



УДК 577.152.344.052.6

РОЛЬ ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ МИОЗИНА И АКТИНСВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ В ИНДУЦИРОВАННОЙ ТРОМБИНОМ ПРОНИЦАЕМОСТИ ЭНДОТЕЛИЯ

© 2003 г. Т. Борбиев, Дж. Г. Н. Гарсия, А. Д. Верин[#]

Университет Джонса Гопкинса, 21224, Балтимор, Мэриленд, США

Поступила в редакцию 21.10.2002 г. Принята к печати 07.02.2003 г.

Вызываемое тромбином нарушение барьерной функции эндотелия кровеносных сосудов в виде повышения его проницаемости в значительной степени опосредуется через инициацию специфических рецепторов, которые запускают множественные сигнальные каскады, в том числе активацию ряда протеинкиназ и фосфорилирование их цитоскелетных мишеней. В обзоре рассматривается роль фосфорилирования миозина и актинсвязывающих белков, а также возможные механизмы регуляции барьерной функции в индуцированной тромбином проницаемости эндотелия.

Ключевые слова: тромбин, барьерная функция эндотелия, цитоскелет.

ТРОМБИН И БАРЬЕРНАЯ ФУНКЦИЯ ЭНДОТЕЛИЯ

Одна из важнейших функций эндотелиальных клеток, выстилающих внутреннюю поверхность кровеносных сосудов, – формирование селективного барьера между кровью и окружающими тканями. Свойства эндотелиального барьера на протяжении кровеносного русла различаются; они зависят от вида сосуда и специфичны для различных органов. Нарушение барьерной функции эндотелия приводит к развитию воспалительного процесса и лежит в основе патогенеза ряда сосудистых заболеваний и синдромов. Целостность эндотелиального барьера в физиологических условиях может нарушаться в результате действия воспалительных цитокинов, факторов роста, активных форм кислорода и вазоактивных агентов. Барьерная дисфункция эндотелия и повышенная

проницаемость возникают, главным образом, вследствие изменения формы эндотелиальных клеток и образования зазоров между клетками (параклеточная проницаемость), хотя не исключена и возможность транспорта сквозь эндотелиальные клетки (трансклеточная проницаемость) [1, 2]. Предполагается, что изменения формы эндотелиальных клеток и, как следствие, образование брешей определяются нарушением динамического равновесия между центростремительными силами клеточного сокращения и клеточной адгезией [3]. Таким образом, актомиозиновому сокращению клеток противостоят силы, связывающие клетки с внеклеточным матриксом через фокальные контакты и с другими клетками через белки семейства ZO1 и кадгерин [2]. Важная роль в ответе эндотелиальных клеток на действие тромбина, стимулирующее повышенную проницаемость, принадлежит актомиозиновому аппарату клетки и фосфорилированию миозина и некоторых актинсвязывающих белков.

Тромбин, образующийся в плазме крови из неактивного предшественника протромбина в результате протеолитической реакции, вызывает множественные эффекты, индуцируя барьерную дисфункцию эндотелия *in vivo* и *in vitro* [4, 5], высвобождение воспалительных цитокинов, факторов роста и иницируя воспалительный процесс. Действие тромбина опосредуется через специфические белокативируемые рецепторы (PAR) [6], относящиеся по своей структуре к рецепторам, сопряженным с G-белками. Наиболее изученным является PAR-1, который взаимодействует с G-белками трех семейств: G_i, G_q и G_{α12/13} [7, 8].

Клеточный ответ на тромбин включает сигнальные каскады, ведущие к активации фос-

Сокращения: CaD – кальдесмон; CaM – кальмодулин; CaMPK – кальмодулинзависимая протеинкиназа II; Hsp27 – малый белок теплового шока с M 27 кДа; KRP-домен – домен в MLCK, идентичный белку телокину; MLC – легкие цепи миозина; MLCK – киназа легких цепей миозина; MLCP – фосфатаза легких цепей миозина; MAPK – митоген-активируемая протеинкиназа; MAPKK, MEK1/2 и MKK – киназы MAPK; MAPKKK – киназа MAPKK; MAPKAP2-киназа – протеинкиназа 2, активируемая MAPK; MAPKAP2/3-киназа – протеинкиназа 2/3, активируемая MAPK; PAR – белокативируемые рецепторы; PAKs – протеинкиназы, активируемые малыми G-белками; Rac, Ras, Rho – малые G-белки; Raf1 – серин-треониновая протеинкиназа; RhoK – Rho-зависимая протеинкиназа; SAPK – стрессактивируемая протеинкиназа; TAK – киназа, активируемая фактором роста TGF-β; ZIP – лейциновый зиппер-домен; ZIPK – ZIP-протеинкиназа; фосфатазы PP-1-типа – серин-треониновые фосфатазы 1 типа.

[#] Автор для переписки (тел.: (410) 550-59-87; факс: (410) 550-79-14; эл. почта: averin@jhmi.edu).

