

УДК 576.322.2

KRP/телокин разнонаправленно регулирует филаментообразование и фосфорилирование легких цепей немышечного миозина II в фибробластах

Серебряная Д.В., Щербакова О.В., Дуднакова Т.В., Ширинский В.П., Воротников А.В.

Лаборатория клеточной подвижности, Институт экспериментальной кардиологии
кардиологического научно-производственного комплекса МЗСР, Москва 121552, 3-я
Черепковская ул, 15а.

Адресат для корреспонденции:

Воротников А.В.
тел. (495) 414-7246
fax (495) 414-6719
email a.vorotnikov@cardio.ru

РЕЗЮМЕ

KRP, или телокин – миозин-связывающий белок гладких мышц, экспрессирующийся с генетического локуса киназы легких цепей миозина (КЛЦМ) независимо от КЛЦМ. Ранее мы показали, *in vitro*, что KRP взаимодействует с гладкомышечным и немышечным миозинами II в области «шейки» и регуляторных легких цепей (РЛЦ) этих молекул. Это вызывает разворачивание мономеров миозина, сложенных в присутствии физиологических концентраций соли и АТФ, и их спонтанную полимеризацию в стабильные филаменты. Кроме того, KRP конкурирует с КЛЦМ за связывание с миозином и тем самым ингибирует фосфорилирование его РЛЦ, но само фосфорилирование РЛЦ приводит к диссоциации KRP от миозина. До сих пор было неясно, реализуются ли эти активности KRP в контексте двигательного аппарата живой клетки. Удобным объектом такого исследования являются немышечные клетки, так как в норме они не экспрессируют KRP. Поэтому мы получили линии трансгенных 3Т3 фибробластов, которые стабильно экспрессируют KRP на уровне, сопоставимом с концентрацией немышечного миозина II, а также фибробласты, постоянно экспрессирующие KRP, лишенный критически важного для взаимодействия с миозином С-концевого домена. Мы обнаружили, что в клетках, экспрессирующих KRP, уровень фосфорилирования РЛЦ достоверно снижен, но повышена доля миозина, находящегося в филаментах. Напротив, контрольные клетки и фибробласты, экспрессирующие KRP без С-конца, не отличались по этим параметрам от нетрансфицированных 3Т3 фибробластов. Таким образом, наши результаты показывают, что (1) KRP стимулирует полимеризацию миозина II в клетке, но при этом снижает уровень фосфорилирования его РЛЦ, (2) эти эффекты опосредованы прямым связыванием KRP с миозином II, и (3) трансгенные 3Т3 фибробласты, постоянно экспрессирующие KRP, представляют собой удобную клеточную модель для изучения роли структурной динамики миозина II в клеточной подвижности.

ВВЕДЕНИЕ

Фосфорилирование остатка Ser-19 регуляторных легких цепей (РЛЦ) является необходимым условием активации несаркомерных миозинов II типа, к которым относятся гладкомышечный миозин и немышечные миозины IIА и IIВ [1]. Это фосфорилирование выполняет одновременно две функции, активируя АТФ-азную (моторную) активность и приводя к полимеризации молекул миозина II в филаменты [2]. Находясь в филаментах, миозин обратимо взаимодействует с филаментами актина и генерирует сокращение по механизму скользящих нитей [3]. В клетках обнаружены несколько киназ РЛЦ миозина, основными из которых являются киназа легких цепей миозина (КЛЦМ) и Rho-зависимая киназа (Rho-киназа), а также фосфатаза РЛЦ миозина, специфичность которой определяется ее миозин-связывающей субъединицей МУРТ [4]. Баланс активностей киназ и фосфатазы РЛЦ миозина определяет внутриклеточный уровень фосфорилирования РЛЦ и двигательную активность гладких мышц и немышечных клеток [5].

В большинстве гладких мышц миозин II почти постоянно находится в филаментах за счет базального уровня фосфорилирования РЛЦ, своей высокой концентрации и связыванию стабилизирующих белков [6]. Поэтому фосфорилирование Ser-19 РЛЦ реализует в гладкой мускулатуре главным образом функцию активации миозинового мотора и сокращения [5]. Напротив, в немышечных клетках значительная доля миозина II представлена стабилизированными АТФ мономерами в свернутой конформации, в которой стержневая часть тяжелых цепей миозина складывается и взаимодействует с областью так называемой «шейки» молекулы вблизи Ser-19 РЛЦ [2]. Фосфорилирование РЛЦ нарушает это взаимодействие и стержневые части развернутых мономеров миозина спонтанно ассоциируют с образованием активных филаментов.

В то время как моторная функция миозина II играет ведущую роль в движении клеток, значение структурной организации и динамики филаментов немышечного миозина остается неясным. Трудность его анализа заключается в отсутствии способов разобщения эффекта фосфорилирования РЛЦ на полимеризацию миозина II и активацию его моторной функции. В данной работе мы показываем, что таким «разобщителем» может выступать белок KRP, который отсутствует в немышечных клетках, но может быть искусственно введен с помощью трансгенных технологий.

KRP, известный также как телокин, экспрессируется с генетического локуса киназы легких цепей миозина (КЛЦМ) как независимый белок [7]. Первичная структура KRP идентична С-концевой последовательности КЛЦМ и включает область некаталитического взаимодействия КЛЦМ с миозином. К настоящему времени KRP обнаружен только в гладких мышцах и кардиомиоцитах, причем наибольший уровень экспрессии KRP наблюдается в фазной гладкой

мускулатуре [8,9]. В экспериментах *in vitro* мы ранее показали, что KRP взаимодействует с гладкомышечным и немышечным миозинами II в области «шейки» и регуляторных легких цепей (РЛЦ), что дестабилизирует свернутую конформацию мономеров миозина и вызывает их спонтанную полимеризацию в стабильные филаменты при физиологических концентрациях соли и АТФ [10]. В связывании KRP с миозином ключевую роль играют 20 С-концевых остатков белка и их удаление приводит к уменьшению сродства KRP к миозину почти на порядок [11]. Кроме того, KRP конкурирует с КЛЦМ за связывание с миозином и тем самым ингибирует фосфорилирование его РЛЦ, но само фосфорилирование РЛЦ нарушает взаимодействие KRP с миозином и вызывает его диссоциацию [11]. Таким образом, KRP может динамично воздействовать на миозин II и «разобщать» функциональные последствия фосфорилирования РЛЦ, однако, реализует ли KRP этот потенциал в контексте живой клетки, остается неясным. Целью данной работы явился анализ результатов трансгенной экспрессии KRP в гетерологичной модели 3Т3 фибробластов.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение молекулярно-генетических конструкций для эукариотической экспрессии KRP

