

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

**A TIMAP fehérje szerepe a protein foszfatáz 1 és az
endotél barrier funkció szabályozásában**

Czikora István



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2011

1. TARTALOM

1.	TARTALOM	2
2.	RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
3.	BEVEZETÉS	6
4.	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	7
4.1.	Fehérjék reverzibilis foszforilációja	7
4.2.	A protein foszfatázok csoportosítása és jellemzésük	8
4.3.	Protein foszfatáz 1	10
4.4.	A miozin foszfatáz enzim felépítése és regulátor alegységei	13
4.4.1.	A MYPT fehérjecsald	14
4.4.2.	A TIMAP fehérje	15
4.5.	Foszfatázok szerepe az endotél barrier funkcióban	16
4.6.	PP2A, PP2B és a citoskeleton	19
4.7.	Az ERM fehérjecsald	20
5.	CÉLKITŰZÉSEK	22
6.	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	23
6.1.	Anyagok	23
6.1.1.	Vegyszerek	23
6.1.2.	Táploldatok, táptalajok	23
6.1.3.	Pufferek, oldatok	24
6.1.4.	Oligonukleotid primerek	25
6.1.5.	Expressziós vektorok	25
6.1.6.	Baktériumtörzsek	25
6.2.	Módszerek	26
6.2.1.	Reverz transzkriptáz (RT) reakció és polimeráz láncreakció (PCR)	26
6.2.2.	Restrikciós hasítás	26
6.2.3.	Ligálás	27
6.2.4.	Agaróz gélelektroforézis	27
6.2.5.	DNS kinyerése agaróz gélből	27
6.2.6.	<i>E. coli</i> transzformáció	27
6.2.7.	Plazmid preparálás	28
6.2.8.	DNS szekvenálás	28
6.2.9.	GST-fúziós fehérjék előállítása és tisztítása	28
6.2.10.	Sejtkultúra	29
6.2.11.	Sejtek tenyésztése, passzálása	30
6.2.12.	TIMAP csendesítése siRNS technikával	30
6.2.13.	In vitro GST Pull-Down Assay	31
6.2.14.	Immunprecipitáció	31
6.2.15.	Immunfluoreszcencia	31
6.2.16.	SDS-PAGE, Western-blot	32
6.2.17.	Protein foszfatáz aktivitás meghatározása	32
6.2.18.	Transzendotél elektromos ellenállás (TER)	33
6.2.19.	Felületi plazmon rezonancia	34
6.2.20.	<i>In vitro</i> fehérje foszforiláció	35
6.3.	Adatok elemzése, kiértékelése	36
7.	EREDMÉNYEK	37
7.1.	TIMAP és a PP1c közötti fehérje-fehérje kölcsönhatás vizsgálata tüdő artéria endotél sejtekben	37

7.2.	A TIMAP szerepet játszik az EC barrier funkcióban	42
7.3.	Moezin/ERM, mint a TIMAP lehetséges célpontjai.....	45
7.4.	TIMAP foszforiláció hatása az ERM foszforiláció szintjére és az endotél barrier funkcióra	48
7.5.	A TIMAP foszforiláció hatása a protein foszfatáz 1 aktivitására.....	53
7.6.	A TIMAP Ser333 és Ser337 oldalláncok foszforilációjának hatása a PP1c-vel való kölcsönhatásra.....	55
7.7.	GSK3 β gátlása csökkenti a forskolin HPAEC sejtekre kifejtett védő hatását trombinnal szemben.....	58
8.	MEGBESZÉLÉS	61
9.	ÖSSZEFOGLALÁS	69
10.	SUMMARY	70
11.	HIVATKOZÁSOK.....	71
12.	TÁRGYSZAVAK	79
13.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	80
14.	FÜGGELÉK	81
14.1.	Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:	81

2. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ATCC - American Type Culture Collection

BSA - borjú szérúm albumin

bp - bázispár

cDNS - komplementer DNS

cpm - beütés per perc (counts per minute)

dNTP - dezoxi-nukleozid-trifoszfát

DTT - ditio-treitol

EC – endotél sejtek (endothelial cells)

EDTA - etilén-diamin-tetraecetsav

EGF - epidermális növekedési faktor

EGTA - etilén-glikol-bisz-(2-amino-metil-éter)-tetraecetsav

ERM - ezrin, radixin, moezin fehérjék

FBS - főtális borjúszerúm

GSK3 β - glikogén szintáz kináz 3 β

IPTG - izopropil- β -D-tio-galaktopiranozid

M20 - miozin foszfatáz 20 kDa regulátor alegysége

MBS - miozin kötő alegység

MLC - miozin könnyűlánc

MLCK - miozin könnyűlánc kináz

MP - miozin foszfatáz

MYPT - miozin foszfatáz regulátor alegysége

MT - mikrotubulus

OD - optikai denzitás

PAGE - poliakrilamid gélelektroforézis

PBS - foszfáttal pufferolt sóoldat (phosphate buffered saline)

PBST - PBS + 0,01 % Tween

PKA - cAMP-függő protein kináz, protein kináz A

PKC - protein kináz C

PMSF - fenil-metil-szulfonil-fluorid

PP1 - protein foszfatáz 1

PP2A - protein foszfatáz 2A

PP2B - protein foszfatáz 2B

PP2C - protein foszfatáz 2C
ROK - Rho kináz
rpm - percenkénti fordulatszám
SDS - nátrium-dodecil-szulfát
SOB - Super Optimal Broth
SOC - SOB + 20 mM glükóz
St - standard
TIMAP- TGF β -inhibited membrane associated protein
TCA - triklór-ecetsav
Tris - tris-(hidroxi-metil)-amino-metán

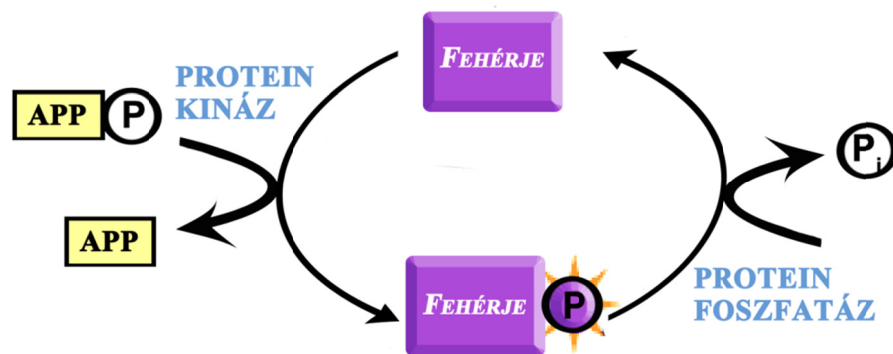
3. BEVEZETÉS

Az endotél sejtekben a kontraktilis és feszítő erők egyensúlya eredményezi a jól működő barrier funkciót. Bioaktív ágensek (pl. trombin) hatására ez az egyensúly felbomolhat, a kontraktilis erők kerülnek túlsúlyba, a sejtek között rések jelennek meg. Ennek következtében növekszik a permeabilitás, az érfal elvesztheti funkcióját és az érintett szervek működése megváltozhat. A sejtek kontrakcióját, pillanatnyi alakját, egymáshoz való illeszkedését, valamint a citoskeleton elemeinek átrendeződését és ezáltal a barrier funkciót is, számos citoskeletonális és ahhoz asszociálódó fehérje foszforilációs állapota befolyásolja. A kontrakció létrejöttében az akto-miozin kölcsönhatás és a miozin könnyűlánc foszforilációja az endotéliumban is részletesen jellemzett. A miozin könnyűlánc (MLC) miozin könnyűlánc kináz általi foszforilációja barrier diszfunkciót vált ki hasonlóan a simaizom sejtekhez. Az MLC defoszforilációját pedig a miozin foszfatáz (MP) katalizálja [1], amely a protein foszfatáz 1 katalitikus és MYPT (myosin phosphatase target subunit) regulátor alegységekből áll. A citoskeleton további elemei (intermediér filamentumok, mikrotubulus) és a hozzájuk kapcsolódó fehérjék foszforilációs szintjének szabályozása, valamint a PP1 más holoenzim formáinak szerepe kevésbé ismert. A MYPT fehérjecsald tagjai közé sorolják a részletesen tanulmányozott MYPT1 fehérjén kívül még a MYPT2, valamint a hozzájuk hasonló MBS85, MYPT3 és TIMAP (TGF β -inhibited membrane associated protein) fehérjéket. A MYPT-tel való szerkezeti rokonság alapján feltételezhető volt, hogy a TIMAP fehérje is szabályozhatja a protein foszfatáz 1 aktivitását. A TIMAP expressziója magas az endotéliumban más sejtípusokhoz képest és elsősorban membránfehérjeként azonosították, amiből arra következtethetünk, hogy az endotél barrier funkció szabályozásában szerepe lehet. A disszertációban összefoglalt eredményeink mindkét feltételezés helyességét igazolták.

4. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

4.1. Fehérjék reverzibilis foszforilációja

A sejtek biokémiai folyamatainak, mint pl. energia metabolizmusának, a sejtek osztódásának, növekedésének és differenciálódásának, mozgásának, valamint anyagcsere folyamatainak egyik nagyon fontos szabályozása az ezekben a folyamatokban résztvevő fehérjék foszforilálódásán és defoszforilálódásán keresztül történik [2, 3]. A két egymással szoros kapcsolatban lévő, de ellentétes mechanizmusért a protein kinázok és protein foszfatázok a felelősek. A regulációs mechanizmus - a protein kinázok által foszfát csoport beépítése fehérjék Ser-, Thr- vagy Tyr-oldalláncára és a protein foszfatázok által a foszfát csoport lehasítása (hidrolízise) - csak akkor képes szerepét betölteni, ha ez a folyamat reverzibilis (4.1. ábra).



4.1. ábra. A fehérjék foszforilációjának és defoszforilációjának mechanizmusa

A foszfátcsoporthoz történő kovalens kapcsolódás, illetve lehasítása allosztérikusan regulálhatja az adott fehérje biológiai aktivitását, pl. enzimaktivitását, gátolhatja vagy aktiválhatja azok katalitikus centrumát, így egyes enzimek be- és kikapcsolhatók, fehérje komplexek keletkezhetnek, illetve bomolhatnak fel. A szubsztrát fehérjék foszforiláltsági fokát a kinázok és foszfatázok aktivitásának egymáshoz való viszonya határozza meg [4]. Ezért nagyon fontos a protein kinázok és protein foszfatázok közötti egyensúly, működésüknek összhangban kell lenniük. Ha ez az egyensúly felbomlik, bizonyos fehérjék túl- vagy éppen alulfoszforilált állapotba kerülhetnek, és ezáltal elveszthetik funkciójukat.

A humán genomban közel 150 foszfatáz van kódolva és a csoportosításuk különböző módokon történhet, szubsztrát specificitásuk, reakciómechanizmusuk és aminosav szekvenciájuk alapján [3, 4].

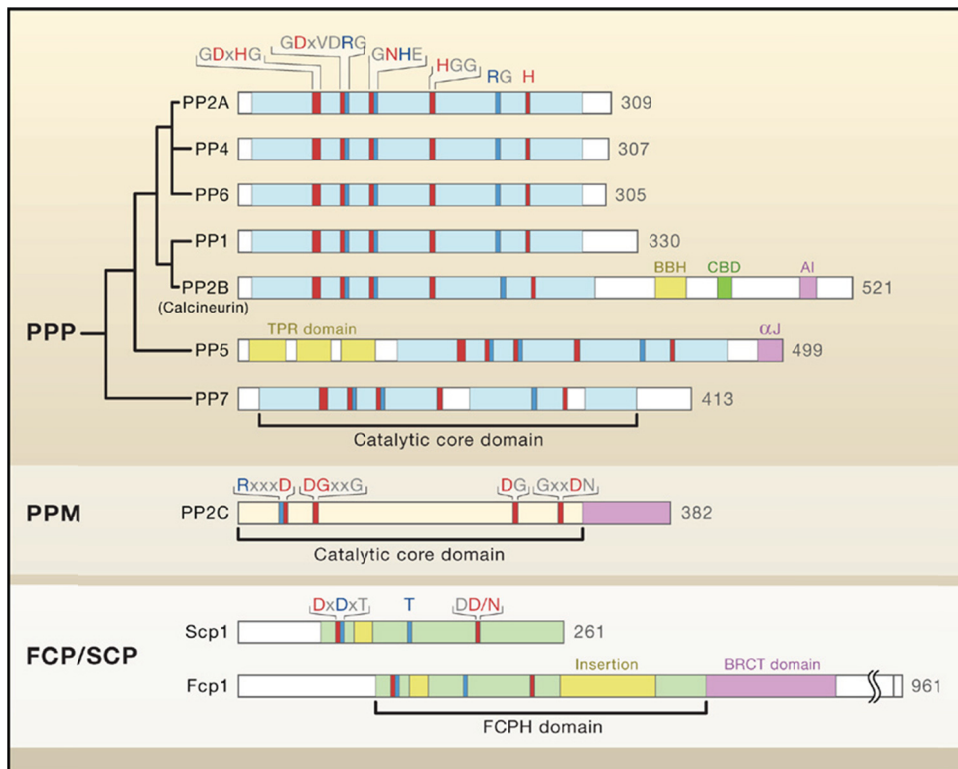
4.2. A protein foszfatázok csoportosítása és jellemzésük

A protein foszfatázok csoportosíthatóak aszerint, hogy a foszfofehérjék milyen aminosav oldalláncát defoszforilálják. Eszerint a foszfatázok egy csoportja a fehérjék foszfoszerin és foszforeonin oldalláncát defoszforilálja, a következő csoportba tartoznak a fehérjék foszfortirozin oldalláncát defoszforilálók, és van egy harmadik család is, amelybe a kettős specificitású foszfatázok (DSP) sorolhatók [5]. Ezek a fehérjék Ser/Thr és Tyr oldalláncairól egyaránt képesek a foszfátot lehasítani [6]. A szubsztrátspecificitás és a hőstabil inhibitor fehérjékkel szembeni érzékenységük alapján a Ser/Thr specifikus foszfatázok két nagy csoportba sorolhatóak, protein foszfatáz-1 (PP1) és -2 (PP2) típus. A kettős típusú foszfatázok, a fémion függésük alapján tovább osztályozhatók. A PP2A aktivitásához nincs szükség fémionra, a PP2B Ca^{2+} -ion stimulált, míg a PP2C Mg^{2+} -ion függő.

A Ser/Thr specifikus foszfatázok szerkezete, szekvenciája és a katalitikus mechanizmus alapján történő felosztása szerint megkülönböztetünk foszfoprotein foszfatázokat (PPP) és fémion-függő protein foszfatázokat (PPM) (4.2. ábra) [3, 7, 8]. Ide tartoznak a klasszikus és a legutóbb megismert, de még kevésbé jellemzett enzimek, amelyek különböző fajokból származnak [3, 8, 9]. A hasonló szekvenciájú PPP alcsoportba tartozó foszfatázok közül megemlíthetők a Zn/Fe tartalmú enzimek (PP1, PP2A és a PP2B) valamint az új típusú foszfatázok (PP4, PP5, PP6 és a PP7) [3, 10]. A PP2C, amelynek aktivitásához Mg^{2+} -ion szükséges a $\text{Mg}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ függő protein foszfatázok (PPM) alcsoportjába tartozik.

Ismerünk még haloacid dehalogenáz (HAD)-szerű foszfatázokat, valamint aszpartát alapú foszfatázokat (FCP), és az RNS polimeráz II C-terminális régiójára specifikus foszfatázokat (SCP). Az FCP/SCP foszfatázok eddig ismert egyedüli szubsztrátja az RNS polimeráz II C-terminális doménje, amely szerinben gazdag tandem ismétlődéseket tartalmaz [11]. A Tyr-specifikus foszfatázok, illetve kettős specificitású foszfatázok egy külön géncsaládot alkotnak (PTP), közös jellemzőjük, hogy a katalitikus reakcióban kitüntetett szerepe van az aktív centrumban elhelyezkedő

cisztein aminosavnak. A PTP családba tartozó foszfatázok kétlépéses folyamatban végzik a defoszforilációt tiofoszforil enzim intermedier képződése közben [12, 13].



4.2. ábra. A Ser/Thr protein foszfatázok csoportosítása (Shi és munkatársai, 2009).

A humán sejtekben található fehérjék túlnyomórészt Ser (86,4%), Thr (11,8%) és Tyr (1,8%) oldalláncaikon foszforilálódnak [14]. Genetikai vizsgálatok lehetővé tették egy katalógus összeállítását, mely tartalmazza az eukarióta szervezetekben megtalálható kinázokat és foszfatázokat. A humán DNS 518 protein kinázt kódol, melyből 428-at tartanak felelősnek a Ser/Thr oldalláncok foszforilációjáért és 90-re tehető a Tyr oldalláncot foszforiláló kinázok száma [15, 16]. Ezzel szemben, mindössze 147 humán protein foszfatázt ismerünk, amelyek közül 107 tartozik a Tyr foszfatázok közé [15, 17, 18]. Érdekes, hogy a fehérjék foszforilációjának több mint 98%-a a Ser és Thr oldalláncokon történik, és a 147 ismert foszfatáz közül csupán ~40 felel ezek defoszforilációjáért. Ez az ellentmondás a foszfatázok célzott, de sokféle módon történő szabályozásával magyarázható. A ~40 foszfatázból 18 PP2C enzim, amelyhez nem társul más regulátor alegység. A többi Ser/Thr oldalláncokra specifikus foszfatáz funkciójának betöltéséhez a katalitikus alegységekhez további regulátor alegység(ek), illetve más kölcsönható fehérjék kapcsolódhatnak, hogy a megfelelő helyre és/vagy

szubsztrátokhoz irányítsák azokat és szabályozzák aktivitásukat [19]. A sejtekben a PP1 és PP2A, valamint a PP2B foszfatázok a legelterjedtebb és leginkább vizsgált Ser/Thr specifikus foszfatázok.

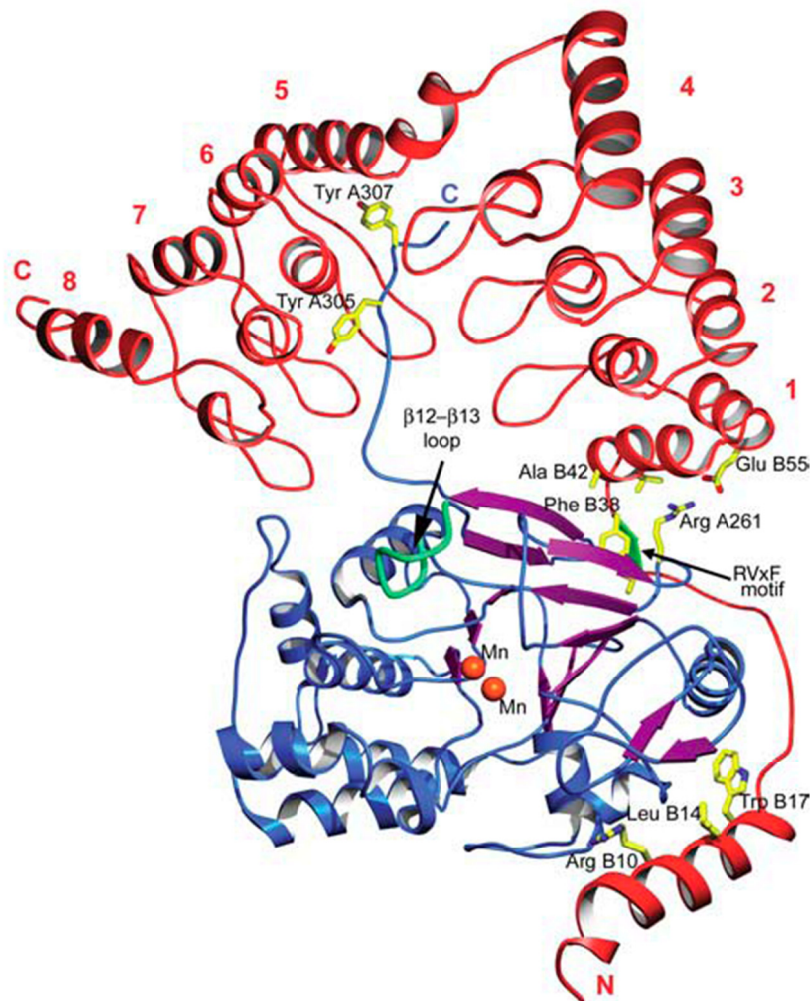
4.3. Protein foszfatáz 1

A PP1 a Ser/Thr foszfatázok egyik legjelentősebb képviselője, amely az eukarióta sejtekben szinte mindenütt jelentős mértékben expresszálódik. A PP1 a foszforiláz kináz α és β alegységei közül a β alegységet (míg a PP2 foszfatázok a foszforiláz kináz α alegységet) defoszforilálja specifikusan [20, 21], aktivitása I-1 és I-2 hőstabil inhibitor fehérjékkel gátolható. Kiemelkedő szerepet tölt be a sejtekben végbemenő folyamatok nagy többségében, mint például a sejtciklusban, az apoptózisban, a fehérjeszintézisben, sejtranszformációban, a citoskeleton újrendeződésében, vagy a membrán receptorok és csatornák szabályozásában [17, 22]. A nagyszámú biológiai folyamat szabályozásában való részvétellel összhangban van a PP1 széles szubsztrátspecificitása.

A PP1 katalitikus alegység aminosav sorrendje erősen konzerválódott az evolúció során az eukarióta szervezetekben, ez a fehérje szekvenciában körülbelül 70 %-os vagy akár nagyobb homológiát jelent. Megállapítható az is, hogy a PPP család tagjainak szerkezete, a fehérjék harmadlagos szerkezete túlnyomórészt hasonló, valamint az aktív centrum is hasonlóan helyezkedik el [3]. A humán PP1 katalitikus alegységének három izoformája ismert: PP1 α , PP1 β/δ és PP1 γ . A γ izoformának további két splice variánsa van: γ_1 és γ_2 . A *Saccharomyces cerevisiae* kivételével (egyetlen PP1 génnel (glc7)) minden eukarióta genomja több PP1 gént kódol (*Arabidopsis thaliana*: 8, *Drosophila melanogaster*: 4, *Caenorhabditis elegans*: feltehetőleg 30) [19].

A 4.3. ábrán a PP1 β kristályszerkezete látható 2,7 Å felbontásban egyik regulátora, a MYPT1 N-terminális (1-299) régiójával komplexben. A fehérje feltekeredése két szorosan összekapcsolódó domént hoz létre: egy N-terminális α/β domént (1-160 aminosav), valamint a C-terminális β domént (161-327 aminosav), amely szintén tartalmaz három α -hélixet. A β -redők nagyrészt a két domén belső határfelülete felé közelítenek, és így alakítják ki a két β -redőből álló β -szendvicset. A PP1 katalitikus helye az Y alakú résben fekszik a két domén között [23-25]. Az Y rés három szárán helyezkedik el a hidrofób árok, a savas árok és a C-terminális árok. A

savas- és a C-terminális árkot választja el egy kiálló hurok (Asn271-Asp277), amelynek nagy szerepe van a különböző szubsztrátok és inhibitorok kötődésében az enzimhez. A PP1c-MYPT1₁₋₂₉₉ komplex katalitikus centrumában kétféle fémiont azonosítottak, az egyik a Mn²⁺-ion, amelyet a tisztítás és kristályosítás során sikerült kimutatni. A másik lehetséges fémion a Fe²⁺, ahogyan a PP1c γ -wolframát komplexben is kimutatható [26].

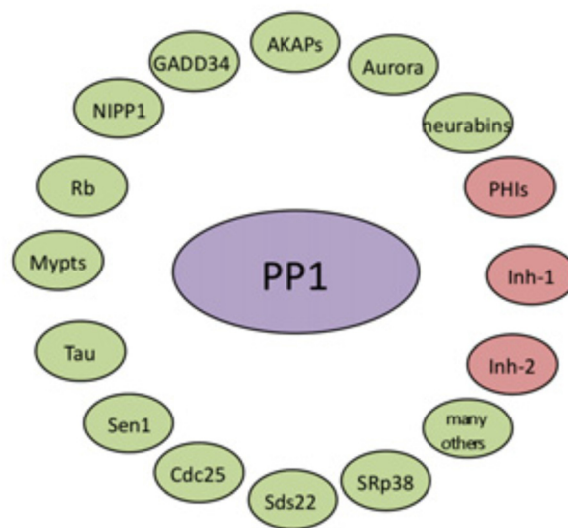


4.3. ábra. A PP1c-MYPT1₁₋₂₉₉ komplex modellje. A PP1c β α -hélix és hurok szerkezeti egységei kék színnel, a β -redők lila színnel, valamint a MYPT1 piros színnel és a két fémion helye a katalitikus centrumban pedig narancssárga színnel vannak kiemelve (Terrak és munkatársai, 2004)

A különféle regulátor alegységek a holoenzimet a sejtek alkotóelemeihez irányíthatják, szabályozhatják a szubsztrátspecifitást, fokozva vagy éppen gátolva a PP1 enzim aktivitását, de akár még szubsztrátként is viselkedhetnek [8, 17]. A

katalitikus és regulátor alegység közötti kölcsönhatás ezért kulcsszerepet tölt be a PP1 működésében [3]. A funkcionális PP1 holoenzimek általában dimer felépítésűek - egy katalitikus alegységből és egy regulátor alegységből állnak (4.4. ábra).

Az ismert PP1 regulátor alegységek aminosav szekvenciája nagyon eltérő, de mindegyik tartalmaz egy rövid (R/K)VxF motívumot. Ezt a konzervált motívumot elsődlegesnek tartják a PP1 katalitikus alegységhez (PP1c) való kötődésben, habár a szomszédos szekvencia részletek is jelentősen befolyásolják az affinitást [8, 17, 27, 28]. Számos regulátor alegység PP1c kötő motívum szekvenciájának alaposabb vizsgálata alapján egy általánosabb, komplexebb motívumot javasoltak: [R/K]-X₀₋₁-[V/I]-X-[F/W]. Ebben az összes lehetséges aminosav szerepelhet, kivéve a prolint [29]. Ezen kívül további PP1c kötő doméneket is leírtak, amelyek segítségével egyetlen PP1 katalitikus alegység nemcsak egy, de több regulátor alegységhez is képes egyszerre kötődni, így heterotrimer szerkezetű holoenzimek is kialakulhatnak [30, 31]. A kötőmotívumot tartalmazó fehérjékre történő szűrések különböző eukarióta szervezetekben a regulátor alegységek számának robbanásszerű növekedését jósolják [19].



4.4. ábra. A protein foszfatáz 1 lehetséges kölcsönható fehérjéi (Virshup és munkatársai, 2009).

Modern szerkezeti vizsgálatok segítségével betekintést nyerhettünk abba, hogyan ismerik fel a foszfatáz holoenzimek a szubsztrátjaikat. Például a PP1 katalitikus alegység és az M110, más néven miozin foszfatáz regulátor alegység 1 (MYPT1, PPP1R112A) együttes kristályosítása kimutatta, hogy az M110 ankirin ismétlődések és

a PP1 katalitikus centrumának határfelülete jelentősen megnöveli a szubsztrátkötő helyet [32, 33].

4.4. A miozin foszfatáz enzim felépítése és regulátor alegységei

A miozin foszfatáz (MP) holoenzim egy katalitikus alegységből (PP1c β) és két regulátor alegységből épül fel, a nagyobb, ~110 kDa-os, miozinhoz is kötődő regulátor alegységből (MYPT1), valamint egy kisebb, 20 kDa-os alegységből (M20) [34]. A MYPT1 az N-terminális végén a PP1c katalitikus alegységgel, a C-terminális végén az M20 regulátor alegységgel van kölcsönhatásban, ily módon hozva létre a holoenzimet. A MYPT1 izoformák szerkezetében alapvető jelentőségű a hét ankirinszerű ismétlődés, amely a MYPT1 izoformák N-terminális részének legkonzerváltabb szekvenciariészlete, valamint a PP1c kötő motívum az ankirinszerű ismétlődések N-terminális szélén. Fontos megemlíteni a MYPT1 foszforilációs helyeit, amelyek egyaránt eredményezhetnek MP aktiválódást, vagy gátlást [35]. Elsőként a MP-t gátló Thr695 foszforilációs helyet mutatták ki [36], amelyet számos kináz képes foszforilálni, mint például a Rho-kináz, integrinekhez kapcsolódó kináz (ILK), a p21-aktivált kináz (PAK), az MDPK, ZIP kináz és Raf-1 kináz [37-43]. A Thr850 oldallánc foszforilációjának - amelyet szintén a ROK katalizál - hatása az enzim aktivitására még nem teljesen tisztázott. A gátló foszforilációs helyek mellett aktiváló helyeket is találunk a MYPT1 szekvenciájában, ezek a Ser691, Ser694 és Ser849, amelyeket ciklikus nukleotid-függő kinázok, PKA és PKG foszforilálhatnak [44]. További foszforilációs helyek még a Thr432, a Thr435, amelyek a PP1c-hez való asszociáció növelésével az enzim aktiválódását eredményezik [45]. A Thr34 oldallánc PKC általi foszforilációja nincs hatással az enzim aktivitására, viszont a PKC az ankirinszerű ismétlődések régiójában is foszforilálja a MYPT1-t, ami gyengíti az MP alegységei közötti kölcsönhatást [46].

