszen a ROCK2 immunprecipitátumában az ERM kizárólag akkor volt kimutatható, ha az NHERF2 is jelen volt az EC-ben, NHERF2 depletált mintákban azonban nem. Az ERM közvetlenül kapcsolódhat az NHERF2 C-terminális ERM kötő doménjéhez. A kináz és az NHERF2 közötti kölcsönhatás sem feltétlenül indirekt, ugyanis a ROCK2 szerkezetében található egy PH (pleckstrin-homology) domén [259], ami kötődhet az NHERF2 PDZ doménjeihez [260], de ennek megerősítése további vizsgálatokat igényel.

Az NHERF2 ERM foszforilációra gyakorolt hatásán keresztül szabályozhatja az EC citoskeletonjának átrendeződését. Az NHERF2 csendesítése vagy overexpressziója a filopódiumok kialakulását ellentétesen befolyásolta, a depletált sejteken nem, vagy alig láttunk filopódiumokat, az adaptor fehérjét túltermelő EC-n pedig a filopódiumok száma a kontrollhoz képest megnőtt. Ez TER méréseink szerint az EC barrier kialakulását, a sejtek adhéziós és migrációs képességét is befolyásolta, amiben ismert az ERM fehérjék részvétele [261, 262]. HeLa sejteket vizsgálva Gandy és mtsai szintén kapcsolatot találtak a filopódiumok kialakulása és az ERM foszforilációja között [263]. Egy másik munkacsoport egy mutáns PDZ domént tartalmazó NHERF2-t expresszáló fibrosarcoma sejtvonal csökkent lamellopódium képződési és migrációs képességét detektálta [257].

Az előzőekkel összhangban az NHERF2 az angiogenesis szabályozásában is részt vesz. Kontroll EC néhány óra alatt sejthálózatokat, csövecskéket hozott létre Matrigelen (bazális membránkivonat), miközben az ERM foszforiláció emelkedését detektáltuk. Az NHERF2 csendesített sejtek viszont aggregátumokban gyűltek össze, és az ERM foszforilációs szintje sem emelkedett, ami azt bizonyítja, hogy az NHERF2 hiányában a sejtek nem képesek az angiogenesisre. Májsejtes karcinoma sejtek (HCC) invazív jellege és az ezrin hiperfoszforilációja között korrelációt találtak, továbbá, ha a ROCK gátlásával

csökkentették az ezrin foszforilációját, az blokkolta a HCC invazivitását [264]. Ezért lehetségesnek tartjuk, hogy az NHERF2 az ERM foszforiláció modulátoraként befolyásolhatja a daganatos sejtek invazív tulajdonságát.

Eredményeink szerint az EBP50 és az NHERF2 funkciója és kölcsönható partnerei az endotél sejtekben eltérőek. Az EBP50 a sejtciklus szabályozásában játszik szerepet. Az NHERF2 az ERM fehérjék preferált kölcsönható partnere, biztosítja azok foszforilációját és ezzel a plazmamembrán-ERM-aktin kölcsönhatást.

5.5 Az eredmények lehetséges hasznosítása

Munkánk alapkutatási jellegéből fakadóan eredményeink közvetlen klinikai hasznosításra nem alkalmasak. A protein kinázok és foszfatázok működésének célzott befolyásolását ma már számos betegség gyógyításában felhasználják, illetve intenzív kutatások folynak új, specifikus aktivátoraik és gátlószereik felismerésére és terápiás céllal történő alkalmazására [265-267]. A munkát nehezítik a kináz és foszfatáz családokon belüli hasonlóságok az egyes enzimek között, ezért az egyes sejt folyamatok szabályozásában résztvevő konkrét kináz vagy foszfatáz enzimek típusának, izoformájának és kölcsönható fehérjepartnereinek azonosítása rendkívül fontos. Eredményeink ebben a tekintetben bírhatnak jelentőséggel. Az általunk vizsgált protein kinázok és foszfatázok, valamint kölcsönható fehérje partnereik a tüdő artéria EC esszenciális élettani funkciója, az érpermeabilitás sokoldalú, több jelátviteli pályán keresztül megvalósuló szabályozásának meghatározó résztvevői. Az EC kontrahált/relaxált állapotát, az aktin-miozin kölcsönhatást befolyásoló MLC foszforilációhoz kapcsolódóan az EC MLCK új, az endotél sejtekre specifikus szabályozási lehetőségét tártuk fel, és azonosítottuk az MLC defoszforilációját katalizáló EC miozin foszfatáz alegységeinek izoformáját. Ugyanakkor igazoltuk azt is, hogy a TIMAP a PP1c regulátor alegységeként a plazmamembrán és a citoskeleton közötti kapcsolatban fontos ERM fehérjék defoszforilációját, a PP2A pedig a mikrotubulusok szerkezetét és az adherens sejtkapcsolatok stabilitását szabályozza, ezzel szintén lényeges résztvevői az endotél barrier fenntartásának. Az EC barrier a sejt különböző részeihez köthető összetett szabályozó folyamataiban résztvevő, általunk jellemzett fehérjék az endotél sejtek működési zavaaraival kapcsolatos betegségek gyógyítására irányuló kutatásokban célfehérjékként szolgálhatnak.

A vizsgált fehérjék szintjének up- illetve down-regulációja, vagy reverzibilis foszforilációval történő módosításuk az EC funkcióit módosítják, vagy szélsőséges esetben patológiásan megváltoztatják. Ezért eredményeink, további célzott vizsgálatok után, betegségek diagnosztikájában is felhasználhatóak lehetnek. Így például az endotél barrier funkcióra védő hatással bíró TIMAP, valamint a vele kölcsönható fehérjék egészséges és kóros (kezeletlen és gyógyszeresen kezelt) szövetmintákon folytatott vizsgálatai (pl. immunhisztokémia, szövetkivonatokban fehérjeszintek, illetve fehérjék foszforiláltsági szintjének összehasonlítása) jó eséllyel vezethetnek a klinikumban hasznosítható eredményekhez. A daganatos betegségek szempontjából érdekes és ígéretes lehet továbbá az NHERF2 angiogenezis szabályozásában való részvétele és a daganatos sejtek invazivitásával való lehetséges kapcsolata.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A vaszkuláris endotél sejtek integritása a tüdő működésében meghatározó jelentőségű. Az integritás sérülése, paracelluláris rések kialakulása, ezzel együtt a permeabilitás szignifikáns és hosszan tartó megemelkedése a tüdő gyulladással járó betegségeinek egyik legfőbb tünete, amelyek ma is magas halálozási rátával bírnak. A tüdő artéria endotél sejtek barrier funkciójával összefüggésben protein kinázokat és foszfatázokat tanulmányoztunk. Munkánk igazolja, hogy számos fehérje összehangolt, különböző jelátviteli folyamatokon keresztül megvalósuló reverzibilis foszforilációja bír nagy jelentőséggel az endotél barrier kialakulásában és fenntartásában. Az értekezésben bemutatott eredményeink részben az endotél permeabilitás meghatározásában központi szerepet játszó MLC reverzibilis foszforilációját biztosító MLCK és a miozin foszfatáz vizsgálatából születtek. Bizonyítottuk továbbá, hogy a PP1c β izoformája nem kizárólag a miozin foszfatáz holoenzim komponenseként, az MLC defoszforilációjával segíti az endotél barrier fenntartását. A PP2A vizsgálata is arra hívja fel a figyelmet, hogy az MLC mellett még számos, a citoszkeletonhoz vagy a sejt-kapcsolatokhoz köthető fehérje foszforiláltsági szintje is befolyásolja a tüdő artéria endotél sejtek barrier funkcióját. Kísérleteinkkel új fehérje-fehérje kölcsönhatásokat is azonosítottunk, amelyek többek között néhány adaptor fehérje részvételét is bizonyították az endotél permeabilitás és az angiogenezis szabályozásában.

Összességében kutatási eredményeink új információval szolgálnak az endotél barrier funkció és az angiogenezis szabályozásában kulcsszerepet betöltő molekulákról.

Az értekezésben bemutatott új eredményeink a következők:

1. Az endotél sejtekben expresszálandó MLCK enzim egyedi, N-terminális régiója Tyr oldalláncon foszforilálódik. Ezzel aktivitása fokozódik, ami az enzim egy új, korábban nem ismert szabályozási lehetőségére hívja fel a figyelmet.
2. Jellemeztük az endotél miozin foszfatáz PP1c β katalitikus és MYPT1 regulátor alegységét és igazoltuk szabályozó szerepüket az endotél barrier funkcióban.
3. Bizonyítottuk egy másik jelentős Ser/Thr-oldalláncon specifikus protein foszfatáz, a PP2A részvételét az endotél citoszkeleton szabályozásában és két, a citoszkeletonhoz kapcsolódó szubsztrát, a tau és a HSP27 fehérjék defoszforilációjában.

4. Az endotél sejtek jól működő adherens kapcsolataihoz szükséges a PP2A aktivitás, ezzel összhangban fehérje-fehérje kölcsönhatásokat azonosítottunk a foszfatáz B α regulátor alegysége és a VE-kadherin valamint a β -katenin között, ez utóbbi fehérje Ser552 oldalláncának defoszforilációjában valószínűsítettük a PP2A szerepét.
5. Igazoltuk, hogy az endotél sejtekben magas szinten expresszálandó TIMAP fehérje a PP1c β regulátor alegysége és a TIMAP az endotél barrier védő funkciót tölt be a sejtekben. A TIMAP/PP1c β holoenzim katalizálja az ERM fehérjék defoszforilációját, aktivitása a TIMAP foszforilációjával szabályozott.
6. Felismertük a RACK1 állványfehérje szerepét a TIMAP prenilációjában és plazmamembránhoz történő transzlokációjában, valamint a RACK1 új kölcsönható partnereiként azonosítottuk a TIMAP és farnezil transzferáz fehérjéket.
7. Az endotél sejtekben alig vizsgált NHERF fehérjecsald két tagjáról, az EBP50 és NHERF2 fehérjékről kimutattuk, hogy funkciójuk és fehérje partnereik különböznek. Az EBP50 minden bizonnyal az endotél sejtciklus szabályozásában vesz részt, míg az NHERF2 az ERM fehérjék foszforilációját segíti és ezzel az endotél sejtek barrier funkciójában és az angiogenezisben játszik szerepet.