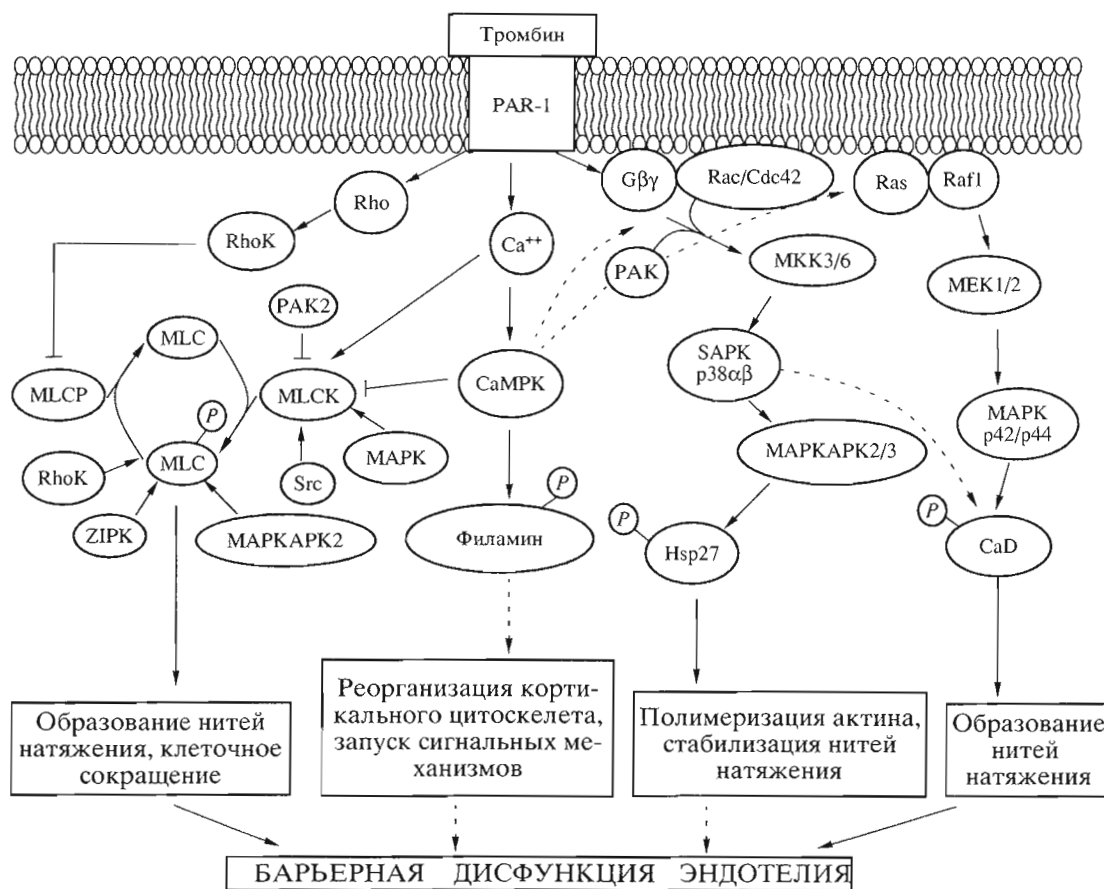


Схема. Фосфорилирование миозина и актинсвязывающих белков и возможные механизмы регуляции барьерной функции в индуцированной тромбином проницаемости эндотелия.

Обозначения белков см. в списке сокращений. Штрихованной и сплошной стрелками или значком “⊥” обозначены возможность эффекта (активации), активация или ингибирование регуляторных белков соответственно. Остальные объяснения см. в тексте.

фолипаз (A₂, C и D), ингибированию аденилатциклазы, мобилизации Ca²⁺, активации белка Rho и Rho-зависимой протеинкиназы, фосфатидилинозитол-3-киназы, митоген- и стрессактивируемых протеинкиназ p42/p44 и p38 (MAPK p42/p44 и SAPK p38 соответственно), тирозиновых киназ, протеинкиназы C, кальмодулинзависимой протеинкиназы II (CaMK) и киназы легких цепей миозина (MLCK) (схема) [8–18]. Как уже отмечалось, важное место в ответе эндотелиальных клеток на действие тромбина принадлежит активации сократительного аппарата клетки и соответствующей реорганизации цитоскелета, выражающейся в растворении кортикального слоя актина и формировании нитей натяжения (схема). Исходя из этого, MLCK, а также протеинкиназы или фосфатазы, влияющие на уровень фосфорилирования MLC, потенциально способны регулировать барьерную функцию эндотелия [19–23].

ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ ЛЕГКИХ ЦЕПЕЙ МИОЗИНА И РЕГУЛЯЦИЯ ПРОНИЦАЕМОСТИ ЭНДОТЕЛИЯ

Гладкомышечная киназа MLC и немышечная киназа MLCK (MLCK), отличающаяся от гладкомышечной дополнительным N-концевым доменом, имеющим потенциальные участки фосфорилирования для ряда протеинкиназ, являются продуктами одного и того же генетического локуса [24–28]. Эти киназы различаются по распространению в тканях и органах, внутриклеточной локализации, взаимодействию с цитоскелетными белками и, возможно, выполняемой функцией [29–31]. В эндотелиальных клетках, наряду с гладкомышечной киназой MLC, обнаруживаются пять изоформ немышечной киназы, представляющие собой полную размерную изоформу и ее четыре делеционных варианта, с преимущественной экспрессией изоформы MLCK-2 [32, 33]. Роль различных изоформ киназы MLC в клетке в достаточной степени не изучена, однако известно, что, в отличие от

MLCK-2, изоформа MLCK-1 может активироваться под действием фосфорилирования тирозиновой протеинкиназой Src (Src-зависимое фосфорилирование) по остаткам Tyr464 и Tyr471 в участке, который отсутствует в изоформе MLCK-2 [34].

