

С-КОНЦЕВЫЕ САЙТЫ КАЛЬДЕСМОНА УПРАВЛЯЮТ ЦИКЛОМ ГИДРОЛИЗА АТФ, СДВИГАЯ ПРОМЕЖУТОЧНЫЕ СОСТОЯНИЯ АКТОМИОЗИНА К СЛАБЫМ ФОРМАМ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МИОЗИНА С АКТИНОМ

© О. Е. Пронина,¹ О. Копеланд,² С. Марстон,² Ю. С. Боровиков^{1,*}

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

и ² Национальный институт сердца и легких, Лондон, Великобритания;

* электронный адрес: boroviko@mail.cytspb.rssi.ru

С помощью метода поляризационной флуориметрии в теневых мышечных волокнах, содержащих тропомиозин, исследовали влияние кальдесмона (CaD) и рекомбинантных пептидов CaDH1 (остатки 506—793), CaDH2 (остатки 683—767), CaDH12 (остатки 506—708), Cg1 (остатки 658—756) и 658C (остатки 658—793) на ориентацию и подвижность флуоресцентного зонда 1.5-IAEDANS, специфически связанного с Cys-707 субфрагмента-1 (S1) миозина в отсутствие нуклеотида и в присутствии MgADP, MgAMP-PNP, MgATPγS или MgATP. Показано, что при моделировании различных промежуточных состояний актомиозина ориентация и подвижность диполей красителя изменяются дискретно, что указывает на многоступенчатое изменение структурного состояния головки миозина в цикле гидролиза АТФ. Максимальные различия в ориентации зонда на 7° и его подвижности на 30 % были обнаружены между актомиозином в присутствии MgATP и MgADP. Актинсвязывающие сайты кальдесмона С и В' ингибируют формирование сильносвязанных состояний актомиозина, тогда как сайт В активирует формирование этих состояний актомиозина. Предполагается, что в цикле гидролиза АТФ взаимодействие миозина с актином инициирует зависимое от нуклеотида вращение моторного домена головки миозина и изменение ее подвижности. С-концевые актинсвязывающие сайты кальдесмона управляют циклом гидролиза АТФ, сдвигая равновесие от сильных к слабым формам связывания миозина с актином.

Ключевые слова: регуляция мышечного сокращения, аналоги АТФ, промежуточные состояния актомиозина, кальдесмон, конформационные изменения субфрагмента-1 миозина, поляризация флуоресценции.

Многочисленные биохимические и механические исследования показали связь между гидролизом АТФ актомиозином и генерацией силы мышц. Кинетические исследования свидетельствуют о том, что в зависимости от связанного нуклеотида и его взаимодействий с актином головка миозиновой молекулы, так называемый субфрагмент-1 (S1), испытывает ряд конформационных изменений в течение АТФазного цикла (Bagshaw, Trentham, 1974; Geeves, 1991). Структурные состояния поперечных мостиков могут быть отнесены к двум группам — к состояниям, характерным для слабой и сильной форм связывания с актином. Группа слабосвязанных с актином состояний характеризуется низким сродством к актину, высокой кинетикой присоединения (отсоединения) головок миозина к актину и не обладает способностью к кооперативному включению регулируемых тонких нитей (Stein et al., 1979; Chalovich et al., 1981). Напротив, группа сильносвязанных состояний поперечного мостика обладает высоким сродством к актину, низкой кинетикой присоединения (отсоединения) миозина к актину и способностью к кооперативному включению регулируемых тонких нитей (Bremel, Weber, 1972; Marston, Weber, 1975; Greene, Eisenberg, 1980a; Marston, 1982). В группу слабосвязанных с актином состояний входят актомиозин · АТФ

(состояние $AM^* \cdot ATP$) и актомиозин · АДФ · Φ_n (состояние $AM^{**} \cdot ADP \cdot P_i$), тогда как в группу сильносвязанных состояний миозина входят актомиозин в отсутствие нуклеотида (состояние $A \cdot M$) и в присутствии MgADP ($AM^{\wedge} \cdot ADP$) (Greene, Eisenberg, 1980b), где А — актин; М, М*, М** и М[^] — промежуточные конформационные состояния миозина (Bagshaw, Trentham, 1974); $\Phi_n(P_i)$ — неорганический фосфат. Считается, что генерация силы происходит при переходе от слабосвязанного состояния поперечных мостиков к сильносвязанному, при этом происходит освобождение P_n и АДФ (Houdusse, Sweeney, 2001).

Кальдесмон играет важную роль в регуляции сокращения гладких мышц, осуществляемой белками тонких нитей (см. обзоры: Chalovich et al., 1998; Marston et al., 1998). Показано, что этот белок кооперативно ингибирует активацию АТФазной активности миозина комплексом актин—тропомиозин в растворе (Sobue et al., 1982; Ngai, Walsh, 1984; Dabrowska et al., 1985; Horiuchi, Chacoko, 1989; Chalovich et al., 1990), движение актиновых филаментов над иммобилизованными молекулами миозина (Shirinsky et al., 1992; Fraser, Marston, 1995), а также напряжение, развиваемое демембранизированными мышечными волокнами (Heubach et al., 1997; Burton, Marston, 1999; Вихорев и др., 2000).

В молекуле кальдесмона выделяют четыре структурных домена. 170 С-концевых аминокислотных остатков (соответствующих домену 4) ответственны за связывание актина и кальмодулина (Sobue et al., 1982; Szpacenko, Dabrowska, 1986; Wang et al., 1991; Redwood, Marston, 1993; Marston et al., 1994; Mornet et al., 1995). Участки связывания тропомиозина идентифицированы в доменах 1, 2 и 4 (Fujii et al., 1987; Katayama et al., 1989; Humphrey et al., 1992; Bogatcheva et al., 1993; Redwood, Marston, 1993). Домены 1, 3 и 4 (остатки 620—793) способны взаимодействовать с миозином (Yamakita et al., 1992; Huber et al., 1993; Vorotnikov et al., 1997).

Области кальдесмона, участвующие в ингибировании АТФазы миозина, активируемой комплексом актин—тропомиозин, детально изучены методами химического расщепления кальдесмона и экспрессии его усеченных мутантных форм. Показано, что ингибиторная способность полностью локализована в домене 4 (Szpacenko, Dabrowska, 1986; Wang et al., 1991; Redwood, Marston, 1993).

Исследования рекомбинантных пептидов, соответствующих различным областям домена 4, показали, что в тропомиозинзависимом ингибировании АТФазной активности актомиозина участвуют так называемые сайт С (остатки 663—683) и сайт В' (остатки 775—781). В противоположность указанным сайтам центральная часть домена 4, которой соответствует рекомбинантный пептид CaDH2 (остатки 683—767), содержит только сайт В (остатки 745—752). Этот пептид усиливает активацию, вызываемую комплексом актин—тропомиозин, т. е. оказывает влияние, противоположное эффекту сайтов С и В' кальдесмона (Marston et al., 1994; Fraser et al., 1997). Рекомбинантные пептиды, соответствующие различным участкам домена 4, имеют общий сайт связывания на актине. Однако пептид CaDH2 (центральная часть домена 4) связывается с актином сравнительно слабо, тогда как пептиды, соответствующие всему домену 4, а также его N- и С-концевым частям, образуют сильное связывание с актином (Fraser et al., 1997). До настоящего времени молекулярные механизмы регуляции актинсвязывающими сайтами кальдесмона АТФазной активности актомиозина изучены недостаточно.

Ранее, используя метод поляризационной флуориметрии, мы показали, что при формировании между F-актином и миозином сильной формы связывания (стадии АМ) мономеры актина переходят в типичное для этой стадии актомиозина «включенное» состояние, и головки миозина приобретают упорядоченную ориентацию в мышечном волокне. В противоположность этому при формировании слабой формы связывания миозина с актином (стадии АМ·АТФ) наблюдается дезориентация головок миозина, и мономеры актина переходят в так называемое выключенное состояние (Vorotnikov et al., 1991). Оказалось, что присоединение кальдесмона к тонким нитям приводит к «замораживанию» структуры актина (Galazkiewicz et al., 1987). Тонкие нити, содержащие кальдесмон, становятся плохо приспособленными для изменения своей конформации под влиянием миозиновых мостиков при переходе глицеринизированного мышечного волокна из расслабленного состояния в ригор или при изометрическом сокращении волокна (Galazkiewicz et al., 1987; Вихорев и др., 2000). Параллельно с ингибированием конформационных перестроек актина в мышечном волокне обнаружено падение напряжения, развиваемого волокнами (Вихорев и др., 2000). Кроме

того, было показано, что в стадии АМ кальдесмон вызывает частичную дезориентацию головок миозина, и это указывает на ослабление связей между миозином и актином в этой стадии цикла гидролиза АТФ (Nowak et al., 1989).

