

НИИЭК ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» МЗ РФ
Лаборатория клеточной подвижности

На правах рукописи

ЩЕРБАКОВА
Ольга Владимировна

**БЕЛОК KRP КАК ИНГИБИТОР
ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ МИОЗИНА: УЧАСТИЕ В
РЕГУЛЯЦИИ СОКРАЩЕНИЯ ГЛАДКИХ МЫШЦ**

03.01.04 – Биохимия

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:

кандидат биологических наук, доцент

Воротников Александр Вячеславович

Научный консультант:

доктор биологических наук, профессор

Ширинский Владимир Павлович

Москва 2015

ОГЛАВЛЕНИЕ:

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	7
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	9
1. Основные принципы регуляции сокращения гладких мышц	9
1.1. Особенности структуры и регуляции гладкомышечного миозина	10
2. Механизмы регуляции фосфорилирования миозина	13
2.1. Киназа лёгких цепей миозина	13
2.1.1. Структура и свойства киназы лёгких цепей миозина	13
2.1.2. Регуляция киназы лёгких цепей миозина	15
2.2. Ca^{2+} -независимое фосфорилирование миозина	18
2.2.1. ZIP-киназа	21
2.2.2. ILK	24
2.3. Фосфатаза лёгких цепей миозина	27
2.3.1. Структура и свойства фосфатазы лёгких цепей миозина	27
2.3.2. Регуляция фосфатазы лёгких цепей миозина	29
3. KRP	31
3.1. Структура белка KRP и его свойства <i>in vitro</i>	32
3.2. Расслабление гладких мышц под действием KRP	34
3.3. Фосфорилирование KRP	36
4. Использование скинированных гладкомышечных волокон для исследования регуляции сократительной активности	37
ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ	40
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	41
Материалы	41
Методы	44
1. Молекулярно-биологические методы	44
1.1. Получение химически компетентных клеток <i>E. coli</i>	44
1.2. Трансформация бактериальных клеток	44
1.3. Выделение плазмидной ДНК из клеток <i>E. coli</i>	45
1.4. Бактериальная экспрессия рекомбинантных белков	45
2. Биохимические методы	46
2.1. Определение концентрации белков	46
2.2. Приготовление образцов тканей для электрофореза	46

2.3. Электрофоретическое разделение белков в полиакриламидном геле (ПААГ) по методу Лэммли	47
2.4. Электрофоретическое разделение белков в ПААГ в присутствии мочевины и глицерина	48
2.5. Иммуноблоттинг	48
2.6. Выделение белков	49
2.6.1. Выделение тяжёлого меромиозина (НММ).....	49
2.6.2. Выделение цГМФ-зависимой протеинкиназы (PKG).....	51
2.6.3. Выделение рекомбинантного KRP человека (wt-hKRP и ΔC-hKRP).....	52
2.6.4. Выделение рекомбинантного KRP курицы, содержащего С-концевой полигистидин (chiKRP-His ₆ , ΔN-chiKRP-His ₆ и ΔC-chiKRP-His ₆).....	53
2.6.5. Экспрессия и очистка GST-p44 ^{erk1} MAP-киназы	54
2.7. Получение фрагмента КЛЦМ с массой 61 кДа.....	54
2.8. Фосфорилирование KRP in vitro и его очистка от протеинкиназ	56
2.9. Фосфорилирование НММ под действием КЛЦМ	58
3. Физиологические методы исследования	59
3.1. Получение препарата taenia coli, скинированного Тритоном X-100	59
3.2. Измерение сократительной активности taenia coli	60
3.3. Измерение фосфорилирования KRP в волокнах в ходе сокращения, индуцированного микроцистином	61
3.4. Измерение дефосфорилирования KRP в волокнах taenia coli.....	62
4. Конфокальная микроскопия волокон taenia coli.....	63
5. Статистический анализ	64
РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТОВ.....	65
1. KRP ингибирует фосфорилирование НММ под действием киназы лёгких цепей миозина, лишённой KRP-домена	65
2. KRP тормозит развитие сокращения, индуцированного микроцистином	68
3. Фосфорилирование KRP под действием PKA/PKG и MAPK не влияет на его ингибиторный эффект	71
3.1. Фосфорилирование не влияет на ингибиторную активность KRP в условиях in vitro	72
3.2. Фосфорилирование не влияет на способность KRP ингибировать сокращение, индуцированное микроцистином	74
4. Влияние PKA и PKG на развитие сокращения, индуцированного микроцистином.....	79
4.1. PKA и PKG не влияют на сокращение, индуцированное микроцистином.....	79
4.2. Фосфорилированный KRP не изменяет эффекта PKA/PKG на сокращение, индуцированное микроцистином	80
5. Фосфорилирование KRP под действием PKA/PKG и MAPK не влияет на его способность расслаблять гладкие мышцы, сокращённые при субмаксимальной концентрации кальция.....	82
5.1. PKA, но не PKG вызывает расслабление скинированных волокон, сокращённых при субмаксимальной концентрации кальция	83

5.2. KRP вызывает расслабление сокращённых при субмаксимальной концентрации кальция волокон, но действие KRP не зависит от его фосфорилирования.....	86
5.3. PKG не усиливает действия KRP	89
5.4. KRP не усиливает действия PKA.....	91
6. Влияние KRP на сенситизацию Ca^{2+} -сокращения, вызванную ингибированием фосфатазы миозина.....	93
7. Удаление С-концевой последовательности KRP приводит к потере его регуляторного эффекта на сократительную активность мышц.....	95
7.1. С-концевая, но не N-концевая последовательность необходима для ингибиторного действия KRP in vitro	96
7.2. С-концевая последовательность необходима для ингибиторного действия KRP в модели сокращения, индуцированного микроцистином	98
7.3. Δ СКRP не вызывает расслабления гладкомышечных волокон, предсокращённых под действием Ca^{2+}	100
ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	102
1. Гипотетический механизм ингибирования фосфорилирования РЛЦ миозина белком KRP	102
2. Роль KRP в регуляции сократительной активности гладких мышц.....	105
3. Эффект KRP не регулируется фосфорилированием	108
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	109
ВЫВОДЫ.....	111
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	1122

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АТФ	аденозин-5'-трифосфат
ДАБ	3,3'-диаминобензидин
ДМСО	диметилсульфоксид
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ДСН	додецилсульфат натрия
ДТТ	1,4-дителиотреитол
кДНК	комплиментарная ДНК
КЛЦМ	киназа легких цепей миозина
ПААГ	полиакриламидный гель
РЛЦ	регуляторные легкие цепи
СЛЦ	существенные легкие цепи
Трис	трис (гидроксиметил) аминотетан
ТСБТ	трис-солевой буфер с Твин-20
ТХУ	трихлоруксусная кислота
ФЛЦМ	фосфатаза легких цепей миозина
ФМСФ	фенилметансульфонилфторид
ФСБ	фосфатно-солевой буфер
цАМФ	аденозин-3',5'-цикломонофосфат
цГМФ	гуанозин-3',5'-цикломонофосфат
ЭГТА	этиленгликольтетрауксусная кислота
ЭДТА	этилендиаминтетрауксусная кислота
AIM-1	Аврора/Ipl1p-родственная киназа (Aurora/Ipl1p-related kinase)
CaM	кальмодулин
CaMK	Ca ²⁺ /CaM-зависимая киназа (Ca ²⁺ /CaM-dependent protein Kinase)
CAPS	3-(циклогексиламино)-1-пропансульфоновая кислота
CPI-17	ингибиторный белок каталитической субъединицы фосфатазы типа I с массой 17 кДа, активируемый PKC (PKC-potentiated PP1 Inhibitory protein of 17 kDa)
DAPI	4',6-диамидино-2-фенилиндол

DAPK	киназа, ассоциированная со смертью (Death Associated Protein Kinase)
DEAE-сефароза	диэтиламиноэтилсефароза
Dlk	киназа, похожая на DAPK (DAP like kinase)
DPCC	дифенилкарбамилхлорид
GSK	киназа гликогенсинтетазы
GST	глутатион-S-трансфераза
HMM	тяжелый меромиозин
ILK	интегрин-связанная киназа (Integrin Linked Kinase)
IPTG	изопропил- β -D-тиогалактопиранозид
ILKAP	белок, ассоциированный с ILK
KRP	белок, родственник КЛЦМ (Kinase Related Protein)
LMM	лёгкий меромиозин
MAPK	митоген-активируемая протеинкиназа (Mitogen Activated Protein Kinase)
MAPKAP	протеинкиназа, активируемая MAPK (MAPK – activated protein kinase)
MEK	киназа, регулируемая митогенами и внеклеточными сигналами (Mitogen/Extracellular signal-regulated Kinase)
MES	2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота
MOPS	3-(N-морфолино)пропансульфоновая кислота
MRCK	киназа миотонической дистрофии, родственная киназе, связывающей Cdc42 (Myotonic dystrophy kinase Related Cdc42-binding Kinase)
MYPT	миозин-связывающая субъединица фосфатазы (Myosin Phosphatase Target Subunit)
M-RIP	белок, взаимодействующий с RhoA и ФЛЦМ (Myosin phosphatase-Rho Interacting Protein)
PAK	киназа, активируемая белком p21 (p21-activated protein kinase)
Par-4	Белок апоптозного ответа простаты – 4 (Prostate apoptosis response-4)
PI3K	фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат 3-киназа (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-Kinase)
PIP3	фосфатидилинозитол (3,4,5)-трисфосфат (phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate)
PKA	цАМФ-зависимая протеинкиназа

PKC	Ca ²⁺ -фосфолипид-зависимая протеинкиназа
PKG	цГМФ -зависимая протеинкиназа
ROCK	киназа, активируемая белком Rho, Rho-киназа (Rho-activated kinase)
RSK	киназа белка S6 рибосомы, с массой 90 кДа (p90 ribosomal S6 kinase)
SMTNL	белок, схожий со смузелинами (SMooTheliN-Like)
PVDF	поливинилиден-дифторидная мембрана
TPCK	L-(тозиламидо-2-фенил) этил хлорметил кетон
VIP	вазоактивный интестинальный пептид (Vasoactive Intestinal Peptide)
ZIPK	киназа, взаимодействующая с лейциновой молнией (Zipper Interacting Protein Kinase)
WT	белок дикого типа (wild type)

ВВЕДЕНИЕ

Гладкомышечные клетки являются основным компонентом стенок кровеносных сосудов и внутренних органов, и отвечают за динамические изменения диаметров сосудов и объёма полостей органов. Многие патологии связаны с нарушениями сократительной активности гладких мышц (Ogut and Brozovich, 2008), поэтому понимание процессов, лежащих в основе регуляции сокращения гладких мышц, представляется важным не только с теоретической, но и с практической точек зрения.

Считается общепринятым, что фосфорилирование регуляторных легких цепей (РЛЦ) миозина по Ser¹⁹ является необходимым условием для инициации сокращения гладких мышц. Фосфорилирование РЛЦ осуществляется киназой легких цепей миозина (КЛЦМ), которая активируется при повышении внутриклеточной концентрации Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) и связывании насыщенного кальцием кальмодулина с ферментом. Дефосфорилирование РЛЦ миозина, катализируемое фосфатазой легких цепей миозина (ФЛЦМ), приводит к расслаблению гладких мышц (Barany, 1996).

Гормональная регуляция сократительной активности гладких мышц осуществляется не только путем изменения $[\text{Ca}^{2+}]_i$, но и путем изменения чувствительности сократительного аппарата к ионам кальция. Это позволяет регулировать силу сокращения в зависимости от конкретных физиологических или патофизиологических условий. Патологические изменения чувствительности сократительного ответа к $[\text{Ca}^{2+}]_i$ приводят к развитию многих заболеваний, таких как гипертония (Wirth, 2010, Lee et al., 2004, Connolly and Aaronson, 2011, Cho et al., 2011), спазм сосудов (Miwa et al., 2005, Obara et al., 2005), нарушения перистальтики кишечника (Ozaki et al., 2005), а также других заболеваний (Kim et al., 2008). Поэтому понимание молекулярных механизмов регуляции сокращения мышц необходимо для разработки новых методов лечения патологий, связанных с нарушением функционирования гладких мышц.

Считается, что повышение чувствительности сократительного аппарата к Ca^{2+} (т.н. Ca^{2+} -сенситизация), осуществляется преимущественно благодаря ингибированию активности ФЛЦМ (Puetz et al., 2009). Кроме того, Ca^{2+} -сенситизация может осуществляться за счет фосфорилирования миозина неканоническими киназами, активируемыми при воздействии определённых агонистов. Такими неканоническими киназами миозина могут выступать так называемые ZIPK (Zipper Interacting Protein Kinase) и ILK (Integrin Linked Kinase) (Niino and Ikebe, 2001, Deng et al., 2001).

Некоторые гормоны и низкомолекулярные соединения (такие, например, как NO или VIP) могут активировать циклонуклеотид-зависимые протеинкиназы (PKA и PKG) и это приводит к уменьшению чувствительности сократительного аппарата к ионам кальция (т.н. Ca^{2+} -десенситизации). Механизмы Ca^{2+} -десенситизации могут состоять в восстановлении различными путями ранее подавленной активности ФЛЦМ (Murthy, 2006) или ингибировании ферментативной активности КЛЦМ (Kamm and Stull, 2001). Ещё одним известным Ca^{2+} -десенситизирующим агентом является белок KRP (Kinase Related Protein), который обнаружен преимущественно в фазных гладких мышцах (Krymsky et al., 2001). Другое название белка KRP – телокин, от греч. *telos* и англ. *kinase*, что означает буквально «хвост киназы» (Ito et al., 1989). KRP представляет собой независимо экспрессируемый С-концевой домен КЛЦМ с массой 17 кДа. KRP не обладает киназной активностью и связывается с миозином своим отрицательно-заряженным С-концевым участком. Высказано предположение, что KRP ингибирует активность киназы легких цепей миозина, конкурируя с её KRP-доменом за связывание с миозином (Shirinsky et al., 1993, Silver et al., 1997). Помимо этого в литературе есть данные, свидетельствующие о том, что даже при подавлении активности киназы легких цепей миозина под действием низкомолекулярных ингибиторов, KRP способен смещать равновесие в сторону дефосфорилированного миозина (Khromov et al., 2006). Таким образом, KRP может участвовать в расслаблении гладких мышц, как активируя фосфатазу легких цепей миозина, так и подавляя активность различных протеинкиназ, способных фосфорилировать миозин, и в частности не только собственно киназы легких цепей миозина, но и других неканонических протеинкиназ. Последнее предположение согласуется с тем фактом, что участки связывания регуляторной цепи миозина и KRP с тяжелой цепью миозина расположены в непосредственной близости друг от друга (Masato et al., 1997, Silver et al., 1997). Это позволяет предположить, что KRP способен затруднять доступ субстрата (регуляторных цепей миозина) для любых киназ, а не только для киназы легких цепей миозина. Эта гипотеза до последнего времени не подвергалась тщательной экспериментальной проверке.

Следует отметить, что в гладких мышцах KRP фосфорилируется по нескольким участкам (Krymsky et al., 2001). Так например, MAPK способна фосфорилировать Ser¹⁹ KRP, а цАМФ/цГМФ-зависимое расслабление коррелирует с фосфорилированием Ser¹³ KRP (Khapchaev et al., 2004). В то же время причинно-следственные связи между фосфорилированием KRP и расслаблением гладких мышц остаются практически не исследованными. Все сказанное делает целесообразным подробное исследование участия KRP в регуляции расслабления гладких мышц.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1. Основные принципы регуляции сокращения гладких мышц

В основе сокращения мышц лежит скольжение филаментов актина и миозина друг относительно друга. Это скольжение осуществляется за счёт энергии гидролиза АТФ благодаря циклическому взаимодействию миозина с актином, и генерации миозином тянущего усилия (Geeves and Holmes, 2005).

Особенность гладкомышечного миозина заключается в том, что фосфорилирование регуляторных цепей (РЛЦ) миозина (см. п. 1.1) является необходимым условием для активации АТФ-азы миозина, и, таким образом, для развития сокращения. Эта реакция фосфорилирования миозина осуществляется киназой лёгких цепей миозина (КЛЦМ), которая активируется при связывании комплекса Ca^{2+} - кальмодулина (CaM) (Kamm and Stull, 2001). Поэтому для инициации сокращения необходимо повышение концентрации свободного Ca^{2+} в цитоплазме ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). Это происходит в результате входа Ca^{2+} из внеклеточного пространства и/или высвобождения Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума при деполяризации клеточной мембраны или при воздействии агонистов. Расслабление наступает после удаления Ca^{2+} из цитоплазмы обратно в саркоплазматический ретикулум и/или во внеклеточное пространство благодаря функционированию Ca^{2+} -АТФаз (Berridge, 2008). Удаление кальция приводит к диссоциации комплекса Ca^{2+} /CaM-КЛЦМ и инактивации протеинкиназы. Фосфорилированный миозин дефосфорилируется фосфатазой лёгких цепей миозина (ФЛЦМ) (Hartshorne et al., 2004), что приводит к расслаблению.

Таким образом, повышение концентрации свободного кальция в цитоплазме в ответ на различные стимулы является основным условием инициации сокращения гладких мышц. Однако множество агонистов способны вызывать увеличение силы сокращения при заданном фиксированном значении $[\text{Ca}^{2+}]_i$. В то же время существуют соединения, которые повышают внутриклеточный уровень циклических нуклеотидов и вызывают расслабление гладких мышц не только за счёт снижения $[\text{Ca}^{2+}]_i$, но и за счёт снижения Ca^{2+} -чувствительности, так называемой Ca^{2+} -десенситизации (Pfitzer, 2001, Somlyo and Somlyo, 2003).

Это позволяет осуществлять подстройку силы сокращения мышцы в зависимости от её функции или конкретной физиологической ситуации. Так, например, фазные мышцы, образующие стенки пищевода, матки, мочевого пузыря, находятся, в основном, в расслабленном состоянии. Они периодически сокращаются в ответ на увеличение объёма полости и/или нейростимуляцию. В тоже время тонические мышцы,

образующие стенки сосудов или мышцы сфинктеров, наоборот, способны поддерживать длительное сокращение (Reho et al., 2014).

Тонкая регуляция силы и характера сокращения достигается множеством разнообразных способов. Однако все способы регуляции можно поделить на 3 основные группы:

1. Механизмы регуляции активности АТФ-азы миозина за счёт изменения степени фосфорилирования регуляторных лёгких цепей (РЛЦ) миозина;
2. Механизмы регуляции доступности актина для взаимодействия с миозином, которые осуществляются благодаря специальным регуляторным белкам, связанным с актином (кальдесмон и кальпонин);
3. Механизмы реорганизации цитоскелета гладкомышечных клеток (Kim et al., 2008).

Считается, что фосфорилирование РЛЦ миозина является необходимым и достаточным условием для развития сокращения, в то время как другие типы регуляции играют лишь модулирующую роль (Walsh, 1994, Vorotnikov et al., 2002). Далее мы подробно рассмотрим именно первую группу механизмов. Для этого необходимо прежде всего проанализировать некоторые особенности строения и свойств гладкомышечного миозина.

1.1. Особенности структуры и регуляции гладкомышечного миозина

Гладкомышечный миозин II типа представляет собой гексамер, состоящий из двух тяжёлых цепей (≈ 200 кДа) и двух пар лёгких цепей – существенных и регуляторных (17 кДа и 20 кДа, соответственно). На N-конце тяжёлой цепи располагается глобулярная «головка», обладающая АТФазной активностью и отвечающая за взаимодействие с актином. С-концевая часть тяжёлой цепи миозина представляет собой длинную α -спираль. С-концевые α -спирали двух тяжёлых цепей закручиваются друг относительно друга, и вместе образуют суперскрученную α -спираль. Эта часть молекулы миозина называется стержневой. Лёгкие цепи связываются с тяжёлыми в районе «шейки» миозина – участке молекулы, где стержневая часть переходит в глобулярную «головку» (Barany, 1996). Структура миозина схематично представлена на рис. 1.

Стержневые части молекул гладкомышечного миозина упорядоченно взаимодействуют друг с другом и образуют филаменты с боковой полярностью (Xu et al., 1996). Как уже отмечалось, в «головке» миозиновой молекулы сосредоточен моторный домен. Здесь же расположены центры связывания АТФ и актина. Гидролизую АТФ, «моторный» домен способен изменять конформацию и генерировать тянущее усилие (Geeves and Holmes, 2005, Sweeney and Houdusse, 2010).

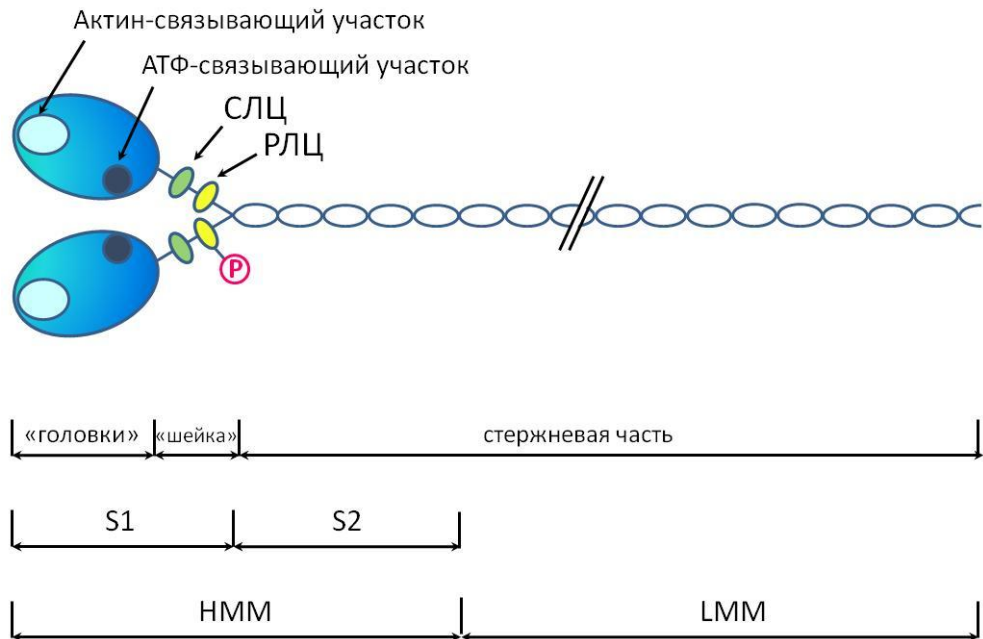


Рис. 1. Схема строения гладкомышечного миозина II типа. Миозин представляет собой гексамер, состоящий из 2-х тяжелых цепей, и 2-х пар легких цепей: существенных (СЛЦ) и регуляторных (РЛЦ). N-концевые части тяжелых цепей образуют моторные домены («головки»), С-концевые части образуют суперскрученную α -спираль, стержневую часть молекулы. СЛЦ (обозначено зеленым) и РЛЦ (обозначено желтым) связываются с тяжелыми цепями миозина в районе «шейки». «Р» обозначает фосфорилирование РЛЦ. При воздействии химотрипсина миозин расщепляется на тяжелый меромиозин (heavy meromyosin, НММ) и легкий меромиозин (light meromyosin, LMM). При воздействии трипсина и папаина на миозин образуются субфрагменты 1 и 2 (S1 и S2) и LMM.

Молекула миозина может находиться в двух различных конформациях: в развёрнутой (с коэффициентом седиментации 6S), способной к образованию филаментов, и в свёрнутой (10S) конформации (см. рис. 2). При физиологических концентрациях солей и АТФ, равновесие смещается в сторону 10S конформации (Trybus et al., 1982). Когда миозин находится в свёрнутой конформации, «шейка» миозина взаимодействует с участком, расположенным в стержневой части молекулы. При этом миозин не активен и не способен собираться в филаменты. Гладкомышечный миозин переходит из 10S в 6S конформацию при фосфорилировании его регуляторных лёгких цепей (РЛЦ) (Craig et al., 1983). Разворачивание молекулы миозина может происходить и при взаимодействии миозина с белком KRP, который связывается с «шейкой» миозина (Shirinsky et al., 1993), или с белком p38, который взаимодействует со стержневой частью молекулы миозина (Okagaki et al., 2000).

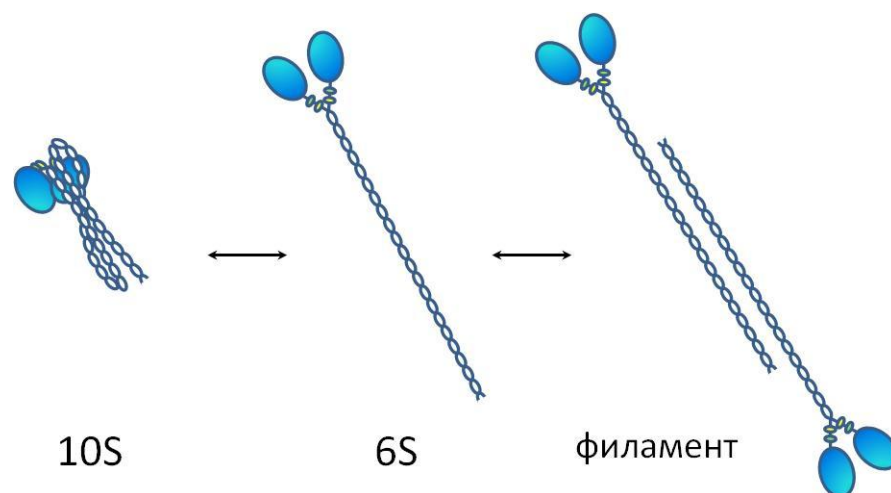


Рис. 2. Схематичное изображение конформационных переходов гладкомышечного миозина II типа. В свёрнутой 10S конформации участок молекулы миозина, расположенный на расстоянии одной трети длины молекулы от С-конца, взаимодействует с одной из РЛЦ миозина. В развёрнутой 6S конформации миозин способен образовывать филаменты.

Даже если миозин находится в развёрнутом состоянии, для его активации необходимо фосфорилирование РЛЦ. Когда ни одна из РЛЦ миозина не фосфорилирована, две головки миозина взаимодействуют друг с другом: актин-связывающий домен одной головки ассоциирован с конвертерным доменом другой головки. Это взаимодействие блокирует связывание с актином одной головки и АТФ-азную активность другой головки (Wendt et al., 2001, Liu et al., 2003, Burgess et al., 2007). Фосфорилирование приводит к изменению конформации РЛЦ. Это, по-видимому, приводит к изменению характера взаимодействия РЛЦ с существенными лёгкими цепями и тяжёлыми цепями миозина (Ni et al., 2012, Espinoza-Fonseca et al., 2014, Taylor et al., 2014). Вследствие этого снимается ингибирующий эффект взаимодействия двух головок миозина (Baumann et al., 2012). Фосфорилирование обеих РЛЦ миозина полностью восстанавливает актин-зависимую активность АТФ-азы миозина и делает возможным осуществление его моторной функции (Sellers, 1991). Фосфорилирование лишь одной из РЛЦ достаточно для частичной активации миозина. Однако при этом уровень активности монофосфорилированного миозина ниже, чем миозина, фосфорилированного по обоим регуляторным цепям (Ellison et al., 2000, Rovner et al., 2006, Tanaka et al., 2008, Walcott et al., 2009).

2. Механизмы регуляции фосфорилирования миозина

Степень фосфорилирования РЛЦ миозина определяется балансом активностей ферментов, осуществляющих фосфорилирование и дефосфорилирование РЛЦ. Принято считать, что основным ферментом, который осуществляет фосфорилирование РЛЦ миозина, является Ca^{2+} /CaM-зависимая киназа лёгких цепей миозина, КЛЦМ, так называемая каноническая киназа миозина. Помимо этого, РЛЦ миозина в гладких мышцах могут фосфорилироваться и целым рядом альтернативных киназ, активность которых может зависеть как от концентрации кальция, так и от действия различных гормональных стимулов (Ihara and Macdonald, 2007, Takeya et al., 2014). Дефосфорилирование РЛЦ осуществляется единственной фосфатазой лёгких цепей миозина, ФЛЦМ. В соответствии с этим, механизмы регуляции фосфорилирования РЛЦ миозина можно подразделить на 3 группы: 1) механизмы регуляции активности КЛЦМ; 2) механизмы регуляции активности неканонических киназ миозина; 3) механизмы регуляции активности ФЛЦМ.

2.1. Киназа лёгких цепей миозина

2.1.1. Структура и свойства киназы лёгких цепей миозина

Киназа лёгких цепей миозина (КЛЦМ) – это Ca^{2+} /кальмодулин-зависимый фермент, относящийся к классу Ser/Thr протеинкиназ. КЛЦМ у млекопитающих кодируется тремя генами *mylk1*, *mylk2* и *mylk3* (Herring et al., 2006, Takashima, 2009). *Mylk2* и *mylk3* кодируют КЛЦМ скелетных мышц и сердца, соответственно (Zhi et al., 2005, Chan et al., 2008). Продукты гена *mylk1*, в отличие от двух других генов, экспрессируются повсеместно, в том числе в гладких, сердечных и скелетных мышцах, а также в немышечных клетках млекопитающих (Gallagher et al., 1995, Birukov et al., 1998, Herring et al., 2000, Kamm and Stull, 2001). Ген *mylk1* кодирует по крайней мере 3 белковых продукта: изоформу КЛЦМ с массой 220 кДа (млекопитающие) или 210 кДа (птицы), изоформу КЛЦМ с массой 130 кДа (млекопитающие) или 108 кДа (птицы), и белок KRP с массой 17 кДа, не обладающий киназной активностью (см. гл. 3 разд. «Обзор литературы»)¹. Транскрипция мРНК продуктов генетического локуса осуществляется с независимых промоторов, расположенных в интронах генетического локуса КЛЦМ. В гладких мышцах преимущественно экспрессируется «короткая» изоформа КЛЦМ с массой 130(108) кДа (Хапчаев и соавт., 2003, Herring et al., 2006). Далее, говоря о КЛЦМ, мы будем подразумевать именно эту изоформу фермента.

¹ Молекулярные массы приведены для КЛЦМ млекопитающих

КЛЦМ играет ключевую роль в регуляции сокращения гладких мышц. Так, у мышей, нокаутных по КЛЦМ, в значительной степени нарушена функция гладких мышц, как фазных, так и тонических. Оказалось, что избирательный нокаут КЛЦМ в фазных мышцах желудочно-кишечного тракта или тонических мышцах дыхательных путей в 5-6 раз снижет сократительный ответ и степень фосфорилирования РЛЦ (He et al., 2008, Zhang et al., 2010).

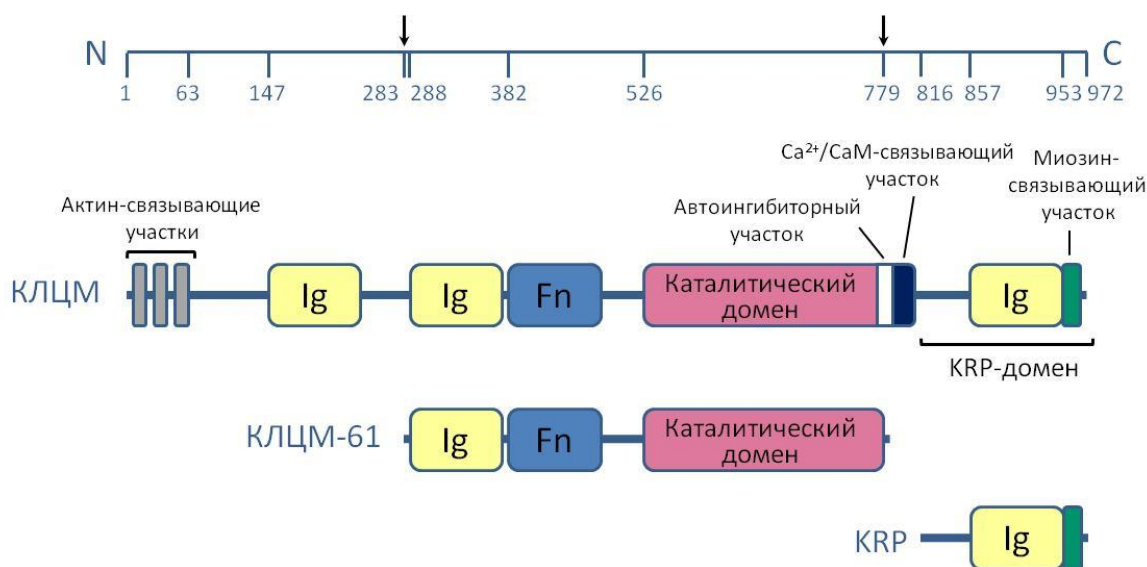


Рис. 3. Схема доменной организации КЛЦМ и KRP. Представлена схема строения КЛЦМ курицы с массой 108 кДа, её протеолитического фрагмента с массой 61 кДа и KRP с массой 17 кДа. КЛЦМ курицы содержит участки связывания актина и миозина, 3 иммуноглобулино (Ig)-подобных домена, фибронектино (Fn)-подобный домен и каталитический домен. Каталитический домен содержит регуляторные (автоингибиторный и $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -связывающий) участки. Продукт трипсинолиза КЛЦМ содержит каталитический домен без регуляторных участков, один Ig-подобный и один Fn-подобный домен. KRP содержит один Ig-подобный домен и участок связывания миозина. Сверху приведена шкала с номерами аминокислот, соответствующих границам структурных элементов КЛЦМ курицы, описанным ранее (Olson et al., 1990). Стрелками отмечены участки действия трипсина.

Доменная организация КЛЦМ показана на рис. 3. В N-концевой области КЛЦМ расположен актин-связывающий участок, образованный тремя DFRXXL мотивами. У млекопитающих, в отличие от птиц, сразу за актин-связывающим участком начинаются KRPV/A повторы, состоящие из 12 остатков. Их функция в настоящий момент неясна. Далее, продвигаясь к С-концу молекулы, расположены иммуноглобулиновые домены (Ig1 и Ig2). Есть сведения о том, что они также связывают актин. После иммуноглобулиновых доменов расположен фибронектиновый домен (Fn; тип 3), с неизвестной функцией. Каталитический домен локализуется в центральной части молекулы КЛЦМ и содержит участки связывания РЛЦ и АТР. Регуляторный сегмент КЛЦМ расположен рядом с

каталитическим доменом, вблизи от С-концевой части молекулы. Он включает в себя автоингибиторный, и Ca^{2+} /кальмодулин-связывающий участки (Хапчаев и соавт., 2003, Hong et al., 2011). С-концевой домен КЛЦМ содержит в своем составе участок связывания миозина. Этот фрагмент молекулы, соответствует белку KRP (Gallagher and Herring, 1991, Collinge et al., 1992, Yoshikai and Ikebe, 1992). Далее для этого домена мы будем использовать название KRP-домен. Для исследования свойств КЛЦМ используют различные протеолитические фрагменты. В частности, фрагмент с массой 61 кДа, полученный в результате трипсинолиза (см. рис. 3), который является активным даже не будучи связанным с комплексом Ca^{2+} /CaM (Ikebe et al., 1987).

КЛЦМ обладает высокой специфичностью и фосфорилирует РЛЦ миозина II по Ser^{19} (Pearson et al., 1984). В условиях *in vitro* КЛЦМ может фосфорилировать РЛЦ миозина по Thr^{18} , однако эта реакция протекает медленнее, чем фосфорилирование по Ser^{19} , и для этого требуются более высокие концентрации КЛЦМ (Ikebe and Hartshorne, 1985). Поэтому считается маловероятным, что КЛЦМ фосфорилирует Thr^{18} в условиях *in vivo* (Takeya et al., 2014). Кинетические параметры реакции фосфорилирования, определённые разными авторами для изолированных РЛЦ миозина, слегка варьируют. Согласно данным базы BRENDA², $K_m^{\text{РЛЦ}}$ и $K_m^{\text{АТФ}}$ составляют ~5–20 μM и 0,05 – 0,2 мМ соответственно, $V_{\max}$ лежит в пределах 2–20 $\mu\text{моль/мин*мг}$.

2.1.2. Регуляция киназы лёгких цепей миозина

Основным способом регуляции активности КЛЦМ является изменение $[\text{Ca}^{2+}]_i$. При низких значениях $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($p\text{Ca} \geq 8$) автоингибиторный участок КЛЦМ, который представляет собой псевдосубстратную последовательность, взаимодействует с каталитическим центром. Это препятствует связыванию РЛЦ миозина с каталитическим центром КЛЦМ и таким образом делает невозможным фосфорилирование РЛЦ. Повышение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($p\text{Ca} \leq 7$) делает возможным образование комплекса Ca^{2+} /CaM (Walsh, 1994). Связывание Ca^{2+} /CaM с регуляторным сегментом приводит к вытеснению автоингибиторного участка из каталитического центра, восстанавливая тем самым протеинкиназную активность КЛЦМ (Gallagher et al., 1997).

Таким образом, повышение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ является ключевым фактором для активации КЛЦМ. Важно отметить, что эффективность фосфорилирования РЛЦ миозина под действием активной КЛЦМ может модулироваться и за счёт иных механизмов. В частности, КЛЦМ подвергается фосфорилированию по нескольким сайтам. При

² <http://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=2.7.11.18>

определённых условиях, фосфорилирование КЛЦМ может иметь регуляторное значение. Помимо этого, в фазных мышцах КЛЦМ может ингибироваться продуктом своего же генетического локуса, белком KRP (см. разд. 3 гл. «Обзор литературы»).

Модуляция активности КЛЦМ путем фосфорилирования. Молекула КЛЦМ содержит несколько участков фосфорилирования: 1) участок А, который находится в $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -связывающем участке; 2) участок В, который расположен в KRP-домене киназы; 3) несколько аминокислотных остатков в актин-связывающем участке и между двумя иммуноглобулиновыми доменами в N-концевой части молекулы (Хапчаев и соавт., 2003).

Участок А КЛЦМ фосфорилируется рядом протеинкиназ в условиях *in vitro*: цАМФ-зависимой протеинкиназой (PKA) (Conti and Adelstein, 1981), цГМФ-зависимой протеинкиназой (PKG) (Nishikawa et al., 1984), PKC (Nishikawa et al., 1985), $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -зависимой протеинкиназой II типа (CaMKII) (Hashimoto and Soderling, 1990) и p21-активируемой киназой 2 (PAK2) (Goeckeler et al., 2000). Фосфорилирование сайта А КЛЦМ (по Ser^{815})³ приводит к увеличению константы диссоциации $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ в 10 раз. Другими словами, необходимая для активации КЛЦМ концентрация комплекса $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ увеличивается, и это, соответственно, приводит к тому, что фосфорилированная КЛЦМ при заданной концентрации Ca^{2+} обладает меньшей активностью, чем нефосфорилированный фермент. Следует отметить, что, если КЛЦМ уже находится в комплексе с $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$, то фосфорилирование по участку А оказывается невозможным (Conti and Adelstein, 1981).

В связи с тем, что участок А КЛЦМ фосфорилируется цАМФ- и цГМФ-зависимыми протеинкиназами, было предположено, что этот механизм участвует в циклонуклеотид-зависимом расслаблении гладких мышц (de Lanerolle et al., 1984). Однако это предположение пока не получило экспериментального подтверждения, так как при активации аденилатциклазы, фосфорилирование КЛЦМ происходило по другому участку, и активность КЛЦМ не изменялась (Miller et al., 1983, Stull et al., 1990, Van Riper et al., 1995). Поэтому вопрос о физиологической роли фосфорилирования сайта А КЛЦМ остаётся открытым.

Сайт В КЛЦМ фосфорилируется под действием ряда протеинкиназ, при этом считается, что в состав сайта В входит несколько близко расположенных остатков. Например, установлено, что протеинкиназа PAK фосфорилирует КЛЦМ

³ Здесь и далее, если не указано иное, нумерация аминокислотных остатков приведена для КЛЦМ курицы

предположительно по Ser⁸²⁷, PKA и PKG – по Ser⁸²⁸, киназа гликогенсинтазы 3 типа (GSK3) – по Ser⁸³¹, а MAP-киназа – по Ser⁸³⁴ (Хапчаев и соавт., 2003). Фосфорилирование остатка Ser⁸²⁸ КЛЦМ под действием как PKA, так и PKG не влияет на активность КЛЦМ (Conti and Adelstein, 1981, Nishikawa et al., 1984). Протеинкиназы PAK и MAPK изменяют активность КЛЦМ в условиях *in vitro* (Sanders et al., 1999, Хапчаев, 2004). Однако до сих пор не показано, что фосфорилирование участка В КЛЦМ этими или другими протеинкиназами играет какую-то роль в регуляции сокращения гладкой мускулатуры. При этом, практически весь фосфат, связанный с КЛЦМ *in vivo*, содержится в участке В (Vorotnikov et al., 2002). Участок В расположен в KRP-домене киназы, поэтому фосфорилируется и в белке KRP, причём, уровень фосфорилирования KRP в гладких мышцах достаточно высок (Krymsky et al., 2001). В этой связи, можно предположить, что физиологическое значение фосфорилирования сайта В связано именно с функцией белка KRP (см. разд. 3 гл. «Обзор литературы»).

Фосфорилирование аминокислотных остатков в N-концевой части молекулы КЛЦМ, возможно, играет роль в связывании КЛЦМ с актиновыми филаментами. Так, например, установлено, что фосфорилирование Thr⁴³, расположенного в актин-связывающем участке КЛЦМ, и катализируемое MAP киназой, снижает связывание КЛЦМ с актином и миофиламентами в условиях *in vitro* (Хапчаев, 2004).

Регуляция КЛЦМ белком KRP. Как уже было сказано выше, КЛЦМ содержит 2 центра связывания с субстратом, один из которых расположен в каталитическом домене, а другой в С-концевом KRP-домене. KRP-домен КЛЦМ связывается с нефосфорилированным миозином в районе «шейки». Удаление KRP-домена КЛЦМ увеличивает K_m для миозина почти в 3 раза, по сравнению с полноразмерным белком (с 7 до 22 μM). При этом удаление этого участка не влияет на K_m для изолированных цепей. Все это указывает на то, что С-концевой KRP-домен увеличивает активность КЛЦМ за счёт облегчения связывания КЛЦМ с субстратом (Numata et al., 2001). Белок KRP связывается с миозином в том же самом участке, что и KRP-домен КЛЦМ (Masato and Numata, 1997, Silver et al., 1997). Предполагается, что белок KRP вытесняет KRP-домен КЛЦМ с «шейки» миозина, в результате чего КЛЦМ может связываться с РЛЦ миозина только своим каталитическим доменом. Действительно, KRP ингибирует фосфорилирование РЛЦ в составе миозина, при этом не влияя на фосфорилирование изолированных РЛЦ (Collinge et al., 1992, Shirinsky et al., 1993). Это указывает на необходимость связывания KRP с миозином для ингибирования КЛЦМ. Было высказано предположение, что KRP является специфичным ингибитором КЛЦМ, который

конкурирует с KRP-доменом КЛЦМ за связывание с миозином (Shirinsky et al., 1993, Silver et al., 1997). Тем не менее, детали этого механизма до последнего времени оставались неисследованными.

2.2. Ca^{2+} -независимое фосфорилирование миозина

Ca^{2+} /CaM-зависимая киназа лёгких цепей миозина играет ключевую роль в фосфорилировании РЛЦ в гладких мышцах, инициации и развитии сокращения. Однако при низких значениях $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($\text{pCa} > 8$), когда КЛЦМ неактивна, степень фосфорилирования РЛЦ не равна нулю. При этом сокращение гладкой мускулатуры поддерживается на определённом базальном уровне. Степень фосфорилирования РЛЦ в покоей мышце составляет примерно 15-30% для разных типов волокон (Ratz, 2011). Предполагается, что базальное фосфорилирование РЛЦ миозина обеспечивается балансом активностей альтернативных, то есть отличных от КЛЦМ, Ca^{2+} -независимых киназ миозина и ФЛЦМ (Ihara et al., 2007б). Активность этих протеинкиназ выявляется в присутствии ингибиторов фосфатаз 1 и 2 типа, таких как микроцистин-LR (Weber et al., 1999, Kureishi et al. 1999), ооадаевая кислота (Obara et al., 1989) или каликулин А (Ishihara et al., 1989, Suzuki and Itoh, 1993). При добавлении этих ингибиторов к волокнам (в среде с $\text{pCa} > 8$), развивается сокращение. Оно опосредовано киназной активностью, так как стауроспорин, общий ингибитор всех протеинкиназ, ингибирует это сокращение. В то же время, специфичные ингибиторы канонической Ca^{2+} /CaM-зависимой КЛЦМ, такие как вортманин и другие, не влияют на это сокращение. Это говорит о том, что в Ca^{2+} -независимом сокращении, вызванном ингибиторами фосфатаз, участвует не КЛЦМ, а другие неканонические киназы миозина (Weber et al., 1999, Wilson et al., 2005).

Был выявлен ряд протеинкиназ, отличных от КЛЦМ, и при этом способных фосфорилировать РЛЦ миозина. Известные на настоящий момент киназы, которые фосфорилируют Ser^{19} РЛЦ миозина и способные таким образом активировать миозин, приведены в табл. 1. Все эти «неканонические» киназы РЛЦ миозина, в отличие от КЛЦМ, обладают широкой специфичностью и способны фосфорилировать не только РЛЦ, но и другие белки, участвующие в регуляции гладких мышц. Поэтому вклад «неканонических» киназ в регуляцию сокращения носит комплексный характер, и прямое фосфорилирование РЛЦ является далеко не единственным и основным механизмом. Так, например, показано, что активация таких «неканонических» киназ РЛЦ, как CaMKII (Kim et al., 2000) и PAK (Van Eyk et al., 1998) приводит к развитию сокращения гладких мышц. Однако в этом случае сокращение обусловлено не прямым фосфорилированием РЛЦ миозина указанными киназами, а опосредовано фосфорилированием других регуляторных

белков. Экспериментальные свидетельства участия в развитии Ca^{2+} -независимого сокращения гладких мышц за счёт прямого фосфорилирования РЛЦ имеются в настоящий момент лишь для ILK (Deng et al., 2001), ZIPK (Niirö and Ikebe, 2001) и ROCK (Kureishi et al., 1997). ROCK при введении её в волокна вызывает сокращение, которое сопровождается фосфорилированием РЛЦ Ser¹⁹ (Kureishi et al., 1997). Тем не менее, было многократно показано, что сокращение, вызванное ингибитором фосфатазы (микроцистином-LR), не подавляется специфичными ингибиторами ROCK (Kureishi et al., 1999, Deng et al., 2001, Wilson et al., 2005 и др.). Это означает, что ROCK не участвует в сокращении, индуцированном микроцистином. Скорее всего, участие ROCK в регуляции мышечного сокращения сводится к ингибированию ФЛЦМ, а не к прямому фосфорилированию РЛЦ (см. разд. 2.3). Поэтому оставшимися кандидатами на роль киназ, которые опосредуют сокращение, индуцированное микроцистином, являются ILK и ZIPK (Ihara and Macdonald, 2007). Далее, мы подробнее рассмотрим эти киназы (см. разд. 2.2.1-2). Однако стоит отметить, что помимо ILK и ZIPK в сокращении, индуцированном микроцистином могут участвовать другие, неисследованные до последнего времени киназы РЛЦ миозина.

Интересно, что индуцированное микроцистином сокращение сопровождается фосфорилированием РЛЦ не только по Ser¹⁹, но и по Thr¹⁸ (Weber et al., 1999). В гладких мышцах сосудов в ряде патологических ситуаций выявлено фосфорилирование РЛЦ по обоим участкам (Takeya et al., 2014). При этом наблюдается прямая зависимость повышенной сократимости и фосфорилирования по обоим участкам. Установлено, что, уровень дифосфорилирования РЛЦ в спазмированных коронарной и феморальной артерии повышен по сравнению с неспазмированными сосудами (Harada et al., 1995, Katsumata et al., 1997). Помимо этого, фосфорилирование РЛЦ миозина по двум участкам было выявлено при спазме сосудов головного мозга (Obara et al., 2005), гиперплазии интимы (Seto et al., 1993) и других патологиях. Таким образом, «неканонические» киназы, которые фосфорилируют Ser¹⁹ и Thr¹⁸ с одинаковой эффективностью, в том числе ILK и ZIPK, могут участвовать в развитии ряда патологий.

