

ВЛИЯНИЕ КАЛЬДЕСМОНА НА ОБРАЗОВАНИЕ СИЛЬНОЙ ФОРМЫ СВЯЗЫВАНИЯ МИОЗИНА С АКТИНОМ В ДЕНЕРВИРОВАННЫХ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦАХ КРЫС

© В. П. Кириллина, А. Якубец-Пука, Ю. С. Боровиков

¹ Институт цитологии РАН, 194064, Санкт-Петербург, и

² Институт экспериментальной биологии Ненцкого, 02093, Варшава, Польша;
электронный адрес: boroviko@mail.cytspb.rssi.ru

С помощью поляризационной флуориметрии исследовали влияние кальдесмона (CaD) на конформационные изменения Ф-актина (модифицированного флуоресцентным зондом TRITC-фаллоидином), инициированные субфрагментом 1 (С1) миозина в отсутствие и в присутствии CaD в теневых мышечных волокнах, полученных из интактных и денервированных медленных *m. soleus* (SOL) и быстрых *m. extensor digitorum longus* (EDL) скелетных мышц крысы. Показано, что присоединение С1 к актину мышц как SOL, так и EDL вызывает изменения поляризационных параметров TRITC-фаллоидина, характерные для формирования между актином и миозином сильной формы связывания и трансформации актиновых субъединиц из выключенной (неактивной) во включенную (активную) конформацию. CaD существенно ингибирует этот эффект. Денервационная атрофия подавляет эффект С1, но не оказывает влияния на способность CaD ингибировать образование сильной формы связывания в актомиозиновом комплексе. Предполагается, что CaD «замораживает» структуру Ф-актина в выключенном состоянии, при этом нарушение структуры актина, вызванное развитием денервационной атрофии, не затрагивает участков, ответственных за связывание CaD и выключение мономеров актина в тонких нитях.

Ключевые слова: мышечное сокращение, кальдесмон, сильная форма связывания миозина с актином, конформационные изменения Ф-актина, поляризованная флуоресценция TRITC-фаллоидина.

Хорошо известно, что в основе мышечного сокращения лежит взаимодействие двух основных сократительных белков — актина и миозина, сопровождаемое гидролизом АТФ. Однако молекулярные механизмы, связанные с производством силы мышцей, до конца не изучены. Кинетические исследования свидетельствуют о том, что в цикле гидролиза АТФ головка миозина (С1), взаимодействуя с актином, претерпевает ряд конформационных изменений (Bagshaw, Trentham, 1974; Geeves, 1991; Borovikov, Kirillina, 1992). При этом промежуточные структурные состояния миозина могут быть отнесены к двум группам состояний, характерным для слабой и сильной форм связывания миозина с актином. Слабосвязанные состояния актомиозина характеризуются низким средством миозина к актину, высокой скоростью присоединения (отсоединения) молекул друг к другу и отсутствием способности головок миозина к кооперативному включению регулируемых тонких нитей (Chalovich et al., 1981; Stein et al., 1981). Напротив, сильно связанные состояния актомиозина характеризуются высоким средством миозина к актину, низкой скоростью присоединения (отсоединения) миозина к актину, способностью головок миозина к кооперативному включению регулируемых тонких нитей (Bremel, Weber, 1972; Marston, Weber, 1975; Greene, Eisenberg, 1980; Marston, 1982). Считается, что головки миозиновых молекул (миозиновые мостики) развивают напряжение при переходе от слабой к силь-

ной форме их связывания с актином. Участие структурных изменений поперечных мостиков в механизмах генерации силы хорошо показано в ряде работ (см. обзоры: Cook, 1997; Houdusse, Sweeney, 2001). Имеются некоторые факты, указывающие на то, что структурные изменения актина также могут играть существенную роль в механизмах мышечного сокращения (Egelman, 1985; Egelman, Orlova, 1995a, 1995b; Orlova, Egelman, 1997).

