

УДК 577.29

ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ РЕГУЛИРУЕТ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ N-КОНЦЕВОГО ДОМЕНА ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНОЙ КИНАЗЫ ЛЕГКИХ ЦЕПЕЙ МИОЗИНА С АКТИНОВЫМ ЦИТОСКЕЛЕТОМ*

© 2015 Е.Л. Вилиткевич^{1#}, А.Ю. Хапчаев^{1#}, Д.С. Кудряшов²,
А.В. Никашин¹, Дж.П. Шавоки³, Т.Дж. Лукас³,
Д.М. Ваттерсон³, В.П. Ширинский^{1**}

¹ Российский кардиологический научно-производственный комплекс
Минздрава России, 121552 Москва, 3-я Черепковская ул., 15а;
факс: +7(495)414-6719, электронная почта: shirinsky@cardio.ru

² Государственный университет Огайо, Коламбус, 43210 США

³ Северо-Западный университет, Чикаго, 60611 США

Поступила в редакцию 26.05.15

После доработки 20.06.15

Высокомолекулярная киназа легких цепей миозина (КЛЦМ210) представляет собой многофункциональный белок, участвующий в активации миозина II типа и интеграции компонентов клеточного цитоскелета. В центральной части молекулы и в составе N-концевого домена КЛЦМ210 располагаются участки взаимодействия с актином. В клетках HeLa показано фосфорилирование N-концевого домена КЛЦМ210 по остаткам серина, предположительно под действием активной в митозе протеинкиназы Auroга В (Дульянинова и Брезник, *Exp. Cell Res.*, 2004), однако функциональная значимость данного фосфорилирования осталась неустановленной. Результаты настоящей работы указывают, что N-концевой актинсвязывающий участок КЛЦМ210 располагается в пределах 27–157 а.о. (N27-157, нумерация остатков приведена для КЛЦМ210 курицы). В условиях *in vitro* цАМФ-зависимая протеинкиназа (ПКА) и протеинкиназа Auroга В фосфорилируют N27-157 по остаткам S140 и S149, ослабляя его взаимодействие с актином. Эти же остатки фосфорилируются ПКА-зависимым образом в трансфицированных клетках HeLa. Более того, фосфоимитирующие мутанты N27-157 менее прочно связываются с детергент-нерастворимой цитоскелетной фракцией клеток, в то время как *in vitro* замена S149D ослабляет связывание N27-157 с F-актином в той же степени, как и фосфорилирование N27-157 под действием ПКА. Таким образом, фосфорилирование КЛЦМ210 по остаткам серина, в основном по S149, ослабляет взаимодействие N-концевого домена КЛЦМ210 с актиновым цитоскелетом и может регулировать способность КЛЦМ210 перешивать микрофиламенты в клетке.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: высокомолекулярная киназа легких цепей миозина, связывание с актином, фосфорилирование, белок-белковые взаимодействия, цАМФ-зависимая протеинкиназа, протеинкиназа Auroга В.

Высокомолекулярная киназа легких цепей миозина (КЛЦМ210) относится к семейству серинтреониновых (S/T) протеинкиназ и обладает наиболее высокой молекулярной массой (210 кДа) среди белковых продуктов генетического локуса позвоночных, кодирующего немышечную/гладкомышечную киназу легких цепей миозина (КЛЦМ) [1]. Данный локус кодирует также бо-

лее короткую КЛЦМ с молекулярной массой 108–135 кДа (КЛЦМ108) и небольшой (17 кДа) белок KRP (от англ. Kinase-Related Protein, известный в литературе также как телокин) [2]. Аминокислотная последовательность КЛЦМ210 включает последовательность КЛЦМ108 и содержит дополнительный N-концевой участок. КЛЦМ210 экспрессируют лейкоциты, эпители-

Принятые сокращения: КЛЦМ210 – высокомолекулярная киназа легких цепей миозина (210 кДа); KRP – белок, родственник КЛЦМ (Kinase-related protein); N27-157 – генетическая конструкция N-концевого домена КЛЦМ210 курицы, кодирующая а.о. с 27 по 157-й, а также соответствующий этой конструкции белковый продукт; ПКА – цАМФ-зависимая протеинкиназа; а.о. – аминокислотные остатки; TRITC – тетраметилродамин; ЭСБ – эмбриональная сыворотка быка; ФСБ – фосфатно-солевой буфер.

* Первоначально английский вариант рукописи был опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow), Papers in Press, BM15-156, 16.08.2015.

** Адресат для корреспонденции.

Авторы внесли равный вклад в работу.

альные и эндотелиальные клетки, а также культивируемые фибробласты. В зависимости от физиологических условий или условий культивирования КЛЦМ210 является преимущественной формой или существует совместно с КЛЦМ108 [2, 3–6].

C-концевой KRP-домен КЛЦМ210 не обладает каталитической активностью и служит участком взаимодействия с миозином [7]; в центральной части молекулы КЛЦМ210 последовательность, содержащая повторяющиеся мотивы DF/VRxxL, представляет участок высокоаффинного взаимодействия с микрофиламентами, а уникальный для КЛЦМ210 N-концевой домен содержит дополнительные участки взаимодействия с микрофиламентами и микротрубочками [8–10]. В результате предыдущих исследований N-концевой участок связывания с актином был локализован в пределах 1–201 а.о. [11]. В составе КЛЦМ210 обнаружены участки взаимодействия с рядом других белков, таких как ингибитор миграции макрофагов MIF, кортактин, супервиллин, ацетилаза hARD1, Ryk2 и тирозиназная протеинкиназа p60^{src} [6, 12–16].

Согласно предложенной модели, учитывающей взаимодействие КЛЦМ210 с компонентами цитоскелета, в нем мышечных клетках КЛЦМ210 интегрирует цитоскелет и организует двигательную активность [9]. Так, считается, что КЛЦМ210 прочно связана с микрофиламентами своей центральной частью, тогда как N- и C-концевые области обратимо взаимодействуют с другими компонентами цитоскелета и белками, участвующими в реализации двигательной активности. KRP-домен КЛЦМ210 связывается с растворимыми мономерами немышечного миозина II типа и направляет каталитический домен КЛЦМ210 на легкие цепи миозина II. Фосфорилирование миозина II приводит к сборке миозиновых филаментов, обеспечивая локальное актомиозиновое движение. N-концевой домен, связывающийся с микрофиламентами и микротрубочками, представляется важным для интеграции КЛЦМ210 с другими компонентами цитоскелета, позволяя обеспечивать локальный контроль жесткости цитоплазмы и актомиозиновую подвижность. N-концевой домен КЛЦМ210 фосфорилируется в интерфазных и митотических клетках HeLa [17], однако модифицируемые остатки не были установлены. Вместе с тем в головном мозге мыши протеомный анализ позволил выявить фосфопептид, возникающий из N-концевой области КЛЦМ210 и содержащий фосфосерин в положении, соответствующем S149 курицы [18, 19]. Однако в обоих случаях осталась неустановленной функциональная значимость модификации N-концевой области

КЛЦМ210, и модификации конкретных остатков не были соотнесены с потенциальными протеинкиназами.

С целью углубления знаний о фосфорилировании N-концевой области КЛЦМ210 и потенциальной функциональной значимости этого фосфорилирования в настоящей работе были поставлены задачи более точно установить локализацию N-концевого актинсвязывающего участка КЛЦМ210, идентифицировать участки фосфорилирования и выявить связь между фосфорилированием конкретных остатков и изменением актинсвязывающих свойств КЛЦМ210 и ее внутриклеточной локализации. Полученные результаты указывают на то, что фосфорилирование специфических остатков в N-концевой области КЛЦМ210 может служить механизмом регуляции взаимодействия КЛЦМ210 с цитоскелетом, что, в свою очередь, обеспечивает опосредованную КЛЦМ210 реализацию локальных биологических ответов.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Все использованные реактивы общего назначения имели качество «ч.д.а.» и были приобретены в фирмах «Sigma» (США) и «Fisher Scientific» (США).