7. IRODALOMJEGYZÉK

1. Mehta D, Malik AB: **Signaling mechanisms regulating endothelial permeability.** *Physiol Rev* 2006, **86**:279-367.
2. Chi JT, Chang HY, Haraldsen G, Jahnsen FL, Troyanskaya OG, Chang DS, Wang Z, Rockson SG, van de Rijn M, Botstein D, Brown PO: **Endothelial cell diversity revealed by global expression profiling.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**:10623-10628.
3. Aird WC: **Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms.** *Circ Res* 2007, **100**:158-173.
4. Rajotte D, Arap W, Hagedorn M, Koivunen E, Pasqualini R, Ruoslahti E: **Molecular heterogeneity of the vascular endothelium revealed by in vivo phage display.** *J Clin Invest* 1998, **102**:430-437.
5. Feletou M: **The Endothelium: Part 1: Multiple Functions of the Endothelial Cells-Focus on Endothelium-Derived Vasoactive Mediators.** *San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences*; 2011. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK57149/> 2011.
6. Lin W, Jacobs E, Schapira RM, Presberg K, Effros RM: **Stop-flow studies of distribution of filtration in rat lungs.** *J Appl Physiol (1985)* 1998, **84**:47-52.
7. Qiao RL, Bhattacharya J: **Segmental barrier properties of the pulmonary microvascular bed.** *J Appl Physiol (1985)* 1991, **71**:2152-2159.
8. Schnitzer JE, Siflinger-Birnboim A, Del Vecchio PJ, Malik AB: **Segmental differentiation of permeability, protein glycosylation, and morphology of cultured bovine lung vascular endothelium.** *Biochem Biophys Res Commun* 1994, **199**:11-19.
9. Stevens T, Garcia JG, Shasby DM, Bhattacharya J, Malik AB: **Mechanisms regulating endothelial cell barrier function.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000, **279**:L419-422.
10. Blum MS, Toninelli E, Anderson JM, Balda MS, Zhou J, O'Donnell L, Pardi R, Bender JR: **Cytoskeletal rearrangement mediates human microvascular endothelial tight junction modulation by cytokines.** *Am J Physiol* 1997, **273**:H286-294.
11. Tuma P, Hubbard AL: **Transcytosis: crossing cellular barriers.** *Physiol Rev* 2003, **83**:871-932.
12. Dudek SM, Garcia JG: **Cytoskeletal regulation of pulmonary vascular permeability.** *J Appl Physiol* 2001, **91**:1487-1500.
13. Bogatcheva NV, Garcia JG, Verin AD: **Molecular mechanisms of thrombin-induced endothelial cell permeability.** *Biochemistry (Mosc)* 2002, **67**:75-84.
14. Verin AD, Birukova A, Wang P, Liu F, Becker P, Birukov K, Garcia JG: **Microtubule disassembly increases endothelial cell barrier dysfunction: role of MLC phosphorylation.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001, **281**:L565-574.
15. van Nieuw Amerongen GP, van Hinsbergh VW: **Targets for pharmacological intervention of endothelial hyperpermeability and barrier function.** *Vascul Pharmacol* 2002, **39**:257-272.
16. Csontos C, Kolosova I, 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* 2007, **293**:L843-854.
17. Shasby DM, Shasby SS, Sullivan JM, Peach MJ: **Role of endothelial cell cytoskeleton in control of endothelial permeability.** *Circ Res* 1982, **51**:657-661.
18. Gotlieb AI: **The endothelial cytoskeleton: organization in normal and regenerating endothelium.** *Toxicol Pathol* 1990, **18**:603-617.
19. Phillips PG, Lum H, Malik AB, Tsan MF: **Phalloidin prevents thrombin-induced increases in endothelial permeability to albumin.** *Am J Physiol* 1989, **257**:C562-567.
20. Watts ME, Woodcock M, Arnold S, Chaplin DJ: **Effects of novel and conventional anti-cancer agents on human endothelial permeability: influence of tumour secreted factors.** *Anticancer Res* 1997, **17**:71-75.

21. Dejana E, Orsenigo F, Molendini C, Baluk P, McDonald DM: **Organization and signaling of endothelial cell-to-cell junctions in various regions of the blood and lymphatic vascular trees.** *Cell Tissue Res* 2009, **335**:17-25.
22. Dejana E, Tournier-Lasserre E, Weinstein BM: **The control of vascular integrity by endothelial cell junctions: molecular basis and pathological implications.** *Dev Cell* 2009, **16**:209-221.
23. Bazzoni G, Dejana E: **Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis.** *Physiol Rev* 2004, **84**:869-901.
24. Dejana E: **Endothelial cell-cell junctions: happy together.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004, **5**:261-270.
25. Lampugnani MG, Resnati M, Raiteri M, Pigott R, Pisacane A, Houen G, Ruco LP, Dejana E: **A novel endothelial-specific membrane protein is a marker of cell-cell contacts.** *J Cell Biol* 1992, **118**:1511-1522.
26. Gao X, Kouklis P, Xu N, Minshall RD, Sandoval R, Vogel SM, Malik AB: **Reversibility of increased microvessel permeability in response to VE-cadherin disassembly.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000, **279**:L1218-1225.
27. Corada M, Mariotti M, Thurston G, Smith K, Kunkel R, Brockhaus M, Lampugnani MG, Martin-Padura I, Stoppacciaro A, Ruco L, et al: **Vascular endothelial-cadherin is an important determinant of microvascular integrity in vivo.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**:9815-9820.
28. Venkiteswaran K, Xiao K, Summers S, Calkins CC, Vincent PA, Pumiglia K, Kowalczyk AP: **Regulation of endothelial barrier function and growth by VE-cadherin, plakoglobin, and beta-catenin.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2002, **283**:C811-821.
29. Cattelino A, Liebner S, Gallini R, Zanetti A, Balconi G, Corsi A, Bianco P, Wolburg H, Moore R, Oreda B, et al: **The conditional inactivation of the beta-catenin gene in endothelial cells causes a defective vascular pattern and increased vascular fragility.** *J Cell Biol* 2003, **162**:1111-1122.
30. Carmeliet P, Lampugnani MG, Moons L, Breviario F, Compernelle V, Bono F, Balconi G, Spagnuolo R, Oosthuysen B, Dewerchin M, et al: **Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis.** *Cell* 1999, **98**:147-157.
31. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, et al: **The sequence of the human genome.** *Science* 2001, **291**:1304-1351.
32. Brautigan DL: **Protein Ser/Thr phosphatases--the ugly ducklings of cell signalling.** *FEBS J* 2013, **280**:324-345.
33. Tonks NK: **Protein tyrosine phosphatases--from housekeeping enzymes to master regulators of signal transduction.** *FEBS J* 2013, **280**:346-378.
34. Hanks SK, Hunter T: **Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification.** *FASEB J* 1995, **9**:576-596.
35. Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S: **The protein kinase complement of the human genome.** *Science* 2002, **298**:1912-1934.
36. Sutherland C: **What Are the bona fide GSK3 Substrates?** *Int J Alzheimers Dis* 2011, **2011**:505607.
37. Boggon TJ, Eck MJ: **Structure and regulation of Src family kinases.** *Oncogene* 2004, **23**:7918-7927.
38. Barford D, Das AK, Egloff MP: **The structure and mechanism of protein phosphatases: insights into catalysis and regulation.** *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 1998, **27**:133-164.
39. Ingebritsen TS, Cohen P: **The protein phosphatases involved in cellular regulation. 1. Classification and substrate specificities.** *Eur J Biochem* 1983, **132**:255-261.
40. Das AK, Helps NR, Cohen PT, Barford D: **Crystal structure of the protein serine/threonine phosphatase 2C at 2.0 Å resolution.** *EMBO J* 1996, **15**:6798-6809.

41. Sheppeck JE, 2nd, Gauss CM, Chamberlin AR: **Inhibition of the Ser-Thr phosphatases PP1 and PP2A by naturally occurring toxins.** *Bioorg Med Chem* 1997, **5**:1739-1750.
42. Egloff MP, Cohen PT, Reinemer P, Barford D: **Crystal structure of the catalytic subunit of human protein phosphatase 1 and its complex with tungstate.** *J Mol Biol* 1995, **254**:942-959.
43. Goldberg J, Huang HB, Kwon YG, Greengard P, Nairn AC, Kuriyan J: **Three-dimensional structure of the catalytic subunit of protein serine/threonine phosphatase-1.** *Nature* 1995, **376**:745-753.
44. Zhang J, Zhang Z, Brew K, Lee EY: **Mutational analysis of the catalytic subunit of muscle protein phosphatase-1.** *Biochemistry* 1996, **35**:6276-6282.
45. Shi Y: **Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure.** *Cell* 2009, **139**:468-484.
46. Sasaki K, Shima H, Kitagawa Y, Irino S, Sugimura T, Nagao M: **Identification of members of the protein phosphatase 1 gene family in the rat and enhanced expression of protein phosphatase 1 alpha gene in rat hepatocellular carcinomas.** *Jpn J Cancer Res* 1990, **81**:1272-1280.
47. Cohen PT: **Two isoforms of protein phosphatase 1 may be produced from the same gene.** *FEBS Lett* 1988, **232**:17-23.
48. Cohen PT: **Protein phosphatase 1--targeted in many directions.** *J Cell Sci* 2002, **115**:241-256.
49. Stone SR, Hofsteenge J, Hemmings BA: **Molecular cloning of cDNAs encoding two isoforms of the catalytic subunit of protein phosphatase 2A.** *Biochemistry* 1987, **26**:7215-7220.
50. Baharians Z, Schonthal AH: **Autoregulation of protein phosphatase type 2A expression.** *J Biol Chem* 1998, **273**:19019-19024.
51. Hemmings BA, Adams-Pearson C, Maurer F, Muller P, Goris J, Merlevede W, Hofsteenge J, Stone SR: **alpha- and beta-forms of the 65-kDa subunit of protein phosphatase 2A have a similar 39 amino acid repeating structure.** *Biochemistry* 1990, **29**:3166-3173.
52. Wang SS, Esplin ED, Li JL, Huang L, Gazdar A, Minna J, Evans GA: **Alterations of the PPP2R1B gene in human lung and colon cancer.** *Science* 1998, **282**:284-287.
53. Ruediger R, Pham HT, Walter G: **Alterations in protein phosphatase 2A subunit interaction in human carcinomas of the lung and colon with mutations in the A beta subunit gene.** *Oncogene* 2001, **20**:1892-1899.
54. Groves MR, Hanlon N, Turowski P, Hemmings BA, Barford D: **The structure of the protein phosphatase 2A PR65/A subunit reveals the conformation of its 15 tandemly repeated HEAT motifs.** *Cell* 1999, **96**:99-110.
55. Janssens V, Goris J: **Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling.** *Biochem J* 2001, **353**:417-439.
56. Mayer RE, Hendrix P, Cron P, Matthies R, Stone SR, Goris J, Merlevede W, Hofsteenge J, Hemmings BA: **Structure of the 55-kDa regulatory subunit of protein phosphatase 2A: evidence for a neuronal-specific isoform.** *Biochemistry* 1991, **30**:3589-3597.
57. Healy AM, Zolnierowicz S, Stapleton AE, Goebel M, DePaoli-Roach AA, Pringle JR: **CDC55, a *Saccharomyces cerevisiae* gene involved in cellular morphogenesis: identification, characterization, and homology to the B subunit of mammalian type 2A protein phosphatase.** *Mol Cell Biol* 1991, **11**:5767-5780.
58. Zolnierowicz S, Csontos C, Bondor J, Verin A, Mumby MC, DePaoli-Roach AA: **Diversity in the regulatory B-subunits of protein phosphatase 2A: identification of a novel isoform highly expressed in brain.** *Biochemistry* 1994, **33**:11858-11867.
59. Strack S, Chang D, Zaucha JA, Colbran RJ, Wadzinski BE: **Cloning and characterization of B delta, a novel regulatory subunit of protein phosphatase 2A.** *FEBS Lett* 1999, **460**:462-466.

