

МОДУЛЯЦИЯ КОНФОРМАЦИИ СУБФРАГМЕНТА-1 МИОЗИНА (S-1) И ИНГИБИРОВАНИЕ S-1-АТФазы КАЛЬПОНИНОМ МИДИИ

© В. В. Сиренко,¹ А. О. Симонян,¹ А. В. Добржанская,² Н. С. Шелудько,² Ю. С. Боровиков^{1, *}

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург,

и ² Институт биологии моря им. А. В. Жирмунского ДВО РАН, Владивосток;

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

Роль кальпонины в физиологических процессах гладких мышц, несмотря на многолетнее изучение, остается во многом непонятной. Несмотря на большое количество экспериментальных данных, вопрос о роли кальпонины в регуляции сокращения гладких мышц остается открытым до сих пор. Решению вопроса может помочь изучение кальпониноподобных белков, т. е. белков, имеющих гомологичные последовательность и структуру, но функционирующих в клетках животных разных таксономических групп. В настоящей работе мы исследовали недавно идентифицированный кальпонин мидии *Crenomytilus grayanus* с мол. массой 40 кДа (CaP-40). Во-первых, проверяли его ингибирующие свойства на актин-активируемую АТФазу S-1 в присутствии ионов кальция. Во-вторых, с помощью метода поляризационной флуориметрии на глицеринизированных мышечных волокнах изучали влияние CaP-40 на конформационные изменения головки миозина при моделировании различных стадий АТФазного цикла. Показано, что CaP-40 ингибирует активность АТФазы S-1 кролика. Ингибирование достигало 80 % при соотношении CaP-40 и актина 1 : 2. Кроме того, показано, что CaP-40 модулирует конформацию S-1 таким образом, что ингибируется формирование сильных форм связывания (стадии А·М и А·М·АДФ) между S-1 и актином с переводом их в слабую форму связывания. При этом CaP-40 почти не влиял на слабосвязанное состояние (стадия А·М·АДФ·Фн). Полученные результаты указывают на то, что взаимодействие CaP-40 с актином приводит к таким конформационным изменениям актина и головки миозина, которые препятствуют формированию сильной формы связывания S-1 с актином в цикле гидролиза АТФ.

Ключевые слова: кальпонин мидии, конформационные изменения S-1, поляризация флуоресценции.

Принятые сокращения: Фн — неорганический фосфат, ЭГТА — этиленгликольтетрауксусная кислота, ЭДТА·Na₂ — натриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты, эйконоген — 4-амино-3-гидрокси-1-нафтолсульфоновая кислота, 1,5-IAEDANS — N-иодоацетил-N'-(5-сульфо-1-нафтил)-этилендиамин, АМР-РNP — аденозин-5(β, γ-имидо)трифосфат (негидролизруемый аналог АТФ), DTT — DL-дитиотреитол, PMSF — фенилметилсульфонилфторид.

Кальпонин был впервые изолирован из мускульного желудочка цыпленка и связывался специфически с антителами к регуляторному белку тонких нитей тропонину Т (Takahashi et al., 1986). На основании его локализации и свойств было сделано предположение о том, что вновь открытый белок может принимать участие в регуляции сокращения гладких мышц. Дальнейшие исследования показали, что кальпонин ингибирует АТФазную активность в реконструированной актомиозиновой системе (Winder, Walsh, 1990; Gimona, Small, 1996), а в пермеабилезированных волокнах гладкой мышцы избыток кальпонины ингибирует скорость сокращения ненагруженной мышцы, но не влияет на возникновение изометрической силы (Jawogowski et al., 1995; Obara et al., 1996). Эти работы укрепили предположение о том, что кальпонин, ассоциированный с сократительным аппаратом клетки, может быть вовлечен в прямое регулирование сократимости мышечной ткани. Позже было показано, что фосфорилирование кальпонины упраздняет ингибирующее действие

кальпонины на АТФазу миозина и коррелирует с неспособностью связываться с актином (Winder, Walsh, 1990). После выхода этой работы стало понятно, что именно взаимодействие кальпонины с актином определяет ингибирующее действие кальпонины на АТФазу миозина.

После того как была установлена аминокислотная последовательность кальпонины, включающая в себя последовательности, гомологичные последовательностям таких белков, как тропонин Т, тропонин I и кальдесмон (Takahashi, Nadal-Ginard, 1991), возник вопрос о том, по какому типу осуществляется ингибирование кальпонином АТФазы миозина — по тропониновому или кальдесмоновому (Miki et al., 1992). Известно, что модификация остатка Lys-61 в актине изменяет характеристики связывания тропомиозина и модифицирует регуляторные эффекты тропонина и тропомиозина (Miki, 1989). Оказалось, что модификация остатка Lys-61 в актине не влияла на ингибирование кальпонином АТФазы тяжелого меромиозина при взаимодействии с актином в отличие от ком-

плекса тропонин—тропомиозин (Miki et al., 1992). Модификация региона, обогащенного кислыми аминокислотными остатками вблизи N-конца актина, не влияла на способность кальпонины связываться с актином в отличие от кальдесмона (Adams et al., 1990). Наконец, кальпонин ингибирует АТФазную активность химически связанного комплекса актин—S-1, чего не наблюдается для кальдесмона (Bartegi et al., 1990). На основании этих данных был сделан вывод о том, что механизм действия кальпонины должен отличаться как от тропонин-тропомиозинового, так и от кальдесмон-тропомиозинового.

