

## ВЛИЯНИЕ ГИПОТИРЕОЗИСА НА ДВИЖЕНИЕ СУБДОМЕНА-1 АКТИНА, ИНДУЦИРОВАННОЕ СВЯЗЫВАНИЕМ СУБФРАГМЕНТА 1 МИОЗИНА В БЫСТРЫХ И МЕДЛЕННЫХ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦАХ КРЫС

© В. П. Кириллина,<sup>1,\*</sup> А. Якубец-Пука,<sup>2</sup> Ю. С. Боровиков<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия,  
<sup>2</sup>Институт экспериментальной биологии Ненцкого, Варшава, Польша;  
\*электронный адрес: kirill@mail.cytspb.rssi.ru

С помощью поляризационной флуориметрии изучали ориентацию и подвижность флуоресцентной метки 1.5-IAEDANS (N-(iodoacetyl)-(1-naphthyl-5-sulpho-ethylenediamine)), специфически связанной с Cys-374 актина, в теневых мышечных волокнах, полученных из быстрых и медленных мышц крыс, в отсутствие и в присутствии субфрагмента 1 миозина (С1) в норме и в процессе постепенного (в течение 2—5 нед) снижения уровня тироидных гормонов (развития гипотиреозиса) в организме крыс. Показано, что присоединение С1 к F-актину теневого мышечного волокна вызывает изменения ориентации диполей флуоресцентного зонда 1.5-IAEDANS и относительного количества хаотически расположенных флуорофоров, что указывает на изменение ориентации и подвижности субдомена-1 актина, вызванное образованием сильной формы связывания с С1. Развитие гипотиреозиса существенно ингибирует этот эффект. Наибольшее влияние гипотиреозиса обнаружено на 34-е сут развития болезни. Предполагается, что изменение тироидного статуса мышц приводит к ингибированию способности F-актина формировать с миозином существенную для генерации силы сильную форму связывания.

**Ключевые слова:** мышечное сокращение, гипотиреозис, конформационные изменения актина, F-актин, поляризация флуоресценции.

В основе мышечного сокращения лежит взаимодействие двух сократительных белков — актина и миозина, сопровождаемое гидролизом АТФ. Считается, что генерация силы осуществляется при переходе от слабой к сильной форме связывания миозина с актином (Geeves, Holmes, 2005). Сильная форма связывания характеризуется высоким сродством миозина к актину, медленной кинетикой присоединения и отсоединения головок миозина от тонких нитей и способностью головок миозина к кооперативной активации актиновой нити (Lymn, Taylor, 1971; Bremel, Weber, 1972; Marston, 1982; Geeves, 1991). В противоположность этому слабая форма связывания характеризуется низким сродством миозина к актину, быстрой кинетикой присоединения и отсоединения головки миозина от актина и отсутствием кооперативной активации регулируемых нитей актина (Lymn, Taylor, 1971; Chalovich et al., 1983). Формирование сильной и слабой форм связывания сопровождается конформационными перестройками миозина и актина (см. обзор: Cooke, 1997).

Ранее было установлено, что связывание миозина с F-актином вызывает изменение гибкости актиновых нитей (Yanagida, Oosawa, 1978; Prochniewicz-Nakajama et al., 1983) и инициирует внутримолекулярные движения некоторых областей (субдоменов) актина (Orlova, Egelman, 1997). В последние годы выявлены нуклеотидзависимые движения субдомена-1 актина при моделировании разных стадий цикла гидролиза АТФ (Дедова и др., 2004; Borovikov et al., 2004).

Нарушение сократительной функции мышц при денервационной атрофии, гипертрофии и обездвиживании мышц (перерезке сухожилий) (Боровиков и др., 1977; Szczepanowska et al., 1987; Ciechomska et al., 1998; Jakubiec-Puka et al., 1998; Кириллина и др., 2006), а также при моделировании состояния мышц, сходного с патологическим, например при высокочастотной электростимуляции мышц (Borovikov et al., 1992), сопровождается изменением характера конформационных перестроек актина, происходящих при формировании существенного для генерации силы сильного связывания миозина с актином (Боровиков и др., 1981, 1982; Szczepanowska et al., 1987, 1998; Ciechomska et al., 1998; Jakubiec-Puka et al., 1998; Кириллина и др., 2006).

