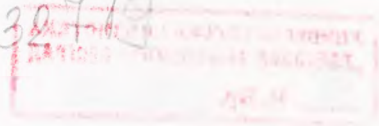


P.D. 10329

ID = 178307/18



**UNIVERZITET U BEOGRADU  
BIOLOŠKI FAKULTET**

**DOKTORSKA DISERTACIJA**



**Uticaj ekspresije katalitičkog domena  
kinaze lakog lanca miozina na kontraktilna svojstva  
ne-mišićnih ćelija**

**Gordana (Trojanović) Nikčević**

**1998.**

Komentori:

Dr. Zvezdana Popović, Viši naučni saradnik, IMGGI

Dr. Mirjana Stojiljković, Docent, Biološki Fakultet, PMF, Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije:

Dr. Zvezdana Popović, Viši naučni saradnik, IMGGI

Dr. Mirjana Stojiljković, Docent, Biološki Fakultet, PMF, Univerzitet u Beogradu

Dr. Milena Stevanović, Viši naučni saradnik, IMGGI

Datum odbrane:

Datum promocije:

Mojim roditeljima,  
Željku i Sonji.

Izuzetnu zahvalnost dugujem Dr. Zvezdani Popović, koja je me je pre mnogo godina (u stvari i ne pre tako mnogo godina) uvela u svet nauke, bila moj mentor i spretno me vodila kroz razne probleme koji su se pojavljivali. Na veoma specifičan i efikasan način pomagala mi je i davala savete, bila (i ostala) ključna osoba na koju sam mogla da se oslonim u svakom trenutku. Njene sugestije u toku finalne izrade ove teze bile su od neprocenjivog značaja. Zbog svega toga, a pogotovu onoga što nije u ovim redovima - hvala.

Duboku zahvalnost i poštovanje dugujem prof. Dr. Jovi Martinoviću, koji je sa velikim angažovanjem učestvovao u početnim fazama prijave moje teze, a koga je nažalost bolest pobedila i otrgla od nas.

Dr. Mirjani Stojiljković se posebno zahvaljujem što je prihvatila da bude komentor i član moje komisije i pomogla prilikom završnih koraka u izradi teze, koji sa razdaljine "preko okeana" ne mogu jednostavno i lako da se reše.

Dr. Mileni Stevanović sam veoma zahvalna što kao član komisije učestvuje u poslednjim fazama realizacije ove teze, a svakako i za mnoge lepe (i one druge) događaje koje smo tokom godina delile.

Besprekorno povezivanje svih članova komisije i veliki administrativni deo posla u vezi ove teze, obavila je Dr. Jelena Zarić i ja sam joj beskrajno zahvalna za to. Naše dugogodišnje druženje je nešto što meni izuzetno znači i na šta sam ponosna.

Ova teza je napisana za vreme mog boravka u grupi Dr. Brende Russell, na UIC-u (University of Illinois at Chicago). Njoj dugujem veliku zahvalnost za konstruktivne savete i podršku. Takodje, rad u njenoj laboratoriji je dalje proširio moja interesovanja i znanje iz oblasti mišićne fiziologije i molekularne biologije i nadovezao se na rad prikazan u ovoj tezi.

Rezultati opisani u ovoj tezi su uradjeni u laboratoriji Dr. Primal de Lanerolle-a, na UIC-u. Njemu dugujem zahvalnost što sam imala prilike da radim u "uzavreloj" naučnoj atmosferi, što svakako nije bilo lako, ali mi je omogućilo da steknem znanje i iskustvo vezano za ovu oblast. Sa velikim entuzijazmom i kompletno posvećen eksperimentima, umešno je vodio moje kolege i mene kroz "miozinski svet". Na tome sam mu iskreno zahvalna.

Saradnja sa Dr. Gail Hecht je imala značajan uticaj na izradu ove teze. Deo eksperimenata u vezi epitelijalnih ćelija je uradjen u njenoj laboratoriji i ja joj se posebno zahvaljujem što je uvek bila spremna da mi pomogne i da korisne savete.

Sa Lidijom Pestić-Dragović sam delila svokodnevne naučne i privatne događaje za sve vreme mog boravka na UIC-u. Dugujem joj zahvalnost za sve što je učinila za mene i moju porodicu, za lepo i toplo druženje. Posle svega, sigurna sam da ćemo se tog perioda u našim životima obe sećati sa zadovoljstvom.

Duge, sadržajne diskusije o eksperimentima, naučnim (i ostalim) problemima vodila sam sa mojim kolegom Dr. Grzegorz Novak-om. Njemu se zahvaljujem za savete i sugestije, za sve što sam od njega naučila iz oblasti biohemije.

Dr. Merja Perhonen mi je puno pomogla prilikom tehničke obrade ove teze. Naučna saradnja i prijateljstvo sa njom su mi veoma važni i dragi i zbog svega toga ostaću joj zauvek zahvalna.

Profesori Dr. Vladimir Glišin, Dr. Ana Savić, Dr. Ljubiša Topisirović, Dr. Dragan Savić, Dr. Radomir Crkvenjakov, sve kolege iz "Centra" i IMGGI pomagali su mi tokom godina i ja im se najiskrenije zahvaljujem. Svako od njih je na sebi specifičan način doprineo da mi "Centar" i Beograd nedostaju u "tudjem svetu". Srećna sam što sam sa takvim kolegama delila najznačajnije trenutke u svom životu.

U godinama koje dolaze, nadam se da ću uspeti da se zahvalim svim rođacima i prijateljima koji su mi pomagali iskreno i sa puno ljubavi.

## SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. CILJ RADA	3
3. OPŠTI DEO	4
3.1 Citoskelet	4
3.2 Miozini	6
3.2.1 Struktura miozina	8
3.2.2 Miozin-II	8
3.2.2.1 Filamentozna organizacija miozina-II	10
3.2.2.2 Regulacija aktivnosti miozina-II	12
3.2.3 Kinaza lakog lanca miozina	17
3.3 Aktin i miozin-II u ne-mišićnim ćelijama	19
3.3.1 Aktin i miozin-II u fibroblastima	20
3.3.2 Aktin i miozin-II u epitelijalnim ćelijama	22
3.4 Epitelijalne ćelije	22
3.4.1 Transepitelijalni otpor MDCK ćelija	25
3.4.2 Organizacija citoskeletnih filamenata epitelijalnih ćelija	26
3.5 Kontraktilnost eukariotskih ćelija	27
4. MATERIJAL I METODE	28
4.1 Ćelijska kultura	28
4.2 Konstruisanje ekspresionih vektora	28
4.3 Elektroforeza DNK fragmenata na agaroznom gelu	28
4.4 Izolovanje DNK fragmenata iz agaroznog gela	29
4.5 Subkloniranje DNK fragmenata u ekspresione vektore	29
4.6 Transformisanje bakterija	29
4.7 Izolovanje plazmidne DNK	30
4.8 Retrovirusno eksprimiranje proteina u ćelijama	32
4.9 Reverzna transkripcija - lančana polimerazna reakcija (RT-PCR)	33
4.9.1 Izolovanje RNK	33
4.9.2 Reverzna transkripcija	33

4.9.3 Lančana polimerazna reakcija	34
4.10 Imunoprecipitacija miozina	35
4.11 Obeležavanje proteina u ćelijama u kulturi sa <sup>35</sup> S	36
4.12 Fosfopeptidno mapiranje	37
4.13 Kvantifikovanje čvrstoće citoskeleta	38
4.14 Konstruisanje fibroblastnih vlakana	38
4.15 Merenje kontraktilnosti	39
4.16 Merenje transepitelijalnog otpora	39
4.17 Statistička analiza rezultata	40
5. REZULTATI	41
5.1 Konstruisanje ekspresionih vektora	41
5.1.1 Konstruisanje pLNC-tMK vektora	43
5.1.2 Konstruisanje pLNC-β-gal vektora	44
5.2 Potvrda tMK ekspresije i aktivnosti	45
5.2.1 Ekspimiranje tMK u fibroblastima	45
5.2.2 Ekspimiranje tMK u epitelijalnim ćelijama	47
5.3 Aktivnost tMK u fibroblastima i epitelijalnim ćelijama	49
5.3.1 Aktivnost tMK u fibroblastima	49
5.3.2 Aktivnost tMK u epitelijalnim ćelijama	51
5.4 Fosfopeptidno mapiranje lakih lanaca miozina	53
5.5 Čvrstoća citoskeleta tMK ćelija	55
5.6 Kontraktilna svojstva 3T3-tMK ćelija	56
5.7 Fosforilacija lakih lanaca miozina posle stimulisanja 3T3 ćelija serumom	59
5.8 Efekat povećane fosforilacije lakih lanaca miozina na barijernu funkciju MDCK ćelija	64
6. DISKUSIJA	66
6.1 Aktivnost kinaze lakog lanca miozina	67
6.2 Aktivnost tMK u 3T3 i MDCK ćelijama	70
6.3 Čvrstoća citoskeleta tMK ćelija	71
6.4 Kontraktilna svojstva 3T3-tMK ćelija	73

6.5 Epitelijalne ćelije	82
6.5.1 Citoskelet i transepitelijalna permeabilnost	83
6.6 Kontraktilnost eukariotskih ćelija	92
7. ZAKLJUČCI	93
8. LITERATURA	95



6.5 Epitelijalne ćelije	82
6.5.1 Citoskelet i transepitelijalna permeabilnost	83
6.6 Kontraktilnost eukariotskih ćelija	92
7. ZAKLJUČCI	93
8. LITERATURA	95

## SKRAĆENICE

ATP	- adenzin trifosfat
ADP	- adenzin difosfat
bp	- bazni par
DNK	- dezoksiribonukleinska kiselina
RNK	- ribonukleinska kiselina
iRNK	- informacijska ribonukleinska kiselina
dNTP	- deoksinukleotid trifosfati
EtBr	- etidijum bromid
PCR	- lančana polimerazna reakcija
RT	- reverzna transkripcija
TRIS	- hidroksimetilaminometan
kD	- kilo dalton
cito D	- citohalazin D
LLM	- laki lanci miozina
TLM	- teški lanci miozina
tMK	- truncated myosin kinase (konstitutivno aktivna forma kinaze lakog lanca miozina)
neo	- gen za neomicin

## ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the role of myosin light chain (MLC) phosphorylation (MLC-P) in non-muscle cell contractility by comparing MLC-P in control and 3T3 fibroblasts/MDCK epithelial cells expressing the catalytic domain of myosin light chain kinase (tMK). Analysis of myosin immunoprecipitated from <sup>32</sup>P-labeled cells demonstrated that MLC-P was increased:  $5.7 \pm 1.6$  fold in 3T3-tMK cells, and  $3.1 \pm 0.9$  fold in MDCK-tMK cells, compared to control cells. Phosphopeptide mapping confirmed that tMK was responsible for the increased MLC phosphorylation. Expressing tMK in both cell lines also results in a 2-fold increase in cortical stiffness.

Contractile properties of 3T3 cells were quantified by growing control and tMK cells in collagen and attaching the ensuing fibers to an apparatus for performing mechanical measurements. Serum stimulation resulted in a dose-dependent increase in force with maximal force generated in the presence of 30% (v/v) serum. Surprisingly, MLC-P did not increase in cells following stimulation with serum, and tMK expression did not affect the contractile properties of fibers made from these cells. These data demonstrate that 3T3 cells can generate force without an increase in MLC-P, and that an increase in MLC-P does not affect the contractile properties of fibroblast fibers.

Transepithelial electrical resistance, a measurement of barrier function, of MDCK-tMK cell monolayers was consistently <10% of that of monolayers comprised of control cells. These data support the idea that MLC-P by tMK is involved in regulating epithelial tight junction permeability.

## APSTRAKT

U ovom radu je ispitivana uloga fosforilacije lakih lanaca miozina (LLM) u regulaciji kontraktilnih karakteristika ne-mišićnih ćelija. U tu svrhu korišćene su dve ćelijske linije, 3T3 fibroblasti i MDCK epitelijalne ćelije, u kojima je eksprimiran katalitički domen kinaze lakog lanca miozina (tMK). Analiza miozina imunoprecipitiranog iz ćelija obeleženih sa  $^{32}\text{P}$ , pokazala je da je nivo fosforilacije LLM povećan:  $5.7 \pm 1.6$  puta u 3T3-tMK ćelijama, i  $3.1 \pm 0.9$  puta u MDCK-tMK ćelijama, u poredjenju sa odgovarajućim kontrolnim ćelijama. Fosfopeptidnim mapiranjem je potvrđeno da je tMK enzim odgovoran za ovo povećanje fosforilacije LLM. Takođe, eksprimiranje tMK u obe ćelijske linije dovodi do značajnog povećanja u čvrstoći ćelijskog skeleta.

Kontraktilna svojstva 3T3 ćelija su kvantifikovana tako što su od tMK ćelija i kolagena formirana ćelijska vlakna, koja su zatim povezivana za aparat za mehanička merenja. Stimulacija ovih vlakana serumom rezultirala je u generisanju sile. Ono što je bilo iznenadjujuće je da nije detektovano povećanje fosforilacije LLM po stimulaciji serumom, kao i to da tMK ekspresija nije uticala na kontraktilna svojstva vlakana napravljena od ovih ćelija. Ovi rezultati su pokazali da 3T3 ćelije mogu da generišu silu bez povećanja fosforilacije LLM, kao i to da povećanje fosforilacije LLM ne utiče na kontraktilna svojstva fibroblastnih vlakana.

Vrednosti dobijene merenjem transepitelijalnog otpora MDCK-tMK ćelija bile su oko 10% od vrednosti otpora koji proizvode kontrolne ćelije. Ovi rezultati su u skladu sa pretpostavkom da je fosforilacija LLM tMK enzimom uključena u regulaciju

propustljivosti čvrstih veza epitelijalnih ćelija, t.j. da je kontraktilno stanje citoskeleta značajna determinanta barijerne funkcije epitelijalnih ćelija.

## 1. UVOD

Citoskelet predstavlja visok nivo organizacije proteinskih molekula koji se u vidu mreže prostiru kroz citoplazmu. To je izuzetno dinamična struktura koja se kontinuirano reorganizuje. U suštini, citoskelet bi mogao da se nazove i "citomuskulatura" zato što je direktno odgovoran za promenu oblika i kontrakciju ćelija, kretanje ćelija po podlozi, unutarćelijsko pokretanje (kao što je transport organela sa jednog mesta u citoplazmi na drugo, segregacija hromozoma u toku mitoze) (1).

Mnogobrojne aktivnosti citoskeleta zavise od tri vrste proteinskih filamenata. To su: aktinski filamenti, mikrotubule i intermedijalni filamenti (2). Ovi filamenti mogu da budu toliko dugački da se protežu od jednog kraja ćelije do drugog, da povezuju proteinske komplekse i organele koji se nalaze u različitim delovima ćelije i služe kao put po kome se obavlja transport između njih. Osim toga, ti filamenti obezbeđuju mehaničku potporu koja je važna za očuvanje volumena citoplazme (3). Aktin i tubulin su izuzetno konzervirani kod eukariota, njihovi proteinski filamenti (aktinski filamenti i mikrotubule) intereaguju sa velikim brojem različitih pomoćnih proteina, koji omogućavaju da isti filamenti imaju različite funkcije u različitim delovima ćelije (4,5).

Bakterije nemaju citoskelet, pa se smatra da on predstavlja jedan od ključnih faktora u evoluciji eukariotskih ćelija (2).

U ovoj tezi detaljnije će biti opisani miozini ili tzv. motorni proteini, koji intereaguju sa aktinom. Naime, u kontaktu sa aktinom, miozini hidrolizuju ATP, pri čemu se proizvodi sila neophodna za kontrakciju. Kontrakcija je izuzetno evoluirala u mišićnim

ćelijama i zato je taj model sistem najviše izučen i opisan. Nasuprot tome, mnogo se manje zna o akto-miozinskim sistemima ne-mišićnih ćelija. Ova teza je bazirana na istraživanjima koja su imala za cilj da ispituju ulogu miozina u kontraktilnim svojstvima fibroblasta i paraćelijskom permeabilitetu epitelijalnih ćelija.

## 2. CILJ RADA

Ova disertacija imala je za cilj da istraži efekat povećane fosforilacije lakih lanaca miozina na fiziološke procese koji regulišu kontraktilnost i paraćelijski permeabilitet. U tu svrhu korišćen je retrovirusni sistem za eksprimiranje katalitičkog domena kinaze lakog lanca miozina u 3T3 fibroblastima i MDCK epitelijalnim ćelijama.

Fosforilacija lakih lanaca miozina u ne-mišićnim ćelijama favorizuje formiranje miozinskih filamenata koji intereaguju sa aktinskim filamentima i formiraju akto-miozinski kompleks, koji može da se kontrahuje. Jedna od hipoteza koju smo testirali je da li će povećana fosforilacija lakih lanaca miozina prouzrokovati povećanje kontrakcije akto-miozinskog kompleksa i na taj način povećati čvrstoću ćelijskog skeleta. Takođe, postavljena je hipoteza da povećanje kontrakcije akto-miozinskog prstena, koji opasuje epitelijalne ćelije, dovodi do otvaranja apikalnih veza između ovih ćelija, što utiče na povećanje paraćelijskog permeabiliteta.



### 3. OPŠTI DEO

#### 3.1 Citoskelet

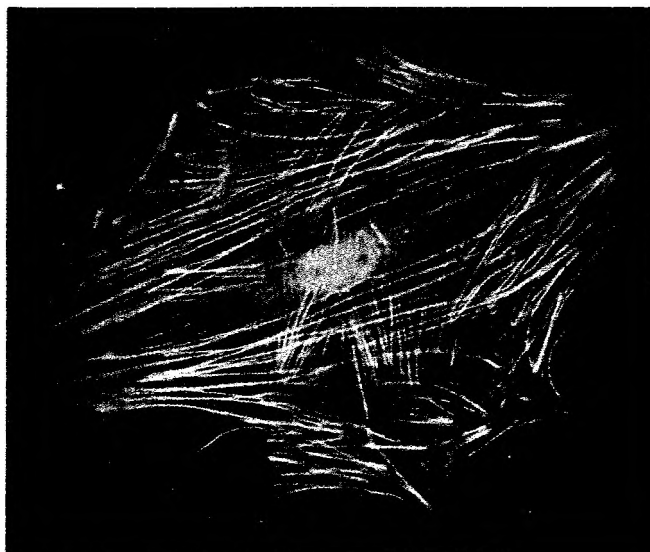
Citosol je fluidni region ćelijske citoplazme koji se nalazi van organela. Ranije se smatralo da je citosol relativno homogeni "rastvor" u kome plivaju organele. Međutim, sada se zna da citosol eukariotskih ćelija sadrži vlaknastu proteinsku mrežu koja se naziva citoskelet. Ovu strukturu sačinjavaju najmanje tri klase proteinskih vlakana: mikrofilamenti ili aktinski filamenti, sagradjeni od aktina (4); zatim mikrotubule, sagradjene od tubulina (5); i intermedijarni filamenti, sačinjeni od fibroznih proteina kao što su vimentin i lamin (6). Kolektivna uloga svih ovih vlakana je da obezbeduju čvrstoću i rigidnost ćelija, a takodje i pokretanje, kako samih ćelija, tako i unutar njih. Ovi filamenti se prostiru duž ćelije i medjusobno ukrštaju. Zbog izuzetno visoke koncentracije proteina u citosolu (25-50% od ukupne količine proteina u ćelijama), smatra se da organizovani kompleksi proteina mogu da se formiraju čak i kada nema dovoljno energije koja ih stabilizuje (7).

Izučavanje citoskeleta je osnovna komponenta u studiranju ćelijske strukture i mehanike. Ćelijski oblik, elastičnost i otpor koji ćelije pružaju deformaciji su esencijalne za funkcionisanje velikog broja ćelija, kao što su eritrociti, fibroblasti i epitelijalne ćelije. Citoskelet je odgovoran za aktivnosti kao što su ćelijska deoba, kretanje ćelija, fagocitoza, transport unutarćelijskih partikula (1).

Izučavanje citoskeleta je uglavnom fokusirano na ulogu aktina i mikrotubula, većinom zato što su ovi proteini izuzetno zastupljeni u ćelijama i zato što su poznate supstance kojima je moguće manipulirati njihovu polimerizaciju i depolimerizaciju (8).

Na primer, citohalazin B i D, alkaloidi poreklom iz gljiva, prouzrokuju depolimerizaciju aktinskih filamenata. Vezuju se za deo aktina na kome blokiraju dalje dodavanje subjedinica, što dovodi do disocijacije ostalih subjedinica sa filamenata. Faloidin je toksin koji ima suprotan efekat, on sprečava depolimerizaciju aktinskih filamenata. Zbog ove karakteristike se faloidin, povezan sa fluorescentnim bojama, koristi za detekciju aktina u ćelijama. Ćelijski korteks, uzani prostor koji se nalazi neposredno ispod plazma membrane, je najbogatiji aktinskim filamentima (9). U ovom regionu, većina aktinskih filamenata je aranžirana u mrežu koja se najčešće vidi na mikrografijama kortikalnog aktinskog citoskeleta (Slika 1.).

Iako su glavne komponente citoskeleta i većine pomoćnih proteina koji su u vezi sa njima, izolovani i poznata je njihova struktura, još uvek nije potpuno razjašnjeno kako svi ovi proteini funkcionišu u ćeliji. U poslednjih nekoliko godina u fokusu su istraživanja vezana za različite tipove ćelijskog pokretanja. Te funkcije zavise od interakcije miozina i aktina i biće detaljno opisane u sledećem poglavlju.

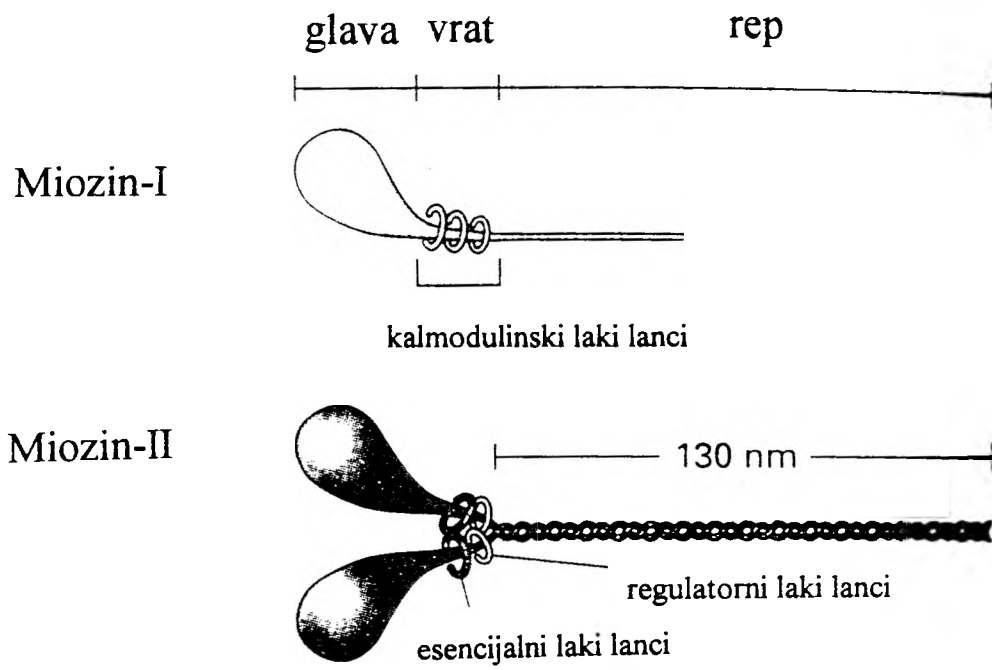


Slika 1. Fluorescentna mikrografija na kojoj se vidi distribucija dugih aktinskih filamenata u fibroblastnoj ćeliji u kulturi. Korišćen je faloidin obeležen rodaminom (3).

### 3.2 Miozini

Miozini predstavljaju superfamiliju proteina koji imaju sposobnost da pretvaraju energiju oslobodjenu hidrolizom ATP-a u mehanički rad (10). Zbog toga se još nazivaju mehano-hemijski enzimi ili motorni proteini. Familija ovih proteina je mnogobrojna i može biti podeljena na 14 klasa (11,88). Zajednička karakteristika svih ovih različitih miozina je da imaju ATP-aznu aktivnost i mesto za vezivanje za aktin. Tradicionalna klasifikacija bazirana je na osnovu toga da li su u formi monomera ili dimera. Zbog toga su istorijski poznate dve klase: miozin-I i miozin-II (12) (Šema 1.). Prvo je otkriven tzv. konvencionalni, miozin-II, dimer, koji može da formira filamente i nalazi se uglavnom u skeletnim, srčanim i glatkim mišićima, a takodje je prisutan i u ne-mišićnim ćelijama (13). Nešto kasnije otkriven je miozin-I, manji, monomerni molekul koji ne formira filamente i može da se vezuje za membrane. Miozin-I je prvo otkriven u jednoćelijskim organizmima, ali se sada zna da je široko rasprostranjen i u ne-mišićnim ćelijama i da učestvuje u procesima transporta vezikula (12).

Do sada je, kao što je napomenuto, otkriven veliki broj miozina. Miozin-I i II su najzastupljeniji i najdetaljnije izučeni. Biohemijska svojstva i fiziološke uloge većine miozina se još uvek ne znaju i predmet su intenzivnih istraživanja. Cilj ovog rada bio je ispitivanje uloge miozina-II u kontraktilnim svojstvima ne-mišićnih ćelija. Zbog toga će u daljem tekstu miozin-II biti detaljnije opisan.



Šema 1. Strukture miozinskih molekula (3).

### **3.2.1 Struktura miozina**

Svi miozini se sastoje od jednog ili dva teška lanca i od jednog ili više lakih lanaca (Šema 1.). Ovi molekuli imaju definisane regione glave, vrata i repa. Naime, amino-terminalni deo teškog lanca je savijen u globulrni domen, koji se naziva glava i koji je preko regiona vrata povezan sa alfa heliksnim domenom - rep - čija dužina varira od jedne do druge klase miozina (10,11). Vezivanje za aktin i hidroliza ATP-a se dešavaju u glavi miozina. Laki lanci se vezuju za regione glave i vrata teških lanaca. Ti regioni su konzervirani kod svih do sada ispitivanih miozina. Nasuprot tome, analize regiona repa pokazale su mnogo veću varijabilnost medju članovima ove superfamilije. Rep ima specifične regione za vezivanje za membranu ili za rep-rep interakcije koje dovode do formiranja miozinskih filamenata (22).

### **3.2.2 Miozin-II**

Miozin-II je široko rasprostranjen u eukariotskim ćelijama i njegova uloga u mišićnoj kontrakciji je poznata: hidroliza ATP-a i ciklična interakcija aktina i miozina su esencijalni za kontrakciju skeletnih, srčanih i glatkih mišića (10). Važnost kontrakcije poprečno-prugastih mišića je očigledna. Takodje, za miozin-II glatkih mišića se zna da igra glavnu ulogu u regulaciji protoka krvi, protoka vazduha u plućima, u procesu varenja hrane, pri porođaju (14). Podjednako važan, ali manje očigledan, je značaj miozina-II u ćelijama koje nisu specijalizovane za kontrakciju, kao što su: epitelijalne ćelije, limfociti, krvne pločice, neuroni ili fibroblasti (12). Naime, istraživanja su pokazala da miozin-II ima važnu ulogu u formiranju citoskeleta (15), u izduživanju neurona (16), u procesima kao što su citokineza i ćelijska pokretljivost (17), sekrecija

(18), sakupljanje receptora (receptor capping) (19), kontraktilnost endotelijalnih ćelija (20), barijerna f-ja epitelijalnih ćelija (21), strujanje (streaming) citoplazme (15).