Таблица 1. Киназы регуляторных лёгких цепей миозина.

Киназы	Характеристики фосфорилирования РЛЦ			Активатор	Ссылка
	Сайт	Кинетические параметры	Показано <i>in vivo</i>		
КЛЦМ	Ser ¹⁹ >> Thr ¹⁸	$K_m = 5-12 \mu M$ $K_{cat} = 21-62 c^{-1}$	да	Ca ²⁺ /CaM	Hong et al., 2011
Цитрон киназа	Ser ¹⁹ = Thr ¹⁸	$K_m = 7 \mu M$ $K_{cat} = 0,3 c^{-1}$	да	RhoA	Yamashiro et al., 2003
AIM-1 ⁴	Ser ¹⁹	н.д. ⁵	да		Murata-Hori et al., 2000
CaMKI ⁶	Ser ¹⁹	$K_m = 26 \mu M$ $K_{cat} = 1,7 c^{-1}$	да	Ca ²⁺ /CaM	Suizu et al., 2002
CaMKII ⁷	Ser ¹⁹	н.д.	н.д.	Ca ²⁺ /CaM	Edelman et al., 1990
DAPK ⁸	Ser ¹⁹ = Thr ¹⁸	$K_m = 36 \mu M$ $K_{cat} = 0,06 c^{-1}$	да	Ca ²⁺ /CaM	Jin et al., 2001
ILK	Ser ¹⁹ = Thr ¹⁸	н.д.	да	PIP3 ⁹	Deng et al., 2001
MAPKAP2 ¹⁰	Ser ¹⁹	н. д.	н.д.	MAPK	Komatsu and Hosoya, 1996
MRCK α ¹¹	Ser ¹⁹	н. д.	н. д.		Leung et al., 1998
PAK2	Ser ¹⁹	$K_m = 12 \mu M$ $K_{cat} = 0,2 c^{-1}$	да	Cdc42 Rac	Chew et al., 1998
PAK3	Ser ¹⁹	н. д.	н. д.	Cdc42 Rac	Van Eyk et al., 1998
RSK2 ¹²	Ser ¹⁹	н. д.	н. д.		Suizu et al., 2000
ROCK ¹³	Ser ¹⁹ > Thr ¹⁸	$K_m = 3 \mu M$ $K_{cat} = 0,3 c^{-1}$	да	RhoA	Amano et al., 1996
ZIPK-L	Ser ¹⁹ = Thr ¹⁸	$K_m = 1-10 \mu M$ $K_{cat} = 0,2-0,7 c^{-1}$	да		Niir and Ikebe, 2001 Murata-Hori et al., 2001
ZIPK-S	Ser ¹⁹ = Thr ¹⁸	$K_m = 73 \mu M$ $K_{cat} = 0,8 c^{-1}$	н. д.		Takamoto et al., 2006
ZIP-like киназа	Ser ¹⁹ = Thr ¹⁸	$K_m = 53 \mu M$ $K_{cat} = 2 \times 10^{-2} c^{-1}$	да		Borman et al., 2002

⁴ AIM-1, (Aurora/Ipl1p-related kinase) – Аврора/Ipl1p-родственная киназа

⁵ Н.д. – нет данных

⁶ CaMKI, Ca²⁺/CaM-dependent protein Kinase I - Ca²⁺/CaM-зависимая киназа 1

⁷ CaMKII, Ca²⁺/CaM-dependent protein kinase II- Ca²⁺/CaM-зависимая киназа 2

⁸ DAPK, Death associated protein kinase – киназа, ассоциированная со смертью

⁹ PIP3, phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate – фосфатидилинозитол (3,4,5)-трисфосфат

¹⁰ MAPKAP2, MAPK-activated protein kinase 2 – протеинкиназа, активируемая MAPK 2

¹¹ MRCK (myotonic dystrophy kinase related Cdc42-binding kinase) – киназа миотонической дистрофии, родственная киназе, связывающей Cdc42

¹² RSK2, p90 ribosomal S6 kinase-2 – киназа белка S6 рибосомы, с массой 90 кДа

¹³ ROCK, Rho-activated kinase – киназа, активируемая белком Rho, Rho-киназа

2.2.1. ZIP-киназа

ZIP-киназа (Zipper-Interacting Protein Kinase – киназа, взаимодействующая с лейциновой молнией; другие названия: DAPK3; Dlk, DAP like kinase) принадлежит семейству Ca^{2+} /CaM-зависимых Ser/Thr протеинкиназ, подсемейству DAP-киназ, которые по структуре своего каталитического центра, несомненно, принадлежат семейству Ca-CaM-зависимых протеинкиназ, но некоторые из них утратили способность регулироваться кальцием и кальмодулином.. ZIP-киназа задействована в регуляции клеточного гомеостаза, в процессах деления, клеточной гибели и сокращении гладких мышц (Usui et al., 2014).

ZIPK с молекулярной массой 54 кДа (ZIPK-L, 448-454 аминокислотных остатков. для разных видов) экспрессируется во многих органах и тканях, в том числе и в гладких мышцах (аорта, другие артерии, портальная вена, кишечник, желудок) (Kögel et al., 1998, Kawai et al., 1998, Niiro and Ikebe, 2001, Endo et al., 2004, Vetterkind and Morgan, 2009). В мочевом пузыре также найдена короткая изоформа ZIPK без лейциновой молнии (ZIPK-S) с молекулярной массой 37 кДа (322 аминокислотных остатков). Последовательность аминокислот ZIPK-S идентична N-концевой последовательности ZIPK-L за исключением того, что на C-конце ZIPK-S расположена уникальная последовательность из 10 аминокислот (Takamoto et al., 2006) (см. рис. 4). Также, в ряде гладкомышечных тканей (мочевой пузырь, желудок, аорта, каудальная артерия) была найдена киназа с кажущейся массой 32 кДа, ассоциированная в комплексе с ФЛЦМ, которая получила название ZIP-like киназа (MacDonald et al., 2001a). Эта киназа детектируется антителами к ZIPK-L, и, согласно результатам секвенирования пептидов, совпадает с ZIPK-L в отсеквенированных участках последовательности. ZIP-like киназа, как и ZIPK-S не содержит лейциновой молнии (MacDonald et al., 2001a, Borman et al. 2002, Borman et al., 2007). Остаётся невыясненным, является ли ZIP-like киназа независимо экспрессирующейся изоформой ZIP-киназы, или её протеолитическим фрагментом (Endo et al., 2004). Неясно, также, соответствует ли эта форма независимо экспрессирующейся ZIPK-S (Takamoto et al., 2006).

Доменная организация ZIP-киназы схематично представлена на рис.4. На N-конце молекулы расположен протеинкиназный домен, гомологичный каталитическому домену DAPK на 80%, а КЛЦМ на 49% (Kawai et al., 1998, Kögel et al., 1998). У ZIPK имеются нефункциональные гомологи автоингибиторной последовательности (273-342aa) и Ca^{2+} /CaM-связывающего участка КЛЦМ. В отличие от гомологичных участков последовательности КЛЦМ, они не принимают участия в регуляции активности ZIP-

киназы. Киназный домен содержит уникальную петлю, преимущественно состоящую из основных аминокислот (примерно с 50 по 60 аа), которая является отличительным признаком подсемейства DAP-киназ (Tereshko et al., 2001). На С-конце молекулы расположена лейциновая молния, которая и дала название ZIP-киназе (Kawai et al., 1998). Помимо этого ZIP-киназа содержит в своей структуре 4 сигнальных последовательности, определяющих ядерную локализацию (NLS-последовательности) (Kögel et al., 1998)

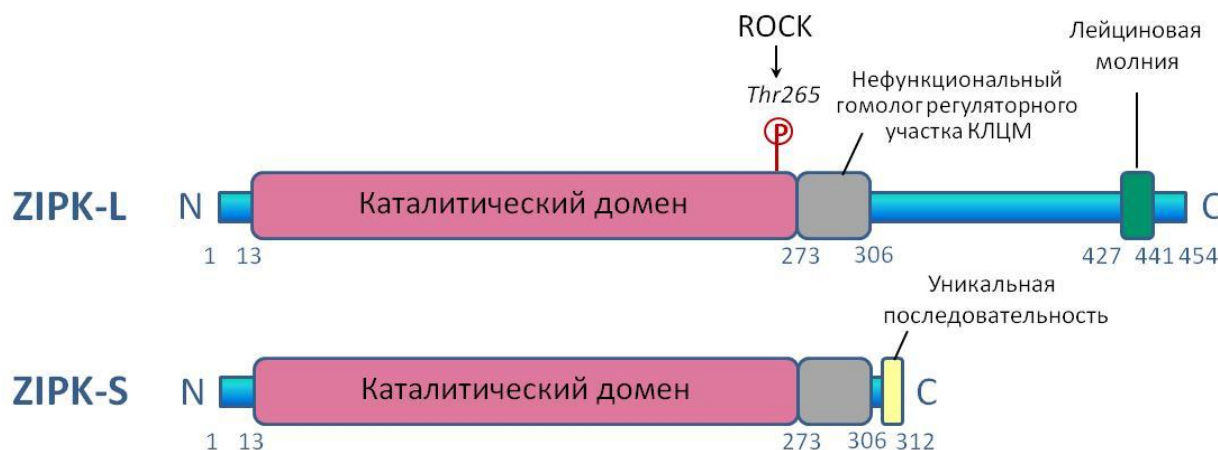


Рис. 4. Схема доменной организации ZIPK. Представлена схема ZIPK-L и ZIPK-S человека с массой 54 кДа и 37 кДа, соответственно. Отмечен участок фосфорилирования ZIP-киназы Rho-киназой, в результате которого происходит активация ZIPK. Указаны номера аминокислот, соответствующих границам структурных элементов ZIPK.

ZIP-киназа $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ независимо фосфорилирует РЛЦ в составе миозина, что приводит к активации миозина. В отличие от КЛЦМ, которая практически не фосфорилирует РЛЦ по Thr¹⁸, ZIP-киназа фосфорилирует как Ser¹⁹, так и Thr¹⁸ РЛЦ (Niiro and Ikebe, 2001). В связывании с миозином участвует непосредственно каталитический домен ZIPK. После фосфорилирования, связывание ZIPK с миозином ослабляется (Takamoto et al., 2006).

ZIPK осуществляет регуляцию фосфорилирования РЛЦ не только за счёт прямого фосфорилирования РЛЦ, но и за счёт ингибирования ФЛЦМ. ZIPK ингибирует ФЛЦМ, напрямую фосфорилируя регуляторную субъединицу фосфатазы (Borman et al., 2002), или же опосредованно, фосфорилируя белки-регуляторы активности фосфатазы: CPI-17 и Par-4 (MacDonald et al., 2001b, Vetterkind and Morgan, 2009). Более подробно регуляция ФЛЦМ под действием ZIP-киназы будет рассмотрена разд. 2.3.

При введении в скинированные, то есть лишённые наружной мембраны, гладкомышечные волокна, ZIPK вызывает Ca^{2+} -независимое сокращение. При этом,

мутантная каталитически неактивная форма ZIPK не вызывает сокращения (Borman et al., 2007). Развитие сокращения сопровождается увеличением фосфорилирования как Ser¹⁹ РЛЦ миозина, так и Thr⁶⁹⁶ регуляторной субъединицы ФЛЦМ (Niiro and Ikebe, 2001, Borman et al., 2002, Moffat et al., 2011). Таким образом, увеличение степени фосфорилирования Ser¹⁹ РЛЦ может происходить как за счёт фосфорилирования РЛЦ непосредственно ZIP-киназой, так и за счёт ингибирования ФЛЦМ.

Исследование участия ZIPK в сокращении, индуцированном микроцистином, которое исключает регуляцию фосфатазы, стало возможным после обнаружения специфического ингибитора ZIP-киназы и родственной ей киназы DAPK. Низкомолекулярный ингибитор, HS38, взаимодействует с сайтом связывания АТФ этих киназ. Было показано, что HS38, но не его структурный аналог, который в 5 раз хуже связывается с ZIPK и DAPK1, снижает сократительную активность гладких мышц и степень фосфорилирования РЛЦ миозина. Это свидетельствует об участии обеих или одной из этих протеинкиназ в регуляции сокращения гладких мышц. Поскольку DAPK1 является Ca²⁺/CaM-зависимой киназой, то индивидуальный вклад ZIPK удалось выявить при исследовании Ca²⁺-независимого сокращения. Оказалось, что HS38 ингибирует микроцистин-зависимое и каликулин А-зависимое сокращение (Carlson et al., 2013). Это говорит о том, что ZIPK участвует в регуляции сокращения гладких мышц и в развитии Ca²⁺-независимого сокращения в частности.

Регуляция активности ZIPK. Было показано, что Rho-киназа фосфорилирует ZIPK по аминокислотным остаткам Thr²⁶⁵ и Thr²⁹⁹ (Hagerty et al., 2007). Фосфорилирование по Thr²⁶⁵ необходимо для активации ZIPK (Graves et al., 2005, Sato et al., 2006, Hagerty et al., 2007). Фосфорилирование Thr²⁹⁹ не влияет на ферментативную активность, но, по-видимому, обеспечивает цитоплазматическую локализацию ZIP-киназы (Graves et al., 2005). При воздействии на интактную гладкомышечную ткань мочевого пузыря активатором ацетилхолиновых рецепторов, карбахолом, активность ZIP-like киназы увеличивается, что сопровождается её фосфорилированием. Эффект снимается при добавлении специфического ингибитора Rho-киназы, Y-27632, что указывает на участие Rho-киназы в регуляции ZIPK *in vivo* (MacDonald et al., 2001a). На регуляторную роль Rho-киназы также указывает тот факт, что при коэкспрессии в клетках НЕК293, доминант-негативный RhoA подавляет взаимодействие ZIPK и регуляторной субъединицы фосфатазы (Endo et al., 2004).

Другой киназой, фосфорилирующей ZIPK, является DAP-киназа. DAPK и ZIPK взаимодействуют друг с другом своими киназными доменами. DAPK фосфорилирует

ZIPK по 6 остаткам: Thr²⁹⁹, Ser³⁰⁹, Thr³¹¹, Ser³¹², Ser³¹⁸, Ser³²⁶ (Shani et al., 2004). Однако роль фосфорилирования ZIP-киназы DAP-киназой в гладких мышцах в настоящий момент остается непонятной.

Оказалось, что ZIP-киназа не только является субстратом для других протеинкиназ, но может подвергаться и автофосфорилированию по остаткам Thr²⁶⁵ и Thr²⁹⁹ (Graves et al., 2005, Hagerty et al., 2007). В длинной изоформе ZIP-киназы, было выявлено еще 4 участка, подвергающихся автофосфорилированию: Thr¹⁸⁰ (в активационной Т-петле), Thr²²⁵ (в субстрат-связывающей бороздке), Thr³⁰⁶ и Thr³¹¹. Фосфорилирование Thr¹⁸⁰ и Thr²²⁵ приводит к повышению активности ZIPK, а функция фосфорилирования Thr³⁰⁶ и Thr³¹¹ остается невыясненной (Graves et al., 2005).

Недавно было показано, что ZIP-киназа *in vivo* взаимодействует с белком RhoD, принадлежащему семейству Rho-ГТФ-аз. RhoD подавляет некоторые функции ZIPK, связанные с клеточной подвижностью, но механизм действия RhoD пока остаётся невыясненным (Nehru et al., 2013).

2.2.2. ILK

Интегрин-связанная киназа (Integrin-linked kinase, ILK) представляет собой Ser/Thr протеинкиназу с массой 59 кДа. ILK получила своё название в связи с тем, что была впервые обнаружена в ходе поиска партнёров интегрин $\beta 1$ (Hannigan et al., 1996). ILK экспрессируется во многих органах и тканях, в том числе, в гладких мышцах (аорта и другие артерии, трахея, кишечник, желудок) (Hannigan et al., 1996, Deng et al., 2001, Wilson et al., 2005, Friedrich et al., 2006, Huang et al., 2006, Borman et al., 2007, Zhang et al., 2007, Ho et al., 2008). Подавление экспрессии ILK показало, что она жизненно важна как для эмбрионального развития, так и для гомеостаза клетки (McDonald et al., 2008). ILK участвует во внутриклеточных каскадах, регулирующих пролиферацию, выживание и миграцию клеток, а также в регуляции сокращения гладкой мускулатуры (Legate et al., 2006, Ghatak et al., 2013).

На N-конце молекулы расположено 5 анкириновых повторов, которые участвуют в белок-белковых взаимодействиях (Chiswell et al., 2008). С-концевая часть представляет собой киназный домен (19% гомологии с КЛЦМ), а в центральной части находится плекстриновый домен (РН -домен), который отвечает за взаимодействие с фосфатидилинозитол-3,4,5-трисфосфатом, PIP3 (Hannigan et al., 1996, Delcommenne et al., 1998, Melchior et al., 2002). Доменная организация ILK проиллюстрирована на рис. 5.

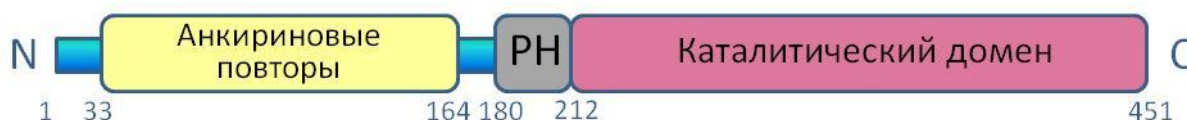


Рис. 5. Схема доменной организации ILK. Представлена схема ILK человека с массой 59 кДа. Указаны номера аминокислот, соответствующих границам структурных элементов ZIPK.

Киназный домен ILK представляет особый интерес. В нём отсутствуют некоторые аминокислотные остатки, которые, как считается, участвуют в фосфотрансферной реакции (Hanks et al., 1988). Наиболее существенные изменения коснулись консервативных мотивов DFG (Asp-Phe-Gly) и HRD (His-Arg-Asp). В HRD мотиве, который входит в состав субдомена, ответственного за приём протона от гидроксильной группы субстрата, отсутствует остаток аспарагиновой кислоты. А мотив DFG в субдомene, содержащем активационную петлю, необходимую для правильной ориентации γ -фосфата АТФ, заменён на мотив DVK (Asp-Val-Lys) (Ghatak et al., 2013). Это дало основание некоторым авторам предполагать, что ILK не обладает киназной активностью (Lynch et al. 1999, Boudeau et al. 2006, Ghatak et al., 2013). Однако было показано, что высоко очищенный препарат ILK без примесей других протеинкиназ фосфорилирует ряд субстратов *in vitro*. Интересно, что в отличие от большинства протеинкиназ, ILK предпочтительнее использует MnАТФ (а не MgАТФ) в качестве субстрата, при этом, K_m для MnАТФ в 150 раз ниже, чем для MgАТФ (Maydan et al., 2010). Возможно, ILK использует механизм фосфорилирования, отличный от классических протеинкиназ (Hannigan et al., 2011).

ILK входит в состав комплекса ILK-PINCH-парвин, который является связующим звеном между интегринами и цитоскелетом (Legate et al., 2006), поэтому следовало бы ожидать что ILK должна локализоваться в примембранной области клетки. Тем не менее, при разрушении мембраны гладкомышечных клеток, примерно 70% протеинкиназы остаётся связанной с миофиламентами (Kim et al., 2004). По-видимому, в клетке, ILK может находиться как в примембранной области, так и быть связанной с миофиламентами. Это делает возможным её участие в регуляции сокращения гладких мышц. ILK фосфорилирует РЛЦ миозина Ca^{2+} /CaM-независимо по Ser¹⁹ и Thr¹⁸ (Deng et al., 2001, Maydan et al., 2010). Также как и ZIP-киназа, ILK не только прямо фосфорилирует РЛЦ, но

и регулирует активность фосфатазы миозина. ILK фосфорилирует регуляторную субъединицу ФЛЦМ, что приводит к подавлению активности фосфатазы (Kiss and Murányi, 2002, Murányi et al., 2002). Помимо этого, ILK способна фосфорилировать ингибитор фосфатаз CPI-17 и его ортологи, что приводит к ингибированию активности ФЛЦМ (Deng et al., 2002, Erdődi et al., 2003) (см. разд. 2.3.).

На данный момент кинетические параметры фосфорилирования указанных белков-мишеней (РЛЦ, CPI-17, MYPT1) неизвестны. Также, не до конца понятно, в каких физиологических ситуациях реализуется действие ILK. В культуре клеток кольцевых волокон кишечника, при стимуляции соматостатинового (sstr3), δ -опиоидного или аденозинового (A_1) рецепторов, сопряжённых с Gi-белками, происходит активация ILK, что приводит к фосфорилированию РЛЦ и CPI-17, и сокращению гладкомышечных клеток (Huang et al., 2006). Было высказано предположение, что функция ILK заключается в поддержании фосфорилирования ЛЦ на определённом уровне в гладких мышцах для обеспечения сокращения в отсутствие кальция (Huang et al., 2006, Ihara et al., 2007b).

Участие ILK в Ca^{2+} -независимом сокращении гладких мышц, индуцированном ингибитором фосфатазы, оокаевой кислотой, было продемонстрировано на модели фазных кольцевых мышц пищевода кошки. Сокращение подавляется при ингибировании ILK путём введения антител к этой протеинкиназе (Kim et al., 2004). Концентрация оокаевой кислоты, использованная в данном эксперименте, составила 10^{-9} М. При такой концентрации активность фосфатазы миозина ингибируется, но не блокируется полностью. Поэтому эффект подавления активности ILK в описываемом эксперименте может быть связан с её действием как на РЛЦ миозина, так и на ФЛЦМ или CPI-17. Другими словами, данный эксперимент не объясняет механизм сокращения гладких мышц под действием ILK. Неизвестно, вызывает ли ILK сокращение за счёт прямого фосфорилирования РЛЦ миозина, или же за счёт ингибирования фосфатазы.

Несмотря на существование специфических ингибиторов ILK, которые активно используются для определения роли ILK в других клеточных процессах, (таких как пролиферация и злокачественное перерождение клетки (Yau et al., 2005, Younes et al., 2007)) пока не было сообщений об экспериментах по использованию указанных ингибиторов для ингибирования Ca^{2+} -независимого сокращения гладких мышц. Насколько нам известно, пока не проводили опытов по введению ILK в скринированные волокна, подобно тому, как это делали с ZIPK. Поэтому участие ILK в развитии Ca^{2+} -независимого сокращения требует дальнейших исследований.

Регуляция активности ILK. ILK содержит плекстриновый домен, при связывании фосфатидилинозитол-(3,4,5)-трисфосфата (PIP3) с которым, происходит активация протеинкиназы. PIP3 образуется из фосфатидилинозитол-(4,5)-бисфосфата под действием фосфатидилинозитол 3-киназы (PI3K) (Delcommenne et al., 1998, Pasquali et al., 2007). Активация PI3K в гладкомышечных клетках происходит при активации рецепторов, сопряжённых с Gi-белками, и, действительно, приводит к активации ILK (Huang et al., 2006).

В подавлении активности ILK участвует фосфатаза, которая носит название белок ассоциированный с ILK (ILKAP). Механизм действия ILKAP в настоящее время неизвестен (Leung-hagesteijn et al., 2001, Kumar et al., 2004). α -Парвин также способен ингибировать активность ILK, локализованной в примембранной области (Maydan et al., 2010).

2.3. Фосфатаза лёгких цепей миозина

2.3.1. Структура и свойства фосфатазы лёгких цепей миозина

Фосфорилированные РЛЦ миозина дефосфорилируются под действием фосфатазы типа 1 (PP1). Фосфатаза 1 типа экспрессируется повсеместно и обладает широкой специфичностью в отношении фосфо-белков. Выбор конкретного субстрата определяется тем, с каким регуляторным белком взаимодействует фосфатаза (Bollen et al., 2010). Для фосфорилированных РЛЦ миозина таким регуляторным белком является миозин-связывающая субъединица типа 1 (Myosin Phosphatase Target Subunit 1, MYPT1). MYPT1 экспрессируется во многих тканях, но ее концентрация в гладких мышцах наиболее высока (Ito et al., 2004). Холофермент фосфатазы лёгких цепей миозина (ФЛЦМ) гладких мышц состоит из каталитической субъединицы фосфатазы типа 1 δ , (PP1 δ) с массой 38 кДа, большой регуляторной субъединицы MYPT1 с массой $\approx$ 110 кДа, и малой субъединицы (M20) с массой $\approx$ 20 кДа (Hartshorne et al., 1998). Регуляторная субъединица MYPT1 связывается с фосфорилированным миозином, и таким образом осуществляет адресную доставку каталитической субъединицы фосфатазы к субстрату (Shimizu et al., 1994). Связывание MYPT1 с каталитической субъединицей увеличивает её сродство к фосфорилированным РЛЦ миозина и скорость реакции дефосфорилирования (Alessi et al., 1992, Shirazi et al., 1994, Tanaka et al., 1998). Функция малой субъединицы M20 до сих пор не ясна. Связывание M20 с MYPT1 не влияет на активность каталитической субъединицы, но, возможно, усиливает связывание MYPT1 с миозином (Butler et al., 2013).

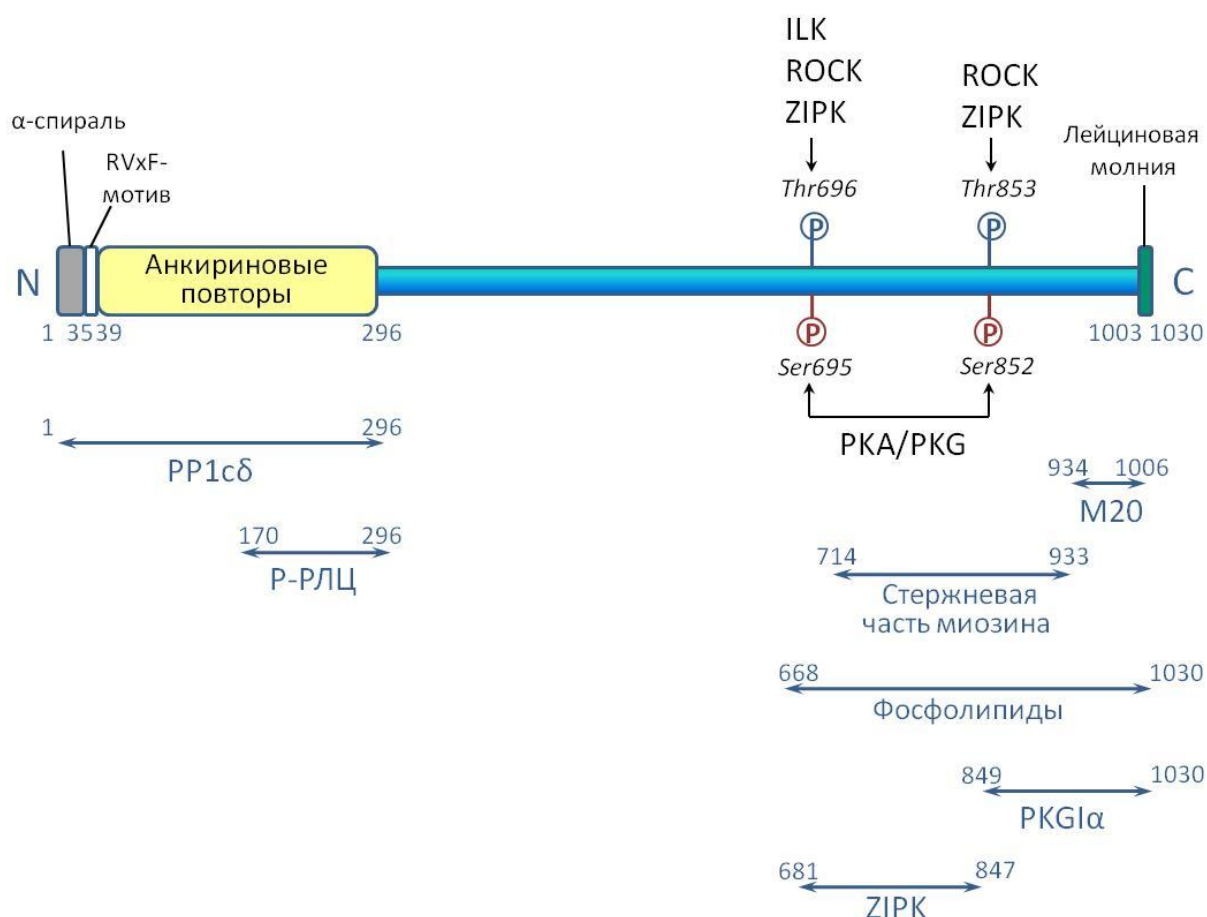


Рис. 6. Схема доменной организации регуляторной субъединицы фосфатазы миозина, MYPT1. Представлена схема MYPT1 человека (изоформа PPP1R12A) с массой 130 кДа. Отмечены участки фосфорилирования MYPT1 различными протеинкиназами. Фосфорилирование MYPT1 по Thr^{696/853} (сверху, отмечены синим) приводит к ингибированию ФЛЦМ, фосфорилирование по Ser^{695/852} (снизу, отмечены красным) восстанавливает активность ФЛЦМ. Приведены участки связывания MYPT1 с другими субъединицами ФЛЦМ, миозином, фосфолипидами и протеинкиназами. Указаны номера аминокислот, соответствующих границам структурных элементов MYPT1 и участкам связывания.

Функционально-значимые участки MYPT1 схематично изображены на рис. 6. На N-конце молекулы регуляторной субъединицы фосфатазы MYPT1 расположены α-спираль и мотив RVxF (Arg-Val-x-Phe), которые обеспечивают связывание с каталитической субъединицей PP1cδ. К этому мотиву прилегает домен, содержащий 8 анкириновых повторов, который также вовлечён во взаимодействие с каталитической субъединицей фосфатазы (Terrak et al., 2004, Pinheiro et al., 2011). С-концевая половина анкириновых повторов обеспечивает связывание фосфорилированных РЛЦ миозина (Hirano et al., 1997). Центральная часть молекулы MYPT1 содержит участки связывания с регуляторными белками (см. ниже) и, предположительно, со стержневой частью

молекулы миозина (Johnson et al., 1997, Ito et al., 2004). Кроме того, в центральной части молекулы MYPT1 расположены участки фосфорилирования различными протеинкиназами. На С-конце расположен участок связывания малой субъединицы фосфатазы M20 (Butler et al., 2013). Также, в С-концевой половине молекулы расположены участки связывания фосфолипидов (Ito et al., 2004).

Альтернативный сплайсинг двух экзонов пре-мРНК MYPT1 приводит к образованию четырёх изоформ MYPT1. Они отличаются наличием вставки в центральном участке молекулы и/или лейциновой молнии на С-конце белка. Функциональное значение центральной вставки неизвестно, а наличие лейциновой молнии может иметь какое-то регуляторное значение (Dippold and Fisher, 2014).

2.3.2. Регуляция фосфатазы лёгких цепей миозина

Усиление активности каталитической субъединицы фосфатазы в отношении фосфорилированных РЛЦ миозина происходит при связывании с регуляторной субъединицей MYPT1 (Tanaka et al., 1998). Дальнейшая регуляция активности ФЛЦМ сводится к ингибированию активности ФЛЦМ и нейтрализации этого ингибиторного воздействия. Все пути регуляции активности ФЛЦМ можно условно разделить на 2 группы по способу воздействия на ФЛЦМ: 1) фосфорилирование MYPT1; 2) связывание регуляторных белков с ФЛЦМ (с каталитической субъединицей, или MYPT1).

Регуляция ФЛЦМ за счёт фосфорилирования MYPT1. Фосфорилирование MYPT1 по Thr⁶⁹⁶ и/или по Thr⁸⁵³ приводит к снижению активности ФЛЦМ как *in vitro*, так и *in vivo* (Murányi et al., 2005, Khromov et al., 2009).¹⁴ Эти участки подвергаются фосфорилированию под действием нескольких протеинкиназ. Rho-киназа, и Zip-киназа фосфорилируют Thr⁶⁹⁶ и Thr⁸⁵³ (Feng et al., 1999, MacDonald et al., 2001a, Borman et al., 2002). Фосфорилирование Thr⁶⁹⁶ происходит также под действием ILK (Kiss et al., 2002, Murányi et al., 2002). При этом, *in vitro* ZIP-киназа эффективнее фосфорилирует Thr⁶⁹⁶, чем Thr⁸⁵³, а Rho-киназа, наоборот, эффективнее фосфорилирует Thr⁸⁵³, чем Thr⁶⁹⁶ (Hagerty et al., 2007).

Предполагается, что участки аминокислотной последовательности, прилегающие к фосфорилированным Thr⁶⁹⁶ и/или Thr⁸⁵³, могут выступать в роли псевдосубстратной последовательности, которая связывается с активным центром каталитической субъединицы фосфатазы, и блокирует активность фермента (Mori et al.,

¹⁴ Здесь и далее нумерация приводится для полноразмерной человеческой изоформы MYPT1 (PPP1R12A)

2009, Khromov et al., 2009). В системе *in vivo* механизм снижения активности ФЛЦМ в результате фосфорилирования Thr⁸⁵³, по-видимому, иной. В этом случае фосфорилирование MYPT1 по Thr⁸⁵³ нарушает взаимодействие MYPT1 с миозином, что приводит к диссоциации всего комплекса ФЛЦМ от миозина (Velasco et al., 2002). При этом происходит транслокация ФЛЦМ на мембрану, и последующая диссоциация каталитической субъединицы фосфатазы от MYPT1 (Shin et al., 2002, Nepl et al., 2009). В отсутствие данных о том, что при фосфорилировании MYPT1 по Thr⁸⁵³ происходит диссоциация холофермента ФЛЦМ, предполагается, что именно связывание MYPT1 с мембраной вызывает диссоциацию всего комплекса (Shin et al., 2002, Ito et al., 2004). Таким образом, фосфорилирование по Thr⁸⁵³, в конечном итоге, приводит к нарушению связывания каталитической субъединицы с субстратом.

Фосфорилирование MYPT1 под действием PKA и/или PKG по аминокислотным остаткам Ser⁶⁹⁵ и Ser⁸⁵² предотвращает ингибиторное фосфорилирование по соседним остаткам Thr⁶⁹⁶ и Thr⁸⁵³, соответственно (Wooldridge et al., 2004, Grassie et al., 2012). При этом само по себе фосфорилирование MYPT1 по Ser⁶⁹⁵ и Ser⁸⁵² не влияет на активность ФЛЦМ (Grassie et al., 2012). Интересно, что изоформа MYPT1, содержащая лейциновую молнию, эффективнее фосфорилируется под действием PKG (Yuen et al., 2011).

Модуляция активности ФЛЦМ за счёт связывания регуляторных белков.

Выявлен ряд фосфобелков-псевдосубстратов ФЛЦМ, которые связываются с активным центром каталитической субъединицы фосфатазы, и конкурируют за связывание с фосфорилированными РЛЦ миозина. Наиболее изученный среди них – ингибиторный белок фосфатазы PP1, активируемый PKC, с массой 17 кДа (PKC-potentiated PP1 Inhibitory protein of 17 kDa, CPI-17) (Eto et al., 1995, Eto, 2009). Фосфорилирование CPI-17 по Thr³⁸ является необходимым и достаточным условием для ингибирования ФЛЦМ (Eto et al., 1995, Eto et al., 1997). PKC, Rho-киназа, ILK и ZIP-киназа фосфорилируют CPI-17 по остатку Thr³⁸ (Eto et al., 1995, Koyama et al., 2000, MacDonald et al., 2001b, Deng et al., 2002).

Недавно обнаружено, что гладкомышечный белок из семейства смузелинов, (Smoothelin-like1, SMTNL1) ингибирует активность ФЛЦМ (Borman et al., 2009). При этом ингибиторный эффект SMTNL1 заметно уменьшается при фосфорилировании этого белка по Ser³⁰¹ под действием PKG и PKA. Механизм действия SMTNL1 в настоящий момент не ясен (Turner and MacDonald, 2014).

Противоречивые сведения получены о регуляции ФЛЦМ белком, взаимодействующим с RhoA и ФЛЦМ (Myosin phosphatase-Rho Interacting Protein, M-RIP). M-RIP представляет собой каркасный белок с массой 116 кДа, который одновременно может связывать MYPT1 (изоформу с лейциновой молнией), RhoA, и α -актин (Surks et al., 2003). С одной стороны, M-RIP связывается с актиновыми филаментами, и поэтому может увеличивать доступность фосфорилированных РЛЦ миозина для ФЛЦМ, способствуя локализации вблизи субстрата (Koga and Ikebe, 2005). С другой стороны, связывая RhoA, M-RIP облегчает фосфорилирование MYPT1 Rho-киназой, которое приводит к ингибированию ФЛЦМ (Riddick et al., 2008). Недавно появились сведения о том, что активация PKG в гладкомышечных клетках вызывает фосфорилирование M-RIP. При этом высказывается предположение, что фосфорилирование M-RIP усиливает его способность связываться с MYPT1, и, таким образом, увеличивает активность ФЛЦМ (Mahavadi et al., 2014).

Белок апоптозного ответ простаты-4 (Prostate apoptosis response-4, Par-4) предположительно взаимодействует с изоформой MYPT1, содержащей лейциновую молнию, и предотвращает фосфорилирование ингибиторного участка Thr⁶⁹⁶ MYPT1. Эффект белка Par-4 исчезает при его фосфорилировании ZIP-киназой (Vetterkind et al., 2010).

Высказано предположение, что нейтрализация ингибиторного воздействия на ФЛЦМ возможна и без изменения статуса фосфорилирования MYPT1 по Thr⁶⁹⁶ и Thr⁸⁵³ под действием белка KRP (Khromov et al., 2012). Этот вопрос рассматривается более подробно в разд. 3.2.

3. KRP

Белок KRP представляет собой независимо экспрессируемый С-терминальный миозин-связывающий домен КЛЦМ (Gallagher and Herring, 1991). В начальных работах было установлено, что KRP экспрессируется в гладких мышцах и эмбриональных кардиомиоцитах (Birukov et al., 1998, Gallagher and Herring, 1991, Herring and Smith, 1996). В тонической гладкой мускулатуре уровень экспрессии KRP не велик, в то время как в фазной гладкой мускулатуре, содержание этого белка сравнимо с содержанием миозина, и составляет от 18 до 90 μ M (Shirinsky et al., 1993, Khapchaev et al., 2004, Choudhury et al., 2004). Считается общепринятым, что KRP снижает сократительную активность гладких мышц (Khromov et al., 2006), однако механизм его действия до сих пор до конца неясен.

3.1. Структура белка KRP и его свойства *in vitro*

В состав белка KRP входит 154 аминокислотных остатка. Методом рентгеноструктурного анализа охарактеризовано положение 103 центральных аминокислотных остатков. Данным методом не удается выявить положение 32 N-концевых и 19 C-концевых аминокислот, что свидетельствует о высокой подвижности и малой упорядоченности N- и C-концевых участков молекулы белка (Holden et al., 1992).

Центральная часть KRP имеет бочонкообразную форму и состоит из семи антипараллельных β -тяжей которые образуют два слоя, один из них содержит три β -тяжа, а другой – четыре (см. рис. 7). Эта структура гомологична структуре CH2-доменов иммуноглобулинов (*heavy chain constant domain 2*). Однако в отличие от CH2-доменов, центральная часть молекулы KRP не содержит внутримолекулярной дисульфидной связи между цистеиновыми остатками Cys⁶³ и Cys¹¹⁵, которые находятся в положениях, структурно идентичных остаткам цистеинов иммуноглобулиноподобных доменов. Иммуноглобулиноподобные домены присутствуют в таких мышечных белках как титин, твитчин и С-белок, и вовлечены во взаимодействие с миозином (Holden et al., 1992).

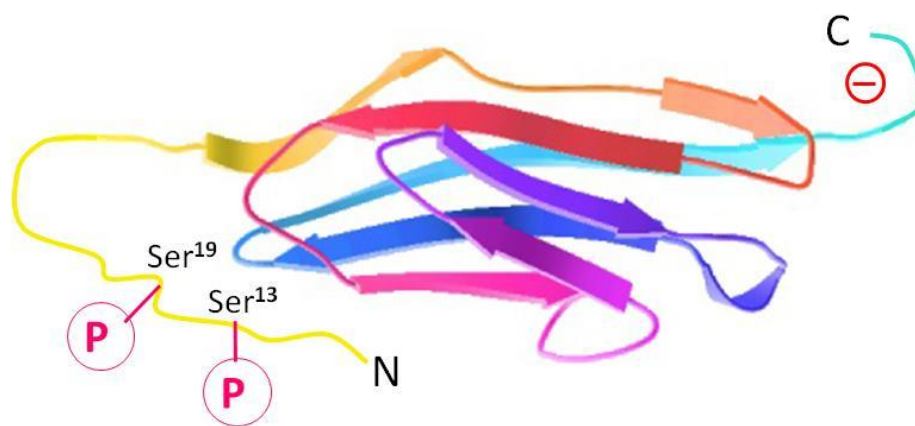


Рис. 7. Структура молекулы KRP (по Holden et al., 1992). Центральная часть молекулы представлена 7 антипараллельными β -тяжами, образующими бочонкообразную структуру. N- и C-концевая часть состоят из 32 и 19 аминокислотных остатков, соответственно. C-концевой участок богат отрицательно-заряженными участками, а N-концевой участок подвергается фосфорилированию под действием нескольких протеинкиназ.

KRP связывается с нефосфорилированным миозином в соотношении 1:1 с константой диссоциации $\sim 5\text{--}10\text{ }\mu\text{M}$ (Shirinsky et al., 1993, Silver et al. 1997). О связывании KRP с монофосфорилированным миозином ничего неизвестно, в тоже время есть данные,

свидетельствующие от том, что KRP не способен связываться с миозином, регуляторные легие цепи которого фосфорилированы сразу по двух участкам (Shirinsky et al., 1993). Центральная часть молекулы KRP может участвовать в связывании с миозином, но основную роль в этом взаимодействии играет С-коцевой домен молекулы, характеризующийся обилием отрицательно заряженных аминокислотных остатков¹⁵: ¹³⁹GK(EG)₄EEDEEEEEEE¹⁵⁷. Удаление участка с 151 по 157 аминокислотный остаток не сильно влияет на связывание с миозином. Дальнейшее удаление аминокислот с С-конца ослабляет связывание KRP с миозином. Минимальный участок связывания соответствует последовательности GK(EG)₄EE (Silver et al., 1997). Этот участок является высоко консервативным и выявлен в первичной структуре KRP практически всех исследованных к настоящему времени видов животных (Hong et al., 2011).

С помощью электронной микроскопии (Masato et al., 1997) и с использованием делеционных мутантов миозина (Silver et al., 1997) было показано, что участок взаимодействия миозина с KRP локализован в месте соединения S1 и S2 субфрагментов миозина в непосредственной близости от N-конца РЛЦ. Этот же участок вовлечен в образование свернутой (10S) конформации миозина (см. разд. 1.1). Таким образом, KRP конкурирует с хвостовой частью миозина за связывание с шейкой миозина. KRP взаимодействует с нефосфорилированным миозином и катализирует его переход из свернутой (10S) в развернутую (6S) конформацию, в которой миозин способен образовывать филаменты. В присутствии физиологических концентраций солей и АТФ KRP инициирует образование филаментарного миозина *in vitro*. Это позволило предположить, что KRP участвует в стабилизации миозиновых филаментов немышечных и гладкомышечных клеток, которые находятся в расслабленном состоянии, то есть когда уровень фосфорилирования РЛЦ низок (Shirinsky et al., 1993, Masato et al., 1997).

Группой А. Собешка было показано, что связывание KRP вызывает конформационные изменения в молекуле миозина в составе филаментов, наподобие того, как это происходит с мономерным миозином. Как уже отмечалось, в случае мономерного миозина, KRP вызывает диссоциацию «шейки» миозина от участка стержневой части *той же* молекулы миозина. В случае филаментарного миозина, предполагается, что KRP вызывает диссоциацию «шейки» одной молекулы миозина от стержневой части *соседней* молекулы миозина (Sobieszek et al., 2005).

¹⁵ Нумерация аминокислотных остатков приведена для KRP курицы, если не указано иное

В экспериментах *in vitro* было показано, что KRP является своеобразным ингибитором реакции фосфорилирования РЛЦ киназой легких цепей миозина. Наблюдаемые кинетические параметры такие же, как при конкурентном типе ингибирования. Действительно в присутствии KRP K_m реакции фосфорилирования для миозина увеличивается с 2,4 до 29 μM (для HMM), а V_{max} реакции при этом не изменяется (Silver et al., 1997). Тем не менее, ингибирование наблюдается, только если в качестве субстрата для киназы используется интактная молекула миозина, или тяжелый меромиозин (HMM) (Shirinsky et al., 1993), но не в том случае, когда в качестве субстрата используются изолированные РЛЦ (Collinge et al., 1992) или субфрагмент S1 (Nieznanski and Sobieszek, 1997). Таким образом, для того, чтобы ингибировать КЛЦМ, KRP необходимо связаться с участком «шейки» миозина. Было предположено, что KRP конкурирует с KRP-доменом КЛЦМ за связывание с миозином (Shirinsky et al., 1993, Silver et al., 1997). Однако близость участка связывания KRP и РЛЦ позволяет предположить иной механизм, согласно которому KRP физически препятствует связыванию каталитического домена КЛЦМ с РЛЦ миозина. В этом случае KRP может оказаться более универсальным ингибитором фосфорилирования РЛЦ и ингибировать фосфорилирование РЛЦ не только под действием КЛЦМ, но и под действием неканонических протеинкиназ. Для уточнения механизма ингибирования фосфорилирования РЛЦ белком KRP, представляется необходимым проведение дополнительных исследований с использованием делеционных фрагментов KRP и КЛЦМ.

3.2. Расслабление гладких мышц под действием KRP

Специфическое подавление экспрессии KRP у мышей не явилось летальным. Однако гладкие мышцы мышей, не способных экспрессировать KRP, проявляли большую чувствительность к кальцию по сравнению с мышами дикого типа. Эти данные свидетельствуют о том, что KRP может участвовать в снижении Ca^{2+} -чувствительности гладких мышц *in vivo* (Khromov et al., 2006). В экспериментах на изолированных гладкомышечных волокнах, обработанных тритоном X-100, так называемых, скинированных волокнах (см. разд. 4), также было показано, что KRP снижает сократительную активность мышц. Добавление экзогенного KRP к скинированной мышце приводит к снижению уровня фосфорилирования РЛЦ и расслаблению мышцы при фиксированной концентрации ионов кальция (Wu et al., 1998, Walker et al., 2001, Sobieszek et al., 2005).

Для объяснения этого феномена было выдвинуто две гипотезы о действии KRP на сократительный аппарат: 1) KRP ингибирует КЛЦМ, и, таким образом, снижает скорость фосфорилирования РЛЦ (Shirinsky et al., 1993, Vorotnikov, 1997); 2) KRP активирует ФЛЦМ, и, соответственно, повышает скорость дефосфорилирования РЛЦ (Wu et al. 1998, Somlyo and Somlyo, 1998).