Молекулярно-биологические конструкции. На рис. 1 представлено структурное соответствие полноразмерной КЛЦМ210 и использованных в работе конструкций, кодирующих N-концевой фрагмент КЛЦМ210. Нумерация а.о. приведена для КЛЦМ210 курицы [1]. Фрагмент N201 был описан ранее [9, 11]. Эндонуклеазы рестрикции и ДНК-модифицирующие ферменты приобретали у «New England Biolabs» (США), «Fermentas» (Литва) и «Силекс» (Россия). Для очистки фрагментов ДНК из агарозного геля и плазмидной ДНК из бактериальных культур использовали наборы реактивов фирмы «Qiagen» (Германия). Олигонуклеотиды для ПЦР заказывали у фирмы «Синтол» (Россия), нуклеотидная последовательность использованных в работе олигонуклеотидов может быть предоставлена по требованию. кДНК N27-157 была получена методом ПЦР, используя в качестве матрицы конструкцию pETN452 [9], с последующим клонированием в вектор pAsk-IBA3 («IBA GmbH», Германия) по участкам EcoRI и NcoI для введения последовательности, кодирующей Strep-последовательность, на 3'-конец в одну рамку считывания с кДНК N27-157. На следующем этапе кДНК N27-157-Strep была амплифицирована методом ПЦР и клонирована в вектор pET21(d+) («Novagen», США) по участкам EcoRI и HindIII

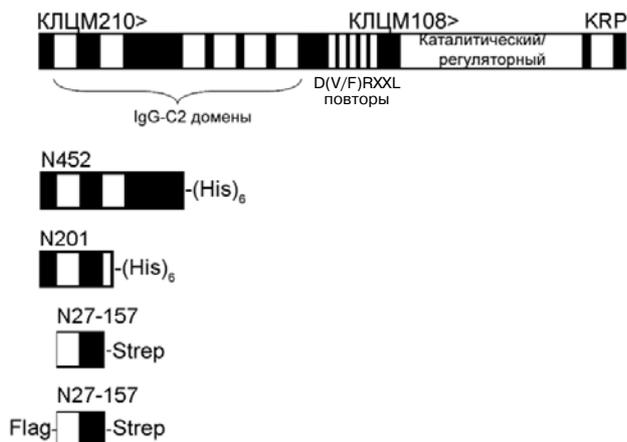


Рис. 1. N-концевые фрагменты КЛЦМ210, использованные в работе. Представлено структурное соответствие рекомбинантных фрагментов и полноразмерной КЛЦМ210. Пустые прямоугольники – IgG-подобные домены С2-типа, KRP – KRP-домен

для бактериальной экспрессии N27-157, содержащего С-концевую Strep-последовательность.

Для экспрессии в эукариотических клетках кДНК N27-157-Strep была амплифицирована методом ПЦР и клонирована в вектор pFlag-CMV2 («Sigma», США) по участкам EcoRI и BamHI для получения кДНК N27-157, содержащей 5'-концевую Flag-последовательность и 3'-концевую Strep-последовательность. Точечные аминокислотные замены остатков S140 и S149 на остатки аспарагиновой кислоты или аланина осуществляли с использованием набора реактивов для направленного мутагенеза («Stratagene», США) в соответствии с рекомендациями производителя.

Последовательности всех конструкций были подтверждены секвенированием.

Очистка белков. Актин выделяли из ацетонового порошка скелетной мышцы кролика по стандартному методу, предложенному Спудич и Ватт [20]. Выделение содержащего полигистидиновую последовательность фрагмента N201 [11] и содержащего Strep-последовательность фрагмента N27-157 проводили с использованием носителей TALON («Clontech», США) или Strep-Tactin агароза («IBA GmbH») соответственно, следуя рекомендациям производителей за тем исключением, что во все буферные растворы дополнительно добавляли 0,1 мМ диизопропилфторфосфат (DFP, «Sigma», США) для подавления активности протеаз. N27-157 диализовали в буфер, содержащий 10 мМ MOPS, pH 7,0, 100 мМ NaCl, 1 мМ MgCl₂, 0,1 мМ этиленгликольтетрауксусную кислоту (ЭГТА), 1 мМ

дитиотреитол (ДТТ), и замораживали каплями в жидком азоте. Белки до использования хранили при -70°.

Концентрацию белков измеряли спектрофотометрически, используя следующие коэффициенты экстинкции и молекулярные массы: G-актин: ОП_{290 нм}^{1 мг/мл} = 0,62 (43 кДа); N201: ОП_{280 нм}^{1 мг/мл} = 1,08 (22 кДа); N27-157: ОП_{280 нм}^{1 мг/мл} = 1,42 (16 кДа).

Коседиментационный анализ. Актин полимеризовали диализом в буфер, содержащий 10 мМ MOPS, pH 7,0, 100 мМ NaCl, 1 мМ MgCl₂, 0,1 мМ ЭГТА, 1 мМ ДТТ. Для анализа взаимодействия N27-157 и фосфо-N27-157 (2,5–30 мкМ) с F-актином (5–15 мкМ) белки смешивали в вышеуказанном буфере, инкубировали 20 мин при комнатной температуре и центрифугировали при 100 000 g в течение 30 мин. Надосадочную жидкость и осадки анализировали электрофорезом в пластинах 12%-ного ПААГ в присутствии Ds-Na с последующим окрашиванием красителем Кумасси R-250.

Электрофорез и иммуноблоттинг. Электрофорез проводили по методу Лэммли [21], гели окрашивали Кумасси R-250. Электроперенос белков на поливинилидендифлуоридные (PVDF, Immobilon P) или нитроцеллюлозные мембраны («Millipore», США) проводили по методу Тоубин с соавт. [22], используя камеру для полусухого переноса («Bio-Rad», США). Для обработки мембран использовали первичные моноклональные антитела M2 против Flag-последовательности («Sigma»), фосфосерина («GenTex», США), Strep-последовательности («IBA GmbH»), глицеральдегидфосфатдегидрогеназы (ГАФД, «Sigma», США) и вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена («Pierce», США). Для визуализации использовали набор реактивов для хемилюминесцентной детекции («GE Healthcare», Великобритания) и рентгенографическую пленку («Fotochemische werke GmbH», Германия). Гели и проявленные пленки оцифровывали с помощью сканера («Hewlett-Packard», США) и проводили денситометрический анализ с помощью программного обеспечения NIH Image, версия 1.59 («NIH», США).

Фосфорилирование *in vitro* и определение участков фосфорилирования. Рекомбинантные фрагменты КЛЦМ210 (10–18,3 мкМ) фосфорилировали *in vitro* в буфере, содержащем 10 мМ MOPS, pH 7,4, 100 мМ NaCl, 1 мМ MgCl₂, 0,1 мМ ЭГТА, 1 мМ ДТТ, в присутствии 0,5 мМ γ-[³²P]ATP («GE Healthcare», Великобритания). Реакцию начинали внесением каталитической субъединицы ПКК («New England Biolabs», США) или протеинкиназы Aurora B («Cell Signaling», США) до конечной концентрации 0,22 и 0,12 мкМ соответственно. Аликвоты реакционной смеси

наносили на бумажные фильтры «Whatman» (США) в трех повторах для каждой точки. Фильтры промывали фосфатным буфером, содержащим 10% трихлоруксусной кислоты, и анализировали включение радиоактивной метки методом жидкостной сцинтилляции. В дополнение к этому проводили Ds-Na-электрофорез радиоактивных образцов, гели окрашивали Кумасси R-250 и экспонировали на рентгенографическую пленку или определяли интенсивность сигнала в содержащих радиоактивную метку белковых полосах с помощью прибора Storm Phosphorimager («Molecular Dynamics», США).