В настоящей работе исследовали влияние кальдесмона и рекомбинантных пептидов CaDH1, CaDH2, CaDH12, Cg1 и 658С на взаимодействие F-актина и S1 миозина при моделировании в теновом мышечном волокне различных промежуточных состояний АТФазного цикла: $A \cdot M$, $A^{\wedge} \cdot M^{\wedge} \cdot ADP$, $A' \cdot M' \cdot APP$, $A^* \cdot M^* \cdot ATP$ и $A^{**} \cdot M^{**} \cdot ADP \cdot P_i$. Эти стадии цикла гидролиза АТФ моделировали при декорировании тонких нитей S1 в отсутствие или в присутствии MgADP, MgAMP-PNP, MgATPγS или MgATP соответственно. Cys-707 S1 миозина модифицировали флуоресцентным зондом 1.5-IAEDANS. Показано, что взаимодействие S1 с F-актином вызывает зависимые от присутствия нуклеотидов конформационные изменения S1 миозина. Кальдесмон и рекомбинантные пептиды модифицируют структурное состояние S1 на всех стадиях цикла гидролиза АТФ.

Материал и методика

Реактивы. Флуоресцентный зонд N-(iodoacetyl)-N'-(5-sulfo-1-naphthyl)ethylenediamine (1.5-IAEDANS) был приобретен в фирме Molecular Probes, Inc. (США). KCl, MgCl₂, CaCl₂, Трис, диметилформамид, EGTA, FITC-фаллоидин, ATPγS, AMP-PNP, ATP и ADP были от фирмы Sigma (США, St. Louis, MO); β-меркаптоэтанол и NaN₃ — от фирм Merck (ФРГ) и Fluka (Швейцария) соответственно.

Получение пептидов и белков. Рекомбинантные пептиды CaDH1 (остатки 506—793), CaDH2 (остатки 683—767), CaDH12 (остатки 506—708), Cg1 (остатки 658—756) и 658С (остатки 658—793) были получены в результате экспрессии кДНК кальдесмона человека в *E. coli*, как описано ранее (Way et al., 1989; Huber et al., 1993; Fraser et al., 1997). S1 миозина получали путем расщепления миозина из скелетных мышц кролика α-химо трипсином (Okamoto, Sekine, 1985). Тропомиозин и кальдесмон были выделены из гладких мышц цыпленка, как описано ранее (Dabrowska et al., 1980; Bretscher, 1984). Модификацию Cys-707 S1 осуществляли по описанной методике (Borejdo, Putnam, 1977). Степень модификации S1 была 0.90—0.95.

Теневые волокна получали из одиночных глицеринизированных мышечных волокон поясничной мышцы (*m. psoas*) кролика, экстрагируя миозин, тропомиозин и тропонин (Vorotnikov, Gusev, 1983).

Связывание тропомиозина, S1, CaD, CaDH1, CaDH2, CaDH12, Cg1 и 658С с F-актином теневых волокон. Взаимодействие F-актина с актинсвязывающими белками происходило при инкубации теневого мышечного волокна с каждым из белков в соответствующем растворе следующего состава: 100 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 1 mM NaN₃, 67 mM Na,K-фосфатного буфера (pH 7.0) и 2—5 мг/мл тропомиозина; 5 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 1 mM NaN₃, 1 mM DTT, 10 mM Трис-HCl (pH 7.0) и 5 мг/мл кальдесмона или рекомбинантных пептидов CaDH1, CaDH12, Cg1, или 658С; 10 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 0.1 mM NaN₃, 1 mM DTT, 20 mM Трис-HCl (pH 7.6) и 2 мг/мл S1. Несвязавшийся белок отмывали инкубацией волокон в соответствующем буферном рас-

творе. Белковый состав реконструированных волокон контролировали методом электрофореза в ПААГ в присутствии ДСН (Laemmli, 1970). Молярные отношения тропомиозина, S1, кальдесмона или рекомбинантного пептида к актину в теневых волокнах были равны 1.0 : 6.5 (± 3), 1 : 5 (± 2), 1 : 7 (± 3) и 1 : 5 (± 3) соответственно.

Измерение параметров поляризованной флуоресценции. Поляризованную флуоресценцию 1.5-IAEDANS возбуждали светом с длиной волны 365 ± 5 нм и регистрировали в диапазоне 480—550 нм. Флуоресценцию измеряли в буфере А, содержащем 10 мМ КСl, 1 мМ MgCl₂, 1 мМ NaN₃, 6.7 мМ Na,К-фосфатного буфера (рН 7.0) и 4 мМ EGTA в отсутствие или в присутствии 2.5 мМ ADP, 15 мМ AMP-PNP, 25 мМ АТРγS или 5 мМ АТР. В отсутствие нуклеотида моделировалась стадия А·М цикла гидролиза АТФ. MgADP, MgAMP-PNP, MgАТРγS и MgАТР использовали для того, чтобы моделировать структурные состояния миозина М[^]·ADP, М'·ADP, М*·АТР и М**·ADP·P_i соответственно (Goody, Hofmann, 1980; Roopnarine, Thomas, 1996).

Измеряли интенсивность четырех компонентов поляризованной флуоресценции: I_{\parallel} , I_{\perp} , I_{\perp} и I_{\parallel} , где индексы слева от I обозначают параллельное (\parallel) или перпендикулярное (\perp) направление поляризации возбуждающего света, а индексы справа от I — параллельное или перпендикулярное направление поляризации флуоресценции зондов относительно оси волокна. Экспериментальные данные анализировали, как описано ранее (Tregear, Mendelson, 1975; Kakol et al., 1987). Используемая математическая модель основывалась на допущении, что осцилляторы флуорофоров располагаются по спирали вдоль образующей поверхности конусов. Соотношения четырех интенсивностей поляризованной флуоресценции $I_{\perp} / I_{\parallel}$, $I_{\perp} / I_{\parallel}$ и $I_{\perp} / I_{\parallel}$ рассматривали как функции углов Φ_A , Φ_E , N , где Φ_A и Φ_E — углы между осью волокна и осцилляторами поглощения и излучения красителя соответственно, N — относительное количество хаотично расположенных флуорофоров.

В рамках описываемой модели Φ_A и Φ_E являются показателями ориентации флуорофоров 1.5-IAEDANS в волокне, тогда как величина N прямо пропорциональна их подвижности (см. обзор: Боровиков, 1998). Поскольку изменения Φ_A были аналогичны изменениям Φ_E , значенность угла Φ_A не приводятся. Статистическую достоверность изменений параметров флуоресценции оценивали с помощью критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Влияние нуклеотидов на поляризованную флуоресценцию комплекса 1.5-IAEDANS—S1. Декорирование тонких нитей теневого волокна S1 миозина, модифицированного 1.5-IAEDANS, вызывает появление поляризованной флуоресценции волокна. В соответствии с ранее опубликованными данными (Borovikov et al., 1991) в отсутствие нуклеотида степени поляризации флуоресценции при ориентации волокна параллельно (P_{\parallel}) и перпендикулярно (P_{\perp}) плоскости поляризации света возбуждения были высокой положительной ($P_{\parallel} = 0.412 \pm 0.001$) и низкой положительной ($P_{\perp} = 0.025 \pm 0.002$) величины. Это указывает на то, что диполи поглощения и излучения красителя располагаются преимущественно вдоль мышечного волокна (Nichei

et al., 1974; Borejdo, Putnam, 1977; Borovikov et al., 1991). Анализ поляризованной флуоресценции S1, меченного 1.5-IAEDANS (см. раздел «Материал и методика»), указывает на то, что в мышечном волокне имеются две популяции флуорофоров: фракция хаотически расположенных осцилляторов и фракция осцилляторов, ориентированных под углом, близким к 43° (рис. 1, а). Известно, что в отсутствие нуклеотидов головки миозиновых молекул хорошо ориентированы и образуют с тонкой нитью угол, близкий к 45° (Reedy et al., 1965). По-видимому, упорядоченно расположенные молекулы красителя располагаются параллельно моторному домену головки миозиновой молекулы.