Механизм ингибирования КЛЦМ уже обсуждался ранее (см. разд. 3.1). Механизм активации ФЛЦМ гораздо менее понятен. Все экспериментальные данные в пользу активации ФЛЦМ, имеющиеся в настоящий момент, получены на моделях, включающих большое количество участников помимо ФЛЦМ, KRP и миозина. KRP не влияет на дефосфорилирование фосфо-РЛЦ миозина каталитической субъединицей ФЛЦМ и холоферментом ФЛЦМ *in vitro* (Sobieszek et al., 1997). Прямых доказательств взаимодействия KRP с ФЛЦМ *in vitro* также нет.

Косвенное свидетельство влияния KRP на активность ФЛЦМ было найдено на модели «нативных миозиновых филаментов». В данном препарате, помимо актомиозина присутствуют белки, связанные с сократительным аппаратом, в том числе, КЛЦМ и ФЛЦМ. Добавление кальция и АТФ к таким миофиламентам вызывает фосфорилирование РЛЦ миозина, которое продолжается до тех пор, пока не заканчивается АТФ. В отсутствие АТФ КЛЦМ и другие киназы становятся неактивными. Это приводит к дефосфорилированию РЛЦ миозина до базального уровня. В присутствии KRP, не только снижается скорость фосфорилирования, что можно объяснить ингибированием КЛЦМ, но и повышается скорость дефосфорилирования РЛЦ миозина (Sobieszek et al., 2005). Этот результат указывает на возможную роль KRP в активации ФЛЦМ.

Регуляторная субъединица ФЛЦМ, МҮРТ, при воздействии агонистов, стимулирующих сократительную активность мышц, фосфорилируется по Thr⁶⁹⁶ и/или Thr⁸⁵³. Фосфорилированная МҮРТ не связывается с фосфорилированным миозином. Это затрудняет дефосфорилирование легких цепей миозина под действием каталитической субъединицы ФЛЦМ. Было показано, что KRP увеличивает доступность фосфо-РЛЦ миозина для каталитической субъединицы ФЛЦМ, если МҮРТ1 фосфорилирована по Thr⁶⁹⁶ (Khromov et al., 2012). Однако механизм действия KRP на фосфорилированную ФЛЦМ до конца не понятен. Авторы предполагают, что KRP, связываясь с фосфо-МҮРТ, обеспечивает лучшее связывание фосфорилированного миозина с ФЛЦМ. но до последнего времени не было установлено прямого (без участия каких-то иных белков-посредников) взаимодействия KRP и фосфо-МҮРТ.

Как было описано в раз. 2.3, в регуляции фосфорилирования РЛЦ миозина участвуют не только КЛЦМ и ФЛЦМ, но и Ca^{2+} -независимые киназы. Поэтому кроме двух приведённых выше гипотез, возможен и третий вариант влияния KRP на сокращение гладких мышц. Не исключено, что KRP ингибирует фосфорилирование РЛЦ миозина под действием Ca^{2+} -независимых киназ. Данная гипотеза ранее не была проверена.

3.3. Фосфорилирование KRP

Белок KRP подвергается фосфорилированию в гладких мышцах. N-концевая часть белка KRP содержит остатки серина, которые могут быть фосфорилированы цАМФ-зависимой или цГМФ-зависимой протеинкиназами (Ser^{13}) и MAP-киназой (Ser^{19}), а также рядом других киназ (Krymsky et al., 2001, MacDonald et al., 2000).

Результаты многочисленных исследований свидетельствуют о том, что степень фосфорилирования KRP изменяется в цикле сокращения-расслабления гладких мышц и коррелирует с расслаблением. Так, в нашей лаборатории показано, что уровень фосфорилирования KRP по Ser^{13} повышается с 25 до 100% при цАМФ-зависимом расслаблении гладкой мускулатуры (*ileum*) под действием форсколина (активатора аденилатциклазы) (Kharchaev et al., 2004). Расслабляющее действие KRP на скинированные волокна *ileum*, сокращенные под действием субмаксимальных концентраций Ca^{2+} , усиливается в присутствии PKG и/или её активатора 8-Br-цГМФ (Wu et al., 1998, Walker et al., 2001). Данный эффект сопровождается фосфорилированием KRP по остатку Ser^{13} . Расслабление гладкомышечных волокон *ileum*, вызванное добавлением 8-Br-цГМФ, происходит эффективнее у мышей дикого типа по сравнению с мышами, нокаутированными по KRP (Khromov et al., 2006). При расслаблении гладких мышц желудка (*fundus*), вызванном электростимуляцией NANC-нейронов, которые генерируют NO, происходит активация PKG. Это приводит к снижению уровня фосфорилирования РЛЦ по Ser^{19} , которое сопровождается повышением степени фосфорилирования KRP по Ser^{13} (Puetz et al., 2010). И наоборот, сокращение гладких мышц сопровождается дефосфорилированием KRP. Так, в процессе сокращения лёгочных артерий, вызванном гипоксией, наблюдается фосфорилирование Ser^{19} РЛЦ миозина, которое сопровождается дефосфорилированием Ser^{13} KRP (Madden et al., 2008). Таким образом, существует обратная корреляция между фосфорилированием Ser^{13} KRP и сокращением гладкой мускулатуры, но не понятно, есть ли причинно-следственная связь между этими событиями.

Согласно механизму, предложенному группой А. Сомлио, фосфорилированный по Ser^{13} KRP может выступать в роли посредника циклонуклеотид-зависимого

расслабления гладких мышц. Авторы предполагают, что фосфорилирование KRP по Ser¹³ усиливает его способность активировать ФЛЦМ (Wu et al., 1998, Walker et al., 2001, Khromov et al., 2006). Однако в отсутствие данных о прямом взаимодействии KRP с фосфатазой РЛЦ миозина и регуляции этого взаимодействия путем фосфорилирования KRP, роль предложенного механизма остаётся в настоящее время неясной.

При PKC-зависимой активации MAPK в гладких мышцах происходит фосфорилирование KRP по другому аминокислотному остатку – Ser¹⁹ (Kharpchaev et al., 2004). Физиологическое значение фосфорилирования KRP по Ser¹⁹ неизвестно. Также, неизвестно, каким образом фосфорилирование KRP влияет на его свойства. Показано, что фосфорилирование KRP по Ser¹³ и/или по Ser¹⁹ не влияет на связывание KRP ни с очищенным миозином (Vorotnikov et al., 1996), ни с нативными миофиламентами гладких мышц (Kharpchaev et al., 2004). Поэтому для выяснения роли фосфорилирования KRP в регуляции сократительной активности гладких мышц требуются дальнейшие исследования.

4. Использование скинированных гладкомышечных волокон для исследования регуляции сократительной активности

Исследования на модели интактных гладких мышц позволяют получить лишь косвенную информацию о регуляции сократительного аппарата. В то же время, при использовании очищенных белков невозможно реконструировать структуру ткани. Скинированные гладкомышечные волокна можно рассматривать как некую промежуточную модель между интактными мышцами и раствором белков. В таких препаратах гладкомышечных волокон плазматическая мембрана клеток и саркоплазматический ретикулум полностью разрушены, а сократительный аппарат сохраняется интактным. Это позволяет исключить влияние трансмембранных ионных потоков на сокращение волокон и контролировать концентрацию Ca²⁺. В то же время, отсутствие мембран позволяет воздействовать на сократительный аппарат экзогенно добавляя исследуемые белки или низкомолекулярные соединения (Pfitzer, 1996).

Для проведения измерений сократительной активности скинированных волокон в инкубационную среду добавляют необходимые для сокращения компоненты, которые вымываются после разрушения клеточной мембраны: АТФ и АТФ-регенерирующую систему, представленную креатинкиназой и креатин-фосфатом, CaCl₂ и кальмодулин (Sparrow et al., 1981). Для создания необходимой концентрации свободного кальция ([Ca²⁺]_{free}) используют ЭГТА в качестве кальциевого буфера (Fabiato and Fabiato, 1979).

Скинированные волокна сокращаются при $pCa \leq 6$, и расслабляются в MgATФ-содержащих растворах с $pCa > 8$ (Arner, 1982). При этом максимальная сила сокращения скинированных волокон достигает 60-80% от максимальной силы сокращения интактных волокон (Arner, 1982, Peterson, 1982). Воспроизводимость сократительного ответа скинированных волокон зависит от pH инкубационной среды (Mrwa et al., 1974), ионной силы (Arheden et al., 1988, Gagelmann and Güth, 1985), концентрации свободного Mg^{2+} (Arner, 1983, Barsotti et al., 1987) и других факторов.

Широко используемым методом скинирования является обработка мышц 1% раствором детергента Тритона X-100 (Meisheri et al., 1985). При обработке мышц Тритоном X-100 происходит разрушение всех клеточных мембран, что приводит к вымыванию ряда белков (Spedding, 1983, Kossmann et al., 1987). Однако связанные с сократительным аппаратом регуляторные белки частично остаются в волокнах (Kossmann et al., 1987), а экзогенно добавленные белки могут диффундировать внутрь волокон. Для того чтобы экзогенно добавленные белки могли диффундировать по всей толщине скинированного волокна, необходимо, чтобы диаметр волокон был небольшим (100 – 200 мкм). Такие волокна хорошо воспроизводимой толщины могут быть легко получены из наружного слоя продольных волокон ленты ободочной кишки (*taenia coli*). Скинированные Тритоном X-100 волокна *taenia coli* являются удобной моделью и широко применяются для исследования эффектов экзогенно добавленных белков на регуляцию сокращения мышц (Wirth et al., 2003, Sobieszek et al., 2005).

Исследования роли Ca^{2+} -независимых киназ в сократительной активности гладких мышц были также проведены на модели скинированных волокон (см. разд. 2.2. гл. «Обзор литературы»). В работе Д.В.Серебряной для выявления активности Ca^{2+} -независимых протеинкиназ использовали ингибитор фосфатаз 1 и 2 типа, микроцистин LR. Микроцистин вызывает медленное сокращение скинированных Тритоном X-100 волокон *taenia coli*, которое обусловлено фосфорилированием РЛЦ. При этом исключена возможность того, что протеолитический конституционно активный фрагмент КЛЦМ участвует в сокращении, индуцированном микроцистином, так как ингибитор КЛЦМ вортманин не оказывал влияния на сокращение. Кроме того, было установлено, что ингибитор Rho-киназы Y27632 также не оказывал влияния на сократительную активность (Серебряная, 2006). Как уже было рассмотрено в разд. 2.2 гл. «Обзор литературы», возможными кандидатами, ответственными за сокращение гладких мышц, индуцированное микроцистином, являются ILK и ZIPK. Следует отметить что указанные протеинкиназы экспрессируются в *teania coli* морской свинки, а после скинирования

Тритоном X-100 остаются в волокнах (Серебряная, 2006). Поэтому ILK и/или ZIPK могут опосредовать сокращение, индуцированное микроцитином, в этой модели. Таким образом, модель скинированных Тритоном X-100 волокон *taenia coli* морской свинки является подходящей для исследования влияния KRP на сокращение, опосредованное Ca^{2+} -независимыми протеинкиназами.

ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ

Целью работы было установить механизма регуляции сократительной активности гладких мышц под действием KRP. Для достижения указанной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Выяснить, способен ли KRP в условиях *in vitro* ингибировать фосфорилирование миозина киназой легких цепей миозина, лишенной KRP домена.
2. Исследовать влияние KRP на развитие сокращения скинированных волокон *taenia coli*, индуцированное микроцистином
3. Изучить влияние фосфорилирования, катализируемого PKA/PKG и MAPK, на регуляторную активность KRP в условиях *in vitro* и в модели скинированных волокон *taenia coli*
4. Определить роль С-концевой последовательности, обеспечивающей связывание KRP с миозином, в осуществлении регуляторной активности KRP в условиях *in vitro* и в модели скинированных волокон *taenia coli*

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

Все использованные биохимические реактивы общего назначения были аналитической чистоты и были приобретены в фирмах Sigma (США), Serva (Германия), Fluka (Швейцария), Fisher (США), ICN (США), AppliChem (Германия), Merck (США), ДиАМ (Россия), Реахим (Россия), Bio-Rad (США), Amersham (Великобритания).

Носители для хроматографии:

DEAE-сефароза, Octyl-сефароза, фенил-сефароза Q-сефароза, глутатион-сефароза и сефакрил-S-300 фирмы Pharmacia Biotech., Швеция,

TALON Clontech, USA,

Фосфоцеллюлоза фирмы Sigma, USA,

8-[(6-амино)гексил]амино-цАМФ-сефароза фирмы Jena Bioscience, Германия.

Антитела:

Моноклональные антитела к тотальным РЛЦ миозина (клон MY-21) фирмы Sigma (США),

Поликлональные антитела к тотальным РЛЦ MRLC3 фирмы Proteintech Group (США)

Антитела кролика специфические к РЛЦ миозина, фосфорилированным по остатку S¹⁹, были любезно предоставлены профессором Д.М. Ваттерсоном (Северо-Западный университет, Чикаго, США) (Goncharova et al, 2002).

Аффинно-очищенные антитела козы к KRP и антитела кролика, специфически узнающие фосфо-S¹³-KRP (R5) и фосфо-S¹⁹-KRP (R8) были получены и охарактеризованы в лаборатории Клеточной подвижности Института Экспериментальной Кардиологии РКНПК (Krymsky et al., 2001, Хапчаев и др., 2004).

Антитела козы к PKGI α / β (клон T-19) были приобретены в фирме Santa Cruz (США).

Вторичные антитела против IgG кролика, мыши и козы, а также вторичные антитела против IgM мыши, конъюгированные с пероксидазой, были приобретены в фирмах Amersham (Великобритания) и Pierce (США).

Очищенные препараты белков:

Кальмодулин из семенников быка предоставлен сотрудниками Института Вегетативной физиологии (Кёльн, Германия),

Каталитическая субъединица цАМФ-зависимой протеинкиназы (РКА) фирмы New England Biolabs (США) и Calbiochem (США),

Химотрипсин, DPCC-трипсин (Sigma, США)

Очищенные препараты рекомбинантной конститутивно активной протеинкиназы His₆-MEK1 и полноразмерной КЛЦМ-108 из желудков кур, предоставлены сотрудниками лаборатории клеточной подвижности (Институт Экспериментальной Кардиологии, Россия).

Очищенные препараты мутантных форм человеческого KRP с заменой аминокислотного остатка Ser¹³ на Ala (S¹³A-hKRP) и с заменами Ser¹³ и Ser¹⁹ на Asp (S¹³D-S¹⁹D-hKRP) предоставлены сотрудником Института Вегетативной Физиологии Кельнского университета Ш. Циттрихом (Кельн, Германия).

Молекулярно-генетические конструкции любезно предоставлены:

кДНК KRP курицы: полноразмерного (с 1 по 157 аминокислотный остаток), без N-конца (36-157) и без C-конца (1-138), субклонированные в вектор pET21d(+) и содержащие C-концевой полигистидин (chiKRP-His₆, ΔN-chiKRP-His₆ и ΔC-chiKRP-His₆ соответственно), любезно предоставлены д-ром Дж.Р.Селлерсом (J.R.Sellers, NHLBI, NIH, США),

кДНК KRP человека: дикого типа (с 1 по 154 аминокислотный остаток), wthKRP, субклонированная в вектор pET22b(+), без C-конца (1-136 aa), ΔC-hKRP, субклонированная в вектор pET28a(+), предоставлены сотрудниками лаборатория клеточной подвижности (Институт Экспериментальной Кардиологии НИИИЭК),

кДНК p44^{erk1} MAP-киназы, субклонированная в вектор pGEX-3X, – д-ром Т.А.Войно-Ясенецкой (UIC, Чикаго, США).

Биологический материал:

Морские свинки (*Cavia porcellus*) для физиологических экспериментов были любезно предоставлены доктором Хансом Оствальдом, заведующим виварием Медицинского факультета Кельнского университета (Кельн, Германия),

Куриные желудки были предоставлены Майдаровской Птицефабрикой Солнечногорского района (Московская область, Россия),

Лёгкие быка были предоставлены мясокомбинатом Fleischversorgung Köln GmbH FVK (Кёльн, Германия).

В работе также были использованы:

γ -[³²P]АТФ фирмы Hartmann Analytic (Брауншвейг, Германия),

PVDF мембраны с размером пор 0,45 мкм фирмы Millipore (США) и Amersham (Великобритания),

3,3'-диаминобензидин (SIGMAFAST™ DAB with metal enhancer) фирмы Sigma (США),

Изофлуоран AppliChem (Германия),

Ингибитор РКА «5-24» Merck (Великобритания),

Коктейль ингибиторов протеаз Roche (Швейцария),

Микроцистин-LR фирмы Sigma (США),

Набор для определения белка по методу Бредфорд фирмы BioRad (США),

Набор реагентов для хемилюминесцентной детекции фирмы Amersham (Великобритания) и Pierce (США),

Наборы фирмы Qiagen (Германия) для выделения плазмидной ДНК,

Нитроцеллюлозные мембраны с размером пор 0.45 мкм фирмы Bio-Rad (США) и Amersham (Великобритания),

Окадаевая кислота фирмы Calbiochem (США),

Пленки для автордиографии X-ray Retina фирмы Fotochemische Werke GmbH (Германия) и Kodak (США),

Сукцинимидиловый эфир Alexa Fluor® 488, Alexa Fluor® 488 C⁵ малеимид, фаллоидин, меченый Alexa Fluor® 555, DAPI (Molecular probes, США),

Заливочная среда Mowiol 4-88 (Германия).

Методы

1. Молекулярно-биологические методы

1.1. Получение химически компетентных клеток *E. coli*.

Компетентные клетки получали согласно методу (Inoue et al., 1990). Клетки *E. coli* (штаммы DH5 α , BL21(DE3) или BL21(DE3)pLys) высевали на чашку с LB-агаром (1,5% бакто-агар, на среде LB (1% бакто-триптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 1% NaCl на дистиллированной воде, pH 7,0)) и инкубировали при +37°C в течение 12-18 ч. Выросшие колонии (10 шт) помещали в 250 мл среды 2*YT (1,6 % бакто-триптон, 1% дрожжевой экстракт, 1% NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, pH 7,0)) и инкубировали при +22°C до достижения оптической плотности 0,2 - 0,5 при 600 нм. По достижении указанной плотности клетки помещали на 10 мин в лёд, переносили в стерильные центрифужные пробирки и осаждали 3 мин при 4000 g, +4°C. Дальнейшие операции проводили на льду. Клетки ресуспендировали в 40 мл стерильного буфера ТБ (10 mM MOPS, pH 6,7, 250 mM KCl, 15 mM CaCl₂, 55 mM MnCl₂), инкубировали 10 минут и центрифугировали при вышеуказанных условиях. Осадок ресуспендировали в 5 мл буфера ТБ и при постоянном перемешивании добавляли ДМСО до конечной концентрации 7%. Инкубировали клеточную суспензию 10 мин, разделяли на аликвоты и замораживали в жидком азоте. Готовые компетентные клетки хранили при -70°C.

1.2. Трансформация бактериальных клеток

Трансформацию проводили согласно (Cohen et al., 1972). Перед использованием компетентные клетки размораживали на льду и добавляли к ним раствор плазмиды (10-25 нг плазмиды / 100 μ л клеток). После инкубации смеси 30 мин на льду, клетки подвергали тепловому шоку (+42°C, 45 сек). Смесь сразу же охлаждали на льду, приливали стерильную среду LB до конечного объема 1 мл и инкубировали 1 час при +37°C при постоянном перемешивании 250 об./мин. (Incubator Shaker, New Brunswick Scientific Co., США). Клетки осаждали 5 мин. при 4000g, удаляли большую часть надосадочной жидкости, оставляя 50-70 мкл, ресуспендировали клетки в этом объеме и растирали на чашках с агаром, содержащим соответствующие антибиотики. Концентрация использованных антибиотиков была: ампициллин 0,1 мг/мл, левомицетин 0,035 мг/мл, канамицин 0,035 мг/мл. Чашки инкубировали 12 - 18 часов при +37°C. Колонии в чашках Петри хранили при +4°C не более недели.

1.3. Выделение плазмидной ДНК из клеток *E. coli*

Наращивание и выделение плазмидной ДНК проводили в клетках *E. coli* штамма DH5α. Трансформированные клетки растили в течение 12-18 часов в среде LB с соответствующими антибиотиками (LB+) при постоянном перемешивании (250 об./мин.) при +37°C. Плазмидную ДНК из выросших культур выделяли с помощью коммерческих наборов фирмы Qiagen (Германия) по протоколу, рекомендованному производителем. Чистоту и целостность выделенных плазмид оценивали электрофорезом в агарозном геле. Концентрацию плазмид измеряли спектрофотометрически по поглощению при 260 нм, используя коэффициент экстинкции $E_{260 \text{ нм}}^{1 \text{ мкг/мл}} = 38,1$.

1.4. Бактериальная экспрессия рекомбинантных белков

Для экспрессии полноразмерного chiKRP-His₆, ΔN-chiKRP-His₆ и ΔC-chiKRP-His₆ использовали клетки *E. coli* штамма BL21(DE3)pLys, несущие ген устойчивости к левомицетину, трансформированные плазмидами pET21d(+)/chiKRP1-157(His6), pET21d(+)/chiKRP1-138(His6) и pET21d(+)/chiKRP36-157(His6), соответственно. Селекцию бактериальных клонов, несущих указанные плазмиды, проводили с помощью ампициллина и левомицетина. Для экспрессии p44^{erk1}-МАР-киназы, полноразмерного hKRP и ΔC-hKRP использовали клетки *E. coli* штамма BL21(DE3), трансформированные плазмидами pGEX-3X/p44^{erk1}-МАРК, pET22b(+)/hKRP1-154 и pET28a(+)/hKRP1-136, соответственно. Селекцию бактериальных клонов, несущих плазмиды pGEX-3X/p44^{erk1}-МАРК, pET22b(+)/hKRP1-154, проводили с помощью ампициллина. В случае pET28a(+)/hKRP1-136 использовали канамицин.

Первоначально проводили тестовую экспрессию для отбора клона, синтезирующего максимальное количество рекомбинантного белка. Для этого отбирали несколько одиночных колоний, полученных после трансформации, и переносили их на новую чашку и в питательную среду LB с антибиотиками. Суспензию клеток растили (при 37°C, 250 об./мин.) до достижения оптической плотности 0,4 – 0,6 при 600 нм. Затем вносили индуктор экспрессии рекомбинантного белка – изопропил-β-D-тиогалактопиранозид (IPTG) – до конечной концентрации 3 мМ и отбирали аликвоты объемом 1 мл через 1, 2 и 3 часа. Отобранные клетки осаждали центрифугированием (4000g, 5 мин.), супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в небольшом объеме воды, добавляли равный объем двукратного буфера для образцов по Лэммли, и кипятили образцы 5 мин. при 100°C. Полученные образцы и контрольный образец (до добавки IPTG) анализировали электрофорезом или иммуноблоттингом.

Отобранные клоны клеток растили в 20 мл LB с антибиотиками в течение ночи (при 37°C, при постоянном перемешивании 250 об/мин), затем бактериальные культуры переносили в двухлитровые колбы с 600 мл среды LB и инкубировали в тех же условиях. Когда оптическая плотность суспензии при 600 нм достигала значения 0,4 – 0,6, вносили IPTG до конечной концентрации 3 мМ и продолжали инкубировать ещё 3 часа. Затем культуру охлаждали и осаждали клетки (5000g, 30 мин.). Осадок клеток, в случае KRP человека, ресуспендировали в буфере, содержащем 25% сахарозу, 0,2 М KCl, 30 мМ трис-HCl, pH 8,0, 0,2 мМ TPCK, 0,5 мМ ФМСФ, 10 мМ 2-меркаптоэтанол, 2 мМ ЭДТА, 2 мМ ЭГТА. В случае рекомбинантных белков, содержащих His₆- или GST-таговую последовательность, осадок ресуспендировали в 20 мл соответствующего буфера для аффинной хроматографии (см. соответственно пп. 1.6.4 и 1.6.5 этой главы) и хранили при –20°C. Клетки размораживали, разрушали их с помощью ультразвука (Branson SONIFIER 450, Branson Ultrasonics Corp., США) Полученный лизат центрифугировали (9000g, 20 мин.) и супернатант использовали для выделения рекомбинантных белков.

2. Биохимические методы

2.1 Определение концентрации белков

Концентрацию KRP и НММ определяли спектрофотометрически по поглощению при 280 нм. В работе использовали следующие коэффициенты экстинкции ($E_{280 \text{ нм}}^{1 \text{ мг/мл}}$): 0,69, 0,85 и 0,78 для chiKRP-His₆, ΔN-chiKRP-His₆ и ΔC-chiKRP-His₆, соответственно (Silver et al., 1997), 0,77 для hKRP, S¹³A-hKRP, S¹³D-S¹⁹D-hKRP (Хапчаев, 2004), 0,75 для ΔC-hKRP (Серебряная, 2006), 0,647 для НММ (Young et al., 1964), 0,56 для миозина (Sellers et al., 1981).

Концентрацию GST- p44^{erk1} MAP-киназы определяли амидовым чёрным по методу Шаффнера-Вайсмана (Schaffner and Weissmann, 1973).

Концентрацию PKG и общий белок в тканевых экстрактах определяли по методу Бредфорд (Bradford, 1976) с помощью набора реактивов Bradford Protein Assay Kit фирмы Bio-Rad (США) по протоколу производителя, используя бычий сывороточный альбумин в качестве стандарта.

2.2. Приготовление образцов тканей для электрофореза

Скинированные гладкомышечные волокна *taenia coli* морской свинки фиксировали в 15% ТХУ в течение 10 мин на льду. Волокна отмывали от ТХУ 95% ацетоном 3-4 раза по 5 мин. Для контроля следовых количеств ТХУ, волокна погружали на 2-3 мин в 20 мМ имидазол pH 7,6 с добавлением 0,05% бромфенолового синего. В

случае появления у раствора желтой окраски, волокна повторно промывали ацетоном до тех пор, пока раствор не приобретал синий цвет. Затем волокна снова выдерживали 5 минут в ацетоне и высушивали. Препараты волокон хранили при -20°C и использовали для приготовления образцов для электрофореза по методу Лэммли и мочевино-глицеринового электрофореза.

Для приготовления образцов для электрофореза по методу Лэммли, ткань растирали с помощью стеклянного гомогенизатора (Micro, 200 мкл, Kimble-Kontes, США) на льду в минимальном объеме двухкратного буфера для образцов по Лэммли (62,5 мМ трис-HCl, pH 6,8, 2% додецилсульфат натрия (ДСН), 5% 2-меркаптоэтанол, 10% глицерин, 0,05% бромфеноловый синий), содержащем ингибиторы протеаз – 3 мкМ апротинин, 10 мкМ лейпептин и 0,1 мМ PMSF. Полученные образцы кипятили в течение 5 мин, охлаждали, добавляли мочевины до конечной концентрации 5М и инкубировали 30 мин на льду для экстракции нерастворившихся в ходе гомогенизации белков. Затем пробы центрифугировали при 15000 g в течение 20 мин. Надосадочную жидкость хранили при -20°C и использовали для электрофореза.

Для приготовления образцов для мочевино-глицеринового электрофореза, волокна инкубировали в буфере для мочевино-глицеринового электрофореза (20 мМ трис-HCl pH 6,8, 9 М мочевины, 10 мМ ДТТ, 0,05% бромфеноловый синий) с добавлением ингибиторов протеаз – 3 мкМ апротинина, 10 мкМ лейпептина и 0,1 мМ PMSF — 1 час при комнатной температуре. Полученный таким способом образец гомогенизировали, и продолжали инкубацию еще 1 час при комнатной температуре. Пробы подвергали центрифугированию (15000 g, 20 мин), супернатант использовали для электрофореза сразу после приготовления.

2.3. Электрофоретическое разделение белков в полиакриламидном геле (ПААГ) по методу Лэммли

Препараты очищенных белков и экстракты тканей подвергали электрофорезу в пластинах полиакриламидного геля в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН) и β -меркаптоэтанола, который проводили по методу Лэммли (Laemmli, 1970). Использовали 4% концентрирующий гель, приготовленный на 0,125 М трис-HCl буфере pH 6,8, содержащем 0,1% ДСН; и 7-20% (в зависимости от массы разделяемых белков) разделяющие гели, приготовленные на 0,375 М трис-HCl буфере pH 8,8, содержащем 0,1% ДСН. Соотношение мономеров акриламида и NN'-метиленбисакриламида составляло 36,5:1. Электрофорез проводили в буфере с pH 8,3, содержащем 0,025 М трис-, 0,192 М

глицин и 0,1% ДСН при 80В и 150В в случае концентрирующего и разделяющего геля, соответственно.

Нагрузка дорожек различалась в зависимости от целей эксперимента и для очищенных препаратов белка составляла 0,4–3 мкг для последующей окраски гелей Кумасси R-250 и 2–250 нг белка для последующего иммуноблоттинга. Для окраски гелей при исследовании образцов тканей наносили 15-25 мкг общего белка, а для последующего иммуноблоттинга необходимое количество образца подбирали экспериментально. Окрашенные пластины сканировали для проведения денситометрического анализа с использованием калиброванного денситометра BioRad GS800 и программы Quantity One 4.6 и/или высушивали. Для автордиографии высушенные гели помещали на рентгеновскую пленку в кассету с экраном для усиления сигнала и экспонировали в течение 2-48 часов при -70° С, в зависимости от интенсивности сигнала, и также проводили денситометрический анализ.

2.4. Электрофоретическое разделение белков в ПААГ в присутствии мочевины и глицерина

Для оценки степени фосфорилирования РЛЦ миозина и KRP образцы гладкомышечных волокон и фосфорилированных белков подвергали электрофорезу в пластинах полиакриламидного геля в присутствии мочевины и глицерина по методу (Persechini et al., 1986). В работе использовали 5% концентрирующий гель, приготовленный на 20 мМ Tris/HCl pH 6,8 и содержащий 16,5% глицерин и 3,3 М мочевины; и 12% разделяющий гель, приготовленный на 20 мМ трис-глициновом буфере, pH 8,6, содержащем 40% глицерин. Соотношение мономеров акриламида и NN'-метиленабисакриламида составляло 19:1. Разделение проводили в 20 мМ трис-глициновом буфере, pH 8,6 в течение 20 мин при 330V и 115 мин при 400V, в концентрирующем и разделяющем геле, соответственно.

2.5. Иммуноблоттинг

Иммуноблоттинг проводили, как это было описано ранее (Towbin et al., 1979). Электроперенос РЛЦ миозина после электрофореза в ПААГ в присутствии мочевины и глицерина, осуществляли на нитроцеллюлозные мембраны в 25 мМ трис-192 мМ глициновом буфере pH 8,6, содержащем 20% метанол. В случае электропереноса белка KRP использовали буфер CAPS (10 мМ Caps, pH 11,0, 10% этанол, 5мМ β-меркаптоэтанол), при 350 мА в течение 1 часа. Остальные белки блоттировали в буфере,

содержащем 25 мМ трис-180 мМ глицин, рН 8,3, 20% этанол, 0,02% ДСН. в течение 1-3 ч при 350мА на PVDF-мембраны.

После электропереноса PVDF- и нитроцеллюлозные мембраны инкубировали в течение 15 минут с 0,25% глутаровым альдегидом для ковалентной иммобилизации белков на мембране. При необходимости визуализации белковых полос на мембране, её ополаскивали 7% уксусной кислотой и окрашивали 0,1% Ронсеау S, 1% CH₃COOH. После этого мембрану отмывали ТСБТ (трис-солевой буфер: 25 мМ трис-HCl, рН 7,4, 140 мМ NaCl, содержащий 0,1% Твин 20) и блокировали участки неспецифического связывания, инкубируя мембрану в течение 1 часа в присутствии 5% раствора обезжиренного сухого молока в ТСБТ. Далее мембрану отмывали ТСБТ и затем инкубировали при перемешивании 1 час при комнатной температуре (или в течение ночи при +4°C) с раствором первичных антител, приготовленном на 1% обезжиренном молоке на ТСБТ. Для удаления неспецифически связавшихся первичных антител мембрану отмывали ТСБТ и после этого инкубировали 1 час в растворе вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена (раствор вторичных антител также готовили на 1% обезжиренном молоке на ТСБТ). После инкубации мембрану повторно отмывали от неспецифически связавшихся вторичных антител раствором ТСБТ.

Первичные антитела к KRP, фосфорилированному KRP (клоны R5 и R8) и фосфорилированным РЛЦ миозина использовали в разведении 1:500 – 1:2000. Коммерчески приобретённые препараты первичных и вторичных антител, использовали в разведениях, рекомендованных производителем. Для выявления белковых полос применяли хемилюминесцентную детекцию или 3,3'-диаминобензидин (ДАБ) согласно инструкциям производителей. В случае хемилюминесцентной детекции время экспозиции мембран варьировали в зависимости от интенсивности сигнала от 0,5 до 30 мин.

2.6. Выделение белков

2.6.1. Выделение тяжёлого меромиозина (НММ)

НММ выделяли из мускульных желудков курицы, как это было описано ранее (Sellers et al., 1981). Все операции проводили при +4°C. Мускульные желудки курицы (15 г) гомогенизировали в 100 мл буфера А (10 мМ MOPS, рН 6,8 50 мМ NaCl, 1 мМ ЭГТА, 10 мМ 2-меркаптоэтанол, 0,2 мМ ФМСФ), содержавшем 0,5% тритон X-100 и коктейль ингибиторов протеаз в концентрации, рекомендованной производителем (Roche, Швейцария), и центрифугировали 15 минут при 10 000 g. Осадок промывали, гомогенизируя его 4-5 раз в буфере А (каждый раз по 80 мл), и центрифугировали 15

минут при 10 000 g. К полученному осадку добавляли 85 мл буфера В для экстракции (30 mM MOPS, pH 7,4, 55 mM NaCl, 1 mM ЭДТА, 3 mM ЭГТА, 10 mM 2-меркаптоэтанол, 0,2 mM ФМСФ) и перемешивали на льду в течение 1 часа, после чего центрифугировали 15 минут при 22 000 g. В супернатант последовательно при перемешивании добавляли сухой NaCl до 0,6 M, раствор MgАТФ (100 mM, pH 7,2-7,4) до 5 mM, $MgCl_2$ до 20 mM. Затем к гомогенату добавляли насыщенный раствор сульфата аммония (приготовленный на 10 mM ЭДТА, pH 7,0) до 42% насыщения и центрифугировали 15 минут при 25 000 g. К полученному супернатанту добавляли сухой сульфат аммония до 60% насыщения, перемешивали в течение 10 минут на льду и центрифугировали 15 минут при 25 000 g. Осадок растворяли в минимальном объеме холодного буфера С (5 mM MOPS, pH 7,0, 25 mM NaCl, 0,1 mM ЭГТА, 10 mM 2-меркаптоэтанол, 0,1 mM ФМСФ) и диализовали против того же буфера.

Диализат разбавляли в три раза холодной водой, добавляли раствор $MgCl_2$ до конечной концентрации 20 mM, перемешивали в течение 15 минут и центрифугировали 15 минут при 40 000 g. Осадок тщательно растворяли в минимальном объеме буфера Д, (5 mM MOPS, pH 7,0, 0,5 M NaCl, 0,1 mM ЭГТА, 10 mM 2-меркаптоэтанол, 0,1 mM ФМСФ) и центрифугировали 15 минут при 20 000 g. Полученный супернатант диализовали против буфера Е (10 mM MOPS, pH 7,0, 0,5 M NaCl, 0,1 mM ЭГТА, 1 mM $MgCl_2$, 10 mM 2-меркаптоэтанол, 0,1 mM ФМСФ).

В диализате доводили содержание $MgCl_2$ до 15 mM, $CaCl_2$ до 0,4 mM, кальмодулина до $2 \cdot 10^{-8}$ M, АТФ до 5 mM, для того чтобы защитить РЛЦ миозина от предстоящего химотрипсинолиза путем их фосфорилирования. Раствор перемешивали 10 минут на водяной бане при 25°C, добавляли 5 M раствор NaCl до конечной концентрации 0,5 M, перемешивали на водяной бане в течение 5 минут, доводили содержание ЭГТА до 5,5 mM. Химотрипсинолиз проводили в течение 7 минут при 25°C, добавляя к раствору химотрипсин до конечной концентрации 0,08 мг/мл (раствор химотрипсина 10 мг/мл, приготовленный на 1 mM HCl). Концентрация миозина, измеренная спектрофотометрически, составляла 20 мг/мл. Реакцию химотрипсинолиза останавливали, добавляя ФМСФ до конечной концентрации 0,5 mM. Раствор диализовали против буфера Е, содержавшего 25 mM NaCl и 10 mM $MgCl_2$.

Диализат центрифугировали 20 минут при 40 000 g для удаления нерасщепленного миозина и легкого меромиозина. В полученном супернатанте доводили концентрацию NaCl до 0,5 M и наносили на колонку с Сефакрил-S-300 (100 см x 5 см), уравновешенную буфером Е с концентрацией NaCl 0,5 M. Гельфильтрация проводилась для отделения тяжелого меромиозина от киназы и фосфатазы РЛЦ миозина.

Полученные после гель-фильтрации фракции подвергали ДСН-электрофорезу по Лэммли и анализировали гомогенность полученных белков окрашиванием гелей раствором Кумасси R - 250. Фракции, содержавшие НММ, объединяли, концентрировали осаждением сульфатом аммония и центрифугировали 20 минут при 22 000 g. Полученный осадок ресуспендировали в минимальном объеме буфера Р (10 мМ MOPS, pH 7,0, 50 мМ NaCl, 1 мМ ЭГТА, 1 мМ MgCl₂, 10 мМ 2-меркаптоэтанол, 0,1 мМ ФМСФ) и диализовали против этого буфера. После добавления NaCl до 0,5 М, полученный препарат замораживали и хранили в жидком азоте в виде шариков.

В препарате НММ проверяли наличие активности фосфатазы. Для этого препарат полностью фосфорилировали КЛЦМ (см. раздел 1.9 Материалов и методов), а затем добавляли раствор ЭГТА, pH 7,0 до конечной концентрации 5 мМ, и инкубировали в тех же условиях 80 минут. Уменьшения степени фосфорилирования препарата НММ при этом обнаружено не было, что говорит об отсутствии фосфатазной активности в препарате НММ. Киназной активности также обнаружено не было, так как при инкубации препарата НММ в присутствии АТР, Ca²⁺ и СаМ (см. раздел 1.9 Материалов и методов) в течение 30 минут, фосфорилирования НММ не наблюдалось.

2.6.2. Выделение цГМФ-зависимой протеинкиназы (PKG)

PKG выделяли из лёгких быка по методу Линкольна (Lincoln, 1983) с некоторыми модификациями. Все операции проводили при +4°C, если не указано иное. Лёгкие отделяли от трахеи и крупных бронхов и измельчали в мясорубке. К полученному фаршу (1,4 кг) добавляли тройной объём (4,2 л) буфера РЕМ (20 мМ калий-фосфат, pH 7,0, 4 мМ ЭДТА, 0,2 мМ бензамидин, 0,1 мМ ФМСФ, 15 мМ 2-меркаптоэтанол), гомогенизировали в блендере и центрифугировали 20 минут при 15000 g. Супернатант фильтровали через стеклянную вату и разбавляли в 2 раза буфером РЕМ. Полученный раствор доводили до 60% насыщения (NH₄)₂SO₄ и центрифугировали 20 минут при 20000 g. Осадок растворяли в буфере РЕМ и диализовали в том же буфере.

Диализат центрифугировали 20 минут при 20000 g и супернатант наносили на колонку с DEAE-сефарозой (супернатант делили на 3 части и последовательно наносили на колонку размером 2,6 см x 40 см, после каждого хроматографического разделения колонку регенерировали 1М NaCl), уравновешенную буфером РЕМ. Затем колонку промывали буфером РЕМ с 50 мМ NaCl до полного отсутствия белка в элюате (при этом происходит элюция РКА). Далее элюировали градиентом 150 - 700 мМ NaCl. Фракции анализировали при помощи иммуноблоттинга с использованием антител, специфичных к PKG.

Фракции, содержавшие PKG, наносили на колонку с 8-[(6-амино)гексил]амино-цАМФ-сефарозой (5 мл) со скоростью не превышающей 40 мл/ч. Далее колонку последовательно промывали буфером РЕМ, буфером РЕМ с 1 М NaCl и буфером РЕМ с 10 мМ 5'-АМФ и буфером РЕМ. Затем колонку инкубировали в буфере РЕМ с 10 мМ цГМФ при 37°C в течение 10 мин, и при комнатной температуре элюировали PKG (1 объем колонки). Операцию повторяли 5 раз. Полученные фракции анализировали при помощи иммуноблоттинга с использованием антител, специфичных к PKG.

Фракции, содержавшие PKG, наносили на колонку с DEAE-сефарозой (1 мл), промывали буфером РЕМ и элюировали 700 мМ NaCl. Полученный препарат PKG диализовали в буфер для хранения (20 мМ фосфат калия, pH 7,0, 2 мМ ЭДТА, 20 мМ сахараза, 4 мМ ДТТ, 1 мкг/мл лейпептин), концентрировали на концентраторах Microcon YM-10, добавляли глицерин до 50% и хранили при -20°C.

Активность PKG измеряли, используя в качестве субстрата hKRP (120μМ). Реакцию фосфорилирования проводили в буфере РЕМ в присутствии 0,1 мМ АТФ, 0,01 мМ 8-Br-cGMP и 5 мМ MgCl₂ при 30°C. Степень фосфорилирования hKRP определяли с помощью мочевино-глицеринового электрофореза аналогично hKRP, фосфорилированному PKA (см. раздел 1.8 Материалов и методов). Было показано, что 1 мг PKG фосфорилирует $1,09 \times 10^{-2}$ μмоль hKRP за 1 мин. Для проверки примеси PKA в препарате PKG использовали ингибитор PKA, пептид «5-24», в концентрации 1μМ. Было установлено, что пептид «5-24» не влияет на активность препарата PKG, но в то же время ингибирует PKA в условиях проведения реакции. Это свидетельствует о том, что в препарате отсутствует активность PKA.

2.6.3 Выделение рекомбинантного KRP человека (wt-hKRP и ΔC-hKRP)

Выделение wt-hKRP. Для выделения KRP использовали метод Ито (Ito et al., 1989) с некоторыми модификациями. Экстракт бактериальных клеток, экспрессирующих wt-hKRP, полученный из 3-х литров культуры, доводили до 20% насыщения (NH₄)₂SO₄, приливая к экстракту насыщенный раствор (NH₄)₂SO₄, инкубировали 20 мин при 4°C и центрифугировали (20000g x 20 мин). Полученный супернатант последовательно доводили до 40% и 60% насыщения (NH₄)₂SO₄ аналогичным образом. Осадок, полученный при 60% насыщении (NH₄)₂SO₄, диализовали против 30 мМ KCl, 30 мМ трис-HCl, pH 7,5, 5 мМ 2-меркаптоэтанол, 0,1 мМ ФМСФ и наносили на колонку с Q-сефарозой (или DEAE-сефарозой) размером 7,0 см x 1,6, уравновешенную тем же буфером. Связавшийся белок элюировали с колонки линейным градиентом NaCl 0 – 1 М. Фракции, содержащие по результатам ДСН-электрофореза KRP, объединяли и диализовали против

буфера Г (30 мМ трис- SO_4 , pH 7,5, 1 мМ CaCl_2 , 20 мМ 2-меркаптоэтанол), содержащего 2 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. После диализа образец наносили на колонку с октил-сефарозой (или фенил-сефарозой) размером 7,0 см x 2,6 см, уравновешенную тем же буфером. Белки элюировали уменьшающимся градиентом $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2–0 М. Гомогенные по результатам ДСН-электрофореза фракции объединяли и многократно диализовали против буфера МРВ (10 мМ Mops, pH 7,0, 2,5 мМ MgCl_2 , 0,1 мМ ЭГТА, 20 мМ NaCl , 1 мМ ДТТ). Диализат концентрировали на фильтрах Amicon (США) и хранили в аликвотах при -20°C . Фильтрат, полученный при концентрировании белка, использовали как контрольный буфер для измерения сократительной активности гладкомышечных волокон.

Выделение $\Delta\text{C-hKRP}$. Выделение $\Delta\text{C-hKRP}$ осуществляли так же как wt-hKRP за исключением некоторых этапов. При высаливании $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ отбирали фракцию с 30-60% насыщением. После ионообменной хроматографии фракции диализовали против буфера Г, содержащего 1М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. После диализа образец наносили на колонку с фенил-сефарозой, уравновешенную тем же буфером. Белки элюировали с колонки уменьшающимся градиентом концентрации сульфата аммония 1–0 М.

2.6.4. Выделение рекомбинантного KRP курицы, содержащего C-концевой полигистидин (chiKRP-His_6 , $\Delta\text{N-chiKRP-His}_6$ и $\Delta\text{C-chiKRP-His}_6$)

Экстракт бактериальных клеток, экспрессирующих chiKRP-His_6 , $\Delta\text{N-chiKRP-His}_6$ или $\Delta\text{C-chiKRP-His}_6$, полученный из 600 мл культуры, наносили на колонку TALON (Clontech, США) размером 1,5 см x 1 см, уравновешенную буфером А (20 мМ трис- HCl , pH 8,0, 0,5 М NaCl , 5 мМ имидазол, 5 мМ 2-меркаптоэтанол, 0,5 мМ PMSF), после чего колонку промывали 10 объёмами того же буфера. Элюцию связавшегося белка осуществляли буфером А, содержащим 60 мМ имидазол. Затем колонку регенерировали: промывали раствором 1М имидазола и уравновешивали буфером нанесения. Полученные фракции анализировали с помощью метода электрофореза. Если после аффинной хроматографии с использованием носителя TALON, препарат белка оказывался недостаточно чистым, его подвергали дальнейшей очистке методом ионообменной хроматографии. Раствор белка диализовали против буфера В (30 мМ трис- HCl , 30 мМ NaCl , 5мМ 2-меркаптоэтанол, 0,1 мМ PMSF) и наносили на колонку с Q-сефарозой размером 2 см x 0,5 см, уравновешенную тем же буфером. Связавшийся белок элюировали ступенчатым градиентом NaCl 0,0 – 0,6 М. Фракции, содержащие электрофоретически чистый белок, объединяли, концентрировали и диализовали против буфера МРВ. Полученный препарат замораживали в жидком азоте в виде шариков и хранили при -70°C .

2.6.5. Экспрессия и очистка GST-p44^{erk1} MAP-киназы

Экстракт бактериальных клеток, экспрессирующих химерную GST (глутатион-S-трансфераза)-таговую p44^{erk1} MAP-киназу, полученный из 1 л культуры, диализовали против ФСБ-ДТТ буфера (фосфатно-солевой буфер 2,7 мМ KCl, 140 мМ NaCl, 10 мМ Na₂HPO₄, 1,8 мМ KH₂PO₄, pH 7,3, 0,5 мМ ДТТ) и пропускали через колонку с глутатион-сефарозой (6 см x 1 см). Связавшийся белок элюировали буфером 50 мМ трис-HCl, pH 8,0, 10 мМ восстановленный глутатион. Для этого на колонку наносили объем буфера элюции, равный свободному объему колонки, давали буферу войти в носитель, инкубировали 20 минут и собирали элюат. Аналогично собирали несколько фракций, которые затем анализировали методом ДСН-электрофореза и объединяли фракции, содержащие электрофоретически гомогенную p44^{erk1} MAP-киназу. Белок диализовали в буфере MPB (10 мМ MOPS, pH 7,0, 1 мМ MgCl₂, 0,1 мМ ЭГТА, 20 мМ NaCl, 1 мМ ДТТ), затем добавляли глицерин до конечной концентрации 50%, и хранили при -20°C.