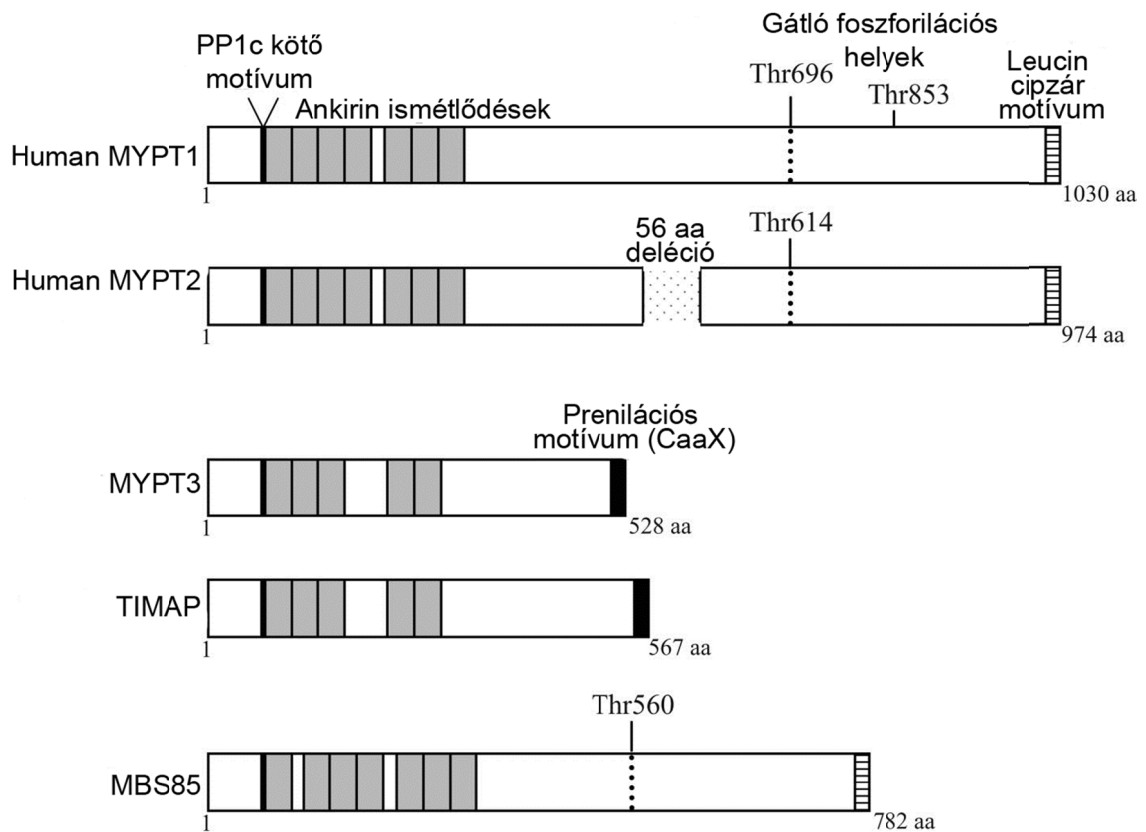
A MYPT gént egy housekeeping génnek tartják, ugyanis a MYPT1 számos szövetben kifejeződik, bár a legtöbb a simaizomban expresszálódik [47, 48]. A MYPT1 klónozása elsőként csirke zúzából és patkány aortából történt. Több izoformáját azonosították, de az izoformákat egyetlen gén kódolja, ami a 12q15-q21.2 kromoszómán helyezkedik el [49]. A MYPT1 izoformák splice variánsként jönnek létre. Ismerünk például kazetta-típusú splice variánsokat, ilyen például a csirke MYPT1 két izoformája, amelyeknél az eltérést az M130 és az M133 között egy 123 nukleotidból álló exon hiánya vagy jelenléte okozza [50]. További splice variánsokban a különbség a

C-terminális végen levő leucin-cipzár motívum hiányában, illetve jelenlétében nyilvánul meg. Így a csirke MYPT1 esetében egy alternatív 31 nukleotidnyi exon hiánya hozzá létre a leucin-cipzár pozitív variánst, míg a leucin-cipzár negatív variáns esetében az exon jelenléte az olvasási keretet eltolja az előzőhöz képest, így a stop kodon a motívum elé kerül [51].

4.4.1. A MYPT fehérjecsald

A MYPT családhhoz sorolnak még további négy másik fehérjét is, amelyek szerkezete különböző mértékben hasonlít a MYPT1-hez. Ezek a MYPT2, MBS85 (myosin binding subunit 85), MYPT3 és a TIMAP (TGF- β -inhibited membrane associated protein). A négy különböző molekula közül a legjobban a MYPT2 (61%) és az MBS85 (39%) hasonlítanak a MYPT1-hez aminosav szinten. Minden, a MYPT családba tartozó fehérje tartalmazza a PP1c-kötő motívumot; a MYPT1-nél ez KVKF, a MYPT2-nél RVRF, az MBS85-nél RTVRF, a MYPT3-nál KHVLF és a TIMAP-nál KVSF [52]. A MYPT család tagjai több konzervált régiót tartalmaznak szekvenciájukban, ezek az N-terminális végen található ankirinszerű ismétlődések, a szekvencia középső részét lefedő gátló foszforilációs helyek, és a C-terminálison található leucin-cipzár motívum (4.5. ábra). A MYPT2 fehérje ~110 kDa méretű, főleg csont- és szívizom sejtekben expresszálódik, de először humán agyból klónozták [53]. A MYPT2 két izoformája ismert, amelyek a C-terminális végükben térnek el egymástól, egy méretben kisebb MYPT2A és egy 112 kDa méretű MYPT2B [52]. Az MBS85 egy 85 kDa méretű molekula, melyet a Cdc42-MRCK kináz szubsztrátjaként azonosítottak [54]. A MYPT2 és MBS85 gének az 1-es és 19-es humán kromoszómákon, azok q32.1 illetve q13.3-13.4 régióiban találhatóak. A MYPT3 egy viszonylag új tagja a MYPT családnak. Élesztő két-hibrid módszer segítségével izolálták egér adipocita cDNS-ből csaliként PP1 α -t használva, kódoló génje a 15-ös egér kromoszómán helyezkedik el [55]. A MYPT család többi tagjával 30-40%-ban azonos aminosav szinten, szerkezetében megtalálható öt N-terminális ankirin ismétlődés és a PP1c kötésért felelős kötőmotívum (KHVLF), hasonlóan a MYPT1 és -2 fehérjékhez. Ugyanakkor a mérete kisebb, 58 kDa és a C-terminális végén nem található meg a leucin cipzár motívum és a gátló foszforilációs helyek sem, de a MYPT1 és -2-től eltérően C-terminális végén egy prenilációs felismerőhely (CAAX motívum) van, amely lehetővé teszi a membránhoz való kötődését. Ezek mellett még ATP/GTP-kötő motívumot is tartalmaz. A MYPT3

képes kötődni a PP1c-hez, valamint kimutatták, hogy a PP1c γ aktivitását gátolja foszforiláz *a* és foszfo-MLC szubsztrátokkal szemben [55]. Más MYPT fehérjékkel ellentétben nem tartalmazza ugyan a konzervált szabályozó foszforilációs helyet, de a protein kináz A szubsztrátja lehet, és *in vitro* kimutatták, hogy foszforilált állapotban P-MLC szubsztráttal szemben növeli a PP1c aktivitását [56].



4.5. ábra. A humán MYPT családba tartozó fehérjék

4.4.2. A TIMAP fehérje

A TIMAP-ot (TGF β -inhibited membrane associated protein) reprezentációs differenciál-analízis (RDA) során detektálták először, miközben glomerulus endotél sejteknek transzformáló növekedési faktor-béta (TGF- β 1) hozzáadására adott válaszát vizsgálták. A TGF- β 1 jelentősen lecsökkenti a TIMAP mRNS szintézisét [57], ezért feltételezhető, hogy a TIMAP-nak fontos szerepe van az endotéliumban történt TGF- β 1 okozta változások helyreállításában, mint például apoptózis, kapilláris morfogenezis és barrier diszfunkció. A TIMAP egy 64 kDa méretű fehérje, és kódoló génje a 20-as humán kromoszóma q11.22. régiójában található [57]. Expressziós szintje az endotél és

vérképző sejtekben igen magas. Patkány szöveteket immunfestéssel vizsgálva nyilvánvalóvá vált, hogy a vaszkuláris endotéliumban fejeződik ki legnagyobb mértékben a TIMAP [57]. Szerkezete nagyon hasonló a MYPT3-éhoz, fehérjeszinten 44,7%-os az azonosság. A már korábban említett szerkezeti elemek közül a TIMAP szekvenciájában megtalálható a PP1c-kötő motívum, a jellegzetes ankirin ismétlődések, és a membránhoz való lokalizációért felelős prenilációs motívum is (4.5. ábra). A MYPT fehérjékhez való hasonlóság alapján feltételezhető volt, hogy a TIMAP is a PP1 regulátora. Élesztő és bakteriális két-hibrid rendszer segítségével néhány lehetséges fehérje partnert mutattak ki, mint például a TIMAP-pal kölcsönható 37/67-kDa méretű laminin receptor (LAMR1), amiről közvetett bizonyítékok alapján feltételezték, hogy egy TIMAP-függő PP1c szubsztrát lehet [58].

4.5. Foszfatazok szerepe az endotél barrier funkcióban

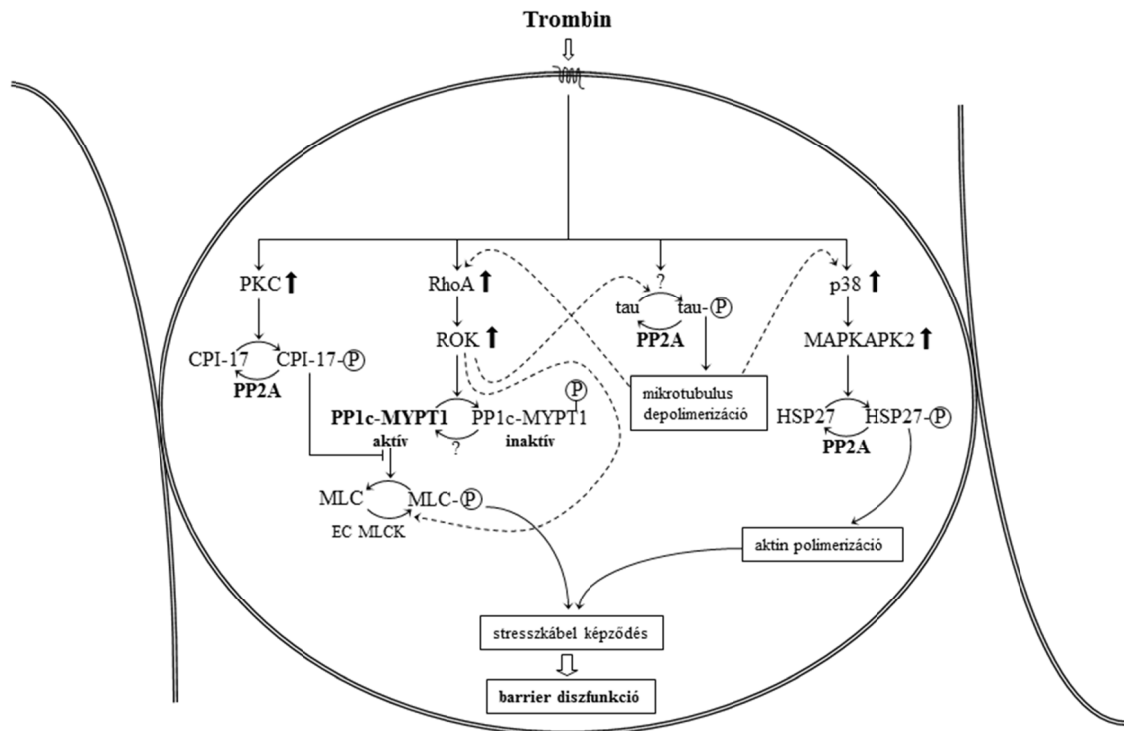
Az endotél sejtek az erek belső falát borító konfluens monolayer alkotó sejtek. A sejtek közötti kommunikációt az adherens kapcsolatok, a szoros kapcsolatok és a rés kapcsolatok biztosítják. Fő szerepük, hogy egy úgynevezett barriert alkossanak a véredények belső tere és az azt körülvevő szövetek között, ily módon szabályozva az intersticiális folyadék és a vérplazma között a makromolekulák áramlását/átjárását. Az endotél monolayer épsége, valamint az endothel sejtek kölcsönhatása az őket körülvevő sejtekkel illetve az extracelluláris mátrix alkotóelemeivel elengedhetetlenül fontos a barrier funkció fenntartásában. Az endotél sejtek egymáshoz való tapadását a homofil sejt-sejt kapcsolatokért felelős transzmembrán adhéziós fehérjéken keresztül a különböző sejtkapcsoló struktúrák alakítják ki. Ezen transzmembrán fehérjék olyan intracelluláris partnerekhez kötődnek, amelyek elősegítik annak a citoszkeletonhoz való horgonyzását, következésképpen stabilizálják a sejt-sejt közötti kapcsolatokat [59]. Az endotél sejtek alakja és ily módon a vaszkuláris permeabilitás is nagymértékben függ tehát a citoszkeleton elemeinek változásaitól. A vaszkuláris endotél sejtekben fellépő kontraktilis és feszítő erők egyensúlyának eredménye a jól működő barrier funkció. Az egyensúly eltolódása a kontraktilis erők irányába a sejtek közötti rések létrejöttét eredményezi. Az aktin mikrofilamentumok, valamint a foszforiláció/defoszforiláció által szabályzott aktin-miozin kölcsönhatások nagymértékben hozzájárulnak a vaszkuláris permeabilitás növekedéséhez. A citoszkeletonhoz asszociálódó fehérjék

foszforilációja/defoszforilációja is fontos szerepet tölt be az endotél barrier funkció szabályozásában.

Simaizomban végzett tanulmányok felfedték azt, hogy a miozin könnyű lánc (MLC) Ser19-es oldalláncának foszforiláltsági szintjét a Ca^{2+} ion mennyiségének változása szabályozza, ugyanis a miozin könnyű lánc kináz (MLCK) aktivitása Ca^{2+} -kalmodulin függő. Az MLC foszforiláltsági szintje emelkedhet Ca^{2+} szenzitizációval, a Ca^{2+} ion koncentráció változása nélkül is. A miozin foszfatáz (MP) gátlásával ugyanis az egyensúly az MLCK és a MP között a foszforiláció irányába tolódik el [60]. A MP-t gátolhatják inhibitor fehérjék (pl. CPI-17) [52, 61], valamint a MP gátlása történhet a MYPT1 foszforilációjával, a MP holoenzim disszociációjával megváltozhat a célirányító szerepe vagy lokalizációja. Így az MLC foszforilációs szintjének fenntartása megvalósulhat közvetlenül azáltal, hogy a ROK foszforilálja az MLC Ser19-es és a Thr18-as, vagy a ROK foszforilálja a MYPT1 Thr696-os és Thr853-as oldalláncokat, amely MP gátláshoz vezet [62]. A MP aktivitását, egy PKC-vel aktivált inhibitor, a 17 kDa tömegű CPI-17 is szabályozhatja. Annak ellenére, hogy *in vitro* számos kináz foszforilálja a CPI-17-t, *in vivo* egyedül a PKC felelős ezért a foszforilációért [63]. A CPI-17 gátló hatása a MP-ra jelentősen megnő Thr38-as oldallánca foszforilációja révén. A PKC aktiválása forbolészterrel simaizomban ezért MP gátlást indukál, ami MLC foszforiláció növekedéshez, illetve sejtkontrakcióhoz vezet. A különféle ágensektől függően a RhoA/ROK és/vagy PKC/CPI-17 útvonal az, amely a miozin foszfatáz gátlását, az MLC foszforilációját mediálja [12].

Hasonlóan a simaizomhoz az ATP, Ca^{2+} -ion, kalmodulin és az EC MLCK szintén fontos elemei az endotélium szabályozásának [64-66]. Az EC MLCK egy nagy molekulatömegű fehérje (214 kDa), amelynek expressziója a humán 3-as kromozómán található génről történik. Ugyanezen gén felelős a kisebb méretű, simaizom MLCK expressziójáért is. Az EC MLCK részletes jellemzése során megállapították, hogy szekvenciája és funkciói is hasonlítanak a simaizomban található változatával [67-71]. Az EC MLCK aktivitásának növekedése MLC foszforilációt vált ki, amelynek következtében az endotél sejtek összehúzódnak a sejtek között rések alakulnak ki, ezzel együtt nő a permeabilitás, így kulcs szerepet tölt be az endotélium barrier funkciójának szabályozásában. Az endotéliumban és a simaizomban a MP aktivitás szabályozása is hasonló. Két jelátviteli útvonal is szerepet játszhat a MP gátlása révén a gátfunkció szabályozásában. Az egyik a vazoaktív ágensek által indukált, főként a ROK által szabályzott RhoA/Rho-kináz útvonal. Pontosabban a ROK

által gátló (Thr696 és Thr853) oldalláncokon foszforilált MYPT és az így gátolt MP eredményezi az endotél permeabilitás megnövekedését [72-75], mert a difoszfo-MLC akkumulálódik és kontrahálnak a sejtek [76, 77]. A másik útvonal pedig a már fentebb említett CPI-17 általi MP aktivitás gátlás, melynél a PKC enzim foszforilálja az inhibitor fehérjét [63]. Ez egyrészt magára a PP1c-re lehet hatással, vagy a MP holoenzimet szabályozhatja anélkül, hogy az disszociálna [78].



4.6. ábra. A barrier diszfunkcióban szerepet játszó jelátviteli útvonalak (Csortos és munkatársai, 2007)

Akut gyulladás következtében a kibocsájtott ATP mennyiségének növekedését tapasztalták [79], ami a barrier funkció megerősödését okozza [80, 81]. Az ATP által kiváltott gátfunkció erősítés mechanizmusának egyik kulcs momentuma a MP aktiválódása [82], ami azt igazolja, hogy a MP aktivitás barriert védő hatású.

A sejtek között rések keletkezhetnek, barrier diszfunkció alakulhat ki a sejtvez átszerveződésének következtében, melyet különféle bioaktív ágensek (pl. trombin) válthatnak ki (4.6. ábra). A gyulladást kiváltó trombin és hisztamin ágensek gyors MLC foszforilációt váltanak ki, megemelik az aktin-miozin kölcsönhatást, ezáltal növekszik az endotélium permeabilitása is [83-86]. A TGF- β szintén MLC foszforilációt okoz az endotéliumban és megemeli annak permeabilitását [87]. Ezzel összhangban van a

vaszkuláris endotél permeabilitás megnövekedése, a mikrotubulusok destabilizálódnak, miközben a MP aktivitása csökken és a MLC foszforilációja növekszik. A vaszkuláris endotélium aktin filamentum és mikrotubulus rendszere szabályozásának tanulmányozása azt sugallja, hogy a két citoszkéletális elem között a szabályozásban párbeszéd van és mindkettő esszenciális szereppel bír a barrier funkció szabályozásában [88, 89].

4.6. PP2A, PP2B és a citoszkélet

A PP1-gyel összehasonlítva sokkal kevesebb tényrt ismerünk a PP2A aktivitásának az endotél sejtek citoszkélet szerkezetének szabályozásában betöltött szerepéről. A citoszkéletban megtalálható PP2A-val kölcsönható fehérjék és ezek szerepe a sejt kontrakcióban vagy elernyedésben még nem teljesen ismert, ennek ellenére ezen a területen is már találhatunk irodalmi adatokat. Például *in vitro* kísérletek azt mutatták, hogy a PP2A felelős a CPI-17 defoszforilálásáért sima izomban [90]. Ezen felül az okadánsav indukált foszforilációja és transzlokálódása a MYPT1-nek is PP2A és változó mértékben ROK kináz függő folyamat HEPG2 sejtekben [91]. Ezen adatok szolgáltatnak bizonyítékot arra, hogy a PP2A részt vesz a MP szabályozásában. Néhány aktin-kötő fehérje, mint például a caldesmon, cofilin, a kisméretű hőszokk fehérje (HSP27) és a mikrotubulusokhoz kötődő tau fehérje további szubsztrátjai a PP2A-nak a citoszkéletban [92-95]. Egyre több bizonyítékot találunk arra, hogy a PP2A és az MT egymással kölcsönhatásban állnak és a PP2A jelentős szerepet játszik a MT stabilizálásában [96-98]. Ezen felül a PP2A változatos B regulátor alegységei és az így létrejövő holoenzim formák különböző szinteken szabályozhatják a barrier funkciót. Munkacsoportunk korábbi eredményei is alátámasztják a PP2A endotéliumban betöltött szerepének fontosságát. A mikrotubulusokat destabilizáló nokodazol kezelés az endotél monolayer-ben rések kialakulását váltja ki. A nokodazol hatása jelentősen fokozható a PP2A gátlásával (okadánsavval), amely a PP2A részvételére utal az endothel sejtek mikrotubulus-mediált barrier funkciójának szabályozásában [99]. Továbbá a PP2A katalitikus (C) alegységének, illetve a C és a szerkezeti A alegységének együttes overexpressziója endotél sejtekben kivédte a nokodazol illetve a trombin mikrotubulust destabilizáló hatását. A PP2A adenovírus konstrukttal fertőzött endotél sejtekben azt tapasztaltuk, hogy a nokodazol vagy trombin kezeléssel kiváltott transzendotél ellenállás csökkenés is mérséklődött a kontroll sejtekhez képest [99]. A HSP27 és tau

fehérjék a PP2A feltételezett szubsztrátjai a citoszkeletonban, melyeket sikerült kimutatni a tubulin gazdag frakcióban a PP2A mellett. A HSP27 illetve tau nokodazol által kiváltott foszforilációja szintén csökkenthető a PP2A overexpressziója révén [99]. Ezek az adatok újabb bizonyítékai a PP2A citoszkeletonra kifejtett védő hatásának.

A PP2B, más néven kalcineurin, mindhárom izoformája expresszálódik a humán endotéliumban, és trombin kezelés hatására az aktivitása is növekszik, amely egyben a katalitikus alegység foszforilációjával jár együtt. További megfigyelések támasztják alá a citoszkeletonban, barrier funkcióban betöltött szerepét, mint például a kalcineurin gátlása csökkenti a trombin kezelés következtében foszforilálódott citoskeletális fehérjék defoszforilációját [100].

4.7. Az ERM fehérjecsalád

Ismert, hogy a MP elsődleges szerepe a miozin defoszforilációja, de számos más folyamat szabályozásában is részt vehet. A MP regulátor alegysége, a MYPT1 ugyanis közvetlenül képes kötődni az F-aktint kötő fehérjékhez, mint például az ERM fehérjecsalád tagjai. Az ide tartozó fehérjék (ezrin, radixin, moezin) egyik fontos szerepe a plazmamembrán és az aktin filamentumok közötti keresztkötés biztosítása [101-105]. Főleg azokban a régiókban, ahol az aktin filamentumok asszociálódnak a plazmamembránhoz, vagyis a mikrovillusok, sejt-sejt adhéziós oldalak, sejt-szubsztrát oldalak mentén expresszálódnak illetve lokalizálódnak nagy mértékben [103, 106-112]. Az ERM fehérjék N-terminális FERM (Fourpoint-one ERM) doménje közvetlenül vagy közvetve kötődik valamilyen nélkülözhetetlen membránfehérjéhez, a C-terminális domén pedig közvetlenül az aktinnal lép kölcsönhatásba [107, 113, 114]. Az ezrin fehérjéről később kiderült, hogy az N-terminális domén is képes részt venni az F-aktinhoz való kötődésében [115]. Részt vesznek tehát a membrán struktúrák morfogenezisében és a sejt adhéziós folyamatokban is, amelyek molekuláris mechanizmusa még nem teljesen jellemzett. Az ERM fehérjék funkcionális gátlása újabb eredményekkel szolgált azzal kapcsolatban, hogy mi is valójában a szerepe ezeknek a fehérjéknek. Az ezrin, radixin, moezin fehérjék expressziós szintjének együttes csökkentése antisense oligonukleotidokkal a sejt felszíni membrán szerkezetek eltűnését váltotta ki thymoma sejtekben [112]. Továbbá egér epitél sejtekben is gátló hatást tapasztaltak hasonló kísérleti körülmények között a sejt mátrix kialakulásánál és a sejt-sejt adhéziós folyamatoknál. Ezek, és még számos más irodalmi adat is

egyhangúan bizonyítja az ERM fehérjék fontosságát a sejtek alakjának kialakításában és fenntartásában [116].

A C-terminális régió aktin kötő doménje mindhárom fehérje esetében tartalmaz egy foszforilációs helyet: ezrin (Thr566), radixin (Thr563) és moezin (Thr557). Ezek a helyek protein kináz C theta (PKC θ) vagy Rho kináz által foszforilálhatóak. Foszforilálatlan formáik „head to tail” monomereket, dimereket valamint oligomereket alkotnak egymással. A foszforiláció konformáció változással jár, amely lehetővé teszi a fehérjék transzlokálódását, oldható formából „membrán-sejtváz asszociált” formára váltanak *in vivo*. A legtöbb kísérletes sejt- és szövet rendszerben az ERM-ek kölcsönhatása a membránnal és a sejtvázzal mindig szorosan összefügg a fehérjék fokozott foszforilációs szintjével [35, 117].

5. CÉLKITŰZÉSEK

A TIMAP a MYPT család tagja, szerkezetéből adódóan is feltételezhető, hogy a PP1c regulátor alegysége, de ahogy az irodalmi összefoglalóban is utaltam erre, a TIMAP PP1 regulátor szerepe még feltáratlan terület.

A TIMAP asszociációja a plazmamembránhoz, valamint feltételezett PP1 regulátor funkciója egyaránt arra utal, hogy a TIMAP, amely az endotél sejtekben más sejtekhez viszonyítva jelentősen expresszálódik, feltehetően membrán/membránhoz asszociálódó fehérjék foszforiláltsági szintjének szabályozásával részt vehet az endotél barrier funkció szabályozásában.

Ezek alapján fogalmaztuk meg a következő célkitűzéseket:

- TIMAP és PP1c fehérjék kölcsönhatásának vizsgálata különböző vizsgálati módszerek felhasználásával.
- A TIMAP PP1c aktivitást reguláló szerepének igazolása, szubsztrátok azonosítása.
- A TIMAP foszforiláció tanulmányozása a TIMAP-PP1c közötti kölcsönhatásban, illetve a PP1c enzim aktivitásának szabályozásában.
- A TIMAP endotél barrier funkcióban betöltött szerepének tanulmányozása.

6. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

6.1. Anyagok

6.1.1. Vegyszerek

A következőkben felsorolt anyagokat a nevek előtt feltüntetett cégektől szereztük be:

Amersham Biosciences: Hybond ECL nitrocellulóz membrán, *BD Biosciences Pharmingen* egér monoklonális anti-moezin antitest, *Biacore*: GST kapcsolási kit, CM5 sensor chip, *Bio-Rad*: előfestett fehérje standard, agaróz, *Calbiochem*: forskolin, protein kináz A (PKA), *Cell Signaling Technology, Inc.*: nyúl poliklonális anti-PP1 α és anti-foszfo-ERM antitest, *EMD Biosciences*: proteáz inhibitor koktél set III, *GE Healthcare*: bakteriális expressziós vektor pGEX-4T-3 és pGEX-4T-2 (4.9 kb), GST SpinTrap purification module kit, *Izotóp Intézet Kft.*: [γ -³²P]-ATP, *Molecular Probes*: Alexa 488-, Alexa 594-konjugált másodlagos antitestek, Texas Red-phalloidin, ProLong Gold Antifade médium, *New England*: glikogén szintáz kináz (GSK3 β) enzim *Promega*: GoTaq polimeráz, T4 DNS ligáz, restrikciós enzimek; *Bam*HI, *Eco*RI, *Xho*I, *Qiagen*: QIAquick gélextrakciós kit, QIAprep Spin Miniprep plazmid izoláló kit, *R & D Systems*: egérben termeltetett monoklonális anti-PP1c antitest, *Santa Cruz Biotechnology Inc.*: kecske poliklonális foszfo-moezin antitest, *Sigma-Aldrich*: Humán trombin és szfingozin 1-foszfát (S1P), GSK3 β inhibitor (AR-A014418), *Upstate*: nyúl poliklonális anti-PP1c β , nyúl poliklonális anti-ROK α /ROCK-II antitestek, *Zymed laboratories*: rendelésre készült nyúl poliklonális anti-TIMAP antipeptid (NGDIRETRTDQENK) antitest.