Известно, что развитие гипотиреозиса влияет на функциональные свойства мышц (Salvati et al., 1985; Jakubiec-Puka et al., 1990, 1992, 1998). Они замедляют мышечное сокращение, приводят к увеличению количества медленных мышечных волокон, изменяют синтез изоформ миозина и АТФазную активность миофибрилл (McKeran et al., 1975; Wile et al., 1979; Everts et al., 1981; Nwoye et al., 1981; Leijendekker et al., 1983, 1985; Leijendekker, van Hardeveld, 1985; Elzinga et al., 1987; Weigel et al., 1996; Jakubiec-Puka et al., 1998; Toft, Boon, 2000). Вместе с тем деструктивные изменения в актине при развитии немускульных патологических состояний, таких как гипотиреозис, изучены недостаточно.

В настоящей работе с помощью метода поляризационной флуориметрии предполагается изучить, как гипо-

тиреозис изменяет структурное состояние актина и ингибирует способность F-актина формировать существенную для генерации силы сильную форму связывания с миозином.

### Материал и методика

Получение моделей мышечных волокон. В работе использовали самцов крыс линии Wistar в возрасте 2—3 мес массой 150—170 г. Гипотиреозис вызывали тиректомией (удалением щитовидной железы), после чего животным с питьевой водой давали 0.04%-ный полипропилацетил в течение 5 нед для поддержания тироидного статуса (Jakubiec-Puka et al., 1998). После развития болезни животных декапитуировали, изолировали медленные скелетные мышцы *m. soleus* (SOL) и быстрые *m. extensor digitorum longus* (EDL) (Jakubiec-Puka et al., 1998) и глицеринизировали, как было описано ранее (Szent-Gyorgy, 1949). Белки толстых нитей, тропомиозин и тропонин удаляли инкубацией одиночных глицеринизированных мышечных волокон в течение 1.5 ч в растворе, содержащем 0.8 М KCl, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ АТФ и 67 мМ фосфатный буфер, pH 7.0 (Кириллина и др., 1979; Borovikov, Gusev, 1983). Полученные теньевые мышечные волокна состояли более чем на 80 % из актина.

Модификацию F-актина флуоресцентным красителем 1.5-IAEDANS (N-(iodoacetyl)-(1-naphthyl-5-sulpho-ethyl)enediamine)) осуществляли при инкубации волокна в течение 1 ч в растворе, содержащем 100 мкМ 1.5-IAEDANS, 60 мМ KCl, 1 мМ MgCl<sub>2</sub> и 25 мМ трис-HCl, pH 8.0 (Боровиков и др., 1988). Несвязавшийся краситель удаляли стандартным ригоризирующим раствором, следующего состава (мМ): 100 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub> и 6.7 фосфатного буфера, pH 7.8. Белковый состав волокна и специфичность модификации актина флуоресцентным красителем определяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (Laemmli, 1970) с последующим измерением интенсивности флуоресценции красителя при сканировании гелей. Для всех волокон обнаружена флуоресценция только актина. Молярное отношение красителя к актину составляло 0.8 : 1.0.

Получение субфрагмента 1 миозина. Субфрагмент 1 (С1) миозина получали перевариванием скелетного миозина кролика  $\alpha$ -химотрипсином в течение 10 мин при 25 °С (Okamoto, Sekine, 1985). Связывание С1 с F-актином осуществляли инкубацией теневого волокна в растворе, содержащем 10 мМ KCl, 3 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ DTT, 6.7 мМ фосфатного буфера, pH 7.0, и 1.0—2.5 мг/мл С1. Несвязавшийся белок отмывали в течение 30 мин при комнатной температуре в том же растворе, не содержащем С1. Молярное отношение С1 к актину составляло 1 : 5 ( $\pm 1$ ).

Измерение поляризованной флуоресценции F-актина. Поляризованную флуоресценцию 1.5-AEDANS возбуждали светом с длиной волны  $310 \pm 5$  нм и регистрировали в области 480—550 нм, измерения осуществляли в стандартном ригоризирующем растворе до и после декорирования тонких нитей волокна С1. В присутствии С1 моделировали существенную для генерации силы сильную форму связывания миозина с актином.