Ova grupa proteina je podeljena u dve velike podgrupe: miozin-II poprečno-prugastih mišića i miozin-II glatkih mišića / ne-mišićnih ćelija (11). Podgrupa poprečno-prugastih miozina može dalje biti podeljena na forme koje se nalaze u skeletnim i srčanim mišićima. Svi ovi miozini imaju veoma slične strukturne karakteristike ali različite nivoe ATP-azne aktivnosti i različita regulatorna svojstva.

Što se strukture tiče, već je pomenuto da je ovaj protein klasifikovan kao dimer jer se sastoji od dva molekula teških lanaca, povezanih upletenim repovima. Svaki miozinski monomer ima N-terminalni, globularni domen (glava) koji je povezan za filamentozni C-terminalni domen (rep). Jedan teški lanac miozina-II ima molekulsku težinu od 190-210,000 D. Za svaki globularni domen nekovalentno je vezan par lakih lanaca. Molekulska težina lakih lanaca varira od 15-30,000 D. Tako, kompletni miozin-II je u stvari heksamer i ima molekulsku težinu od oko 450,000 D (10).

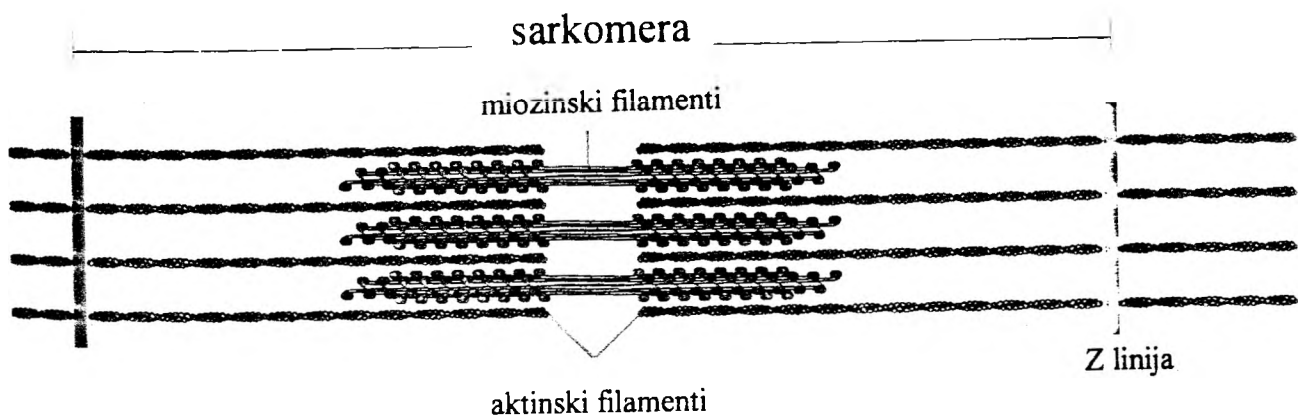
C-terminalni deo teških lanaca formira alfa-heliksni rep, preko koga se u fiziološkim uslovima, miozinski molekuli povezuju jedan sa drugim i formiraju bipolarnu filamente (22).

Jedan par lakih lanaca na svakom miozinskom molekulu neophodan je za ATP-aznu aktivnost miozina - to su esencijalni laki lanci. Drugi par, za koji je pokazano da prolazi kroz reverzibilnu, kovalentnu fosforilaciju naziva se regulatornim lakim lancima (10,23).

### 3.2.2.1 Filamentozna organizacija miozina-II

Regulatorni laki lanci miozina-II se reverzibilno fosforilišu enzimom koji se naziva kinaza lakog lanca miozina (24). Veoma je važno istaći da fosforilacija regulatornih lakih lanaca skeletnih i srčanih mišića nije neophodna za njihovu aktivnost (10). Medjutim, aktivnost miozina-II glatkih mišića u direktnoj je korelaciji sa fosforilacijom lakih lanaca (25). Ono što je izuzetno znacajno je da fosforilacija lakih lanaca miozina-II glatkih mišića i ne-mišićnih ćelija utiče na formiranje filamenata. Naime, ovi miozini prolaze kroz konformacione promene koje su regulisane fosforilacijom njihovih regulatornih lakih lanaca (26). Kada laki lanci nisu fosforilisani, rep teškog lanca je savijen prema glavi. Ovo je tzv. 10S konformacija, nazvana po sedimentacionim karakteristikama. Kada dodje do fosforilacije lakih lanaca, rep se pomera od glave i molekul prelazi u izduženu, 6S konformaciju. Samo molekuli u 6S konformaciji mogu da formiraju filamente. Ova karakteristika ne-mišićnih miozina-II je izuzetno važna, i povezana je sa potrebom ovih ćelija da reorganizuju miozinske filamente za vreme kretanja ćelija i drugih funkcija u kojima miozin-II učestvuje.

Miozin-II poprečno-prugastih mišića, nasuprot, ne prolazi kroz slične konformacione promene, verovatno zato što je u ovim ćelijama mnogo više fiksiran. Naime, u mišićnim ćelijama, miozin i aktin su prisutni u velikim količinama i aranžirani su u stabilne, visoko organizovane redove filamenata, koji se nazivaju sarkomere (27) (Šema2).



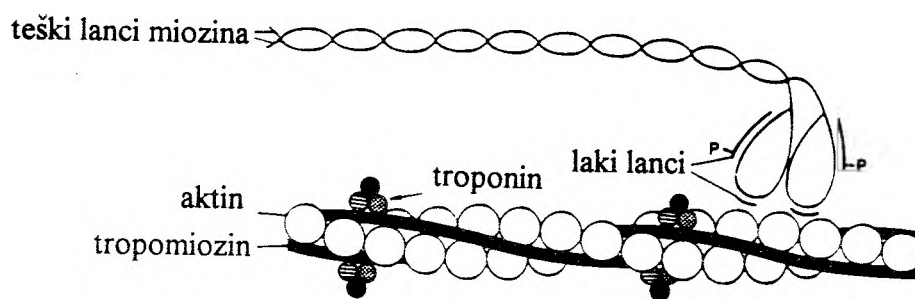
Šema 2. Sarkomera (2)  
Z linija je struktura koja spaja dve sarkomere.



Ova organizacija miozinskih (tzv. debelih) i aktinskih (tzv. tankih) filamenata obezbeđuje efikasnu transformaciju hemijske energije ATP-a u mehanički rad. Mišićna kontrakcija sastoji se od cikličnog uspostavljanja i gubljenja kontakata između globularnih delova miozinskih molekula i aktinskih filamenata. ATP-zavisne konformacione promene u glavama miozina dovode do pomeranja glava duž aktinskih filamenata, što izgleda kao da miozinske glave "hodaju" po aktinskim filamentima. Na taj način aktinski i miozinski filamenti "klize" jedni duž drugih i sarkomere se skraćuju, što dovodi do kontrakcije mišića (27). Na ovom mestu treba definisati termin kontrakcije. Naime, za mišić se kaže da se kontrahuje ako je stimulisan i produkuje tenziju. U tom smislu, znači da se mišić može kontrahovati i bez promene svoje dužine, pa se takva kontrakcija naziva izometrička. Kontrakcija u toku koje se mišić skraćuje nasuprot fiksiranom teretu, naziva se izotonična. Ova dva tipa kontrakcije su najpogodnija za eksperimentalni rad, ali je očigledno da su mnogi drugi kontraktilni uslovi mogući i da se *in vivo* teret kontinuirano menja (27,50,51).

### **3.2.2.2 Regulacija aktivnosti miozina-II**

Kalcijum reguliše interakciju aktina i miozina, tj. hidrolizu ATP-a i kontrakciju. Zavisno od ćelija u kojima se ovi procesi dešavaju postoje dva tipa te regulacije: jedna je bazirana na aktinu, a druga na miozinu (10) (Šema 3.).



Šema 3. Interakcija miozina-II i aktinskih filamenata (10)

U skeletnim i srčanim mišićima ova regulacija je bazirana na aktinu. Stimulacija poprečno-prugastih mišića dovodi do povećanja intracelijske koncentracije kalcijuma. Kalcijum se zatim vezuje za tzv. c-subjedinicu troponinskog kompleksa, koji se nalazi na tankim, aktinskim filamentima. Ovaj proces inicira konformacionu promenu u troponinskom kompleksu, koja dovodi do pomeranja tropomiozina u odnosu na aktinski filament i miozinsku glavu. Novonastala promena oslobadja sternu inhibiciju i dolazi do interakcije glave miozina sa aktinom, pri čemu se hidrolizuje ATP. Miozinski filamenti zatim "klize" duž aktinskih filamenta i mišići se kontrahuju. Relaksacija se dešava kada opadne koncentracija intracelularnog kalcijuma, što dovodi do reverznih konformacionih promena na troponinu i tropomiozin se vraća na poziciju u kojoj efektivno blokira aktomiozinsku interakciju (10).

U glatkim mišićima i ne-mišićnim ćelijama, nema troponina i regulacija aktivnosti miozina-II se značajno razlikuje (25). Kontraktilni stimulus dovodi do povećanja intracelularne koncentracije kalcijuma, koji se vezuje za regulatorni protein kalmodulin. Kalcijum-kalmodulinski kompleks se zatim vezuje za kinazu lakog lanca miozina i aktivira je. Aktivirani enzim zatim fosforiliše serin 19 na regulatornim lakim lancima miozina, što dovodi do formiranja miozinskih filamenata, kontakta sa aktinskim filamentima i ATP hidrolize. Rezultat hidrolize ATP-a je pokretanje filamenata jednih duž drugih, što dovodi do kontrakcije glatkih mišića. Relaksacija nastupa kada se smanji intracelijska koncentracija kalcijuma, pri čemu dolazi do disocijacije kalcijuma sa kalmodulina, a potom i disocijacije kalmodulina sa kinaze lakog lanca miozina. Na taj način je ovaj enzim inaktivisan, a konstitutivno aktivne fosfataze miozina defosforilišu njegove regulatorne lake lance (12,25).

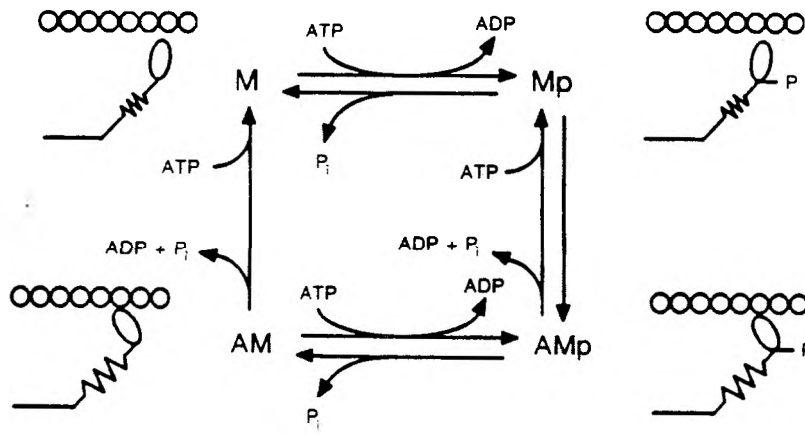
Veoma malo se zna kako, na molekularnom nivou, fosforilacija lakih lanaca miozina utiče na interakciju miozinske glave, aktina i ATP-a. Već je pomenuto da kovalentna fosforilacija lakih lanaca miozina reguliše dinamički ekvilibrijum između 10S i 6S konformacije. Kada se laki lanci fosforilišu, miozinski molekuli prelaze iz savijene u izduženu, 6S konformaciju, pri čemu formiraju filamente koji mogu da intereaguju sa aktinom (26). Takođe, pokazano je da kada laki lanci miozina nisu fosforilisani, miozin ima bazalni nivo ATP-azne aktivnosti, koji se veoma malo poveća pri dodavanju aktina. U slučaju kada su laki lanci miozina fosforilisani, ATP-azna aktivnost miozina se pri dodavanju aktina poveća 10 puta (15). Nefosforilisani laki lanci, dakle, deluju kao inhibitori akto-miozinske interakcije, a fosforilacija oslobadja ovu inhibiciju. Mogući mehanizam je da laki lanci kontrolišu relativnu pokretljivost različitih regiona miozinske glave i tako utiču na njenu sposobnost da interaguje sa aktinom (15).

Po ovom modelu, dakle, postoje 2 faze u akto-miozinskoj interakciji. Prva je kada nema kontakta, jer laki lanci miozina (LLM) nisu fosforilisani, a druga faza je kada se po fosforilaciji LLM uspostavlja akto-miozinska interakcija.

Medjutim, kao rezultat studija kontrakcije arterijskih glatkih mišića (43,44), formiran je još jedan model akto-miozinske interakcije. Po tom modelu, po stimulaciji mišića dolazi do rapidnog povećanja u nivou fosforilacije LLM, posle čega dolazi do kontrakcije. Medjutim, prvi put je u ovim studijama pokazano da dok još uvek postoji kontrakcija mišića, fosforilacija LLM opada na bazalni nivo. Murphy i saradnici su opisani fenomen održavanja sile, bez povećanja fosforilacije LLM nazvali "latch", što podrazumeva "zaključavanje" miozinskih glava vezanih za aktinske filamente, uz delimičnu defosforilaciju LLM (43).

Dakle, po ovom modelu (Šema 4.) postoje 4 faze u akto-miozinskom kontaktu: 1. (M) LLM nisu fosforilisani i nema kontakta sa aktinom; 2. (Mp) LLM su fosforilisani i još uvek nije došlo do akto-miozinskog kontakta; 3. (AMp) LLM su fosforilisani i uspostavljen je kontakt aktina i miozina; 4. (AM) miozin ostaje zakačen za aktinske filamente, ali je većina LLM defosforilisana ("latch bridge"). Po ovom modelu, povećanje fosforilacije LLM je neophodno za iniciranje kontrakcije, ali ne i za njeno održavanje, čime se doprinosi tzv. ekonomisanju u toku održavanja sile u glatkim mišićnim ćelijama.

Nezavisno od tipa ćelija, generalni model za ćelijsku kontrakciju zasniva se na formiranju kontakata (crossbridges) između aktina i miozina pri čemu dolazi do aktivacije ATP-azne funkcije miozina (27).



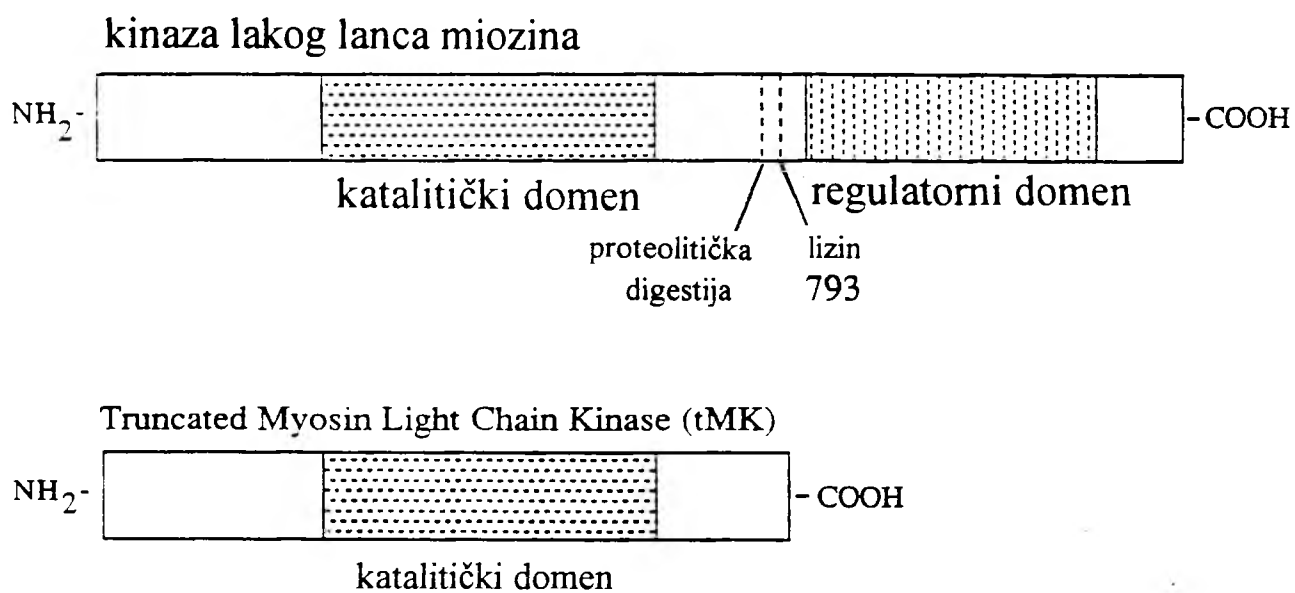
Šema 4. Dijagram "latch bridge" modela akto-miozinske interakcije (44)  
A - aktin, M - miozin.

### 3.2.3 Kinaza lakog lanca miozina

Ovaj protein pripada familiji kalmodulin-zavisnih protein kinaza (24). Nalazi se u mnogim vertebratnim ćelijama i katalizuje fosforilaciju serina 19 lakih lanaca miozina (mnogo redje i treonin 18). U glatkim mišićnim i ne-mišićnim ćelijama ovaj enzim ima značajnu ulogu u aktiviranju akto-miozinskog kompleksa. Kao što je već rečeno, kinaza lakog lanca miozina se aktivira kada se za nju veže kompleks kalcijuma i kalmodulina. Strukturne analize su pokazale da se katalitički domen ovog enzima nalazi na NH<sub>2</sub>-kraju, a regulatorni deo, za koji se vezuje kalmodulin, na COOH-kraju (Šema 5).

Pokazano je da proteolitička digestija kinaze lakog lanca miozina dovodi do formiranja konstitutivno aktivne forme enzima, nezavisne od kalcijum-kalmodulinskog kompleksa (28). Na primer, tripsin deli ovaj enzim na katalitički i regulatorni domen. Takodje, ubacivanje stop kodona na mestu lizina 793 u genu za kinazu lakog lanca miozina, ima isti efekat, jer stop kodon sprečava translaciju regulatornog domena (29). Ovi autori su pokazali da konstitutivno aktivna forma enzima zadržava specifičnost za supstrat - laki lanac miozina, kao i to da su kinetički parametri mutantne kinaze veoma slični parametrima nativnog enzima.

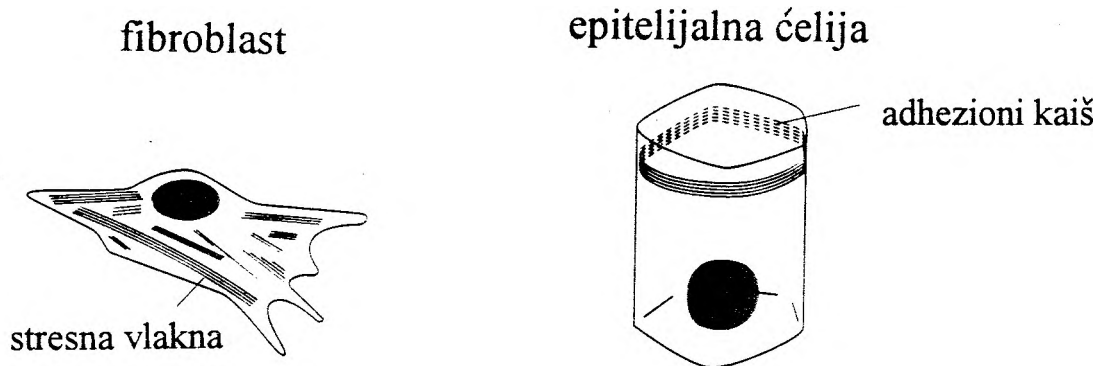
Ljubaznošću drV.Guerriero, jednog od autora navedenog rada, u eksperimentima opisanim u ovoj tezi korišćen je mutirani gen za kinazu lakog lanca miozina, koji je nazvan tMK (t - truncated).



Šema 5. Struktura kinaze lakog lanca miozina

### 3.3 Aktin i miozin-II u ne-mišićnim ćelijama

U ne-mišićnim ćelijama aktin i miozin-II su organizovani u kontraktilne snopove koji podsećaju na sarkomere. Ove strukture se u fibroblastima nazivaju stresna vlakna, a u epitelijalnim ćelijama - adhezioni kaiševi (Šema 6.). Ti kontraktilni snopovi se najčešće nalaze duž ćelijske membrane na mestima gde je ćelija ili u kontaktu sa podlogom (adhezione plake - kod fibroblasta), ili sa drugom ćelijom (adherens spojevi - kod epitelijalnih ćelija). Struktura i kompozicija ovih spojeva je veoma slična. Ova kontaktna mesta se sastoje od integralnih membranskih proteina koji povezuju ćeliju sa ekstraćelijskim matriksom ili drugom ćelijom, adapternih proteina koji povezuju membranske proteine sa kontraktilnim snopovima i na kraju ovih struktura su kontraktilni snopovi (2,30).



Šema 6. Kontraktilni snopovi u ne-mišićnim ćelijama (2)  
Kontraktilni snopovi se sastoje od aktinskih i miozinskih filamenata.



### 3.3.1 Aktin i miozin-II u fibroblastima

Kod fibroblasta ovi kontraktilni snopovi se nazivaju stresna vlakna (stress fibers) i obično se nalaze duž ventralne površine ćelija koje se gaje na staklenim ili plastičnim površinama (31) (Šema 6.). Početak i kraj ovih snopova nalazi se u adhezionim plakama, specijalnim strukturama koje zakačinju ćelije za podlogu. U stresnim vlaknima se nalazi i kinaza lakog lanca miozina. Kontraktilnost ovih vlakana je pokazana tako što su stresna vlakana odvojena od adhezionih plaka i dodat je ATP, što je prouzrokovalo skraćivanje vlakana. Ranije se mislilo da ova vlakna imaju ulogu u ćelijskom pokretanju. Međutim, eksperimenti su pokazali da fibroblasti koji se kreću imaju svega nekoliko stresnih vlakana, a da se njihov broj znatno poveća kada ćelije prestanu da se kreću. Takodje, kada se ove ćelije u kulturi odvoje od podloge, postaju sferične i stresna vlakna se gube. Posle nekoliko sati posto se ćelije ponovo dovedu u kontakt sa podlogom, stresna vlakna se iznova formiraju (32). Pošto su krajevi vlakana čvrsto zakačeni za adhezione plake ovi snopovi, u ovom slučaju, proizvode tenziju. Dakle, stresna vlakna su specijalizovane, visoko organizovane citoskeletne strukture koje predstavljaju potencijalni kontraktilni kompleks odgovoran za citoplazmatsku tenziju (33). Činjenica da se stresna vlakna mogu relativno lako detektovati imunološkim metodama i svetlosnim mikroskopom, razlog je što su ove strukture poslužile za izučavanje dinamike citoskeleta.

U literaturi je detaljno opisan model sistem fibroblasta koji su gajeni u medijumu bez seruma (31). Tako tretirane ćelije se ne dele, spljoštene su i imaju izuzetno puno stresnih vlakana na periferiji ćelija, uz ćelijsku membranu. Što se ide više ka unutrašnjosti, sve ih je manje i u perinuklearnom regionu stresna vlakna se ne mogu uopšte detektovati. Dodavanje seruma ovakvim ćelijama dovodi do kontrakcije većine

stresnih vlakana (32). Stimulacija serumom inicira kaskadu molekularnih događaja. Između ostalih, faktori rasta dovode do povećanja intracelularne koncentracije kalcijuma. Korišćenjem paradigme sa glatkim mišićima, može se pretpostaviti da bi ovo povećanje u koncentraciji kalcijuma moglo da dovede do aktiviranja kinaze lakog lanca miozina, povećanja fosforilacije lakih lanaca miozina, aktiviranja miozina i kontrakcije stresnih vlakana (31).

Fibroblasti su izuzetno adherentne ćelije, sa velikim brojem stresnih vlakana. Međutim, stresna vlakna nisu jedine strukture u kojima se miozin-II nalazi u fibroblastnim ćelijama. Naime, zajedno sa mrežom aktinskih filamenata, miozin-II formira kortikalni citoskelet, koji se nalazi neposredno ispod plazma membrane i značajno doprinosi čvrstoći ćelija (cell stiffness) (19).

Deformabilnost ćelija može se meriti tzv. "ćelijskim ubadačem" (cell poker) (34). Ovaj instrument meri silu kojom se ćelija suprotstavlja (odupire) ubadanju štapićem na čijem kraju se nalazi mala staklena loptica. Pokazano je da tretiranje ćelija citohalazinom B, koji depolimerizuje aktinske filamente, značajno smanjuje silu koja je neophodna za ubadanje ćelija (34). Takođe, membrane mutiranih ćelija, koje nemaju miozin-II, deformišu se mnogo lakše staklenom lopticom ćelijskog ubadača nego membrane normalnih ćelija (19). Dakle, ova istraživanja su potvrdila da deformabilnost adherentnih ćelija zavisi od aktinskih i miozinskih filamenata i uvela korišćenje "ćelijskog ubadača" u cilju detektovanja finih promena čvrstoće citoskeleta.

### **3.3.2 Aktin i miozin-II u epitelijalnim ćelijama**

U epitelijalnim ćelijama snopovi aktinskih i miozinskih filamenata formiraju tzv. kaiš (adhesion, circumferential belt) koji opasuje unutrašnju površinu ćelija (35) (Šema 6.). Akto-miozinski opasači i kontakti (veze) između epitelijalnih ćelija formiraju kompleks koji funkcioniše kao tenziona uža, koje učvršćava ove ćelije sa unutrašnje strane i na taj način kontroliše njihov oblik.

Epitelijalne ćelije imaju veoma složenu strukturu i funkcije, i zbog toga će biti detaljno opisane u sledećem poglavlju.

### **3.4 Epitelijalne ćelije**

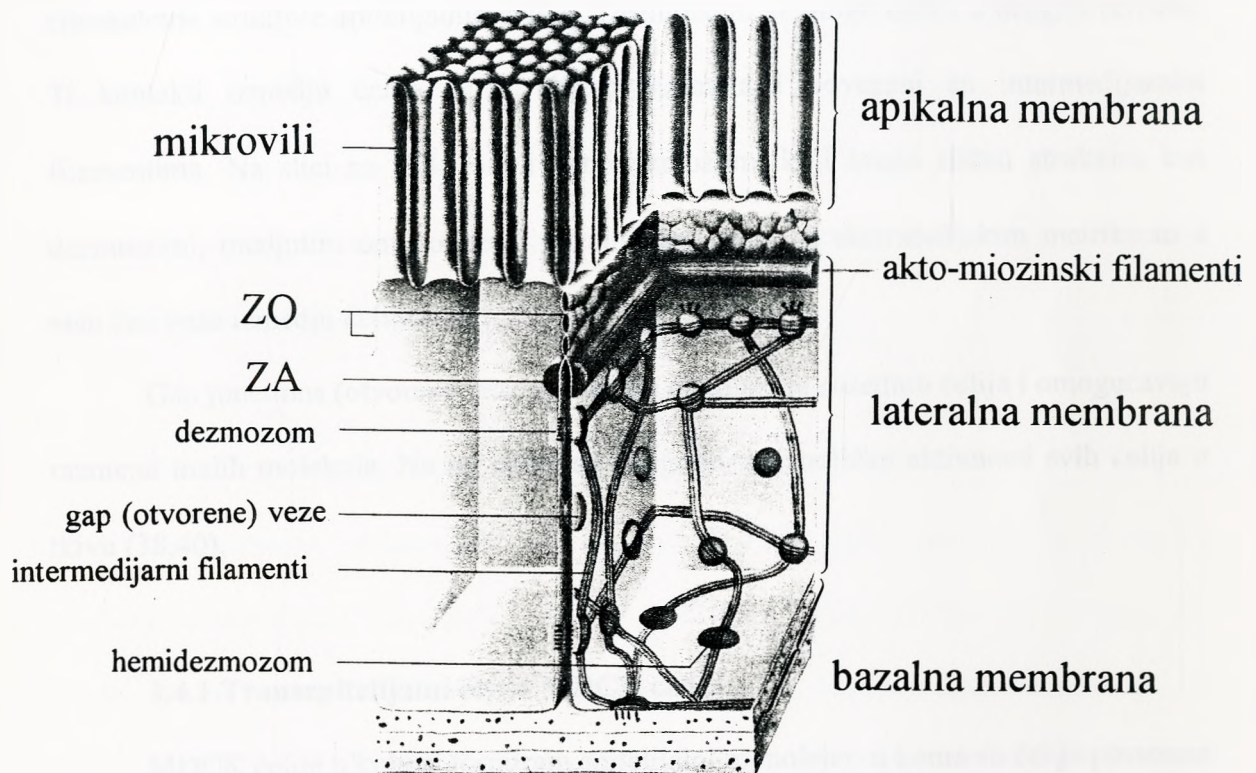
Kao jedan od model sistema u ovom radu korišćene su MDCK ćelije (Madin-Darby canine kidney), pseće epitelijalne ćelije bubrega (36). One pripadaju grupi epitelijalnih ćelija koje imaju dve primarne fiziološke uloge. Prva je da deluju kao barijere između delova organa i tkiva kroz koje prolaze fluidi, a druga je da obezbeđuju transport jona, organskih jedinjenja, vode i makromolekula između tih različitih delova. Postoje dva puta kojima joni i rastvori prolaze epitelijalnu barijeru. Prvi je direktno kroz ćelije (transćelijski put), a drugi je između ćelija, tzv. paraćelijski put (37).