Относительное количество хаотически расположенных осцилляторов 1.5-IAEDANS было меньше 40 % ($N = 0.336 \pm 0.003$; рис. 1, б). Поскольку фракция хаотически ориентированных осцилляторов является главным образом вследствие колебательных и вращательных движений самой головки миозиновой молекулы в мышечном волокне (Nichei et al., 1974; Borovikov et al., 1991), относительно низкое значение N указывает на то, что в отсутствие нуклеотида головки миозиновых молекул формируют с актином сильную форму связывания (Borovikov et al., 1991; Andreev et al., 1995) — состояние А·М (рис. 2, а).

Как следует из данных таблицы и рис. 1, MgADP, MgAMP-PNP, MgАТРγS и MgАТР оказывают заметное влияние на значения P_{\parallel} и P_{\perp} (см. таблицу), Φ_E (рис. 1, а) и на величину N (рис. 1, б). Изменения всех поляризационных параметров были достоверны ($p < 0.05$) и обратимы. Так, замена раствора, содержащего MgАТР, на раствор, не содержащий нуклеотида, приводит к практически полному возвращению поляризационных параметров к исходным значениям. Это свидетельствует о том, что изменения поляризованной флуоресценции теневого волокна обусловлены главным образом влиянием нуклеотидов на структурное состояние головки миозина в комплексе актин—S1.

При низких концентрациях нуклеотидов структурное состояние популяции S1 может быть неоднородным. Для того чтобы избежать погрешностей, связанных с этой неоднородностью, в работе подбирали оптимальную концентрацию для каждого аналога АТФ. Оказалось, что эффекты нуклеотидов заметно возрастают при увеличении их концентрации. Максимальные изменения поляризационных параметров для ADP, AMP-PNP, АТРγS и АТР наблюдались соответственно при концентрациях 1.5, 10.0, 17.0 и 2.5 мМ. Дальнейшее увеличение концентрации этих нуклеотидов соответственно до 3, 15, 25 и 7 мМ практически не оказывало влияния на поляризационные параметры, указывая на однородность структурного состояния S1. В таблице и на рис. 1 представлены результаты опытов, которые проводились в присутствии 2.5 мМ ADP, 15 мМ AMP-PNP, 25 мМ АТРγS или 5 мМ АТР, т. е. в условиях, когда популяция S1—1.5-IAEDANS—нуклеотид была практически однородной по структурному состоянию. Подобные концентрации аналогов АТФ использовались ранее и в других работах (Goody, Hofmann, 1980; Roopnarine, Thomas, 1996).

Как известно, поляризованная флуоресценция 1.5-IAEDANS определяется структурным состоянием головки миозина (Nichei et al., 1974; Borejdo, Putnam, 1977; Borovikov et al., 1991; Andreev et al., 1995; Burghardt et al., 1997) и в широком интервале молярных отношений миозина к актину не зависит от концентрации S1, находящегося в во-

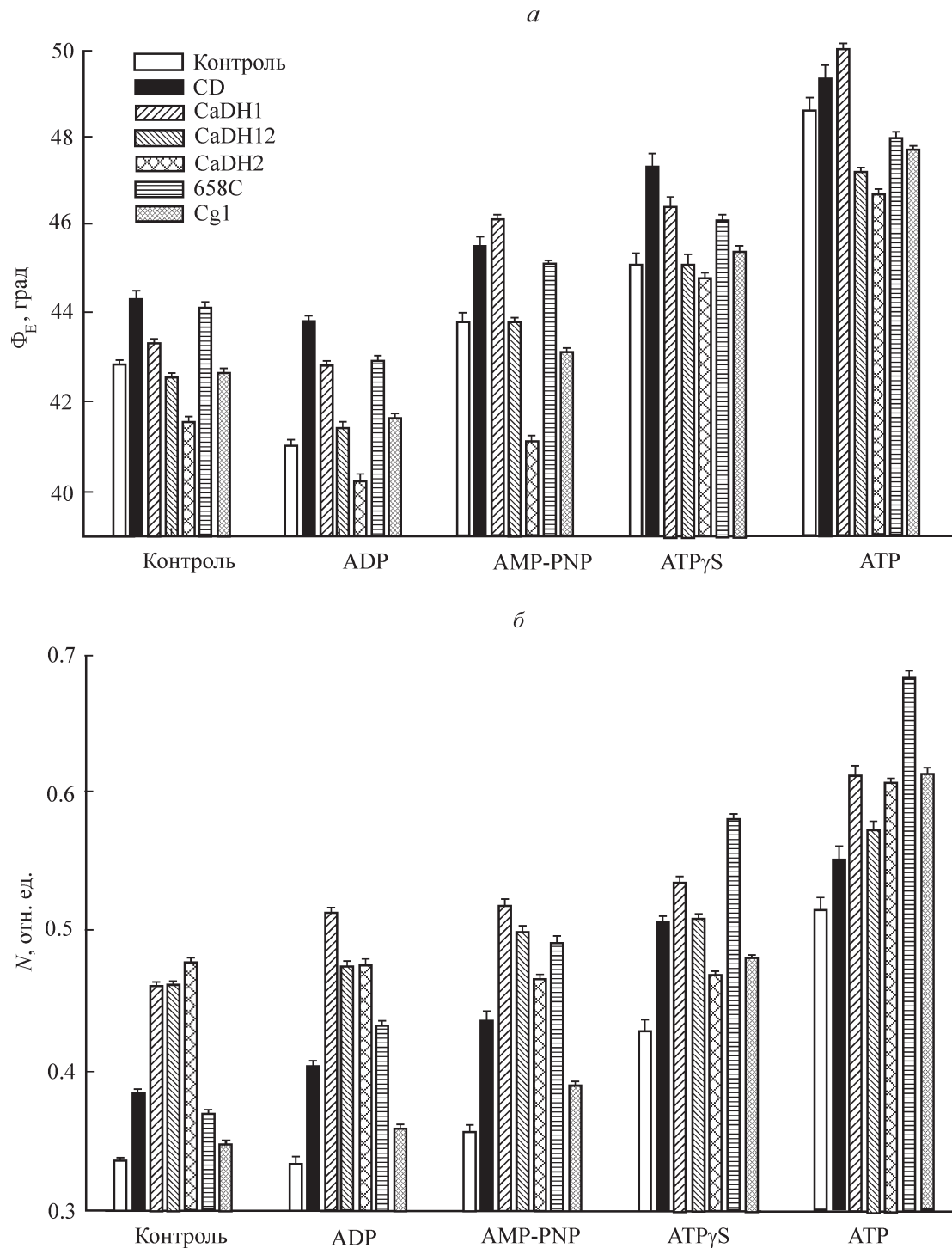


Рис. 1. Влияние ряда нуклеотидов на величины угла Φ_E и значения N в отсутствие и в присутствии кальдесмона или рекомбинантных пептидов CaDH1, CaDH12, CaDH2, Cg1 и 658C.

Вычисление величины угла Φ_E (а) и значения N (б) описано в разделе «Материал и методика». Во всех экспериментах тонкие нити были предварительно реконструированы тропомиозином. Каждая величина является средним значением измерений, выполненных на 5–20 волокнах. Вертикальными отрезками обозначены 95%-ые доверительные интервалы. Различия между комплексами актин—S1, актин—S1—ADP, актин—S1—AMP—PNP, актин—S1—ATP γ S и актин—S1—ATP по величинам Φ_E и N в отсутствие и в присутствии кальдесмона или рекомбинантных пептидов достоверны при $p < 0.05$.

