

На правах рукописи

СИРЕНКО

Владимир Владимирович

**Регуляция актин-миозинового взаимодействия
кальпониноподобным белком мидии Грея**



03.03.04 - клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2015

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки
Институт цитологии Российской академии наук

Научный руководитель:

Боровиков Юрий Сергеевич

доктор биологических наук, профессор,
заведующий лабораторией молекулярных основ
клеточной подвижности ФГБУН Институт
цитологии РАН, г. Санкт-Петербург

Официальные оппоненты:

Кулева Надежда Владимировна

доктор биологических наук, профессор кафедры
биохимии ФГБОУ ВПО Санкт-Петербургский
государственный университет, г. Санкт-Петербург

Левицкий Дмитрий Иванович

доктор биологических наук, профессор,
заведующий лабораторией структурной биохимии
белка Института биохимии им. А. Н. Баха РАН.
Федеральный исследовательский центр
"Фундаментальные основы биотехнологии"
Российской академии наук, г. Москва

Ведущая организация:

Институт экспериментальной кардиологии
Российского кардиологического научно-
производственного комплекса Министерства
здравоохранения РФ, г. Москва

Защита состоится «29» января 2016 года в 12 часов на заседании диссертационного
совета Д 002.230.01 на базе Института цитологии РАН по адресу:

194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., д. 4

Сайт института: <http://www.cytspb.rssi.ru>

Адрес электронной почты института: cellbio@mail.cytspb.rssi.ru

Факс института (812)297-03-41

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института цитологии РАН и на сайте
института

Реферат разослан «_____» 2015 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Е. В. Каминская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Известны два пути регуляции сокращения гладких мышц. Первый – связан с регуляцией миозина. Так, фосфорилирование легких цепей миозина соответствующей киназой после стимуляции Ca^{2+} -кальмодулином, приводит к активации сокращения. Второй – опосредован белками тонких (актиновых) нитей – кальдесмоном и кальпонином. Их присутствие на актиновых нитях приводит к ингибированию сокращения. Эти регуляторные белки действуют на сильную форму связывания миозина с актином. Сокращение любого типа мышц сопровождается циклической сменой слабосвязанного и сильносвязанного состояний между головками миозина и актиновыми нитями. Сильносвязанное состояние ($K_{\text{асс}}$ равна 10^9 M^{-1}), между миозиновой головкой и мономерами актина существует в отсутствие адениновых нуклеотидов. После присоединения молекулы АТФ с её последующим гидролизом головкой миозина, последняя претерпевает конформационные изменения, приводящие к ослаблению связи с актиновой нитью. Возникает слабосвязанная форма актомиозина ($K_{\text{асс}}$ равна 10^4 M^{-1}), сопровождающая активацию головки миозина, которая приводит к разрыву связи с актином. Когда такая активированная головка миозина снова приходит в соприкосновение с актином, вновь возникает слабосвязанная форма, которая тут же переходит в сильносвязанное состояние. Конформационный переход слабосвязанного актомиозина в сильносвязанный сопровождается возникновением элементарного усилия, создаваемого одиночной миозиновой головкой. А циклическая работа всех миозиновых головок в конкретной мышце приводит к её сокращению.

Возвращаясь к ингибирующему влиянию гладкомышечного кальпониона на сильносвязанную форму актомиозина, следует сказать, что это теоретически может осуществляться на одном из двух шагов актомиозинового цикла. Первый из них возможен на стадии присоединения активированной АТФ головки миозина к актиновой нити (McKillop and Geeves, 1993), а второй – при переходе слабосвязанной формы актомиозина в сильносвязанную (Geeves and Halsall, 1987). Из работы (Horiuchi and Chacko, 1991) следует, что кальпониин, при ингибировании актомиозина, осуществляет второй вариант; он не влияет на актомиозиновое взаимодействие, а тормозит изомеризацию головки миозина, что приводит к снижению скорости гидролиза АТФ.

Надо сказать, что несмотря на многочисленные свойства кальпониона, указывающие на возможность его регулирующей роли в сокращении гладкой мышцы, в настоящее время считается, что он принимает участие в передаче агонист-индуцированного сигнала (Kim et al., 2008), а роль ингибитора гладкомышечного сокращения отводится кальдесмону. Если сравнить потенциальные возможности кальпониона и кальдесмона регулировать гладкомышечное сокращение, то обнаружим между ними большое сходство.

Действительно, в гладкомышечных клетках кальдесмон связывается с актином, миозином и тропомиозином (Тм) (Marston and Lehman, 1985; Marston and Huber, 1996). Кальдесмон *in vitro* взаимодействует с Ф-актином и филаментами миозина (Morgan and Gangopadhyay, 2001). Данные о том, что кальдесмон

ингибирует как Mg^{2+} -АТФазу актомиозина (Marston and Huber, 1996), так и развитие изометрической силы в пермеабелизованных волокнах гладкой мышцы (Szpacenko et al., 1985) дают основание утверждать, что кальдесмон является ингибиторным белком. Изучение влияния кальдесмона на конформационные состояния актина и собственное положение кальдесмона при генерации силы в глицеринизированных волокнах показало, что структура и / или способ прикрепления кальдесмона к актину модулируют как возрастание силы, так и переход мономеров актина в цикле АТФазы из выключенного "ВЫКЛ" конформационного состояния во включенное "ВКЛ" (Pronina et al., 2007).

Кальпонин, со своей стороны, белок с молекулярной массой 32 кДа, ассоциирован с филаментами тонких нитей и как было ранее предположено, участвует в регуляции сокращения гладких мышц (Takahashi et al., 1986; Winder and Walsh, 1990a). Он, как известно, способен связываться с актином, тропомиозином и кальмодулином (Takahashi et al., 1986; Takahashi et al., 1988a; Childs et al., 1992a) и ингибировать активируемую актином АТФазную активность миозина (Winder and Walsh, 1990a; El-Mezgueldi and Marston, 1996). Это ингибирующее влияние кальпонины является обратимым после его фосфорилирования (Winder and Walsh, 1990a) или добавления Ca^{2+} -кальмодулина (Wills et al., 1993). Кальпонин ингибирует перемещение актина по миозиновым головкам, как показывает тест искусственной подвижности *in vitro* (Shirinsky et al., 1992; Borovikov et al., 1996a; El-Mezgueldi, 1996). Фосфорилирование кальпонины, как и кальдесмона, предотвращает его связывание с Ф-актином и полностью снимает ингибирование актомиозинового взаимодействия (Khalil and Morgan, 1993). При изучении конформационных изменений в актиновых нитях выяснилось, что и кальпонин и 38 кДа фрагмент кальдесмона ингибируют конформационные изменения Ф-актина, которые присущи состоянию «сильного» связывания между головками миозина и актином (Borovikov et al., 1996b). Кальдесмон и кальпонин могут взаимодействовать с фосфолипидами. Предполагается, что кальпонин и кальдесмон при взаимодействии с фосфолипидами могут принимать участие в формировании цитоскелета (Gusev, 2001). Свойства кальпонины и кальдесмона сравнивают с компонентами тропонина, которые участвуют в регуляции сократительной активности поперечно-полосатых мышц (Gusev et al., 1991).

Как следует из этого, далеко не полного перечня свойств, кальпонин и кальдесмон имеют поразительно общие свойства и в равной степени могут претендовать на участие в регуляции сокращения гладких мышц. В этом качестве они рассматривались на протяжении 10 – 15 лет, но затем основное внимание было уделено механизму регуляции гладкомышечного сокращения кальдесмоном. Так, в 2006 году (Alahyan et al., 2006) для определения механизма ингибирования S1-АТФазы исследовали кинетику переходных состояний и определяли скорость элементарных шагов актин-S1-АТФазы под действием именно кальдесмона, а не кальпонины. В связи с этим возникает вопрос, могут ли все свойства, проявляемые кальпонином в отношении ингибирования актомиозиновой АТФазы, быть только побочными свойствами белка, участвующего наравне с десятками других в проведении сигнала?

Открытие в запирающей мышце мидии *Crenomytilus grayanus* актин-связывающего белка с молекулярной массой 40 кДа (Добржанская и др., 2010) и его способности ингибировать Mg^{2+} -АТФазу миозина, а также гомологичного кальпонию и названного кальпониноподобным (Dobrzhanskaya et al., 2013), вновь поднимает вопрос о роли гладкомышечного кальпонию позвоночных (h1) в регуляции актомиозинового цикла.

Актуальность изучения этого белка в мышечной биологии, которая является традиционным разделом клеточной биологии, обоснована тем, что он принадлежит к важнейшему классу белков, а именно, к регуляторным белкам. Причем речь идет о регуляции актин-миозинового взаимодействия, которое составляет молекулярную основу фундаментального свойства живых существ – подвижности. Особую актуальность этому изучению придает тот факт, что проблема роли h1 в регуляции актин-миозинового взаимодействия так и не нашла до сих пор своего решения.

В связи с этим, актуальным стало определить молекулярный механизм, с помощью которого кальпониноподобный белок регулирует актин-миозиновое взаимодействие. Знание такого механизма облегчит в дальнейшем решение вопроса о молекулярных механизмах кэтч-состояния, развиваемого запирающей мышцей двустворчатых моллюсков.

Определение в данной работе молекулярного механизма, каким кальпониноподобный белок ингибирует актомиозиновое взаимодействие, позволило его сравнить с механизмом ингибирования того же взаимодействия белком h1. Это сравнение показало, что, несмотря на сотни миллионов лет самостоятельного развития беспозвоночных и позвоночных животных, последние сохранили h1, регулирующий актин-миозиновое взаимодействие, хотя в корне изменился его механизм в сравнении с кальпониноподобным белком беспозвоночных. Уже один этот факт ставит под сомнение утвердившееся сейчас представление о том, что только кальдесмон регулирует актомиозиновое взаимодействие в гладких мышцах позвоночных.

Цель исследования

Целью работы было выяснение молекулярных механизмов регуляции актин-миозинового взаимодействия кальпониноподобным белком (Cap) тонких нитей запирающей мышцы моллюска мидии Грея (*Crenomytilus grayanus*).