Ovako delikatno funkcionisanje epitelijalnih ćelija koje transportuju različite materije, obezbeđeno je striktnom strukturnom i funkcionalnom polarizovanošću. Naime, jedna od najvažnijih strukturnih karakteristika ovih ćelija je da one uspostavljaju i održavaju polarizovanu distribuciju membranskih proteina između apikalnih i bazolateralnih membrana. Osim ove, intracelularne organizacije, zbog usmerenog

transporta materija epitelijalne ćelije su organizovane kao izuzetno kohezivni monolejari sa složenim intercelularnim vezama (21).

Visoka organizovanost epitelijalnih ćelija prikazana je na Šemi 7 (3). Apikalna plazma membrana ovih ćelija je tipično organizovana u mikrovile. Adhezija između ćelija se uspostavlja i održava pomoću spojnog kompleksa (junctional complex) koji se formira na lateralnim membranama susednih ćelija. Ovaj spoj sačinjavaju: zonula occludens (ZO), zonula adherens (ZA), desmosome (D) i gap (otvorene) veze. Ćelije su takodje povezane sa bazalnom laminom preko specifičnih receptora i spojeva.

Zonula occludens ili tight junction (čvrsti spoj) nalazi se na mestu koje je najbliže apikalnoj membrani, i ovaj prvi ćelija-ćelija kontakt pretstavlja apikalno-bazolateralnu granicu (21,76). Čvrsti spoj limitira difuziju jona i tečnosti između luminalnog (apikalnog) i bazolateralnih delova i time uspostavlja bazu za selektivni permeabilitet epitelijalnih monolejara. Dakle, ovi specijalizovani regioni plazma membrane formiraju barijeru koja npr. sprečava mešanje sadržaja intestinalnog lumena ili pankreatičnih duktusa sa krvlju. Osim barijerne funkcije, čvrste veze takodje sprečavaju difuziju membranskih proteina i glikolipida između apikalnih i bazolateralnih regiona plazma membrane. Na taj način je obezbedjena asimetrična organizacija proteina unutar i na površini epitelijalnih ćelija (39). Istraživanja u kojima su korišćene metode subćelijskog frakcionisanja i imunocitohemijski eseji, pokazala su polarizovanu distribuciju jonskih kanala, jonskih pumpi i ćelijskih receptora između apikalnih i bazolateralnih domena plazma membrane. Elektronska mikroskopija ovih delova ćelija pokazala je da se plazma membrane susednih ćelija dodiruju ili čak fuzionišu u odgovarajućim intervalima (40).



Šema 7. Epitelijalne ćelije i tipovi veza koje ih spajaju (3)

Zonula adherens (ZA) ili intermedijarni spoj i dezmozomi su spojevi susednih ćelija koji obezbeđuju strukturni integritet i rigidnost celog tkiva. ZA je karakteristična za epitelijalne ćelije i interakcija između dve ćelije na ovim mestima je u vidu pojasa. To je mesto na kome se prsten akto-miozinskih filamenata povezuje sa lateralnom membranom većine epitelijalnih ćelija (38). (U daljem tekstu će biti opisane ove i druge citoskeletne strukture epitelijalnih ćelija). Dezmozomi se mogu naći i u drugim tkivima. Ti kontakti između ćelija su u obliku dugmeta i povezani su intermedijarnim filamentima. Na slici su prikazani i hemidezmozomi koji imaju sličnu strukturu kao dezmozomi, međutim oni povezuju bazalni deo ćelija sa ekstraćelijskim matriksom a nisu deo veze između ćelija.

Gap junctions (otvorene veze) povezuju citoplazmu susednih ćelija i omogućavaju razmenu malih molekula. Na taj način se integrišu metaboličke aktivnosti svih ćelija u tkivu (38,40).

### **3.4.1 Transepitelijalni otpor MDCK ćelija**

MDCK ćelije u kulturi formiraju epitelijalni monolejer u kome su ćelije povezane između sebe spojnim kompleksima (41). Kao što je već rečeno, na taj način se formira barijera za prolazak materija i tečnosti. Ovakvi monolejeri razvijaju transepitelijalni otpor posle nekoliko sati od dodavanja ćelija u kulturu. Barijerna funkcija čvrstih veza epitelijalnih ćelija definiše se kao otpor koji se razvija prilikom transepitelijalnog prolaska struje. Najčešće se određena struja (I) propusti kroz monolejer, a zatim se meri rezultujući transepitelijalni napon (V). Primenjivanjem Omovog zakona izračunava se otpor ( $R=V/I$ ) (21). Dakle, otpor monolejera za prolazak električne struje predstavlja

direktnu meru otpora monolejera za pasivni prolazak jona. Studiranje funkcionalnog integriteta čvrstih veza ovih ćelija omogućeno je korišćenjem specijalnih sudova za ćelijsku kulturu. Naime, ćelije se gaje na poroznim membranskim filterima koji se nalaze na dnu cilindra. Ovi cilindri se stavljaju u ćelijske sudove sa medijumom i dele medijum na gornji i donji rezervoar. Na taj način su polarizovani delovi ćelija (apikalni i bazolateralni) u kontaktu sa različitim medijumom sa svake strane filtera. Sudovi su konstruisani tako da je moguće staviti elektrode u oba dela suda (iznad i ispod membrane). Kroz monolejer se zatim propušta struja i meri transepitelijalni napon. Na ovaj način je moguće detektovati i kvantifikovati fine razlike u promeni paraćelijskog permeabiliteta epitelijalnih ćelija (21).

### **3.4.2 Organizacija citoskeletnih filamenata epitelijalnih ćelija**

Transmisiona elektronska mikroskopija MDCK ćelija pokazala je prisustvo uredjene mreže citoskeletnih filamenata koji povezuju plazma membranu i nukleus (38). Citokeratinski filamenti (klasa intermedijarnih filamenata) su locirani uz dezmozome, a u većini epitelijalnih ćelija mikrotubule se prostiru paralelno sa lateralnom membranom. MDCK ćelije u kulturi koje su zasadjene u malom broju i još uvek nisu uspostavile međućelijske kontakte raširene su i imaju akto-miozinske filamente organizovane kao stresna vlakna uniformno raspoređene ispod plazma membrane. U konfluentnim monolejerima ćelije postaju izduženije i stresna vlakna nestaju. Međutim, filamentozna aktinska mreža koja sačinjava kortikalni citoskelet je prisutna i u pojedinačnim i u konfluentnim ćelijama. U toku formiranja monolejera, uspostavlja se akto-miozinski prsten u nivou zonula-e adherens (ZA), a neposredno ispod čvrstih veza (42). Kao što je

već rečeno, čvrste veze između epitelijalnih ćelija imaju najvećeg udela u regulaciji paraćelijskog protoka. Biohemijski događaji koji regulišu ovu permeabilnost još uvek nisu okarakterisani, mada nekoliko studija (21,42,45), (koje će biti opisane u Diskusiji), ukazuju da akto-miozinski prsten ima ulogu u modulaciji transepitelijalnog permeabiliteta.

### **3.5 Kontraktilnost eukariotskih ćelija**

Struktura i kontrakcija mišićnih ćelija je izuzetno dobro opisana (50,51). Otkriće da su proteini za koje se zna da su osnovni elementi sarkomernog funkcionisanja, takodje prisutni i u ne-mišićnim ćelijama, učvrstilo je ideju da je proces kontrakcije univerzalan u svim ćelijama. Međutim, ova paralela sa mišićnim ćelijama ne može se u potpunosti preneti na funkcionisanje kontraktilnih sistema ne-mišićnih ćelija. Kao prvo, sarkomere imaju pravilnu geometrijsku strukturu, koja u toku kontrakcije ima ograničeno pokretanje duž jedne ose. Takva pravilna i stabilna geometrijska struktura se ne zapaža u ne-mišićnim ćelijama. Reorganizacija i redistribucija citoskeleta ne-mišićnih ćelija je esencijalna za njihov veliki repertoar kretanja, kao što su: pokretanje samo pojedinih delova ćelije, formiranje i održavanje polariteta, pokretanje cele ćelije duž podloge (46).

Iako su istraživanja u ovoj oblasti u ekspanziji, još uvek se sa sigurnošću ne znaju svi molekularni mehanizmi kontrakcije ne-mišićnih ćelija. U tom smislu i ovaj rad predstavlja pokušaj da se rasvetle neki detalji tih veoma složenih procesa.



## **4. MATERIJAL I METODE**

### **4.1 Čelijska kultura**

NIH 3T3 fibroblasti i MDCK epitelijalne ćelije su gajene u DMEM medijumu (Dulbecco's modified Eagle's medium), uz dodatak glutamina, penicilin-streptomycin antibiotika i 10% fetalnog telećeg seruma, na 37° C u atmosferi koja sadrži 5% CO<sub>2</sub>. Sve komponente kompletnog medijuma su iz kompanije Sigma, MO, USA.

### **4.2 Konstruisanje ekspresionih vektora**

Digestije restrikcionim enzimima su vršene u zapremini od 20 µl ili 100 µl u zavisnosti da li su vektori samo proveravani na prisustvo odredjenih fragmenata ili su iz njih izolovani odgovarajući DNK fragmenti. U prvom slučaju je korišćeno 0.2-0.3 µg, a u drugom 2 µg plazmidne DNK. U svim reakcijama su korišćeni enzimi kompanije Gibco, Life Technologies, MD, USA, uz prisustvo 1X odgovarajućih pufera. Takodje, za popunjavanje krajeva DNK fragmenata korišćen je enzim Klenow fragment E.coli DNK polimeraze, iz iste kompanije. Sve navedene enzimske reakcije su radjene po već detaljno opisanim metodama (47).

### **4.3 Elektroforeza DNK fragmenata na agaroznom gelu**

Produkti digestija restrikcionim enzimima su razdvajani na 1% agaroznim gelovima u 1X TAE puferu (0.04 M Tris-acetat, 0.001 M EDTA) uz prisustvo etidijum bromida (1 µg/ml). Veličina DNK fragmenata je odredjivana na osnovu uporedjivanja sa

DNK markerom (1 kb DNA Ladder, GIBCO), koji je prikazan uz Sliku 2. u Rezultatima ovog rada.

#### **4.4 Izolovanje DNK fragmenata iz agaroznog gela**

Posle elektroforeze na agaroznom gelu, odgovarajući fragmenti su isecani iz gela, a zatim eluirani po proceduri Qiagen kompanije (QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit). Na jednu zapreminu gela sa fragmentom se dodaju tri zapremine QX1 pufera i 10  $\mu$ l silika resin kuglica (QIAEX II pufer). Ova smeša se inkubira 10' na 50° C, uz povremeno mućkanje. Uzorci se zatim centrifugiraju 30" i supernatant se odstrani. Talog (kuglice za koje je vezana DNK) se opere dva puta puferima QX1 i PE. Talog se na kraju suši 15' na sobnoj temperaturi, posle čega se DNK eluira sa 20  $\mu$ l H<sub>2</sub>O.

#### **4.5 Subkloniranje DNK fragmenata u ekspresione vektore**

Izolovani linearizovani vektori i odgovarajući DNK fragmenti su ligirani u molarnom odnosu 1:3, u smeši od 20  $\mu$ l: 1X ligacioni pufer; vektor - 50, insert-150 fmol krajeva; T4 DNK ligaza 1 U (Gibco). Reakcije su vršene na 14° C preko noći, a zaustavljane su dodavanjem 1  $\mu$ l 0.5 M EDTA.

#### **4.6 Transformisanje bakterija**

Po završenom ligiranju, alikvot od 4  $\mu$ l ligacione reakcije je 5 puta razblažen u sterilnoj H<sub>2</sub>O, a zatim korišćen za transformisanje bakterija. Korišćene su kompetentne ćelije soja Epicurian Coli XL1-Blue MRF' (Stratagene, WI, USA). Alikvoti od 100  $\mu$ l

kompetentnih ćelija su otopljeni na ledu za svaki uzorak koji treba da se transformiše. Zatim je dodato po 1.7  $\mu$ l 1.42 M  $\beta$ -merkaptoetanolu i smeša je inkubirana 10' na ledu, posle čega su dodate razblažene ligacione reakcije. Sledeća inkubacija je vršena 30' na ledu, zatim 45" na 42° C i na kraju 2' na ledu. U svaku epruvetu se zatim dodaje po 0.9 ml SOC medijuma i uz mućkanje od 225 rpm, epruvete se inkubiraju 1 h na 37° C. Na LB-Amp petri šolje (50  $\mu$ g/ml ampicilina) dodato je po 100  $\mu$ l transformacione smeše. Šolje su inkubirane preko noći na 37° C.

#### **4.7 Izolovanje plazmidne DNK**

Pojedinačne bakterijske kolonije su sterilnom ezom prenošene u epruvete sa 5 ml tečnog LB medijuma u koji je dodat ampicilin (50  $\mu$ g/ml) i inkubirane preko noći na 37° C uz mućkanje. Posle završenog rasta, bakterijska kultura je podeljena na dva dela: 3 ml je korišćeno za mini-izolaciju plazmida, koja je korišćena za brzu analizu restrikcionim enzimima, a 1 ml je korišćen za inokulaciju velike bakterijske kulture (100 ml) za izolovanje veće količine novokonstruisane plazmidne DNK, koja će se koristiti za transformisanje eukariotskih ćelija.

Za izolovanje male količine plazmidne DNK korišćen je kit kompanije Boehringer Mannheim (High Pure Plasmid Isolation Kit). Bakterije se talože centrifugiranjem u Eppendorf centrifugi, 5' na 5000 rpm. Talog se zatim resuspenduje u 250  $\mu$ l pufera 1 (50 mM Tris-HCL; 10 mM EDTA, pH 8.0; 100 mg/ml RNK-za A) i dodaje se 250  $\mu$ l pufera za lizu bakterija (0.2 M NaOH; 1% SDS). Posle inkubacije od 5' na sobnoj temperaturi, dodaje se 350  $\mu$ l pufera 3 (4 M guanidin hidrohlorid; 0.5 M KAc, pH

4.2), sadržaj se pažljivo promeša i inkubira na ledu 5'. Zatim se epruvete centrifugiraju 10' na 14,000 rpm, posle čega se bistri supernatant, u kome je DNK, nanosi na kolonu i centrifugira 1'. Na kolone se zatim nanese pufer za ispiranje (20 mM NaCl; 2mM Tris-HCL, pH 7.5) i ponovi se centrifugiranje. Na kraju se kolone prebace u nove Ependorf epruvete, na njih se doda 100 µl pufera za eluiranje (10 mM Tris-HCL; 1 mM EDTA, pH 8.5) i centrifugiraju se 30" na 14,000 rpm. U sakupljenom eluatu se nalazi plazmidna DNK.

Za izolovanje plazmida u velikoj količini korišćen je kit kompanije Qiagen (Plasmid Maxi Kit). 100 ml bakterijske kulture je centrifugirano 15' na 6,000 rpm u Ja-10 Beckman rotoru. Talog je resuspendovan u 10 ml pufera P1 (50 mM Tris-HCL; 10 mM EDTA, pH 8.2; 100 mg/ml RNK-za A), a zatim je dodato 10 ml pufera P2 (0.2 M NaOH; 1% SDS). Posle 5' inkubiranja na sobnoj temperaturi, dodato je 10 ml pufera P3 (3 M KAc, pH 5.5) i reakcija je inkubirana 20' na ledu. Smeša je zatim centrifugirana 30' na 9,800 rpm u Ja-10 Beckman rotoru, posle čega je supernatant prenešen u epruvete za Ja-20 rotor i centrifugiran 15' na 13,000 rpm. Qiagen kolone za prečišćavanje plazmida su ekvilibrisane sa 10 ml pufera QBT (750 mM NaCl; 50 mM MOPS, pH 7; 15% izopropanol; 0.15% Triton X-100) i na njih je nanešen supernatant posle centrifugiranja. Kolone se potom ispiraju dva puta sa 30 ml pufera QC (1 M NaCl; 50 mM MOPS, pH 7; 15% izopropanol), a zatim se DNK eluira sa kolona sa 15 ml pufera QF (1.25 M NaCl; 50 mM Tris-HCL, pH 8.5; 15% izopropanol) i istaloži sa 10.5 ml izopropanola. Posle 30' centrifugiranja na 18,500 rpm u Beckman Ja-20 rotoru, DNK talog se ispere 70% EtOH, osusi i rastvori u sterilnoj H<sub>2</sub>O.

Koncentracije ovako prečišćenih plazmidnih DNK određivane su merenjem na spektrofotometru.

#### **4.8 Retrovirusno eksprimiranje proteina u ćelijama**

Željeni geni su uvedeni u fibroblastne ćelije retrovirusnom transdukcijom. Najpre se prečišćena plazmidna DNK kalcijum fosfatnom transfekcijom (48) uvede u ćelije za pakovanje virusa (packaging cells). Naime, 15 µg plazmida se precipitira etanolom, a zatim centrifugira 20' na 14,000 rpm. Posle ispiranja 70% EtOH i sušenja, DNK talog se u sterilnim uslovima resuspenduje u 375 µl H<sub>2</sub>O i 125 µl 1M CaCl<sub>2</sub>. Ova smeša se kap po kap dodaje u epruvetu sa 500 µl 2x HeBS pufera koji se konstantno "bućka" vazduhom, (za 100ml 2x HeBS: 1.64g NaCl, 1.19g HEPES, 0.021g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.05). Precipitat se zatim inkubira 20' na sobnoj temperaturi i doda na 24 h ranije zasadjene ćelije za pakovanje retrovirusa. U ovom radu je korišćena amfotropna ćelijska linija GP+envAM12 (49). Posle inkubiranja od 5 h, ćelije su isprane PBS-om i dodat im je kompletan medijum. 48 h kasnije započeta je selekcija na neomicinsku rezistenciju t.j. dodat je svež medijum sa antibiotikom G-418 (0.8 mg/ml efektivne koncentracije). Ćelije su gajene u ovim uslovima 8 dana. Selektovane ćelije su zatim umnožene i 4 x 10<sup>5</sup> ćelija je zasadjeno na 100 mm šolje. Sa tih ćelija je 24 h kasnije, sakupljen medijum u kome se nalaze virusi, filtriran kroz 0.45 µm filter, i korišćen za transdukovanje 3T3 fibroblasta u logaritamskoj fazi rasta. 24 h posle transdukcije 3T3 ćelije su selektovane u medijumu sa 0.9 mg/ml G-418. Ćelije koje su preživele ovaj tretman su umnožene i korišćene za studiranje.

U MDCK ćelije su retrovirusni vektori uvedeni formiranjem kompleksa sa lipofektinom (Gibco). 2.5 µg DNK je pomešano sa 30 µl lipofektina i ova smeša je inkubirana preko noći sa ćelijama zasadjanim prethodnog dana (30% konfluentne). 48 h posle transfekcije ćelije su selektovane u medijumu sa G-418 (1 mg/ml). Stabilna transfekcija ćelija vektorom koji nosi gen za β-gal, potvrđena je korišćenjem eseja za β-galaktozidaznu aktivnost (5 Prime - 3 Prime, CO, USA).

## **4.9 Reverzna transkripcija - lančana polimerazna reakcija (RT-PCR)**

### **4.9.1 Izolovanje RNK**

Totalna RNK je izolovana iz ćelija koristeći Pure script kit, kompanije Gentra Systems, MN, USA. Konfluentne ćelije u 35 mm sudovima su lizirane dodavanjem 300 µl CLS rastvora za lizu. Posle 2-3 x pipetiranja, lizat je prenešen u Eppendorf epruvete i dodato je 100 µl rastvora za precipitiranje proteina i DNK (PS). Smeša je promućkana pažljivo nekoliko puta i inkubirana na ledu 5', posle čega je centrifugirana 3' na 14,000 rpm. Precipitirani proteini i DNK su u talogu, a supernatant u kome se nalazi RNK se prebaci u novu epruvetu sa 300 µl izopropanola. Posle 3' centrifugiranja RNK je u talogu, koji se ispere 70% EtOH i susi 15' na vazduhu. 50 µl HS rastvora je korišćeno za rastvaranje RNK, posle čega je spektrofotometrijski određivana koncentracija.

### **4.9.2 Reverzna transkripcija**

Procesom reverznog prepisivanja (RT), 10 µg RNK je prepisano u jednolančanu cDNK u prisustvu enzima reverzne transkriptaze (MMLV-RT) (Gibco). Najpre je RNK sa 1 µM oligo(dT)<sub>12-18</sub> prajmerima inkubirana 15' na 70° C, a potom 5' na ledu. Zatim je

dodato 200 U enzima i 2 mM dNTP-a u totalnoj zapremini od 100  $\mu$ l. Reakcija je vršena 90' na 37° C.

#### 4.9.3 Lančana polimerazna reakcija

Lančana polimerazna reakcija - PCR je metoda za umnožavanje određenih fragmenata DNK uz prisustvo specifičnih oligonukleotidnih prajmera. 10  $\mu$ l smeše u kojoj se nalazi cDNK inkubirano je sa 1 mM dNTP smešom, po 1  $\mu$ M prajmerima, 1x puferom (PCR Optimizer kit, Invitrogene, CA,USA) i Taq polimerazom (1U) u totalnoj zapremini od 50  $\mu$ l. PCR umnožavanje je izvodjeno u sledećim uslovima:

1 ciklus	94° C	3'
30 ciklusa	94° C	1'
	59° C	2'
	72° C	2'
1 ciklus	72° C	7'

Po 10  $\mu$ l svake PCR reakcije je analizirano na agaroznom gelu.

U ovom radu korišćeni su sledeći prajmeri:

za aktin: 5'-CACTGGCATTGTCATGGACT-3' i  
5'-CTTGATCTTCATGGTGCTGG-3'

za neo: 5'-CTGAATGAACTGCAGGACGAGG-3' i  
5'-CGCCAAGCTCTTCAGCAATATC-3'

Prajmeri za tMK su bili izabrani tako da je pomoću njih moguće detektovati samo tMK ekspresiju, a ne i endogenu kinazu lakog lanca miozina. Zbog toga je jedan prajmer

hibridizovao sa sekvencom vektora: 5'-ATCGAATTCCTGCAGC-3', a drugi prajmer: 5'-CTACACATTGCACGAGC-3' je hibridizovao u okviru tMK inserta.

#### 4.10 Imunoprecipitacija miozina

Monolejari ćelija u 60 mm sudovima ili ćelijska vlakna koja su rasla u kalupima od silikonske gume (biće opisana kasnije), isprana su DMEM-om koji ne sadrži fosfatne jone. Ćelije su zatim inkubirane u 1 ml istog medijuma kome je dodato 50  $\mu\text{Ci}$   $^{32}\text{P}$ , 6 h na 37°C. Ćelijama koje su stimulisane serumom, posle ove inkubacije je u medijum sa  $^{32}\text{P}$  dodat fetalni teleći serum (finalna konc. 30%) i inkubiranje je nastavljeno 5' ili 20'. Ćelije u sudovima ili vlaknima, su u odgovarajuća vremena isprane 2x hladnim Gey's puferom (za 100ml: 0.012g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.003g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.037g  $\text{KCl}$ , 0.7g  $\text{NaCl}$ , 0.227g  $\text{NaHCO}_3$ , 0.1g D-glukoze, 150  $\mu\text{l}$  1M  $\text{CaCl}_2$ , 30 $\mu\text{l}$  1M  $\text{MgSO}_4$ , 100  $\mu\text{l}$  1M  $\text{MgCl}_2$ ; pH 7.4). Odmah po odlivanju pufera sudovi sa ćelijama su zamrzavani na pločama suvog leda, kao i vlakna koja su prebačena u epruvete. U zamrznute ćelije dodat je 1 ml pufera za ekstrakciju, EB, (50 mM pirofosfat, 100 mM  $\text{NaF}$ , 300 mM  $\text{NaCl}$ , 10 mM  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ , 10 mM EGTA, 2 mM EDTA, 1% NP40; pH 7.4). Neposredno pre upotrebe, dodati su inhibitori proteaza: pepstatin, leupeptin, PMSF, (0.01 mg/ml); i 10  $\mu\text{g/ml}$  RNK-aze. Ćelije su postepeno otapane i sakupljane (koristeći "cell scraper"), a vlakna su homogenizovana. Posle centrifugiranja od 10' na 20,000 rpm u Sorvall SS34 rotoru, supernatant je prenešen u nove epruvete i dodata su antitela na miozin (20  $\mu\text{l}$ , 2 mg/ml, zečija, anti mišija antitela na makrofagni miozin). Ova smeša je inkubirana 3 h u hladnoj sobi uz blago mućkanje, posle čega je dodato 300  $\mu\text{l}$  50% protein A sefaroze i inkubacija nastavljena 2 h u hladnoj sobi. Epruvete su zatim centrifugirane 20" i sefaroza je ispirana



po 2x sa EB, Gey's puferom i 5 mM Tris pH 7.5. Proteini su eluirani sa sefaroze u 300  $\mu$ l pufera: 0.25% SDS, 5 mM DTT, 5 mM Tris pH 6.8, inkubiranjem od 5' na 100° C i liofilizovani preko noći. Talozi su resuspendovani u 50  $\mu$ l pufera: 15% glicerol, 300 mM Tris pH 6.7 uz dodatak brom fenol plave boje. Posle inkubiranja od 5' na 100° C, uzorci su nanoseni na SDS-poliakrilamidni gel (5-20% gradijent). Posle bojenja u Coomassie blue rastvoru, gelovi su sušeni na vazduhu i eksponirani na x-ray filmove. Trake na autoradiogramu, koje predstavljaju lake lance miozina (LLM) su kvantifikovane denzitometrijski, kao i teški lanci miozina (TLM) sa Coomassie obojenih gelova. Vrednosti za LLM su zatim podeljene sa vrednostima odgovarajućih TLM. U eksperimentima sa stimulacijom ćelija serumom, rezultati fosforilacije LLM kontrolnih i tMK ćelija su normalizovani deljenjem vrednosti dobijenih posle 5' i 20' sa vrednostima bez stimulacije (0').