Последовательности полноразмерного KRP человека (остатки 1-154) и его мутантной формы, лишенной С-концевого домена (\square CKRP, остатки 1-136), были амплифицированы методом ПЦР с использованием 5'-TATAGATCTCCATGGCAATGATCTCAGGGC-3' в качестве прямого праймера и 5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGGTGGC-3' или 5'-AAACTCGAGAAGCTCTGCTGTGCAGGTG-3' для KRP и \square CKRP, соответственно, в качестве обратных праймеров. Полученные ПЦР-продукты были переклонированы в вектор pCMV/мус/cyto (Invitrogen, США) по рестриктным сайтам NcoI и Xho I. Этот вектор кодирует последовательность мус-эпитопа (QKLLISQEDL), которая в результате такого клонирования оказывается на С-конце экспрессированного KRP или \square CKRP и может быть детектирована с помощью специфических антител. Правильность полученных конструкторов была подтверждена рестрикционным анализом и сиквенированием.

Получение трансгенных 3Т3 фибробластов и культивирование клеток

Линейные NIH3T3 фибробласты мыши (ATCC код CRL-1658,) культивировали при 37° С и 5% CO₂ в среде DMEM, содержащей 10% ЭТС (Hyclone, США), 2 мМ глутамин, 100 ед/мл пенициллин, 100 мкг/мл стрептомицин. Для получения трансгенных клеточных линий NIH3T3, стабильно экспрессирующих KRP и \square CKRP, клетки трансфицировали плазмидами pCMV/KRP/c-мус/cyto и pCMV/ \square CKRP/c-мус/cyto с помощью реагента Unifectin-21 (Пеплайн, Россия). Для получения моск-клонов использовали вектор pCMV/c-мус/cyto без вставки. Селекцию трансфицированных клеток проводили на антибиотике G418 следующим образом. Через 36 часов после трансфекции клетки трипсинизировали и делали серийные разведения клеточной суспензии (от 10% до 0,01%) в DMEM, содержащем 600 мкг/мл G418. Затем клетки рассаживали в 96-луночные планшеты и растили в стандартной среде для культивирования клеток (DMEM с 10% ЭТС) в присутствии 600 мкг/мл G418. По истечении 10 дней, когда нетрансфицированные клетки погибали, отмечали лунки, в которых образовалась только одна клеточная колония. Такие колонии растили до монослоя и далее пассировали последовательно в 24-х-луночном и 6-луночном планшете, затем в 35 мм чашке, 60 мм чашке и, наконец, 100 мм чашке. Далее клоны анализировали на содержание мус-KRP с помощью иммуноблоттинга и те из них, которые содержали KRP или \square CKRP, замораживали и хранили в жидком азоте.

Иммунофлуоресцентный анализ

Клетки культивировали на стеклах и фиксировали в течение 3 мин раствором 3,8% формальдегида в фосфатно-солевом буфере (ФСБ), содержащем 150 мМ NaCl, 5,2 мМ Na₂HPO₄, pH 7,4, и обрабатывали 1% раствором Тритона X-100 в ФСБ в течение 2 минут. Затем клетки промывали ФСБ и блокировали 10% ЭТС в течение 1 часа при 37° С. После этого клетки инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре с первичными антителами к немышечному миозину ПВ (Covance, США) или ядерным красителем DAPI (Molecular Probes, США), разведенными в ФСБ с 1% БСА в пропорциях, рекомендованных производителем. В случае окрашивания миозина ПВ стекла после инкубации с первичными антителами промывали ФСБ и окрашивали соответствующими вторичными антителами, мечеными TRITC, в тех же условиях. После этого стекла промывали ФСБ, закрепляли и флуоресцентный сигнал регистрировали при длинах волн 360 нм (DAPI) и 560 нм (миозин ПВ) с помощью микроскопа Zeiss Axiovert 200M (Оберховен, Германия), оснащенного CCD камерой AxioCam. Анализ изображений проводили с помощью программного обеспечения Axiovision версии 3,1 и Adobe Photoshop версии 6,0.

Экстракция растворимого миозина с помощью Тритона X-100

Фибробласты выращивали до монослоя, убирали среду, промывали ФСБ и экстрагировали растворимые белки в течение 10 минут в растворе ФСБ, содержащем 0,2% Triton X-100, 1 мМ ванадата натрия и 0,02% смеси ингибиторов протеаз (Roche, США). В экстракты добавляли двукратный буфер для образцов для белкового электрофореза (0,15 М трис-НСl, 20% глицерин, 2% ДСН, 10% β-меркаптоэтанол, 0,1% бромфеноловый синий, pH 7,6), с добавлением смеси ингибиторов протеаз. Нерастворимые цитоскелеты фибробластов, в состав которых входят филаменты миозина, промывали ФСБ и растворяли в двукратном буфере для образцов для белкового электрофореза. После этого приготовленные препараты кипятили при 99° С в течение 5 минут. Полученные образцы хранили при -70° С.

Электрофорез и иммуноблоттинг клеточных лизатов

Клетки растили в 60 мм чашках до монослоя, затем удаляли среду, промывали фосфатно-солевым буфером ФСБ для удаления остатков среды и лизировали в 60-80 мкл двукратного буфера для приготовления образцов. После этого образцы инкубировали при 99°С в течение 5 минут и несколько раз пропускали с помощью шприца через тонкую иглу для разрушения клеточной ДНК. Разделение белков проводили с помощью электрофореза при 150 V по методу Лэммли [12] в пластинах 10-15% полиакриламидного геля в

присутствии 0,1% лаурилсульфата натрия (Sigma, США), используя камеры MiniProtean 3 (Bio-Rad, США). После электрофореза гели окрашивали Кумасси R-250 или проводили иммуноблоттинг по методу Towbin et al [13]. Для электропереноса белков использовали поливинилхлоридные мембраны (PVDF) с размером пор 0,45 мкм (Immobilon, США). Для последующей детекции KRP электроперенос осуществляли в буфере, содержащем 10 мМ CAPS (pH 11) и 10 % этанол. В случае детекции других белков для электропереноса использовали трис-глициновый буфер (pH 8,3), содержащий 20% этанол. Перенос проводили в течение 50 минут при силе тока 350 мА.