Уровень фосфорилирования MLC по остаткам Ser19 и Thr18 определяется не только активностью MLCK, но и активностью миозиновой фосфатазы (MLCP), а также фосфорилированием другими протеинкиназами. Фосфорилирование MLC, осуществляемое киназой MLC, и запуск клеточного сокращения имеет важное значение в регуляции индуцированной тромбином проницаемости эндотелия [35]. Тромбин вызывает быстрое увеличение концентрации Ca^{2+} в клетке, за которым следует 6–8-кратное увеличение уровня фосфорилирования MLC с последующим изменением формы клеток и образованием брешей (к пятой минуте), максимум проницаемости эндотелиального монослоя достигается к десятой минуте [35]. Кривая активации киназы MLC коррелирует с кривой изменения содержания Ca^{2+} [36]. В целом, между образованием нитей натяжения, увеличением уровня фосфорилирования MLC и увеличением эндотелиальной проницаемости имеется тесная зависимость [2].

Миозиновая фосфатаза эндотелиальных клеток, так же как и фосфатаза гладкомышечной ткани, принадлежит к PP-1-типу [37]. Это гетеротример, состоящий из каталитической (38 кДа), регуляторной (110–130 кДа) и малой (20 кДа) субъединиц [38]. В эндотелиальных клетках фосфатаза MLC связана с миозином, и именно специфичное ингибирование фосфатаз PP-1 (но не PP-2A) приводит к увеличению уровня фосфорилирования MLC и проницаемости эндотелиального монослоя [37]. Кроме того, определенную роль в дефосфорилировании MLC и модуляции барьерной функции эндотелия может играть фосфатаза 2B (кальцийнейрин), которая активируется под действием тромбина и способствует дефосфорилированию MLC на поздних стадиях активации клеток эндотелия этим агонистом [39]. Связывание регуляторной субъединицы миозиновой фосфатазы с миозином регулируется ее фосфорилированием Rho-зависимой протеинкиназой, которое приводит к ослаблению взаимодействия этой субъединицы с миозином и тем самым к ингибированию фосфатазной активности по отношению к миозину [40]. Действие тромбина на эндотелиальные клетки индуцирует активацию Rho-зависимой протеинкиназы, что приводит к инактивации фосфатазы MLC, и это коррелирует с максимальным увеличением уровня фосфорилирования MLC [41].

Помимо киназы и фосфатазы на уровень фосфорилирования MLC по остаткам Ser19 и Thr18 могут влиять киназы PAK2, MAPKAP2, ZIPK и

RhoK [42–45], которые также могут участвовать в регуляции барьерной функции эндотелия (схема). Кроме того, активность самой киназы MLC может изменяться в результате фосфорилирования другими протеинкиназами. При этом фосфорилирование киназой MAPK p42/p44 по сайтам в N-концевом и KRP-доменах или Src-зависимое фосфорилирование в N-концевом участке приводит к активации киназы MLC [34, 46, 47]. Фосфорилирование PAK2 по остаткам Ser439 и Ser991 ведет к ингибированию каталитической активности киназы MLC [48]. Известно, что фосфорилирование CaM-протеинкиназой II (CaMK) кальмодулинсвязывающего участка (сайт A) ингибирует киназу MLC *in vitro* [49, 50], однако есть данные, что активация CaMK способствует повышению уровня фосфорилирования MLC и гладкомышечному сокращению [51].

Приведенные выше факты позволяют рассматривать фосфорилирование MLC как важный параметр барьерной дисфункции эндотелия и подчеркивают сложный характер регуляции этого процесса.

РОЛЬ ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ АКТИНСВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ В РЕГУЛЯЦИИ БАРЬЕРНОЙ ФУНКЦИИ ЭНДОТЕЛИЯ

Как отмечалось выше, фосфорилирование MLC играет большую роль в регуляции барьерной функции эндотелия. Вместе с тем, кривые изменения уровня фосфорилирования MLC и проницаемости эндотелиального монослоя совпадают лишь в начальной стадии (первые 30 мин) клеточного ответа на действие тромбина. На более поздних стадиях уровень фосфорилирования MLC возвращается к базальному, в то время как восстановление исходной проницаемости происходит гораздо медленнее [35], напоминая фазу тонического сокращения в гладкомышечной ткани. Предполагается, что в данном случае задействованы отличные от фосфорилирования миозина регуляторные компоненты актомиозинового сокращения. Действие тромбина на эндотелиальные клетки вызывает активацию ряда протеинкиназ, которые незначительно изменяют уровень фосфорилирования MLC, но достоверно повышают проницаемость эндотелиального монослоя. Возможно, что цитоскелетные мишени этих протеинкиназ оказывают модулирующее влияние на барьерную функцию эндотелия. Ниже будут рассмотрены активируемые тромбином MAPK p42/p44, SAPK p38 и CaMK, а также фосфорилируемые ими актинсвязывающие белки кальдесмон, Hsp27 и филамин.

Митогенактивируемая протеинкиназа p42/p44 (MAPK p42/p44) участвует во внутриклеточной передаче сигналов от рецепторов факторов

роста, сопряженных с G-белками, а также в регуляции экспрессии генов, пролиферации, дифференциации, деления, миграции и апоптоза клеток [52, 53]. MAPK p42/p44 активируется фосфорилированием остатков треонина и тирозина в результате функционирования известного для этого семейства киназ сигнального каскада: малая GTP-аза – киназа киназы MAPK (MAPKKK) – киназа MAPK (MAPKK) – MAPK. В эндотелиальных клетках этот сигнальный каскад представлен в виде: Ras – Raf1 – MEK1/2 – MAPK p42/p44 (схема) [54]. Показано также, что активация MAPK p42/p44 зависит от увеличения концентрации Ca^{2+} и активации CaMPK [55].

