

·综述·

肌球蛋白轻链激酶介导的肌球蛋白调节轻链磷酸化研究

高文¹,李科¹,李雪萍¹,李亚²,宋梅¹

(1.西安医学院临床医学院,陕西 西安 710021;

2.西安医学院第一附属医院,陕西 西安 710003)

摘要:肌球蛋白轻链激酶(MLCK)是一种Ca²⁺/CaM(钙调素)依赖性蛋白激酶,通过介导肌球蛋白调节轻链(RLC)磷酸化促进肌肉的收缩。近年来研究发现RLC磷酸化在细胞病理生理功能中起着重要作用,本文就MLCK介导的RLC磷酸化最新研究进展作一综述。

关键词:肌球蛋白轻链激酶;肌球蛋白调节轻链;肌肉收缩

中图分类号:Q512.2

文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2021.08.008

文章编号:1006-1959(2021)08-0028-04

Study on Myosin Light Chain Phosphorylation Mediated by Myosin Light Chain Kinase

GAO Wen¹, LI Ke¹, LI Xue-ping¹, LI Ya², SONG Mei¹

(1.The Clinical Medicine College of Xi'an Medical University, Xi'an 710021, Shaanxi, China;

2.The First Affiliated Hospital of Xi'an Medical University, Xi'an 710003, Shaanxi, China)

Abstract: Myosin light chain kinase (MLCK) is a Ca²⁺/CaM (calmodulin)-dependent protein kinase that promotes muscle contraction by mediating myosin-regulated light chain (RLC) phosphorylation. In recent years, studies have found that RLC phosphorylation plays an important role in cell pathophysiological functions. This article reviews the latest research progress of MLCK-mediated RLC phosphorylation.

Key words: Myosin light chain kinase; Myosin regulatory light chain; Muscle contraction

肌球蛋白轻链激酶(myosin light chain kinase, MLCK)是一种专门依赖Ca²⁺/CaM(钙调素)的蛋白激酶,广泛存在于骨骼肌、平滑肌、心肌以及哺乳动物非肌肉细胞中,通过催化肌球蛋白调节轻链(regulatory light chain of myosin, RLC)N末端丝氨酸残基的磷酸化,可增强肌动蛋白激活的肌球蛋白ATP酶活性,从而促进肌球蛋白和肌动蛋白之间的相互作用^[1]。MLCK在选择蛋白质底物方面存在显著特异性,RLC是其唯一已知的生理底物。Ca²⁺/CaM依赖的MLCK磷酸化RLC在细胞功能中起着不同作用^[2,3],例如平滑肌收缩的起始、骨骼肌和心肌收缩力的增强、血小板和内皮细胞的聚集收缩、成纤维细胞的收缩和分泌以及轴突生长锥的运动。本文将对MLCK分型、结构及RLC磷酸化在不同肌肉组织中的生物学作用进行阐述,旨在为相关疾病的临床诊疗新技术提供思路及理论依据。

1 MLCK的分型

MLCK是由4种不同的激酶MLCK1, MLCK2, MLCK3和MLCK4组成,分别由4种不同的基因MYLK1, MYLK2, MYLK3和MYLK4编码^[4,5]。根据其肌肉类型的特异性表达和活动,MLCK1被称为平滑肌MLCK(smooth muscle MLCK, smMLCK), MLCK2被称为骨骼肌MLCK(skeletal muscle MLCK, skML-

CK), MLCK3被称为心肌MLCK(cardiac muscle MLCK, cMLCK), MLCK4是最近才被发现的,基于其在心肌细胞中的选择性蛋白表达,可能是另一种心肌MLCK^[6]。每块肌肉中存在着特定的MLCK,这种差异表明每块肌肉在体内的特殊作用,并有助于以不同的方式在每一个组织中进行不同的能量活动。