После электропереноса PVDF мембраны обрабатывали в течение 15 минут 0,25% раствором глутарового альдегида для ковалентной иммобилизации белков на мембране. Качество переноса контролировали окрашиванием 0,2 % раствором Ponceau S в 10 % уксусной кислоте. После этого мембраны отмывали и блокировали в течение 1 часа 5% раствором обезжиренного сухого молока в трис-солевом буфере (ТСБТ), содержащем 25 мМ Трис-НСl, pH 7.4, 140 мМ NaCl, 0,1% Tween 20. После этого мембраны отмывали ТСБТ 3 раза по 10 минут и инкубировали 1 час при комнатной температуре (или в течение ночи при +4°C) с раствором первичных антител в ТСБТ и 1% обезжиренного молока, которые использовали в разведениях, рекомендованных производителем. В работе использовали следующие препараты первичных антител: поликлональные антитела, специфично узнающие KRP и изоформы КЛЦМ, в разведении 1:2000 [8], моноклональные антитела против КЛЦМ (клон К36) или ГАФД, (Sigma, США), моноклональные антитела к мус-эпитопу (Invitrogen, США), моноклональные антитела к немышечному миозину ПВ (Covance, США), моноклональные антитела к Rho-киназе (Bethyl, США), поликлональные антитела к одной из субъединиц ФЛЦМ МУРТ (Abscam, Великобритания), моноклональные антитела к РЛЦ миозина, связывание которых не зависит от их фосфорилирования РЛЦ (Sigma, США), и поликлональные фосфоспецифичные антитела к РЛЦ миозина, фосфорилированным по Ser¹⁹, в разведении 1:1000 [14]. Далее мембраны отмывали ТСБТ 3 раза по 10 минут и инкубировали 1 час с раствором вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена, в ТСБТ и 1% обезжиренном молоке. После инкубации мембраны несколько раз промывали ТСБТ и проявляли методом усиленной хемилюминесценции, используя реактивы фирмы Amersham (США).

Количественная обработка изображений и статистический анализ

Количественный анализ окрашенных гелей и PVDF мембран осуществляли после компьютерного сканирования изображений с помощью программы Scion Image версии

ImageJ (Scion Inc., США). Статистическую обработку данных проводили с использованием Microsoft Excel версии 5.0 и GraphPad Prism версии 4.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ уровня экспрессии KRP и миозина II в трансгенных 3Т3 фибробластах

Трансгенные 3Т3 фибробласты, экспрессирующие KRP или \square CKRP, а также моск-клоны (не экспрессирующие KRP, но устойчивые к антибиотику G418), получали как описано в разделе «Методы исследования». Было отобрано и проанализировано несколько клонов каждого типа и мы не обнаружили заметных клоногенных эффектов. На рис. 1А представлены результаты такого анализа трех клонов, экспрессирующих KRP (K2, K3 и K4), трех клонов, экспрессирующих \square CKRP (C5, C6 и C7), и одного моск-клона M1. Ни в исходных 3Т3 фибробластах, ни в контрольных моск клетках KRP не детектируется, тогда как остальные трансфектанты содержат различные, но сопоставимые количества KRP и \square CKRP. Позитивная реакция антител к С-концевому тус-эпитопу подтверждает активность трансгена и свидетельствует о целостности его продукта (рис. 1А, нижняя панель).

Далее мы измерили внутриклеточные концентрации KRP и миозина II типа в полученных нами клеточных линиях. Такая необходимость вызвана двумя причинами. Во-первых, использование клеток с чрезмерной экспрессией KRP может привести к артефактным результатам и поэтому нежелательно. Во-вторых, скорее всего, KRP функционирует в клетке путем взаимодействия с миозином II. Для образования ощутимого комплекса этих белков, их концентрации должны быть сопоставимы и близки к величине константы взаимодействия. Средство нативного и рекомбинантного KRP к миозину II составляет *in vitro* 5,5 и 9,5 мкМ, соответственно, тогда как для \square CKRP это значение существенно ниже (45,5 мкМ) [11].

Для определения концентрации KRP и \square CKRP в клетках, различные количества стандартного белка (рис. 1Б, ромбы на графике) и известного числа клеток, экспрессирующих KRP и \square CKRP (рис. 1Б, квадраты и треугольники на графике) были количественно проанализированы с помощью электрофореза и иммуноблоттинга, используя специфичные к KRP антитела. Количество KRP в одной клетке определяли из экспериментальных точек, которые попадали на линейный участок зависимости, показанной на рис. 1Б, и приводили эти значения к числу клеток, взятых для данного измерения. Внутриклеточную концентрацию KRP рассчитывали, учитывая величины молекулярных масс KRP и \square CKRP (17 кДа и 15 кДа) и размеров NIH3Т3 фибробласта. Средний объем NIH3Т3 фибробласта определяли измерением объема осадка, полученного низкоскоростным осаждением клеточной суспензии с заранее подсчитанным в камере Горяева числом клеток, и последующим делением этого значения на количество клеток.

Рассчитанный по результатам трех независимых измерений, объем единичной клетки составил $3,6 \pm 0,45$ пиколитра. Поскольку KRP является цитоплазматическим белком, мы далее делали поправку на средний размер клеточного ядра. Ядра окрашивали красителем DAPI и послойным сканированием препаратов на микроскопе Axiovert 200M определяли их линейные параметры, которые оказались примерно одинаковыми в длину, ширину и высоту. Рассчитанный как объем шара в трех независимых измерениях, размер ядра единичного 3Т3 фибробласта составил $0,88 \pm 0,06$ пиколитра. Рассчитанные на основании этих измерений значения концентраций KRP и \square СКRP в цитоплазме трансгенных клеток представлены в таблице 1.