60. McCright B, Virshup DM: **Identification of a new family of protein phosphatase 2A regulatory subunits.** *J Biol Chem* 1995, **270**:26123-26128.
61. Csontos C, Zolnierowicz S, Bako E, Durbin SD, DePaoli-Roach AA: **High complexity in the expression of the B' subunit of protein phosphatase 2A0. Evidence for the existence of at least seven novel isoforms.** *J Biol Chem* 1996, **271**:2578-2588.
62. Klee CB, Crouch TH, Krinks MH: **Calcineurin: a calcium- and calmodulin-binding protein of the nervous system.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979, **76**:6270-6273.
63. Klee CB, Ren H, Wang X: **Regulation of the calmodulin-stimulated protein phosphatase, calcineurin.** *J Biol Chem* 1998, **273**:13367-13370.
64. Wang MG, Yi H, Guerini D, Klee CB, McBride OW: **Calcineurin A alpha (PPP3CA), calcineurin A beta (PPP3CB) and calcineurin B (PPP3R1) are located on human chromosomes 4, 10q21-->q22 and 2p16-->p15 respectively.** *Cytogenet Cell Genet* 1996, **72**:236-241.
65. Rumi-Masante J, Rusinga FI, Lester TE, Dunlap TB, Williams TD, Dunker AK, Weis DD, Creamer TP: **Structural basis for activation of calcineurin by calmodulin.** *J Mol Biol* 2012, **415**:307-317.
66. Somlyo AP, Somlyo AV: **Signal transduction and regulation in smooth muscle.** *Nature* 1994, **372**:231-236.
67. Somlyo AP, Somlyo AV: **Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase.** *Physiol Rev* 2003, **83**:1325-1358.
68. Fukata Y, Amano M, Kaibuchi K: **Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells.** *Trends Pharmacol Sci* 2001, **22**:32-39.
69. Wysolmerski RB, Lagunoff D: **Involvement of myosin light-chain kinase in endothelial cell retraction.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990, **87**:16-20.
70. Wysolmerski RB, Lagunoff D: **Regulation of permeabilized endothelial cell retraction by myosin phosphorylation.** *Am J Physiol* 1991, **261**:C32-40.
71. Birch KA, Pober JS, Zavoico GB, Means AR, Ewenstein BM: **Calcium/calmodulin transduces thrombin-stimulated secretion: studies in intact and minimally permeabilized human umbilical vein endothelial cells.** *J Cell Biol* 1992, **118**:1501-1510.
72. Garcia JG, Siflinger-Birnboim A, Bizios R, Del Vecchio PJ, Fenton JW, 2nd, Malik AB: **Thrombin-induced increase in albumin permeability across the endothelium.** *J Cell Physiol* 1986, **128**:96-104.
73. Sheldon R, Moy A, Lindsley K, Shasby S, Shasby DM: **Role of myosin light-chain phosphorylation in endothelial cell retraction.** *Am J Physiol* 1993, **265**:L606-612.
74. Garcia JG, Davis HW, Patterson CE: **Regulation of endothelial cell gap formation and barrier dysfunction: role of myosin light chain phosphorylation.** *J Cell Physiol* 1995, **163**:510-522.
75. van Nieuw Amerongen GP, Draijer R, Vermeer MA, van Hinsbergh VW: **Transient and prolonged increase in endothelial permeability induced by histamine and thrombin: role of protein kinases, calcium, and RhoA.** *Circ Res* 1998, **83**:1115-1123.
76. Tinsley JH, De Lanerolle P, Wilson E, Ma W, Yuan SY: **Myosin light chain kinase transference induces myosin light chain activation and endothelial hyperpermeability.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2000, **279**:C1285-1289.
77. Verin AD, Gilbert-McClain LI, Patterson CE, Garcia JG: **Biochemical regulation of the nonmuscle myosin light chain kinase isoform in bovine endothelium.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998, **19**:767-776.
78. Verin AD, Lazar V, Torry RJ, Labarrere CA, Patterson CE, Garcia JG: **Expression of a novel high molecular-weight myosin light chain kinase in endothelium.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998, **19**:758-766.

79. Garcia JG, Lazar V, Gilbert-McClain LI, Gallagher PJ, Verin AD: **Myosin light chain kinase in endothelium: molecular cloning and regulation.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997, **16**:489-494.
80. Lazar V, Garcia JG: **A single human myosin light chain kinase gene (MLCK; MYLK).** *Genomics* 1999, **57**:256-267.
81. Shi S, Verin AD, Schaphorst KL, Gilbert-McClain LI, Patterson CE, Irwin RP, Natarajan V, Garcia JG: **Role of tyrosine phosphorylation in thrombin-induced endothelial cell contraction and barrier function.** *Endothelium* 1998, **6**:153-171.
82. Gilbert-McClain LI, Verin AD, Shi S, Irwin RP, Garcia JG: **Regulation of endothelial cell myosin light chain phosphorylation and permeability by vanadate.** *J Cell Biochem* 1998, **70**:141-155.
83. Alessi D, MacDougall LK, Sola MM, Ikebe M, Cohen P: **The control of protein phosphatase-1 by targetting subunits. The major myosin phosphatase in avian smooth muscle is a novel form of protein phosphatase-1.** *Eur J Biochem* 1992, **210**:1023-1035.
84. Ito M, Nakano T, Erdodi F, Hartshorne DJ: **Myosin phosphatase: structure, regulation and function.** *Mol Cell Biochem* 2004, **259**:197-209.
85. Diwan AH, Honkanen RE, Schaeffer RC, Jr., Strada SJ, Thompson WJ: **Inhibition of serine-threonine protein phosphatases decreases barrier function of rat pulmonary microvascular endothelial cells.** *J Cell Physiol* 1997, **171**:259-270.
86. Verin AD, Patterson CE, Day MA, Garcia JG: **Regulation of endothelial cell gap formation and barrier function by myosin-associated phosphatase activities.** *Am J Physiol* 1995, **269**:L99-108.
87. Shasby DM, Stevens T, Ries D, Moy AB, Kamath JM, Kamath AM, Shasby SS: **Thrombin inhibits myosin light chain dephosphorylation in endothelial cells.** *Am J Physiol* 1997, **272**:L311-319.
88. Takahashi N, Ito M, Tanaka J, Nakano T, Kaibuchi K, Odai H, Takemura K: **Localization of the gene coding for myosin phosphatase, target subunit 1 (MYPT1) to human chromosome 12q15-q21.** *Genomics* 1997, **44**:150-152.
89. Li J, Mahajan A, Tsai MD: **Ankyrin repeat: a unique motif mediating protein-protein interactions.** *Biochemistry* 2006, **45**:15168-15178.
90. Eto M, Kirkbride JA, Brautigan DL: **Assembly of MYPT1 with protein phosphatase-1 in fibroblasts redirects localization and reorganizes the actin cytoskeleton.** *Cell Motil Cytoskeleton* 2005, **62**:100-109.
91. Hartshorne DJ, Ito M, Erdodi F: **Myosin light chain phosphatase: subunit composition, interactions and regulation.** *J Muscle Res Cell Motil* 1998, **19**:325-341.
92. Essler M, Amano M, Kruse HJ, Kaibuchi K, Weber PC, Aepfelbacher M: **Thrombin inactivates myosin light chain phosphatase via Rho and its target Rho kinase in human endothelial cells.** *J Biol Chem* 1998, **273**:21867-21874.
93. Carbajal JM, Gratrix ML, Yu CH, Schaeffer RC, Jr.: **ROCK mediates thrombin's endothelial barrier dysfunction.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2000, **279**:C195-204.
94. Takizawa N, Niuro N, Ikebe M: **Dephosphorylation of the two regulatory components of myosin phosphatase, MBS and CPI17.** *FEBS Lett* 2002, **515**:127-132.
95. Kolozsvari B, Bako E, Becsi B, Kiss A, Czikora A, Toth A, Vamosi G, Gergely P, Erdodi F: **Calcineurin regulates endothelial barrier function by interaction with and dephosphorylation of myosin phosphatase.** *Cardiovasc Res* 2012, **96**:494-503.
96. Eto M, Ohmori T, Suzuki M, Furuya K, Morita F: **A novel protein phosphatase-1 inhibitory protein potentiated by protein kinase C. Isolation from porcine aorta media and characterization.** *J Biochem* 1995, **118**:1104-1107.
97. Fujioka M, Takahashi N, Odai H, Araki S, Ichikawa K, Feng J, Nakamura M, Kaibuchi K, Hartshorne DJ, Nakano T, Ito M: **A new isoform of human myosin phosphatase targeting/regulatory subunit (MYPT2): cDNA cloning, tissue expression, and chromosomal mapping.** *Genomics* 1998, **49**:59-68.