Было показано специфическое взаимодействие кальпонины с Glu334 актина (El-Mezgueldi et al., 1992). Этот остаток находится в пределах последовательности 332—334 актина, которая является частью сайта, ответственного за сильную форму связывания миозина (Rayment et al., 1993). Далее авторы предположили, что кальпонин будет влиять на сильное связывание миозина с актином (El-Mezgueldi, Marston, 1996). Для проверки этой гипотезы они исследовали влияние кальпонины на сильное (S-1 · AMP-PNP) и слабое (S-1 · АДФ · Фн) связывание S-1 с актином. Оказалось, что минимальная концентрация кальпонины, достаточная для максимального ингибирования активности АТФазы, уменьшает количество связанного S-1 · AMP-PNP с актином, но не оказывает никакого влияния на количество слабосвязанного актомиозинового комплекса. В экспериментах по конкурентному вытеснению сильных и слабых форм связывания S-1 с актином было показано, что кальпонин вытесняет из актиновых нитей комплекс S-1 · AMP-PNP и S-1 · АДФ, но не S-1 · АДФ · Фн. Был сделан вывод о том, что кальпонин ингибирует актинактивируемую S-1-АТФазу, блокируя на актине сайт сильного связывания и не блокируя сайт слабого связывания с S-1.

В настоящее время СаР-40 является единственным белком кальпонинового семейства из гладких мышц беспозвоночных животных, физико-химические свойства которого хорошо изучены и совпадают со свойствами кальпонины гладких мышц позвоночных животных (Добжанская и др., 2010). Свойства СаР-40 были изучены нами и с помощью метода поляризационной флуориметрии (Сиренко и др., 2012). В упомянутой работе мы показали, что этот белок изменяет свою мобильность и пространственную ориентацию в теневых волокнах, выделенных из скелетных мышц.

В настоящей работе мы исследовали влияние СаР-40 на активность актин-активируемой АТФазы S-1 в присутствии ионов кальция. Показано, что ингибирование АТФазы S-1 достигает 80 %, что совпадает с результатами тестирования ингибирующей способности СаР-40 на АТФазу миозина в гибридных сократительных моделях с использованием нативной молекулы скелетного миозина (Добжанская и др., 2010, 2013). Кроме того, в настоящей работе с помощью метода поляризационной флуориметрии на глицеринизированных волокнах было исследовано влияние СаР-40 на конформационные изменения головки миозина при моделировании различных стадий АТФазного цикла. Было показано, что СаР-40 ингибирует формирование сильных форм связывания между S-1 и актином и не оказывает влияния на слабосвязанное состояние.

Влиянию кальпонины на конформацию S-1 с использованием метода поляризационной флуориметрии посвящено несколько работ (Borovikov et al., 1996a, 1996b; Borovikov, 1999). Результаты этих исследований показали,

что кальпонин, выделенный из гладких мышц позвоночных, модулирует конформационные изменения головки миозина и тем самым приводит к ослаблению связи между мономерами актина и моторным доменом головки миозина.

В настоящей работе с помощью этого метода, используя мышечные волокна с минимально нарушенной структурой (глицеринизированные волокна), мы исследовали влияние СаР-40 на конформационные изменения головки миозина при моделировании различных стадий АТФазного цикла. Было показано, что СаР-40 ингибирует формирование сильных форм связывания между S-1 и актином и практически не оказывает влияния на слабосвязанное состояние.