Для определения участков фосфорилирования методом масс-спектрометрии фрагмент КЛЦМ210 N201 фосфорилировали ПКА *in vitro* в течение 2 ч при 37°. Реакционную смесь разделяли в 12%-ном ПААГ в присутствии Ds-Na; окрашенную Кумасси R-250 полосу, соответствующую N201, вырезали и подвергали трипсинолизу. Пептиды экстрагировали из геля и разделяли ВЭЖХ на колонке C18 с обращенной фазой (Zorbax C18, 0,075 × 50 мм). Пептиды элюировали 0,1%-ной муравьиной кислотой в воде с градиентом ацетонитрила до 60% за 60 мин при скорости тока жидкости 0,3 мкл/мин. Спектральные данные получали на масс-спектрометре типа ионная ловушка Agilent 1100 ХСТ, сопряженном с жидкостным хроматографом, в информативно-зависимом МС/МС-режиме сканирования положительно заряженных ионов. На каждом цикле регистрировали пять МС/МС-спектров; проанализированные родительские ионы исключали из последующих циклов МС/МС-анализа на 2 мин. Идентификацию фосфопептидов по тандемным масс-спектрам осуществляли с использованием поисковых алгоритмов Spectrum Mill («Agilent Technologies», США) и Mascot («Matrix Science», США) с ограничением поиска в базе данных белковых последовательностей классом птиц. Алгоритм оценки качества спектров и валидации идентификаций пептидов описан ранее [23].

Анализ связывания N27-157 с актиновыми филаментами в клетках. Культуральный пластик приобретали у «Corning» (Нидерланды). Клетки HeLa культивировали в питательной среде DMEM («Invitrogen», США), дополнительно содержащей 10%-ную эмбриональную сыворотку быка (ЭСБ, «HyClone», США), при 37° в атмосфере 5%-ного CO₂. По достижении клетками плотности монослоя 50–70% в чашках диаметром 35 мм клетки трансфицировали конструкциями, кодирующими рFlag-N27-157 дикого типа или с заменой фосфорилируемых остатков, с использованием набора реактивов Максифек-

тин-21 («Пеплайн», Россия) в соответствии с рекомендациями производителя. Через 24 ч после трансфекции экстрагировали растворимую клеточную фракцию, используя буфер, содержащий 2 мМ КН₂РO₄, 10 мМ Na₂НРO₄, рН 7,4, 150 мМ NaCl, 2,4 мМ KCl, 1 мМ ЭГТА, 0,5%-ный Triton X-100, 0,1 мМ DFP. Клетки инкубировали с 50 мкл указанного буфера на льду в течение 10 мин, собирали всю жидкость и добавляли к ней 25 мкл 3× буфера для образцов по Лэммли. В чашку вносили 75 мкл 1× буфера для образцов по Лэммли и собирали нерастворимую в присутствии детергента цитоскелетную фракцию с помощью резинового скребка. Образцы растворимой и нерастворимой фракций клеток HeLa кипятили в течение 3 мин и анализировали методом Ds-Na-электрофореза в 10%-ном ПААГ с последующим иммуноблоттингом.

Фосфорилирование N27-157 в клетках. Клетки HeLa культивировали в чашках диаметром 35 мм, как описано выше, до достижения плотности монослоя 50–70% и трансфицировали 3 мкг генетических конструкций рFlag-N27-157 или рFlag-N27-157(S140A, S149A) с помощью стандартного кальций-фосфатного метода. Через три дня после трансфекции клеткам заменяли питательную среду на 1,8 мл полноценной среды DMEM с 10% ЭСБ, дополнительно содержащей [³²P]-ортофосфат (Физико-энергетический институт им. А.И. Лейпунского, Обнинск, Россия; 8 МБк в расчете на чашку диаметром 60 мм), и инкубировали 12 ч. Затем питательную среду заменяли на 1,8 мл DMEM без ЭСБ, но содержащую [³²P]-ортофосфат (8 МБк). Через 1 ч удаляли 1 мл питательной среды и вносили форсколин («Alexis Biochemicals», США) до 10 мкМ, омегаевую кислоту («LC Laboratories», США) до 1 мкМ и ингибитор фосфодиэстеразы IBMX («Loba Feinchemie GmbH», Австрия) до 100 мкМ. В отдельные чашки вносили дополнительно ингибитор ПКА KT5720 («Calbiochem», США) до конечной концентрации 1 мкМ. Клетки инкубировали в течение 40 мин при 37° в атмосфере 5%-ного CO₂. В контрольные чашки вносили соответствующий объем растворителя (диметилсульфоксид, ДМСО, «Sigma», США). Клетки промывали холодным ФСБ (фосфатно-солевой буфер) и лизировали в 300 мкл буфера, содержащего 100 мМ Tris-HCl, рН 8,0, 1 М NaCl, 1 мМ ЭДТА, 0,1% Triton X-100, ингибиторы протеаз («Roche», Швейцария) и фосфатаз («Thermo Scientific», США). Клеточную ДНК разрушали механически, пропуская через иглу туберкулинного шприца. Нерастворимую фракцию отделяли центрифугированием при 13 000 об/мин при 4° на настольной центрифуге. Надосадочную жидкость инкубировали с 50 мкл Strep-

Tactin сефарозы в течение 1 ч при 4°. Затем зерна сефарозы промывали буфером, содержащим 100 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 150 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА; вносили 50 мкл 1× буфера для Ds-Na-электрофореза по Лэммли, кипятили в течение 3 мин, растворимую фракцию разделяли в 10%-ном ПААГ в присутствии Ds-Na и осуществляли электроперенос на фильтры PVDF. Фильтр высушивали, окрашивали красителем Ponceau S и экспонировали в кассету Storage Phosphor Screen для визуализации. Интенсивность радиоактивного сигнала, включенного в N27-157, анализировали с помощью прибора Storm Phosphoimager («Molecular Dynamics», США). Полученные изображения обрабатывали с помощью программного обеспечения ImageJ («NIH», США). Тот же PVDF-фильтр затем обрабатывали моноклональными антителами против Flag-последовательности и визуализировали методом хемилюминесценции для нормализации сигнала радиоактивного фосфата на общее содержание N27-157. В отдельных экспериментах первичные антитела против Flag-последовательности и вторичные антитела снимали с PVDF-фильтров по методу, предложенному Йонг и Стэнли [24], и обрабатывали моноклональными антителами против фосфосерина.

Иммунофлуоресцентный анализ. Клетки на стеклянных подложках фиксировали 3,7%-ным раствором формальдегида в ФСБ, пермеабелизовали 1%-ным раствором Triton X-100 в ФСБ и инкубировали с антителами против Flag-последовательности и вторичными антителами, мечеными Alexa Fluor 488, и TRITC-меченым фаллоидином («Molecular Probes», США). Иммунофлуоресцентные изображения получали с помощью микроскопа Zeiss Axiovert 200 («Zeiss», Германия), оборудованного камерой AxioCam с охлаждением, и программного обеспечения Axiovision версия 3.1. Компьютерную обработку изображений проводили с помощью программного обеспечения Adobe Photoshop версия 6.0 («Adobe Systems», США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

N-концевой актинсвязывающий участок КЛЦМ210. Внутриклеточное распределение содержащего Flag-последовательность фрагмента N27-157 исследовали в трансфицированных клетках HeLa. Как представлено на рис. 2, а–в (см. цветную вклейку), в распластанных интерфейсных клетках N27-157 локализуется вблизи микрофиламентов, визуализируемых TRITC-меченым фаллоидином (стрелки). В округлых митотических клетках (метафаза) антитела про-

тив Flag-последовательности локализируются совместно с содержащими F-актин выростами клеточной мембраны и не обнаруживаются в центральной части цитоплазмы (рис. 2, г–е).