Ранее было показано, что метод поляризационной флуориметрии обладает высокой чувствительностью к конформационным перестройкам актина, происходящим в процессе мышечного сокращения (Боровиков и др., 1972, 1974; Yanagida, Oosawa, 1978; Borovikov, Chernogriadskaia, 1979; Borovikov, 1980; Prochniewicz-Nakayama et al., 1983; Borovikov et al., 1991; см.: обзор: Боровиков, 1998). Так, оказалось, что взаимодействие головки миозина с актином сопровождается заметными изменениями в ориентации и подвижности полипептидных цепей актина, доменов этого белка и мономеров актина в тонких нитях. При этом характер конформационных изменений актина при образовании сильной формы связывания головки миозина с актином существенно отличался от характера изменений, сопровождавших образование слабой формы их связывания (Borovikov et al., 1991, 2004; Хаймина и др., 2005). Установлено, что регуляторные белки тонких нитей, такие как CaD, кальпонин и тропонин-1, способны модифицировать структурное состояние

актина. Было высказано предположение о том, что регуляторные белки «замораживают» структуру актина в выключенном состоянии, подавляют образование сильной формы связывания поперечных миозиновых мостиков с актином (стадию АМ и(или) АМ-АДФ цикла гидролиза АТФ) и таким способом осуществляют ингибирование актин-миозинового взаимодействия (Nowak et al., 1989, 1991; Borovikov et al., 1995, 2001; Вихорев и др., 2000).

На существенную роль структурных изменений актина в механизмах генерации силы и регуляции мышечного сокращения указывают также данные, полученные при изучении структурного состояния Ф-актина при денервационной атрофии, реиннервации и гипертрофии (Боровиков и др., 1981, 1982, 1989; Borovikov et al., 1983, 1984; Strankfeld, Moskalenko, 1987; Szczepanowska et al., 1987, 1998). Так, было показано, что актин денервированных мышц плохо полимеризуется (Strankfeld, Moskalenko, 1987) и не может эффективно изменять конформацию при взаимодействии с головками миозина (Borovikov et al., 1983; Szczepanowska et al., 1987, 1998). Было высказано предположение о том, что денервационная атрофия вызывает изменение структурного состояния актина в сайтах взаимодействия актина с актином и актина с миозином (Szczepanowska et al., 1987, 1998). Вместе с тем остается невыясненным, насколько денервационная атрофия затрагивает другие функциональные сайты актина, например те, которые определяют способность этого белка осуществлять вместе с регуляторными белками тонких нитей регуляцию (модуляцию) актин-миозинового взаимодействия.

В настоящей работе мы изучали влияние регуляторного белка кальдесмона на конформационные изменения Ф-актина, модифицированного флуоресцентным зондом TRITC-фаллоидином, инициированные субфрагментом 1 (С1) миозина в теневых мышечных волокнах, полученных из интактных и денервированных мышц. Показано, что денервационная атрофия оказывает заметное влияние на способность актина отвечать конформационными изменениями на связывание С1, тогда как способность CaD ингибировать образование сильной формы связывания миозина с актином остается неизменной.

Материал и методика

Реактивы. TRITC-фаллоидин был приобретен в фирме Molecular Probes, Inc. (США). Остальные реактивы были из фирмы Sigma (США).

Для получения моделей мышечных волокон использовали самцов крыс Wistar в возрасте 2—3 мес массой 150—170 г. Денервационную атрофию вызывали удалением седалищного нерва, как описано ранее (Szczepanowska et al., 1987). После 14 и 28 сут развития денервационной атрофии медленные скелетные мышцы *m. soleus* (SOL) и быстрые *m. extensor digitorum longus* (EDL) изолировали и глицеринизировали, как описано ранее (Szent-Gyorgyi, 1949). Работа была выполнена на одиночных мышечных волокнах, подвергнутых избирательной экстракции миозина, тропомиозина и тропонина (на теневых мышечных волокнах). Белки толстых нитей, тропомиозин и тропонин удаляли инкубацией одиночного глицеринизированного мышечного волокна в течение 1.5 ч в растворе, содержащем 0.8 KCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM АТФ и 67 mM фосфатный буфер, pH 7.0 (Borovikov, Gusev, 1983). Контроль полноты экст-

ракции проводили с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН) (Laemmli, 1970). Полученные теневые мышечные волокна состоят более чем на 80 % из актина. Модификацию Ф-актина флуоресцентным красителем TRITC-фаллоидином осуществляли при инкубации волокна в растворе, содержащем 10 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 6.7 mM фосфатный буфер, pH 7.0, и 40 мкМ TRITC-фаллоидина (Kakol et al., 1987). Несвязавшийся краситель удаляли раствором такого же состава, не содержащим TRITC-фаллоидина (раствора А), в течение 15 мин при комнатной температуре.

