

УДК 577.15.08

МЕТОД ИММУНОБЛОТТИНГА ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ИЗМЕРЕНИЯ УРОВНЯ ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ РЕГУЛЯТОРНЫХ ЛЕГКИХ ЦЕПЕЙ МИОЗИНА II В НЕБОЛЬШИХ КОЛИЧЕСТВАХ НЕМЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК*

© 2019 О.А. Казакова¹, А.Ю. Хапчаев^{1,2**}, А.А. Рагимов³,
Э.Л. Салимов³, В.П. Ширинский^{1,2}

¹ Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии,
121552 Москва, Россия; электронный адрес: askerkhapcha@gmail.com

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
факультет фундаментальной медицины, 119192 Москва, Россия

³ Первый московский государственный медицинский
университет им. И.М. Сеченова, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 06.07.18

После доработки 10.09.18

Принята к публикации 10.09.18

Миозин II типа – основной молекулярный мотор для осуществления актомиозин-зависимых двигательных процессов в клетках. Фосфорилирование регуляторных легких цепей (РЛЦ) миозина по остатку Ser-19 является необходимым условием для активации гладкомышечного/немышечного миозина II и служит биохимическим эквивалентом их активности. Дополнительное фосфорилирование РЛЦ по Thr-18 повышает АТФ-азную активность миозина II. Для измерения уровня фосфорилирования РЛЦ миозина по Ser-19 или дифосфорилирования по Thr-18/Ser-19 существует ряд методов, эффективных и надежных при измерениях в богатых миозином тканях. Однако для неммышечных клеток, которые характеризуются низким содержанием миозина II и обычно доступны для исследований в существенно меньших количествах, применение этих методов ограничено. В этой связи анализ динамики изменения фосфорилирования РЛЦ в многочисленных образцах неммышечных клеток становится серьезной задачей, требующей большого количества клеток. Использование фосфоспецифических антител повышает чувствительность измерений, но позволяет определить только относительные уровни фосфорилирования РЛЦ по индивидуальным остаткам. Следовательно, сложно говорить о физиологической значимости наблюдаемых изменений. С целью количественного измерения уровня фосфорилирования РЛЦ в небольших количествах неммышечных клеток мы использовали калибровочные стандартные нефосфорилированные и фосфорилированные *in vitro* РЛЦ в иммуноблоттинге с фосфоспецифическими антителами против РЛЦ после классического электрофореза. В настоящей работе приведено подробное описание данного метода и продемонстрировано его применение для количественного измерения изменений уровня фосфорилирования РЛЦ в эндотелиальных клетках человека в ответ на природные агонисты, тромбин и инсулин, а также содержания фосфорилированных РЛЦ в тромбоцитах человека. Обсуждены преимущества и ограничения описываемого метода в сравнении с другими методами измерения уровня фосфорилирования РЛЦ в неммышечных клетках.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: регуляторные легкие цепи миозина, неммышечные клетки, фосфорилирование, иммуноблоттинг, количественное измерение.

DOI: 10.1134/S0320972519010068

Миозин II типа – универсальный моторный белок, обеспечивающий многочисленные двигательные реакции эукариотических клеток.

Механическое усилие развивается при взаимодействии с актиновыми филаментами в результате вызванных гидролизом АТФ конформаци-

Принятые сокращения: ДМЕМ – питательная среда Игла в модификации Дульбекко; ГАФД – глицеральдегидфосфатдегидрогеназа; КаМ – кальмодулин; КЛЦМ – киназа легких цепей миозина; РЛЦ – регуляторная легкая цепь; Ф-РЛЦ – монофосфорилирование РЛЦ по остатку Ser-19; ФФ-РЛЦ – дифосфорилирование по остаткам Thr-18/Ser-19; НФ-РЛЦ – отсутствие фосфорилирования по остаткам Thr-18/Ser-19; ТСБ – Tris-солевой буфер; ФСБ – фосфатно-солевой буфер; GST – глутатион-S-трансфераза; FBS – сыворотка эмбриональная бычья; NMII – неммышечный миозин II типа; PVDF – поливинилидендифлуоридная мембрана; ROCK – Rho-ассоциированная протеинкиназа; SMMII – гладкомышечный миозин II типа.

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>, в рубрике «Papers in Press», BM18-193, 08.10.2018.

** Адресат для корреспонденции.

онных перестроек миозина II. Немышечный (NMII) и гладкомышечный миозин II (SMMII) активируется при фосфорилировании регуляторной легкой цепи (РЛЦ) миозина по остатку Ser-19; дополнительное фосфорилирование Thr-18 повышает АТФазную активность миозина II [1, 2]. Список протеинкиназ, способных фосфорилировать и активировать NMII в клетках, постоянно расширяется [3, 4]. Однако в настоящее время основными активаторами миозина II в немышечных клетках считаются две протеинкиназы: киназа легких цепей миозина (КЛЦМ, MYLK1) и Rho-ассоциированная протеинкиназа (ROCK). КЛЦМ является Ca^{2+} -кальмодулин (CaM)-зависимой протеинкиназой, узкоспециализированной в отношении NMII и SMMII [5]. ROCK считается основным Ca^{2+} -независимым активатором миозина II и входит в сигнальный путь малой GTPазы RhoA [6, 7]. ROCK прямо фосфорилирует РЛЦ *in vitro* и *in vivo* [6]; более того, ROCK фосфорилирует регуляторную субъединицу-1 фосфатазы миозина (MYPT1), приводя к повышению общего уровня фосфорилирования РЛЦ за счет подавления активности фосфатазы миозина [8].

Для измерения уровня монофосфорилирования РЛЦ по остатку Ser-19 (Ф-РЛЦ) и дифосфорилирования по остаткам Thr-18/Ser-19 (ФФ-РЛЦ) разработан ряд методов, включающих изоэлектрическое фокусирование после электрофоретической очистки миозина в присутствии пиррофосфата [9], ПААГ-электрофорез в присутствии мочевины и глицерина [10] и метод Phos-tag (электрофорез в присутствии фосфат-связывающей химической субстанции Phos-tagTM) [11–14]. Эти методы применяются в различных модификациях, различаются своей чувствительностью и способностью специфически идентифицировать участок фосфорилирования, а также обычно требуют относительно большого количества образца и/или трудозатратных манипуляций с образцами. В этой связи метод, основанный на классическом Ds-Na-электрофорезе и иммуноблоттинге, может стать доступным альтернативным подходом для измерения и мониторинга уровня Ф-РЛЦ и/или ФФ-РЛЦ в немышечных клетках. Несмотря на то, что метод иммуноблоттинга принято считать полуколичественным, существуют методологические подходы для получения надежных количественных данных с помощью этого метода [15, 16].