Четыре значения интенсивности (I) поляризованной флуоресценции мышечного волокна регистрировали при ориентации волокна параллельно ( $I_{\parallel}$ ,  $I_{\perp}$ ) и перпендику-

лярно ( $I_{\perp}$ ,  $I_{\parallel}$ ) плоскости поляризации возбуждающего света. Отношения поляризации флуоресценции определяли как  $P_{\parallel} = (I_{\parallel} - I_{\perp}) / (I_{\parallel} + I_{\perp})$ ,  $P_{\perp} = (I_{\perp} - I_{\parallel}) / (I_{\perp} + I_{\parallel})$ .

Экспериментальные данные анализировали с помощью модельзависимого метода (Tregear, Mendelson, 1975; Kakol et al., 1987; Borovikov et al., 2004). Принимали, что в мышечном волокне имеется фракция хаотически расположенных флуорофоров (N) и фракция флуорофоров, расположенных по спирали, где углы ориентации осцилляторов поглощения и излучения относительно оси волокна обозначаются  $\Phi_A$  и  $\Phi_E$  соответственно. Поскольку во всех экспериментах характер изменения  $\Phi_A$  и  $\Phi_E$  аналогичен, в работе представлены только значения  $\Phi_A$ . Статистическую достоверность изменений оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента.

### Результаты и обсуждение

Считается, что присоединение 1.5-IAEDANS к Cys-374 актина не оказывает существенного влияния на функциональные свойства актина, в том числе на способность этого белка активировать АТФазную активность С1 миозина (Miki et al., 1987). В согласии с ранее опубликованными данными (Боровиков и др., 1988), степень поляризации флуоресценции при ориентации волокна параллельно плоскости поляризации света возбуждения ( $P_{\parallel}$ ) была выше для медленных (SOL) и быстрых (EDL) мышц ( $0.274 \pm 0.002$  и  $0.248 \pm 0.002$  соответственно), чем при ориентации волокна перпендикулярно ( $P_{\perp}$ ) этой плоскости (для SOL  $0.230 \pm 0.002$ , для EDL —  $0.211 \pm 0.002$ ) (см. таблицу). Это свидетельствует о том, что диполи поглощения и излучения красителя располагаются преимущественно вдоль оси мышечного волокна (Боровиков и др., 1988).

Анализ поляризованной флуоресценции показал, что диполи поглощения красителя, локализованного в тонких нитях медленных и быстрых мышц, в отсутствие С1 миозина образуют с осью тонкой нити углы  $\Phi_A$ , близкие соответственно к 48 и 50° (рис. 1, 2). При этом хаотически

**Влияние развития гипотиреозиса на изменения параметров поляризованной флуоресценции ( $P_{\parallel}$  и  $P_{\perp}$ ) зонда 1.5-IAEDANS в медленных (SOL) и быстрых (EDL) теньевых мышечных волокнах крыс в отсутствие и в присутствии головок (С1) миозина**

Тип волокна	С1	$P_{\parallel}$	$P_{\perp}$
SOL, контроль	–	$0.274 \pm 0.002$	$0.230 \pm 0.003$
	+	$0.259 \pm 0.005$	$0.203 \pm 0.003$
SOL, 14 сут	–	$0.268 \pm 0.001$	$0.246 \pm 0.002$
	+	$0.259 \pm 0.002$	$0.220 \pm 0.004$
SOL, 34 сут	–	$0.268 \pm 0.002$	$0.228 \pm 0.004$
	+	$0.272 \pm 0.003$	$0.238 \pm 0.004$
EDL, контроль	–	$0.248 \pm 0.002$	$0.211 \pm 0.002$
	+	$0.261 \pm 0.005$	$0.223 \pm 0.004$
EDL, 14 сут	–	$0.263 \pm 0.002$	$0.218 \pm 0.002$
	+	$0.287 \pm 0.003$	$0.252 \pm 0.005$
EDL, 34 сут	–	$0.247 \pm 0.003$	$0.208 \pm 0.004$
	+	$0.287 \pm 0.005$	$0.224 \pm 0.003$