98. Tan I, Ng CH, Lim L, Leung T: **Phosphorylation of a novel myosin binding subunit of protein phosphatase 1 reveals a conserved mechanism in the regulation of actin cytoskeleton.** *J Biol Chem* 2001, **276**:21209-21216.
99. Skinner JA, Saltiel AR: **Cloning and identification of MYPT3: a prenylatable myosin targetting subunit of protein phosphatase 1.** *Biochem J* 2001, **356**:257-267.
100. Cao W, Mattagajasingh SN, Xu H, Kim K, Fierlbeck W, Deng J, Lowenstein CJ, Ballermann BJ: **TIMAP, a novel CAAX box protein regulated by TGF-beta1 and expressed in endothelial cells.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2002, **283**:C327-337.
101. Kim K, Li L, Kozlowski K, Suh HS, Cao W, Ballermann BJ: **The protein phosphatase-1 targeting subunit TIMAP regulates LAMR1 phosphorylation.** *Biochem Biophys Res Commun* 2005, **338**:1327-1334.
102. Gabel S, Benefield J, Meisinger J, Petruzzelli GJ, Young M: **Protein phosphatases 1 and 2A maintain endothelial cells in a resting state, limiting the motility that is needed for the morphogenic process of angiogenesis.** *Otolaryngol Head Neck Surg* 1999, **121**:463-468.
103. Nakamura Y, Hashimoto R, Amano M, Nagata K, Matsumoto N, Goto H, Fukusho E, Mori H, Kashiwagi Y, Kudo T, et al: **Localized phosphorylation of vimentin by rho-kinase in neuroblastoma N2a cells.** *Genes Cells* 2000, **5**:823-837.
104. Usui T, Marriott G, Inagaki M, Swarup G, Osada H: **Protein phosphatase 2A inhibitors, phoslactomycins. Effects on the cytoskeleton in NIH/3T3 cells.** *J Biochem* 1999, **125**:960-965.
105. Pato MD, Sutherland C, Winder SJ, Walsh MP: **Smooth-muscle caldesmon phosphatase is SMP-I, a type 2A protein phosphatase.** *Biochem J* 1993, **293** (Pt 1):35-41.
106. Cairns J, Qin S, Philp R, Tan YH, Guy GR: **Dephosphorylation of the small heat shock protein Hsp27 in vivo by protein phosphatase 2A.** *J Biol Chem* 1994, **269**:9176-9183.
107. Ambach A, Saunus J, Konstandin M, Wesselborg S, Meuer SC, Samstag Y: **The serine phosphatases PP1 and PP2A associate with and activate the actin-binding protein cofilin in human T lymphocytes.** *Eur J Immunol* 2000, **30**:3422-3431.
108. Lavoie JN, Lambert H, Hickey E, Weber LA, Landry J: **Modulation of cellular thermoresistance and actin filament stability accompanies phosphorylation-induced changes in the oligomeric structure of heat shock protein 27.** *Mol Cell Biol* 1995, **15**:505-516.
109. Guay J, Lambert H, Gingras-Breton G, Lavoie JN, Huot J, Landry J: **Regulation of actin filament dynamics by p38 map kinase-mediated phosphorylation of heat shock protein 27.** *J Cell Sci* 1997, **110** (Pt 3):357-368.
110. Drewes G, Ebneith A, Mandelkow EM: **MAPs, MARKs and microtubule dynamics.** *Trends Biochem Sci* 1998, **23**:307-311.
111. Biernat J, Gustke N, Drewes G, Mandelkow EM, Mandelkow E: **Phosphorylation of Ser262 strongly reduces binding of tau to microtubules: distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding.** *Neuron* 1993, **11**:153-163.
112. Sontag E, Nunbhakdi-Craig V, Bloom GS, Mumby MC: **A novel pool of protein phosphatase 2A is associated with microtubules and is regulated during the cell cycle.** *J Cell Biol* 1995, **128**:1131-1144.
113. Sontag E, Nunbhakdi-Craig V, Lee G, Brandt R, Kamibayashi C, Kuret J, White CL, 3rd, Mumby MC, Bloom GS: **Molecular interactions among protein phosphatase 2A, tau, and microtubules. Implications for the regulation of tau phosphorylation and the development of tauopathies.** *J Biol Chem* 1999, **274**:25490-25498.
114. Hiraga A, Tamura S: **Protein phosphatase 2A is associated in an inactive state with microtubules through 2A1-specific interaction with tubulin.** *Biochem J* 2000, **346** Pt 2:433-439.
115. Price NE, Wadzinski B, Mumby MC: **An anchoring factor targets protein phosphatase 2A to brain microtubules.** *Brain Res Mol Brain Res* 1999, **73**:68-77.

116. Witt CJ, Gabel SP, Meisinger J, Werra G, Liu SW, Young MR: **Interrelationship between protein phosphatase-2A and cytoskeletal architecture during the endothelial cell response to soluble products produced by human head and neck cancer.** *Otolaryngol Head Neck Surg* 2000, **122**:721-727.
117. Huot J, Houle F, Marceau F, Landry J: **Oxidative stress-induced actin reorganization mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase/heat shock protein 27 pathway in vascular endothelial cells.** *Circ Res* 1997, **80**:383-392.
118. Roura S, Miravet S, Piedra J, Garcia de Herreros A, Dunach M: **Regulation of E-cadherin/Catenin association by tyrosine phosphorylation.** *J Biol Chem* 1999, **274**:36734-36740.
119. Hulsken J, Birchmeier W, Behrens J: **E-cadherin and APC compete for the interaction with beta-catenin and the cytoskeleton.** *J Cell Biol* 1994, **127**:2061-2069.
120. Lickert H, Bauer A, Kemler R, Stappert J: **Casein kinase II phosphorylation of E-cadherin increases E-cadherin/beta-catenin interaction and strengthens cell-cell adhesion.** *J Biol Chem* 2000, **275**:5090-5095.
121. Huber AH, Weis WI: **The structure of the beta-catenin/E-cadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recognition by beta-catenin.** *Cell* 2001, **105**:391-402.
122. Valenta T, Hausmann G, Basler K: **The many faces and functions of beta-catenin.** *EMBO J* 2012, **31**:2714-2736.
123. Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R: **beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway.** *EMBO J* 1997, **16**:3797-3804.
124. Rubinfeld B, Albert I, Porfiri E, Fiol C, Munemitsu S, Polakis P: **Binding of GSK3beta to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly.** *Science* 1996, **272**:1023-1026.
125. Taurin S, Sandbo N, Qin Y, Browning D, Dulin NO: **Phosphorylation of beta-catenin by cyclic AMP-dependent protein kinase.** *J Biol Chem* 2006, **281**:9971-9976.
126. Fang D, Hawke D, Zheng Y, Xia Y, Meisenhelder J, Nika H, Mills GB, Kobayashi R, Hunter T, Lu Z: **Phosphorylation of beta-catenin by AKT promotes beta-catenin transcriptional activity.** *J Biol Chem* 2007, **282**:11221-11229.
127. Serres M, Grangeasse C, Haftek M, Durocher Y, Duclos B, Schmitt D: **Hyperphosphorylation of beta-catenin on serine-threonine residues and loss of cell-cell contacts induced by calyculin A and okadaic acid in human epidermal cells.** *Exp Cell Res* 1997, **231**:163-172.
128. Ron D, Chen CH, Caldwell J, Jamieson L, Orr E, Mochly-Rosen D: **Cloning of an intracellular receptor for protein kinase C: a homolog of the beta subunit of G proteins.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, **91**:839-843.
129. Ron D, Luo J, Mochly-Rosen D: **C2 region-derived peptides inhibit translocation and function of beta protein kinase C in vivo.** *J Biol Chem* 1995, **270**:24180-24187.
130. Stebbins EG, Mochly-Rosen D: **Binding specificity for RACK1 resides in the V5 region of beta II protein kinase C.** *J Biol Chem* 2001, **276**:29644-29650.
131. Rigas AC, Ozanne DM, Neal DE, Robson CN: **The scaffolding protein RACK1 interacts with androgen receptor and promotes cross-talk through a protein kinase C signaling pathway.** *J Biol Chem* 2003, **278**:46087-46093.
132. Birikh KR, Sklan EH, Shoham S, Soreq H: **Interaction of "readthrough" acetylcholinesterase with RACK1 and PKCbeta II correlates with intensified fear-induced conflict behavior.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**:283-288.
133. Yarwood SJ, Steele MR, Scotland G, Houslay MD, Bolger GB: **The RACK1 signaling scaffold protein selectively interacts with the cAMP-specific phosphodiesterase PDE4D5 isoform.** *J Biol Chem* 1999, **274**:14909-14917.
134. Okano K, Schnaper HW, Bomszyk K, Hayashida T: **RACK1 binds to Smad3 to modulate transforming growth factor-beta1-stimulated alpha2(I) collagen transcription in renal tubular epithelial cells.** *J Biol Chem* 2006, **281**:26196-26204.