Были поставлены следующие задачи:

1. Определить влияние Cap на конформационные изменения головки миозина, происходящие в условиях слабого и сильного связывания актина с миозином.
2. Выявить конформационные изменения, происходящие в Ф-актине и субдомене-1 актина в цикле гидролиза АТФ под влиянием белка Cap.
3. Установить механизм ингибирования белком Cap АТФазной активности головки миозина в процессе взаимодействия последней с актином.

Основные положения, выносимые на защиту

- 1) Cap, связываясь с актиновой нитью, располагается вдоль нее и связывание это имеет среднюю силу сродства.

- 2) Сар переводит головку миозина из состояния, характерного для сильной формы связывания миозина с актином, в состояние слабого взаимодействия, что служит основной причиной ингибирования актомиозиновой АТФазы.
- 3) Сар вызывает конформационные изменения в Ф-актине, сопровождающиеся изменением количества «включенных» мономеров актина при моделировании цикла гидролиза АТФ, что также способствует ингибированию. Актиновая нить при этом становится более жесткой.
- 4) Сар ингибирует актомиозиновую АТФазную активность преимущественно по конкурентному типу.
- 5) Ингибирование тропомиозином актомиозиновой АТФазной активности осуществляется по неконкурентному типу.

Научная новизна

В работе впервые исследовано влияние Сар на связывание головки миозина с Ф-актином и на конформационные изменения субдомена-1 актина, меченного флуоресцентными зондами, при моделировании нескольких промежуточных стадий АТФазного цикла актомиозина. Методом поляризационной флуориметрии показано, что Сар, при связывании с Ф-актином, делает актиновую нить более жесткой, уменьшает амплитуду вращения субдомена-1 актина при переходе от слабого к сильному связыванию между актином и миозином и, возможно, конкурирует с субфрагментом-1 миозина за участок сильного связывания головки миозина с актином. Впервые показано, что ингибирование белком Сар АТФазной активности головки миозина связано с ослаблением сильных форм связывания миозина с актином ($A \cdot M$ и $A \cdot M \cdot ADP$).

Методом коседиментации Сар с Ф-актином впервые определен единственный класс связывающих сайтов с константой ассоциации, равной $5.6 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ и максимальным значением связывания $V_{\max} = 4.73 \text{ нмоль/мг}$ актина.

Расчет кинетических параметров АТФазной активности актомиозина в условиях связанного с актином белка Сар в насыщающей концентрации впервые показал, что последний ингибирует эту активность, увеличивая значение K_{ATPase} и незначительно уменьшая V_{\max} . Наоборот, T_m , оказывающий ингибирующее влияние на актомиозиновую АТФазу в насыщающей дозе при постоянном количестве S1, не изменяет значение K_{ATPase} и уменьшает значение V_{\max} . Влияние Сар и T_m на разные шаги АТФазного цикла дает основание предполагать, что, находясь на одном мышечном волокне, T_m не будет влиять на свойства белка Сар ингибировать АТФазу.

Теоретическое и практическое значение работы

Полученные в работе данные расширяют представление о вкладе Сар в регуляцию гладкомышечного сокращения, составляющего важную часть мышечной биологии. Сар имеет общий тип строения и определенную гомологию в полипептидной последовательности с гладкомышечным кальпонином: его гомология составляет 41% с кальпониноподобным белком из гладкой мышцы двустворчатого моллюска *Mytilus galloprovincialis*, который, в свою очередь, на 36% гомологичен кальпониону из гладких мышц цыпленка (Dobrzhanskaya et al., 2013). В отличие от гладкомышечного кальпониона, Сар препятствует взаимодействию актомиозина, но не влияет на ферментативную активность

головки миозина, так как существенно увеличивает K_{ATPase} и не меняет значение V_{max} . Знание механизма, которым кальпониноподобный белок мидии ингибирует актомиозиновую АТФазу, облегчит в дальнейшем решение вопроса о молекулярном механизме кэтч-состояния, развиваемого запирающей мышцей двустворчатых моллюсков. Несмотря на это различие в механизме ингибирования, Сар с такой же эффективностью ингибирует АТФазу миозина, как и кальпонин. Выяснение того, в какой мере Сар имеет молекулярный механизм ингибирования актомиозиновой АТФазы, отличающийся от h1, показало, в каком направлении двигался эволюционный процесс регуляции актомиозина от беспозвоночных к позвоночным животным. Результаты данной работы имеют определенную практическую ценность, так как выяснение механизмов гладкомышечного сокращения имеет большое значение для разработки подходов и методов лечения различных патологий гладких мышц, в частности, сосудистой патологии.

Апробация работы и публикации

По теме диссертации опубликовано 7 печатных работ, в том числе 3 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК для размещения материалов кандидатских диссертаций, и 4 тезисов докладов. Результаты исследования представлены на международном симпозиуме «Biological motility: new facts and hypotheses», Пущино, 2014, Россия; 16-й Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология-наука XXI века», Пущино, 2012, Россия; IV Съезде биофизиков России, Симпозиум III «Физика – медицине и экологии», Нижний Новгород, 2012, Россия; 40-й Европейской мышечной конференции, Берлин, 2011, Германия.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 174 страницах машинописного текста и состоит из «Введения», глав «Обзор литературы», «Методы исследования», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы» и списка цитируемой литературы, включающего 347 источников, из них 336 – на английском языке. Работа содержит 23 рисунка, 4 таблицы и 2 схемы. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проекты № 11-04-00244 и 14-04-00454).

Личный вклад соискателя

Все экспериментальные процедуры и обработка результатов выполнены автором лично. Все исследования проводились на оборудовании Института цитологии РАН.

Материалы, вошедшие в представленную работу и опубликованные в виде статей, написаны самим автором и обсуждались совместно с соавторами и научным руководителем.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение белков

Миозин выделяли из скелетных мышц кролика согласно методике (Иванов и Юрьев, 1961). Для получения ацетонового порошка из скелетных мышц кролика использовали схему, предложенную (Potter, 1982). Субфрагмент-1 миозина (S1) получали перевариванием миозина из скелетных мышц α -химотрипсином, как описано (Okamoto and Sekine, 1985). G-актин выделяли из ацетонового порошка

по методу (Pardee and Spudich, 1982). Выделение тропомиозина из ацетонового порошка скелетных мышц проводили по методу, описанному (Smillie, 1982). Сар получали из изолированных тонких нитей запирательной мышцы мидии *Crenomytilus grayanus* посредством избирательной экстракции при 2°C (Dobrzhanskaya et al., 2013).

Мечение мышечных белков флуоресцентными зондами

Сар метили акрилоданом, как описано ранее (Wills et al., 1993). Сар метили еще и флуоресцентным зондом 5-IAF (Ip and Fellows, 1990). G-актин метили флуоресцентным зондом 1,5-IAEDANS по остатку Цис374, как описано ранее (Miki et al., 1987). Мечение наиболее реактивной сульфгидрильной группы миозина SH₁ (остаток Цис707) флуоресцентным красителем 1,5-IAEDANS осуществляли согласно методу (Borejdo and Putnam, 1977). Мечение Ф-актина теневых мышечных волокон ФИТЦ-фаллоидином осуществляли в течение 30 мин по схеме, предложенной в работе (Vorovikov et al., 1993).

Определение концентрации белков

Концентрацию Сар определяли по методу (Bradford, 1976). Концентрации известных белков, таких как актин, миозин, S1 и Тм, определяли в ультрафиолетовой области спектра, применяя соответствующие коэффициенты поглощения.

Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия

Степень очистки белков, белковый состав мышечного волокна, молярные соотношения S1 и актина, степень мечения белков флуоресцентным красителем определяли методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (Laemmli, 1970).

Измерение актин-миозиновой АТФазной активности

Активируемую актином АТФазную активность субфрагмента-1 миозина определяли по скорости образования неорганического фосфата, количество которого измеряли по методу (Fiske and Subbarow, 1925)

Коседиментация Сар с актином

Параметры связывания определяли после коседиментации Сар, меченного флуоресцентным зондом 5-IAF, с Ф-актином при ультрацентрифугировании. По результатам коседиментации (каждая точка представляет среднее из трех-четырёх независимых экспериментов) строили зависимость количества связавшейся фракции от концентрации несвязавшейся фракции и параметры связывания определяли с помощью графической программы Graph Pad Prism.

Определение кинетических параметров V_{max} и K_{ATPase} взаимодействия актина и S1

Кинетические параметры V_{max} и K_{ATPase} определяли по графикам зависимости обратных величин скорости гидролиза АТФ головкой миозина и концентрации актина. Статистическую обработку данных и вычисление V_{max} и K_{ATPase} с построением графиков осуществляли с помощью программы GraphPad Prism.

Получение мышечных волокон

Глицеринизированные волокна получали из поясничных мышц кролика по методу (Szent-Gyorgyi, 1949). Мышечные волокна, лишённые большей части миозина и

регуляторных белков актиновой нити («теневые» волокна, ghost fibers), получали при инкубации одиночных глицеринизированных мышечных волокон в течение 80-90 мин при комнатной температуре в экстрагирующем растворе. Теневое волокно затем "реконструировали" инкубацией в растворе, содержащем белки, меченные флуоресцентными зондами для придания волокну флуоресцентной анизотропии.