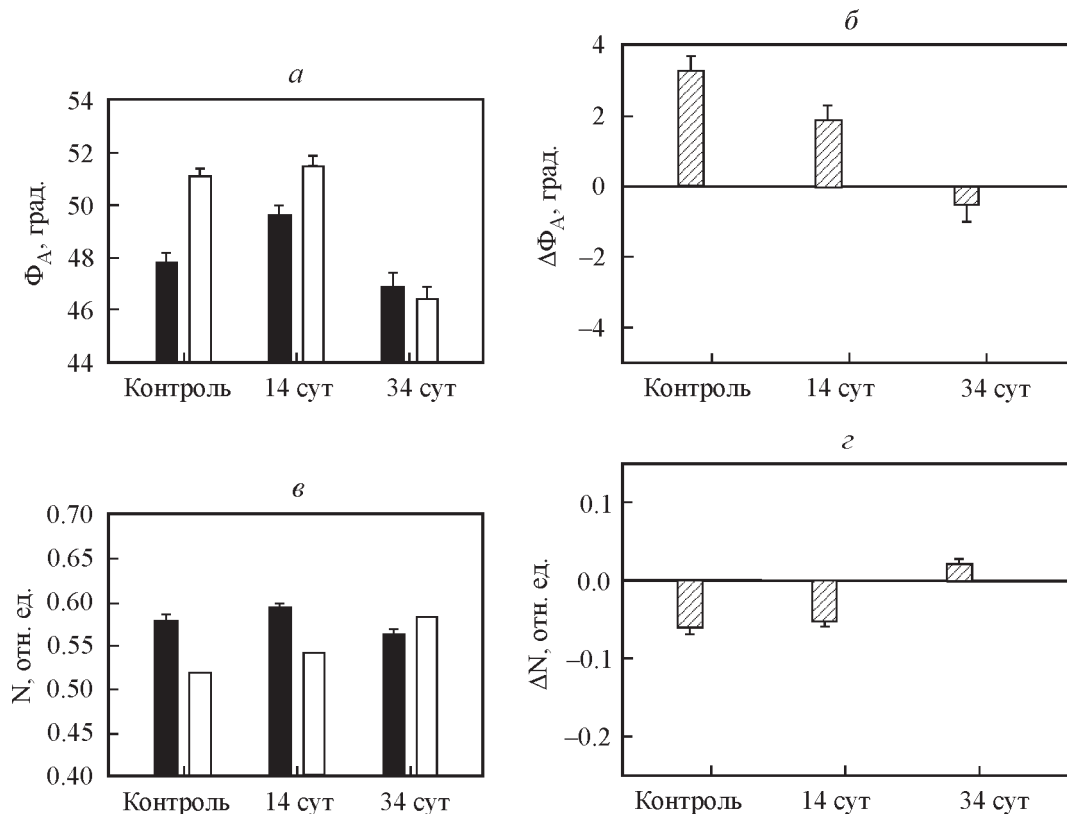


Рис. 1. Влияние субфрагмента-1 (C1) миозина на ориентацию (а, б) и подвижность (в, з) субдомена-1 актина в тонких нитях теневых мышечных волокон медленных мышц *soleus* (SOL) крыс в норме (контроль) и при развитии гипотиреозиса в течение 14 и 34 сут.

Черные и белые столбики (а, в) — теневые волокна в отсутствие и в присутствии C1 соответственно; б, з — разница между величинами  $\Phi_A$  (б) и величинами N (з) до и после связывания C1. Здесь и на рис. 2 доверительный интервал вычисляли с помощью критерия Стьюдента,  $P < 0.05$ .

ориентированных молекул красителя было не больше 60 %: в относительных величинах значения N для SOL и EDL были  $0.579 \pm 0.008$  и  $0.513 \pm 0.021$  соответственно (рис. 1). Это указывает на то, что флуоресцентная метка жестко связана с актином в тонких нитях (Боровиков и др., 1988). Различия между значениями  $\Phi_A$  и N для быстрых и медленных мышц можно объяснить различиями в структурном состоянии актина в этих мышцах крыс (Кириллина и др., 2006).

Гипотиреозис оказывает заметное влияние на поляризационные параметры ( $P_{\parallel}$ ,  $P_{\perp}$ ,  $\Phi_A$  и N) F-актина медленных и быстрых мышц (см. таблицу, рис. 1, 2), что свидетельствует о том, что развитие этого патологического процесса в мышцах сопровождается конформационными перестройками F-актина (Jakubiec-Puka et al., 1998).

