

КИНАЗА ЛЕГКИХ ЦЕПЕЙ МИОЗИНА MYLK1: АНАТОМИЯ, ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ, ФУНКЦИИ И МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ

©2016 г. А. Ю. ХАПЧАЕВ^{1,2}, В. П. ШИРИНСКИЙ¹

¹Российский кардиологический научно-производственный комплекс
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва;

²Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова,
факультет фундаментальной медицины, Москва

I. Введение. II. Классификация и обозначения. III. Организация сложного гена *mylk1* и контроль транскрипции. IV. Доменная структура КЛЦМ. V. Белок-белковые взаимодействия продуктов гена *mylk1*. VI. Посттрансляционные модификации продуктов гена *mylk1*. VII. Участие КЛЦМ/KRP в физиологических реакциях клеток. VIII. Участие КЛЦМ в патологических процессах. IX. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Целью настоящего обзора является объединение, анализ и обобщение данных в области молекулярных и клеточно-биологических исследований киназы легких цепей миозина (КЛЦМ) с включением в рассмотрение самых последних результатов, которые не вошли в более ранние обзоры [1–10].

Фермент КЛЦМ был впервые обнаружен около 40 лет назад в скелетных и гладких мышцах [11, 12]. С тех пор знания о нем претерпели значительную эволюцию. Сегодня известно, что в геноме позво-

Принятые сокращения: КаМ – кальмодулин; КЛЦМ – киназа легких цепей миозина; МАП-киназа – митоген-активируемая протеинкиназа; ПКА – цАМФ-зависимая протеинкиназа, протеинкиназа А; ПТМ – посттрансляционная модификация; РЛЦ – регуляторные легкие цепи; ФЛЦМ – фосфатаза легких цепей миозина; Erk1/2 – extracellular regulated kinase-1/2; IFN γ – интерферон гамма; IL-1 β – интерлейкин-1бета; KRP – kinase related protein; MYPT1 – myosin phosphatase target subunit 1; ROCK – RhoA-associated protein kinase; TNF α – фактор некроза опухолей альфа; ZIPK – zipper-interacting protein kinase.

Адрес для корреспонденции: askerkhapcha@gmail.com

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ 16-04-01742; 14-04-01813 и РНФ 14-35-00026 (раздел VII, подраздел «Экзоцитоз», раздел VIII, подраздел «Резистентность к инсулину и диабет»).

ночных есть не менее трех генов, кодирующих КЛЦМ. Ген *mylk2* кодирует скелетномышечную КЛЦМ, а ген *mylk3* – сердечную КЛЦМ [13, 14]. Эти киназы специфично экспрессируются в обозначенных типах мышц. В отличие от этих генов ген *mylk1* устроен значительно сложнее [15, 16], и его многочисленные продукты распространены во многих, если не во всех клетках и тканях. Настоящий обзор посвящен рассмотрению именно гена *mylk1* и его продуктов – множественных изоформ КЛЦМ и, частично, некиназного белка KRP/телокина.

Первоначально считалось, что единственной функцией КЛЦМ является фосфорилирование 20 кДа регуляторных легких цепей (РЛЦ) миозина. Дальнейшие исследования показали, что в ряде случаев вклад КЛЦМ в обеспечение клеточных реакций определяется не столько ее ферментативной активностью, сколько способностью выступать в роли скаффолда, т.е. платформы для сборки макромолекулярных комплексов. Соотношение каталитической и скаффолдной активностей в КЛЦМ, в особенности, в ее высокомолекулярной изоформе, является чрезвычайно актуальным вопросом, ответ на который позволит значительно трансформировать взгляды на роль КЛЦМ в (пато)физиологии клетки.

КЛЦМ подвергается фосфорилированию другими протеинкиназами, а также может быть ацетилирована и метилирована. Современные методы протеомного анализа выявляют более 50 посттрансляционных модификаций (ПТМ) в структуре КЛЦМ, многие из которых реализуются *in vivo* (<http://www.phosphosite.org> [17]). При этом их функциональное значение установлено лишь в единичных случаях, также как и природа модифицирующих ферментов. Учитывая, что ПТМ белков часто имеют регуляторное значение *in vivo*, представляется важным изучить их роль в КЛЦМ в контексте регуляции клеточных функций. В настоящем обзоре систематизированы имеющиеся данные по ПТМ КЛЦМ и предложены направления дальнейших исследований в этой критической области.

Несмотря на то, что вопросы участия КЛЦМ в патологических процессах не являются центральной темой обзора, трансляционные тенденции в области исследований этого белка отражены в обзоре отдельным разделом, в котором также оценены перспективы использования КЛЦМ в качестве молекулярной мишени для создания новых лекарственных препаратов.

II. КЛАССИФИКАЦИЯ И ОБОЗНАЧЕНИЯ

Впервые КЛЦМ выделили из скелетных мышц [12], затем была выделена гладкомышечная форма КЛЦМ [11] и обнаружена высокомолекулярная КЛЦМ, включающая полную последовательность гладкомышечной КЛЦМ и содержащая уникальную N-концевую область [18]. Более того, С-концевой фрагмент гладкомышечной КЛЦМ экспрессируется как независимый белок KRP/телокин (см. ниже), не обладающий каталитической активностью [19]. Все три белковых продукта (две изоформы КЛЦМ и KRP/телокин) кодируются сложным геном *mylk*, изначально описанным термином «генетический локус» [18]. В литературе используется также обозначение *mylk1*, подчеркивающее различия с КЛЦМ из скелетной и сердечной мышц. В данном обзоре нумерация экзонов сохранена в соответствии с первой работой по характеристике гена *mylk1* [15], нумерация аминокислотных остатков соответствует высокомолекулярной КЛЦМ человека, включающей 1914 аминокислотных остатков. В геноме человека ген *mylk1* располагается в третьей хромосоме в области 3qcen-q21 [16] и захватывает около 270 тыс. п.о. ДНК [20, 21]. Специфичная для скелетных мышц КЛЦМ (skКЛЦМ) кодируется геном *mylk2* [14], а в сердечной мышце с гена *mylk3* экспрессируется специфичная сердечная изоформа КЛЦМ (saКЛЦМ) [13]. Кроме того, недавно обнаружена кальмодулин (CaM)-независимая сердечная изоформа КЛЦМ [22].

Для белковых продуктов гена *mylk1* в литературе встречаются различные обозначения, вносящие определенную путаницу. Так, синонимами «высокомолекулярной» (high molecular weight) КЛЦМ являются также названия «немышечная» (non-muscle), «тяжелая» (heavy), «большая» (long) или указывается молекулярная масса белка (210–220 кДа); для низкомолекулярной КЛЦМ используются названия «гладкомышечная» (smooth muscle), «легкая» (light), «малая» (small), «короткая» (short) или со ссылкой на молекулярную массу (108–155 кДа). Лишенный каталитической активности С-концевой 17 кДа фрагмент КЛЦМ [19] известен под названиями KRP (Kinase-Related Protein) и телокин (telos + kinase). На наш взгляд, с современными знаниями об устройстве и тканеспецифичности изоформ КЛЦМ, происходящих с гена *mylk1*, согласуются названия «высокомолекулярная» и «низкомолекулярная» КЛЦМ (в англоязычной литературе более короткими и удобными представляются термины «long MLCK», L-MLCK и «short MLCK», s-MLCK). Поскольку в литературе аббревиатура KRP иногда также используется для обозначения белков, родственных кинезину (Kinase-Related Proteins), мы будем использовать название KRP/телокин.

III. ОРГАНИЗАЦИЯ СЛОЖНОГО ГЕНА *MYLK1* И КОНТРОЛЬ ТРАНСКРИПЦИИ

Описанным белковым продуктам гена *mylk1* соответствуют три класса мРНК, например, у птиц 9,0, 5,5 и 2,7 тыс. п.о., соответственно [15, 18, 23] (рис. 1А). У млекопитающих размеры мРНК могут несколько отличаться [24]. Каждая мРНК возникает с независимого промотора, при этом промоторы s-КЛЦМ и KRP/телокина располагаются в интронных для L-КЛЦМ областях [25–27], обуславливая возникновение с соответствующих интронов уникальных 5'-некодирующих последовательностей мРНК. Таким образом, s-КЛЦМ и KRP/телокин используют более протяженные в 5'-область экзоны [25–27].

Рис. 1. Схема строения гена *mylk1* и регуляция его множественных промоторов.

А. Три класса мРНК транскрибируются с гена *mylk1*. Они кодируют изоформы KRP/телокина, s-КЛЦМ и L-КЛЦМ. KRP/телокин использует экзон 29А большего размера, чем экзон 29, используемый s-КЛЦМ и L-КЛЦМ. s-КЛЦМ использует экзон большего размера, чем экзон 15, используемый L-КЛЦМ. Экзон 11 (9 в более ранних работах), присутствующий в L-MLCK1, отсутствует в результате сплайсинга в L-MLCK2. Нумерация экзонов приводится по оригинальным работам. Размеры экзонов и интронов, а также расстояния здесь и ниже указаны не в масштабе.

Б. Регуляция промотора KRP/телокина. Позиция +1 соответствует старту мРНК телокина человека (chr3 reverse strand: 123,620,607). Нумерация нуклеотидов соответствует последовательности гена *mylk1* человека и основана на результатах исследований промотора KRP/телокина у кролика, мыши и крысы. Активаторы транскрипции и энхансеры показаны градициями зеленого цвета, ингибиторы и сайленсеры выделены красным и лиловым цветом. Зеленые стрелки обозначают стимулирующую активность, красные линии с кружком – ингибиторный эффект.

В. Регуляция промотора s-КЛЦМ. Нумерация нуклеотидов соответствует последовательности гена *mylk1* человека и основана на результатах исследований промотора s-КЛЦМ мыши. Позиция +1 соответствует началу мРНК s-MLCK человека (chr3 reverse strand: 123,701,003). Пунктирные линии обозначают, что эффекты миокардина существенно слабее, чем в случае промотора KRP/телокина. Для транскрипционных факторов Foxf1 и TEF показано связывание с промотором s-MLCK на основании их эффектов на этот промотор, однако точное место их связывания не определено. AR, рецептор андрогенов.

Г. Регуляция промотора L-КЛЦМ. Показана локализация гомологичных *цис*-элементов. Две указанные позиции +1 соответствуют участкам инициации транскрипции с двух независимых удаленных промоторов: мРНК NM_053025 (chr3 reverse strand 123,831,670) и NM_001321309 (chr3 reverse strand 123,884,253).

Детальное описание в тексте.

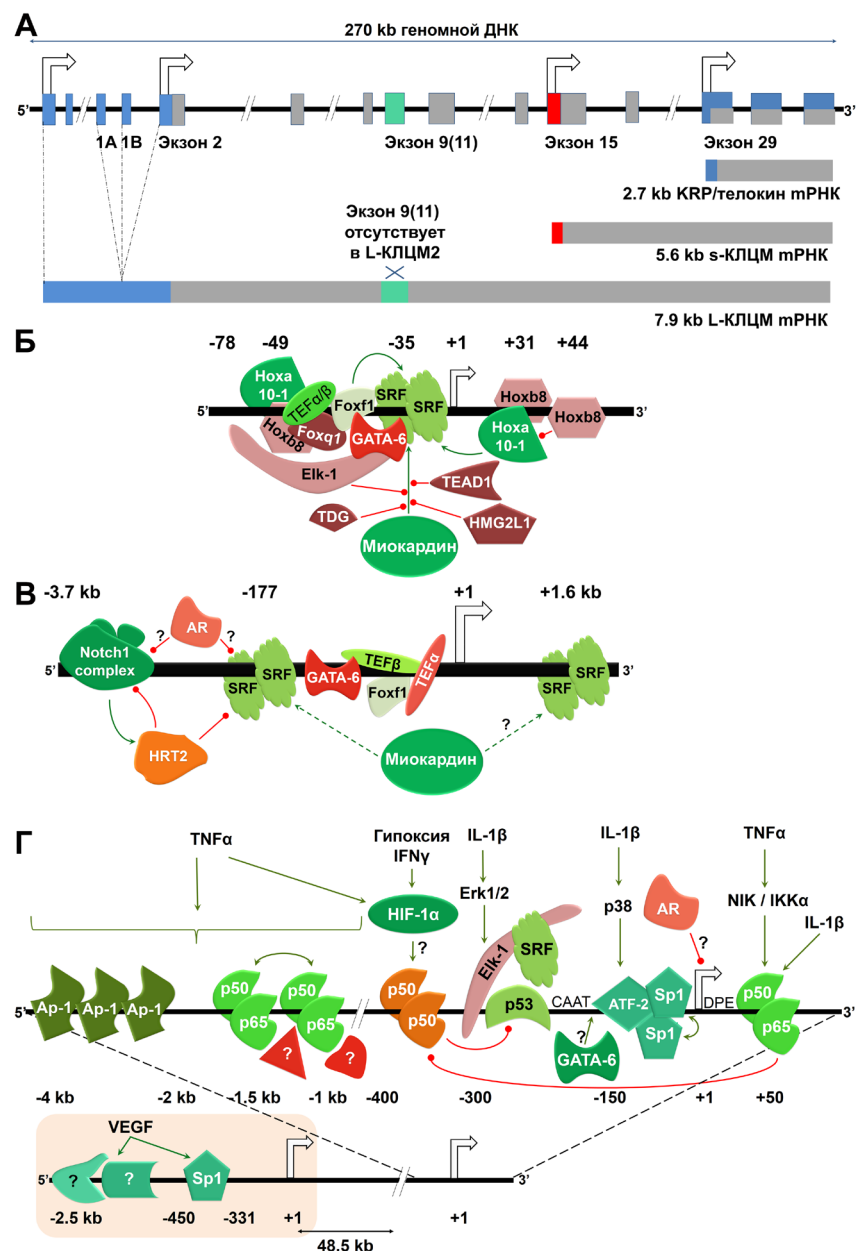


Рис. 1. Подпись к рис. см. на предыдущей стр.

ПРОМОТОР KRP/ТЕЛОКИНА

Промотор KRP/телокина (рис. 1Б) активен только в гладких мышцах взрослого организма [28]. Ведущую роль в экспрессии KRP/телокина у мышцы играет последовательность длиной 30 п.о., включающая А/Т-богатый участок и *цис*-элемент CC(AT)₆GG (CArG-бокс), связывающий транскрипционный фактор SRF [29]. Удаление CArG-бокса практически полностью подавляло экспрессию KRP/телокина, не затрагивая экспрессию s-КЛЦМ [30]. Активацию промотора KRP/телокина под действием SRF усиливает кофактор, миокардин [31].

В присутствии SRF и миокардина другим факторам, по-видимому, отводится второстепенная роль [32, 33]. Все описанные на сегодняшний день регуляторы промотора KRP/телокина связываются в непосредственной близости от участка связывания SRF, усиливая или ослабляя комплекс миокардина с SRF и, по-видимому, определяя различный уровень экспрессии KRP/телокина в разных типах гладких мышц. А/Т-богатая область связывает ряд энхансерных факторов: Ноха10-1 [32], близкородственные факторы TEF α и TEF β [33] и фактор Foxf1 [34]. С тем же участком взаимодействуют репрессорные факторы Foxq1 [35] и Hoxb8 [32]. Ноха10-1 и Hoxb8 конкурируют также за второй *цис*-элемент в 3'-области относительно старта транскрипции. Рядом располагается третий *цис*-элемент для Hoxb8. Фактор Ноха10-1, возможно, участвует в контроле экспрессии KRP/телокина в отдельных типах гладких мышц, например, в гладких мышцах матки и кишечника, а сайленсерный эффект родственных ему Ноха10-2 и Hoxb8, возможно, связан с регуляцией активности промотора KRP/телокина в неммышечных тканях [32].

Конкуренция с миокардином за связывание с SRF показана также для факторов GATA-6 [36] и Elk-1 [37], имеющих участки посадки на промоторе KRP/телокина рядом с CArG-боксом. Интересно отметить, что в промоторе KRP/телокина человека в гомологичном участке в консенсусном *цис*-элементе фактора GATA-6 присутствует замена: САТС вместо ТАТС. Насколько эта замена окажется важной для регуляторного влияния GATA-6 у человека остается неизвестным. Потенциальное ослабление эффекта GATA-6 у человека, возможно, компенсируется другими факторами, а также может объяснять следовую экспрессию KRP/телокина в сердце человека [38]. Конкурентными ингибиторами комплекса миокардин/SRF, для которых не обнаружены *цис*-элементы в промоторе, являются тимин-ДНК-гликозилаза (TDG) [39] и HMG2L1 [40]. Фактор TEAD1 аналогичным образом ингибирует промоторы ряда гладкомышечных белков, в том числе s-КЛЦМ, позволяя предположить его отрицательное влияние на промотор KRP/телокина [41].

ПРОМОТОР S-КЛЦМ

Промотор s-КЛЦМ (рис. 1B) не имеет классической ТАТА-последовательности, но демонстрирует ряд общих черт с промотором KRP/телокина. Минимальный промотор s-КЛЦМ располагается в небольшом (432 п.о.) интроне между экзонами 14 и 15. В промоторе s-КЛЦМ мыши CArG-бокс связывает SRF, обеспечивает базовую активность промотора и принципиально важен для экспрессии s-КЛЦМ. Влияние миокардина на промотор s-КЛЦМ выражено меньше, чем в случае промотора KRP/телокина [27, 31]. Интересно, что у спонтанно гипертензивных крыс в непосредственной близости с гомологичным CArG-боксом находится вставка из 12 п.о., благодаря которой SRF прочнее связывается с промотором s-КЛЦМ, отвечая за повышенную экспрессию s-КЛЦМ [42]. Фактор GATA-6, связываясь с промотором s-КЛЦМ мыши, оказывает супрессорное действие [27]. У человека, как и в случае промотора KRP/телокина, в гомологичном консенсусном участке связывания GATA-6 присутствует замена, позволяющая предположить менее значимую роль GATA-6 в регуляции экспрессии s-КЛЦМ у человека. Фактор Foxf1 активирует промотор s-КЛЦМ, однако фактор Foxq1 не влиял на экспрессию s-КЛЦМ [34]. Поскольку в промоторе KRP/телокина Foxf1 и Foxq1 конкурируют за связывание с одним *цис*-элементом, отсутствие эффекта Foxq1 на активность промотора s-КЛЦМ может объясняться влиянием дополнительных неустановленных факторов. Аналогичное объяснение можно дать тому факту, что активаторы промотора KRP/телокина TEF α и TEF β оказывают разнонаправленное действие на активность промотора s-КЛЦМ: TEF α подавляет, а TEF β усиливает экспрессию s-КЛЦМ в линейных гладкомышечных клетках A10 [33].