Метод поляризационной микрофлуориметрии

Для изучения конформационных изменений белков использовали поляризованную флуоресценцию зондов: 1,5-IAEDANS, связанного с актином и субфрагментом-1 миозина, акрилодана, связанного с Сар и ФИТЦ-фаллоидина, связанного с Ф-актином мышечного волокна. Поляризованную флуоресценцию 1,5-IAEDANS возбуждали при 407 ± 5 нм и регистрировали в области 550–650 нм. Флуоресценцию акрилодана и ФИТЦ-фаллоидина возбуждали при 479 ± 5 нм и регистрировали в области 550–650 нм. Измерения осуществляли с помощью двухканального поляризационного микрофлуориметра (Иоффе и др., 1974; Borovikov et al., 2004). Измерения поляризованной флуоресценции мышечных волокон производили в растворе в присутствии 3 мМ MgADP или 5 мМ MgATP. Фиксировали показания четырех интенсивностей поляризованной флуоресценции: $I_{||}$, I_{\perp} , I_{\perp} и $I_{||}$. Значки слева от I обозначают параллельное ($||$) и перпендикулярное (\perp) направления поляризации возбуждающего света, а те же значки справа от I – направление поляризации флуоресценции. Степень поляризации флуоресценции P при ориентации волокна параллельно ($P_{||}$) и перпендикулярно (P_{\perp}) плоскости поляризации возбуждающего света вычисляли на основании уравнений:

$$P_{||} = (I_{||} - I_{\perp}) / (I_{||} + I_{\perp}); P_{\perp} = (I_{\perp} - I_{||}) / (I_{\perp} + I_{||}).$$

Полученные данные анализировали с помощью модель-зависимого метода (Tregear and Mendelson, 1975; Borejdo and Putnam, 1977; Borovikov et al., 2004). Исходили из предположения, что в мышечном волокне имеются две популяции флуорофоров: N флуорофоров расположены хаотически, а $(1-N)$ флуорофоров ориентированы вдоль образующей поверхности конуса, ось которого совпадает с осью Ф-актина. Осцилляторы поглощения и излучения ориентированных флуорофоров отклоняются от оси Ф-актина на углы Φ_A и Φ_E , соответственно. В отсутствие нуклеотидов моделировали стадию А•М цикла гидролиза АТФ (состояние ригора). Использовали нуклеотиды MgADP и MgATP для того, чтобы моделировать соответственно сильносвязанное (А•М•ADP) и слабосвязанное (А•М•ADP•Pi) состояния актомиозина (Cooke, 1997). В рамках описываемой модели угол Φ_E является показателем ориентации флуорофоров относительно оси волокна, тогда как величина N зависит от подвижности участка, с которым они жестко связаны, а $\Theta_{1/2}$ – отражает упругость тонкой нити на изгиб. Регистрацию интенсивностей флуоресценции осуществляли для каждого мышечного волокна в пяти точках. Статистическую достоверность изменений оценивали с помощью t -критерия Стьюдента. Изменения считали достоверными при $P \leq 0,05$, т.е. $\beta > 0,95$. Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Влияние Cap на циклическую работу головки миозина в АТФазном цикле (Сиренко и др., 2012, 2014)

Использование теневых мышечных волокон, декорированных S1 с флуоресцентным зондом, позволяет выявить ориентацию и подвижность миозиновых головок в процессе моделирования их циклической работы, которое достигается последовательным воздействием на такие волокна нуклеотидов MgADP и MgATP. Определив поляризованную флуоресценцию, характерную для каждой фазы этой циклической работы головки миозина, можно оценить влияние различных регуляторных белков на эти состояния S1, так как встраивание исследуемых белков в теневые волокна будет изменять поляризационные параметры, найденные для каждой фазы такого цикла. В этом разделе описаны результаты исследования белка Cap, который при связывании с теневым волокном изменял поляризационные параметры S1, меченной флуоресцентным зондом 1,5-IAEDANS по остатку Цис 707. Моделировали три состояния актомиозина: без нуклеотидов (моделирование сильного связывания миозина с актином, характерного для ригора), в присутствии MgADP (моделирование сильного связывания актина и миозина) и в присутствии MgATP (моделирование слабого связывания). То есть схема исследования такова: меченый S1 + немеченый актин + немеченый Cap + нуклеотиды.

Как следует из табл. 1, в отсутствие нуклеотидов и Cap значение $P_{||}$ актомиозина больше, чем P_{\perp} , следовательно, диполи излучения красителя, связанного с S1, располагаются преимущественно вдоль мышечного волокна.

ТАБЛИЦА 1. Влияние Cap на поляризованную флуоресценцию S1, меченного 1,5-IAEDANS, при моделировании некоторых стадий АТФазного цикла нуклеотидами MgADP и MgATP.

Нуклеотиды	S1	Cap	$P_{ } \pm SEM$	$P_{\perp} \pm SEM$
-	+	-	$0,410 \pm 0,002$	$-0,022^{**} \pm 0,003$
	+	+	$0,366 \pm 0,003$	$0,040 \pm 0,002$
MgADP	+	-	$0,419 \pm 0,004$	$-0,027^{**} \pm 0,003$
	+	+	$0,356 \pm 0,004$	$0,077 \pm 0,003$
MgATP	+	-	$0,322^{*} \pm 0,005$	$0,189 \pm 0,006$
	+	+	$0,313^{*} \pm 0,005$	$0,266 \pm 0,006$

Обозначения: $P_{||}$ и P_{\perp} – степени поляризации флуоресценции при ориентации волокон параллельно и перпендикулярно плоскости поляризации возбуждающего света, соответственно. Данные получены на 6-10 теневых волокнах. SEM – стандартное отклонение среднего. *, ** – одной (двумя) звёздочками отмечены средние, разность между которыми недостоверна. Для остальных сравнений $\beta > 0,95$

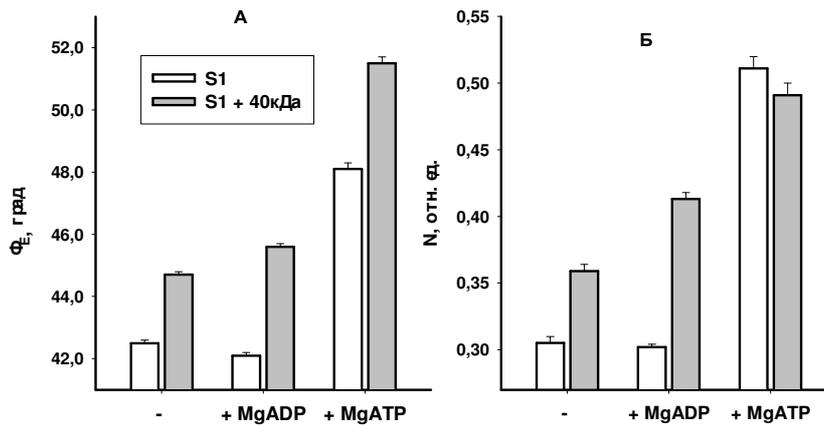


Рис. 1. Влияние Сар (40кДа) на ориентацию Φ_E (А) и подвижность N субфрагмента S1, меченного 1,5-IAEDANS (Б), в теновом мышечном волокне в отсутствие или в присутствии нуклеотидов MgADP и MgATP.

Анализ поляризованной флуоресценции S1, меченного 1,5-IAEDANS, указывает на то, что в отсутствие нуклеотидов упорядоченно расположенные осцилляторы образуют с тонкой нитью угол, близкий к $42,5^\circ$ (рис. 1, А). В мышечном волокне, кроме упорядоченно расположенных флуорофоров, имеются молекулы красителя, которые располагаются хаотически (Nichei et al., 1974; Borejdo and Putnam, 1977; Borovikov et al., 1991; Andreev et al., 1995; Borejdo et al., 2002). Поскольку такая ориентация флуорофоров в мышечном волокне появляется, главным образом, вследствие колебательных и вращательных движений самой головки миозина, связанной с актиновой нитью (Borovikov et al., 1991; Andreev et al., 1995), то параметр N можно использовать как характеристику прочности связывания головки миозина с актином

Оказалось, что при моделировании сильной формы связывания в отсутствие нуклеотидов ($A \cdot M$) относительное количество хаотически расположенных осцилляторов N в мышечном волокне приблизительно 30% ($N = 0,305 \pm 0,005$) (рис. 1, Б). Соответственно, относительное количество ориентированных осцилляторов ($1-N$) в этом же структурном состоянии актомиозина составляет около 70%. Это свидетельствует о том, что головки миозиновых молекул в этих экспериментальных условиях обладают высоким сродством к актину и жестко связаны с Ф-актином. В присутствии MgADP величина Φ_E (угол между осью актинового волокна и зондом на S1) достоверно уменьшается (рис. 1, А), при этом оси диполей излучения зондов поворачиваются к оси мышечного волокна. Относительное количество хаотически расположенных осцилляторов N в присутствии MgADP практически не изменяется. Следовательно, головки миозиновых молекул жестко связаны с Ф-актином и формируют сильную форму связывания. В присутствии MgATP степень поляризации $P_{||}$ уменьшается, а P_{\perp} – увеличивается (табл. 1). Величина Φ_E увеличивается с $42,1^\circ$ до $48,1^\circ$ (на 14%), что происходит тогда, когда диполи отклоняются в направлении от оси мышечного волокна. При этом относительное количество хаотически расположенных осцилляторов N увеличивается с 0,302 до

0,511 отн. ед. (на 70%). Увеличение значения N указывает на то, что амплитуда колебаний диполей зонда существенно возрастает, т.е. увеличивается мобильность головки миозина на Ф-актине. Это указывает на формирование слабой формы связывания S1 с актином в присутствии MgATP (Borovikov et al., 1991). Белок Cap при взаимодействии с актиновой нитью, заметно изменяет подвижность и пространственное расположение зондов, расположенных на S1, при моделировании сильных и слабой форм связывания (рис. 1, А и Б). Так, в отсутствие нуклеотидов Cap увеличивал угол наклона флуоресцентной метки Φ_E с $42,5^\circ$ до $44,7^\circ$. При этом относительное количество хаотически расположенных флуорофоров N возрастало с 0,305 до 0,359 отн. ед. (на 18%). Похожие изменения параметров Φ_E и N наблюдались в отсутствие этого белка при моделировании слабой формы актин-миозинового взаимодействия в присутствии MgATP (табл. 1, рис.1). Ингибирующее влияние Cap на формирование сильной формы связывания актомиозина наблюдалось и в присутствии MgADP. Как следует из данных (рис.1А), в присутствии Cap и MgADP величина Φ_E увеличивалась с $42,1^\circ$ до $45,6^\circ$. Это указывает на вращение оси диполей излучения в направлении от продольной оси мышечного волокна, что характерно для формирования слабой формы связывания актина и миозина (Borovikov et al., 1991; Пронина и др., 2005). В присутствии MgATP Cap увеличивает угол Φ_E от $48,1^\circ$ до $51,5^\circ$ (рис. 1 А), а N в этих экспериментах было около 50%, что соответствует слабому связыванию актомиозина. Сравнение этих поляризационных характеристик с соответствующими характеристиками в экспериментах без Cap указывает на то, что этот белок оказывает лишь небольшое влияние на формирование слабой формы связывания S1 с актином (табл. 1). Интересно сравнить данные по влиянию Cap на конформационные изменения остатка Цис 707 головки миозина, связанного с зондом 1,5-IAEDANS, представленные выше, с влиянием h1 на тот же участок миозиновой головки, описанным в работе Боровикова с соавторами (Borovikov et al., 1996). Если, как показано выше, Cap увеличивал угол наклона обсуждаемого участка, то h1 – уменьшал его, но при этом оба белка увеличивали мобильность сульфгидрильной группы SH₁, входящей в состав «рукоятки» рычага.