локне (Andreev et al., 1995). В наших экспериментах как в отсутствие, так и в присутствии различных нуклеотидов увеличение молярного отношения S1/актин в интервале от 1/20 до 1/3 не оказывало заметного влияния на параметры поляризованной флуоресценции. Результаты, представленные на рис. 1, были получены в интервале

молярных отношений S1/актин от 1/14 до 1/5, т. е. в условиях, когда отсутствует зависимость поляризационных параметров от концентрации головок миозина. Следовательно, различия в ориентации и подвижности красителя при моделировании разных промежуточных состояний АТФазной реакции миозина (рис. 1) отражают

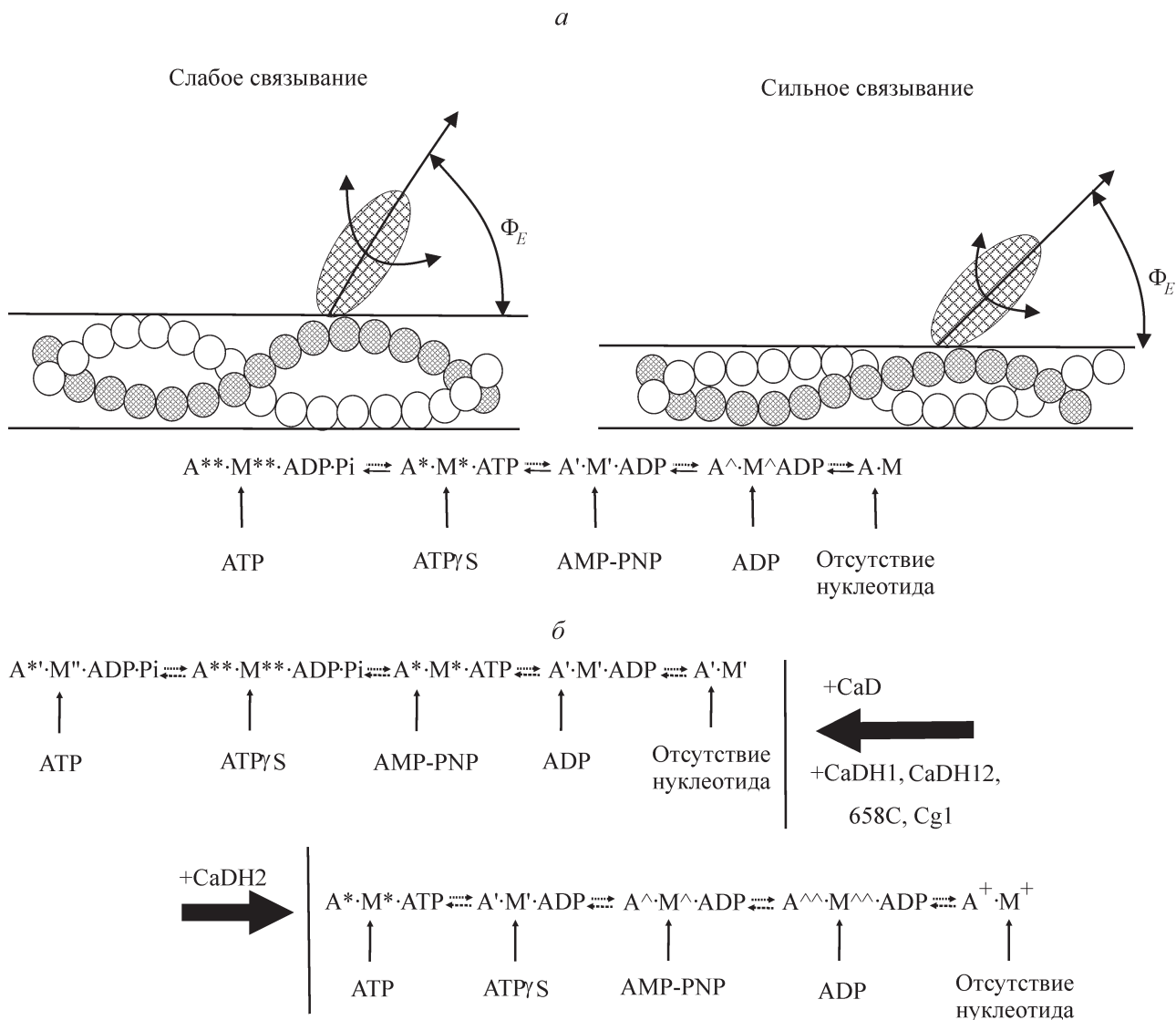


Рис. 2. Промежуточные состояния актомиозина в АТФазной реакции в отсутствие (а) и в присутствии (б) кальдесмона или рекомбинантных пептидов.

Φ_E — угол между осью волокна и осциллятором излучения красителя; M^* , M^{**} , M' , M^{\wedge} , $M^{\wedge\wedge}$, M^+ и M — промежуточные структурные состояния миозина; A^* , A^{**} , A' , A^{\wedge} , $A^{\wedge\wedge}$, A^+ и A — промежуточные структурные состояния актина. $A^* \cdot M' \cdot ADP \cdot Pi$, $A^* \cdot M^* \cdot ATP$, $A^{**} \cdot M^{**} \cdot ADP \cdot Pi$, $A' \cdot M' \cdot ADP$ и $A' \cdot M'$ — слабые формы связывания миозина с актином. $A^{\wedge} \cdot M^{\wedge} \cdot ADP$, $A^{\wedge\wedge} \cdot M^{\wedge\wedge} \cdot ADP$, $A^+ \cdot M^+$ и $A \cdot M$ — сильные формы связывания миозина с актином. MgADP, MgAMP-PNP, MgATP γ S и MgATP, кальдесмон и рекомбинантные пептиды CaDH1, CaDH12, CaDH2, Cg1 и 658C сдвигают равновесие промежуточных состояний актомиозина в цикле гидролиза АТФ в сторону слабого взаимодействия миозина с актином.

разное структурное состояние головок миозина в мышечном волокне.

В присутствии MgADP различие между P_{\parallel} и P_{\perp} было больше, чем в отсутствие нуклеотида (см. таблицу). Величина Φ_E уменьшается достоверно ($p < 0.05$) (рис. 1, а). Известно, что при добавлении MgADP к тонким нитям, декорированным S1, или к мышечным волокнам в ригоре (Sleep, Hutton, 1980; Fajer et al., 1990) возникает промежуточное состояние миозина, близкое к $M^{\wedge} \cdot ADP$ (Roopnarine, Thomas, 1996). Согласно данным электронной микроскопии, головки миозиновых молекул в этом состоянии образуют с тонкими нитями угол, близкий к 45° (Reedy et al., 1965). Результаты большинства работ, выполненных с использованием флуоресцентных (см. обзор: Volkman, Hanein, 2000) и спиновых (Fajer et al., 1990; Roopnarine, Thomas, 1996) меток, связанных с Cys-707, не показали или показали лишь слабое изменение

наклона головки миозина, происходящее под влиянием MgADP. Предполагается, что это изменение наклона головки миозина отражает «обратное движение» поперечного мостика (Tekezawa et al., 1990).

Как известно, флуоресцентный зонд 1.5-IAEDANS жестко связывается с головкой миозиновой молекулы (Hudson, Weber, 1973), поэтому изменения в ориентации красителя можно рассматривать как изменения в ориентации миозинового мостика (Nichei et al., 1974; Borejdo, Putnam, 1977).

Однако такая интерпретация полученных данных не является единственно возможной. Согласно современным представлениям, при моделировании различных стадий АТФазной реакции в моторном домене головки миозина происходят значительные перемещения отдельных субдоменов, что в итоге приводит к повороту «рычага» (регуляторного домена) и к генерации силы (Houdusse et al., 2000). Остаток Cys-707, к которому присое-

Влияние нуклеотидов ADP и ATP на параметры поляризованной флуоресценции комплекса 1.5-IAEDANS—S1 в отсутствие и в присутствии кальдесмона (CaD) или рекомбинантных полипептидов

Нуклеотид	Полипептид	<i>n</i>	P_{\parallel} , отн. ед., $\bar{x} \pm s_x$	P_{\perp} , отн. ед., $\bar{x} \pm s_x$
—	—	14	0.412 ± 0.001	0.025 ± 0.002
	CaD	20	0.391 ± 0.002	0.077 ± 0.002
	CaDH1	6	0.396 ± 0.002	0.099 ± 0.003
	CaDH12	5	0.409 ± 0.002	0.080 ± 0.003
	CaDH2	6	0.432 ± 0.002	0.100 ± 0.003
	658C	5	0.380 ± 0.002	0.053 ± 0.003
	Cg1	6	0.409 ± 0.002	0.023 ± 0.003
	ADP	—	11	0.427 ± 0.002
CaD		15	0.404 ± 0.003	0.086 ± 0.002
CaDH1		6	0.407 ± 0.002	0.129 ± 0.003
CaDH12		5	0.432 ± 0.002	0.080 ± 0.003
CaDH2		5	0.455 ± 0.002	0.102 ± 0.003
658C		5	0.404 ± 0.002	0.070 ± 0.003
Cg1		6	0.430 ± 0.002	0.011 ± 0.003
ATP		—	6	0.333 ± 0.002
	CaD	14	0.334 ± 0.003	0.254 ± 0.003
	CaDH1	6	0.305 ± 0.002	0.287 ± 0.003
	CaDH12	5	0.362 ± 0.004	0.219 ± 0.004
	CaDH2	5	0.358 ± 0.002	0.233 ± 0.003
	658C	5	0.363 ± 0.002	0.266 ± 0.003
	Cg1	6	0.368 ± 0.002	0.228 ± 0.003

Примечание. P_{\parallel} и P_{\perp} вычислены из соотношений $_{\parallel}I_{\perp}/I_{\parallel}$, $_{\perp}I_{\parallel}/I_{\perp}$ и $_{\perp}I_{\parallel}/I_{\parallel}$, (см. раздел «Материал и методика»). *n* — число исследованных волокон. Изменения параметров достоверны при $P < 0.05$.