Minden más analitikai minőségű vegyszer a Sigma Aldrich cégtől származott.

6.1.2. Tápoldatok, táptalajok

A tápoldatokat autoklávban sterilizáltuk (121°C, 20 perc)

LB (Luria-Bertani-féle) agar: 10 g/l tripton, 5 g/l élesztő kivonat, 10 g/l NaCl, 1,5 % agar, pH 7,0

LB tápoldat: 10 g/l tripton, 5 g/l élesztő kivonat, 10 g/l NaCl, pH 7,0

SOC: 20 g/l tripton, 2 g/l élesztő kivonat, 0,6 g NaCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glükóz, pH 7,0

2xYTA: 16 g/l tripton, 10 g/l élesztő kivonat, 5 g/l NaCl, pH 7,0

Antibiotikum-antimikotikum: (*Gibco*)

FBS (Foetal Bovine Serum): (*Gibco*)

Komplett médium: 80% (v/v) MEM, 20% (v/v) marha szérum, 15 µg/ml Na-piruvát, 1% antibiotikum és antimikotikum (penicillin, 10,000 egység/ml; sztreptomycin, 10 µg/ml; és amfotericin B 25 µg/ml) és 0,1 mM nem-esszenciális aminosavak.

6.1.3. Pufferek, oldatok

1xTAE: 4 mM Tris, 0,1 mM EDTA, 0,114% ecetsav, pH 8,5

1x TE puffer: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0

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

6X DNS mintapuffer: 66,6% szacharóz, 0,416% brómfenolkék

10x PBS (pH 7,4): 35,6 g/l dinátrium-hidrogén-foszfát, 61,5 g/l NaCl

10x PBST (pH 7,4): PBS + 0,1 % Tween 20

Ampicillin oldat: 100 µg/ml végkoncentrációjú Ampicillin

Bradford reagens: 0,1 mg/ml Coomassie Brilliant Blue G-250, 5 v/v%-os 96% etanol, 10 v/v%-os 85% H₃PO₄, az elegyet az elkészítés után szűrtük

BSA (Borjú szérum albumin): 6mg/ml BSA vízben oldva (Bovine Serum Albumin)

Futtató puffer: 25 mM Tris, 192 mM glicin, 0,25 mM SDS

Feltáró (Lízis) puffer: 50 mM Tris, pH=7.5, 0.1 mM EDTA, 28 mM 2-merkapto-etanol, 0.5 mM PMSF (Mr=174.2 g/mol) 2.5 %-osból 1:29 hígítás vagy 100 mM 1:200, 2 mM benzamidin (Mr=156.62 g/mol), 2 µg/ml leupeptin, 2 µg/ml pepstatin, 50 µg/ml lizozim HBS-EP (10 mM HEPES pH 7,4, 0,15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0,005 % Surfactant P20) puffer

IP puffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM nátrium vanadát, 1% NP-40)

PBS: 20 mM Na₂HPO₄, 115 mM NaCl, pH 7,4

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

SDS mintapuffer: 10% glicerin, 5% merkapto-etanol (ME), 2% SDS, 62,5 mM Tris, brómfenolkék

TBST (25 mM Tris-HCl, 0.15 M NaCl, 0.1% Tween-20, pH 7.5)

TCA (10%-os triklór-ecetsav)

TM: 20 mM Tris pH=7.4, 0.1% 2-ME

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

6.1.4. Oligonukleotid primerek

A TIMAP szubklónozásához a kódoló DNS szekvenciát PCR-ral sokszorosítottuk az alábbi primereket a használva:

Sense 5'-TGGGATCCATGGCCAGTCACGTGG-3'

Antisense 5'-CGCTCGAGTCCTAGGAGATACGGCAAC-3'

A mutáns TIMAP (Δ 1-71 aminosav) szubklónozásához pedig a PCR reakcióban az alábbi primereket alkalmaztuk:

Sense 5'-TGGGATCCCTGCTGGAGGCCTCG-3'

Antisense 5'-CGCTCGAGTCCTAGGAGATACGGCAAC-3'

A moesin szubklónozásához használt primerek a következők voltak:

Sense 5'-AAGAATTCCCATGCCCAAACGATCAGT-3'

Antisense 5'-GGCTCGAGTTACATAGACTCAAATTCGTC-3'

Minden primerpárt úgy terveztünk meg, hogy a szubklónozáshoz szükséges restrikciós helyeket tartalmazzák. (BamHI és XhoI, valamint EcoRI és XhoI)

6.1.5. Expressziós vektorok

pGEX-4T-3 (TIMAP, mTIMAP)

pGEX-4T-2 (moesin)

6.1.6. Baktériumtörzsek

Escherichia coli DH5 α : plazmidfenntartó sejtvonala, amelyet a Novagen-től szereztünk be.

Escherichia coli BL-21 (DE3) fehérje expressziós sejtvonala, Invitrogen.

6.2. Módszerek

6.2.1. Reverz transzkriptáz (RT) reakció és polimeráz lánreakció (PCR)

Az endotél sejtekből totál RNS-t izoláltunk TRIzol reagens segítségével a gyári leírás szerint (Invitrogen). A reverz transzkriptáz reakció közege egyszeres RT pufferben a következőket tartalmazta: 2 µg RNS, 0,111 µM oligo(DT), 5 mM dNTP és 200 U M-MLV RT. A reakcióközeget egy órán át 37°C-on inkubáltuk, majd PCR reakcióban használtuk fel templátként.

Első lépésben 94°C-on denaturáltunk 1 percig. A következő lépéseket 5 cikluson keresztül folytattuk: 94°C-on denaturálás 0,5 percig, ezt a lépést a hibridizáció követte, ami 55°C-on 0,5 percig zajlott. Ezután következett a szintézis szakasza 72°C-on 2 percig. Az első 5 ciklust egy 25 ciklusból álló szakasz követte: denaturáció 94°C-on 0,5 perc, hibridizáció *°C-on 0,5 perc, végül a ciklus befejező lépéseként 72°C-on szintézis 2 percig. Végül a mintákat 5 percig a szintézis hőmérsékletén tartottuk.

Az első 5 ciklusban azért alkalmaztunk 55°C-ot és nem *°C-ot, mert a primerek 5' harmada nem komplementer a templáthoz, ugyanis a szubklónozáshoz szükséges hasítási helyeket tartalmazzák.

25 µl PCR közeg összetétele: 5 µl Mg-mentes 5x GoTaq PCR puffer (*Promega*), 1,5 µL 25 mM MgCl₂ (*Promega*), 0,5 µL 10 mM dNTP, 1 vagy 5 µl DNS templát, 20–20 pmol sense és antisense primer, 0,625 U GoTaq DNS polimeráz és nukleáz mentes víz 25 µl-re.

* A különböző primerek olvadáspontjának megfelelő hőmérsékletet jelöli

6.2.2. Restriktions hasítás

Minden restriktions hasítást az enzimet gyártó cég adott enzimre vonatkozó előírásai szerint hajtottunk végre, az enzimnek megfelelő pufferben. A restriktions enzim mennyisége sohasem haladta meg a teljes hasítási közeg 10%-át. 10 µl hasítási közeg egyféle restriktions enzimből 0,5 µl-t tartalmazott. A restriktions hasításoknál a *Promega* cég enzimeit használtuk.

6.2.3. Agaróz gélelektroforézis

A 0,5-6 kB méretű DNS darabok elválasztására 1-1,2%-os agaróz géleket használtunk. Az agarózt 1xTAE pufferben melegítéssel oldottuk fel. Etídium-bromidot (2 µl/100ml) adtunk az oldathoz a DNS láthatóvá tétele érdekében, majd 50 °C-ra hűlés után a gélt futtatótálcában öntöttük meg.

A DNS mintákhoz a saját térfogatuk ötödével egyenlő 6X DNS mintapuffert adtunk, majd ezt követte a minta felvitele a megszilárdult gélre. 80 V feszültség mellett 1X TAE pufferben futtattunk.

6.2.4. DNS kinyerése agaróz gélből

A kinyeréshez a QIAquick gélextrakciós kitjét használtuk fel. A tisztítást a gyártó cég által mellékelt protokoll szerint végeztük. Az izolálás utolsó lépésében a DNS-t 30 µl TE pufferrel eluáltuk.

6.2.5. Ligálás

A ligálást T4 DNS ligázzal végeztük (*Promega*). A ligálási közeg (10 µl) összeállításánál a gyártó cég által biztosított ligáz puffert és az általuk ajánlott körülményeket alkalmaztuk. A ligáláshoz 1:1 molarányban használtuk a vektort és az inzertet.

6.2.6. *E. coli* transzformáció

Frissen tenyésztett (OD= 0,4) DH5α és BL21 *E. coli* sejteket kalcium-kloriddal kezelve tettünk kompetenssé és 500 µl-es részletekben 15% glicerin jelenlétében –80 °C-on tároltuk azokat. A transzformáláshoz szükséges *E.coli* törzsből készített kompetens sejteket jégen felolvasztottuk, majd egyenlő részekre osztottuk (50µl-50µl). 10 percig jégen inkubáltuk a sejtuszpenziót, majd az egyik részlethez hozzáadtuk a DNS-t 2-8 µl-ben (plazmidot), a másikhoz azonos térfogatú TB puffert. 45 perc újabb inkubálás következett jégen, majd 50 másodperc 42° C-os hősoikk, amit 2 perces jégen való inkubálás követett, majd a sejtekhez 450 µl SOC-ot adtunk és 1 órán át 37° C-on rázattuk (180-210 rpm), az antibiotikum rezisztencia kifejlődése érdekében.

Ezután a transzformált sejteket antibiotikumtartalmú LB agar lemezre oltottuk ki. A kontrollként szolgáló, konstruktot nem tartalmazó szuszpenziót, antibiotikumot tartalmazó illetve nem tartalmazó lemezre oltottuk ki. Az LB agar lemezeket 16 órán át 37° C-on inkubáltuk.

6.2.7. Plazmid preparálás

A plazmid izolálás első lépéseként a beépült DNS szakaszt tartalmazó plazmidot hordozó telepeket 100 µg/ml ampicillint tartalmazó 5 ml LB folyékony táptalajba oltottuk le és inkubáltuk egy éjszakán át 37 °C-on, 200 rpm fordulatszámú rázatás mellett. A plazmidot QIAprep Spin Miniprep plazmid izoláló kit segítségével izoláltuk a cég leírása szerint. A beépült DNS méretét a plazmid megfelelő restriktív enzimmel történő emésztését követően agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük 1 %-os gélen. Plazmidpreparáláshoz ezenkívül Novagen (Mobius™1000 Plasmid Kits) és Qiagen midi vagy maxi plazmidpreparáló kitéket is használtunk, ilyenkor a preparálást a cég által leírt használati utasítás alapján végeztük.

6.2.8. DNS szekvenálás

A klónok ellenőrzésére a beépült DNS-t szekvenáltattuk az MTA SZBK Szegedi Biológiai Kutató Központ DNS Szekvenáló Laboratóriumában, illetve Chicago-ban (Sequencing Facility, Cancer Research Center, University of Chicago, Chicago, IL) vektorspecifikus pGEX primerek felhasználásával.

6.2.9. GST-fúziós fehérjék előállítása és tisztítása

A vad típusú- és mutáns TIMAP ($\Delta 1-71$ aminosav) valamint a vad típusú moezin fehérjéket *Escherichia coli* BL21(DE3) sejtekben, pGEX-4T expressziós rendszert használva állítottuk elő glutation-S-transzferáz (GST) fúziós fehérjékként. A rekombináns fehérjék expressziója során minden lépést 37°C-on és 100 µg/ml ampicillin antibiotikum jelenlétében végeztünk. Az expresszió első lépéseként a megfelelő plazmidot tartalmazó baktériumokat 1 % agart tartalmazó LB (10 g/l tripton, 5 g/l élesztő kivonat, 10 g/l NaCl, pH 7,2) lemezre szélesztettük és 16-18 óráig tenyésztettük. Az agarlemezről egy különálló telepet 5 ml 2xYTA tápoldatba oltottunk és 16 óráig ráztuk, majd a felszaporított baktériumok 200 µl-ét 10 milliliterre

hígítottuk. Ezt a tenyészetet 3-4-órán keresztül rázattuk ($OD_{600}=0,6-0,8$), és a rekombináns fehérje expressziót az alábbi táblázat szerint végeztük.

	IPTG koncentráció	hőmérséklet (°C)	idő (óra)
vadtípusú TIMAP	0,1 mM	22	2
mutáns TIMAP	0,1 mM	22	2
vadtípusú moezin	0,1 mM	22	3

További 2-3 óra inkubálás után a sejteket centrifugálással (5 000 g, 15 perc) gyűjtöttük össze. Az üledéket 5 ml PBS-sel mostuk, majd fagyasztottuk. A fagyasztott sejteket 600 µl előhűtött lízis pufferben (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.1% TWEEN 20, 0.2% 2-ME + proteáz inhibitor koktél, 1:200 hígításban) homogenizáltuk szonikálással 2x1 percig. A fehérje tisztítását a GST SpinTrap Purification Module kit (GE Healthcare) segítségével végeztük úgy, hogy a lizátum oldható frakcióját centrifugálással (10 000 g, 20 perc, 4°C) választottuk el, és a felülúszóban levő fehérjét glutation-Sepharose 4B MicroSpin oszlopon történő inkubálással (1-2 óra, 4°C) immobilizáltuk. A mátrixot PBS-sel mostuk és a kötődött rekombináns fehérjét 150-250 µl 10 mM glutationt tartalmazó 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) pufferrel eluáltuk. A glutation S-transzferáz tag eltávolítását trombin proteáz segítségével proteolitikus hasítással végeztük a gyártó cég által mellékelt leírás szerint. A körülbelül 100 µg totál fehérjének megfelelő GST-moezin fúziós fehérjét glutation-Sepharose oszlophoz kötöttük ki és 1x PBS-ben oldott 1 U mennyiségű trombin proteázzal inkubáltuk 16 órán át szobahőmérsékleten. A hasítást követően a trombin proteáz eltávolítása az oldatból p-aminobenzamidin-agarózzal való kevertetéssel történt 30 percen át. Az így eluált GST tag nélküli moezin fehérjét SDS-PAGE-sel ellenőriztük. A TIMAP fehérje esetén is próbálkoztunk trombin proteáz hasítással, de a fehérje nem volt ellenálló, így csupán degradátumokat kaptunk.

6.2.10. Sejtkultúra

Kísérleteinkben marha tüdő artéria (BPAEC, Bovine Pulmonary Artery Endothelial cells): American Type Tissue Culture Collection (CCL 209 sejtvonal) és humán tüdő artéria endotél sejteket (HPAEC, Human Pulmonary Artery Endothelial cells) (Cambrex Bio Science) használtunk.

Az effektorokkal történő kezeléshez a sejteket 70-80 %-os konfluenciáig növesztettük, majd a sejteket 10 μM ATP (30 min), 50 μM forskolin (10 perc), 0.1 μM nokodazol (30 min), 1 μM S1P (3 h), vagy 20 illetve 50 nM trombin (20 perc) jelenlétében inkubáltuk. Kombinált kezelések során a sejteket 30 percig 50 μM forskolinnal előinkubáltunk a trombin kezeléseket megelőzően. A kezeléseket követően a sejtekhez lízis puffert adtunk és felkapartuk, szuszpendálást követően a sejteket SDS-mintapufferben főztük 5 percen át.

6.2.11. Sejtek tenyésztése, passzálása

Kísérleteinkhez a BPAEC sejteket MEM médiumban tenyésztettünk, 20% (v/v) borjú szérum, 1% antibiotikum és antimikotikum, 1% Na-piruvát és 0.1 mM nem-esszenciális aminosavak jelenlétében. 100 %-os konfluencia (T75-ös sejttenyésztő edényben) eléréskor a sejteket passzáltuk: először eltávolítottuk a médiumot, majd a sejteket 3x mostuk 10 ml PBS-sel. Ezután a sejtekhez 2 ml tripszint (0,5 g/l tripszin, 0,2 g/l EDTA) adtunk és 1-2 percig 37 °C-on inkubáltuk, majd ütögetés segítségével leválasztottuk az edény faláról a sejteket. 8 ml médium hozzáadása után a sejtsuszpenziót kettéosztottuk 2 db 50 ml-es Falcon csőbe. Az esetlegesen az edény falán maradt sejteket 50 ml friss médiummal mostuk le és hozzáadtuk a sejtsuszpenzióhoz, majd 4 db 75 cm²-es tenyésztő edénybe 15-15 ml-t tettünk az így elkészített szuszpenzióból és a sejteket CO₂ termosztátban 37 °C-on tenyésztettük, majd 16 és 23 passzálási számok között használtuk fel. A HPAEC sejtvonalat EBM-2 médiumban tenyésztettük (Endothelial Cell Basal Medium-2) (Cambrex) 10% FBS és EGM-2 SingleQuots (Cambrex) növekedési faktorok jelenlétében. A sejtek tenyésztése hasonló körülmények között (37°C, 5% CO₂ és 95% levegő) történt a 6–10 passzálási szám között.

6.2.12. TIMAP csendesítése siRNS technikával

HPAEC sejtekben siRNS technikával TIMAP géncsendesítést hajtottunk végre. SMARTselection-designed TIMAP-specifikus és nonspecifikus siRNS-oligonukleotidokkal (SMARTpool reagens) kezeltünk, amelyeket a Dharmacon Research (Lafayette, CO) cégtől szereztünk be azonnal használható formában. A sejteket 70%-os konfluencia elérése után DharmaFECT1 transzfekciós reagenssel

transzfektáltuk 50 nM végkoncentrációjú siRNS-sel és a 48 órás poszttranszfekciós idő leteltével további kísérletekben használtuk fel.

6.2.13. *In vitro* GST Pull-Down Assay

HPAEC sejteket 60 mm átmérőjű sejttenyésztő edényben tenyésztettünk 100% konfluencia eléréséig, mostuk 2x 4°C-os 1x PBS-sel, majd felkapartuk. A sejtfeltárást 600 µl lízis pufferrel (50 mM Tris-HCl, pH 7.4 puffer, 0.1 % 2-merkaptoetanol és 1:200 proteáz inhibitor koktél) végeztük. A körülbelül 1 mg teljes fehérje tartalmú lizátummal inkubáltuk az 1-1 µmol GST és GST-TIMAP valamint GST-TIMAP mutáns fúziós fehérjékkel, amelyeket glutation-Sepharose mátrixon immobilizáltunk 1 óráig 4°C-on. A mikrospin oszlopokat 3x mostuk 1x PBS oldattal és 150 µl 5x SDS mintapufferrel főztük. Centrifugálással elválasztottuk a mátrixot és a felülúszó 20 µl-ét Western blot analízissel vizsgáltuk.

6.2.14. Immunprecipitáció

A 100 mm átmérőjű sejttenyésztő edényekben tenyésztett HPAEC ill. BPAEC sejtek monolayer-ét 3x mostuk 1x PBS-sel, majd 600 µl immunprecipitációs pufferben tártuk fel. Centrifugáltuk majd az így nyert felülúszót a nem specifikus kötődések elkerülése végett előtisztítottuk 60 µl Protein G-Sepharose-zal (GE Healthcare) 3 órán át, 4 °C-on történő kevertetéssel, majd centrifugáltuk (10000 rpm, 3 perc, 4 °C). Az így előtisztított felülúszót 10-15 µg specifikus antitesttel inkubáltuk 1 órán át 4 °C-on, majd 60 µl Protein G-Sepharose-zal egy éjszakán keresztül, állandó keverés mellett. Mosást követően (3x 1x PBS) a gyantát centrifugálással (10000 rpm, 3 perc, 4 °C) gyűjtöttük össze, majd 160 µl 1x SDS-mintapufferrel főztük 10 percig. Az így kapott mintákat Western blottal analizáltuk.

6.2.15. Immunfluoreszcencia

A HPAEC és BPAEC sejteket üveg fedőlemezekben tenyésztettük közel 100%-os konfluencia eléréséig. A sejteket 1x PBS oldattal mostuk és 3.7 % paraformaldehidet tartalmazó 1x PBS-ben fixáltuk 10 percig szobahőmérsékleten. Minden lépést követően 3x mostuk a fedőlemezeket 1x PBS-sel. A permeabilizálás (0.25 % Triton-X 100

tartalmú TBST-ben szobahőmérsékleten 30 percig) után a sejteket blokkoltuk 2 % BSA-t tartalmazó TBST-vel (30 percig szobahőmérsékleten). Az elsődleges antitestekkel (blokkoló oldatban 1:100 arányban hígított), majd ezután a másodlagos antitestekkel is 1 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk a sejteket sötétben. Mosást követően a fedőlemezeket ProLong Gold Antifade (Molecular Probes, Eugene, OR) médiummal tárgylemezekre rögzítettük és 60x nagyítás mellett Nikon Eclipse TE300 mikroszkóppal, vagy Carl Zeiss Axiolab mikroszkóppal elemeztük a mintákat. A másodlagos antitestek aspecifikus kötődését kontroll kísérletekben ellenőriztük.

6.2.16. SDS-PAGE, Western-blot

A fehérjék molekulatömeg szerinti elválasztását SDS-poliakrilamid gélelektrofórezissel (SDS-PAGE), a Bio-Rad Mini Protean berendezésével végeztük el. A látszólagos molekulatömegek azonosítására előfestett alacsony és közepes molekulású standardot (*Bio-Rad Dual Color standard*) használtunk.

Az elektroforézist (35 mA, 1-1,5 h) követően az elválasztott fehérjéket nitrocellulóz membránra (*Amersham*) transzferáltuk elektromos erőtér segítségével (250 mA), hűtve, transzferpufferben, 1,5 órán át. A nitrocellulóz membrán szabad kötőhelyeit tejporral blokkoltuk (5% tejport tartalmazó TBST) 1 órán át, majd a primer, utána pedig a szekunder, peroxidáz jelzett antitesttel inkubáltuk 3-4, illetve 1 órán át a membránt, amit az egyes lépések között háromszor tíz percig TBST-vel mostunk. A kötődött antitesteket kemilumineszcenciás módszerrel detektáltuk, ECL reagenssel (*Amersham*), és az eredményt röntgenfilmen (*Agfa CP-BU New film*) rögzítettük.

6.2.17. Protein foszfatáz aktivitás meghatározása

A protein foszfatáz aktivitást [γ -³²P]-ATP-vel foszforilált miozin könnyű lánc (Erdődi és mtsai, 1989) szubsztráttal mértük. A mérési közeg 1/3-át alkotta az enzimet tartalmazó kivonat, 1/3-át a megfelelő effektor, vagy TM puffer. A kivonat hígítását, vagyis az enzim mennyiségét úgy állítottuk be, hogy a mérés során a szubsztrát kevesebb, mint 10%-át hasítsa a foszfatáz. Az elegyet 5 percig előinkubáltuk 30 °C-on, majd a reakciót 1/3 össztérfogatnyi szubsztráttal indítottuk. Az elegyet 10 percen át 30 °C-on inkubáltuk, a leállítás 200 μ l 10%-os TCA hozzáadásával történt, a fehérjék kicsapásának elősegítésére még 200 μ l 6 mg/ml-es BSA oldatot is adtunk a közeghez. A

kicsapott fehérjét centrifugálással üleptítettük, majd a felülúszó 400 μ l-ét 5 ml 0,25 M NaOH-hoz adtuk és szcintillációs számlálóban mértük a szubsztrátból felszabadított 32 P_i mennyiségét.

Aktivitméréshez a 0,5 mg/ml koncentrációjú rekombináns moezin fehérjét Rho-kinázzal (0,4 U/ml) két-két és fél órán át foszforiláltuk Rho kináz puffer jelenlétében (20mM MOPS pH 7,2, 25 mM glicerofoszfát, 0,5 mM EGTA and 0,5 mM DTT 1 μ M mikrocisztin LR, 5 mM MgCl₂ és 0,2 mM ATP). A feleslegben maradt ATP-t és mikrocisztint alapos dialízissel távolítottuk el a foszforilált moezintől, amelyet a későbbiekben szubsztrátként alkalmaztunk a foszfatáz aktivitásméréses kísérleteinkben. A 2 μ M koncentrációjú P-moezint 10 pmól rekombináns PP1c β -val defoszforiláltuk 30 percen át 30°C-on különböző effektorok jelenlétében és távollétében (mutáns GST-TIMAP, egyszer foszforilált GST-TIMAP, kétszer foszforilált GST-TIMAP és kontrollként GST fehérje). A reakciót a szubsztrát (P-moezin) hozzáadásával indítottuk, majd forró 5x SDS mintapufferrel állítottuk le és 10 percig forraltuk. A P-moezin foszforilációs szintjét a foszfatáz assay-t követően Western Blot kísérletben ellenőriztük foszfo-ERM antitesttel.

6.2.18. Transzendentél elektromos ellenállás (TER)

A sejtek barrier funkciójának tanulmányozására nagy érzékenységu biofizikai módszert választottunk (electrical cell-substrate impedance sensing system – ECIS, Applied Biophysics, Troy, NY, USA), és az irodalmi hivatkozásokban leírtaknak megfelelően használtuk. A sejteket arany elektróddal (10⁻⁴ cm²) ellátott szövettenyésztő edényekben tenyésztettük és elektrolitként a tenyésztő médiumot használtuk. A totál elektromos ellenállást a teljes monolayer-en keresztül mértük, a meghatározás úgy történt, hogy a mértük a sejtek bazális felszíne és az arany elektródok közötti ellenállást figyelembe véve a fokális adhéziót és a sejtek egymás közötti ellenállását. Amikor a sejtek kitapadnak az elektródra az ellenállás megnövekszik, azonban ha a sejtek lekerekednek, elválnak a felszíntől, vagy csökken az adhéziós készségük, a TER lecsökken [118].

6.2.19. Felületi plazmon rezonancia

A TIMAP különböző formái és a PP1c közötti kölcsönhatást felületi plazmon rezonancia (SPR) mérésekkel vizsgáltuk Biacore 3000 készülékkel. A karboxi-metil dextranszerű CM5 szenzor chip felületét amino-csoport kapcsolós eljárással készítettük elő, 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 ki hozzá. A fennmaradó reaktív csoportokat ezután 1 mM etanolamin (pH 8,5) injektálásával blokkoltuk. A felület előkészítése és a mérések kivitelezése során egyaránt 10 µl/perc áramlási sebességet alkalmaztunk. Ezután a következő lépés a fehérjék immobilizálása volt. A négy különálló felületből három felszínre GST-TIMAP, mutáns (Δ 1-71 as) GST-TIMAP és rekombináns GST, vagy négy felszínre a nem foszforilált-, egyszer foszforilált (S337)-, kétszer foszforilált(S333,S337) - GST-TIMAP és rekombináns GST volt immobilizálva 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 (RU) növekedésének mértékéből határoztuk meg. A vad típusú és mutáns GST-TIMAP-ból körülbelül 1400-1500 RU kötődött ki, ami 1,4-1,5 ng fehérje mennyiségnek felel meg [119]. A kísérletünk második részében a TIMAP foszforilált formáinak immobilizált mennyiségei a következőképpen változtak: a 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 a rekombináns PP1c-t 0,2 µM, 0,5 µM, 1 µM, 2 µM és 3 µM koncentrációban, az immobilizált fehérjék feloldására használt pufferben injektáltuk a felszínre. A fehérjék asszociációját 7 percig követtük, a disszociációs fázisban pedig a kötődő fehérje nélküli puffert injektáltunk 5 percig. A kontroll felületeket ugyanúgy kezeltük, mint a többi felületet, a nonspecifikus kötődés kizárása érdekében. Az így kapott jelet pedig kivontuk a ligandumokkal borított felszíneken kapott értékekből. Az idő függvényeként ábrázolva az immobilizált fehérjékhez kikötődött PP1c mennyiségének (RU) növekedését, görbéket (szenzogramokat) kaptunk, amelyek kiértékelését a BIAevaluation 3.1 szoftver (Biacore) segítségével végeztük egyszerű 1:1 arányú Langmuir kölcsönhatási modell alkalmazásával [119].