Кроме транскрипционных факторов субстратом для MAPK p42/p44 является актинсвязывающий белок кальдесмон (CaD), участвующий в регуляции актомиозинового сокращения (схема). Помимо актина, кальдесмон связывается также с миозином, тропомиозином и кальмодулином. мРНК кальдесмона транскрибируется с единственного гена в виде двух сплайсинг-вариантов, которые соответствуют двум основным изоформам кальдесмона: высокомолекулярной (120–150 кДа), характерной для гладкомышечной ткани, и низкомолекулярной (70–80 кДа), представленной в немышечных клетках [56]. Доменную структуру кальдесмона часто рассматривают как состоящую из трех составных частей: С-концевой области, которая содержит актин-, тропомиозин- и кальмодулинсвязывающие участки; N-концевой части, включающей миозин-, а также слабые актин- и кальмодулинсвязывающие участки; среднего участка, представленного только в высокомолекулярной изоформе и не имеющего связывающих сайтов. CaD способен ингибировать миозиновую АТФ-азную активность *in vitro*, утрачивая это свойство в результате фосфорилирования или связывания с Ca^{2+} -кальмодулином [57, 58].

В гладкомышечной ткани CaD локализуется с актиновыми филаментами, а в немышечных клетках связывает между собой актин и миозин, участвует в образовании нитей натяжения и формировании фокальных контактов, а также в процессах клеточного сокращения и деления [56, 59–63]. Показано, что нити натяжения содержат как кальдесмон [59, 62], так и актин, миозин, α -актинин, CaM, киназу MLC, белки фокальных контактов, и действительно являются сократительными элементами клеток [64], причем сформированные нити, предположительно, находятся под действием сократительных сил [65]. Исходя из биохимических свойств кальдесмона, его функции в составе нитей натяжения, возможно, состоят в их стабилизации за счет сшивания актина и миозина и в регуляции актомиозинового сокращения.

MAPK p42/44 является киназой кальдесмона *in vivo*, фосфорилирующей остатки Ser759 и Ser789

в С-концевой части [66, 67] (нумерация согласно последовательности гладкомышечного CaD млекопитающих [68]). Фосфорилирование этой киназой приводит к ослаблению взаимодействия кальдесмона с актином *in vitro* [69], что предполагает (с учетом локализации сайтов фосфорилирования кальдесмона) обращение его ингибирующих свойств. Однако данные о роли индуцированного MAPK p42/p44 фосфорилирования кальдесмона в активации миозиновой АТФ-азы и клеточного сокращения *in vitro* и *in situ* противоречивы. В одних экспериментах фосфорилирование CaD данной киназой приводило к активизации актомиозинового сокращения [70–73], в других исследованиях такой зависимости обнаружено не было [74, 75]. Возможно, это связано либо с различиями в использованных образцах гладкомышечной ткани (тип и происхождение) и препаратах очищенной протеинкиназы, либо с особенностями лабораторных методик, либо с использованием в опыте белков (CaD), отличающихся по уровню базального фосфорилирования. В последнем случае эффект активации или ингибирования протеинкиназы и соответственно фосфорилирования или дефосфорилирования кальдесмона на клеточное сокращение может оказаться недостоверным. Кроме того, сложность может вносить комплексный характер фосфорилирования кальдесмона, то есть фосфорилирование его несколькими киназами по многим сайтам.

В эндотелиальных клетках индуцированная тромбином активация MAPK p42/p44 приводит к фосфорилированию кальдесмона только по остатку Ser789. Ингибирование данной протеинкиназы блокирует фосфорилирование CaD по этому сайту и ослабляет образование нитей натяжения. Кроме того, фосфорилированный кальдесмон гораздо хуже связывается с миозином и актином, что, в целом, согласуется с ролью кальдесмона как регуляторного белка актомиозинового сокращения (Борбиев, Гарсия, Верин, неопубликованные данные).

Стрессактивируемая протеинкиназа p38 (SAPK p38) активируется в ответ на стресс, действие воспалительных медиаторов, бактериальных эндотоксинов и экспрессируется в виде четырех изоформ: p38 α (SAPK2a), p38 β (SAPK2b), p38 γ (SAPK3) и p38 δ (SAPK4) [76]. Сигнальный каскад, ведущий к активации данной киназы, выглядит как Ras – PAKs – TAK – MKK3/6 – SAPK p38 (схема) [77]. Субстратами для SAPK p38 являются транскрипционные факторы и MAPKAP2/3-киназы, то есть протеинкиназы, активируемые митогенактивируемой протеинкиназой, которые фосфорилируют актинсвязывающий белок Hsp27 [76, 77].

Активация SAPK p38 имеет большое значение в регуляции иммунного ответа, воспалительного

процесса, апоптоза, а также в пролиферации, дифференциации и миграции клеток [78–80]. Сигнальные каскады, ведущие к активации MAPK p42/p44 и SAPK p38, существуют не изолированно друг от друга, но взаимодействуют между собой в зависимости от природы агониста, что приводит к модуляции их активностей. Показано, что активация SAPK p38 может как ингибировать, так и активировать MAPK p42/p44 [81–83].