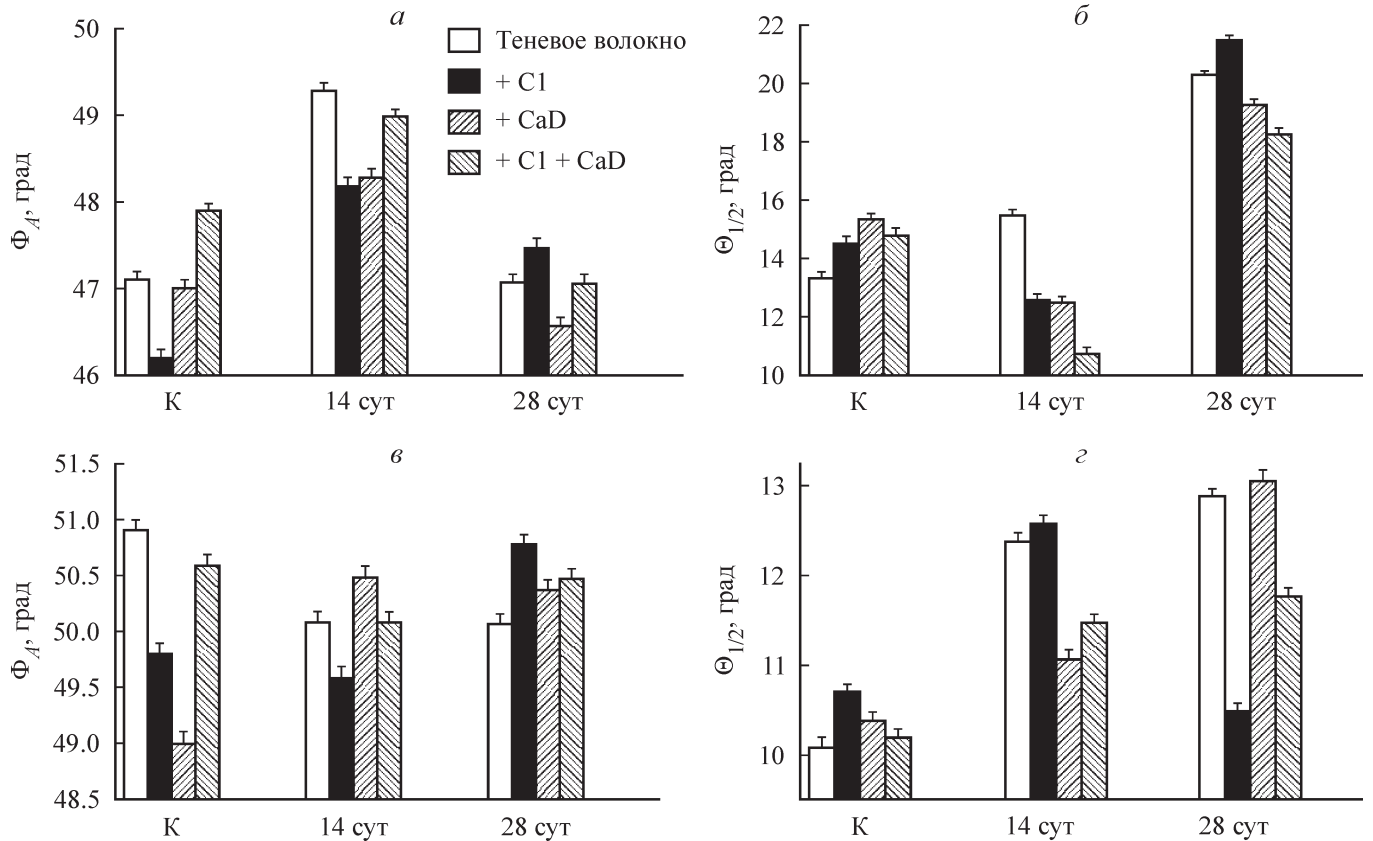
Получение белков. CaD был выделен из гладкой мускулатуры желудка цыпленка, как описано ранее (Noguchi, Chacko, 1989). Субфрагмент 1 (С1), не содержащий регуляторных легких цепей, получали перевариванием скелетного миозина α -химотрипсином в присутствии 2 mM ЭДТА (Okamoto, Sekine, 1985).