135. Chang BY, Harte RA, Cartwright CA: **RACK1: a novel substrate for the Src protein-tyrosine kinase.** *Oncogene* 2002, **21**:7619-7629.
136. Wang S, Chen JZ, Zhang Z, Gu S, Ji C, Tang R, Ying K, Xie Y, Mao Y: **Cloning, expression and genomic structure of a novel human GNB2L1 gene, which encodes a receptor of activated protein kinase C (RACK).** *Mol Biol Rep* 2003, **30**:53-60.
137. Del Vecchio I, Zuccotti A, Pisano F, Canneva F, Lenzken SC, Rousset F, Corsini E, Govoni S, Racchi M: **Functional mapping of the promoter region of the GNB2L1 human gene coding for RACK1 scaffold protein.** *Gene* 2009, **430**:17-29.
138. Adams DR, Ron D, Kiely PA: **RACK1, A multifaceted scaffolding protein: Structure and function.** *Cell Commun Signal* 2011, **9**:22.
139. Sondek J, Siderovski DP: **Ggamma-like (GGL) domains: new frontiers in G-protein signaling and beta-propeller scaffolding.** *Biochem Pharmacol* 2001, **61**:1329-1337.
140. Chang BY, Chiang M, Cartwright CA: **The interaction of Src and RACK1 is enhanced by activation of protein kinase C and tyrosine phosphorylation of RACK1.** *J Biol Chem* 2001, **276**:20346-20356.
141. Chang BY, Conroy KB, Machleder EM, Cartwright CA: **RACK1, a receptor for activated C kinase and a homolog of the beta subunit of G proteins, inhibits activity of src tyrosine kinases and growth of NIH 3T3 cells.** *Mol Cell Biol* 1998, **18**:3245-3256.
142. Arimoto K, Fukuda H, Imajoh-Ohmi S, Saito H, Takekawa M: **Formation of stress granules inhibits apoptosis by suppressing stress-responsive MAPK pathways.** *Nat Cell Biol* 2008, **10**:1324-1332.
143. Bird RJ, Baillie GS, Yarwood SJ: **Interaction with receptor for activated C-kinase 1 (RACK1) sensitizes the phosphodiesterase PDE4D5 towards hydrolysis of cAMP and activation by protein kinase C.** *Biochem J* 2010, **432**:207-216.
144. Thornton C, Tang KC, Phamluong K, Luong K, Vagts A, Nikanjam D, Yaka R, Ron D: **Spatial and temporal regulation of RACK1 function and N-methyl-D-aspartate receptor activity through WD40 motif-mediated dimerization.** *J Biol Chem* 2004, **279**:31357-31364.
145. Yaka R, He DY, Phamluong K, Ron D: **Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP(1-38)) enhances N-methyl-D-aspartate receptor function and brain-derived neurotrophic factor expression via RACK1.** *J Biol Chem* 2003, **278**:9630-9638.
146. Yaka R, Thornton C, Vagts AJ, Phamluong K, Bonci A, Ron D: **NMDA receptor function is regulated by the inhibitory scaffolding protein, RACK1.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**:5710-5715.
147. Besson A, Wilson TL, Yong VW: **The anchoring protein RACK1 links protein kinase Cepsilon to integrin beta chains. Requirements for adhesion and motility.** *J Biol Chem* 2002, **277**:22073-22084.
148. Hermanto U, Zong CS, Li W, Wang LH: **RACK1, an insulin-like growth factor I (IGF-I) receptor-interacting protein, modulates IGF-I-dependent integrin signaling and promotes cell spreading and contact with extracellular matrix.** *Mol Cell Biol* 2002, **22**:2345-2365.
149. Isacson CK, Lu Q, Karas RH, Cox DH: **RACK1 is a BKCa channel binding protein.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2007, **292**:C1459-1466.
150. Yang J, Wang Q, Zheng W, Tuli J, Li Q, Wu Y, Hussein S, Dai XQ, Shafiei S, Li XG, et al: **Receptor for activated C kinase 1 (RACK1) inhibits function of transient receptor potential (TRP)-type channel Pkd2L1 through physical interaction.** *J Biol Chem* 2012, **287**:6551-6561.
151. Donowitz M, Cha B, Zachos NC, Brett CL, Sharma A, Tse CM, Li X: **NHERF family and NHE3 regulation.** *J Physiol* 2005, **567**:3-11.
152. Cunningham R, Biswas R, Steplock D, Shenolikar S, Weinman E: **Role of NHERF and scaffolding proteins in proximal tubule transport.** *Urol Res* 2010, **38**:257-262.

153. Morais Cabral JH, Petosa C, Sutcliffe MJ, Raza S, Byron O, Poy F, Marfatia SM, Chishti AH, Liddington RC: **Crystal structure of a PDZ domain.** *Nature* 1996, **382**:649-652.
154. Fanning AS, Anderson JM: **Protein-protein interactions: PDZ domain networks.** *Curr Biol* 1996, **6**:1385-1388.
155. Shenolikar S, Minkoff CM, Steplock DA, Evangelista C, Liu M, Weinman EJ: **N-terminal PDZ domain is required for NHERF dimerization.** *FEBS Lett* 2001, **489**:233-236.
156. Wade JB, Welling PA, Donowitz M, Shenolikar S, Weinman EJ: **Differential renal distribution of NHERF isoforms and their colocalization with NHE3, ezrin, and ROMK.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2001, **280**:C192-198.
157. Seidler U, Singh AK, Cinar A, Chen M, Hillesheim J, Hogema B, Riederer B: **The role of the NHERF family of PDZ scaffolding proteins in the regulation of salt and water transport.** *Ann N Y Acad Sci* 2009, **1165**:249-260.
158. Voltz JW, Weinman EJ, Shenolikar S: **Expanding the role of NHERF, a PDZ-domain containing protein adapter, to growth regulation.** *Oncogene* 2001, **20**:6309-6314.
159. Bhattacharya R, Wang E, Dutta SK, Vohra PK, E G, Prakash YS, Mukhopadhyay D: **NHERF-2 maintains endothelial homeostasis.** *Blood* 2012, **119**:4798-4806.
160. Shenolikar S, Voltz JW, Cunningham R, Weinman EJ: **Regulation of ion transport by the NHERF family of PDZ proteins.** *Physiology (Bethesda)* 2004, **19**:362-369.
161. Yun CH, Lamprecht G, Forster DV, Sidor A: **NHE3 kinase A regulatory protein E3KARP binds the epithelial brush border Na⁺/H⁺ exchanger NHE3 and the cytoskeletal protein ezrin.** *J Biol Chem* 1998, **273**:25856-25863.
162. Yun CH, Oh S, Zizak M, Steplock D, Tsao S, Tse CM, Weinman EJ, Donowitz M: **cAMP-mediated inhibition of the epithelial brush border Na⁺/H⁺ exchanger, NHE3, requires an associated regulatory protein.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, **94**:3010-3015.
163. Lamprecht G, Weinman EJ, Yun CH: **The role of NHERF and E3KARP in the cAMP-mediated inhibition of NHE3.** *J Biol Chem* 1998, **273**:29972-29978.
164. Zizak M, Lamprecht G, Steplock D, Tariq N, Shenolikar S, Donowitz M, Yun CH, Weinman EJ: **cAMP-induced phosphorylation and inhibition of Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger 3 (NHE3) are dependent on the presence but not the phosphorylation of NHE regulatory factor.** *J Biol Chem* 1999, **274**:24753-24758.
165. Murtazina R, Kovbasnjuk O, Chen TE, Zachos NC, Chen Y, Kocinsky HS, Hogema BM, Seidler U, de Jonge HR, Donowitz M: **NHERF2 is necessary for basal activity, second messenger inhibition, and LPA stimulation of NHE3 in mouse distal ileum.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2011, **301**:C126-136.
166. Fouassier L, Nichols MT, Gidey E, McWilliams RR, Robin H, Finnigan C, Howell KE, Housset C, Doctor RB: **Protein kinase C regulates the phosphorylation and oligomerization of ERM binding phosphoprotein 50.** *Exp Cell Res* 2005, **306**:264-273.
167. Lau AG, Hall RA: **Oligomerization of NHERF-1 and NHERF-2 PDZ domains: differential regulation by association with receptor carboxyl-termini and by phosphorylation.** *Biochemistry* 2001, **40**:8572-8580.
168. Hall RA, Spurney RF, Premont RT, Rahman N, Blitzer JT, Pitcher JA, Lefkowitz RJ: **G protein-coupled receptor kinase 6A phosphorylates the Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger regulatory factor via a PDZ domain-mediated interaction.** *J Biol Chem* 1999, **274**:24328-24334.
169. He J, Lau AG, Yaffe MB, Hall RA: **Phosphorylation and cell cycle-dependent regulation of Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor-1 by Cdc2 kinase.** *J Biol Chem* 2001, **276**:41559-41565.
170. Garbett D, LaLonde DP, Bretscher A: **The scaffolding protein EBP50 regulates microvillar assembly in a phosphorylation-dependent manner.** *J Cell Biol* 2010, **191**:397-413.
171. Fehon RG, McClatchey AI, Bretscher A: **Organizing the cell cortex: the role of ERM proteins.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010, **11**:276-287.

172. Reczek D, Berryman M, Bretscher A: **Identification of EBP50: A PDZ-containing phosphoprotein that associates with members of the ezrin-radixin-moesin family.** *J Cell Biol* 1997, **139**:169-179.
173. Ingraffea J, Reczek D, Bretscher A: **Distinct cell type-specific expression of scaffolding proteins EBP50 and E3KARP: EBP50 is generally expressed with ezrin in specific epithelia, whereas E3KARP is not.** *Eur J Cell Biol* 2002, **81**:61-68.
174. Fievet B, Louvard D, Arpin M: **ERM proteins in epithelial cell organization and functions.** *Biochim Biophys Acta* 2007, **1773**:653-660.
175. Bretscher A, Edwards K, Fehon RG: **ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002, **3**:586-599.
176. Dransfield DT, Bradford AJ, Smith J, Martin M, Roy C, Mangeat PH, Goldenring JR: **Ezrin is a cyclic AMP-dependent protein kinase anchoring protein.** *EMBO J* 1997, **16**:35-43.
177. Csontos C, Lazar V, Garcia JG: **Screening cDNA Libraries Using Partial Probes to Isolate Full-Length cDNAs from Vascular Cells.** *Methods Mol Med* 1999, **30**:59-72.
178. Vereb G, Matko J, Vamosi G, Ibrahim SM, Magyar E, Varga S, Szollosi J, Jenei A, Gaspar R, Jr., Waldmann TA, Damjanovich S: **Cholesterol-dependent clustering of IL-2Ralpha and its colocalization with HLA and CD48 on T lymphoma cells suggest their functional association with lipid rafts.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, **97**:6013-6018.
179. Verin AD, Cooke C, Herenyiova M, Patterson CE, Garcia JG: **Role of Ca²⁺/calmodulin-dependent phosphatase 2B in thrombin-induced endothelial cell contractile responses.** *Am J Physiol* 1998, **275**:L788-799.
180. Ding A, Chen B, Fuortes M, Blum E: **Association of mitogen-activated protein kinases with microtubules in mouse macrophages.** *J Exp Med* 1996, **183**:1899-1904.
181. Imai S, Takeda K: **Effects of vasodilators on the isolated taenia coli of the guinea-pig.** *Nature* 1967, **213**:509-511.
182. Kiss E, Muranyi A, Csontos C, Gergely P, Ito M, Hartshorne DJ, Erdodi F: **Integrin-linked kinase phosphorylates the myosin phosphatase target subunit at the inhibitory site in platelet cytoskeleton.** *Biochem J* 2002, **365**:79-87.
183. Laemmli UK: **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature* 1970, **227**:680-685.
184. Toth A, Kiss E, Herberg FW, Gergely P, Hartshorne DJ, Erdodi F: **Study of the subunit interactions in myosin phosphatase by surface plasmon resonance.** *Eur J Biochem* 2000, **267**:1687-1697.
185. Giaever I, Keese CR: **A morphological biosensor for mammalian cells.** *Nature* 1993, **366**:591-592.
186. Imbert V, Peyron JF, Farahi Far D, Mari B, Auberger P, Rossi B: **Induction of tyrosine phosphorylation and T-cell activation by vanadate peroxide, an inhibitor of protein tyrosine phosphatases.** *Biochem J* 1994, **297 (Pt 1)**:163-173.
187. Posner BI, Faure R, Burgess JW, Bevan AP, Lachance D, Zhang-Sun G, Fantus IG, Ng JB, Hall DA, Lum BS, et al.: **Peroxovanadium compounds. A new class of potent phosphotyrosine phosphatase inhibitors which are insulin mimetics.** *J Biol Chem* 1994, **269**:4596-4604.
188. Gallagher PJ, Herring BP, Griffin SA, Stull JT: **Molecular characterization of a mammalian smooth muscle myosin light chain kinase.** *J Biol Chem* 1991, **266**:23936-23944.
189. Adelstein RS, Klee CB: **Purification and characterization of smooth muscle myosin light chain kinase.** *J Biol Chem* 1981, **256**:7501-7509.
190. Kemp BE, Pearson RB, House C: **Role of basic residues in the phosphorylation of synthetic peptides by myosin light chain kinase.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983, **80**:7471-7475.
191. Ikebe M, Hartshorne DJ: **Phosphorylation of smooth muscle myosin at two distinct sites by myosin light chain kinase.** *J Biol Chem* 1985, **260**:10027-10031.