6.2.20. *In vitro* fehérje foszforiláció

A rekombináns vad típusú GST-TIMAP *in vitro* foszforilációja során a PKA katalitikus alegységével (200 U PKA/1 mg fehérje) foszforiláltunk. A reakcióelegyet (50 mM Tris-HCl, pH= 7,5; 1mM benzamidin, 1 mM PMSF, 2 mM DTT, 1 mM EGTA, 10 mM NaF, 0,05 mM Na-vanadát, 200 mM MgCl₂, 0,5 mM ATP- γ -S) 30 °C-on inkubáltuk egy órán át. A reakciót protein kináz hozzáadásával indítottuk. A kétszer foszforilált GST-TIMAP előállításához a már egyszeresen foszforilált GST-TIMAP-ból indultunk ki, amelyet GSK3 β (500 U GSK/1 mg fehérje) kinázzal foszforiláltunk. A reakcióközeg 20 mM Tris-HCl-ot pH 7,5, 10 mM MgCl₂-ot, 5 mM DTT-t és 0,2 mM ATP- γ -S-t tartalmazott és a reakcióelegyet 30 °C-on 30 percig inkubáltuk. Mindkét reakció után az elegyet alaposan dializáltuk a feleslegben maradó ATP- γ -S eltávolítása érdekében 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,1 % 2-merkaptoetanol és 0,5 % proteáz inhibitor koktélt tartalmazó oldatban. A további kísérleteinkben (Plazmon rezonancia és aktivitásmérés) a TIMAP ezen ATP- γ -S-tal foszforilált formáit használtuk fel.

Radioaktív foszforiláció esetében 10⁷ cpm [γ ³²-P]-ATP-t (Izotóp Intézet Kft.) használtunk, az előzőekben megadott reakcióközegeket összemértük és azonos körülmények között játszódott le a reakció. A reakcióelegyből meghatározott időközönként (0, 30, 60 és 120 perc) 5-5 μ l mintát vettünk és 2x SDS-mintapufferhez adtuk, illetve kationcserélő papírra (Whatman P81) cseppentettük. A fehérjemintákat SDS-PAGE-sel választottuk el 12 %-os gélen (Laemmli, 1970), majd a Coomassie Brilliant Blue R250 festés után a gélét beszárítottuk. A ³²P beépülést autoradiográfiával detektáltuk Agfa CP-BU New röntgenfilm felhasználásával. A P81-es papírhoz kikötött mintákat 3x 10 percig mostuk 0,5 % H₃PO₄, 10 % TCA oldatban, majd 5 ml 0,25 N NaOH oldatot tartalmazó folyadékszintillációs csövekbe helyeztük és megmértük a minták Cserenkov sugárzását. Ezt követően kiszámoltuk, hogy hány mól foszfát épült be 1 mól rekombináns fehérjébe az adott időpontokig (Witt és Roskoski, 1975). A 60- és 30 perces foszforilálás elegendőnek bizonyult, ugyanis a PKA foszforilációt követően 0,8 mól beépülést határoztunk meg, valamint a PKA/GSK3 β -val való foszforilálás 1,7 mól foszfátot épített be 1 mól fehérjébe. Annak érdekében, hogy a tiofoszforilálás sikerességét megvizsgáljuk, az ATP- γ -S utáni foszforilációt követően a TIMAP-ot tovább foszforiláltuk frissen hozzáadott ATP és kináz jelenlétében, majd a két mintát Western blot segítségével foszfo-szerin elleni antitesttel hasonlítottuk össze, de további foszfát beépülést nem tapasztaltunk.

6.3. Adatok elemzése, kiértékelése

Az amplifikációhoz felhasznált oligonukleotid primereket a DNASTAR program [URL: <http://www.dnastar.com/>] segítségével terveztük. A DNS szekvencia adatok összehasonlítását az NCBI honlapján található align funkció [URL: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>] segítségével végeztük el.

Az immunfluoreszcens felvételek szerkesztése az Adobe Photoshop CS5 képszerkesztő programmal történt.

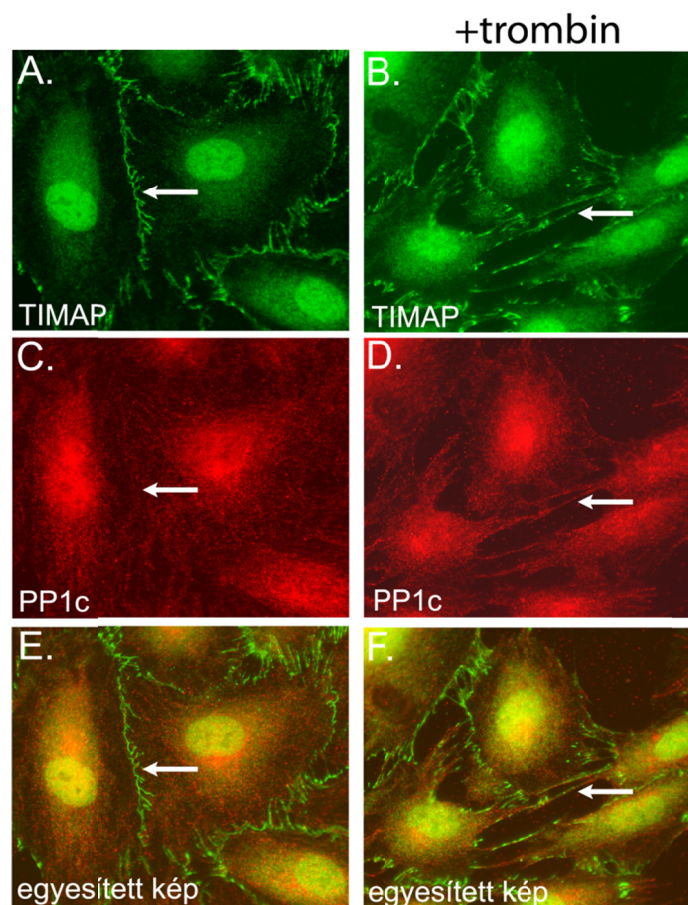
Az eredmények átlagának illetve szórásának (SD) meghatározásához az Excel szoftvert (Microsoft Corporation) használtuk. A statisztikai elemzést szintén az Excel program segítségével, a kísérleti körülményektől függően kétmintás, illetve önkontrollos t-próbával végeztük.

A Western blotok értékelésekor az autoradiogramokat digitalizáltuk egyszerű szkenneléssel, illetve már eleve digitalizált formában nyertük FluorChem FC2 multi-imager berendezéssel és a fehérjesávok intenzitását ImageJ 1.42q (<http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>) szoftverrel denzitometráltuk.

7. EREDMÉNYEK

7.1. TIMAP és a PP1c közötti fehérje-fehérje kölcsönhatás vizsgálata tüdő artéria endotél sejtekben

A TIMAP fehérje N-terminális végéhez közel, az ankirin ismétlődések előtt található PP1c-kötő motívum (63-66 aminosavak, KVSF) és más szerkezeti hasonlóságok a MYPT fehérjecsaláddal [57] a TIMAP és a PP1c közötti kölcsönhatásra utaltak. Ezért a fehérjék közötti kölcsönhatást különböző módszerek segítségével tanulmányoztuk humán illetve marha tüdő artéria endotél sejtekben.

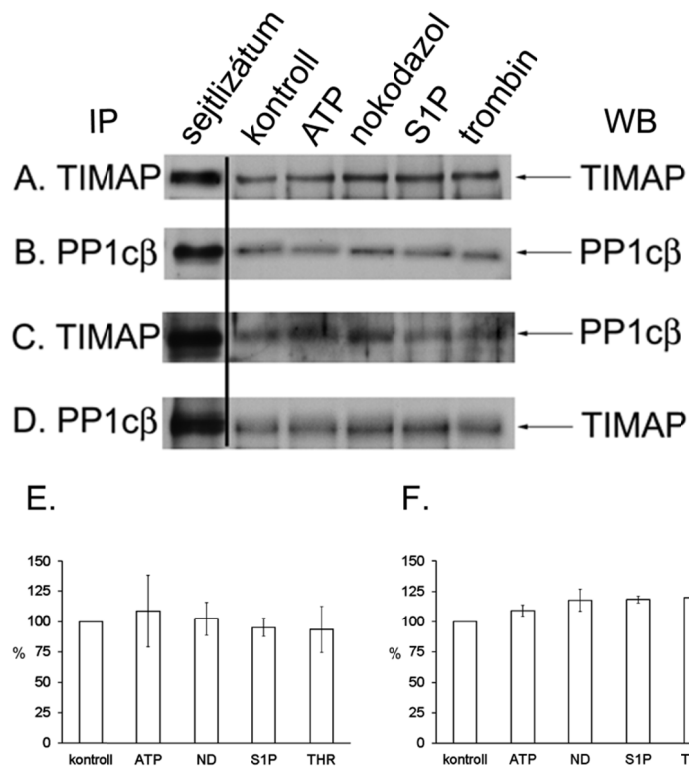


7.1. ábra. Endogén TIMAP és PP1c lokalizációja endotél sejtekben. HPAEC sejtek monolayer-ét inkubáltuk trombin távollétében (A,C,E) és jelenlétében (20 nM, 30 perc) (B,D,F), majd immunfluoreszcens festéssel jelöltük a fehérjéket anti-TIMAP (A,B; zöld) és anti-PP1c (C,D; piros) elsődleges antitesteket használva. E és F egyesített képek (A-C→E és B-D→F). Nyilakkal azonos területeket emeltünk ki a megfelelő képeken. A másodlagos antitestek aspecifikus kötődését kontroll kísérletekben nem tapasztaltuk. Három párhuzamos kísérlet reprezentatív eredményét mutatjuk be.

A humán tüdő artéria endotél sejtek monolayer-ét fixáltuk és TIMAP poliklonális (A,B) valamint PP1c α és β izoformák elleni monoklonális (C,D) antitestekkel jelöltük a fehérjéket. A TIMAP főleg a sejtmembránban és a magban festődik, illetve a citoszolban a perinukleáris térben látható. A PP1c homogén eloszlást mutat a sejten belül, helyenként kihangsúlyozva a filamentum struktúra elrendeződést. Trombin kezelés (B,D,F) hatására a TIMAP eloszlása a sejteken belül nem változik, a PP1c mennyisége viszont nőtt a sejtmembránban. Az egyesített képen a két fehérje részleges kolokalizációját figyelhetjük meg, különösen trombin kezelést követően. Mindkét fehérje expressziós szintje igen magas az endotél sejtekben, ezért bár az immunfluoreszcens festés lehetséges kolokalizációt sugall, nem tudtuk kizárni, hogy ez csak véletlen egybeesés lenne.

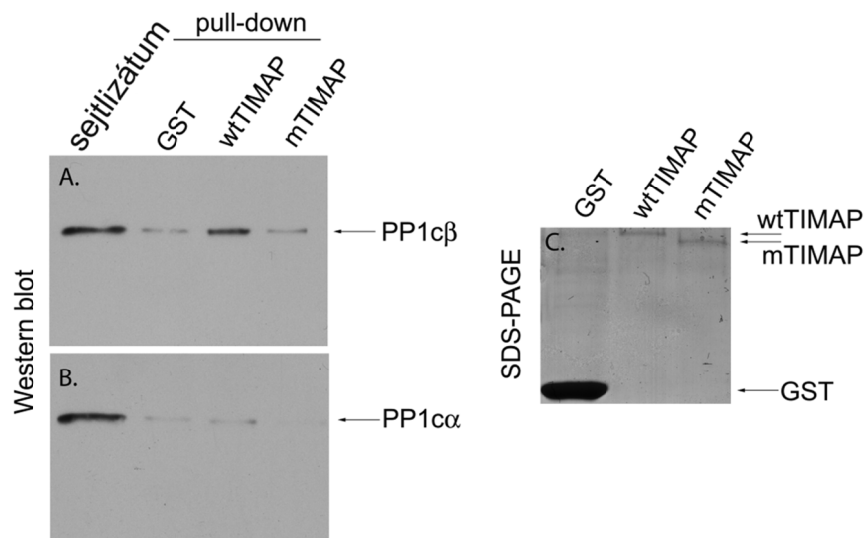
Eredményeink további alátámasztására megvizsgáltuk az endogén TIMAP és PP1c közötti kölcsönhatást endotél sejt-lizátumban. A PP1c-TIMAP komplex kialakulását anti-TIMAP és anti-PP1c (α,β) antitesteket alkalmazva ellenőriztük immunprecipitációs kísérletekben. A HPAEC sejtek lizátumának Western blot analízisével a TIMAP 64 kDa (7.2. ábra A,C), míg a PP1c 36 kDa (7.2. ábra B,D) méretű fehérjeként mutatható ki a fehérjékre specifikus antitestekkel. Az anti-PP1c (α,β) antitesttel kapott immunprecipitátumban TIMAP antitesttel kimutatható a 64 kDa-os fehérje (7.2. ábra D), míg fordított immunprecipitációs kísérletben, a TIMAP antitest immunkomplexében detektálható a PP1c fehérje jelenléte (7.2. ábra C).

Következőekben azt vizsgáltuk, hogy különböző, az endothel sejtek barrier funkcióját befolyásoló kezelések hatására változik-e az immunprecipitátumban a fehérjék mennyisége. Barrier funkciót védő (ATP és S1P), valamint gátló (nokodazol és trombin) ágensekkel kezeltük a sejteket, majd az immunprecipitáció után Western blot módszerrel detektáltuk a TIMAP illetve PP1c fehérjék jelenlétét (7.2. ábra). A mennyiségi analízis elvégzése után nem kaptunk jelentős mennyiségi változást a különböző kezelések hatására. Mindezen eredmények a natív TIMAP és PP1c fehérjék közötti fehérje-fehérje kölcsönhatást igazolják HPAEC sejtek lizátumában. Továbbá azt tapasztaltuk, hogy a barrier funkciót befolyásoló, általunk vizsgált kezelések nem befolyásolják a kapcsolódó TIMAP és PP1c mennyiségét, feltehetően a kötés erőssége nem változhatott jelentősen.



7.2. ábra. Fehérje-fehérje kölcsönhatás TIMAP és PP1c között, valamint barrier funkciót erősítő, illetve barrier diszfunkciót kiváltó ágensekkel való kezelések nincsenek hatással a TIMAP-PP1c közötti kölcsönhatásra. TIMAP- (A,C) és PP1c- (B,D) antitestet kapcsoltunk Protein-G Sepharose gyantához, melyet ezután kezeletlen (kontroll), illetve ATP-vel (10 μ M, 30min), nokodazollal (0,1 μ M, 30 min), szfingozin-1 foszfáttal (S1P; 1 μ M, 3h) vagy trombinnal (20 nM, 30min) kezelt HPAEC sejtek lizátumával inkubáltunk az „Anyagok és módszerek” részben leírtak szerint. Az immunprecipitátumokban kötődött TIMAP (A,D) illetve PP1c β (B,C) fehérjét specifikus antitestekkel detektáltuk. Pozitív kontrollként HPAEC sejtízátumot használtunk. Az ábra C és D részén bemutatott fehérje sávok kvantitatív analízisét denzitometrálással végeztük el, amelynek eredményét az alsó két panelen (E: IP-TIMAP és WB:PP1c; F: IP-PP1c és WB: TIMAP) mutatjuk be.

A natív fehérjék közötti kölcsönhatás kimutatása után kíváncsiak voltunk arra is, hogy találunk-e a különböző PP1c izoformák kötődésében eltérést. Rekombináns TIMAP fehérjével pull-down kísérletben vizsgáltuk, hogy egy endotél sejtízátumból a natív PP1c mely izoformáját köti meg.

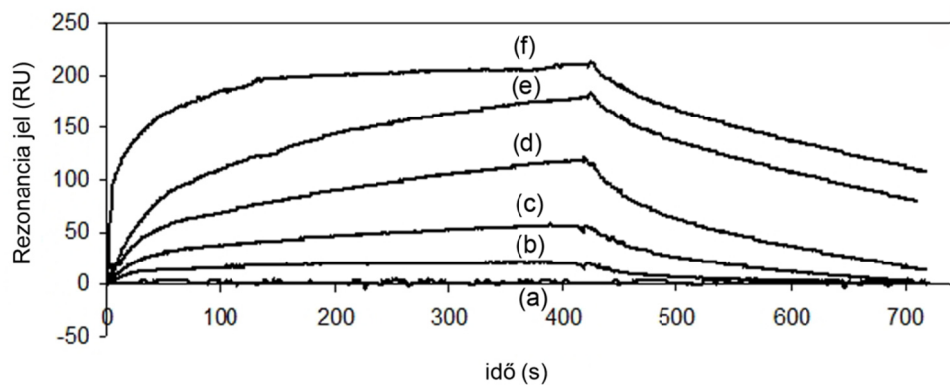


7.3. ábra. A TIMAP és a PP1c különböző izoformái közötti kölcsönhatás specificitásának tanulmányozása. Bakteriális expresszióval előállított GST fúziós fehérjével kapcsolt vad típusú TIMAP-ot (wtTIMAP), mutáns TIMAP-ot (mTIMAP) és GST fehérjét immobilizáltunk glutation-Sepharose 4B-n, majd humán tüdőartéria endotél sejtizátummal inkubáltuk. Többszöri mosás után eluáltuk a fehérje komplexeket, majd Western blot kísérletben PP1cβ (A) illetve PP1cα (B) elleni nyúl poliklonális antitesttel detektáltuk a foszfatáz jelenlétét. Pozitív kontrollként HPAEC sejtizátumot használtunk. A jobb oldalon (C) a glutation-Sepharose oszlopról eluált GST, wtTIMAP és mTIMAP rekombináns fehérjék Coomassie kék festése látható.

A kísérlet kivitelezéséhez GST fúziós fehérjével kapcsolt vad típusú TIMAP-ot, illetve egy olyan mutánst állítottunk elő, amely nem tartalmazta a PP1c kötő motívumot és az első ankirin ismétlődés egy részét. HPAEC sejtizátummal inkubáltuk egy órán át a glutation-Sepharose 4B-n immobilizált rekombináns vad típusú és mutáns TIMAP-ot valamint a GST-t. A kapcsolt és kölcsönható fehérjéket SDS mintapufferrel eluáltuk, majd Western blot analízissel kimutattuk, hogy a sejtizátumból a PP1c β izoformája kötődött a vad típusú GST-TIMAP-hoz, az α izoforma azonban nem (7.3. ábra). A vártan megfelelően a mutáns GST-TIMAP csak jelentéktelen kötődést mutat, amely aspecifikusnak tekinthető. Kontrollként rekombináns GST fehérjét használtunk, amely a mutánshoz hasonlóan nem adott specifikus jelet. Ezen adatok tehát megerősítik a TIMAP és PP1c fehérjék közötti kölcsönhatást HPAEC sejtekben, továbbá azt találtuk, hogy a kötődés izoforma specifikus, a β izoforma specifikus kötődését tudtuk igazolni.

Az immunfluoreszcens, az immunprecipitációs és pull-down kísérletek eredményei egyaránt igazolták a fehérje-fehérje kölcsönhatást. A TIMAP és PP1c

fehérjék kölcsönhatásának további jellemzése céljából felületi plazmon rezonancián (SPR) alapuló kötődési kísérleteket végeztünk. A Biacore készülék alkalmas a különböző molekulák és a szenzor chip felületén kikötött fehérje közötti kölcsönhatás erősségének és specificitásának vizsgálatára. A kapott szenzogram kiértékelésével a kölcsönhatás kinetikájáról kaphatunk további információkat, mint pl. az asszociációs és disszociációs sebességi állandókat, illetve a kölcsönhatásra jellemző asszociációs állandót. A kölcsönhatás SPR módszerrel történő igazolásához GST-TIMAP-ot, kontrollként mutáns GST-TIMAP-ot és GST-t immobilizáltunk anti-GST antitesttel kapcsolt CM5 chip felszínére, majd vizsgáltuk 0,2 μM , 0,5 μM , 1,0 μM , 2,0 μM és 3,0 μM koncentrációban a felületre injektált PP1c kötődését (7.4. ábra).



7.4. ábra. TIMAP-PP1c kölcsönhatás jellemzése felületi plazmon rezonancia módszer segítségével. Mutáns TIMAP-ot (a) és vad típusú TIMAP-ot (b,c,d,e,f) immobilizáltunk CM5 szenzor chip felületére, majd rekombináns PP1c-t injektáltunk a felületre különböző koncentrációkban: 0,2 μM (b), 0,5 μM (c), 1,0 μM (d), 2,0 μM (e), és 3,0 μM (a, f). Biacore 3000 készülék segítségével szenzogramokat kaptunk, melyek a kölcsönhatás következtében fellépő rezonanciajel változásokat mutatják az idő függvényében.

A kapott szenzogramok a PP1c és GST-TIMAP koncentrációfüggő kölcsönhatását mutatják. A szenzogramok alapján a BIAevaluation 3.1 szoftver segítségével határoztuk meg a TIMAP és PP1c kölcsönhatására jellemző asszociációs állandót (K_A), valamint az asszociációs és disszociációs sebességi állandókat (7.1. táblázat). Az illesztések eredményeként PP1c-re az asszociációs állandó (K_A) $1,80 \times 10^6$ 1/M-nak adódott. Nem volt viszont detektálható kölcsönhatás a PP1c kötőmotívot nem tartalmazó mutáns GST-TIMAP és a PP1c között (7.4. ábra (a)). Ez, és a fenti kötődési mintázat, valamint az asszociációs állandó értéke a TIMAP és a PP1c közötti specifikus kölcsönhatást bizonyítja.

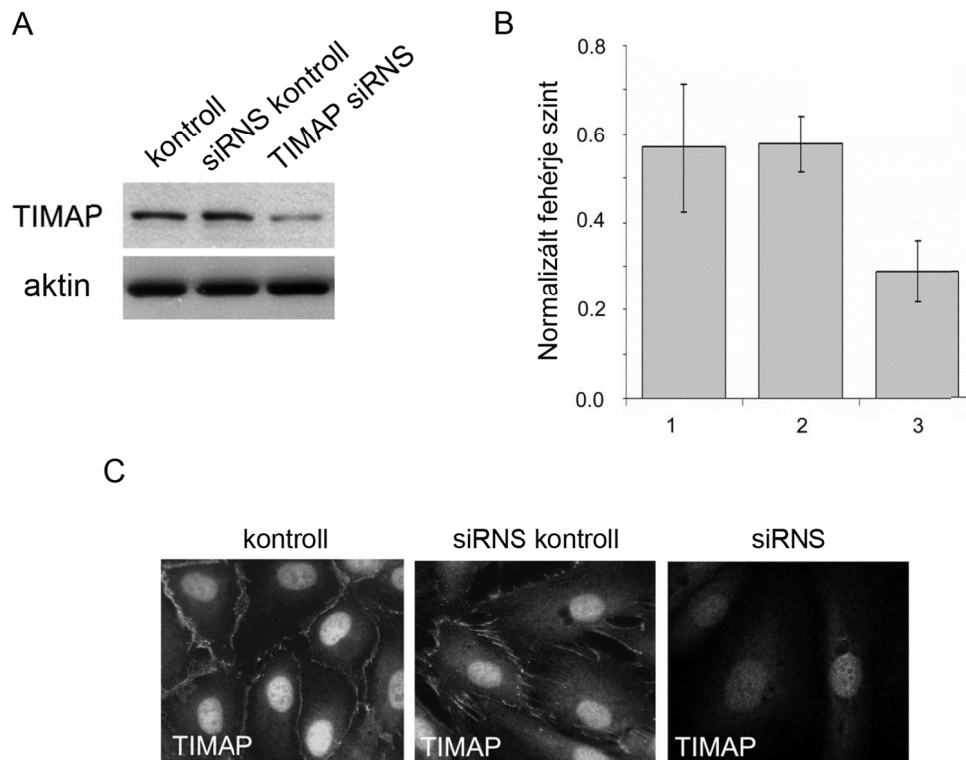
k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_A (1/M)
$6,38(\pm 0,74) \times 10^3$	$2,70(\pm 0,52) \times 10^{-3}$	$1,80 \times 10^6$

7.1.táblázat. A TIMAP és PP1c közötti kölcsönhatásra jellemző állandók. k_a asszociációs sebességi állandó, k_d disszociációs sebességi állandó, K_A asszociációs állandó.

7.2. A TIMAP szerepet játszik az EC barrier funkcióban

Feltételeztük, hogy az endotélium barrier funkciójának szabályozásában a TIMAP fehérjének szerepe lehet, ugyanis az előzőekben leírt kölcsönhatása a PP1c-vel arra enged következtetni, hogy a fehérje a PP1 egy lehetséges regulátor alegysége. A TIMAP a sejtmembránban lokalizálódik, ezért valószínűsíthető, hogy ott a PP1 aktivitást eddig még nem azonosított kölcsönhatások révén membrán, vagy membránhoz asszociáló fehérjé(k)-hez irányítja, szabályozza azok foszforilációs szintjét és ezáltal szabályozza a gátfunkciót. Ennek igazolására TIMAP specifikus siRNS-sel csendesítettük HPAEC sejtekben a TIMAP fehérjét és mértük a transzendentél elektromos ellenállás (TER) változását a monolayer-en különböző kezelések után. Ismert, hogy a TER változás követésével az endotélium gátfunkciójának változásairól kaphatunk felvilágosítást. Az ellenállás növekedése a barrier funkció stabilizálódását, míg csökkenése a barrier funkció gyengülését jelzi [120].

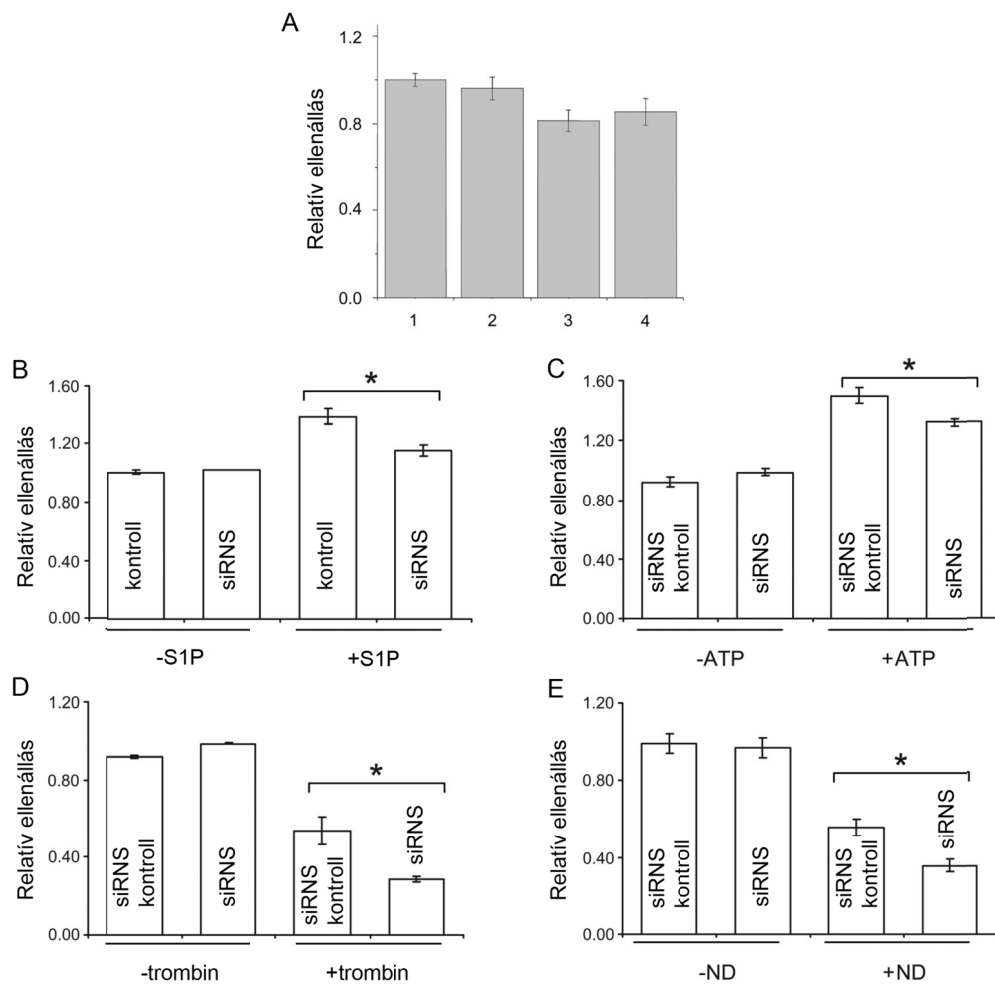
A TIMAP specifikus siRNS kezelés hatására a fehérje mennyiségében számottevő csökkenés volt tapasztalható. Kontrollként nem specifikus siRNS oligonukleotidokat alkalmaztunk, amelyek nem befolyásolták a TIMAP fehérje szintjét HPAEC-ben. Ezt Western blot-tal és immunfluoreszcenciával mutattuk ki (7.5. ábra).