В промоторе s-КЛЦМ обнаружен второй CArG-бокс, располагающийся в 1-ом для s-КЛЦМ интроне и не оказывающий существенного влияния на экспрессию s-КЛЦМ в линейных гладкомышечных клетках A10 и фибробластах 10T1/2 [27], однако удаление участка интрона, включающего этот элемент, избирательно снижало экспрессию s-КЛЦМ в гладких мышцах у трансгенной мыши, не затрагивая экспрессию L-КЛЦМ и KRP/телокина [43].

В дополнение к регуляции промотора s-КЛЦМ комплексом SRF/миокардин в промоторе s-КЛЦМ мыши обнаружен консервативный *цис*-элемент CTGGGAA, ответственный за усиление промотора s-КЛЦМ регуляторным комплексом Notch1. Участие Notch1-сигналинга в экспрессии s-КЛЦМ подтверждается снижением экспрессии s-КЛЦМ в гладкомышечных клетках трансгенных мышей с нарушенным сигналингом Notch1 [44]. Комплекс Notch1 индуцирует также

фактор HRT2, ингибирующий комплекс SRF/миокардин и взаимодействие Notch1-комплекса со своим *цис*-элементом. Таким образом, влияние Notch1 на активность промотора s-КЛЦМ определяется интенсивностью сигнала самого Notch1 и имеет авторегуляторный характер [45].

ПРОМОТОР L-КЛЦМ

Промотор L-КЛЦМ (рис. 1Г) не содержит классической ТАТА-последовательности, однако картированы DPE-промотор и другие классические регуляторные *цис*-элементы, такие как СААТ-бокс и несколько элементов класса E-бокс. Базовую активность промотора в эпителиальных клетках независимо контролируют *цис*-элемент для связывания p53 [20] и два кооперативных участка связывания Sp1 [46]. В эпителиальных клетках воспалительные факторы интерферон гамма (IFN γ), фактор некроза опухолей альфа (TNF α) или интерлейкин-1бета (IL-1 β) индуцируют экспрессию L-КЛЦМ [20, 47], которая не зависит от факторов p53 [20] и Sp1 [46] и регулируется при участии фактора NF- κ B [20]. Так, действие репрессорного гомодимера NF- κ B p50/p50 отменяется связыванием гетеродимера NF- κ B p50/p65, отвечающего за индукцию промотора L-КЛЦМ в ответ на стимуляцию TNF α [48] или IL-1 β [49]. В активации гетеродимера p50/p65 в эпителиальных клетках участвует TNF α -зависимый каскад с участием протеинкиназ NIK и IKK α [50]. Вместе с тем, IL-1 β через каскад Erk1/2 активирует фактор Elk-1, который связывается со своим *цис*-элементом в минимальном промоторе L-КЛЦМ и активирует промотор [51], возможно, кооперируя с p65 NF- κ B. В передаче сигнала от IL-1 β участвует также каскад p38 MAP-киназ, активирующий фактор ATF-2 [52]. Возможно, факторы Elk-1 и ATF-2 функционируют скоординированно, поскольку независимое ингибирование каждого из них подавляет эффекты IL-1 β [51, 52]. В более удаленной 5'-области промотора обнаружены дополнительные энхансерные участки, два из которых связывают NF- κ B, а три других связывают Ap-1. Вместе с тем, имеются указания на существование в той же области неустановленных сайленсерных элементов [46]. Наличием описанной выше многокомпонентной системы регуляции промотора L-КЛЦМ может объясняться отсутствие эффектов фармакологического ингибирования NF- κ B на индукцию L-КЛЦМ при стимуляции эпителиальных клеток TNF α [47], а также снижение вклада NF- κ B и параллельное возрастание роли Ap-1 в активации промотора L-КЛЦМ при дифференцировке эпителиальных клеток [46]. Совместное действие TNF α и IFN γ существенно усиливает

индукцию L-КЛЦМ по сравнению с индивидуальным действием этих факторов [46], подтверждая комплексный контроль экспрессии L-КЛЦМ. Участком конвергенции сигналов $IFN\gamma$ и $TNF\alpha$ могут быть, например, фактор $HIF-1\alpha$ и его антагонист FIH . В условиях гипоксии, а также при стимуляции эпителиальных клеток $IFN\gamma$ или $TNF\alpha$ происходит активация $HIF-1\alpha$, коррелирующая с активацией экспрессии L-КЛЦМ, при этом специфическое подавление $HIF-1\alpha$ отрицательно влияло на экспрессию L-КЛЦМ. Однако прямого взаимодействия $HIF-1\alpha$ с промотором L-КЛЦМ не показано [53, 54].

Для эндотелиальных клеток описан второй «минимальный промотор» и участок инициации транскрипции, располагающиеся на расстоянии примерно 52 тыс. п.о. в 5'-области относительно описанных выше регуляторных элементов [21]. Расхождения с процитированными выше работами связаны, возможно, с наличием транскрипционных вариантов мРНК L-КЛЦМ, отличающихся 5'-некодирующей областью в эпителиальных и эндотелиальных клетках [21, 46]. Поэтому экзон 1A в описанных выше работах соответствует экзону 3 (по мРНК NM_053025) в работе [21], показавшей, что экспрессия L-КЛЦМ в эндотелиальных клетках человека в ответ на стимуляцию VEGF определяется связыванием фактора $Sp1$ в области -450...-331 п.о. относительно наиболее удаленного от кодирующей последовательности участка инициации транскрипции.

В дополнение к описанной выше регуляторной картине в гладкомышечных клетках A10 показано энхансерное действие $GATA-6$ на экспрессию L-КЛЦМ в противоположность сайленсерным эффектам $GATA-6$ на промоторы s-КЛЦМ и KRP/телокина [27]. Наконец, в регуляции гена *mylk1* могут участвовать андрогены. Так, в клетках рака простаты, экспрессирующих L-КЛЦМ и s-КЛЦМ, андрогены подавляли экспрессию обеих форм КЛЦМ [55].

ПОСТТРАНСКРИПЦИОННЫЙ КОНТРОЛЬ ПРОДУКТОВ ГЕНА MYLK1

МикроРНК представляют собой класс небольших эндогенных некодирующих РНК, участвующих в контроле уровня мРНК многих белков. В эндотелиальных клетках показана возможность отрицательной регуляции L-КЛЦМ при участии микроРНК *miR-374a*, *miR-374b*, *miR-1290*, *miR-520c-3p* и *miR-155* при этом их действие имеет аддитивный характер [56, 57]. Эти микроРНК связываются с 3'-некодирующей областью мРНК L-КЛЦМ, поэтому нельзя исключать их участия в регуляции мРНК s-КЛЦМ и KRP/телокина. У мышей с генетическим нокаутом микроРНК *miR-1* в кардиомиоцитах индуцируется экспрессия гладкомышечной изоформы миокардина и

KRP/телокина. Несмотря на то, что miR-1 способна непосредственно связываться с 3'-некодирующей областью мРНК KRP/телокина, общей для KRP/телокина и s-КЛЦМ, экспрессия последней в кардиомиоцитах не изменялась при нокауте miR-1 [58]. Возможно, эти различия связаны с большей зависимостью экспрессии KRP/телокина от миокардина (см. выше), однако нельзя исключать также влияния других регуляторных факторов. Для эндотелиальных клеток HUVEC показано, что стимуляция окисленными ЛПНП приводит к снижению уровня микроРНК miR-1 и активации экспрессии L-КЛЦМ, указывая, что низкий уровень экспрессии L-КЛЦМ в эндотелиальных клетках может быть, по крайней мере отчасти, обусловлен ингибиторным влиянием miR-1 [59]. В нескольких типах раковых клеток и у пациенток с раком молочной железы отмечено, что снижение уровня miR-200c коррелирует с повышением экспрессии L-КЛЦМ и усилением инвазивной способности клеток. Более того, miR-200c имеет участки посадки в 3'-некодирующей области мРНК L-КЛЦМ [60], видимо, ограничивая уровень экспрессии L-КЛЦМ и, возможно, других продуктов гена *mylk1*.

ПОЛИМОРФИЗМ ПРОДУКТОВ ГЕНА MYLK1

Как было отмечено выше, с гена *mylk1* возникает три класса мРНК, кодирующих L-КЛЦМ, s-КЛЦМ и KRP/телокин, в то же время для L-КЛЦМ, видимо, существует два промотора, определяющих разные участки инициации транскрипции в различных типах клеток и возможен альтернативный сплайсинг некодирующих экзонов 5'-нетранслируемой последовательности [21, 46]. Описаны сплайс-варианты мРНК L-КЛЦМ и KRP/телокина, затрагивающие кодирующую последовательность. Так, альтернативный сплайсинг 1 и 2 экзонов мРНК KRP/телокина приводит к возникновению дополнительного остатка Glu29 [38]. Для L-КЛЦМ человека описано несколько сплайс-вариантов, затрагивающих кодирующую последовательность, однако подтверждены только 2 белковых продукта: полноразмерная изоформа КЛЦМ1 и преимущественно экспрессирующаяся КЛЦМ2, не содержащая остатки 437–505 [61]. В дополнение к сплайс-вариантам L-КЛЦМ у человека обнаружен ряд однонуклеотидных полиморфизмов, в том числе выражающихся в аминокислотных заменах, например, Pro21His, Pro147Ser, Val261Ala, Ser1341Pro, Arg1450Gln, Ser1759Pro, предварительной терминации полипептидной цепи (Arg1480X) или модулирующих уровень экспрессии [62–66].

Существенной гетерогенностью характеризуется KRP/телокин. Было обнаружено три ацетилированных N-концевых последовательности, соответствующих модифицированным Ala2, Met3 или Ser8 KRP/телокина птиц, при этом преобладала наиболее короткая форма белка. Кроме того, из 6 кодируемых C-концевых остатков Glu в очищенном из ткани KRP/телокине их количество варьирует от 0 до 5 [67]. Поскольку C-концевая последовательность KRP/телокина важна для связывания с миозином, гетерогенность C-концевого участка может создавать пулы KRP/телокина с различным сродством к миозину, регулируя его способность конкурировать с КЛЦМ за связывание с миозином (см. ниже).

В антисмысловой цепи гена *mylk1* расположено два семейства некодирующих РНК [68]: MYLK-AS1, включающая 4 экзона, и более короткая MYLK-AS2, включающая 3 экзона. Интересно, что один из экзонов MYLK-AS1 перекрывается с кодирующей последовательностью *mylk1*, указывая на возможное участие MYLK-AS1 в регуляции s-КЛЦМ и L-КЛЦМ на посттранскрипционном уровне.

ТКАНЕСПЕЦИФИЧНАЯ ЭКСПРЕССИЯ БЕЛКОВЫХ ПРОДУКТОВ ГЕНА MYLK1

Независимая регуляция белковых продуктов гена *mylk1*, и остающиеся во многом неизученными регуляторные сигналы, контролируют тканеспецифичную экспрессию изоформ L-КЛЦМ, s-КЛЦМ и KRP/телокина.

KRP/телокин экспрессируется преимущественно в гладких мышцах, при этом в фазных гладких мышцах экспрессия существенно выше [15, 26, 69]. В небольших количествах KRP/телокин экспрессируется в сердечной мышце человека [38].

s-КЛЦМ демонстрирует универсальную экспрессию и присутствует практически во всех тканях [70]. В эмбриональный период экспрессия s-КЛЦМ низка и возрастает в постнатальный период в противоположность снижению экспрессии L-КЛЦМ [15, 71–73]. В некоторых типах тканей и клеток s-КЛЦМ и L-КЛЦМ экспрессируются совместно, например, в аорте птиц, откуда L-КЛЦМ была впервые выделена как белок [74, 75], и в нейтрофилах [76]. В эндотелии, эпителии, моноцитах и Т-клетках показано присутствие L-КЛЦМ [77–79], в то время как из тромбоцитов была выделена s-КЛЦМ с небольшой примесью L-КЛЦМ [80].

При анализе данных иммуноблоттинга тканей с антителами к КЛЦМ складывается впечатление, что L-КЛЦМ, как правило, лучше выявляется в тканях с высоким содержанием немышечных

клеток – эпителия, эндотелия, иммунных клеток, и относительно невысоким содержанием гладких мышц (легкие, печень, почки, селезенка) [73, 75]. При культивировании первичных клеток экспрессия L-КЛЦМ возрастает, полностью или частично замещая s-КЛЦМ [70, 71, 73]. Обе изоформы КЛЦМ в разном соотношении обычно присутствуют в линейных клетках, например, в клетках гладкомышечного происхождения A10, A7r5 и GbaSM-4 [74, 81], и немышечного происхождения HeLa, COS-7, 3T3 [73, 82, 83] и др. Раковая трансформация клеток также сопровождается изменением уровня экспрессии КЛЦМ, при этом в одних типах наблюдается снижение экспрессии [84, 85], а в других экспрессия возрастает [60, 86]. Учитывая описанную выше сложную регуляцию гена *mylk1*, различия в экспрессии его продуктов в тканях в различные периоды развития организма, а также при раковой трансформации и переводе клеток в культуру можно связать с изменением баланса регуляторных сигналов и факторов, контролирующих экспрессию этого гена.

IV. ДОМЕННАЯ СТРУКТУРА КЛЦМ

Все три белковых продукта гена *mylk1* используют одну рамку считывания, поэтому структура меньшего продукта полностью включена в структуру большего. На рис. 2 приведена схема строения самого протяженного белкового продукта, L-КЛЦМ; N-концевой Met1 s-MLCK соответствует Met923 L-КЛЦМ, а N-конец KRP/телокина соответствует Met1761 L-КЛЦМ. Биохимическая организация s-КЛЦМ и отдельные аспекты ее ферментативных свойств были суммированы ранее [7, 10]. В настоящей работе будут отмечены наиболее интересные и важные биохимические и структурные свойства s-КЛЦМ, рассмотрены новые данные, и больше внимания будет уделено уникальной области L-КЛЦМ, а также известным способам регуляции каталитических и неферментативных свойств КЛЦМ.

Каталитический домен располагается в центральной области s-КЛЦМ, гомологичен каталитическим доменам ряда других протеинкиназ и содержит консенсусную Mg^{2+} -АТФ-связывающую последовательность Gly-X-Gly-X-X-Gly-(X)₁₄-Lys [23], постоянно доступную для связывания Mg^{2+} -АТФ [87]. К N-концу от Mg^{2+} -АТФ-связывающего участка располагается кластер кислых остатков, важных для распознавания РЛЦ [88]. Фермент сначала связывает Mg^{2+} -АТФ, а затем РЛЦ [89]. Несмотря на то, что несколько работ претендуют на расширение списка субстратов КЛЦМ [76, 90, 91], РЛЦ миозина являются единственным общепризнанным субстратом

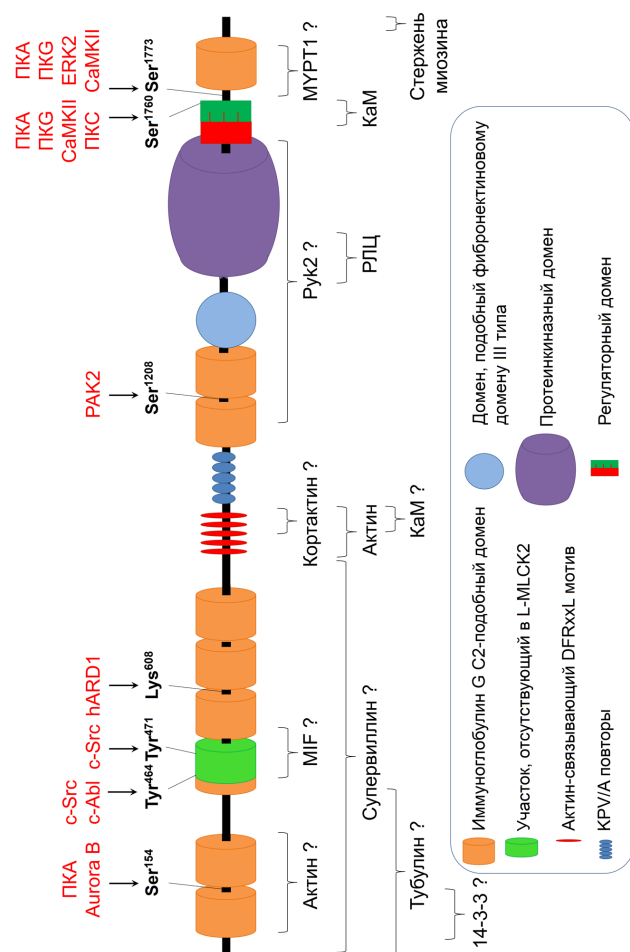


Рис. 2. Доменная организация, блок-белковые взаимодействия и посттрансляционные модификации L-КЛЦМ

Основные структурные элементы L-КЛЦМ (см. вставку с расшифровкой обозначений) представлены в линейной форме. На схеме доменной организации L-КЛЦМ отмечены некоторые аминокислотные остатки, модификация которых может иметь физиологическое значение. Нумерация остатков дана для L-КЛЦМ1 человека (NM_053025). Ферменты, модифицирующие эти остатки, указаны сверху. Скобки отмечают участки L-КЛЦМ, вовлеченные во взаимодействие с другими белками (обозначены под скобками). (?) – участок / участки взаимодействия точно не картированы или имеют слабую доказательную базу. PKG – протеинкиназа G, PKC – протеинкиназа C, SamKII – Ca-Кам-зависимая киназа II типа. Детальное описание в тексте.