192. Tokui T, Ando S, Ikebe M: **Autophosphorylation of smooth muscle myosin light chain kinase at its regulatory domain.** *Biochemistry* 1995, **34**:5173-5179.
193. Xia D, Stull JT, Kamm KE: **Myosin phosphatase targeting subunit 1 affects cell migration by regulating myosin phosphorylation and actin assembly.** *Exp Cell Res* 2005, **304**:506-517.
194. Kolosova IA, Mirzapoiazova T, Adyshev D, Usatyuk P, Romer LH, Jacobson JR, Natarajan V, Pearse DB, Garcia JG, Verin AD: **Signaling pathways involved in adenosine triphosphate-induced endothelial cell barrier enhancement.** *Circ Res* 2005, **97**:115-124.
195. Matsui T, Maeda M, Doi Y, Yonemura S, Amano M, Kaibuchi K, Tsukita S: **Rho-kinase phosphorylates COOH-terminal threonines of ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins and regulates their head-to-tail association.** *J Cell Biol* 1998, **140**:647-657.
196. Fukata Y, Kimura K, Oshiro N, Saya H, Matsuura Y, 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* 1998, **141**:409-418.
197. Yong J, Tan I, Lim L, Leung T: **Phosphorylation of myosin phosphatase targeting subunit 3 (MYPT3) and regulation of protein phosphatase 1 by protein kinase A.** *J Biol Chem* 2006, **281**:31202-31211.
198. Li L, Kozlowski K, Wegner B, Rashid T, Yeung T, Holmes C, Ballermann BJ: **Phosphorylation of TIMAP by glycogen synthase kinase-3beta activates its associated protein phosphatase 1.** *J Biol Chem* 2007, **282**:25960-25969.
199. Wera S, Hemmings BA: **Serine/threonine protein phosphatases.** *Biochem J* 1995, **311** (Pt 1):17-29.
200. Cohen P, Holmes CF, Tsukitani Y: **Okadaic acid: a new probe for the study of cellular regulation.** *Trends Biochem Sci* 1990, **15**:98-102.
201. Kiely PA, O'Gorman D, Luong K, Ron D, O'Connor R: **Insulin-like growth factor I controls a mutually exclusive association of RACK1 with protein phosphatase 2A and beta1 integrin to promote cell migration.** *Mol Cell Biol* 2006, **26**:4041-4051.
202. Rodriguez MM, Ron D, Touhara K, Chen CH, Mochly-Rosen D: **RACK1, a protein kinase C anchoring protein, coordinates the binding of activated protein kinase C and select pleckstrin homology domains in vitro.** *Biochemistry* 1999, **38**:13787-13794.
203. Keese CR, Wegener J, Walker SR, Giaever I: **Electrical wound-healing assay for cells in vitro.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**:1554-1559.
204. Sharma GD, He J, Bazan HE: **p38 and ERK1/2 coordinate cellular migration and proliferation in epithelial wound healing: evidence of cross-talk activation between MAP kinase cascades.** *J Biol Chem* 2003, **278**:21989-21997.
205. Carbajal JM, Schaeffer RC, Jr.: **H2O2 and genistein differentially modulate protein tyrosine phosphorylation, endothelial morphology, and monolayer barrier function.** *Biochem Biophys Res Commun* 1998, **249**:461-466.
206. Barfod ET, Moore AL, Van de Graaf BG, Lidofsky SD: **Myosin light chain kinase and Src control membrane dynamics in volume recovery from cell swelling.** *Mol Biol Cell* 2011, **22**:634-650.
207. Dudek SM, Birukov KG, Zhan X, Garcia JG: **Novel interaction of cortactin with endothelial cell myosin light chain kinase.** *Biochem Biophys Res Commun* 2002, **298**:511-519.
208. Dudek SM, Jacobson JR, Chiang ET, Birukov KG, Wang P, Zhan X, Garcia JG: **Pulmonary endothelial cell barrier enhancement by sphingosine 1-phosphate: roles for cortactin and myosin light chain kinase.** *J Biol Chem* 2004, **279**:24692-24700.
209. Dudek SM, Chiang ET, Camp SM, Guo Y, Zhao J, Brown ME, Singleton PA, Wang L, Desai A, Arce FT, et al: **Abl tyrosine kinase phosphorylates nonmuscle Myosin light chain kinase to regulate endothelial barrier function.** *Mol Biol Cell* 2010, **21**:4042-4056.

210. Zhao J, Singleton PA, Brown ME, Dudek SM, Garcia JG: **Phosphotyrosine protein dynamics in cell membrane rafts of sphingosine-1-phosphate-stimulated human endothelium: role in barrier enhancement.** *Cell Signal* 2009, **21**:1945-1960.
211. Shimizu H, Ito M, Miyahara M, Ichikawa K, Okubo S, Konishi T, Naka M, Tanaka T, Hirano K, Hartshorne DJ, et al.: **Characterization of the myosin-binding subunit of smooth muscle myosin phosphatase.** *J Biol Chem* 1994, **269**:30407-30411.
212. Tountas NA, Brautigan DL: **Migration and retraction of endothelial and epithelial cells require PHI-1, a specific protein-phosphatase-1 inhibitor protein.** *J Cell Sci* 2004, **117**:5905-5912.
213. Terrak M, Kerff F, Langsetmo K, Tao T, Dominguez R: **Structural basis of protein phosphatase 1 regulation.** *Nature* 2004, **429**:780-784.
214. Hasko G, Cronstein BN: **Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity.** *Trends Immunol* 2004, **25**:33-39.
215. Zimmermann H: **Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides.** *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2000, **362**:299-309.
216. Eckle T, Fullbier L, Wehrmann M, Khoury J, Mittelbronn M, Ibla J, Rosenberger P, Eltzschig HK: **Identification of ectonucleotidases CD39 and CD73 in innate protection during acute lung injury.** *J Immunol* 2007, **178**:8127-8137.
217. Reutershan J, Vollmer I, Stark S, Wagner R, Ngamsri KC, Eltzschig HK: **Adenosine and inflammation: CD39 and CD73 are critical mediators in LPS-induced PMN trafficking into the lungs.** *FASEB J* 2009, **23**:473-482.
218. Umapathy NS, Fan Z, Zemskov EA, Alieva IB, Black SM, Verin AD: **Molecular mechanisms involved in adenosine-induced endothelial cell barrier enhancement.** *Vascul Pharmacol* 2010, **52**:199-206.
219. Matsumura F, Hartshorne DJ: **Myosin phosphatase target subunit: Many roles in cell function.** *Biochem Biophys Res Commun* 2008, **369**:149-156.
220. Amano M, Fukata Y, Kaibuchi K: **Regulation and functions of Rho-associated kinase.** *Exp Cell Res* 2000, **261**:44-51.
221. Ke Y, Lum H, Solaro RJ: **Inhibition of endothelial barrier dysfunction by P21-activated kinase-1.** *Can J Physiol Pharmacol* 2007, **85**:281-288.
222. Drechsel DN, Hyman AA, Cobb MH, Kirschner MW: **Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau.** *Mol Biol Cell* 1992, **3**:1141-1154.
223. Litersky JM, Johnson GV, Jakes R, Goedert M, Lee M, Seubert P: **Tau protein is phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II within its microtubule-binding domains at Ser-262 and Ser-356.** *Biochem J* 1996, **316 (Pt 2)**:655-660.
224. Zhu B, Zhang L, Creighton J, Alexeyev M, Strada SJ, Stevens T: **Protein kinase A phosphorylation of tau-serine 214 reorganizes microtubules and disrupts the endothelial cell barrier.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, **299**:L493-501.
225. Gerthoffer WT, Gunst SJ: **Invited review: focal adhesion and small heat shock proteins in the regulation of actin remodeling and contractility in smooth muscle.** *J Appl Physiol (1985)* 2001, **91**:963-972.
226. Benndorf R, Hayess K, Ryazantsev S, Wieske M, Behlke J, Lutsch G: **Phosphorylation and supramolecular organization of murine small heat shock protein HSP25 abolish its actin polymerization-inhibiting activity.** *J Biol Chem* 1994, **269**:20780-20784.
227. Birukova AA, Birukov KG, Gorshkov B, Liu F, Garcia JG, Verin AD: **MAP kinases in lung endothelial permeability induced by microtubule disassembly.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005, **289**:L75-84.
228. Meng G, Sun Y, Fu W, Guo Z, Xu L: **Microcystin-LR induces cytoskeleton system reorganization through hyperphosphorylation of tau and HSP27 via PP2A inhibition and subsequent activation of the p38 MAPK signaling pathway in neuroendocrine (PC12) cells.** *Toxicology* 2011, **290**:218-229.