2 MLCK的结构

与skMLCK和cMLCK相比,smMLCK的基因结构较为复杂,它的多种蛋白质产物在所有组织中几乎均有表达,包括骨骼肌和心肌^[6]。MYLK1基因以细胞特异性的方式表达3个转录本,这是由交替启动子决定的。在人类基因组中,MYLK1基因编码非肌肉亚型、平滑肌亚型以及由不同起始位点编码的终止蛋白Telokin(也称为激酶相关蛋白或KRP)亚型。由于非肌肉亚型结构中存在N-末端氨基酸的延伸,因此非肌肉亚型是一种高分子量亚型,被称为长型MLCK,平滑肌亚型是低分子量亚型被称为短型MLCK,其在平滑肌和非肌肉细胞中的表达存在差异性。短型MLCK具有一个催化核心,是一个包含自抑制和钙调素结合序列的调控片段,还包含3个免疫球蛋白结构模块(Ig)、纤连蛋白结构模块(Fn)、富含PEVK重复区域和三个N-末端重复的DFRXXL肌动蛋白结合序列^[7]。与短型MLCK相比,长型MLCK是同一基因通过其他启动子编码的蛋白产物,其N-末端含有额外的结构模块,在内皮细胞、上皮细胞以及其他非肌肉细胞中的含量较丰富,且在细胞的迁移过程中起着重要作用^[8]。Telokin蛋白是由位于MLCK基因内含子中的另一启动子转

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:81801863)

作者简介:高文(1996.10-),女,陕西咸阳人,硕士,住院医师,主要从事慢性病的诊疗研究

通讯作者:李科(1984.1-),男,陕西西安人,博士,讲师,主要从事疾病诊疗新技术研究

录的一种 17 KDa 的平滑肌特异性蛋白, 由于缺乏激酶结构域, 其催化活性较低。Telokin 结构与 MLCK 和钙调蛋白结构域下游的 C-末端结构相同, 该结构可促进酶与未磷酸化的 RLC 或肌球蛋白的结合, 从而增强 MLCK 的收缩活性^[7]。它仅仅在平滑肌组织和细胞中有表达, 例如肠道、尿路上皮、生殖道平滑肌中含量最丰富^[9]。

在骨骼肌中, skMLCK 选择性表达一种独特的 MLCK, 在快速抽搐纤维中含量最高^[6]。有研究报道^[10], skMLCK 也存在于心脏, 但其含量太低, 无法维持 RLC 的基本磷酸化。skMLCK 具有与 smMLCK 相似的催化核心和调控片段, C 末端含有一个自抑制序列, 该序列包含一个钙调素结合序列, 并与酶的活性位点直接相互作用以抑制激活^[11]。尽管这两种酶都是 RLC 作为唯一生理底物的特异性蛋白激酶, 但是二者在底物识别决定因子方面的催化特性存在差异。

cMLCK 基因在心房和心室肌细胞中都有特异性表达, 由保守的激酶结构域组成, 该区域包括一个 C-末端的 ATP 酶结合位点, 其氨基酸末端具有独特性, 与其它已知蛋白无明显同源性^[12]。有研究发现^[13], cMLCK 在人类心力衰竭过程中可被同源盒蛋白 Nkx2-5 高度调控。

最近发现的 MLCK4 也是在心肌中有表达, 催化的结构域序列与其它 MLCK 相似, 但缺乏一个自抑制调控片段^[14]。其晶体结构以活性构象显示催化结构域, 一个短的 C 端“假调节螺旋”(PRH) 代替了一个完整的自我调节片段, 由于缺少连接区, 不能抑制催化作用^[9]。通过比较 MLCK4 的晶体结构与其它 MLCK 的结构序列, 可以推测 MLCK4 可能具有 Ca^{2+} /CaM 独立的激酶活性。

3 RLC 的磷酸化及其生物学作用

3.1 RLC 磷酸化在平滑肌中的作用 所有的平滑肌细胞中都含有肌球蛋白, 肌球蛋白分子是由两条重链和两对肌球蛋白轻链组成的六聚体结构^[15]。重链运动域可逆地与肌动蛋白丝结合, 通过水解 ATP, 从而将化学能转化为机械能。 Ca^{2+} /CaM 依赖的 MLCK 激活平滑肌与非肌肉细胞肌球蛋白, 并磷酸化 RLC, 以促进肌球蛋白与肌动蛋白之间的相互作用^[16]。在大多数细胞类型中, RLC 的磷酸化对于调节肌动球蛋白的细胞骨架功能具有重要意义, 例如局灶性黏连和应力纤维的形成、离子交换、胞质分裂、轴突生长锥的推进、细胞扩散、内皮和上皮屏障的形成、细胞的迁移等^[17, 18]。在平滑肌中, RLC 的磷酸化也被认为是参与肌肉收缩起始的关键步骤^[2]。长型 MLCK 和短型 MLCK 在细胞功能上有着显著差异, 绿色荧光蛋白标记的长型 MLCK 的荧光成像显示, 该亚型定位于有丝分裂 HeLa 细胞的卵裂沟中, 而