#### **4.11 Obeležavanje proteina u ćelijama u kulturi sa <sup>35</sup>S**

24 h pre eksperimenta ćelije su zasadjene u DMEM medijumu u 60mm sudovima. Zatim su ćelije 2x oprane medijumom u kome nema metionina i cisteina, posle čega je dodato 2 ml istog medijum sa 50  $\mu$ Ci/ml Tran <sup>35</sup>S (ICN, CA,USA), koji sadrži 75% <sup>35</sup>S-metionina i 15% <sup>35</sup>S-cisteina (ostalih 10% aktiviteta nisu biološki značajne komponente). Inkubiranje je trajalo 5 h, posle čega su ćelije oprane 2x PBS-om i dodat im je ekstrakcioni pufer (1% NP-40, 0.5M NaCl, 5mM EDTA, 2mM DTT, 40mM Tris, pH 7.5). Pipetom su ekstrakti prenešeni iz ćelijskih sudova u Ependorf epruvete, zamrznuti u suvom ledu, otopljeni i centrifugirani 10' na 20,000 rpm u Sorvall SS34 rotoru. Supernatanti su prenešeni u nove epruvete i određena je koncentracija ukupnih proteina

po metodi Bradforda. Po 50  $\mu\text{g}$  proteinskog ekstrakta je nanošeno na SDS-poliakrilamidni gel (5-20%).

#### 4.12 Fosfopeptidno mapiranje

90% konfluentne tMK ćelije, koje su zasadjene u dva 100 mm ćelijska suda, inkubirane su 6 h sa po 300  $\mu\text{Ci}$   $^{32}\text{P}$  u 3 ml DMEM-a bez fosfata. Kontrolne ćelije su gajene pod istim uslovima, ali bez  $^{32}\text{P}$ , u kompletnom DMEM. Iz obe grupe ćelija je imunoprecipitiran miozin po već opisanoj metodi. Miozin izolovan iz kontrolnih ćelija, kao i miozini purifikovani iz trahealnih glatkih mišića i makrofaga su fosforilisani *in vitro* u 50  $\mu\text{l}$  reakcionoj smesi: 0.1 mM ( $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ )ATP, 0.3  $\mu\text{M}$  kalmodulin, 0.25 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.0125 mg/ml purifikovana kinaza lakog lanca miozina glatkih mišića; 15' na sobnoj temperaturi. Obeleženi, imunoprecipitirani miozini iz tMK ćelija, kontrolnih ćelija i purifikovani miozini su razdvojeni na SDS-poliakrilamidnim gelovima. Gornje polovine gelova su obojene (Coomassie) i detektovani su TLM, a donji delovi su sušeni i autoradiografijom su na njima identifikovane trake koje odgovaraju LLM. Postavljanjem autoradiografija iznad gelova, precizno su definisane pozicije LLM i ti delovi gela su isecani. Komadi gela su ispirani 3x po 15' sa 5 ml 25% izopropanola, a zatim sa 10% metanolom, posle čega su preneseni u Ependorf epruvete i homogenizovani. Tako obrađenim gelovima je dodato 950  $\mu\text{l}$  100 mM  $\text{NH}_4\text{CO}_3$ , pH 8.0 i 50  $\mu\text{l}$  tripsina (1mg/ml). Uzorci su digerirani tripsinom 24 h na 37° C, posle čega je supernatant prenesen u nove epruvete i liofilizovan. Talozi su zatim rastvoreni u 50  $\mu\text{l}$  pufera (8M Urea, 10 mM DTT, 10 mM Tris) i nanošeni na izoelektrofokusrajuće gelove. Fosfopeptidi su analizirani sa autoradiografija izoelektrofokusrajućih gelova (52). Izelektrofokusrajući gelovi (7.5%

akrilamid, 4M Urea) su sadržali koktel amfolina sa sledećim opsezima pH: 2.5-5, 3-5 i 5-8; koji su u toku elektroforeze formirali linearne pH gradijente. Kao katodni, gornji, pufer za elektroforezu korišćen je 100 mM NaOH, a anodni, donji, 100mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Preelektroforeza je vršena 30' na 450 V, a elektroforeza 3 h i 45' na 900 V i na kraju 15' na 1500 V, uz konstantno hladjenje (53).

#### **4.13 Kvantifikovanje čvrstoće citoskeleta**

Ćelije na kojima su vršena ova merenja su sadjene na staklenim pločicama koje su prethodno bile obložene sa 15 µg/ml polihidroksietil metakrilatom (poly-HEMA), čime je sprečeno da se ćelije potpuno rašire na podlozi. Posle 4-6 h od sadjenja ćelija, pločice su montirane u komoru "ćelijskog ubadača" (34), u invertovanoj poziciji (ćelije su okrenute na dole). Otprilike na sredini ćelije, površina ćelijske membrane je deformisana 2.6 µm u dubinu, brzinom 5.1 µm/s, pomoću staklenog ubadača sa vrhom prečnika 2 µm, povezanog sa fleksibilnom polugom, poznate konstante savijanja. Stepenn savijanja ove poluge (X) je korišćen da se izračuna deformabilitet, tj. čvrstoća citoskeleta, koja predstavlja silu kojom se citoskelet suprotstavlja deformisanju ( $F = k \cdot X$ , gde je k konstanta savijanja).

#### **4.14 Konstruisanje fibroblastnih vlakana**

Ćelije su tripsinizovane i 2 x 10<sup>6</sup> ćel. u 1 ml medijuma je pomešano sa 1 ml (0.5 mg/ml) ledeno hladnog kolagena (iz repa pacova, Vitrogen, CA, USA). Ova suspenzija kolagena i ćelija je razlivena u kalup (0.8 x 5 x 0.5 cm), koji je napravljen u sloju silikonske gume u 100 mm staklenoj petri šolji. Posle 8 h inkubiranja u CO<sub>2</sub> inkubatoru

na 37° C, dodat je još 1 ml kompletnog medijuma. Inkubiranje je nastavljeno 3-5 dana, tj. do trenutka kada su ćelije sakupile gel i formirale vlakno, zakačeno za držače od silikonske gume na samim krajevima kalupa.

#### **4.15 Merenje kontraktibilnosti**

Formirana ćelijska vlakna su sečena na 5 mm dugačke delove i pomoću cijanoakrilnog lepka postavljena između dva staklena držača u aparat za merenje generisane sile (Sensonor force transducer). Jedan držač je bio fiksiran, a drugi povezan sa silikonskim poluprovodnikom, preko koga su detektovane promene u tenziji, proporcionalno transformisane u električni signal, koji je zatim beležen na oscilografu. Ovaj aparat meri izometričku kontrakciju, tj. dužina vlakna ili mišića se održava konstantnom između staklenih držača, a detektuju se promene u tenziji, tj. sili koja se generiše (transduktor sile) (54,55). Za sve vreme merenja vlakna su bila potopljena u MOPS-PSS pufer: (mM) NaCl,140; KCl,4.7; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,1.2; EDTA,0.02; MgSO<sub>4</sub>,1.2; CaCl<sub>2</sub>,2.5; dekstroza,5.5; MOPS,20; pH 7.4; na 37° C. Merenje kontraktibilnosti vršeno je po dodavanju telećeg seruma u odgovarajućoj finalnoj koncentraciji u MOPS-PSS pufer.

#### **4.16 Merenje transepitelijalnog otpora**

MDCK ćelije su tripsinizovane i zasađene u konfluentnoj gustini (10<sup>6</sup> ćel/0.49 cm<sup>2</sup>) u čašicama sa permeabilnim filterima na dnu (Transwell, Costar), koje su zatim postavljene u odgovarajuće komore ćelijskih sudova (6-well dish). Dodat je kompletni DMEM medijum, 1.5 ml u čašice, 2.5 ml u komore; što je obezbeđivalo podjednaki hidrostatički pritisak. Struja od 100 µA je propuštana kroz monolejer i meren je

rezultujući napon pomoću EVOM epitelijalnog voltmetra i štapićastih elektroda (World Precision Instrument, Sarasota, FL, USA), pri čemu je jedna elektroda bila potopljena u čašicu, a druga u komoru. Transepitelijalni električni otpor je izračunavan po formuli  $R=V/I$ . Dobijene vrednosti otpora su normalizovane množenjem sa površinom filtera i zbog toga su prikazani rezultati u  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ .

#### **4.17 Statistička analiza rezultata**

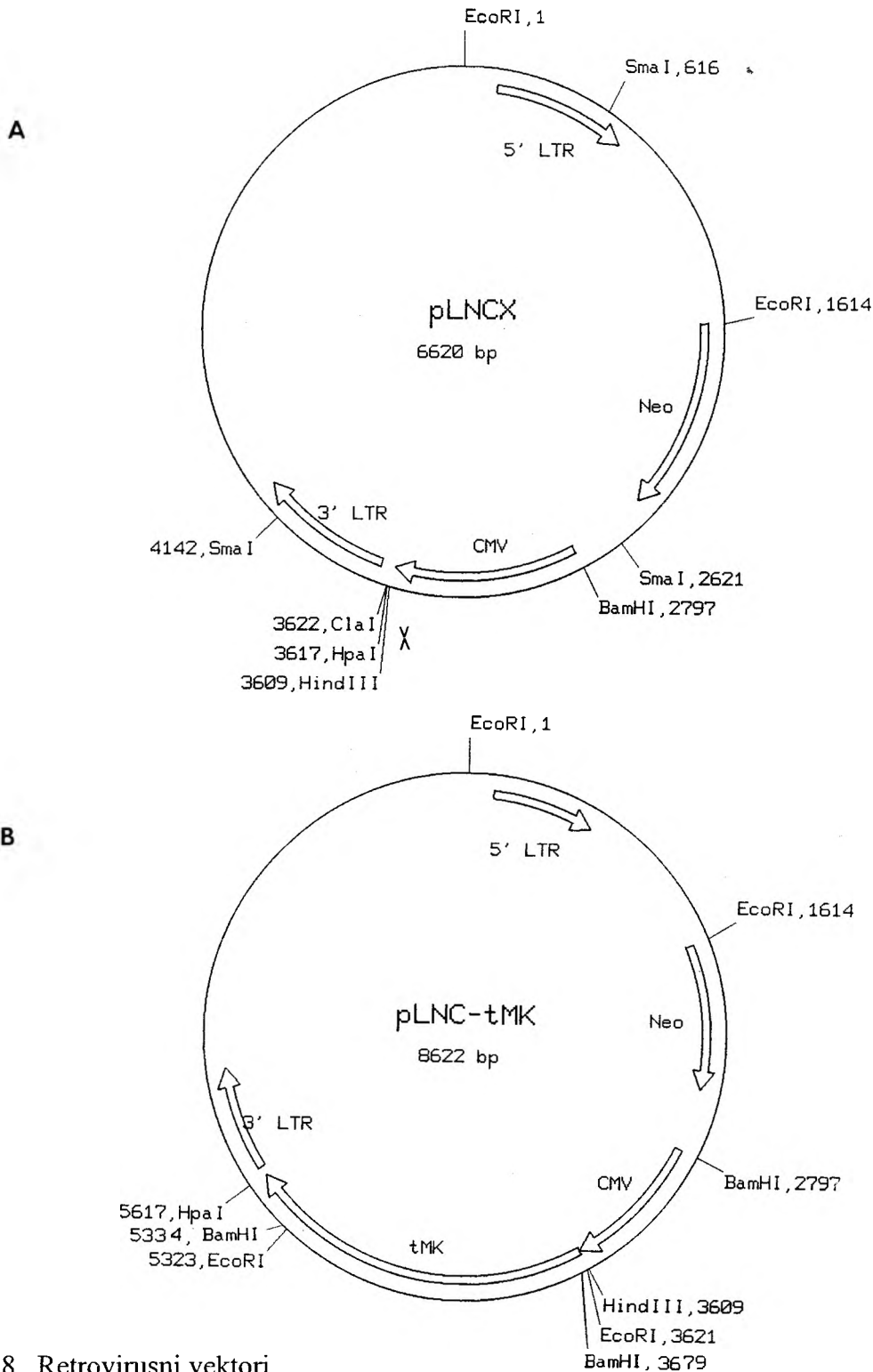
Svi rezultati su prikazani kao srednje vrednosti  $\pm$  SE (standardna greška),  $n$  = broj uradjenih eksperimenata. Statistički značaj rezultata je evaluiran korišćenjem nesporenog t-testa.

## 5. REZULTATI

Ovaj rad imao je za cilj da ispita efekat povećane fosforilacije lakih lanaca miozina na kontraktilna svojstva fibroblasta i epitelijalnu permeabilnost. Eksperimenti su bili koncipirani tako da se u NIH 3T3 fibroblaste i MDCK epitelijalne ćelije uvedu retrovirusni vektori koji nose gen za katalitički domen kinaze lakog lanca miozina i da se zatim prate biohemijski i molekularni mehanizmi uključeni u regulaciju kontraktilnosti ovih ćelija. Dakle, za ova istraživanja neophodno je bilo prvo konstruisati eukariotske ekspresione vektore.

### 5.1 Konstruisanje ekspresionih vektora

Retrovirusni vektor pLNCX, koji sadrži regulatorne elemente mišjeg Maloni virusa leukemije (56), korišćen je kao osnovni vektor za konstruisanje ekspresionih vektora opisanih u ovom radu (Šema 8.A). Kao što se sa šeme vidi, gen za neomicin je pod kontrolom virusnog 5'dugog ponovljenog niza (5'LTR), a mesto za kloniranje gena (X) se nalazi 3' u odnosu na citomegalo-virusni promotor, tako da je ekspimiranje uvedenih gena pod kontrolom ovog promotora. 3'dugi ponovljeni niz (3'LTR) obezbedjuje 3'regulatorne sekvence neophodne za ekspimiranje novouvedenih gena.



Šema 8. Retrovirusni vektori

A. Vektor pLNCX, 5'LTR (long terminal repeat) - 5'dugi ponovljeni niz; neo - gen za neomicin, obezbeđuje rezistenciju na antibiotik G-418 u eukariotskim ćelijama; CMV - citomegalo-virusni promotor; X - mesto za kloniranje gena; 3'LTR - 3'dugi ponovljeni niz. Vektor sadrži i sve regulatorne elemente za umnožavanje u bakterijama, kao i gen za rezistenciju na antibiotik ampicilin (mesta nisu označena). B. Novokonstruisani vektor pLNC-tMK, tMK - truncated myosin light chain kinase - deletirana kinaza lakog lanca miozina.

### 5.1.1 Konstruisanje pLNC-tMK vektora

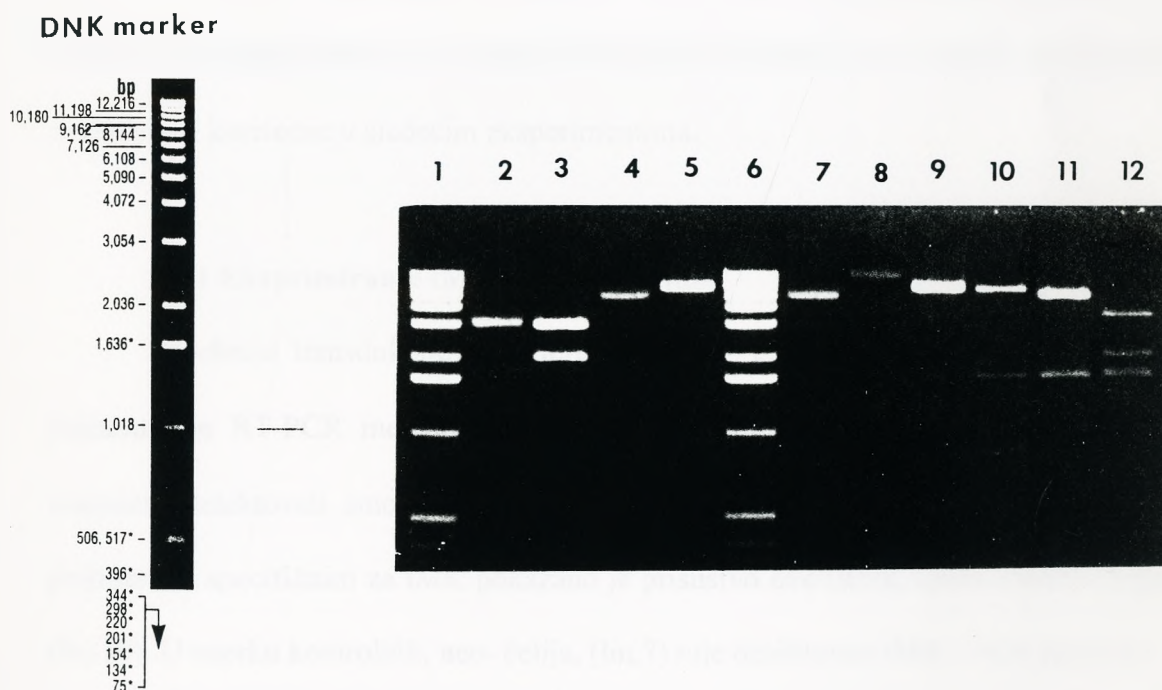
Uvodjenjem stop kodona na mestu lizina 793 u genu za kinazu lakog lanca miozina konstruisan je konstitutivno aktivan katalitički fragment enzima, nazvan tMK (truncated) (29). Od autora smo dobili mutirani gen subkloniran u *Nhe* I mesto vektora pBlueBac (Invitrogen, CA,USA). tMK gen je zatim, iz tog vektora subkloniran u *Xba* I mesto vektora pBluescript II SK (Stratagene, WI, USA). Ovaj vektor je linearizovan enzimom *Not* I, posle čega su krajevi popunjeni. Ovako obradjeni molekuli su digerirani enzimom *Hind* III i izolovan je 2005 bp tMK fragment (Sl.2, lin.3). pLNCX vektor je digeriran enzimima *Hpa* I i *Hind* III (Sl.2, lin.5). Izolovani tMK fragment je zatim ligiran sa ovako obradjenim vektorom. Konstruisanje novog, pLNC-tMK vektora, (Šema 8.B) potvrđeno je restrikcionom analizom enzimima *Bam* HI i *Eco* RI (Sl.2, lin.9-12). Naime, enzim *Bam* HI samo linearizuje vektor pLNCX (lin.9), a rezultat digestije pLNC-tMK vektora su 3 fragmenta veličine: 6085, 1655 i 882 bp (lin.10). Rezultat digestije pLNCX vektora enzimom *Eco* RI su 2 fragmenta: 5006 i 1614 bp (lin.11). Proizvod digestije pLNC-tMK vektora istim enzimom su 4 fragmenta veličine: 3299, 2007, 1702 i 1614 bp (lin.12). Treba napomenuti da poslednja dva fragmenta, zbog veoma male razlike u veličini, ko-migriraju i vide se kao jedna jasnije izražena traka.

Ovi rezultati su potvrdili da je uspešno konstruisan novi vektor, pLNC-tMK, koji je dalje korišćen za ekspimiranje tMK u 3T3 i MDCK ćelijama.



### 5.1.2 Konstruisanje pLNC- $\beta$ -gal vektora

pHIVlacZ plazmid (koji smo dobili ljubaznošću Joseph Maio, Albert Einstein College of Medicine, New York), obradjen je enzimom *Pst* I i krajevi su popunjeni. Digestijom enzimom *Hind* III formiran je 4390 bp fragment koji sadrži kompletan gen za  $\beta$ -galaktozidazu, koji je subkloniran u *Hind* III - *Hpa* I digeriran pLNCX vektor. Konstruisanje novog, pLNC- $\beta$ -gal vektora potvrđeno je restrikcionom analizom (rezultati nisu pikazani).



Slika 2. Konstruisanje i restrikciona analiza pLNC-tMK vektora

lin.1 i 6 DNK marker, lin.2 pBluescript-tMK nd., lin.3 pBluescript-tMK d. *Not* I i *Hind* III, lin.4 pLNCX nd., lin.5 pLNCX d. *Hpa* I i *Hind* III, lin.7 pLNCX nd., lin.8 pLNC-tMK nd., lin.9 pLNCX d. *Bam* HI, lin.10 pLNC-tMK d. *Bam* HI, lin.11 pLNCX d. *Eco* RI, lin.12 pLNC-tMK d. *Eco* RI.

(d.- digeriran, nd.- nedigeriran)

## 5.2 Potvrda tMK ekspresije i aktivnosti

U cilju ispitivanja mehanizama koji regulišu kontraktilnost ne-mišićnih ćelija, pLNC-tMK vektor je korišćen za eksprimiranje katalitičkog domena kinaze lakog lanca miozina u 3T3 fibroblastima i MDCK epitelijalnim ćelijama. Ćelije u koje je uveden ovaj gen nazvane su 3T3-tMK i MDCK-tMK. Vektor pLNCX je poslužio kao kontrolni vektor u eksperimentima sa fibroblastima, pa su odgovarajuće ćelije nazvane 3T3-neo. U eksperimentima sa MDCK ćelijama, pLNC- $\beta$ -gal vektor je korišćen kao kontrolni, a odgovarajuće ćelije su nazvane MDCK- $\beta$ -gal.

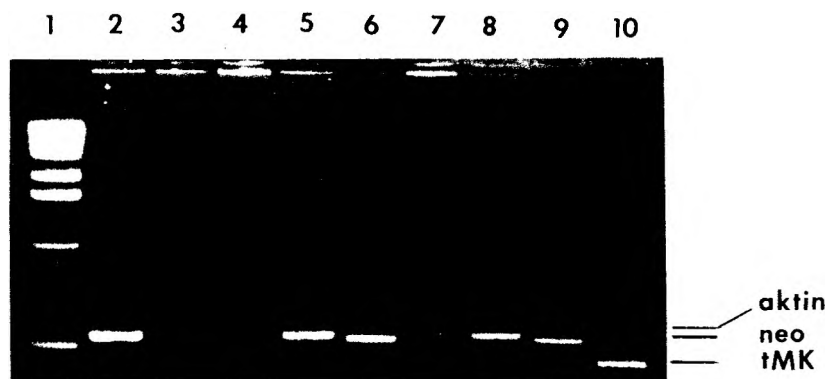
Kao što je već rečeno, svi navedeni vektori sadrže gen za neomicin (Šema 8.), pa su posle uvođenja vektora sve ćelije tretirane antibiotikom G-418. Selektovane ćelije su umnožene i korišćene u sledećim eksperimentima.

### 5.2.1 Ekspimiranje tMK u fibroblastima

Uspešnost transdukcije 3T3 fibroblasta neo- i tMK- retrovirusnim vektorima pokazano je RT-PCR metodom (Slika 3.). Koristeći prajmere specifične za gen za neomicin detektovali smo prisustvo ove iRNK u obe ćelijske linije (lin.6 i 9). Sa prajmerima specifičnim za tMK pokazano je prisustvo ove iRNK samo u tMK- ćelijama (lin.10). U uzorku kontrolnih, neo- ćelija, (lin.7) nije detektovan tMK - PCR proizvod.

Negativni kontrolni eksperimenti urađeni su sa RNK izolovanom iz netransdukovanih, wt-3T3 fibroblasta. PCR produkti nisu detektovani ni sa neomicinskim, ni sa tMK specifičnim prajmerima (lin.3 i 4). Pozitivni kontrolni eksperimenti urađeni su korišćenjem prajmera specifičnih za aktin. Prisustvo

odgovarajućeg fragmenta pokazano je posle amplifikacije cDNK iz sve tri grupe ćelija: wt-, neo- i tMK- (lin.2, 5 i 8).



Slika 3. Detektovanje tMK ekspresije u 3T3 ćelijama RT-PCR metodom

Lin.1 DNK marker. Lin.2, 3 i 4 amplifikacione reakcije sa cDNK iz wt-ćelija, sa prajmerima za: aktin - lin.2, neo - lin.3, tMK- lin.4. Lin.5, 6 i 7 amplifikacione reakcije sa cDNK iz neo-ćelija, sa prajmerima za: aktin - lin.5, neo - lin.6, tMK- lin.7. Lin.8, 9 i 10 amplifikacione reakcije sa cDNK iz tMK-ćelija, sa prajmerima za: aktin - lin.8, neo - lin.9, tMK- lin.10. Veličine PCR produkata: aktin - 541 bp, neo - 532 bp, tMK - 482bp.

### 5.2.2 Ekspimiranje tMK u epitelijalnim ćelijama

Uspešnost transfekcije epitelijalnih ćelija vektorima koji sadrže  $\beta$ -gal- i tMk-gene, takodje je pokazana RT-PCR metodom. U ovim eksperimentima korišćeni su isti prajmeri kao i prilikom analize 3T3 fibroblasta (rezultati sa prajmerima za aktin nisu prikazani). Amplifikacione reakcije sa prajmerima za neo- gen i tMK- insert uradjene su sa cDNK iz wt-,  $\beta$ -gal- i tMK- ćelija. Produkti PCR reakcija za svaki ćelijski tip su pomešani i nanešeni na gel (Slika 4.). Ovi rezultati pokazuju da se tMK- iRNK može detektovati samo u tMK- ćelijama (lin.4), dok se neo- iRNK nalazi i u  $\beta$ -gal- i u tMK- ćelijama (lin.3 i 4). U wt-, netransfektovanim epitelijalnim ćelijama, nisu detektovane iRNK ni za neo- ni za tMK- gen (lin.2).

Kao što je i očekivano, rezultati RT-PCR analize su potvrdili da sve ćelije koje su preživele G-418 selekciju ekspimiraju gen za neomicin, kao i to da se u wt ćelijama ne može naći ova iRNK. Ono što je izuzetno važno je da se tMK gen ekspimirao sa novokonstruisanog vektora, kao i to da je napravljen dobar izbor prajmera kojima je detektovana samo ekspresija tMK sa vektora, a ne i cDNK za endogenu, nemutiranu kinazu lakog lanca miozina.



Slika 4. Detektovanje tMK ekspresije u MDCK ćelijama RT-PCR metodom

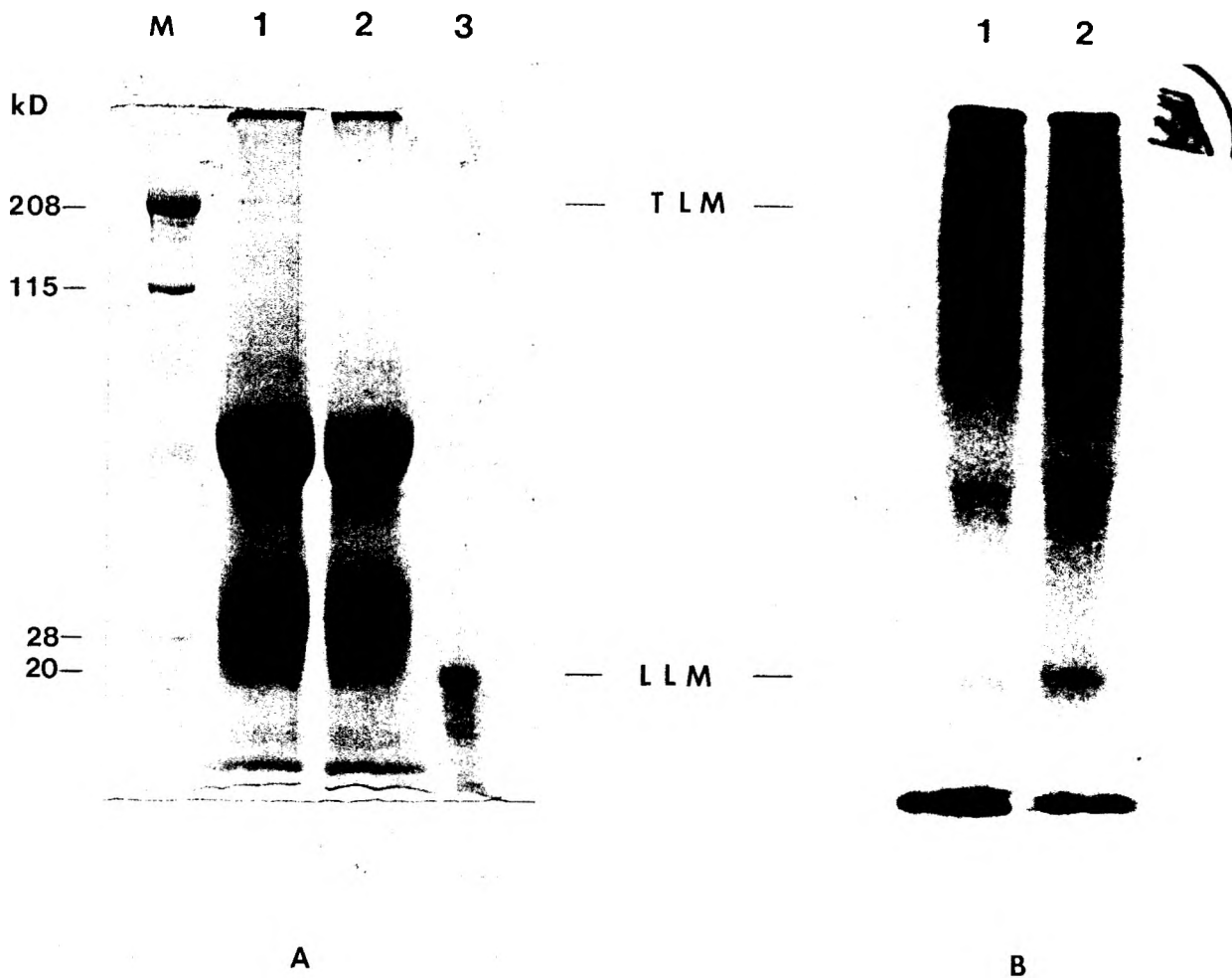
Lin.1 DNK marker, lin.2 amplifikacione reakcije sa cDNK iz wt-ćelija, sa prajmerima za neo i tMK, lin.3 amplifikacione reakcije sa cDNK iz  $\beta$ -gal-ćelija, sa prajmerima za neo i tMK, lin.4 amplifikacione reakcije sa cDNK iz tMK-ćelija, sa prajmerima za neo i tMK. Veličine PCR produkata: neo - 532 bp, tMK - 482bp.