2.7. Получение фрагмента КЛЦМ с массой 61 кДа

Фрагмент КЛЦМ с массой 61 кДа (КЛЦМ-61), содержащий каталитический домен, но лишенный KRP домена, получали с помощью протеолиза полноразмерной КЛЦМ из желудков кур с массой 108 кДа (КЛЦМ-108) согласно (Ikebe et al., 1989). В работе (Ikebe et al., 1987) установлено, что в ходе протеолиза КЛЦМ-108 под действием трипсина, сначала образуется Ca²⁺/CaM-зависимый фрагмент КЛЦМ с массой 66 кДа (КЛЦМ-66), затем неактивный фрагмент с массой 64 кДа, и, в последнюю очередь, конститутивно-активный фрагмент – КЛЦМ-61. Теми же авторами (Ikebe et al., 1989) показано, что кальмодулин, связываясь с соответствующим участком КЛЦМ, защищает его от действия трипсина, и, таким образом, позволяет избежать образования конститутивно неактивной формы КЛЦМ (64 кДа).

КЛЦМ из желудков кур (0,5 мг/мл = 1,4 мкМ) обрабатывали DPCC-трипсином в присутствии 0,05 мМ Ca²⁺ и 2,7 мкМ кальмодулина. Весовое отношение КЛЦМ : трипсин составляло 50 : 1. Реакцию проводили в буфере: 30 мМ трис-HCl, pH 7,5, 50 мМ KCl, при 25°C в течение 20 мин. Протеолиз останавливали добавлением 15-кратного избытка (мг/мг) соевого ингибитора трипсина.

Образующиеся в ходе реакции фрагменты КЛЦМ анализировали с помощью электрофореза в градиентном (7,5-20%) ПААГ (см. рис. 8). В ходе реакции наблюдалось снижение молекулярной массы препарата КЛЦМ и появление фрагментов КЛЦМ с кажущейся молекулярной массой 23 кДа (на 1 минуте) и 15 кДа (на 5 минуте).

Образующийся при этом фрагмент КЛЦМ с массой 66 кДа к 20 минутам полностью переходил в КЛЦМ-61. Полученные фрагменты с массами 15 и 23 кДа, по-видимому, соответствуют N-концевому фрагменту КЛЦМ и С-концевому KRP-домену (Ikebe et al., 1987).

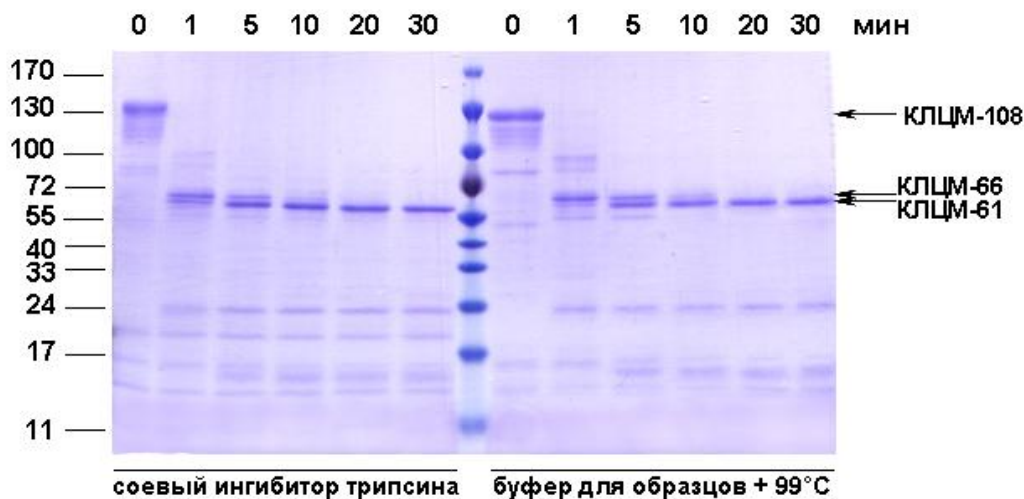


Рис. 8. Получение каталитического фрагмента КЛЦМ. КЛЦМ-108 обрабатывали трипсином (весовое отношение КЛЦМ : трипсин = 50 : 1), как описано в «Материалах и методах». В указанное время реакцию останавливали либо добавлением соевого ингибитора трипсина в соотношении по массе ингибитор : трипсин, равном 15 : 1 (левая часть рисунка), либо добавлением буфера для образцов и последующим кипячением (правая часть рисунка). Полученные образцы анализировали с помощью электрофореза по методу Лэммли с последующим окрашиванием кумаси R-250. Молекулярные маркеры белковых масс приведены в центре геля, соответствующие массы указаны слева. Положение КЛЦМ-108 и её фрагментов обозначено справа.

Для проверки эффективности действия ингибиторов, проводили две параллельных реакции. В контрольной пробе протеолиз останавливали добавлением буфера для образцов и последующим кипячением (рис. 8, слева). В опытной пробе протеолиз останавливали добавлением соевого ингибитора трипсина. После этого, реакционную смесь инкубировали ещё 30 мин при 30°C, затем добавляли буфер для образцов и кипятили (рис. 8, справа). Электрофореграммы, полученные при анализе аликвот реакций в обоих случаях, были идентичны. Это свидетельствует о том, что после добавления соевого ингибитора не происходит дальнейшего разрушения КЛЦМ.

Таким образом, нами был получен фрагмент КЛЦМ, не содержащий KRP-домена и обладающий каталитической активностью КЛЦМ (см. рис. 10Б). Такой фрагмент удобен для изучения механизма влияния KRP на активность каталитического домена КЛЦМ в реакции фосфорилирования миозина.

2.8. Фосфорилирование KRP in vitro и его очистка от протеинкиназ

Фосфорилирование KRP. Все реакции фосфорилирования проводили в буфере MPB в присутствии 0,5 мМ АТФ и 5 мМ MgCl₂ при 30°C. Концентрация KRP при фосфорилировании киназами не превышала 2 мг/мл.

Рекомбинантный hKRP фосфорилировали каталитической субъединицей PKA и/или GST-p44^{erk1}-МАРК в молярном соотношении фермент:KRP – 1:100 и 1:20, соответственно, в течение 60 мин. Рекомбинантная GST-p44^{erk1} МАРК экспрессируется в бактериях в неактивном состоянии, поэтому необходимое количество МАРК активировали фосфорилированием конститутивно активной формой протеинкиназы MEK непосредственно перед использованием. Реакцию проводили в течение 30 мин. Весовое отношение МАРК:МЕК составляло 20:1. В случае, когда hKRP фосфорилировали по двум участкам, сначала проводили фосфорилирование PKA, очищали препарат P-S¹³-hKRP от протеинкиназы, и затем фосфорилировали МАР-киназой.

Степень фосфорилирования hKRP, фосфорилированного по Ser¹⁹ (МАРК), определяли по изменению подвижности при электрофорезе по Лэммли, поскольку электрофоретическая подвижность P-S¹⁹-hKRP ниже, чем нефосфорилированного hKRP (см. рис. 9 А, справа). В случае KRP, фосфорилированного PKA, использовали метод мочевинно-глицеринового электрофореза, так как в этих условиях P-S¹³-hKRP, как это ни парадоксально, обладает более низкой электрофоретической подвижностью, чем нефосфорилированный KRP (см. рис. 9А, слева). Как видно из рис. 9 А, в указанных условиях удастся достичь полного фосфорилирования KRP как под действием PKA, так и МАРК.

Очистка фосфорилированного hKRP от протеинкиназ. P-S¹³-hKRP очищали от PKA с использованием ионообменной хроматографии на колонке с фосфоцеллюлозой, уравновешенной буфером, содержащим 15 мМ MES, pH 6,5, 0,1 мМ ФМСФ и 1 мМ ДТТ. В данных условиях PKA связывается с носителем, а hKRP не сорбируется на ионообменнике. Для очистки P-S¹⁹-hKRP от GST-p44^{erk1} МАРК и His₆-MEK1 использовали колонки с аффинными носителями, глутатион-сефрозой и TALON, соответственно.

Для оценки эффективности очистки определяли активность соответствующих протеинкиназ в полученных препаратах P-S¹³-hKRP, P-S¹⁹-hKRP и P-S¹³,P-S¹⁹-hKRP. При этом в качестве субстрата протеинкиназ использовали нефосфорилированный ΔC-hKRP.

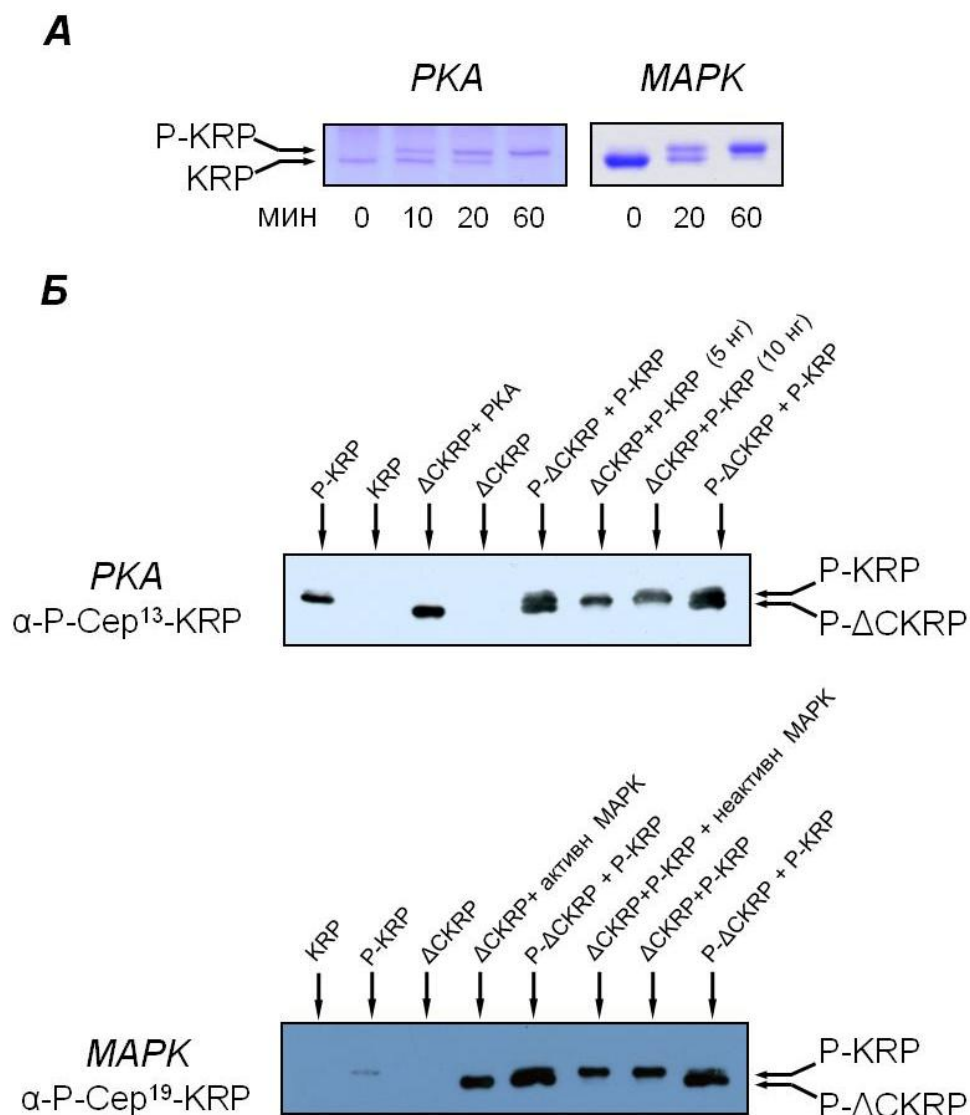


Рис. 9. Результат фосфорилирования KRP под действием PKA и MAPK *in vitro* и очистки полученных препаратов P-KRP от протеинкиназ. (А) KRP полностью фосфорилируется PKA и MAPK за 60 минут. Представлены электрофореграммы KRP, фосфорилированного PKA или MAPK в течение указанного времени. KRP, фосфорилированный PKA и MAPK обладает более низкой электрофоретической подвижностью при разделении с помощью мочевинно-глицеринового электрофореза и ДСН-электрофореза соответственно. (Б) Препараты P-KRP не содержат активностей PKA и MAPK. Нефосфорилированный Δ CKRP (« Δ CKRP») инкубировали с препаратами P-S¹³-hKRP или P-S¹⁹-hKRP («P-KRP»), очищенными от PKA и MAPK/MEK, соответственно (« Δ CKRP + P-KRP»), для определения наличия активности PKA или MAPK; или с препаратом P-S¹⁹-hKRP с добавлением неактивной MAPK (« Δ CKRP + P-KRP + неактивн MAPK»), как указано в материалах и методах (п. 1.8.). В качестве положительного контроля Δ CKRP инкубировали с PKA (« Δ CKRP + PKA») или активированной MAPK (« Δ CKRP + активн MAPK»). Для доказательства различной электрофоретической подвижности, препараты P-KRP и P- Δ CKRP наносили совместно на одну дорожку («P- Δ CKRP + P-KRP»).

Для проверки эффективности очистки препаратов P-S¹⁹-hKRP и P-S¹³,P-S¹⁹-hKRP от МЕК, к ним также добавляли неактивную MAPK в качестве субстрата. Условия проведения реакций были аналогичны тем, что использовались для фосфорилирования hKRP: концентрация препаратов P-hKRP и ΔC-hKRP составила 2 мг/мл, время инкубации 60 минут. Таким образом, если бы препараты не подвергались очистке, в них бы содержалось такое количество протеинкиназ, которого было бы достаточно для полного фосфорилирования ΔC-hKRP в течение указанного времени. В качестве положительного контроля ΔC-hKRP фосфорилировали соответствующим количеством PKA или активированной MAPK.

Различие молекулярных масс полноразмерного hKRP и белка, лишённого C-концевой последовательности (ΔC-hKRP), позволило разделить их с помощью денатурирующего электрофореза и отслеживать фосфорилирование только ΔC-hKRP. Фосфорилирование ΔC-hKRP определяли методом иммуноблоттинга с антителами, специфичными к P-S¹³-hKRP или P-S¹⁹-hKRP. Во всех проведенных опытах мы не обнаружили сигнала, соответствующего фосфорилированному ΔC-hKRP, что указывает на высокую эффективность очистки и полное отсутствие протеинкиназ в препаратах фосфорилированного hKRP (см. рис. 9 Б).

2.9. Фосфорилирование НММ под действием КЛЦМ

4 μМ НММ фосфорилировали КЛЦМ-108 (10 нМ) или КЛЦМ-61 (40 нМ) при +30°C в буфере MPB, содержащем 20 или 150 мМ NaCl, с 0,1 – 0,5 мМ АТФ в присутствии или отсутствии KRP человека или KRP курицы (20 и 50 μМ), KRP, фосфорилированного PKA и/или MAPK, или мутантных форм KRP. В случае КЛЦМ-108 в инкубационную среду добавляли 0,5 мМ Ca²⁺ и 300 нМ кальмодулин. Перед проведением реакции НММ размораживали и диализовали против MPB. Препарат повторно не замораживали и хранили после размораживания не более суток. Реакцию инициировали добавлением НММ. Аликвоты реакционной смеси отбирали и смешивали с буфером для образцов с добавлением коктейля ингибиторов протеаз (Roche, Швейцария). Полноту прохождения реакции анализировали двумя способами:

1) Фосфорилированную и нефосфорилированную формы РЛЦ миозина разделяли с помощью мочевино-глицеринового электрофореза. Поскольку электрофоретическая подвижность РЛЦ при проведении электрофореза в присутствии мочевины и глицерина совпадает с таковой для KRP, РЛЦ детектировали методом иммуноблоттинга. Для электропереноса использовали нитроцеллюлозную мембрану, которую окрашивали

антителами против РЛЦ, нечувствительными к фосфорилированию РЛЦ. Визуализацию окрашенных полос производили с использованием ДАБ;

2) Метод радиоавтографии. В этом случае в реакцию фосфорилирования проводили в присутствии γ -[32 P]АТФ (1,5-2,5 кБк/мл). После проведения электрофореза по методу Лэммли, гелевые пластины окрашивали Кумасси-R250, отмывали, высушивали, и экспонировали на фотопленке при -70°C в кассете с экраном для усиления сигнала в течение 2 - 48 ч в зависимости от интенсивности сигнала.

Уровень фосфорилирования РЛЦ вычисляли как соотношение: фосфо-РЛЦ/(фосфо-РЛЦ + РЛЦ). В случае использования радиоактивной АТФ величины сигналов были нормированы на величину сигнала полностью фосфорилированных РЛЦ. В этом случае полноту фосфорилирования определяли с помощью мочевинно-глицеринового электрофореза.

3. Физиологические методы исследования

3.1. Получение препарата *taenia coli*, скинированного Тритоном X-100

Самцов и самок морских свинок (*Cavia porcellus*) возрастом 3-5 месяцев анестезировали изофлуораном (2 мл) и декапитировали. Брюшную полость вскрывали и извлекали *taenia coli* – гладкомышечную ленту, расположенную вдоль ободочной части толстого кишечника. *Taenia coli* очищали от соединительной ткани и изометрически фиксировали на чашке Петри, покрытой силиконом, в растворе PSS с низким содержанием кальция (24 mM Hepes pH 7,4, 118 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,2 mM Na₂HPO₄, 1,2 mM MgCl₂, 1,6 mM CaCl₂, 2 mM ЭГТА, 10 mM глюкоза). После этого проводили скинирование волокон согласно методу Вирт и соавт. (Wirth et al., 2003). PSS удаляли и инкубировали фиксированные волокна в растворе, содержащем 20 mM имидазол pH 7,4 (при +4°C), 5 mM ЭГТА, 50 mM KCl, 150 mM сахарозы, 2 mM ДТТ, в течение 30 мин. при +4°C при перемешивании. Затем фиксированные волокна переводили в тот же раствор с добавлением 1% Тритона X-100, и выдерживали 4 часа на льду при постоянном перемешивании. Затем волокна промывали раствором без 1% Тритона X-100 и переводили в раствор для расслабления, который здесь и далее обозначается К (20 mM имидазол pH 6,7, 7,5 mM Na₂АТР, 10 mM MgCl₂, 4 mM ЭГТА, 1 mM NaN₃, 2 mM ДТТ, 1 μ M леупептин), содержащий 50% глицерин, и инкубировали в течение 15 мин. в тех же условиях до тех пор, пока волокна не становились полупрозрачными. Волокна хранили в этом растворе при -20°C в течение двух недель.

3.2. Измерение сократительной активности *taenia coli*

Все измерения проводили при температуре 22°C, используя раствор для расслабления, К, содержащий 140 Ед/мл креатинкиназы и 1 μM кальмодулина, и раствор для сокращения, L, который дополнительно содержал 4 мМ CaCl_2 . Необходимую концентрацию свободного кальция ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{free}}$) получали путём смешивания растворов К и L в соответствующей пропорции. $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{free}}$ вычисляли согласно методу Эндрюс и соавт. (Andrews et al., 1991).

Силу сокращения волокон измеряли одновременно в 4-6 камерах объемом 0,2 – 1 мл с помощью изометрических тензодатчиков, оснащенных трансдюсерами KG7 (Scientific Instruments, Германия). Регистрацию и анализ данных проводили с помощью программного обеспечения Real View v 3.0.

Волокна, скинированные Тритоном X-100, разделяли на продольные тонкие сегменты толщиной 100 – 200 мкм и длиной 5 мм в растворе К с 50% глицерином, закрепляли на изометрических датчиках, помещали в камеры с раствором К, растягивали на 5% длины и уравнивали в течение 15-20 мин до достижения стационарного уровня базального натяжения.

Для анализа воздействия KRP на сокращение скинированных волокон при субмаксимальной концентрации Ca^{2+} , сначала вызывали контрольный сократительный ответ добавлением раствора L (pCa 4,5), после чего отмывали волокна релаксирующим раствором К до базального уровня. Далее волокна стимулировали добавлением субмаксимальной концентрации Ca^{2+} , дожидались плато изометрического сокращения и добавляли KRP (10-20 μM), и/или PKA (31200 Ед/мл), 8Br-цГМФ/PKG (50 μM /0,18 μM), или соответствующий контрольный буфер и инкубировали 15-40 минут. Затем ещё раз вызывали контрольный сократительный ответ добавлением раствора L для оценки стабильности волокон в ходе выполнения эксперимента. В некоторых экспериментах для ускорения процесса (из-за нестабильности скинированных Тритоном X-100 волокон), после контрольного сокращения при максимальном Ca^{2+} (pCa 4,5), волокна не отмывали расслабляющим раствором, а сразу помещали в раствор с субмаксимальной концентрацией Ca^{2+} . Далее эксперимент проводили, как обычно.

Для исследования влияния KRP на Ca^{2+} -независимое сокращение, индуцированное добавлением ингибитора ФЛЦМ микроистина-LR, сначала также вызывали контрольный сократительный ответ добавлением раствора L (pCa 4,5), после

чего отмывали волокна раствором К до базального уровня. Далее волокна инкубировали с KRP (10 μM) или буфером, использованным при диализе, в течение 40 мин, после чего стимулировали сокращение гладкомышечных волокон добавлением 10 μM микроцистина, в присутствии KRP или диализного буфера (см. раздел 1.6.3). После регистрации Ca^{2+} -независимого сокращения волокна помещали в раствор L (pCa 4,5) для определения значения максимальной силы сокращения (F_{max}), которое использовалось для нормализации силы сокращения, индуцированного микроцистином.

Для исследования влияния KRP на Ca^{2+} -сенситизацию, вызванную тиюфосфорилированием, волокна после контрольного сократительного ответа (pCa 4,5) помещали в раствор К. Дожидались полного расслабления, и далее отмывали волокна от АТФ и ингибировали КЛЦМ. Для этого помещали волокна в раствор К без АТФ (20 мМ имидазол, pH 6,7, 2,5 мМ $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, 3 мМ ЭГТА, 1 мМ NaN_3 , 50 мМ KCl, 1 μM леупептин, 2 мМ ДТТ) с 300 μM ингибитором КЛЦМ, ML-9, на 15 минут. Далее помещали волокна в такой же раствор с добавлением 1 мМ АТФ γ S на 3 минуты. Волокна отмывали раствором К 2 раза по 5 минут, и вызывали сокращение, погружая волокна в раствор с pCa 6,8. Далее вызывали ещё один контрольный сократительный ответ (pCa 4,5) для определения значения максимальной силы сокращения (F_{max}), которое использовалось для нормализации силы сокращения. Время инкубации с АТФ γ S подбирали так, чтобы сила сокращения при pCa 6,8 составляла около 50% от F_{max} . На этом временном отрезке наблюдалась линейная зависимость силы сокращения при pCa 6,8 от времени инкубации с АТФ γ S. При увеличении времени инкубации до 10 минут, сила сокращения при pCa 6,8 приближалась к 100% от F_{max} . hKRP добавляли к растворам в концентрации 20 μM . В качестве контроля добавляли соответствующее количество буфера, использовавшегося при диализе KRP.

3.3. Измерение фосфорилирования KRP в волокнах в ходе сокращения, индуцированного микроцистином

Полоски ткани изометрически закрепляли на U-образной проволоке из нержавеющей стали с помощью гистоакрилового клея и подвергали тем же процедурам, что и при измерении сократительной активности. После инкубации (40 мин) в растворе К с 10 μM hKRP, волокна помещали в раствор К, содержащий 10 μM микроцистин, 10 μM hKRP и 3,3 МБк $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ / $\mu\text{моль}$ АТФ и инкубировали 60 минут. Далее волокна фиксировали в ТХУ и использовали для приготовления образцов для анализа с помощью электрофореза по Лэммли с последующей авторадиографией и иммуноблоттингом с

антителами, специфичными к KRP, как описано в разделах 1.2, 1.3, 1.5. Волокна, инкубировавшиеся с диализным буфером вместо hKRP, использовали в качестве контроля. Для определения количества фосфорилированного hKRP, детектируемого в волокнах, в качестве стандарта использовали hKRP фосфорилированный *in vitro* MAP-киназой (см. раздел 1.8) в течение 60 минут, в присутствии [γ - 32 P]-АТФ с той же удельной активностью, что использовались для экспериментов с волокнами.

3.4. Измерение дефосфорилирования KRP в волокнах *taenia coli*

Степень дефосфорилирования фосфорилированного hKRP в *taenia coli* определяли двумя методами: непосредственно в волокнах, и с гомогенатами *taenia coli*, к которым добавляли P-hKRP в качестве субстрата.

Для того чтобы определить может ли фосфорилированный hKRP дефосфорилироваться в ходе измерения сокращения волокон, полоски ткани изометрически фиксировали на U-образной проволоке из нержавеющей стали с помощью гистоакрилового клея и подвергали тем же процедурам, что и при измерении сократительной активности. После инициации максимального сокращения и расслабления, волокна инкубировали в растворе К, содержащем 10 μ М P-hKRP, (полученным в результате фосфорилирования под действием РКА или MAP-киназы), в течение 60 мин, а затем фиксировали в ТХУ (см. раздел 1.2). В качестве контроля начального уровня фосфорилирования hKRP, волокна инкубировали 60 мин с фосфо-hKRP и 10 μ М микроцистином или с 10 нМ ооадаевой кислотой в растворе К без АТФ. Степень дефосфорилирования Ser¹³ и Ser¹⁹ hKRP определяли с помощью мочевино-глицеринового электрофореза или электрофореза по Лэммли, соответственно (см. раздел 2.8), с последующим иммуноблоттингом с антителами к KRP, нечувствительными к фосфорилированию KRP. Для контроля количества белка, нанесённого на дорожку, верхнюю часть геля, содержащую полосу, соответствующую актину окрашивали Кумасси R-250.

Для того, чтобы выяснить, может ли фосфорилированный hKRP дефосфорилироваться гомогенатом скинированной ткани *taenia coli*, скинированные волокна гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе на льду в 5 объёмах (масса/объём) раствора К без АТФ. 10 μ М hKRP, фосфорилированного РКА или MAP-киназой, инкубировали с гомогенатом *taenia coli* в растворе К без АТФ (1/10 (масса/объём)) в присутствии или в отсутствие 4 мМ CaCl₂ при 30°C в течение 40 мин. В качестве контроля начального уровня фосфорилирования hKRP, использовали P-hKRP, инкубированный с гомогенатом в присутствии 10 μ М микроцистина в тех же условиях.

Реакцию останавливали добавлением буфера для образцов для электрофореза по Лэммли. Уровень фосфорилирования hKRP определяли с помощью иммуноблоттинга с антителами, специфичными к фосфо-hKRP (см. раздел 1.5). Для контроля количества белка, нанесённого на дорожку, верхнюю часть геля, содержащую полосу, соответствующую актину окрашивали Кумасси R-250.

4. Конфокальная микроскопия волокон *taenia coli*

Для оценки проникновения KRP в скинированные волокна *taenia coli* использовали конфокальную микроскопию. Рекомбинантный KRP человека последовательно метили по ε-аминогруппам лизиновых остатков и по SH-группам цистеиновых остатков.

Для включения метки по лизиновым остаткам, KRP диализовали в буфер ФСБ, а затем добавляли бикарбонат натрия (pH 9,0) до конечной концентрации 0,1 М. Далее добавляли сукцинимидиловый эфир Alexa Fluor® 488, и инкубировали 1 час при комнатной температуре. Концентрация KRP в реакционной смеси составляла 2 мг/мл, сукцинимидиловый эфир Alexa Fluor® 488 использовался в 9-ти кратном молярном избытке по отношению к остаткам лизина. Реакцию останавливали добавлением гидроксиламина (pH 8,5) до конечной концентрации 0,15 М, с последующей инкубацией в течение часа при комнатной температуре.

Для включения метки по цистеиновым остаткам, KRP диализовали в буфер ФСБ, затем добавляли ДТТ до конечной концентрации 10 мМ, и инкубировали 30 мин при 37°C для восстановления сульфгидрильных групп. Затем, во избежание влияния избытка ДТТ на присоединение метки, KRP диализовали в ФСБ с добавлением 0,1 мМ ДТТ. Далее добавляли Alexa Fluor® 488 C₅ малеимид, инкубировали 4 часа при 18°C. Концентрация KRP в реакционной смеси составила 2 мг/мл, Alexa Fluor® 488 C₅ малеимид использовался в 3-х кратном молярном избытке по отношению к SH-группам. Реакцию останавливали добавлением ДТТ (1 мМ). Не связавшуюся метку удаляли многократным диализом против буфера MPB.

Волокна *taenia coli*, скинированные Тритоном X-100, изометрически фиксировали на тензодатчике, инкубировали в растворе К с 10 µМ меченым KRP или с его диализным буфером (контроль) в течение 40 минут при комнатной температуре. Меченый KRP, не связавшийся с волокнами, удаляли 2-х кратным (по 2 мин) промыванием в растворе К, содержащем 10 µМ немеченый KRP или просто в растворе К (контроль). Далее волокна фиксировали 4% параформальдегидом в течение 30 мин и дважды промывали ФСБ. Окрашивали ядра DAPI в течение 10 мин при комнатной температуре в разведении,

рекомендованном производителем. F-актин окрашивали фаллоидином меченым Alexa Fluor[®] 555 в количестве 5 единиц (определённых производителем) на одно волокно *taenia coli* в течение 30 мин при комнатной температуре.

Волокна фиксировали на предметных стёклах с помощью заливочной среды Mowiol 4-88, накрывали покровными стёклами и детектировали сигнал с помощью конфокального микроскопа Leica DMI 6000B. Длина волны возбуждающего света: 405 нм для DAPI, 488 нм для Alexa Fluor[®] 488 и 561 нм для Alexa Fluor[®] 555. Интенсивность лазера: 16% для 405 нм, 22% для 488 нм и 18% для 561 нм.

5. Статистический анализ

Для статистического анализа результатов использовали *t*-тест Стьюдента. Данные представляли как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего из *n* независимых экспериментов. Значение $P < 0,05$ принимали статистически достоверным. Для вычислений использовали программы Microsoft Excel, GraphPad и Statistica.

РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТОВ

1. KRP ингибирует фосфорилирование НММ под действием киназы лёгких цепей миозина, лишённой KRP-домена

Киназа лёгких цепей миозина содержит два центра связывания с субстратом. Один центр расположен в каталитическом домене, другой, дополнительный центр связывания с миозином расположен на С-конце молекулы протеинкиназы, в области KRP-домена. Изолированный KRP связывается с тем же участком миозина, что и KRP-домен КЛЦМ. Поэтому KRP конкурирует с полноразмерной киназой легких цепей миозина и снижает каталитическую активность КЛЦМ, препятствуя связыванию фермента с субстратом (Shirinsky et al., 1993, Silver et al., 1997). Однако близость участка связывания KRP и регуляторных легких цепей на молекуле миозина позволяет предположить, что KRP может не только конкурировать с KRP-доменом КЛЦМ за участок связывания на миозине, но способен помимо этого влиять на доступность участка фосфорилирования РЛЦ для КЛЦМ.

Для того чтобы проверить эту гипотезу, мы сравнили влияние рекомбинантного полноразмерного KRP курицы (χ -KRP-His₆) на активность полноразмерной КЛЦМ (КЛЦМ-108), и КЛЦМ, лишённой KRP-домена (КЛЦМ-61). В качестве субстрата мы использовали НММ. Указанный фрагмент миозина (см. рис. 1) содержит участок связывания KRP, но, в отличие от миозина, растворим в водных растворах с низкой ионной силой, что делает его более удобным в работе. Реакцию фосфорилирования проводили в присутствии γ [³²P]АТФ, как описано в «Материалах и методах».

Оказалось, что χ -KRP-His₆ ингибирует фосфорилирование регуляторной лёгкой цепи НММ под действием не только полноразмерной КЛЦМ-108 (см. рис. 10А), но и под действием киназы, лишённой KRP домена (рис. 10Б). За 5 минут инкубации в отсутствие KRP достигается практически полное ($95 \pm 4\%$ ($n=7$)) фосфорилирование регуляторных лёгких цепей НММ под действием КЛЦМ-61. В то время как в присутствии 50 μ M KRP, степень фосфорилирования составляет всего лишь около 10% ($10 \pm 2\%$ ($n=3$)).

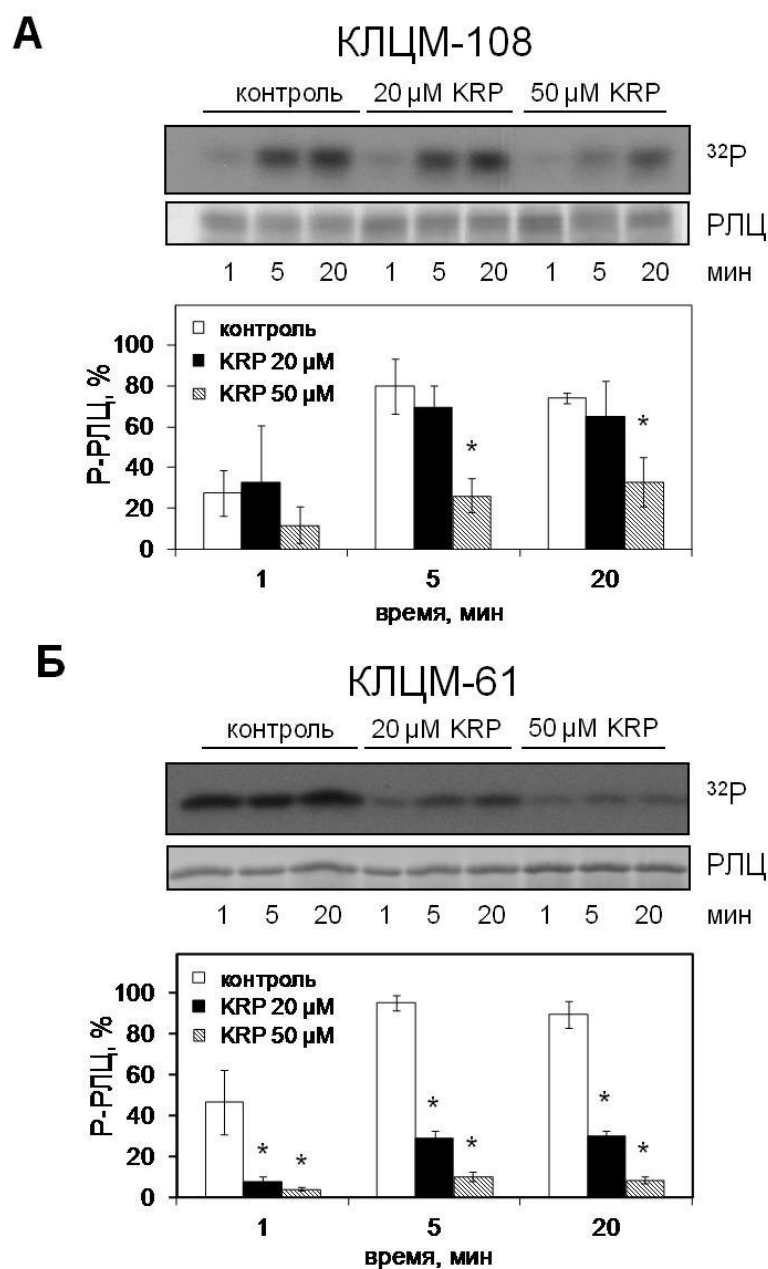


Рис. 10. Влияние KRP на фосфорилирование НММ под действием полноразмерной КЛЦМ-108 и её каталитического домена КЛЦМ-61. НММ (4 μ M) фосфорилировали КЛЦМ-108 (10 нМ) (А) или КЛЦМ-61 (40 нМ) (Б) в присутствии γ -[32 P]АТФ в буфере МРВ с 20 мМ NaCl в течение указанных промежутков времени, как описано в «Материалах и методах». Реакцию проводили в отсутствие (контроль) или в присутствии 20 и 50 μ M chi-KRP-His₆. Представлены репрезентативные автордиограммы (верхние панели) и соответствующие электрофореграммы, окрашенные Кумасси R-250 (нижние панели). Гистограммы показывают средние значения (в % от полного) $\pm$ стандартная ошибка среднего (n = 3-6) степени фосфорилирования РЛЦ в отсутствие KRP (белые столбики) или в присутствии 20 или 50 μ M KRP (чёрные и заштрихованные столбики, соответственно). *P < 0,05 по отношению к контролю, t-тест Стьюдента.

Более того, эффект KRP в случае КЛЦМ-61 выражен даже сильнее, чем в случае КЛЦМ-108. KRP тормозит фосфорилирование НММ под действием КЛЦМ-61 уже в концентрации 20 μM (на 69% по сравнению с контролем через 5 минут после начала реакции), в то время как аналогичное действие (68%) на полноразмерную КЛЦМ проявляется только при концентрации KRP, равной 50 μM .

Рекомбинантный KRP человека без дополнительного полигистидина ингибировал фосфорилирование НММ под действием каталитического домена КЛЦМ (см. раздел 3.1. и рис. 13). Это свидетельствует о том, что ингибиторный эффект KRP качественно не зависит от наличия С-концевого полигистидина. В отличие от экспериментов, показанных на рис. 10, которые были проведены в условиях низкой ионной силы (20 мМ NaCl), в экспериментах, показанных на рис 13, мы использовали более высокую концентрацию NaCl (150 мМ) с целью создания условий более приближенных к физиологическим. Несмотря на различную ионную силу, KRP ингибирует фосфорилирование в обоих случаях, что согласуется с результатами по связыванию KRP с миозином, которое слабо зависит от ионной силы (Shirinsky et al., 1993). Мы можем также констатировать, что эффект KRP не является видоспецифичным. Так, например, KRP человека хотя и хуже, чем KRP курицы, но тем не менее ингибирует фосфорилирование НММ курицы под действием КЛЦМ-61, полученной из гладких мышц курицы. Представленные данные согласуются с результатами подобных исследований, проведенных ранее (Sobieszek et al., 2005).

Таким образом, KRP не только конкурирует с KRP-доменом КЛЦМ за связывание с областью соединения субфрагментов S1 и S2 миозина, что было известно ранее (Shirinsky et al., 1993, Silver et al., 1997), но и препятствует фосфорилированию миозина каталитическим доменом КЛЦМ. Мы предполагаем, что связываясь в области S1-S2 миозина, близкой к участку связывания регуляторной лёгкой цепи, KRP ограничивает доступность Ser¹⁹ лёгкой цепи для КЛЦМ, и таким образом препятствует фосфорилированию. Полученные результаты указывают на то, что он может ингибировать и неканонические (Ca²⁺-независимые) киназы миозина, у которых нет KRP-доменов. Считается, что такие ферменты играют важную роль в развитии тонического сокращения гладких мышц, в том числе сосудистых, обеспечивая Ca²⁺-независимое фосфорилирование миозина (Ihara et al., 2007b).

2. KRP тормозит развитие сокращения, индуцированного микроцистином

Для того чтобы проверить, ингибирует ли KRP сокращение под действием Ca^{2+} -независимых протеинкиназ, мы использовали скинированные Тритоном X-100 гладкомышечные волокна *taenia coli* морской свинки (описание модели приводится в разд. 4 главы «Обзор литературы»).

Как показал результат иммуноблоттинга (рис. 11А), при скинировании Тритоном X-100, KRP полностью вымывается из волокон *taenia coli*, а при инкубации скинированных волокон в растворе, содержащем рекомбинантный KRP, белок проникает обратно в волокна (см. рис. 11А, дорожка 3). Конфокальная микроскопия скинированных волокон, инкубированных с меченым флуоресцентной меткой Alexa Fluor[®] 488 KRP, показала равномерное распределение KRP по всей толщине волокна (см. рис. 11Б и В)¹⁶. Используемая нами в работе концентрация рекомбинантного KRP (10 μM) близка к таковой в интактной мышце *taenia coli* (13 μM). Поэтому скинированные Тритоном X-100 волокна *taenia coli* являются адекватной экспериментальной моделью, которая позволяет анализировать эффекты экзогенно добавленного KRP на микроцистин-зависимое сокращение без искажающего влияния эндогенного KRP.

Для выявления сокращения, опосредованного Ca^{2+} -независимыми протеинкиназами, необходимо блокировать КЛЦМ и ФЛЦМ. Поэтому мы проводили все эксперименты в среде с низкой концентрацией кальция ($\text{pCa} > 8$) (что делало невозможным функционирование киназы легкой цепи миозина, активность которой зависит от кальция и кальмодулина) и блокировали ФЛЦМ с помощью необратимого ингибитора фосфатаз типа 1 и 2А, микроцистина-LR. На рис. 12А видно, что 10 μM микроцистин-LR вызывает медленное продолжительное сокращение, которое при $\text{pCa} > 8$ после 40 минут инкубации достигает максимума: $91 \pm 1\%$ максимальной силы (F_{max}), измеренной при $\text{pCa} 4,5$. Полученная нами зависимость силы микроцистинового сокращения от времени инкубации, схожа с таковой, описанной ранее для скинированных волокон (Weber et al., 1999, Ihara et al., 2007б).

В присутствии 10 μM hKRP, происходит значительное ($p < 0,05$, t-тест Стьюдента) торможение развития Ca^{2+} -независимого сокращения, вызванного добавлением 10 μM микроцистина (см. рис. 12 Б, В). Под действием KRP увеличивается продолжительность лаг-периода, составляющего в контроле 2-3 мин, и достигающего 10

¹⁶ Эта часть работы была проведена совместно с М. Шрётер (Институт вегетативной физиологии, г. Кёльн) и А. Ногель (Институт биохимии, г. Кёльн).

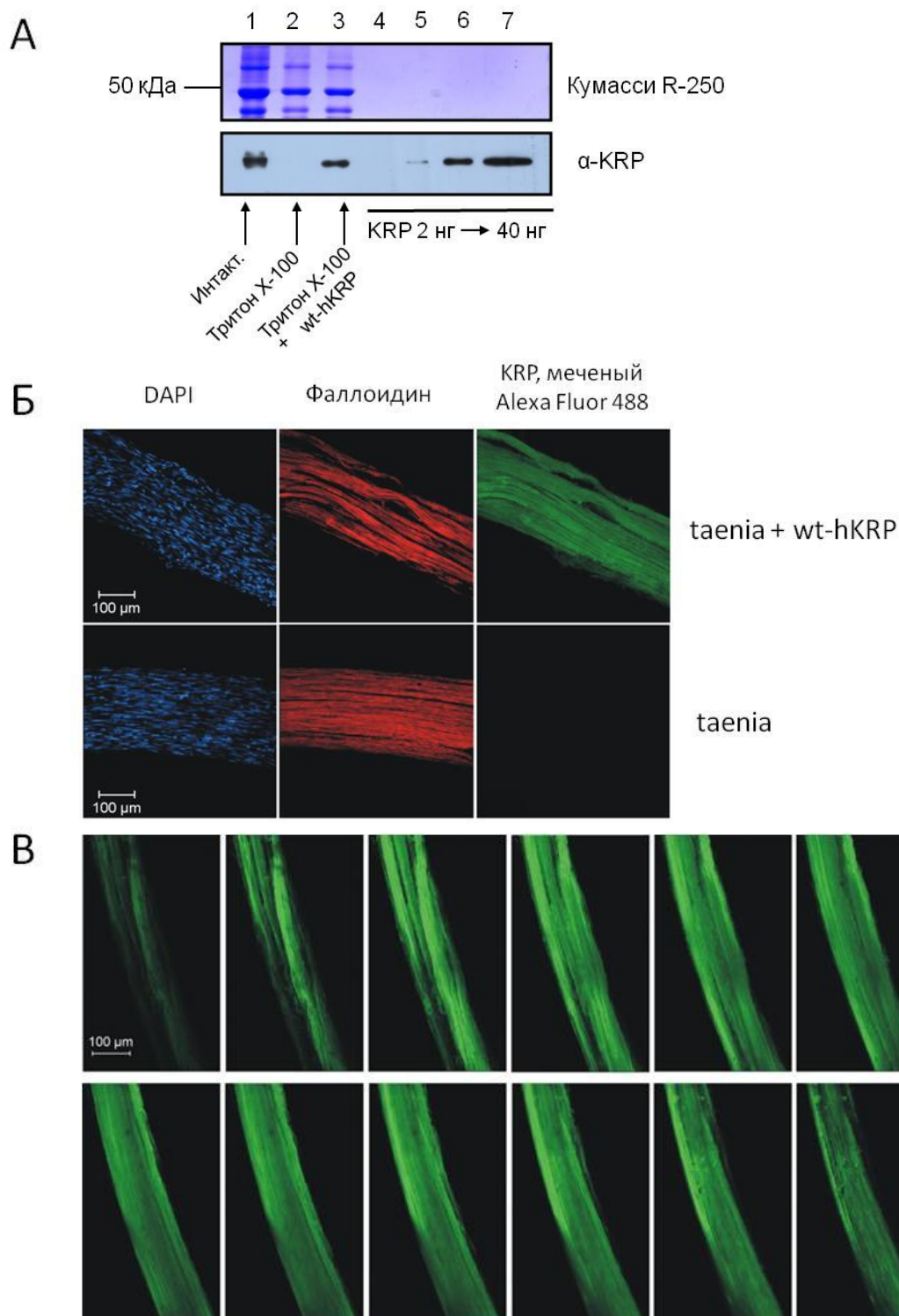


Рис. 11. Эндогенный KRP полностью вымывается из волокон *taenia coli*, а экзогенный KRP проникает в волокна по всей толщине. А. Результат иммуноблоттинга с антителами против KRP (нижняя панель). Верхнюю часть геля окрашивали Кумасси R-250 (верхняя панель) для контроля нанесения равного количества белка. Дорожки: 1 – intactные волокна *taenia coli*; 2 – скинированные Тритоном X-100 волокна; 3 - скинированные Тритоном X-100 волокна, инкубировавшиеся 30 мин с 10 μM KRP; 4-7 – 2, 5, 15 и 40 нг очищенного препарата hKRP. **Б.** Репрезентативные изображения волокон *taenia coli*, скинированных Тритоном X-100, полученные методом конфокальной микроскопии. Верхние панели – волокна, инкубировавшиеся с 10 μM hKRP, меченым Alexa Fluor® 488, нижние панели – контрольные волокна. Ядра и F-актин покрашены DAPI и фаллоидином, меченым Alexa Fluor® 555, соответственно. **В.** Оптические срезы волокон инкубировавшихся с меченым hKRP, полученные с интервалом 5,3 μм.