КЛЦМ *in vivo* с неоспоримой физиологической значимостью. В составе РЛЦ ключевую роль играет Arg16 [92], направляющий КЛЦМ на Ser19 РЛЦ. Фосфорилирование двух РЛЦ на одной головке миозина происходит упорядоченно с использованием различных механизмов [93]. Одной из причин такого поведения может быть некаталитическое взаимодействие КЛЦМ с миозином за счет С-концевой области (см. ниже). В условиях *in vitro* при высоких концентрациях КЛЦМ фосфорилируется также Thr18 РЛЦ [94], однако *in vivo* Thr18, по-видимому, служит субстратом для других протеинкиназ, в частности ROCK [95] и ZIPK [96]. Фосфорилирование Thr18 в дополнение к Ser19 усиливает активность Mg^{2+} -АТФазы миозина [97], однако монофосфорилирование РЛЦ по Thr18 коррелирует с расслаблением в гладких мышцах [98] и, возможно, в отсутствие фосфорилирования Ser19 не будет стимулировать активность немышечного миозина в других клетках.

Регуляторный участок КЛЦМ прилегает непосредственно к С-концу каталитического домена и состоит из автоингибиторной последовательности и следующим за ней участком связывания Ca^{2+} /КаМ. Предложенная изначально модель псевдосубстратного ингибирования основывалась на сходстве в расположении положительно заряженных аминокислотных остатков в автоингибиторной последовательности и в участке фосфорилирования РЛЦ [99], однако соседний гидрофобный кластер Tyr–Met–Ala в автоингибиторной последовательности оказался наиболее важным для ингибирования [100], указывая, что механизм автоингибирования не ограничивается мимикрией РЛЦ. На основании анализа автоингибиторной последовательности КЛЦМ был разработан пептидный ингибитор РІК (от англ. Peptide Inhibitor of Kinase), [101], который дополнительно обладал способностью проникать через биологические мембраны [102, 103]. В дальнейшем был создан также ряд более устойчивых аналогов РІК, применяемых в исследованиях *in vitro* и *in vivo* [102, 104, 105].

КЛЦМ является Ca^{2+} /КаМ-зависимым ферментом. Даже при базовой концентрации Ca^{2+} в клетке С-концевой домен КаМ может быть постоянно связан с КЛЦМ [106]. Повышение уровня Ca^{2+} и последующее связывание Ca^{2+} в N-концевой области КаМ вызывают перестройки как в КаМ так и в КЛЦМ, открывая доступ РЛЦ к активному центру [107]. Эти данные указывают на то, что эффективное связывание пептидных ингибиторов КЛЦМ, представляющих собой аналоги РЛЦ (как, например, пептид 11-19 [108]) будет происходить только после повышения уровня Ca^{2+} и освобождения участка связывания РЛЦ.

Наконец, следует отметить, что субстратная специфичность, активация под действием Ca^{2+} /КаМ и ферментативные свойства L-КЛЦМ *in vitro* полностью идентичны таковым s-КЛЦМ [74].

Участок связывания миозина, отличный от каталитического центра, располагается непосредственно на С-конце молекулы КЛЦМ и является общим для обеих форм КЛЦМ и KRP/телокина. Кислая С-концевая область KRP/телокина обеспечивает основной вклад в связывание с миозином *in vitro* [109], индуцируя переход миозина II в развернутую, способную к филаментообразованию конформацию [110], а также отвечает за конкурентное ингибирование фосфорилирования РЛЦ под действием КЛЦМ [111] и других протеинкиназ со сходной субстратной специфичностью [112].

Ig- и Fn-подобные домены. Непосредственно к N-концу от каталитического домена располагается фибронектин-подобный домен III типа, функции которого остаются неизвестными. В s-КЛЦМ присутствуют три иммуноглобулин G-подобных домена С2-типа (IgG C2), каждый из которых включает порядка 100 аминокислотных звеньев: два IgG C2-подобных домена расположены к N-концу от Fn-подобного домена, а третий составляет С-концевой домен КЛЦМ. Именно этот домен с небольшими фланкирующими последовательностями экспрессируется как независимый белок KRP/телокин. В уникальной N-концевой области L-КЛЦМ располагается еще 6 дополнительных IgG C2-подобных доменов [18, 61]. Их функциональная значимость остается малоизученной, однако высказаны предположения, что они участвуют в белок-белковых взаимодействиях КЛЦМ непосредственно или, по аналогии с IgG-подобными доменами титина [113], могут обратимо расплетаться, увеличивая линейные размеры КЛЦМ и/или открывая участки для взаимодействия с другими белками (см. ниже).

Повторы KPV/A обнаруживаются в составе КЛЦМ млекопитающих, располагаясь к N-концу от первого IgG C2-подобного домена s-КЛЦМ. Повторы этого типа представляют собой 12-членные участки, в которых присутствуют по два консервативных триплета KPV и KPA. У разных видов животных количество таких повторов сильно различается, внося существенный вклад в межвидовые различия по молекулярной массе КЛЦМ. Роль KPV/A повторов остается неясной.

Актин-связывающий домен s-КЛЦМ располагается на самом N-конце молекулы и представляет собой три 28-членных повтора, в составе которых ключевую роль во взаимодействии с актином играет мотив DFRxxL [114]. Считается, что три DFRxxL мотива обес-

печивают связывание s-КЛЦМ с тремя мономерами актина, и благодаря нескольким участкам связывания с актином N-концевая область s-КЛЦМ способна перешивать отдельные филаменты актина *in vitro* [115]. Высказано предположение, что за счет поочередного связывания и диссоциации отдельных DFRxxL-мотивов s-КЛЦМ мигрирует вдоль актинового филамента, расширяя свой ареал действия [116]. На филаменте актина участок взаимодействия DFRxxL-домена s-КЛЦМ отличен от участков связывания миозина, тропомиозина, кальпонины и кальдесмона [117], не налагая стерических препятствий на латеральную миграцию s-КЛЦМ. Возможно, в регуляции ассоциации КЛЦМ с актином принимает участие КаМ за счет второго участка связывания, который, согласно исследованиям *in vitro*, перекрывается с DFRxxL-мотивами [118, 119]. Связывание s-КЛЦМ с актином за счет DFRxxL-мотивов относительно непрочное, поэтому в немышечных клетках, менее «насыщенных» акто-миозиновыми структурами, s-КЛЦМ обнаруживается преимущественно диффузно и легко диссоциирует при нарушении целостности клеток [115]. В составе уникального N-концевого домена L-КЛЦМ обнаруживаются еще два DF/VRxxL-мотива, усиливающих связывание с актином [74]. Однако полное удаление пяти DFRxxL-мотивов из состава полноразмерной L-КЛЦМ не приводило к ее диссоциации от цитоскелета [115], указывая на наличие дополнительного участка связывания актина. Он был картирован в пределах двух первых IgG C2-подобных доменов [120, 121].

V. БЕЛОК-БЕЛКОВЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПРОДУКТОВ ГЕНА MYLK1

Неоспоримыми физиологически значимыми белковыми партнерами КЛЦМ являются актин, миозин и КаМ. В то же время, экспериментальные данные указывают на существование и других белковых партнеров (рис. 2).

Тубулин – структурный компонент микротрубочек взаимодействует с L-КЛЦМ *in vitro* и колокализуется с L-КЛЦМ в трансфицированных клетках CV-1 [122]. Благодаря взаимодействию с тубулином L-КЛЦМ может служить одним из структурных организаторов цитоскелета, интегрируя актиновый и тубулиновый цитоскелет.

Супервиллин представляет собой скаффолдовый мембранный белок, содержащий участки взаимодействия с актином, миозином и рядом других цитоскелетных белков. N-концевой фрагмент супервиллина (остатки 1–174) взаимодействует с уникальным N-концевым доменом L-КЛЦМ *in vitro* и колокализуется с активированным

миозином на периферии клеток [123]. Авторы предположили, что ингибиторный эффект супервиллина на распластывание клеток реализуется благодаря активации и сборке миозина в примембранной области. При этом эффект супервиллина отменялся при подавлении активности КЛЦМ в клетках.

Кортактин, актин-связывающий цитоскелетный белок, взаимодействует с L-КЛЦМ в эндотелиальных клетках. Кортактин иммунопреципитируется антителами против L-КЛЦМ из эндотелиальных клеток, при этом стимуляция тирозиновых киназ повышает количество кортактина в преципитате [124]. Фосфорилирование кортактина или полноразмерной сплайс-изоформы L-КЛЦМ (L-КЛЦМ1) тирозиновой киназой c-Src усиливает его взаимодействие с L-КЛЦМ1, однако кортактин не влиял на активность всех изоформ КЛЦМ *in vitro*, как и КЛЦМ не влияла на связывание кортактина с актином. В то же время, присутствие L-КЛЦМ подавляло стимулируемую кортактином активацию Atp2/3 [125]. За связывание со всеми изоформами КЛЦМ отвечает SH3-домен кортактина. Предполагаемые участки связывания кортактина с КЛЦМ локализованы в районе DFRxxL мотивов [126] и, возможно, это взаимодействие может регулироваться Ca^{2+} /CaM, связывающимся в этом участке и модулирующим связывание КЛЦМ с актином. Возможно, в уникальном N-концевом домене L-КЛЦМ имеются дополнительные кортактин-связывающие элементы. Усиление фосфорилирования кортактина по остаткам тирозина в эндотелиальных клетках в присутствии L-КЛЦМ может быть обусловлено ее скаффолдной активностью и рекрутированием нерецепторных тирозиновых протеинкиназ, в частности, c-Src [124] и/или изменением конформации кортактина и облегчением его взаимодействия с c-Src. Участие L-КЛЦМ в активации тирозиновых киназ было отмечено также в нейтрофилах [76].

Рук2, цитоплазматическая тирозиновая киназа семейства FAK, в нейтрофилах рекрутируется в комплекс с $\beta 2$ -интегринами и необходима для полноценной активации интегринов и адгезии нейтрофилов. В нейтрофилах L-КЛЦМ^{-/-} мышей активация Рук2 снижена и нарушено взаимодействие Рук2 с $\beta 2$ -интегринами. Прямое взаимодействие Рук2 с L-КЛЦМ подтверждается коиммунопреципитацией, а также взаимодействием очищенной Рук2 и рекомбинантного каталитического домена КЛЦМ *in vitro*. Интересно отметить также, что подавление ферментативной активности L-КЛЦМ в нейтрофилах частично подавляло активацию Рук2, а каталитический домен КЛЦМ способен фосфорилировать и активировать Рук2 *in vitro*. Эти данные указывают на участие как каталитической, так и неферментативной активности КЛЦМ в активации Рук2 [76].

MIF (Macrophage Migration Inhibition Factor) был идентифицирован в качестве партнера L-КЛЦМ с использованием двугибридной системы. Взаимодействие подтверждается данными иммунопреципитации химерного фрагмента КЛЦМ из лизатов эндотелиальных клеток ВРАЕС и косвенными иммунофлуоресцентными данными. Взаимодействие MIF с уникальным N-концевым фрагментом L-КЛЦМ ослаблялось при укорочении фрагмента с 585 до 516 N-концевых аминокислотных остатков. При делеции экзона, отсутствующего в L-КЛЦМ2 (см. выше), связывание ослаблялось еще больше. Таким образом, 515 N-концевых аминокислотных остатков L-КЛЦМ достаточно для взаимодействия с MIF и последовательность L-КЛЦМ 437–505 может быть одним из участков взаимодействия. Вместе с тем, MIF не экранировал фосфорилирования L-КЛЦМ с-Src (в пределах 415–500) и не влиял на взаимодействие L-КЛЦМ с актином и кортактином [127]. Функциональная значимость потенциального взаимодействия MIF с L-КЛЦМ остается неясной.

Скаффолд 14-3-3 имеет потенциальные участки связывания на краях 1-го IgG C2-подобного домена L-КЛЦМ. В пользу взаимодействия L-КЛЦМ и 14-3-3 указывает обогащение двух изоформ 14-3-3 (24 и 27 кДа) в иммунопреципитате FLAG-меченого фрагмента КЛЦМ и частичное подавление фосфорилирования Tyr464 L-КЛЦМ, отменявшееся в присутствии антагониста белков 14-3-3 [128]. К сожалению, взаимодействие 14-3-3 и L-КЛЦМ основано на косвенных данных и не подтверждено пока другими работами.

Фосфатаза легких цепей миозина (ФЛЦМ) – специализированный антагонист КЛЦМ, по-видимому, также является партнером белковых продуктов гена *mylk1*. Еще в ранних работах было предположено существование комплекса КЛЦМ и ФЛЦМ на основании совместного выделения этих ферментов из гладкомышечной ткани [129]. Эти косвенные данные получили продолжение в виде ряда экспериментальных наблюдений у мыши с генетическим нокаутом KRP/телокина, указывавших на роль KRP/телокина в положительной модуляции активности ФЛЦМ [30]. Поскольку KRP/телокин экранирует РЛЦ в составе миозина от действия активирующих протеинкиназ [111, 112], но не связывается с фосфорилированным миозином [130], было предположено, что влияние KRP/телокина на дефосфорилирование миозина реализуется через прямое или косвенное влияние на ФЛЦМ [30]. Недавно были представлены экспериментальные физиологические и биохимические указания на непосредственное взаимодействие KRP/телокина с фосфорилированной регуляторной субъединицей ФЛЦМ MYPT1, приводившее к отмене эффекта ингибиторного фосфорилирования MYPT1 [131].

Возможно, такое взаимодействие объясняется определенным сходством последовательности KRP/телокина и малой субъединицы ФЛЦМ M20, функции которой остаются пока неизвестными.

Потенциальными партнерами КЛЦМ, идентифицированными в ходе глобальных скрининговых работ с использованием методов дрожжевой двугибридной системы, коиммунопреципитации и метода пептидных матриц, является еще порядка трех десятков белков, однако подтверждение взаимодействия КЛЦМ с этими белками и установление функциональной значимости таких взаимодействий остается предметом будущих исследований.

С известными оговорками к числу белковых партнеров можно отнести различные ферменты, использующие КЛЦМ и KRP/телокин в качестве своих субстратов, в частности тирозиновую киназу c-Src [125]. Поскольку обратимые посттрансляционные модификации (ПТМ) играют важную роль в регуляции активности практически всех белков организма, ниже будут рассмотрены наиболее интересные ПТМ белковых продуктов гена *mylk1*.

VI. ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫЕ МОДИФИКАЦИИ ПРОДУКТОВ ГЕНА MYLK1

По данным интернет-ресурса PhosphositePlus (<http://www.phosphosite.org>) [17], в структуре L-КЛЦМ обнаруживается более 10 участков ацетилирования и около 40 участков фосфорилирования. В то же время метилирование и убиквитинирование остатков Lys и Arg встречается в этом белке в единичных случаях. Для подавляющего большинства ПТМ L-КЛЦМ не установлена функциональная значимость, и в литературе имеются лишь отдельные сообщения по этой теме.

МОДУЛЯЦИЯ СВОЙСТВ БЕЛКОВЫХ ПРОДУКТОВ ГЕНА MYLK1 АЦЕТИЛИРОВАНИЕМ

Одной из первых обнаруженных посттрансляционных модификаций KRP/телокина было конститутивное ацетилирование N-концевой аминокислоты всех изоформ, отличающихся длиной N-концевой последовательности [67]. Для s-КЛЦМ также показано ацетилирование по остатку Met1 [132]. По-видимому, эти модификации защищают KRP/телокин и s-КЛЦМ от деградации. Недавно показана возможность модуляции L-КЛЦМ под действием ацетилтрансферазы hARD1 [133]. Авторы показали, что hARD1 связывается в районе 4–5 IgG C2-подобных доменов L-КЛЦМ и ацетилюет эпсилон-аминогруппу Lys608 (рис. 2). В трансфицированных клетках hARD1 подавляет фосфорилирование РЛЦ и КЛЦМ-зависимую инвазию и миграцию

раковых клеток HT1080, а замена Lys608Arg полностью отменяла эффект hARD1 на активность L-КЛЦМ. Взаимодействие hARD1 с L-КЛЦМ требовало предварительной активации L-КЛЦМ Ca^{2+} /КаМ, указывая на возможные сложные взаимодействия между удаленными в первичной последовательности доменами L-КЛЦМ.

МОДУЛЯЦИЯ СВОЙСТВ БЕЛКОВЫХ ПРОДУКТОВ ГЕНА MYLK1 ФОСФОРИЛИРОВАНИЕМ

Модуляция свойств белковых продуктов гена *mylk1* фосфорилированием на сегодняшний день изучена несколько лучше по сравнению с другими типами ПТМ. Благодаря протеомным технологиям идентифицирован целый ряд участков фосфорилирования КЛЦМ *in vivo*, часть из которых совпала с ПТМ, определенными ранее в исследованиях *in vitro* (рис. 2). Одна из таких имеющих большое функциональное значение ПТМ – фосфорилирование КЛЦМ по т.н. сайту А в КаМ-связывающем домене [134]. Фосфорилирование Ser1760 в этом сайте протеинкиназами А (ПКА), G, С или Ca^{2+} /КаМ-зависимой протеинкиназой II типа приводит к ослаблению взаимодействия КаМ с КЛЦМ и снижению доступности РЛЦ, экранированной автоингибиторной последовательностью белка [134–136]. Фосфорилирование Ser1759 с теми же функциональными последствиями осуществляет р21-активируемая протеинкиназа PAK2 [137]. Имеются коммерческие фосфоспецифические антитела, позволяющие оценивать фосфорилирование Ser1760, и, соответственно, уровень ингибирования КЛЦМ, однако встречаются работы, где положительная реакция с этими антителами рассматривается как активация КЛЦМ [83], что заставляет с осторожностью относиться к выводам таких исследований.