Материал и методика

S-1 получали перевариванием миозина кролика α -химотрипсином по описанному методу (Okamoto, Sekine, 1985) с модификациями. К 50 мг миозина (6 мл раствора миозина в 50%-ном глицерине) добавляли 5 объемов холодной деионизированной воды и центрифугировали при 9000 g в течение 20 мин. Осадок ресуспендировали до концентрации белка 10 мг/мл в растворе следующего состава: 0.12 M NaCl, 2.0 mM ЭДТА · Na₂, 10 mM Трис-НСl (pH 6.8) и 1 mM NaN₃, гомогенизировали и нагревали до 25 °C на водяном термостате. Гомогенат переваривали α -химотрипсином при соотношении α -химотрипсина и миозина по весу 1 : 300 в течение 20 мин при 25 °C. Переваривание останавливали добавлением в белковую смесь PMSF (реактив предварительно растворяли в 70%-ном спирте) до конечной концентрации 1 mM. Добавляли равный объем холодного раствора MgCl₂ до конечной концентрации 6 mM и быстро перемешивали. Смесь центрифугировали 10 мин при 15 000 g и супернатант высаливали насыщенным раствором сульфата аммония до конечной концентрации 70 %. Взвесь центрифугировали 10 мин при 15 000 g. Осадок, содержащий S-1, растворяли в 2.5 мл буфера следующего состава: 1 mM MgCl₂, 0.1 mM NaN₃ и 20 mM Трис-НСl (pH 7.5) и хроматографировали на колонке, заполненной Sephadex G-25. Полученный таким образом препарат S-1 содержал щелочные легкие цепи и не содержал регуляторных легких цепей.

Мечение S-1 флуоресцентным красителем 1,5-IAEDANS. Модификацию реактивной сульфгидрильной группы миозиновой головки (остаток СуS-707) флуоресцентным красителем 1,5-IAEDANS осуществляли по известному методу (Borejdo, Putnam, 1977). Для этого раствор S-1 (20 мкМ) в буфере, содержащем 60 mM KCl, 0.1 mM DTT и 30 mM Трис-НСl (pH 7.5), смешивали с 3-кратным избытком красителя и инкубировали в течение 18 ч при 4 °C. Реакцию останавливали добавлением раствора DTT до конечной концентрации 1 mM. Несвязавшийся краситель удаляли диализом против раствора, содержащего 10 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 0.1 mM DTT и 10 mM Трис-НСl (pH 6.8). Молярное отношение флуоресцентного зонда 1,5-IAEDANS, связанного с головкой миозина, оценивали, принимая молярный коэффициент поглощения при 337 нм равным 6100 M⁻¹ · см⁻¹.

Выделение актина (по: Spudich, Watt, 1971). Навеску ацетонового порошка актина (2 г) суспендировали в 80 мл буфера (2 mM Трис-НСl, pH 7.5, 0.2 mM АТФ, 0.2 mM CaCl₂, 0.5 mM DTT и 0.1 mM NaN₃) и перемешива-

ли на льду в течение 30 мин. Экстракт отделяли от нерастворимой фракции центрифугированием в течение 20 мин при 10 000 *g*. Цистеиновые остатки актина, оставшиеся в супернатанте, восстанавливали, добавляя 1 М раствора DTT до конечной концентрации 2 мМ. Глобулярную форму актина (G-актин) полимеризовали добавлением 3 М раствора KCl до конечной концентрации 50 мМ. Через 2 ч инкубации на холоде добавляли навеску сухого порошка KCl до конечной концентрации 0.6 М (для диссоциации тропомиозина от актина) и растворяли, перемешивая в течение 1 ч при комнатной температуре. Полимеризованный актин (F-актин) собирали ультрацентрифугированием при 100 000 *g* в течение 1.5 ч при 4 °С. Осадок ресуспендировали в 30 мл буфера G и гомогенизировали. Полученный раствор G-актина восстанавливали раствором DTT и полимеризовали добавлением 3 М раствора KCl до конечной концентрации 50 мМ. Полимеризованный актин собирали ультрацентрифугированием при 100 000 *g* в течение 1.5 ч при 4 °С. Осадок ресуспендировали в 20 мл буфера G и диализовали 1 сут с тремя сменами буфера G. Остатки полимеризованного F-актина удаляли ультрацентрифугированием при 145 000 *g* в течение 1.5 ч при 4 °С. Собирали супернатант и определяли концентрацию актина спектрофотометрическим методом. G-актин полимеризовали для получения F-актина, диализуя в течение 1 сут против буфера KMg50 следующего состава: 10 мМ Трис-HCl (pH 7.5), 50 мМ KCl, 2 мМ DTT, 5 мМ MgCl₂ и 0.1 мМ NaN₃.

Концентрацию CaP-40 определяли по методу Брэдфорд (Bradford, 1976) с помощью калибровочной кривой для бычьего сывороточного альбумина (BSA) в качестве стандарта. Концентрацию актина, миозина и S-1 определяли спектрофотометрически, используя их коэффициенты поглощения *A* в 1%-ном растворе при соответствующих длинах волн: *A*₂₉₀ = 6.3 для актина, *A*₂₈₀ = 5.88 для миозина и *A*₂₈₀ = 7.5 для S-1.