绿色荧光蛋白标记的短型 MLCK 则广泛存在于细胞质中。

由于其专一的性质, MLCK 在调节非肌肉细胞的多种功能和平滑肌收缩活动中的重要性显而易见, MLCK 表达的改变将影响细胞的生理功能, 例如在心血管系统中, MLCK 表达的改变将影响内皮细胞的屏障功能和血管平滑肌细胞的张力, 从而影响血压^[19]。相关研究也表明, 在血管损伤^[20], 肠道炎症^[21], 气道超敏反应^[22, 23]等病理条件下, MLCK 的表达也随之发生变化。

3.2 RLC 磷酸化对快速骨骼肌收缩的调节作用 骨骼肌肌节是由肌动蛋白细丝和肌球蛋白粗丝规律排列构成的。来自神经肌肉接头处的动作电位穿过肌膜, 并进入 T 管, 触发肌浆网释放 Ca^{2+} , 细胞内升高的 Ca^{2+} 通过与肌节细丝中的肌钙蛋白结合, 引起骨骼肌的收缩, 从而允许粗丝中的肌球蛋白跨桥与细丝中的肌钙蛋白结合^[24]。释放到肌节中的 Ca^{2+} 也能够调节 skMLCK 的活性, 并作为一种生化记忆, 在长时间或重复活动中增强肌肉的收缩力量。近年来关于动物快速抽搐骨骼肌的研究表明, skMLCK 介导的 RLC 磷酸化与强直性肌肉刺激后等长抽搐力的振幅增加存在时间相关性^[25-27]。由于肌肉疲劳, 使得肌肉力量出现可逆性下降, 这是肌肉持续活动的必然结果。然而, 快速抽搐骨骼肌的一个显著特性是在疲劳期间抽搐力增强与强直力下降共存^[28]。由于疲劳不会干扰 RLC 磷酸化的能力, 因此在这种情况下, 此机制似乎可以增强低频肌肉的力量, 以帮助维持肌肉功能。

目前对于 skMLCK 和 RLC 磷酸化在人骨骼肌中的作用的认知有限。人类骨骼肌的激活后增强(post-activation potentiation, PAP) 最近受到广泛关注, 因其可能影响人类在力量和耐力运动中的表现^[28]。PAP 是由强烈的自发收缩引起的, 在随后的抽搐收缩过程中, 这种自发收缩会增加峰值力和力的发展速度。PAP 的潜在机制是 RLC 磷酸化和运动单位的增加。因此, 在随后的爆发性肌肉活动中比如跳跃、短跑等, 可以通过调节收缩来增强力量, 从而诱发 PAP^[3]。

3.3 RLC 磷酸化在心脏生理病理中的作用 心脏是由心肌细胞组成的无意识横纹肌, 通过协调心肌收缩和舒张的连续循环, 将血液从心房和心室泵入肺部及全身血管。在持续跳动的的心脏中, 肌肉在很长一段时间内不会因肌丝收缩蛋白 Ca^{2+} 激活或失活的周期性增加和减少而放松。心脏与调节其功能的信号传导模块之间有着复杂的联系。在心肌细胞的收缩装置中, 主要的驱动因素是肌球蛋白分子的 ATP 酶活性, 而 cMLCK 通过磷酸化心肌 RLC 来激活或调节肌球蛋白的 ATP 酶活性。Sevrieva 等^[29]通过建立

动物模型研究发现,无论是cMLCK的消融还是RLC的磷酸化都可导致心肌收缩力障碍和心肌病理性肥厚。心力衰竭是由多因素引起的复杂疾病,收缩反应中的肌原纤维蛋白磷酸化的改变在心力衰竭患者心泵功能下降中起着重要作用。在人类心力衰竭和心衰的动物模型中发现,cMLCK表达和RLC的磷酸化程度都降低^[30]。cMLCK的过度表达增加了心肌收缩力,cMLCK的下调则降低了心肌收缩力。这些研究充分表明RLC磷酸化是心脏功能的决定因素,RLC磷酸化的水平降低直接影响心脏功能。cMLCK的过度表达增加了心肌收缩力,cMLCK的下调则降低了心肌收缩力,cMLCK和RLC的磷酸化在维持正常心肌肌节结构中发挥着重要作用。