диняется флуоресцентная метка, находится в моторном домене на конце короткой α -спирали, соединяющей N-концевой субдомен с «конвертером» (субдоменом, непосредственно примыкающим к регуляторному домену и подвергающимся наиболее сильным изменениям в ориентации в процессе АТФазной реакции). Поэтому представляется вероятным, что ориентация и подвижность остатка Cys-707 (а вместе с ним и присоединенной к нему флуоресцентной метки) могут существенным образом изменяться при моделировании разных промежуточных состояний АТФазной реакции. Не исключено, например, что под влиянием MgADP область остатка Cys-707 поворачивается вместе с «конвертером», т. е. изменяет свою ориентацию в моторном домене головки миозина. При этом общее положение моторного домена относительно актина может не изменяться.

Поскольку в литературе отсутствуют данные, свидетельствующие о вращении всей головки миозиновой молекулы, но имеются данные о перемещении субдоменов в моторном домене (Houdusse et al., 2000), результаты, представленные на рис. 1, легче всего объяснить изменениями азимутальной ориентации моторного домена (Burghardt et al., 1997) или области этого домена, содержащего краситель.

В соответствии с предложенной выше интерпретацией изменения в ориентации 1.5-IAEDANS, обнаруженные в присутствии MgADP, можно объяснить тем, что моторный домен или участок, содержащий краситель, отклоняется от позиции, характерной для ригора, в направлении к длинной оси мышечного волокна (рис. 2, а). Относительное количество хаотически расположенных осцилляторов 1.5-IAEDANS в присутствии MgADP было меньше 40 % ($N = 0.334 \pm 0.005$; рис. 1, б). Это указывает на сильную форму связывания головки миозина с актином в комплексе актин—S1—ADP и на формирование состояния актомиозина, близкого к $A' \cdot M' \cdot ADP$ (рис. 2, а).

MgAMP-PNP, MgATP γ S и MgATP также вызывают изменение P_{\parallel} , P_{\perp} , Φ_E и N . Однако в этих случаях различие между P_{\parallel} и P_{\perp} было меньше, чем в отсутствие нуклеотида (см. таблицу), и значения Φ_E и N возрастали (рис. 1).

Так, MgAMP-PNP уменьшает P_{\parallel} до 0.390 ± 0.004 и увеличивает P_{\perp} до 0.057 ± 0.004 . При этом Φ_E увеличивается (рис. 1, а). Известно, что MgAMP-PNP ослабляет взаимодействие миозина с актином. Предполагается, однако, что в присутствии этого аналога АТФ головки миозина формируют с актином сильную форму связывания (Greene, Eisenberg, 1978). Комплекс актомиозин—AMP-PNP имеет механические (Marston et al., 1976), структурные (Goody et al., 1975; Levitsky et al., 1992) и ориентационные (Fajer et al., 1988) свойства, промежуточные между ригором и расслаблением. Считается, что в присутствии этого аналога АТФ в мышечном волокне есть две популяции головок миозина: фракция не связанных с актином головок и фракция головок, связанных с актином. Фракция миозиновых головок, не связанных с актином, имеет практически полный беспорядок в ориентации, тогда как фракция связанных с актином головок миозина имеет строгий порядок в организации (Roopnarine, Thomas, 1996).

В условиях эксперимента (низкая ионная сила) равновесие между этими двумя фракциями смещается в сторону фракции связанных с актином головок миозина (Brenner et al., 1982). Поэтому можно предположить, что в присутствии MgAMP-PNP поляризованная флуоресценция волокна создается главным образом головками миозина, связанными с актином.

Как показано на рис. 1, MgAMP-PNP вызывает увеличение Φ_E ($p < 0.05$). Следовательно, в комплексе актин—S1—AMP-PNP угол наклона моторного домена или участка цепи, содержащего краситель, увеличивается, указывая на вращение флуоресцентной метки от оси мышечного волокна, т. е. в направлении к той ориентации метки, которая характерна для слабой формы связывания миозина с актином (Bogovikov et al., 1991). Оказалось, что величина N в присутствии MgAMP-PNP достоверно выше, чем в присутствии MgADP (рис. 1, б). Это указывает на формирование более слабой формы связывания головок миозина и актина. По-видимому, комплекс актин—S1—AMP-PNP имеет свойства, близкие к слабой форме связывания миозина с актином, — состояние, близкое к $A' \cdot M' \cdot ADP$ (рис. 2, а). Похожие выводы были сделаны ранее при использовании спиновой метки, связанной с Cys-707 (Roopnarine, Thomas, 1996). Авторы пришли к выводу о том, что MgAMP-PNP по сравнению с MgADP имитирует более слабую форму связывания головок миозина, которую авторы обозначили как состояние миозина $M' \cdot ADP$.

Наиболее существенные изменения параметров Φ_E и N , а следовательно, и наибольшие изменения ориентации моторного домена или участка, содержащего краситель, и наибольшие изменения подвижности головок миозина наблюдали в присутствии $MgATP\gamma S$ и $MgATP$. Считается, что в присутствии $MgATP$ одновременно существует несколько разных состояний миозина, среди которых преобладает состояние $M^{**} \cdot ADP \cdot P_i$ (Ponomarev et al., 1995). Результаты механических и спектроскопических исследований позволяют предположить, что состояние головок миозина в присутствии $MgATP\gamma S$ напоминает промежуточное состояние АТФазной реакции, близкое к $M^* \cdot ATP$ (Dantzig et al., 1988; Berger, Thomas, 1994; Ponomarev et al., 1995). В наших экспериментах $MgATP\gamma S$ и $MgATP$ вызвали заметное увеличение величин Φ_E и N (рис. 1), и это указывает на то, что в присутствии этих нуклеотидов головка миозина формирует с актином слабую форму связывания. Однако значения Φ_E и N в присутствии $MgATP\gamma S$ были достоверно ниже значений этих параметров в присутствии $MgATP$. Так, в присутствии $MgATP\gamma S$ значения Φ_E и N были выше, чем в отсутствие нуклеотида на $2.3 \pm 0.2^\circ$ и на $28.2 \pm 2.3\%$ соответственно. В то же время в присутствии $MgATP$ эти параметры были выше, чем в отсутствие нуклеотида, на $4.9 \pm 0.3^\circ$ и на $54.2 \pm 2.6\%$ соответственно (рис. 1). Результаты свидетельствуют о том, что структурные состояния головок миозина в комплексах актин—S1— $ATP\gamma S$ и актин—S1— ATP отличаются друг от друга. По-видимому, структурное состояние актомиозина в присутствии $ATP\gamma S$ находится между состояниями $A^* \cdot M^* \cdot ATP$ и $A^{**} \cdot M^{**} \cdot ADP \cdot P_i$, тогда как в присутствии $MgATP$ актомиозин находится главным образом в состоянии $A^{**} \cdot M^{**} \cdot ADP \cdot P_i$ (рис. 2, а).

Таким образом, полученные данные указывают на то, что структурное состояние головок миозина в комплексе актин—S1—нуклеотид существенно различается при сильной и слабой формах связывания. Для каждой из этих групп связывания выявляются промежуточные состояния актомиозина, отличающиеся друг от друга подвижностью головки миозина и ориентацией моторного домена или участка этого домена, содержащего краситель. В порядке уменьшения угла наклона осцилляторов красителя и уменьшения подвижности головок миозина промежуточные состояния актомиозина можно расположить следующим образом: $A^{**} \cdot M^{**} \cdot ADP \cdot P_i$ (в присутствии $MgATP$) > $A^* \cdot M^* \cdot ATP$ (в присутствии $MgATP\gamma S$) > $A' \cdot M' \cdot ADP$ (в присутствии $MgAMP$ -PNP) > $A \cdot M$ (в отсутствие нуклеотида) > $A^{\wedge} \cdot M^{\wedge} \cdot ADP$ (в присутствии $MgADP$) (рис. 2, а).