Участки фосфорилирования ПКА в N-концевом домене КЛЦМ210. N-концевой актинсвязывающий участок КЛЦМ210 содержит несколько мотивов типа R/KxS (где x – любой а.о.), потенциально узнаваемых ПКА. Участки, фосфорилируемые ПКА в N-концевом домене КЛЦМ210 курицы, определяли методом масс-спектрометрии с использованием более протяженного актинсвязывающего участка КЛЦМ210, фрагмента N201 [11]. ПКА включала 1,5–2,0 моль фосфата на 1 моль N201 *in vitro* (данные не представлены). Анализ масс-спектров показал, что фосфорилированию подвергаются остатки S140 и S149 в составе одного фосфопептида ¹³⁴TPGGRLSVPPVENHRPSI¹⁵⁷WGESP¹⁵⁷PK, образующегося из фрагмента N201. Отношение «масса/заряд» для пептида составило 914,5, что соответствует трехзарядному иону пептида с массой 2740 Да. Фосфорилируемые остатки определяли по потере нейтральных частиц дочерними ионами, включавшими подчеркнутые остатки серина.

ПКА и протеинкиназа Аугога В фосфорилируют идентичные остатки в N-концевом актинсвязывающем участке КЛЦМ210. Учитывая, что более короткий актинсвязывающий фрагмент КЛЦМ210, N27-157, включает участки фосфорилирования ПКА, идентифицированные во фрагменте N201, дальнейшие исследования роли фосфорилирования этих остатков проводили с использованием фрагмента N27-157. Для подтверждения участков фосфорилирования S140 и S149 N27-157 заменяли на остатки аланина. Рекомбинантный N27-157 дикого типа и его двойной аланиновый мутант фосфорилировали *in vitro* ПКА и протеинкиназой Аугога В. По результатам включения радиоактивного фосфата N27-157 дикого типа являлся более хорошим субстратом для ПКА и протеинкиназы Аугога В (рис. 3, а). ПКА (рис. 3, а, слева) включала $1,730 \pm 0,116$ моль фосфата на 1 моль N27-157 и $0,545 \pm 0,037$ моль фосфата на 1 моль N27-157(S140A, S149A). Протеинкиназа Аугога В (рис. 3, а, справа) включала $0,287 \pm 0,030$ моль фосфата на 1 моль N27-157 и только $0,025 \pm 0,004$ моль фосфата на 1 моль N27-157(S140A, S149A). Таким образом, замещение S140 и S149 на остатки аланина приводило к выраженному снижению включения фосфата под действием ПКА и протеинкиназы Аугога В, подтверждая доступность этих участков для посттрансляционной модификации в N27-157. Следует отметить, что в присутствии ПКА включение радиоактивной метки во фрагмент N27-157(S140A, S149A) остается значи-

мым, указывая на возможное существование латентного(ых) участков фосфорилирования.

ПКА участвует в фосфорилировании N-концевого актинсвязывающего участка КЛЦМ210 в клетках HeLa. Для оценки фосфорилирования N27-157 в культивируемых клетках HeLa, транзитивно экспрессирующих N27-157 и N27-157(S140A, S149A), клетки культивировали в присутствии [³²P]-ортофосфата и агонистов и/или ингибиторов ПКА. Затем N27-157 выделяли из клеточных лизатов с помощью аффинного носителя и определяли отношение количества включенной радиоактивной метки к общему содержанию N27-157.

Из рис. 3, б (левая часть) видно, что в стандартных условиях культивирования в клетках HeLa в состав N25-157 включается радиоактивная метка. Одновременное воздействие активатора аденилатциклазы форсколина, ингибитора фосфодиэстеразы IBMX (с целью активации эндогенной ПКА), а также ингибитора серин-треониновых фосфатаз, ооадаевой кислоты, приводило к небольшому увеличению включения [³²P]-фосфата в N27-157. В присутствии ингибитора ПКА, KT5720, содержание фосфата в N27-157 снижалось в 1,5 раза относительно его содержания в стандартных условиях культивирования