Hsp27 относится к семейству белков теплового шока, основная функция которых, как молекулярных шаперонов, состоит в защите клеток от действия различных стрессов путем предотвращения агрегации белков и их ренатурации [84, 85]. Hsp27-белки млекопитающих фосфорилируются MAPKAP2/3-киназами по двум (Hsp25 грызунов) или трем (человеческий Hsp27) остаткам серина: 15, 78 и 82 [86–89]. Фосфорилирование Hsp27 приводит к диссоциации крупных агрегатов Hsp27 (>500 кДа) до мономеров и модуляции динамики актина [90–95]. Нефосфорилированный Hsp27 функционирует как белок, копирующий и ингибирующий полимеризацию актина, однако утрачивающий эти свойства в результате фосфорилирования MAPKAP2/3-киназами [95]. Активация MAPKAP2/3-киназ и фосфорилирование Hsp27 приводит также к стабилизации актинового цитоскелета после действия холецистокинина, цитохалазина D или различных видов стресса [91, 96–98], и имеет значение в процессах сокращения и миграции клеток [80, 99–103]. Так как опосредованное активацией MAPK, p38 и MAPKAP2/3-киназ фосфорилирование Hsp27 вызывает значительные изменения в актиновом цитоскелете клетки (схема), можно полагать, что данный сигнальный механизм участвует в регуляции барьерной функции эндотелия.

Кроме того, SAPK p38 способна непосредственно фосфорилировать CaD (схема) [104, 105] и таким образом оказывать влияние на барьерную функцию эндотелия. В эндотелиальных клетках тромбин индуцирует зависимое от данной протеинкиназы фосфорилирование кальдесмона и уменьшает его связывание с миозином и актином. Ингибирование SAPK p38 предотвращает образование нитей натяжения и фосфорилирование Ser789, что вновь указывает на возможную роль кальдесмона в регуляции проницаемости эндотелия (Борбиев, Гарсия, Верин, неопубликованные данные).

Мультифункциональная кальмодулинзависимая протеинкиназа II (CaMPK), которая активируется в результате увеличения концентрации Ca²⁺, участвует во многих внутриклеточных сигнальных механизмах [106]. Действие тромбина на эндотелиальные клетки приводит к активации этой протеинкиназы до максимального уровня в первые минуты клеточного ответа и к фосфорилированию субстрата – актинсвязывающего

белка филамина (схема) [17], который играет важную роль как во внутриклеточной передаче сигналов, так и в динамической реорганизации актинового цитоскелета [107]. В результате фосфорилирования филамина уменьшается его способность сшивать актиновые филаменты [108]. Специфичное ингибирование CaMPK или использование пептидов, последовательность которых содержит участок фосфорилирования филамина CaM-протеинкиназой II, достоверно уменьшает как проницаемость эндотелия, так и уровень фосфорилирования филамина [17]. Возможно, фосфорилирование филамина модулирует барьерную функцию эндотелия либо в результате реорганизации кортикального слоя актинового цитоскелета, контролирующего форму клетки и клеточную адгезию [109], либо путем инициации неидентифицированных сигнальных механизмов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Тромбин вызывает барьерную дисфункцию эндотелия в результате действия ряда сигнальных механизмов. Важная роль в клеточном ответе, с точки зрения проницаемости эндотелия, принадлежит киназе MLC и уровню фосфорилирования MLC. На этот процесс влияет множество факторов, например регуляция активности MLCK как Ca²⁺-кальмодулином, так и протеинкиназами (CaMPK, PAK, MAPK p42/p44), модуляция активности миозиновой фосфатазы, фосфорилирование MLC другими протеинкиназами (Rho-зависимой протеинкиназой, PAK, ZIP-киназой, MAPKAP2-киназой) (схема). Кроме того, актомиозиновое сокращение и барьерная функция эндотелия могут регулироваться актинсвязывающими белками, такими, как кальдесмон, Hsp27 и филамин. Предположительно, индуцированная тромбином проницаемость эндотелия модулируется также тирозиновыми протеинкиназами [10], реорганизацией микротрубочек и промежуточных филаментов, изменениями в клеточной адгезии [110]. Дальнейшие исследования в этом направлении помогут оценить вклад каждого из этих механизмов в общую картину индуцированной тромбином барьерной дисфункции эндотелия.

Данная работа была поддержана грантами NIH (HL67307, HL50533), а также грантом American Heart Association.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Stevens T., Garcia J.G., Shasby D.M., Bhattacharya J., Malik A.B. // *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2000. V. 279. P. L419–422.
2. Dudek S.M., Garcia J.G. // *J. Appl. Physiol.* 2001. V. 91. P. 1487–1500.
3. Garcia J.G., Schaphorst K.L. // *J. Investig. Med.* 1995. V. 43. P. 117–126.