### **5.3 Aktivnost tMK u fibroblastima i epitelijalnim ćelijama**

Prethodni eksperimenti su pokazali uspešnu sintezu iRNK za tMK gen u transdukovanim fibroblastima i transfektovanim epitelijalnim ćelijama. Cilj eksperimenata koji slede bio je da se pokaže aktivnost novosintetisanog tMK enzima u opisanim ćelijskim linijama. Kao što je već rečeno u Opštem delu, tMK je konstitutivno aktivna forma kinaze lakog lanca miozina koja katalizuje fosforilaciju lakih lanaca miozina (29). Očekivano je dakle, da je u tMK ćelijama više miozinskih lakih lanaca fosforilisano nego u kontrolnim ćelijama. Da bi to ispitali koristili smo metodu imunoprecipitacije miozina iz ćelija koje su gajene u medijumu sa  $^{32}\text{P}$ .

#### **5.3.1 Aktivnost tMK u fibroblastima**

Na obojenom SDS-poliakrilamidnom gelu imunoprecipitiranih proteina (Slika 5.A) vidi se podjednaka količina teških lanaca miozina (TLM) u oba uzorka: neo- lin.1, tMK- lin.2. Međutim, autoradiografija istog gela (Slika 5.B) pokazala je značajno povećanje fosforilacije lakih lanaca miozina (LLM) u 3T3 ćelijama koje eksprimiraju tMK (lin.2), u poredjenju sa kontrolnim ćelijama (lin.1). Ovaj fosfoprotein identifikovan je kao laki lanac miozina na osnovu sledećih karakteristika: imunoprecipitiran je kao deo miozinskog kompleksa; ko-migrira sa proteinskim standardom odgovarajuće molekulske težine (20 kD) (Sl.5.A, lin.M), kao i sa purifikovanim LLM (Sl.5.A, lin.3); i specifično ga prepoznaju antitela za LLM (rezultati nisu prikazani). Denzitometrijska analiza imunoprecipitiranih proteina iz četiri nezavisna eksperimenta, pokazala je povećanje od  $5.7 \pm 1.6$  puta u fosforilaciji lakih lanaca miozina u 3T3-tMK ćelijama u poredjenju sa kontrolnim ćelijama.



Slika 5. Fosforilacija lakih lanaca miozina u 3T3 ćelijama

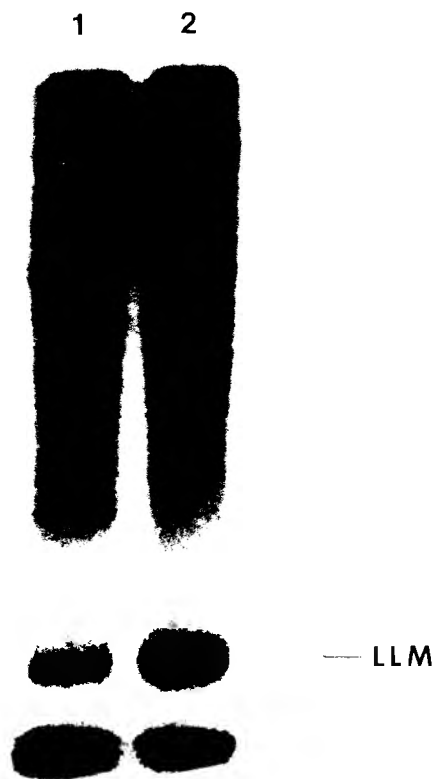
A. SDS-poliakrilamidni gel imunoprecipitiranog miozina iz neo-ćelija (lin.1) i tMK-ćelija (lin.2); lin.M, proteinski standard molekulskih težina; lin.3, purifikovani LLM (20 kD).  
 B. Autoradiografija istog gela, lin.1 i 2 odgovaraju lin.1 i 2 sl.A. TLM - teški lanac miozina, LLM - laki lanac miozina.

### 5.3.2 Aktivnost tMK u epitelijalnim ćelijama

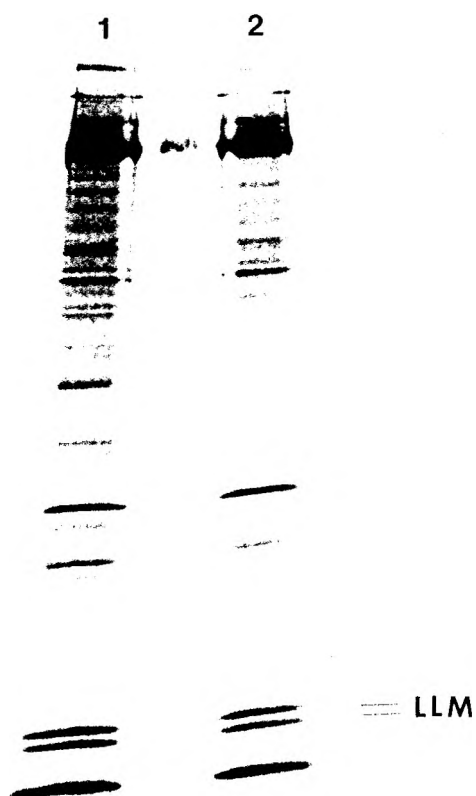
Na Slici 6. prikazana je autoradiografija gela sa imunoprecipitiranim proteinima iz  $\beta$ -gal- (lin.1) i tMK- (lin.2) MDCK ćelija. Očigledno je povećanje fosforilacije lakih lanaca miozina u tMK- ćelijama u poredjenju sa kontrolnim. Rezultati iz tri nezavisna eksperimenta pokazali su da to uvećanje iznosi  $3.1 \pm 0.9$  puta. Kao što je opisano u delu Materijal i metode, da bi mogli da se porede nivoi fosforilacije lakih lanaca miozina izmedju tMK i kontrolnih ćelija, svi rezultati su korigovani u odnosu na kolicine teških lanaca miozina. Medjutim, da bi se potvrdilo da je povećani nivo fosforilacije LLM prouzrokovan aktivnošću tMK, a ne rezultat povećanog nivoa proteina LLM u tMK ćelijama, uradjen je još jedan kontrolni eksperiment. Totalni proteini su ekstrahovani iz istog broja ćelija koji je korišćen za imunoprecipitaciju, pri čemu su ćelije gajene u medijumu sa  $^{35}\text{S}$ . Ćelijski ekstrakti su nanešeni na SDS gel i kao što se sa Slike 7. vidi, nema razlike u sadržaju totalnih ćelijskih proteina izmedju  $\beta$ -gal i tMK- epitelijalnih ćelija.

Ovim eksperimentima je pokazano da je novosintetisani tMK enzim aktivan i u 3T3- i u MDCK- tMK ćelijama.





Slika 6. Fosforilacija lakih lanaca miozina u MDCK ćelijama  
 Autoradiografija SDS-poliakrilamidnog gela sa imunoprecipitiranim miozinom iz  $\beta$ -gal-  
 (lin.1) i tMK-ćelija (lin.2).

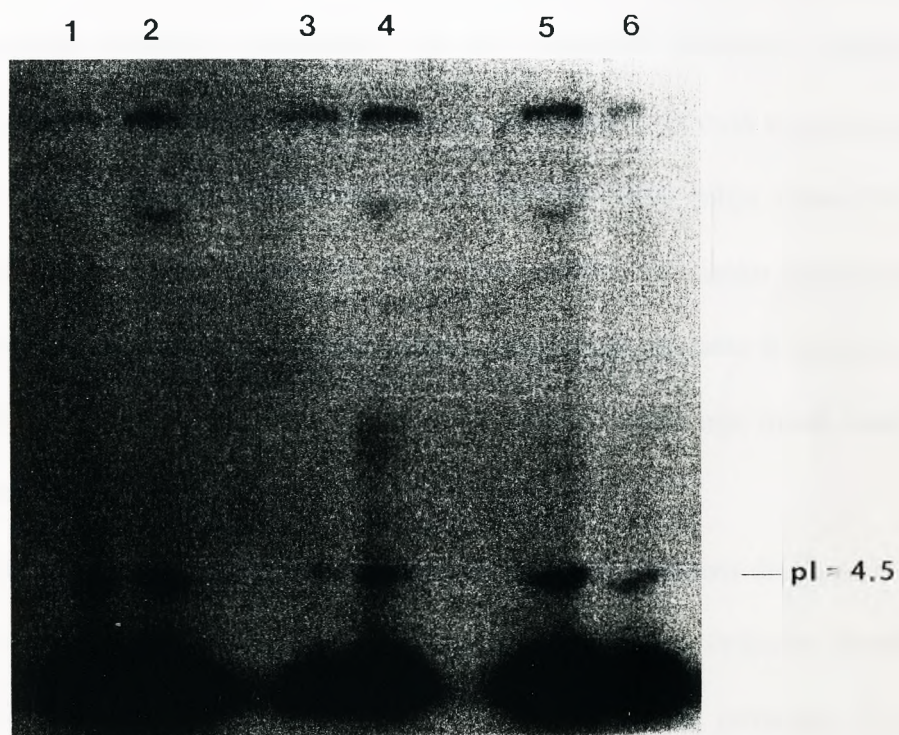


Slika 7. Ukupni proteini iz MDCK ćelija  
 Autoradiografija SDS-poliakrilamidnog gela sa totalnim proteinima iz  $\beta$ -gal- (lin.1) i  
 tMK-ćelija (lin.2), obeleženih  $^{35}\text{S}$ .

## 5.4 Fosfopeptidno mapiranje lakih lanaca miozina

Ovi eksperimenti su imali za cilj da dodatno potvrde da su laki lanci miozina specifično fosforilisani tMK enzimom.

Fosfo-peptidno mapiranje je uradjeno sa tripsinom digeriranim lakim lancima miozina koji su imunoprecipitirani iz 3T3- i MDCK- tMK ćelija (Slika 8., lin.2 i 4). Pokazano je prisustvo jednog fosfo-peptida sa izoelektričnom tačkom 4.5. Ovaj rezultat je u skladu sa objavljenom izoelektričnom tačkom fosfo-peptida lakog lanca miozina, koji sadrži ser 19, amino kiselinu koju fosforiliše kinaza lakog lanca miozina (52). Osim toga, laki lanci miozina imunoprecipitirani iz kontrolnih 3T3 i MDCK ćelija (lin.1 i 3); kao i miozini purifikovani iz trahealnih glatkih mišića (lin.5) i makrofaga (lin.6), koji su *in vitro* fosforilisani purifikovanom kinazom lakog lanca miozina, takodje pokazuju prisustvo jednog fosfo-peptida sa identičnom izoelektričnom tačkom. Ovim rezultatima je potvrđeno da novosintetisani enzim, tMK, specifično fosforiliše lake lance miozina u opisanim tMK- ćelijama.



Slika 8. Fosfopeptidno mapiranje lakih lanaca miozina

Autoradiografija izoelektrofokusrajućeg gela sa tripsinom digeriranim LLM izolovanim iz: 3T3-neo (lin.1), 3T3-tMK (lin.2), MDCK-β-gal (lin.3), MDCK-tMK (lin.4) ćelija, trahealnih glatkih mišića (lin.5) i makrofaga (lin.6).

## 5.5 Čvrstoća citoskeleta tMK ćelija

Cilj ovih eksperimenata bio je da se ispita efekat tMK ekspresije, tj. detektovanog povećanja fosforilacije lakih lanaca miozina, na čvrstoću skeleta tMK ćelija. Čvrstoća citoskeleta je kvantifikovana korišćenjem tzv. "ćelijskog ubadača", aparatom koji meri silu neophodnu da deformiše slobodnu površinu membrane adherentnih ćelija (34). Analiza histograma čvrstoće citoskeleta čije su vrednosti dobijene "ubadanjem" individualnih kontrolnih ili tMK ćelija prikazana je na Tabeli 1. Iz ovih rezultata se vidi da je srednja vrednost čvrstoće citoskeleta i 3T3- i MDCK- tMK ćelija, skoro dva puta veća nego kod odgovarajućih kontrolnih ćelija (ove razlike su visoko signifikantne). Merenja čvrstoće citoskeleta pojedinačnih ćelija i ćelija koje su rasle u grupama nisu pokazala značajnu razliku, što ukazuje da prisustvo okolnih ćelija nije imalo uticaja na rezultate ove analize.

Rezultati do sada opisanih eksperimenata su potvrdili hipotezu da eksprimiranje katalitičkog domena kinaze lakog lanca miozina u ne-mišićnim ćelijama dovodi do povećanja fosforilacije lakih lanaca miozina, što zatim utiče na povećanje čvrstoće citoskeleta.

Tabela 1. Čvrstoća citoskeleta kontrolnih i tMK ćelija

	čvrstoća citoskeleta (mdin/ $\mu$ m)	
	neo	tMK
3T3 fibroblasti	0.21 $\pm$ 0.03	0.40 $\pm$ 0.03
n	23	30
MDCK epitelijalne ć.	$\beta$ -gal	tMK
	0.23 $\pm$ 0.02	0.43 $\pm$ 0.02
n	43	46

## 5.6 Kontraktilna svojstva 3T3-tMK ćelija

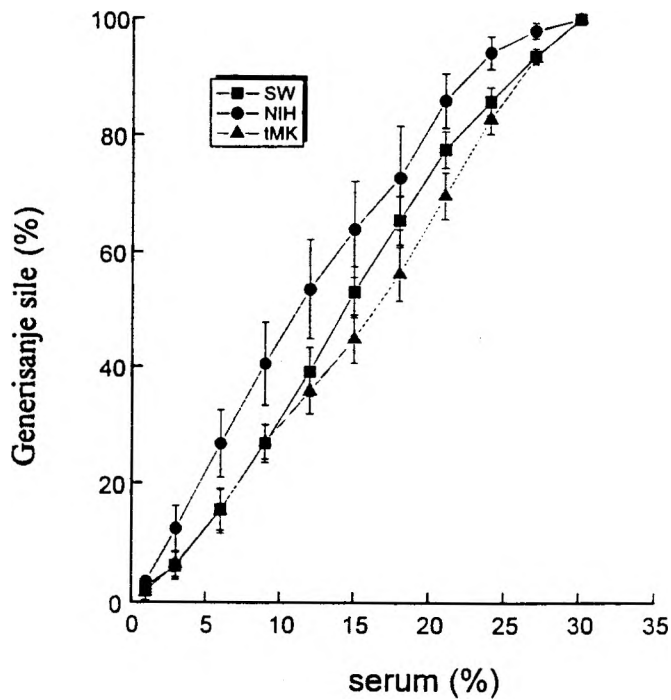
U ovim eksperimentima korišćena su tzv. ćelijska vlakna napravljena od wt- i tMK- 3T3 fibroblasta. Suspenzija kolagena i ćelija formirana u vlakno prikazana je na Slici 9. U literaturi je opisano da se ćelije pomešane sa kolagenom, u toku formiranja vlakna, orijentišu longitudinalno duž kolagenskog matriksa, skupljaju ga i formiraju trodimenzionalnu ćelijsku mrežu (54). Kao što je navedeno u delu Materijal i metode, ovakva ćelijska vlakna su sečena na 5mm dugačke delove, koji su zatim povezivani za aparat za merenje kontraktilnih svojstava. Prvo je određena bazalna linija sile koju vlakna proizvode bez ikakve stimulacije (Tabela 2). Može se zapaziti da po toj karakteristici nema nikakve značajne razlike između wt i tMK ćelija.

Kao što je navedeno u Opštem delu, jedan od načina da se indukuje kontrakcija ćelija je dodavanje seruma u medijum (31). U ovim istraživanjima je takodje, serum korišćen za stimulisanje ćelijske kontraktilnosti. Da bi mogli da poredimo kontrakciju tMK i kontrolnih ćelija, bilo je neophodno prvo ispitati odnos koncentracije seruma dodatog ćelijskim vlaknima i sile koju ona proizvode. Na Slici 10. prikazane su kumulativne doza-zavisne krive dobijene merenjem proizvedene sile u toku inkubiranja ćelijskih vlakana sa puferima koji sadrže rastuće koncentracije seruma. Korišćena su vlakna napravljena od tMK-3T3 ćelija i od dve linije wt fibroblasta: NIH 3T3 i SW-3T3 (Swiss). Analizirano je ukupno po 6 vlakana u okviru svake ćelijske linije. Merenja su pokazala da nema statistički signifikantne razlike u nivou kontrakcije između pojedinih ćelijskih vlakana za bilo koju koncentraciju seruma. U svim sledećim eksperimentima korišćen je 30% serum, jer je pri toj koncentraciji postignut maksimalni efekat (Sl.10).



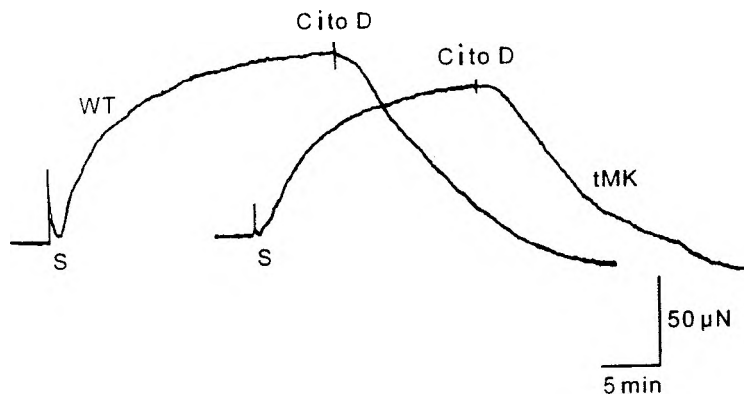
Slika 9. Ćelijsko vlakno

Suspenzija kolagena i wt NIH 3T3 ćelija posle 48h inkubiranja.



Slika 10. Generisanje sile u serumom stimulisanim ćelijskim vlaknima

SW- Swiss, NIH- i tMK- 3T3 fibroblasti su korišćeni za pravljenje ćelijskih vlakana.



Slika 11. Ciklus kontrakcije i relaksacije wt i tMK fibroblastnih vlakana  
 S - dodavanje 30% telećeg seruma, Cito D - dodavanje 1µM citohalazina D

Tabela 2. Kontraktilni parametri fibroblastnih vlakana

	NIH 3T3	SW 3T3	tMK 3T3
sila (µN)			
bez stim.	53.3 ± 6.1	53.4 ± 10	50.3 ± 11.2
30% serum	141.0 ± 9.5	158.0 ± 16.1	178.7 ± 16.7
Cito D	25.2 ± 8.1	33.4 ± 1.4	26.7 ± 5.8
vreme (min)			
50% relaks.	6.7 ± 1.2	8.3 ± 1.4	8.3 ± 1.1
n	3	8	6

Razlike u kontraktilnim parametrima između pojedinih fibroblastnih vlakana nisu statistički signifikantne ( $p > 0.05$ ).

SW - Swiss 3T3 fibroblasti

bez stim. - nestimulisana vlakna, 30% serum - dodavanje 30% telećeg seruma, Cito D - dodavanje 1µM citohalazina D, relaks. - relaksacija vlakana.

Na Slici 11. je prikazan zapis kontraktilnog ciklusa wt i tMK ćelijskih vlakana. Vidi se da dodavanje seruma (S) dovodi do generisanja sile (numeričke karakteristike su prikazane u Tabeli 2). Maksimalni efekat je postignut posle 20 minuta od dodavanja seruma, a kao što je i očekivano, otklanjanje seruma ili dodavanje citohalazina D (Cito D), dovelo je do smanjenja sile, čak i ispod bazalnog nivoa. Gubitak sile po dodavanju citohalazina D (depolimerizuje aktinske filamente), potvrdilo je da je aktinski citoskelet esencijalan za nastajanje sile i kontrakcije. Međutim, ono što je bilo iznenadjujuće je da je vremenski tok i stepen kontrakcije - relaksacije skoro identičan kod oba tipa ćelijskih vlakana, tj. nema značajne razlike u mehaničkim karakteristikama između wt i tMK ćelijskih vlakana.

Dakle, iz dosadašnjih eksperimenata je zaključeno da povećanje fosforilacije lakih lanaca miozina u tMK ćelijama ima lokalni ćelijski efekat - dovodi do povećanja čvrstoće citoskeleta, ali izgleda da se ovaj lokalni uticaj ne prenosi na celo ćelijsko vlakno.

## **5.7 Fosforilacija lakih lanaca miozina posle stimulisanja**

### **3T3 ćelija serumom**

Pošto je po dodavanju seruma detektovano generisanje sile u ćelijskim vlaknima, ali bez značajne razlike u mehaničkim karakteristikama između wt i tMK ćelija, želeli smo da ispitamo stanje fosforilacije lakih lanaca miozina iz ovako stimulisanih ćelija. U tu svrhu miozin je imunoprecipitiran ili iz ćelija u kulturi ili iz ćelijskih vlakana inkubiranih u puferu sa 30% serumom. Većina rezultata je dobijena korišćenjem ćelija gajenih u ćelijskim sudovima zato što je bilo mnogo komplikovanije raditi sa <sup>32</sup>P-obeležanim ćelijskim vlaknima. Rezultati fosforilacije su bili isti bez obzira na način na



koji su ćelije gajene. Takođe, pošto je za ove eksperimente bio neophodan veliki broj ćelija i ćelijskih vlakana, naizmenično su, kao kontrolne, korišćene wt i neo ćelije. Na Slici 12. je pokazana imunoprecipitacija miozina iz vlakana napravljenih od ove dve ćelijske linije. Jasno se vidi da nema razlike u nivou fosforilacije lakih lanaca miozina izmedju wt i neo ćelija; tj. da obe ćelijske linije mogu da posluže kao kontrola za analizu tMK ćelija.

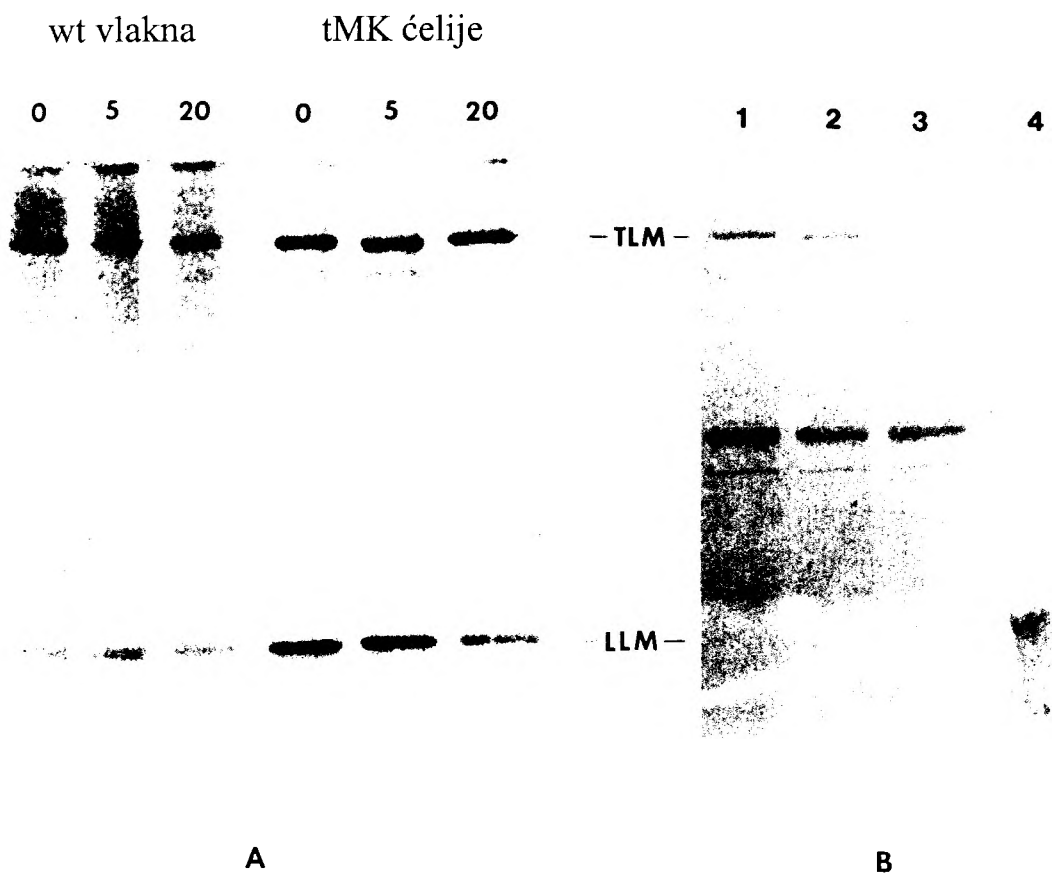


Slika 12. Imunoprecipitacija miozina iz ćelijskih vlakana

Autoradiografija SDS-poliakrilamidnog gela sa imunoprecipitiranim miozinom iz vlakana napravljenih od: wt- (lin.1) i neo- (lin.2) NIH 3T3 ćelija.  
LLM - laki lanac miozina.

Sa Slike 11. se vidi da se posle stimulacije ćelijskih vlakana serumom, generiše sila koja dostiže plato posle 20 minuta. Taj vremenski period je zato korišćen u sledećim eksperimentata, koji su imali za cilj da kvantifikuju fosforilaciju lakih lanaca miozina u toku stimulacije ćelija serumom. Takodje, analizirane su i ćelije posle 5' od dodavanja seruma u cilju detektovanja promena na početku stimulacije. Dakle, wt 3T3 ćelije u vlaknima i tMK ćelije u ćelijskim sudovima su inkubirane sa  $^{32}\text{P}$  i stimulisane serumom 5 ili 20 minuta. Zatim je iz ovako tretiranih ćelija (i netretiranih, 0 min.) imunoprecipitiran miozin i razdvojen na SDS gelovima. Na Slici 13.A su prikazane autoradiografije tih gelova. Za tMK ćelije je, u delu B. iste slike, prikazan i SDS gel, sa koga se vidi da je količina teških lanaca miozina veoma slična u sva 3 uzorka. U delu Materijal i metode je opisano kako je uradjena statistička obrada ovih rezultata, koja je prikazana na Tabeli 3. Rezultati ovih eksperimenata su pokazali da (nasuprot onog što smo očekivali) ni u wt ni u tMK ćelijama ne dolazi do značajnog povećanja fosforilacije lakih lanaca miozina posle stimulacije serumom. Dakle, iako dodavanje seruma izaziva generisanje sile u wt ćelijama (Sl.11), nije detektovano i uporedno povećanje fosforilacije lakih lanaca miozina u ovim ćelijama (Sl.13. wt vlakna 0, 5, 20 min.). Takodje, u tMK ćelijama, iako je bazalni nivo fosforilacije lakih lanaca miozina značajno povećan u odnosu na kontrolne ćelije (0 min.), fosforilacija lakih lanaca se nije dalje povećavala u toku stimulacije ćelija serumom (tMK 5 i 20 min).