Получение мышечных волокон. Пучки мышечных волокон выделяли из *m. psoas* кролика и пермеабелизировали их глицерином (Szent-Gyorgyi, 1949). Пучок мышечных волокон диаметром около 2 мм закрепляли на лигатурах-распяхах и помещали на 1 сут в охлажденный до 4 °С глицеринизирующий раствор, содержащий 50 % глицерина, 0.1 М KCl, 1 мМ MgCl₂ и 67 мМ фосфатного буфера (pH 7.0). Через 1 сут пучки мышечных волокон переносили в новую порцию глицеринизирующего раствора на 1 сут. В следующей порции этого раствора материал хранился при -20 °С в течение 3—4 мес. За 2 ч до эксперимента из пучков выделяли одиночные волокна и промывали их охлажденным до 4 °С отмывающим раствором, содержащим 0.1 М KCl, 1 мМ MgCl₂ и 67 мМ фосфатного буфера (pH 7.0).

Внедрение S-1-IAEDANS в пермеабелизованное глицерином одиночное мышечное волокно. S-1-IAEDANS связывался с F-актином глицеринизированных волокон путем проникновения через пермеабелизованную сарколемму при инкубации волокна в отмывающем растворе (10 мМ KCl, 3 мМ MgCl₂ и 6.7 мМ фосфатного буфера, pH 7.0) в течение 20 ч при 4 °С. Несвязавшийся белок удаляли многократным промыванием зафиксированных на предметном стекле волокон в течение 10 мин при комнатной температуре.

Поляризационная флуориметрия. Поляризованную флуоресценцию 1,5-IAEDANS возбуждали при 407 ± 5 нм и регистрировали в области 550—650 нм.

Измерения осуществляли с помощью двухканального поляризационного микрофлуориметра. Измерения флуоресцирующих мышечных волокон производили в растворе, содержащем 10 мМ KCl, 3 мМ MgCl₂, 1 мМ DTT, 6.7 мМ фосфатного буфера (pH 7.0) и 4 мМ ЭГТА, в отсутствие нуклеотидов и в присутствии 3.0 мМ АДФ или 5 мМ АТФ. Фиксировали показания четырех интенсивностей поляризованной флуоресценции: $I_{||}$, I_{\perp} , I_{\perp} и $I_{||}$. Знаки слева от *I* обозначают параллельное ($I_{||}$) и перпендикулярное (I_{\perp}) направления поляризации возбуждающего света, а те же значки справа от *I* — направление поляризации флуоресценции. Степень поляризации флуоресценции *P* при ориентации волокна параллельно ($P_{||}$) и перпендикулярно (P_{\perp}) плоскости поляризации возбуждающего света высчитывали на основании уравнений

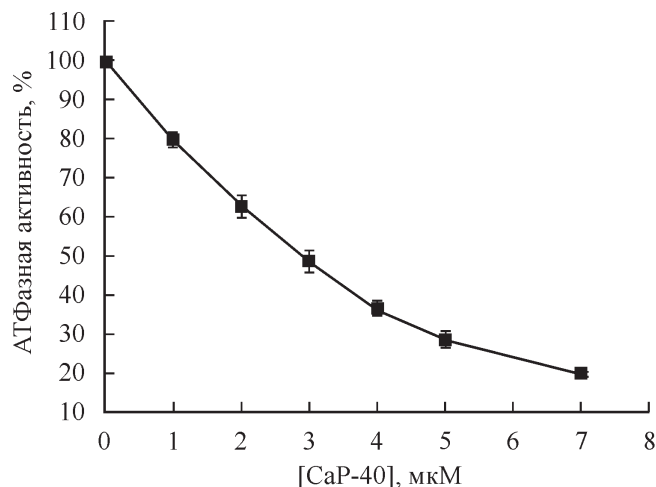
$$P_{||} = (I_{||} - I_{\perp}) / (I_{||} + I_{\perp}),$$

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

Полученные данные по поляризации анализировали с помощью модельзависимого метода (Tregear, Mendelson, 1975; Borejdo, Putnam, 1977). Допускали, что в мышечном волокне имеются две популяции флуорофоров: фракция флуорофоров, расположенных по спирали вдоль тонких актиновых волокон, углы ориентации осцилляторов поглощения и излучения которых обозначаются соответственно Φ_a и Φ_e , и фракция хаотически расположенных флуорофоров — *N*. Поскольку во всех экспериментах характер изменения Φ_a был аналогичен характеру изменения Φ_e , значения Φ_a не приводятся. В отсутствие нуклеотидов моделировали стадию А·М цикла гидролиза АТФ. Использовали нуклеотиды АДФ и АТФ для того, чтобы моделировать соответственно сильносвязанное (А·М·АДФ) и слабосвязанное (А·М·АДФ·Фн) состояния актомиозина (Cooke, 1997). В рамках описываемой модели угол Φ_e является показателем ориентации флуорофоров 1,5-IAEDANS относительно оси волокна, тогда как величина *N* зависит от подвижности участка, с которым они жестко связаны. Статистическую достоверность изменений оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента. Изменения считали достоверными при *P* ≤ 0.05.