Присоединение CaD и С1 к актину. Связывание белков с актином теневого мышечного волокна осуществляли инкубацией волокна в растворе А, содержащем 1.0—2.5 мг/мл соответствующего белка. Несвязавшийся белок отмывали в среде такого же состава, не содержащей белка, в течение 15 мин при комнатной температуре. Молярное отношение белков к актину определяли методом электрофореза в присутствии ДСН (Laemmli, 1970) с последующей денситометрией гелей. Молярные отношения CaD и С1 к актину были соответственно 1 : 14 (± 2) и 1 : 5 (± 2).

Измерение поляризованной флуоресценции. Флуоресценцию TRITC-фаллоидина возбуждали при 479 ± 5 нм и регистрировали в области 550—650 нм. Анализ экспериментальных данных проводили, как описано ранее (Borovikov et al., 2004). Регистрировали четыре составляющие интенсивности поляризованной флуоресценции волокна $I_{\parallel\parallel}$, $I_{\perp\perp}$, $I_{\perp\parallel}$ и $I_{\parallel\perp}$, где подстрочные значки слева от I означают параллельное (\parallel) и перпендикулярное (\perp) направления поляризации возбуждающего света, а значки справа от I — параллельное и перпендикулярное направления поляризации флуоресценции зонда относительно оси волокна. Степень поляризации флуоресценции (P) при ориентации волокна параллельно (P_{\parallel}) и при ориентации волокна перпендикулярно (P_{\perp}) плоскости поляризации возбуждающего света определяли на основании уравнений $P_{\parallel} = (I_{\parallel\parallel} - I_{\perp\perp}) / (I_{\parallel\parallel} + I_{\perp\perp})$ и $P_{\perp} = (I_{\perp\perp} - I_{\parallel\parallel}) / (I_{\perp\perp} + I_{\parallel\parallel})$. Три соотношения четырех интенсивностей поляризованной флуоресценции ($I_{\parallel\perp}/I_{\parallel\parallel}$), ($I_{\perp\perp}/I_{\parallel\parallel}$) и ($I_{\perp\parallel}/I_{\parallel\parallel}$) рассматривали как функции углов Φ_A , Φ_E и $\Theta_{1/2}$, где Φ_A и Φ_E — углы между осью тонкой нити и осцилляторами поглощения и излучения красителя соответственно $\Theta_{1/2}$ — угол между осью волокна и осью тонкой нити. Статистическую достоверность оценивали с помощью t -критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Модификация Ф-актина теневых мышечных волокон TRITC-фаллоидином вызывает появление поляризованной флуоресценции волокна. В соответствии с ранее опубликованными данными (Вихорев и др., 2000), степени поляризации флуоресценции теневого мышечного волокна быстрых и медленных мышц при ориентации их параллельно и перпендикулярно плоскости поляризации возбуждающего света были высокими (для SOL $P_{\parallel} = 0.323 \pm 0.002$, для EDL $P_{\parallel} = 0.247 \pm 0.002$) и низкими



Влияние субфрагмента 1 миозина (и/или) кальдесмона на ориентацию актиновых мономеров и гибкость тонких нитей в теневых мышечных волокнах, полученных из нативных и денервированных медленных (а, в) и быстрых (б, г) мышц крысы.

Представлены значения Φ_A (а, в) и $\Theta_{1/2}$ (б, г), где Φ_A и $\Theta_{1/2}$ — соответственно углы между осью тонкой нити и осциллятором излучения FITC-фаллоидина и между осью волокна и осью тонкой нити (см. раздел «Материал и методика»). Каждый столбик представляет собой среднее значение, полученное из 30–50 измерений, выполненных на 6–10 волокнах. Стандартная ошибка для Φ_A и $\Theta_{1/2}$ была 0.1° . Различия в поляризационных параметрах между актином и комплексами актин—С1, актин—CaD и актин—С1—CaD достоверны ($P < 0.05$). К — контроль.