Dakle, najznačajniji aspekt ovog dela istraživanja je očigledno razilaženje između kontraktilnih parametara, koji imaju sve karakteristike akto-miozinskog sistema, i fosforilacije lakih lanaca miozina.



Slika 13. Fosforilacija lakih lanaca miozina posle stimulisanja 3T3 ćelija serumom

A. Autoradiografije SDS-poliakrilamidnih gelova sa imunoprecipitiranim miozinom iz wt vlakana i tMK ćelija posle 0, 5, i 20 minuta od dodavanja 30% seruma. B. SDS-poliakrilamidni gel sa imunoprecipitiranim miozinom iz tMK ćelija. Lin. 1, 2 i 3 odgovaraju lin. slike A: tMK ćelije 0', 5' i 20'. Lin.4, purifikovani LLM (20 kD). TLM - teški lanac miozina, LLM - laki lanac miozina.

Tabela 3. Fosforilacija lakih lanaca miozina posle stimulisanja 3T3 ćelija serumom

---

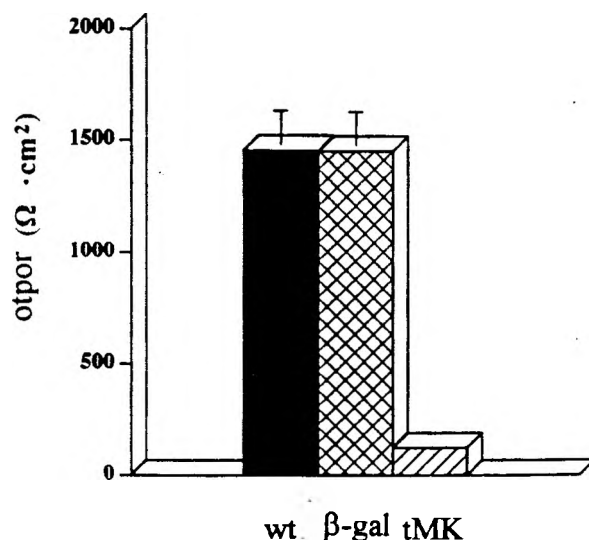
30% serum	wt vlakna	tMK ćel.
0 min.	1	1
5 min.	1.03±0.21	1.37±0.21
20 min.	0.88±0.19	0.83±0.15

---

Statistička analiza je pokazala da nema signifikantne razlike u nivou fosforilacije LLM wt i tMK ćelija u toku stimulacije ćelija 30% serumom, ( $p > 0.05$ ,  $n=4$  imunoprecipitacije).

## 5.8 Efekat povećane fosforilacije lakih lanaca miozina na barijernu funkciju MDCK ćelija

Dosadašnji eksperimenti na MDCK-tMK ćelijama potvrdili su eksprimiranje katalitičkog domena kinaze lakog lanca miozina u ovim ćelijama. Biohemijskim metodama je dakle, utvrđeno povećanje fosforilacije lakih lanaca miozina (LLM), kao i povećanje čvrstoće skeleta ovih ćelija. Poslednji u nizu eksperimenata sa MDCK ćelijama, bio je vezan za ispitivanje uticaja detektovanog povećanja fosforilacije LLM na jednu od osnovnih fizioloških funkcija koju ove ćelije imaju - barijernu funkciju. Kao što je već rečeno, barijerna funkcija epitelijalnih ćelija izučavana je merenjem transepitelijalnog električnog otpora (21). Merenja na monolejerima MDCK ćelija pokazala su da je otpor ( $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ) koji proizvode tMK ćelije  $123 \pm 20$ , wt ćelije  $1456 \pm 178$  i B-gal ćelije  $1452 \pm 174$ , (Slika 14.).



Slika 14. Transepitelijalni otpor MDCK ćelija

Otpori monolejera i wt i  $\beta$ -gal ćelija su signifikantno veći od otpora tMK ćelija ( $p < 0.05$ ;  $n=9$  za svaku grupu ćelija).

Ovi rezultati pokazuju da je transepitelijalni otpor tMK ćelija manji od 10% od otpora koji proizvode wt ili  $\beta$ -gal ćelije. Prema tome, svi navedeni eksperimenti na MDCK ćelijama potvrđuju hipotezu da tMK ekspresija utiče na povećanje fosforilacije LLM što dovodi do akto-miozinske kontrakcije citoskeletnog prstena, koja se prenosi na lateralne ćelijske membrane, zbog čega se povećava paraćelijska propustljivost.

## 6. DISKUSIJA

Miozin je primarni kontraktilni protein u molekularnoj mašineriji mišićnog tkiva. Njegova struktura i funkcija su detaljno izučeni u skeletnim mišićima, po čemu je i dobio naziv sarkomerni ili konvencionalni miozin (miozin-II). Pošto je ovaj isti molekul pronađen u glatkim mišićnim i većini ne-mišićnih ćelija, smatralo se da će studije poprečno-prugastih mišića obezbediti bazu za razumevanje kontraktilnih funkcija i ovih ćelija (110). Međutim, otkriće da je regulacija aktivnosti miozina-II u glatkim mišićnim i ne-mišićnim ćelijama vezana za reverzibilni fosforilacioni mehanizam, otvorilo je kompletno novo polje istraživanja. Osim uloge u kontrakciji, koja je zahvaljujući studijama skeletnih mišića jedno od najbolje opisanih ćelijskih pokretanja, miozin ima veoma značajnu ulogu u ćelijskom skeletu (111). Mišićno tkivo predstavlja stabilan, relativno jednostavan primer citoskeleta, za razliku od ne-mišićnih ćelija u kojima je ovo izuzetno dinamična struktura uključena u raznovrsne funkcije. Još uvek se sa sigurnošću ne znaju svi molekularni mehanizmi regulacije miozina-II u ne-mišićnim ćelijama i ovaj rad predstavlja pokušaj da se rasvetle pojedini detalji tih veoma složenih procesa.

U ovoj tezi su prikazani rezultati istraživanja uticaja hiperfosforilacije lakih lanaca miozina (LLM) na kontraktilnost 3T3 fibroblasta i MDCK epitelijalnih ćelija. Pokazano je da eksprimiranje katalitičkog domena kinaze lakog lanca miozina (tMK) dovodi do povećanja u nivou fosforilacije LLM od: ~ 5.7 puta u 3T3-tMK ćelijama, i ~ 3.1 puta u MDCK-tMK ćelijama, što prouzrokuje signifikantno povećanje čvrstoće citoskeleta tMK ćelija.

tMK fibroblasti su korišćeni za studiranje regulacije miozina u toku generisanja sile, a tMK epitelijalne ćelije za analizu transepitelijalnog otpora.

I dok su rezultati na epitelijalnim ćelijama potvrdili pretpostavku da povećanje fosforilacije LLM dovodi do povećanja kontrakcije akto-miozinskog prstena, dakle u saglasnosti su sa relativno dobro uspostavljenom ulogom LLM u regulaciji kontrakcije glatkih mišićnih ćelija, eksperimenti na fibroblastima su pokazali da u ovom eksperimentalnom sistemu te korelacije nema. Moguće je da je detektovana razlika u regulaciji kontrakcije vezana za činjenicu da je u epitelijalnim ćelijama akto-miozinski prsten relativno stabilna struktura, za razliku od fibroblasta u kojima su kompleksi aktina i miozina u mnogo dinamičnijem rearanžmanu. Iz tog razloga fibroblasti možda imaju kompleksniju regulaciju generisanja sile, u koju su uključeni još neki mehanizmi nezavisni od fosforilacije LLM.

## **6.1 Aktivnost kinaze lakog lanca miozina**

Kinaza lakog lanca miozina je enzim koji ima ključnu ulogu u regulaciji kontrakcije glatkih mišićnih i ne-mišićnih ćelija. Ovaj enzim pripada grupi kalcijum-kalmodulin zavisnih protein kinaza i karakterističan je po tome što katalizuje fosforilaciju samo lakih lanaca miozina, nasuprot većine protein kinaza, koje fosforilišu više supstrata (89). Iako je detaljno studiran, struktura i mehanizam funkcionisanja ovog enzima još uvek su predmet intenzivnih istraživanja. Pretpostavlja se da se u okviru regulatornog domena kinaze LLM nalazi pseudosupstratni, inhibitorski region, koji je savijen ka katalitičkom domenu enzima, pri čemu se kreira sterični blok i sprečava pristup supstratu. Vezivanje kalcijum-kalmodulina za region koji se preklapa sa inhibitorskim domenom



najverovatnije indukuje konformacione promene koje otklanjaju pseudosupstrat sa aktivnog mesta i aktiviraju enzim (90). Intenzivnim mutagenetskim studijama kreirane su različite deletirane i substituirane forme enzima na osnovu čijih aktivnosti se pokušavaju da definišu sve sekvence i regioni uključeni u regulaciju ovog enzima (91). Međutim, specifičan pristup za ispitivanje uloge ovog enzima u kontrakciji glatkih mišićnih i ne-mišićnih ćelija obezbedila je činjenica da u toku preparativne procedure najčešće dolazi do proteolize ovog enzima, što dovodi do otklanjanja kalcijum-kalmodulin zavisnog domena (10). Na taj način je otkrivena konstitutivno aktivna forma enzima, koja zadržava specifičnost za svoj supstrat. Nešto kasnije je otkriveno da kontrolisana digestija kinaze LLM tripsinom generiše 61 kD fragment, koji je takodje konstitutivno aktivan, nezavistan od kalcijum-kalmodulina (28).

Početna ispitivanja uloge fosforilacije LLM u fiziološkim procesima kontrakcije glatkih mišićnih i ne-mišićnih ćelija bila su bazirana na korišćenju ili kompletnog enzima ili proteolitički kreiranog, katalitički aktivnog domena kinaze LLM. Ovim istraživanjima su bili obuhvaćeni veliki broj različitih glatkih mišića (92,93) i ne-mišićnih ćelija (60,63), kojima je potvrđena uloga kinaze LLM u regulaciji kontrakcije ovih ćelija. Biće navedena samo jedna grupa eksperimenata, uradjena u laboratoriji dr de Lanerolle-a, kojima je pokazano da elektroinjeciranje kalcijum-kalmodulin nezavisne forme enzima u makrofage prouzrokuje povećanje od ~2 puta u nivou fosforilacije LLM u odnosu na kontrolne ćelije, što zatim dovodi do smanjenja od 50% u broju ćelija koje migriraju ka hemoatraktantu (61). Navedeni pristup izučavanju uloge kinaze LLM u regulaciji aktivnosti miozina i njegovoj ulozi u fiziološkim procesima ne-mišićnih ćelija, predstavlja osnovu od koje se pošlo prilikom postavljanja eksperimenata opisanih u ovoj

tezi. Osnovna razlika je što je za ova istraživanja korišćen mutiran gen za kinazu LLM (tMK). Studiranje ćelija u koje je retrovirusnim vektorima uveden gen za tMK, tj. u kojima se konstitutivno eksprimira katalitički domen kinaze LLM, predstavlja značajnu prednost u odnosu na injeciranje proteina u ćelije. Novi pristup je omogućio rad sa selektovanom, homogenom populacijom ćelija koje ekspimiraju tMK i koje se mogu jednostavno gajiti i tretirati u kulturi.

Kada se govori o aktivnosti kinaze LLM i pristupima za izučavanje regulacije miozina, važno je napomenuti da nivo fosforilacije lakih lanaca miozina predstavlja balans između aktivnosti kinaze LLM i fosfataza. Prema tome, manipulacije koje utiču na ovaj balans predstavljaju pristup za izučavanje regulacije miozina (68). U literaturi su dakle, osim opisanih istraživanja u kojima je aktivnost kinaze LLM u ćelijama bila povećana, prikazane i studije u kojima su praćene fiziološke promene nastale usled smanjene aktivnosti ovog enzima. Na primer, pokazano je da elektroinjeciranje antitela na kinazu LLM u makrofage dovodi do smanjenja fosforilacije LLM (0.68 puta u odnosu na netretirane ćelije), što značajno inhibira ćelijsku migraciju (61). Takođe, dodavanje istih antitela u permeabilizovane mišje fibroblaste inhibira kontrakciju lamelipodija (62).

Iako je nekoliko fosfataza izolovano iz glatkih mišićnih ćelija (94), identitet fosfataze odgovorne za defosforilaciju miozinskih lakih lanaca *in vivo* još uvek nije ustanovljen. Pošto za aktivnost većine serin/treonin fosfataza nije neophodna striktna struktura supstrata, postoji mogućnost da nekoliko fosfataza mogu da budu uključene u defosforilaciju LLM (95). Najnovija istraživanja iz oblasti signalne transdukcije ukazuju na moguću ulogu G proteina u regulaciji aktivnosti fosfataze(a) LLM (detalji će biti opisani kasnije).

## 6.2 Aktivnost tMK u 3T3 i MDCK ćelijama

U Rezultatima ovog rada pokazano je da je enzim tMK aktivan kada se eksprimira u 3T3 i MDCK ćelijama. Naime, analiza imunoprecipitiranih proteina iz ćelija obeleženih sa  $^{32}\text{P}$  pokazala je veću inkorporaciju  $^{32}\text{P}$  u LLM u ćelijama koje ekspimiraju tMK u odnosu na kontrolne ćelije (Slike 5. i 6.).

Kinaza LLM fosforiliše serin 19 LLM, a pri relativno visokim koncentracijama enzima, fosforilisan je i treonon 18, što prouzrokuje povećanje aktinom aktivirane ATP-azne funkcije miozina (24).

Laki lanci miozina mogu biti fosforilisani i enzimom protein kinaza C (PKC), na mestima: serin 1 i/ili 2 i/ili treonin 9 (96).

Ova fosforilacija ima suprotan efekat od fosforilacije serina 19 i treonina 18, tj. dolazi do inhibiranja aktinom-aktivirane ATP-azne funkcije miozina i do redukovanja stabilnosti miozinskih filamenata (97). Da bi potvrdili da je tMK enzim odgovoran za detektovano povećanje nivoa fosforilacije LLM u tMK ćelijama neophodno je bilo uraditi fosfopeptidnu analizu lakih lanaca miozina iz 3T3-tMK i MDCK-tMK ćelija. Jednodimenzionalno fosfopeptidno mapiranje je korišćeno za analizu tripsinom digeriranih fosforilisanih LLM. Kao što je pokazano na Slici 8., detektovano je prisustvo jednog fosfopeptida izoelektrične tačke 4.5. Fosfopeptidi LLM fosforilisanih enzimom PKC imaju izoelektrične tačke 7, 3 i 2.5 (95). Ovom analizom je potvrđeno da novosintetisani tMK enzim specifično fosforiliše lake lance miozina u opisanim ćelijama.

### 6.3 Čvrstoća citoskeleta tMK ćelija

Jedna od hipoteza koja je postavljena na početku ovih istraživanja, bila je da će hiperfosforilacija lakih lanaca miozina u tMK ćelijama prouzrokovati organizovanje miozina u filamente, koji će zatim uspostaviti kontakt sa aktinskim filamentima. Novoformirani akto-miozinski kompleksi u kortikalnom citoskeletu će dovesti do povećanja čvrstoće ćelijskog skeleta.

Ćelijska deformabilnost je esencijalna za pravilno funkcionisanje velikog broja ne-mišićnih ćelija. Zbog toga su izuzetno važna istraživanja koja su fokusirana na problem kako ćelije brzo i reverzibilno menjaju oblik bez fragmentisanja. Strukturna osnova čvrstine ćelijskog skeleta još uvek nije potpuno razjašnjena. Razlog leži u činjenici da je izučavanje citoskeletnih proteina otežano zbog toga što oni imaju strukturne i mehaničke funkcije koje je mnogo teže pratiti i kvantifikovati, i *in vitro* i *in vivo*, nego npr. katalitičke aktivnosti enzima (19). Pretpostavlja se da samo kortikalni aktinski filamenti nisu dovoljni za obavljanje ovih složenih procesa, a uloga miozina-II u njima, još uvek nije kompletno rasvetljena.

Citi, S. i koautori (98) su pokazali da se purifikovani skeletni i timusni (ne-mišićni) miozini mogu *in vitro* organizovati u hibridne filamente. Stabilnost hetero- i homopolimera (ne-mišićni/skeletni miozini i fosforilisani/nefosforilisani ne-mišićni miozini) u prisustvu ATP-a je određivano sedimentacionim, imunohemijskim tehnikama i elektronskom mikroskopijom. Pokazano je da se filamentozni, nefosforilisani ne-mišićni miozini uz dodatak ATP-a rastavljaju (disassembly) istom brzinom bez obzira da li je miozin u homo- ili heteropolimerima. Međutim, prisustvo proporcionalno malog broja fosforilisanog ne-mišićnog miozina u homopolimerima bilo je dovoljno da spreči

rastavljanje ne-mišićnih miozinskih filamenata. Pokazano je dakle, da fosforilisanje lakih lanaca ne-mišićnih miozina kooperativno stabilizuje ne-mišićne miozinske filamente, kao i to da skeletni miozin nema stabilizujući efekat na hibridne miozinske filamente. Na osnovu analize ovih, i miozina izolovanih iz velikog broja drugih ne-mišićnih ćelija (22,26,64,65,66), zaključeno je da *in vitro* formiranje i rastavljanje ne-mišićnih miozinskih filamenata predstavlja dinamički ekvilibrijum između monomera i polimera, koji je regulisan fosforilacijom LLM.

Fenomen formiranja miozinskih filamenata usled povećanja fosforilacije LLM opisan je i *in vivo*. Reorganizacija akto-miozinskog citoskeleta je praćena u toku mitoze NRK ćelija (normal rat kidney) u koje je mikroinjeciran katalitički fragment kinaze LLM (60). Imuno-fluorescentna i video mikroskopska ispitivanja su pokazala da u toku metafaze i anafaze dolazi do formiranja tzv. površinskih mehurova (surface blebs) u čijoj osnovi je zapaženo značajno povećanje aktina i miozina. Takođe, Western blot analizom je pokazano da dolazi do 15% povećanja u zastupljenosti miozina u triton nesolubilnoj (citoskeletnoj) frakciji kod ćelija čiji LLM imaju povećanje fosforilacije od 2 puta (61). Slična redistribucija miozina je zapažena u humanim krvnim pločicama u toku sekretornih procesa. Pokazano je da stimulacija ovih ćelija trombinom prouzrokuje simultano povećanje fosforilacije LLM i asocijacije miozina sa aktinskim filamentima u citoskeletu (99).

Direktnije učešće filamentoznog miozina-II u regulaciji čvrstoće citoskeleta pokazano je eksperimentima na Dictyostelium ćelijama kojima je homologom rekombinacijom eliminisan jedini gen za teški lanac miozina-II (19). Mutirane ćelije imaju značajno smanjenu čvrstoću ćelijskog skeleta (0.28 m<sub>din</sub>/μm) u odnosu na wt

ćelije ( $0.41 \text{ mđin}/\mu\text{m}$ ). Tretiranje ćelija konkavalinom A, koji dovodi do "sakupljanja receptora", prouzrokuje značajno povećanje čvrstoće citoskeleta wt ćelija ( $0.91 \text{ mđin}/\mu\text{m}$ ), a tek neznatno mutiranih ( $0.35 \text{ mđin}/\mu\text{m}$ ). Na osnovu ovih eksperimenata je zaključeno da je čvrstina citoskeleta Dictyostelum ćelija u direktnoj korelaciji sa prisustvom miozina-II.

Rezultati prikazani u ovoj tezi (Slike 5. 6. 8., Tabela 1.) pokazuju da je u 3T3-tMK i MDCK-tMK ćelijama, čiji LLM su hiperfosforilisani, značajno povećana čvrstoća kortikalnog ćelijskog skeleta. Pošto je kinetičkim studijama potvrđeno da je inicijacija filamentozne strukture limitirajući korak u procesu miozinske organizacije (95), zaključeno je da prisustvo konstitutivno aktivne forme kinaze LLM u tMK ćelijama utiče na povećanje broja izduženih miozinskih monomera (6S konformacija), spremnih za formiranje filamenata. Korišćenjem direktne, kvantitativne analize po prvi put je pokazano da je čvrstoća ćelijskog skeleta jednim delom determinisana nivoom fosforilacije lakih lanaca miozina. Ovaj rezultat predstavlja važan doprinos razumevanju uloge miozina-II u strukturno-mehaničkim karakteristikama ne-mišićnih ćelija.

#### **6.4 Kontraktilna svojstva 3T3-tMK ćelija**

Za glatke mišićne i ne-mišićne ćelije je utvrđeno da kontrakcija direktno zavisi od aktivacije miozina. Osnova ove aktivacije leži u fosforilisanju LLM kinazom LLM, pri čemu dolazi do akto-miozinskog kontakta i stimulacije ATP-azne aktivnosti miozina. Pošto je kinaza LLM kalcijum-zavisni enzim, opisani proces se smatra za dominantni mehanizam kojim kalcijum reguliše kontrakciju glatkih mišićnih ćelija. Iako je generalno prihvaćeno da je fosforilacija LLM esencijalna za generisanje sile i za njeno održavanje,

ova korelacija još uvek nije kompletno definisana. Kao što je navedeno u Opštem delu, kontraverzni podaci se odnose na promene u nivou fosforilacije LLM za vreme kontrakcije glatkih mišićnih i ne-mišićnih ćelija.

Michael i Kate Barany (100) su sakupili rezultate iz 14 laboratorija koji su se odnosili na analizu 12 različitih glatkih mišića (prikazano je ukupno 27 pojedinačnih slučajeva), čiji rezultati zajedno ne mogu da daju jasan zaključak kakvo je stanje fosforilacije LLM u toku generisanja sile. Rezultati ove analize mogu grubo da se podele u tri grupe, i biće navedeni samo neki tipični primeri. Važno je napomenuti da je inicijalna fosforilacija LLM determinisana 0.3-3.0 minuta posle stimulusa, a da je u toku održavanja sile fosforilacija LLM određivana u intervalima od 5 ili 10 minuta, pri čemu je dužina trajanja kontrakcije varirala zavisno od eksperimenta (od 10-60 minuta).

Kvantifikovanje nivoa fosforilacije miozina trahealnih glatkih mišića u toku stimulacije metaholinom pokazalo je da postoji linearni odnos između povećanja fosforilacije LLM i generisane tenzije (59,101), tj. detektovano je povećanje fosforilacije LLM uz simultano povećanje izometričke tenzije. Po dodavanju atropina, trahealni glatki mišići se relaksiraju uz paralelno opadanje fosfatnog sadržaja miozina do inicijalne vrednosti (59).

Studije na arterijskim glatkim mišićima (69) i trahealnim glatkim mišićima (102) su pokazale da po stimulaciji mišića fosforilacija LLM dostiže pik na samom početku kontrakcije, pre nego što se razvije maksimalna sila, a zatim opada i stabilizuje se na signifikantno povišenom nivou za sve vreme održavanja sile. Različiti su i podaci o tome koliki je nivo opadanja fosforilacije LLM posle dostignutog pika, od neznatnog, do 30% od inicijalno povišene vrednosti (u proseku 50%) (100). Najveći broj podataka u literaturi

je u skladu sa ovakvom korelacijom fosforilacije LLM i generisanja sile i zbog toga je prihvaćen generalni zaključak da je fosforilacija LLM esencijalna za generisanje sile i njeno održavanje.

Murphy i saradnici (43,44) su iz studija na arterijskim glatkim mišićima pokazali da je povećanje fosforilacije LLM neophodno samo za iniciranje kontrakcije, ali da u toku trajanja kontrakcije, dolazi do opadanja fosforilacije LLM i to na nivo koji je identičan stanju relaksacije (latch model, opisan u Opštem delu).

Što se ne-mišićnih ćelija tiče, broj podataka je znatno manji. Uporedo sa otkrivanjem značaja kontraktilnih procesa u fiziologiji ne-mišićnih ćelija, razvijale su se i tehnike za njihovo studiranje (54,55). Studiranje kontrakcije ćelija u kulturi ima nekoliko prednosti u odnosu na ispitivanje kontrakcije celih tkiva. Korišćenjem ćelija u kulturi mogu preciznije da se kontrolišu eksperimentalni uslovi, moguće je studirati homogenu ćelijsku populaciju, jednostavno je varirati komponente ekstraćelijskog matriksa i u kontinuitetu pratiti stanje citoskeletnih komponenti. Takodje, biohemijske i genetičke manipulacije mogu relativno jednostavno da se primene na ćelijama u kulturi i da se na taj način rasvetle molekularni mehanizmi uključeni u kontrolu mehaničkih funkcija. Medjutim, složenost i delikatnost ovih eksperimenata su svakako razlozi zbog kojih postoji veoma mali broj podataka o stanju fosforilacije LLM u toku generisanja sile u ne-mišićnim ćelijama.

Kolodney i Wysolmerski (54) su uspostavili model sitem za ispitivanje kontraktilnih svojstva ne-mišićnih ćelija u kome je primarna kultura pilećih embrionalnih fibroblasta pomešana sa kolagenom i gajena između dva porozna polietilenska držača. Jedan držač je bio fiksiran, a drugi povezan za tzv. transduktor sile (sličan onome koji je



opisan u delu Materijal i metode). Pokazano je da se po stimulaciji ćelija trombinom može detektovati kontrakcija u ovako opisanom sistemu. Trombin je faktor rasta za ove ćelije, a pošto po njegovom dodavanju u medijum dolazi do rapidnog povećanja intracelularnog kalcijuma, prepostavlja se da je stimulacija kontrakcije vezana za aktiviranje kinaze LLM. Pokazano je da su ove ćelije longitudinalno orijentisane i imaju dobro definisane aktinske filamente koji se prostiru u istom pravcu, paralelno sa ćelijama-ćelija kontaktnim linijama. Ovakva orijentisanost ćelija imitira stanje u glatkim mišićnim ćelijama i obezbeđuje kontrakciju duž jedne ose. Neophodnost intaktnog aktinskog citoskeleta za kontrakciju ovih ćelija pokazana je rapidnim opadanjem generisane sile po dodavanju citohalazina D. Koristeći isti model sistem, pokazano je da u toku izometričke kontrakcije pilećih embrionalnih fibroblasta dolazi do paralelnog povećanja fosforilacije LLM u toku generisanja sile (103). Posle 10' od stimulacije i sila i fosforilacija počinju da opadaju, fosforilacija rapidnije od sile. Posle 20', fosforilacija LLM je opala za 40% od maksimalne vrednosti.

Video-mikroskopske studije na Swiss 3T3 fibroblastima (31), su pokazale da stimulacija ovih ćelija serumom dovodi do kontrakcije stresnih vlakana uz paralelno povećanje nivoa fosforilacije lakih lanaca miozina. Takodje, u istim ćelijama je ispitivana strukturna i hemijska dinamika miozina-II u toku citokineze korišćenjem fluorescentnog analoga miozina-II i fluorescentnog biosenzora za fosforilaciju serina 19 LLM (17). Povećanje fosforilacije LLM je pratilo skraćivanje akto-miozinskih vlakana u deobnoj brazdi.

Nasuprot ovim podacima, studije kontrakcije endotelijalnih ćelija su pokazale da je povećanje fosforilacije LLM detektovano na početku kontrakcije kratkotrajno, tj. da se vraća na bazalni nivo u okviru 5' od početka stimulacije (20).