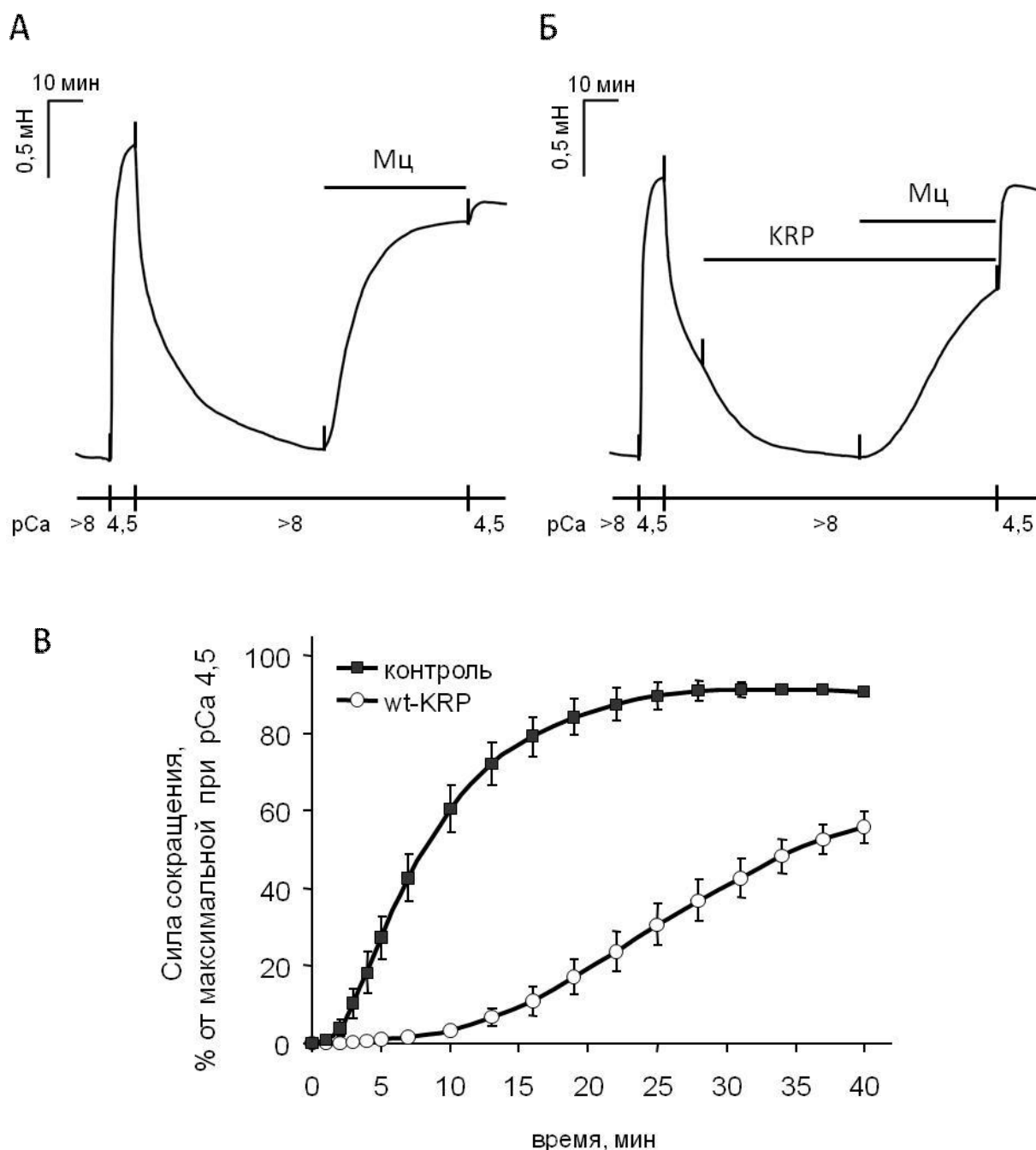


Рис. 12. Эффект KRP на Ca^{2+} -независимое сокращение *taenia coli*, вызванное микроцистином. Контрольный сократительный ответ вызывали добавлением раствора с pCa 4,5, затем волокна отмывали релаксирующим раствором до базального уровня сокращения и инкубировали с соответствующим количеством буфера, в котором содержался KRP (контроль)(А) или с 10 μM wt-hKRP (Б) в течение 40 мин, после чего стимулировали сокращение гладкомышечных волокон добавлением 10 μM микроцистина, в присутствии KRP или диализного буфера. По прошествии 40 минут волокна помещали в раствор с pCa 4,5 для определения значения максимальной силы сокращения, которое использовалось для нормализации силы сокращения, индуцированного микроцистином. (В) Показана зависимость силы сокращения (% от максимальной при pCa 4,5), вызванного микроцистином (10 μM), от времени инкубации. За 0 минут принимается момент добавления микроцистина. Данные представлены как среднее значение ($n=7$) $\pm$ стандартная ошибка среднего. $P < 0,05$

мин в присутствии 10 μ M KRP. Одновременно с этим, время, за которое достигалось 50% максимальной силы сокращения ($t_{1/2}$), увеличивается от $8,4 \pm 0,9$ мин до $35,1 \pm 2,5$ мин. Сокращение в присутствии KRP не достигало плато даже после 40 минут инкубации с микроцистином. Его сила на 40^{ой} минуте инкубации ($F_{40\text{мин}}$) составила $56 \pm 4\%$ от F_{max} ($n=7$), при этом, в контроле соответствующая величина составила $91 \pm 4\%$ ($n=7$). Сокращение не регистрировали в течение более длительного периода времени, поскольку при инкубации более 40 минут с микроцистином, наблюдалось падение силы сокращения из-за нестабильности волокон, скинированных Тритоном X-100.

Индуктированное микроцистином сокращение обусловлено фосфорилированием РЛЦ под действием Ca^{2+} -независимых киназ (см. разд. 2.2 и 4 гл. «Обзор литературы»). Предварительные исследования, проведённые в нашей лаборатории, показали, что KRP снижает уровень фосфорилирования легких цепей миозина в ходе сокращения, индуцированного микроцистином (Серебряная, 2006).

В совокупности, приведенные данные означают, что KRP тормозит развитие Ca^{2+} -независимого сокращения, индуцированного микроцистином за счёт ингибирования фосфорилирования РЛЦ миозина. В литературе высказываются предположения о том, что KRP вызывает расслабление, активируя фосфатазу миозина (Wu et al., 1998, Khromov et al., 2006, Khromov et al., 2012), и/или ингибируя фосфорилирование миозина под действием киназы легких цепей миозина (Shirinsky et al., 1993, Silver et al., 1997, Sobieszek et al. 2005). В нашей работе мы установили, что KRP не является специфическим ингибитором фосфорилирования под действием киназы легких цепей миозина, и способен ингибировать фосфорилирование РЛЦ миозина как под действием канонической КЛЦМ, так и под действием Ca^{2+} -независимых неканонических протеинкиназ. Неоспоримым доказательством того, что KRP ингибирует и другие неканонические киназы может стать выявление конкретных киназ, которые ответственны за вызванное микроцистином сокращение, их выделение, и проверка способности KRP ингибировать фосфорилирование миозина под действием этих киназ в условиях *in vitro*.

3. Фосфорилирование KRP под действием PKA/PKG и MAPK не влияет на его ингибиторный эффект

KRP подвергается активному фосфорилированию протеинкиназами в фазных гладких мышцах *in vivo*, причём KRP может фосфорилироваться по нескольким участкам (Krumsky et al., 2001) (см. разд. 3.3 главы «Обзор литературы»). Известно, что фосфорилирование KRP по Ser¹³ коррелирует с цАМФ/цГМФ-зависимым расслаблением

гладких мышц. Например, было показано, что уровень фосфорилирования KRP по Ser¹³ в гладких мышцах *ileum* крысы повышается при цАМФ-зависимом расслаблении, вызванном активацией аденилатциклазы форсколином (Kharchaev et al., 2004). Также известно, что расслабление гладкомышечных волокон *ileum*, вызванное добавлением 8-Br-цГМФ, происходит эффективнее у мышей дикого типа по сравнению с мышами, нокаутированными по гену KRP (Khromov et al., 2006). С другой стороны, при сокращении лёгочной артерии, вызванном гипоксией, наблюдается дефосфорилирование KRP (Madden et al., 2008). То есть, имеется обратная корреляция между степенью фосфорилирования KRP и силой сокращения гладких мышц. Однако остаётся невыясненным, имеется ли какая-то причинно-следственная связь между фосфорилированием Ser¹³ KRP и расслаблением, и, если такая связь существует, то каков механизм ее реализации. Функциональная значимость фосфорилирования KRP по Ser¹⁹, осуществляемого MAPK, вообще остается не изученной.

Мы предположили, что фосфорилирование KRP может усиливать его ингибиторные свойства в отношении фосфорилирования РЛЦ под действием КЛЦМ и Ca²⁺-независимых киназ и тем самым ингибировать сокращение и усиливать расслабление. Для проверки этого предположения, мы исследовали влияние фосфорилирования KRP по Ser¹³ и Ser¹⁹ или по обоим указанным участкам на его способность ингибировать фосфорилирование РЛЦ миозина под действием КЛЦМ *in vitro*, и индуцированное микроцистином сокращение скинированных гладкомышечных волокон *taenia coli*.

Мы получили препараты hKRP полностью фосфорилированные по Ser¹³ и Ser¹⁹, а также по обоим этим участкам (см. п. 2.8 разд. «Материалы и методы», рис. 9А). Для того, чтобы избежать какого-либо влияния MAPK и PKA на фосфорилирование НММ или Ca²⁺-независимое сокращение, мы очистили препараты фосфо-KRP от соответствующих протеинкиназ (см. п. 2.8 разд. «Материалы и методы», рис. 9Б).

3.1. Фосфорилирование не влияет на ингибиторную активность KRP в условиях *in vitro*

Мы сравнили способность фосфорилированного и нефосфорилированного KRP ингибировать фосфорилирование НММ *in vitro* под действием КЛЦМ-61, лишенной KRP-домена. Как видно из рис 13, нефосфорилированный KRP и его фосфорилированные производные (P-S¹³-hKRP, P-S¹⁹-hKRP, P-S¹³,P-S¹⁹-hKRP) с одинаковой эффективностью ингибируют фосфорилирование регуляторных легких цепей миозина НММ.

Действительно, в присутствии 20 μM нефосфорилированного KRP степень фосфорилирования РЛЦ через 3 мин после начала реакции составляет $62 \pm 3\%$ ($n=3$), что не отличается от таковой для P-S¹³-hKRP ($62 \pm 9\%$ ($n=3$)), P-S¹⁹-hKRP ($61 \pm 8\%$ ($n=3$)), и PP-KRP ($63 \pm 6\%$ ($n=3$)). Более того, удаление N-концевой последовательности KRP, которая содержит несколько потенциальных участков фосфорилирования, не лишает KRP способности ингибировать фосфорилирование миозина (см. рис. 24).

Таким образом, мы установили, что фосфорилирование участков, расположенных в N-концевой области, не влияет на способность KRP ингибировать фосфорилирование РЛЦ миозина в условиях *in vitro*.

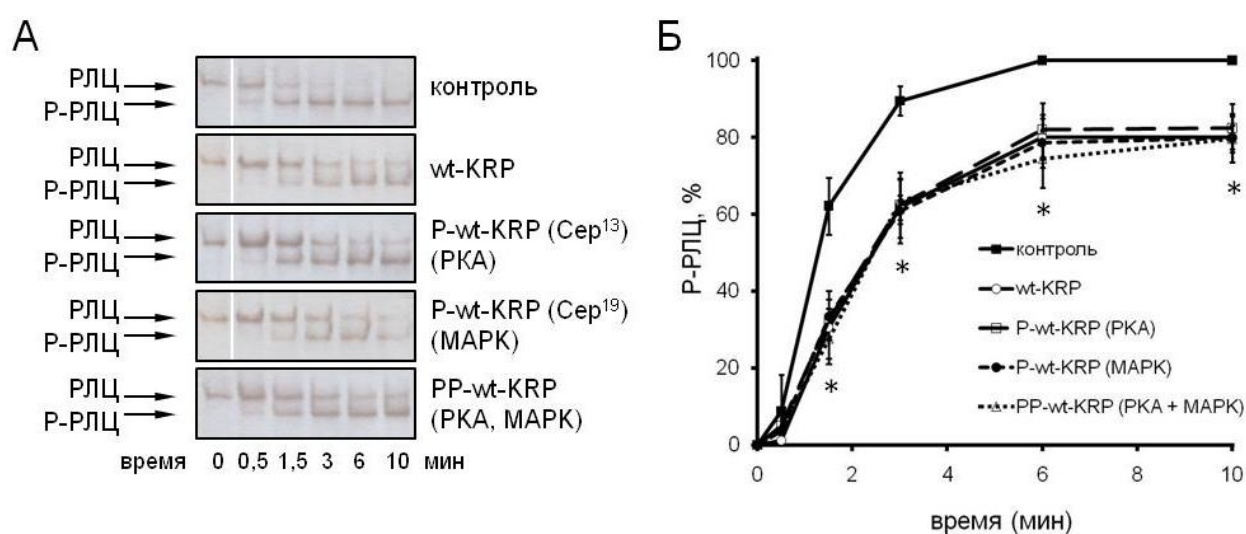


Рис. 13. Влияние фосфорилирования KRP на ингибирование фосфорилирования НММ под действием киназы лёгких цепей миозина (КЛЦМ-61). НММ (4 μM) фосфорилировали КЛЦМ-61 (40 нМ) в присутствии 20 μM KRP или P-KRP в буфере MPB с 150 мМ NaCl, как описано в «Материалах и методах». В указанное время аликвоты реакционных смесей добавляли к буферу для образцов. Полученные образцы анализировали электрофорезом в присутствии мочевины и глицерина, с последующим иммуноблоттингом и окрашиванием антителами против РЛЦ. **(А)** Репрезентативные результаты иммуноблоттинга аликвот, отобранных при проведении реакций фосфорилирования НММ в присутствии различных форм фосфорилированного KRP. Соответствующие формы KRP указаны справа, положение нефосфорилированных и фосфорилированных РЛЦ указано слева. **(Б)** Показан график зависимости степени фосфорилирования РЛЦ НММ (средние значения (в % от полного) $\pm$ стандартная ошибка среднего ($n = 2 - 7$)) в отсутствие KRP (контроль), в присутствии нефосфорилированного KRP, или KRP, фосфорилированного PKA, p44^{erk1} MAPK или обеими этими киназами KRP, от времени. * $P < 0,05$ по отношению к контролю.

3.2. Фосфорилирование не влияет на способность KRP ингибировать сокращение, индуцированное микроцистином

Мы сравнили влияние нефосфорилированного KRP и KRP, фосфорилированного отдельно MAP-киназой, PKA или одновременно обеими протеинкиназами, на индуцированное микроцистином сокращение скинированных Тритоном X-100 гладкомышечных волокон *taenia coli* морской свинки. Как видно из рис 14, фосфорилирование не влияет на способность KRP подавлять развитие микроцистинового сокращения. Значения $t_{1/2}$ и $F_{40\text{мин}}$ для различных форм P-KRP в сравнении с нефосфорилированным KRP представлены в таблице 2.

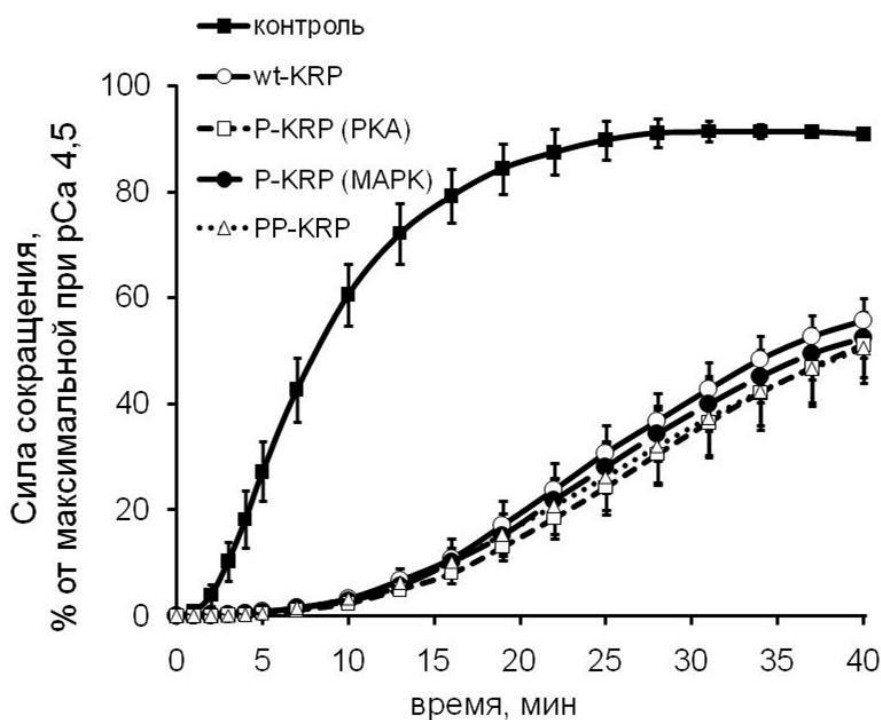


Рис. 14 Влияние фосфорилирования KRP на подавление Ca^{2+} -независимого сокращения волокон *taenia coli* морской свинки, вызванного микроцистином. Показана зависимость силы сокращения (% от максимальной при pCa 4,5), вызванного микроцистином (10 μM), от времени инкубации. Сначала вызывали контрольный сократительный ответ добавлением раствора с pCa 4,5, затем волокна отмывали релаксирующим раствором до базального уровня и инкубировали с 10 μM KRP человека wt-hKRP, P-S¹³-hKRP, P-S¹⁹-hKRP, P-S¹³,P-S¹⁹-hKRP или диализным буфером (контроль) в течение 40 мин, после чего стимулировали сокращение гладкомышечных волокон добавлением 10 μM микроцистина, в присутствии различных форм KRP или диализного буфера. По прошествии 40 минут волокна помещали в раствор с pCa 4,5 для определения значения максимальной силы сокращения, которое использовалось для нормирования силы сокращения, индуцированного микроцистином. Данные представлены как среднее значение ($n=5-7$) $\pm$ стандартная ошибка среднего.

Таблица 2. Значения $t_{1/2}$ и $F_{40\text{мин}}$ микроцистинового сокращения в присутствии hKRP, P-S¹³-hKRP, P-S¹⁹-hKRP и P-S¹³,P-S¹⁹-hKRP

	$t_{1/2} \pm$ стандартная ошибка среднего, мин	$F_{40\text{мин}} \pm$ стандартная ошибка среднего, % от Fmax	N
контроль	8 ± 1	91 ± 1	7
KRP	35 ± 3	56 ± 4	7
P-S ¹³ -hKRP	40 ± 5	51 ± 6	6
P-S ¹⁹ -hKRP	38 ± 3	52 ± 4	6
P-S ¹³ ,P-S ¹⁹ -hKRP	37 ± 3	51 ± 7	5

Микроцистин-LR блокирует активность фосфатаз типа 1 и 2A, ковалентно связываясь с активным центром фосфатаз, что было использовано нами для смещения равновесия в сторону фосфорилирования РЛЦ миозина под действием Ca²⁺-независимых киназ. Однако добавление микроцистина могло также привести к увеличению степени фосфорилирования не только РЛЦ но и других белков, в том числе и экзогенно добавленного KRP. В волокнах *taenia coli* после процедуры скинирования могли остаться протеинкиназы, фосфорилирующие KRP, например, PKA и MAPK. Поэтому мы проверили, фосфорилируется ли экзогенный KRP в ходе инкубации скинированных волокон с 10 μM микроцистином. Для этого волокна насыщали рекомбинантным wt-hKRP, а затем инкубировали с микроцистином как описано в разделе «Материалы и методы» (пункт 3.3.) в присутствии $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$. Далее лизаты разделяли с помощью электрофореза по методу Лэммли и определяли включение ³²P в полосу, соответствующую рекомбинантному wt-hKRP. Как видно из рис. 15 (дорожки 5,6, средняя панель), ³²P включается в полосы с относительной подвижностью ~20 и ~35 кДа, но не в полосу, соответствующую рекомбинантному wt-hKRP. В качестве контроля использовали KRP, фосфорилированный *in vitro* MAP-киназой (рис. 15, дорожки 1 — 4) в присутствии $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ с той же удельной активностью, как и для экспериментов с волокнами. Мы обнаружили, что, как минимум, 5 нг фосфорилированного KRP, нанесённого на дорожку, детектируется методом автордиографии. Тот же гель анализировали методом иммуноблоттинга с антителами, специфичными к KRP. Как видно из нижней панели, детектируемое количество KRP (5 нг) приблизительно в 4 раза меньше, чем в волокнах (>20 нг на дорожку). Это показывает, что KRP не фосфорилируется в волокнах *taenia coli* в ходе индуцированного микроцистином сокращения.

Поскольку волокна насыщаются KRP в отсутствие ингибитора фосфатаз, остаётся возможность того, что P-KRP дефосфорилируется в ходе инкубации с волокнами. Чтобы исключить эту возможность, мы провели контрольные эксперименты (см. пункт 3.4 разд. «Материалы и методы»). Из рис. 16 и 17 видно, что фосфорилированный KRP не дефосфорилируется ни в скинированных волокнах *taenia coli*, ни при инкубации с гомогенатами этих волокон.

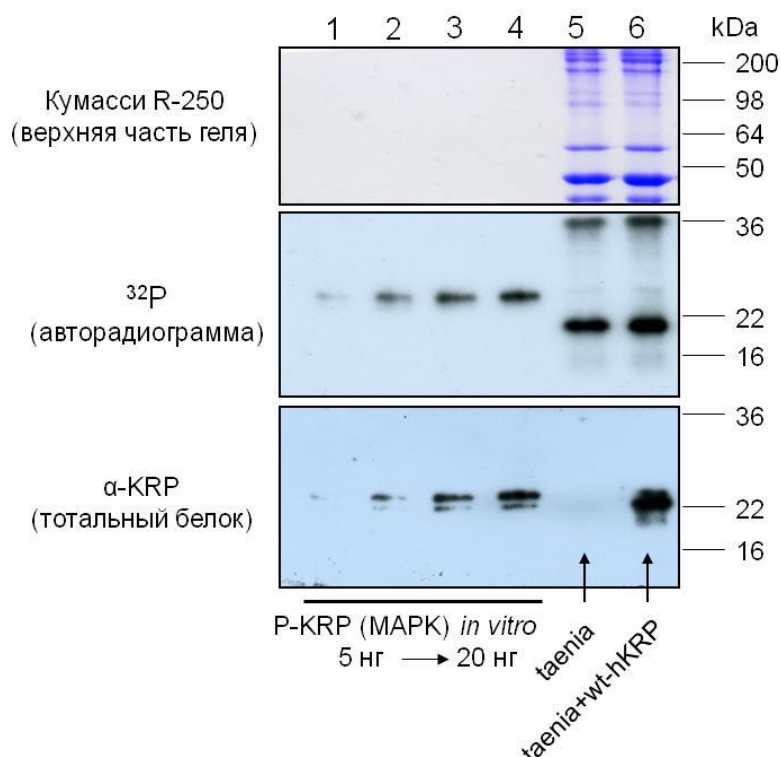


Рис. 15. KRP не фосфорилируется в ходе индуцированного микроцистином сокращения скинированных волокон *taenia coli* морской свинки. Волокна *taenia coli* морской свинки инкубировали с KRP и микроцистином в присутствии [γ -³²P]-АТФ, как описано в разделе «Материалы и методы» (пункт 3.3). Лизаты волокон разделяли с помощью электрофореза по Лэммли. Верхнюю часть геля окрашивали Кумасси R-250 (верхняя панель) для контроля нанесения равного количества белка на дорожки, нижнюю часть геля переносили на PVDF-мембрану с последующей авторадиографией для определения включения ³²P (средняя панель) и иммуноблоттингом с использованием антител против KRP (нижняя панель). Дорожки 1-4: 5, 10, 15 и 20 нг hKRP, фосфорилированного *in vitro* MAP-киназой, в присутствии [γ -³²P]-АТФ с той же удельной активностью, что использовалась для экспериментов с волокнами (см. раздел «Материалы и методы» пункт 1.8). Дорожки 5 и 6: волокна *taenia coli*, инкубированные с микроцистином в отсутствие и в присутствии KRP, соответственно. Представлены репрезентативные результаты трёх независимых экспериментов.

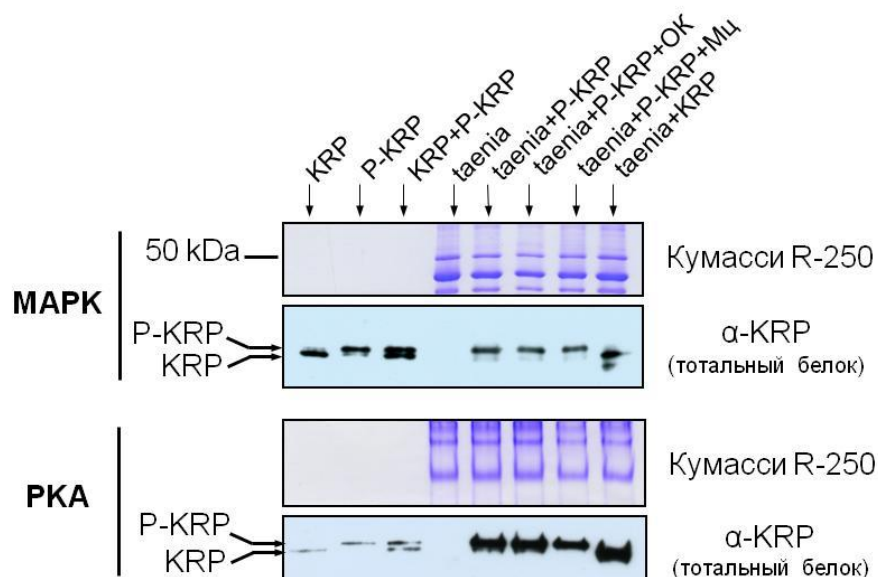


Рис. 16. Фосфорилированный KRP не дефосфорилируется при инкубации со скинированными волокнами *taenia coli* морской свинки. Скинированные волокна инкубировали без («*taenia*») и с фосфорилированным под действием MAPK (верхняя панель) или PKA (нижняя панель) KRP («*taenia*+P-KRP») в течение 60 минут, как указано в разделе «Материалы и методы», п. 3.4. Степень фосфорилирования KRP в лизатах анализировали с помощью электрофореза по Лэммли (для KRP, фосфорилированного MAPK), или мочевино-глицеринового электрофореза (для KRP, фосфорилированного PKA), с последующим иммуноблоттингом с антителами к KRP, не избирательными по отношению к фосфорилированию KRP. Для определения подвижности нефосфорилированного и фосфорилированного KRP использовали соответствующие стандарты (дорожки 1-3). В качестве контроля начального уровня фосфорилирования hKRP, волокна инкубировали 60 мин с фосфо-hKRP и микроцистином («*taenia*+P-KRP+Мц») или с ооадевой кислотой («*taenia*+P-KRP+ОК»). Для контроля количества белка, нанесённого на дорожку, верхнюю часть геля окрашивали Кумасси R-250. Представлены репрезентативные результаты двух независимых экспериментов.

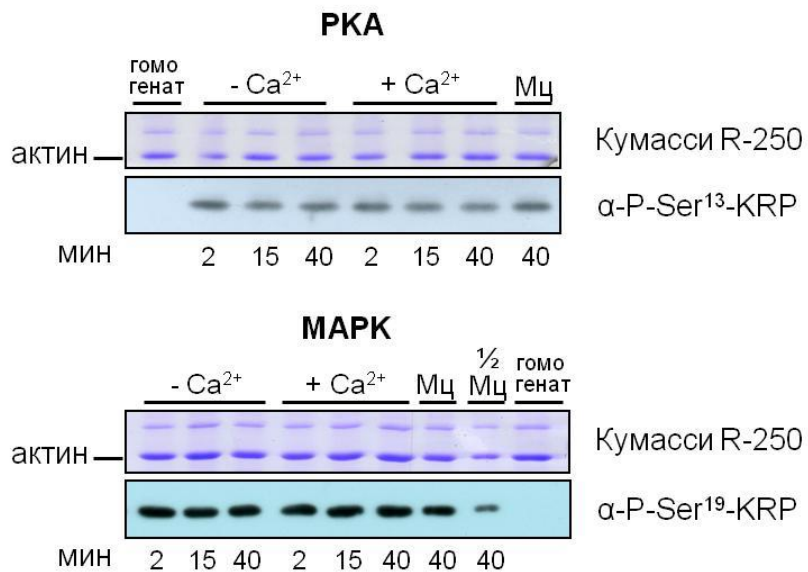


Рис. 17. Фосфорилированный KRP не дефосфорилируется при инкубации с лизатами *taenia coli* морской свинки. 10 μ M hKRP, фосфорилированный PKA (верхняя панель) или MAPK (нижняя панель), инкубировали с гомогенатом *taenia coli* в течение 2, 15 и 40 мин в присутствии или отсутствии Ca²⁺, как указано в разделе «Материалы и методы», п. 3.4. Реакцию останавливали добавлением буфера для образцов для электрофореза по Лэмбли. Уровень фосфорилирования hKRP определяли с помощью иммуноблоттинга с антителами, специфичными к фосфо- hKRP методом хемилюминесцентной детекции. Для контроля количества белка, нанесённого на дорожку, верхнюю часть геля окрашивали Кумасси R-250. В качестве контроля начального уровня фосфорилирования hKRP, использовали P-hKRP, инкубированный с гомогенатом в присутствии 10 μ M микроцистина в течение 40 мин («Мц»). Половину этого образца («1/2 Мц») наносили для того, чтобы удостовериться в линейности сигнала, получаемого при хемилюминесцентной детекции. Представлены репрезентативные результаты трёх независимых экспериментов.

Мы показали, что фосфорилирование KRP как по Ser¹³ (PKA/PKG), так и по Ser¹⁹ (МАРК) не влияет на его способность ингибировать Ca²⁺-независимое сокращение. Можно предположить, что, фосфорилированный KRP оказывает влияние на Ca²⁺-независимое сокращение не напрямую, а через какие-то посредники, не присутствующие в нашей системе из-за их вымывания в ходе скинирования. Такими посредниками могут быть различные протеинкиназы, в том числе PKA или PKG. Для того чтобы проверить это предположение, далее мы исследовали действие P-S¹³-hKRP на микроцистин-зависимое сокращение в присутствии очищенных препаратов PKA или PKG.

4. Влияние PKA и PKG на развитие сокращения, индуцированного микроцистином

Участие PKA/PKG в расслаблении гладких мышц было неоднократно показано в литературе (Lincoln et al., 2001, Morgado et al., 2012). В гладкомышечных тканях присутствует ряд специфических субстратов этих ферментов, хотя полный их список пока не определен. Расслабление является результатом сдвига баланса активностей ферментов, контролирующих фосфорилирование миозина, в пользу фосфатазы РЛЦ миозина. Это значит, что субстраты PKA/PKG могут вызывать расслабление, равновероятно ослабляя фосфорилирование или усиливая дефосфорилирование РЛЦ миозина.

Одним из субстратов PKA и PKG является KRP, его фосфорилирование по S¹³ коррелирует с расслаблением (Kharchaev et al., 2004, Puetz et al., 2010). Однако, как мы показали в разд. 3 гл. «Результаты экспериментов», фосфорилирование KRP не влияет на его способность снижать фосфорилирование РЛЦ миозина. Скинирование гладкомышечных волокон может сопровождаться потерей различных регуляторных белков. В частности, ими могут быть сами PKA и PKG, которые действуют и на другие субстраты, отличные от KRP. Возможно, отсутствие эффекта фосфорилирования KRP в ранее описанных экспериментах (см. гл. 3) объясняется тем, что для его проявления требуются дополнительные участники. Мы исследовали эту возможность, проведя серию экспериментов, где к скинированным волокнам добавляли очищенные препараты PKA или PKG.

4.1. PKA и PKG не влияют на сокращение, индуцированное микроцистином

PKA/PKG замедляют развитие сокращения гладких мышц (Rüegg and Paul, 1982, Pfitzer et al. 1984). PKA/PKG могут регулировать активность фосфатазы миозина (Lincoln et al., 2001, Murthy, 2006, Morgado et al., 2012), но неизвестно, влияют ли PKA/PKG на других участников регуляции сокращения, присутствующих в скинированных волокнах. Чтобы ответить на этот вопрос, мы исследовали действие PKA (рис. 18А) и PKG (рис. 18Б) на сокращение скинированных волокон, вызванное микроцистином. Тот факт, что в этой модели миозиновая фосфатаза полностью заблокирована, позволил нам выявить избирательное воздействие PKA/PKG на остальных участников регуляции сокращения.

Как видно из рис. 18 и таблицы 3, ни PKA, ни PKG не влияют на сокращение скинированных тритоном X-100 волокон *taenia coli*, индуцированное микроцистином.

Значения $t_{1/2}$ и $F_{40\text{мин}}$ микроцистинового сокращения в присутствии PKA или PKG статистически не отличаются от таковых для контроля без протеинкиназ (см. табл. №3).

Таблица 3. Значения $t_{1/2}$ и $F_{40\text{мин}}$ микроцистинового сокращения в присутствии PKA и PKG

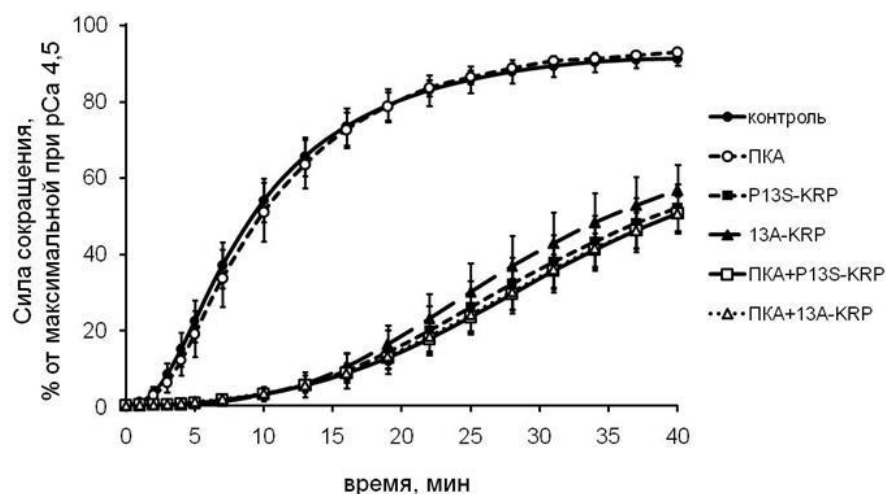
	$t_{1/2} \pm$ стандартная ошибка среднего, мин	$F_{40\text{мин}} \pm$ стандартная ошибка среднего, % от F_{max}	N
контроль	9 ± 1	91 ± 2	10
PKG	10 ± 1	90 ± 1	3
PKA	10 ± 1	92 ± 1	3

4.2. Фосфорилированный KRP не изменяет эффекта PKA/PKG на сокращение, индуцированное микроцистином

Мы показали, что ни PKA, ни PKG не влияют на сокращение, индуцированное микроцистином (п. 4.1). Кроме того, фосфорилирование KRP по Ser¹³ также не влияет на его способность замедлять развитие индуцированного микроцистином сокращения (п. 3.3). Однако остается вероятность того, что несколько субстратов PKA/PKG, включая KRP, действуют скоординировано, препятствуя развитию сокращения. Для того чтобы проверить это предположение, мы исследовали действие P-S¹³-hKRP на сокращение, индуцированное микроцистином в присутствии очищенных препаратов PKA или PKG. С целью проконтролировать, насколько наблюдаемый эффект связан именно с фосфорилированием KRP, мы также сравнили эффект изолированного нефосфорилируемого аналога KRP, A¹³-hKRP, на сокращение, индуцированное микроцистином, с эффектом этого белка в присутствии PKA или PKG.

Мы не обнаружили существенных отличий воздействия смеси KRP и протеинкиназ или индивидуальных белков на индуцированное микроцистином сокращение. Ни PKA, ни PKG не оказывают заметного дополнительного влияния при совместной инкубации с P-S¹³-hKRP или с A¹³-KRP (сравн. кривые P-S¹³- KRP и A¹³-KRP с P-S¹³- KRP+PKA/PKG и A¹³-KRP+PKA/PKG, соответственно, рис. 18).

А



Б

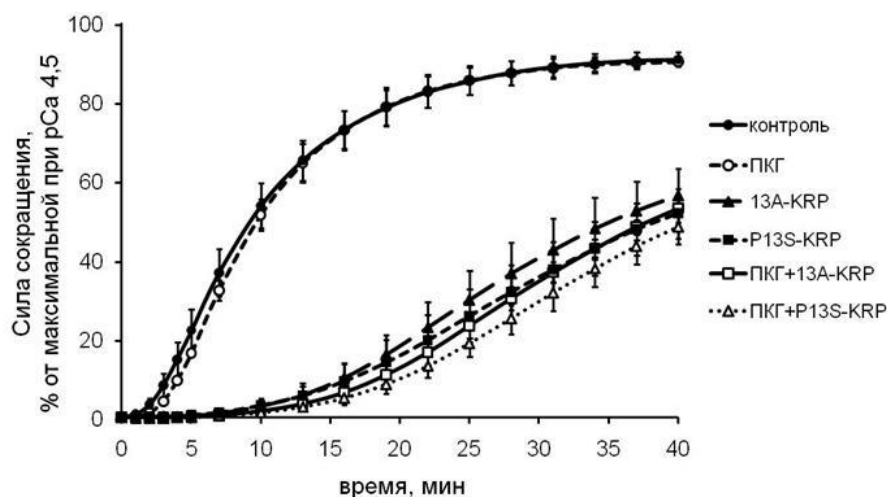


Рис. 18. Влияние P-S¹³-KRP на индуцированное микроцистином сокращение в присутствии PKA и PKG. Волокна *taenia coli*, подготовленные как описано в разделе «Материалы и методы», пп. 3.1-3.2, инкубировали в расслабляющем растворе в присутствии P-S¹³-hKRP (см. раздел «Материалы и методы», п. 2.8), A¹³-hKRP (10μM), PKA (31200 Ед/мл), смеси PKG (0,18 μM) и 8Br-цГМФ (50μM), P-S¹³-hKRP или A¹³-hKRP в присутствии PKA или PKG, либо контрольного буфера в течение 40 минут. После чего стимулировали сокращение гладкомышечных волокон добавлением 10 μM микроцистина, в присутствии всё тех же компонентов. По прошествии 40 минут волокна помещали в раствор с pCa 4,5 для определения значения максимальной силы сокращения, которое использовали для нормирования силы сокращения, индуцированного микроцистином. Данные представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего (n=3-10).

Значения $t_{1/2}$ и $F_{40\text{мин}}$ сокращения, индуцированного микроцистином представлены в таблице 4. Видно, что значения $t_{1/2}$ и $F_{40\text{мин}}$ статистически не различаются для $P\text{-S}^{13}\text{-KRP}$ и $P\text{-S}^{13}\text{-KRP} + \text{PKG/PKA}$, а также для $A^{13}\text{-KRP}$ и $A^{13}\text{-KRP} + \text{PKG/PKA}$.

Таблица 4. Значения $t_{1/2}$ и $F_{40\text{мин}}$ для индуцированного микроцистином сокращения в присутствии $P\text{-S}^{13}\text{-hKRP}$, $A^{13}\text{-hKRP}$, $P\text{-S}^{13}\text{-KRP} + \text{PKG}$, $A^{13}\text{-hKRP} + \text{PKG}$, $P\text{-S}^{13}\text{-hKRP} + \text{PKA}$ или $A^{13}\text{-hKRP} + \text{PKA}$

	$t_{1/2} \pm$ стандартная ошибка среднего, мин	$F_{40\text{мин}} \pm$ стандартная ошибка среднего, % от F_{max}	N
$P\text{-S}^{13}\text{-hKRP}$	38 ± 4	52 ± 6	7
$A^{13}\text{-hKRP}$	36 ± 5	56 ± 7	7
$P\text{-S}^{13}\text{-hKRP} + \text{PKG}$	36 ± 4	48 ± 4	3
$A^{13}\text{-hKRP} + \text{PKG}$	38 ± 1	53 ± 1	3
$P\text{-S}^{13}\text{-hKRP} + \text{PKA}$	40 ± 3	50 ± 5	5
$A^{13}\text{-hKRP} + \text{PKA}$	40 ± 4	50 ± 5	4

Таким образом, мы можем заключить, что PKA и PKG не влияют на развитие микроцистин-зависимого сокращения волокон и не усиливают эффекта KRP вне зависимости от его фосфорилирования. В ряде работ (Wu et al., 1998, Sobieszek et al., 2005, Khromov et al., 2006, Khromov et al., 2012) было продемонстрировано, что KRP усиливает расслабление гладкомышечных волокон. Более того, данные литературы указывают на то, что фосфорилирование KRP под действием циклонуклеотид-зависимых протеинкиназ усиливает эффект KRP именно на стадии расслабления (Wu et al., 1998, Walker et al., 2001, Khromov et al., 2006). В этой связи, представлялось целесообразным исследовать причинно-следственную связь между расслаблением, индуцируемым PKA/PKG, и фосфорилированием KRP.

5. Фосфорилирование KRP под действием PKA/PKG и MAPK не влияет на его способность расслаблять гладкие мышцы, сокращённые при субмаксимальной концентрации кальция

Для того, чтобы исследовать эффект фосфорилирования KRP на более полную систему регуляции фосфорилирования миозина, мы обратились к модели расслабления

волокон после Ca^{2+} -зависимого сокращения. В отличие от модели сокращения, индуцированного микроцистином, помимо Ca^{2+} -независимых киназ, здесь задействованы фосфатаза и киназа легких цепей миозина.

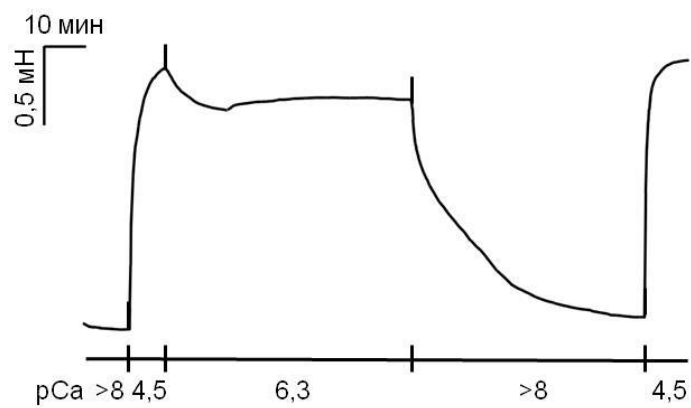
5.1. PKA, но не PKG вызывает расслабление скинированных волокон, сокращенных при субмаксимальной концентрации кальция

Действие PKA и PKG в гладких мышцах направлено как на уменьшение $[\text{Ca}^{2+}]_i$, так и на уменьшение чувствительности сократительного аппарата к кальцию (Morgado et al., 2012). В скинированных волокнах, отсутствует наружная мембрана, а саркоплазматический ретикулум нефункционален. Поэтому PKA и PKG не могут влиять на изменения концентрации кальция. В тоже время в нашей системе может реализовываться ряд механизмов, связанных с изменением чувствительности сократительного аппарата к Ca^{2+} . Эти механизмы могут быть связаны или не связаны с влиянием KRP. Поэтому мы проверили, как сами PKA и PKG влияют на расслабление после субмаксимального Ca^{2+} -сокращения волокон в отсутствие KRP в используемой нами модели.

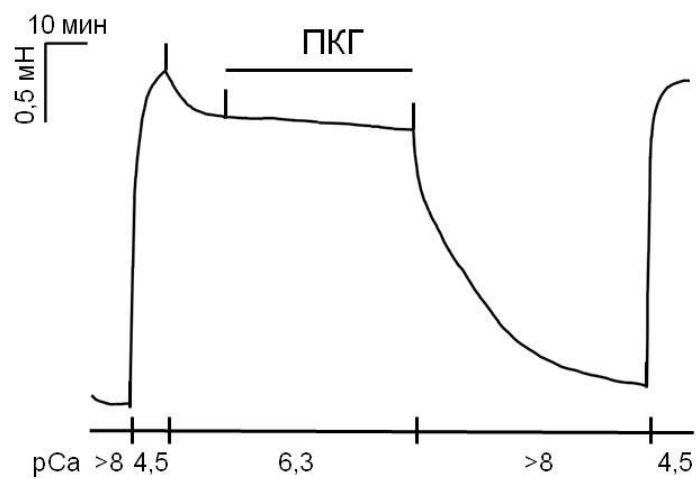
Оказалось, что PKG практически не вызывает расслабления волокон, сокращенных при субмаксимальных концентрациях кальция. PKA, напротив, оказывает заметный релаксирующий эффект. На рис. 19 (А-В) представлены репрезентативные регистрации расслабления волокон после субмаксимального мышечного сокращения. Волокна *taenia coli* после достижения плато субмаксимального сокращения, помещали в раствор с той же концентрацией Ca^{2+} , содержащий контрольный буфер (рис. 19 А), PKA (31200 Ед/мл) (рис. 19Б), или PKG (0,18 μM) и 8-Br-цГМФ (50 μM) (рис. 19В), и инкубировали 40 минут.

Степень расслабления за 40 минут выражали в процентах, принимая силу сокращения при $p\text{Ca } 6,3$ до добавления PKA или PKG ($F_{p\text{Ca } 6,3}$) за 100%, согласно формуле: $(F_{p\text{Ca } 6,3} - F_{\text{PKA/PKG}}) * 100 / F_{p\text{Ca } 6,3}$, где $F_{\text{PKA/PKG}}$ - сила сокращения после 40 минут инкубации с PKA или PKG. Эффект расслабления графически представлен на рис. 19Г. Для PKG он составил $7 \pm 9\%$, $n=5$, что статистически не отличается от контроля без добавления протеинкиназ: $2 \pm 7\%$, $n=5$ ($P > 0,05$). PKA, напротив, обладала заметным релаксирующим эффектом: $36 \pm 6\%$, $n=4$ ($P < 0,01$).

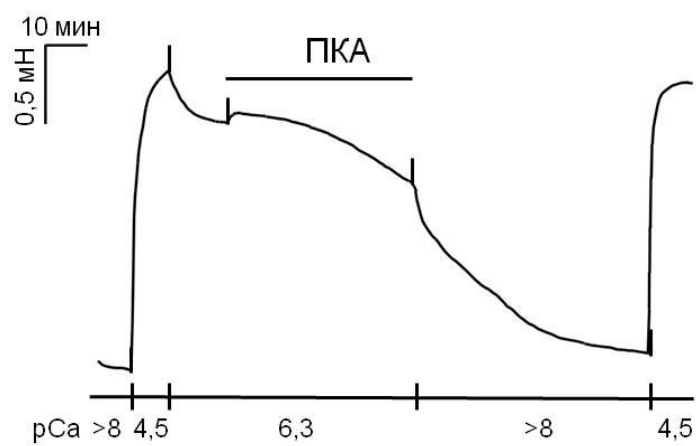
А



Б



В



Г

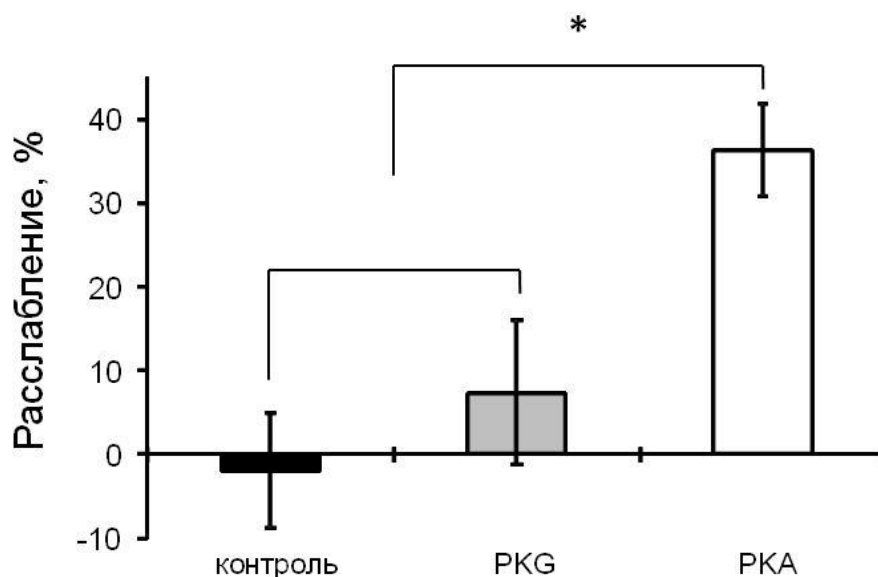


Рис. 19. Влияние PKA и PKG на расслабление скинированных Тритоном X-100 мышечных волокон *taenia coli* морской свинки после сокращения, вызванного субмаксимальной концентрацией кальция. Волокна *taenia coli*, подготовленные как описано в разделе «Материалы и методы», пп. 3.1-3.2, для контрольного сократительного ответа помещали в раствор с pCa 4,5. Затем инкубировали в растворе с pCa 6,3 до достижения плато субмаксимального сокращения, после чего помещали в раствор с той же концентрацией Ca^{2+} , содержащий контрольный буфер (А), PKA (31200 Ед/мл) (Б), или PKG (0,18 μM) и 8-Br-цГМФ (50 μM) (В), и инкубировали 40 минут. Затем отмывали релаксирующим раствором, и ещё раз вызывали контрольный сократительный ответ добавлением раствора с pCa 4,5. Представлены репрезентативные регистрации. (Г) Гистограммы показывают средние значения степени расслабления, вызванного PKA или PKG, после 40 минут инкубации (в % от силы сокращения до добавления PKA/PKG) $\pm$ стандартная ошибка среднего ($n = 4-6$). * $P < 0,01$.