4. Lo S.K., Perlman M.B., Niehaus G.D., Malik A.B. // *J. Appl. Physiol.* 1985. V. 58. P. 1421–1427.
5. Garcia J.G., Siflinger-Birnboim A., Bizios R., Del Vecchio P.J., Fenton J.W., 2nd, Malik A.B. // *J. Cell. Physiol.* 1986. V. 128. P. 96–104.
6. Coughlin S.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999. V. 96. P. 11023–11027.
7. Barr A.J., Brass L.F., Manning D.R. // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. P. 2223–2229.
8. Hung D.T., Wong Y.H., Vu T.K., Coughlin S.R. // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. P. 20831–20834.
9. Buhl A.M., Johnson N.L., Dhanasekaran N., Johnson G.L. // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270. P. 24631–24634.
10. Shi S., Verin A.D., Schaphorst K.L., Gilbert-McClain L.I., Patterson C.E., Irwin R.P., Natarajan V., Garcia J.G. // *Endothelium.* 1998. V. 6. P. 153–171.
11. Garcia J.G., Fenton J.W., 2nd, Natarajan V. // *Blood.* 1992. V. 79. P. 2056–2067.
12. Garcia J.G., Patterson C., Bahler C., Aschner J., Hart C.M., English D. // *J. Cell. Physiol.* 1993. V. 156. P. 541–549.
13. Hong S.L., Deykin D. // *J. Biol. Chem.* 1982. V. 257. P. 7151–7154.
14. van Nieuw Amerongen G.P., van Delft S., Vermeer M.A., Collard J.G., van Hinsbergh V.W. // *Circ. Res.* 2000. V. 87. P. 335–340.
15. Stasek J.E., Jr., Patterson C.E., Garcia J.G. // *J. Cell. Physiol.* 1992. V. 153. P. 62–75.
16. Krymskaya V.P., Penn R.B., Orsini M.J., Scott P.H., Plevin R.J., Walker T.R., Eszterhas A.J., Amrani Y., Chilvers E.R., Panettieri R.A., Jr. // *Am. J. Physiol.* 1999. V. 277. P. L65–78.
17. Borbiev T., Verin A.D., Shi S., Liu F., Garcia J.G. // *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2001. V. 280. P. L983–990.
18. Grand R.J., Turnell A.S., Grabham P.W. // *Biochem. J.* 1996. V. 313. P. 353–368.
19. Tan J.L., Ravid S., Spudich J.A. // *Annu. Rev. Biochem.* 1992. V. 61. P. 721–759.
20. Wysolmerski R.B., Lagunoff D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990. V. 87. P. 16–20.
21. Wysolmerski R.B., Lagunoff D. // *Am. J. Physiol.* 1991. V. 261. P. C32–40.
22. Pestic-Dragovich L., O'Donnell M.E., Wang N., Ingber D., Elson E., de Lanerolle P. // *Am. J. Physiol.* 1998. V. 275. P. C1349–1356.
23. Verin A.D., Lazar V., Torry R.J., Labarrere C.A., Patterson C.E., Garcia J.G. // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1998. V. 19. P. 758–766.
24. Watterson D.M., Collinge M., Lukas T.J., van Eldik L.J., Birukov K.G., Stepanova O.V., Shirinsky V.P. // *FEBS Lett.* 1995. V. 373. P. 217–220.
25. Potier M.C., Chelot E., Pekarsky Y., Gardiner K., Rossier J., Turnell W.G. // *Genomics.* 1995. V. 29. P. 562–570.
26. Gallagher P.J., Herring B.P. // *J. Biol. Chem.* 1991. V. 266. P. 23 945–23 952.
27. Collinge M., Matrisian P.E., Zimmer W.E., Shattuck R.L., Lukas T.J., van Eldik L.J., Watterson D.M. // *Mol. Cell. Biol.* 1992. V. 12. P. 2359–2371.
28. Gallagher P.J., Herring B.P., Griffin S.A., Stull J.T. // *J. Biol. Chem.* 1991. V. 266. P. 23936–23944.
29. Garcia J.G., Lazar V., Gilbert-McClain L.I., Gallagher P.J., Verin A.D. // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1997. V. 16. P. 489–494.
30. Lazar V., Garcia J.G. // *Genomics.* 1999. V. 57. P. 256–267.
31. Kamm K.E., Stull J.T. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 4527–4530.
32. Blue E.K., Goekeler Z.M., Jin Y., Hou L., Dixon S.A., Herring B.P., Wysolmerski R.B., Gallagher P.J. // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2002. V. 282. P. 451–460.
33. Poperechnaya A., Varlamova O., Lin P.J., Stull J.T., Bresnick A.R. // *J. Cell Biol.* 2000. V. 151. P. 697–708.
34. Birukov K.G., Csontos C., Marzilli L., Dudek S., Ma S.F., Bresnick A.R., Verin A.D., Cotter R.J., Garcia J.G. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 8567–8573.
35. Garcia J.G., Davis H.W., Patterson C.E. // *J. Cell. Physiol.* 1995. V. 163. P. 510–522.
36. Verin A.D., Gilbert-McClain L.I., Patterson C.E., Garcia J.G. // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1998. V. 19. P. 767–776.
37. Verin A.D., Patterson C.E., Day M.A., Garcia J.G. // *Am. J. Physiol.* 1995. V. 269. P. 99–108.
38. Hartshorne D.J., Ito M., Erdodi F.J. // *Muscle Res. Cell Motil.* 1998. V. 19. P. 325–341.
39. Verin A.D., Cooke C., Herenyiova M., Patterson C.E., Garcia J.G. // *Am. J. Physiol.* 1998. V. 275. P. 788–799.
40. Kimura K., Ito M., Amano M., Chihara K., Fukata Y., Nakafuku M., Yamamori B., Feng J., Nakano T., Okawa K., Iwamatsu A., Kaibuchi K. // *Science.* 1996. V. 273. P. 245–248.
41. Essler M., Amano M., Kruse H.J., Kaibuchi K., Weber P.C., Aepfelbacher M. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. P. 21 867–21 874.
42. Amano M., Ito M., Kimura K., Fukata Y., Chihara K., Nakano T., Matsuura Y., Kaibuchi K. // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. P. 20246–20249.
43. Zeng Q., Lagunoff D., Masaracchia R., Goekeler Z., Cote G., Wysolmerski R. // *J. Cell Sci.* 2000. V. 113. P. 471–482.
44. Komatsu S., Hosoya H. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996. V. 223. P. 741–745.
45. Niirio N., Ikebe M. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 29567–29574.
46. Morrison D.L., Sanghera J.S., Stewart J., Sutherland C., Walsh M.P., Pelech S.L. // *Biochem. Cell. Biol.* 1996. V. 74. P. 549–557.
47. Klemke R.L., Cai S., Giannini A.L., Gallagher P.J., de Lanerolle P., Cheres D.A. // *J. Cell Biol.* 1997. V. 137. P. 481–492.
48. Goekeler Z.M., Masaracchia R.A., Zeng Q., Chew T.L., Gallagher P., Wysolmerski R.B. // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. P. 18 366–18 374.
49. Tansey M.G., Luby-Phelps K., Kamm K.E., Stull J.T. // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. P. 9912–9920.
50. Tansey M.G., Word R.A., Hidaka H., Singer H.A., Schworer C.M., Kamm K.E., Stull J.T. // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. P. 12511–12516.