7.5. ábra. TIMAP fehérje csendesítése HPAEC sejtekben. A panel: TIMAP fehérje expressziós szintjének változása Western blot kísérletben. A HPAEC sejteket az „Anyagok és módszerek” részben leírtak alapján transzfektáltuk, majd a sejtizátumokat SDS-PAGE-sel elválasztottuk, és specifikus antitestekkel Western blottal a TIMAP, valamint aktin fehérjéket detektáltuk. B panel: Meghatároztuk a kapott jelek denzitását, négy reprezentatív kísérletet átlagoltunk, és az aktin mennyiségi kontrollra normalizáltunk (1: nem transzfektált, 2: kontroll nem specifikus siRNS-sel, 3: TIMAP siRNS-sel transzfektált). C panel: a TIMAP csendesítés hatékonyságát egy-egy reprezentatív immunfluoreszcencia kísérlet eredményével is bemutatjuk.

HPAEC monolayer-eken bazális ellenállás mérések során azt tapasztaltuk, hogy a transzfekciós reagens nem volt hatással a mért ellenállásra. Mindkét, nem specifikus és specifikus siRNS kezelés jelentéktelen mértékben csökkentette a TER értékeket, közöttük szignifikáns eltérést nem tapasztaltunk (7.6. ábra A). Megvizsgáltuk, hogy a gátfunciót befolyásoló kezelések vajon hogyan hatnak a barrier funkcióra kontroll és TIMAP csendesített endotél sejtekben. A TER mérések során azt tapasztaltuk, hogy a barrier funkciót erősítő S1P és ATP hatása csökkent (7.6. ábra B,C), másrészt a barrier diszfunkciót kiváltó trombin és nokodazol hatása pedig fokozódott (7.6. ábra D,E) azokban a sejtekben, amelyekben a TIMAP-ot csendesítettük, a kontrollhoz képest. Ebből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a TIMAP fehérje valóban szabályozó

szerepet tölt be az endotél sejtek barrier funkciójában, eredményeink azt sugallják, hogy a TIMAP-nak gátfunkciót védő szerepet tulajdoníthatunk.

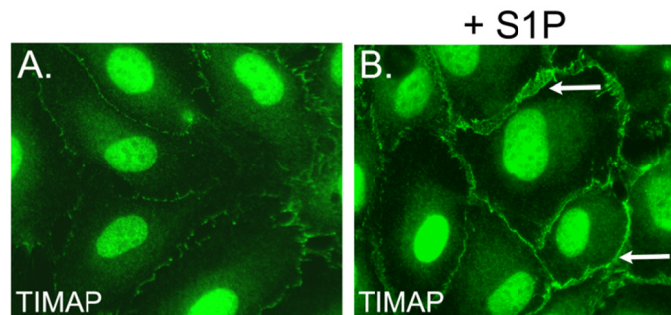


7.6. ábra. TIMAP fehérje csendesítés hatása a HPAEC sejtek barrier funkciójára.

A panel: A nem transzfektált (1), a transzfekciós negatív kontroll (2), a nem specifikus siRNS-sel (3) valamint a TIMAP siRNS-sel (4) transzfektált sejtek bazális transzendentél ellenállását mértük. Három reprezentatív kísérlet eredményének átlagát tüntettük fel, elvégeztük a statisztikai kiértékelést és nem tapasztaltunk jelentős eltérést. B-E panel: nem transzfektált (kontroll), nem specifikus siRNS-sel (siRNS kontroll), illetve TIMAP specifikus siRNS-sel (siRNS) transzfektált sejteket kezeltünk +/- 1 μ M S1P-tal (B), 10 μ M ATP-tal (C), 20 nM trombinnal (D) vagy 0,1 μ M nokodazollal (ND) (E), 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 ábrázoltuk. A statisztikai kiértékelés legalább 3 kísérletből történt. A szignifikanciát (*, $p < 0.01$) kétmintás T-próbával határoztuk meg.

7.3. Moezin/ERM, mint a TIMAP lehetséges célpontjai

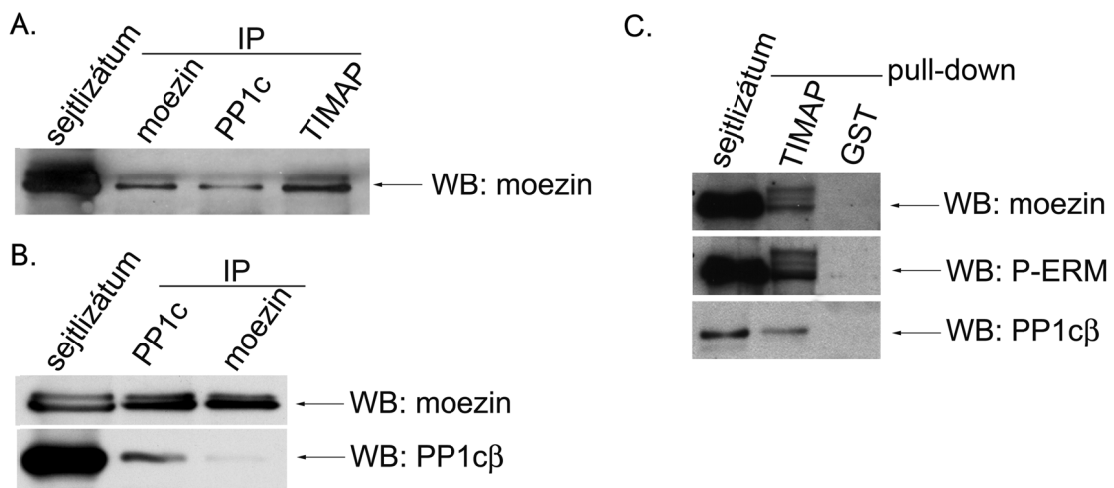
Az eddigi eredményeket összefoglalva a TIMAP fehérje és a PP1c között trombin kezelés hatására immunfluoreszcenciával kolokalizációt tapasztaltunk, és több módszerrel sikerült bizonyítani a fehérjék közötti kölcsönhatást, valamint a TIMAP-nak a barrier funkcióban betöltött pozitív szerepét is valószínűsítettük. További immunfluoreszcenciás felvételeink szerint HPAEC sejtekben S1P kezelést követően, ami a gátfunkciót erősíti, a sejt-sejt kapcsolatok mentén jóval intenzívebbé vált a TIMAP festődése (7.7. ábra) megerősítve azt a feltételezésünket, hogy az endotél barrier funkcióban a TIMAP szabályozó szerepet tölt be.



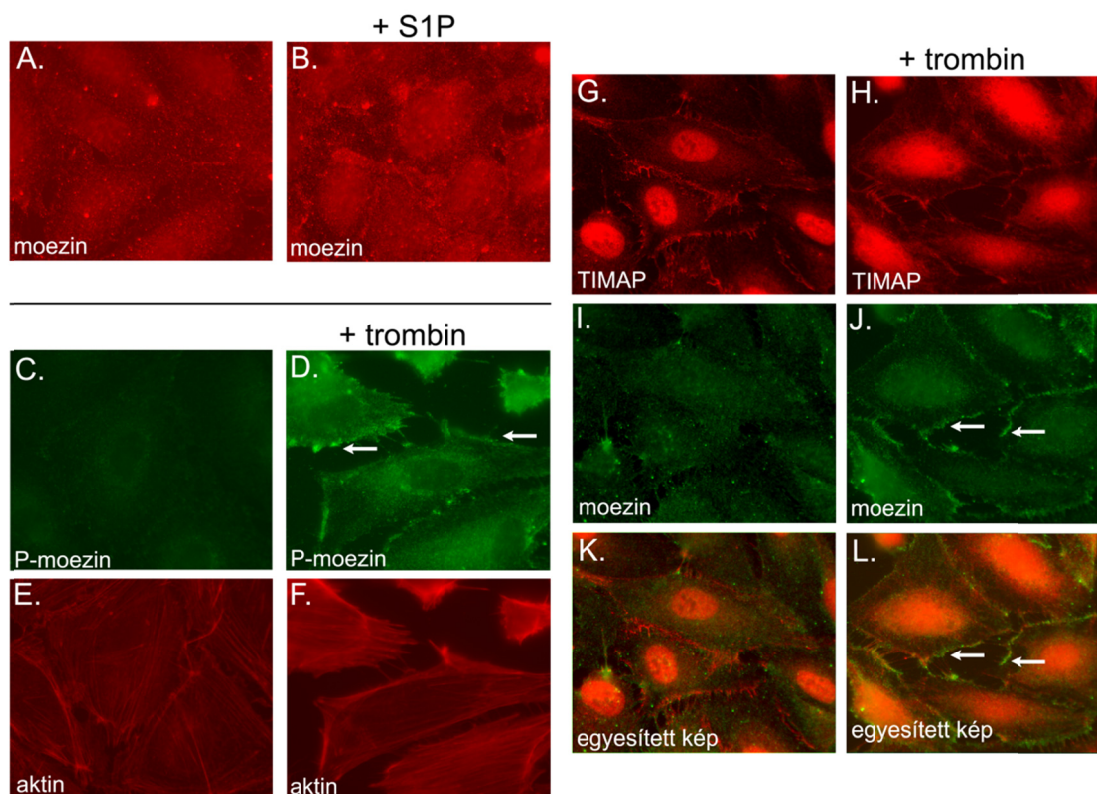
7.7. ábra. TIMAP fehérje lokalizációjának vizsgálata immunfluoreszcenciával HPAEC sejtekben. Kezeletlen (A) és S1P (1 μ M 3 óra; B) kezelt konfluens HPAEC sejtek monolayer-ét anti-TIMAP elsődleges antitestekkel jelöltünk. A nyilak az S1P kezelés hatására megerősödött TIMAP festődést (B) jelölik.

Ismert, hogy az ERM (ezrin, radixin, moezin) fehérjék az F-aktin filamentumokat a plazmamembrán fehérjékhez irányítják, ezáltal a citoszkeletont stabilizálják. Ez a folyamat foszforiláció/defoszforiláció által szabályozott, az ERM fehérjék konformációja ugyanis a C-terminális régiójukban található treonin oldalláncon bekövetkező foszforiláció révén változik [121]. Már korábban kimutatták, hogy MDCK (Madine-Darby canine kidney) sejtekben az ERM fehérjék, és ezek közül is a moezin kölcsönhat a PP1 egyik regulátor alegységével, a MYPT1-gyel [122]. Az MDCK sejtekben nem expresszálódik a TIMAP [58], ezért arra gondoltunk, hogy az endotél sejtekben viszont a membránban jelentős mennyiségben jelenlévő TIMAP a MYPT1 helyett, vagy azzal együtt töltheti be ugyanezt a szerepet, tehát kölcsönhat az ERM fehérjékkel és szabályozza azok foszforilációját, ezáltal a barrier funkciót.

Első lépésben immunprecipitációval és pull-down kísérletekkel próbáltuk meg feltételezésünket igazolni. HPAEC lizátumokban vizsgáltuk a natív PP1c és moezin, illetve a TIMAP és moezin egymáshoz való kötődését, majd pull-down kísérletekben vizsgáltuk rekombináns TIMAP és natív moezin, vagy az ERM fehérjék foszforilált formái közötti kölcsönhatást (7.8. ábra). Az immunprecipitációt anti-moezin, anti-PP1c és anti-TIMAP antitestekkel végeztük, majd a precipitátumban a moezin fehérjét anti-moezin antitesttel detektáltuk. Az immunkomplexekben a megfelelő antitesttel a PP1c-t is detektálni tudtuk. A TIMAP-moezin komplex kialakulásának további megerősítése érdekében baktériumban termeltetett, affinitás kromatográfiával tisztított, immobilizált GST-TIMAP fehérjét HPAEC sejtek lizátumával inkubáltunk. Az elúció után az SDS-PAGE-sel elválasztott komplexben moezint, foszfo-ERM-et és PP1c-t tudtunk kimutatni. Eredményeink igazolják annak a lehetőségét, hogy a TIMAP a PP1c-t az ERM fehérjékhez irányíthatja és ezáltal szabályozhatja azok defoszforilációját.



7.8. ábra. Fehérje-fehérje kölcsönhatás TIMAP, PP1c és moezin között Moezin, PP1c és TIMAP (A), valamint PP1c és moezin (B) specifikus antitestekkel végeztünk immunprecipitációt HPAEC sejtlizátumban, az IP komplexeket SDS-PAGE-sel elválasztottuk, nitrocellulóz membránra blottoltuk és a fehérjéket moezin- illetve PP1cβ- elleni specifikus antitestekkel detektáltuk. C panel: TIMAP - moezin, TIMAP - P-ERM, valamint TIMAP - PP1c kölcsönhatásainak kimutatása pull-down módszerrel HPAEC sejtlizátumból. Kontrollként rekombináns GST fehérjét immobilizáltunk a glutation-Sepharose-on.



7.9. ábra. TIMAP, moesin és foszfo-moesin lokalizációjának vizsgálata immunfluoreszcenciával HPAEC sejtekben. Immunfluoreszcenciával kezeletlen (A,C,E,G,I,K) és S1P (1 μ M 3 óra; B), illetve trombin (20 nM 30 perc; D,F,H,J,L) kezelt konfluens HPAEC sejtek monolayer-ét anti-TIMAP (G,H: piros), anti-moesin (A,B: piros, I,J: zöld) és anti-foszfo-moesin (C,D: zöld) elsődleges antitestekkel jelöltünk. Az aktin (E,F) festést Texas Red phalloidinnel végeztük. A nyilak a trombin kezelés utáni moesin (J,L) illetve foszfo-moesin (D) membrán lokalizációját jelölik.

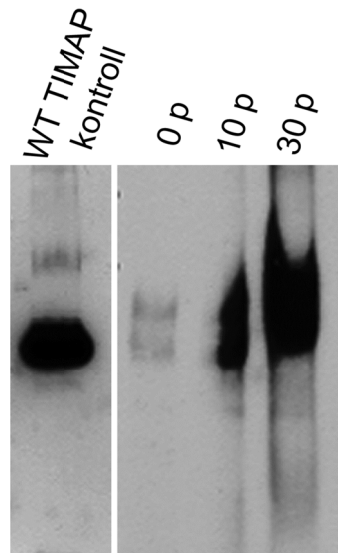
A továbbiakban a TIMAP és az ERM fehérjék esetleges kolokalizációját kívántuk megvizsgálni immunfluoreszcenciával. Moeszinre specifikus monoklonális antitesttel jelölve a sejteket a fluoreszcens festékekkel konjugált másodlagos antitest a fehérje homogén eloszlását mutatta (7.9. ábra A,I). S1P kezelés ezt az eloszlást nem befolyásolta jelentősen (7.9. ábra B), ezzel szemben trombin kezelés hatására határozott feldúsulást tapasztalhatunk a plazmamembrán mentén, tehát a moesin jelentős része a sejtmembránhoz transzlokálódik (7.9. ábra J). A TIMAP festődésében intenzitásbeli különbséget nem figyeltünk meg trombin kezelés előtt és után (7.9. ábra G,H). Kezeletlen sejtek esetében az egyesített képen (7.9. ábra K) nem látható kolokalizáció a moesin és a TIMAP között, ezzel ellentétben a trombin kezelés után (7.9. ábra L) a

fehérjék kolokalizációját tapasztaltuk a sejtmembránnál, amiből szintén a TIMAP és moezin közötti kölcsönhatásra következtetünk. Megállapítottuk továbbá azt is, hogy kontroll sejtekben a moezin foszforilált formája alig detektálható és hasonló diffúz eloszlást mutat, mint a moezin (7.9. ábra C, I). A trombin kezelés viszont jelentősen megemelte a foszfo-moezin szintjét a HPAEC sejtekben és a membránhoz lokalizálódó moezin is foszforilált állapotba kerül (7.9. ábra D, J). Ezek az eredményeink alátámasztották azt a feltételezésünket, hogy a TIMAP részt vesz az ERM fehérjék regulációjában.

7.4. TIMAP foszforiláció hatása az ERM foszforiláció szintjére és az endotél barrier funkcióra

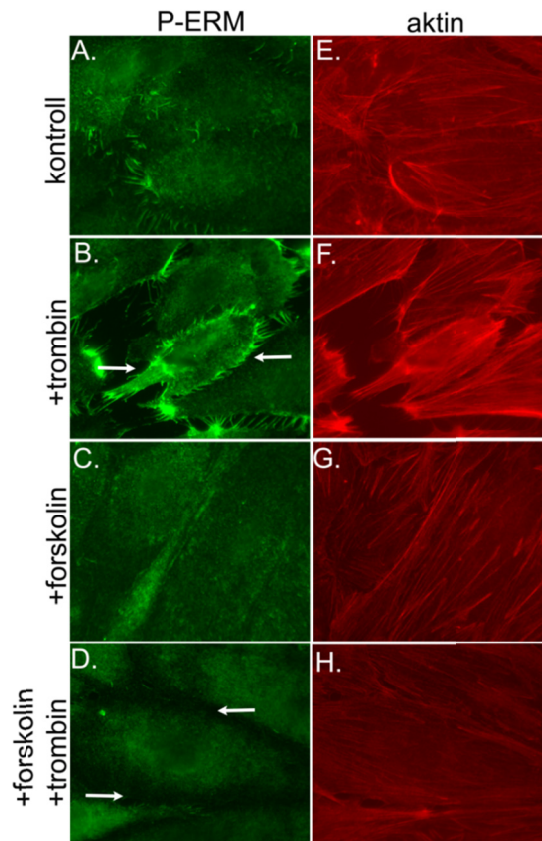
A TIMAP fehérjével rokon MYPT3-ról leírták, hogy számos lehetséges foszforilációs helyet tartalmaz. A MYPT3 PKA-val foszforilálható a Ser 353, majd Ser340 és Ser341 helyeken, de a Ser353 tűnik az elsődleges foszforilációs helynek. Más, MYPT családba tartozó fehérjék foszforilációja PP1c gátlást okoz, ezzel szemben a MYPT3 foszforilációja növeli a PP1c aktivitását [56]. A MYPT3 foszforilációs helyeket tartalmazó régiója nagymértékben homológ a TIMAP fehérjének ugyanezen régiójával, ezért arra gondoltunk, hogy a TIMAP foszforilációja is nagy valószínűséggel növelheti, vagy legalábbis módosíthatja a PP1c aktivitását.

In vitro reakcióközegben megkíséreltük a TIMAP foszforilációját PKA-val. A reakcióközeget a gyártó cég által javasolt módon állítottuk össze és a reakcióközegben radioaktívan jelzett [γ - ^{32}P]-ATP-ot használtunk. Már 10 perc elteltével is detektálható volt a foszfát beépülése, amelynek mértéke 30 perc foszforiláció után 0,8 mol foszfát/mol fehérje volt (7.10. ábra).



7.10. ábra. TIMAP fehérje foszforilációja protein kináz A enzimmel. Bakteriális expresszióval előállított és tisztított GST-TIMAP fehérjét foszforiláltunk protein kináz A-val ^{32}P -ATP jelenlétében. 0-, 10- és 30 perc elteltével mintát vettünk és SDS-PAGE-t követően autoradiogramot készítettünk. Kontrollként az expresszált fehérje Coomassie festése látható a bal oldalon.

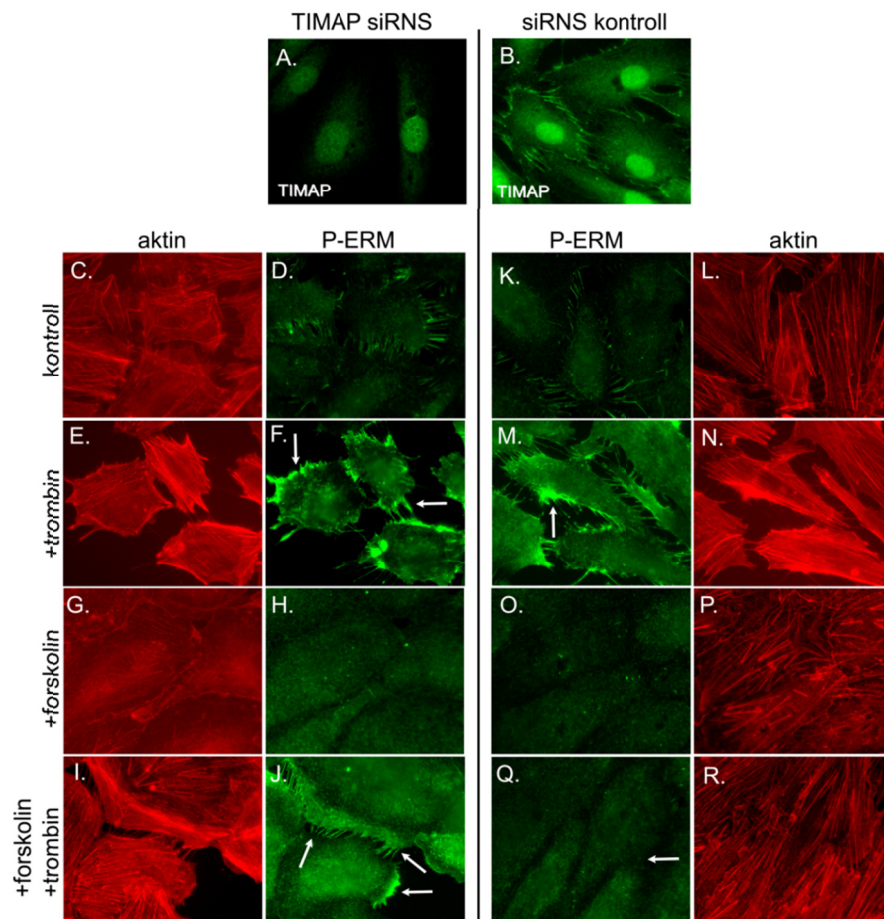
HPAEC sejteket egy adenilát-cikláz aktiváló ágenssel, forskolinnal kezeltünk, hogy PKA aktivitás növekedést indukáljunk. Mivel a TIMAP foszforilált formája elleni antitesttel nem rendelkezünk, azt vizsgáltuk, hogy a TIMAP foszforilációja következtében látunk-e változást az F-aktin szerkezetében (7.11. ábra E-H) és az ERM fehérjék foszforilációs szintjében (7.11. ábra A-D) immunfluoreszcenciás festéssel. Forskolin kezelés után az ERM fehérjék foszforilált formáinak eloszlásában nem tapasztaltunk változást a kontrollhoz képest. A moezinhez hasonlóan a trombin kezelés megnövelte a sejtekben a foszfo-ERM forma mennyiségét, amelynek jelentős része a membránba transzlokálódott. Forskolin előkezelés viszont megakadályozta a trombin okozta stresszkábelek és sejtek közötti rések kialakulását (7.11. ábra H), és teljesen megszüntette a foszfo-ERM festődést a sejt-sejt kapcsolatok mentén (7.11. ábra D).



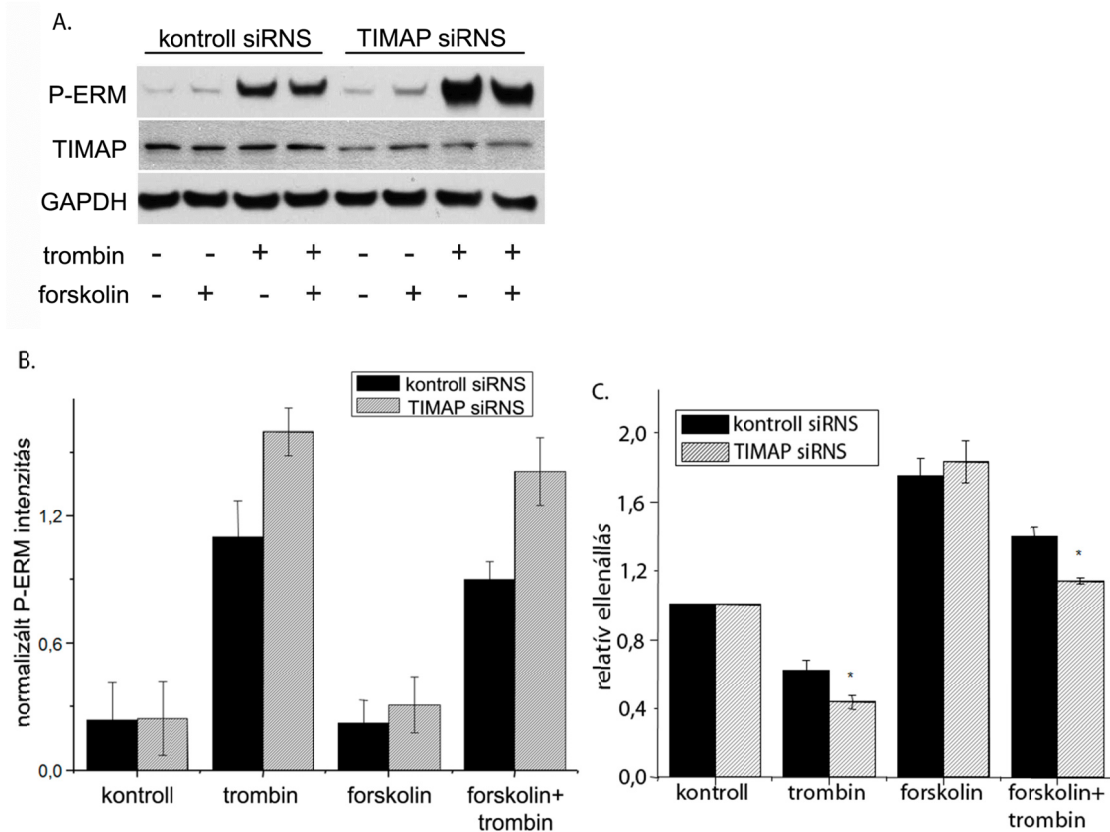
7.11. ábra. Forskolin előkezelés kivédi a trombin által kiváltott barrier diszfunkciót HPAEC sejtekben. HPAEC sejtek monolayer-ét jelöltük anti-foszfo-ERM ellenanyaggal (A-D) illetve Texas Red phalloidinnel (E-H). Kezelés nélkül (A,E) és különböző kezelések után: 50 μ M forskolin (C,G) 10 perc, 20 nM trombin (B,F) 30 perc, 50 μ M forskolin 10 perc után 20 nM trombin 20 perc (D,H) vizsgáltuk a fehérjék eloszlását. Nyilakkal jelöltük a plazmamembránban a foszfo-ERM fehérje feldúsulását trombin kezelés után (B) illetve a forskolin és trombin együttes kezelése után az érintkező membrán régiókat (D).

Az előzőekben bemutatott ECIS eredményeink már a TIMAP pozitív szerepét mutatták a barrier funkcióban. Arra azonban nem rendelkezünk közvetlen bizonyítékkal, hogy a forskolin trombinnal szemben tapasztalt hatása a HPAEC sejtekben valóban a TIMAP foszforilációjának az eredménye. A már korábban alkalmazott TIMAP specifikus siRNS-t használva csendesítést hajtottunk végre HPAEC sejteken, és vizsgáltuk a barrier funkciót befolyásoló ágensek hatását immunfluoreszcenciával. Kontroll, illetve csendesített HPAEC sejtekben trombin kezelés hatására a kezeletlen sejtekhez képest (7.12. ábra C-F és K-N) nem tapasztaltunk szembetűnő változást a foszfo-ERM és az aktin festődésében. Viszont a korábban tapasztalt forskolin által kifejtett védő hatás nem érvényesült az siRNS-sel

csendesített sejtek esetében, a sejt-sejt kapcsolatok mentén a csak trombinnal kezelt sejtekhez hasonlóan a foszforilált ERM fehérje feldúsulása figyelhető meg (J). Ezen eredmények alapján azt feltételezzük, hogy a TIMAP PKA-val történő foszforilációja befolyásolja kölcsönhatását az ERM fehérjékkel, következésképpen a TIMAP foszforilációja a barrier funkció szabályozásának is egyik kulcslépése lehet.



7.12. ábra. A TIMAP csendesítése gátolja a forskolin védő hatását a trombinnal kezelt HPAEC sejtekben. A TIMAP siRNS-sel csendesített (C-J) és a nem specifikus siRNS-sel transzfektált (K-R) HPAEC sejtek monolayer-ét festettük anti-foszfo-ERM ellenanyaggal (D,F,H,J,K,M,O,Q) illetve Texas Red phalloidinnel (C,E,G,I,L,N,P,R). A nem kezelt mintákon (C,D,K,L) és különböző kezelések után: 50 μ M forskolin (G,H,O,P) 10 perc, 20 nM trombin (E,F,M,N) 30 perc, 50 μ M forskolin 10 perc után 20 nM trombin 30 perc (I,J,Q,R) vizsgáltuk a fehérjék eloszlását. A nyilakkal jelöltük a plazmamembránban a foszfo-ERM fehérje feldúsulását TIMAP csendesített sejtekben (F), az siRNS kontrollban (M), a forskolin és trombin együttes kezelése után a csendesített sejtekben (J) illetve a feldúsulás hiányát a nem specifikus siRNS-sel transzfektált sejtekben (Q).