Для определения внутриклеточной концентрации миозина II в фибробластах (см. рис. 2) мы использовали очищенный гладкомышечный миозин курицы в качестве стандарта и описанный выше алгоритм. Поскольку в нем мышечных клетках миозин II представлен, хотя и в разной пропорции, двумя изоформами IIА и IIВ, мы проводили одновременную детекцию их тяжелых цепей после окрашивания гелей Кумасси-R250. В расчетах использовали измеренные ранее параметры клеток NIH3T3, значение молекулярной массы тяжелой цепи миозина II как 220 кДа, и учитывали наличие двух тяжелых цепей в одной молекуле миозина. В результате, концентрация миозина II типа составила $4,7 \pm 1,9$ мкМ в клетках клона М1 и $5,1 \pm 1,2$ мкМ в фибробластах клона К4. Поскольку эти значения существенно не отличались, мы приняли концентрацию миозина II средней и одинаковой для всех NIH3T3 фибробластов (табл. 1). Как видно из табл. 1, внутриклеточные концентрации KRP и миозина II сопоставимы и приближаются к значению константы взаимодействия этих белков, составляющей 5-10 мкМ *in vitro* [11].

KRP увеличивает количество полимерного миозина II в трансгенных фибробластах

Для качественной оценки состояния миозина II в клетках после трансгенной экспрессии KRP мы провели иммуофлуоресцентный анализ клеток моск-клона М1 и экспрессирующего KRP клона К4 с использованием антител, специфичных к изоформе IIВ, которая, в основном, представляет миозин II в 3Т3 фибробластах. Хотя мы и наблюдали значительные вариации в окрашивании миозина IIВ, тем не менее, представленные на рис. 3А изображения репрезентативных клеток отражают общую тенденцию к большей выраженности филаментных структур в KRP-содержащих клетках. В клетках К4 миозин чаще проявлялся в виде четких, "пунктатных" филаментов, густо распределенных по всей цитоплазме, в то время как в клетках М1 обнаруживались, в основном, слабо окрашенные нитевидные образования не имеющие "пунктатной" структуры, столь характерной для формируемых миозином II полимерных структур [15,

16]. Кроме того, окрашиваемые в клетках М1 филаментоподобные образования имели тенденцию к околядерному расположению в центре клеток, истончаясь и часто пропадая ближе к периферии. Эти наблюдения указывают на то, что фибробласты, экспрессирующие KRP, могут содержать большее количество филаментов миозина по сравнению с обычными ЗТЗ фибробластами.

Для количественного подтверждения этих различий мы сравнили, с помощью иммуноблоттинга, распределение миозина IIВ между нерастворимой Тритоном X-100 цитоскелетной фракцией полимерного миозина и растворимой фракцией мономерного миозина. На рис. 3Б показано типичное распределение миозина IIВ в клетках контрольного клона М1 и экспрессирующих KRP клеток клона К4. В KRP-содержащих клетках основная часть миозина IIВ находится в филаментах в нерастворимой фракции, тогда как в контрольных клетках миозин IIВ приблизительно поровну распределен между мономерной и филаментной формами. В таблице 1 представлены результаты статистического анализа наиболее существенных клонов, из которых видно, что количество филаментов миозина на 15-20% выше в экспрессирующих KRP клетках по сравнению с контрольными фибробластами или клетками, содержащими □СКRP. Последнее означает, что именно связывание KRP с миозином, опосредуемое С-концевым доменом KRP, способствует полимеризации миозина II в клетках.

Константы связывания KRP с миозином II были определены равными 5,5 мкМ для нативного KRP, 9,5 мкМ для рекомбинантного KRP, и 46 мкМ для □СКRP [11]. Мы использовали эти значения и определенные нами внутриклеточные концентрации этих белков для вычисления процентной доли миозина, ожидаемого в комплексе с KRP (см. нижнюю часть в табл. 1). Оказалось, что определенные нами экспериментально различия в количестве миозиновых филаментов в KRP-содержащих и контрольных фибробластах находятся в нижнем диапазоне теоретически ожидаемых величин, демонстрируя прямую зависимость от внутриклеточной концентрации KRP. Наиболее вероятно, что количественные различия между теоретическими и экспериментальными значениями связаны с тем, что существенная часть нефосфорилированного по РЛЦ внутриклеточного миозина II уже находится в филаментах, стабилизированных иначе, чем связыванием KRP [6]. Такие молекулы миозина способны формировать комплекс с KRP в трансгенных клетках [10], однако, это не будет отражаться в виде увеличения фракции полимерного миозина.

KRP снижает уровень фосфорилирования РЛЦ миозина в трансгенных фибробластах

Другим результатом взаимодействия KRP с миозином, ожидаемым из экспериментов *in vitro*, является снижение уровня фосфорилирования РЛЦ миозина в клетках. Поэтому мы сравнили уровень фосфорилирования РЛЦ в трансгенных фибробластах и нетрансфицированных клетках, измеренный как указано в подписи к табл. 2 и разделе "Методы исследования". Результаты, представленные в табл. 1, показывают, что уровень фосфорилирования РЛЦ миозина в клонах, экспрессирующих KRP, на 50-60% ниже, чем в моск-клетках и нетрансфицированных фибробластах. Уровень фосфорилирования РЛЦ в клетках, содержащих \square СКRP, слабо отличился от такового в контрольных фибробластах, что еще раз указывает на важность взаимодействия KRP с миозином для регуляции активности миозина II в трансгенных клетках. Однако это небольшое различие в 15-20% является статистически достоверным ($p < 0.05$) и может указывать на дополнительный механизм регуляции уровня фосфорилирования РЛЦ миозина под действием KRP. О его наличии также косвенно свидетельствует более глубокий эффект подавления степени фосфорилирования РЛЦ в трансгенных клетках, чем этого можно было ожидать из теоретического расчета доли миозина, образующего комплекс с KRP (см. табл. 1), а также отсутствие четкой "дозо-зависимости" степени подавления от внутриклеточной концентрации KRP (см. табл. 2). Возможно, этот дополнительный механизм связан с фосфорилированием N-концевого домена KRP и \square СКRP под действием внутриклеточных протеинкиназ, которое мы не исследовали в рамках настоящей работы. Известно, что в гладкомышечных тканях KRP подвергается значительному фосфорилированию по нескольким остаткам в N-концевой области [8,17], которое связано с ускорением дефосфорилирования РЛЦ под действием фосфатазы РЛЦ по неясному пока механизму [9]. В то время как наши результаты принципиально не опровергают такой возможности, они демонстрируют важное значение прямого взаимодействия С-концевой области KRP с миозином, которое приводит к снижению уровня фосфорилирования РЛЦ, но полимеризации миозина II в фибробластах.