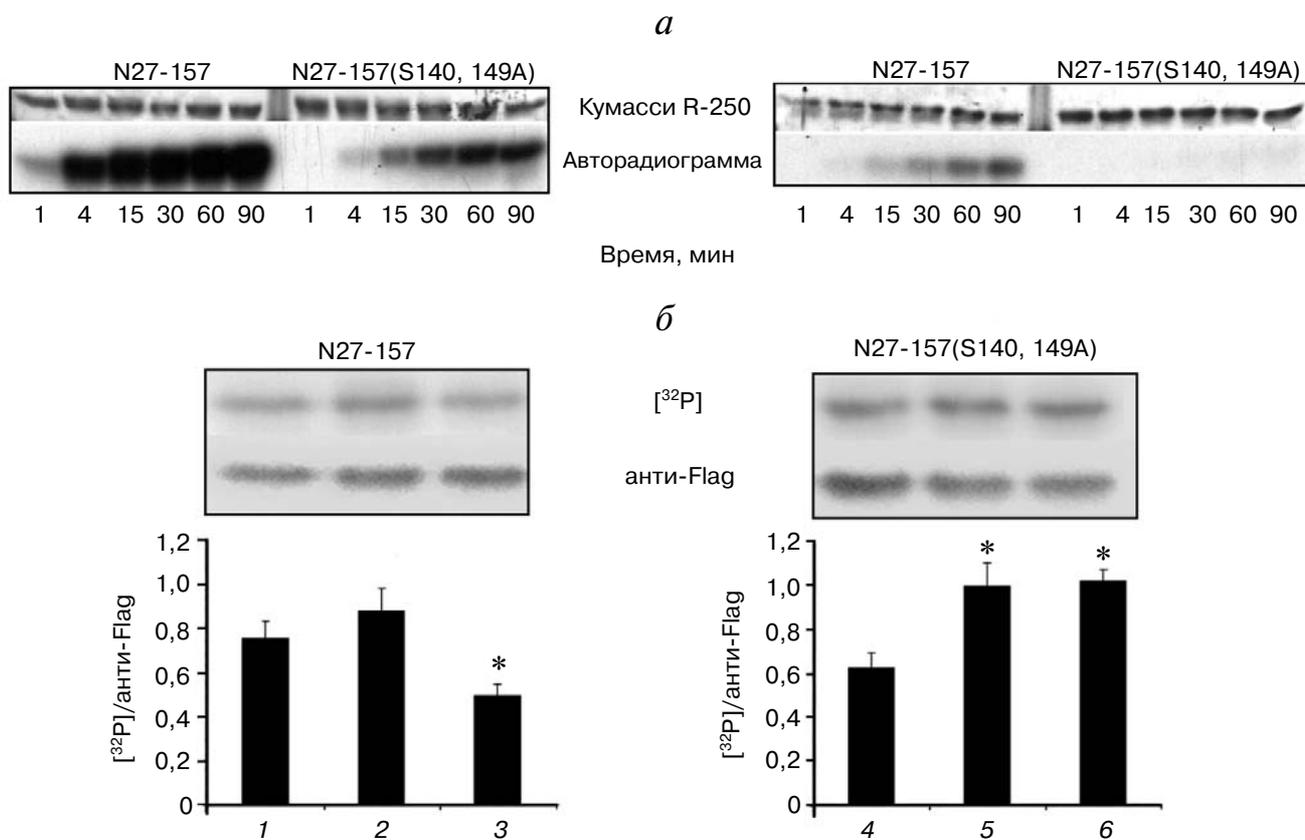


Рис. 3. Фосфорилирование N27-157 и N27-157(S140A, S149A) *in vitro* и в трансфицированных клетках HeLa. *а* – Рекombинантный N27-157 дикого типа и мутант N27-157(S140A, S149A) фосфорилировали *in vitro* ПКА (слева) или протеинкиназой Auk1 (справа) в присутствии γ -[³²P]АТФ, как описано в разделе «Методы исследования». Представлены типичные изображения гелей, окрашенных Кумасси R-250 (верхняя панель), и автордиограммы (нижняя панель); *б* – клетки HeLa, экспрессирующие сопоставимые количества N27-157 (1–3) или N27-157(S140A, S149A) (4–6), инкубировали в среде, содержащей [³²P]-фосфат, и вносили растворитель (1, 4), или стимулировали смесь, содержащей (указаны конечные концентрации) 10 мкМ форсколин, 1 мкМ ооадаевую кислоту и 100 мкМ IBMX (2, 5), или такой же смесью, дополнительно включавшей ингибитор ПКА KT5720 в конечной концентрации 1 мкМ (3, 6). Верхняя часть рисунка, верхний ряд – включение [³²P]-фосфата в N27-157 и N27-157(S140A, S149A) в клетках HeLa, визуализация с помощью Storm Phosphoimager. Верхняя часть рисунка, нижний ряд – общее содержание N27-157 и N27-157(S140A, S149A) в тех же образцах, визуализация с помощью антител против Flag-последовательности. Нижняя панель – гистограмма, отражающая нормализованное содержание радиоактивной метки [³²P] в N27-157 (1–3) и N27-157(S140A, S149A) (4–6) после обработки клеток в указанных выше условиях. Каждый столбец отражает отношение интенсивности сигнала радиоактивной метки к интенсивности сигнала, полученного при детекции с помощью иммуноблоттинга. Представлены средние значения \pm s.d., $n = 3$. * $p < 0,05$ относительно исходного уровня фосфорилирования

клеток и приблизительно в 1,8 раза относительно уровня, наблюдаемого при обработке клеток форсколином, IBMX и ооадаевой кислотой.

Уровень фосфорилирования N27-157(S140A, S149A) в клетках HeLa в стандартных условиях культивирования был ниже, чем уровень фосфорилирования N27-157 (рис. 3, б, справа). Однако при одновременной обработке клеток форсколином, IBMX и ооадаевой кислотой нормированное содержание радиоактивной метки в N27-157(S140A, S149A) возрастало сильнее, чем в случае N27-157, и оставалось неизменным даже в присутствии ингибитора ПКА. Аналогичные результаты были получены при определении уровня фосфорилирования N27-157 и N27-157(S140A, S149A) с помощью моноклональных антител против фосфосерина (данные не представлены).

Фосфорилирование под действием ПКА ослабляет связывание N27-157 с актином *in vitro*. Взаимодействие рекомбинантного очищенного N27-157 с F-актином подтверждали *in vitro* с помощью коседиментационного анализа. На рис. 4 показано, что в использованных условиях N27-157 обнаруживался в осадке только при внесении в

пробы F-актина. Фосфорилирование под действием ПКА *in vitro* изменяет взаимодействие N27-157 с очищенным F-актином, приводя к снижению количества фосфо-N27-157 в осадках с F-актином.

Фосфоимитирующие замены ослабляют взаимодействие N27-157 с цитоскелетом в культивируемых клетках и *in vitro*. Для выяснения роли фосфорилирования S140 и S149 в культивируемых клетках были выполнены фосфоимитирующие замены остатков S140 и S149 N27-157 на остатки аспарагиновой кислоты. Взаимодействие N27-157(S149D) и N27-157(S140D, S149D) с цитоскелетом в трансфицированных клетках HeLa исследовали с помощью дифференциальной экстракции фрагментов. Как представлено на рис. 5, а, N27-157 дикого типа равномерно распределялся между цитоскелетной и растворимой фракциями, полученными при лизисе клеток в присутствии детергента. В случае точечных фосфоимитирующих замен, как единичной по S149, так и двойной по S140 и S149, N27-157 обнаруживался преимущественно в растворимой фракции, указывая на ослабление взаимодействия с компонентами цитоскелета. Распределение

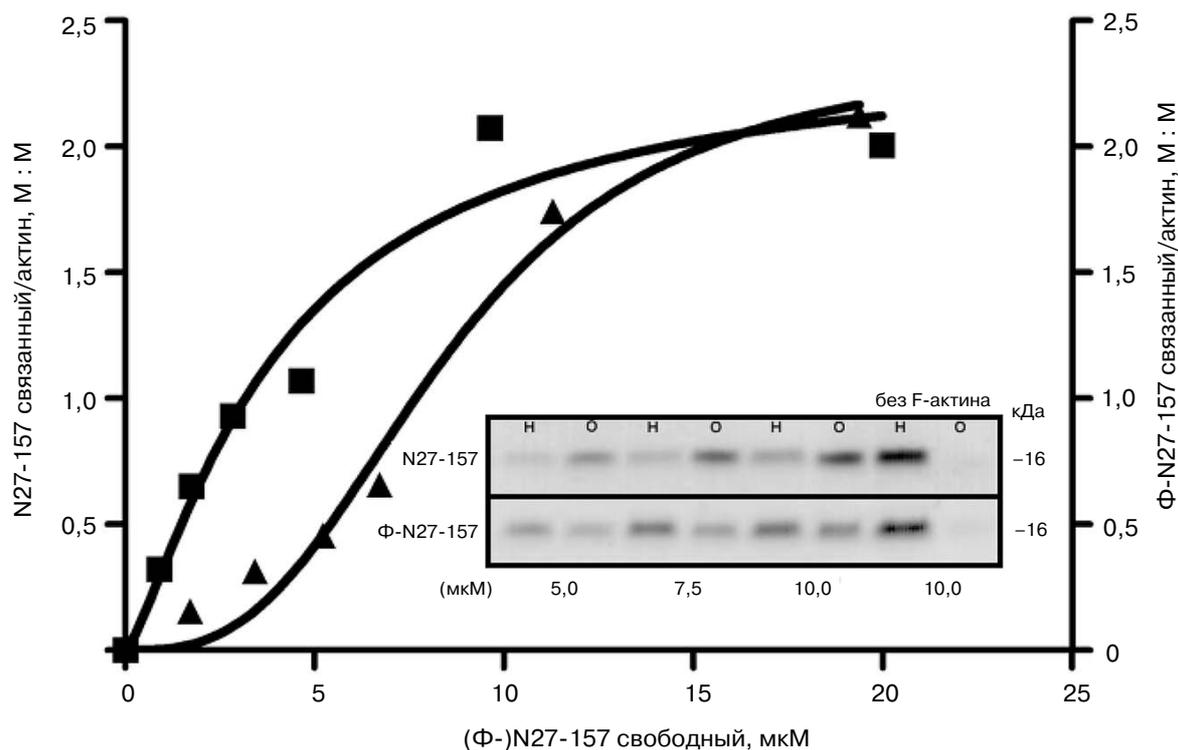


Рис. 4. Связывание N27-157 и фосфо-N27-157 с F-актином *in vitro*. Кривые связывания N27-157 (квадраты) и фосфо-N27-157 (Ф-N27-157, треугольники) с F-актином получали обработкой экспериментальных данных нелинейного сглаживания с помощью программного обеспечения GraphPad Prizm 4. Врезка – типичные окрашенные Кумасси R-250 гели, демонстрирующие распределение N27-157 и Ф-N27-157 (под действием ПКА) между надосадочной жидкостью (н) и осадком (о), содержащим F-актин, при коседиментационном анализе при указанных концентрациях фрагмента КЛЦМ210 (мкМ). Без F-актина – самоосаждение N27-157 и фосфо-N27-157