Таким образом, из этих экспериментов следует, что Cap воздействует на сильные формы связывания миозина с актином ($A \cdot M$ и $A \cdot M \cdot ADP$), ослабляя связь между ними.

2. Влияние Cap на конформационные изменения мономеров актина и упругость актиновой нити в процессе моделирования АТФазного цикла (Сиренко и др., 2013)

Чтобы исследовать влияние Cap на конформационные изменения Ф-актина в цикле гидролиза АТФ, в работе использовали теньевые мышечные волокна, содержащие тонкие нити, декорированные флуоресцентным зондом ФИТЦ-фаллоидином, или реконструированные из актина, меченного зондом 1,5-IAEDANS по остатку Цис 374. Схема исследования была следующей: меченый актин + немеченый S1 + немеченый Cap + нуклеотиды.

Параметры поляризованной флуоресценции 1,5-IAEDANS, связанного с остатком Цис 374 субдомена-1 актина, и Ф-актина, модифицированного ФИТЦ-

фаллоидином, представлены, соответственно, в табл. 2 и 3. Как следует из табл. 2, в отсутствие нуклеотидов и Cap значение P_{\parallel} ($0,285 \pm 0,001$) больше, чем P_{\perp} ($0,187 \pm 0,001$); следовательно, диполи излучения красителя, связанного с Цис 374 субдомена-1 актина, располагаются преимущественно вдоль мышечного волокна (Kakol et al., 1987). Оказалось, что присоединение S1 увеличивает угол наклона флуоресцентной метки Φ_E с $49,2^\circ$ до $55,6^\circ$. (на 13%, рис. 2, 1А) и уменьшает подвижность метки с 0,518 до 0,478 отн. ед., т.е. почти на 8% (рис. 2, 1Б). Нуклеотиды MgADP и MgATP в отсутствие Cap изменяют подвижность и пространственное расположение зондов при моделировании, соответственно, сильной и слабой форм связывания S1 с актином, что указывает на изменение конформационных состояний этого участка белка. В сильной форме связывания (состояние A • M • ADP) угол Φ_E заметно не меняется (рис. 2, 1А), но увеличивается подвижность метки (величина N возрастает на 4%). Наоборот, при моделировании слабой формы связывания (A • M • ADP • Pi) угол Φ_E уменьшается, а подвижность флуорофора еще больше возрастает и уже не отличается от величины N , характерной для теневого волокна в отсутствие S1 (рис. 2, 1Б).

На основании полученных данных можно предположить, что S1, связываясь с Ф-актином теневого волокна, поворачивает субдомен-1 актина в направлении периферии тонкой нити, ограничивая его вращательные и колебательные движения. Переход от сильносвязанного состояния к слабосвязанному сопровождается, наоборот, вращением субдомена-1 к центру нити и восстановлению свободы движения С-концевого участка актина.

ТАБЛИЦА 2. Влияние Cap на поляризованную флуоресценцию 1,5-IAEDANS, связанного с Цис- 374 субдомена-1 актина в реконструированном мышечном волокне в отсутствие и в присутствии S1 и нуклеотидов MgADP и MgATP

Нуклеотиды	n	S1	Cap	$P_{\parallel} \pm SEM$	$P_{\perp} \pm SEM$
-	17	-	-	$0,285 \pm 0,001$	$0,187 \pm 0,001$
-	7	-	+	$0,264 \pm 0,003$	$0,222^{**} \pm 0,003$
-	7	+	-	$0,179^* \pm 0,007$	$0,279^{***} \pm 0,003$
	7	+	+	$0,215 \pm 0,003$	$0,280^{***} \pm 0,002$
MgADP	7	+	-	$0,188^* \pm 0,007$	$0,278^{***} \pm 0,003$
	6	+	+	$0,223 \pm 0,003$	$0,276^{***} \pm 0,002$
MgATP	6	+	-	$0,252 \pm 0,003$	$0,224^{**} \pm 0,002$
	6	+	+	$0,239 \pm 0,003$	$0,229 \pm 0,001$

Обозначения : n – количество исследованных теневых волокон; P_{\parallel} и P_{\perp} – степени поляризации флуоресценции при ориентации волокон параллельно и перпендикулярно плоскости поляризации возбуждающего света, соответственно. *, **, *** – одной (двумя, тремя) звёздочками отмечены средние, разность между которыми недостоверна. Для остальных сравнений $\beta > 0.95$

Поскольку известно, что образование сильной формы связывания сопровождается "включением" мономеров актина в тонких нитях, можно предположить, что уменьшение величины Φ_E и увеличение значения параметра N могут отражать уменьшение относительного количества "включенных" мономеров актина в тонких нитях.

Присоединение Сар к Φ -актину вызывает заметные изменения конформации Φ -актина. На это указывают изменения параметров Φ_E и N (рис. 2). Значение параметра Φ_E увеличивается с $49,2^\circ$ до $51,0^\circ$ (на 4%, рис. 2, 1А), а величина N возрастает с 0,518 отн. ед. до 0,534 отн. ед. (на 3%, рис. 2, 1Б). Сар инициирует конформационные изменения актина, противоположные тем, что вызываются головкой миозина.

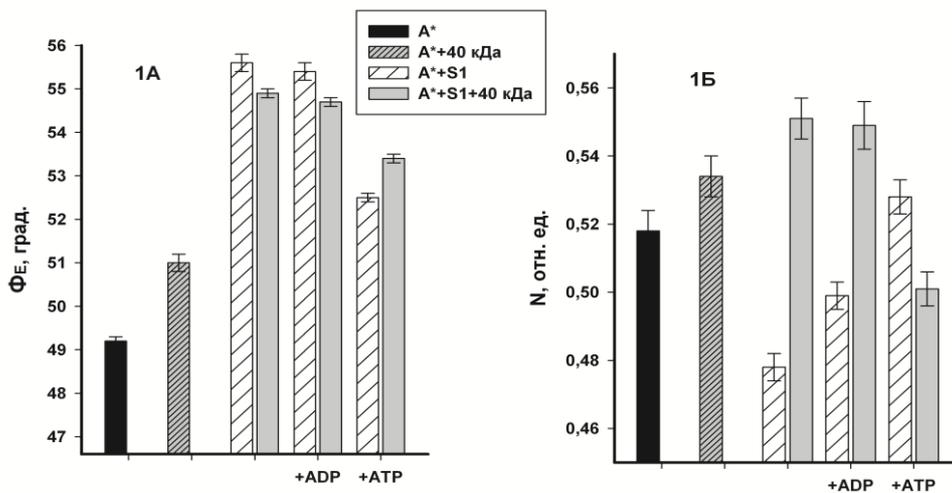


Рис. 2. Влияние Сар (40 кДа) на ориентацию Φ_E (1А) и подвижность N субдомена-1 актина, меченного 1,5-IAEDANS (A^*) (1Б) в отсутствие и в присутствии $S1$ и нуклеотидов MgADP и MgATP

Действительно, после связывания этого белка с тонкой нитью угол ориентации осциллятора Φ_E уменьшается с $55,6^\circ$ до $54,9^\circ$, при этом подвижность N субдомена-1 актина увеличивается с 0,478 до 0,551 отн. ед. (на 15%). Следовательно, в присутствии Сар субдомен-1 актина отклоняется к центру тонкой нити, имея при этом существенно увеличенную подвижность С-концевого участка актина, что характерно для более слабой формы связывания актомиозина (Chalovich et al., 1983), в то время как $S1$ поворачивал этот участок к периферии тонкой нити. Похожая закономерность обнаруживается при моделировании стадии ($A \cdot M \cdot \text{ADP}$) в присутствии Сар . Таким образом, влияние Сар на формирование сильных форм связывания $A \cdot M$ и $A \cdot M \cdot \text{ADP}$ актомиозина выражается в уменьшении относительного количества "включенных" мономеров актина в тонких нитях. В присутствии MgATP угол ориентации зонда увеличивается примерно на 2% (рис. 2,1А) и существенно ограничивается подвижность (параметр N снижается больше, чем на 5% (рис. 2,1Б). По-видимому, в этих экспериментальных условиях Сар вызывает вращение субдомена-1 актина в направлении периферии тонкой нити и уменьшает свободу движения С-конца актинового мономера.

Чтобы исследовать влияние Cap на гибкость тонкой нити, в работе использовали флуоресцентную метку ФИТЦ-фаллоидин, специфически связывающуюся с соседними мономерами актина в тонкой нити. Результаты этих экспериментов сведены в табл. 3 и рис. 3. Поскольку ФИТЦ-фаллоидин прочно связывается с соседними мономерами актина и располагается в бороздке, образованной актиновыми мономерами (Lorenz et al., 1993), изменения в ориентации красителя можно рассматривать как изменения в ориентации связанной группы мономеров актина и гибкости тонкой нити (Borovikov et al., 2004).

ТАБЛИЦА 3. Влияние Cap на поляризованную флуоресценцию ФИТЦ-фаллоидина, которым метили тонкие нити теневого мышечного волокна, в отсутствие и присутствии S1 и нуклеотидов MgADP и MgATP.