При описании поворотов участков молекулы, меченных зондами, нами используются выражения «к центру» мышечного волокна или «к периферии». При этом имеется в виду следующее: если тонкую нить расположить вдоль оси *OX*, то при вращении участка, связанного с зондом, ось осциллятора излучения будет проецироваться на азимутальную ось, перпендикулярную этой оси, т. е. на ось *OZ*. Поэтому направление «к периферии» мышечного волокна означает не направление к *Z*-диску саркомера, а от оси волокна к поверхности цилиндра, которым условно можно представить актиновую нить, а направление «к центру» означает не направление к *M*-линии саркомера, а от поверхности цилиндра к оси тонкой нити.

Определение АТФазной активности. Активируемую актином S-1-АТФазную активность определяли при 25 °С измерением скорости высвобождения неорганического фосфата. Исследование проводили в 0.4 мл раствора, содержащего 12 мМ Трис-HCl (pH 6.0), 2.5 мМ MgCl₂, 5 мМ KCl, 0.4 мМ CaCl₂ и 2 мМ DTT. Реакцию запускали добавлением раствора АТФ в конечной концентрации 2 мМ и через 10 мин останавливали 9%-ным раствором трихлоруксусной кислоты. После центрифугирования в течение 5 мин при 2000 *g* количество Фн в



Ингибирование кальпонином мидии (СаР-40) скорости актин-активируемой АТФазы S-1 кролика.

Гидролиз АТФ осуществлялся при 25 °С в присутствии 0–7 мкМ СаР-40 в среде, содержащей 14 мкМ F-актина и 0.5 мкМ S-1, 12 мМ Трис-НСl (рН 6.0), 2.5 мМ MgCl₂, 5 мМ KCl, 0.4 мМ CaCl₂, 2 мМ DTT и 2 мМ АТФ. Ингибирующее влияние СаР-40 на активность АТФазы S-1 выражали в процентах от ее активности, измеренной в отсутствие этого белка и составляющей 5.6 мкмоль Фн за 1 ч в расчете на 1 нмоль S-1.

супернатанте определяли по известному методу (Fiske, Subbarow, 1925) в модификации, а именно к 0.7 мл супернатанта добавляли 0.78 мл деионизованной воды, затем 0.3 мл молибденовой смеси (смесь равных объемов 2.5 % молибдата аммония и 5 Н серной кислоты) и 0.12 мл основного раствора эйконогена (0.25 % эйконогена, 14 % Na₂S₂O₅ и 0.5 % Na₂SO₃). Пробы инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре и фотометрировали при длине волны 640 нм.

Использовали следующие реактивы: α-химоотрипсин, ЭДТА·Na₂, Трис-НСl, NaN₃, PMSF, 1,5-IAEDANS, DTT, АТФ, АМР-РNP, БСА, АДФ, Sephadex G-25 и эйконоген фирмы Sigma (США); остальные реактивы российского производства квалификации х. ч.

Результаты

Величину актин-активируемой АТФазы S-1 кролика измеряли в условиях нерегулируемой тонкой нити, как описано выше. Влияние СаР-40 на активность АТФазы S-1 выражали в процентах от ее активности, измеренной в отсутствие этого белка. Для условий, при которых производилось измерение (14 мкМ F-актина и 0.5 мкМ S-1 в инкубационной среде), скорость акто-S-1-АТФазы составляла 5.6 мкмоль Фн за 1 ч на 1 нмоль S-1. Скорость S-1-АТФазы (без актина) составляла 0.44 мкмоль Фн за 1 ч на 1 нмоль S-1. Скорость неферментативного гидролиза АТФ составляла менее 2 %.

Влияние СаР-40 на активность актин-активируемой АТФазы S-1 кролика определяли при разных соотношениях СаР-40 к актину — от 1 : 14 до 1 : 2. В присутствии ионов Ca²⁺ (см. рисунок) СаР-40 постепенно снижал активность АТФазы S-1 по мере увеличения его отношения к актину и достигал максимального ингибирования при соотношении 1 : 2. В этой точке ингибирование достигало 80 %, т. е. составляло 20 % от исходной активности.

В таблице представлены степени поляризации флуоресценции (P_{||} и P_⊥), ориентации осей осциллятора излучения красителя IAEDANS, ковалентно связанного с остатком Cys-707 головки миозина, по отношению к оси мышечного волокна (Φ_E) и относительные количества хаотически расположенных осцилляторов (N). Как следует из данных таблицы, в отсутствие нуклеотидов и СаР-40 значение P_{||} больше, чем P_⊥, и упорядоченно расположенные осцилляторы образовывали с тонкой нитью угол, близкий к 43.4°, а величина N приближалась к 40 % (N = 0.377). Следовательно, относительное количество ориентированных осцилляторов в этом структурном состоянии актомиозина составляло около 60 %.