Как следует из данных рис. 1 и 2, связывание C1 с F-актином вызывает увеличение  $\Phi_A$  для контрольных медленных и быстрых мышц более чем на  $3^\circ$ , следовательно, C-концевой участок мономера актина или весь субдомен-1 актина поворачивается от оси тонкой нити (Borovikov et al., 2004). При этом фракция неориентированных флуорофоров уменьшается для медленных и возрастает для быстрых мышц на 0.060 и 0.044 отн. ед. соответственно (рис. 1, в; 2, в). Поскольку при связывании C1 с актином моделируется сильная форма связывания (Geeves, Holmes, 2005), можно предположить, что при формировании такой формы связывания происходит вращение субдомена-1 актина от оси тонкой нити как для быстрых, так и для медленных мышц. Подвижность субдомена-1

актина при этом уменьшается для медленных и увеличивается для быстрых мышц.

Развитие гипотиреозиса оказывает существенное влияние на подвижность субдомена-1 актина и его способность изменять свою ориентацию при формировании сильной формы связывания (рис. 1, 2).

Как видно из данных рис. 1, 2, развитие гипотиреозиса в медленных мышцах вызывает увеличение угла  $\Phi_A$  (от  $49.6$  до  $51.5^\circ$ ) на ранних стадиях развития процесса и уменьшение его (от  $46.9$  до  $46.4^\circ$ ) на поздних стадиях. Для быстрых мышц развитие этого процесса ведет к уменьшению угла  $\Phi_A$  на ранних и поздних стадиях от  $51.2$  до  $50.2$  и от  $51.9$  до  $50.0^\circ$  соответственно (рис. 1, а; 2, а). Гипотиреозис оказывает слабое влияние на подвижность субдомена-1 актина (рис. 1, в, з; 2, в, з). Следовательно, быстрые мышцы более чувствительны к гипотиреозису, чем медленные.

Ранее при изучении конформационных изменений актина на разных стадиях цикла гидролиза АТФ актомиозиновым комплексом было установлено, что при образовании сильной формы связывания субдомен-1 актина поворачивается, смещаясь от оси тонкой нити, тогда как образование слабой формы связывания, наоборот, вызывает смещение субдомена-1 к оси тонкой нити (Borovikov et al., 2004, 2006). Поскольку в патологически измененных мышцах субдомен-1 поворачивался, смещаясь к оси тонкой нити (рис. 1, 2), можно предположить, что гипотиреозис вызывает такие конформационные изменения актина, которые изменяют характер актин-миозинового