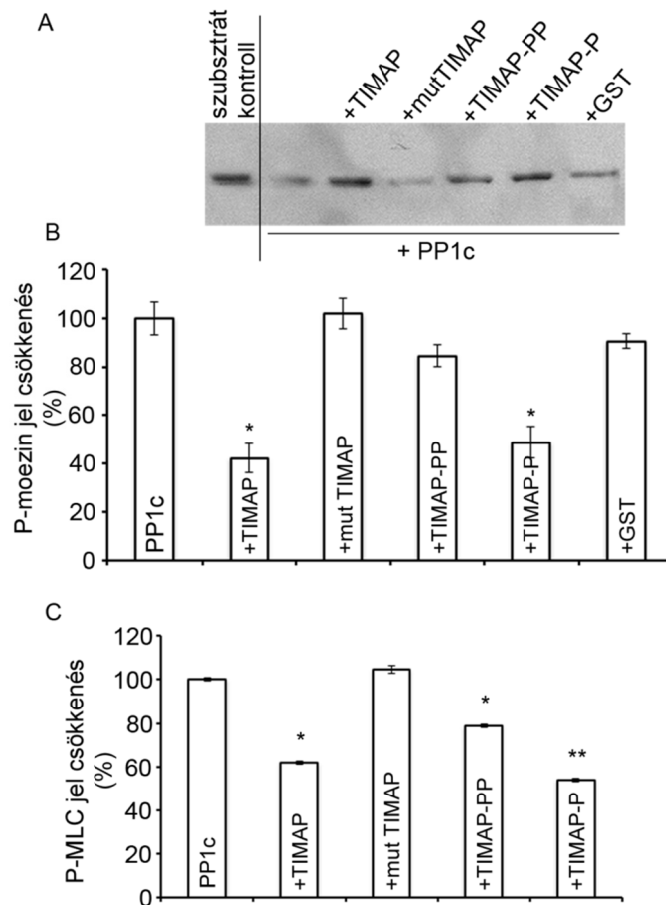
7.13. ábra. Forskolin és trombin hatása az ERM fehérjék foszforilációjára TIMAP siRNS-sel csendesített HPAEC sejtekben. A és B panel: HPAEC sejtek monolayer-ét TIMAP siRNS-sel transzfektáltuk, majd a következő kezeléseknek vetettük alá: 50 μ M forskolin 10 perc, 20 nM trombin 30 perc, 50 μ M forskolin 10 perc után 20 nM trombin 30 perc. A sejteket 20 mM NaF-ot tartalmazó SDS mintapufferben felkapartuk, és Western blot-tal vizsgáltuk a foszfofehérjék mennyiségi változását foszfo-ERM antitesttel. TIMAP elleni antitesttel a csendesítést ellenőriztük, a GAPDH a géltre felvitt fehérje mennyiségét mutatta és ehhez viszonyítottuk a foszfo-ERM sávokat. Az ábra A része egy reprezentatív Western blot eredményét mutatja be. A B panelen három független kísérlet eredményeit átlagoltuk, és a nem kezelt kontroll siRNS-sel transzfektált mintára normalizáltuk. C panel: bazális TER mérést követően a sejteket forskolinnal (50 μ M) vagy DMSO-val előkezeltük. A maximális hatás elérése után (~30 perc) a megfelelő mintákat trombinnal kezeltük (100 nM). Három független transzfekció eredményét (maximális növekedés vagy csökkenéskor mért relatív ellenállás) mutatjuk be. A szignifikanciát a TIMAP siRNS-sel, és a hozzájuk tartozó kontroll siRNS-sel kezelt mintákból határoztuk meg ($P < 0,05$).

Ezt a megfigyelésünket Western blot-tal is szeretnénk volna megerősíteni. A sejteket lizáltuk, majd SDS-PAGE-sel elválasztottuk a fehérjéket, és specifikus foszfo-ERM, TIMAP és GAPDH elleni antitestekkel detektáltuk a fehérjéket. A foszforilált ERM

fehérje szintjében ugyan csak mérsékelt csökkenést tapasztaltunk a sejtek forskolinnal és trombinnal történő együttes kezelése után (7.13. ábra A, B), de a változás tendenciája megegyezett az immunfluoreszcencia eredményeivel. Ezért egy másik, érzékenyebb módszert is alkalmaztunk, kontroll és TIMAP siRNS-sel kezelt sejtek transzendentél ellenállását mértük. A csendesített sejtekben a forskolin védő hatása a trombin kezeléssel szemben szintén szignifikánsan kisebbnek bizonyult, mint a kontroll sejtekben (7.13. ábra C). A TIMAP hiányában tapasztalt eltérő ERM foszforilációs szint és a TER mérések eredményei a sejtek különböző kezelése után megerősítette azt a feltételezésünket, hogy az ERM foszforiláció szabályozása is része a TIMAP barrier funkcióra kifejtett pozitív hatásának.

7.5. A TIMAP foszforiláció hatása a protein foszfatáz 1 aktivitására

Immunfluoreszcenciás kísérleteink arra utaltak, hogy a foszforilált moezin egy lehetséges szubsztrátja a PP1c-nek, és a TIMAP szabályozó funkciót tölt be ebben a defoszforilációs folyamatban, hiszen ha a TIMAP-ot csendesítettük, a forskolinnal előkezelt sejtekben az ERM fehérjék foszforilált állapotban maradtak trombin kezelést követően. Ezért megvizsgáltuk foszforilált rekombináns TIMAP hatását a foszfo-moezin PP1c általi defoszforilációjában. Bakteriális expresszióval rekombináns GST-moezint állítottunk elő, amelyet glutation-Sepharose 4B oszlopon affinitás kromatográfiával tisztítottunk. A GST epitópot (fúziós fehérjét) trombin proteázzal távolítottuk el. Ezt a rekombináns moezint Rho kinázzal foszforiláltuk és a foszfatáz mérésekhez szubsztrátként használtuk. Időközben Li és munkatársai megvizsgálták rekombináns TIMAP-on annak lehetséges foszforilációs helyeit és a PKA (Ser337) mellett egy GSK3 β foszforilációs helyet is (Ser333) valószínűsítettek [123]. Ezért a vad típusú TIMAP-ot (GST-TIMAP) tiofoszforiláltuk PKA-val (GST-TIMAP-P, Ser337), majd a minta egy részét tovább tiofoszforiláltuk GSK3 β -val (GST-TIMAP-PP, Ser333). A PP1c-t előinkubáltuk a nem foszforilált- és tiofoszforilált fehérjékkel, majd P-moezin és ³²P-miozin könnyűlánc (MLC) szubsztrátokkal mértük *in vitro* az enzim aktivitását. A P-moezin szubsztráttal történt aktivitásméréseknél Western blot analízissel, specifikus foszfo-ERM antitestet alkalmazva követtük nyomon a változásokat.

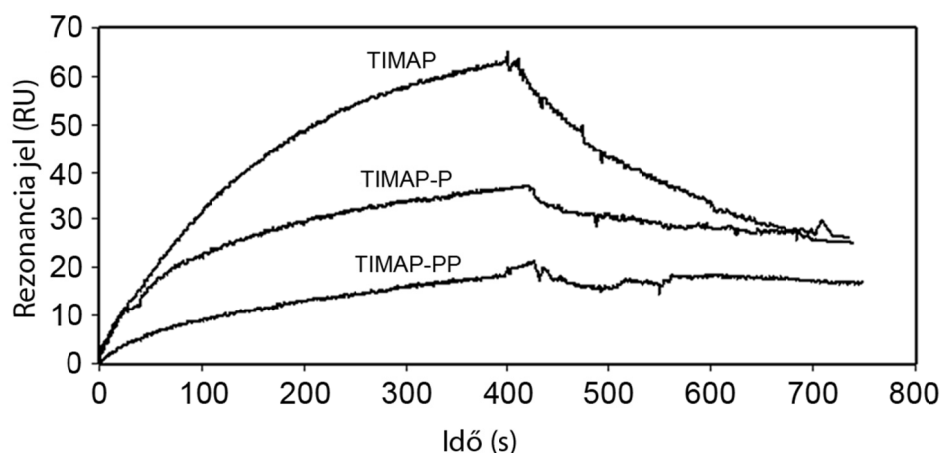


7.13. ábra. A nem foszforilált TIMAP gátolja a foszfo-moezin illetve a foszfo-MLC20 defoszforilációját. Foszfo-moezin (A,B) valamint foszfo-MLC20 (P-MLC) (C) szubsztrátokat PP1c-vel defoszforiláltunk az „Anyagok és módszerek” részben leírtak szerint vad típusú GST-TIMAP, egyszeresen tiofoszforilált GST-TIMAP (TIMAP-P), kétszeresen tiofoszforilált GST-TIMAP (TIMAP-PP), mutáns GST-TIMAP, illetve GST jelenlétében, vagy távollétében. Specifikus foszfo-ERM antitesttel követtük a foszfo-moezin mennyiségének csökkenését. Az A panelen a legelső sáv a teljes foszfo-moezin mennyiségét mutatja foszfátáz kezelés nélkül. A foszfo-moezin illetve a foszfo-MLC jel csökkenését a defoszforilálást követően a csak PP1c-vel kezelt mintáknál tapasztalt csökkenés (100%) százalékában fejeztük ki. Az oszlopdiaqramokon 4 reprezentatív kísérlet átlagát tüntettük fel. A foszfátáz mennyisége a P-MLC foszfátáz assay során a kontrollban körülbelül 20-25%-os $^{32}\text{P}_i$ kihasítást eredményezett, amelyet a 2 μM -nyi P-MLC szubsztrát totál aktivitásából határoztunk meg, és ezt vettük 100%-nak. Legalább négy párhuzamos mérés eredményeit értékeltük ki úgy, hogy meghatároztuk a kapott sávok denzitását. Kétmintás t-próbával végeztük el az adatok statisztikai elemzését, és a szignifikáns eltéréseket a kontrollhoz képest jelöltük: * ($P < 0,05$) vagy ** ($P < 0,01$)

A GST-TIMAP és a GST-TIMAP-P jelentősen (~60% és ~50%) csökkentette a PP1c aktivitását, ezzel ellentétben a GST-TIMAP-PP esetében nem tapasztaltuk ugyanezt (<10%) (7.13. ábra A,B). A kontroll fehérjék, GST és a mutáns GST-TIMAP hatása elhanyagolható volt. Hasonló eredményeket kaptunk a P-MLC szubsztráttal is (7.13. ábra C), így megállapíthatjuk, hogy a vad típusú TIMAP gátló hatása a PP1c aktivitásra nem szubsztrát specifikus.

7.6. A TIMAP Ser333 és Ser337 oldalláncok foszforilációjának hatása a PP1c-vel való kölcsönhatásra.

Felületi plazmon rezonanciás kísérletekben megvizsgáltuk a GST-TIMAP különböző nem foszforilált és foszforilált formáinak kölcsönhatását a PP1c-vel. A korábbi kísérletekhez viszonyítva (lásd 7.4. ábra) a chip felületére immobilizált ligandumok mennyisége ebben a kísérletsorozatban (7.14. ábra) körülbelül annak harmada volt.



7.14. ábra. A foszforilált TIMAP és PP1c kölcsönhatásának jellemzése felületi plazmon rezonancia módszer segítségével. Vad típusú, egyszeresen foszforilált (TIMAP-P) és kétszeresen foszforilált (TIMAP-PP) GST-TIMAP-ot CM5 szenzor chip felületén immobilizáltunk, majd rekombináns PP1c-t injektáltunk a felületre 3.0 μM koncentrációban. A méréseket legalább 3 PP1c koncentrációval végeztük el Biacore 3000 készülék segítségével, a kapott szenzogrammok közül az ábrán egy reprezentatív sorozatot mutatunk be.

A nem foszforilált TIMAP és a PP1c asszociációs állandó értékei mindkét kísérlet sorozatnál közel azonosak voltak ($K_A = 1,28 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ és $K_A = 1,80 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$). 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 asszociációs állandó körülbelül négyszeres értéke ($K_A = 7,39 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) mérsékelt 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 ($K_A = 1,93 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) esetén a kötődés közel azonos erősségű, mint a nem foszforilált TIMAP-PP1c ($K_A = 1,28 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) esetében.

Ligandum	Komplex képződés sebességi	Disszociációs sebességi	Asszociációs állandó,
	állandója, k_a	állandó, k_d	$K_A = k_a/k_d$
	(1/Ms)	(1/s)	(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	$1,01(\pm 0,47) \times 10^3$	$5,22(\pm 0,57) \times 10^{-4}$	$1,93 \times 10^6$

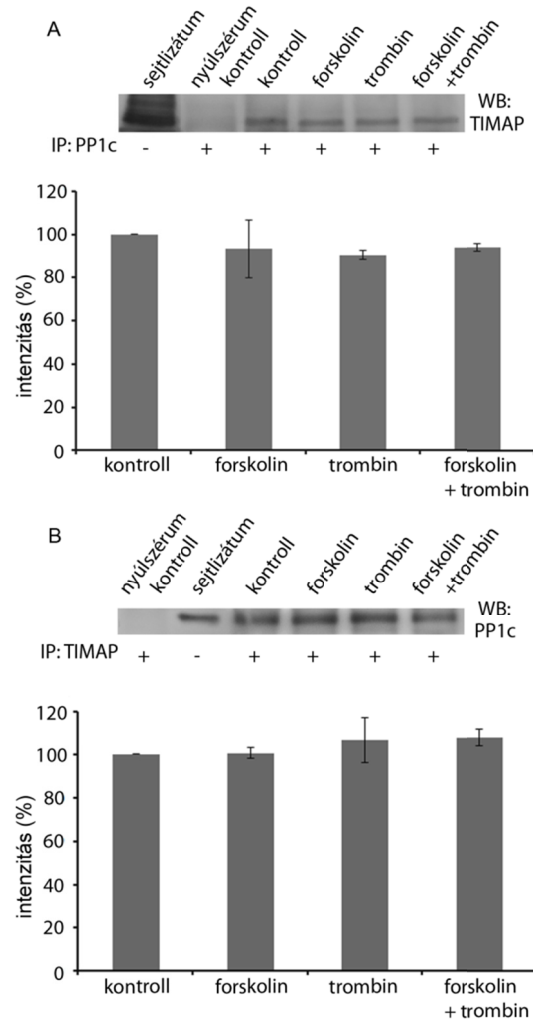
7.2. táblázat. TIMAP, TIMAP-P illetve TIMAP-PP és PP1c kölcsönhatására vonatkozó állandók

Nem foszforilált, egyszeresen- és kétszeresen tiofoszforilált GST-TIMAP rekombináns fehérjéket immobilizáltunk CM5-ös szenzorchip felületére és 1,0, 2,0 és 3,0 μM koncentrációkban PP1c-t áramoltattunk át a felületen. A sebességi állandókat, k_a –komplex képződés sebességi állandója, k_d – a komplex disszociációs sebességi állandója, a megfelelő szenzogramok elemzésével határoztuk meg legalább 3 független kísérlet adatainak felhasználásával.

A natív TIMAP és PP1c fehérjék közötti kölcsönhatást immunprecipitációs kísérletekben vizsgáltuk arra keresve a választ, hogy a kezelésekkel kiváltott TIMAP foszforiláció hogyan befolyásolja a natív fehérjék egymáshoz való kötődését.

Ezért a HPAEC sejteket forskolinral, trombinral és forskolin előkezelés után trombinral kezeltük. Li és munkatársai, valamint saját eredményeink alapján feltételezhető, hogy forskolin kezelést követően a TIMAP a S337 helyen foszforilálódik. Ez indukálhatja a GSK3 β -t, amely a S333 helyet is foszforilálja. Trombin kezelés hatására a Rho kináz útvonal aktiválódik, de egyelőre még nem ismert az, hogy ez hogyan befolyásolja a TIMAP-ot. Eredményeink szerint (7.15. ábra) a két

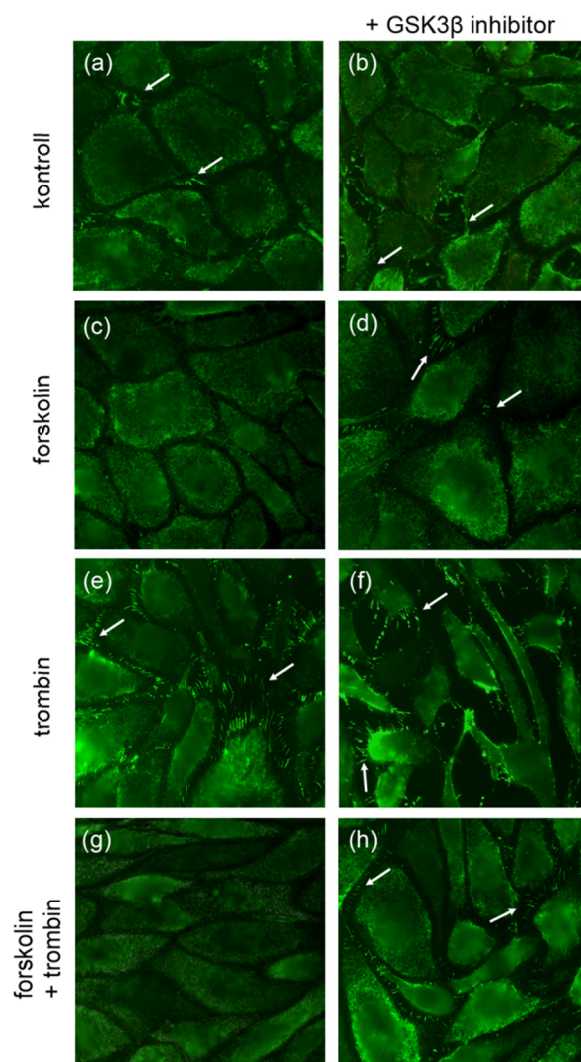
fehérje kölcsönhatásában a különböző kezelések jelentős mennyiségi változást nem okoztak.



7.15. ábra. A TIMAP *in vivo* foszforilációja nincs hatással a PP1c-vel való kötődésére. BPAEC sejteket kezeltünk forskolinnal (50 μ M, 30 min), trombinnal (50nM, 20 min), valamint forskolin előkezelés után trombinnal, majd a sejteket lizáltuk és vizsgáltuk a PP1c (A panel) és TIMAP (B panel) immunprecipitátumában anti-TIMAP (A panel) illetve anti-PP1c (B panel) antitestekkel a fehérjék jelenlétét. Különböző kontrollokat (sejtlizátum kontroll, nem-immun nyúlszérummal kapcsolt Protein-G Sepharose kontroll, és kezeletlen sejtlizátum) használtunk. A sávok intenzitását denzitometrálassal határoztuk meg legalább 3 reprezentatív kísérletből.

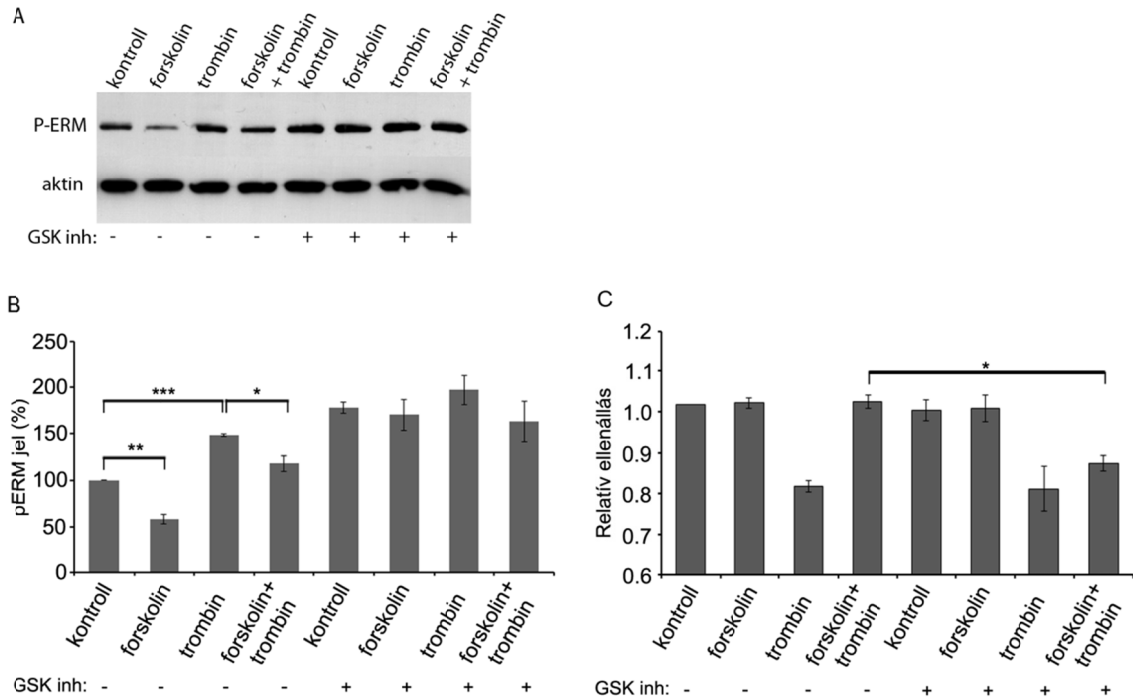
7.7. GSK3 β gátlása csökkenti a forskolin HPAEC sejtekre kifejtett védő hatását trombinnal szemben.

A foszfatáz aktivitás mérések során a PKA illetve PKA és GSK3 β -val egyszeresen, illetve kétszeresen foszforilált TIMAP hatása eltérő volt a PP1c aktivitására a foszfo-moezin szubsztráttal. Ezért megvizsgáltuk, hogy az endotél sejtekben az ERM foszforilációjában a PKA-val foszforilált TIMAP, vagy a PKA-val és GSK3 β -val együttesen foszforilált TIMAP játszik inkább szerepet.



7.16. *ábra.* A GSK3 β inhibitor a forskolin hatását mérsékli I. Kontroll (a,c,e,g) és AR-A014418 inhibitorral előkezelt BPAEC sejtek monolayer-ét festettük anti-foszfo-ERM ellenanyaggal további kezelés nélkül (a,b) illetve a következő kezelések után: 50 μ M forskolin (c,d) 10 perc, 50 nM trombin (e,f) 20 perc, 50 μ M forskolin 10 perc után 50 nM trombin 20 perc (g,h). A nyilak plazmamembránban feldúsult foszfo-ERM-et jelölik.

Immunfluoreszcenciával vizsgáltuk a foszforilált ERM mennyiségét és eloszlását BPAEC sejtekben kontroll, forskolin, trombin valamint forskolin és trombin kezelések után GSK3 β gátlószer (AR-A014418) jelenlétében és hiányában.



7.17. ábra. A GSK3 β inhibitor a forskolin hatását mérsékli II.

A.: Kontroll (-) és AR-A014418 inhibitorral előkezelt (+) BPAEC sejteket további kezelés nélkül, illetve a következő kezelések után: 50 μ M forskolin 10 perc, 50 nM trombin 20 perc, 50 μ M forskolin 10 perc után 50 nM trombin 20 perc; lizáltunk és a mintákat Western blot analízissel vizsgáltuk. B.: A Western blot foszfo-ERM és aktin jeleit denzitometráltuk, a foszfo-ERM mennyiségét a megfelelő aktin mennyiségére normalizáltuk. Az eredmények itt bemutatott kvantitatív analízise 3 reprezentatív kísérletből származik. A kezeletlen minta P-ERM mennyiségét vettük 100%-nak és ennek százalékában fejeztük ki a többi. C.: Transzendentél ellenállás mérés. Bazális TER mérések követően (kiindulási ellenállás 750-850 Ω) a sejteket 20 μ M AR-A014418 inhibitorral vagy DMSO kontrollal kezeltük elő 4 óráig. Ezután adtuk a megfelelő mintákhoz 50 μ M forskolint. Miután a kezelt minták ellenállása újra megközelítette a kontrollok értékeit (körülbelül 2 óra elteltével), a megfelelő sejteket trombinnal kezeltük (20 nM). Az ábrán a thrombin kezelés után bekövetkezett maximális TER csökkenés időpontjában detektált relatív ellenállás értékeket mutatjuk be. Három kísérlet eredményét átlagoltuk, az eredmények statisztikai elemzését párosítatlan *t* próbával végeztük el. A szignifikáns eltéréseket csillaggal jelöltük: * ($P < 0.05$), ** ($P < 0.01$), vagy *** ($P < 0.001$).

A GSK3 β inhibitor jelenléte a foszfo-ERM szintjében csekély növekedést okozott a kontroll és a forskolinnal kezelt BPAEC sejtek plazmamembránjában (7.16. ábra b. és d.). A forskolin, ahogyan már korábban is tapasztaltuk, megszüntette a lazán érintkező sejtek felületén látható tüskéket (7.16. ábra c.). A GSK3 β inhibitor és forskolin kezelés után a sejtek morfológiája a kontroll sejtekre hasonlít a legjobban, amely bizonyíték lehet arra, hogy a forskolin által indukált PKA aktiválódás után a GSK3 β is aktiválódik (7.16. ábra a. és d.). Ugyancsak erre utal, hogy a GSK3 β gátlása a trombin hatását fokozta és a GSK3 β inhibitor jelenlétében a forskolin nem tudta kifejteni trombinnal szembeni védő hatását (7.16. ábra h.), rések alakultak ki a sejtek között és az ERM is foszforilálódott. Mindezek alapján arra következtethetünk, hogy az ERM fehérjék foszforilációs szintjének szabályozásában a TIMAP PKA és GSK3 β általi foszforilációja egyaránt fontos.

A sejtek ugyanezen kezelése után Western blot-tal is hasonló tendenciát találtunk a foszfo-ERM szint változásában (7.17. ábra A,B). A kisebb mértékű változás oka feltehetően az, hogy a Western blot-tal a sejtek teljes fehérje mennyiségét detektáljuk, míg az immunfluoreszcenciával a sejtek plazmamembránjában történő lokális változások is jól követhetőek. Másrészről a transzendentél ellenállás mérésekkel azt találtuk, hogy a GSK3 β inhibitor jelenléte a forskolinnal előkezelt, majd trombinnal kezelt sejteknél számottevő ellenállás csökkenést okozott, tehát a GSK3 β aktivitás gátlása jelentősen csökkentette a forskolin védő hatását a trombinnal szemben (7.17. ábra C). Következésképpen a TIMAP GSK3 β általi foszforilációja szükséges ahhoz, hogy a TIMAP ki tudja fejteni hatását a trombinnal indukált barrier diszfunkcióval szemben.

8. MEGBESZÉLÉS

A TIMAP fehérjéről korábban kimutatták, hogy expressziós szintje az endotél sejtekben igen magas [57], de fiziológias szerepe még mindig nem tisztázott. Szerkezeti felépítése alapján a MYPT fehérjecsalád tagjaként írták le, így tehát a PP1 egyik lehetséges regulátor alegysége, annak aktivitását befolyásolhatja, aktiválhatja, illetve gátolhatja azt.

A PP1 és a TIMAP közötti kölcsönhatás bizonyítása érdekében különféle módszerek segítségével vizsgálatokat végeztünk. Immunfluoreszcenciás kísérletekben a két fehérje közötti esetleges kolokalizációt tanulmányoztuk HPAEC sejtekben. A MYPT3-hoz hasonlóan a TIMAP is tartalmazza az N-terminális régiójában a magi lokalizációs szignált, valamint a CAAX box-nak nevezett prenilációs motívumot a C-terminális végén, amely a plazmamembránban való lokalizációjáért felelős. Ez utóbbi a MYPT család többi tagjánál nincs jelen. Ezzel összhangban az endogén TIMAP esetében elsősorban membrán illetve magi lokalizációt figyelhetünk meg, valamint a mag körüli régióban is tapasztalható volt a fehérje jelenléte. A natív PP1c esetében a festődés homogén eloszlását a trombinnal való kezelés változtatta meg oly módon, hogy a foszfatáz egy része a plazmamembránba transzlokálódott, tehát ebben a régióban részleges kolokalizációt figyelhetünk meg. Ez a megfigyelés arra enged következtetni, hogy a TIMAP-PP1c közötti kölcsönhatás szabályozása a plazmamembrán régióban a sejt fiziológias állapotától függ. Ezen túl további bizonyítékként szolgáltak az immunprecipitációs kísérleteink is. A TIMAP immunprecipitátumában ki tudtuk mutatni a PP1c-t és ugyanezt fordítva is megismételtük. Az igazán izgalmas kérdés megválaszolására, hogy vajon van-e különbség a PP1c különböző izoformái és a TIMAP közötti kölcsönhatásban, rekombináns TIMAP-ot állítottunk elő és pull-down kísérletekben használtuk fel. Elsőként nekünk sikerült kimutatni azt, hogy elsősorban a β/δ izoforma kötődik a TIMAP-hoz, ellentétben az α izoformával. Végül, hogy számszerű adatokkal támasszuk alá a TIMAP és a PP1c közötti kölcsönhatást felületi plazmon rezonancián alapuló kísérleteket végeztünk. Az így kapott asszociációs állandó ($K_a = 1,80 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1}$) is megerősíti a feltevést, mely szerint a két fehérje között specifikus a kötődés.