229. Serres M, Filhol O, Lickert H, Grangeasse C, Chambaz EM, Stappert J, Vincent C, Schmitt D: **The disruption of adherens junctions is associated with a decrease of E-cadherin phosphorylation by protein kinase CK2.** *Exp Cell Res* 2000, **257**:255-264.
230. Beckers CM, Garcia-Vallejo JJ, van Hinsbergh VW, van Nieuw Amerongen GP: **Nuclear targeting of beta-catenin and p120ctn during thrombin-induced endothelial barrier dysfunction.** *Cardiovasc Res* 2008, **79**:679-688.
231. Gotz J, Probst A, Mistl C, Nitsch RM, Ehler E: **Distinct role of protein phosphatase 2A subunit Calpha in the regulation of E-cadherin and beta-catenin during development.** *Mech Dev* 2000, **93**:83-93.
232. Taurin S, Sandbo N, Yau DM, Sethakorn N, Dulin NO: **Phosphorylation of beta-catenin by PKA promotes ATP-induced proliferation of vascular smooth muscle cells.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2008, **294**:C1169-1174.
233. Le Guelte A, Galan-Moya EM, Dwyer J, Treps L, Kettler G, Hebda JK, Dubois S, Auffray C, Chneiweiss H, Bidere N, Gavard J: **Semaphorin 3A elevates endothelial cell permeability through PP2A inactivation.** *J Cell Sci* 2012, **125**:4137-4146.
234. Shopik MJ, Li L, Luu HA, Obeidat M, Holmes CF, Ballermann BJ: **Multi-directional function of the protein phosphatase 1 regulatory subunit TIMAP.** *Biochem Biophys Res Commun* 2013, **435**:567-573.
235. Poirier C, Gorshkov BA, Zemsanova MA, Bogatcheva NV, Verin AD: **TIMAP protects endothelial barrier from LPS-induced vascular leakage and is down-regulated by LPS.** *Respir Physiol Neurobiol* 2011, **179**:334-337.
236. Paik JH, Skoura A, Chae SS, Cowan AE, Han DK, Proia RL, Hla T: **Sphingosine 1-phosphate receptor regulation of N-cadherin mediates vascular stabilization.** *Genes Dev* 2004, **18**:2392-2403.
237. Bogatcheva NV, Zemsanova MA, Gorshkov BA, Kim KM, Daglis GA, Poirier C, Verin AD: **Ezrin, radixin, and moesin are phosphorylated in response to 2-methoxyestradiol and modulate endothelial hyperpermeability.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 2011, **45**:1185-1194.
238. Birukova AA, Liu F, Garcia JG, Verin AD: **Protein kinase A attenuates endothelial cell barrier dysfunction induced by microtubule disassembly.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004, **287**:L86-93.
239. Baumer Y, Spindler V, Werthmann RC, Bunemann M, Waschke J: **Role of Rac 1 and cAMP in endothelial barrier stabilization and thrombin-induced barrier breakdown.** *J Cell Physiol* 2009, **220**:716-726.
240. Liedtke CM, Wang X: **The N-terminus of the WD5 repeat of human RACK1 binds to airway epithelial NHERF1.** *Biochemistry* 2006, **45**:10270-10277.
241. Bourd-Boittin K, Le Pabic H, Bonnier D, L'Helgoualc'h A, Theret N: **RACK1, a new ADAM12 interacting protein. Contribution to liver fibrogenesis.** *J Biol Chem* 2008, **283**:26000-26009.
242. Chiba Y, Tanabe M, Sakai H, Kimura S, Misawa M: **A functional interaction between CPI-17 and RACK1 proteins in bronchial smooth muscle cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 2010, **401**:487-490.
243. Kiely PA, Baillie GS, Lynch MJ, Houslay MD, O'Connor R: **Tyrosine 302 in RACK1 is essential for insulin-like growth factor-I-mediated competitive binding of PP2A and beta1 integrin and for tumor cell proliferation and migration.** *J Biol Chem* 2008, **283**:22952-22961.
244. Dalby MJ, Hart A, Yarwood SJ: **The effect of the RACK1 signalling protein on the regulation of cell adhesion and cell contact guidance on nanometric grooves.** *Biomaterials* 2008, **29**:282-289.
245. Li J, Guo Y, Feng X, Wang Z, Wang Y, Deng P, Zhang D, Wang R, Xie L, Xu X, et al: **Receptor for activated C kinase 1 (RACK1): a regulator for migration and invasion in oral squamous cell carcinoma cells.** *J Cancer Res Clin Oncol* 2012, **138**:563-571.

246. Knezevic N, Tauseef M, Thennes T, Mehta D: **The G protein betagamma subunit mediates reannealing of adherens junctions to reverse endothelial permeability increase by thrombin.** *J Exp Med* 2009, **206**:2761-2777.
247. Murthy A, Gonzalez-Agosti C, Cordero E, Pinney D, Candia C, Solomon F, Gusella J, Ramesh V: **NHE-RF, a regulatory cofactor for Na(+)-H+ exchange, is a common interactor for merlin and ERM (MERM) proteins.** *J Biol Chem* 1998, **273**:1273-1276.
248. Fouassier L, Rosenberg P, Mergey M, Saubamea B, Claperon A, Kinnman N, Chignard N, Jacobsson-Ekman G, Strandvik B, Rey C, et al: **Ezrin-radixin-moesin-binding phosphoprotein (EBP50), an estrogen-inducible scaffold protein, contributes to biliary epithelial cell proliferation.** *Am J Pathol* 2009, **174**:869-880.
249. Shibata T, Chuma M, Kokubu A, Sakamoto M, Hirohashi S: **EBP50, a beta-catenin-associating protein, enhances Wnt signaling and is over-expressed in hepatocellular carcinoma.** *Hepatology* 2003, **38**:178-186.
250. Kutay U, Hetzer MW: **Reorganization of the nuclear envelope during open mitosis.** *Curr Opin Cell Biol* 2008, **20**:669-677.
251. Schmitz MH, Held M, Janssens V, Hutchins JR, Hudecz O, Ivanova E, Goris J, Trinkle-Mulcahy L, Lamond AI, Poser I, et al: **Live-cell imaging RNAi screen identifies PP2A-B55alpha and importin-beta1 as key mitotic exit regulators in human cells.** *Nat Cell Biol* 2010, **12**:886-893.
252. Wu JQ, Guo JY, Tang W, Yang CS, Freel CD, Chen C, Nairn AC, Kornbluth S: **PP1-mediated dephosphorylation of phosphoproteins at mitotic exit is controlled by inhibitor-1 and PP1 phosphorylation.** *Nat Cell Biol* 2009, **11**:644-651.
253. Mochida S, Ikeo S, Gannon J, Hunt T: **Regulated activity of PP2A-B55 delta is crucial for controlling entry into and exit from mitosis in Xenopus egg extracts.** *EMBO J* 2009, **28**:2777-2785.
254. Dai JL, Wang L, Sahin AA, Broemeling LD, Schutte M, Pan Y: **NHERF (Na+/H+ exchanger regulatory factor) gene mutations in human breast cancer.** *Oncogene* 2004, **23**:8681-8687.
255. Pan Y, Wang L, Dai JL: **Suppression of breast cancer cell growth by Na+/H+ exchanger regulatory factor 1 (NHERF1).** *Breast Cancer Res* 2006, **8**:R63.
256. Oh YS, Jo NW, Choi JW, Kim HS, Seo SW, Kang KO, Hwang JI, Heo K, Kim SH, Kim YH, et al: **NHERF2 specifically interacts with LPA2 receptor and defines the specificity and efficiency of receptor-mediated phospholipase C-beta3 activation.** *Mol Cell Biol* 2004, **24**:5069-5079.
257. Theisen CS, Wahl JK, 3rd, Johnson KR, Wheelock MJ: **NHERF links the N-cadherin/catenin complex to the platelet-derived growth factor receptor to modulate the actin cytoskeleton and regulate cell motility.** *Mol Biol Cell* 2007, **18**:1220-1232.
258. Reczek D, Bretscher A: **Identification of EPI64, a TBC/rabGAP domain-containing microvillar protein that binds to the first PDZ domain of EBP50 and E3KARP.** *J Cell Biol* 2001, **153**:191-206.
259. Rana MK, Worthylake RA: **Novel mechanism for negatively regulating Rho-kinase (ROCK) signaling through Coronin1B protein in neuregulin 1 (NRG-1)-induced tumor cell motility.** *J Biol Chem* 2012, **287**:21836-21845.
260. Molina JR, Agarwal NK, Morales FC, Hayashi Y, Aldape KD, Cote G, Georgescu MM: **PTEN, NHERF1 and PHLPP form a tumor suppressor network that is disabled in glioblastoma.** *Oncogene* 2012, **31**:1264-1274.
261. Arpin M, Chirivino D, Naba A, Zwaenepoel I: **Emerging role for ERM proteins in cell adhesion and migration.** *Cell Adh Migr* 2011, **5**:199-206.
262. Adyshev DM, Moldobaeva NK, Elangovan VR, Garcia JG, Dudek SM: **Differential involvement of ezrin/radixin/moesin proteins in sphingosine 1-phosphate-induced human pulmonary endothelial cell barrier enhancement.** *Cell Signal* 2011, **23**:2086-2096.

263. Gandy KA, Canals D, Adada M, Wada M, Roddy P, Snider AJ, Hannun YA, Obeid LM: **Sphingosine 1-phosphate induces filopodia formation through S1PR2 activation of ERM proteins.** *Biochem J* 2013, **449**:661-672.
264. Chen Y, Wang D, Guo Z, Zhao J, Wu B, Deng H, Zhou T, Xiang H, Gao F, Yu X, et al: **Rho kinase phosphorylation promotes ezrin-mediated metastasis in hepatocellular carcinoma.** *Cancer Res* 2011, **71**:1721-1729.
265. Cohen P: **Protein kinases--the major drug targets of the twenty-first century?** *Nat Rev Drug Discov* 2002, **1**:309-315.
266. Grant SK: **Therapeutic protein kinase inhibitors.** *Cell Mol Life Sci* 2009, **66**:1163-1177.
267. Zhang M, Yogesha SD, Mayfield JE, Gill GN, Zhang Y: **Viewing serine/threonine protein phosphatases through the eyes of drug designers.** *FEBS J*, **280**:4739-4760.