В данной работе описан метод количественного измерения уровня моно- и дифосфорилирования РЛЦ миозина с помощью Ds-Na-электрофореза с последующим иммуноблоттингом с фосфоспецифическими антителами против РЛЦ

и использованием внешних стандартных РЛЦ, фосфорилированных *in vitro*. Продемонстрировано применение данного метода для количественного измерения изменений уровня фосфорилирования РЛЦ в эндотелиальных клетках линии EA.hy926 в ответ на стимуляцию тромбином, вызывающим гиперпроницаемость эндотелиального монослоя [17], или инсулином, оказывающим протекторное действие на барьерную функцию эндотелия [18]. С помощью данного метода также измерен уровень фосфорилирования РЛЦ в нестимулированных тромбоцитах. В работе обсуждена проблема выбора между предлагаемым методом и альтернативными методами измерения уровня фосфорилирования РЛЦ миозина в немышечных клетках.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы. В работе использовали биохимические реактивы аналитической степени чистоты, которые приобретали в компаниях «Sigma-Aldrich», «Calbiochem», «Bio-Rad», «ThermoFisher Scientific», «Merck», «Enzyme Research South Bend», «BD Biosciences» и «Enzo Life Sciences». Для иммуноблоттинга использовали поливинилидендифлуоридные (PVDF) мембраны («Amersham», США) и наборы реактивов для хемилюминесцентной детекции West Pico Chemiluminescent Substrate («Thermo Fisher Scientific», США) или Clarity Western ECL Substrate («Bio-Rad», США). В работе применяли следующие первичные антитела: анти-РЛЦ («ProteinTech», кат. № 10324-1-AP), антитела против фосфо-РЛЦ(Ser-19) («Cell Signaling», кат. № 3675), антитела против дифосфо-РЛЦ(Ser-19/Thr-18) («Cell Signaling», кат. № 3674), антитела против глицеральдегидфосфатдегидрогеназы (ГАФД) («Sigma-Aldrich», кат. № G8795). Вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена против иммуноглобулинов кролика («Sigma-Aldrich», кат. № A0545) и против иммуноглобулинов G мыши («Abcam», кат. № ab97046). В работе использовали тромбин («Enzyme Research», США); инсулин («Sigma», США), глутатион-сефарозу («Thermo Fisher Scientific», США), Phos-tag («NARD Ltd.», Япония). Культуральный пластик приобретали в компаниях «Corning» (США) и «Greiner-bio-one» (Австрия). Питательную среду Игла в модификации Дульбекко (DMEM) приобретали у «Пан-Эко» (Россия); эмбриональную сыворотку быка (FBS) – у «HyClone» (США). Кодированная ДНК РЛЦ человека на основе вектора pGEX4T-1 была любезно предоставлена проф. Д.М. Ваттерсоном (D.M. Watterson) из Северо-западного университета (Чикаго, США). Тромбоциты челове-

ка получали в Центре переливания крови Первого московского медицинского университета им. И.М. Сеченова (Москва, Россия).

Получение стандартных моно- и дифосфорилированных РЛЦ. Кальмодулин (CaM) выделяли из мозга быка согласно Gopalakrishna et al. [19]. КЛЦМ и РЛЦ миозина выделяли из мышечных желудков индейки по протоколам, описанным Adelstein et al. [20]. Концентрацию КЛЦМ и РЛЦ индейки определяли по методу Брэдфорд [21]. Рекомбинантные РЛЦ человека, слитые с глутатион-S-трансферазой (GST), получали из трансформированных клеток *E. coli* (штамм BL21pLys) после индукции экспрессии внесением изопрропил-β-D-тиогалактопиранозидом до конечной концентрации 1 мМ и 3-часовой инкубации при 37 °С. GST–РЛЦ очищали на колонке с глутатион-сефарозой в соответствии с протоколом производителя. GST-tag отщепляли тромбином (0,77 ед./1 мг GST–РЛЦ, 30 мин, 30 °С) в буфере, содержащем 10 мМ восстановленного глутатиона, 50 мМ Tris-HCl, pH 8,0. Реакцию останавливали внесением диизопрропилфторфосфата (DFP) до конечной концентрации 1 мкМ. Эффективность расщепления GST–РЛЦ подтверждали Ds-Na-электрофорезом, используя РЛЦ индейки в качестве стандарта. Полученный препарат РЛЦ применяли в работе без дальнейшей очистки.

Для получения фосфо-РЛЦ(Ser-19) индейки очищенные РЛЦ (20 мкМ) инкубировали в течение 20 мин при 30 °С с КЛЦМ (6 нМ) в буфере, содержащем 10 мМ 3-(N-морфолино)пропансульфонной кислоты (MOPS) (pH 7,0), 2 мМ MgCl₂, 100 мМ KCl, 20 мМ NaCl, 1 мМ дитиотреитол, 0,5 мМ АТР, 1 мМ CaCl₂ и 300 нМ CaM. Дифосфо-РЛЦ индейки получали, повышая концентрацию КЛЦМ до 1,8 мкМ и время инкубации – до 100 мин. Рекомбинантные фосфо-РЛЦ(Ser-19) человека получали по описанному выше протоколу с небольшими модификациями: 60 мин при 37 °С в присутствии 0,5 мкМ КЛЦМ и 1 мкМ CaM. Для получения дифосфо-РЛЦ человека реакцию проводили в течение 300 мин при 37 °С в буфере, содержащем 10 мМ MOPS (pH 7,0), 10 мМ MgCl₂, 100 мМ KCl, 20 мМ NaCl, 2 мМ дитиотреитол, 2 мМ АТР, 5 мМ CaCl₂, 1,5 мкМ CaM и 2 мкМ КЛЦМ. Степень фосфорилирования РЛЦ анализировали электрофорезом в присутствии глицерина и мочевины (рис. 1, а).

Электрофорез и иммуноблоттинг. Электрофорез очищенных белков и клеточных лизатов проводили по методу Лэммли [22] в 12%-ном ПААГ. Для разделения фосфорилированных форм белков гели полимеризовали в присутствии реактива Phos-tag [11]. Электрофорез в

присутствии мочевины и глицерина проводили по методу Persechini et al. [10]. В частности, образцы растворяли в буфере, содержащем 20 мМ Tris-HCl (pH 6,8), 9 М мочевины, 10 мМ дитиотреитол и 0,05% бромфенолового синего; электрофорез проводили в камерах «MiniProtean III» («Bio-Rad», США) в буфере, содержащем 4 мМ Tris и 4,6 мМ глицина (pH 8,6), а также 14 мМ 2-меркаптоэтанола при 330 В в течение 50 мин и затем при 400 В в течение 240 мин. Гели окрашивали красителем Кумасси R-250 или осуществляли электроперенос (300 мА, 1 ч) на фильтры PVDF по методу Towbin et al. [23] в буфере, содержащем 25 мМ Tris и 192 мМ глицина (pH 8,6), а также 20% этанола. После электропереноса фильтры инкубировали в течение 20 мин при 25 °С в 0,25%-ном глутаровом альдегиде для ковалентного связывания белков с фильтром. Для иммуноблоттинга фильтры инкубировали в течение 1 ч при 25 °С в Tris-солевом буфере (ТСБ, 20 мМ Tris-HCl, pH 7,6, 165 мМ NaCl), дополненным 0,05% Твин-20 и 5%-ным обезжиренным молоком, для блокировки сайтов неспецифического связывания белков. Фильтры отмывали в ТСБ, последующие инкубации с первичными и вторичными антителами проводили в течение ночи при 4 °С в ТСБ, дополнительно содержащем 0,1% бычьего сывороточного альбумина (БСА) и 0,1% NaN₃. Использовали следующие рабочие разведения первичных антител: анти-РЛЦ – 1 : 1000; антифосфо-РЛЦ(Ser¹⁹) – 1 : 2000; антифосфо-РЛЦ(Ser¹⁹/Thr¹⁸) – 1 : 2000; анти-ГАФД – 1 : 10 000. Для повторных окрасок связавшиеся с белками антитела отмывали по методу Yeung et al. [24]. В частности, после регистрации сигнала фильтры PVDF трижды отмывали в ТСБ в течение 5 мин при 25 °С. Связавшиеся антитела отмывали двумя 5-минутными инкубациями в растворе, содержащем 6 М гуанидина, 20 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 0,2% NP-40 и внесенный непосредственно перед процедурой 0,1 М 2-меркаптоэтанол. Затем фильтры четыре раза в течение 5 мин при 25 °С, отмывали в ТСБ, дополнительно содержащем 0,1% Твин-20, ополаскивали дистиллированной водой, высушивали на воздухе и хранили при 25 °С до вторичной инкубации с новыми антителами. Хемилюминесцентный сигнал регистрировали в видео-режиме с помощью прибора Fusion SL3500W («Vilber Lourmat», Франция). Полученные при экспозиции разной длительности изображения обсчитывали с помощью программного обеспечения ImageJ v1.48 (НИН, США).