Добавление PKA к скинированным тритоном X-100 волокнам *taenia coli* морской свинки, приводит к их заметному расслаблению, что согласуется с данными литературы (Mrwa et al., 1979, Meisheri and Ruegg, 1983, Meisheri et al., 1986). Релаксирующий эффект цГМФ/PKG показан на препаратах гладких мышц, пермеабелизованных различными способами (Pfitzer et al., 1984, Pfitzer et al., 1986, Nishimura et al., 1992). Отсутствие эффекта PKG в полученных нами скинированных Тритоном X-100 препаратах *taenia coli* может быть связано с вымыванием каких-то её субстратов в ходе процедуры скинирования. Однако если эффект PKG опосредуется только фосфорилированием KRP, то добавление к волокнам KRP должно восстановить способность PKG индуцировать расслабление.

5.2. KRP вызывает расслабление сокращённых при субмаксимальной концентрации кальция волокон, но действие KRP не зависит от его фосфорилирования

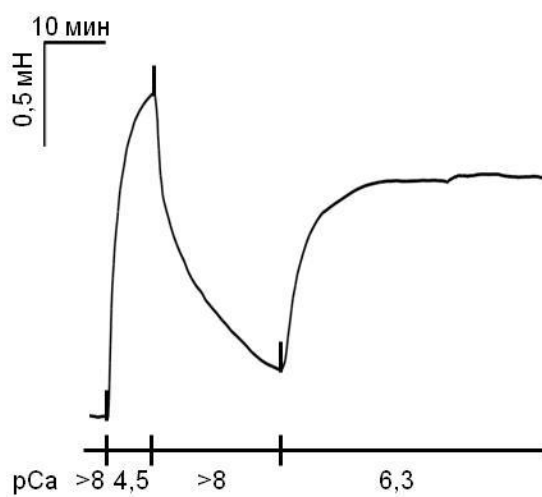
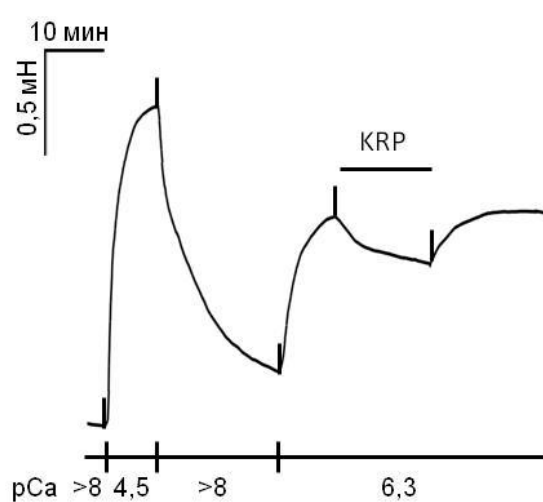
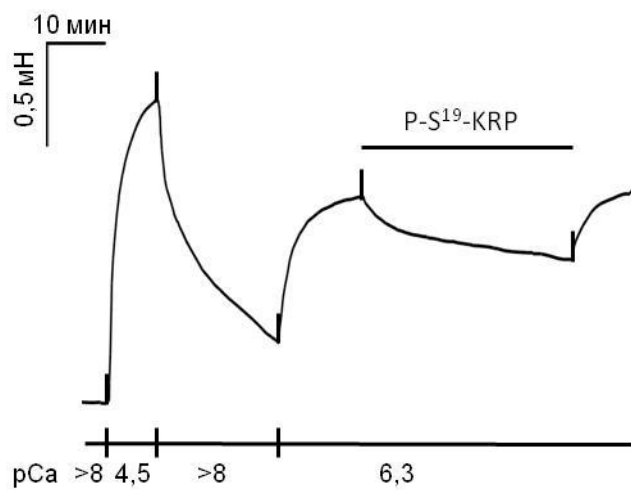
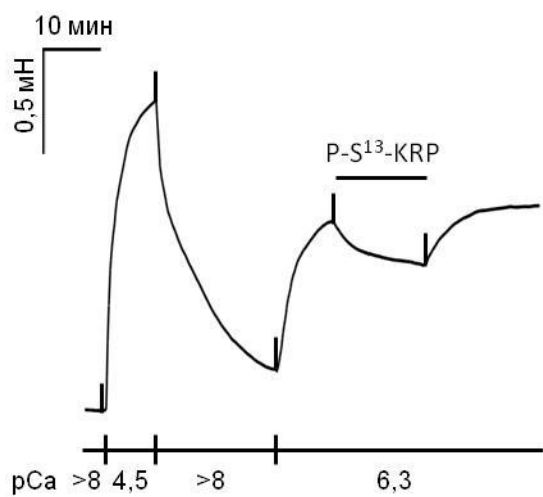
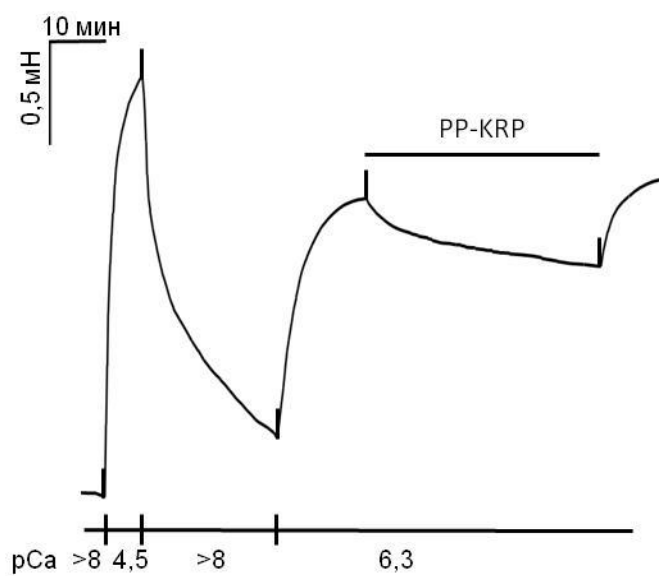
Релаксирующий эффект KRP на предсокращённые при субмаксимальной концентрации Ca^{2+} гладкомышечные волокна был показан в разных лабораториях (Wu et al., 1998, Walker et al., 2001, Sobieszek et al., 2005). В наших опытах мы подтвердили, что добавление KRP индуцирует расслабление после субмаксимального сокращения волокон *taenia coli*, индуцированного повышением концентрации кальция

На рис. 20 (А,Б) представлены репрезентативные кривые расслабления после субмаксимального Ca^{2+} -сокращения. Сокращённые при $p\text{Ca } 6,3$ скинированные тритоном X-100 волокна *taenia coli* помещали в раствор с той же концентрацией Ca^{2+} , содержащий контрольный буфер (рис. 20А) или $10 \mu\text{M}$ KRP (рис. 20Б) и инкубировали 15 и более минут, как описано в п. 3.2 раздела «Материалы и методы». Степень расслабления за 15 минут выражали в процентах, принимая силу сокращения при $p\text{Ca } 6,3$ до добавления KRP ($F_{p\text{Ca } 6,3}$) за 100%. Для расчетов использовали формулу $(F_{p\text{Ca } 6,3} - F_{\text{KRP}}) \cdot 100 / F_{p\text{Ca } 6,3}$, где F_{KRP} - сила сокращения после 15 минут инкубации с KRP.

Эффект расслабления вызванный добавлением $10 \mu\text{M}$ KRP за 15 минут составил $28 \pm 9\%$ ($n = 7$), в время как в контрольных волокнах этот эффект составил $(-7) \pm 3\%$ ($n = 7$). Отрицательное значение в контроле объясняется тем, что после добавления контрольного буфера, наблюдалось медленное увеличение силы сокращения, постепенно выходящее на плато (см. рис. 20А).

Таким образом, степень расслабления KRP, наблюдаемая в нашей работе ($28 \pm 9\%$ за 15 минут), близка к таковой, описанной в литературе: $31 \pm 6\%$ за 10 мин для $10 \mu\text{M}$ KRP (Wu et al., 1998).

Группой А. Сомлио было показано, что расслабляющий эффект KRP на предсокращённые гладкомышечные волокна в присутствии PKG больше, нежели суммарный эффект нефосфорилированного KRP и PKG по отдельности (Wu et al., 1998). Однако неизвестно, связан ли наблюдаемый эффект именно с тем, что фосфорилированный по Ser^{13} KRP лучше расслабляет гладкомышечные волокна, чем нефосфорилированный белок. Поэтому мы проверили эффект фосфорилированного под действием PKA (по Ser^{13}) KRP на сокращённые при субмаксимальной концентрации Ca^{2+} ($p\text{Ca } 6,3$) волокна *taenia coli*. Чтобы исключить влияние PKA (которая использовалась для фосфорилирования KRP) на силу сокращения волокон, мы предварительно очищали

А**Б****В****Г****Д**

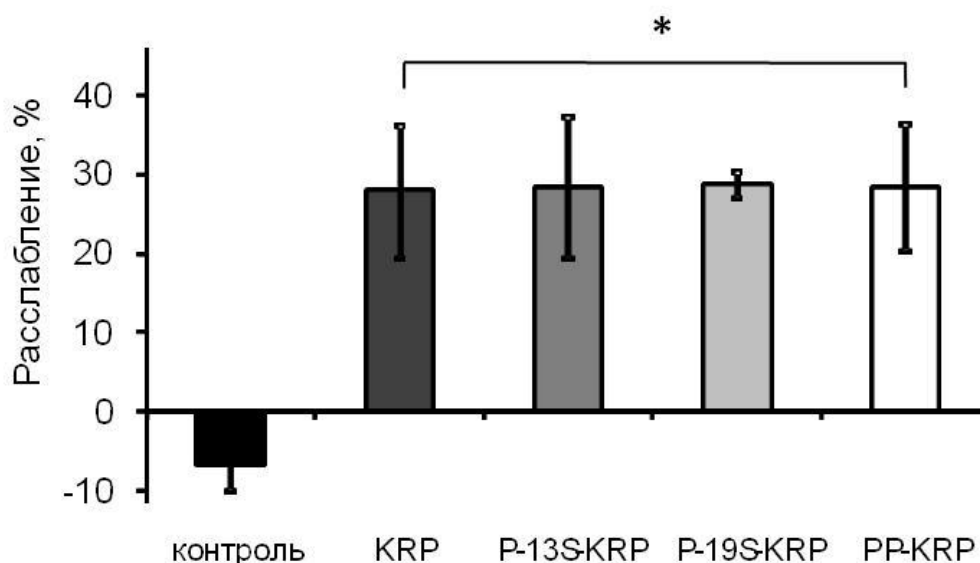
Е

Рис. 20. KRP вызывает расслабление после субмаксимального Ca^{2+} -сокращения скинированных волокон, но эффект KRP не зависит от его фосфорилирования. Препараты *taenia coli* для контрольного сократительного ответа сначала помещали в раствор с pCa 4,5, затем помещали в релаксирующий раствор. После этого инкубировали в растворе с pCa 6,3 до достижения плато сокращения, а затем помещали в раствор с той же концентрацией Ca^{2+} , содержащий контрольный буфер (А), 10 μM hKRP (Б), P-S^{19} -hKRP (В), P-S^{13} -hKRP (Г), или $\text{P-S}^{13}, \text{P-S}^{19}$ -hKRP (Д). После этого волокна отмывали раствором с pCa 6,3, не содержащим KRP. Представлены репрезентативные регистрации. Е. Гистограммы показывают средние значения степени расслабления, вызванного KRP, после 15 минут инкубации (в % от силы сокращения до добавления KRP) $\pm$ стандартная ошибка среднего ($n = 3-7$). * $P < 0,01$ по сравнению с контролем. t-тест Стьюдента. Отрицательные величины в контроле означают, что в этих условиях наблюдалось медленное увеличение натяжения.

полученный *in vitro* препарат P-S^{13} -KRP от PKA (см. разд. 2.8 гл. «Материалы и методы», рис. 9).

Оказалось, что релаксирующий эффект P-S^{13} -hKRP не отличается от эффекта нефосфорилированного KRP. За 15 минут P-S^{13} -hKRP вызывает расслабление на $28 \pm 9\%$ ($n=5$) (см. рис. 20 Г, Е), то есть проявляет точно такой же эффект как и нефосфорилированный KRP ($28 \pm 9\%$ ($n = 7$) (см. рис. 20 Б,Е)).

О влиянии фосфорилирования KRP по Ser^{19} (сайт фосфорилирования MAP-киназы) на функциональные свойства KRP ничего не известно. Ранее (см. разд. 3) мы показали, что P-S^{19} -KRP так же ингибирует фосфорилирование HMM *in vitro* и развитие индуцированного микроцистином сокращения, как и нефосфорилированный KRP. Однако возможно, что фосфорилирование KRP по Ser^{19} влияет на его релаксирующий эффект, поскольку в данной модели задействовано большее количество участников регуляции

мышечного сокращения. Можно было предположить, что фосфорилирование KRP одновременно по двум участкам (Ser¹³ и Ser¹⁹) окажется способным влиять на его свойства. Поэтому мы исследовали эффект расслабления, вызываемого P-S¹⁹-hKRP и P-S¹³,P-S¹⁹-hKRP в нашей модели. Препараты фосфорилированных *in vitro* белков также были очищены от PKA и MAPK, чтобы исключить влияние протеинкиназ на силу сокращения волокон (см. разд. 2.8 гл. «Материалы и методы», рис. 9).

Эффект расслабления всех фосфорилированных форм KRP, исследованных в данной работе, не отличался от эффекта нефосфорилированного KRP. На рис. 20 (В-Д) представлены репрезентативные кривые расслабления в присутствии 10 μ M P-S¹⁹-hKRP (рис. 20В) и 10 μ M P-S¹³,P-S¹⁹-hKRP (рис. 20Д). Степень расслабления графически представлена на рис. 20Е. Оказалось, что P-S¹⁹-hKRP вызывал расслабление на $29 \pm 2\%$ (n=3), а P-S¹³,P-S¹⁹-hKRP – на $28 \pm 8\%$, (n=4). Таким образом, эффекты расслабления, вызываемые фосфорилированными формами KRP, статистически неотличимы от эффекта нефосфорилированного KRP ($P > 0,05$ для каждой фосфорилированной формы KRP по сравнению с нефосфорилированным KRP).

Можно предположить, что отсутствие эффекта фосфорилирования связано с тем, что фосфорилированный KRP подвергается дефосфорилированию в скинированных волокнах. Для проверки этого предположения мы оценили степень фосфорилирования P-S¹³-hKRP и P-S¹⁹-hKRP после инкубации со скинированными волокнами в условиях, соответствующих условиям проведения эксперимента. Мы показали, что в скинированном препарате *taenia coli* морской свинки не происходит дефосфорилирования фосфорилированных форм KRP (см. рис. 16-17, раздел 3.2).

Таким образом, можно заключить, что KRP вызывает расслабление после субмаксимального Ca²⁺-зависимого сокращения, и этот эффект KRP не зависит от фосфорилирования исследуемого белка.

5.3. PKG не усиливает действия KRP

Ранее в литературе была высказана гипотеза, что PKG регулирует расслабляющий эффект KRP за счёт фосфорилирования по Ser¹³ (Wu et al., 1998, Khromov et al., 2006). Однако в наших экспериментах оказалось, что P-S¹³-KRP вызывает расслабление волокон *taenia coli* точно также, как и нефосфорилированный KRP (см. разд. 5.2.). Можно предположить, что для усиления эффекта KRP необходимо не только фосфорилирование непосредственно KRP, но также фосфорилирование других субстратов PKG, с которыми, возможно, взаимодействует фосфорилированный KRP. Поэтому мы

исследовали процесс расслабления после субмаксимального Ca^{2+} -сокращения под действием фосфорилированного по Ser^{13} KRP в присутствии PKG.

С целью проконтролировать, насколько наблюдаемый эффект связан именно с фосфорилированием KRP, мы использовали неспособный фосфорилироваться мутант KRP, в котором Ser^{13} замещён на Ala (A^{13} -hKRP). Мы добавляли к волокнам A^{13} -hKRP совместно с PKG. Если бы эффекты P-S^{13} -KRP и PKG были бы синергичными, то суммарный эффект P-S^{13} -KRP и PKG был бы больше суммарного эффекта A^{13} -hKRP и PKG.

Оказалось, что PKG не усиливает релаксирующий эффект P-S^{13} -KRP. Этот результат графически представлен на рис. 21. В присутствии $0,18 \mu\text{M}$ PKG и $50 \mu\text{M}$ 8Br-цГМФ, $10 \mu\text{M}$ P-S^{13} -hKRP за 15 минут вызывает расслабление на $31 \pm 10\%$ ($n=4$). Этот эффект практически полностью совпадает с суммарным эффектом $10 \mu\text{M}$ A^{13} -hKRP и PKG/8Br-цГМФ, который составил $30 \pm 6\%$ ($n=4$) ($P > 0,05$). Приведённые выше значения также соответствуют эффекту расслабления нефосфорилированного KRP без PKG (см. раздел 5.2).

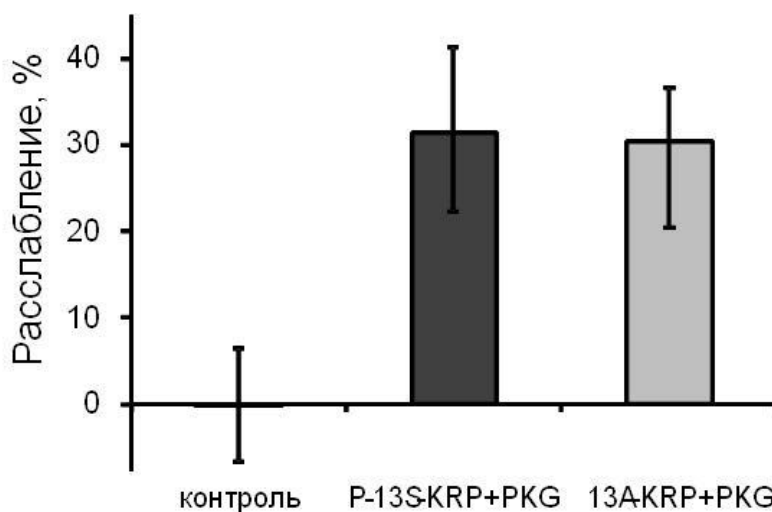


Рис. 21. Влияние P-S^{13} -KRP на расслабление после субмаксимального Ca^{2+} -сокращения скинированных тритоном-X-100 волокон *taenia coli* морской свинки в присутствии PKG. Препараты *taenia coli*, подготовленные как описано в разделе «Материалы и методы», пп. 3.1-3.2, для контрольного сократительного ответа помещали в раствор с pCa 4,5. Затем инкубировали в растворе с pCa 6,3 до достижения плато субмаксимального сокращения. После этого помещали в раствор с той же концентрацией Ca^{2+} , содержащий $0,18 \mu\text{M}$ PKG и $50 \mu\text{M}$ 8Br-цГМФ или контрольный буфер и инкубировали 10 мин. Затем 15 минут инкубировали в присутствии контрольного буфера, PKG/8Br-цГМФ, или PKG/8Br-цГМФ + $10 \mu\text{M}$ P-S^{13} -hKRP, или PKG/8Br-цГМФ + $10 \mu\text{M}$ A^{13} -hKRP. Гистограммы показывают средние значения степени расслабления, после 15 минут инкубации (в % от силы сокращения до добавления KRP) $\pm$ стандартная ошибка среднего ($n = 4$).

Мы показали, что усиления расслабляющего эффекта KRP не происходит ни при его фосфорилировании, ни при добавлении к нему PKG. Таким образом, PKG в нашей системе не усиливает эффекта KRP. По всей видимости, цГМФ - зависимое расслабление не опосредуется фосфорилированным KRP. Фосфорилирование KRP является лишь следствием активации PKG, но его функция не связана с расслаблением.

5.4. KRP не усиливает действия PKA

Ранее в нашей лаборатории было установлено, что цАМФ-зависимое расслабление гладких мышц ileum крысы сопровождается значительным повышением уровня фосфорилирования KRP по Ser¹³ (с 25% до 100%) (Kharchaev et al., 2004). Мы решили проверить, есть ли причинно-следственная связь между фосфорилированием KRP по Ser¹³ под действием PKA и эффектом расслабления. Однако, как мы уже упоминалось (см. разд. 5.2.), префосфорилированный KRP, очищенный от PKA, вызывает расслабление волокон *taenia coli* с такой же эффективностью как и нефосфорилированный белок. В тоже время, добавление PKA сопровождается расслаблением скинированных волокон и в отсутствие KRP (см. разд. 5.1.). Тем не менее, это не исключает возможности того, что KRP усиливает эффект PKA, взаимодействуя с какими-то иными фосфорилированными субстратами этого фермента. Поэтому мы исследовали совместное расслабляющее действие KRP и PKA на волокна *taenia coli*, сокращённые при субмаксимальной концентрации ионов Ca²⁺.

Мы обнаружили, что при совместном действии KRP и PKA не происходит усиления анализируемого эффекта. Действительно, через 30 минут инкубации изолированный фосфорилированный KRP вызывает расслабление, составляющее 36±14%, (n=3). В аналогичных условиях изолированная PKA вызывает расслабление, составляющее 20±6%, (n=4). Смесь двух белков вызывает расслабление составляющее 62±8 % (n=2), что близко к сумме релаксирующих эффектов, индуцируемых изолированными белками (36+20=56%) Более наглядно это можно видеть на графике зависимости степени расслабления от времени, представленном на рис. 22А. Как видно на рис. 22А, кривая, соответствующая алгебраической сумме кривых расслабления, индуцируемых изолированными PKA и KRP (выделена серым цветом), полностью совпадает с экспериментальной кривой расслабления, вызываемого добавлением смеси KRP и PKA.

В данном эксперименте, KRP не был префосфорилирован, поэтому аддитивный эффект можно было бы объяснить тем, что KRP слишком медленно фосфорилируется в

ходе инкубации волокон со смесью KRP и PKA. Однако, как следует из рис. 22Б, уже после 5 минут инкубации KRP полностью фосфорилируется по Ser¹³.

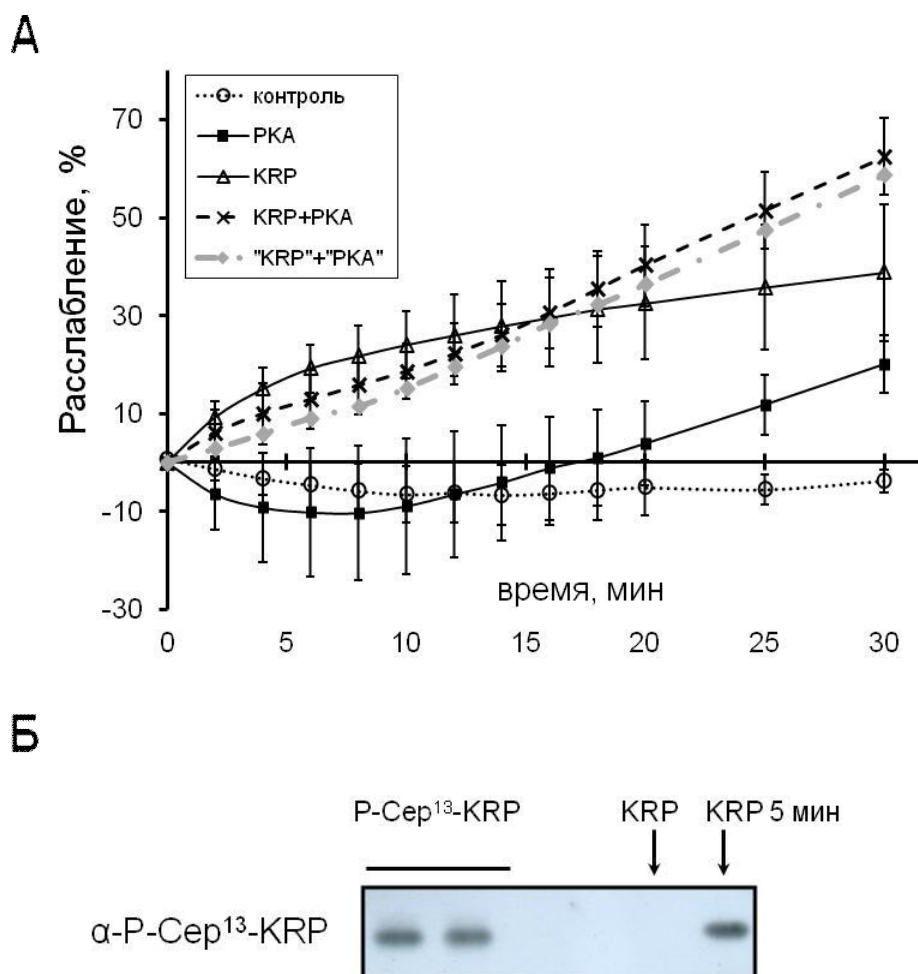


Рис. 22. Влияние PKA и KRP на расслабление после субмаксимального Ca²⁺-сокращения скинированных тритоном-X-100 волокон *taenia coli* морской свинки. Препараты *taenia coli* для контрольного сократительного ответа сначала помещали в раствор с рСа 4,5, затем помещали в релаксирующий раствор. После этого инкубировали в растворе с рСа 6,3 до достижения плато сокращения, а затем помещали в раствор с той же концентрацией Ca²⁺, содержащий либо контрольный буфер, либо 32000 Ед./мл PKA, либо 10μМ KRP, или совместно KRP и PKA, и инкубировали 30 мин. (А) Представлена зависимость степени расслабления (в % от силы сокращения до добавления KRP) ± стандартная ошибка среднего (n = 2-4) от времени. Серым цветом выделена кривая, представляющая собой алгебраическую сумму кривых расслабления KRP и PKA по отдельности. (Б) Анализ фосфорилирования KRP в ходе эксперимента. Через 5 минут после начала инкубации волокон с KRP и PKA, отбирали аликвоту инкубационной среды. Аликвоту анализировали с помощью электрофореза по Лэммли с последующим иммуноблоттингом с антителами, специфичными к P-S¹³-KRP с использованием метода хемилюминесцентной детекции. Образец наносили на гель из расчёта 20 нг общего KRP на дорожку (KRP, 5 мин). В качестве положительного контроля использовали 20 нг 100% фосфорилированного P-S¹³-KRP (P-S¹³-KRP). В качестве отрицательного контроля – 20 нг нефосфорилированного белка KRP (KRP).

Таким образом, мы подтвердили, что добавление РКА к скинированным волокнам приводит к их расслаблению. При этом указанная протеинкиназа способна фосфорилировать KRP. Однако два этих эффекта не связаны между собой. Фосфорилирование KRP не является главной причиной расслабления, вызываемого РКА. Судя по всему, хотя циклонуклеотид-зависимое расслабление фазных гладких мышц и сопровождается активным фосфорилированием KRP (Kharchaev et al., 2004), P-S¹³-KRP не является посредником в этом механизме расслабления, по крайней мере, в модели скинированных волокон. Вероятно, фосфорилирование KRP в мышцах всего лишь является следствием активации PKG или РКА.

6. Влияние KRP на сенситизацию Ca²⁺-сокращения, вызванную ингибированием фосфатазы миозина

Мы показали, что KRP является универсальным ингибитором фосфорилирования миозина (см. разд. 1 и 2). Однако уменьшение Ca²⁺-чувствительности гладких мышц может происходить как за счёт снижения скорости фосфорилирования, так и за счет увеличения скорости дефосфорилирования миозина. Одним из механизмов ингибирования ФЛЦМ является фосфорилирование Thr⁶⁹⁶/Thr⁸⁵³ регуляторной субъединицы MYPT1 (Feng et. al, 1999). Ввиду схожести аминокислотных последовательностей, прилегающих к сайтам фосфорилирования Thr⁶⁹⁶ MYPT1 и Ser¹⁹ РЛЦ, мы предположили, что KRP может препятствовать фосфорилированию MYPT1 по ингибиторному сайту, и таким образом способствовать поддержанию активности ФЛЦМ.

Для проверки этого предположения мы использовали модель, в которой происходит тиофосфорилирование MYPT по ингибиторному сайту. В работе Pfitzer et al., 2001 было показано, что добавление АТФγS к волокнам *taenia coli*, скинированным Тритоном X-100, в условиях, когда активность КЛЦМ подавлена обратимым ингибитором, происходит тиофосфорилирование MYPT. При этом Ca²⁺-чувствительность волокон усиливается. Мы исследовали, каким образом KRP влияет на сенситизацию волокон в этих условиях.

Волокна, подготовленные как описано в разд. 3.2 гл. «Материалы и методы», помещали в раствор для расслабления без АТФ, содержащий обратимый ингибитор КЛЦМ, ML-9 (300μM), и АТФγS (1 mM) на 3 минуты. Затем отмывали волокна от ингибитора КЛЦМ и АТФγS, и вызывали сокращение, погружая волокна в растворе с pCa 6,8. Как мы видим (см. рис. 23Б), в этих волокнах, при pCa 6,8 возникает сокращение – 54±4% (n=3), которое не регистрируется в случае волокон, к которым не добавляли

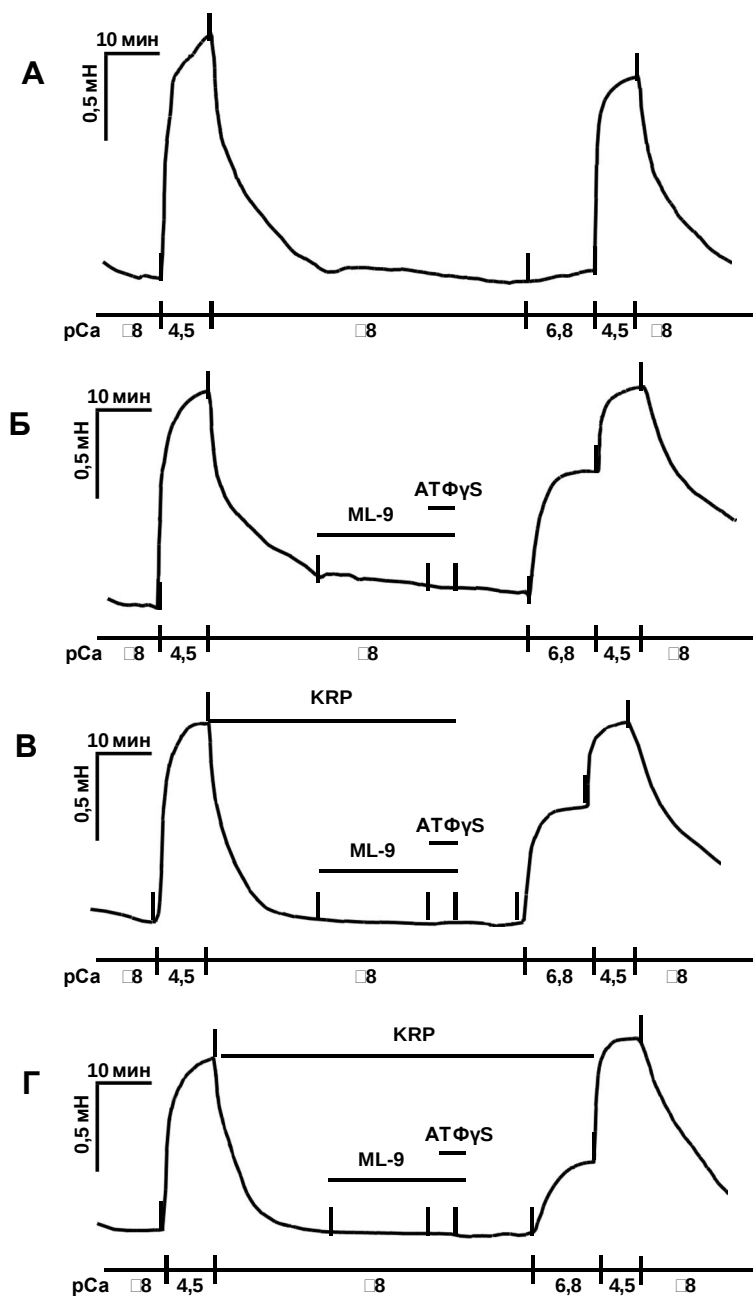


Рис. 23. Влияние KRP на сенситизацию Ca^{2+} -сокращения. Волокна *taenia coli*, подготовленные как описано в разделе «Материалы и методы», п. 3.2 помещали в раствор для расслабления без АТФ, с добавлением 300μM ML-9 и 1 mM АТФγS на 3 минуты. Затем волокна промывали в растворе К, и вызывали субмаксимальное сокращение при рСа 6,8, а затем контрольное сокращение при рСа 4,5. А – временной контроль; Б – тиюфосфорилирование в присутствии ML-9; В – тиюфосфорилирование в присутствии ML-9 и 20μM KRP, после тиюфосфорилирования волокна отмывали от KRP; Г – тиюфосфорилирование в присутствии ML-9 и 20μM KRP, субмаксимальное сокращение в присутствии 20μM KRP.

АТФγS (см. рис. 23А) – $2 \pm 2\%$ ($n=3$). Таким образом, в нашей модели, при инкубации волокон с АТФγS, происходит заметная Ca^{2+} -сенситизация.

Присутствие 20 μM KRP при тιοфосфорилировании не повлияло на Ca^{2+} -сенситизацию волокон (см. рис. 23В). При рСа 6,8 возникает такой же ответ, как и без KRP $56 \pm 3\%$ ($n=3$). Этот факт косвенно указывает на то, что KRP не влияет на процесс тιοфосфорилирования МΥРТ по Thr⁶⁹⁶.

Если же KRP (20 μM) присутствовал в растворе с рСа 6,8, которым вызывали сокращение после тιοфосфорилирования, то сократительный ответ был меньше и составлял $28 \pm 5\%$ ($n=3$) (см. рис. 23Г). Таким образом, KRP подавляет развитие сокращения в условиях Ca^{2+} -сенситизации в том случае, если физически присутствует в волокнах в процессе развития сокращения, но не за счёт влияния на тιοфосфорилирование МΥРТ по ингибиторному сайту.

* * *

Представленные нами данные (см. разд. 1,2 и 5 гл. «Результаты экспериментов»), свидетельствуют о том, что KRP ингибирует фосфорилирование РЛЦ НММ, индуцированное микроцистином сокращение и усиливает расслабление гладкомышечных волокон. В этой связи представлялось целесообразным установить, какие участки молекулы KRP могут быть ответственны за наблюдаемые эффекты. Для этого был проведен ряд экспериментов с делеционными мутантами KRP.

7. Удаление С-концевой последовательности KRP приводит к потере его регуляторного эффекта на сократительную активность мышц

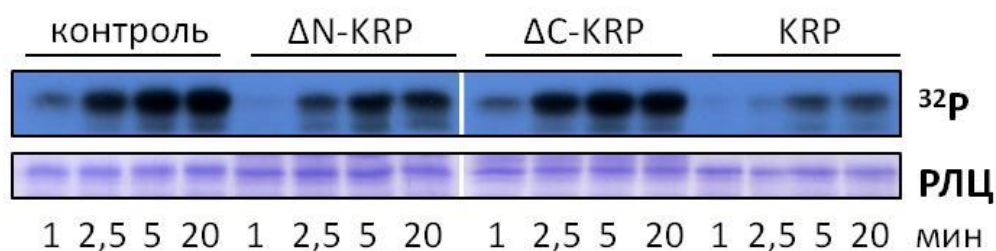
Известно, что KRP связывается с миозином в области соединения субфрагментов S1 и S2, в непосредственной близости от участка связывания РЛЦ (Silver et al., 1997, Masato et al., 1997). При этом KRP не влияет на фосфорилирование изолированных РЛЦ (Collinge et al., 1992), в отличие от миозина или НММ, в которых область соединения субфрагментов S1 и S2 остается интактной (Shirinsky et al., 1993). Поэтому мы предположили, что связывание KRP с миозином является необходимым для проявления его ингибиторного эффекта в отношении фосфорилирования миозина и сокращения мышечных волокон. Для проверки этого предположения мы использовали делеционный мутант KRP без С-концевого участка, так как ранее было установлено, что С-концевой участок KRP играет ключевую роль в связывании с молекулой миозина (Silver et al., 1997).

7.1. С-концевая, но не N-концевая последовательность необходима для ингибиторного действия KRP *in vitro*

Как было описано в первой главе раздела «Результаты экспериментов», KRP ингибирует фосфорилирование РЛЦ НММ под действием каталитического домена КЛЦМ. Для того чтобы проверить, каким образом С-концевой участок KRP, важный для связывания с миозином, влияет на ингибиторные свойства KRP, мы исследовали эффект делеционного мутанта KRP курицы без С-концевого участка (Δ C-chiKRP-His₆, см. гл. 2.6.4. раздела «Материалы и методы») на фосфорилирование легких цепей миозина в составе НММ под действием каталитического домена КЛЦМ. Выбор КЛЦМ-61 обусловлен тем, что эффект KRP может модулироваться KRP-доменом в составе полноразмерной КЛЦМ вследствие конкуренции за участок связывания на миозине. КЛЦМ-61 не содержит KRP-домена и в этом отношении более удобен для изучения влияния KRP на взаимодействие каталитического домена КЛЦМ с ее субстратом.

Оказалось, что удаление С-концевых аминокислотных остатков со 139 по 157 лишает KRP способности ингибировать фосфорилирование легких цепей миозина (рис. 24). Действительно, в отсутствие KRP (в контрольной реакции), уже через 5 минут инкубации удается достичь практически полного фосфорилирования легких цепей миозина ($95 \pm 4\%$, ($n=7$)). В присутствии 20 μ M полноразмерного KRP (chiKRP-His₆), пятиминутная инкубация с ферментом приводит к фосфорилированию лёгких цепей лишь на $29 \pm 4\%$ ($n=5$). В тоже время добавление 20 μ M Δ C-chiKRP-His₆ приводит к тому, что за 5 минут инкубации удается достичь степени фосфорилирования легких цепей миозина, составляющей $87 \pm 12\%$ ($n=5$), что статистически не отличается от результатов, полученных в отсутствие KRP ($P > 0,05$, см. рис. 24). Это означает, что С-концевая последовательность KRP необходима для ингибирования фосфорилирования легких цепей миозина в составе НММ под действием каталитического домена КЛЦМ.

А



Б

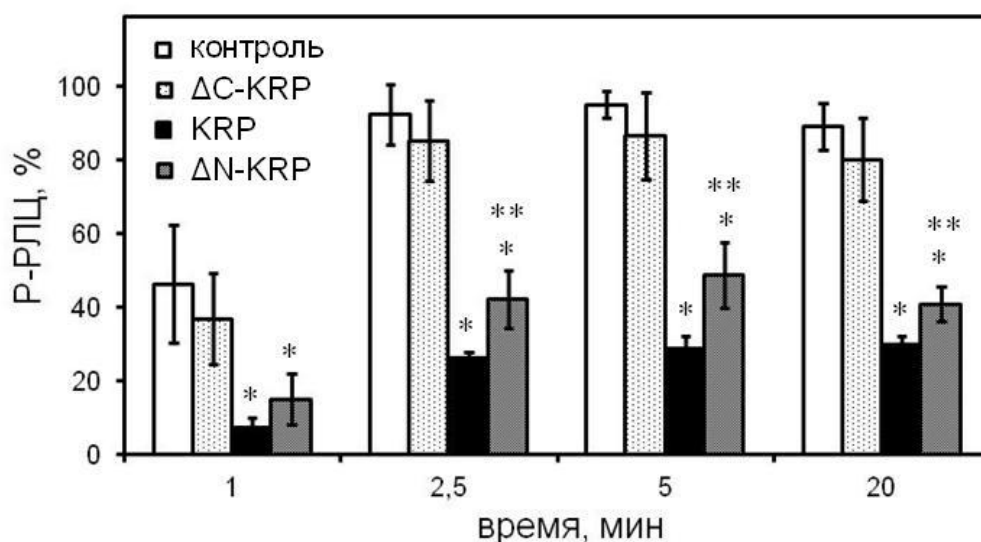


Рис. 24. С-конец KRP необходим для ингибирования фосфорилирования РЛЦ. НММ (4 μM) фосфорилировали КЛЦМ-61 (40 нМ) в присутствии $\gamma\text{-}[^{32}\text{P}]\text{АТФ}$ в буфере МРВ с 20 мМ NaCl в течение указанных промежутков времени, как описано в «Материалах и методах». Реакцию проводили в отсутствие (контроль) или в присутствии 20 μM chiKRP-His_6 (KRP), $\Delta\text{C-chiKRP-His}_6$ ($\Delta\text{C-KRP}$), $\Delta\text{N-chiKRP-His}_6$ ($\Delta\text{N-KRP}$). **А.** Репрезентативные автордиограммы (верхняя панель) и соответствующие электрофореграммы, окрашенные Кумасси R-250 (нижняя панель). **Б.** Гистограммы показывают средние значения (в % от полного) $\pm$ стандартная ошибка среднего ($n = 5-7$) степени фосфорилирования РЛЦ в отсутствие KRP (белые столбики) или в присутствии 20 μM chiKRP-His_6 , $\Delta\text{C-chiKRP-His}_6$ или $\Delta\text{N-chiKRP-His}_6$ ($\Delta\text{N-KRP}$) (чёрные, заштрихованные или серые столбики, соответственно). * $P < 0,05$ по отношению к контролю, ** $P < 0,05$ по отношению к chiKRP-His_6 .

N-концевая последовательность KRP содержит в себе несколько сайтов фосфорилирования. Однако, как мы показали ранее (см. гл. 3), ни фосфорилирование по MAP-киназному сайту (Ser¹⁹), ни по сайту PKA (Ser¹³) не влияет на ингибиторные свойства KRP. Поэтому мы решили проверить, влияет ли вообще N-концевая последовательность на ингибиторный эффект KRP в отношении фосфорилирования РЛЦ НММ.

Удаление N-концевых аминокислотных остатков с 1 по 35 не лишает KRP способности ингибировать фосфорилирование РЛЦ миозина в составе НММ. Так, степень фосфорилирования регуляторных лёгких цепей на 5 минуте в присутствии 20 μ M KRP без N-концевого участка (Δ N-chiKRP-His₆) составила $49 \pm 9\%$ ($n=5$; $P<0,05$ по сравнению с контролем). При этом следует заметить (см. рис 24), что Δ N-KRP все-таки является менее эффективным ингибитором фосфорилирования миозина, чем полноразмерный KRP. Это различие является статистически значимым ($P<0,05$ по сравнению с wt-KRP).

Таким образом, не только фосфорилирование KRP в N-концевой области не влияет на его ингибиторные свойства, но даже удаление самого N-концевого участка полностью не лишает KRP способности ингибировать фосфорилирование миозина. Наличие C-концевого участка KRP, важного для связывания с миозином, напротив, критично для ингибирования. Это указывает на то, что связывание KRP с миозином является необходимым для ингибирования процесса фосфорилирования легких цепей миозина.

7.2. C-концевая последовательность необходима для ингибиторного действия KRP в модели сокращения, индуцированного микроцистином

В предыдущем разделе мы показали, что C-концевой участок KRP, важный для связывания миозина, играет ключевую роль в ингибировании фосфорилирования миозина под действием КЛЦМ. Поэтому мы предположили, что отсутствие C-концевого участка молекулы KRP также может влиять и на его ингибиторные свойства в отношении сокращения скинированных 0,1% Тритоном X-100 волокон *taenia coli*, индуцированного микроцистином (см. разд. 2).

Как видно из рис. 25, Δ C-hKRP не влияет на развитие индуцированного микроцистином сокращения. В присутствии 10 μ M Δ C-hKRP не происходит увеличения лаг фазы сокращения по сравнению с контрольными волокнами. Время, за которое

достигалось 50% максимальной силы сокращения (F_{max}), $t_{1/2}$, в присутствии 10 μ M Δ C-hKRP составило $8,4 \pm 1,6$ мин, что не отличается от контроля – $7,4 \pm 0,6$ мин ($n=5$; $P>0,05$).

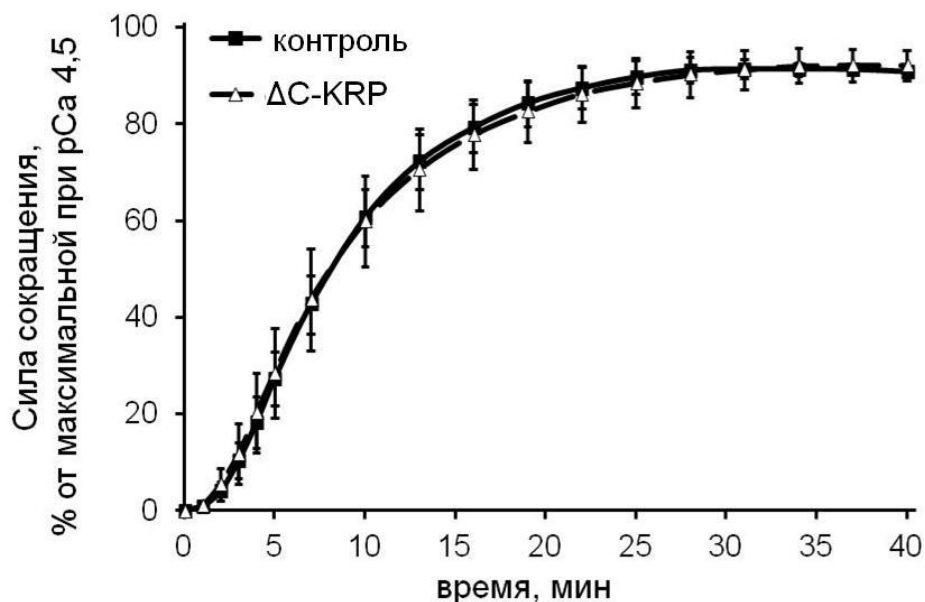


Рис. 25. С-конец KRP необходим для ингибирования Ca^{2+} -независимого сокращения скинированных 0,1% Тритоном X-100 волокон *taenia coli* морской свинки, вызванного микроцистином. Показана зависимость силы сокращения (% от максимальной при pCa 4,5), вызванного микроцистином (10 μ M) от времени. Сначала вызывали контрольный сократительный ответ добавлением раствора с pCa 4,5, затем волокна отмывали релаксирующим раствором до базального уровня и инкубировали с 10 μ M человеческого Δ C-hKRP или диализным буфером (контроль) в течение 40 мин, после чего стимулировали сокращение гладкомышечных волокон добавлением 10 μ M микроцистина, в присутствии Δ C-hKRP или диализного буфера. По прошествии 40 минут волокна помещали в раствор с pCa 4,5 для определения значения максимальной силы сокращения, которое использовалось для нормирования силы сокращения, индуцированного микроцистином. Данные представлены как среднее значение ($n=5$) $\pm$ стандартная ошибка среднего.

Сила сокращения волокон после 40 мин инкубации с микроцистином в присутствии 10 μ M Δ C-hKRP составила $92 \pm 2\%$ от F_{max} по сравнению с $93 \pm 3\%$ в контрольных волокнах ($n=5$; $P>0,05$).

Таким образом, наличие С-концевого участка KRP необходимо не только для эффективного ингибирования фосфорилирования легких цепей миозина, но и для ингибирования индуцированного микроцистином сокращения. Это указывает на то, что связывание KRP с миозином является принципиальным для ингибиторного действия KRP.