Для L-КЛЦМ был показан ряд участков фосфорилирования вне каталитического домена, но влияющих на ферментативную активность. Так, фосфорилирование Tyr464 и Tyr471 в уникальном N-концевом домене L-КЛЦМ под действием протеинкиназы c-Src *in vitro* в 2–3 раза повышает ферментативную активность L-КЛЦМ [138], указывая, что L-КЛЦМ может иметь «сложенную» пространственную структуру, в которой реализуется взаимодействие N-концевой и C-концевой частей молекулы. С такой гипотетической моделью конформации L-КЛЦМ согласуются и упомянутые выше данные по влиянию ацетилирования Lys608 L-КЛЦМ под действием hARD1 [133]. К сожалению, кристаллическая структура полноразмерной L-КЛЦМ, где будут отражены взаимодействия пространственно удаленных участков, остается неизвестной.

Интересно отметить, что Tyr464 и Tyr471 входят в состав единого экзона, отсутствующего в L-КЛЦМ2 [61]. Соответственно, c-Src не фосфорилирует L-КЛЦМ2 и не регулирует ее каталитическую активность. Тирозиновая киназа c-Abl фосфорилирует *in vitro* около 10 тирозиновых остатков в L-КЛЦМ1, включая Tyr464. В результате фосфорилирования c-Abl также, как и под действием c-Src, возрастает каталитическая активность L-КЛЦМ и увеличивается ее сродство к кортактину [139]. В этой же работе обнаружено аутофосфорилирование L-КЛЦМ по 19 остаткам Ser и Thr. В связи с этим, соотносить фосфорилирование каких-либо определенных остатков L-КЛЦМ с изменением ее каталитической активности не представляется возможным. Более того, столь множественное фосфорилирование не исключает неспецифической модификации *in vitro* в присутствии избытка протеинкиназы. В пользу такого предположения говорит то обстоятельство, что только в двух случаях из девяти тирозиновое фосфорилирование по участкам c-Abl *in vitro* подтверждено в раковых клетках с помощью масс-спектрометрии (см. <http://www.phosphosite.org>).

Показано, что мутирование остатка Ser149 в последовательности L-КЛЦМ курицы (гомологичен Ser154 человека и Ser149 мыши и подтвержден как фосфосайт *in vivo*) на Asp149 приводит к ослаблению связывания N-концевого актин-связывающего фрагмента L-КЛЦМ с цитоскелетом в клетках HeLa [121]. К протеинкиназам, которые могут фосфорилировать Ser149 птиц *in vitro*, относятся PKA и сходная с ней по субстратной специфичности протеинкиназа Aukoga B. Последняя активна в митозе и фосфорилирует N-концевой домен L-КЛЦМ по остаткам серина в митотических клетках HeLa [140]. PKA может фосфорилировать L-КЛЦМ в интерфазных клетках. Таким образом, PKA и Aukoga B составляют минимальный набор протеинкиназ, способных модулировать актин-связывающие свойства L-КЛЦМ в клетках.

В большинстве же работ, где сообщается о фосфорилировании L-КЛЦМ в клетках и тканях, не установлены механистические связи между фосфорилированием конкретных аминокислотных остатков L-КЛЦМ и изменениями свойств клеток. Так, тирозиновое фосфорилирование L-КЛЦМ подтверждено в эндотелиальных клетках, стимулированных дипероксидом, мощным активатором тирозиновых киназ и ингибитором тирозиновых фосфатаз [124], и показано в фибробластах, трансформированных конститутивно активным рецептором эпидермального фактора роста v-Erb-B [141]. В обоих случаях авторы отмечали изменения в статусе активации сократительных белков в изучаемых клетках. Проте-

монстрировано фосфорилирование КЛЦМ под действием МАП киназ, сопровождающееся увеличением каталитической активности КЛЦМ, повышением уровня фосфорилирования РЛЦ миозина в клетках и ускорением их миграции [142]. Поскольку консенсусные участки для МАП киназ располагаются вне каталитического домена КЛЦМ, можно предположить, что активация КЛЦМ, обнаруженная в этой работе, требовала внутримолекулярных взаимодействий между удаленными в первичной структуре доменами КЛЦМ, аналогично тому, как это предположено выше для фосфорилирования Tyr464 и Tyr471 и ацетилирования Lys608 в N-концевой области L-КЛЦМ.

Обнаружено множественное фосфорилирование KRP/телокина как отдельного белкового продукта гена *mylk1*, так и в составе С-концевого домена КЛЦМ (см. <http://www.phosphosite.org>). Для восьми из десяти остатков Ser и Thr в неструктурированной последовательности, фланкирующей с N-конца IgG C2-подобный домен KRP/телокина, показано фосфорилирование, что позволяет предположить важную регуляторную роль этого участка в КЛЦМ. В то же время никаких указаний на функциональные свойства этой последовательности в составе КЛЦМ, которые могли бы регулироваться фосфорилированием, не получено за исключением сообщения о том, что фосфорилирование этого домена протеинкиназой А усиливает ингибиторный эффект фосфорилирования по сайту А [136]. Фосфорилирование гомологичного участка KRP/телокина ПКА и МАП киназами не влияет на его способность ингибировать фосфорилирование миозина и развитие сокращения гладкой мышцы [112]. При стимуляции сокращения изолированных фазных гладких мышц фосфорилирование KRP/телокина возрастает при развитии сокращения, но мало изменяется при последующем расслаблении [75]. Количественный анализ изменения степени фосфорилирования отдельных остатков показал рост фосфорилирования Ser13 KRP/телокина с 20 до 100% при сокращении мышцы, тогда как уровень фосфорилирования Ser19 изменялся при сокращении/расслаблении незначительно и составлял 25% [143]. Согласно данным лаборатории А. Сомлио и предложенной ими модели, KRP/телокин активирует ФЛЦМ и, таким образом, вызывает расслабление гладкой мышцы. Этот эффект усиливается при фосфорилировании KRP/телокина по остатку Ser13 протеинкиназой G [144, 145] за счет того, что фосфо-KRP/телокин связывается с фосфорилированной и инактивированной МΥРТ1 и преодолевает это ингибирование, позволяя ФЛЦМ дефосфорилировать миозин [131]. Следует заметить, что прямое взаимодействие с МΥРТ1 *in vitro* было показано для фосфо-

мимикрирующего мутанта KRP/телокина (Ser13Asp), но не для фосфорилированного по Ser13 KRP/телокина и белка дикого типа.

Суммируя раздел, можно отметить, что все белковые продукты гена *mylk1* подвергаются в клетках и тканях множественным ПТМ. Для некоторых ПТМ доказано влияние на каталитическую активность КЛЦМ, что отражается на активации миозинового мотора и, следовательно, на параметрах клеточной подвижности. Функциональное значение основной части ПТМ в КЛЦМ и KRP/телокине остается не известным.

ВИ. УЧАСТИЕ КЛЦМ / KRP В ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ РЕАКЦИЯХ КЛЕТОК

Роль КЛЦМ в физиологических процессах в клетках в основном связывают с активацией миозина II, за счет которой КЛЦМ вовлекается в огромное разнообразие клеточных реакций, внешне не имеющих между собой ничего общего, но все они зависят от работы двигательного аппарата клетки. КЛЦМ является Ca^{2+} /КаМ-зависимым активатором миозина и сама активируется при повышении Ca^{2+} в клетке за счет действия Ca^{2+} -мобилизующих агонистов, таких как гистамин, тромбин, брадикинин, бомбезин, холецистокинин, ацетилхолин, катехоламины, fMet-Leu-Phe, оксиданты и др. Помимо протеинкиназной активности КЛЦМ ее взаимодействия с белками-партнерами (см. раздел V) могут вносить вклад в общий КЛЦМ-зависимый функциональный ответ клетки.

АДГЕЗИЯ И МИГРАЦИЯ

Фундаментальным свойством субстрат-зависимых клеток является адгезия и миграция. КЛЦМ вовлечена в обеспечение обеих этих клеточных реакций. Совместно с киназой фокальных контактов, протеинкиназами c-Src и Erk КЛЦМ играет роль в формировании и разборке адгезивных контактов на переднем краю движущейся клетки, тем самым обеспечивая ее поступательное движение [146]. Фармакологическое ингибирование КЛЦМ и КаМ в фибробластах, закрывающих рану, вызывает нарушение формирования фокальных адгезий, миграции клеток и сокращения ими коллагеновой сети и раны в целом [147]. Клетки париетальной эндодермы F9 формируют фокальные адгезии и ламеллиподии и мигрируют в культуре под контролем КЛЦМ, которая в свою очередь регулируется МАП-киназами семейства Erk [148].

В фибробластах активность КЛЦМ по формированию фокальных адгезий сосредоточена на периферии клетки, в то время как ROCK-за-

висимые фокальные адгезии находятся в центре. Избирательное ингибирование фосфорилирования миозина этими протеинкиназами приводило к разборке либо периферических, либо центральных фокальных адгезий и выражалось в различных изменениях миграции. Так, при ингибировании КЛЦМ фибробласты формировали мембранные протрузии во все стороны, более часто поворачивали и мигрировали менее эффективно, чем клетки с ингибированной ROCK. Последние двигались более быстро и прямолинейно [149]. Положения этой работы о пространственном разделении каталитических функций КЛЦМ и ROCK находят подтверждение в других исследованиях с иными клеточными моделями [150–153].

В то же время ряд исследователей приводит доказательства того, что для миграции клеток важны некаталитические свойства КЛЦМ, т.е. взаимодействие с актином и другими белками-партнерами [76, 81, 154]. Как было описано выше, КЛЦМ способна выступать в качестве платформы для белок-белковых взаимодействий и обладает возможностями интегрировать цитоскелетные структуры [122–124]. В ряде случаев, например, при трансмиграции нейтрофилов через эндотелий, связывание L-КЛЦМ нейтрофилов с тирозиновыми киназами c-Src и Fyn и рекрутирование Fyn к β 2-интегринам было, вероятно, достаточным КЛЦМ-зависимым событием, в то время как двигательную активность нейтрофилов опосредовал миозин II, активированный ROCK [76]. В то же время результаты экспериментов по «замещению» каталитической активности КЛЦМ ее актин-связывающей активностью, выполненных при гиперэкспрессии КЛЦМ и ее доменов [81, 154], следует интерпретировать с осторожностью. Очевидно, что эктопическая экспрессия в клетках избытка актин-связывающих доменов КЛЦМ приведет к стабилизации актинового цитоскелета даже в отсутствие каталитической активности КЛЦМ [122], а двигательную составляющую смогут обеспечить альтернативные миозин-активирующие протеинкиназы, такие как ROCK, ZIPK, цитрон киназа и др.

ПРОЛИФЕРАЦИЯ

КЛЦМ участвует в контроле клеточного деления. На модели пролиферирующих гепатоцитов грызунов с помощью ингибирования каталитической активности КЛЦМ и подавления ее экспрессии методом РНК-интерференции было продемонстрировано, что КЛЦМ контролирует переход клеток из поздней G1 фазы в S фазу, и механизм контроля включает Erk2-зависимую активацию p70S6 киназы [155]. Подавление экспрессии и каталитической активности КЛЦМ

в различных видах раковых клеток тормозит их пролиферацию [156–158]. С другой стороны, подавление экспрессии КЛЦМ в гладкомышечных клетках GbaSM-4 увеличивало скорость их пролиферации и сокращало время удвоения популяции [159]. По-видимому, эффекты КЛЦМ на клеточное деление опосредуются состоянием цитоскелета, активностью внутриклеточных сигнальных систем, с которыми она взаимодействует, и уровнем белков-партнеров КЛЦМ. Эти параметры в нормальных нетрансформированных клетках могут существенно отличаться от таковых в опухолевых клетках.

В делящихся клетках HeLa L-КЛЦМ концентрируется в кортикальной цитоплазме в метафазе и в области перетяжки деления в анафазе и телофазе [160]. За такую локализацию отвечают актин-связывающие DFRxxL мотивы в центральной части молекулы и последовательности в N-концевой ее части. Перетяжка деления – это типичная актомиозиновая структура, и включение в нее L-КЛЦМ представляется логичным. Очевидно, L-КЛЦМ участвует в формировании перетяжки деления и ее констрикции, используя как свой каталитический домен, так и некаталитические домены. В этой же работе был показан и другой эффект N-концевого домена L-КЛЦМ, который нарушал нормальную структуру веретена деления. Авторы предположили, что это может быть новой неожиданной регуляторной функцией L-КЛЦМ при митозе, но нельзя исключить, что это артефакт гиперэкспрессии N-концевого домена L-КЛЦМ, который способен *in vitro* и в клетках взаимодействовать с тубулином и микротрубочками [122].

ЭНДОЦИТОЗ

Большое количество экспериментальных данных свидетельствует в пользу активного участия КЛЦМ в эндоцитозе. Эндоцитоз плазматической мембраны используется клеткой для восстановления нормального объема после набухания при гипотоническом стрессе. КЛЦМ и миозин II накапливались вместе с актином в области возникших при набухании мембранных пузырей перед их ретракцией. Ингибирование КЛЦМ приводило к персистенции пузырей и замедлению восстановления нормального объема клетки. КЛЦМ совместно с актином, c-Src киназой, кортактином и динамином формировала специальные комплексы в области эндоцитируемой мембраны, и ингибирование КЛЦМ или c-Src влияло на время жизни этих комплексов [161].

Эндоцитоз синаптических везикул с целью рециклизации везикулярных мембран необходим для поддержания синаптической передачи нервных импульсов. Показано, что в этом процессе участвует

КЛЦМ и ее каталитическая активность [162]. Ингибирование КЛЦМ и подавление ее экспрессии тормозило эндоцитоз везикул и предотвращало фосфорилирование РЛЦ миозина в бутонах гиппокампа крысы, индуцируемое в норме при деполяризации нейронов. Аналогичный эффект достигался ингибированием миозина II в этой модели, а также с помощью блокаторов Ca^{2+} -каналов и КаМ. Ранее подобное явление было обнаружено при изучении гигантских синапсов Хелда (calyx of Held synapse) у крыс [163]. Авторы этих работ полагают, что стимулируемое КЛЦМ фосфорилирование миозина и активация эндоцитоза синаптических везикул является универсальным процессом в нервной системе, ускоряющим рециклизацию везикулярных мембран при повышении активности синапсов.

ЭКЗОЦИТОЗ

Участие КЛЦМ в экзоцитозе также давно признано. Так, еще в 1994 г. была показана существенная роль КЛЦМ в АТФ-зависимой инициации индуцируемого Ca^{2+} экзоцитоза катехоламинов в хромоаффинных клетках надпочечников [164]. В дальнейшем участие КЛЦМ в процессах экзоцитоза/секреции было показано и на других типах клеток. В бета-клетках поджелудочной железы КЛЦМ, активируя немышечный миозин IIА, модулирует транслокацию секреторных гранул и приводит к повышенной секреции инсулина. [165]. В агонист-стимулированных тромбоцитах КЛЦМ кооперирует с ROCK в активации миозина II, индуцируя сокращение тромбоцитов и секрецию плотных гранул [166].

На примере экзоцитоза ламеллярных гранул альвеолоцитами II типа показано, что КЛЦМ и ROCK транслоцируются на покрытые актином ламеллярные гранулы вблизи плазматической мембраны и активируют миозин на их поверхности. Для эффективного сокращения актиновой оболочки на поверхность гранул дополнительно привлекаются кофилин-1 и α -актинин, совместно вызывая секреторный ответ клеток [167]. Можно предполагать, что деполимеризация с участием кофилина-1 происходит в зоне контакта ламеллярных гранул с мембраной, где нужно устранить препятствия для их слияния, а КЛЦМ-зависимое и ROCK-зависимое сокращение других частей актомиозиновой оболочки гранул способствует опорожнению содержимого гранул (компонентов сурфактанта) в образовавшуюся пору.

Приведенная схема событий на поздних этапах экзоцитоза согласуется с экспериментальными данными и, таким образом, может быть приложима к различным вариантам экзоцитоза, будь то секреция катехоламинов и инсулина, экстернализация рецепторов и глюкозных транспортеров, телец Вейбеля-Паладе и ламеллярных гранул и т.д. Во всех случаях роль КЛЦМ, вероятно, состоит в активации сокра-

тительной активности миозина на поверхности экзоцитируемого объекта. Нельзя исключить, что скаффолдная активность КЛЦМ также принимает участие в экзоцитозе.

РЕГУЛЯЦИЯ МЕХАНИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КЛЕТКИ

Все клетки обладают определенной жесткостью, которая в осмоотических условиях определяется, в основном, их цитоскелетом и его перестройками. При гиперэкспрессии конститутивно активной s-КЛЦМ в фибробластах механическая прочность клеток возрастала вдвое, а при деполимеризации микрофиламентов цитохалазином D вновь снижалась [168]. В недавнем исследовании у *L-КЛЦМ*^{-/-} мышей было продемонстрировано, что резистивные сосуды, в эндотелии которых не было L-КЛЦМ, не отвечали NO-зависимым расслаблением на поток. Такой же эффект достигался при ингибировании КЛЦМ в эндотелии сосудов мышей дикого типа [169]. Таким образом, удаление / ингибирование КЛЦМ приводило к нарушению механочувствительности NO-синтазы в сосудистом эндотелии.

В работе Dudek et al. с помощью метода атомной силовой микроскопии (АСМ) обосновывается важная роль белкового комплекса, состоящего из тирозиновой протеинкиназы c-Abl, кортактина и L-КЛЦМ, в реорганизации кортикального цитоскелета эндотелиальных клеток и 30% увеличении жесткости их цитоплазмы при воздействии на них сфингозин-1-фосфата [139]. Прямых указаний на участие L-КЛЦМ в регуляции жесткости эндотелиальной цитоплазмы в этой работе не содержится, но они были получены в дальнейших исследованиях. Методом АСМ было показано, что эндотелиальные клетки из *L-КЛЦМ*^{-/-} мышей, действительно, мягче, чем эндотелий дикого типа, и что помимо L-КЛЦМ протеинкиназа ROCK участвует в поддержании жесткости эндотелиальных клеток [170, 171]. Вопрос о роли некаталитических доменов L-КЛЦМ в регуляции жесткости цитоплазмы клеток остается неизученным. При этом наличие в структуре L-КЛЦМ нескольких участков связывания актина, в том числе с регулируемой фосфорилированием аффинностью [121], позволяет ожидать проявления сшивающих свойств у этого белка, которые могут отразиться на жесткости актинового цитоскелета и модуле упругости клетки.