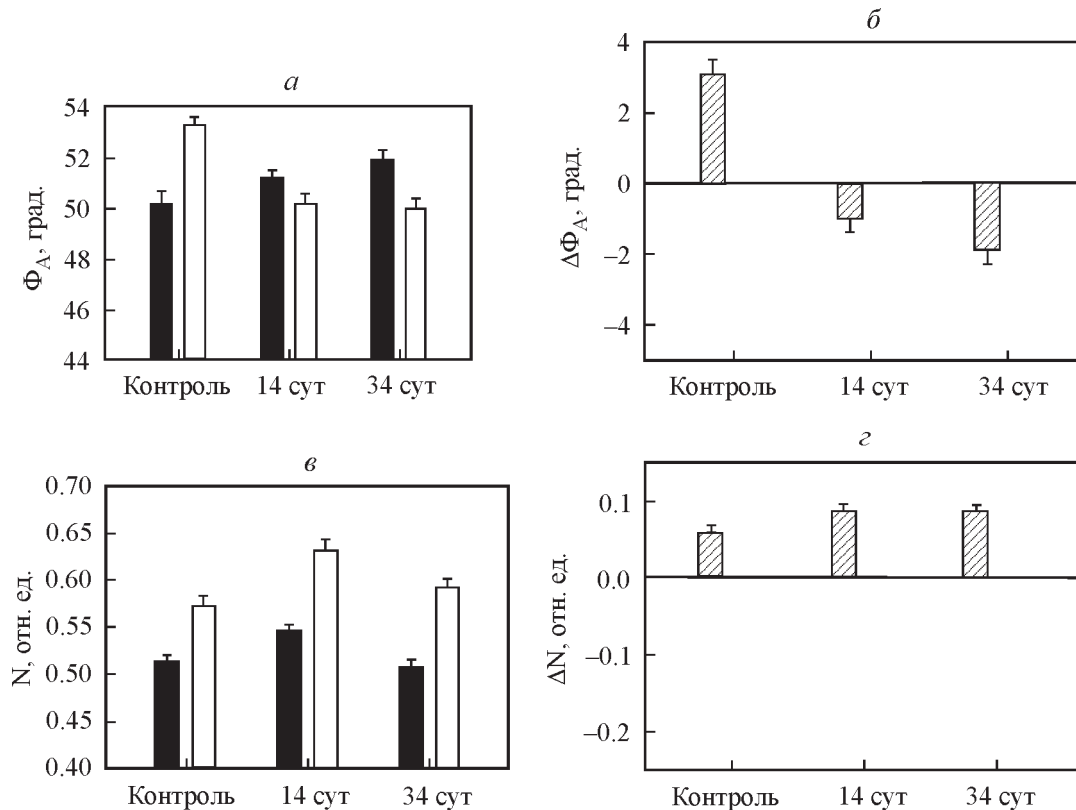


Рис. 2. Влияние субфрагмента-1 (C1) миозина на ориентацию (а, б) и подвижность (в, з) субдомена-1 актина в тонких нитях теневых мышечных волокон быстрых мышц *extensor digitorum longus* (EDL) крыс в норме (контроль) и при развитии гипотиреозиса в течение 14 и 34 сут.

а–з — то же, что и на рис. 1.

взаимодействия. Вместо формирования существенной для генерации силы сильной формы связывания при гипотиреозисе возникает, по-видимому, типичная для ослабления волокна слабая форма связывания.

Согласно современным представлениям, генерация силы поперечным мостиком осуществляется при переходе от слабой к сильной форме связывания, сопряженном с высвобождением неорганического фосфата в цикле гидролиза АТФ (Geeves, Holmes, 2005). Считается, что именно на этой стадии АТФазного цикла поперечный мостик, или «миозиновый рычаг», поворачивается относительно оси волокна, генерируя силу (Geeves, Holmes, 2005). Так как сильная форма связывания ингибируется при гипотиреозисе, можно предположить, что и обнаруженное ранее при развитии этого патологического процесса в мышцах уменьшение АТФазной активности (см., например: Wiles et al., 1979) является следствием конформационных изменений актина, которые приводят к подавлению формирования сильной формы связывания между миозином и актином. Кроме этого, полученные результаты позволяют предполагать, что гипотиреозис как один из патогенных факторов, влияющих на организм в целом и на мышцы в частности, влияет на движения субдомена-1 молекулы F-актина таким образом, какой был обнаружен для типичной денервационной мышечной атрофии, т. е. ингибирует сильную форму связывания миозина с актином (Кириллина и др., 2006).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект

08-04-00960а), программы «Ведущие научные школы России» (НШ-1961.2008.4) и фонда научных исследований Польши и Института экспериментальной биологии ПАН.

#### Список литературы

- Боровиков Ю. С., Добровольский З., Дабровска Р. 1988. Тропомиозин и субфрагмент-1 миозина индуцируют в тонких нитях мышечного волокна разные по характеру конформационные перестройки С-концевого участка полипептидной цепи актина. Цитология. 30 (8) : 1014—1017.
- Боровиков Ю. С., Кириллина В. П., Москаленко И. Е., Штранкфельд И. Г. 1981. Об изменении структуры F-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 центровского некроза и денервационной атрофии на структуру F-актина. Цитология. 24 (8) : 918—923.
- Боровиков Ю. С., Кириллина В. П., Черноградская Н. А., Браун А. Д. 1977. Изучение структурных изменений сократительных белков мышечного волокна с помощью поляризационной ультрафиолетовой флуоресцентной микроскопии. III. Структурные изменения сократительного аппарата мышечного волокна в процессе распространяющегося некроза. Цитология. 19 (4) : 382—387.
- Дедова И. В., Аврова С. В., Вихорева Н. Н., Хазлет Т. М., Ван дер Меер В., Дос Ремедиос С., Боровиков Ю. С. 2004. Конформационные изменения актина, вызванные сильным и слабым связыванием субфрагмента-1 миозина. Цитология. 46 (8) : 719—734.