7.3. Δ CKRP не вызывает расслабления гладкомышечных волокон, предсокращенных под действием Ca^{2+}

Мы показали, что С-концевой участок KRP необходим для ингибирования фосфорилирования миозина под действием КЛЦМ (см. разд. 7.1) и развития сокращения мышечных волокон, индуцированного микроцистином (см. разд. 7.2). Это означает, что связывание KRP с миозином играет ключевую роль в его функции регулятора фосфорилирования миозина. Следует заметить, что в ряде работ (Wu et al., 1998, Khromov et al., 2006, Khromov et al., 2012) высказывается мнение о том, что усиление расслабления под действием KRP обусловлено активацией дефосфорилирования миозина. Поэтому связывание с миозином может не играть никакой роли в этом механизме. Для того, чтобы выяснить, необходимо ли связывание KRP с миозином для его релаксирующего действия, мы исследовали способность Δ C-hKRP расслаблять предсокращённые при субмаксимальной концентрации Ca^{2+} скинированные волокна.

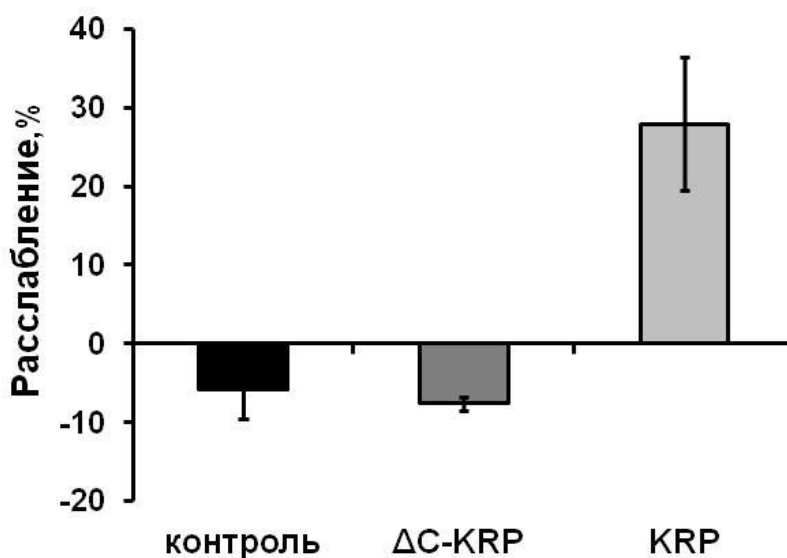


Рис. 26. С-конец KRP необходим для расслабления после субмаксимального Ca^{2+} -сокращения скинированных Тритоном X-100 волокон *taenia coli* морской свинки. Препараты *taenia coli* для контрольного сократительного ответа сначала помещали в раствор с pCa 4,5, затем помещали в релаксирующий раствор. После этого инкубировали в растворе с pCa 6,3 до достижения плато сокращения, а затем помещали в раствор с той же концентрацией Ca^{2+} , содержащий контрольный буфер, 10 μM hKRP или Δ C-hKRP. Затем волокна отмывали раствором с pCa 6,3, не содержащим KRP. Гистограммы показывают средние значения степени расслабления, вызванного KRP, после 15 минут инкубации (в % от силы сокращения до добавления KRP) $\pm$ стандартная ошибка среднего ($n = 3$).

Сокращённые при $pCa\ 6,3$ волокна помещали в раствор, содержащий $10\ \mu M\ \Delta C$ -hKRP или диализный буфер, и инкубировали 15 минут как описано в п. 3.2 раздела «Материалы и методы». Степень расслабления определяли, как описано в разделе 5.1. Оказалось, что KRP без C-концевого участка, в отличие от полноразмерного KRP (см. разд. 5.2.), не расслабляет гладкомышечные волокна *taenia coli*. После 15 минут инкубации волокон с $10\ \mu M\ \Delta C$ -hKRP, степень расслабления составила $(-8) \pm 1\%$, по сравнению с $(-6) \pm 4\%$ в контроле ($n=3$; $p>0,05$) (см. рис. 26). Отрицательные значения объясняются тем, что после добавления контрольного буфера или ΔC -hKRP, кривая силы сокращения продолжала выходить на плато.

* * *

Представленные результаты означают, что C-концевой участок KRP необходим не только для ингибирования фосфорилирования миозина и сокращения, но и для расслабления гладкомышечных волокон. Это свидетельствует о том, что связывание KRP с миозином играет ключевую роль в расслаблении мышц. По-видимому, в нашей модели механизм расслабления гладкомышечных волокон под действием KRP совпадает с механизмом ингибирования сокращения. То есть KRP, связываясь с миозином в непосредственной близости от РЛЦ, препятствует его активации. Это приводит к смещению равновесия в сторону дефосфорилирования миозина, и, таким образом, к снижению сократительного ответа, то есть к Ca^{2+} -десенситизации.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В нашей работе было показано, что KRP ингибирует фосфорилирование миозина под действием КЛЦМ без KRP-домена и тормозит развитие Ca^{2+} -независимого сокращения, индуцируемого микроцистином. В этой связи, становится возможным постулировать новый механизм действия, согласно которому KRP ингибирует фосфорилирование миозина, затрудняя доступ киназы к РЛЦ миозина. Мы выяснили, что этот механизм реализуется за счёт связывания KRP с миозином. Мы показали, что действие KRP в мышцах не регулируется фосфорилированием по Ser^{13} (PKA/PKG) и по Ser^{19} (MAPK). Несмотря на то, что фосфорилирование по Ser^{13} коррелирует с цАМФ- и цГМФ-зависимым расслаблением мышечных волокон, P-S¹³-KRP не является посредником в этом сигнальном пути в использованной нами физиологической модели.

1. Гипотетический механизм ингибирования фосфорилирования РЛЦ миозина белком KRP

В экспериментах *in vitro* было показано, что KRP является ингибитором реакции фосфорилирования РЛЦ киназой легких цепей миозина (Shirinsky et al., 1993). Однако ингибирование наблюдалось, только если в качестве субстрата для киназы используется интактная молекула миозина, или тяжелый меромиозин (НММ), который содержит участок связывания с KRP. В тоже время, ингибиторный эффект KRP полностью отсутствует, если в опыте использовались изолированные РЛЦ (Collinge et al., 1992) или субфрагмент S1 (Nieznanski and Sobieszek, 1997), с которыми KRP не связывается. В нашей работе было установлено, что удаление С-концевого участка KRP, ответственного за связывание с миозином, лишает KRP способности ингибировать фосфорилирование НММ (см. гл. 7.1. раздела «Результаты экспериментов»). Это означает, что связывание KRP с миозином необходимо для ингибирования фосфорилирования РЛЦ.

КЛЦМ содержит два центра связывания с субстратом: один располагается в каталитическом домене и непосредственно участвует в связывании РЛЦ, другой (KRP-домен) находится на С-конце и обеспечивает связывание с областью S1-S2 миозина. KRP вытесняет KRP-домен КЛЦМ с участка связывания на миозине (Shirinsky et al., 1993, Kudryashov et al., 1999). Поэтому было предположено, что ингибиторный эффект KRP объясняется тем, что КЛЦМ вынуждена фосфорилировать РЛЦ миозина из раствора, с

меньшей эффективностью, чем, если бы фермент был бы связан с миозином своим KRP-доменом (Shirinsky et al., 1993, Silver et al., 1997).

Мы установили, что KRP способен ингибировать фосфорилирование миозина под действием КЛЦМ-61, у которой нет KRP-домена (см. гл. 1 раздела «Результаты экспериментов»). Более того, KRP ингибирует индуцированное микроцистином сокращение, опосредованное неканоническими протеинкиназами миозина, у которых также нет KRP-доменов (см. гл. 2 раздела «Результаты экспериментов»). Это говорит о том, что помимо механизма конкуренции белка KRP с KRP-доменом КЛЦМ, существует иной механизм, не зависящий от наличия у киназы миозина KRP-домена. Участки связывания KRP и РЛЦ с тяжёлыми цепями миозина расположены в непосредственной близости друг от друга (Silver et al., 1997, Masato et al., 1997). Это позволяет предложить, что KRP затрудняет доступ активного центра киназы к РЛЦ, причём, ингибиторное действие KRP не специфично по отношению к КЛЦМ.

Если KRP действительно затрудняет взаимодействие каталитического домена КЛЦМ с субстратом, то возникает резонный вопрос, почему KRP-домен в составе КЛЦМ-108 не ингибирует фосфорилирование миозина?

Фосфорилирование миозина под действием КЛЦМ происходит в строго заданной последовательности. Так, *in vitro* КЛЦМ сначала фосфорилирует РЛЦ только одной из головок миозина, а включение фосфатного остатка в РЛЦ второй головки происходит только после того, как все молекулы миозина уже содержат по одному фосфату (Persechini and Hartshorne, 1981, 1983). По-видимому, такой механизм обеспечивается благодаря KRP-домену КЛЦМ, который координирует каталитический домен по отношению к одной из РЛЦ (Хапчаев и соавт., 2003). Мы предполагаем, что KRP затрудняет фосфорилирование одной из РЛЦ, в то время как доступ ко второй остаётся свободным. После фосфорилирования одной из РЛЦ KRP-домен теряет способность связываться с миозином, поэтому КЛЦМ фосфорилирует вторую РЛЦ из раствора, и KRP-домен этому не препятствует. Таким образом, в составе полноразмерной КЛЦМ, KRP-домен может выполнять ориентирующую функцию для каталитического домена относительно одной из РЛЦ. Аналогично, в случае неканонических киназ, которые не содержат KRP-домен, эту ориентирующую функцию может выполнять белок KRP. Однако данные предположения нуждаются в дальнейшей экспериментальной проверке.

На основании всего вышесказанного, мы можем предложить гипотетический механизм ингибирования фосфорилирования РЛЦ миозина под действием КЛЦМ белком

KRP. Он представлен на рис. 27. В отсутствие KRP, обе РЛЦ миозина доступны для фосфорилирования (рис. 27-1). При этом полноразмерная КЛЦМ связывается с миозином своим KRP-доменом, который экранирует РЛЦ одной из головок, поэтому каталитический домен киназы фосфорилирует другую РЛЦ (рис. 27-2). КЛЦМ-61 лишена KRP-домена и фосфорилирует РЛЦ миозина из раствора (рис. 27-3).

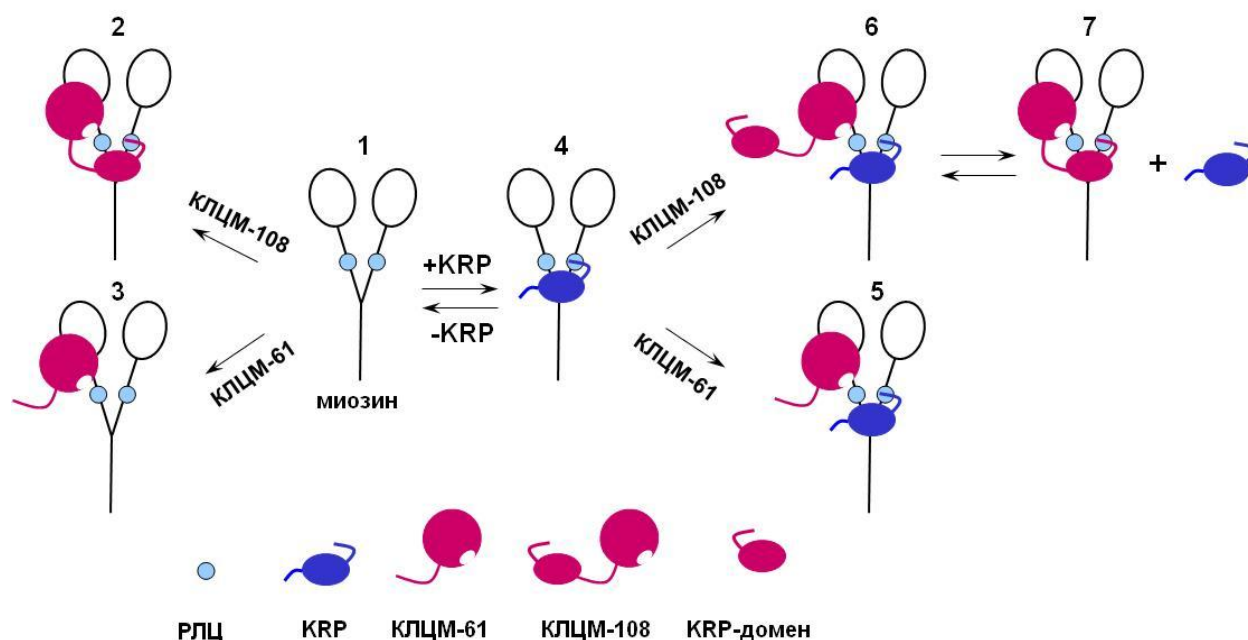


Рис. 27. Схема механизма ингибирования фосфорилирования РЛЦ миозина полноразмерной КЛЦМ-108 и её каталитического домена КЛЦМ-61 в присутствии и в отсутствие KRP. Описание см. в тексте

В присутствии KRP, только одна РЛЦ миозина доступна для фосфорилирования (рис. 27-4), поэтому скорость фосфорилирования НММ под действием как КЛЦМ-61 (рис. 27-5), так и КЛЦМ-108 (рис. 27-6) снижается. В отличие от КЛЦМ-61, полноразмерный фермент способен не только фосфорилировать РЛЦ из раствора, но замещать KRP и связываться с миозином KRP-доменом (рис. 27-7).

Следует отметить, что в литературе предложен альтернативный механизм действия KRP. А. Собешек. предположил, что связывание KRP вызывает конформационные изменения в молекуле миозина в составе филаментов, наподобие того, как это происходит с мономерным миозином (Sobieszek et al., 2005). В случае мономерного миозина, KRP переводит миозин из 10S конформации в 6S, вызывая диссоциацию «шейки» миозина от участка стержневой части *той же* молекулы миозина (Shirinsky et al., 1993, Masato et al., 1997). В случае филаментарного миозина, предполагается, что KRP вызывает диссоциацию «шейки» и стержневой части *соседней* молекулы миозина. Как полагают авторы, именно эти конформационные изменения, вызывают диссоциацию КЛЦМ от миозиновых филаментов в присутствии KRP (Sobieszek

et al., 2005). Тот факт, что ингибирование в присутствии KRP наблюдается, если в качестве субстрата КЛЦМ используется НММ, а не только миозин, не противоречит данной гипотезе. Поскольку НММ, хоть и не содержит участка связывания с «шейкой» миозина, расположенного в С-концевой части стержневого фрагмента миозина, тем не менее, может претерпевать конформационные изменения наподобие целой молекулы миозина (Suzuki et al., 1985). Однако причинно-следственная связь диссоциации КЛЦМ с конформационными изменениями в молекулах миозина не доказана. Диссоциация КЛЦМ может быть также объяснена вытеснением KRP-домена КЛЦМ белком KRP (Shirinsky et al., 1993). Поэтому предложенный авторами механизм также остаётся гипотетическим.

2. Роль KRP в регуляции сократительной активности гладких мышц

Сократительный ответ мышцы определяется балансом активностей киназ и фосфатазы миозина. Ингибирование киназ миозина приводит к смещению равновесия в сторону дефосфорилирования миозина. Поэтому KRP, ингибируя фосфорилирование РЛЦ миозина, может не только подавлять развитие сокращения, но и способствовать расслаблению гладких мышц. Ряд авторов предполагает, однако, что KRP усиливает расслабление за счёт активации фосфатазы миозина (Sobieszek et al., 2005, Khromov et al. 2006). Тем не менее, прямых доказательств того, что KRP усиливает активность фосфатазы, в настоящее время, нет. Более того, установлено, что, KRP не влияет на дефосфорилирование Р-РЛЦ миозина как каталитической субъединицей ФЛЦМ, так и холоферментом *in vitro* (Sobieszek et al., 1997).

В работе группы А. Собешка на модели, «нативных миозиновых филаментов», которые содержат как эндогенную КЛЦМ, так и ФЛЦМ, был продемонстрирован двунаправленный эффект KRP (Sobieszek et al., 2005). Добавление Ca^{2+} и АТФ к таким филаментам вызывает фосфорилирование РЛЦ миозина, которое продолжается до тех пор, пока не заканчивается АТФ. В отсутствие АТФ КЛЦМ становится неактивной. Это приводит к дефосфорилированию РЛЦ миозина до базального уровня. В присутствии KRP, с одной стороны, снижается скорость фосфорилирования, а с другой стороны, повышается скорость дефосфорилирования РЛЦ миозина. Этот результат косвенно свидетельствует о том, что KRP увеличивает активность ФЛЦМ. Однако необходимо обратить внимание на то, что в указанном исследовании были использованы не чистые компоненты, а препарат грубо очищенных «нативных миозиновых филаментов». Не исключено, что в данном препарате могли содержаться и другие участники регуляции сокращения, помимо ФЛЦМ и КЛЦМ. Поэтому эффект KRP на скорость

дефосфорилирования мог быть обусловлен не прямым воздействием на ФЛЦМ, а влиянием на других участников регуляции сокращения.

В результате действия Ca^{2+} -сенситизирующих стимулов, происходит фосфорилирование регуляторной субъединицы фосфатазы миозина (MYPT) по Thr⁶⁹⁶ и Thr⁸⁵³, которое может осуществляться такими киназами, как ROCK, ILK, ZIPK. Это приводит к подавлению активности фосфатазы. Мы предположили, что KRP может ингибировать фосфорилирование MYPT, и, таким образом, предотвращать ингибирование ФЛЦМ. В скинированных Тритоном X-100 волокнах, в условиях, когда происходит тιοфосфорилирование MYPT, но не РЛЦ миозина, подавляется активность ФЛЦМ и возникает Ca^{2+} -сенситизация волокон (Pfitzer et al., 2001). Мы воспроизвели эти условия, и выяснили, что присутствие KRP при тιοфосфорилировании не уменьшает эффекта сенситизации (см. гл. 6 раздела «Результаты экспериментов»). Это косвенно указывает на то, что KRP не влияет на тιοфосфорилирование MYPT. Когда же KRP физически присутствует именно в ходе развития сокращения волокон, происходит подавление Ca^{2+} -сенситизации. Этот результат можно трактовать двояко. С одной стороны, KRP ингибирует фосфорилирование РЛЦ, связываясь с миозином, и поэтому вне зависимости от активности фосфатазы, подавляет Ca^{2+} -сенситизацию. С другой стороны, нельзя полностью исключить возможности влияния KRP на активность ингибированной фосфатазы.

Наши результаты согласуются с данными, полученными на модели пермеабелизованных β -эсцином волокон *ileum* (Khromov et al., 2012). В указанной работе сокращение, вызванное Ca^{2+} , сопровождалось фосфорилированием MYPT по Thr⁶⁹⁶ и Thr⁸⁵³. При добавлении KRP, происходило расслабление волокон, но степень фосфорилирования MYPT также не изменялась. Фосфорилированная по Thr⁸⁵³ MYPT не связывается с миозином. Это затрудняет дефосфорилирование РЛЦ миозина под действием каталитической субъединицы ФЛЦМ. Авторы указанной работы высказывают предположение, что KRP связывается с фосфорилированной MYPT. Это делает возможным связывание фосфо-MYPT с фосфо-миозином, и восстанавливает активность ФЛЦМ. Другими словами, KRP может предположительно осуществлять адресную доставку субстрата для каталитической субъединицы ФЛЦМ. Действительно, KRP обеспечивает связывание фосфо-миозина из гомогената *ileum* с иммобилизованной фосфо-MYPT, а также усиливает активность фосфо-ФЛЦМ в гомогенатах ткани. Авторы предположили, что KRP связывается с фосфо-MYPT. В гладкомышечных клетках методом PLA (Proximity Ligation Assay) было продемонстрировано взаимодействие KRP и

фосфо-МҮРТ (Khromov et al., 2012). Тем не менее, ни в одном из экспериментов прямо не было показано, что KRP связывается с фосфо-МҮРТ в отсутствие других участников сокращения, т.е. *in vitro*. Поэтому остаётся возможность того, что KRP облегчает связывание фосфо-МҮРТ с фосфо-миозином при участии других белков.

В нашей модели расслабления после субмаксимального Ca^{2+} -сокращения присутствуют основные известные участники регуляции сокращения, в том числе и ФЛЦМ. Оказалось, что ΔCKRP , не способный связываться с миозином, не расслабляет мышечные волокна (см. гл. 7 раздела «Результаты экспериментов»). Это говорит о том, что связывание KRP с миозином необходимо и для эффекта расслабления. Полученный результат косвенно указывает на то, что действие KRP в нашей модели связано, скорее, с ингибированием фосфорилирования миозина, а не с активацией дефосфорилирования. В модели скинированных Тритоном X-100 волокон *taenia coli* присутствуют протеинкиназы, которые могут фосфорилировать МҮРТ1 (Серебряная, 2006), однако, к сожалению, мы не анализировали статус фосфорилирования ФЛЦМ. Возможно, в нашей модели эффект KRP на ФЛЦМ не проявляется, потому что МҮРТ1 не подвергалась фосфорилированию в достаточной степени. Также, не исключено влияние других агентов, помимо ФЛЦМ и KRP, которые, возможно, имеют значение для активации ФЛЦМ, но не присутствуют в нашей модели скинированных Тритоном X-100 волокон.

Для реализации предложенного нами механизма в физиологических условиях необходимо, чтобы была возможность образования ощутимого количества комплекса миозин:KRP. Стехиометрия связывания миозина и KRP составляет 1:1 (Silver et al., 1997). Концентрация KRP в *taenia coli* составляет 13 μM . Тогда как концентрация миозина гладких мышцах по разным источникам колеблется в интервале от 26 до 40 μM (Choudhury et al., 2004, Cohen and Murphy 1978). Учитывая константу диссоциации KRP и миозина, 5,5 μM (Silver et al., 1997), концентрация комплекса составит 10-11 μM . Это означает, что около 27-37% миозина будет находиться в комплексе с KRP. В ряде других мышц (*ileum*, портальная вена), содержание KRP заметно выше, чем в *taenia coli* (Kharchaev et al., 2004, Choudhury et al., 2004). Так, концентрация KRP в гладкомышечном слое *ileum* составляет 30 μM (Kharchaev et al., 2004), а в портальной вене – 18-33 μM (Choudhury et al., 2004), и в мускульном желудке курицы – 80-90 μM (Shirinsky et al., 1993) и т.д. Очевидно, что в этих мышцах большая часть миозина будет находиться в комплексе с KRP. Именно поэтому концентрация KRP в фазных гладких мышцах оказывается достаточной для ингибирования фосфорилирования миозина согласно предложенному нами механизму.

3. Эффект KRP не регулируется фосфорилированием

Неоднократно указывалось, что степень фосфорилирования KRP по Ser¹³ существенно возрастает при цАМФ/цГМФ-зависимом расслаблении (Krymsky et al., 2001, Khapchaev et al., 2004, Khromov et al., 2006, Puetz et al., 2010) и снижается при сокращении (Madden et al., 2008). Таким образом, можно было предположить, что фосфорилирование KRP носит регуляторный характер. Однако, несмотря на все наши усилия, мы не обнаружили влияния фосфорилирования KRP по Ser¹³ ни на его ингибиторную активность в отношении фосфорилирования миозина и сокращения, индуцированного микроцистином, ни на его релаксирующую активность (см. гл. 3.1, 3.2, 5.2 разд. «Результаты экспериментов»). Более того, добавление PKA или PKG к волокнам вместе с фосфорилированным KRP не усиливает его эффект (см. гл. 4 и 5 разд. «Результаты экспериментов»). Это говорит о том, что, по крайней мере, в нашей модели, циклонуклеотид-зависимое расслабление не опосредуется фосфорилированием KRP, хотя и коррелирует с ним.

Мы показали, что фосфорилирование KRP по Ser¹⁹, которое происходит при PKC-зависимой активации MAPK (Khapchaev et al., 2004), также не влияет на свойства KRP. P-Ser¹⁹-KRP и дифосфорилированный P-Ser¹³,P-Ser¹⁹-KRP с одинаковой эффективностью, по сравнению с нефосфорилированным KRP, ингибируют фосфорилирование миозина *in vitro* и микроцистин-зависимое сокращение. Кроме того, они одинаково влияют на расслабление предварительно сокращенных под действием кальция волокон *taenia coli*. Таким образом, несмотря на то, что около трети KRP фосфорилировано по Ser¹⁹ *in vivo* (Khapchaev et al., 2004), его фосфорилирование не играет роли в регуляции сокращения в использованной нами физиологической модели. Возможно, что фосфорилирование KRP при действии различных стимулов является лишь побочным эффектом активации других регуляторных путей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании полученных нами данных и сведений из литературы мы предлагаем следующую схему участия KRP в регуляции сокращения гладких мышц (см. рис. 28).

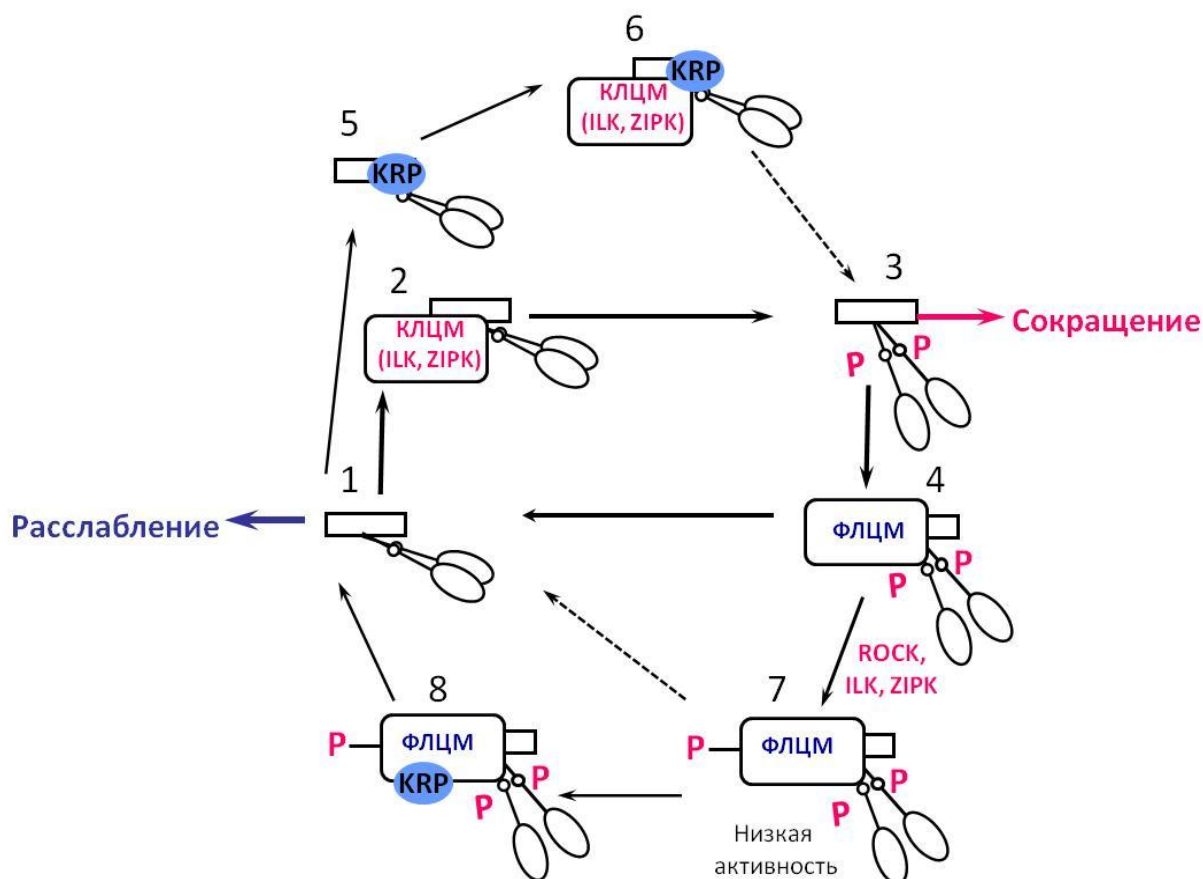


Рис. 28. Участие KRP в Ca^{2+} -десенситизации гладких мышц. Объяснение см. в тексте.

Нефосфорилированный миозин (1) неактивен, поэтому сокращение мышцы невозможно. Под действием Ca^{2+} /CaM зависимой КЛЦМ или альтернативных Ca^{2+} -независимых киназ (например, ILK и ZIPK) (2) миозин фосфорилируется (3), и это приводит к сокращению. Дефосфорилирование осуществляет ФЛЦМ (4), вследствие чего становится возможным расслабление. Если в мышце экспрессируется KRP, то он связывается с миозином в области близкой к участку связывания РЛЦ (5). Как показано в нашей работе, связывание KRP затрудняет фосфорилирование РЛЦ под действием как КЛЦМ, так и Ca^{2+} -независимых киназ (6). В результате происходит сдвиг равновесия в сторону дефосфорилирования миозина и, соответственно, расслабления. Активность фосфатазы миозина регулируется за счёт фосфорилирования её регуляторной

субъединицы (MYPT) (Feng et al., 1999). Rho-киназа, ILK и ZIPK фосфорилируют MYPT по ингибиторным сайтам (7), что приводит к снижению активности фосфатазы и смещению равновесия в сторону фосфорилирования миозина (Feng et al., 1999, MacDonald et al., 2001a, Kiss et al., 2002). Есть основания предположить, что KRP, связываясь с фосфорилированной MYPT (8), может восстанавливать активность ФЛЦМ (Khromov et al., 2012), что способствует расслаблению.

Данные, полученные в ходе нашего исследования, говорят о том, что KRP является не специфичным к КЛЦМ, но более универсальным ингибитором фосфорилирования миозина. Его действие, по-видимому, проявляется независимо от других агентов, регулирующих сократительную активность мышц, поскольку KRP действует за счёт связывания напрямую с миозином. Физиологическая функция неканонических киназ РЛЦ миозина до сих пор не полностью ясна. Предполагается, что они играют роль в Ca^{2+} -сенситизации и поддержании сокращения при низких концентрациях Ca^{2+} (Ihara et al., 2007b), а также при сокращении определённых видов гладких мышц (Kim et al., 2004). Поэтому мы предполагаем, что KRP играет роль в регуляции базального уровня сокращения и фосфорилирования РЛЦ посредством механизма, описанного в работе. С одной стороны, KRP выполняет функцию некоего барьера для активации сокращения при низких концентрациях Ca^{2+} , препятствуя фосфорилированию миозина. С другой стороны, при высоком уровне фосфорилирования РЛЦ, то есть когда мышца максимально сокращена, KRP не может связываться с миозином (Shirinsky et al., 1993). В данных условиях KRP, может снижать фосфорилирование РЛЦ и силу сокращения предположительно за счёт восстановления активности фосфатазы, если она была ингибирована фосфорилированием (Khromov et al., 2012). Таким образом, KRP усиливает расслабление уже сокращённой мышцы, сдвигая равновесие в сторону дефосфорилирования миозина. Такое двунаправленное действие позволяет KRP оказывать Ca^{2+} -десенситизирующее влияние вне зависимости от степени активации гладкой мускулатуры.

ВЫВОДЫ

1. KRP в условиях *in vitro* ингибирует фосфорилирование миозина под действием киназы легких цепей миозина, лишённой KRP-домена.
2. KRP тормозит развитие индуцированного микроцистином сокращения скинированных волокон *taenia coli*, препятствуя фосфорилированию легких цепей миозина.
3. Фосфорилирование под действием PKA/PKG и MAPK не влияет на способность KRP ингибировать фосфорилирование миозина *in vitro*, а также на способность KRP ингибировать индуцированное микроцистином сокращение и вызывать расслабление после Ca^{2+} -зависимого сокращения скинированных гладкомышечных волокон.
4. С-концевая последовательность KRP играет ключевую роль в способности этого белка ингибировать фосфорилирование легких цепей миозина, индуцированное микроцистином сокращение и вызывать расслабление после Ca^{2+} -зависимого сокращения скинированных гладких мышц.
5. Предложен новый механизм функционирования KRP, согласно которому этот белок ингибирует фосфорилирование миозина и сокращение гладких мышц, связываясь с миозином и затрудняя доступ протеинкиназ к регуляторным лёгким цепям миозина.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Диксон, М., Уэбб, Э. Ферменты/ Диксон, М., Уэбб, Э.– Москва: Мир – 1982. – 392с.
2. Серебряная, Д.В.. Анализ молекулярных аспектов функционирования миозина II в мышечном сокращении и клеточной подвижности с помощью белка KRP: дисс. канд. биол. наук: 03.00.04/ Серебряная Дарья Владимировна. – М. 2006. – 130 с.
3. Хапчаев, А.Ю. Фосфорилирование киназы лёгких цепей миозина и белка KRP в регуляции сократительной активности гладких мышц: дисс. канд. биол. наук: 03.00.04/ Хапчаев Аскер Юсуфович. – М.2004 – 125 с.
4. Хапчаев, А.Ю., Ширинский, В.П., Воротников, А.В. Структура, свойства и регуляция белковых продуктов генетического локуса киназы лёгких цепей миозина // Успехи Биологической Химии – 2003. – Т.43. – С. 365–420.
5. Alessi, D., MacDougall, L.K., Sola, M.M., Ikebe, M., and Cohen, P.. The control of protein phosphatase-1 by targetting subunits. The major myosin phosphatase in avian smooth muscle is a novel form of protein phosphatase-1.// Eur. J. Biochem. – 1992. – V. 210. – P.1023–1035.
6. Amano, M., Ito, M., Kimura, K., Fukata, Y., Chihara, K., Nakano, T., Matsuura, Y., and Kaibuchi, K.. Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase).// J. Biol. Chem. – 1996. – V.271. – P.20246–20249.
7. Andrews, M.A., Maughan, D.W., Nosek, T.M., and Godt, R.E. Ion-specific and general ionic effects on contraction of skinned fast-twitch skeletal muscle from the rabbit.// J. Gen. Physiol. – 1991. – V.98. – P.1105–1125.
8. Arheden, H., Arner, A., and Hellstrand, P. Cross-bridge behaviour in skinned smooth muscle of the guinea-pig taenia coli at altered ionic strength.// J. Physiol. – 1988. – V.403. – P.539–558.
9. Arner, A. Mechanical characteristics of chemically skinned guinea-pig taenia coli.// Pflugers Arch. – 1982. – V.395. – P.277–284.
10. Arner, A. Force-Velocity Relation in Chemically Skinned Rat Portal Vein Effects of Ca^{2+} and Mg^{2+} Anders.// Pflugers Arh. – 1983. – V.397. – P.6–12.
11. Barany, M. Biochemistry of Smooth Muscle Contraction/ Barany, M. – Academic Press: San Diego – 1995. – 418
12. Barsotti, R.J., Ikebe, M., and Hartshorne, D.J. Effects of Ca^{2+} , Mg^{2+} , and myosin phosphorylation on skinned smooth muscle fibers.//Am. J. Physiol. – 1987. – V. 252. – P.C543–C554.
13. Baumann, B.A.J., Taylor, D.W., Huang, Z., Tama, F., Fagnant, P.M., Trybus, K.M., and Taylor, K.A. Phosphorylated smooth muscle heavy meromyosin shows an open conformation linked to activation.// J. Mol. Biol. – 2012. – V.415. – P.274–287.
14. Berridge, M.J. Smooth muscle cell calcium activation mechanisms.// J. Physiol. – 2008. – V.586. – P.5047–5061.
15. Birukov, K.G., Schavocky, J.P., Shirinsky, V.P., Chibalina, M. V, Van Eldik, L.J., and Watterson, D.M. Organization of the genetic locus for chicken myosin light chain

- kinase is complex: multiple proteins are encoded and exhibit differential expression and localization.// *J. Cell. Biochem.* – 1998. – V.70 – P.402–413.
16. Bollen, M., Peti, W., Ragusa, M.J., and Beullens, M. The extended PP1 toolkit: designed to create specificity.// *Trends Biochem. Sci.* – 2010. – V.35. – P.450–458.
 17. Borman, M. A, MacDonald, J.A, Murányi, A., Hartshorne, D.J., and Haystead, T. A J. Smooth muscle myosin phosphatase-associated kinase induces Ca^{2+} sensitization via myosin phosphatase inhibition.// *J. Biol. Chem.* – 2002. – V. 277. – P.23441–23446.
 18. Borman, M.A., MacDonald, J.A., and Haystead, T.A.J. Staurosporine inhibition of zipper-interacting protein kinase contractile effects in gastrointestinal smooth muscle.// *Biochem. Cell Biol.* – 2007. – V.85. – P.111–120.
 19. Borman, M.A., Freed, T.A., Haystead, T.A.J., and Macdonald, J.A. The role of the calponin homology domain of smoothelin-like 1 (SMTNL1) in myosin phosphatase inhibition and smooth muscle contraction.// *Mol. Cell. Biochem.* – 2009. – V.327. – P. 93–100.
 20. Boudeau, J., Miranda-Saavedra, D., Barton, G.J., and Alessi, D.R. Emerging roles of pseudokinases.// *Trends Cell Biol.* – 2006 – V.16. – P.443–452.
 21. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.// *Anal. Biochem.* – 1976. – V.72. – P.248–254.
 22. Burgess, S.A., Yu, S., Walker, M.L., Hawkins, R.J., Chalovich, J.M., and Knight, P.J. Structures of smooth muscle myosin and heavy meromyosin in the folded, shutdown state.// *J. Mol. Biol.* – 2007. – V.372. – P.1165–1178.
 23. Butler, T., Paul, J., Europe-Finner, N., Smith, R., and Chan, E.-C. Role of serine-threonine phosphoprotein phosphatases in smooth muscle contractility.// *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2013. – V.304. – P.C485–C504.
 24. Carlson, D.A., Franke, A.S., Weitzel, D.H. Fluorescence linked enzyme chemoproteomic strategy for discovery of a potent and selective DAPK1 and ZIPK inhibitor.// *ACS Chem. Biol.* – 2013. – V.8. – P.2715–2723.
 25. Chan, J.Y., Takeda, M., Briggs, L.E., Graham, M.L., Lu, J.T., Horikoshi, N., Weinberg, E.O., Aoki, H., Sato, N., Chien, K.R., and Kasahara, H. Identification of cardiac-specific myosin light chain kinase.// *Circ. Res.* – 2008. – V.102 – P.571–580.
 26. Chew, T.L., Masaracchia, R.A., Goeckeler, Z.M., and Wysolmerski, R.B. Phosphorylation of non-muscle myosin II regulatory light chain by p21-activated kinase (gamma-PAK).// *J. Muscle Res. Cell Motil.* – 1998. – V.19. – P.839–854.
 27. Chiswell, B.P., Zhang, R., Murphy, J.W., Boggon, T.J., and Calderwood, D.A. The structural basis of integrin-linked kinase – PINCH interactions.// *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2008. – V.105. – P.20677–20682.
 28. Cho, Y.-E., Ahn, D.-S., Morgan, K.G., and Lee, Y.-H. Enhanced contractility and myosin phosphorylation induced by Ca^{2+} -independent MLCK activity in hypertensive rats.// *Cardiovasc. Res.* – 2011. – V.91 – P.162–170.
 29. Choudhury, N., Khromov, A.S., Somlyo, A.P., and Somlyo, A. V Telokin mediates Ca^{2+} -desensitization through activation of myosin phosphatase in phasic and tonic smooth muscle.// *J. Muscle Res. Cell Motil.* – 2004. – V.25. – P.657–665.
 30. Cohen, D.M., and Murphy, R.A. Differences in cellular contractile protein contents among porcine smooth muscles: evidence for variation in the contractile system.// *J. Gen. Physiol.* – 1978. – V.72. – P.369–380.

31. Cohen, S.N., Chang, A.C., and Hsu, L. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA.// *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1972. – V.69 – P.2110–2114.
32. Collinge, M., Matrisian, P.E., Zimmer, W.E., Shattuck, R.L., Lukas, T.J., Van Eldik, L.J., and Watterson, D.M. Structure and expression of a calcium-binding protein gene contained within a calmodulin-regulated protein kinase gene.// *Mol. Cell. Biol.* – 1992. – V.12. – P.2359–2371.
33. Connolly, M.J., and Aaronson, P.I. Key role of the RhoA/Rho kinase system in pulmonary hypertension.// *Pulm. Pharmacol. Ther.* – 2011. – V.24 – P.1–14.
34. Conti, M.A., and Adelstein, R.S. The relationship between calmodulin binding and phosphorylation of smooth muscle myosin kinase by the catalytic subunit of 3':5' cAMP-dependent protein kinase.// *J. Biol. Chem.* – 1981. – V.256. – P.3178–3181.
35. Craig, R., Smith, R., and Kendrick-Jones, J. Light-chain phosphorylation controls the conformation of vertebrate non-muscle and smooth muscle myosin molecules.// *Nature* – 1983. – V.302. – P.436–439.
36. Delcommenne, M., Tan, C., Gray, V., Rue, L., Woodgett, J., and Dedhar, S. Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B/AKT by the integrin-linked kinase.// *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1998. – V.95 – P.11211–11216.
37. Deng, J.T., Van Lierop, J.E., Sutherland, C., and Walsh, M.P. Ca²⁺-independent smooth muscle contraction. a novel function for integrin-linked kinase.// *J. Biol. Chem.* – 2001. – V.276. – P.16365–16373.
38. Deng, J.T., Sutherland, C., Brautigan, D.L., Eto, M., and Walsh, M.P. Phosphorylation of the myosin phosphatase inhibitors, CPI-17 and PHI-1, by integrin-linked kinase Jing.// *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2002. – V.367 – P.517–524.
39. Dippold, R.P., and Fisher, S.A. Myosin phosphatase isoforms as determinants of smooth muscle contractile function and calcium sensitivity of force production.// *Microcirculation* – 2014. – V.21. – P.239–248.
40. Edelman, A M., Lin, W.H., Osterhout, D.J., Bennett, M.K., Kennedy, M.B., and Krebs, E.G. Phosphorylation of smooth muscle myosin by type II Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase.// *Mol. Cell. Biochem.* – 1990. – V.97. – P.87–98.
41. Ellison, P.A., Sellers, J.R., and Cremo, C.R. Kinetics of smooth muscle heavy meromyosin with one thiophosphorylated head.// *J. Biol. Chem.* – 2000. – V.275. – P.15142–15151.
42. Endo, A., Surks, H.K., Mochizuki, S., Mochizuki, N., and Mendelsohn, M.E. Identification and characterization of zipper-interacting protein kinase as the unique vascular smooth muscle myosin phosphatase-associated kinase.// *J. Biol. Chem.* – 2004. – V.279. – P.42055–42061.
43. Erdödi, F., Kiss, E., Walsh, M.P., Stefansson, B., Deng, J.T., Eto, M., Brautigan, D.L., and Hartshorne, D.J. Phosphorylation of protein phosphatase type-1 inhibitory proteins by integrin-linked kinase and cyclic nucleotide-dependent protein kinases.// *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2003. – V.306. – P.382–387.
44. Espinoza-Fonseca, L.M., Colson, B.A., and Thomas, D.D. Effects of pseudophosphorylation mutants on the structural dynamics of smooth muscle myosin regulatory light chain.// *Mol. Biosyst.* – 2014. – V.10. – P.2693–2698.

45. Eto, M. Regulation of cellular protein phosphatase-1 (PP1) by phosphorylation of the CPI-17 family, C-kinase-activated PP1 inhibitors. //J. Biol. Chem. – 2009. – V.284. – P.35273–35277.
46. Eto, M., Ohmori, T., Suzuki, M., Furuya, K., and Morita, F. A novel protein phosphatase-1 inhibitory protein potentiated by protein kinase C. Isolation from porcine aorta media and characterization.// J. Biochem. – 1995. – V.118. – P.1104–1107.
47. Eto, M., Senba, S., Morita, F., and Yazawa, M. Molecular cloning of a novel phosphorylation-dependent inhibitory protein of protein phosphatase-1 (CPI17) in smooth muscle: its specific localization in smooth muscle.// FEBS Lett. – 1997. – V.410. – P.356–360.
48. Van Eyk, J.E., Arrell, D.K., Foster, D.B., Strauss, J.D., Heinonen, T.Y., Furmaniak-Kazmierczak, E., Côté, G.P., and Mak, A S. Different molecular mechanisms for Rho family GTPase-dependent, Ca^{2+} -independent contraction of smooth muscle.// J. Biol. Chem. – 1998. – V.273. – P.23433–23439.
49. Fabiato, A., and Fabiato, F. Calculator programs for computing the composition of the solutions containing multiple metals and ligands used for experiments in skinned muscle cells.// J. Physiol. (Paris). – 1979. – V.75 – P.463–505.
50. Feng, J., Ito, M., Kureishi, Y., Ichikawa, K., Amano, M., Isaka, N., Okawa, K., Iwamatsu, a, Kaibuchi, K., Hartshorne, D.J., and Nakano, T. Rho-associated kinase of chicken gizzard smooth muscle.// J. Biol. Chem. – 1999a. – V.274 – P.3744–3752.
51. Feng, J., Ito, M., Ichikawa, K., Isaka, N., Nishikawa, M., Hartshorne, D.J., and Nakano, T. Inhibitory phosphorylation site for Rho-associated kinase on smooth muscle myosin phosphatase.// J. Biol. Chem. – 1999b. – V.274 – P.37385–37390.
52. Friedrich, E.B., Clever, Y.P., Wassmann, S., Werner, N., Böhm, M., and Nickenig, G. Role of integrin-linked kinase in vascular smooth muscle cells: regulation by statins and angiotensin II.// Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2006. – V.349 – P.883–889.
53. Gagelmann, M., and Güth, K. Force generated by non-cycling crossbridges at low ionic strength in skinned smooth muscle from *Taenia coli*.// Pflugers Arch. – 1985. – V.403. – P.210–214.
54. Gallagher, P.J., and Herring, B.P. The carboxyl terminus of the smooth muscle myosin light chain kinase is expressed as an independent protein, telokin.// J. Biol. Chem. – 1991. – V.266. – P.23945–23952.
55. Gallagher, P.J., Garcia, J.G., and Herring, B.P. Expression of a novel myosin light chain kinase in embryonic tissues and cultured cells.// J. Biol. Chem. – 1995. – V.270. – P.29090–29095.
56. Gallagher, P.J., Herring, B.P., and Stull, J.T. Myosin light chain kinases.// J. Muscle Res. Cell Motil. – 1997. – V.18. – P.1–16.
57. Geeves, M.A., and Holmes, K.C. The molecular mechanism of muscle contraction.// Adv. Protein Chem. – 2005. – V.71. – P.161–193.
58. Ghatak, S., Morgner, J., and Wickström, S.A. ILK: a pseudokinase with a unique function in the integrin-actin linkage.// Biochem. Soc. Trans. – 2013. – V.41. – P.995–1001.
59. Goeckeler, Z.M., Masaracchia, R.A., Zeng, Q., Chew, T.L., Gallagher, P., and Wysolmerski, R.B. Phosphorylation of myosin light chain kinase by p21-activated kinase PAK2.// J. Biol. Chem. – 2000. – V.275 – P.18366–18374.