Клеточные культуры и стимуляция клеток. Клетки EA.hy926 (АТСС, США) высевали на покрытые желатином чашки диаметром 35 мм (для подготовки образцов для электрофореза в присутствии мочевины и глицерина использо-

вали чашки диаметром 100 мм) и инкубировали при 37 °С в атмосфере 5% CO₂ в питательной среде ДМЕМ, дополнительно содержащей 10% FBS и антибиотики. Смену питательной среды проводили каждые два дня. Перед стимуляцией клетки депривировали в течение 1 ч, используя ДМЕМ без FBS. Растворы α-тромбина и инсу-

лина готовили непосредственно перед применением: растворяли в ДМЕМ или 0,1%-ном растворе БСА в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) соответственно и использовали в конечной концентрации 100 нМ. Влияние тромбина и инсулина на уровень фосфо-РЛЦ в клетках EA.hy926 анализировали, через 12 и 15 мин соответственно.

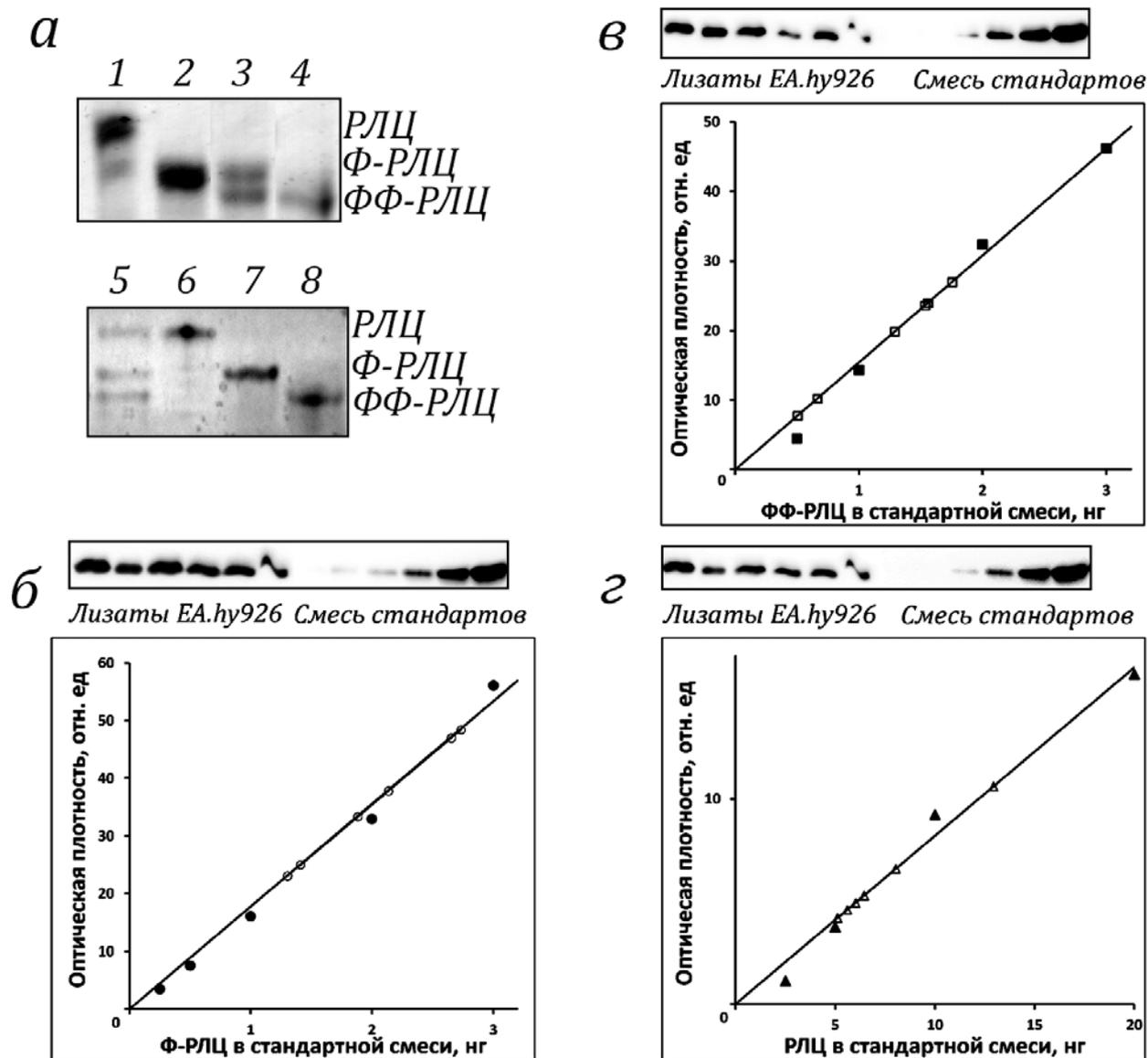


Рис. 1. Количественное измерение уровня Ф-РЛЦ, ФФ-РЛЦ и нефосфо-РЛЦ в лизатах эндотелиальных клеток с использованием стандартных РЛЦ в одном иммуноблоттинге. *а* – Репрезентативные изображения окрашенных Кумасси R-250 гелей после электрофореза в присутствии мочевины и глицерина: *верхняя панель* – РЛЦ мускульного желудка индейки (1); Ф-РЛЦ (2); эквимольная смесь Ф-РЛЦ и ФФ-РЛЦ (3); ФФ-РЛЦ (4); *нижняя панель* – рекомбинантные РЛЦ человека: эквимольная смесь нефосфорилированных РЛЦ, Ф-РЛЦ и ФФ-РЛЦ (5); нефосфо-РЛЦ (6); Ф-РЛЦ (7); ФФ-РЛЦ (8). Положение различных форм РЛЦ помечено справа; репрезентативные калибровочные кривые для Ф-РЛЦ (*б*), ФФ-РЛЦ (*в*) и общих РЛЦ (*г*), полученные на основании денситометрического анализа сигналов от возрастающих количеств смеси стандартных РЛЦ (заштрихованные маркеры); незаштрихованные маркеры соответствуют сигналам, полученным из лизатов эндотелиальных клеток. Над графиками приведены соответствующие изображения репрезентативного иммуноблоттинга с эмпирически подобранным нанесением лизатов эндотелиальных клеток и калибровочными стандартными РЛЦ. Калибровочный график отражает линейный диапазон всей калибровочной кривой, полученный при различных временах экспозиции и перекрывающий величины сигналов от экспериментальных образцов

В течение 2 ч после выделения тромбоцитарного концентрата (50 мл) тромбоциты отмывали в растворе Хэнкса (30 мл) тремя последовательными циклами центрифугирования/взмучивания при 800 g в течение 10 мин при 4 °С.