Нуклеотиды	n	S1	Cap	$P_{\parallel} \pm \text{SEM}$	$P_{\perp} \pm \text{SEM}$
-	11	-	-	$0,370^* \pm 0,003$	$0,154^{***} \pm 0,004$
-	11	-	+	$0,365^* \pm 0,002$	$0,129 \pm 0,003$
-	8	+	-	$0,371^* \pm 0,001$	$0,101 \pm 0,002$
	11	+	+	$0,335^{**} \pm 0,002$	$0,135^{****} \pm 0,002$
MgADP	8	+	-	$0,315 \pm 0,002$	$0,136^{****} \pm 0,001$
	11	+	+	$0,335^{**} \pm 0,001$	$0,148 \pm 0,001$
MgATP	8	+	-	$0,370^* \pm 0,002$	$0,144 \pm 0,001$
	11	+	+	$0,332^{**} \pm 0,001$	$0,151^{***} \pm 0,002$

Обозначения: n – количество исследованных теневых волокон; P_{\parallel} и P_{\perp} – степени поляризации флуоресценции при ориентации волокон параллельно и перпендикулярно плоскости поляризации возбуждающего света, соответственно. *, **, ***, **** – одной (двумя, тремя, четырьмя) звёздочками отмечены средние, разность между которыми недостоверна.. Для остальных сравнений $\beta > 0.95$

Как следует из табл. 3, в отсутствие нуклеотидов и Cap диполи излучения красителя, локализованные в центральной области актиновой нити, располагаются преимущественно вдоль оси мышечного волокна.

Для того чтобы получить более полную картину характера распределения зондов в волокне и оценить гибкость тонких нитей, поляризованную флуоресценцию мышечного волокна анализировали с помощью модель-зависимого метода. Анализ полученных данных показал, что угол Φ_E , образуемый флуоресцентным зондом и осью волокна, приближается к $47,4^\circ$ (рис. 3, 2А), а значение $\Theta_{1/2}$ тонкой нити достигало $7,6^\circ$ (рис. 3, 2Б).

Присоединение S1 к актиновой нити увеличивает угол наклона флуоресцентной метки Φ_E с $47,4^\circ$ до $48,8^\circ$ (т.е. почти на 3%, рис. 3, 2А), при этом гибкость нити достоверно не меняется (рис. 3, 2Б). Ранее предположили, что изменение ориентации ФИТЦ-фаллоидина отражает, скорее всего, вращение мономеров актина относительно оси мышечного волокна. При этом вращение

мономеров актина к периферии тонкой нити указывает на их "включение" (Nowak et al., 1989; Nowak et al., 1991; Вихорев и др., 2000; Borovikov et al., 2001; Borovikov et al., 2004). Следовательно, присоединение S1 к актину увеличивает относительное количество "включенных" мономеров актина в тонких нитях. Как следует из данных рис. 3, 2А, MgADP вызывает достоверное увеличение угла Φ_E , при этом гибкость нити немного возрастает (рис. 3, 2Б).

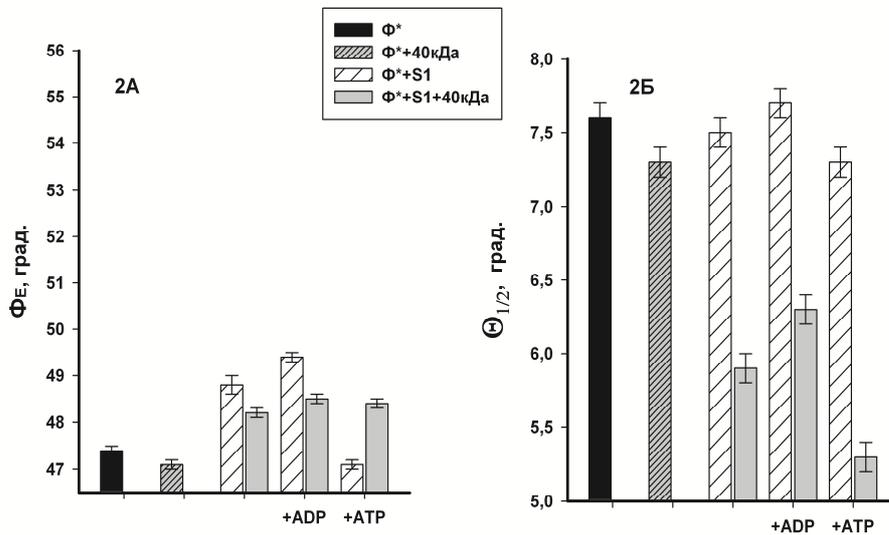


Рис. 3. Влияние Cap (40 кДа) на ориентацию Φ_E ФИТЦ-фаллоидина (Φ^*) (2А) и гибкость Φ -актина ($\Theta_{1/2}$) (2Б) в реконструированных тонких нитях теневого мышечного волокна в отсутствие и в присутствии S1 и нуклеотидов MgADP и MgATP.

Переход миозиновой головки в слабую форму связывания с актином под действием MgATP вызывает, наоборот, уменьшение угла Φ_E с $49,4^\circ$ до $47,1^\circ$ (почти на 5%), а угол $\Theta_{1/2}$ незначительно, но достоверно уменьшается с $7,7^\circ$ до $7,3^\circ$ (рис. 3, 2А и 2Б). Присоединение Cap к тонким нитям вызывает достоверное уменьшение угла Φ_E (с $47,4^\circ$ до $47,1^\circ$; рис. 3, 2А) и небольшое, но достоверное снижение угла $\Theta_{1/2}$ (рис. 3, 2Б). Следовательно, присоединение Cap к актиновой нити, по-видимому, вызывает такие конформационные изменения в Φ -актине, которые сопровождаются вращением группы мономеров актина к центру тонкой нити, делая нить более жесткой и "выключая" мономеры актина. Декорирование тонких нитей одновременно S1 и Cap уменьшает значение угла Φ_E с $48,9$ до $48,2^\circ$ (рис. 3, 2А), при этом значение угла $\Theta_{1/2}$ снижается на 20% (рис. 3, 2Б), если сравнивать его со значениями в отсутствие S1, указывая на "выключение" мономеров актина и еще большее возрастание жесткости нити. В присутствии Cap MgADP увеличивает угол Φ_E , но в меньшей степени, чем это делает S1 в отсутствие этого белка, и достоверно повышает гибкость нити (в сравнении с условиями, когда нуклеотид отсутствует; рис. 3, 2Б), то есть способствует "включению" мономеров актина. Переход актомиозина в слабую форму связывания при добавлении MgATP не меняет расположения флуоресцентной метки в сравнении с предыдущим состоянием (в присутствии MgADP). Иными словами, Cap может модулировать структурное состояние актиновых нитей в

цикле гидролиза АТР, изменяя в тонких нитях соотношение "включенных" и "выключенных" мономеров актина.

Суммируя вышесказанное, можно сказать, что Сар инициирует такие конформации актина, которые сопровождаются изменением количества «включенных» мономеров актина при прохождении цикла гидролиза АТР. При этом Сар уменьшает амплитуду вращения субдомена-1 актина при переходе от слабой формы связывания актомиозина к сильной её форме, "выключая" при этом актиновые мономеры, и делает нить более жесткой.

3. Подвижность и расположение Сар на тонких нитях теневого мышечного волокна при моделировании различных стадий цикла гидролиза АТР

(Сиренко и др. ,2012)

Были исследованы также подвижность и расположение белка Сар на тонких нитях теневого мышечного волокна при моделировании различных стадий цикла гидролиза АТР. Для этого использовали Сар, меченный акрилоданом.

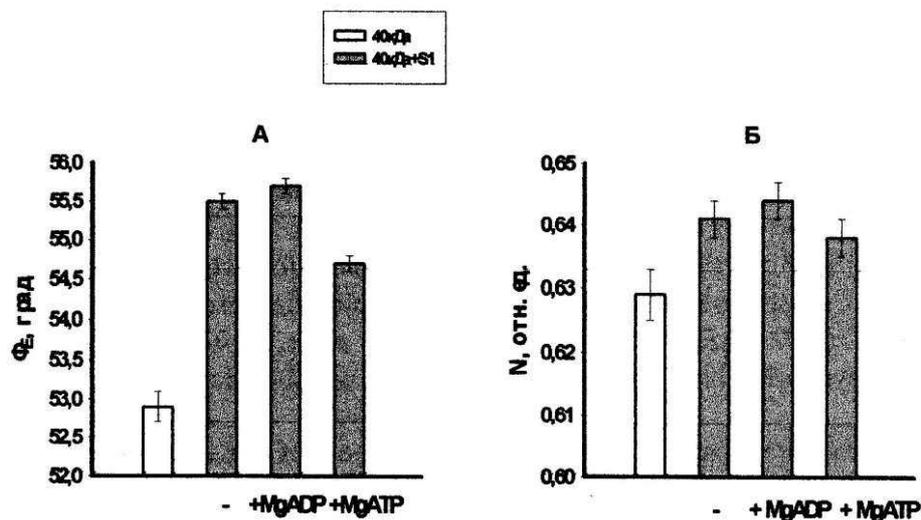


Рис. 4. Влияние различных состояний актомиозинового комплекса, моделируемых нуклеотидами MgADP и MgATP, на ориентацию Φ_E (А) и подвижность N (Б) белка Сар (40кДа), меченного акрилоданом, в теновом мышечном волокне.

Декорирование тонких нитей теневого мышечного волокна белком Сар, меченным акрилоданом, вызывает появление поляризованной флуоресценции теневого волокна (рис. 4 и табл. 4). Поскольку степень поляризации P_{\perp} ($0,353 \pm 0,002$) была выше, чем P_{\parallel} ($0,336 \pm 0,003$), можно было предположить, что оси диполей излучения флуорофоров ориентированы преимущественно перпендикулярно оси волокна, в то время как этот белок располагается параллельно мышечному волокну, либо диполи расположены параллельно молекуле Сар, но сам он присоединяется к тонким нитям преимущественно перпендикулярно. По аналогии с кальпонином может показаться, что и Сар, связываясь с тонкой нитью в сравнимых экспериментальных условиях, также

будет связываться перпендикулярно актиновому филаменту. Но в дальнейшем, при исследовании коседиментации Cap с актином стало ясно, что Cap располагается параллельно актиновой нити, и тогда надо признать, что флуоресцентная метка располагается перпендикулярно мышечной оси.

ТАБЛИЦА 4. Влияние S1 и нуклеотидов MgADP и MgATP на поляризованную флуоресценцию Cap , меченного акрилоданом.