KRP не влияет на экспрессию белков-регуляторов миозина II в трансгенных фибробластах

Уровень фосфорилирования РЛЦ миозина в клетках определяется балансом активностей киназ и фосфатазы РЛЦ. В немых клетках в фосфорилировании РЛЦ основную роль играют КЛЦМ и Rho-киназа [18, 19]. Rho-киназа контролирует также активность фосфатазы РЛЦ, фосфорилируя ее миозин-связывающую субъединицу MYPT, которая определяет специфичность фосфатазы РЛЦ к миозину II [20]. Очевидно, что

изменение уровня экспрессии любого из этих белков может привести к значительным изменениям статуса фосфорилирования и активности миозина II в клетке. Чтобы установить, не изменена ли экспрессия этих белков-регуляторов миозина II в трансгенных клетках, мы сравнили содержание КЛЦМ, Rho-киназы и MYPT в клетках клона K4, экспрессирующих KRP, и контрольных фибробластах линии NIH3T3 (рис. 4). Мы обнаружили, что 3T3 фибробласты экспрессируют, в основном, высокомолекулярную изоформу КЛЦМ с массой 210 кДа и, в меньшем количестве, гладкомышечную изоформу КЛЦМ с массой 108 кДа. Однако их содержание, также как и содержание Rho-киназы и MYPT было одинаковым в контрольных и трансгенных фибробластах (рис. 4). Таким образом, мы заключаем, что обнаруженные нами функциональные изменения состояния миозина II в трансгенных клетках связаны с селективной экспрессией физиологических концентраций KRP.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В этой работе мы показали, что в системе трансгенных клеточных линий KRP регулирует две основные структурно-функциональные характеристики миозина II: (1) организацию миозина II в филаменты и (2) уровень фосфорилирования его регуляторных легких цепей. При этом KRP оказывает разнонаправленное действие на эти два процесса – вызывает полимеризацию миозина II, снижая уровень фосфорилирования его РЛЦ.

KRP проявляет свою внутриклеточную активность благодаря прямому взаимодействию с миозином в физиологическом диапазоне концентраций, а не в результате сверхэкспрессии. Удаление основной миозин-связывающей последовательности из KRP приводит к устранению внутриклеточных эффектов при его трансгенной экспрессии. Определенная ранее внутриклеточная концентрация KRP составляет 20-40 мкМ в гладкомышечных тканях, что достигает нижних пределов содержания миозина II [10, 17, 21]. Аналогично, в полученных нами трансгенных клетках концентрация KRP варьирует в пределах 1 – 4 мкМ, но не превышает концентрации миозина II, составляющей около 5 мкМ. Более того, степень выраженности эффекта KRP на структурное состояние миозина прямо зависит от концентрации KRP в клетке, соответствуя теоретически рассчитанному количеству комплекса этих двух белков.

Как ассоциация миозина II в филаменты с последующим образованием актомиозиновых стресс-фибрилл, так и активация моторной АТФ-азы миозина критически необходимы для двигательных реакций немышечных клеток [22,23]. Оба эти процесса одновременно контролируются фосфорилированием остатка Ser-19 РЛЦ миозина [2]. Отсутствие способа разобщения эффекта фосфорилирования РЛЦ на структурную организацию и моторную активность миозина крайне затрудняет анализ их индивидуального вклада в клеточную подвижность. Последние исследования указывают на потенциальную значимость формирования миозином II филаментных структур в активной зоне ламеллы движущейся клетки [16,24], а также на то, что фосфорилирование РЛЦ лимитирует динамику этого процесса и движения клетки в целом [25]. Наше исследование показывает, что KRP может выполнять роль "разобщителя" моторной и структурной функций миозина, что позволяет использовать линии клеток с трансгенной экспрессией KRP в качестве экспериментальной модели для изучения индивидуальной роли структурной организации миозина II в двигательных ответах клеток.

БЛАГОДАРНОСТИ

Данная работа была поддержана грантом РФФИ 05-04-49498а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sellers J.R., Adelstein R.S. // *Curr Top Cell Regul* .1985. V. 27. P. 51-62.
2. Trybus K.M.// Myosin regulation and assembly. In: Barany K. and Barany M., editors. *Biochemistry of smooth muscle contraction*. NY: Acad. Press. 1996. P. 37-46.
3. Huxley A.F.// *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2000. V. 355. №1396. P. 433-440.
4. Воротников А.В., Крымский М.А., Ширинский В.П.// *Журн. Биохимия*. 2002. Т. 67. № 12. С. 1309-1328.
5. Somlyo A.P., Somlyo A.V.// *Nature*. 1994. V. 372. № 6503. P. 231-236.
6. Seow C.Y.// *Am J Physiol Cell Physiol*. 2005. V. 289. № 6. P. C1363-C1368
7. Хапчаев А.Ю., Ширинский В.П., Воротников А.В.// *Журн. Усп. Биол. Химии*. 2003. Т. 43. С. 365-420.
8. Krymsky M.A., Kudryashov D.S., Shirinsky V.P., Lukas T.J., Watterson D.M., Vorotnikov A.V.// *J Muscle Res Cell Motil*. 2001. Т. 22. № 5. P. 425-437.
9. Wu X., Haystead T.A., Nakamoto R.K., Somlyo A.V., Somlyo A.P. // *J Biol Chem* .1998. V. 273. № 18. P. 11362-11369.
10. Shirinsky V.P., Vorotnikov A.V., Birukov K.G., Nanaev A.K., Collinge M., Lukas T.J., Sellers J.R., Watterson D.M.// *J Biol Chem*. 1993. V. 268. № 22. P.16578-16583.
11. Silver D.L., Vorotnikov A.V., Watterson D.M., Shirinsky V.P., Sellers J.R.//*J Biol Chem*. 1997. V. 272. № 40. P. 25353-25359.
12. Laemmli U.K.//*Nature*. 1970. V. 227. № 5259. P. 680-685.
13. Towbin H., Staehelin T., Gordon J.// *Proc Natl Acad Sci U S A*.1979. V. 76. № 9. P. 4350-4354.
14. Goncharova E.A., Vorotnikov A.V., Gracheva E.O., Wang C.L., Panettieri R.A., Jr., Stepanova V.V., Tkachuk V.A.//*Biol Chem*. 2002. V. 383. № 1. P 115-126.
15. Conrad P.A., Giuliano K.A., Fisher G., Collins K., Matsudaira P.T., Taylor D.L.// *J Cell Biol*. 1993. V. 120. № 6. P. 1381-1391.
16. Verkhovsky A.B., Borisy G.G.// *J Cell Biol*. 1993.V. 123. № 3. P. 637-652.
17. Хапчаев А.Ю., Крымский М.А., Сидорова М.В., Беспалова Ж.Д., Ванг Ч.-Л.А., Ширинский В.П., Воротников А.В.// *Журн. биохимия*.2004. Т. 69. № 7. С. 789-798.
18. Totsukawa G., Yamakita Y., Yamashiro S., Hartshorne D.J., Sasaki Y., Matsumura F.//*J Cell Biol*. 2000. V. 150. № 4. P. 797-806.
19. . Totsukawa G., Wu Y., Sasaki Y., Hartshorne D.J., Yamakita Y., Yamashiro S., Matsumura F. // *J Cell Biol*. 2004. V. 164. № 3. P. 427-439.
20. . Ito M., Nakano T., Erdodi F., Hartshorne D.J.// *Mol Cell Biochem*. 2004. V. 259. №1-2. P. 197-209.
21. Choudhury N., Khromov A.S., Somlyo A.P., Somlyo A.V.// *J Muscle Res Cell Motil*. 2004. V. 25. № 8. P. 657-665.
22. Small J.V., Geiger B., Kaverina I., Bershadsky A.// *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002. V. 3. № 12. P. 957-964.
23. Small J.V., Resch G.P.// *Curr Opin Cell Biol*. 2005. V. 17. № 5. P. 517-523.
24. Verkhovsky A.B., Svitkina T.M., Borisy G.G.// *J Cell Biol*. 1995. V. 131. № 4. P. 989-1002.
25. Post P.L., DeBiasio R.L., Taylor D.L.// *Mol Biol Cell*. 1995. V. 6. № 12. P.1755-1768.