家族性肥厚性心肌病(familial hypertrophic cardiomyopathy, FHC)是一种常染色体显性遗传疾病,由包括心室RLC在内的所有主要肌节蛋白的突变引起,从而导致肌原纤维紊乱和心室肌增厚,并损害心脏的收缩功能。研究表明^[31],RLC基因突变的小鼠心室RLC磷酸化水平的降低与FHC存在相关性。还有研究表明人心肌RLC中谷氨酸-22突变为赖氨酸也与肥厚型心肌病有关,这种突变抑制了磷酸化和Ca²⁺与RLC的结合,此外,还增加了肌力发育和肌原纤维ATP酶活性的Ca²⁺敏感性^[32]。

总之,导致激酶活性丧失和RLC磷酸化降低的cMLCK基因突变将会导致肌节功能障碍和心力衰竭。对cMLCK及RLC磷酸化重要性的认识能够为发现其在人类心脏病理生理中的作用提供新的临床靶点。

4 总结

近年来,MLCK备受关注,这突出了酶在生物学中的广泛应用,本文综述了MLCK的结构以及RLC磷酸化在不同肌肉组织中的生物功能,体现了RLC磷酸化对健康和疾病中的肌肉活动有重要影响,从而为相关肌肉疾病的临床研究提供新的思路,并可能成为未来的治疗靶点。

参考文献:

- [1]Yu H,Chakravorty S,Song W,et al.Phosphorylation of the regulatory light chain of myosin in striated muscle:methodological perspectives [J].European Biophysics Journal Ebj,2016,45(8):779-805.
- [2]Fegghi S,Tooley WW,Sniadecki NJ.Nonmuscle Myosin II A Regulates Platelet Contractile Forces Through Rho Kinase and Myosin Light-Chain Kinase [J].J Biomech Eng,2016,138(10):1045061-1045064.
- [3]Kelley CA,Wirshing ACE,Zaidel-Bar R,et al.The myosin light-chain kinase MLCK-1 relocates during Caenorhabditis elegans ovulation to promote actomyosin bundle assembly and drive contraction[J].Mol Biol Cell,2018,29(16):1975-1991.
- [4]Kamm KE,Stull JT.Signaling to Myosin Regulatory Light

Chain in Sarcomeres[J].Journal of Biological Chemistry,2011,286(12):9941-9947.

[5]Chang AN,Mahajan P,Knapp S,et al.Cardiac myosin light chain is phosphorylated by Ca²⁺/calmodulin-dependent and -independent kinase activities [J].Proceedings of the National Academy of Sciences,2016,113(27):E3824-E3833.

[6]Khapchaev AY,Shirinsky VP.Myosin Light Chain Kinase MYLK1:Anatomy,Interactions,Functions,and Regulation [J].Biochemistry,2016,81(13):1676-1697.

[7]Mascarenhas JB,Tchourbanov AY,Danilov SM,et al.The Splicing Factor hnRNPA1 Regulates Alternate Splicing of the MYLK Gene[J].Am J Respir Cell Mol Biol,2018,58(5):604-613.

[8]Mirzapiazova T,Moitra J,Moreno-Vinasco L,et al.Non-Muscle Myosin Light Chain Kinase Isoform Is a Viable Molecular Target in Acute Inflammatory Lung Injury[J].American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology,2011,44(1):40-52.

[9]Deng JT,Bhaidani S,Sutherland C,et al.Rho-associated kinase and zipper-interacting protein kinase,but not myosin light chain kinase, are involved in the regulation of myosin phosphorylation in serum-stimulated human arterial smooth muscle cells[J].PLoS One,2019,14(12):e0226406.

[10]Davis JS,Hassanzadeh S,Winitzky S,et al.The overall pattern of cardiac contraction depends on a spatial gradient of myosin regulatory light chain phosphorylation[J].Cell,2001,107(5):631-641.

[11]Heller WT,Krueger JK,Trewhella J.Further Insights into Calmodulin-Myosin Light Chain Kinase Interaction from Solution Scattering and Shape Restoration [J].Biochemistry,2003,42(36):10579-10588.

[12]Kampourakis T,Irving M.Phosphorylation of myosin regulatory light chain controls myosin head conformation in cardiac muscle [J].Journal of Molecular and Cellular Cardiology,2015(85):199-206.

[13]Ding P,Huang J,Battiprolu PK,et al.Cardiac Myosin Light Chain Kinase is Essential for Myosin Regulatory Light Chain Phosphorylation and Normal Cardiac Function in vivo [J].Biophysical Journal,2011,100(3):369a-369a.