Нуклеотиды	S1	Cap^{\otimes}	$P_{\parallel} \pm \text{SEM}$	$P_{\perp} \pm \text{SEM}$
-	-	+	$0,336^{*} \pm 0,003$	$0,353 \pm 0,002$
-	+	+	$0,328^{*} \pm 0,003$	$0,384^{**} \pm 0,003$
MgADP	+	+	$0,331^{*} \pm 0,002$	$0,386^{**} \pm 0,002$
MgATP	+	+	$0,330^{*} \pm 0,003$	$0,376 \pm 0,002$

Обозначения: S1 – субфрагмент-1 миозина; Cap^{\otimes} – кальпониноподобный белок мидии, меченный акрилоданом; P_{\parallel} и P_{\perp} – степени поляризации флуоресценции при ориентации волокон параллельно и перпендикулярно плоскости поляризации возбуждающего света, соответственно. Данные получены на 8-10 теневых волокнах. *, ** – одной (двумя) звездочками отмечены средние, разность между которыми недостоверна. Для остальных сравнений $\beta > 0.95$

Как следует из рис. (4, А), в отсутствие S1 угол Φ_E между флуоресцентным зондом, прикрепленным к Cap , и осью Φ -актина равен 52.9° , тогда как относительное количество хаотически расположенных флуорофоров N достигает 63%. Оказалось, что декорирование тонких нитей, содержащих Cap , субфрагментом 1 приводит к возрастанию N (рис. 4, Б) и увеличению угла Φ_E с $52,9^\circ$ до $55,5^\circ$ (на 5%) (рис. 4, А), что можно расценивать как свидетельство смещения Cap на актиновых нитях мышечного волокна. При этом сродство Cap к актину, по-видимому, несколько уменьшается, что следует из увеличения числа N . Поскольку изменения угла наклона зондов, связанных с миозиновой головкой (от $42,5^\circ$ до $44,7^\circ$) и с Cap (от $52,9^\circ$ до $55,5^\circ$) являются однонаправленными и количественно равными, можно предположить, что S1 в отсутствие нуклеотидов подвергается смещению (или вращению) к периферии тонкой нити под действием Cap . При этом именно Cap играет активную роль в смещении миозиновой головки, а последняя лишь перемещается вслед за Cap . Такие данные позволяют предположить, что Cap , как и h1, конкурирует с головкой миозина за сайт сильного связывания на актине. Изменения конформации актомиозинового комплекса в процессе моделирования АТФазного цикла, вызванные нуклеотидами MgADP и MgATP, оказывают влияние на поляризационные параметры P_{\parallel} , P_{\perp} , Φ_E и N акрилодана. Так, MgADP увеличивал Φ_E до $55,7^\circ$, а MgATP уменьшал этот угол до $54,7^\circ$ (рис. 4, А). Интересно отметить, что в присутствии MgATP значения Φ_E стремятся к величине, характерной для тонких нитей, содержащих Cap , и не декорированных субфрагментом-1 миозина. Это может свидетельствовать о том, что слабая форма связывания актина с миозином, по-видимому, позволяет Cap

частично восстановить свою позицию на актине, смещаясь (или поворачиваясь) ближе к центру тонкой нити.

Таким образом, обобщая данные, рассмотренные в этой части, можно констатировать, что Сар, связываясь с актиновой нитью, располагается вдоль неё и, возможно, конкурирует с S1 за участок сильного связывания головки миозина на актине, как и гладкомышечный кальпонин.

4. Параметры связывания Сар с Ф-актином *in vitro*.

Результаты по связыванию *in vitro* Сар с Ф-актином представлены на рис. 5. Из результатов следует, что Сар имеет только один класс связывающих сайтов с актином с константой диссоциации, равной $1,8 \times 10^{-7}$ М (или константой ассоциации, равной $5,6 \times 10^6$ М⁻¹). Для сравнения, константы ассоциации h1 с актином лежат в интервале между 10^6 и 10^7 М⁻¹ (Winder et al., 1991; Nakamura et al., 1993). Таким образом, Сар связывается с актином с такой же аффинностью, как и h1. Из максимального значения связывания ($B_{\max} = 4,73$ нмоль / мг актина) следует, что стехиометрическое соотношение между Сар и актином соответствует 1 к 5. Для сравнения, стехиометрия связывания h1 с актином, по данным из доступной литературы, представляет собой большой разброс: от 1 к 1 (Makuch et al., 1991) до 1 к 10 (Nishida et al., 1990).

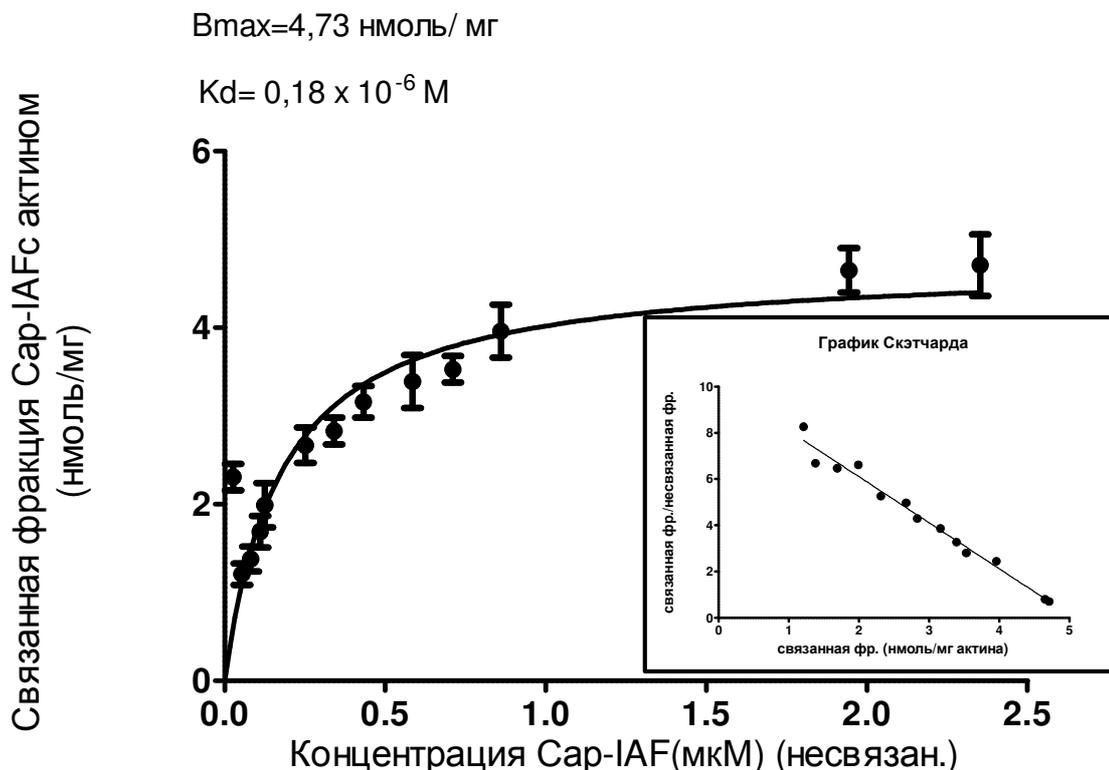


Рис. 5. Связывание Сар-IAF с Ф-актином.

5. Ингибирующее влияние Сар на АТФазную активность акто-S1. (Сиренко и др., 2014)

Влияние Сар на активность АТФазы акто-S1 выражали в процентах от ее активности, измеренной в отсутствие этого белка, и определяли при разных соотношениях Сар к актину. Сар снижает активность АТФазы S1 по мере увеличения своего отношения к актину и достигает максимального ингибирования при соотношении 1 к 2 (рис. 6). При таком соотношении ингибирование достигает 80%, т.е. составляет 20% от исходной активности. Сравнивая эти результаты с теми, что получены ранее другими авторами в отношении ингибирования АТФазы миозина h1 в условиях, сравнимых с нашими, можно сказать, в целом, что они очень похожи. Так, в работе (Horiuchi and Chacko, 1991) ингибирование h1 при соотношении его с актином 1 : 2 составляло около 90%.

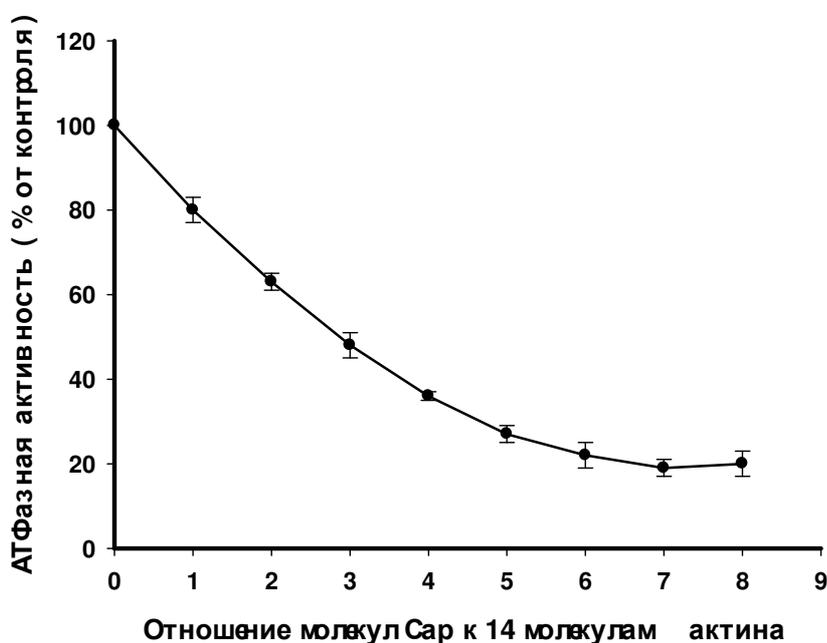


Рис. 6. Ингибирование белком Сар АТФазы акто-S1.

Сравнение с этими данными позволяет считать, что Сар так же эффективно ингибирует АТФазную активность миозина, как и h1. Более того, наличие ингибирующей АТФазу активности у Сар убеждает в том, что у h1 такое ингибирование – не курьез природы, а важное свойство, физиологическое значение которого до сих пор не выяснено.