Количественное определение уровня фосфорилирования РЛЦ в клетках. Клетки EA.hy926 культивировали на чашках диаметром 35 мм до достижения монослоя. Клетки депривировали и стимулировали 100 нМ тромбином или инсулином. Через заданные промежутки времени клетки промывали охлажденным (на льду) ФСБ и лизировали в 100 мкл двукратного буфера для образцов по Лэммли. Для анализа фосфорилирования РЛЦ в нестимулированных клетках равные объемы суспензии тромбоцитов, полученные от каждого донора, помещали в две пробирки объемом 1,5 мл (конечный объем 0,5–0,7 мл), осаждали центрифугированием при 5000 g в течение 5 мин при 4 °С и лизировали в 200 мкл трехкратного буфера для образцов по Лэммли. Смесь стандартных РЛЦ получали путем объединения нефосфо-, монофосфо- и дифосфо-РЛЦ в молярном соотношении 60/20/20. Возрастающие количества стандартных РЛЦ и эмпирически подобранные объемы клеточных лизатов разделяли в одном ПААГ и осуществляли электроперенос на фильтр PVDF, который затем поочередно инкубировали со всеми первичными антителами против РЛЦ и соответствующими вторичными антителами после регистрации сигнала и отмывки предыдущей пары антител, как описано выше. В отдельных экспериментах с помощью повторной инкубации отмытого фильтра с вторичными антителами было получено подтверждение полноты удаления антител с фильтра: хемилюминесцентный сигнал не детектировался. Количество Ф-РЛЦ и ФФ-РЛЦ в клеточных лизатах определяли по стандартным калибровочным кривым, полученным на основании сигналов после инкубации с антителами против Ф-РЛЦ или ФФ-РЛЦ соответственно (рис. 1, б, в). Общее содержание РЛЦ в образцах определяли по сигналу, полученному после инкубации с фосфонеспецифическими антителами против РЛЦ (рис. 1, г). Равномерность внесения образцов в гель дополнительно контролировали нормировкой с помощью антител против ГАФД. Долю фосфо-РЛЦ рассчитывали как отношение количества фосфо-РЛЦ (нг) к общему количеству (нг) РЛЦ.

Статистическая обработка данных. Объединяли данные из трех независимых экспериментов; результаты представляли как среднее значение \pm среднеквадратическое отклонение (SD). Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$ по критерию Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Валидация стандартов фосфо-РЛЦ и антител против РЛЦ. Для измерения уровня фосфо-РЛЦ в клетках были получены внешние стандартные фосфо-РЛЦ. Остаток Ser-19 РЛЦ служит хорошим субстратом для КЛЦМ, однако последующее фосфорилирование Thr-18 требует длительной инкубации и существенного увеличения количества фермента [25]. Для получения Ф-РЛЦ(Ser-19) и ФФ-РЛЦ(Thr-18/Ser-19) очищенный из ткани препарат РЛЦ индейки и рекомбинантные РЛЦ человека фосфорилировали *in vitro* очищенной КЛЦМ. Полноту фосфорилирования РЛЦ подтверждали по изменению электрофоретической подвижности РЛЦ в ПААГ в присутствии мочевины и глицерина (рис. 1, а). Как видно из рис. 1, а, очищенный из ткани препарат РЛЦ (верхняя панель, 1) содержит 3% монофосфорилированных РЛЦ (согласно денситометрическому анализу геля, окрашенного Кумасси R-250). После инкубации 20 мкМ РЛЦ с 6 нМ очищенной КЛЦМ в течение 20 мин практически все РЛЦ переходили в монофосфорилированную форму (рис. 1, а, верхняя панель, 2). Длительная инкубация РЛЦ в присутствии высоких концентраций КЛЦМ приводила к полному переходу РЛЦ в дифосфорилированную форму (рис. 1, а, верхняя панель, 4). На нижней панели рис. 1, а представлены стандартные рекомбинантные фосфо-РЛЦ человека, полученные аналогичным образом.

Для валидации фосфоспецифических антител против РЛЦ лизаты эндотелиальных клеток EA.hy926 разделяли электрофорезом в присутствии мочевины и глицерина или реактива Phos-tag и подтверждали, что выбранные для данной работы антитела против Ф-РЛЦ(Ser-19) и ФФ-РЛЦ(Thr-18/Ser-19) в иммуноблоттинге не реагируют с другими фосφοформами РЛЦ, которые потенциально могли возникать в ответ на стимуляцию клеток EA.hy926 тромбином или инсулином (данные не показаны). Кроме того, в соответствии с ожидаемым результатом, данные антитела реагировали только с заявленными производителем фосφοформами стандартных РЛЦ. Эти эксперименты подтверждают возможность применения данных антител для мониторинга уровня фосфо-РЛЦ миозина в клетках EA.hy926 при стимуляции тромбином или инсулином.

Основным ограничением при количественном анализе хемилюминесцентного сигнала при иммуноблоттинге является узкий диапазон линейности, обычно не превышающий одного порядка. По причине различий в реакционной способности различных антител против РЛЦ не представляется возможным использовать один

и тот же линейный диапазон для измерения сигналов фосфо-РЛЦ и общих РЛЦ. При оптимальных для регистрации экспозициях Ф-РЛЦ и ФФ-РЛЦ сигнал от общих РЛЦ не достигает линейного диапазона, тогда как при оптимальных сигналах от общих РЛЦ сигналы, регистрируемые с помощью антител против Ф-РЛЦ и ФФ-РЛЦ, уже выходят из линейного диапазона. Для преодоления этой проблемы в данной работе калибровочные стандарты РЛЦ на одном иммуоблоте проявляли в течение разных периодов времени для получения линейной зависимости хемилюминесцентного сигнала от количества внесенных стандартных РЛЦ в оптимальном диапазоне нагрузки РЛЦ для определения уровня фосфо-РЛЦ или общих РЛЦ в экспериментальных образцах, внесенных в тот же гель. Такой подход позволил измерить абсолютные значения уровня Ф-РЛЦ, ФФ-РЛЦ и общих РЛЦ в лизатах эндотелиальных клеток.

Вместе с тем проведенные эксперименты показали отсутствие необходимости в отдельных иммуоблоттингах для детекции разных фосфоформ РЛЦ, т.к. все необходимые данные можно получить из одной мембраны после отмывки связавшихся антител и инкубации с антителами против другой фосфоформы или против общих РЛЦ. При обработке фильтра PVDF глутаровым альдегидом после электропереноса стандартных РЛЦ и исследуемых образцов мембрану можно использовать в иммуоблот-

тинге с разными антителами не менее трех раз без потери интенсивности хемилюминесцентного сигнала (рис. 2, а, б). Такой подход позволяет снизить расход экспериментальных образцов и избежать ошибок, связанных с вариациями в нанесении образца в разные гели.