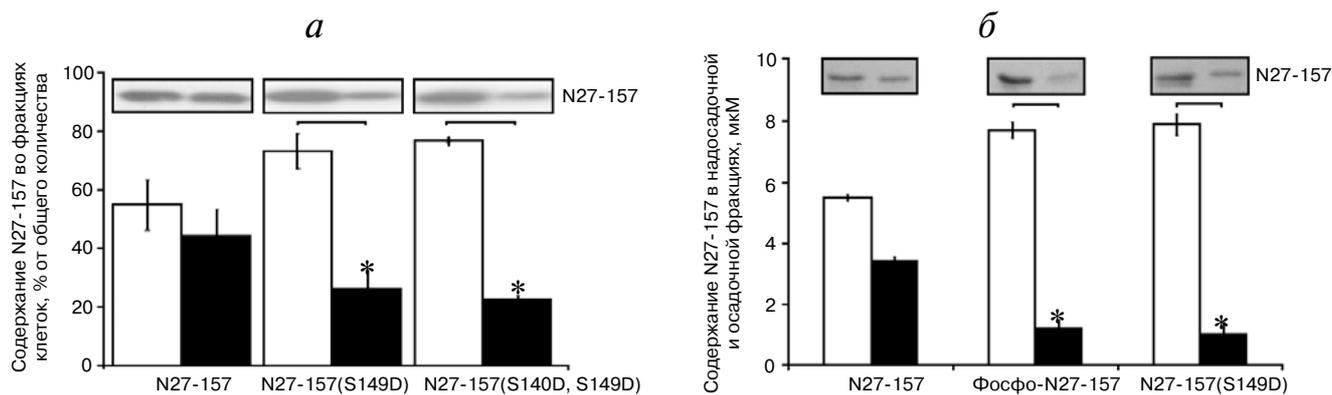


Рис. 5. Влияние фосфорилирования N27-157 дикого типа и фосфоимитирующих мутаций на связывание с актином в клетках и *in vitro*. *а* – Относительное распределение N27-157 и его фосфоимитирующих мутантов N27-157(S149D) и N27-157(S140D, S149D) между растворимой в присутствии детергента (белые столбцы) и цитоскелетной (черные столбцы) фракциями трансфицированных клеток HeLa определяли методом иммуноблоттинга с антителами против Flag-последовательности. Представлены средние значения \pm s.d., $n = 6$. * $p < 0,05$. Над столбцами приведены соответствующие иммуноблоты. *б* – Связывание N27-157, N27-157, фосфорилированного ПКА, и мутанта N27-157(S149D) с F-актином *in vitro*. Распределение N27-157 между надосадочной жидкостью (белые столбцы) и осадком F-актина (черные столбцы) вычисляли методом денситометрии гелей, окрашенных Кумасси R-250. Представлены средние значения \pm s.d., $n = 3$. Над столбцами приведены соответствующие типичные гели

N27-157(S149D) и N27-157(S140D, S149D) между растворимой и цитоскелетной фракциями было сопоставимым, свидетельствуя, по-видимому, о ведущей роли замены S149D на ослабление взаимодействия N27-157 с цитоскелетными структурами. Нормированное по ГАФД содержание N27-157 в трансфицированных клетках статистически не отличалось для N27-157 дикого типа и мутантов N27-157(S149D) и N27-157(S140D, S149D) (данные не представлены).

Влияние замены S149D подтверждали методом коседиментационного анализа *in vitro*. Как видно из рис. 5, б, фосфорилирование N27-157 дикого типа или введение точечной аминокислотной замены S149D оказывало сопоставимое ослабляющее действие на связывание N27-157 с актиновыми филаментами.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В рамках данного исследования *N*-концевой актинсвязывающий участок КЛЦМ210 был локализован в пределах первого IgG-подобного домена и следующей за ним короткой *C*-концевой последовательности (27–157 а.о. КЛЦМ210 курицы, что соответствует 33–162 а.о. в последовательности фермента человека). Показано, что взаимодействие данного участка с актином регулируется фосфорилированием по входящему в его состав мотиву для серин-треониновых протеинкиназ. Вызванное фосфорилированием изменение актинсвязывающих свойств наблю-

далось в условиях *in vitro* с использованием очищенных белков и в экспериментах с трансфицированными культивируемыми клетками. Реконбинантный белок N27-157, представляющий фрагмент КЛЦМ210, колокализировался с актиновыми филаментами в трансфицированных распластанных клетках HeLa, которые в норме характеризуются низким уровнем экспрессии эндогенной КЛЦМ210. При этом в ошарившихся митотических клетках HeLa N27-157 демонстрировал тенденцию к накоплению в выступах по периферии клеток, где сохранялись филаменты актина (рис. 2, см. цветную вклейку). Эти структуры, по-видимому, представляют собой якорные волокна, служащие для удержания клеток на субстрате при митозе [25].

Ранее нами было показано, что более протяженные *N*-концевые фрагменты КЛЦМ210 связываются с актином [8, 11]. В настоящей работе мы показали, что фрагмент N27-157 сохраняет способность связываться с актином в культивируемых клетках и *in vitro* (рис. 2 и 4). Эти данные свидетельствуют, что фрагмент N27-157 включает участок, достаточный для направления N27-157 к актинсодержащим филаментам в клетках. Другими авторами было показано, что *N*-концевой участок КЛЦМ210, включавший два первых *N*-концевых IgG-подобных домена, обладал способностью перешивать филаменты актина *in vitro* [26]. Возможно, это указывает на составную организацию *N*-концевого актинсвязывающего участка КЛЦМ210 аналогично структуре другого актинсвязывающего участка в

центральной части молекулы КЛЦМ210, который включает пять D(F/V)RxxL-мотивов. Полученные нами результаты указывают, что *N*-концевой актинсвязывающий участок или, по крайней мере, независимая часть предположительно составного *N*-концевого актинсвязывающего участка, располагается в пределах N27-157. Анализ последовательности N27-157 позволил выявить шестичленный участок, EHRPSI, который по аминокислотному составу сходен с актинсвязывающими мотивами DF/VRxxL, представленными в центральной части молекулы КЛЦМ210 и отвечающими за прочное взаимодействие с актином [27, 28]. Следует отметить, что последовательность EHRPSI консервативна у птиц, грызунов и человека. Наличие единичного DF/VRxxL-подобного мотива в *N*-концевом актинсвязывающем участке против пяти DF/VRxxL-мотивов в центральной части молекулы согласуется с существенными различиями в средстве [8–11] этих участков к актину. В этой связи *N*-концевой участок менее прочного связывания с актином может быть вовлечен в образование короткоживущих связей с соседними филаментами актина, тогда как центральный актинсвязывающий участок прочно удерживает КЛЦМ210 на одном филаменте. Принимая модель структурной организации КЛЦМ210, согласно которой уникальная *N*-концевая последовательность представляет подвижную цепочку из шести IgG-подобных доменов, соединенных неструктурированными участками, можно предположить, что КЛЦМ210 содержит два удаленных друг от друга актинсвязывающих участка. В таком случае КЛЦМ210 можно рассматривать как молекулу, способную перешивать удаленные филаменты актина и участвовать в формировании непрочной сети актиновых филаментов. Такая модель подтверждается полученными ранее данными электронной микроскопии, где полноразмерный уникальный для КЛЦМ210 *N*-концевой домен приводил к образованию актиновой сети и пучков актиновых филаментов [8]. Следовательно, в этом отношении в клетке КЛЦМ210 может дополнять функции другого высокомолекулярного актинсвязывающего белка филamina [29] и совместно с ним регулировать локальные переходы цитоплазмы типа «гель–золь».