БАРЬЕРНАЯ ФУНКЦИЯ ЭПИТЕЛИЯ И ЭНДОТЕЛИЯ

Эпителий и эндотелий образуют плотные монослои, через который в норме проходят низкомолекулярные вещества, но не белковые молекулы [172]. С цитоплазматической стороны клетки белки межклеточных контактных комплексов взаимодействуют с актиновым

цитоскелетом и могут испытывать на себе тянущее усилие, развиваемое актомиозином. Многие естественные стрессорные агенты (гистамин, тромбин, VEGF, TNF α , бактериальный липополисахарид, активные формы кислорода, избыточная механическая деформация и др.) вызывают нарушение контактных взаимодействий эндотелия и эпителия и активируют актомиозиновое сокращение. В ряде случаев активация актомиозина в этих клетках опосредуется каталитической активностью L-КЛЦМ [1, 173]. Сокращение клеток отводит их друг от друга и не позволяет им быстро восстановить физический контакт за счет распластывания. Кроме этого, накопление КЛЦМ и миозина II в ламеллоподиях сокращает время жизни ламеллоподий и их размер, стимулируя их ретракцию [153]. Таким образом, L-КЛЦМ в эндотелии и эпителии участвует в дестабилизации клеточного барьера и повышении его проницаемости.

С другой стороны, L-КЛЦМ может образовывать комплекс с тирозиновой протеинкиназой c-Abl и кортактином, участвуя в реорганизации кортикального актинового цитоскелета эндотелия при стимуляции клеток сфингозин-1-фосфатом, секретируемым тромбоцитами и укрепляющим барьер [139]. Возможно, в последнем случае играет роль не каталитическая активность L-КЛЦМ, а скаффолдная и сшивающая активности, которые и обеспечивают укрепление эндотелиального барьера, однако, детальных исследований в этом направлении не проводилось. Известно, что *L-КЛЦМ*^{-/-} мыши менее подвержены нарушению барьерной функции эндотелия и эпителия при стрессе [102, 105, 174, 175], в то время как гиперэкспрессия L-КЛЦМ в эндотелии у мышей делает его более проницаемым для макромолекул [176].

СОКРАЩЕНИЕ ГЛАДКИХ МЫШЦ

В отличие от s-КЛЦМ, которая запускает сокращение гладких мышц, активируя гладкомышечный миозин, KRP/телокин, вероятно, выполняет противоположную функцию. Локализуясь на миозине в области регуляторных легких цепей, он стерически препятствует активирующим миозин протеинкиназам фосфорилировать миозин [112]. С другой стороны, KRP/телокин, вероятно, способен активировать ФЛЦМ. У KRP/телокин^{-/-} мышей на 30% снижена активность ФЛЦМ в гладких мышцах кишечника и повышено фосфорилирование РЛЦ миозина [30]. Таким образом, независимо от молекулярного механизма действия KRP/телокин подавляет активацию миозина в гладких мышцах и стимулирует их расслабление. Играет ли аналогичную роль соответствующий KRP/телокину домен КЛЦМ остается неизвестным.

VIII. УЧАСТИЕ КЛЦМ В ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССАХ

ДИСФУНКЦИЯ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОГО / ЭПИТЕЛИАЛЬНОГО БАРЬЕРА

Дисфункция эндотелиального / эпителиального барьера наблюдается при многих патологических состояниях у человека, в том числе, при сепсисе, инфаркте миокарда, инсульте, влажной форме макулодистрофии, травматическом повреждении мозга, панкреатите. К нарушению сосудистой проницаемости и развитию отека легких и мозга может приводить агрессивная терапия онкологическими препаратами, отравление пулмонотоксическими ядами, термические ожоги тела, размножение тканей, высотная гипоксия и другие причины. Нарушение проницаемости кишечного эпителия наблюдается при болезни Крона, целиакии, аутоиммунных и воспалительных процессах в желудочно-кишечном тракте, инфекционных заболеваниях, кишечной непроходимости, отравлениях.

При воздействии на мышей фактора некроза опухолей $\text{TNF}\alpha$ в их кишечном эпителии происходит активация КЛЦМ, которая запускает кавеолин-1-зависимый эндоцитоз окклюдина, важного компонента плотных контактов кишечного эпителия [177]. Предполагается, что это один из механизмов повышения проницаемости кишечного эпителия при действии различных стрессорных агентов, вызывающих повышение $\text{TNF}\alpha$ в организме.

По КЛЦМ-зависимому механизму, вероятно, происходит проникновение комменсальных бактерий в кишечные энтероциты на фоне воздействия $\text{INF}\gamma$. В клетках усиленно фосфорилируется миозин II в области терминальной сети, формируются т.н. арки, происходит разрыхление щеточной каемки и затем наблюдается транцитоз бактериальных клеток. Введение в полость кишечника ингибитора КЛЦМ или использование антител к $\text{INF}\gamma$ подавляет проникновение бактерий в энтероциты. Бактериальной транслокации под действием $\text{INF}\gamma$ не наблюдается у $L\text{-КЛЦМ}^{-/-}$ мышей, что подтверждает участие КЛЦМ в этом процессе [178].

В ряде исследований с использованием $L\text{-КЛЦМ}^{-/-}$ мышей и ингибиторов КЛЦМ, в том числе малых органических молекул и проникающих в клетки пептидов, сообщается о положительных эффектах подавления активности КЛЦМ с целью поддержания целостности эндотелиального / эпителиального барьера, ограничения трансмиграции клеток иммунной системы в ткани и минимизации клинических признаков патологии [1, 76, 104, 105, 174, 179–182].

Выявлены ассоциации полиморфизмов в гене *mylk1* с предрасположенностью различных популяций людей (афроамериканцы,

потомки испанцев, европеоиды, жители Карибов и др.) к развитию острого повреждения легких, сепсиса и астмы [5]. Эти генетические вариации могут отражаться на уровне экспрессии КЛЦМ в эндотелии и эпителии легких и отвечать за повышенное содержание этого белка в гладких мышцах воздухоносных путей у астматиков [183]. Ряд полиморфизмов в гене *mylk1* ассоциирован с расслоением и аневризмами грудной аорты у человека [66].

АТЕРОСКЛЕРОЗ

У мышей *AnoE^{+/+}/L-КЛЦМ^{-/-}*, получавших жирную пищу, уменьшается размер бляшек в аорте и содержание в них липидов и макрофагов [77], связываемые авторами со сниженной проницаемостью эндотелия аорты, что подтверждается прямыми экспериментами. Вместе с тем, авторы отмечают снижение фосфорилирования c-Src в *L-КЛЦМ^{-/-}* эндотелии при его стимуляции тромбином [77] и связывают это с некаталитической активностью L-КЛЦМ. Подтверждая более ранние исследования [76], авторы показывают, что трансмиграция моноцитов через эндотелий замедляется в отсутствие у них L-КЛЦМ, что также связывается со скаффолдной активностью L-КЛЦМ.

РЕЗИСТЕНТНОСТЬ К ИНСУЛИНУ И ДИАБЕТ

КЛЦМ играет важную роль в инсулиновой сигнализации, развитии резистентности к инсулину и при диабете. Ингибирование миозина II и КЛЦМ снижало стимулируемую глюкозой секрецию инсулина бета-клетками поджелудочной железы, что сопровождалось укорочением в них периферических пучков актиновых филаментов, снижением числа фокальных адгезий и инсулиновых гранул вблизи базальной мембраны [165]. Таким образом, каталитическая активность КЛЦМ необходима для модуляции секреции инсулина поджелудочной железой.

Взаимодействие инсулина с инсулиновыми рецепторами на клетках скелетных мышц и жировой ткани предполагает выход инсулина из кровотока сквозь эндотелиальный барьер. Транспорт инсулина через эндотелий микрососудов осуществляется транцитозом посредством везикул, окаймленных клатрином [184]. Известно, что в экзоцитозе таких везикул участвует миозин II типа [185], активность которого может регулироваться КЛЦМ. Ограничение экзоцитоза инсулиновых гранул эндотелием при нарушениях в системе КЛЦМ-миозин II может быть одним из факторов развития резистентности к инсулину за счет снижения концентрации инсулина у поверхности клеток, депонирующих глюкозу, повышения содержания глюкозы в крови и развитию реактивной гиперинсулинемии.

В норме инсулин стимулирует встраивание транспортеров глюкозы GLUT4 в мембрану адипоцитов и скелетных миоцитов. Этот процесс представляет собой вариант экзоцитоза и также зависит от КЛЦМ и активируемого ею миозина IIА. Активный (акто)миозин необходим для слияния GLUT4 везикул с плазматической мембраной, и для поддержания активности GLUT4 [83, 186, 187]. Снижение эффективности работы GLUT4 в адипоцитах ведет к гипергликемии и развитию резистентности к инсулину.

Персистирующая гипергликемия при диабете вызывает накопление т.н. конечных продуктов гликирования (AGE), например, альбумина и гемоглобина, неферментативно модифицированных глюкозой. AGE связываются со своими рецепторами RAGE на эндотелии сосудов и стимулируют его гиперпроницаемость. Поскольку КЛЦМ вовлечена в нарушение барьерной функции эндотелия, ее ингибирование или подавление экспрессии ослабляет эдемагенные эффекты AGE и тормозит развитие васкулопатий, характерных для диабета [188].

Дополнительно, гипергликемия и гиперлипидемия усиливают экспрессию КЛЦМ и накопление фосфорилированной (ингибированной) MYPT1 в аортальном эндотелии крыс со стрептозотоциновым диабетом, что способствует сократительному фенотипу эндотелия и гиперпроницаемости. Эти эффекты в значительной мере обращаются при введении крысам мелатонина [189]. Инсулин, напротив, восстанавливает подавленную экспрессию КЛЦМ в желудке и кишечнике крыс со стрептозотоциновым диабетом. Снижение содержания КЛЦМ в этих органах – возможная причина задержки пассажа пищи у крыс с диабетом [190].

Наконец, в недавней работе утверждается, что в сыворотке крови больных диабетом 2 типа содержание КЛЦМ существенно выше, чем у здоровых доноров. Таким образом, КЛЦМ может вскоре стать новым биомаркером диабета 2 типа [191]. Нельзя исключить, что иммунореактивность к КЛЦМ появляется у больных диабетом в результате постоянного повреждения сосудистого эндотелия под действием оксидативного стресса, который может усиливаться эндотелиальной L-КЛЦМ за счет модуляции взаимодействия кортактина и p47(phox), необходимого для сборки и активации эндотелиальной NADPH оксидазы [192].

РАК

Поскольку КЛЦМ активно вовлечена в физиологические процессы клеточной адгезии, миграции и пролиферации, нарушение ее экспрессии и регуляции активности при раковой трансформации

клеток во многом будет определять миграционный и инвазивный потенциал этих клеток и, следовательно, динамику онкологического заболевания и тактику его лечения. Как показывают исследования, КЛЦМ ассоциирована с различными видами рака, включая рак молочной железы, легких, простаты, толстого кишечника и др. [5].

Снижение содержания КЛЦМ в нормальных эпителиальных клетках молочной железы ведет к нарушению межклеточных взаимодействий и активирует инвазивное поведение этих клеток. В инвазирующих клетках рака молочной железы содержание КЛЦМ ниже, чем в неинвазирующих, и низкие уровни КЛЦМ коррелируют с плохим прогнозом у HER2-положительных пациентов с раком молочной железы [85]. В то же время в других работах указывается на противоположное соотношение содержания/активности КЛЦМ и инвазивности раковых клеток [60, 193], что может отражать специфические отличия клеток, исследуемых в разных работах. Профили экспрессии генов в различных раковых клетках даже из одного органа могут существенно различаться, соответственно, могут различаться и клеточные реакции. Ацетилирование Lys608 L-КЛЦМ ацетилтрансферазой hARD1 инактивирует L-КЛЦМ и ведет к снижению фосфорилирования РЛЦ миозина в раковых клетках, ингибируя их миграцию и инвазию [133].

L-КЛЦМ активируется локально в эндотелиальных клетках сосудов, через которые происходит инвазия раковых клеток в сосудистое русло, и активирует актомиозиновое сокращение. Блокирование фосфорилирования миозина в эндотелии ослабляет трансэндотелиальную, но не парацеллюлярную инвазию раковых клеток [194].

КЛЦМ КАК МОЛЕКУЛЯРНАЯ МИШЕНЬ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ НОВЫХ ЛЕКАРСТВ

В связи с вовлеченностью КЛЦМ в развитие важнейших патологических состояний она рассматривается многими исследователями как перспективная молекулярная мишень для создания лекарственных средств с широким диапазоном применения. Вместе с тем, разработка таких препаратов может встретить существенные трудности, связанные с потенциальным негативным воздействием этих соединений на физиологические процессы, регулируемые КЛЦМ. Так, ингибирование каталитической активности L-КЛЦМ в эндотелии/эпителии может подавлять активность гладкомышечной s-КЛЦМ и других киназ РЛЦ миозина (скелетной, сердечной) в отсутствие технологий направленной доставки ингибитора. Избирательная модуляция экспрессии КЛЦМ в определенном типе клеток потребует знаний об

особенностях тканеспецифической регуляции множественных промоторов гена *mylk1*, а селективное воздействие на некаталитические активности КЛЦМ потребует детальной характеристики участков связывания КЛЦМ с белками-партнерами и также будет критически зависеть от эффективных методов направленного транспорта.

IX. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Неослабевающий в течение нескольких десятилетий интерес к КЛЦМ говорит о ее признанном биомедицинском значении и одновременно свидетельствует о больших пластах непонятого в плане организации и регуляции гена *mylk1*, структурно-функциональных свойств его продуктов и их роли в (пато)физиологии клетки и организма в целом. Сегодня довольно много известно о дифференциальной регуляции экспрессии гена *mylk1*, но практически отсутствуют механистические исследования роли его полиморфизмов в предрасположенности к заболеваниям, равно как и сам список патологических состояний, ассоциированных с полиморфизмами КЛЦМ, представляется далеко не полным.

Сделаны лишь первые шаги в исследовании взаимодействий L-КЛЦМ, s-КЛЦМ и KRP/телокина с белками-партнерами, которые могут модулировать их ферментативные и неферментативные свойства. В случае L-КЛЦМ белок-белковые взаимодействия уникальной N-концевой области L-КЛЦМ могут определять ее внутриклеточную локализацию и участие в различных клеточных процессах. Учитывая подтвержденное участие L-КЛЦМ во многих физиологических процессах в клетках и тканях, расшифровка белок-белковых взаимодействий L-КЛЦМ, их функциональной роли и механизмов регуляции является актуальной фундаментальной задачей с многообещающими прикладными результатами.

Несмотря на общепризнанное значение посттрансляционных модификаций в регуляции структуры и функций белков в клетках, в случае L-КЛЦМ и других продуктов гена *mylk1* регуляторная роль ПТМ практически не изучена, а имеющиеся сообщения, связывающие ПТМ и свойства белка, ставят больше вопросов, чем дают ответов. В частности, это связано с недостаточным пониманием организации самой КЛЦМ и ее взаимодействий с другими белками. Определение участков внутримолекулярных и белок-белковых взаимодействий в первичной структуре КЛЦМ даст ключ к пониманию роли ПТМ в этом белке. И наоборот, распределение ПТМ в КЛЦМ, по-видимому, указывает на те участки в ее первичной структуре, которые вовлечены в различные взаимодействия и потому подвергаются регуляции

in vivo. Таким образом, решение проблемы ПТМ L-КЛЦМ представляет собой актуальное направление исследований этого белка, позволяющее глубже понять его роль в (пато)физиологии клетки. Движение в этом направлении во многом зависит от прогресса в изучении молекулярной анатомии КЛЦМ и идентификации участков связывания ее партнеров.

Исследования роли КЛЦМ в жизнедеятельности клетки и целого организма, выполненные с помощью молекулярно-генетических и фармакологических методов управления содержанием и активностью этого белка, позволили обозначить ареал КЛЦМ-зависимых клеточных реакций. Как и предполагалось, в него вошли различные аспекты клеточной подвижности. В дальнейшем удалось показать, что при сердечно-сосудистых, онкологических, инфекционных и других заболеваниях, диабете и травмах нарушения двигательных реакций клеток, лежащие в основе этих патологий, также зачастую связаны с нарушениями в молекулярной системе КЛЦМ-белки партнеры. Это дает основания рассматривать КЛЦМ как перспективную молекулярную мишень при создании новых лекарственных препаратов. Первые шаги в этом направлении уже сделаны. Однако предстоит преодолеть еще много объективных сложностей, связанных с широким распространением КЛЦМ и ее вовлеченностью в важнейшие физиологические процессы в организме. Критическим для успеха здесь становится понимание механизмов тканеспецифической регуляции экспрессии гена *mylk1*, взаимодействий и посттрансляционных модификаций КЛЦМ, а также разработка методов направленной доставки специфичных к КЛЦМ реагентов (синтетические ингибиторы, интеркалирующие пептиды, молекулярно-биологические конструкции и т.д.) *in vivo*. Дальнейшие исследования в этих направлениях позволят осуществить трансляцию фундаментальных знаний о КЛЦМ в технологии и продукты, в которых остро нуждается практическая медицина.

Примечание при корректуре

Когда обзор был готов к публикации, Gaceb et al.* сообщили о том, что циркулирующие микровезикулы из *L-КЛЦМ*^{-/-} мышей оказывают защитное действие в случае воспалительных реакций, вызванных липополисахаридом *in vivo* и в культуре эндотелия аорты.