РИСУНКИ

Рис.1

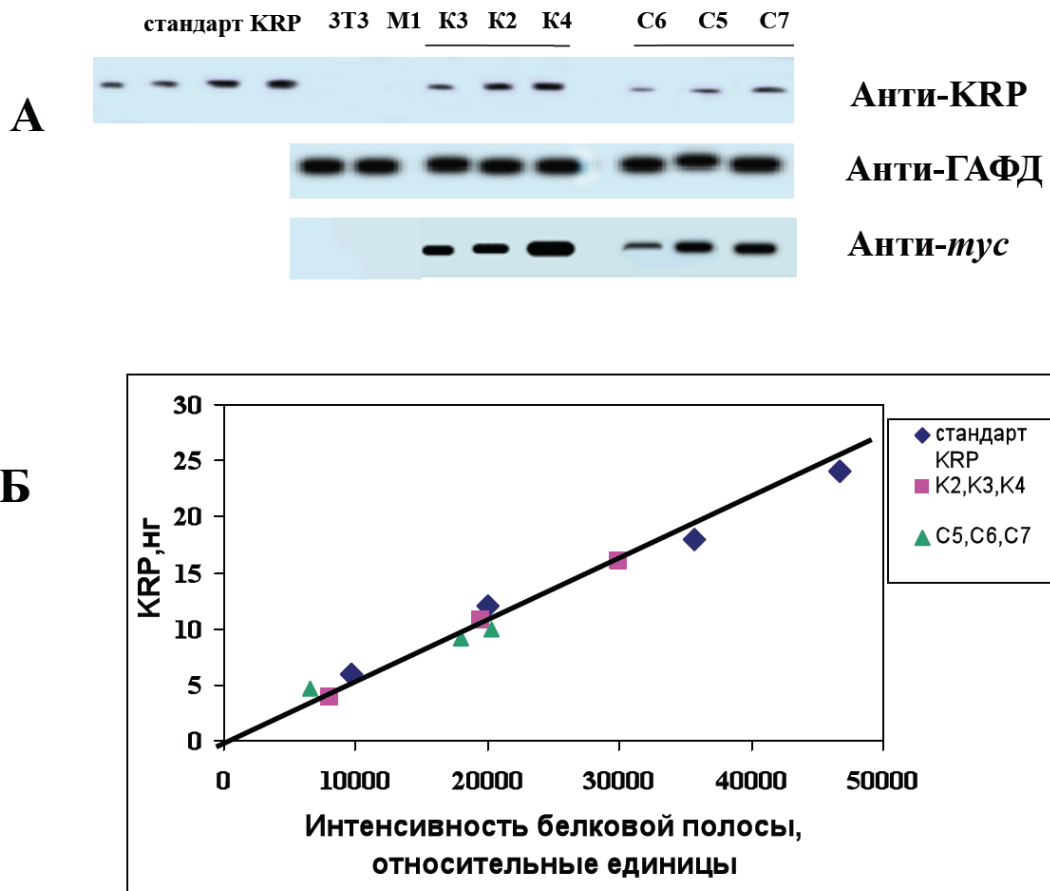


Рис.2

1 Е4 Аэааеиі ъ њ а:і ъ е і еіçеі, і еа

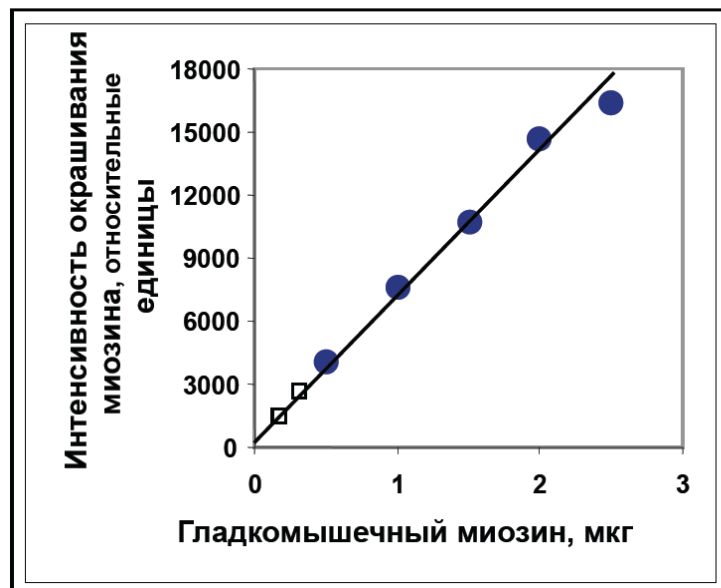


Рис.3