В присутствии АДФ величина угла Φ_E уменьшалась, при этом оси диполей излучения зондов поворачивались на 43.1°, а относительное количество хаотически расположенных осцилляторов N незначительно увеличивалось (см. таблицу). В присутствии АТФ степень поляризации флуоресценции при ориентации волокна параллельно (P_{||}) уменьшалась, а P_⊥ увеличивалась. Величина Φ_E увеличивалась от 43.1 до 49.5° (на 15 %), а относительное количе-

Влияние СаР-40 на поляризованную флуоресценцию, ориентацию (Φ_E) и значение N меченого субфрагмента-1 миозина в пермеабилizированных мышечных волокнах при моделировании нуклеотидами АДФ и АТФ стадий АТФазного цикла

Нуклеотиды	СаР-40	P	P _⊥	Φ _E	N
Контроль	– (n = 7)	0.395 ± 0.002	0.045 ± 0.003	43.4 ± 0.1	0.377 ± 0.003
	+ (n = 6)	0.373 ± 0.003	0.116 ± 0.003	44.8 ± 0.1	0.439 ± 0.004
АДФ	– (n = 7)	0.400 ± 0.002	0.074 ± 0.003	43.1 ± 0.1	0.422 ± 0.005
	+ (n = 6)	0.371 ± 0.002	0.107 ± 0.004	45.2 ± 0.1	0.455 ± 0.006
АТФ	– (n = 7)	0.335 ± 0.002	0.270 ± 0.003	49.5 ± 0.1	0.646 ± 0.006
	+ (n = 6)	0.310 ± 0.004	0.262 ± 0.005	49.8 ± 0.1	0.589 ± 0.005

Примечание. Приведены средние значения и их ошибка. P_{||} — степень поляризации флуоресценции при ориентации волокон параллельно плоскости поляризации возбуждающего света. P_⊥ — степень поляризации флуоресценции при ориентации волокон перпендикулярно плоскости поляризации возбуждающего света. Φ_E — показатель ориентации флуорофора 1,5-IAEDANS относительно оси волокна. N — показатель подвижности участка, с которым жестко связан флуорофор.

ство хаотически расположенных осцилляторов N увеличилось от 0.422 до 0.646 отн. ед. (на 53 %).

В отсутствие нуклеотидов (стадия А·М) СаР-40 увеличивал угол наклона флуоресцентной метки Φ_E с 43.4 до 44.8 град. При этом относительное количество хаотически расположенных флуорофоров N возрастало с 0.377 до 0.439 отн. ед. (на 16 %), R_{\parallel} уменьшалась, а R_{\perp} увеличивалась (см. таблицу). В присутствии СаР-40 и АДФ величина Φ_E не уменьшалась, как это наблюдалось в отсутствие этого белка, а, наоборот, увеличивалась от 44.8 до 45.2°, и относительное количество хаотически расположенных флуорофоров N увеличивалось от 0.439 до 0.455 отн. ед. В присутствии АТФ СаР-40 увеличивал угол Φ_E от 49.5 до 49.8°, при этом R_{\parallel} уменьшалась, а R_{\perp} не менялась. Значение величины N в этих экспериментах было около 60—65 %, что соответствовало слабому связыванию актомиозина — состоянию А·М·АДФ·Фн.

Обсуждение

Ингибирование АТФазы S-1 белком СаР-40 (см. рисунок) достигало 80 % уже при соотношении с актином 1 : 2. Высокая степень ингибирования (80 %) по аналогии с кальцинином позвоночных (Horiuchi, Chacko, 1991) может свидетельствовать о том, что СаР-40, используемый в наших экспериментах, не был фосфорилирован.

Сравнивая эти результаты с теми, что получены ранее другими авторами в отношении ингибирования АТФазы миозина кальцинином гладких мышц в близких экспериментальных условиях, можно сказать, что в целом они похожи. Так, есть данные (Horiuchi, Chacko, 1991) о том, что ингибирование кальцинином составляло около 90 % при соотношении его с актином 1 : 2, а в наших экспериментах — около 80 %. В другой работе (Lu et al., 1995) при таком же соотношении кальцинина с актином ингибирование составило только 60 %, но в качестве источника АТФазы была взята изоформа S-1 (A1), которая, как известно, сильнее связывается с актином (Левитский и др., 1991), что может объяснить такое уменьшение степени ингибирования. А в работе Марстона (Marston, 1991) ингибирование достигало 85 %, а полумаксимальное ингибирование приходилось на соотношение кальпина с актином, равное 0.2 (в нашей работе 0.14).