- Кириллина В. П., Боровиков Ю. С., Черноградская Н. А., Браун А. Д. 1979. Электрофоретическое исследование белкового состава мышц при ценкеровском некрозе. Цитология. 21 (7): 864—866.
- Кириллина В. П., Якубец-Пука А., Боровиков Ю. С. 2006. Влияние кальдесмона на образование сильной формы связывания миозина с актином в денервированных скелетных мышцах крыс. Цитология. 48 (7): 554—558.
- Borovikov Y. 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 S1 or pPDM-S1 on movements of distinct areas of actin. Biophys. J. 86 : 3020—3029.
- Borovikov Yu. S., Gusev E. 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., Kirillina V. P., Szczepanowska J., Carraro U. 1991. Polarized microfluorimetry investigation of the conformational changes of F-actin in ghost fibers of fast (EDL) and slow (SOL) rat muscles induced by functional electrostimulation. Basic and Applied Myology. 1 : 139—143.
- Borovikov Y. S., Kulikova N., Pronina O. E., Khaimina S. S., Wrzosek A., Dabrowska R. 2006. Caldesmon freezes the structure of actin filaments during the actomyosin ATPase cycle. Biochim. acta. 1764 : 1054—1062.
- Bremel R. D., Weber A. 1972. Cooperation within actin filaments in vertebrate skeletal muscle. Nature. 238 : 97—101.
- Chalovich J. M., Green L. E., Eisenberg E. 1983. Crosslinked myosin-subfragment-1: a stable analog of the subfragment-1—ATP complex. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 80 : 4909—4913.
- Ciechomska I., Wojda J., Jakubiec-Puka A., Kirillina V. 1998. Effects of some hormones on the skeletal muscle denervation atrophy and on the muscle recovery following self-reinnervation. I. Thymus factor X (TFX) and Ubiquitin. Int. J. Thymol. 6 : 493—501.
- Cooke R. 1997. Actomyosin interaction in striated muscle. Physiol. Rev. 77 : 671—697.
- Everts M. E., van Hardeveld C., Ter Keurs H. E. D. J., Kassenaar A. A. H. 1981. Force development and metabolism in skeletal muscle of euthyroid and hypothyroid rats. Acta Endocrinol. 97 : 221—225.
- Geeves M. A. 1991. The dynamics of actin and myosin association and the cross-bridge model of muscle contraction. Biochem. J. 274 : 1—14.
- Geeves M. A., Holmes K. S. 2005. The molecular mechanism of muscle contraction. Adv. Protein Chem. 71 : 161—193.
- Jakubiec-Puka A., Catani C., Carraro U. 1992. Myosin heavy chain composition in striated muscle after tenotomy. Biochem. J. 282 : 237—242.
- Jakubiec-Puka A., Kordowska J., Carraro U. 1990. Myosin heavy chain isoform composition in striated muscle after denervation and self-reinnervation. Eur. J. Biochem. 193 : 623—628.
- Jakubiec-Puka A., Wojda J., Ciechomska I., Kirillina V. 1998. The effects of hormones on the skeletal muscle denervation atrophy and on the muscle recovery following self-reinnervation. II. Glucocorticoids. Int. J. Thymol. 6 : 611—617.
- Kakol I., Borovikov Yu. S., Szczesna D., Kirillina V. S., Levitskii D. I. 1987. Conformational changes of F-actin in myosin-free ghost single fibre induced by either phosphorylated and dephosphorylated heavy meromyosin. Biochim. biophys. acta. 913 : 1—9.
- Kirillina V. P., Borovikov Yu. S. 1992. Effect of  $\epsilon$ -ADP on the structure of F-actin-myosin subfragment-1 complex. Basic and Applied Myology. 2 : 169—174.
- Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of head of bacteriophage T4. Nature. 227 : 680—685.
- Leijendekker W. J., van Hardeveld C. 1985. Phosphorylase a formation, myosin light chain phosphorylation and the energy turnover in contracting skeletal muscle of hypothyroid rats. J. Muscle Res. Cell Motyl. 6 : 91—94.
- Leijendekker W. J., van Hardeveld C., Kassenaar A. A. H. 1983. The influence of the thyroid state on energy turnover during tetanic stimulation in the fast-twitch (mixed-type) muscle of rats. Metabolism. 32 : 615—621.
- Leijendekker W. J., van Hardeveld C., Kassenaar A. A. H. 1985. Coupled diminished energy turnover and phosphorylase a formation in contracting hypothyroid rat muscles. Metabolism. 34 : 437—441.
- Lynn R. W., Taylor E. W. 1971. Mechanism of adenosine triphosphate hydrolysis by actomyosin. Biochemistry. 10 : 4617—4624.
- Marston S. B. 1982. The rates of formation and dissociation of actin-myosin complex. Effects of solvent, temperature, nucleotide binding and head-head interactions. Biochem. J. 203 : 453—460.
- McKeran R. O., Slavin G., Andrews T. M., Ward P., Mair W. G. P. 1975. Muscle fibre type changes in hypothyroid miopathy. J. Clin. Pathol. 28 : 659—663.
- Miki M., Dos-Remedios C. G., Barden J. A. 1987. Spatial relationship between the nucleotide-binding site Lis-61 and Cys-374 in actin and a conformational change induced by myosin subfragment-1 binding. Eur. J. Biochem. 168 : 339—345.
- Nwoye L., Mommaerts W. F. M. H. 1981. The effect of thyroid status on some properties of rat fast-twitch muscle. J. Muscle Res. Cell Motyl. 2 : 307—320.
- Okamoto Y., Sekine T. 1985. Streamlined method of subfragment one preparation from myosin. J. Biochem. 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-Nakajama I., 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.
- Salvati J., Zeviani M., Betto R., Nacamulli D., Busnardo B. 1985. Effects of thyroid hormones on the biochemical specialization of human muscle fibers. Muscle and Nerve. 8 : 363—371.
- Szczepanowska J., Borovikov Yu. S., Jakubiec-Puka A. 1987. Effect of denervation, reinnervation and hypertrophy on the state of actin filament in skeletal muscle fibers. Eur. J. Cell Biol. 43 : 394—402.
- Szczepanowska J., Borovikov Yu. S., Jakubiec-Puka A. 1998. Effect of denervation and muscle inactivity on the organization of actin. Muscle and Nerve. 21 : 309—317.
- Szent-Gyorgy A. G. 1949. Free-energy relation and contraction of acto-myosin complex. Biol. Bull. 96 : 140—161.
- Toft A. D., Boon N. A. 2000. Thyroid disease and the heart. Heart. 84 : 455—460.
- Treager R., Mendelson R. A. 1975. Polarization from a helix of fluorophores and its relation to that obtained from muscle. Biophys. J. 15 : 455—467.
- Weigel N. L. 1996. Steroid hormone receptors and their regulation by phosphorylation. Biochem. J. 319 : 657—667.
- Wiles C. N., Young A., Jones D. A., Edwards R. H. T. 1979. Muscle relaxation rate, fibre type composition and energy turnover in hyper- and hypothyroid patients. Clin. Sci. 57 : 375—384.
- Yanagida T., Oosawa F. 1978. Polarized fluorescence from  $\epsilon$ -ADP incorporates into F-actin and changes in a myosin-free single fibre: conformation of F-actin and changes induced in it by heavy meromyosin. J. Mol. Biol. 126 : 507—524.