Результаты исследований трехмерной структуры S1 позволяют предположить, что максимальные изменения в ориентации регуляторного домена головки миозина («рычага») происходят при переходе головки миозина из структурного состояния $M^{**} \cdot ADP \cdot P_i$ в состояние $M^{\wedge} \cdot ADP$ (Volkman, Hanein, 2000). Согласно данным, полученным в настоящей работе, при переходе из слабой формы связывания актомиозина в сильную форму связывания моторный домен головки миозина или область этого домена (участок α -спирали, соединяющей N-концевой субдомен с «конвертером») поворачивается на 7° (рис. 1, а). Подобные изменения в ориентации обнаружены недавно и для регуляторного домена (Borejdo et al., 2002). Есть основания для предположения о том, что эти области головки миозина вращаются как «жесткое тело» в процессе мышечного сокращения (Burghardt et al.,

2001). По-видимому, в цикле гидролиза АТФ весь моторный домен или область локализации Cys-707 поворачивается в моторном домене головки миозина вместе с «конвертером» и регуляторным доменом.

В самое последнее время мы показали, что каждому промежуточному структурному состоянию головки миозина соответствует определенное состояние актина, которое обладает определенной ориентацией и подвижностью мономеров актина в тонких нитях (Хаймина и др., 2004). Учитывая эти данные, можно предположить, что в цикле гидролиза АТФ большая часть головки миозина (моторный и регуляторный домены) вместе с несколькими мономерами актина вращаются как единое целое, как «жесткое тело», ригидность которого определяется связыванием актина с миозином. Генерация силы, скорее всего, осуществляется при глобальном изменении конформации актомиозина (см. обзор: Houdusse, Sweeney, 2001), причем миозин и актин, испытывая последовательную серию структурных изменений в цикле гидролиза АТФ, вращаются однонаправлено относительно осей мышечного волокна (рис. 2, а) и вызывают перемещение тонких и толстых нитей друг относительно друга.

Влияние кальдесмона и рекомбинантных полипептидов на поляризованную флуоресценцию комплекса 1.5-IAEDANS—S1. При соединении кальдесмона или рекомбинантных пептидов к тонким нитям, содержащим тропомиозин и S1—1.5-IAEDANS, существенно изменяет параметры поляризованной флуоресценции $P_{||}$, P_{\perp} , Φ_E и N как в отсутствие, так и в присутствии нуклеотидов (см. таблицу; рис. 1). Так, в отсутствие нуклеотида кальдесмон и рекомбинантные пептиды CaDH1, CaDH12, Cg1 и 658C увеличивают Φ_E и N . Похожие значения тех же параметров были обнаружены нами без кальдесмона и пептидов в присутствии $MgAMP$ -PNP (рис. 1). Результаты указывают на то, что в отсутствие нуклеотида кальдесмон и рекомбинантные пептиды CaDH1, CaDH12, Cg1 или 658C имитируют эффект $MgAMP$ -PNP, вызывая вращение головок миозина в направлении, совпадающем с тем, которое было отмечено под влиянием $MgAMP$ -PNP в отсутствие кальдесмона и пептидов. Кроме того, в отсутствие нуклеотида кальдесмон и пептиды увеличивают подвижность головок миозина, поскольку величина N возрастает (рис. 1, б), что указывает на формирование слабой формы связывания миозина с актином. Следовательно, кальдесмон и рекомбинантные пептиды CaDH1, CaDH12, Cg1 и 658C смещают промежуточное состояние актомиозина из состояния $A \cdot M$ в состояние актомиозина с более слабой формой связывания, обозначенное как $A' \cdot M'$ (рис. 2, б).

Рекомбинантный пептид CaDH2 в противоположность другим пептидам вызывает уменьшение величин Φ_A , Φ_E и N , что указывает на смещение состояния актомиозина в сторону формирования более сильной формы связывания, т. е. из состояния $A \cdot M$ в состояние, обозначенное как $A^+ \cdot M^+$ (рис. 2, б).

Выводы об изменении кальдесмоном и рекомбинантными пептидами формы связывания головок миозина и актина были сделаны нами при изучении других состояний комплекса актин—S1—нуклеотид. Так, в присутствии $MgADP$ кальдесмон и рекомбинантные пептиды CaDH1, CaDH12, Cg1 и 658C активируют вращение головки миозина от оси тонкой нити и увеличивают фракцию хаотически расположенных флуорофоров, т. е. ингибируют образование сильной формы связывания. Вме-

сто состояния актомиозина $A^{\wedge} \cdot M^{\wedge} \cdot ADP$ формируется более слабая форма связывания миозина с актином — состояние, близкое к $A' \cdot M' \cdot ADP$ (рис. 2, б). Рекомбинантный пептид CaDH2, наоборот, вызывает уменьшение величин Φ_E и N , что указывает на смещение состояния актомиозина в сторону формирования более сильной формы связывания — к состоянию актомиозина, обозначенному нами как $A^{\wedge} \cdot M^{\wedge} \cdot ADP$ (рис. 2, б).

В присутствии MgAMP-PNP, MgATP γ S или MgATP кальдесмон и рекомбинантные пептиды CaDH1, CaDH12, Cg1 или 658C также усиливали вращение головки миозина от тонкой нити, и это указывает на то, что взаимодействие головки миозина с актином сдвигается к более слабому их связыванию. Так, в присутствии MgAMP-PNP вместо состояния актомиозина $A' \cdot M' \cdot ADP$ возникает, по-видимому, состояние, близкое к $A^* \cdot M^* \cdot ATP$, тогда как в присутствии MgATP γ S структурное состояние головки миозина сдвигалось к состоянию, близкому к $M^{**} \cdot ADP \cdot P_i$ (рис. 2, б). Интересно отметить, что кальдесмон и рекомбинантные пептиды CaDH1, CaDH12, Cg1 и 658C ослабляют связывание головки миозина с актином даже в присутствии MgATP, когда головки миозина имеют очень слабое взаимодействие с актином. Об этом свидетельствует резкое увеличение величин Φ_A , Φ_E и N в экспериментах с MgATP (рис. 1).

Рекомбинантный пептид CaDH2, наоборот, ингибирует увеличение Φ_E и N , наблюдаемое в присутствии MgAMP-PNP, MgATP γ S или MgATP, что указывает на смещение состояния актомиозина в сторону формирования более сильных форм связывания актомиозина. Вместо $A' \cdot M' \cdot ADP$, $A^* \cdot M^* \cdot ATP$ и $A^{**} \cdot M^{**} \cdot ADP \cdot P_i$ в мышечном волокне, по-видимому, формируются состояния, близкие к $A^{\wedge} \cdot M^{\wedge} \cdot ADP$, $A' \cdot M' \cdot ADP$ и $A^* \cdot M^* \cdot ATP$ соответственно (рис. 2, б). Поскольку рекомбинантные пептиды CaDH1, CaDH12, Cg1 и 658C имеют актинсвязывающие сайты С, В и В', а пептид CaDH2 содержит в своем составе только актинсвязывающий сайт В', различные эффекты, наблюдаемые в экспериментах, можно объяснить разным влиянием этих сайтов на взаимодействие миозина с актином (Marston et al., 1994; Fraser et al., 1997; Borovikov et al., 2001). По-видимому, сайты С и В' кальдесмона сдвигают формирование промежуточных состояний АТФазной реакции в сторону образования более слабых форм связывания миозина с актином, тогда как сайт В кальдесмона, наоборот, сдвигает формирование промежуточных состояний в сторону формирования более сильных форм связывания. Следовательно, кальдесмон, взаимодействуя с актином через разные актинсвязывающие сайты, способен управлять циклом гидролиза АТФ, смещая равновесие от сильной к слабой форме связывания миозина с актином.

Работа выполнена при финансовой поддержке ИНТАС (проект 01-0516) и Российского фонда фундаментальных исследований (проект 05-04-48812а).

Список литературы

- Боровиков Ю. С. 1998. Исследование молекулярных механизмов мышечного сокращения методом поляризационной флуориметрии. Цитология. 40 (8/9) : 715—734.
 Вихорев П. Г., Вихорева Н. Н., Рослякова М. А., Чако С. 2000. Кальдесмон подавляет формирование сильносвязанных поперечных миозиновых мостиков и активирует способность

слабосвязанных мостиков трансформировать субъединицы актина в выключенную конформацию. Цитология. 42 (5) : 444—453.

Хаймина С. С., Вржосек А., Дабровска Р., Боровиков Ю. С. 2005. Ориентация и подвижность актина в различных промежуточных состояниях аденозин-трифосфатазного цикла. Биохимия. 00 (00) : 000—000.

Andreev O. A., Takashi R., Borejdo J. 1995. Fluorescence polarization study of the rigor complexes formed at different degrees of saturation of actin filaments with myosin subfragment-1. J. Muscle Res. Cell Motil. 16 : 353—367.