Ранее мы обнаружили влияние СаР-40 на конформационные изменения актина в теневых мышечных волокнах при моделировании различных стадий АТФазного цикла (Сиренко и др., 2013). В настоящей работе, чтобы определить характер влияния СаР-40 на конформационные изменения головок миозина при моделировании цикла гидролиза АТФ, мы также использовали поляризованную флуоресценцию глицеринизированных мышечных волокон, декорированных S-1-IAEDANS. Измеряя флуоресценцию волокна параллельно и перпендикулярно плоскости поляризации возбуждающего света, в работе оценивали степень поляризации флуоресценции R_{\parallel} и R_{\perp} соответственно. Если диполи осцилляторов излучения располагаются преимущественно параллельно оси мышечного волокна, то при расположении волокна параллельно плоскости поляризации возбуждающего света значение R_{\parallel} будет выше значения R_{\perp} (Borejdo, Putnam, 1977; Borovikov et al., 1991).

Как следует из данных таблицы, в отсутствие нуклеотидов и СаР-40 R_{\parallel} больше, чем R_{\perp} , следовательно, диполи излучения красителя, связанного с головкой миозина,

располагаются преимущественно вдоль мышечного волокна. Анализ поляризованной флуоресценции S-1, меченного 1,5-IAEDANS, указывает на то, что в отсутствие нуклеотидов (состояние А·М) упорядоченно расположенные осцилляторы образуют с тонкой нитью угол, близкий к 40° (Borejdo, Putnam, 1977), похожее значение было и в нашем случае (43.4°). В мышечном волокне кроме упорядоченно расположенных флуорофоров имеются молекулы красителя, которые располагаются хаотически. Поскольку такая ориентация флуорофоров в мышечном волокне появляется вследствие колебательных и вращательных движений самой головки миозина, расположенной на тонкой нити (Andreev et al., 1995), параметр N можно использовать как показатель характера актин-миозинового взаимодействия (Nichei et al., 1974; Borejdo et al., 2002). Низкая доля хаотически расположенных осцилляторов N в мышечном волокне (40 %) свидетельствует о том, что головки миозиновых молекул в состоянии А·М обладают высоким сродством к актину и жестко связаны с F-актином.

В присутствии АДФ величина Φ_E уменьшалась, т. е. оси диполей излучения зондов поворачивались к центру мышечного волокна. Известно, что при добавлении АДФ к тонким нитям, декорированным S-1 (Fajer et al., 1990), возникает промежуточное состояние актомиозина, обозначаемое А·М·АДФ (Roopnarine, Thomas, 1996). При этом значение N в присутствии АДФ практически не изменялось, следовательно, головки миозиновых молекул жестко связаны с F-актином и формируют сильную форму связывания.

В присутствии АТФ оси диполей излучающих зондов поворачивались к периферии мышечного волокна, а дезориентация диполей существенно возрастала, т. е. увеличивалась мобильность головок миозина на тонких нитях. Это указывает на формирование слабой формы связывания головок миозина с актином в присутствии АТФ (Borovikov et al., 1991). Считается, что в присутствии АТФ имеется смесь разных состояний миозина, среди которых преобладает состояние А·М·АДФ·Фн (Ponomarev et al., 1995).

Оказалось, что СаР-40 заметно изменял подвижность и пространственное расположение зондов при моделировании сильных форм связывания S-1 с актином и существенно не влиял на слабую форму связывания. Так, в отсутствие нуклеотидов (стадия А·М) СаР-40 увеличивал значения Φ_E и N. Похожее значения поляризационных параметров наблюдали в отсутствие этого белка при моделировании слабой формы актин-миозинового взаимодействия (стадия А·М·АДФ·Фн), что свидетельствует о сдвиге актомиозиновой связи в слабосвязанную форму.

Подобный эффект подавления формирования сильной формы связывания актомиозина под действием СаР-40 наблюдали и в присутствии АДФ. Как следует из данных таблицы, величины Φ_E и N увеличивались. Следовательно, СаР-40 ингибировал формирование сильных форм связывания (стадии А·М и А·М·АДФ) между S-1 и актином, переводя их в более слабую форму связывания. Похожие выводы были сделаны в работе, где исследовали ингибирование кальцинином актомиозиновой АТФазы (El-Mezgueldi, Marston, 1996).

В присутствии АТФ белок СаР-40 незначительно увеличивал угол Φ_E , а количество хаотически расположенных флуорофоров N в этих экспериментах оставалось высоким, что соответствует слабому связыванию актомиозина — состоянию А·М·АДФ·Фн. Сравнение этих по-

ляризационных характеристик с соответствующими характеристиками в экспериментах без CaP-40 указывает на то, что этот белок оказывает лишь незначительное влияние на формирование слабой формы связывания S-1 с актином. Похожие выводы были сделаны при исследовании молекулярных механизмов регуляции актомиозинового взаимодействия гладкомышечным кальпонином позвоночных (El-Mezgueldi, Marston, 1996).