Navedena istraživanja ukazuju na činjenicu da se o relaciji fosforilacija LLM-kontrakcija u ne-mišićnim ćelijama ne može doneti definitivni zaključak, ali većina rezultata pokazuje, kao i kod glatkih mišićnih ćelija, da je fosforilacija LLM neophodna za generisanje sile. Važno je istaći da ne-mišićne ćelije, za razliku od glatkih mišićnih ćelija, imaju veoma raznovrsne funkcije, što dodatno otežava razumevanje detektovanih razlika u regulaciji miozina u toku kontrakcije.

U ovom radu, ćelijska vlakna napravljena od wt-fibroblasta i od fibroblasta koji eksprimiraju katalitički domen kinaze lakog lanca miozina (tMK), stimulirani su serumom na kontrakciju i analiziran je fosfatni sadržaj njihovih LLM.

Na osnovu većine podataka iz literature o odnosu između fosforilacije lakih lanaca miozina i kontrakcije (25,59,67,103), prepostavili smo da će u toku generisanja sile doći do povećanja fosforilacije LLM. Naime, zna se da stimulisanje ćelija serumom dovodi do aktiviranja inozitol fosfolipidnog signalnog puta, pri čemu dolazi do aktiviranja kalcijumovih kanala u membrani endoplazmatičnog retikuluma i oslobađanja kalcijuma u citoplazmu (104). Po formiranju kalcijum-kalmodulinskog kompleksa dolazi do aktiviranja kinaze LLM. Ovo je proces koji smo očekivali da će se desiti i u wt i u tMK ćelijama, tj. da će na ovaj način doći do aktiviranja endogene kinaze LLM, što će rezultovati u povećanju fosforilacije LLM u obe ćelijske linije. Osim toga, iako ne apsolutno potvrđen, postavljen je još jedan model signalnog puta koji se dešava istovremeno sa već opisanim i može takođe da utiče na povećanje fosforilacije LLM

prilikom stimulisanja ćelija serumom. U Swiss 3T3 fibroblastima je pokazano da po dodatku lizofosfatne kiseline (LPA, jedna od komponenti seruma) dolazi do aktivacije Rho GTP-aza, što kao krajnji efekat ima formiranje stresnih vlakana. Pretpostavlja se da ekstracelularni faktori, kao što je LPA, aktiviraju Rho, koji se zatim vezuje za Rho kinazu i aktivira je. Aktivirana Rho kinaza fosforiliše fosfatazu lakog lanca miozina i inaktivira je, što rezultira u akumulaciji fosforilisane forme LLM. Ovo povećanje fosforilacije LLM, povećava vezivanje akto-miozinskih filamenata i dovodi do formiranja stresnih vlakana, koja mogu da se kontrahuju (105,106). Takođe, pokazano je da Rho-stimulisana kontrakcija fibroblasta može da bude blokirana inhibitorom kinaze LLM, što rezultuje u smanjenju fosforilacije LLM i gubitku stresnih vlakana (107).

Na osnovu svega navedenog, očekivali smo da će se prilikom stimulacije ćelija serumom generisati sila uz povećanje fosforilacije LLM. Međutim, ono što je iznenadjuće u rezultatima prikazanim u ovoj tezi je da nema te korelacije između kontraktilnih parametara i fosforilacije lakih lanaca miozina. Rezultati prikazani na Sl.13. pokazuju da prilikom stimulacije serumom, u uslovima u kojima se generiše sila za kontrakciju (Sl.10. i 11.); ne dolazi do povećanja fosforilacije lakih lanaca miozina, ni u wt-vlaknima, ni u tMK ćelijama. Važno je istaći da su korišćene eksperimentalne procedure obezbedjivale inhibiciju defosforilacije LLM od momenta lize ćelija. Naime, pokazano je da kombinacija molibdata i pirofosfata u ekstrakcionom puferu, inhibira defosforilaciju LLM trahealnih glatkih mišića, katalizovanu fosfoprotein fosfatazama (59). Ono što je takođe iznenadjuće u rezultatima ovih istraživanja je da povećani nivo fosforilacije lakih lanaca miozina u tMK ćelijama nema uticaja na kontraktilna svojstva.

Naime, i wt- i tMK- ćelijska vlakna se kontrahuju i relaksiraju istom brzinom (Slika 11.), i generišu podjednaku silu kao odgovor na stimulaciju serumom (Tabela 2.).

Jedno od mogućih objašnjenja je da po stimulisaniu ćelija serumom dolazi do rapidnog povećanja fosforilacije LLM, koja dostiže maksimalnu vrednost podjednaku u obe ćelijske linije, što obezbeđuje inicijaciju kontrakcije po latch modelu i rezultira u istim kontraktilnim karakteristikama wt i tMK ćelijskih vlakana. Dakle, inicijalno povećana fosforilacija LLM se brzo vraća na bazalni nivo usled dejstva ili nekih fosfataza koje Rho kinaza ne inhibira, ili pre nego što su inaktivisane fosfataze LLM, tako da su u prvom momentu koji smo mi analizirali (5') već detektovani procesi defosforilacije LLM. Po ovom modelu, povećani nivo fosforilacije LLM u tMK ćelijama ne mora da ima uticaja na kontraktilne karakteristike vlakana napravljenih od ovih ćelija.

Medjutim, pitanje zašto povećanje fosforilacije LLM u tMK ćelijama ne dovodi do povećanog bazalnog nivoa sile koji ćelije generišu pre stimulisania serumom ostaje otvoreno. Konstitutivno aktivna kinaza LLM je u tMK ćelijama uticala na formiranje miozinskih filamenata, koji su značajno povećali čvrstinu ćelijskog skeleta, ali se ovaj efekat nije preneo na celo ćelijsko vlakno. Na osnovu iznetih podataka za glatke mišićne ćelije, očekivali smo da će povećana fosforilacija LLM u tMK ćelijama uticati na povećanje akto-miozinske interakcije i dovesti do povećanja mehaničkih karakteristika ćelijskih vlakana. U prilog ovoj pretpostavci išao je i rezultat da je po dodavanju citohalazina D u medijum sa vlaknima došlo do gubitka sile (Slika 11.), što je ukazalo da je aktinski citoskelet bio uključen u generisanje sile u opisanom sistemu.

Da bi se sagledala kompleksnost ovog problema, važno je istaći nekoliko razlika između mišićnih i ne-mišićnih ćelija. Najpre, po nivou organizovanosti akto-miozinskih

filamenata glatke mišićne ćelije se nalaze između poprečno-prugastih mišićnih i ne-mišićnih ćelija. U njima nema fiksirane sarkomerne organizacije, ali je i u relaksiranim glatkim mišićnim ćelijama (kada LLM nisu fosforilisani) detektovano prisustvo miozinskih filamenata (26). Pretpostavlja se da visoka koncentracije miozina u glatkim mišićnim ćelijama prelazi kritičnu koncentraciju za organizovanje u filamente, čak i kada je miozin u defosforilisanom stanju (95). Fosforilacija LLM najverovatnije dovodi do promene u fleksibilnosti miozinskih molekula u okviru filamenata, što obezbeđuje kontakt sa aktinskim filamentima i otpočinjanje kontrakcije (26). U ne-mišićnim ćelijama, gde je miozinska koncentracija niža, organizovanje i rastajanje miozinskih filamenata je mnogo dinamičnije. Pretpostavlja se da savijanje miozina u kompaktnu formu (10S konformacija) ubrzava njegov transport ka intracelularnom mestu gde je neophodan, a zatim fosforilacija LLM indukuje formiranje filamenata, koji u kombinaciji sa aktinskim filamentima generišu silu. Osim toga, nasuprot glatkim mišićnim ćelijama, koje su specijalizovane za kontrakciju duž jedne ose (uniaxial contraction), fibroblasti imaju mnogo raznovrsniji opseg mehaničkih funkcija. U toku ovih procesa, ne samo da se kontrahuju različiti delovi ćelija u različitim pravcima, već ove ćelije mnogo češće povećavaju svoju površinu nego što je smanjuju (npr. u toku migracije ili prilikom kontakta sa podlogom), posle čega sledi kontrakcija drugih delova ćelije (108,109). Pošto je kontraktilni dijapazon fibroblasta mnogo širi nego glatkih mišićnih ćelija, ne bi bilo iznenadjujuće da su molekularni mehanizmi uključeni u regulaciju kontraktilnih odgovora fibroblasta kompleksniji od glatkih mišićnih ćelija. To može da znači da je generisanje sile u fibroblastima regulisano i nekim drugim mehanizmima koji su ili nezavisni od fosforilacije LLM ili deluju zajedno sa fosforilacijom LLM. Osim toga, sile

koje se proizvode u toku ovih procesa, možda uključuju i aktivnost nekih drugih miozinskih - motornih proteina, čije funkcionisanje tek treba da se definiše.

## 6.5 Epitelijalne ćelije

Barijerna funkcija je jedna od osnovnih fizioloških funkcija epitelijuma. Čvrste veze epitelijalnih monolejera su primarne strukture odgovorne za kontrolisanje protoka kroz paraćelijske prostore (21). To su dinamične strukture koje su pod uticajem različitih ekstra- i intracelularnih faktora (112). Pretpostavlja se da kontraktilno stanje aktomiozinskog prstena, koji se nalazi neposredno ispod ovih struktura, ima uticaja na paraćelijsku permeabilnost (42, 113), međutim biohemijski mehanizmi koji regulišu ove procese još uvek nisu kompletno okarakterisani.

Na osnovu studiranja MDCK epitelijalnih ćelija prikazanih u ovoj tezi, zaključeno je da postoji korelacija između fosforilacije LLM i regulacije paraćelijskog protoka. Pokazano je da eksprimiranje konstitutivno aktivne forme kinaze LLM (tMK) u ovim ćelijama rezultira u hiperfosforilaciji LLM, što dovodi do značajnog smanjenja barijerne funkcije ovih ćelija. Ovim rezultatima je potvrđena pretpostavka da je fosforilacija LLM, usled aktivnosti kinaze LLM, uključena u regulaciju propustljivosti čvrstih veza MDCK ćelija. Pretpostavljeni mehanizam je da usled hiperfosforilacije LLM u MDCK-tMK ćelijama dolazi do povećanja kontrakcije aktomiozinskog prstena, što se prenosi na lateralne ćelijske membrane i dovodi do povećanja paraćelijske propustljivosti. Kao što je to istaknuto u prethodnom delu Diskusije, ova pretpostavka je bazirana na podacima o ulozi fosforilacije LLM u kontrakciji glatkih mišićnih ćelija. Činjenica da je u MDCK-tMK ćelijama detektovana ista funkcionalna korelacija, verovatno ima veze sa strukturno-organizacionom sličnošću kontraktilnog aparata u ovim ćelijama. Naime, aktomiozinska struktura je i kod glatkih mišićnih i kod epitelijalnih ćelija relativno stabilna, tj. ne podleže dinamičnom, kontinuiranom organizovanju i rastavljanju, koje je opisano za

fibroblastne ćelije. To je možda razlog zbog koga je regulacija aktivnosti miozina u toku kontrakcije u ne-mišićnim, MDCK, ćelijama sličnija glatkim mišićima nego fibroblastima.

### **6.5.1 Citoskelet i transepitelijalna permeabilnost**

Kao što je već rečeno, protok materija između epitelijalnih ćelija regulisan je u najvećoj meri čvrstim vezama. Rezultati nekoliko studija pokazuju da prsten citoskeletnih proteina (adhezioni kaiš), koji se nalazi neposredno ispod čvrstih veza, ima direktnu ulogu u ovim procesima (21,42).

Elektronska mikroskopija intestinalnih epitelijalnih ćelija, kojima su solubilni citoplazmatski proteini otklonjeni tretiranjem deterdžentima, pokazala je da se aktinski mikrofilamenti iz adhezionog kaiša prostiru do čvrstih veza (81). Aktinski filamenti su detektovani intimno asocirani sa delovima čvrstih veza na kojima su lateralne membrane fuzionisane i koji su odgovorni za barijernu funkciju. Na osnovu ovih anatomskih studija pretpostavljeno je da asocijacija filamenata iz adhezionog kaiša sa čvrstim vezama, može da pretstavlja strukturnu osnovu za citoskeletnu kontrolu propustljivosti čvrstih veza (81). Takodje, pokazano je da tretiranje MDCK ćelijskih monolejera citohalazinom B (sprečava polimerizaciju aktina), dovodi do postepene dezintegracije mikrofilamentnog prstena uz istovremeno opadanje električnog otpora (42, 114). Isti rezultati su dobijeni eksperimentima na epitelijalnim ćelijama zučne kese (70) i intestinalnim ćelijama tretiranih citohalazinom D (71). Nasuprot tome, tretiranje MDCK ćelija kolhicinom, koji depolimerizuje mikrotubule, nema nikakvog efekta na električni otpor ovih ćelija (72).



Ovi rezultati su nedvosmisleno pokazali da je aktinski citoskelet neophodan za održavanje transepitelijalnog otpora.

Uloga miozina u strukturnom integritetu i stabilnosti akto-miozinskog prstena epitelijalnih ćelija pokazana je mikroinjiciranjem anti-miozinskih antitela u ćelije bubrega u kulturi (115). Po dodavanju antitela, u ćelijama nije mogao da se formira normalan adhezioni kaiš, što je dovelo do nastajanja ćelija sa promenjenim oblikom i defektnim epiteloidnim monolejerima.

Pitelka i saradnici (75) su pokazali da mehanički aplicirana lateralna tenzija može da indukuje promene u strukturi čvrstih veza mišjih epitelijalnih ćelija mlečnih žlezda. Ćelije su gajene na kolagenskim gelovima koji su bili podvrgnuti kontrolisanoj promeni tenzije. Morfološke promene čvrstih veza su praćene elektronskim mikroskopom. Pokazano je da dolazi do zaravnjavanja ćelijske membrane u ovim regionima i koordinativnog razdvajanja susednih ćelija kada je tenzija bila aplicirana u nivou adhezionog kaiša. Ovi rezultati su sugerisali da je kontrolisanje tenzije u okviru akto-miozinskog prstena jedan od načina kako epitelijalne ćelije mogu da regulišu propustljivost čvrstih veza.

Studije perfuzije izolovanih segmenata intestinuma su pokazale da prisustvo glukoze ili aminokiselina u rastvoru za perfuziju indukuje velike dilatacije u okviru čvrstih veza. Ove strukturne promene su bile povezane sa kondenzacijom mikrofilamenata u predelu akto-miozinskog prstena (113). Pošto su detektovane promene bile praćene padom transepitelijalnog električnog otpora, pretpostavljeno je da je usled kontrakcije akto-miozinskog prstena došlo do otvaranja čvrstih veza što je uslovalo povećanje paraćelijskog protoka. Ostalo je otvoreno pitanje kako transport glukoze i

aminokiselina aktivira kontrakciju akto-miozinskog prstena. Zna se da je natrijum ko-transporter ovih materija, pa prilikom ovog transporta može da dodje do aktiviranja ATP-aze asocirane sa natrijumovom pumpom, međutim ne zna se kako bi taj proces mogao da utiče na fosforilaciju kontraktilnih proteina (LLM) (113).

Luminalna površina intestinalnih epitelijalnih ćelija je visoko specijalizovana za apsorbciju. Ovaj region se naziva "brush border", jer se sastoji od velikog broja mikrovila i zbog toga izgleda kao četka (73). Takvi produžetci ćelijske membrane sadrže u sebi snopove polarizovanih aktinskih filamenata, koji su duž mikrovila u kontaktu sa različitim proteinima, a njihovi početci iz citoplazme ("koreni") se nalaze uz akto-miozinski prsten u okviru zonula-e adherens (ZA). U cilju ispitivanja mehanizma pokretanja mikrovila, razvijene su tehnike za izolovanje ovih struktura. Dobro očuvane "brush borders" strukture se sastoje od 10-25 apikalnih delova ćelija, koje su još uvek povezane interćelijskim vezama (74). Eksperimenti na takvim odvojenim, apikalnim delovima ćelija, koje sadrže intaktni akto-miozinski prsten, pokazali su da dodavanje kalcijuma i ATP-a dovodi do kontrakcije akto-miozinskog prstena (45). Naime, ove strukture su fiksirane 1, 3, 5 i 10 minuta po dodavanju kalcijuma i ATP-a i analizirane svetlosnom i elektronskom mikroskopijom. Pokazana je aktivna i dramatična kontrakcija u nivou ZA, koja je dovela do potpunog razdvajanja lateralnih membrana u nivou čvrstih veza (zonula occludens, ZO). Takodje, uradjena je analiza fosforilisanih proteina posle *in situ* fosforilacije ovih struktura, pod istim uslovima pri kojima je detektovana kontrakcija. Pokazana je direktna korelacija izmedju povećanja fosforilacije LLM i dinamike skraćivanja adhezionog kaiša. Takodje, oba procesa su inhibirana trifluoperazinom, inhibitorom kalmodulinske aktivnosti, pa je zaključeno da kalcijum reguliše *in vitro*

kontrakciju citoskeletnog prstena, stimulišući kalmodulin zavistnu kinazu LLM. Ovom zaključku doprinela je i činjenica da izolovane "brush border" citostrukture sadrže sve proteine kontraktilne mašinerije, najverovatnije asocirane za akto-miozinski prsten. Detektovana kontrakcija nije imala uticaja na aktivno pokretanje mikrovila, ali je ukazala na druge moguće uloge miozina u epitelijalnim ćelijama. Pretpostavljeno je da, kada je fosforilacija LLM na bazalnom nivou, akto-miozinski prsten obezbeđuje strukturnu potporu mikrovila. Već je diskutovano postojanje miozinskih filamenata u relaksiranim glatkim mišićima, kada je nivo fosforilacije LLM nizak (116), pa se pretpostavlja da je to slučaj i u ovoj citoskeletnoj strukturi epitelijalnih ćelija. Druga uloga miozina u adhezionom kaišu bila bi kontraktilna, po povećanju fosforilacije LLM. Slični rezultati kontrakcije akto-miozinskog prstena su dobijeni na istim ćelijama, ali na izolovanim koherentnim monolejerima. Ćelije su permeabilizovane glicerolom i egzogeno dodat ATP je prouzrokovao kontrahovanje u nivou ZA (117).

Veza između povećanja fosforilacije LLM i propustljivosti čvrstih veza pokazana je na hepatocitima pacova (118). Ćelije su tretirane vazopresinom, za koji je ranije pokazano da utiče na povećanje permeabiliteta čvrstih veza (119), i praćen je fosfatni sadržaj LLM imunoprecipitacijom miozina. Pokazano je da u tretiranim ćelijama dolazi do značajnog povećanja fosforilacije LLM (3 puta u odnosu na kontrolu), koje je bilo u skladu sa povećanjem permeabiliteta ovih monolejera. Naime, detektovano je podudaranje doza-zavistne krive fosforilacije LLM i propustljivosti čvrstih veza u odnosu na koncentraciju apliciranog vazopresina. Takođe, korišćenjem fluorescentnog indikatora (fura-2), pokazano je da dolazi do simultanog povećanja intracelularne koncentracije  $Ca^{2+}$  po dodavanju vazopresina (preko inozitol fosfolipidnog signalnog puta (104)).

Pretpostavljeno je da je aktiviranje kinaze LLM kalcijum-kalmodulinom, mehanizam koji je doveo do akto-miozinske kontrakcije i povećanja permeabiliteta ovih ćelijskih monolejera.

Svi navedeni rezultati ukazuju na ulogu akto-miozinskog prstena u fiziološkoj regulaciji paraćelijskog permeabiliteta t.j. da ova funkcija epitelijalnih ćelija može biti modulirana promenama u citoskeletu.

Na osnovu rezultata prikazanih u ovoj tezi zaključeno je takodje, da postoji odnos između fosforilacije lakih lanaca miozina i regulacije paraćelijske propustljivosti. Naime, pokazano je da MDCK-tMK ćelije, koje eksprimiraju gen za katalitički domen kinaze lakog lanca miozina, imaju hiperfosforilisane LLM (Slika 6.), i da monolejeri MDCK-tMK ćelija imaju značajno smanjen transepitelijalni otpor (Slika 14.). U ovom radu je takodje pokazano da eksprimiranje tMK dovodi do signifikantnog povećanja čvrstoće kortikalnog citoskeleta MDCK-tMK ćelija. Uloga miozina i značaj njegove regulacije u ovoj mehaničkoj karakteristici ne-mišićnih ćelija je već diskutovana. Međutim, za epitelijalne ćelije kortikalni citoskelet je veoma važan ne samo za održavanje njihovog oblika i polarizovanosti, već i za uspostavljanje intercelularnih kontakata odgovornih za tkivnu arhitekturu. Zbog toga je podatak da stanje fosforilacije LLM utiče na čvrstinu citoskeleta MDCK ćelija izuzetno značajan i predstavlja doprinos razumevanju uloge miozina-II u ovim ćelijama. Generalizovana kontrakcija kortikalnog citoskeleta MDCK-tMK ćelija može takodje da doprinese paraćelijskoj provodljivosti, ili povećanjem propustljivosti čvrstih veza ili povećanjem širine lateralnih prostora, ili verovatno na oba načina zajedno. Kontrakcija kortikalnog citoskeleta najverovatnije povećava dimenzije lateralnih prostora, tako što dalje odvaja lateralne membrane susednih ćelija, što bi moglo

da doprinese smanjenju otpora. Međutim, pokazano je da su interćelijski lateralni prostori kod MDCK monolejera relativno široki (200-600 nm) i da neznatno utiču na visoki transepitelijalni otpor koji ove ćelije razvijaju u kulturi (41). Prema tome, zaključeno je da je povećana permeabilnost MDCK-tMK ćelija u najvećoj meri prouzrokovana povećanjem propustljivosti čvrstih veza, usled povećane kontrakcije aktomiozinskog prstena lokalizovanog neposredno ispod ovih struktura.

U laboratoriji dr. de Lanerolle-a uradjena je druga grupa eksperimenata na MDCK ćelijama, čiji rezultati pokazuju da ekspimiranje lakih lanaca miozina koji su mutirani tako da kinaza LLM ne može da ih fosforiliše, takodje dovodi do povećanja paraćelijskog permeabiliteta (79). Naime, u gen za LLM pacova su na poziciji treonina 18 i serina 19, uvedeni alanini. Mutirani i wt geni za LLM su takodje na 3' kraju imali c-myc DNK fragment koji je kodirao aminokiselinski epitop, u cilju identifikovanja ekspresije ovih proteina u MDCK ćelijama. Mnogobrojne studije su pokazale da LLM mogu skoro kompletno da budu zamenjeni egzogeno dodatim lakim lancima (95), što je korišćenjem anti-myc antitela i Western blot analizom i ovim studijama potvrđeno. Transepitelijalni električni otpor MDCK ćelija koje su ekspimirale mutirane LLM bio je signifikantno smanjen. Mada je mnogo teže da se vizualizuje kako smanjenje fosforilacije lakih lanaca miozina i smanjenje kontraktalnog stanja citoskeleta dovodi do identičnih fizioloških promena kao i povećanje istih, ovi rezultati su u saglasnosti sa nekim prethodnim observacijama. Već je pomenuto da tretiranje MDCK ćelija citohalazinima dovodi do smanjenja transepitelijalnog otpora (42,114), što ukazuje da je jedan nivo aktinskih filamenata neophodan za održavanje integriteta barijerne funkcije i da smanjenje aktinskih filamenata ispod tog nivoa, dovodi do povećanja paraćelijskog permeabiliteta.

Slično, bazalni nivo fosforilacije lakih lanaca miozina utiče na postojanje miozinskih filamenata, pa kompletno eliminisanje fosforilacije LLM može da dovede do razilaženja miozinskih filamenata i smanjenja barijerne funkcije.

Opisana uloga miozina u propustljivosti čvrstih veza, ne isključuje druge mehanizme koji regulišu paraćelijsku provodljivost.

Imunofluorescentnom mikroskopijm hepatocita, epidermalnih keratinocita pacova i MDBK ( B-bovine) ćelija pokazano je povećano prisustvo tirozin kinaza src familije (c-yes, c-src) u predelu ćelija-ćelija kontakata u nivou ZA (78). Takodje, identifikovane su izoforme G proteina i protein kinaze C (PKC) u nivou ZO kod MDCK i epitelijalnih ćelija humanog adenokarcinoma kolona (Caco-2), što ukazuje na potencijalne mehanizme lokalne regulacije funkcije čvrstih veza (120).

Osim toga, veliki broj studija je pokazao da ekstracelularni kalcijum može da moduliše postojanje čvrstih veza (72). Otklanjanje ekstracelularnih kalcijumovih jona helatnim agensima ili kada se kultura epitelijalnih ćelija prebaci iz medijuma sa normalnom koncentracijom kalcijuma (1-2mM) u medijum sa niskom koncentracijom (<50µM), ćelija-ćelija kontakti u nivou čvrstih veza nestaju i transepitelijalni otpor dramatično opada (77). Otklanjanje ekstracelularnog kalcijuma (tzv. Ca<sup>2+</sup> "switch" model) je izuzetno pogodan eksperimentalni model za ispitivanje dinamike ćelijske interakcije i signalne transdukcije. Ova istraživanja su pokazala da je akto-miozinski prsten preko kompleksa adapternih proteina, u kontaktu sa E-kadherinom, integralnim membranskim proteinom koji uspostavlja kalcijum zavistni ćelija-ćelija kontakt (121). Pokazano je da posle otklanjanja Ca<sup>2+</sup>, istovremeno sa gubitkom transepitelijalnog otpora, dolazi do redistribucije kadherina, adapternih proteina (katenini, vinkulin, alfa- aktinin) i

proteina čvrstih veza (ZO-1 i cingulin) sa površine ćelija, u intracelularne granule (77,122). Reverzibilnost ovih procesa potvrđena je imunofluorescentnom i elektronskom mikroskopijom i imunoprecipitacijom. Naime, po dodavanju kalcijuma dolazi do komigriranja veznih proteina iz citosola na ćelijsku površinu i formiranja ćelijskih kontakata. Otklanjanje seruma iz medijuma ili preinkubiranje ćelija sa cikloheksimidom nisu imali uticaja na ove događaje (77). Međutim, gubitak ćelija-ćelija kontakata, opadanje transepitelijalnog otpora i redistribucija veznih proteina, kada su ćelije gajene u medijumu sa niskom koncentracijom  $Ca^{2+}$ , bili su inhibirani pretretiranjem ćelija protein kinaznim inhibitorima (H-7 -kinazni, staurosporin -PKC, forskolin -PKA inhibitor) (77,123). Ovi rezultati sugerišu da otklanjanje  $Ca^{2+}$  deluje na sve tipove veza zajedničkim mehanizmom, koji najverovatnije uključuje fosforilaciju jednog ili više veznih proteina. Po najjednostavnijem pretpostavljenom modelu, kalcijum služi kao most preko koga kadherini svojim ekstracelularnim domenima povezuju susedne ćelije, a preko svojih citoplazmatskih delova direktno ili indirektno intereaguju sa protein kinazama. Otklanjanje kalcijuma sa ekstracelularnog domena kadherina najverovatnije dovodi do nastajanja i prenošenja konformacione promene do intracelularnog domena i aktivacije kinaza(e). Ovaj regulatorni mehanizam može da bude izuzetno važan u toku embrionalnog razvića, kada morfogeneza tkiva zahteva dinamično uspostavljanje i gubljenje epitelijalnih ćelijskih kontakata (124), ili u toku tumorskih metastaza (125). Međutim, kako svi ovi signalni putevi orkestrirano deluju i modulišu različite aktivnosti epitelijalnih ćelija, uključujući organizaciju i funkcionisanje čvrstih veza i citoskeleta, tek treba da se definiše (120).