(для SOL $P_{\perp} = 0.229 \pm 0.002$, для EDL $P_{\perp} = 0.060 \pm 0.002$) положительными величинами. Это указывает на то, что диполи поглощения и излучения красителя ориентируются преимущественно вдоль мышечного волокна (Kakol et al., 1987; Borovikov et al., 1991). Присоединение метки к Ф-актину не оказывает заметного влияния ни на активируемую актином Mg-АТФазную активность миозина (Dancker et al., 1975), ни на напряжение, развиваемое глицеринизированным мышечным волокном (Вихорев и др., 2000).

В качестве теста для изучения конформационных изменений актина в работе использовали изменение углов ориентации осциллятора излучения (Φ_E) и поглощения (Φ_A) красителя и изменение углового распределения флуорофора ($\Theta_{1/2}$) (см. раздел «Материал и методика»). Поскольку характер изменений Φ_E не отличался от соответствующих изменений Φ_A , значения Φ_E в работе не указаны.

Анализ поляризованной флуоресценции показал, что диполи поглощения и излучения красителя в тонких нитях медленных и быстрых мышц располагаются под углом, близким к 50° (см. рисунок). При этом значения Φ_A меньше для SOL, тогда как значения $\Theta_{1/2}$ меньше для EDL (см. рисунок). Поскольку TRITC-фаллоидин жестко связывается с четырьмя соседними мономерами актина и располагается в бороздке, образованной актиновыми мономерами, изменения в ориентации красителя можно рассматривать как изменения в ориентации всей молеку-

лы этого белка или большей ее части (Borovikov et al., 2004). Полученные данные можно объяснить разной азимутальной ориентацией мономеров актина в тонких нитях быстрых и медленных мышц, например разным наклоном актиновых мономеров к оси мышечного волокна. Так как большему углу $\Theta_{1/2}$ соответствует меньшая жесткость тонких нитей (Yanagida, Oosawa, 1978; Nowak et al., 1991), можно заключить, что тонкие нити медленных мышц обладают большей гибкостью, чем тонкие нити быстрых мышц.

Присоединение С1 к актину сопровождается заметными изменениями параметров поляризованной флуоресценции (см. рисунок). Так, величина Φ_A уменьшается на $0.9 \pm 0.1^\circ$ для SOL и на $1.1 \pm 0.1^\circ$ для EDL (см. рисунок, а, в), а значение $\Theta_{1/2}$ увеличивается на $1.2 \pm 0.1^\circ$ для SOL и на $0.6 \pm 0.1^\circ$ для EDL (см. рисунок, б, г). Согласно интерпретации, предложенной ранее (Borovikov et al., 1991, 2004), вышеописанные изменения поляризационных параметров отражают такие конформационные изменения актина, которые вызваны образованием сильной формы связывания между головкой миозина и актином. Такая форма связывания инициирует переход субъединиц актина из «выключенного» во «включенное» состояние (Borovikov et al., 1991, 2004). Следовательно, присоединение С1 к Ф-актину вызывает «включение» мономеров актина как в быстрых так и в медленных мышцах.

Присоединение CaD к актину существенно изменяет значения поляризационных параметров быстрых и медленных мышц. Значения Φ_A уменьшаются на $0.2 \pm 0.1^\circ$ для SOL и на $1.9 \pm 0.1^\circ$ для EDL (см. рисунок, а, в), а значения $\Theta_{1/2}$ увеличиваются на $2.0 \pm 0.1^\circ$ для SOL и на $0.3 \pm 0.1^\circ$ для EDL (см. рисунок, б, з). Следовательно, CaD, связываясь с актином, изменяет его конформацию как в быстрых, так и в медленных мышечных волокнах. Кроме того, CaD изменяет эффект C1 на противоположный: величина Φ_A возрастает на $0.9 \pm 0.1^\circ$ для SOL и на $1.6 \pm 0.1^\circ$ для EDL (см. рисунок, а, в), а величина $\Theta_{1/2}$ уменьшается на $0.5 \pm 0.1^\circ$ для SOL и на $0.2 \pm 0.1^\circ$ для EDL (см. рисунок, б, з). Согласно интерпретации, предложенной ранее, такие изменения поляризационных параметров указывают на то, что головки миозина формируют с актином слабую форму связывания (Borovikov et al., 1991, 1995, 2004). Следовательно, присоединение CaD к актину коренным образом изменяет характер взаимодействия головок миозина с актином. Вместо сильной формы связывания головки миозина образуют с актином слабую форму связывания. По-видимому, CaD «замораживает» структуру Ф-актина в выключенном состоянии.