60. Grassie, M.E., Sutherland, C., Ulke-Lemée, A., Chappellaz, M., Kiss, E., Walsh, M.P., and MacDonald, J.A. Cross-talk between Rho-associated kinase and cyclic nucleotide-dependent kinase signaling pathways in the regulation of smooth muscle myosin light chain phosphatase.// *J. Biol. Chem.* – 2012. – V.287. – P.36356–36369.
61. Graves, P.R., Winkfield, K.M., and Haystead, T.A J. Regulation of zipper-interacting protein kinase activity in vitro and in vivo by multisite phosphorylation.// *J. Biol. Chem.* – 2005. – V. 280. – P.9363–9374.
62. Hagerty, L., Weitzel, D.H., Chambers, J., Fortner, C.N., Brush, M.H., Loiselle, D., Hosoya, H., and Haystead, T. A J. ROCK1 phosphorylates and activates zipper-interacting protein kinase.// *J. Biol. Chem.* – 2007. – V.282. – P.4884–4893.
63. Hanks, S.K., Quinn, A.M., and Hunter, T. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains.// *Science* – 1988. – V.241 – P.42–52.
64. Hannigan, G.E., Leung-Hagesteijn, C., Fitz-Gibbon, L., Coppolino, M.G., Radeva, G., Filmus, J., Bell, J.C., and Dedhar, S. Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase. // *Nature* – 1996. – V.379. – P.91-96
65. Hannigan, G.E., McDonald, P.C., Walsh, M.P., and Dedhar, S. Integrin-linked kinase: not so “pseudo” after all.// *Oncogene* – 2011. – V.30. – P.4375–4385.
66. Harada, T., Seto, M., Sasaki, Y., London, S., Luo, Z., and Mayberg, M. The time course of myosin light-chain phosphorylation in blood-induced vasospasm.// *Neurosurgery* – 1995. – V.36. – P.1178–1183.
67. Hartshorne, D.J., Ito, M., and Erdödi, F. Myosin light chain phosphatase: subunit composition, interactions and regulation.// *J. Muscle Res. Cell Motil.* – 1998. – V.19. – P.325–341.
68. Hartshorne, D.J., Ito, M., and Erdödi, F. Role of protein phosphatase type 1 in contractile functions: myosin phosphatase.// *J. Biol. Chem.* – 2004. – V.279. – P.37211–37214.
69. Hashimoto, Y., and Soderling, T.R. Phosphorylation of smooth muscle myosin light chain kinase by Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II: comparative study of the phosphorylation sites.// *Arch. Biochem. Biophys.* – 1990. – V.278. – P.41–45.
70. He, W.-Q., Peng, Y.J., Zhang, W.C., Lv N, Tang, J., Chen, C., Zhang, C.H., Gao, S., Chen, H.Q., Zhi, G., Feil, R., Kamm, K.E., Stull, J.T., Gao, X., Zhu, M.S. Myosin light chain kinase is central to smooth muscle contraction and required for gastrointestinal motility in mice.// *Gastroenterology* – 2008. – V.135. – P.610–620.
71. Herring, B.P., and Smith, A.F. Telokin expression is mediated by a smooth muscle cell-specific promoter.// *Am. J. Physiol.* – 1996. – V.270. – P.C1656–C1665.
72. Herring, B.P., Dixon, S., and Gallagher, P.J. Smooth muscle myosin light chain kinase expression in cardiac and skeletal muscle.// *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2000. – V.279. – P.C1656–C1664.
73. Herring, B.P., El-Mounayri, O., Gallagher, P.J., Yin, F., and Zhou, J. Regulation of myosin light chain kinase and telokin expression in smooth muscle tissues.// *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2006. – V.291. – P.C817–C827.
74. Hirano, K., Phan, B.C., and Hartshorne, D.J. Interactions of the subunits of smooth muscle myosin phosphatase.// *J. Biol. Chem.* – 1997. – V.272 – P.3683–3688.
75. Ho, B., Hou, G., Pickering, J.G., Hannigan, G., Langille, B.L., and Bendeck, M.P. Integrin-linked kinase in the vascular smooth muscle cell response to injury.// *Am. J. Pathol.* – 2008. – V.173. – P.278–288.

76. Holden, H.M., Ito, M., Hartshorne, D.J., and Rayment, I. X-ray structure determination of telokin, the C-terminal domain of myosin light chain kinase, at 2.8 Å resolution.// *J. Mol. Biol.* – 1992. – V.227. – P.840–851.
77. Hong, F., Haldeman, B.D., Jackson, D., Carter, M., and Baker, J.E. Biochemistry of Smooth Muscle Myosin Light Chain Kinase.// *Arch Biochem Biophys* – 2011. – V.510. – P.135–146.
78. Huang, J., Mahavadi, S., Sriwai, W., Hu, W., and Murthy, K.S. Gi-coupled receptors mediate phosphorylation of CPI-17 and MLC20 via preferential activation of the PI3K/ILK pathway.// *Biochem. J.* – 2006. – V.396. – P.193–200.
79. Ihara, E., and Macdonald, J.A. The regulation of smooth muscle contractility by zipper-interacting protein kinase 1.// *Can. J. Physiol. Pharmacol.* – 2007. – V.87. – P.79–87.
80. Ihara, E., Moffat, L., Ostrander, J., Walsh, M.P., and MacDonald, J.A Characterization of protein kinase pathways responsible for Ca²⁺ sensitization in rat ileal longitudinal smooth muscle.// *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2007. – V.293. – P.G699–G710.
81. Ikebe, M., and Hartshorne, D.J. Phosphorylation of smooth muscle myosin at two distinct sites by myosin light chain kinase.// *J. Biol. Chem.* – 1985. – V.260. – P.10027–10031.
82. Ikebe, M., Stepinska, M., Kemp, B.E., Means, A.R., and Hartshorne, D.J. Proteolysis of smooth muscle myosin light chain kinase. Formation of inactive and calmodulin-independent fragments.// *J. Biol. Chem.* – 1987. – V.262. – P.13828–13834.
83. Ikebe, M., Maruta, S., and Reardon, S. Location of the inhibitory region of smooth muscle myosin light chain kinase.// *J. Biol. Chem.* – 1989. – V.264 – P.6967–6971.
84. Ishihara, H., Ozaki, H., Sato, K., Hori, M., Karaki, H., Watabe, S., Kato, Y., Fusetani, N., Hashimoto, K., and Uemura, D. Calcium-independent activation of contractile apparatus in smooth muscle by calyculin-A.// *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 1989. – V.250. – P.388–396.
85. Ito, M., Dabrowskag, R., Guerriero, V., and Hartshornes, D.J. Identification in Turkey Gizzard of an Acidic Protein Related to the C-terminal Portion of Smooth Muscle Myosin Light Chain Kinase.// *J. Biol. Chem.* – 1989. – V.264. – P.13971–13974.
86. Ito, M., Nakano, T., Erdodi, F., and Hartshorne, D.J. Myosin phosphatase: structure, regulation and function.// *Mol. Cell. Biochem.* – 2004. – V.259. – P.197–209.
87. Jin, Y., Blue, E.K., Dixon, S., Hou, L., Wysolmerski, R.B., and Gallagher, P.J. Identification of a new form of death-associated protein kinase that promotes cell survival.// *J. Biol. Chem.* – 2001. – V.276. – P.39667–39678.
88. Johnson, D., Cohen, P., Chen, M.X., Chen, Y.H., and Cohen, P.T. Identification of the regions on the M110 subunit of protein phosphatase 1M that interact with the M21 subunit and with myosin.// *Eur. J. Biochem.* – 1997. – V.244. – P.931–939.
89. Kamm, K.E., and Stull, J.T. Dedicated myosin light chain kinases with diverse cellular functions.// *J. Biol. Chem.* – 2001. – V.276. – P.4527–4530.
90. Katsumata, N., Shimokawa, H., Seto, M., Kozai, T., Yamawaki, T., Kuwata, K., Egashira, K., Ikegaki, I., Asano, T., Sasaki, Y., and Takeshita, A. Enhanced myosin light chain phosphorylations as a central mechanism for coronary artery spasm in a swine model with interleukin-1beta.// *Circulation* – 1997. – V.96 – P.4357–4363.
91. Kawai, T., Matsumoto, M., Takeda, K., Sanjo, H., and Akira, S. ZIP kinase, a novel serine/threonine kinase which mediates apoptosis.// *Mol. Cell. Biol.* – 1998. – V.18 – P.1642–1651.

92. Khapchaev, A Y., Krymsky, M.A, Sidorova, M. V, Beshpalova, Z.D., Wang, C.-L. A, Shirinsky, V.P., and Vorotnikov, A.V. Novel phosphospecific antibodies for monitoring phosphorylation of proteins encoded by the myosin light chain kinase genetic locus.// *Biochemistry (Mosc.)* – 2004. – V.69. – P.789–798.
93. Khromov, A., Choudhury, N., Stevenson, A.S., Somlyo, A. V, and Eto, M. Phosphorylation-dependent autoinhibition of myosin light chain phosphatase accounts for Ca^{2+} sensitization force of smooth muscle contraction. // *J. Biol. Chem.* – 2009. – V.284 – P.21569–21579.
94. Khromov, A.S., Wang, H., Choudhury, N., McDuffie, M., Herring, B.P., Nakamoto, R., Owens, G.K., Somlyo, A.P., and Somlyo, A.V. Smooth muscle of telokin-deficient mice exhibits increased sensitivity to Ca^{2+} and decreased cGMP-induced relaxation.// *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2006. – V.103. – P.2440–2445.
95. Khromov, A.S., Momotani, K., Jin, L., Artamonov, M. V, Shannon, J., Eto, M., and Somlyo, A. V Molecular mechanism of telokin-mediated disinhibition of myosin light chain phosphatase and cAMP/cGMP-induced relaxation of gastrointestinal smooth muscle.// *J. Biol. Chem.* – 2012. – V.287. – P.20975–20985.
96. Kim, H.R., Appel, S., Vetterkind, S., Gangopadhyay, S.S., and Morgan, K.G. Smooth muscle signalling pathways in health and disease.// *J. Cell. Mol. Med.* – 2008. – V.12. – P.2165–2180.
97. Kim, I., Je, H.D., Gallant, C., Zhan, Q., Riper, D. V, Badwey, J.A., Singer, H.A., and Morgan, K.G. Ca^{2+} -calmodulin-dependent protein kinase II-dependent activation of contractility in ferret aorta.// *J. Physiol.* – 2000. – V.526 –Pt 2 – P.367–374.
98. Kim, N., Cao, W., Song, I.S., Kim, C.Y., Harnett, K.M., Cheng, L., Walsh, M.P., and Biancani, P. Distinct kinases are involved in contraction of cat esophageal and lower esophageal sphincter smooth muscles. // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2004. – V.287 – P.C384–C394.
99. Kiss, E., Murany, A., Csontos, C., Gergely, P., Ito, M., Hartshorne, D.J., and Erdodi, F. Integrin-linked kinase phosphorylates the myosin phosphatase target subunit at the inhibitory site in platelet cytoskeleton.// *Biochem. J.* – 2002. – V.87 – P.79–87.
100. Koga, Y., and Ikebe, M. p116Rip decreases myosin II phosphorylation by activating myosin light chain phosphatase and by inactivating RhoA.// *J. Biol. Chem.* – 2005. – V.280. – P.4983–4991.
101. Kögel, D., Plöttner, O., Landsberg, G., Christian, S., and Scheidtmann, K.H. Cloning and characterization of Dlk, a novel serine/threonine kinase that is tightly associated with chromatin and phosphorylates core histones.// *Oncogene* – 1998. – V.17. – P.2645–2654.
102. Komatsu, S., and Hosoya, H. Phosphorylation by MAPKAP kinase 2 activates $\text{Mg}(2+)$ -ATPase activity of myosin II.// *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1996. – V.223. – P.741–745.
103. Kossmann, T., Fürst, D., and Small, J. V Structural and biochemical analysis of skinned smooth muscle preparations.// *J. Muscle Res. Cell Motil.* – 1987. – V.8. – P.135–144.
104. Koyama, M., Ito, M., Feng, J., Seko, T., Shiraki, K., Takase, K., Hartshorne, D.J., and Nakano, T. Phosphorylation of CPI-17, an inhibitory phosphoprotein of smooth muscle myosin phosphatase, by Rho-kinase.// *FEBS Lett.* – 2000. – V.475. – P.197–200.

105. Krymsky, M. A., Kudryashov, D.S., Shirinsky, V.P., Lukas, T.J., Watterson, D.M., and Vorotnikov, A.V. Phosphorylation of kinase-related protein (telokin) in tonic and phasic smooth muscles.// *J. Muscle Res. Cell Motil.* – 2001. – V.22. – P.425–437.
106. Kudryashov, D.S., Chibalina, M. V, Birukov, K.G., Lukas, T.J., Sellers, J.R., Van Eldik, L.J., Watterson, D.M., and Shirinsky, V.P. Unique sequence of a high molecular weight myosin light chain kinase is involved in interaction with actin cytoskeleton.// *FEBS Lett.* – 1999. – V.463. – P.67–71.
107. Kumar, A.S., Naruszewicz, I., Wang, P., Leung-Hagesteijn, C., and Hannigan, G.E. ILKAP regulates ILK signaling and inhibits anchorage-independent growth.// *Oncogene* – 2004. – V.23. – P.3454–3461.
108. Kureishi, Y., Kobayashi, S., Amano, M., Kimura, K., Kanaide, H., Nakano, T., Kaibuchi, K., and Ito, M. Rho-associated kinase directly induces smooth muscle contraction through myosin light chain phosphorylation.// *J. Biol. Chem.* – 1997. – V.272. – P.12257–12260.
109. Kureishi, Y., Ito, M., Feng, J., Okinaka, T., Isaka, N., and Nakano, T. Regulation of Ca²⁺-independent smooth muscle contraction by alternative staurosporine-sensitive kinase.// *Eur. J. Pharmacol.* – 1999. – V.376 – P.315–320.
110. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.// *Nature* – 1970. – V.227. – P.680–685.
111. De Lanerolle, P., Nishikawa, M., Yost, D.A., and Adelstein, R.S. Increased phosphorylation of myosin light chain kinase after an increase in cyclic AMP in intact smooth muscle.// *Science* – 1984. – V.223. – P.1415–1417.
112. Lee, D.L., Webb, R.C., and Jin, L. Hypertension and RhoA/Rho-kinase signaling in the vasculature: highlights from the recent literature.// *Hypertension* – 2004. – V.44 – P.796–799.
113. Legate, K.R., Montañez, E., Kudlacek, O., and Fässler, R. ILK, PINCH and parvin: the tIPP of integrin signalling.// *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2006. – V.7. – P.20–31.
114. Leung, T., Chen, X.Q., Tan, I., Manser, E., and Lim, L. Myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase acts as a Cdc42 effector in promoting cytoskeletal reorganization.// *Mol. Cell. Biol.* – 1998. – V.18. – P.130–140.
115. Leung-hagesteijn, C., Mahendra, A., Naruszewicz, I., and Hannigan, G.E.. Modulation of integrin signal transduction by ILKAP , a protein phosphatase 2C associating with the integrin-linked kinase, ILK1.//*EMBO J.* – 2001 – V.20. – No.9 – P.2160-2170
116. Lincoln, T. cGMP-dependent protein kinase.// *In Met. Enz. Academic Press, Inc.,* –1983. – 99. – P. 62–72.
117. Lincoln, T.M., Dey, N., Sellak, H., Thomas, M., and Invited, H.S. Invited Review: cGMP-dependent protein kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression.// *J Appl Physiol* – 2001. – V. 91. – P.1421–1430.
118. Liu, J., Wendt, T., Taylor, D., and Taylor, K. Refined model of the 10S conformation of smooth muscle myosin by cryo-electron microscopy 3D image reconstruction. // *J. Mol. Biol.* – 2003. – V.329. – P.963–972.
119. Lynch, D.K., Ellis, C.A., Edwards, P.A., and Hiles, I.D. Integrin-linked kinase regulates phosphorylation of serine 473 of protein kinase B by an indirect mechanism.// *Oncogene* – 1999. – V.18. – P.8024–8032.

120. MacDonald, J. A, Borman, M. A, Murányi, A, Somlyo, A V, Hartshorne, D.J., and Haystead, T. A Identification of the endogenous smooth muscle myosin phosphatase-associated kinase.// *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2001a. – V.98. – P.2419–2424.
121. MacDonald, J. A, Eto, M., Borman, M. A, Brautigan, D.L., and Haystead, T. A Dual Ser and Thr phosphorylation of CPI-17, an inhibitor of myosin phosphatase, by MYPT-associated kinase.// *FEBS Lett.* – 2001b. – V.493. – P.91–94.
122. MacDonald, J.A., Walker, L.A., Nakamoto, R.K., Gorenne, I., Somlyo, A. V, Somlyo, A.P., and Haystead, T.A.J. Phosphorylation of telokin by cyclic nucleotide kinases and the identification of in vivo phosphorylation sites in smooth muscle.// *FEBS Lett* – 2000. – V.479. – P.83–88.
123. Madden, J. A, Dantuma, M.W., Sorokina, E. A, Weihrauch, D., and Kleinman, J.G. Telokin expression and the effect of hypoxia on its phosphorylation status in smooth muscle cells from small and large pulmonary arteries.// *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* – 2008. – V.294. – P.L1166–L1173.
124. Mahavadi, S., Nalli, A., Al-Shboul, O., and Murthy, K.S. Inhibition of MLC20 phosphorylation downstream of Ca^{2+} and RhoA: A novel mechanism involving phosphorylation of myosin phosphatase interacting protein (M-RIP) by PKG and stimulation of MLC phosphatase activity. // *Cell Biochem. Biophys.* – 2014. – V.68. – P.1–8.
125. Masato, T., Numata, T., Katoh, T., Morita, F., and Yazawa, M. Crosslinking of Telokin to Chicken Gizzard Smooth Muscle Myosin// *J. Biochem.* – 1997. – V.121. – P.225–230.
126. Maydan, M., McDonald, P.C., Sanghera, J., Yan, J., Rallis, C., Pinchin, S., Hannigan, G.E., Foster, L.J., Ish-Horowicz, D., Walsh, M.P., and Dedhar, S. Integrin-linked kinase is a functional Mn^{2+} -dependent protein kinase that regulates glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) phosphorylation.// *PLoS One* – 2010. – V.5. – P.e12356.
127. McDonald, P.C., Fielding, A.B., and Dedhar, S. Integrin-linked kinase--essential roles in physiology and cancer biology.// *J. Cell Sci.* – 2008. – V.121. – P.3121–3132.
128. Meisheri, K.D., and Ruegg, J.C.. Pflugers Archiv Dependence of cyclic-AMP induced relaxation on Ca^{2+} and calmodulin in skinned smooth muscle of guinea pig *Taenia coli*.// *Pflugers Arch.* – 1983 – V.399. – P.315–320.
129. Meisheri, K.D., Ruegg, J.C., and Paul, R.J. Studies on Skinned Fiber Preparations. In *Calcium and Contractility*.// A.K. Grover, and E.E. Daniel. – Totowa, NJ: Humana Press – 1985. – P.191–224.
130. Meisheri, K.D., Zeugner, C., and Rüegg, J.C. Ca^{2+} -cyclic AMP interaction in chemically skinned smooth muscle.// *Eur. J. Pharmacol.* – 1986. – V.129. – P.405–409.
131. Melchior, C., Kreis, S., Janji, B., and Kieffer, N. Promoter characterization and genomic organization of the gene encoding.// *Biochem. Biophys. Acta* – 2002. – V. 575. – P.117–122.
132. Miller, J.R., Silver, P.J., and Stull, J.T. The role of myosin light chain kinase phosphorylation in beta-adrenergic relaxation of tracheal smooth muscle.// *Mol. Pharmacol.* – 1983. – V.24. – P.235–242.
133. Miwa, K., Fujita, M., and Sasayama, S. Recent insights into the mechanisms, predisposing factors, and racial differences of coronary vasospasm. // *Heart Vessels* – 2005. – V.20. – P.1–7.

134. Moffat, L.D., Brown, S.B.A., Grassie, M.E., Ulke-Lemée, A., Williamson, L.M., Walsh, M.P., and MacDonald, J.A. Chemical genetics of zipper-interacting protein kinase reveal myosin light chain as a bona fide substrate in permeabilized arterial smooth muscle.// *J. Biol. Chem.* – 2011. – V.286. – P.36978–36991.
135. Morgado, M., Cairrão, E., Santos-Silva, A.J., and Verde, I. Cyclic nucleotide-dependent relaxation pathways in vascular smooth muscle. // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2012. – V.69. – P.247–266.
136. Mori, S., Iwaoka, R., Eto, M., and Ohki, S. Solution structure of the inhibitory phosphorylation domain of myosin phosphatase targeting subunit 1.// *Proteins* – 2009. – V.77. – P.732–735.
137. Mrwa, U., Achtig, I., and Ruegg, J.C. Influences of calcium concentration and pH on the tension development and ATPase activity of the arterial actomyosin contractile system.// *Blood Vessels* – 1974. – V.11 – P.277–286.
138. Mrwa, U., Troschka, M., and Rüegg, J.C. Cyclic AMP-dependent inhibition of smooth muscle actomyosin.// *FEBS Lett.* – 1979. – V.107. – P.371–374.
139. Murányi, A., MacDonald, J.A., Deng, J.T., Wilson, D.P., Haystead, T.A.J., Walsh, M.P., Erdodi, F., Kiss, E., Wu, Y., and Hartshorne, D.J. Phosphorylation of the myosin phosphatase target subunit by integrin-linked kinase. // *Biochem. J.* – 2002. – V.366, – P.211–216.
140. Murányi, A., Derkach, D., Erdodi, F., Kiss, A., Ito, M., and Hartshorne, D.J. Phosphorylation of Thr695 and Thr850 on the myosin phosphatase target subunit: inhibitory effects and occurrence in A7r5 cells.// *FEBS Lett.* – 2005. – V.579. – P.6611–6615.
141. Murata-Hori, M., Fumoto, K., Fukuta, Y., Iwasaki, T., Kikuchi, A., Tatsuka, M., and Hosoya, H. Myosin II regulatory light chain as a novel substrate for AIM-1, an aurora/Ipl1p-related kinase from rat.// *J. Biochem.* – 2000. – V.128. – P.903–907.
142. Murata-Hori, M., Fukuta, Y., Ueda, K., Iwasaki, T., and Hosoya, H. HeLa ZIP kinase induces diphosphorylation of myosin II regulatory light chain and reorganization of actin filaments in nonmuscle cells.// *Oncogene* – 2001. – V.20. – P.8175–8183.
143. Murthy, K.S. Signaling for contraction and relaxation in smooth muscle of the gut.// *Annu. Rev. Physiol.* – 2006. – V.68. – P.345–374.
144. Nehru, V., Almeida, F.N., and Aspenström, P. Interaction of RhoD and ZIP kinase modulates actin filament assembly and focal adhesion dynamics.// *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2013. – V.433. – P.163–169.
145. Nepl, R.L., Lubomirov, L.T., Momotani, K., Pfitzer, G., Eto, M., and Somlyo, A. V Thromboxane A2-induced bi-directional regulation of cerebral arterial tone.// *J. Biol. Chem.* – 2009. – V.284. – P.6348–6360.
146. Ni, S., Hong, F., Haldeman, B.D., Baker, J.E., Facemyer, K.C., and Cremo, C.R. Modification of interface between regulatory and essential light chains hampers phosphorylation-dependent activation of smooth muscle myosin. // *J. Biol. Chem.* – 2012. – V. 287. – P.22068–22079.
147. Nieznanski, K., and Sobieszek, A. Telokin (kinase-related protein) modulates the oligomeric state of smooth-muscle myosin light-chain kinase and its interaction with myosin filaments.// *Biochem. J.* – 1997. – V.322 – Pt.1. – P.65–71.

148. Niiro, N., and Ikebe, M. Zipper-interacting protein kinase induces Ca^{2+} -free smooth muscle contraction via myosin light chain phosphorylation.// *J. Biol. Chem.* – 2001. – V.276. – P.29567–29574.
149. Nishikawa, M., de Lanerolle, P., Lincoln, T.M., and Adelstein, R.S. Phosphorylation of mammalian myosin light chain kinases by the catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase and by cyclic GMP-dependent protein kinase.// *J. Biol. Chem.* – 1984. – V.259. – P.8429–8436.
150. Nishikawa, M., Shirakawa, S., and Adelstein, R.S. Phosphorylation of smooth muscle myosin light chain kinase by protein kinase C. Comparative study of the phosphorylated sites.// *J. Biol. Chem.* – 1985. – V.260. – P.8978–8983.
151. Nishimura, J., Moreland, S., Ahn, H.Y., Kawase, T., Moreland, R.S., and van Breemen, C. Endothelin increases myofilament Ca^{2+} sensitivity in alpha-toxin-permeabilized rabbit mesenteric artery.// *Circ. Res.* – 1992. – V.71. – P.951–959.
152. Numata, T., Katoh, T., and Yazawa, M. Functional role of the C-terminal domain of smooth muscle myosin light chain kinase on the phosphorylation of smooth muscle myosin.// *J. Biochem.* – 2001. – V.129. – P.437–444.
153. Obara, K., Takai, A., Ruegg, J.C., and de Lanerolle, P. Okadaic acid, a phosphatase inhibitor, produces a Ca^{2+} and calmodulin-independent contraction of smooth muscle.// *Pflugers Arch.* – 1989. – V.414. – P.134–138.
154. Obara, K., Nishizawa, S., Koide, M., Nozawa, K., Mitate, A., Ishikawa, T., and Nakayama, K. Interactive role of protein kinase C-delta with rho-kinase in the development of cerebral vasospasm in a canine two-hemorrhage model.// *J. Vasc. Res.* – 2005. – V.42. – P.67–76.
155. Ogut, O., and Brozovich, F. V The potential role of MLC phosphatase and MAPK signalling in the pathogenesis of vascular dysfunction in heart failure. // *J. Cell. Mol. Med.* – 2008. – V.12. – P.2158–2164.
156. Okagaki, T., Nakamura, a, Suzuki, T., Ohmi, K., and Kohama, K. Assembly of smooth muscle myosin by the 38k protein, a homologue of a subunit of pre-mRNA splicing factor-2.// *J. Cell Biol.* – 2000. – V.148. – P.653–663.
157. Olson, N.J., Pearson, R.B., Needleman, D.S., Hurwitz, M.Y., Kemp, B.E., and Means, a R. Regulatory and structural motifs of chicken gizzard myosin light chain kinase.// *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1990. – V.87 – P.2284–2288.
158. Ozaki, H., Hori, M., Kinoshita, K., and Ohama, T. Intestinal dysmotility in inflammatory bowel disease: mechanisms of the reduced activity of smooth muscle contraction.// *Inflammopharmacology* – 2005. – V.13 – P.103–111.
159. Pasquali, C., Bertschy-Meier, D., Chabert, C., Curchod, M.-L., Arod, C., Booth, R., Mechtler, K., Vilbois, F., Xenarios, I., Ferguson, C.G., Prestwich, G.D., Camps, M., and Rommel, C. A chemical proteomics approach to phosphatidylinositol 3-kinase signaling in macrophages.// *Mol. Cell. Proteomics* – 2007. – V.6. – P.1829–1841.
160. Pearson, R.B., Jakes, R., John, M., Kendrick-Jones, J., and Kemp, B.E. Phosphorylation site sequence of smooth muscle myosin light chain ($M_r = 20\ 000$). // *FEBS Lett.* – 1984. – V.168. – P.108–112.
161. Persechini, A, and Hartshorne, D.J. Phosphorylation of smooth muscle myosin: evidence for cooperativity between the myosin heads.// *Science* – 1981. – V.213. – P.1383–1385.

162. Persechini, A, and Hartshorne, D.J. Ordered phosphorylation of the two 20 000 molecular weight light chains of smooth muscle myosin.// *Biochemistry* – 1983. – V.22. – P.470–476.
163. Persechini, A., Kamm, K.E., and Stull, J.T. Different phosphorylated forms of myosin in contracting tracheal smooth muscle.// *J. Biol. Chem.* – 1986. – V.261. – P.6293–6299.
164. Peterson, J.W. Rate-limiting steps in the tension development of freeze-glycerinated vascular smooth muscle.// *J. Gen. Physiol.* – 1982. – V.79. – P.437–452.
165. Pfitzer, G. Permeabilized Smooth Muscle. In *Biochemistry of Smooth Muscle Contraction*// M. Barany – Academic Press: San Diego – 1995. – P.191–199.
166. Pfitzer, G. Regulation of myosin phosphorylation in smooth muscle.// *J Appl Physiol* – 2001. – V.91. – P.497–503.
167. Pfitzer, G., Hofmann, F., DiSalvo, J., and Rüegg, J.C. cGMP and cAMP inhibit tension development in skinned coronary arteries.// *Pflugers Arch.* – 1984. – V.401 – P.277–280.
168. Pfitzer, G., Merkel, L., Rüegg, J.C., and Hofmann, F. Cyclic GMP-dependent protein kinase relaxes skinned fibers from guinea pig taenia coli but not from chicken gizzard.// *Pflugers Arch.* – 1986. – V.407. – P.87–91.
169. Pfitzer, G., Sonntag-bensch, D., and Brkic-koric, D. Thiophosphorylation-induced Ca^{2+} sensitization of guinea-pig ileum contractility is not mediated by Rho-associated kinase. // *J. Physiol.* – 2001. – V.553. – P.651–664.
170. Pinheiro, A.S., Marsh, J.A., Forman-Kay, J.D., and Peti, W. Structural signature of the MYPT1-PP1 interaction.// *J. Am. Chem. Soc.* – 2011. – V.133. – P.73–80.
171. Puetz, S., Lubomirov, L.T., and Pfitzer, G. Regulation of smooth muscle contraction by small GTPases.// *Physiology (Bethesda).* – 2009. – V.24 – P.342–356.
172. Puetz, S., Lubomirov, L.T., Neulen, A., Chang, Z., Solzin, J., Aumailley, M., Somlyo, A., and Pfitzer, G. Signalling events involved in cyclic nucleotide mediated relaxation of murine gastric fundus.// *Acta Physiol.* – 2010 – P.198.
173. Ratz, P.H. ROK controls urethral tone, but by what mechanism? // *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* – 2011. – V.300. – P.F71–F72.
174. Reho, J.J., Zheng, X., and Fisher, S.A. Smooth muscle contractile diversity in the control of regional circulations.// *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2014. – V.306. – P.H163–H172.
175. Riddick, N., Ohtani, K.-I., and Surks, H.K. Targeting by myosin phosphatase-RhoA interacting protein mediates RhoA/ROCK regulation of myosin phosphatase.// *J. Cell. Biochem.* – 2008. – V.103 – P.1158–1170.
176. Van Riper, D.A., Weaver, B.A., Stull, J.T., and Rembold, C.M. Myosin light chain kinase phosphorylation in swine carotid artery contraction and relaxation. // *Am. J. Physiol.* – 1995. – V.268. – P.H2466–H2475.
177. Rovner, A.S., Fagnant, P.M., and Trybus, K.M. Phosphorylation of a single head of smooth muscle myosin activates the whole molecule. *Biochemistry* – 2006. – V.45. – P.5280–5289.
178. Rüegg, J.C., and Paul, R.J. Vascular smooth muscle. Calmodulin and cyclic AMP-dependent protein kinase after calcium sensitivity in porcine carotid skinned fibers.// *Circ. Res.* – 1982. – V.50 – P.394–399.
179. Sanders, L.C., Matsumura, F., Bokoch, G.M., and de Lanerolle, P. Inhibition of myosin light chain kinase by p21-activated kinase. // *Science* – 1999. – V.283. – P.2083–2085.

180. Sato, N., Kamada, N., Muromoto, R., Kawai, T., Sugiyama, K., Watanabe, T., Imoto, S., Sekine, Y., Ohbayashi, N., Ishida, M., Akira, S., and Matsuda, T. Phosphorylation of threonine-265 in Zipper-interacting protein kinase plays an important role in its activity and is induced by IL-6 family cytokines. // *Immunol. Lett.* – 2006. – V.103. – P.127–134.
181. Schaffner, W., and Weissmann, C. A rapid, sensitive, and specific method for the determination of protein in dilute solution.// *Anal. Biochem.* – 1973. – V.56. – P.502–514.
182. Sellers, J.R. Regulation of cytoplasmic and smooth muscle myosin.// *Curr. Opin. Cell Biol.* – 1991. – V.3. – P.98–104.
183. Sellers, J.R., Pato, M.D., and Adelstein, R.S. Reversible phosphorylation of smooth muscle myosin, heavy meromyosin, and platelet myosin.// *J. Biol. Chem.* – 1981. – V.256. – P.13137–13142.
184. Seto, M., Yano, K., Sasaki, Y., and Azuma, H. Intimal hyperplasia enhances myosin phosphorylation in rabbit carotid artery.// *Exp. Mol. Pathol.* – 1993. – V.58. – P.1–13.
185. Shani, G., Marash, L., Gozuacik, D., Bialik, S., Teitelbaum, L., Shohat, G., and Kimchi, A. Death-Associated Protein Kinase Phosphorylates ZIP Kinase , Forming a Unique Kinase Hierarchy To Activate Its Cell Death Functions.// *Mol. Cell. Biol.* – 2004. – V.24. – P.19 8611–8626.
186. Shimizu, H., Ito, M., Miyahara, M., Ichikawa, K., Okubo, S., Konishi, T., Naka, M., Tanaka, T., Hirano, K., and Hartshorne, D.J. Characterization of the myosin-binding subunit of smooth muscle myosin phosphatase.// *J. Biol. Chem.* – 1994. – V.269. – P.30407–30411.
187. Shin, H.-M., Je, H.-D., Gallant, C., Tao, T.C., Hartshorne, D.J., Ito, M., and Morgan, K.G. Differential association and localization of myosin phosphatase subunits during agonist-induced signal transduction in smooth muscle.// *Circ. Res.* – 2002. – V.90. – P.546–553.
188. Shirazi, A., Iizuka, K., Fadden, P., Mosse, C., Somlyo, A.P., Somlyo, A. V, and Haystead, T.A. Purification and characterization of the mammalian myosin light chain phosphatase holoenzyme. The differential effects of the holoenzyme and its subunits on smooth muscle.// *J. Biol. Chem.* – 1994. – V.269. – P.31598–31606.
189. Shirinsky, V.P., Vorotnikov, A. V., Birukov, K.G., Nanaev, A. K., Collinge, M., Lukas, T.J., Sellers, J.R., and Watterson, D.M. A kinase-related protein stabilizes unphosphorylated smooth muscle myosin minifilaments in the presence of ATP.// *J. Biol. Chem.* – 1993. – V.268. – P.16578–16583.
190. Silver, D.L., Vorotnikov, A.V, Watterson, D.M., Shirinsky, V.P., and Sellers, J.R. Sites of interaction between kinase-related protein and smooth muscle myosin.// *J. Biol. Chem.* – 1997. – V.272. – P.25353–25359.
191. Sobieszek, A., Andruchov, O., and Nieznanski, K. Kinase-related protein (telokin) is phosphorylated by smooth-muscle myosin light-chain kinase and modulates the kinase activity.// *Biochem. J.* – 1997. – V.32B. – P.425–430.
192. Sobieszek, A., Andruchov, O.Y., Grabarek, Z., Kulikova, N., Liebetrau, C., and Matusovsky, O.S. Modulation of myosin filament activation by telokin in smooth muscle liberation of myosin kinase and phosphatase from supramolecular complexes.// *Biophys. Chem.* – 2005. – V.113. – P.25–40.

193. Somlyo, A.P., and Somlyo, A. V From pharmacomechanical coupling to G-proteins and myosin phosphatase.// *Acta Physiol. Scand.* – 1998. – V.164. – P.437–448.
194. Somlyo, A.P., and Somlyo, A. V Ca^{2+} Sensitivity of Smooth Muscle and Nonmuscle Myosin II□: Modulated by G Proteins , Kinases , and Myosin Phosphatase.//*Physiol. Rev.* – 2003. – V.83 – P.1325–1358.
195. Sparrow, M.P., Mrwa, U., Hofmann, F., and Rüegg, J.C. Calmodulin is essential for smooth muscle contraction.// *FEBS Lett.* – 1981. – V.125 – P.141–145.
196. Spedding, M. Direct inhibitory effects of some “calcium-antagonists” and trifluoperazine on the contractile proteins in smooth muscle. //*Br. J. Pharmacol.* – 1983. – V.79 – P.225–231.
197. Stull, J.T., Hsu, L.C., Tansey, M.G., and Kamm, K.E. Myosin light chain kinase phosphorylation in tracheal smooth muscle. //*J. Biol. Chem.* – 1990. – V.265. – P.16683–16690.
198. Suizu, F., Ueda, K., Iwasaki, T., Murata-Hori, M., and Hosoya, H. Activation of actin-activated MgATPase activity of myosin II by phosphorylation with MAPK-activated protein kinase-1b (RSK-2).// *J. Biochem.* – 2000. – V.128. – P.435–440.
199. Suizu, F., Fukuta, Y., Ueda, K., Iwasaki, T., Tokumitsu, H., and Hosoya, H. Characterization of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase I as a myosin II regulatory light chain kinase in vitro and in vivo.// *Biochem. J.* – 2002. – V.367. – P.335–345.
200. Surks, H.K., Richards, C.T., and Mendelsohn, M.E.). Myosin phosphatase-Rho interacting protein. A new member of the myosin phosphatase complex that directly binds RhoA.// *J. Biol. Chem.* – 2003 – V.278. – P.51484–51493.
201. Suzuki, A., and Itoh, T. Effects of calyculin A on tension and myosin phosphorylation in skinned smooth muscle of the rabbit mesenteric artery.// *Br. J. Pharmacol.* – 1993. – V.109. – P.703–712.
202. Suzuki, H., Stafford, W.F., Slayters, H.S., and Seidel, J.C. A Conformational Transition in Gizzard Heavy Meromyosin Involving the Head-Tail Junction , Resulting in Changes in Sedimentation Coefficient , ATPase Activity , and Orientation of Heads.//*J. Biol. Cell.* – 1985. – V.260 – P.14810–14817.
203. Sweeney, H.L., and Houdusse, A. Structural and functional insights into the Myosin motor mechanism.// *Annu. Rev. Biophys.* – 2010. – V.39. – P.539–557.
204. Takamoto, N., Komatsu, S., Komaba, S., Niuro, N., and Ikebe, M. Novel ZIP kinase isoform lacks leucine zipper.// *Arch. Biochem. Biophys.* – 2006. – V.456 – P.194–203.
205. Takashima, S. Phosphorylation of myosin regulatory light chain by myosin light chain kinase, and muscle contraction.// *Circ. J.* – 2009. – V.73 – P.208–213.
206. Takeya, K., Wang, X., Sutherland, C., Kathol, I., Loutzenhiser, K., Loutzenhiser, R.D., and Walsh, M.P. The involvement of myosin regulatory light chain diphosphorylation in sustained vasoconstriction under pathophysiological conditions.// *J. Smooth Muscle Res.* – 2014. – V.50. – P.18–28.
207. Tanaka, H., Homma, K., White, H.D., Yanagida, T., and Ikebe, M. Smooth muscle myosin phosphorylated at single head shows sustained mechanical activity.// *J. Biol. Chem.* – 2008. – V.283. – P.15611–15618.
208. Tanaka, J., Ito, M., Feng, J., Ichikawa, K., Hamaguchi, T., Nakamura, M., Hartshorne, D.J., and Nakano, T. Interaction of myosin phosphatase target subunit 1 with the

- catalytic subunit of type 1 protein phosphatase.// *Biochemistry* – 1998. – V.37. – P.16697–16703.
209. Taylor, K.A., Feig, M., Brooks, C.L., Fagnant, P.M., Lowey, S., and Trybus, K.M. Role of the essential light chain in the activation of smooth muscle myosin by regulatory light chain phosphorylation.// *J. Struct. Biol.* – 2014. – V.185. – P.375–382.
 210. Tereshko, V., Teplova, M., Brunzelle, J., Watterson, D.M., and Egli, M. Crystal structures of the catalytic domain of human protein kinase associated with apoptosis and tumor suppression.// *Nat. Struct. Biol.* – 2001. – V.8. – P.899–907.
 211. Terrak, M., Kerff, F., Langsetmo, K., Tao, T., and Dominguez, R. Structural basis of protein phosphatase 1 regulation.// *Nature* – 2004. – V.429. – P.780–784.
 212. Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.// *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1979. – V.76. – P.4350–4354.
 213. Trybus, K.M., Huiatt, T.W., and Lowey, S. A bent monomeric conformation of myosin from smooth muscle.// *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1982. – V.79. – P.6151–6155.
 214. Turner, S.R., and MacDonald, J.A. Novel contributions of the smoothelin-like 1 protein in vascular smooth muscle contraction and its potential involvement in myogenic tone.// *Microcirculation* – 2014. – V.21. – P.249–258.
 215. Usui, T., Okada, M., and Yamawaki, H. Zipper interacting protein kinase (ZIPK): function and signaling.// *Apoptosis* – 2014. – V.19 – P.387–391.
 216. Velasco, G., Armstrong, C., Morrice, N., Frame, S., and Cohen, P. Phosphorylation of the regulatory subunit of smooth muscle protein phosphatase 1M at Thr850 induces its dissociation from myosin.// *FEBS Lett.* – 2002. – V.527. – P.101–104.
 217. Vetterkind, S., and Morgan, K.G. The pro-apoptotic protein Par-4 facilitates vascular contractility by cytoskeletal targeting of ZIPK.// *J. Cell. Mol. Med.* – 2009. – V.13. – P.887–895.
 218. Vetterkind, S., Lee, E., Sundberg, E., Poythress, R.H., Tao, T.C., Preuss, U., and Morgan, K.G. Par-4: a new activator of myosin phosphatase.// *Mol. Biol. Cell* – 2010. – V.21. – P.1214–1224.
 219. Vorotnikov, A. V Kinase-related protein: a smooth muscle myosin-binding protein.// *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 1997. – V.29. – P.727–730.
 220. Vorotnikov, A. V, Krymsky, M.A., and Shirinsky, V.P. Signal transduction and protein phosphorylation in smooth muscle contraction.// *Biochemistry (Mosc.)* – 2002. – V.67. – P.1309–1328.
 221. Vorotnikov, A.V., Silver, D.L., Sellers, J.R., Watterson, D.M., Shirinsky, V.P. Kinase-related protein is phosphorylated both in vitro and in smooth muscle by mitogen-activated and cyclic AMP-dependent protein kinases.// *J. Muscle Res. Cell Motil.* – 1996. – V.17. – P.153a.
 222. Walcott, S., Fagnant, P.M., Trybus, K.M., and Warshaw, D.M. Smooth muscle heavy meromyosin phosphorylated on one of its two heads supports force and motion.// *J. Biol. Chem.* – 2009. – V.284 – P.18244–18251.
 223. Walker, L. A, MacDonald, J. A, Liu, X., Nakamoto, R.K., Haystead, T. A, Somlyo, A.V., and Somlyo, A P. Site-specific phosphorylation and point mutations of telokin modulate its Ca^{2+} -desensitizing effect in smooth muscle.// *J. Biol. Chem.* – 2001. – V.276 – P.24519–24524.

224. Walsh, M.P. Calmodulin and the regulation of smooth muscle contraction.// *Mol. Cell. Biochem.* – 1994. – V.135. – P.21–41.
225. Weber, L.P., Van Lierop, J.E., and Walsh, M.P. Ca^{2+} -independent phosphorylation of myosin in rat caudal artery and chicken gizzard myofilaments.// *J. Physiol.* – 1999. – V.516 – Pt 3– P.805–824.
226. Wendt, T., Taylor, D., Trybus, K.M., and Taylor, K. Three-dimensional image reconstruction of dephosphorylated smooth muscle heavy meromyosin reveals asymmetry in the interaction between myosin heads and placement of subfragment 2.// *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2001. – V.98. – P.4361–4366.
227. Wilson, D.P., Sutherland, C., Borman, M. a, Deng, J.T., Macdonald, J. a, and Walsh, M.P. Integrin-linked kinase is responsible for Ca^{2+} -independent myosin diphosphorylation and contraction of vascular smooth muscle.// *Biochem. J.* – 2005. – V.392. – P.641–648.
228. Wirth, A. Rho kinase and hypertension.// *Biochim. Biophys. Acta* – 2010. – V.1802. – P.1276–1284.
229. Wirth, a, Schroeter, M., Kock-Hauser, C., Manser, E., Chalovich, J.M., De Lanerolle, P., and Pfitzer, G. Inhibition of contraction and myosin light chain phosphorylation in guinea-pig smooth muscle by p21-activated kinase 1.// *J. Physiol.* – 2003. – V.549 – P.489–500.
230. Wooldridge, A. A, MacDonald, J. A, Erdodi, F., Ma, C., Borman, M.A, Hartshorne, D.J., and Haystead, T.A J. Smooth muscle phosphatase is regulated in vivo by exclusion of phosphorylation of threonine 696 of MYPT1 by phosphorylation of Serine 695 in response to cyclic nucleotides.// *J. Biol. Chem.* – 2004 – V.279 – P.34496–34504.
231. Wu, X., Haystead, T.A.J., Nakamoto, R.K., Somlyo, A. V, and Somlyo, A.P. Acceleration of Myosin Light Chain Dephosphorylation and Relaxation of Smooth Muscle by Telokin.//*J. Biol. Chem.* – 1998. – V.273 – P.11362–11369.
232. Xu, J.Q., Harder, B.A, Uman, P., and Craig, R. Myosin filament structure in vertebrate smooth muscle.// *J. Cell Biol.* – 1996. – V.134 – P.53–66.
233. Yamashiro, S., Totsukawa, G., Yamakita, Y., Sasaki, Y., Madaule, P., Ishizaki, T., Narumiya, S., and Matsumura, F. Citron kinase, a Rho-dependent kinase, induces di-phosphorylation of regulatory light chain of myosin II.// *Mol. Biol. Cell* – 2003. – V.14. – P.1745–1756.
234. Yau, C.Y.F., Wheeler, J.J., Sutton, K.L., and Hedley, D.W. Inhibition of integrin-linked kinase by a selective small molecule inhibitor, QLT0254, inhibits the PI3K/PKB/mTOR, Stat3, and FKHR pathways and tumor growth, and enhances gemcitabine-induced apoptosis in human orthotopic primary pancreatic cancer xenograf.// *Cancer Res.* – 2005. – V.65. – P.1497–1504.
235. Yoshikai, S., and Ikebe, M. Molecular cloning of the chicken gizzard telokin gene and cDNA.// *Arch. Biochem. Biophys.* – 1992. – V.299. – P.242–247.
236. Younes, M.N., Yigitbasi, O.G., Yazici, Y.D., Jasser, S.A., Bucana, C.D., El-Naggar, A.K., Mills, G.B., and Myers, J.N. Effects of the integrin-linked kinase inhibitor QLT0267 on squamous cell carcinoma of the head and neck.// *Arch. Otolaryngol. Head. Neck Surg.* – 2007. – V.133. – P.15–23.
237. Young, D.M., Himmelfarb, S., and Harrington, W.F. The relationship of the meromyosin to the molecular structure of myosin.// *J. Biol. Chem.* – 1964. – V.239. – P.2822–2829.

- 238. Yuen, S., Ogut, O., and Brozovich, F. V MYPT1 protein isoforms are differentially phosphorylated by protein kinase G.// J. Biol. Chem. – 2011. – V.286 – P.37274–37279.
- 239. Zhang, W., Wu, Y., Wu, C., and Gunst, S.J. Integrin-linked kinase regulates N-WASp-mediated actin polymerization and tension development in tracheal smooth muscle.// J. Biol. Chem. – 2007. – V.282 – P.34568–34580.
- 240. Zhang, W.-C., Peng, Y.-J., Zhang, G.-S., et al. Myosin light chain kinase is necessary for tonic airway smooth muscle contraction. J. Biol. Chem. – 2010. – V.285. – P.5522–5531.
- 241. Zhi, G., Ryder, J.W., Huang, J., Ding, P., Chen, Y., Zhao, Y., Kamm, K.E., and Stull, J.T. Myosin light chain kinase and myosin phosphorylation effect frequency-dependent potentiation of skeletal muscle contraction.// Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 2005. – V.102. – P.17519–17524.