* Gaceb, A., Vergori, L., Martinez, M.C., Andriantsitohaina, R. (2016) Activation of endothelial pro-resolving anti-inflammatory pathways by circulating microvesicles from non-muscular myosin light chain kinase-deficient mice, *Front. Pharmacol.*, 7, 322. doi: 10.3389/fphar.2016.00322).

ЛИТЕРАТУРА

1. Cunningham, K.E., Turner, J.R. (2012) Myosin light chain kinase: pulling the strings of epithelial tight junction function, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1258**, 34–42.
2. Herring, B.P., El-Mounayri, O., Gallagher, P.J., Yin, F., Zhou, J. (2006) Regulation of myosin light chain kinase and telokin expression in smooth muscle tissues, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **291**, C817–C827.
3. Kamm, K.E., Stull, J.T. (2001) Dedicated myosin light chain kinases with diverse cellular functions, *J. Biol. Chem.*, **276**, 4527–4530.
4. Lukas, T.J., Shirinsky, V.P. (2012) MYLK (Myosin Light Chain Kinase). *Encyclopedia of Signaling Molecules*. / Ed. S. Choi. New York.: Springer Reference, 1160–1165.
5. Shen, K., Wang, T., Garcia, J.G. (2012) MYLK (myosin light chain kinase), *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*, **16**, 901–908.
6. Хапчаев А.Ю., Ширинский В.П., Воротников, А.В. (2003) Структура, свойства и регуляция белковых продуктов генетического локуса киназы легких цепей миозина, *Успехи биологической химии*, **43**, 365–420.
7. Gallagher, P.J., Herring, B.P., Stull, J.T. (1997) Myosin light chain kinases, *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **18**, 1–16.
8. Gao, Y., Ye, L.H., Kishi, H., Okagaki, T., Samizo, K., Nakamura, A., Kohama, K. (2001) Myosin light chain kinase as a multifunctional regulatory protein of smooth muscle contraction, *IUBMB Life*, **51**, 337–344.
9. Takashima, S. (2009) Phosphorylation of myosin regulatory light chain by myosin light chain kinase, and muscle contraction, *Circ. J.*, **73**, 208–213.
10. Hong, F., Haldeman, B.D., Jackson, D., Carter, M., Baker, J.E., Cremo, C.R. (2011) Biochemistry of smooth muscle myosin light chain kinase, *Arch. Biochem. Biophys.*, **510**, 135–146.
11. Dabrowska, R., Sherry, J.M., Aromatario, D.K., Hartshorne, D.J. (1978) Modulator protein as a component of the myosin light chain kinase from chicken gizzard, *Biochemistry*, **17**, 253–258.
12. Pires, E., Perry, S.V., Thomas, M.A. (1974) Myosin light-chain kinase, a new enzyme from striated muscle, *FEBS Lett.*, **41**, 292–296.
13. 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., et al. (2008) Identification of cardiac-specific myosin light chain kinase, *Circ. Res.*, **102**, 571–580.
14. Roush, C.L., Kennelly, P.J., Glaccum, M.B., Helfman, D.M., Scott, J.D., Krebs, E.G. (1988) Isolation of the cDNA encoding rat skeletal muscle myosin light chain kinase. Sequence and tissue distribution, *J. Biol. Chem.*, **263**, 10510–10516.
15. Birukov, K.G., Schavocky, J.P., Shirinsky, V.P., Chibalina, M.V., Van Eldik, L.J., 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.
16. Potier, M.C., Chelot, E., Pekarsky, Y., Gardiner, K., Rossier, J., Turnell, W.G. (1995) The human myosin light chain kinase (MLCK) from hippocampus: cloning, sequencing, expression, and localization to 3qcen-q21, *Genomics*, **29**, 562–570.
17. Hornbeck, P.V., Zhang, B., Murray, B., Kornhauser, J.M., Latham,

- V., Skrzypek, E. (2015) Phospho-SitePlus, 2014: mutations, PTMs and recalibrations, *Nucleic Acids Res.*, **43**, D512–D520.
18. Watterson, D.M., Collinge, M., Lukas, T.J., Van Eldik, L.J., Birukov, K.G., Stepanova, O.V., Shirinsky, V.P. (1995) Multiple gene products are produced from a novel protein kinase transcription region, *FEBS Lett.*, **373**, 217–220.
19. Ito, M., Dabrowska, R., Guerriero, V., Jr., Hartshorne, D.J. (1989) Identification in turkey gizzard of an acidic protein related to the C-terminal portion of smooth muscle myosin light chain kinase, *J. Biol. Chem.*, **264**, 13971–13974.
20. Ye, D., Ma, T.Y. (2008) Cellular and molecular mechanisms that mediate basal and tumour necrosis factor- α -induced regulation of myosin light chain kinase gene activity, *J. Cell Mol. Med.*, **12**, 1331–1346.
21. Shimizu, Y., Camp, S.M., Sun, X., Zhou, T., Wang, T., Garcia, J.G. (2015) Sp1-mediated nonmuscle myosin light chain kinase expression and enhanced activity in vascular endothelial growth factor-induced vascular permeability, *Pulm. Circ.*, **5**, 707–715.
22. Chang, A.N., Mahajan, P., Knapp, S., Barton, H., Sweeney, H.L., Kamm, K.E., Stull, J.T. (2016) Cardiac myosin light chain is phosphorylated by Ca²⁺/calmodulin-dependent and -independent kinase activities, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, E3824–E3833.
23. Guerriero, V., Jr., Russo, M.A., Olson, N.J., Putkey, J.A., Means, A.R. (1986) Domain organization of chicken gizzard myosin light chain kinase deduced from a cloned cDNA, *Biochemistry*, **25**, 8372–8381.
24. Garcia, J.G., Lazar, V., Gilbert-McClain, L.I., Gallagher, P.J., Verin, A.D. (1997) Myosin light chain kinase in endothelium: molecular cloning and regulation, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **16**, 489–494.
25. Collinge, M., Matrisian, P.E., Zimmer, W.E., Shattuck, R.L., Lukas, T.J., Van Eldik, L.J., Watterson, D.M. (1992) Structure and expression of a calcium-binding protein gene contained within a calmodulin-regulated protein kinase gene, *Mol. Cell Biol.*, **12**, 2359–2371.
26. Gallagher, P.J., Herring, B.P. (1991) The carboxyl terminus of the smooth muscle myosin light chain kinase is expressed as an independent protein, telokin, *J. Biol. Chem.*, **266**, 23945–23952.
27. Yin, F., Hoggatt, A.M., Zhou, J., Herring, B.P. (2006) 130-kDa smooth muscle myosin light chain kinase is transcribed from a CArG-dependent, internal promoter within the mouse mylk gene, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **290**, C1599–C1609.
28. Hoggatt, A.M., Simon, G.M., Herring, B.P. (2002) Cell-specific regulatory modules control expression of genes in vascular and visceral smooth muscle tissues, *Circ. Res.*, **91**, 1151–1159.
29. Herring, B.P., Smith, A.F. (1997) Telokin expression in A10 smooth muscle cells requires serum response factor, *Am. J. Physiol.*, **272**, C1394–C1404.
30. Khromov, A.S., Wang, H., Choudhury, N., McDuffie, M., Herring, B.P., Nakamoto, R., Owens, G.K., Somlyo, A.P., Somlyo, A.V. (2006) Smooth muscle of telokin-deficient mice exhibits increased sensitivity to Ca²⁺ and decreased cGMP-induced relaxation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 2440–2445.
31. Zhou, J., Herring, B.P. (2005) Mechanisms responsible for the promoter-specific effects of myocardin, *J. Biol. Chem.*, **280**, 10861–10869.
32. El-Mounayri, O., Triplett, J.W., Yates, C.W., Herring, B.P. (2005)

- Regulation of smooth muscle-specific gene expression by homeodomain proteins, Hoxa10 and Hoxb8, *J. Biol. Chem.*, **280**, 25854–25863.
33. Zhou, J., Hoggatt, A.M., Herring, B.P. (2004) Activation of the smooth muscle-specific telokin gene by thyrotroph embryonic factor (TEF), *J. Biol. Chem.*, **279**, 15929–15937.
34. Hoggatt, A.M., Kim, J.R., Ustiyani, V., Ren, X., Kalin, T.V., Kalinichenko, V.V., Herring, B.P. (2013) The transcription factor Foxf1 binds to serum response factor and myocardin to regulate gene transcription in visceral smooth muscle cells, *J. Biol. Chem.*, **288**, 28477–28487.
35. Hoggatt, A.M., Kriegel, A.M., Smith, A.F., Herring, B.P. (2000) Hepatocyte nuclear factor-3 homologue 1 (HFH-1) represses transcription of smooth muscle-specific genes, *J. Biol. Chem.*, **275**, 31162–31170.
36. Yin, F., Herring, B.P. (2005) GATA-6 can act as a positive or negative regulator of smooth muscle-specific gene expression, *J. Biol. Chem.*, **280**, 4745–4752.
37. Zhou, J., Hu, G., Herring, B.P. (2005) Smooth muscle-specific genes are differentially sensitive to inhibition by Elk-1, *Mol. Cell Biol.*, **25**, 9874–9885.
38. Watterson, D.M., Schavocky, J.P., Guo, L., Weiss, C., Chlenski, A., Shirinsky, V.P., Van Eldik, L.J., Haiech, J. (1999) Analysis of the kinase-related protein gene found at human chromosome 3q21 in a multi-gene cluster: organization, expression, alternative splicing, and polymorphic marker, *J. Cell Biochem.*, **75**, 481–491.
39. Zhou, J., Blue, E.K., Hu, G., Herring, B.P. (2008) Thymine DNA glycosylase represses myocardin-induced smooth muscle cell differentiation by competing with serum response factor for myocardin binding, *J. Biol. Chem.*, **283**, 35383–35392.
40. Zhou, J., Hu, G., Wang, X. (2010) Repression of smooth muscle differentiation by a novel high mobility group box-containing protein, HMG2L1, *J. Biol. Chem.*, **285**, 23177–23185.
41. Liu, F., Wang, X., Hu, G., Wang, Y., Zhou, J. (2014) The transcription factor TEAD1 represses smooth muscle-specific gene expression by abolishing myocardin function, *J. Biol. Chem.*, **289**, 3308–3316.
42. Han, Y.J., Hu, W.Y., Chernaya, O., Antic, N., Gu, L., Gupta, M., Piano, M., de Lanerolle, P. (2006) Increased myosin light chain kinase expression in hypertension: Regulation by serum response factor via an insertion mutation in the promoter, *Mol. Biol. Cell*, **17**, 4039–4050.
43. Chen, M., Zhang, W., Lu, X., Hoggatt, A.M., Gunst, S.J., Kassab, G.S., Tune, J.D., Herring, B.P. (2013) Regulation of 130-kDa smooth muscle myosin light chain kinase expression by an intronic CArG element, *J. Biol. Chem.*, **288**, 34647–34657.
44. Basu, S., Srinivasan, D.K., Yang, K., Raina, H., Banerjee, S., Zhang, R., Fisher, S.A., Proweller, A. (2013) Notch transcriptional control of vascular smooth muscle regulatory gene expression and function, *J. Biol. Chem.*, **288**, 11191–11202.
45. Basu, S., Proweller, A. (2016) Autoregulatory Control of Smooth Muscle Myosin Light Chain Kinase Promoter by Notch Signaling, *J. Biol. Chem.*, **291**, 2988–2999.
46. Graham, W.V., Wang, F., Clayburgh, D.R., Cheng, J.X., Yoon, B., Wang, Y., Lin, A., Turner, J.R. (2006) Tumor necrosis factor-induced long myosin light chain kinase transcription is regulated by differentiation-dependent signaling events. Characterization of the human long myosin light chain kinase promoter, *J. Biol. Chem.*, **281**, 26205–26215.

47. Wang, F., Graham, W.V., Wang, Y., Witkowski, E.D., Schwarz, B.T., Turner, J.R. (2005) Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha synergize to induce intestinal epithelial barrier dysfunction by up-regulating myosin light chain kinase expression, *Am. J. Pathol.*, **166**, 409–419.
48. Ye, D., Ma, I., Ma, T.Y. (2006) Molecular mechanism of tumor necrosis factor-alpha modulation of intestinal epithelial tight junction barrier, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **290**, G496–G504.
49. Al-Sadi, R., Guo, S., Dokladny, K., Smith, M.A., Ye, D., Kaza, A., Watterson, D.M., Ma, T.Y. (2012) Mechanism of interleukin-1beta induced-increase in mouse intestinal permeability in vivo, *J. Interferon Cytokine Res.*, **32**, 474–484.
50. Al-Sadi, R., Guo, S., Ye, D., Rawat, M., Ma, T.Y. (2016) TNF-alpha Modulation of Intestinal Tight Junction Permeability Is Mediated by NIK/IKK-alpha Axis Activation of the Canonical NF-kappaB Pathway, *Am. J. Pathol.*, **186**, 1151–1165.
51. Al-Sadi, R., Ye, D., Said, H.M., Ma, T.Y. (2011) Cellular and molecular mechanism of interleukin-1beta modulation of Caco-2 intestinal epithelial tight junction barrier, *J. Cell Mol. Med.*, **15**, 970–982.
52. Al-Sadi, R., Guo, S., Ye, D., Dokladny, K., Alhmoud, T., Ereifej, L., Said, H.M., Ma, T.Y. (2013) Mechanism of IL-1beta modulation of intestinal epithelial barrier involves p38 kinase and activating transcription factor-2 activation, *J. Immunol.*, **190**, 6596–6606.
53. Cao, M., Wang, P., Sun, C., He, W., Wang, F. (2013) Amelioration of IFN-gamma and TNF-alpha-induced intestinal epithelial barrier dysfunction by berberine via suppression of MLCK-MLC phosphorylation signaling pathway, *PLoS One*, **8**, e61944.
54. Qi, H., Wang, P., Liu, C., Li, M., Wang, S., Huang, Y., Wang, F. (2011) Involvement of HIF-1alpha in MLCK-dependent endothelial barrier dysfunction in hypoxia, *Cell Physiol. Biochem.*, **27**, 251–262.
55. Leveille, N., Fournier, A., Labrie, C. (2009) Androgens down-regulate myosin light chain kinase in human prostate cancer cells, *J. Steroid Biochem Mol Biol*, **114**, 174–179.
56. Adyshev, D.M., Moldobaeva, N., Mapes, B., Elangovan, V., Garcia, J.G. (2013) MicroRNA regulation of nonmuscle myosin light chain kinase expression in human lung endothelium, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **49**, 58–66.
57. Weber, M., Kim, S., Patterson, N., Rooney, K., Searles, C.D. (2014) MiRNA-155 targets myosin light chain kinase and modulates actin cytoskeleton organization in endothelial cells, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **306**, H1192–H1203.
58. Heidersbach, A., Saxby, C., Carver-Moore, K., Huang, Y., Ang, Y.S., de Jong, P.J., Ivey, K.N., Srivastava, D. (2013) microRNA-1 regulates sarcomere formation and suppresses smooth muscle gene expression in the mammalian heart, *Elife*, **2**, e01323.
59. Zhu, H.Q., Wang, F., Dong, L.Y., Zhou, Q., Wang, Y. (2014) MicroRNA1 modulates oxLDL-induced hyperlipidemia by down-regulating MLCK and ERK/p38 MAPK pathway, *Life Sci.*, **107**, 21–26.
60. Sundararajan, V., Gengenbacher, N., Stemmler, M.P., Kleemann, J.A., Brabletz, T., Brabletz, S. (2015) The ZEB1/miR-200c feedback loop regulates invasion via actin interacting proteins MYLK and TKS5, *Oncotarget*, **6**, 27083–27096.
61. Lazar, V., Garcia, J.G. (1999) A single human myosin light chain kinase gene (MLCK; MYLK), *Genomics*, **57**, 256–267.

62. Gao, L., Grant, A., Halder, I., Brower, R., Sevransky, J., Maloney, J.P., Moss, M., Shanholtz, C., Yates, C.R., Meduri, G.U., et al. (2006) Novel polymorphisms in the myosin light chain kinase gene confer risk for acute lung injury, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **34**, 487–495.
63. Gao, L., Grant, A.V., Rafaels, N., Stockton-Porter, M., Watkins, T., Gao, P., Chi, P., Munoz, M., Watson, H., Dunston, G., et al. (2007) Polymorphisms in the myosin light chain kinase gene that confer risk of severe sepsis are associated with a lower risk of asthma, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **119**, 1111–1118.
64. Han, Y.J., Ma, S.F., Wade, M.S., Flores, C., Garcia, J.G. (2012) An intronic MYLK variant associated with inflammatory lung disease regulates promoter activity of the smooth muscle myosin light chain kinase isoform, *J. Mol. Med. (Berl.)*, **90**, 299–308.
65. Lee, S.O., Cheong, H.S., Park, B.L., Bae, J.S., Sim, W.C., Chun, J.Y., Isbat, M., Uh, S.T., Kim, Y.H., Jang, A.S., et al. (2009) MYLK polymorphism associated with blood eosinophil level among asthmatic patients in a Korean population, *Mol. Cells*, **27**, 175–181.
66. Wang, L., Guo, D.C., Cao, J., Gong, L., Kamm, K.E., Regalado, E., Li, L., Shete, S., He, W.Q., Zhu, M.S., Offermanns, S., Gilchrist, D., Eleftheriades, J., Stull, J.T., Milewicz, D.M. (2010) Mutations in myosin light chain kinase cause familial aortic dissections, *Am. J. Hum. Genet.*, **87**, 701–707.
67. Rusconi, F., Potier, M.C., Le Caer, J.P., Schmitter, J.M., Rossier, J. (1997) Characterization of the chicken telokin heterogeneity by time-of-flight mass spectrometry, *Biochemistry*, **36**, 11021–11026.
68. Strausberg, R.L., Feingold, E.A., Grouse, L.H., Derge, J.G., Klausner, R.D., Collins, F.S., Wagner, L., Shenmen, C.M., Schuler, G.D., Altschul, S.F., et al. (2002) Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 16899–16903.
69. Herring, B.P., Smith, A.F. (1996) Telokin expression is mediated by a smooth muscle cell-specific promoter, *Am. J. Physiol.*, **270**, C1656–C1665.
70. Herring, B.P., Dixon, S., Gallagher, P.J. (2000) Smooth muscle myosin light chain kinase expression in cardiac and skeletal muscle, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **279**, C1656–C1664.
71. Gallagher, P.J., Garcia, J.G., Herring, B.P. (1995) Expression of a novel myosin light chain kinase in embryonic tissues and cultured cells, *J. Biol. Chem.*, **270**, 29090–29095.
72. Fisher, S.A., Ikebe, M. (1995) Developmental and tissue distribution of expression of nonmuscle and smooth muscle isoforms of myosin light chain kinase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **217**, 696–703.
73. Blue, E.K., Goeckeler, Z.M., Jin, Y., Hou, L., Dixon, S.A., Herring, B.P., Wysolmerski, R.B., Gallagher, P.J. (2002) 220- and 130-kDa MLCKs have distinct tissue distributions and intracellular localization patterns, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **282**, C451–C460.
74. Kudryashov, D.S., Chibalina, M.V., Birukov, K.G., Lukas, T.J., Sellers, J.R., Van Eldik, L.J., Watterson, D.M., 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.
75. Krymsky, M.A., Kudryashov, D.S., Shirinsky, V.P., Lukas, T.J., Watterson, D.M., Vorotnikov, A.V. (2001) Phosphorylation of kinase-related protein (telokin) in tonic and phasic smooth muscles, *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **22**, 425–437.