Bagshaw C. R., Trentham D. R. 1974. The characterization of myosin—product complexes and of product—release steps during the magnesium ion dependent adenosine triphosphatase reaction. Biochem. J. 141 : 331—349.

Berger C. L., Thomas D. D. 1993. Rotation dynamics of actin-bound intermediates of the myosin adenosine triphosphate cycle in myofibrils. Biophys. J. 67 : 250—261.

Bogatcheva N. V., Vorotnikov A. V., Birukov K. G., Shirinsky V. P., Gusev N. B. 1993. Phosphorylation by casein kinase II affects the interaction of caldesmon with smooth muscle myosin and tropomyosin. Biochem. J. 290 : 437—442.

Borejdo J., Putnam S. 1977. Polarization of fluorescence from single skinned glycerinated rabbit psoas fibres in rigor and relaxation. Biochem. biophys. acta. 459 : 578—595.

Borejdo J., Ushakov D. S., Akopova I. 2002. Regulatory and essential light chains of myosin rotate equally during contraction of skeletal muscle. Biophys. J. 82 : 3150—3159.

Borovikov Yu. S., Avrova S. V., Vikhoreva N. N., Vikhorev P. G., Ermakov V. S., Copeland O., Marston S. B. 2001. C-terminal actin-binding sites of smooth muscle caldesmon switch actin between conformational states. Int. J. Biochem. Cell Biol. 3 : 1151—1159.

Borovikov Yu. S., Gusev N. B. 1983. Effect of troponin—tropomyosin complex and Ca^{2+} on conformational changes in F-actin induced by myosin subfragment-1. Eur. J. Biochem. 136 : 363—369.

Borovikov Yu. S., Kuleva N. V., Khoroshev M. I. 1991. Polarization microfluorimetry study of interaction between myosin head and F-actin in muscle fibers. Gen. Physiol. Biophys. 10 : 441—459.

Bremel R. D., Weber A. 1972. Cooperation within actin filament in vertebrate skeletal muscle. Nature. 238 : 97—101.

Brenner B., Schoenberg M., Chalovich J. M., Green L. E., Eisenberg E. 1982. Evidence for cross-bridge attachment in relaxed muscle at low ionic strength. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 79 : 7288—7291.

Bretscher A. 1984. Smooth muscle caldesmon. Rapid purification and F-actin cross-linking properties. J. Biol. Chem. 259 : 12 873—12 880.

Burghardt T. P., Cruz-Walker A. R., Park S., Ajtai K. 2001. Conformation of myosin interdomain interactions during contraction: deductions from muscle fibers using polarized fluorescence. Biochemistry. 40 : 4821—4833.

Burghardt T. P., Garamszegi S. P., Ajtai K. 1997. Probes bound to myosin Cys-707 rotate during length transients in contraction. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 94 : 9631—9636.

Burton D. J., Marston S. B. 1999. Control of shortening speed in single guinea-pig taenia coli smooth muscle cells by Ca^{2+} , phosphorylation and caldesmon. Pflugers Arch. 437 : 267—275.

Chalovich J. M., Chock P. B., Eisenberg E. 1981. Mechanism of action of troponin and tropomyosin. J. Biol. Chem. 256 : 575—578.

Chalovich J. M., Hemric M. E., Velaz L. 1990. Regulation of ATP hydrolysis by caldesmon. A novel change in the interaction of myosin with actin. Ann. N. Y. Acad. Sci. 599 : 85—99.

Chalovich J. M., Sen A., Resetar A., Leinweber B., Fredrickson R. S., Lu F., Chen Y. D. 1998. Caldesmon: binding to actin and myosin and effects on elementary steps in the ATPase cycle. Acta physiol. Scand. 164 : 427—435.

Dabrowska R., Goch A., Galazkiewicz B., Osinska H. 1985. The influence of caldesmon on ATPase activity of the skeletal muscle actomyosin and bundling of actin filaments. Biochem. biophys. acta. 842 : 70—75.