Показатель «стоимость–эффективность» предлагаемого метода возрастает при повторном использовании рабочих растворов первичных антител, которые при хранении при 4 °С в течение не менее трех месяцев могут быть использованы для как минимум трех иммуоблоттингов с получением воспроизводимого хемилюминесцентного сигнала (данные могут быть предоставлены по запросу).

Измерение уровня Ф-РЛЦ и ФФ-РЛЦ в эндотелиальных клетках EA.hy926, стимулированных тромбином или инсулином. Для демонстрации практического применения предложенного метода измеряли уровень Ф-РЛЦ и ФФ-РЛЦ в эндотелиальных клетках EA.hy926, стимулированных природными агонистами, тромбином и инсулином. Как показано на рис. 2, а, базальный уровень Ф-РЛЦ и ФФ-РЛЦ составлял $25,4 \pm 4,4\%$ и $28,8 \pm 4,6\%$ соответственно (рис. 2, белые столбцы). Через 12 мин после стимуляции 100 нМ тромбином уровень Ф-РЛЦ снижался до $13,7 \pm 3,9\%$, тогда как уровень ФФ-РЛЦ возрастал до $52,3 \pm 5,7\%$ (рис. 2, заштрихованные столбцы). Через 15 мин после стимуляции клеток 100 нМ инсулином уровень Ф-РЛЦ снижался в 2 раза

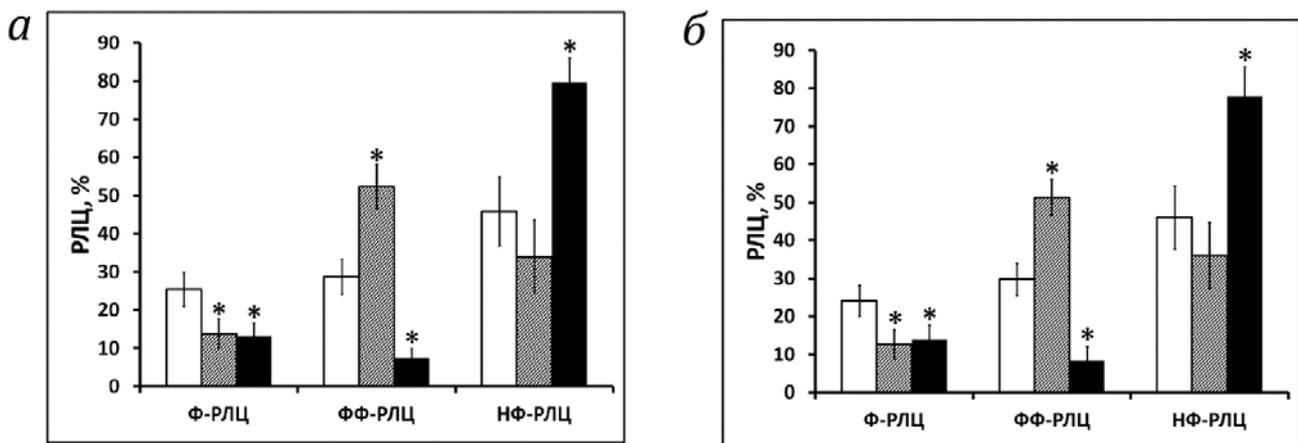


Рис. 2. Измеряемые величины уровня Ф-РЛЦ и ФФ-РЛЦ в эндотелиальных клетках EA.hy926 воспроизводятся после отмывки/повторного связывания антител и не зависят от последовательности инкубаций с антителами. Мембраны после электропереноса последовательно инкубировали с первичными антителами против разных форм РЛЦ, отмывая связавшиеся антитела после каждого цикла регистрации хемилюминесцентного сигнала. Представлены средние абсолютные значения уровня Ф-РЛЦ, ФФ-РЛЦ и НФ-РЛЦ в нестимулированных эндотелиальных клетках EA.hy926 (белые столбцы), в клетках, стимулированных тромбином (серые столбцы) или инсулином (черные столбцы). Долю НФ-РЛЦ рассчитывали как разность между общим содержанием РЛЦ (100%) и суммы Ф-РЛЦ и ФФ-РЛЦ. Последовательность внесения первичных антител: Ф-РЛЦ, ФФ-РЛЦ, РЛЦ, Ф-РЛЦ (панель а) или ФФ-РЛЦ, Ф-РЛЦ, РЛЦ, ФФ-РЛЦ (панель б). В обоих случаях сигналы, полученные в первом цикле, были сравнимы с сигналами, полученными в четвертом цикле. Данные представлены как средние значения \pm SD для трех независимых экспериментов. * Различия с $p < 0,05$ при сравнении с базовым уровнем фосфорилирования

($13,0 \pm 3,6\%$), а уровень ФФ-РЛЦ – в 3 раза ($7,3 \pm 2,8\%$) при сравнении с нестимулированными клетками (рис. 2, черные столбцы). Как было отмечено выше, изменение последовательности антител при повторных инкубациях мембраны не оказывало существенного влияния на полученные результаты (рис. 2, б), указывая на то, что потери антигена с фильтров PVDF не происходит, а также отсутствует необратимое связывание антител против РЛЦ.

При использовании стандартных РЛЦ человека значения Ф-РЛЦ и ФФ-РЛЦ в эндотелиальных клетках EA.hy926 были сопоставимы со значениями, полученными при вычислениях с применением стандартных РЛЦ индейки (данные не показаны).

Дополнительно был оценен уровень Ф-РЛЦ и ФФ-РЛЦ в нестимулированных тромбоцитах человека (два донора). Уровень Ф-РЛЦ составил $<10\%$, тогда как ФФ-РЛЦ не детектировались. Эти результаты согласуются с данными, полученными ранее по включению радиоактивного фосфата [26].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Фосфорилирование РЛЦ миозина по Ser-19 (Ф-РЛЦ) обеспечивает полную активацию SMMII и NMII [27], однако часто отмечается дифосфорилирование по Thr-18/Ser-19 (ФФ-РЛЦ) [28], которое может продлевать активное состояние миозина благодаря более медленному дефосфорилированию РЛЦ [29]. Таким образом, оценка Ф-РЛЦ и/или ФФ-РЛЦ широко используется как биохимический эквивалент моторной активности миозина II и его участия в (пато)физиологических процессах.

Для анализа уровня Ф-РЛЦ и ФФ-РЛЦ разработан ряд экспериментальных подходов, например, электрофоретическое разделение нефосфорилированных РЛЦ (НФ-РЛЦ), Ф-РЛЦ и ФФ-РЛЦ с последующим окрашиванием белковыми красителями и денситометрическим анализом. Для разделения фосфоформ РЛЦ применяют изоэлектрическое фокусирование после очистки миозина в геле в присутствии пирофосфата [9], электрофорез в ПААГ в присутствии мочевины и глицерина [10] или недавно созданного реактива Phos-tag [11–14]. Классические варианты этих методов требуют предварительной очистки миозина, следовательно, относительно больших количеств исходного образца, что делает эти методы малоприменимыми для анализа фосфорилирования миозина II в мышечных клетках. Повышения чувствительности измерения можно добиться благодаря использо-

ванию радиоактивного фосфата с последующим одномерным электрофорезом или двумерным разделением белков и картированием фосфопептидов [30–32]. Однако такой подход не позволяет точно определить модифицированный остаток. Масс-спектрометрический анализ позволяет снять это ограничение [12], однако в этом случае требуются относительные большие количества исходного образца.