Биоинформационный анализ *N*-концевого актинсвязывающего участка КЛЦМ210 позволил выявить несколько мотивов, потенциально узнаваемых ПКА, однако экспериментально в данной работе было подтверждено фосфорилирование только по остаткам S140 и S149. Оба этих остатка располагаются в области, соединяющей первый и второй IgG-подобные домены КЛЦМ210. Остаток S149 входит в состав предполагаемого ак-

тинсвязывающего мотива ¹⁴⁵EHRPSI¹⁵⁰. Ослабление связывания КЛЦМ210 с актином при фосфорилировании S140/149 указывает на потенциальную значимость данного фосфорилирования и возможность сигнализации посредством других внутриклеточных каскадов. В пользу значимости этих участков фосфорилирования свидетельствует также ослабление связи N27-157 с цитоскелетом в трансфицированных клетках HeLa при фосфоимитирующих заменах S149D и S140D, S149D (рис. 5, а). Эксперименты *in vitro* с использованием N27-157(S149D) и N27-157 дикого типа, фосфорилированного ПКА (рис. 5, б), дают основания полагать, что фосфорилирование S149 оказывает более выраженное влияние на взаимодействие N27-157 с актином, тогда как фосфорилирование по S140 и другим оставшимся неустановленным остаткам S/T в составе N27-157 оказывает незначительное влияние.

Установление молекулярных механизмов, обуславливающих влияние фосфорилирования на взаимодействие КЛЦМ210 с актином, требует дальнейших исследований. Тем не менее полученные в данной работе результаты согласуются с простой моделью, согласно которой фосфорилируемый остаток располагается в пределах остатков, вовлеченных во взаимодействие КЛЦМ210 с актином, или в непосредственной близости с ними. Дополнительным аргументом в пользу физиологической значимости данной посттрансляционной модификации, несущей значимые функциональные последствия в различных экспериментальных моделях, может служить обнаружение фосфорилированного остатка, гомологичного S149 КЛЦМ210, при протеомном скрининге тканей головного мозга мыши [18, 19] (см. также <http://www.phosphosite.org/proteinAction.do?id=15552&showAllSites=true>).

Наличие в *N*-концевом домене КЛЦМ210 участков связывания с актином и участков фосфорилирования, непосредственно способных модулировать актинсвязывающие свойства, служит убедительным аргументом в пользу ключевой роли *N*-концевого домена КЛЦМ210 в реализации функций данного фермента в различных внутриклеточных процессах. В то же время клетка располагает целым рядом потенциальных возможностей усложнить и внести избирательность в клеточный ответ. Так, например, активация ПКА под действием других сигнальных путей может привести к фосфорилированию остатков S140 и S149, препятствуя фосфорилированию по участкам в последовательности N27-157, потенциально узнаваемым другими протеинкиназами. Экспериментальные данные, полученные в данной работе при использовании двойной аланиновой замены остатков S140 и S149, согласуются

с возможностью существования таких латентных участков фосфорилирования. Вместе с тем время возникновения сигнала может играть решающую роль в выборе между протеинкиназами, фосфорилирующими одни и те же остатки в зависимости от преобладающей активности того или иного сигнального пути. Примером в этом отношении может служить протеинкиназа Аугога В, способная фосфорилировать *N*-концевой домен КЛЦМ210 [17]. В данной работе мы показали, что протеинкиназа Аугога В может фосфорилировать N27-157, но не фосфорилирует N27-157 с заменами S140A, S149A. Как ПКА, так и протеинкиназа Аугога В способны модифицировать одни и те же остатки в *N*-концевом домене КЛЦМ210, однако выбор между ними может быть обусловлен физиологическими условиями, т.е. зависит от жизненного цикла клетки или от внешнего стимула. Протеинкиназа Аугога В наиболее активна в митозе, тогда как ПКА не имеет такого рода ограничений и может служить проводником сигнала, возникающего при повышении цАМФ в интерфазных клетках. Таким образом, ПКА и протеинкиназа Аугога В могут составлять минимальный набор протеинкиназ, необходимых для фосфорилирования КЛЦМ210 на всех стадиях жизненного цикла клетки.

В настоящей работе выполнено более точное картирование локализации актинсвязывающего участка в уникальном для КЛЦМ210 *N*-концевом домене, и в той же области фермента установлены функциональные участки фосфорилирования. Показано, что серин/треониновые протеинкиназы Аугога В и ПКА способны специфически модифицировать эти участки. продемонстрировано влияние фосфорилирования на связывание КЛЦМ210 с актином *in vitro* и компонентами цитоскелета в культивируемых клетках. Полученные результаты дополняют накапливающиеся данные о функциях некаталитических участков КЛЦМ210 и создают основу для дальнейших исследований, целью которых является описание молекулярных механизмов контроля активности данного ключевого регуляторного фермента.

Авторы признательны О.В. Степановой за помощь на начальных этапах иммунофлуоресцентных исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты 08-04-01158 и 11-04-01343, В.П. Ширинский; 12-04-32265, Е.Л. Вилиткевич).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Watterson, D.M., Collinge, M., Lukas, T.J., Van Eldik, L.J., Birukov, K.G., Stepanova, O.V., and Shirinsky, V.P. (1995) Multiple gene products are produced from a novel protein kinase transcription region, *FEBS Lett.*, **373**, 217–220.
2. Birukov, K.G., Schavocky, J.P., Shirinsky, V.P., Chibalina, M.V., Van Eldik, L.J., and Watterson, D.M. (1998) 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.*, **70**, 402–413.
3. Clayburgh, D.R., Rosen, S., Witkowski, E.D., Wang, F., Blair, S., Dudek, S., Garcia, J.G., Alverdy, J.C., and Turner, J.R. (2004) A differentiation-dependent splice variant of myosin light chain kinase, MLCK1, regulates epithelial tight junction permeability, *J. Biol. Chem.*, **279**, 55506–55513.
4. Gallagher, P.J., Garcia, J.G., and Herring, B.P. (1995) Expression of a novel myosin light chain kinase in embryonic tissues and cultured cells, *J. Biol. Chem.*, **270**, 29090–29095.
5. Garcia, J.G., Lazar, V., Gilbert-McClain, L.I., Gallagher, P.J., and Verin, A.D. (1997) Myosin light chain kinase in endothelium: molecular cloning and regulation, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **16**, 489–494.
6. Xu, J., Gao, X.P., Ramchandran, R., Zhao, Y.Y., Vogel, S.M., and Malik, A.B. (2008) Nonmuscle myosin light-chain kinase mediates neutrophil transmigration in sepsis-induced lung inflammation by activating β 2 integrins, *Nat. Immunol.*, **9**, 880–886.
7. Shirinsky, V.P., Vorotnikov, A.V., Birukov, K.G., Nanaev, A.K., Collinge, M., Lukas, T.J., Sellers, J.R., and Watterson, D.M. (1993) A kinase-related protein stabilizes unphosphorylated smooth muscle myosin minifilaments in the presence of ATP, *J. Biol. Chem.*, **268**, 16578–16583.
8. 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. (1999) Unique sequence of a high molecular weight myosin light chain kinase is involved in interaction with actin cytoskeleton, *FEBS Lett.*, **463**, 67–71.
9. Kudryashov, D.S., Stepanova, O.V., Vilitkevich, E.L., Nikonenko, T.A., Nadezhdina, E.S., Shanina, N.A., Lukas, T.J., Van Eldik, L.J., Watterson, D.M., and Shirinsky, V.P. (2004) Myosin light chain kinase (210 kDa) is a potential cytoskeleton integrator through its unique *N*-terminal domain, *Exp. Cell Res.*, **298**, 407–417.
10. Smith, L., Su, X., Lin, P., Zhi, G., and Stull, J.T. (1999) Identification of a novel actin binding motif in smooth muscle myosin light chain kinase, *J. Biol. Chem.*, **274**, 29433–29438.
11. Вилиткевич Е.Л., Кудряшов Д.С., Степанова О.В., Ширинский В.П. (2004) Новый актинсвязывающий участок высокомолекулярной киназы легких цепей миозина, *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*, **90**, 577–585.
12. Birukov, K.G., Csontos, C., Marzilli, L., Dudek, S., Ma, S.F., Bresnick, A.R., Verin, A.D., Cotter, R.J., and Garcia, J.G. (2001) Differential regulation of alternatively spliced endothelial cell myosin light chain kinase isoforms by p60(Src), *J. Biol. Chem.*, **276**, 8567–8573.
13. Dudek, S.M., Birukov, K.G., Zhan, X., and Garcia, J.G. (2002) Novel interaction of cortactin with endothelial cell myosin light chain kinase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **298**, 511–519.
14. Shin, D.H., Chun, Y.S., Lee, K.H., Shin, H.W., and Park, J.W. (2009) Arrest defective-1 controls tumor cell behavior