Eredményeink jórészt összhangban vannak egy velünk párhuzamosan a TIMAP-ot tanulmányozó munkacsoport által közöltekkel. GEN és MDCK sejtekben az overexpresszált rekombináns TIMAP is mutat nukleáris lokalizációt [57], viszont a GEN

sejtekben az endogén TIMAP hiányzik a sejtmagból [58]. Ez a különbség a TIMAP lokalizációjában a HPAEC és GEN sejtek között azt sugallja, hogy a TIMAP eltérő szerepet tölthet be a glomeruláris, illetve a tüdő artéria sejtekben. A TIMAP magban betöltött szerepéről, illetve a vele ott kölcsönható fehérjéről még semmit nem tudunk. A plazmamembránban korábban azonosítottak egy TIMAP-pal kölcsönható célfehérjét [58, 123]. Li és munkatársai szerint a glomeruláris endotél sejtek (GEN) filopodium képződését a TIMAP - PP1c komplex szabályzza [123], és kimutatták, hogy a LAMR1 fehérje defoszforilációja a kalikulin-A függő protein foszfatáz által egy TIMAP-függő folyamat. Továbbá immunprecipitációs kísérletekkel bizonyították, hogy a TIMAP kölcsönhat a LAMR1 és PP1c fehérjékkel. Mindezek alapján feltételezik, hogy a TIMAP, a LAMR1 fehérje foszforilációját szabályozza [58].

A szfingozin-1 foszfát a barrier funkciót erősítő hatású, mert az aktinfilamentumokat egy kortikális gyűrű alakzatba rendezi, ezáltal megerősíti a citoskeletont, illetve a sejtek közötti kapcsolatokat is [124]. HPAEC sejtek S1P kezelését követően azt tapasztaltuk, hogy a sejtek relaxált állapotba kerültek, miközben a TIMAP feldúsulását figyelhettük meg a membrán régióban. Ebből azt a feltételezést fogalmaztuk meg, hogy a TIMAP egyike lehet a barrier funkciót védő fehérjéknek. Ezt a hipotézisünket transzendotél ellenállás mérésekkel igazoltuk. Kontroll és TIMAP csendesített sejteket különböző, barrier funkcióra ható ágensekkel kezeltünk. Az endotél barrier funkciót erősítő ágensként S1P-t és ATP-t alkalmaztunk [82, 124]. Az ATP különböző jelátviteli útvonalakon fejti ki hatását, aktiválja a miozin-foszfatázt és a protein kináz A-t [82]. A trombin egy ödémát előidéző ágens, gyors MLC foszforilációt, ezáltal endotél permeabilitás növekedést okoz, míg a nokodazol mikrotubulus depolimerizációt kiváltó szintetikus anyag, amely szintén sztreesszörvények kialakulását eredményezi és veszélyezteti a gátfunkció megfelelő működését [83, 84, 89]. A TIMAP csendesítés jelentősen nem befolyásolta a bazális TER értékeket, viszont a barriert védő ágensek (S1P és ATP) pozitív hatását mérsékelte. Emellett a barrier diszfunkciót kiváltó ágensek (trombin és nokodazol) [125] hatása a TIMAP csendesített sejtekben szignifikánsan felerősödött. Eredményeink a TIMAP endotél barrier funkcióban betöltött pozitív szerepét bizonyítják, amelyet elsőként mi írtunk le.

Az, hogy a TIMAP a PP1c potenciális regulátor alegysége, valamint a kolokalizációjuk a plazmamembránban, jogosan vetette fel a kérdést, hogy melyek azok a fehérjék, amelyek ebben a régióban szubsztrátjai lehetnek a protein foszfatáz 1-nek. Az ERM fehérjék, ezrin, radixin és moezin, szerkezetüket tekintve nagyfokú

homológiát mutatnak egymással, és ennek következtében hasonló funkciót is töltenek be [126, 127]. Az ERM fehérjéket keresztköti fehérjéknek tartják, melyek biztosítják az aktinfilamentumoknak a plazmamembránhoz való kötődését, ugyanakkor fontos szerepet töltenek be a sejt adhéziós folyamataiban, a mikrovillusok képződésében, a sejtek motilitásában. [128]. Szerkezetük különféle fehérje-fehérje kölcsönhatások kialakítását teszi lehetővé. A C-terminális C-ERMAD domén képes intramolekulárisan kötődni az N-terminális N-ERMAD/F-ERM doménhez, vagy az F-aktin szálakhoz, amelyet a fehérjék konzervált treonin oldalláncainak (ezrin - Thr567, radixin - Thr564 és moezin - Thr558) foszforilációs állapota szabályoz. *In vitro* kísérletekben vizsgálták a treonin oldalláncok foszforilációjának hatását az intramolekuláris kölcsönhatás kialakulására és azt találták, hogy a foszforiláció negatívan befolyásolja azt [121]. NIH3T3 fibroblast sejtekben az ERM fehérjék foszforilálódhatnak, amely a RhoA/Rho-kináz útvonalon keresztül történik, és ennek következtében a foszforilált formák a membrán apikális kitüremkedéseibe transzlokálódnak [129]. Korábban már kimutatták, hogy az ERM fehérjék treonin oldalláncait a MP defoszforilálja, ennek következtében a citoskeleton/membrán kölcsönhatás és a konformáció is megváltozik. A MYPT család tagjai közül az MBS fehérje kapcsolódását írták le a moezinhez [122]. Endotél sejteket trombinnal kezelve Rho aktiválódást váltottunk ki, melynek következtében mi is ki tudtuk mutatni az ERM, illetve moezin foszforilációt, valamint a membránban való feldúsulást. A TIMAP és az ERM fehérjék foszforilált formái között kolokalizációt mutattunk ki a plazmamembránban, amely alapján feltételezhetjük a kölcsönhatást közöttük. Ez az eredmény vezetett el bennünket ahhoz a következtetéshez, hogy a TIMAP, mint a PP1 regulátor alegysége, a foszfatázt az ERM fehérjékhez irányíthatja és szerepet játszhat defoszforilációjukban. További megerősítésként szolgálnak immunprecipitációs eredményeink is, amelyek bizonyítják a natív PP1c, moezin és TIMAP közötti kölcsönhatást. A TIMAP a plazmamembránhoz asszociálódik az endotél sejtek filopodium képződményeiben, ahol kölcsönhat és egyben hozzájárul a LAMR1 receptor defoszforilációjához [58].

Korábban már leírták a MYPT3 foszforilációját PKA által. Három potenciális PKA foszforilációs helyet (Ser340, Ser341 és Ser353) tanulmányoztak és kimutatták, hogy a Ser340 és a Ser353, az utóbbi magasabb preferenciával, foszforilálódik a PKA enzimmel [56]. A MYPT3 foszforilációs helyeit tartalmazó régió, ³³⁷RRTSSAGSRGKVRRVSL³⁵⁴, a TIMAP szekvenciájában is megtalálható egyetlen aminosav eltéréssel: ³³⁴RRTSSAGSRGKVRRASL³⁵¹. (A két szekvenciában az eltérő

aminosavakat aláhúzással jelöltük, a foszforilációs helyek pedig kiemeltük dőlt és félkövér betűtípussal). *In vitro* kísérletben PKA enzimmel bakteriális expresszióval előállított rekombináns, vad típusú TIMAP-ot valóban sikerült foszforilálnunk. A kináz reakció révén beépült foszfát mennyiségét kiszámítva azt kaptuk, hogy 1 mólnyi fehérjébe körülbelül 0,8 mol foszfátot épített be a kináz. Ez egybevág Li és munkatársai eredményével, amely szerint a TIMAP 1:1 arányban foszforilálódik a PKA-val [123]. A MYPT3 foszforilációjának *in vitro* vizsgálata közben megállapították, hogy foszforilálatlan formában MLC szubsztráttal szemben gátolja a PP1c aktivitását [55]. Viszont más MYPT formáktól eltérően foszforilált formában (PKA-katalizált Ser353 foszforiláció) a PP1c aktivitását MLC szubsztrát iránt fokozta [56]. Feltételezik, hogy ennek a plazmamembránban, a sejtek morfológiájának valamint az izomkontrakció szabályozásában lehet jelentősége [56]. A TIMAP és a MYPT3 közötti magas homológia és a foszforilációs helyek körüli szekvencia azonosság arra engedtek következtetni, hogy a TIMAP foszforilációja is szabályozhatja kölcsönható fehérjéinek (mint pl. ERM fehérjék) PP1c általi defoszforilációját és így szerepet játszhat az endotél barrier funkcióban.

Kíváncsiak voltunk, hogy hasonlóan a MYPT3-hoz a TIMAP is okoz-e PP1c gátlást, valamint foszforilációja PP1c aktiválódást eredményez-e? Annak érdekében, hogy a TIMAP szabályozó szerepét vizsgálhassuk PP1c által katalizált defoszforilációs folyamatokban, *in vitro* foszfátáz assay kísérleteket végeztünk szubsztrátként foszforilált rekombináns moezint használva. Ballerman és munkatársai velünk egyidőben szintén vizsgálták a TIMAP foszforilációját endotél sejtekben, és két foszforilációs helyet határoztak meg, az egyik a Ser337, amelyet a PKA foszforilálhat, a másik a GSK3 β által foszforilálható Ser333[123]. Ezért ezekben a vizsgálatokban már nem csak PKA-val, hanem PKA-val és GSK3 β -val kétszeresen tiofoszforilált TIMAP-ot is vizsgáltunk. A foszforilálatlan és az egyszerűen foszforilált TIMAP gátló hatását tapasztaltuk, míg a kétszeresen foszforilált TIMAP ugyan nem aktiválta a PP1c-t, de nem is gátolta azt. Eredményeink tehát azt igazolták, hogy a TIMAP és a MYPT3 viselkedése a PP1c-vel szemben hasonlít egymáshoz, mindkettő kölcsönhat a foszfátázzal, valamint nem-foszforilált formáik gátolják annak aktivitását. A Ballermann munkacsoport nem közölt a foszforilálatlan TIMAP gátló hatásáról eredményt. Overexpresszált TIMAP-ot immunprecipitáltak és azt használták foszfátáz aktivitás mérésekben. Eredményeik szerint a TIMAP foszforilációja hatással volt a PP1c aktivitására, a foszforilációt utánzó TIMAP mutánsok immunprecipitátumában a

PP1c aktivitása nőtt a vad típusú TIMAP-ot tartalmazó immunprecipitátumhoz képest egy kisméretű, mesterségesen előállított szubsztráttal szemben. Kimutatták, hogy a TIMAP defoszforilációjáért szintén a PP1c enzim a felelős, ezért a TIMAP-PP1c komplex auto-defoszforilációját valószínűsítették [123].

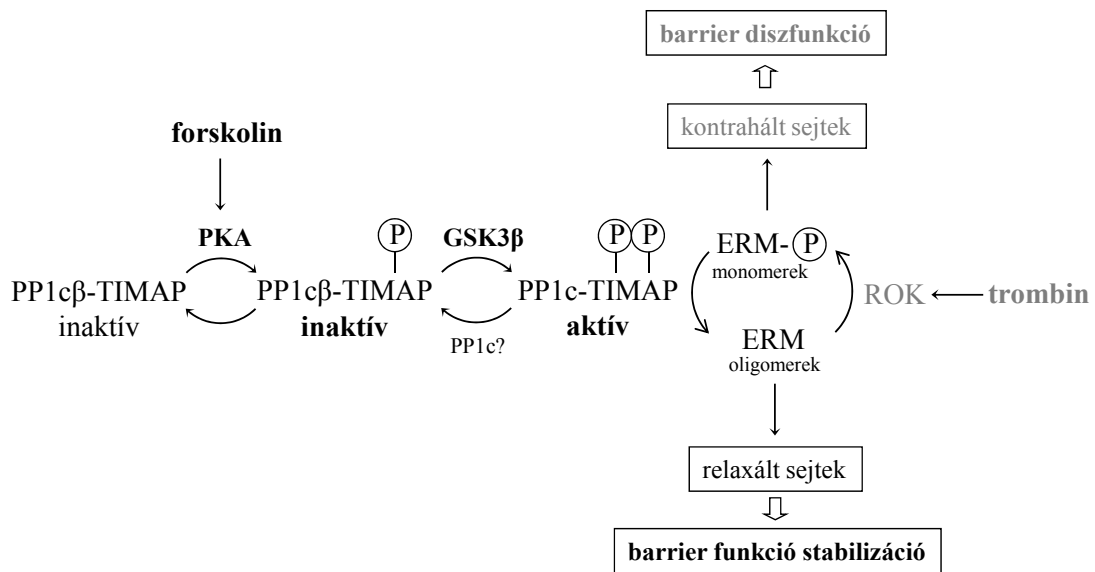
A TIMAP és PP1c közötti fehérje-fehérje kölcsönhatás tanulmányozását ezért kiterjesztettük a TIMAP kétféle foszforilált formájára is. Felületi plazmon rezonancia mérésekkel azt találtuk, hogy az egyszeres foszforiláció nem változtatta meg a komplex képződés sebességi állandóját (k_a), viszont mérsékelte a disszociációs sebességi állandót (k_d) a nemfoszforilált TIMAP-PP1c komplexhez képest. A PKA-val és GSK3 β -val kétszeresen tiofoszforilált TIMAP és PP1c komplex esetén a k_a és k_d értékek is kismértékben csökkentek. Az asszociációs állandókat tekintve ennek megfelelően a következő értékeket kaptuk: a nem foszforilált valamint kétszeresen foszforilált TIMAP ($K_A=1,28 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, $K_A=1,93 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) kölcsönhatása a PP1c-vel közel azonos volt, míg az egyszeresen foszforilált TIMAP ($K_A=7,39 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) és PP1c közötti kölcsönhatás valamivel erősebb (7.2.táblázat, 7.14.ábra). A Ballermann munkacsoport, ahogy azt már korábban említettem, a foszforilációs helyek aminosav oldalláncainak cseréjével mutánsokat hozott létre. Az overexpresszált foszforilációt utánzó mutánsok immunprecipitátumában kevesebb PP1c-t mutattak ki, mint a vad típusú TIMAP-éban, ami azt sugallta, hogy a PKA/GSK3 β -val történt foszforiláció csökkenti az asszociációt a TIMAP és PP1c között. Ezzel részben egybevágnak a mi eredményeink is, tehát a TIMAP foszforilációja hatással van a TIMAP és PP1c közötti kölcsönhatás kinetikájára. Következésképpen a lassúbb TIMAP-PP és PP1c komplex képződés a TIMAP-PP1c komplexhez képest csökkentheti az immunprecipitált fehérjék mennyiségét az eluátumban. Saját felületi plazmon rezonancia, immunprecipitáció és pull-down eredményeink, egybehangzóan azt mutatták, hogy a TIMAP-PP1c kölcsönhatás erőssége és a komplexben jelenlévő fehérjék mennyisége a TIMAP foszforilációjával nem változik, a komplex nem disszociál. Felületi plazmon rezonancia méréseinket rekombináns fehérjékkel végeztük. A TIMAP foszforilált formájában a tioészter kötés véleményünk szerint nagyobb eséllyel viselkedhet a natív foszfo-TIMAP-hoz hasonlóan, mint a savas oldalláncokkal utánzott rekombináns karboxil csoportja [123]. Szintén fontos kiemelni, hogy az immunprecipitációs kísérletekben natív fehérjék között mutattunk ki azonos mértékű kötődést a sejtek kezelésétől függetlenül. A különböző foszforilált és nem foszforilált TIMAP formák eltérő hatása a PP1c

aktivitására lehet a kölcsönható fehérjék felülete, illetve konformációja változásának következménye, amit a TIMAP felületére beépülő foszfát csoport(ok) okozhatnak.

A TIMAP *in vivo* foszforilációja érdekében HPAEC sejteket forskolinnal kezeltünk, amely a sejtekben a cAMP szintjét megemelve PKA aktiválódást vált ki, majd immunfluoreszcenciával követtük nyomon a foszforilált ERM fehérjék eloszlásának változásait. A kezelés a sejtek relaxációját és az ERM fehérjék foszforilációs szintjének csökkenését váltotta ki. Korábban már kimutattuk azt, hogy a PKA aktiválás csökkentette a nokodazol által kiváltott stresszkoetek kialakulását és mérsékelte a barrier funkció sérülését [99]. A forskolin kombinált kezelésben is hatásos volt, a forskolin előkezelés, ugyanis kivédte a trombin által kiváltott barrier diszfunkciót a HPAEC sejtekben. Nem jelentek meg aktin stresszkábelek, az ERM fehérjék foszforilációja sem emelkedett meg. Ezzel összhangban van az is, hogy a PKA csökkenti a különböző ágensekkel kiváltott barrier diszfunkciót [130-132]. Továbbá azt is kimutatták, hogy a PKA aktiválása mérsékli a vaszkuláris endotél gátfunkció sérülését [133]. TIMAP specifikus siRNS alkalmazásával sikerült igazolnunk, hogy a forskolin kezeléssel aktivált jelátviteli útvonalban a TIMAP-nak kulcs szerepe van. Bár a forskolin kezelés után a plazmamembrán régióban az ERM egyaránt defoszforilálódott a kontroll és az siRNS-sel transzfektált sejtekben is; a TIMAP csendesített sejtekben a forskolin előkezelés hatástalan volt a trombin által indukált ERM foszforilációval szemben. Western blottal nem tapasztaltunk ennyire szembetűnő változást a foszfo-ERM mennyiségében a sejtek trombin, valamint forskolin és trombin együttes kezelése után. Ennek az lehet a magyarázata, hogy a sejtek lízisével, majd Western blot-tal az összfehérje mennyiséget tudjuk detektálni, míg az immunfluoreszcenciával közvetlenül a plazmamembránban, a fehérje szint változásait követhetjük nyomon. Immunfluoreszcenciás eredményünket transzendentél rezonancia méréseink is alátámasztották, a sejtek transzendentél ellenállása trombin jelenlétében a TIMAP csendesített sejtekben forskolin jelenlétében is csökkent. Ezek az eredményeink azt sugallják, hogy a PKA által foszforilált TIMAP vagy a foszforilált ERM fehérjék membrán lokalizációját szabályozza, vagy a plazmamembránban található ERM fehérjék foszforilációs szintjének szabályozásában játszik szerepet. Ez a folyamat része lehet a TIMAP által szabályzott barriert védő hatásnak.

Az *in vitro* foszfatáz aktivitás méréseink szerint a PKA-val egyszeresen, illetve PKA/GSK3 β -val kétszeresen foszforilált TIMAP formák különböző módon hatnak a rekombináns moezin defoszforilációjára PP1c-vel. Annak tisztázása érdekében, hogy

egyedül a PKA aktivitásnak vagy a PKA indukált GSK3 β általi TIMAP foszforilációnak is jelentősége van az ERM fehérjék defoszforilációjának szabályozásában, az ERM foszforilációt GSK3 β inhibitor jelenlétében és hiányában tanulmányoztuk BPAEC sejtekben. A GSK3 β gátlószer hatására a forskolinnal kezelt sejtekben a plazmamembránban továbbra is detektálhatóak voltak a tüskék, amelyek a foszfo-ERM jelenlétét jelzik, ami azt igazolja, hogy a PKA aktiválódását a GSK3 β aktiválódása követheti.



8.1. ábra. A TIMAP szerepe az ERM fehérjék defoszforilációjában.

Trombin kezelés az endotéliumban aktiválja a Rho útvonalat, amely az ERM fehérjék foszforilálódását és aktiválódását eredményezi [127, 134]. Az is ismert, hogy a trombin GSK3 β foszforilációt vált ki annak Ser-9 oldalláncán, amelynek következtében inaktiválódik az enzim [135, 136]. Ezzel összhangban mi is ERM foszforilálódást, a sejtek közötti rések kialakulását és barrier diszfunkciót tapasztaltunk trombin kezelés hatására, amit az AR-A014418 gátlószer jelenléte, a GSK3 β gátlása még tovább erősített. Mindezt TER méréseink is alátámasztották: GSK3 β gátlás a trombinnal kezelt sejtekben jelentősen csökkentette a forskolin védő hatását, tehát a PKA és a GSK3 β aktiválódás egyaránt kritikus tényezői a gátfunkció szabályozásának. Az eredményeinket összefoglaló séma (8.1. ábra) a TIMAP foszforiláció és a TIMAP-PP1c feltételezett szerepét mutatja be az ERM fehérjék defoszforilációjának szabályozásában.

Fontosabb eredményeinket röviden összefoglalva elmondhatjuk, hogy a TIMAP és a PP1c β izoforma közötti kölcsönhatást igazoltuk és meghatároztuk a kölcsönhatás asszociációs állandóját. Továbbá elsőként mutattuk be, hogy a TIMAP részt vesz az ERM fehérjék foszforilációs szintjének szabályozásában és a barrier funkció szabályozásában pozitív szerepet tölt be.

9. ÖSSZEFOGLALÁS

A fehérjék foszfo-Ser/Thr oldalláncainak defoszforilációjával a protein foszfatáz 1 (PP1) számos sejt folyamat szabályozásában vesz részt. Kísérleteink során a 64 kDa méretű TIMAP fehérjét vizsgáltuk, amely a MYPT család tagja és ezért a PP1c katalitikus alegység egyik lehetséges regulátor alegysége. Célunk volt a TIMAP és PP1c közötti kölcsönhatás, valamint a TIMAP Ser333 és Ser337 oldallánci foszforilációja hatásának vizsgálata. A TIMAP expressziós szintje az endotél sejtekben más sejt típusokhoz viszonyítva magas és a fehérje a plazmamembránhoz asszociálódik. Ezért kísérleteinkkel a TIMAP humán illetve marha tüdő artéria endotél sejtek barrier funkciójának szabályozásában betöltött szerepét is igyekeztünk feltárni.

Különböző módszerek alkalmazásával igazoltuk a TIMAP és a PP1 katalitikus alegysége közötti fehérje-fehérje kölcsönhatást. Eredményeink szerint a PP1c β izoformája kötődik specifikusan a TIMAP-hoz ($K_a=1.8 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$). A TIMAP tiofoszforilációja PKA-val illetve PKA- és GSK3 β enzimekkel alig, vagy csak kis mértékben módosította a TIMAP és PP1c közötti kölcsönhatásra jellemző asszociációs konstans értékekét. Viszont a nem és egyszeresen tiofoszforilált TIMAP gátolja a PP1c β aktivitását, a kétszeresen tiofoszforilált formának pedig nincs hatása a foszfatáz aktivitásra az általunk vizsgált szubsztrátokkal.

A TIMAP endotél barrier funkcióban betöltött szerepének vizsgálata során siRNS módszert használtunk. Mértük a sejtek elektromos rezisztenciáját különböző effektorok jelenlétében, és kimutattuk, hogy a TIMAP csendesített sejtekben a kontrollhoz képest a barrier funkciót erősítő szfingozin-1 foszfát és ATP hatása mérséklődött, míg a barrier diszfunkciót kiváltó ágenseké, trombin és nokodazol, erősödött. Továbbá azt találtuk, hogy forskolin előkezelés (PKA aktiválás) kivédte a trombin által kiváltott ERM foszforilációt és barrier diszfunkciót a kontroll sejtekben, viszont a TIMAP specifikus siRNS-sel kezelt sejtekben a forskolin ugyanezen hatását nem tapasztaltuk. GSK3 β inhibitor alkalmazásával igazoltuk, hogy endotél sejtekben a PKA aktiválást GSK3 β aktiválódás követi, és mindkét kináz aktiválása szükséges a forskolin endotél barrier funkciót védő hatásának kifejtéséhez. Mindezekből arra következtetünk, hogy a TIMAP részt vesz az ERM fehérjék foszforiláltsági szintjének szabályozásában és ez a funkciója PKA aktivitás által kontrollált, valamint a TIMAP a barrier funkciót pozitívan szabályozza.

10. SUMMARY

Protein phosphatase 1 (PP1) regulates numerous cellular processes by dephosphorylating phospho-Ser/Thr residues of proteins. TIMAP protein (64 kDa), as a member of the MYPT family, is a putative regulatory subunit of the catalytic subunit of PP1 (PP1c). Our aim was to study the interaction between TIMAP and PP1c; and to study the effect of the phosphorylation of Ser333 and Ser337 side chains in TIMAP on this interaction. TIMAP is highly expressed in endothelial cells (EC) compared to other cell lines, and it localizes to the plasma membrane. Therefore we studied the role of TIMAP in the regulation of barrier function of human and bovine pulmonary artery endothelial cells.

Using several methods we provided evidence for specific interaction between TIMAP and PP1c; TIMAP binds preferentially the beta isoform of PP1c ($K_a=1.8 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$). Thiophosphorylation of TIMAP by PKA or sequential thiophosphorylation by PKA and GSK3 β only slightly modifies the association constant for the interaction of TIMAP with PP1c. However, non- and mono-thiophosphorylated forms of TIMAP inhibit PP1c β activity, while the double-thiophosphorylated form does not affect the phosphatase activity with the utilized substrates.

To investigate the role of TIMAP in EC barrier regulation, we depleted TIMAP in HPAEC. We found that depletion of TIMAP attenuates the increases in transendothelial electrical resistance induced by the barrier protective agents (S1P and ATP) and enhances the effect of barrier-compromising agents (thrombin, nocodazole) demonstrating a barrier-protective role of TIMAP in EC. PKA activation by forskolin treatment of EC prevents thrombin evoked barrier dysfunction and ERM phosphorylation at the cell membrane. On the contrary in TIMAP depleted cells forskolin failed to affect the thrombin effect, and the ERM proteins remained phosphorylated. These data demonstrate that TIMAP is involved in the EC barrier protection as part of PKA-mediated ERM (ezrin-radixin-moesin) dephosphorylation. Using a specific GSK3 β inhibitor we have shown that PKA activation is followed by GSK3 β activation in bovine pulmonary EC and activation of both kinases is required for the rescuing effect of forskolin and protects the EC barrier function.

11. HIVATKOZÁSOK

1. Verin, A.D., et al., *Characterization of the protein phosphatase 1 catalytic subunit in endothelium: involvement in contractile responses*. J Cell Biochem, 2000. **79**(1): p. 113-25.
2. Jackson, M.D. and J.M. Denu, *Molecular reactions of protein phosphatases--insights from structure and chemistry*. Chem Rev, 2001. **101**(8): p. 2313-40.
3. Cohen, P.T., *Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life*. Trends Biochem Sci, 1997. **22**(7): p. 245-51.
4. Hunter, T., *Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling*. Cell, 1995. **80**(2): p. 225-36.
5. Pot, D.A. and J.E. Dixon, *A thousand and two protein tyrosine phosphatases*. Biochim Biophys Acta, 1992. **1136**(1): p. 35-43.
6. Barford, D., Z. Jia, and N.K. Tonks, *Protein tyrosine phosphatases take off*. Nat Struct Biol, 1995. **2**(12): p. 1043-53.
7. Barford, D., *Molecular mechanisms of the protein serine/threonine phosphatases*. Trends Biochem Sci, 1996. **21**(11): p. 407-12.
8. Barford, D., A.K. Das, and M.P. Egloff, *The structure and mechanism of protein phosphatases: insights into catalysis and regulation*. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 1998. **27**: p. 133-64.
9. Andreeva, A.V. and M.A. Kutuzov, *PPP family of protein Ser/Thr phosphatases: two distinct branches?* Mol Biol Evol, 2001. **18**(3): p. 448-52.
10. Ingebritsen, T.S. and P. Cohen, *Protein phosphatases: properties and role in cellular regulation*. Science, 1983. **221**(4608): p. 331-8.
11. Shi, Y., *Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure*. Cell, 2009. **139**(3): p. 468-84.
12. Csontos, C., I. Kolosova, and A.D. Verin, *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**(4): p. L843-54.
13. Almo, S.C., et al., *Structural genomics of protein phosphatases*. J Struct Funct Genomics, 2007. **8**(2-3): p. 121-40.
14. Olsen, J.V., et al., *Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks*. Cell, 2006. **127**(3): p. 635-48.
15. Alonso, A., et al., *Protein tyrosine phosphatases in the human genome*. Cell, 2004. **117**(6): p. 699-711.
16. Manning, G., et al., *The protein kinase complement of the human genome*. Science, 2002. **298**(5600): p. 1912-34.
17. Cohen, P.T., *Protein phosphatase 1--targeted in many directions*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 2): p. 241-56.
18. Andersen, J.N., et al., *A genomic perspective on protein tyrosine phosphatases: gene structure, pseudogenes, and genetic disease linkage*. FASEB J, 2004. **18**(1): p. 8-30.
19. Moorhead, G.B., L. Trinkle-Mulcahy, and A. Ulke-Lemee, *Emerging roles of nuclear protein phosphatases*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(3): p. 234-44.
20. Hubbard, M.J. and P. Cohen, *On target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation*. Trends Biochem Sci, 1993. **18**(5): p. 172-7.
21. Mumby, M.C., et al., *Cardiac contractile protein phosphatases. Purification of two enzyme forms and their characterization with subunit-specific antibodies*. J Biol Chem, 1987. **262**(13): p. 6257-65.