В течение нескольких десятилетий основным методом выбора для определения уровня Ф-РЛЦ и ФФ-РЛЦ в образцах клеток и тканей был электрофорез в присутствии мочевины и глицерина. Визуализация фосфоформ РЛЦ с помощью антител против РЛЦ позволяет рассчитать относительные количества НФ-РЛЦ, Ф-РЛЦ и ФФ-РЛЦ [33, 34], однако в этом случае нет уверенности в том, что модифицированными остатками являются именно Ser-19 и/или Thr-18, поскольку потенциально фосфатная группа может быть связана с другим(и) остатками. В то время как фосфорилирование по Ser-19 и/или дифосфорилирование по Thr-18/Ser-19 считаются основными участками модификации РЛЦ для активации актомиозинового сокращения, было показано, что при устойчивом расслаблении гладкой мышцы наблюдается монофосфорилирование РЛЦ по Thr-18 [12]. Более того, согласно базе данных PhosphoSitePlus (<http://www.phosphosite.org>, [35]) в основной изоформе РЛЦ (RLC2) несаркомерного миозина обнаружено порядка десяти участков фосфорилирования, что указывает на возможность образования множественных фосфоформ. Действительно, одновременное наличие множественных фосфоформ РЛЦ было продемонстрировано для культивируемых миоцитов матки [13]. Эти результаты свидетельствуют, что при анализе фосфорилирования РЛЦ не следует оставлять без внимания участки, отличные от Ser-19 и Thr-18. Следовательно, выводам о физиологической значимости фосфорилирования РЛЦ должна предшествовать валидация участков фосфорилирования.

Иммунодетекция РЛЦ после электропереноса из гелей, приготовленных в присутствии мочевины и глицерина, демонстрирует значительно меньшую чувствительность при сравнении с иммуноблоттингом после электрофореза в Ds-Na-ПААГ. Эта проблема не исследована детально, но, возможно, она связана с менее эффективным растворением РЛЦ в присутствии мочевины при сравнении с Ds-Na. В любом случае, для малых количеств мышечных клеток и мышечных тканей предпочтительнее проводить иммунодетекцию РЛЦ миозина II после классического Ds-Na-электрофореза [14].

Предложенный недавно метод разделения фосфоформ белков с использованием реактива Phos-tag позволяет объединить высокую чувствительность иммуноблоттинга и разрешающую способность электрофореза в присутствии мочевины и глицерина, а также идентифицировать фосфоформы РЛЦ, содержащие фосфатные группы у разных аминокислотных остатков. С другой стороны, подвижность фосфоформ РЛЦ в геле в присутствии Phos-tag зависит от положения фосфатной группы в полипептиде [13]. Соответственно, благодаря разрешающей способности метода Phos-tag выявляется множество фосфоформ РЛЦ, различающихся комбинацией фосфорилированных остатков, появление которых может быть уникально в зависимости от агониста/стимула и/или типа клеток/тканей. Для количественных измерений методом Phos-tag с использованием антител против общих РЛЦ представляется необходимым соотнести полосы РЛЦ, содержащие фосфо-Ser-19 и/или Thr-18 с помощью валидированных фосфоспецифичных антител.

Следует отметить, что некоторые коммерческие антитела против общих РЛЦ получены с использованием синтетических пептидов или рекомбинантных антигенов, включающих остатки Ser-19 и Thr-18. Следовательно, такие антитела потенциально могут быть чувствительны к фосфорилированию, и их использование может привести к неверной трактовке полученных результатов, в частности, к завышению значений уровня фосфо-РЛЦ. В то же время есть указания на то, что ряд антител, заявленных как фосфо- и сайтспецифичные, могут связываться также с другими фосфоформами РЛЦ [11–14]. Таким образом, для надежного количественного измерения уровня фосфорилирования Ser-19 и Thr-18 важна валидация антител. В предварительных экспериментах мы подтвердили, что использованное в данной работе антитело против общих РЛЦ («ProteinTech», #10324-1-AP) нечувствительно к фосфорилированию РЛЦ по Ser-19 или Thr-18/Ser-19. С помощью электрофореза в присутствии мочевины и глицерина, а также электрофореза в присутствии реактива Phos-tag, мы подтвердили, что использованные нами фосфоспецифические антитела не связываются с другими фосфоформами РЛЦ, которые потенциально могли бы возникать в клетках EA.hy926 в ответ на стимуляцию тромбином или инсулином.

При наличии валидированных антител к фосфо-РЛЦ с помощью электрофореза в Ds-Na-ПААГ и иммуноблоттинга можно проследить динамику монофосфорилирования РЛЦ по Ser-19 или дифосфорилирования по Thr-18/Ser-19, но

в своем наиболее распространенном формате этот подход не позволяет определить стехиометрию фосфорилирования РЛЦ [36]. Однако в комбинации с внешними стандартами фосфо-РЛЦ можно относительно легко получить количественные данные (рис. 1). Согласно нашим наблюдениям, для воспроизводимого измерения уровня Ф(Ф)-РЛЦ требуется $\sim 10^5$ мышечных клеток. Согласно результатам, представленным на рис. 1, б–г, предлагаемый нами метод позволяет детектировать 0,5–1 нг Ф(Ф)-РЛЦ и 3–5 нг общих РЛЦ в экспериментальном образце. Можно полагать, что чувствительность метода можно увеличить, используя третичные антитела, как описано в работе Takeya et al. [14].

В идеальном случае для наиболее точного количественного измерения уровня фосфо-РЛЦ для каждого образца клеток/ткани следует использовать стандартные РЛЦ, полученные из того же вида животных. Однако при использовании стандартных РЛЦ индейки или рекомбинантных РЛЦ человека мы не обнаружили существенных различий в измеряемом уровне фосфо-РЛЦ в клетках человека. Действительно, консервативность аминокислотной последовательности между этими РЛЦ составляет $\geq 98\%$ (2–3 отличающихся а.о. в зависимости от изоформы РЛЦ), кроме того, использование поликлональных антител против общих РЛЦ сводит возможные вариации в определении к значениям ниже ошибки измерения. В то же время для РЛЦ из других классов животных, может потребоваться корректировка метода в зависимости от степени гомологии последовательности РЛЦ и относительной реакционной способности антител против РЛЦ.

С помощью описанного метода был измерен уровень Ф-РЛЦ и ФФ-РЛЦ в покоящихся эндотелиальных клетках EA.hy926 и проведен анализ динамики изменений Ф-РЛЦ и ФФ-РЛЦ в этих клетках в ответ на тромбин и инсулин. Тромбин вызывал реципрокное изменение Ф-РЛЦ и ФФ-РЛЦ (рис. 2), однако через 12 мин после стимуляции клеток тромбином отмечалось увеличение суммарного количества активированного миозина, т.е. снижение уровня НФ-РЛЦ при сравнении с нестимулированными клетками. Этот результат согласуется с данными литературы о том, что в эндотелиальных клетках тромбин вызывает фосфорилирование миозина с последующим ошариванием, сокращением клеток и развитием гиперпроницаемости [33, 37]. С другой стороны, инсулин снижал уровень Ф-РЛЦ и ФФ-РЛЦ в эндотелиальных клетках в 2–3 раза (рис. 2). Снижение общего уровня фосфорилирования РЛЦ согласуется с наблюдениями о том, что инсулин усиливает барьерную функ-

цию эндотелия [18]. Таким образом, проведенные измерения уровня активности миозина II коррелируют с физиологическими ответами эндотелиальных клеток. Следует особо подчеркнуть, что описанный метод количественного иммуноблоттинга позволяет различить изменения в уровне фосфорилирования РЛЦ в клетках, например, как с 30 до 60%, так и с 3 до 6%. Физиологическое значение этих изменений может быть совершенно различным, но в обоих этих случаях относительный метод оценки с помощью стандартного иммуноблоттинга выявит двукратную активацию миозина, что может привести к некорректной интерпретации результатов.