Аналогичное влияние на конформационные изменения, инициированные C1, оказывает денервационная атрофия. При связывании C1 вместо включения мономеров актина наблюдается их выключение. Такой вывод удалось сделать при анализе результатов, представленных на рисунке. Оказалось, что денервационная атрофия вызывает увеличение значения угла Φ_A для медленных мышц и увеличение $\Theta_{1/2}$ для быстрых мышц. Вместо типичного для сильной формы связывания C1 с актином возрастания Φ_A и уменьшения $\Theta_{1/2}$, наоборот, наблюдалось соответственно уменьшение и увеличение этих параметров (см. рисунок). Следовательно, денервационная атрофия существенно изменяет характер взаимодействия головок миозина с актином. Вместо сильной формы связывания головки миозина образуют с актином быстрых и медленных мышц слабую форму связывания.

В противоположность этому денервационная атрофия не оказывает заметного влияния на способность CaD модифицировать эффект C1. Так, в денервированных волокнах (денервация 28 сут), так же как в нативных волокнах, C1 в присутствии CaD вызывал увеличение значений Φ_A (на $0.5 \pm 0.1^\circ$ для SOL и на $0.2 \pm 0.1^\circ$ для EDL; см. рисунок, а, в). При этом величина $\Theta_{1/2}$ уменьшалась (на $1.0 \pm 0.1^\circ$ для SOL и на $1.3 \pm 0.1^\circ$ для EDL; см. рисунок, б, з). Согласно интерпретации, предложенной ранее, такие изменения поляризационных параметров указывают на то, что головки миозина формируют с актином слабую форму связывания (Borovikov et al., 1991, 1995, 2004). Следовательно, присоединение CaD к актину денервированных мышц не оказывает существенного влияния на характер взаимодействия головок миозина с актином. При связывании миозина с актином в денервированных волокнах формируется слабая форма связывания.

Ранее нами было показано, что актин денервированных мышц не может эффективно изменять конформацию при взаимодействии с головками миозина (Borovikov et al., 1983; Szczepanowska et al., 1987, 1998). Вместо формирования существенной для генерации силы сильной формы связывания с миозином актин образует слабую форму связывания с этим белком. Было высказано предположение о том, что денервационная атрофия вызывает изменение структурного состояния актина в сайтах взаимодействия актина с актином и актина с миозином

(Szczepanowska et al., 1987, 1998). Результаты, полученные в настоящей работе, подтверждают такие представления и указывают на то, что денервационная атрофия не оказывает заметного влияния на способность кальдесмона ингибировать образования сильной формы связывания миозина с актином. По-видимому, денервационная атрофия не модифицирует структурное состояние участков тонких нитей, ответственных за связывания CaD и за выключение мономеров актина в тонких нитях.

Авторы признательны проф. С. Чако (University of Pennsylvania, USA) за любезно предоставленные препараты кальдесмона.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 05-05-48812а).