- by acetylating myosin light chain kinase, *PLoS One*, **4**, e7451.
15. Takizawa, N., Ikebe, R., Ikebe, M., and Luna, E.J. (2007) Supervillin slows cell spreading by facilitating myosin II activation at the cell periphery, *J. Cell Sci.*, **120**, 3792–3803.
 16. Wadgaonkar, R., Dudek, S.M., Zaiman, A.L., Linz-McGillem, L., Verin, A.D., Nurmukhambetova, S., Romer, L.H., and Garcia, J.G. (2005) Intracellular interaction of myosin light chain kinase with macrophage migration inhibition factor (MIF) in endothelium, *J. Cell. Biochem.*, **95**, 849–858.
 17. Dulyaninova, N.G., and Bresnick, A.R. (2004) The long myosin light chain kinase is differentially phosphorylated during interphase and mitosis, *Exp. Cell Res.*, **299**, 303–314.
 18. Huttlin, E.L., Jedrychowski, M.P., Elias, J.E., Goswami, T., Rad, R., Beausoleil, S.A., Villen, J., Haas, W., Sowa, M.E., and Gygi, S.P. (2010) A tissue-specific atlas of mouse protein phosphorylation and expression, *Cell*, **143**, 1174–1189.
 19. Goswami, T., Li, X., Smith, A.M., Luderowski, E.M., Vincent, J.J., Rush, J., and Ballif, B.A. (2012) Comparative phosphoproteomic analysis of neonatal and adult murine brain, *Proteomics*, **12**, 2185–2189.
 20. Spudich, J.A., and Watt, S. (1971) The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin, *J. Biol. Chem.*, **246**, 4866–4871.
 21. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680–685.
 22. Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4350–4354.
 23. Lukas, T.J., Wang, A.L., Yuan, M., and Neufeld, A.H. (2009) Early cellular signaling responses to axonal injury, *Cell Commun. Signal.*, **7**, 5.
 24. Yeung, Y.G., and Stanley, E.R. (2009) A solution for stripping antibodies from polyvinylidene fluoride immunoblots for multiple reprobing, *Anal. Biochem.*, **389**, 89–91.
 25. Mitchison, T.J. (1992) Actin based motility on retraction fibers in mitotic PtK2 cells, *Cell Motil. Cytoskeleton*, **22**, 135–151.
 26. Yang, C.X., Chen, H.Q., Chen, C., Yu, W.P., Zhang, W.C., Peng, Y.J., He, W.Q., Wei, D.M., Gao, X., and Zhu, M.S. (2006) Microfilament-binding properties of N-terminal extension of the isoform of smooth muscle long myosin light chain kinase, *Cell Res.*, **16**, 367–376.
 27. Smith, L., Parizi-Robinson, M., Zhu, M.S., Zhi, G., Fukui, R., Kamm, K.E., and Stull, J.T. (2002) Properties of long myosin light chain kinase binding to F-actin *in vitro* and *in vivo*, *J. Biol. Chem.*, **277**, 35597–35604.
 28. Poperechnaya, A., Varlamova, O., Lin, P.J., Stull, J.T., and Bresnick, A.R. (2000) Localization and activity of myosin light chain kinase isoforms during the cell cycle, *J. Cell Biol.*, **151**, 697–708.
 29. Stossel, T.P., Condeelis, J., Cooley, L., Hartwig, J.H., Noegel, A., Schleicher, M., and Shapiro, S.S. (2001) Filamins as integrators of cell mechanics and signalling, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2**, 138–145.

PHOSPHORYLATION REGULATES THE INTERACTION OF 210-kDa MYOSIN LIGHT CHAIN KINASE N-TERMINAL DOMAIN WITH ACTIN CYTOSKELETON

E. L. Vilitkevich¹, A. Y. Khapchaev¹, D. S. Kudryashov², A. V. Nikashin¹, J. P. Schavocky³, T. J. Lukas³, D. M. Watterson³, V. P. Shirinsky^{1*}

¹ *Russian Cardiology Research and Production Center, ul. 3rd Cherepkovskaya 15a, Moscow, 121552 Russia; fax: +7(495)414-6719, E-mail: shirinsky@cardio.ru*

² *Ohio State University, Columbus, OH 43210, USA*

³ *Northwestern University, Chicago, IL 60611, USA*

Received May 26, 2015
Revision received June 20, 2015

High molecular weight myosin light chain kinase (MLCK210) is a multifunctional protein involved in myosin II activation and integration of cytoskeletal components in cells. MLCK210 possesses actin-binding regions both in the central part of the molecule and in its N-terminal tail domain. In HeLa cells, mitotic protein kinase Aurora B was suggested to phosphorylate MLCK210 N-terminal tail at serine residues (Dulyaninova and Bresnick, *Exp. Cell Res.*, 2004), but the functional significance of the phosphorylation was not established. We report here that *in vitro*, the N-terminal actin-binding domain of MLCK210 is located within residues 27–157 (N27-157, avian MLCK210 sequence), and it is phosphorylated by cAMP-dependent protein kinase (PKA) and Aurora B at serine residues 140/149, leading to a decrease in N27-157 binding to actin. The same residues are phosphorylated in a PKA-dependent manner in transfected HeLa cells. Furthermore, in transfected cells, phosphomimetic mutants of N27-157 showed reduced association with the detergent-stable cytoskeleton, whereas *in vitro* the single S149D mutation reduced N27-157 association with F-actin to a similar extent as that achieved by N27-157 phosphorylation. Altogether, our results indicate that phosphorylation of MLCK210 at distinct serine residues, mainly at S149, attenuates the interaction of MLCK210 N-terminus with the actin cytoskeleton and might serve to regulate MLCK210 microfilament cross-linking activity in cells.

Key words: 210-kDa myosin light chain kinase, phosphorylation-dependent actin binding, protein interactions, cAMP-dependent protein kinase, Aurora B