Полученные результаты подтверждают конкурентоспособность предложенного метода количественного анализа уровня фосфорилирования РЛЦ в немышечных клетках. В таблицу сведены преимущества, ограничения и некоторые практические аспекты для существующих методов определения уровня фосфорилирования Ser-19 и/или Thr-18/Ser-19 в немышечных клет-

ках. Как отмечено в таблице, предлагаемый в настоящей работе метод сочетает высокую чувствительность и экономичность в отношении затрат времени и материальных ресурсов, однако основным недостатком этого метода является необходимость использования стандартных фосфорилированных РЛЦ, которые, насколько нам известно, в настоящее время не представлены на коммерческом рынке.

Таким образом, в настоящей работе описан нетрудоёмкий метод количественного измерения уровня Ф-РЛЦ и ФФ-РЛЦ в биологических образцах с помощью иммуноблоттинга с использованием калибровочных стандартных РЛЦ. Метод позволяет надежно измерять уровень активации миозина II в небольших количествах немышечных клеток и параллельно обрабатывать большое количество образцов при экономном расходовании дорогих реактивов, используемых для стимуляции клеток и последующего анализа. Абсолютные величины уровня фосфо-

Характеристика аналитических методов измерения уровня фосфорилирования РЛЦ миозина II по остаткам Ser-19 и Thr-18/Ser-19 в немышечных клетках

Метод	Количество образца для анализа	Чувствительность	Тип антител	Неоднозначность определения участка фосфорилирования	Примечания
Электрофорез в присутствии пирофосфата/ИЭФ/ИБ	большое	низкая	фосфонеспецифические антитела против РЛЦ	да	требуется оборудование и реактивы для ИЭФ, специальная подготовка образцов
ПААГ-электрофорез в присутствии мочевины и глицерина/ИБ	большое	низкая	фосфонеспецифические антитела против РЛЦ	да	подготовка образцов требует больших затрат времени; электрофоретическое разделение происходит медленно (3–4 ч)
Ds-Na-ПААГ-электрофорез в присутствии реагента Phos-tag/ИБ	умеренное	высокая	фосфонеспецифические антитела против РЛЦ после предварительной идентификации белковых полос с помощью фосфонеспецифических антител против РЛЦ	да – в случае фосфонеспецифических антител против РЛЦ; нет – в случае валидации белковых полос и антител	стандартное оборудование для Ds-Na-ПААГ-электрофореза и ИБ; подготовка образцов и манипуляции с Phos-tag гелями требуют больших затрат времени; трудоемкая валидация фосфоформ РЛЦ
Ds-Na-ПААГ-электрофорез/ИБ	небольшое	высокая	фосфоспецифические и фосфонеспецифические антитела против РЛЦ	нет – в случае валидации антител	стандартное оборудование для Ds-Na-ПААГ-электрофореза и ИБ; требуются стандарты фосфорилированных РЛЦ

Обозначения: ИБ – иммуноблоттинг; ИЭФ – изоэлектрофокусирование.

рилирования РЛЦ в клетках позволяют провести более надежные связи между активацией миозина и физиологическими ответами клеток при сравнении с данными об относительном изменении уровня фосфорилирования миозина.

Финансирование

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 14-04-32039; разработка и валидация описываемого метода) и РНФ (грант № 14-35-00026; работы по количественной оценке действия тромбина и инсулина).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Betapudi, V. (2014) Life without double-headed non-muscle myosin II motor proteins, *Front. Chem.*, **2**, 45.
- Heissler, S.M., and Sellers, J.R. (2016) Various themes of myosin regulation, *J. Mol. Biol.*, **428**, 1927–1946.
- Heissler, S.M., and Manstein, D.J. (2013) Nonmuscle myosin-2: mix and match, *Cell. Mol. Life Sci.*, **70**, 1–21.
- Matsumura, F., Yamakita, Y., and Yamashiro, S. (2011) Myosin light chain kinases and phosphatase in mitosis and cytokinesis, *Arch. Biochem. Biophys.*, **510**, 76–82.
- Khapchaev, A.Y., and Shirinsky, V.P. (2016) Myosin light chain kinase MYLK1: anatomy, interactions, functions, and regulation, *Biochemistry (Moscow)*, **81**, 1676–1697.
- Amano, M., Ito, M., Kimura, K., Fukata, Y., Chihara, K., Nakano, T., Matsuura, Y., and Kaibuchi, K. (1996) Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase), *J. Biol. Chem.*, **271**, 20246–20249.
- Amano, M., Nakayama, M., and Kaibuchi, K. (2010) Rho-Kinase/ROCK: A key regulator of the cytoskeleton and cell polarity, *Cytoskeleton*, **67**, 545–554.
- Kimura, K., Ito, M., Amano, M., Chihara, K., Fukata, Y., Nakafuku, M., Yamamori, B., Feng, J.H., Nakano, T., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Kaibuchi, K. (1996) Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase), *Science*, **273**, 245–248.
- Silver, P. J., and Stull, J. T. (1982) Quantitation of myosin light chain phosphorylation in small tissue samples, *J. Biol. Chem.*, **257**, 6137–6144.
- Persechini, A., Kamm, K. E., and Stull, J. T. (1986) Different phosphorylated forms of myosin in contracting tracheal smooth-muscle, *J. Biol. Chem.*, **261**, 6293–6299.
- Hirano, M., and Hirano, K. (2016) Myosin di-phosphorylation and peripheral actin bundle formation as initial events during endothelial barrier disruption, *Sci. Rep.*, **6**, 20989.
- Puetz, S., Schroeter, M.M., Piechura, H., Reimann, L., Hunger, M.S., Lubomirov, L.T., Metzler, D., Warscheid, B., and Pfitzer, G. (2012) New insights into myosin phosphorylation during cyclic nucleotide-mediated smooth muscle relaxation, *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **33**, 471–483.
- Aguilar, H.N., Tracey, C.N., Tsang, S.C.F., McGinnis, J.M., and Mitchell, B.F. (2011) Phos-tag-based analysis of myosin regulatory light chain phosphorylation in human uterine myocytes, *PLoS One*, **6**, e20903.
- Takeya, K., Loutzenhiser, K., Shiraiishi, M., Loutzenhiser, R., and Walsh, M.P. (2008) A highly sensitive technique to measure myosin regulatory light chain phosphorylation: the first quantification in renal arterioles, *Am. J. Physiol. Renal.*, **294**, F1487–F1492.
- Taylor, S.C., Berkelman, T., Yadav, G., and Hammond, M. (2013) A defined methodology for reliable quantification of Western blot data, *Mol. Biotechnol.*, **55**, 217–226.
- Taylor, S.C., and Posch, A. (2014) The design of a quantitative Western blot experiment, *Biomed. Res. Int.*, **2014**, 361590.
- Siller-Matula, J.M., Schwameis, M., Blann, A., Mannhalter, C., and Jilka, B. (2011) Thrombin as a multifunctional enzyme: focus on *in vitro* and *in vivo* effects, *Thromb. Haemostasis.*, **106**, 1020–1033.
- Liu, Y., Chen, X.L., Wang, L., and Martins-Green, M. (2017) Insulin antagonizes thrombin-induced microvessel leakage, *J. Vasc. Res.*, **54**, 143–155.
- Gopalakrishna, R., and Anderson, W.B. (1982) Ca²⁺-induced hydrophobic site on calmodulin – application for purification of calmodulin by phenyl-Sepharose affinity-chromatography, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **104**, 830–836.
- Adelstein, R.S., and Klee, C.B. (1981) Purification and characterization of smooth-muscle myosin light chain kinase, *J. Biol. Chem.*, **256**, 7501–7509.
- Bradford, M.M. (1976) Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, **72**, 248–254.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680–685.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets – procedure and some applications, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4350–4354.
- Yeung, Y.G., and Stanley, E.R. (2009) A solution for stripping antibodies from polyvinylidene fluoride immunoblots for multiple reprobing, *Anal. Biochem.*, **389**, 89–91.
- Ikebe, M., Hartshorne, D.J., and Elzinga, M. (1986) Identification, phosphorylation, and dephosphorylation of a 2nd site for myosin light chain kinase on the 20,000-dalton light chain of smooth-muscle myosin, *J. Biol. Chem.*, **261**, 36–39.
- Daniel, J.L., Molish, I.R., and Holmsen, H. (1981) Myosin phosphorylation in intact platelets, *J. Biol. Chem.*, **256**, 7510–7514.
- Somlyo, A.P., and Somlyo, A.V. (2003) Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase, *Physiol. Rev.*, **83**, 1325–1358.