Список литературы

- Боровиков Ю. С. 1998. Исследование молекулярных механизмов мышечного сокращения методом поляризационной флуориметрии. Цитология. 40 (8/9): 715—734.
- Боровиков Ю. С., Карлсон Б., Аксенова Н. Б., Лоуберт П. 1989. Влияние иннервации на структурное состояние Ф-актина в быстрых мышцах крысы. Цитология. 31 (1): 80—84.
- Боровиков Ю. С., Кириллина В. П., Москаленко И. Е., Штранкфельд И. Г. 1981. Об изменении структуры Ф-актина при денервации мышцы. Биофизика. 26 (4): 754—755.
- Боровиков Ю. С., Кириллина В. П., Черноградская Н. А. 1982. Изучение состояния сократительного аппарата при развитии патологического процесса в мышцах. V. Влияние ценкерозского некроза и денервационной атрофии на структуру Ф-актина. Цитология. 24 (8): 918—923.
- Боровиков Ю. С., Розанов Ю. М., Барский И. Я., Шудель М. С., Черноградская Н. А. 1972. Исследование поляризованной ультрафиолетовой флуоресценции гигантских мышечных волокон *Balanus rustratus*. Цитология. 14 (8): 957—960.
- Боровиков Ю. С., Черноградская Н. А., Розанов Ю. М. 1974. Изучение структурных изменений миозиновых и актиновых нитей в мышечном волокне поляризационным методом ультрафиолетовой флуоресцентной микроскопии. Цитология. 16 (8): 972—982.
- Вихорев П. Г., Вихорева Н. Н., Рослякова М. А., Чако С., Боровиков Ю. С. 2000. Кальдесмон подавляет формирование сильносвязанных поперечных миозиновых мостиков и активрует способность слабосвязанных мостиков трансформировать субединицы 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. 70 (10): 1376—1381.
- 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 reactin. Biochem. J. 141: 331—349.
- Borovikov Yu. S. 1980. Studies of structural changes of F-actin and myosin in living, intact and damaged muscle fibers by means of polarized ultraviolet fluorescence microscopy. Microsc. acta. 82: 379—388.
- 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., Chernogriadskaia N. A. 1979. Studies of conformational changes in F-actin of glycerinated muscle fibers during relaxation by means of polarized ultraviolet fluorescence microscopy. Microsc. acta. 81: 383—392.