51. Kim I., Je H.D., Gallant C., Zhan Q., Riper D.V., Badwey J.A., Singer H.A., Morgan K.G. // *J. Physiol.* 2000. V. 526. Pt. 2. P. 367–374.
52. Seger R., Krebs E.G. // *Faseb J.* 1995. V. 9. P. 726–735.
53. Chang L., Karin M. // *Nature.* 2001. V. 410. P. 37–40.
54. Verin A.D., Liu F., Bogatcheva N., Borbiev T., Hershenson M.B., Wang P., Garcia J.G. // *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2000. V. 279. P. L360–370.
55. Ginnan R., Singer H.A. // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2002. V. 282. P. 754–761.
56. Sobue K., Sellers J.R. // *J. Biol. Chem.* 1991. V. 266. P. 12115–12118.
57. Marston S.B., Redwood C.S. // *Biochem. J.* 1991. V. 279. P. 1–16.
58. Huber P.A.J., Marston S.B. // *Biochemistry of Smooth Muscle Contraction* / Ed. M. Barany. San Diego: Academic Press, 1996. P. 77–90.
59. Castellino F., Ono S., Matsumura F., Luini A. // *J. Cell Biol.* 1995. V. 131. P. 1223–1230.
60. Goncharova E.A., Shirinsky V.P., Shevelev A.Y., Marston S.B., Vorotnikov A.V. // *FEBS Lett.* 2001. V. 497. P. 113–117.
61. Helfman D.M., Levy E.T., Berthier C., Shtutman M., Riveline D., Grosheva I., Lachish-Zalait A., Elbaum M., Bershadsky A.D. // *Mol. Biol. Cell.* 1999. V. 10. P. 3097–3112.
62. Yamakita Y., Yamashiro S., Matsumura F. // *J. Cell Biol.* 1990. V. 111. P. 2487–2498.
63. Yamashiro S., Chern H., Yamakita Y., Matsumura F. // *Mol. Biol. Cell.* 2001. V. 12. P. 239–250.
64. Katoh K., Kano Y., Masuda M., Onishi H., Fujiwara K. // *Mol. Biol. Cell.* 1998. V. 9. P. 1919–1938.
65. Katoh K., Kano Y., Amano M., Onishi H., Kaibuchi K., Fujiwara K. // *J. Cell Biol.* 2001. V. 153. P. 569–584.
66. Adam L.P., Gapinski C.J., Hathaway D.R. // *FEBS Lett.* 1992. V. 302. P. 223–226.
67. Adam L.P., Hathaway D.R. // *FEBS Lett.* 1993. V. 322. P. 56–60.
68. Humphrey M.B., Herrera-Sosa H., Gonzalez G., Lee R., Bryan J. // *Gene.* 1992. V. 112. P. 197–204.
69. Childs T.J., Watson M.H., Sanghera J.S., Campbell D.L., Pelech S.L., Mak A.S. // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. P. 22853–22859.
70. Dessy C., Kim I., Sougnéz C.L., Laporte R., Morgan K.G. // *Am. J. Physiol.* 1998. V. 275. P. 1081–1086.
71. Gerthoffer W.T., Yamboliev I.A., Shearer M., Pohl J., Haynes R., Dang S., Sato K., Sellers J.R. // *J. Physiol.* 1996. V. 495. P. 597–609.
72. Gerthoffer W.T., Yamboliev I.A., Pohl J., Haynes R., Dang S., McHugh J. // *Am. J. Physiol.* 1997. V. 272. P. L244–252.
73. Watts S.W. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1996. V. 279. P. 1541–1550.
74. Gorenne I., Su X., Moreland R.S. // *Am. J. Physiol.* 1998. V. 275. P. 131–138.
75. Nixon G.F., Iizuka K., Haystead C.M., Haystead T.A., Somlyo A.P., Somlyo A.V. // *J. Physiol.* 1995. V. 487. P. 283–289.
76. Ono K., Han J. // *Cell Signal.* 2000. V. 12. P. 1–13.
77. Paul A., Wilson S., Belham C.M., Robinson C.J., Scott P.H., Gould G.W., Plevin R. // *Cell Signal.* 1997. V. 9. P. 403–410.
78. Herlaar E., Brown Z. // *Mol. Med. Today.* 1999. V. 5. P. 439–447.
79. Nebreda A.R., Porras A. // *Trends Biochem. Sci.* 2000. V. 25. P. 257–260.
80. Hedges J.C., Dechert M.A., Yamboliev I.A., Martin J.L., Hickey E., Weber L.A., Gerthoffer W.T. // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. P. 24211–24219.
81. Zhang H., Shi X., Hampong M., Blanis L., Pelech S. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 6905–6908.
82. Ludwig S., Hoffmeyer A., Goebeler M., Kilian K., Hafner H., Neufeld B., Han J., Rapp U.R. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. P. 1917–1922.
83. Houliston R.A., Pearson J.D., Wheeler-Jones C.P. // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2001. V. 281. P. 1266–1276.
84. Feder M.E., Hofmann G.E. // *Annu. Rev. Physiol.* 1999. V. 61. P. 243–282.
85. Arrigo A.P. // *IUBMB Life.* 2001. V. 52. P. 303–307.
86. Landry J., Chretien P., Laszlo A., Lambert H. // *J. Cell Physiol.* 1991. V. 147. P. 93–101.
87. Landry J., Lambert H., Zhou M., Lavoie J.N., Hickey E., Weber L.A., Anderson C.W. // *J. Biol. Chem.* 1991. V. 267. P. 794–803.
88. Freshney N.W., Rawlinson L., Guesdon F., Jones E., Cowley S., Hsuan J., Saklatvala J. // *Cell.* 1994. V. 78. P. 1039–1049.
89. Lee J.C., Laydon J.T., McDonnell P.C., Gallagher T.F., Kumar S., Green D., McNulty D., Blumenthal M.J., Heys J.R., Landvatter S.W., et al. // *Nature.* 1994. V. 372. P. 739–746.
90. Landry J., Huot J. // *Biochem. Soc. Symp.* 1999. V. 64. P. 79–89.
91. Guay J., Lambert H., Gingras-Breton G., Lavoie J.N., Huot J., Landry J. // *J. Cell Sci.* 1997. V. 110. P. 357–368.
92. Piotrowicz R.S., Levin E.G. // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. P. 25 920–25 927.
93. Rogalla T., Ehrnsperger M., Preville X., Kotlyarov A., Lutsch G., Ducasse C., Paul C., Wieske M., Arrigo A.P., Buchner J., Gaestel M. // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. P. 18947–18956.
94. Lambert H., Charette S.J., Bernier A.F., Guimond A., Landry J. // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. P. 9378–9385.
95. Benndorf R., Hayess K., Ryazantsev S., Wieske M., Behlke J., Lutsch G. // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. P. 20780–20784.
96. Huot J., Houle F., Spitz D.R., Landry J. // *Cancer Res.* 1996. V. 56. P. 273–279.
97. Huot J., Houle F., Marceau F., Landry J. // *Circ. Res.* 1997. V. 80. P. 383–392.
98. Schneider G.B., Hamano H., Cooper L.F. // *J. Cell Physiol.* 1998. V. 177. P. 575–584.
99. Piotrowicz R.S., Hickey E., Levin E.G. // *Faseb J.* 1998. V. 12. P. 1481–1490.
100. Huot J., Houle F., Rousseau S., Deschesnes R.G., Shah G.M., Landry J. // *J. Cell Biol.* 1998. V. 143. P. 1361–1373.