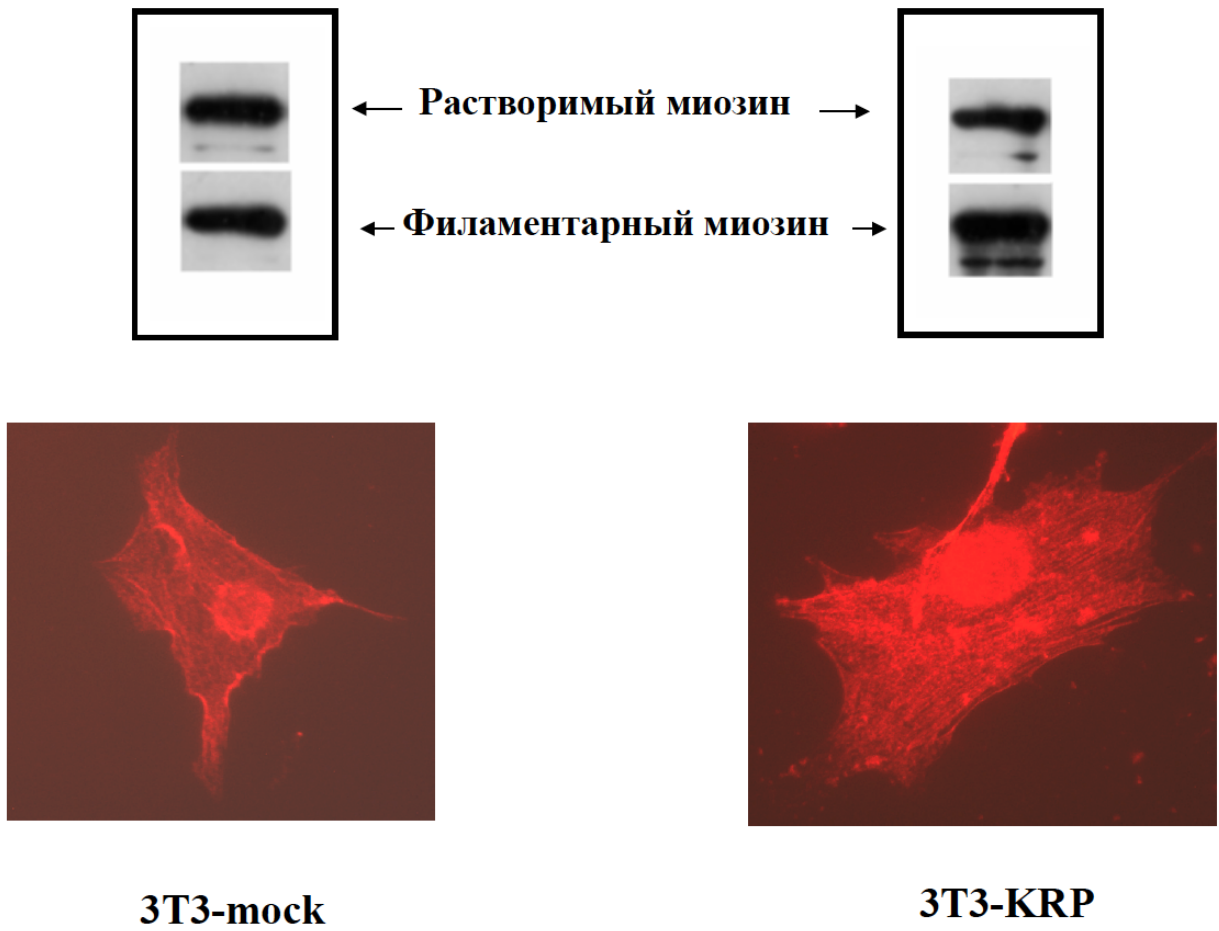
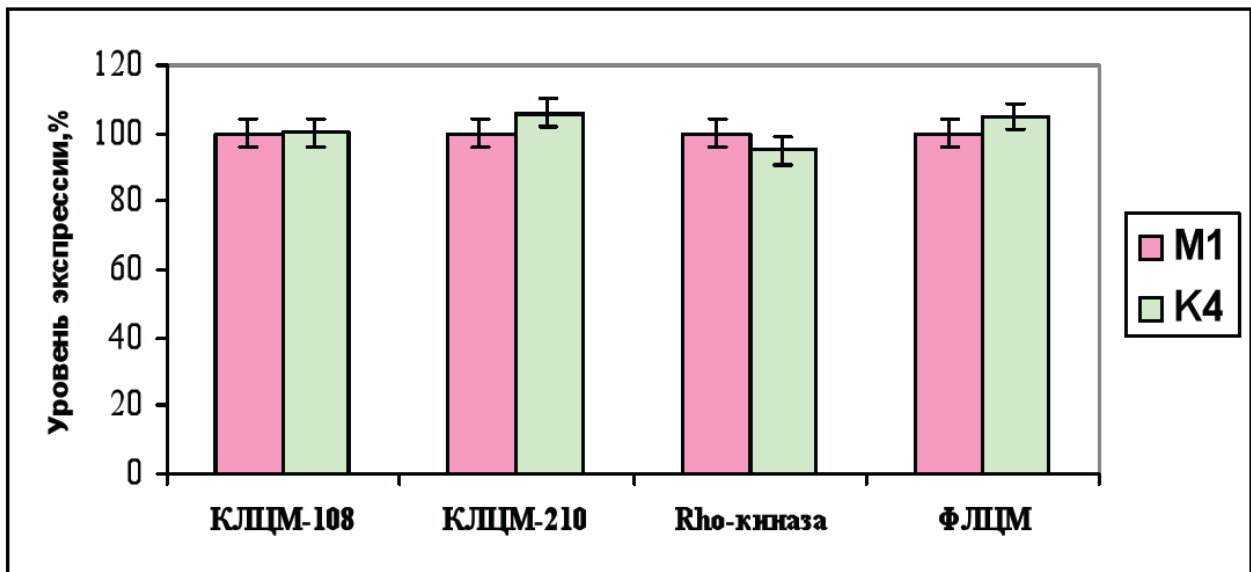


Рис.4.



ПОДПИСИ К РИСУНКАМ

Рисунок 1. Характеристика трансгенных ЗТЗ фибробластов.