8. KÖZLEMÉNYEK

8.1 Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

8.1.1 Az értekezést megalapozó összefoglaló közlemény

Csortos C, Kolosova I, Verin AD: Regulation of vascular endothelial cell barrier function and cytoskeleton structure by protein phosphatases of the PPP family
AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY-LUNG CELLULAR AND MOLECULAR PHYSIOLOGY 293:(4) pp. L843-L854. (2007)

IF: 4,214

8.1.2 Az értekezést megalapozó kísérletes közlemények

Boratkó A, **Csortos C**: NHERF2 is crucial in ERM phosphorylation in pulmonary endothelial cells

CELL COMMUNICATION AND SIGNALING 11:(1), 99 (2013)

IF: 5,093 (2012)

Boratkó A, Gergely P, **Csortos C**: RACK1 is involved in endothelial barrier regulation via its two novel interacting partners

CELL COMMUNICATION AND SIGNALING 11:(2) pp. 1-14. (2013)

IF: 5,093 (2012)

Kása A, Czikora I, Verin AD, Gergely P, **Csortos C**: Protein phosphatase 2A activity is required for functional adherent junctions in endothelial cells

MICROVASCULAR RESEARCH 1: p. 1. (2013)

IF: 2,929 (2012)

Boratkó A, Gergely P, **Csortos C**: Cell cycle dependent association of EBP50 with protein phosphatase 2A in endothelial cells

PLOS ONE 7:(4 / e35595) pp. 1-10. (2012)

IF: 3,73

Kim K, **Csortos C**, Czikora I, Fulton D, Umaphathy NS, Olah G, Verin AD: Molecular characterization of myosin phosphatase in endothelium

JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY 227:(10) pp. 1701-1708. (2012)

IF: 4,218

Czikora I, Kim K, Kása A, Bécsi B, Verin AD, Gergely P, Erdődi F, **Csortos C**: Characterization of the effect of TIMAP phosphorylation on its interaction with protein phosphatase 1

BIOCHIMIE 93:(7) pp. 1139-1145. (2011)

IF: 3,022

Csortos C, Czikora I, Bogatcheva NV, Adyshev DM, Poirier C, Olah G, Verin AD: TIMAP is a positive regulator of pulmonary endothelial barrier function
 AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY-LUNG CELLULAR AND MOLECULAR PHYSIOLOGY 295:(3) pp. L440-L450. (2008)
 IF: 3,924

Tar* K, **Csortos*** C, Czikora I, Oláh G, Ma SF, Wadgaonkar R, Gergely P, Garcia JGN, Verin AD: Role of Protein Phosphatase 2A in The Regulation of Endothelial Cell Cytoskeleton Structure
 JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY 98:(4) pp. 931-953. (2006) (*első szerzők)
 IF: 3,409

Tar K, Birukova AA, **Csortos** C, Bakó É, Garcia JGN, Verin AD: Phosphatase 2A is involved in endothelial cell microtubule remodeling and barrier regulation
 JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY 92:(3) pp. 534-546. (2004)
 IF: 2,946

Birukov KG, **Csortos** C, Marzilli L, Dudek S, Ma SF, Bresnick AR, Verin AD, Cotter RJ, Garcia JGN: Differential regulation of alternatively spliced endothelial cell myosin light chain kinase isoforms by p60(Src)
 JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 276:(11) pp. 8567-8573. (2001)
 IF: 7,258

Verin AD, **Csortos** C, Durbin SD, Aydanyan A, Wang PY, Patterson CE, Garcia JGN: Characterization of the protein phosphatase 1 catalytic subunit in endothelium: Involvement in contractile responses
 JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY 79:(1) pp. 113-125. (2000)
 IF: 2,775

Garcia JGN, Verin AD, Schaphorst K, Siddiqui R, Patterson CE, **Csortos** C, Natarajan V: Regulation of endothelial cell myosin light chain kinase by Rho, cortactin, and p60(src)
 AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY-LUNG CELLULAR AND MOLECULAR PHYSIOLOGY 276:(6) pp. L989-L998. (1999)
 IF: 3,147

Az értekezést megalapozó közleményeket közlő folyóiratok impakt faktora: **51,758**
Független hivatkozások száma: 228

8.2 További publikációk

A kandidátusi fokozat megszerzése után megjelent közlemények

Kim K, Adyshev DM, Kása A, Zemskov EA, Kolosova IA, **Csortos** C, Verin AD: Putative protein partners for the human CPI-17 protein revealed by bacterial two-hybrid screening

MICROVASCULAR RESEARCH 88:(1) pp. 19-24. (2013)

IF: 2,929 (2012)

Zákány R, Sziogyártó Z, Matta C, Juhász T, **Csortos** C, Szűcs K, Czifra G, Bíró T, Módis L, Gergely P: Hydrogen peroxide inhibits formation of cartilage in chicken micromass cultures and decreases the activity of clacineurin: implication of ERK1/2 and Sox9 pathways

EXPERIMENTAL CELL RESEARCH 305:(1) pp. 190-199. (2005)

IF: 4,148

Kiss E, Murányi A, **Csortos** C, Gergely P, Ito M, Hartshorne J, Erdődi F: Integrin-linked kinase phosphorylates the myosin phosphatase target subunit at the inhibitory site in platelet cytoskeleton

BIOCHEMICAL JOURNAL 365: pp. 79-87. (2002)

IF: 4,589

Csortos C, Lazar V, Garcia JG: Screening cDNA libraries using partial probes to isolate full-length cDNAs from vascular cells

In: Baker AH (szerk.) Vascular Disease: Methods Molecular Medicine, Vol. 30.

Totowa: Humana Press, 1999. pp. 59-72. (ISBN:978-0-89603-731-1)

A kandidátusi fokozat megszerzése előtt megjelent közlemények

Csortos C, Zolnierowicz S, Bakó É, Durbin SD, DePaoliRoach AA: High complexity in the expression of the B' subunit of protein phosphatase 2A(0) - Evidence for the existence of at least seven novel isoforms

JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 271:(5) pp. 2578-2588. (1996)

IF: 7,452

Pitcher JA, Payne ES, **Csortos** C, DePaoli-Roach AA, Lefkowitz RJ: The G-protein-coupled receptor phosphatase - a protein phosphatase type 2a with a distinct subcellular-distribution and substrate-specificity

PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA 92:(18) pp. 8343-8347. (1995)

IF: 10,52

Csortos C, Tóth A, Erdódi F: Identification of serine/threonine protein phosphatase catalytic subunits by immunoblotting with type-specific antipeptide antibodies

In: Jenei A (szerk.)

EMBO Practical Course Handbook on Signal Transduction and Cell Surface Structure

Debrecen: Debreceni Egyetem, 1995. pp. 31-36.

Zolnierowicz S, **Csortos C**, Bondor J, Verin A, Mumby MC, DePaoli-Roach AA: Diversity in the regulatory B-subunits of protein phosphatase 2A - identification of a novel isoform highly expressed in brain

BIOCHEMISTRY 33:(39) pp. 11858-11867. (1994)

IF: 5,234

Depaoli-Roach AA, Park IK, Cerovsky V, **Csortos C**, Durbin SD, Kuntz MJ, Sitikov A, Tang PM, Verin AD, Zolnierowicz S: Serine/threonine protein phosphatases in the control of cell function

ADVANCES IN ENZYME REGULATION 34: pp. 199-224. (1994)

IF: 2,268

Erdódi F, **Csortos C**, Sparks L, Murányi A, Gergely P: Purification and characterization of 3 distinct types of protein phosphatase catalytic subunits in bovine platelets

ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS 298:(2) pp. 682-687. (1992)

IF: 2,435

Csortos C, Farkas I, Sparks L, Bányasz T, Kovacs T, Gergely P: Phosphorylase-phosphatase activities of rat-liver in streptozotocin-diabetes

BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA 1052: pp. 235-241. (1990)

IF: 2,411

Csortos C, Matko J, Erdodi F, Gergely P: Interaction of the catalytic subunits of protein phosphatase-1 and phosphatase-2A with inhibitor-1 and inhibitor-2 - a fluorescent study with sulfhydryl-specific pyrene maleimide

BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS 169:(2) pp. 559-564. (1990)

IF: 3,606

Sipos A, **Csortos C**, Sipka S, Gergely P, Sonkoly I, Szegedi G: The antigen receptor specificity of antigranulocyte antibodies in patients with SLE

IMMUNOLOGY LETTERS 19: pp. 329-334. (1988)

IF: 1,137

Farkas I, Toth B, Vereb G, **Csortos C**, Gergely P: Activation-dephosphorylation of rabbit muscle glycogen-synthase by the catalytic subunits of protein phosphatase-1 and phosphatase-2A

ACTA BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA HUNGARICA 23: pp. 231-246. (1988)

IF: 0,431

Erdodi F, **Csortos** C, Bot G, Gergely P: Separation of rabbit liver latent and spontaneously active phosphorylase phosphatases by chromatography on heparin-sepharose

BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS 128:(2) pp. 705-712. (1985)

IF: 3,597

Erdodi F, **Csortos** C, Bot G, Gergely P: Effects of acidic and basic macromolecules on the activity of protein phosphatase-1

BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA 827:(1) pp. 23-29. (1985)

IF: 2,717

Az összes közleményre a közlő folyóiratok impakt faktora:

105,2

Független hivatkozások száma:

813

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálásan köszönöm Dr. Gergely Pál, Dr. Virág László, Dr. Erdódi Ferenc és Dr. Dombrádi Viktor, a Debreceni Egyetem Orvosi Vegytani Intézet professzorainak, hogy munkámat folyamatosan támogatták és segítették, példát mutattak az oktató- és kutatómunkában és bíztattak az értekezés elkészítésére. Iránymutatásukkal szerezhettem meg ismereteimet a protein kinázokról és foszfatázokról.

Az értekezés nem készülhetett volna el Dr. Tar Krisztina, Dr. Czikora István, Dr. Boratkó Anita és Dr. Kása Anita munkája nélkül, akiknek segítséget nyújthattam PhD fokozatuk megszerzésében és Boratkó Anitával továbbra is szerencsém van együtt dolgozni.

Köszönöm az Orvosi Vegytani Intézetben minden volt és jelenlegi kollégám, közülük is kiemelve Rónai Tamásné, Dr. Németh Árpádné, Kovács Éva, Dembrovszkiné Kovács Ella és Balogh István mindenkori segítségét, a jó munkahelyi légkört.

Sokat tanultam külföldi tanulmányútjaim során. Dr. Anna DePaoli-Roach laboratóriumában lehetőségem nyílt elsajátítani a molekuláris biológia alapjait. Dr. Joe Garcia és Dr. Alexander Verin laboratóriumában kezdtem el foglalkozni az endotél sejtek molekuláris szintű vizsgálatával, a velük folytatott eredményes kollaboráció nagyban segítette az értekezésben összefoglalt eredmények megszületését. Köszönet külföldi kollégáimnak, akik közül Dr. Anna Birukova, Dr. Konstantin Birukov és Dr. Kyung-Mi Kim nevét szeretném kiemelni.

Köszönöm Családom, szüleim és két lányom szeretetét, önzetlen támogatását és biztatását.