U ovom radu, odgovor MDCK-tMK ćelijskih monolejera na promenu koncentracije ekstracelularnog kalcijuma praćen je dodavanjem 4mM EGTA u medijum (rezultati nisu prikazani). Otpor tMK i kontrolnih ćelijskih monolejera počeo je da opada neposredno po otklanjanju  $Ca^{2+}$ , a zatim, u okviru od 60' od ponovnog dodavanja  $Ca^{2+}$  vratio se na odgovarajući bazalni nivo, karakterističan za opisane ćelijske linije (Slika 14.). Ovim kontrolnim eksperimentom je potvrđeno da su čvrste veze tMK monolejera zadržale odgovor na  $Ca^{2+}$ , tj. da su drugi mehanizmi koji regulišu permeabilnost ostali funkcionalni u ovim ćelijama.

Dakle, rezultati opisani u ovoj tezi, mada ne isključuju druge procese, ukazuju da je fosforilacija lakih lanaca miozina izuzetno važan mehanizam u regulaciji paraćelijskog permeabiliteta, što ide u prilog ideji da je kontraktilno stanje citoskeleta značajna determinanta barijerne funkcije epitelijalnih ćelija.

Poremećaji u citoskeletu mogu da prouzrokuju patološke promene kože, digestivnog trakta, bubrega. Zbog toga je razumevanje strukture citoskeleta i njegove uloge u fiziološkim procesima epitelijalnih ćelija od izuzetnog značaja za dijagnozu i terapiju različitih bolesti.



## 6.6 Kontraktilnost eukariotskih ćelija

Prošlo je više od jednog veka od kada je Kuhne (82) prvi put izolovao aktin i miozin iz mišića, a još uvek nije do kraja rasvetljen molekularni mehanizam nastajanja sile u toku kontakta ova dva proteina.

Sila proizvedena akto-miozinskom interakcijom nije prisutna samo na velikoj skali, u mišićima, već je takodje osnova mikroskopskih pokretanja, kao što su ćelijsko kretanje, citokineza, transport vezikula i promene ćelijskog oblika (83,84).

Literatura o strukturnim, biohemijskim i biofizičkim karakteristikama miozina je impozantna. To je, bez sumnje, jedan od najbolje okarakterisanih proteina (85). Medjutim, osnovna pitanja o funkcionisanju tzv. motornog proteina ostaju otvorena. Fascinantne nove tehnologije, u kombinaciji sa ultrasenzitivnim optičkim instrumentima, omogućile su istraživanja na nivou jednog molekula miozina (86,87). Ovakve analize otkrivaju nove detalje akto-miozinskog kontakta i omogućile su da se detektuje sila koju proizvodi jedan molekul miozina, što odgovara redu veličine od nekoliko piko Njutna.

Očigledno je da će ovakva vrsta istraživanja iz oblasti *in vitro* mehanike, u kombinaciji sa molekularno-biološkim i strukturnim studijama, uskoro dati odgovor na pitanje kako najmanje i najefikasnije mašine na svetu zaista funkcionišu.

## 7. ZAKLJUČCI

1. Konstruisan je retrovirusni vektor sa genom za katalitički domen kinaze lakog lanca miozina (tMK), koji je nazvan pLNC-tMK.
2. pLNC-tMK vektor je uveden u 3T3 fibroblaste i MDCK epitelijalne ćelije i pokazano je prisustvo iRNK za tMK u obe ćelijske linije (3T3-tMK, MDCK-tMK).
3. Pokazana je aktivnost novosintetisanog tMK enzima u obe ćelijske linije, t.j. detektovano je povećanje od  $5.7 \pm 1.6$  puta u 3T3-tMK ćelijama i  $3.1 \pm 0.9$  puta u MDCK-tMK ćelijama, u nivou fosforilacije lakih lanaca miozina.
4. Metodom fosfopeptidnog mapiranja je potvrđeno da je tMK enzim odgovoran za fosforilisanje LLM u navedenim ćelijskim linijama.
5. Detektovano je signifikantno povećanje od 2 puta u čvrstoći citoskeleta i 3T3-tMK i MDCK-tMK ćelija u poredjenju sa odgovarajućim kontrolnim ćelijama. Time je po prvi put pokazano da je čvrstoća ćelijskog skeleta determinisana, bar jednim delom, nivoom fosforilacije LLM.

6. Ispitivanje kontraktilnih svojstava 3T3-tMK ćelija pokazalo je da nema značajne razlike u kontraktilnom ciklusu između tMK i kontrolnih ćelija. Zaključeno je da povećanje fosforilacije LLM ima lokalni ćelijski efekat (povećanje čvrstoće citoskeleta), koji se ne prenosi na ćelijsko vlakno u celini.

7. Generisanje sile u kontrolnim i 3T3-tMK ćelijama nije praćeno povećanjem nivoa fosforilacije LLM.

8. Vrednost transepitelijalnog otpora MDCK-tMK ćelija je oko 10% od vrednosti otpora koji proizvode kontrolne ćelije. To je u skladu sa pretpostavkom da je fosforilacija LLM tMK enzimom uključena u regulaciju propustljivosti čvrstih veza epitelijalnih ćelija.

## 8. LITERATURA

1. Elson,E.L. 1988. Cellular mechanics as an indicator of cytoskeletal structure and function. *Ann.Rev.Biophys.Biophys.Chem.* 17:397-430
2. Alberts,B., Bray,D., Lewis,J., Raff,M, Roberts,K, Watson,J.D. 1994. In: *Molecular biology of the cell.* New York: Garland. *The Cytoskeleton.* 787-861
3. Lodish,H., Baltimore,D., Berk,A., Zipursky,S.L., Matsudaira,P., Darnell,J. 1995. In: *Molecular cell biology.* New York: Scientific American Books. *Microfilaments: cell motility and control of cell shape.* 991-1049
4. Pollard,T.D., Cooper,J.A. 1986. Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions. *Ann.Rev.Biochem.* 55:987-1035
5. Schulze,E., Kirschner,M. 1987. Dynamic and stable populations of microtubules in cells. *J.Cell.Biol.* 104:277-288
6. Albers,K., Fuchs,E. 1992. The molecular biology of intermediate filament proteins. *Int.Rev.Cytol.* 134:243-279
7. Bonder,E.M., Fishkind,D.J., Mooseker,M.S. 1983. Direct measurement of critical concentrations and assembly rate constants at the two ends of an actin filament. *Cell* 34:491-501
8. Cooper,J.A. 1987. Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J.Cell Biol.* 105:1473-1478
9. Bretscher,A. 1991. Microfilament structure and function in the cortical cytoskeleton. *Ann.Rev.Cell Biol.* 7:337-374

10. Adelstein,R.S., Eisenberg,E. 1980. Regulation and kinetics of the actin-myosin-ATP interaction. *Ann.Rev.Biochem.* 49:921-956
11. Cheney,R.E., Riley,M.A., Mooseker,M.S. 1993. Phylogenic analysis of the myosin superfamily. *Cell Mot.Cytoskel.* 24:215-223
12. Korn,E.D., Hammer,J.A. 1988. Myosins of nonmuscle cells. *Ann.Rev.Biophys.Biophys.Chem.* 17:23-45
13. Engelhardt,W.A., Ljubimova,M.N. 1939. Myosin and adenosinetriphosphatase. *Nature* 144:668-669
14. Murphy,R.A. 1989. Special topic: contraction in smooth muscle cells. *Ann.Rev.Physiol.* 51:275-349
15. Citi,S., Kendrick-Jones,J. 1991. Regulation of non-muscle myosin structure and function. *BioEssays* 7:155-159
16. Miller,M., Bower,E., Levitt,P., Li,D. Chantler,P.D. 1992. Myosin II distribution in neurons is consistent with a role in growth cone motility but not synaptic vesicle mobilization. *Neuron* 8:25-44
17. DeBasio,R.L., LaRocca,G.M., Post,P.L., Taylor,D.L. 1996. Myosin II transport, organization,and phosphorylation: Evidence for cortical flow/solation-contraction coupling during cytokinesis and cell locomotion. *Mol.Biol.Cell* 7:1259-1282
18. Fox,J.E.B., Phillips,D.R. 1982. Role of phosphorylation in mediating the association of myosin with the cytoskeletal structures of human platelets. *J.Biol.Chem.* 257:4120-4126
19. Pasternak,C., Spudich,J.A., Elson,E.L. 1989. Capping of surface receptors and concomitant cortical tension are generated by conventional myosin. *Nature* 341:549-551

20. Sheldon,R., Moy,A., Lindsley,K., Shasby,S., Shasby,M. 1993. Role of myosin light-chain phosphorylation in endothelial cell retraction. *Am.J.Physiol.* 265:L606-L612
21. Madara, J.L., Hecht,G. 1989. In: *Functional epithelial cells in culture*. New York: Alan R.Liss. Tight (occluding) junctions in cultured (and native) epithelial cells. 131-163
22. Kendrick-Jones,J., Smith,R.C., Craig,R., Citi,S. 1987. Polymerization of vertebrate non-muscle and smooth muscle myosins. *J.Mol.Biol.* 198:241-252
23. Lorimer,D.D., de Lanerolle,P. 1996. In: *Principles of medical biology, vol.4. Cell chemistry and physiology*. JAI Pres Inc. Myosins 59-76
24. Adelstein,R.S., 1982. Calmodulin and the regulation of the actin-myosin interaction in smooth muscle and nonmuscle cells. *Cell* 30:349-350
25. de Lanerolle,P., Paul,R.J. 1991. Myosin phosphorylation / dephosphorylation and regulation of airway smooth muscle contractility. *Am.J.Physiol.* 261:L1-L14
26. Craig,R., Smith,R., Kendrick-Jones,J. 1983. Light-chain phosphorylation controls the conformation of vertebrate non-muscle and smooth muscle myosin molecules. *Nature* 302:436-439
27. Huxley,A.F., Niedergerke,R. 1954. Structural changes in muscle contraction. Interference microscopy of living muscle fibres. *Nature* 173:971-973
28. Pearson,R.B., Wettenhall,R.E.H., Means,A.R., Hartshorne,D.J., Kemp,B.E. 1988. Autoregulation of enzymes by pseudosubstrate prototopes: Myosin light chain kinase. *Science* 241:970-973
29. Ito,M., Guerriero,V., Chen,X., Hartshorne,D.J. 1991. Definition of the inhibitory domain of smooth muscle myosin light chain kinase by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* 30:3498-3503

30. Sanger,J.W., Sanger,J.M., Jockusch,B.M. 1983. Differences in the stress fibers between fibroblasts and epithelial cells. *J.Cell Biol.* 96:961-969
31. Giuliano,K.A., Kolega,J., DeBiasio,R.L., Taylor,D.L. 1992. Myosin II phosphorylation and the dynamics of stress fibers in serum - deprived and stimulated fibroblasts. *Mol.Biol.Cell* 3:1037-1048
32. Giuliano,K.A., Taylor,D.L. 1990. Formation, transport, contraction, and disassembly of stress fibers in fibroblasts. *Cell Motil.Cytoskeleton* 16:14-21
33. Burridge,K. 1981. Are stress fibers contractile? *Nature* 294:691-692
34. Petersen,N.O., McConnaughey,W.B., Elson,E.L. 1982. Dependence of locally measured cellular deformability on position on the cell, temperature, and cytochalasin B. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 79:5327-5331
35. Mooseker,M.S. 1985. Organization, chemistry, and assembly of the cytoskeletal apparatus of the intestinal brush border. *Ann. Rev.Cell Biol.* 1:209-241
36. Leighton,J., Brada,Z., Estes,L.W., Justh,G. 1969. Secretory activity and oncogenicity of a cell line (MDCK) derived from canine kidney. *Science* 158:472-473
37. Diamond,J.M. 1977. The epithelial junction: bridge, gate and fence. *Physiologist* 20:10-18
38. Nelson,W.J. 1989. In: *Functional Epithelial Cells in Culture*. New York:Alan R.Liss. Development and maintenance of epithelial polarity: a role for the submembranous cytoskeleton. 3-42
39. Caplan,M., Matlin,K.S. 1989. In: *Functional Epithelial Cells in Culture*. New York:Alan R.Liss. Sorting of membrane and secretory proteins in polarized epithelial cells. 71-127

40. Simons,K., Fuller,S. 1985. Cell surface polarity in epithelia. *Ann.Rev.Cell Biol.* 1:243-288
41. Cerejido,M., Robbins,E.S., Dolan,W.J., Rotunno,C.A., Sabitini,D.D. 1978. Polarized monolayers formed by epithelial cells on a permeable and translucent support. *J.Cell Biol.* 77:853-876
42. Meza,I., Sabanero,A., Stefani,E., Cerejido,M. 1982. Occluding junctions in MDCK cells: modulation of transepithelial permeability by the cytoskeleton. *J.Cell Biochem.* 18:407-421
43. Dillon,P.G., Aksoy,M.O., Driska,S.P., Murphy,R.A. 1981. Myosin phosphorylation and the cross-bridge cycle in arterial smooth muscle. *Science* 211:495-497
44. Murphy,R.A. 1994. What is special about smooth muscle? The significance of covalent crossbridge regulation. *FASEB J.* 8:311-318
45. Keller,T.C., Mooseker,M.S. 1982. Calcium-calmodulin dependent phosphorylation of myosin, and its role in brush border contraction in vitro. *J.CellBiol.*95:943-959
46. Solomon,F. 1987. What myosin might do. *Science* 236:1043-1044
47. Sambrook,J., Fritsch,E.F., Maniatis,T. 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual* (2nd ed.). Plainview, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
48. Graham,F.I., van der Eb,A.J. 1973. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52:456
49. Markowitz,D., Goff,S., Bank,A. 1988. Construction and use of a safe and efficient amphotropic packaging cell line. *Virology* 167:400-406
50. Squire,J. 1981. In: *The structural basis of muscular contraction*. Plenum Press, New York.



51. Carlson,F.D., Wilkie,D.R. 1974. In: Muscle physiology. Prentice-Hall, New Jersey.
52. Daniel,J.L., Sellers,J.R. 1992. Purification and characterization of platelet myosin. *Methods Enzymol.* 215:78-88
53. Freifelder,D. 1984. In: Physical biochemistry. W.H.Freeman, San Francisco.
54. Kolodney,M.S., Wysolmerski,R.B. 1992. Isometric contraction by fibroblasts and endothelial cells in tissue culture: A quantitative study. *J.Cell Biol.* 117:73-82
55. Obara,K., Kolodney,M.S., de Lanerolle,P., Paul,R.J. 1994. Non-muscle motility: force, velocity and stiffness in a reconstituted fibroblast fiber. *Biophys.J.* 66:412A
56. Miller,A.D., Rosman,G.J. 1989. Improved retroviral vectors for gene transfer and expression. *Biotechniques* 7:980-990
57. Adelstein,R.S. 1983. Regulation of contractile proteins by phosphorylation. *J.Clin.Inves.* 72:1863-1866
58. Hartshorne,D.J. 1987. Biochemistry of the contractile process in smooth muscle. In: Johnson,R.L. *Physiology of the gastrointestinal tract.* Raven Press, New York, 423-482
59. de Lanerolle,P., Stull,J.T. 1980. Myosin phosphorylation during contraction and relaxation of tracheal smooth muscle. *J.Biol.Chem.* 255:9993-10000
60. Fishkind,D.J., Cao,L., Wang,Y. 1991. Microinjection of the catalytic fragment of myosin light chain kinase into dividing cells: effects on mitosis and cytokinesis. *J.Cell Biol.* 114:967-975
61. Wilson,A.K., Gorgas,G., Claypool, W.D., de Lanerolle,P. 1991. An increase or a decrease in myosin II phosphorylation inhibits macrophage motility. *J.Cell Biol.* 114:277-283

62. Holzapfel,G., Wehland,J., Weber,K. 1983. Calcium control of actin-myosin based contraction in triton models of mouse 3T3 fibroblasts is mediated by the myosin light chain kinase-calmodulin complex. *Exp.Cell Res.* 148:117-126
63. Cande,W.Z., Ezzell,R.M. 1986. Evidence for regulation of lamellipodial and tail contraction of glycerinated chicken embryonic fibroblasts by myosin light chain kinase. *Cell Mot.Cytoskel.* 6:640-648
64. Scholey,J.M., Smith.R.C., Drenckhahn,D., Groschel-Stewart,U., Kendrick-Jones,J. 1982. Thymus myosin. *J.Biol.Chem.* 257:7737-7745
65. Ikebe,M., Inagaki,M., Naka,M., Hidaka,H. 1988. Correlation of conformation and phosphorylation and dephosphorylation of smooth muscle myosin. *J.Biol.Chem.* 263:10698-10704
66. Trybus,K.M., Huiatt,T.W., Lowey,S. 1982. A bent monomeric conformation of myosin from smooth muscle. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 79: 6151-6155
67. Gerthoffer,W.T. 1986. Calcium dependence of myosin phosphorylation and airway smooth muscle contraction and relaxation. *Am.J.Physiol.* 250:C597-604
68. Cai,S., Nowak,G., de Lanerolle,P. 1994. Myosin dephosphorylation as a mechanism of relaxation of airways smooth muscle. In: *Airways smooth muscle biochemical control of contraction and relaxation.* Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland. 233-251
69. Barron,J.T., Barany,M., Barany,K., Storti,R.V. 1980. Reversible phosphorylation and dephosphorylation of the 20,000-dalton light chain of myosin during the contraction-relaxation-contraction cycle of arterial smooth muscle. *J.Biol.Chem.* 255:6238-6244

70. Bentzel,C.H., Hainau,B., Ho,S., Hui,S.W., Edelman,A., Anagnostopoulos,T., Beneditt,E.L. 1980. Cytoplasmic regulation of tight junction permeability: effect of plant cytokinins. *Am.J.Physiol.* 239:C75-C89
71. Madara,J.L., Barenberg,D., Carlson,S. 1986. Effects of cytochalasin D on occluding junctions of intestinal absorptive cells. *J.Cell Biol.* 102:2125-2135
72. Meza,I., Ibarra,G., Sabanero,M., Martinez-Palomo,A., Cereijido,M.J. 1980. Occluding junctions and cytoskeletal components in a cultured transporting epithelium. *J.Cell Biol.* 87:746-754
73. Bretscher,A., Weber,K. 1978. Localization of actin and microfilament associated proteins in the microvilli and terminal web of the intestinal brush border by immunofluorescence microscopy. *J.Cell Biol.* 79:839-845
74. Mooseker,M.S. 1976. Brush border motility: microvillar contraction in Triton-treated brush borders isolated from intestinal epithelium. *J.Cell Biol.* 71:417-432
75. Pitelka,D.R., Taggart,B.N. 1983. Mechanical tension induces lateral movement of intramembrane components of the tight junction: studies on mouse mammary cells in culture. *J.Cell Biol.* 96:606-612
76. Gumbiner,B., Lowenkopf,T., Apatira,D. 1991. Identification of a 160 kDa polypeptide that binds to the tight junction protein ZO-1. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 88,3460-3464
77. Citi,S. 1992. Protein kinase inhibitors prevent junction dissociation induced by low extracellular calcium in MDCK epithelial cells. *J.Cell Biol.* 117,169-178

78. Tsukita,S., Oishi,K., Akiyama,T., Yamanashi,Y., Yamamoto,T. 1991. Specific protooncogenic tyrosine kinases of src family are enriched in cell-to-cell adherens junctions where level of tyrosine phosphorylation is elevated. *J.Cell Biol.*113,867-879
79. Gandhi,S., Lorimer,D.D., de Lanerolle,P. 1997. Expression of a mutant myosin light chain that cannot be phosphorylated increases paracellular permeability. *Am.J.Physiol.* 272,F214-F221
80. Bullivant,S. 1981. Possible relationships between tight junction structure and function. In: *Epithelial ion and water transport*. Raven Press, New York. 265-275
81. Madara,J.L. 1987. Intestinal absorptive cell tight junctions are linked to cytoskeleton. *Am.J.Physiol.* 253:C171-175
82. Kuhne,W. 1863. Eine lebende Nematode in einer lebenden Muskelfaser beobachtet. *Virchows Archiv.* 26:222-224; i 1864. Untersuchungen uber das Protoplasma und die Contractilitat. Leipzig: von Wilhem Engelmann.
83. Block,S.M. 1996. Fifty ways to love your lever: Myosin motors. *Cell* 87:151-157
84. Warrick,H.M., Spudich,J.A. 1987. Myosin structure and function in cell motility. *Ann.Rev.Cell Biol.* 3:379-4211
85. Squire,J. 1981. In; *The structural basis of muscle contraction*. New York: Plenum Press
86. Finer,J.T., Simmons,R.M., Spudich,J.A. 1994. Single myosin mechanics: picoNewton forces and nanometre steps. *Nature* 368:113-119
87. Ishijima,A., Harada,Y., Kojima,H., Funatsu,T., Higuchi,H., Yanagida,T. 1994. Single - molecule analysis of the actomyosin motor using nano - manipulation. *Biochem.Biophys.Res. Commun.* 199:1057-1063

88. Mermall,V., Post,P.L., Mooseker,M.S. 1998. Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic, and signal transduction. *Science* 279:527-533
89. Greengard,P. 1978. Phosphorylated proteins as physiological effectors. *Science* 199:146-152
90. Gallagher,P.J., Herring,B.P., Trafny,A., Sowadski,J., Stull,J.T. 1993. A molecular mechanism for autoinhibition of myosin light chain kinases. *J.Biol.Chem.* 268:26578-26582
91. Tanaka,M., Ikebe,R., Matsuura,M., Ikebe,M. 1995. Pseudosubstrate sequence may not be critical for autoinhibition of smooth muscle myosin light chain kinase. *EMBO J.* 14:2839-2846
92. Mrwa,W., Guth,K., Ruegg,J.C., Paul,J., Bostrom,S., Barsotti,R., Hartshorne,D.J. 1985. Mechanical and biochemical characterization of the contraction elicited by a calcium-independent myosin light chain kinase in chemically skinned smooth muscle. *Experientia Basel* 41:1002-1005
93. Walsh,M.P., Bridenbaugh,R., Hartshorne, D.J., Kerrick,W.G.L. 1982. Phosphorylation-dependent activated tension in skinned gizzard muscle fibers in the absence of Ca<sup>2+</sup>. *J.Biol.Chem.* 257:5987-5990
94. Nowak,G., Rainer,F., Sobieszek,A. 1993. Purification and characterization of the myofibrillar form of myosin light-chain phosphatase from turkey gizzard smooth muscle. *Biochim. Biophys. Acta* 1203:230-235
95. Barany,K., Barany,M. 1996. In: *Biochemistry of smooth muscle contraction* (Barany,M., ed) Academic Press, Orlando,Fl. Myosin light chains 21-33

96. Bengur,A.R., Robinson,E.A., Appella,E., Sellers,R. 1987. Sequence of the sites phosphorylated by protein kinase C in the smooth muscle myosin light chain J.Biol.Chem. 262:7613-7617
97. Nishikawa,M., Sellers,J.R., Adelstein,R.S., Hidaka,H. 1984. Protein kinase C modulates in vitro phosphorylation of the smooth muscle meromyosin by myosin light chain kinase. J.Biol.Chem. 259: 8808-8814
98. Citi,S., Smith,C., Kendrick-Jones,J. 1987. Effects of light chain phosphorylation and skeletal myosin on the stability of non-muscle myosin filaments. J.Mol.Biol. 198:253-262
99. Fox,J.E.B., Phillips,D.R. 1982. Role of phosphorylation in mediating the association of myosin with the cytoskeletal structures of human platelets. J.Biol.Chem. 257:4120-4126
100. Barany,K., Barany,M. 1996. In: Biochemistry of smooth muscle contraction (Barany,M., ed) Academic Press, Orlando,Fl. Protein phosphorylation during contraction and relaxation 321-339
101. Obara,K., de Lanerolle,P. 1989. Isoproterenol attenuates myosin phosphorylation and contraction of tracheal muscle. J.Appl.Physiol. 66:2017-2022
102. Merkel,L., Gerthoffer,W.T., Torphy, T.J. 1990. Dissociation between myosin phosphorylation and shortening velocity in canine trachea. Am.J.Physiol. 258:C524-C532
103. Kolodney,M.S., Elson,E.L. 1993. Correlation of myosin light chain phosphorylation with isometric contraction of fibroblasts. J.Biol.Chem. 268:23850-23855
104. Berridge,M.J. 1993. Inositol triphosphate and calcium signaling. Nature 361:315-325

105. Aelst,L.V., D'Souza-Schorey,C. 1997. Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev.* 11:2295-2322
106. Hall,A. 1998. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279:509-514
107. Chrzanowska,W.M., Burridge,K. 1996. Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions. *J.Cell Biol.* 133:1403-1415
108. Condeelis,J. 1993. Life at the leading edge: The formation of cell protrusions. *Ann.Rev.Cell Biol.* 9:411-444
109. Chen,W.T. 1981. Mechanism of retraction of the trailing edge during fibroblast movement. *J.Cell Biol.* 90:187-200
110. Stull,J.T. 1996. Myosin minireview series. *J.Biol.Chem.* 271:15849
111. Hurtley,S.M. 1998. Cell biology of the cytoskeleton. *Science* 279:459

#### Literatura

112. Schneeberger,E., Lynch,R.D. 1992. Structure, function and regulation of cellular tight junctions. *Am.J.Physiol.* 262:L647-L661
113. Madara,J.L., Pappenheimer,J.R. 1987. Structural basis for physiological regulation of paracellular pathways in intestinal epithelia. *J.Membrane Biol.* 100:149-164
114. Nybom,P., Magnusson,K.E. 1996. Modulation of the junctional integrity by low or high concentrations of cytochalasin B and dihydrocytochalasin B is associated with distinct changes in F-actin and ZO-1. *Biosci. Rep.* 16:313-326
115. Zurek,B., Sanger,J.M., Sanger,J.W., Jockusch,B.M. 1990. Differential effects of myosin-antibody complexes on contractile rings and circumferential belts in epitheloid cells. *J.Cell Sci.* 97:297-306

116. Somlyo,A.V., Butler,T.M., Bond,M, Somlyo,A.P. 1981. Myosin filaments have non-phosphorylated light chains in relaxed smooth muscle. *Nature* 294:567-569
117. Burgess,D.R. 1982. Reactivation of intestinal epithelial cell brush border motility: ATP-dependent contraction via a terminal web contractile ring. *J.Cell Biol.* 95:853-863
- 118.Yamaguchi,Y., Dalle-Molle,E., Hardison,W.G.M. 1991. Vasopressin and A23187 stimulate phosphorylation of myosin light chain-1 in isolated rat hepatocytes. *Am.J.Physiol.* 261:G312-G319
119. Lowe,P.J., Miyai,K., Steinbach,J.H., Hardison,W.G.M. 1988. Hormonal regulation of hepatocyte tight junctional permeability. *Am.J.Physiol.* 255:G454-G461
120. Dodane,V., Kachar,B. 1996. Identification of isoforms of G proteins and PKC that colocalize with tight junctions. *J.Memb.Biol.* 149:199-209
121. Takeichi,M. 1988. The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development* 102:639-655
122. Rajasekaran,A.K., Hojo,M., Huima,T., Rodriguez-Boulan,E. 1996. Catenins and zonula occludens-1 form a complex during early stages in the assembly of tight junctions. *J.Cell Biol.*132:451-463
123. Nilsson,M., Fagman,H., Ericson,L.E. 1996. Ca<sup>2+</sup>-dependent and Ca<sup>2+</sup>-independent regulation of the thyroid epithelial junction complex by protein kinases. *Exp.Cell Res.* 225:1-11
124. Hyafil,F., Babinet,C., Jacob,F. 1981. Cell-cell interactions in early embryogenesis: a molecular approach to the role of calcium. *Cell* 26:447-454



125. Behrens,J., Marcel,M.M., Van Roj,F.M., Birchmeier,W. 1989. Dissecting tumor cell invasion: epithelial cells acquire invasive properties after the loss of uvomorulin-mediated cell-cell adhesion. J.Cell.Biol. 108:2435-2447