22. Ceulemans, H. and M. Bollen, *Functional diversity of protein phosphatase-1, a cellular economizer and reset button*. *Physiol Rev*, 2004. **84**(1): p. 1-39.
23. Goldberg, J., et al., *Three-dimensional structure of the catalytic subunit of protein serine/threonine phosphatase-1*. *Nature*, 1995. **376**(6543): p. 745-53.
24. Maynes, J.T., et al., *Crystal structure of the tumor-promoter okadaic acid bound to protein phosphatase-1*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(47): p. 44078-82.
25. Kita, A., et al., *Crystal structure of the complex between calyculin A and the catalytic subunit of protein phosphatase 1*. *Structure*, 2002. **10**(5): p. 715-24.
26. Egloff, M.P., et al., *Crystal structure of the catalytic subunit of human protein phosphatase 1 and its complex with tungstate*. *J Mol Biol*, 1995. **254**(5): p. 942-59.
27. Carmody, L.C., et al., *A protein phosphatase-1gamma1 isoform selectivity determinant in dendritic spine-associated neurabin*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(21): p. 21714-23.
28. Terry-Lorenzo, R.T., et al., *Neurabins recruit protein phosphatase-1 and inhibitor-2 to the actin cytoskeleton*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(48): p. 46535-43.
29. Wakula, P., et al., *Degeneracy and function of the ubiquitous RVXF motif that mediates binding to protein phosphatase-1*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(21): p. 18817-23.
30. Eto, M., et al., *Inhibitor-2 regulates protein phosphatase-1 complexed with NimA-related kinase to induce centrosome separation*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(46): p. 44013-20.
31. Lesage, B., et al., *A complex of catalytically inactive protein phosphatase-1 sandwiched between Sds22 and inhibitor-3*. *Biochemistry*, 2007. **46**(31): p. 8909-19.
32. Egloff, M.P., et al., *Structural basis for the recognition of regulatory subunits by the catalytic subunit of protein phosphatase 1*. *EMBO J*, 1997. **16**(8): p. 1876-87.
33. Terrak, M., et al., *Structural basis of protein phosphatase 1 regulation*. *Nature*, 2004. **429**(6993): p. 780-4.
34. Alessi, D., et al., *The control of protein phosphatase-1 by targeting subunits. The major myosin phosphatase in avian smooth muscle is a novel form of protein phosphatase-1*. *Eur J Biochem*, 1992. **210**(3): p. 1023-35.
35. Hirano, K., M. Hirano, and H. Kanaide, *Regulation of myosin phosphorylation and myofilament Ca²⁺ sensitivity in vascular smooth muscle*. *J Smooth Muscle Res*, 2004. **40**(6): p. 219-36.
36. Ichikawa, K., M. Ito, and D.J. Hartshorne, *Phosphorylation of the large subunit of myosin phosphatase and inhibition of phosphatase activity*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(9): p. 4733-40.
37. Feng, J., et al., *Inhibitory phosphorylation site for Rho-associated kinase on smooth muscle myosin phosphatase*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(52): p. 37385-90.
38. Muranyi, A., et al., *Phosphorylation of the myosin phosphatase target subunit by integrin-linked kinase*. *Biochem J*, 2002. **366**(Pt 1): p. 211-6.
39. Niiro, N. and M. Ikebe, *Zipper-interacting protein kinase induces Ca²⁺-free smooth muscle contraction via myosin light chain phosphorylation*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(31): p. 29567-74.
40. MacDonald, J.A., et al., *Identification of the endogenous smooth muscle myosin phosphatase-associated kinase*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(5): p. 2419-24.

41. Takizawa, N., Y. Koga, and M. Ikebe, *Phosphorylation of CPII7 and myosin binding subunit of type 1 protein phosphatase by p21-activated kinase*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002. **297**(4): p. 773-8.
42. Muranyi, A., et al., *Myotonic dystrophy protein kinase phosphorylates the myosin phosphatase targeting subunit and inhibits myosin phosphatase activity*. *FEBS Lett*, 2001. **493**(2-3): p. 80-4.
43. Broustas, C.G., et al., *Phosphorylation of the myosin-binding subunit of myosin phosphatase by Raf-1 and inhibition of phosphatase activity*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(4): p. 3053-9.
44. Wooldridge, A.A., et al., *Smooth muscle phosphatase is regulated in vivo by exclusion of phosphorylation of threonine 696 of MYPT1 by phosphorylation of Serine 695 in response to cyclic nucleotides*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(33): p. 34496-504.
45. Totsukawa, G., et al., *Activation of myosin phosphatase targeting subunit by mitosis-specific phosphorylation*. *J Cell Biol*, 1999. **144**(4): p. 735-44.
46. Toth, A., et al., *Phosphorylation of MYPT1 by protein kinase C attenuates interaction with PPI catalytic subunit and the 20 kDa light chain of myosin*. *FEBS Lett*, 2000. **484**(2): p. 113-7.
47. Okubo, S., et al., *A regulatory subunit of smooth muscle myosin bound phosphatase*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994. **200**(1): p. 429-34.
48. Boudrez, A., et al., *Identification of MYPT1 and NIPPI as subunits of protein phosphatase 1 in rat liver cytosol*. *FEBS Lett*, 1999. **455**(1-2): p. 175-8.
49. Takahashi, N., et al., *Localization of the gene coding for myosin phosphatase, target subunit 1 (MYPT1) to human chromosome 12q15-q21*. *Genomics*, 1997. **44**(1): p. 150-2.
50. Shimizu, H., et al., *Characterization of the myosin-binding subunit of smooth muscle myosin phosphatase*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(48): p. 30407-11.
51. Turek, P., et al., *[Percutaneous renal artery angioplasty--review of current indicators]*. *Przegl Lek*, 2001. **58**(12): p. 1071-5.
52. Ito, M., et al., *Myosin phosphatase: structure, regulation and function*. *Mol Cell Biochem*, 2004. **259**(1-2): p. 197-209.
53. Fujioka, M., et al., *A new isoform of human myosin phosphatase targeting/regulatory subunit (MYPT2): cDNA cloning, tissue expression, and chromosomal mapping*. *Genomics*, 1998. **49**(1): p. 59-68.
54. Tan, I., et al., *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**(24): p. 21209-16.
55. Skinner, J.A. and A.R. Saltiel, *Cloning and identification of MYPT3: a prenylatable myosin targeting subunit of protein phosphatase 1*. *Biochem J*, 2001. **356**(Pt 1): p. 257-67.
56. Yong, J., et al., *Phosphorylation of Myosin Phosphatase Targeting Subunit 3 (MYPT3) and Regulation of Protein Phosphatase 1 by Protein Kinase A*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(42): p. 31202-11.
57. Cao, W., et al., *TIMAP, a novel CAAX box protein regulated by TGF-beta1 and expressed in endothelial cells*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2002. **283**(1): p. C327-37.
58. Kim, K., et al., *The protein phosphatase-1 targeting subunit TIMAP regulates LAMRI phosphorylation*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. **338**(3): p. 1327-34.

59. Dejana, E., G. Bazzoni, and M.G. Lampugnani, *Vascular endothelial (VE)-cadherin: only an intercellular glue?* Exp Cell Res, 1999. **252**(1): p. 13-9.
60. Somlyo, A.P. and A.V. Somlyo, *Signal transduction and regulation in smooth muscle.* Nature, 1994. **372**(6503): p. 231-6.
61. Hartshorne, D.J., M. Ito, and F. Erdodi, *Myosin light chain phosphatase: subunit composition, interactions and regulation.* J Muscle Res Cell Motil, 1998. **19**(4): p. 325-41.
62. Fukata, Y., M. Amano, and K. Kaibuchi, *Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells.* Trends Pharmacol Sci, 2001. **22**(1): p. 32-9.
63. Eto, M., et al., *A novel protein phosphatase-1 inhibitory protein potentiated by protein kinase C. Isolation from porcine aorta media and characterization.* J Biochem, 1995. **118**(6): p. 1104-7.
64. Birch, K.A., et al., *Calcium/calmodulin transduces thrombin-stimulated secretion: studies in intact and minimally permeabilized human umbilical vein endothelial cells.* J Cell Biol, 1992. **118**(6): p. 1501-10.
65. Wysolmerski, R.B. and D. Lagunoff, *Involvement of myosin light-chain kinase in endothelial cell retraction.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(1): p. 16-20.
66. Wysolmerski, R.B. and D. Lagunoff, *Regulation of permeabilized endothelial cell retraction by myosin phosphorylation.* Am J Physiol, 1991. **261**(1 Pt 1): p. C32-40.
67. Birukov, K.G., et al., *Differential regulation of alternatively spliced endothelial cell myosin light chain kinase isoforms by p60(Src).* J Biol Chem, 2001. **276**(11): p. 8567-73.
68. Garcia, J.G., et al., *Myosin light chain kinase in endothelium: molecular cloning and regulation.* Am J Respir Cell Mol Biol, 1997. **16**(5): p. 489-94.
69. Lazar, V. and J.G. Garcia, *A single human myosin light chain kinase gene (MLCK; MYLK).* Genomics, 1999. **57**(2): p. 256-67.
70. Verin, A.D., et al., *Biochemical regulation of the nonmuscle myosin light chain kinase isoform in bovine endothelium.* Am J Respir Cell Mol Biol, 1998. **19**(5): p. 767-76.
71. Verin, A.D., et al., *Expression of a novel high molecular-weight myosin light chain kinase in endothelium.* Am J Respir Cell Mol Biol, 1998. **19**(5): p. 758-66.
72. Wojciak-Stothard, B., et al., *Regulation of TNF-alpha-induced reorganization of the actin cytoskeleton and cell-cell junctions by Rho, Rac, and Cdc42 in human endothelial cells.* J Cell Physiol, 1998. **176**(1): p. 150-65.
73. Carbajal, J.M., et al., *ROCK mediates thrombin's endothelial barrier dysfunction.* Am J Physiol Cell Physiol, 2000. **279**(1): p. C195-204.
74. Essler, M., et al., *Thrombin inactivates myosin light chain phosphatase via Rho and its target Rho kinase in human endothelial cells.* J Biol Chem, 1998. **273**(34): p. 21867-74.
75. van Nieuw Amerongen, G.P., et al., *Activation of RhoA by thrombin in endothelial hyperpermeability: role of Rho kinase and protein tyrosine kinases.* Circ Res, 2000. **87**(4): p. 335-40.
76. Birukova, A.A., et al., *GEF-H1 is involved in agonist-induced human pulmonary endothelial barrier dysfunction.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2006. **290**(3): p. L540-8.
77. Birukova, A.A., et al., *Role of Rho GTPases in thrombin-induced lung vascular endothelial cells barrier dysfunction.* Microvasc Res, 2004. **67**(1): p. 64-77.

78. Senba, S., M. Eto, and M. Yazawa, *Identification of trimeric myosin phosphatase (PP1M) as a target for a novel PKC-potentiated protein phosphatase-1 inhibitory protein (CPII7) in porcine aorta smooth muscle*. J Biochem, 1999. **125**(2): p. 354-62.
79. Bodin, P. and G. Burnstock, *Increased release of ATP from endothelial cells during acute inflammation*. Inflamm Res, 1998. **47**(8): p. 351-4.
80. Gunduz, D., et al., *ATP antagonism of thrombin-induced endothelial barrier permeability*. Cardiovasc Res, 2003. **59**(2): p. 470-8.
81. Jacobson, J.R., et al., *Endothelial cell barrier enhancement by ATP is mediated by the small GTPase Rac and cortactin*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2006. **291**(2): p. L289-95.
82. Kolosova, I.A., et al., *Signaling pathways involved in adenosine triphosphate-induced endothelial cell barrier enhancement*. Circ Res, 2005. **97**(2): p. 115-24.
83. Garcia, J.G., H.W. Davis, and C.E. Patterson, *Regulation of endothelial cell gap formation and barrier dysfunction: role of myosin light chain phosphorylation*. J Cell Physiol, 1995. **163**(3): p. 510-22.
84. Garcia, J.G., et al., *Thrombin-induced increase in albumin permeability across the endothelium*. J Cell Physiol, 1986. **128**(1): p. 96-104.
85. Sheldon, R., et al., *Role of myosin light-chain phosphorylation in endothelial cell retraction*. Am J Physiol, 1993. **265**(6 Pt 1): p. L606-12.
86. van Nieuw Amerongen, G.P., et al., *Transient and prolonged increase in endothelial permeability induced by histamine and thrombin: role of protein kinases, calcium, and RhoA*. Circ Res, 1998. **83**(11): p. 1115-23.
87. Goldberg, P.L., et al., *p38 MAPK activation by TGF-beta1 increases MLC phosphorylation and endothelial monolayer permeability*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2002. **282**(1): p. L146-54.
88. Birukova, A.A., et al., *Microtubule disassembly induces cytoskeletal remodeling and lung vascular barrier dysfunction: role of Rho-dependent mechanisms*. J Cell Physiol, 2004. **201**(1): p. 55-70.
89. Verin, A.D., et al., *Microtubule disassembly increases endothelial cell barrier dysfunction: role of MLC phosphorylation*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2001. **281**(3): p. L565-74.
90. Takizawa, N., N. Niiro, and M. Ikebe, *Dephosphorylation of the two regulatory components of myosin phosphatase, MBS and CPII7*. FEBS Lett, 2002. **515**(1-3): p. 127-32.
91. Lontay, B., et al., *Okadaic acid induces phosphorylation and translocation of myosin phosphatase target subunit 1 influencing myosin phosphorylation, stress fiber assembly and cell migration in HepG2 cells*. Cell Signal, 2005. **17**(10): p. 1265-75.
92. Ambach, A., et al., *The serine phosphatases PP1 and PP2A associate with and activate the actin-binding protein cofilin in human T lymphocytes*. Eur J Immunol, 2000. **30**(12): p. 3422-31.
93. Cairns, J., et al., *Dephosphorylation of the small heat shock protein Hsp27 in vivo by protein phosphatase 2A*. J Biol Chem, 1994. **269**(12): p. 9176-83.
94. Pato, M.D., et al., *Smooth-muscle caldesmon phosphatase is SMP-I, a type 2A protein phosphatase*. Biochem J, 1993. **293** (Pt 1): p. 35-41.
95. Yamamoto, H., et al., *Dephosphorylation of fetal-tau and paired helical filaments-tau by protein phosphatases 1 and 2A and calcineurin*. J Biochem, 1995. **118**(6): p. 1224-31.

96. Hiraga, A. and S. Tamura, *Protein phosphatase 2A is associated in an inactive state with microtubules through 2A1-specific interaction with tubulin*. *Biochem J*, 2000. **346 Pt 2**: p. 433-9.
97. Sontag, E., et al., *A novel pool of protein phosphatase 2A is associated with microtubules and is regulated during the cell cycle*. *J Cell Biol*, 1995. **128(6)**: p. 1131-44.
98. Sontag, E., et al., *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(36)**: p. 25490-8.
99. Tar, K., et al., *Role of protein phosphatase 2A in the regulation of endothelial cell cytoskeleton structure*. *J Cell Biochem*, 2006. **98(4)**: p. 931-53.
100. Verin, A.D., et al., *Role of Ca²⁺/calmodulin-dependent phosphatase 2B in thrombin-induced endothelial cell contractile responses*. *Am J Physiol*, 1998. **275(4 Pt 1)**: p. L788-99.
101. Bretscher, A., *Purification of an 80,000-dalton protein that is a component of the isolated microvillus cytoskeleton, and its localization in nonmuscle cells*. *J Cell Biol*, 1983. **97(2)**: p. 425-32.
102. Pakkanen, R., et al., *Microvillus-specific Mr 75,000 plasma membrane protein of human choriocarcinoma cells*. *J Histochem Cytochem*, 1987. **35(8)**: p. 809-16.
103. Tsukita, S. and Y. Hieda, *A new 82-kD barbed end-capping protein (radixin) localized in the cell-to-cell adherens junction: purification and characterization*. *J Cell Biol*, 1989. **108(6)**: p. 2369-82.
104. Algrain, M., et al., *Ezrin contains cytoskeleton and membrane binding domains accounting for its proposed role as a membrane-cytoskeletal linker*. *J Cell Biol*, 1993. **120(1)**: p. 129-39.
105. Arpin, M., M. Algrain, and D. Louvard, *Membrane-actin microfilament connections: an increasing diversity of players related to band 4.1*. *Curr Opin Cell Biol*, 1994. **6(1)**: p. 136-41.
106. Lankes, W., et al., *A heparin-binding protein involved in inhibition of smooth-muscle cell proliferation*. *Biochem J*, 1988. **251(3)**: p. 831-42.
107. Tsukita, S., A. Nagafuchi, and S. Yonemura, *Molecular linkage between cadherins and actin filaments in cell-cell adherens junctions*. *Curr Opin Cell Biol*, 1992. **4(5)**: p. 834-9.
108. Sato, N., et al., *Radixin, a barbed end-capping actin-modulating protein, is concentrated at the cleavage furrow during cytokinesis*. *J Cell Biol*, 1991. **113(2)**: p. 321-30.
109. Sato, N., et al., *A gene family consisting of ezrin, radixin and moesin. Its specific localization at actin filament/plasma membrane association sites*. *J Cell Sci*, 1992. **103 (Pt 1)**: p. 131-43.
110. Berryman, M., Z. Franck, and A. Bretscher, *Ezrin is concentrated in the apical microvilli of a wide variety of epithelial cells whereas moesin is found primarily in endothelial cells*. *J Cell Sci*, 1993. **105 (Pt 4)**: p. 1025-43.
111. Amieva, M.R., K.K. Wilgenbus, and H. Furthmayr, *Radixin is a component of hepatocyte microvilli in situ*. *Exp Cell Res*, 1994. **210(1)**: p. 140-4.
112. Takeuchi, K., et al., *Perturbation of cell adhesion and microvilli formation by antisense oligonucleotides to ERM family members*. *J Cell Biol*, 1994. **125(6)**: p. 1371-84.

113. Turunen, O., T. Wahlstrom, and A. Vaheri, *Ezrin has a COOH-terminal actin-binding site that is conserved in the ezrin protein family*. J Cell Biol, 1994. **126**(6): p. 1445-53.
114. Pestonjamas, K., et al., *Moesin, ezrin, and p205 are actin-binding proteins associated with neutrophil plasma membranes*. Mol Biol Cell, 1995. **6**(3): p. 247-59.
115. Roy, C., M. Martin, and P. Mangeat, *A dual involvement of the amino-terminal domain of ezrin in F- and G-actin binding*. J Biol Chem, 1997. **272**(32): p. 20088-95.
116. Hirano, K., H. Aiba, and K. Oguro, [*Quantitative study of brain perfusion patterns of 99mTc-ECD SPECT in children with developmental disabilities*]. No To Hattatsu, 2004. **36**(6): p. 481-6.
117. Katoh, N., et al., *The characteristics of patients with atopic dermatitis demonstrating a positive reaction in a scratch test after 48 hours against house dust mite antigen*. J Dermatol, 2004. **31**(9): p. 720-6.
118. Giaever, I. and C.R. Keese, *A morphological biosensor for mammalian cells*. Nature, 1993. **366**(6455): p. 591-2.
119. Toth, A., et al., *Study of the subunit interactions in myosin phosphatase by surface plasmon resonance*. Eur J Biochem, 2000. **267**(6): p. 1687-97.
120. Schaphorst, K.L., et al., *Thrombin-mediated focal adhesion plaque reorganization in endothelium: role of protein phosphorylation*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1997. **17**(4): p. 443-55.
121. Matsui, T., et al., *Rho-kinase phosphorylates COOH-terminal threonines of ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins and regulates their head-to-tail association*. J Cell Biol, 1998. **140**(3): p. 647-57.
122. Fukata, Y., et al., *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**(2): p. 409-18.
123. Li, L., et al., *Phosphorylation of TIMAP by glycogen synthase kinase-3beta activates its associated protein phosphatase 1*. J Biol Chem, 2007. **282**(35): p. 25960-9.
124. McVerry, B.J. and J.G. Garcia, *Endothelial cell barrier regulation by sphingosine 1-phosphate*. J Cell Biochem, 2004. **92**(6): p. 1075-85.
125. Dudek, S.M. and J.G. Garcia, *Cytoskeletal regulation of pulmonary vascular permeability*. J Appl Physiol, 2001. **91**(4): p. 1487-500.
126. Bretscher, A., D. Reczek, and M. Berryman, *Ezrin: a protein requiring conformational activation to link microfilaments to the plasma membrane in the assembly of cell surface structures*. J Cell Sci, 1997. **110 (Pt 24)**: p. 3011-8.
127. Mangeat, P., C. Roy, and M. Martin, *ERM proteins in cell adhesion and membrane dynamics*. Trends Cell Biol, 1999. **9**(5): p. 187-92.
128. Bretscher, A., K. Edwards, and R.G. Fehon, *ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(8): p. 586-99.
129. Shaw, R.J., et al., *RhoA-dependent phosphorylation and relocation of ERM proteins into apical membrane/actin protrusions in fibroblasts*. Mol Biol Cell, 1998. **9**(2): p. 403-19.
130. Birukova, A.A., et al., *Protein kinase A attenuates endothelial cell barrier dysfunction induced by microtubule disassembly*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2004. **287**(1): p. L86-93.
131. Patterson, C.E., et al., *Regulation of endothelial barrier function by the cAMP-dependent protein kinase*. Endothelium, 2000. **7**(4): p. 287-308.

132. Lum, H., et al., *Expression of PKA inhibitor (PKI) gene abolishes cAMP-mediated protection to endothelial barrier dysfunction*. Am J Physiol, 1999. **277**(3 Pt 1): p. C580-8.
133. Shah, D.I. and M. Singh, *Activation of protein kinase A improves vascular endothelial dysfunction*. Endothelium, 2006. **13**(4): p. 267-77.
134. Dudek, E.J., F. Shang, and A. Taylor, *H(2)O(2)-mediated oxidative stress activates NF-kappa B in lens epithelial cells*. Free Radic Biol Med, 2001. **31**(5): p. 651-8.
135. Eto, M., et al., *Glycogen synthase kinase-3 mediates endothelial cell activation by tumor necrosis factor-alpha*. Circulation, 2005. **112**(9): p. 1316-22.
136. Beckers, C.M., et al., *Nuclear targeting of beta-catenin and p120ctn during thrombin-induced endothelial barrier dysfunction*. Cardiovasc Res, 2008. **79**(4): p. 679-88.

12. TÁRGYSZAVAK

Barrier funkció

Protein foszfatáz 1

TIMAP

ERM – ezrin, radixin, moezin

Immunfluoreszcencia

Transzendentél ellenállásmérés

Foszfatáz aktivitásmérés

Biacore

13. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsősorban szeretnék hálás köszönetet mondani Dr. Csontos Csilla témavezetőmnek, hogy számos elméleti és gyakorlati tanáccsal segítette és irányította munkámat.

Köszönöm Dr. Gergely Pál Professzor Úrnak, hogy munkámat támogatta és lehetővé tette számomra, hogy a DEOEC Orvosi Vegytani Intézetében dolgozzak.

Szeretném megköszönni az Orvosi Vegytani Intézet minden dolgozójának a munkámhoz nyújtott segítséget. Külön köszönet, Kása Anitának és Boratkó Anitának a kísérletes munka során nyújtott segítségükért. Továbbá szeretném megköszönni Dr. Erdődi Ferenc, Dr. Erdélyi Katalin, Dr. Kiss Andrea, Dr. Bai Péter, Dr. Kovács László és Brunyánszki Attila szakmai és gyakorlati tanácsait. Hálás köszönettel tartozom Molnár Zsanett, Dr. Németh Árpádné, Kelemenné Szántó Ágota és Tankáné Farkas Andrea asszisztenseknek a laboratóriumi munkában nyújtott segítségükért.

Köszönet Dr. Erdődi Ferencnek és Bécsi Bálintnak, hogy lehetőséget biztosítottak számunkra a Biacore vizsgálatokhoz, valamint a mérések kivitelezésében és értékelésükben nyújtott segítségükért.

Köszönetet szeretnék mondani Dr. Alexander D. Verinnek, hogy laboratóriumában, a Chicago-i Egyetemen egy évet eltölthettem.

Szeretném megköszönni feleségemnek, hogy mindvégig türelmesen segítette munkámat és erőt adott a nehéz időszakokban.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm családomnak, hogy nyugodt és stabil háttérrel biztosítottak számomra.

14. FÜGGELÉK

14.1. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

Csortos C, **Czikora I**, Bogatcheva N, Adyshev DM, Poirier C, Olah G, Verin AD.
TIMAP is a positive regulator of pulmonary endothelial barrier function. Am. J. Phys.
2008 Jun 27. [295(3):L440-50] (IF: 4,26)

Czikora I, Kim KM, 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. 2011 Apr 3. [Epub ahead of print] (IF: 3,897)

Egyéb közlemények:

Tar K, Csortos Cs, **Czikora I**, Oláh G, Ma SF, Wadgaonkar R, Gergely P, Garcia JGN,
and Verin AD Role of protein phosphatase 2A in the regulation of endothelial cell
cytoskeleton structure.
J Cell Biochem. 2006 Jul 1;98(4):931-53. (IF: 3,409)

Az értekezéshez kapcsolódó előadás:

1. I. Czikora: The role of TIMAP in the regulation of endothelial barrier function
A Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola PhD szimpóziuma, Debrecen,
2010. május 31 - június 1

Az értekezéshez kapcsolódó poszterek:

1. Czikora I., Oláh G., Csortos Cs., Verin A.: Characterization of TIMAP, the
potential regulatory subunit of protein phosphatase 1 in human endothelial cells
The American Society for Cell Biology 46th Annual Meeting 2006, San Diego,
CA, December 9-13, 2006
2. Czikora I., Oláh G., Verin A., Csortos Cs.: TIMAP fehérje vizsgálata human
tüdő artéria endothel sejtekben
VII. Magyar Genetikai Kongresszus, XIV. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok,
Balatonfüred, 2007. április 15-17.

3. Czikora I., Oláh G., Verin A., Csontos Cs.: TIMAP fehérje és a PP1c közötti kölcsönhatás vizsgálata human tüdő artéria endothel sejtekben
37. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2007. május 22-25
4. Czikora I., Oláh G., Verin A., Csontos Cs.: A TIMAP fehérje a tüdőendotélium barrier funkcióját pozitívan szabályozza
A Magyar Biokémiai Egyesület 2007. évi vándorgyűlése, Debrecen, 2007. augusztus 26-29.
5. Csontos Cs., Czikora I., Adyshev, D., Oláh G., Verin A.: TIMAP is a positive regulator of pulmonary endothelial barrier function
The American Society for Cell Biology 47th Annual Meeting 2007, Washington, DC, December 1-5, 2007
6. Kása A., Boratkó A., Czikora I., Gergely P., Csontos Cs.: A protein foszfatáz 2A regulátor alegységeinek vizsgálata tüdőartéria endothel sejteken.
A Magyar Biokémiai Egyesület 2008. évi Vándorgyűlése, Szeged, 2008. augusztus 31- szeptember 03.
7. Kása A., Czikora I., Gergely P., Csontos Cs.: A protein foszfatáz 2A regulátor alegységeinek szerepe tüdőartéria endothel sejtek citoszkeleton szerkezetének szabályozásában.
Membrán-transzport konferencia, Sümeg, 2009. május 19-22.
8. Czikora I., Bécsi B., Erdődi F., Gergely P., Csontos Cs.: A TIMAP és az ERM a szerepe a tüdőendotélium gátfunkciójának szabályozásában
A Magyar Biokémiai Egyesület 2009. évi Vándorgyűlése, Budapest, 2009. augusztus 23-26.
9. Kása A., Czikora I., Gergely P., Csontos Cs.: A PP2AB regulátor alegységek szerepe tüdőartéria-endotél sejtek citoszkeleton szerkezetének szabályozásában.
A Magyar Biokémiai Egyesület 2009. évi Vándorgyűlése, Budapest, 2009. augusztus 23-26.
10. Czikora I., Bécsi B., Erdődi F., Gergely P., Csontos Cs.: TIMAP fehérje és a protein foszfatáz 1 kölcsönhatásának vizsgálata tüdő-endotélsejtekben
A Magyar Biokémiai Egyesület 2010. évi Vándorgyűlése, Budapest, 2010. augusztus 25- 28.
11. Boratkó A., Czikora I., Erdődi F., Gergely P., Csontos Cs.: A TIMAP és a protein foszfatáz-1 katalitikus alegységének vizsgálata daganatos sejtekben
A Magyar Biokémiai Egyesület 2010. évi Vándorgyűlése, Budapest, 2010. Augusztus 25- 28.