6. Определение механизма ингибирования белком Сар актин-миозинового взаимодействия по значению параметров V_{max} и K_{ATPase}

АТФазную активность акто-S1 измеряли при возрастающих концентрациях скелетномышечного Ф-актина в отсутствие (контроль) и в присутствии насыщающих концентраций Сар или Тм. На рис. 7 представлены эти результаты в виде кривой насыщения. Из графика на рис. 7 следует, что при увеличении концентрации актина скорость АТФазной реакции возрастает в меньшей степени,

чем в контроле, при исследованных концентрациях $S_{ар}$ или T_m . Мы считаем уместным здесь использовать термины, описывающие ферментативные реакции. Так, согласно аллостерическо-кооперативной гипотезе применительно к регуляции актомиозиновой АТФазы актин рассматривается как фермент, а белково-нуклеотидный комплекс, например, $S1 \cdot ATP$ – как субстрат (Lehrer and Geeves, 1998). Белки, связывающиеся с актином и ингибирующие фермент, как например $S_{ар}$, могут рассматриваться как ингибиторы. На первый взгляд может показаться, что скорость АТФазной активности нужно было определять в зависимости от увеличивающейся концентрации АТФ. Но особенность данной «ферментативной» системы заключается в том, что скорость выделения P_i зависит не от концентрации АТФ, а от концентрации актина, поэтому и константа K_m заменяется на K_{ATPase} . И применение кинетических констант для характеристики влияния $S_{ар}$ и T_m на АТФазную активность оправдано тем, что здесь они отражают кинетику присоединения $S1$ к Φ -актину.

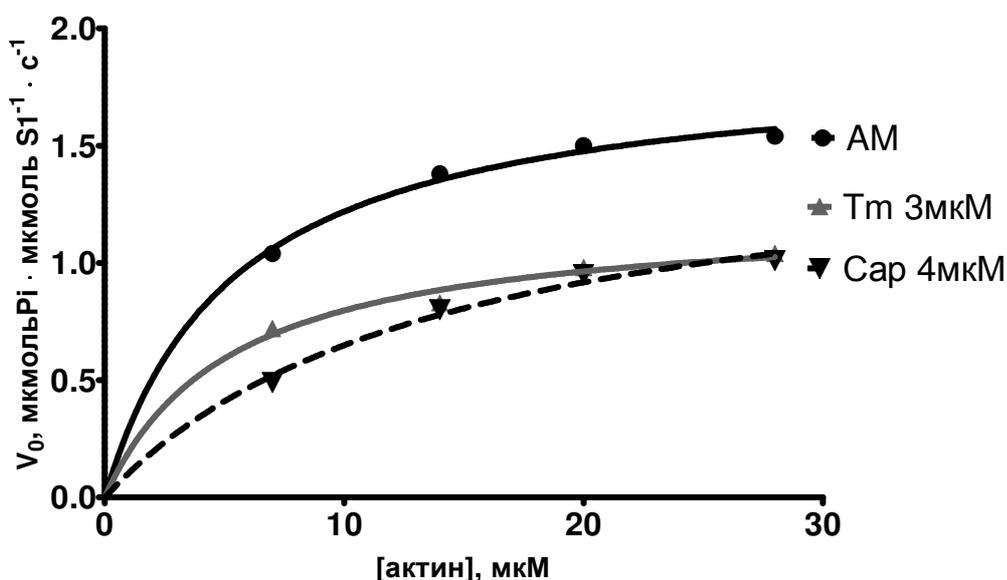


Рис. 7. Зависимость скорости высвобождения P_i в АТФазном цикле от концентрации актина в присутствии насыщающих концентраций T_m и $S_{ар}$. T_m – тропомиозин, $S_{ар}$ – кальпониноподобный белок мидии, AM – акто-S1. Условия: Исследование проводили при $25^\circ C$ в растворе, содержащем 12 мМ Tris-HCl ($pH\ 6,0$), 5 мМ MgCl_2 , 5 мМ KCl , $0,4\text{ мМ CaCl}_2$, 2 мМ DTT и $2,5\text{ мМ ATP}$. Концентрация $S1$ составляла $0,5\text{ мкМ}$. Реакцию запускали добавлением ATP и останавливали через 10 мин . В этом временном интервале зависимость скорости высвобождения фосфата от времени была линейной.

Для того чтобы нагляднее продемонстрировать изменения скорости гидролиза и константы K_{ATPase} , данные, представленные на рис. 7, можно представить в виде двойных обратных величин по Лайнуиверу-Берку (Lineweaver and Burk, 1934). Такой график представлен на рис. 8. Здесь наклон графика равен

K_{ATPase} / V_{max} , он пересекает ось "y" в точке, со значением $1 / V_{max}$, а ось "x" — в точке, со значением $-1 / K_{ATPase}$. Из данных рис.8 следует, что добавление в исследуемую среду насыщающей концентрации Ca_p вызывает повышение наклона графика, что говорит об увеличении K_{ATPase} . Значение K_{ATPase} под воздействием Ca_p увеличивается в 2,5 раза (с $5,36 \pm 0,78$ до $14,19 \pm 1,44$ с достоверностью $\beta > 0,99$), а значение V_{max} уменьшается с $1,87 \pm 0,07$ до $1,57 \pm 0,08$, хотя эта разность оказалась и недостоверной. Из этого следует, что Ca_p ингибирует акто-S1 АТФазу, воздействуя в первую очередь на актомиозиновое взаимодействие.

Увеличение концентрации T_m при низкой концентрации S1 ингибирует АТФазную активность актомиозина. Мы сравнили между собой характер ингибирования актомиозиновой АТФазы тропомиозином и Ca_p в насыщающих концентрациях. Мы определили скорость высвобождения неорганического фосфата в АТФазной реакции в присутствии насыщающей концентрации T_m и сравнили с результатами такой же реакции в присутствии Ca_p (рис.8).

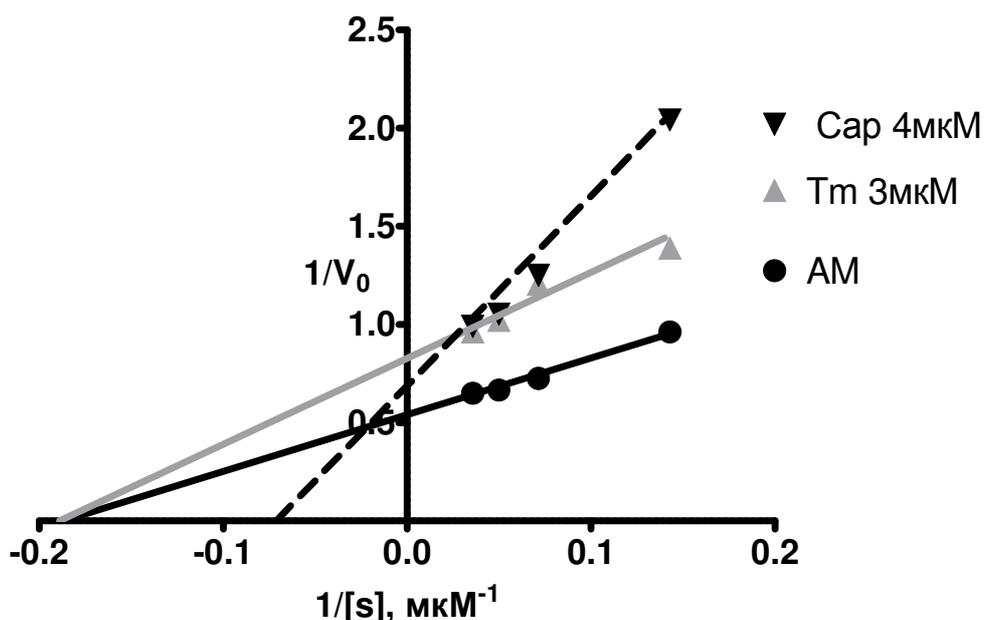


Рис. 8. График двойных обратных величин, демонстрирующий влияние Ca_p и T_m на кинетические параметры V_{max} и K_{ATPase} АТФазной активности акто-S1. Для AM – $V_{max} = 1,87 \pm 0,07$, $K_{ATPase} = 5,36 \pm 0,78$; для T_m (3мкМ) – $V_{max} = 1,22 \pm 0,09$, $K_{ATPase} = 5,28 \pm 1,48$; для Ca_p (4мкМ) – $V_{max} = 1,57 \pm 0,08$, $K_{ATPase} = 14,19 \pm 1,44$.

Из данных рис. 8 следует, что, ингибирование тропомиозином происходит по неконкурентному типу, для которого характерно такое же значение K_{ATPase} , как и для AM (в данном случае $K_{ATPase} = 5,28$ и $5,36$, соответственно, и уменьшение значения V_{max} с $1,87$ до $1,22$ (достоверное уменьшение в 1,5 раза, $\beta > 0,99$)). Сравнение этих данных с кинетическими параметрами для Ca_p на рис.8 наглядно демонстрирует разницу между неконкурентным типом ингибирования

тропомиозином и конкурентным типом для Сар. Уменьшение скорости гидролиза под влиянием Тм означает, что Тм влияет на каталитический шаг актин-активируемого гидролиза АТФ, а не на актин-миозиновое взаимодействие.

Если подвести краткий итог последнему разделу, можно сказать, что расчет кинетических параметров АТФазной активности актомиозина в условиях связанного с актином Сар, показал, что последний ингибирует эту активность по конкурентному типу, для которого характерно увеличение K_{ATPase} и небольшое уменьшение V_{max} . Ингибирование тропомиозином происходит по неконкурентному типу, для которого характерно неизменное значение K_{ATPase} и уменьшение значения V_{max} .