76. Xu, J., Gao, X.P., Ramchandran, R., Zhao, Y.Y., Vogel, S.M., Malik, A.B. (2008) Nonmuscle myosin light-chain kinase mediates neutrophil transmigration in sepsis-induced lung inflammation by activating beta2 integrins, *Nat. Immunol.*, **9**, 880–886.
77. Sun, C., Wu, M.H., Yuan, S.Y. (2011) Nonmuscle myosin light-chain kinase deficiency attenuates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice via reduced endothelial barrier dysfunction and monocyte migration, *Circulation*, **124**, 48–57.
78. Clayburgh, D.R., Rosen, S., Witkowski, E.D., Wang, F., Blair, S., Dudek, S., Garcia, J.G., Alverdy, J.C., 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.
79. Verin, A.D., Lazar, V., Torrey, R.J., Labarrere, C.A., Patterson, C.E., Garcia, J.G. (1998) Expression of a novel high molecular-weight myosin light chain kinase in endothelium, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **19**, 758–766.
80. Hathaway, D.R., Adelstein, R.S. (1979) Human platelet myosin light chain kinase requires the calcium-binding protein calmodulin for activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 1653–1657.
81. Wang, H.H., Nakamura, A., Matsumoto, A., Yoshiyama, S., Qin, X., Ye, L.H., Xie, C., Zhang, Y., Gao, Y., Ishikawa, R., Kohama, K. (2009) Non-kinase activity of MLCK in elongated filopodia formation and chemotaxis of vascular smooth muscle cells toward sphingosylphosphorylcholine, *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.*, **296**, H1683–H1693.
82. Poperechnaya, A., Varlamova, O., Lin, P.J., Stull, J.T., Bresnick, A.R. (2000) Localization and activity of myosin light chain kinase isoforms during the cell cycle, *J. Cell Biol.*, **151**, 697–708.
83. Woody, S., Stall, R., Ramos, J., Patel, Y.M. (2013) Regulation of myosin light chain kinase during insulin-stimulated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes, *PLoS One*, **8**, e77248.
84. Yu, H.J., Serebryanny, L.A., Fry, M., Greene, M., Chernaya, O., Hu, W.Y., Chew, T.L., Mahmud, N., Kadkol, S.S., Glover, S., Prins, G., Strakova, Z., de Lanerolle, P. (2013) Tumor stiffness is unrelated to myosin light chain phosphorylation in cancer cells, *PLoS One*, **8**, e79776.
85. Kim, D.Y., Helfman, D.M. (2016) Loss of MLCK leads to disruption of cell-cell adhesion and invasive behavior of breast epithelial cells via increased expression of EGFR and ERK/JNK signaling, *Oncogene*, **35**, 4495–4508.
86. Minamiya, Y., Nakagawa, T., Saito, H., Matsuzaki, I., Taguchi, K., Ito, M., Ogawa, J. (2005) Increased expression of myosin light chain kinase mRNA is related to metastasis in non-small cell lung cancer, *Tumour Biol.*, **26**, 153–157.
87. Kennelly, P.J., Leng, J., Marchand, P. (1992) The MgATP-binding site on chicken gizzard myosin light chain kinase remains open and functionally competent during the calmodulin-dependent activation-inactivation cycle of the enzyme, *Biochemistry*, **31**, 5394–5399.
88. Herring, B.P., Gallagher, P.J., Stull, J.T. (1992) Substrate specificity of myosin light chain kinases, *J. Biol. Chem.*, **267**, 25945–25950.
89. Sobieszek, A. (1991) Regulation of smooth-muscle myosin-light-chain kinase. Steady-state kinetic studies of the reaction mechanism, *Eur. J. Biochem.*, **199**, 735–743.
90. Sobieszek, A., Andrukhov, O.Y., Nieznanski, K. (1997) Kinase-related protein (telokin) is phosphorylated by smooth-muscle myosin light-chain kinase and modulates the kinase activity, *Biochem. J.*, **328** (Pt 2), 425–430.

91. Davis, H.W., Crimmins, D.L., Thomas, R.S., Garcia, J.G. (1996) Phosphorylation of calmodulin in the first calcium-binding pocket by myosin light chain kinase, *Arch. Biochem. Biophys.*, **332**, 101–109.
92. Kemp, B.E., Pearson, R.B. (1985) Spatial requirements for location of basic residues in peptide substrates for smooth muscle myosin light chain kinase, *J. Biol. Chem.*, **260**, 3355–3359.
93. Persechini, A., Hartshorne, D.J. (1983) Ordered phosphorylation of the two 20 000 molecular weight light chains of smooth muscle myosin, *Biochemistry*, **22**, 470–476.
94. Ikebe, M., Hartshorne, D.J., Elzinga, M. (1986) Identification, phosphorylation, and dephosphorylation of a second site for myosin light chain kinase on the 20,000-dalton light chain of smooth muscle myosin, *J. Biol. Chem.*, **261**, 36–39.
95. Amano, M., Ito, M., Kimura, K., Fukata, Y., Chihara, K., Nakano, T., Matsuura, Y., Kaibuchi, K. (1996) Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase), *J. Biol. Chem.*, **271**, 20246–20249.
96. Murata-Hori, M., Suizu, F., Iwasaki, T., Kikuchi, A., Hosoya, H. (1999) ZIP kinase identified as a novel myosin regulatory light chain kinase in HeLa cells, *FEBS Lett.*, **451**, 81–84.
97. Uehara, R., Hosoya, H., Mabuchi, I. (2008) In vivo phosphorylation of regulatory light chain of myosin II in sea urchin eggs and its role in controlling myosin localization and function during cytokinesis, *Cell Motil. Cytoskeleton*, **65**, 100–115.
98. Puetz, S., Schroeter, M.M., Piechura, H., Reimann, L., Hunger, M.S., Lubomirov, L.T., Metzler, D., Warscheid, B., Pfister, G. (2012) New insights into myosin phosphorylation during cyclic nucleotide-mediated smooth muscle relaxation, *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **33**, 471–483.
99. Pearson, R.B., Wettenhall, R.E., Means, A.R., Hartshorne, D.J., Kemp, B.E. (1988) Autoregulation of enzymes by pseudosubstrate prototopes: myosin light chain kinase, *Science*, **241**, 970–973.
100. Tanaka, M., Ikebe, R., Matsuura, M., Ikebe, M. (1995) Pseudosubstrate sequence may not be critical for autoinhibition of smooth muscle myosin light chain kinase, *EMBO J.*, **14**, 2839–2846.
101. Lukas, T.J., Mirzoeva, S., Slomczynska, U., Watterson, D.M. (1999) Identification of novel classes of protein kinase inhibitors using combinatorial peptide chemistry based on functional genomics knowledge, *J. Med. Chem.*, **42**, 910–919.
102. Clayburgh, D.R., Barrett, T.A., Tang, Y., Meddings, J.B., Van Eldik, L.J., Watterson, D.M., Clarke, L.L., Mrsny, R.J., Turner, J.R. (2005) Epithelial myosin light chain kinase-dependent barrier dysfunction mediates T cell activation-induced diarrhea in vivo, *J. Clin. Invest.*, **115**, 2702–2715.
103. Owens, S.E., Graham, W.V., Siccardi, D., Turner, J.R., Mrsny, R.J. (2005) A strategy to identify stable membrane-permeant peptide inhibitors of myosin light chain kinase, *Pharm. Res.*, **22**, 703–709.
104. Khapchaev, A.Y., Kazakova, O.A., Samsonov, M.V., Sidorova, M.V., Bushuev, V.N., Vilitkevich, E.L., Az'muko, A.A., Molokoedov, A.S., Bepalova, Z.D., Shirinsky, V.P. (2016) Design of Peptidase-resistant Peptide Inhibitors of Myosin Light Chain Kinase, *Journal of Peptide Science*, in press.
105. Mirzapoiazova, T., Moitra, J., Moreno-Vinasco, L., Sammani, S., Turner, J.R., Chiang, E.T., Evenoski, C., Wang, T., Singleton, P.A., Huang, Y., Lussier, Y.A., Watterson, D.M., Dudek, S.M., Garcia, J.G. (2011) Non-muscle myosin light chain kinase isoform is a viable molecular

- target in acute inflammatory lung injury, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **44**, 40–52.
106. Johnson, J.D., Snyder, C., Walsh, M., Flynn, M. (1996) Effects of myosin light chain kinase and peptides on Ca^{2+} exchange with the N- and C-terminal Ca^{2+} binding sites of calmodulin, *J. Biol. Chem.*, **271**, 761–767.
 107. Krueger, J.K., Zhi, G., Stull, J.T., Trehwella, J. (1998) Neutron-scattering studies reveal further details of the Ca^{2+} /calmodulin-dependent activation mechanism of myosin light chain kinase, *Biochemistry*, **37**, 13997–14004.
 108. Pearson, R.B., Misconi, L.Y., Kemp, B.E. (1986) Smooth muscle myosin kinase requires residues on the COOH-terminal side of the phosphorylation site. Peptide inhibitors, *J. Biol. Chem.*, **261**, 25–27.
 109. Silver, D.L., Vorotnikov, A.V., Watterson, D.M., Shirinsky, V.P., Sellers, J.R. (1997) Sites of interaction between kinase-related protein and smooth muscle myosin, *J. Biol. Chem.*, **272**, 25353–25359.
 110. Shirinsky, V.P., Vorotnikov, A.V., Birukov, K.G., Nanaev, A.K., Collinge, M., Lukas, T.J., Sellers, J.R., 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.
 111. Nieznanski, K., Sobieszek, A. (1997) Telokin (kinase-related protein) modulates the oligomeric state of smooth-muscle myosin light-chain kinase and its interaction with myosin filaments, *Biochem. J.*, **322** (Pt 1), 65–71.
 112. Shcherbakova, O.V., Serebryanaya, D.V., Postnikov, A.B., Schroeter, M.M., Zittrich, S., Noegel, A.A., Shirinsky, V.P., Vorotnikov, A.V., Pfitzer, G. (2010) Kinase-related protein/telokin inhibits Ca^{2+} -independent contraction in Triton-skin-*ned* guinea pig taenia coli, *Biochem. J.*, **429**, 291–302.
 113. Minajeva, A., Neagoe, C., Kulke, M., Linke, W.A. (2002) Titin-based contribution to shortening velocity of rabbit skeletal myofibrils, *J. Physiol.*, **540**, 177–188.
 114. Smith, L., Su, X., Lin, P., Zhi, G., Stull, J.T. (1999) Identification of a novel actin binding motif in smooth muscle myosin light chain kinase, *J. Biol. Chem.*, **274**, 29433–29438.
 115. Smith, L., Parizi-Robinson, M., Zhu, M.S., Zhi, G., Fukui, R., Kamm, K.E., 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.
 116. Hong, F., Brizendine, R.K., Carter, M.S., Alcalá, D.B., Brown, A.E., Chaitin, A.M., Haldeman, B.D., Walsh, M.P., Facemyer, K.C., Baker, J.E., Cremo, C.R. (2015) Diffusion of myosin light chain kinase on actin: A mechanism to enhance myosin phosphorylation rates in smooth muscle, *J. Gen. Physiol.*, **146**, 267–280.
 117. Hatch, V., Zhi, G., Smith, L., Stull, J.T., Craig, R., Lehman, W. (2001) Myosin light chain kinase binding to a unique site on F-actin revealed by three-dimensional image reconstruction, *J. Cell Biol.*, **154**, 611–617.
 118. Ye, L.H., Hayakawa, K., Kishi, H., Imamura, M., Nakamura, A., Okagaki, T., Takagi, T., Iwata, A., Tanaka, T., Kohama, K. (1997) The structure and function of the actin-binding domain of myosin light chain kinase of smooth muscle, *J. Biol. Chem.*, **272**, 32182–32189.
 119. Lin, P., Luby-Phelps, K., Stull, J.T. (1997) Binding of myosin light chain kinase to cellular actin-myosin filaments, *J. Biol. Chem.*, **272**, 7412–7420.

120. 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., 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.
121. Вилиткевич Е.Л., Хапчаев А.Ю., Кудряшов Д.С., Никашин А.В., Шабоки Д.П., Лукас Т.Д., Ваттерсон Д.М., Ширинский В.П. (2015) Фосфорилирование регулирует взаимодействие N-концевого домена высокомолекулярной киназы легких цепей миозина с актиновым цитоскелетом, *Биохимия*, **80**, 1561–1571.
122. 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., 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.
123. Takizawa, N., Ikebe, R., Ikebe, M., Luna, E.J. (2007) Supervillin slows cell spreading by facilitating myosin II activation at the cell periphery, *J. Cell Sci.*, **120**, 3792–3803.
124. Garcia, J.G., Verin, A.D., Schaphorst, K., Siddiqui, R., Patterson, C.E., Csontos, C., Natarajan, V. (1999) Regulation of endothelial cell myosin light chain kinase by Rho, cortactin, and p60(src), *Am. J. Physiol.*, **276**, L989–L998.
125. Dudek, S.M., Birukov, K.G., Zhan, X., Garcia, J.G. (2002) Novel interaction of cortactin with endothelial cell myosin light chain kinase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **298**, 511–519.
126. Dudek, S.M., Jacobson, J.R., Chiang, E.T., Birukov, K.G., Wang, P., Zhan, X., Garcia, J.G. (2004) Pulmonary endothelial cell barrier enhancement by sphingosine 1-phosphate: roles for cortactin and myosin light chain kinase, *J. Biol. Chem.*, **279**, 24692–24700.
127. Wadgaonkar, R., Dudek, S.M., Zaiman, A.L., Linz-McGillem, L., Verin, A.D., Nurmukhambetova, S., Romer, L.H., 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.
128. Shen, K., Ramirez, B., Mapes, B., Shen, G.R., Gokhale, V., Brown, M.E., Santarsiero, B., Ishii, Y., Dudek, S.M., Wang, T., Garcia, J.G. (2015) Structure-Function Analysis of the Non-Muscle Myosin Light Chain Kinase (nmMLCK) Isoform by NMR Spectroscopy and Molecular Modeling: Influence of MYLK Variants, *PLoS One*, **10**, e0130515.
129. Sobieszek, A., Borkowski, J., Babychuk, V.S. (1997) Purification and characterization of a smooth muscle myosin light chain kinase-phosphatase complex, *J. Biol. Chem.*, **272**, 7034–7041.
130. Komatsu, S., Miyazaki, K., Tuft, R.A., Ikebe, M. (2002) Translocation of telokin by cGMP signaling in smooth muscle cells, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **283**, C752–C761.
131. Khromov, A.S., Momotani, K., Jin, L., Artamonov, M.V., Shannon, J., Eto, M., Somlyo, A.V. (2012) Molecular mechanism of telokin-mediated disinhibition of myosin light chain phosphatase and cAMP/cGMP-induced relaxation of gastrointestinal smooth muscle, *J. Biol. Chem.*, **287**, 20975–20985.
132. Faux, M.C., Mitchelhill, K.I., Katsis, F., Wettenhall, R.E., Kemp, B.E. (1993) Chicken smooth muscle myosin light chain kinase is acetylated on its NH₂-terminal methionine, *Mol. Cell Biochem.*, **127–128**, 81–91.