28. Walsh, M.P. (2011) Vascular smooth muscle myosin light chain diphosphorylation: mechanism, function, and pathological implications, *IUBMB Life*, **63**, 987–1000.
29. Takeya, K., Wang, X., Sutherland, C., Kathol, I., Loutzenhiser, K., Loutzenhiser, R.D., and Walsh, M.P. (2014) The involvement of myosin regulatory light chain diphosphorylation in sustained vasoconstriction under pathophysiological conditions, *J. Smooth Muscle Res.*, **50**, 18–28.
30. Sandquist, J.C., Swenson, K.I., DeMali, K.A., Burrige, K., and Means, A.R. (2006) Rho kinase differentially regulates phosphorylation of nonmuscle myosin II isoforms A and B during cell rounding and migration, *J. Biol. Chem.*, **281**, 35873–35883.
31. Colburn, J.C., Michnoff, C.H., Hsu, L.C., Slaughter, C.A., Kamm, K.E., and Stull, J.T. (1988) Sites phosphorylated in myosin light chain in contracting smooth-muscle, *J. Biol. Chem.*, **263**, 19166–19173.
32. Kamm, K.E., Hsu, L.C., Kubota, Y., and Stull, J.T. (1989) Phosphorylation of smooth-muscle myosin heavy and light-chains – effects of phorbol dibutyrate and agonists, *J. Biol. Chem.*, **264**, 21223–21229.
33. Garcia, J.G.N., Davis, H.W., and Patterson, C.E. (1995) Regulation of endothelial-cell gap formation and barrier dysfunction – role of myosin light-chain phosphorylation, *J. Cell. Physiol.*, **163**, 510–522.
34. Garcia, J.G.N., Verin, A.D., Schaphorst, K., Siddiqui, R., Patterson, C.E., Csontos, C., and Natarajan, V. (1999) Regulation of endothelial cell myosin light chain kinase by Rho, cortactin, and p60(src), *Am. J. Physiol.*, **276**, L989–L998.
35. Hornbeck, P.V., Zhang, B., Murray, B., Kornhauser, J.M., Latham, V., and Skrzypek, E. (2015) PhosphoSitePlus, 2014: mutations, PTMs and recalibrations, *Nucleic Acids Res.*, **43**, D512–D520.
36. Aguilar, H.N., Zielnik, B., Tracey, C.N., and Mitchell, B.F. (2010) Quantification of rapid myosin regulatory light chain phosphorylation using high-throughput in-cell Western assays: comparison to Western immunoblots, *PLoS One*, **5**, e9965.
37. Vouret-Craviari, V., Boquet, P., Pouyssegur, J., and van Obberghen-Schilling, E. (1998) Regulation of the actin cytoskeleton by thrombin in human endothelial cells: role of Rho proteins in endothelial barrier function, *Mol. Biol. Cell*, **9**, 2639–2653.

WESTERN BLOTTING-BASED QUANTITATIVE MEASUREMENT OF MYOSIN II REGULATORY LIGHT CHAIN PHOSPHORYLATION IN SMALL AMOUNTS OF NON-MUSCLE CELLS

O. A. Kazakova¹, A. Y. Khapchaev^{1,2*}, A. A. Ragimov³,
E. L. Salimov³, and V. P. Shirinsky^{1,2}

¹ National Medical Research Center for Cardiology,
121552 Moscow, Russia; E-mail: askerkhapcha@gmail.co

² Lomonosov Moscow State University, Faculty of Fundamental Medicine,
119192 Moscow, Russia

³ Sechenov First Moscow State Medical University, 119991 Moscow, Russia

Received July 6, 2018

Revision received September 10, 2018

Accepted September 10, 2018

Myosin II is the main molecular motor in the actomyosin-dependent motility in cells. Phosphorylation of the myosin regulatory light chain (RLC) at Ser19 is a prerequisite for smooth muscle/non-muscle myosin II activation and serves as a biochemical equivalent of myosin II activity. Simultaneous phosphorylation at Thr18 further promotes the myosin II ATPase activity. A number of methods have been developed to measure myosin RLC phosphorylation at Ser19 or di-phosphorylation at Thr18/Ser19. While these methods are straightforward and robust in myosin-rich muscle tissues, they demonstrate limited applicability in non-muscle cells that have low myosin II content and are usually available in lesser amounts than muscle tissue. Because of this, dynamic analysis of RLC phosphorylation in multiple samples of non-muscle cells is difficult and requires large number of cells. The use of phospho-specific antibodies increases detection sensitivity but allows estimation of only relative levels of RLC phosphorylation at specific residues, which makes it difficult to estimate the physiologic relevancy of the observed changes in RLC phosphorylation. To measure RLC phosphorylation in small amounts of non-muscle cells, we used external calibration standards of non-phosphorylated and *in vitro* phosphorylated RLC in standard SDS-PAGE and Western blot procedures with phospho-specific RLC antibodies. Here, we describe the method in detail and demonstrate its application for quantitative measurement of myosin RLC phosphorylation in endothelial cells in response to natural agonists (thrombin or insulin) and in intact human platelets. We discuss the advantages and limitations of the proposed method vs other approaches for measuring myosin RLC phosphorylation in non-muscle cells.

Keywords: myosin regulatory light chain, non-muscle cells, phosphorylation, Western blotting, quantitative measurement