EFFECT OF HYPOTHYREOSIS ON ACTIN SUBDOMAIN-1 MOVEMENT INDUCED  
BY MYOSIN SUBFRAGMENT 1-BINDING IN FAST AND SLOW RAT SKELETAL MUSCLES

*V. P. Kirillina,<sup>1,\*</sup> A. Jakubiec-Puka,<sup>2</sup> Yu. S. Borovikov<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, Russia,  
and <sup>2</sup> Nencki Institute of Experimental Biology, Polish Academy of Science, Warsaw, Poland;  
\* e-mail: kirill@mail.cytspb.rssi.ru

Orientation and mobility of fluorescent probe N-((iodoacetyl)-(1-naphthyl-5-sulpho-ethylenediamine)(1.5-IAEDANS)) specifically bound to Cys-374 of actin in ghost muscle fibers isolated from fast and slow rat muscles were studied by polarized fluorimetry in the absence and presence of myosin subfragment-1 (S1) in intact rats and in the animals with gradual (during 2—5 weeks) reduction of thyroid hormones synthesis (hypothyreosis development). S1 binding to F-actin of ghost muscle fibers was shown to induce changes in orientation of the dipoles of the fluorescent probe 1.5-IAEDANS and in the relative amount of the randomly oriented fluorophores that indicated changes in actin subdomain-1 orientation and mobility resulting from the formation of its strong binding with S1. This effect is markedly inhibited by hypothyreosis development. The maximal effect of hypothyreosis is observed after 34 days of disease development. It is suggested that the change of thyroid status in the muscle inhibits the ability of F-actin to form strong binding with myosin which is essential for force generation.

**Key words:** muscle contraction, hypothyreosis, actin conformational changes, F-actin, polarized fluorescence.