А. На *верхней панели* представлены результаты иммуноблоттинга возрастающих количеств (6, 12, 18 и 24 нг) очищенного рекомбинантного КРР человека (стандарт КРР), одинаковых по общему белку количеств лизатов нетрансфицированных NIH3T3 фибробластов и контрольного моск-клона М1, а также клеток, экспрессирующих КРР (К2, К3, К4) или \square СКРР (С6, С5, С7). *Средняя панель* показывает окраску тех же мембран антителами к ГАФД для контроля нагрузки, а *нижняя панель* – окраску аналогичных мембран антителами к тус-эпитопу.

Б. Репрезентативная зависимость интенсивности белковых полос КРР и \square СКРР от количества нанесенного на гель белка, соответствующая мембране, показанной на верхней панели А (подробнее см. в тексте).

Рис. 2. Определение концентрации миозина II в ЗТЗ фибробластах.

Возрастающие количества гладкомышечного миозина (первые пять полос на верхней панели и *кружки* на графике), а также лизаты подсчитанного количества клеток клонов М1 и К4 (две правых полосы на верхней панели и *квадраты* на графике) разделяли в 7,5% геле, который затем окрашивали Кумасси-R250. После этого строили зависимость интенсивности окрашивания миозина от количества внесенного белка, которую использовали для определения количества немышечного миозина в клетках клонов М1 и К4 как описано в тексте для рис. 1.

Рис. 3. Влияние КРР на содержание филаментного миозина в ЗТЗ фибробластах.

А. Иммунофлуоресцентное окрашивание миозина IIВ в контрольных (М1) и экспрессирующих КРР (К4) фибробластах.

Б. Типичное распределение миозина IIВ между растворимой и нерастворимой в тритоне X-100 цитоскелетной фракциями в контрольных (М1, слева) и экспрессирующих КРР (К4, справа) трансгенных фибробластах.

Рис. 4. Трансгенная экспрессия КРР не влияет на содержание изоформ КЛЦМ, Rho-киназы и миозин-связывающей субъединицы фосфатазы РЛЦ в фибробластах.

Лизаты контрольных (М1) и экспрессирующих КРР (К4) фибробластов, предварительно нормированные по содержанию общего белка, анализировали иммуноблоттингом с

последующим окрашиванием антителами, специфичными к КЛЦМ (K36 клон), Rho-киназе и МУРТ, одной из субъединиц ФЛЦМ. Обсчет данных производили при помощи компьютерных программ NIH Image и Microsoft Excel. Данные представлены как среднее значение ($n=3$) \pm стандартное отклонение.

Таблица 1. Цитоплазматические концентрации белков и доля полимерного миозина II в трансгенных ЗТЗ фибробластах. Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение (n=3), p<0,05.

Клон	M1	K2	K3	K4	C5	C7
KRP, мкМ	0	2,35 \pm 0,25	2,12 \pm 0,18	3,6 \pm 0,4	2,07 \pm 0,15	2,54 \pm 0,19
Миозин II, мкМ	4,9 \pm 1,5					
% миозина ПВ в филаментах	45 \pm 3,5	58 \pm 4,2	-	64 \pm 3,7	-	42 \pm 3,5
Ожидаемый % миозина в комплексе с KRP *)	0	21 (15)	14 (10)	29 (21)	3	4

*) Теоретически рассчитанная доля внутриклеточного миозина (в %), образующего комплекс с KRP в клетках, принимая константы связывания KRP с миозином – 5,5 мкМ (или 9,5 мкМ, для значений в скобках), K_{CKRP} с миозином – 46 мкМ (Silver et al., 1997), а также определенные экспериментально внутриклеточные концентрации этих белков.

Табл. 2. Влияние KRP на внутриклеточный уровень фосфорилирования РЛЦ миозина по остатку Ser¹⁹.

Относительную степень фосфорилирования РЛЦ (Ф-РЛЦ) миозина определяли как отношение сигналов фосфо-РЛЦ к суммарной РЛЦ, полученных при сканировании идентичных мембран, проявленных фосфоспецифичными антителами к фосфо-Ser¹⁹ РЛЦ или моноклональными антителами к РЛЦ (клон МУ-21, Sigma, США), связывание которых не зависит от статуса фосфорилирования РЛЦ. За 100% принимали уровень фосфорилирования РЛЦ в 3Т3 фибробластах. Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение (n=13), p<0,05.

Клон	Ф-РЛЦ, %	Клон	Ф-РЛЦ, %
К2	39,5 \pm 2,05	3Т3	100
К3	40,4 \pm 3,53	М1	100,9 \pm 2,36
К4	47,8 \pm 2,46	С5	79,5 \pm 2,1
		С7	86 \pm 3,5

KRP/telokin differentially affects myosin II filament assembly and regulatory light chain phosphorylation in fibroblasts

Serebryanaya DV, Shcherbakova OV, Dudnakova TV, Shirinsky VP and Vorotnikov AV.

KRP, or telokin, is a smooth muscle-specific myosin II binding protein that is expressed from myosin light chain kinase (MLCK) gene locus independently of MLCK. We have earlier shown, *in vitro*, that KRP interacts with the neck region of unphosphorylated smooth muscle and non-muscle myosin II close to the regulatory myosin light chain (rMLC). This causes myosin monomers to unfold in the presence of physiological salt and ATP concentrations and spontaneously associate into stable filaments. Yet, KRP competes with MLCK for myosin binding and thereby inhibits phosphorylation of rMLC, but dissociates from myosin once rMLC becomes phosphorylated. Presently, it is unclear whether KRP exerts these activities in the context of living cell and non-muscle cells provide useful tool to explore KRP function, as they do not normally express KRP. Therefore, we generated 3T3 fibroblasts that express either the wild-type KRP, or its truncated mutant devoid of the C-terminal domain, which primarily contributes to myosin binding of KRP. We found that KRP expressing cells display significantly increased myosin filament content and reduced level of rMLC phosphorylation, whereas the mock transfected cells or cells expressing the C-terminally truncated KRP do not. Our results suggest that (1) KRP promotes polymerization of myosin II and reduces the rMLC phosphorylation level in cells, (2) KRP acts through the direct binding to myosin II, and (3) transgenic 3T3 fibroblasts stably expressing KRP represent useful and versatile model to study role of myosin II filament dynamics in cell motility.