- Dabrowska R., Nowak E., Drabikowski W. 1980. Comparative studies of chicken gizzard and rabbit skeletal tropomyosin. *Comp. Biochem. Physiol.* 65B : 75—83.
- Dantzig J. A., Walker J. W., Trentham D. R., Goldman Y. E. 1988. Relaxation of muscle fibers with adenosine 5'-(γ -thio) triphosphate ((ATP(γ S))) and by laser photolysis of caged ATP(γ S): evidence for Ca^{2+} -dependent affinity of rapidly detaching zero-force cross-bridges. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 85 : 6716—6720.
- Fajer P. G., Fajer E. A., Brunsvold N. J., Thomas D. D. 1988. Effects of AMPPNP on the orientation and rotational dynamics of spin-labeled muscle cross-bridges. *Biophys. J.* 53 : 513—524.
- Fajer P. G., Fajer E. A., Matta J. J., Thomas D. D. 1990. Effects of ADP on the orientation of spin-labeled myosin heads in muscle fibers. *Biochemistry.* 29 : 5865—5871.
- Fraser I. D. C., Copeland O., Bing W., Marston S. B. 1997. The inhibitory complex of smooth muscle caldesmon with actin and tropomyosin involves three interacting segments of the C-terminal domain 4. *Biochemistry.* 36 : 5483—5492.
- Fraser I. D. C., Marston S. B. 1995. *In vitro* motility analysis of smooth muscle caldesmon control of actin-tropomyosin filament movement. *J. Biol. Chem.* 270 : 19 688—19 693.
- Fujii T., Imai M., Rosenfeld G. C., Bryan J. 1987. Domain mapping of chicken gizzard caldesmon. *J. Biol. Chem.* 262 : 2757—2763.
- Galazkiewicz B., Borovikov Yu. S., Dabrowska R. 1987. The effect of caldesmon on actin-myosin interaction in skeletal muscle fibers. *Biochim. biophys. acta.* 916 : 368—375.
- Geeves M. A. 1991. The dynamics of actin and myosin association and the crossbridge model of muscle contraction. *Biochem. J.* 274 : 1—14.
- Goody R. S., Hofmann W. 1980. Stereochemical aspects of the interaction of myosin and actomyosin with nucleotides. *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 1 : 101—115.
- Goody R. S., Holmes K. C., Mannherz H. G., Barrington Leigh J., Rosenbaum G. 1975. Cross-bridge conformation as revealed by X-ray diffraction studies of insect flight muscles with ATP analogues. *Biophys. J.* 15 : 687—705.
- Greene L. E., Eisenberg E. 1980a. Cooperative binding of myosin subfragment-1 to the actin-troponin-tropomyosin complex. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 77 : 2616—2620.
- Greene L. E., Eisenberg E. 1980b. Dissociation of the actin subfragment — one complex by adenylyl-5'-imidodiphosphate, ADP and PP_i . *J. Biol. Chem.* 255 : 543—548.
- Heubach J. F., Hartwell R., Ledwon M., Kraft T., Brenner B., Chalovich J. M. 1997. Inhibition of cross-bridge binding to actin by caldesmon fragments in skinned skeletal muscle fibres. *Biophys. J.* 72 : 1287—1294.
- Horiuchi K. Y., Chacko S. 1989. Caldesmon inhibits the cooperative turning-on of the smooth muscle heavy meromyosin by tropomyosin-actin. *Biochemistry.* 28 : 9111—9116.
- Houdusse A., Sweeney H. L. 2001. Myosin motors: missing structures and hidden springs. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11 : 182—194.
- Houdusse A., Szent-Gyorgyi A. G., Cohen C. 2000. Three conformational states of scallop myosin S1. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 97 : 11 238—11 243.
- Huber P. A. J., Redwood C. S., Avent N. D., Tanner M. J. A., Marston S. B. 1993. Identification of functioning regulatory sites and a new myosin binding site in the C-terminal 288 amino acids of caldesmon expressed from a human clone. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 14 : 385—391.
- Hudson E. N., Weber G. 1973. Synthesis and characterization of two fluorescent sulfhydryl reagents. *Biochemistry.* 12 : 4154—4161.
- Humphrey M. B., Herrera-Sosa H., Gonzalez G., Lee R., Bryan J. 1992. Molecular cloning of human caldesmons. *Gene.* 112 : 197—204.
- Kakol I., Borovikov Yu. S., Szczesna D., Kirillina V. P., Levitsky D. I. 1987. Conformational changes of F-actin in myosin-free ghost single fibre induced by either phosphorylated or dephosphorylated heavy meromyosin. *Biochim. biophys. acta.* 913 : 1—9.
- Katayama E., Horiuchi K. Y., Chacko S. 1989. Characteristics of the myosin and tropomyosin-binding regions of the smooth muscle caldesmon. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 160 : 1316—1322.
- Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227 : 680—685.
- Levitsky D. I., Shnyrov V. L., Khvorov N. V., Bukatina A. E., Vedenkina N. S., Permyakov E. A., Nikolaeva O. P., Poglavov B. F. 1992. Effects of nucleotide binding on thermal transitions and domain structure of myosin subfragment 1. *Eur. J. Biochem.* 209 : 829—835.
- Marston S. B. 1982. The rates of formation and dissociation of actin-myosin complexes. Effects of solvent, temperature, nucleotide binding and head-head interactions. *Biochem. J.* 203 : 453—460.
- Marston S., Burton D., Copeland O., Fraser I., Gao Y., Hodgkinson J., Huber P., Levine B., el-Mezgueldi M., Notarianni G. 1998. Structural interactions between actin, tropomyosin, caldesmon and calcium binding protein and the regulation of smooth muscle thin filaments. *Acta physiol. Scand.* 164 : 401—414.
- Marston S. B., Fraser I. D. C., Huber P. A. J. 1994. Smooth muscle caldesmon controls the strong binding interactions between actin-tropomyosin and myosin. *J. Biol. Chem.* 269 : 32 104—32 109.
- Marston S. B., Rodger C. D., Tregear R. T. 1976. Changes in muscle crossbridges when β , imido-ATP binds to myosin. *J. Mol. Biol.* 104 : 263—276.
- Marston S. B., Weber A. 1975. The dissociation constant of the actin-heavy meromyosin subfragment-1 complex. *Biochemistry.* 14 : 3868—3873.
- Mornet D., Bonet-Kerrache A., Strasburg G. M., Patchell V. B., Perry S. V., Huber P. A., Marston S. B., Slatter D. A., Evans J. S., Levine B. A. 1995. The binding of distinct segments of actin to multiple sites in the C-terminus of caldesmon: comparative aspects of actin interaction with troponin-I and caldesmon. *Biochemistry.* 34 : 1893—1901.
- Ngai P. K., Walsh M. P. 1984. Inhibition of smooth muscle actin-activated myosin Mg^{2+} -ATPase activity by caldesmon. *J. Biol. Chem.* 259 : 13 656—13 659.
- Nichei T., Mendelson R., Botts J. 1974. Use of fluorescence polarization to observe changes in attitude of S-1 moieties in muscle fibres. *Biophys. J.* 14 : 236—242.
- Nowak E., Borovikov Yu. S., Dabrowska R. 1989. Caldesmon weakens the bonding between myosin heads and actin in ghost fibers. *Biochim. biophys. acta.* 23 : 289—292.
- Okamoto Y., Sekine T. J. 1985. A streamlined method of subfragment one preparation from myosin. *J. Biochem. (Tokyo).* 98 : 1143—1145.
- Ponomarev M. A., Timofeev V. P., Levitsky D. I. 1995. The difference between ADP-beryllium fluoride and ADP-aluminium fluoride complexes of the spin-labeled myosin subfragment 1. *FEBS Lett.* 371 : 261—263.
- Redwood C. S., Marston S. B. 1993. Binding and regulatory properties of expressed functional domains of chicken gizzard smooth muscle caldesmon. *J. Biol. Chem.* 268 : 10 969—10 976.
- Reedy M. K., Holmes K. C., Tregear R. T. 1965. Induced changes in the orientation of the cross-bridges of glycerinated insect flight muscle. *Nature. (London).* 207 : 1276—1280.
- Roopnarine O., Thomas D. D. 1996. Orientation of intermediate nucleotide states of indane dione spin-labeled myosin heads in muscle fibers. *Biophys. J.* 70 : 2795—2806.
- Shirinsky V. P., Biryukov K. G., Hettasch J. M., Sellers J. 1992. Inhibition of the relative movement of actin and myosin by caldesmon and calponin. *J. Biol. Chem.* 267 : 15 886—15 892.
- Sleep J. A., Hutton R. L. 1980. Exchange between inorganic phosphate and adenosine 5'-triphosphate in the medium by actomyosin subfragment 1. *Biochemistry.* 19 : 1276—1283.
- Sobue K., Morimoto K., Inui M., Kanda K., Kakiuchi S. 1982. Control of actin-myosin interaction of gizzard smooth muscle by calmodulin and caldesmon-linked flip-flop mechanism. *Biomed. Res.* 3 : 188—196.

Stein L. A., Schwarz R. P., Chock P. B., Eisenberg E. 1979. Mechanism of actomyosin adenosine triphosphatase. Evidence that adenosine 5'-triphosphate hydrolysis can occur without dissociation of the actomyosin complex. *Biochemistry*. 18 : 3895—3909.

Szpacenko A., Dabrowska R. 1986. Functional domains of caldesmon. *FEBS Lett.* 202 : 182—186.

Takezawa Y., Kim D. S., Ogino M., Sugimoto Y., Kobayashi T., Arata T., Wakabayashi K. 1999. Backward movements of cross-bridges by application of stretch and by binding of MgADP to skeletal muscle fibers in the rigor state as studied by X-ray diffraction. *Biophys. J.* 76 : 1770—1783.

Tregear R., Mendelson R. 1975. Polarization from a helix of fluorophores and its relation to that obtained from muscle. *Biophys. J.* 15 : 455—467.

Volkman N., Hanein D. 2000. Actomyosin: law and order in motility. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12 : 26—34.

Vorotnikov A. V., Marston S. B., Huber P. A. 1997. Location and functional characterization of myosin contact sites in smooth muscle caldesmon. *Biochem. J.* 328 : 211—218.

Wang C.-L. A., Wang L.-W. C., Xu S., Lu R. C., Saavedra-Alanis V., Bryan J. 1991. Localization of the calmodulin- and the actin-binding sites of caldesmon. *J. Biol. Chem.* 266 : 9166—9172.

Way M., Gooch G., Pope B., Weeds A. G. 1989. Expression of human plasma gelsolin in *Escherichia coli* and dissection of actin binding sites by segmental deletion mutagenesis. *J. Cell Biol.* 109 : 593—605.

Yamakita Y., Yamashiro S., Matsumura F. 1992. Characterization of mitotically phosphorylated caldesmon. *J. Biol. Chem.* 267 : 12 022—12 029.

Поступила 13 IV 2005

C-TERMINAL SITES OF CALDESMON DRIVE ATP HYDROLYSIS CYCLE BY SHIFTING ACTOMYOSIN INTERMEDIATES FROM STRONG TO WEAK BINDING OF MYOSIN AND ACTIN

O. E. Pronina,¹ O. Copeland,¹ S. Marston,² Yu. S. Borovikov^{1,*}

¹ Institute of Cytology, RAS, St. Petersburg, Russia, and ² National Heart and Lungs Institute, London, UK;

* e-mail: boroviko@mail.cytspb.rssi.ru

Polarized fluorimetry technique and ghost muscle fibers containing tropomyosin were used to study effects of caldesmon (CaD) and recombinant peptides CaDH1 (residues 506—793), CaDH2 (residues 683—767), CaDH12 (residues 506—708) and 658C (residues 658—793) on the orientation and mobility of fluorescent label 1.5—IAEDANS specifically bound to Cys-707 of myosin subfragment-1 (S1) in the absence of nucleotide, and in the presence of MgADP, MgAMP-PNP, MgATP γ S or MgATP. It was shown that at modelling different intermediates of actomyosin ATPase, the orientation and mobility of dye dipoles changed discretely, suggesting a multi-step changing of the myosin head structural state in ATP hydrolysis cycle. The maximum difference in orientation and mobility of the oscillator (4° and 30 %, respectively) was observed between actomyosin in the presence of MgATP, and actomyosin in the presence of MgADP. Caldesmon actin-binding sites C and B' inhibit formation of actomyosin strong binding states, while site B activates it. It is suggested that actin-myosin interaction in ATP hydrolysis cycle initiates nucleotide-dependent rotation of myosin motor domain, or that of its site for dye binding as well as the change in myosin head mobility. Caldesmon drives ATP hydrolysis cycle by shifting the equilibrium between strong and weak forms of actin-myosin binding.

Key words: regulation of muscle contraction, ATP analogues, intermediate states of actomyosin, caldesmon, changes of myosin subfragment-1 conformation, fluorescence polarization.