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Теперь можно вернуться к сравнению механизмов ингибирования АТФазной активности h1 и Сар, так как определение такого механизма у представителя беспозвоночных, безусловно обогатило экспериментальным материалом традиционный раздел цитологии (мышечную биологию). Известно, что h1 уменьшает в основном V_{max} АТФазы и немного K_{ATPase} , причем Тм не влияет на значение K_{ATPase} (Horiuchi and Chako, 1991). Другими словами, h1 не влияет на актомиозиновое взаимодействие, а тормозит изомеризацию головки миозина, что приводит к снижению скорости гидролиза. Сар влияет на эти кинетические параметры противоположным образом: существенно увеличивает K_{ATPase} и незначительно уменьшает значение V_{max} . То есть, Сар препятствует в основном взаимодействию актомиозина, но слабо влияет на ферментативную активность головки миозина. Мы предполагаем, что отсутствие ингибирующего АТФазу гексапептида VKYAEK в последовательности Сар и его присутствие в h1 и определяет существенное различие в механизмах ингибирования актомиозиновой АТФазы. Сравнение этих двух белков по влиянию на поведение флуоресцентных зондов, прикрепленных к актину и S1 в условиях моделирования АТФазного цикла, также выявило различия между ними за исключением того, что оба белка снижают подвижность С-конца субдомена-1 актина и увеличивают мобильность SH₁ группы головки миозина. Это различие между белками в механизмах воздействия на АТФазу миозина контрастирует со сходством в доменной структуре белков и одинаковой эффективностью при ингибировании АТФазы, что является иллюстрацией того, как природа решает одни и те же задачи в разных условиях с помощью аналогичных белков, но различными механизмами. Наличие ингибирующей АТФазу активности у Сар убеждает в том, что присутствие у h1 аналогичной активности является не случайным явлением, а требует еще своего осмысления, несмотря на то, что на сегодняшний день регулирующую роль в гладкомышечном сокращении приписывают исключительно кальдесмону.

ВЫВОДЫ

1. Кальпониноподобный белок, связываясь с актиновой нитью скелетных мышц, располагается вдоль нее и имеет только один класс сайтов связывания с актином (константа диссоциации $1,8 \times 10^{-7}$ М). Максимальное значение связывания $V_{\max} = 4,73$ нмоль/мг актина соответствует стехиометрии 1: 5.
2. Кальпониноподобный белок вызывает конформационные изменения в Ф-актине, сопровождающиеся изменением количества «включенных» мономеров актина при прохождении цикла гидролиза АТФ, что способствует ингибированию. Актиновая нить при этом становится более жесткой.
3. Кальпониноподобный белок переводит головку миозина из состояния, характерного для сильной формы связывания миозина с актином, в состояние слабого взаимодействия, что служит основной причиной ингибирования актомиозиновой АТФазы.
4. Кальпониноподобный белок вызывает максимальное ингибирование АТФазы S1 при соотношении с актином 1 к 2. При таком соотношении ингибирование достигает 80%; таким образом, он действует с такой же эффективностью, как и гладкомышечный кальпонин.
5. Расчет кинетических параметров АТФазной активности акто-S1, в условиях связанного с актином кальпониноподобного белка показал, что последний ингибирует эту активность преимущественно увеличивая K_{ATPase} и незначительно уменьшая значение V_{\max} .
6. Ингибирование АТФазной активности акто-S1 тропомиозином происходит по неконкурентному типу.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Сиренко В.В.**, Симонян А.О., Добржанская А.В., Шелудько Н.С., Боровиков Ю.С. (2012) 40 кДа-белок тонких нитей мидии ингибирует формирование сильных форм связывания миозина с актином в цикле гидролиза АТФ. *Биохимия* **77 (8)**: 1080–1088.
2. **Сиренко В.В.**, Симонян А.О., Добржанская А.В., Шелудько Н.С., Боровиков Ю.С. (2013) 40 кДа-белок тонких нитей мидии изменяет конформацию Ф-актина в АТФазном цикле. *Биохимия* **78 (3)**: 364–374.
3. **Сиренко В.В.**, Симонян А.О., Добржанская А.В., Шелудько Н.С., Боровиков Ю.С. (2014) Модуляция конформации субфрагмента-1 миозина (S-1) и ингибирование S-1-АТФазы кальпонином мидии. *Цитология* **56 (10)**: 763–769.
4. **Sirenko V.V.**, Simonyan A.H., Dobrzhanskaya A.V., Shelud'ko N.S., Borovikov Y.S. (2011) Calponin-like protein inhibits the rotation of SH1 myosin and actin subdomain-1 and alters their mobility during the ATP hydrolysis cycle *in Abstracts of XXXX European Muscle Conference, Berlin, Germany J. Muscle Res. Cell Motil.* **32** : 364.
5. **Сиренко В.В.**, Симонян А.О., Добржанская А.В., Шелудько Н.С., Боровиков Ю.С. (2012) Влияние кальпонино-подобного 40 кДа белка мидии на конформационные изменения F-актина в цикле гидролиза АТФ в материалах докладов IV съезда биофизиков России, Нижний Новгород, стр. 270.
6. Симонян А.О., Крутецкая З.И., Добржанская А.В., Шелудько Н.С., **Сиренко В.В.**, Боровиков Ю.С. (2012) Новый белок из тонких нитей запирательной мышцы

Мидии Грея. В материалах докладов 16 Международной Пушинской школы-конференции молодых ученых "Биология наука XXI века", Пушино, Россия, 30 июля – 3 августа. Пушинский издательский центр РАН, стр.74.

7. **Sirenko V.V., Dobrzhanskaya A.V.** (2014) The molecular basis of regulation of actin-myosin interaction by calponin from the mussel *Crenomytilus grayanus* during the ATPase cycle in *Abstracts of the International Symposium "Biological motility: new facts and hypotheses"*, Pushchino, Russia, 268–269.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Вихорев П.Г., и др.,(2000) *Цитология* **42(5)**: 444-453.–Добржанская А.В., и др.,(2010) *Биофизика* **55(5)** : 785-789.–Иванов И.И. и Юрьев В.А.(1961) Биохимия и патобиохимия мышц, с. 275.–Июффе В.А. и др.,(1974) *Цитология* **16**:112-116.–Пронина О.Е. и др.,(2005) *Биохимия* **70(10)**: 1382-1388.–Alahyan M. et al.,(2006) *J.Biol.Chem.***281**:19433-19448.–Andreev O.A. et al.,(1995) *J.Muscle Res. Cell Motil.***16**:353-367. –Borejdo J. and Putnam S.(1977) *BBA* **459**: 578-595. –Borejdo J.et al., (2002) *Biophys.J.***82**:3150 -3159.–Borovikov Y.S. et al.,(1996a) *Biochem.* **35**:13849-13857.–Borovikov Y.S. et al., (2001) *Int. J.Biochem.Cell Biol.***33**:1151-1159.–Borovikov Y. S. et al., (2004) *Biophys. J.* **86**:3020-3029.–Borovikov Y. S. et al., (1991) *Gen.Physiol.Biophys.***10**:441-459.–Borovikov Y. S. et al.,(1993) *BBA* **1163**: 280-286.–Borovikov Y S. et al.,(1996b) *BBRC* **223**:240-244.–Bradford M. M.(1976) *Anal. Biochem.***72**:248-254.–Chalovich J. M. et al.,(1983) *PNAS USA* **80**:4909-4913.–Childs T.J. et al.,(1992) *BBA* **1121**: 41-46.–Cooke R.(1997) *Physiol.Rev.* **77**:671-697.–Dobrzhanskaya A. V. et al., (2013) *J.Muscle Res.Cell Motil.* **34**:23-33.–El-Mezgueldi M.(1996) *Int. J. Biochem.Cell Biol.***28**:1185-1189.–El-Mezgueldi M. and Marston S. B.(1996) *JBC* **271**:28161- 28167.–Fiske C. H. and Subbarow Y.(1925) *JBC* **66**: 375-400.–Geeves M.A., and Halsall D.J.(1987) *Biophys. J.*, **52**, 215–220.–Gusev N. B.(2001) *Biochem.(Mosc)* **66** :1112-1121.–Gusev N. B. et al.,(1991) *Biokhimiia* **56** :1347-1368.–Horiuchi K. Y. and Chacko S.(1991) *BBRC* **176** : 1487-1493.–Ip W. and Fellows M. E.(1990) *Anal. Biochem.***185**:10-16.–Kakol I. et al.,(1987) *BBA* **913**:1-9.–Khalil R. A. and Morgan K.G.(1993) *Am. J.Physiol.Cell Physiol.***265**:C406–C411.–Kim H. R. et al.,(2008) *J.Cell.Mol.Med.***12**: 2165-2180.–Laemmli U. K.(1970) *Nature* **227**:680-685.–Lehrer S.S and Geeves M. A.(1998) *JMB.* **277**:1081-1089.–Lineweaver B.D. and Burk (1934) *J.Am.Chem.Soc.***56**:658-666.–Lorenz M. et al.,(1993) *JMB* **234**:826-836.–Makuch R. et al., (1991) *Biochem. J.***280**:33-38.–Marston and Huber (1996) In: *Biochemistry of smooth muscle contraction* pp. 77-90.–Marston and Lehman (1985) *Biochem. J.* **231**: 517-522.–Miki M. et al.,(1987) *Eur. J.Biochem.***168**:339-345.–Morgan K. G. and Gangopadhyay S.S.(2001) *J. Appl.Physiol.***91**:953-962.–Nakamura F. et al.,(1993) *JBC* **268**: 6194-6201.–Nichei T. et al.,(1974) *Biophys. J.***14**: 236-242.–Nishida W. et al., (1990) *FEBS Lett.* **268**:165-168.–Nowak E. et al.,(1991) *FEBS Lett.* **281**:51-54.–Nowak E. et al.,(1989) *BBA* **999**: 289-292.–Okamoto Y. and Sekine T.(1985) *JBC* **98**:1143-1145.–Pardee J.D. and Spudich J.A.(1982) *Methods Enzymol.* **85**:164-181.–Potter J. D.(1982) *Methods Enzymol.* **85**:241-263.–Pronina O. E. et al.,(2007) *Cell Biol.Int.***31**:394-404.–Shirinsky V.P. et al., (1992) *JBC* **267**:15886-15892.–Smillie L. B.(1982) *Methods Enzymol.* **85**:234-241.–Szent-Györgyi A.G.(1949) *Biol.Bull.***96**:140-161.–Szpacenko et al.,(1985) *FEBS Lett.***192**: 9-12.–Takahashi K. et al.,(1988a) *J. Hypertens.***6**:S40-S43.–Takahashi K. et al.,(1986) *BBRC* **141**: 20-26.–Tregear R.T. and Mendelson R.A.(1975) *Biophys. J.* **15**: 455-467.–Wills F.L. et al.,(1993) *Biochem.* **32** :2321-2328.–Winder S.J. and Walsh M.P.(1990) *JBC* **265**: 10148-10155.–Winder S.J. et al.,(1991) *Adv.Exp. Med.Biol.* **304**:37-51.