101. Ibitayo A.I., Sladick J., Tuteja S., Louis-Jacques O., Yamada H., Groblewski G., Welsh M., Bitar K.N. // *Am. J. Physiol.* 1999. V. 277. P. 445–454.
102. Yamboliev I.A., Hedges J.C., Mutnick J.L., Adam L.P., Gerthoffer W.T. // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2000. V. 278. P. 1899–1907.
103. Gerthoffer W.T., Gunst S.J. // *J. Appl. Physiol.* 2001. V. 91. P. 963–972.
104. Hedges J.C., Yamboliev I.A., Ngo M., Horowitz B., Adam L.P., Gerthoffer W.T. // *Am. J. Physiol.* 1998. V. 275. P. 527–534.
105. Goncharova E.A., Vorotnikov A.V., Gracheva E.O., Albert W.C., Panettieri R.A., Jr., Stepanova V.V., Tkachuk V.A. // *Biol. Chem.* 2002. V. 383. P. 115–126.
106. Braun A.P., Schulman H. // *Annu. Rev. Physiol.* 1995. V. 57. P. 417–445.
107. Stossel T.P., Condeelis J., Cooley L., Hartwig J.H., Noegel A., Schleicher M., Shapiro S.S. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2001. V. 2. P. 138–145.
108. Ohta Y., Hartwig J.H. // *Biochemistry.* 1995. V. 34. P. 6745–6754.
109. Luna E.J., Hitt A.L. // *Science.* 1992. V. 258. P. 955–964.
110. Schaphorst K.L., Pavalko F.M., Patterson C.E., Garcia J.G. // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1997. V. 17. P. 443–455.

Role of Phosphorylation of Myosin and Actin-Binding Proteins in Thrombin-Induced Permeability of Endothelial Cells

T. Borbiev, J. G. N. Garcia, and A. D. Verin[#]

[#]Phone: (410) 550-5987; fax: (410) 550-7914; e-mail: averin@jhmi.edu

Johns Hopkins University School of Medicine, 5501 Hopkins Bayview Circle, Baltimore, MD 21224 USA

The thrombin-induced dysfunction of the barrier function of the blood vessel endothelium, which manifests itself in increased permeability, is largely mediated via the initiation of specific receptors that trigger multiple signaling cascades, including the activation of some protein kinases and the phosphorylation of their cytoskeletal targets. The role of the phosphorylation of myosin and actin-binding proteins in the thrombin-induced permeability of the endothelium and possible mechanisms of the regulation of the endothelium barrier function are discussed. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2003, vol. 29, no. 5; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: cytoskeleton, endothelial cell barrier function, thrombin