- Borovikov Yu. S., Dedova I. V., dos Remedios C. G., Vikhoreva N. N., Vikhorev P. G., Avrova S. V., Hazlett T. L., Van Der Meer B. W. 2004. Fluorescence depolarization of actin filaments in reconstructed myofibers: the effect of C1 or pPDM-C1 movements of distinct areas of actin. *Biophys. J.* 86 : 3020—3029.
- Borovikov Yu. S., Gusev N. B. 1983. Effect of troponin-tropomyosin complex and C^{2+} on conformational changes in F-actin induced by myosin subfragment-1. *Eur. J. Biochem.* 136 : 363—369.
- Borovikov Yu. S., Horiuchi K. Y., Avrova S. V., Chacko S. 1995. Modulation of actin conformation and inhibition of actin filament velocity by calponin. *Biochemistry.* 35 : 13 849—13 857.
- Borovikov Yu. S., Kirillina V. P. 1992. Effect of Mg-ADP on structure of actin in F-actin-myosin subfragment-1 complex. *Basic App. Myology.* 2 : 169—174.
- 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.
- Borovikov Yu. S., Moskalenko I. E., Kirillina V. P., Strankfeld I. G. 1983. The detection of denervation induced structural changes in actin by phalloidin. *Gen. Physiol. Biophys.* 3 : 277—280.
- Borovikov Yu. S., Moskalenko I. E., Kirillina V. P., Strankfeld I. G. 1984. The detection of denervation-induced structural changes in actin by phalloidin. *Gen. Physiol. Biophys.* 13 : 277—280.
- Bremel R. D., Weber A. 1972. Cooperation within actin filament in vertebrate skeletal muscle. *Nature.* 238 : 97—101.
- Chalovich J. M., Chock P. B., Eisenberg E. 1981. Mechanism of action of troponin-tropomyosin. Inhibition of actomyosin ATPase activity without inhibition of myosin binding to actin. *J. Biol. Chem.* 256 : 575—578.
- Cooke R. 1997. Actomyosin interaction in striated muscle. *Physiol.* : 671—697.
- Dancker P., Low I., Hasselbach W., Wieland T. 1975. Interaction of actin with phalloidin: polymerization and stabilization of F-actin. *Biochim. biophys. acta.* 400 : 407—414.
- Egelman E. H. 1985. The structure of F-actin. *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 6 : 129—151.
- Egelman E. H., Orlova A. 1995a. New insights into actin filament dynamics. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5 : 172—180.
- Egelman E. H., Orlova 1995b. Allosteric, cooperativity, and different structural states in F-actin. [Review]. *J. Struct. Biol.* 115 : 159—162.
- Geeves M. A. 1991. The dynamics of actin and myosin association and the crossbridge model of muscle contraction. *Biochem. J.* 274 : 1—14.
- Greene L. E., Eisenberg E. 1980. Cooperative binding of myosin subfragment-I to the actin-troponin-tropomyosin complex. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 77 : 2616—2620.
- 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.
- 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.
- Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227 : 680—685.
- Margossian S. S., Lowey S. 1978. Interaction of myosin subfragments with F-actin. *Biochemistry.* 17 : 5431—5439.
- 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. B., Weber A. 1975. The dissociation constant of the actin-heavy meromyosin subfragment-1 complex. *Biochemistry.* 14 : 3868—3873.
- 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.
- Nowak E., Borovikov Yu. S., Khoroshev M. I., Dabrowska R. 1991. Troponin-I and caldesmon restrict alteration in actin structure occurring on binding of myosin subfragment 1. *FEBS Lett.* 281 : 51—54.
- Okamoto Y., Sekine T. J. 1985. A streamlined method of subfragment one preparation from myosin. *J. Biochem. (Tokyo).* 98 : 1143—1145.
- Orlova A., Egelman E. H. 1997. Cooperative rigor binding of myosin to actin is a function of F-actin structure. *J. Mol. Biol.* 265 : 469—474.
- Prochniewicz-Nakayama E., Yanagida T., Oosawa F. 1983. Studies of conformation of F-actin in muscle fibers in the relaxed state, rigor, and during contraction using fluorescent phalloidin. *J. Cell Biol.* 97 : 1663—1667.
- Stein L. A., Chock P. B., Eisenberg E. 1981. Mechanism of the actomyosin ATPase: effect of actin on the ATP hydrolysis step. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 78 : 1346—1350.
- Strankfeld I. G., Moskalenko I. E. 1987. Is there difference between actions from intact and denervated muscles? *Gen. Physiol. Biophys.* 6 : 285—295.
- Szczepanowska I., Borovikov Yu. S., Jakubiec-Puka A. 1998. Effect of denervation, reinnervation and hypertrophy on the state of actin filaments in skeletal muscle fibres. *Eur. J. Cell Biol.* 43 : 394—402.
- Szczepanowska I., Borovikov Yu. S., Jakubiec-Puka A. 1998. Effect of denervation and muscle inactivity on the organization of F-actin. *Muscle & Nerve.* 21 : 309—317.
- Szent-Gyorgyi A. G. 1949. Free-energy relation and contraction of actomyosin. *Biol. Bull.* 96 : 140—161.
- Yanagida T., Oosawa F. 1978. Polarized fluorescence from e-ADP incorporated into F-actin in a myosin-free single fibre: conformation of F-actin and changes induced in it by heavy meromyosin. *J. Mol. Biol.* 126 : 507—524.

THE INFLUENCE OF CALDESMON ON STRONG BINDING OF MYOSIN
WITH ACTIN IN DENERVATED RAT SKELETAL MUSCLES

V. P. Kirillina,¹ A. Jakubiec-Puka,² Yu. S. Borovikov¹

¹ Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, Russia, and

² Nencki Institute of Experimental Biology PAN, Warszawa, Poland;
e-mail: boroviko@mail.cytspb.rssi.ru

The effect of caldesmon (CaD) on conformational changes in F-actin modified by fluorescent probe TRITC-phalloidin was investigated by polarized fluorimetry. Changes were induced by a subfragment-1 (S-1) of myosin in the absence or presence of CaD in ghost muscle fibers obtained from intact and denervated slow (SOL) and fast (EDL) skeletal muscles of rats. S-1 binding to actin of both SOL and EDL muscles was shown to cause changes in polarized parameters of TRITC-phalloidin typical for a strong actin-myosin binding as well as of transition of actin subunits from «off» to «on» state. CaD inhibits this significantly. Denervation atrophy inhibits the effect of S-1 as well but does not affect the capability of CaD decreasing the formation of strong binding in actomyosin complex. It is supposed that CaD «freezes» F-actin structure in «off» state. The denervation atrophy has no effect on CaD responsibility to bind thin filaments and to switch «off» actin monomers.