[14]Chang AN,Kamm KE,Stull JT.Role of myosin light chain phosphatase in cardiac physiology and pathophysiology[J].Journal of Molecular and Cellular Cardiology,2016(101):35-43.

[15]Lowey S,Trybus KM.Common Structural Motifs for the Regulation of Divergent Class II Myosins[J].Journal of Biological Chemistry,2010,285(22):16403-16407.

[16]Dexter JP,Biddle JW,Gunawardena J.Model discrimination for Ca²⁺-dependent regulation of myosin light chain kinase in smooth muscle contraction[J].FEBS Letters,2018,592(16):2811-2821.

[17]Alcala DB,Haldeman BD,Brizendine RK,et al.Myosin light chain kinase steady-state kinetics:comparison of smooth muscle myosin II and nonmuscle myosin IIB as substrates [J].Cell Biochemistry and Function,2016,34(7):469-474.

[18]Jin Y,Blikslager AT.The Regulation of Intestinal Mucosal Barrier by Myosin Light Chain Kinase/Rho Kinases[J].Int J Mol Sci,2020,21(10):3550.

(下转第35页)

(上接第 30 页)

- [19] Cole WC, Welsh DG. Role of myosin light chain kinase and myosin light chain phosphatase in the resistance arterial myogenic response to intravascular pressure[J]. Archives of Biochemistry & Biophysics, 2011, 510(2): 160–173.
- [20] Rigor RR, Shen Q, Pivetti CD, et al. Myosin Light Chain Kinase Signaling in Endothelial Barrier Dysfunction [J]. Medicinal Research Reviews, 2013, 33(5): 911–933.
- [21] Islam MS, Kaji N, Mikawa S, et al. Induction of myosin light chain kinase and CPI-17 by TGF- β accelerates contractile activity in intestinal epithelial cells[J]. Journal of Veterinary Medical Ence, 2018, 80(6): 977–984.
- [22] Shi W, Xu C, Hussain M, et al. Inhibition of Myosin Light-Chain Kinase Enhances the Clearance of Lipopolysaccharide-Induced Lung Inflammation Possibly by Accelerating Neutrophil Apoptosis[J]. Shock Injury, 2017, 48(3): 377–386.
- [23] Alvarez-Santos MD, Alvarez-González M, Estrada-Soto S, et al. Regulation of Myosin Light-Chain Phosphatase Activity to Generate Airway Smooth Muscle Hypercontractility [J]. Front Physiol, 2020(11): 701.
- [24] Gordon AM, Homsher E, Regnier M. Regulation of Contraction in Striated Muscle [J]. Physiological Reviews, 2000, 80(2): 853–924.
- [25] Juan DC, Marjorie V, Beatriz L, et al. Myosin Light Chain Kinase (MLCK) Gene Influences Exercise Induced Muscle Damage during a Competitive Marathon[J]. PLoS One, 2016, 11(8): e0160053.
- [26] Yamaguchi M, Kimura M, Li ZB, et al. X-ray diffraction anal-

- ysis of the effects of myosin regulatory light chain phosphorylation and butanedione monoxime on skinned skeletal muscle fibers[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2016, 310(8): C692–C700.
- [27] Rassier DE, Macintosh BR. Coexistence of potentiation and fatigue in skeletal muscle [J]. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 2000, 33(5): 499–508.
- [28] Juan DC, Marjorie V, Beatriz L, et al. Myosin Light Chain Kinase (MLCK) Gene Influences Exercise Induced Muscle Damage during a Competitive Marathon [J]. PLoS One, 2016, 11(8): e0160053.
- [29] Sevríeva IR, Brandmeier B, Ponnamm S, et al. Cardiac myosin regulatory light chain kinase modulates cardiac contractility by phosphorylating both myosin regulatory light chain and troponin I[J]. The Journal of Biological Chemistry, 295(14): 4398–4410.
- [30] Warren SA, Briggs LE, Zeng H, et al. Myosin Light Chain Phosphorylation Is Critical for Adaptation to Cardiac Stress[J]. Circulation, 2012, 126(22): 2575–2588.
- [31] Hodatsu A, Fujino N, Uyama Y, et al. Impact of cardiac myosin light chain kinase gene mutation on development of dilated cardiomyopathy[J]. ESC Heart Failure, 2019, 6(2): 406–415.
- [32] Tobita T, Nomura S, Morita H, et al. Identification of MYLK3 mutations in familial dilated cardiomyopathy [J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 17495.

收稿日期: 2020-10-05; 修回日期: 2020-10-27

编辑/宋伟