133. Shin, D.H., Chun, Y.S., Lee, K.H., Shin, H.W., Park, J.W. (2009) Arrest defective-1 controls tumor cell behavior by acetylating myosin light chain kinase, *PLoS One*, **4**, e7451.
134. Conti, M.A., Adelstein, R.S. (1981) 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.*, **256**, 317831–317881.
135. Lukas, T.J., Mirzoeva, S., Watterson, D.M. (1998) Calmodulin-regulated protein kinases. *Calmodulin and signal transduction*. / Ed. L.J. Van Eldik, D.M. Watterson. New York: Academic Press, 66–168.
136. Nishikawa, M., Shirakawa, S., Adelstein, R.S. (1985) Phosphorylation of smooth muscle myosin light chain kinase by protein kinase C. Comparative study of the phosphorylated sites, *J. Biol. Chem.*, **260**, 8978–8983.
137. Goeckeler, Z.M., Masaracchia, R.A., Zeng, Q., Chew, T.L., Gallagher, P., Wysolmerski, R.B. (2000) Phosphorylation of myosin light chain kinase by p21-activated kinase PAK2, *J. Biol. Chem.*, **275**, 18366–18374.
138. Birukov, K.G., Csontos, C., Marzilli, L., Dudek, S., Ma, S.F., Bresnick, A.R., Verin, A.D., Cotter, R.J., 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.
139. Dudek, S.M., Chiang, E.T., Camp, S.M., Guo, Y., Zhao, J., Brown, M.E., Singleton, P.A., Wang, L., Desai, A., Arce, F.T., Lal, R., Van Eyk, J.E., Imam, S.Z., Garcia, J.G. (2010) Abl tyrosine kinase phosphorylates nonmuscle Myosin light chain kinase to regulate endothelial barrier function, *Mol. Biol. Cell*, **21**, 4042–4056.
140. Dulyaninova, N.G., Bresnick, A.R. (2004) The long myosin light chain kinase is differentially phosphorylated during interphase and mitosis, *Exp. Cell Res.*, **299**, 303–314.
141. McManus, M.J., Boerner, J.L., Danielsen, A.J., Wang, Z., Matsumura, F., Maible, N.J. (2000) An oncogenic epidermal growth factor receptor signals via a p21-activated kinase-caldesmon-myosin phosphotyrosine complex, *J. Biol. Chem.*, **275**, 35328–35334.
142. Klemke, R.L., Cai, S., Giannini, A.L., Gallagher, P.J., de Lanerolle, P., Cheresch, D.A. (1997) Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase, *J. Cell Biol.*, **137**, 481–492.
143. Хапчаев А.Ю., Крымский М.А., Сидорова М.В., Беспалова Ж.Д., Ванг Ч.Л.А., Ширинский В.П., Воротников А.В. (2004) Новые фосфоспецифические антитела для анализа фосфорилирования белковых продуктов генетического локуса киназы легких цепей миозина, *Биохимия*, **69**, 968–980.
144. MacDonald, J.A., Walker, L.A., Nakamoto, R.K., Gorenne, I., Somlyo, A.V., Somlyo, A.P., Haystead, T.A. (2000) Phosphorylation of telokin by cyclic nucleotide kinases and the identification of in vivo phosphorylation sites in smooth muscle, *FEBS Lett.*, **479**, 83–88.
145. Wu, X., Haystead, T.A., Nakamoto, R.K., Somlyo, A.V., Somlyo, A.P. (1998) Acceleration of myosin light chain dephosphorylation and relaxation of smooth muscle by telokin. Synergism with cyclic nucleotide-activated kinase, *J. Biol. Chem.*, **273**, 11362–11369.
146. Webb, D.J., Donais, K., Whitmore, L.A., Thomas, S.M., Turner, C.E., Parsons, J.T., Horwitz, A.F. (2004) FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates ad-

- hesion disassembly, *Nat. Cell Biol.*, **6**, 154–161.
147. Levinson, H., Moyer, K.E., Sagers, G.C., Ehrlich, H.P. (2004) Calmodulin-myosin light chain kinase inhibition changes fibroblast-populated collagen lattice contraction, cell migration, focal adhesion formation, and wound contraction, *Wound Repair Regen.*, **12**, 505–511.
 148. Hong, T., Grabel, L.B. (2006) Migration of F9 parietal endoderm cells is regulated by the ERK pathway, *J. Cell Biochem.*, **97**, 1339–1349.
 149. Totsukawa, G., Wu, Y., Sasaki, Y., Hartshorne, D.J., Yamakita, Y., Yamashiro, S., Matsumura, F. (2004) Distinct roles of MLCK and ROCK in the regulation of membrane protrusions and focal adhesion dynamics during cell migration of fibroblasts, *J. Cell Biol.*, **164**, 427–439.
 150. Katoh, K., Kano, Y., Ookawara, S. (2007) Rho-kinase dependent organization of stress fibers and focal adhesions in cultured fibroblasts, *Genes Cells*, **12**, 623–638.
 151. Smith, A., Bracke, M., Leitinger, B., Porter, J.C., Hogg, N. (2003) LFA-1-induced T cell migration on ICAM-1 involves regulation of MLCK-mediated attachment and ROCK-dependent detachment, *J. Cell Sci.*, **116**, 3123–3133.
 152. Yokomori, H., Yoshimura, K., Nagai, T., Fujimaki, K., Nomura, M., Hibi, T., Ishii, H., Oda, M. (2004) Sinusoidal endothelial fenestrae organization regulated by myosin light chain kinase and Rho-kinase in cultured rat sinusoidal endothelial cells, *Hepatol. Res.*, **30**, 169–174.
 153. Lou, S.S., Diz-Munoz, A., Weiner, O.D., Fletcher, D.A., Theriot, J.A. (2015) Myosin light chain kinase regulates cell polarization independently of membrane tension or Rho kinase, *J. Cell Biol.*, **209**, 275–288.
 154. Chen, C., Tao, T., Wen, C., He, W.Q., Qiao, Y.N., Gao, Y.Q., Chen, X., Wang, P., Chen, C.P., Zhao, W., Chen, H.Q., Ye, A.P., Peng, Y.J., Zhu, M.S. (2014) Myosin light chain kinase (MLCK) regulates cell migration in a myosin regulatory light chain phosphorylation-independent mechanism, *J. Biol. Chem.*, **289**, 28478–28488.
 155. Bessard, A., Coutant, A., Rescan, C., Ezan, F., Fremin, C., Courselaud, B., Ilyin, G., Baffet, G. (2006) An MLCK-dependent window in late G1 controls S phase entry of proliferating rodent hepatocytes via ERK-p70S6K pathway, *Hepatology*, **44**, 152–163.
 156. Barkan, D., Kleinman, H., Simmons, J.L., Asmussen, H., Kamaraju, A.K., Hoenorhoff, M.J., Liu, Z.Y., Costes, S.V., Cho, E.H., Lockett, S., Khanna, C., Chambers, A.F., Green, J.E. (2008) Inhibition of metastatic outgrowth from single dormant tumor cells by targeting the cytoskeleton, *Cancer Res.*, **68**, 6241–6250.
 157. Zhou, X., Liu, Y., You, J., Zhang, H., Zhang, X., Ye, L. (2008) Myosin light-chain kinase contributes to the proliferation and migration of breast cancer cells through cross-talk with activated ERK1/2, *Cancer Lett.*, **270**, 312–327.
 158. Zou, D.B., Wei, X., Hu, R.L., Yang, X.P., Zuo, L., Zhang, S.M., Zhu, H.Q., Zhou, Q., Gui, S.Y., Wang, Y. (2015) Melatonin inhibits the Migration of Colon Cancer RKO cells by Down-regulating Myosin Light Chain Kinase Expression through Cross-talk with p38 MAPK, *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, **16**, 5835–5842.
 159. Wang, H.H., Nakamura, A., Yoshiyama, S., Ishikawa, R., Cai, N., Ye, L.H., Takano-Ohmuro, H., Kohama, K. (2012) Down-regulation of myosin light chain kinase ex-

- pression in vascular smooth muscle cells accelerates cell proliferation: requirement of its actin-binding domain for reversion to normal rates, *J. Pharmacol. Sci.*, **119**, 91–96.
160. Dulyaninova, N.G., Patskovsky, Y.V., Bresnick, A.R. (2004) The N-terminus of the long MLCK induces a disruption in normal spindle morphology and metaphase arrest, *J. Cell Sci.*, **117**, 1481–1493.
 161. Barfod, E.T., Moore, A.L., Van de Graaf, B.G., Lidofsky, S.D. (2011) Myosin light chain kinase and Src control membrane dynamics in volume recovery from cell swelling, *Mol. Biol. Cell*, **22**, 634–650.
 162. Li, L., Wu, X., Yue, H.Y., Zhu, Y.C., Xu, J. (2016) Myosin light chain kinase facilitates endocytosis of synaptic vesicles at hippocampal boutons, *J. Neurochem.*, **138**, 60–73.
 163. Yue, H.Y., Xu, J. (2014) Myosin light chain kinase accelerates vesicle endocytosis at the calyx of Held synapse, *J. Neurosci.*, **34**, 295–304.
 164. Kumakura, K., Sasaki, K., Sakurai, T., Ohara-Imaizumi, M., Misonou, H., Nakamura, S., Matsuda, Y., Nonomura, Y. (1994) Essential role of myosin light chain kinase in the mechanism for MgATP-dependent priming of exocytosis in adrenal chromaffin cells, *J. Neurosci.*, **14**, 7695–7703.
 165. Arous, C., Rondas, D., Halban, P.A. (2013) Non-muscle myosin IIA is involved in focal adhesion and actin remodelling controlling glucose-stimulated insulin secretion, *Diabetologia*, **56**, 792–802.
 166. Getz, T.M., Dangelmaier, C.A., Jin, J., Daniel, J.L., Kunapuli, S.P. (2010) Differential phosphorylation of myosin light chain (Thr)18 and (Ser)19 and functional implications in platelets, *J. Thromb. Haemost.*, **8**, 2283–2293.
 167. Miklavc, P., Ehinger, K., Sultan, A., Felder, T., Paul, P., Gottschalk, K.E., Frick, M. (2015) Actin depolymerisation and crosslinking join forces with myosin II to contract actin coats on fused secretory vesicles, *J. Cell Sci.*, **128**, 1193–1203.
 168. Cai, S., Pestic-Dragovich, L., O'Donnell, M.E., Wang, N., Ingber, D., Elson, E., De Lanerolle, P. (1998) Regulation of cytoskeletal mechanics and cell growth by myosin light chain phosphorylation, *Am. J. Physiol.*, **275**, C1349–C1356.
 169. Ohlmann, P., Tesse, A., Loichot, C., Ralay Ranaivo, H., Roul, G., Philippe, C., Watterson, D.M., Haiech, J., Andriantsitohaina, R. (2005) Deletion of MLCK210 induces subtle changes in vascular reactivity but does not affect cardiac function, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **289**, H2342–H2349.
 170. Samsonov, M.V., Khalisov, M.M., Khapchaev, A.Y., Penniyaynen, V.A., Ankudinov, A.V., Krylov, B.V., Shirinsky, V.P. (2016) The role of 210 kDa myosin light chain kinase and RhoA-activated protein kinase in control of microvascular endothelial cell stiffness. *International Symposium «Biological Motility»*. Pushchino, Russia, 208–209.
 171. Shirinsky, V.P., Kazakova, O.A., Samsonov, M.V., Khalisov, M.M., Khapchaev, A.Y., Penniyaynen, V.A., Ankudinov, A.V., Krylov, B.V. (2016) Spatiotemporal activity profiling of key myosin regulators in endothelial cells with regard to control of cell stiffness and barrier dysfunction. *Experimental and computational biomedicine: Russian Conference with International Participation in memory of Professor Vladimir S. Markhasin*. Ekaterinburg, 53.
 172. Ширинский В.П. (2011) Молекулярная физиология эндотелия и механизмы проницаемости сосудов, *Успехи физиологических наук*, **42**, 18–32.

173. Mehta, D., Malik, A.B. (2006) Signaling mechanisms regulating endothelial permeability, *Physiol. Rev.*, **86**, 279–367.
174. Wainwright, M.S., Rossi, J., Schavocky, J., Crawford, S., Steinhorn, D., Velentza, A.V., Zasadzki, M., Shirinsky, V., Jia, Y., Haiech, J., Van Eldik, L.J., Watterson, D.M. (2003) Protein kinase involved in lung injury susceptibility: evidence from enzyme isoform genetic knockout and in vivo inhibitor treatment, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 6233–6238.
175. Yu, Y., Lv, N., Lu, Z., Zheng, Y.Y., Zhang, W.C., Chen, C., Peng, Y.J., He, W.Q., Meng, F.Q., Zhu, M.S., Chen, H.Q. (2012) Deletion of myosin light chain kinase in endothelial cells has a minor effect on the lipopolysaccharide-induced increase in microvascular endothelium permeability in mice, *FEBS J.*, **279**, 1485–1494.
176. Moitra, J., Evenoski, C., Sammani, S., Wadgaonkar, R., Turner, J.R., Ma, S.F., Garcia, J.G. (2008) A transgenic mouse with vascular endothelial over-expression of the non-muscle myosin light chain kinase-2 isoform is susceptible to inflammatory lung injury: role of sexual dimorphism and age, *Transl. Res.*, **151**, 141–153.
177. Marchiando, A.M., Shen, L., Graham, W.V., Weber, C.R., Schwarz, B.T., Austin, J.R., 2nd, Raleigh, D.R., Guan, Y., Watson, A.J., Montrose, M.H., Turner, J.R. (2010) Caveolin-1-dependent occludin endocytosis is required for TNF-induced tight junction regulation in vivo, *J. Cell Biol.*, **189**, 111–126.
178. Wu, L.L., Peng, W.H., Kuo, W.T., Huang, C.Y., Ni, Y.H., Lu, K.S., Turner, J.R., Yu, L.C. (2014) Commensal bacterial endocytosis in epithelial cells is dependent on myosin light chain kinase-activated brush border fanning by interferon-gamma, *Am. J. Pathol.*, **184**, 2260–2274.
179. Fazal, F., Bijli, K.M., Murrill, M., Leonard, A., Minhajuddin, M., Anwar, K.N., Finkelstein, J.N., Watterson, D.M., Rahman, A. (2013) Critical role of non-muscle myosin light chain kinase in thrombin-induced endothelial cell inflammation and lung PMN infiltration, *PLoS One*, **8**, e59965.
180. Reynoso, R., Perrin, R.M., Breslin, J.W., Daines, D.A., Watson, K.D., Watterson, D.M., Wu, M.H., Yuan, S. (2007) A role for long chain myosin light chain kinase (MLCK-210) in microvascular hyperpermeability during severe burns, *Shock*, **28**, 589–595.
181. Tan, J., Wang, Y., Xia, Y., Zhang, N., Sun, X., Yu, T., Lin, L. (2014) Melatonin protects the esophageal epithelial barrier by suppressing the transcription, expression and activity of myosin light chain kinase through ERK1/2 signal transduction, *Cell. Physiol. Biochem.*, **34**, 2117–2127.
182. Марченко А.В., Сидорова М.В., Секридова А.В., Бушуев В.Н., Лакомкин В.Л., Орлова Ц.Р., Степанова О.В., Капелько В.И., Ваттерсон Д.М., Элдик Л.Д.В., Беспалова Ж.Д., Ширинский В.П. (2009) Проникающий пептидный ингибитор киназы легких цепей миозина подавляет гиперпроницаемость сосудистого эндотелия, *Российский Физиологический журнал им. И.М. Сеченова*, **95**, 507–515.
183. Stephens, N.L., Cheng, Z.Q., Fust, A. (2007) Sensitized airway smooth muscle plasticity and hyperreactivity: a review, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **85**, 679–685.
184. Azizi, P.M., Zyla, R.E., Guan, S., Wang, C., Liu, J., Bolz, S.S., Heit, B., Klip, A., Lee, W.L. (2015) Clathrin-dependent entry and vesicle-mediated exocytosis define insulin

- transcytosis across microvascular endothelial cells, *Mol. Biol. Cell*, **26**, 740–750.
185. Jerdeva, G.V., Wu, K., Yarber, F.A., Rhodes, C.J., Kalman, D., Schechter, J.E., Hamm-Alvarez, S.F. (2005) Actin and non-muscle myosin II facilitate apical exocytosis of tear proteins in rabbit lacrimal acinar epithelial cells, *J. Cell Sci.*, **118**, 4797–4812.
 186. Choi, Y.O., Ryu, H.J., Kim, H.R., Song, Y.S., Kim, C., Lee, W., Choe, H., Leem, C.H., Jang, Y.J. (2006) Implication of phosphorylation of the myosin II regulatory light chain in insulin-stimulated GLUT4 translocation in 3T3-F442A adipocytes, *Exp. Mol. Med.*, **38**, 180–189.
 187. Fulcher, F.K., Smith, B.T., Russ, M., Patel, Y.M. (2008) Dual role for myosin II in GLUT4-mediated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes, *Exp. Cell Res.*, **314**, 3264–3274.
 188. Wu, F., Guo, X., Xu, J., Wang, W., Li, B., Huang, Q., Su, L., Xu, Q. (2016) Role of myosin light chain and myosin light chain kinase in advanced glycation end product-induced endothelial hyperpermeability in vitro and in vivo, *Diab. Vasc. Dis. Res.*, **13**, 137–144.
 189. Tang, S.T., Su, H., Zhang, Q., Tang, H.Q., Wang, C.J., Zhou, Q., Wei, W., Zhu, H.Q., Wang, Y. (2016) Melatonin Attenuates Aortic Endothelial Permeability and Arteriosclerosis in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats: Possible Role of MLCK- and MLCP-Dependent MLC Phosphorylation, *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.*, **21**, 82–92.
 190. Hu, W., Feng, P. (2012) Myosin light chain kinase is involved in the mechanism of gastrointestinal dysfunction in diabetic rats, *Dig. Dis. Sci.*, **57**, 1197–1202.
 191. Di, Y., Pan, W., Li, X. (2015) Serum myosin light chain kinase in type 2 diabetes mellitus: a cross-sectional study, *Ann. Clin. Lab. Sci.*, **45**, 54–57.
 192. Usatyuk, P.V., Singleton, P.A., Pendyala, S., Kalari, S.K., He, D., Gorshkova, I.A., Camp, S.M., Moitra, J., Dudek, S.M., Garcia, J.G., Natarajan, V. (2012) Novel role for non-muscle myosin light chain kinase (MLCK) in hyperoxia-induced recruitment of cytoskeletal proteins, NADPH oxidase activation, and reactive oxygen species generation in lung endothelium, *J. Biol. Chem.*, **287**, 9360–9375.
 193. Kaneko, K., Satoh, K., Masamune, A., Satoh, A., Shimosegawa, T. (2002) Myosin light chain kinase inhibitors can block invasion and adhesion of human pancreatic cancer cell lines, *Pancreas*, **24**, 34–41.
 194. Khuon, S., Liang, L., Dettman, R.W., Sporn, P.H., Wysolmerski, R.B., Chew, T.L. (2010) Myosin light chain kinase mediates transcellular intravasation of breast cancer cells through the underlying endothelial cells: a three-dimensional FRET study, *J. Cell Sci.*, **123**, 431–440.e