Таким образом, результаты нашей работы свидетельствуют о том, что CaP-40 модулирует конформационные изменения головки миозина, которые происходят в процессе циклической работы поперечных мостиков и подтверждают сходство кальпонины и CaP-40 в отношении ингибирования актомиозиновой АТФазы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 11-04-00244а).

Список литературы

- Добржанская А. В., Матусовская Г. Г., Матусовский О. С., Шелудько Н. С. 2010. Тонкие нити запирающих мышц двусторчатых моллюсков могут содержать кальпонин-подобный белок. Биохимика. 55 (5) : 785—789. (Dobrzhanskaya A. V., Matusovskaya G. G., Matusovsky O. S., Shelud'ko N. S. 2010. Thin filaments of bivalve smooth muscle may contain a calponin-like protein. Biophysics. 55 : 703—706.)
- Левицкий Д. И., Голицына Н. Л., Николаева О. П., Боровиков Ю. С. 1991. Взаимодействие изоформ субфрагмента-1 миозина, содержащих флуоресцентно меченные щелочные легкие цепи, с актином мышечных волокон. Биохимия. 56 (4) : 639—647. (Levitsky D. I., Golitsyna N. L., Nikolaeva O. P., Borovikov Y. S. 1991. Interaction of isoforms of myosin subfragment-1 containing fluorescein-labeled alkaline light chains with muscle fiber actin. Biochemistry (Moscow). 56 : 639—647.)
- Сиренко В. В., Симонян А. О., Добржанская А. В., Шелудько Н. С., Боровиков Ю. С. 2012. 40кДа-белок тонких нитей мидии ингибирует формирование сильных форм связывания миозина с актином в цикле гидролиза АТФ. Биохимия. 77 (8) : 1080—1088. (Sirenko V. V., Simonyan A. H., Dobrzhanskaya A. V., Shelud'ko N. S., Borovikov Yu. S. 2012. 40-kDa actin-binding protein of thin filaments of the mussel *Crenomytilus grayanus* inhibits the strong bond formation between actin and myosin head during the ATPase cycle. Biochemistry (Moscow). 77 : 889—895.)
- Сиренко В. В., Симонян А. О., Добржанская А. В., Шелудько Н. С., Боровиков Ю. С. 2013. 40 кДа-белок тонких нитей мидии изменяет конформацию Ф-актина в АТФазном цикле. Биохимия. 78 (3) : 364 — 374. (Sirenko V. V., Simonyan A. H., Dobrzhanskaya A. V., Shelud'ko N. S., Borovikov Yu. S. 2013. 40-kDa protein from thin filaments of the mussel *Crenomytilus grayanus* changes the conformation of F-actin during the ATPase cycle. Biochemistry (Moscow). 78 : 273—281.)
- Adams S., DasGupta G., Chalovich J. M., Reisler E. 1990. Immunochemical evidence for the binding of caldesmon to the NH₂-terminal segment of actin. J. Biol. Chem. 265 : 19 652—19 657.
- 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.
- Bartegi A., Fattoum A., Kassab R. 1990. Cross-linking of smooth muscle caldesmon to the NH₂-terminal region of skeletal F-actin. J. Biol. Chem. 265 : 2231—2237.
- Borejdo J., Putnam S. 1977. Polarization of fluorescence from single skinned glycerinated rabbit psoas fibers in rigor and relaxation. Biochim. 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. 1999. Conformational changes of contractile proteins and their role in muscle contraction. Int. Rev. Cytol. 189 : 267—301.
- Borovikov Yu. S., Horiuchi K. Y., Avrova S. V., Chacko S. 1996a. Modulation of actin conformation and inhibition of actin filament velocity by calponin. Biochemistry. 35 : 13 849—13 857.
- Borovikov Yu. S., Khoroshev M. I., Chacko S. 1996b. Comparison of the effects of calponin and a 38-kDa caldesmon fragment on formation of the strong-binding state in ghost muscle fibers. Biochem. Biophys. Res. Commun. 223 : 240—244.
- 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.
- Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72 : 248—254.
- Cooke R. 1997. Actomyosin interaction in striated muscle. Physiol. Rev. 77 : 671—697.
- Dobrzhanskaya A. V., Vyatchin I. G., Lazarev S. S., Matusovskaya O. S., Shelud'ko N. S. 2013. Molluscan smooth catch muscle contains calponin but not caldesmon. J. Muscle Res. Cell Motil. 34 : 23—33.
- El-Mezgueldi M., Fattoum A., Deranacourt J., Kassab R. 1992. Mapping of the functional domains in the amino-terminal region of calponin. J. Biol. Chem. 267 : 15 943—15 951.
- El-Mezgueldi M., Marston S. B. 1996. The effects of smooth muscle calponin on the strong and weak myosin binding sites of F-actin. J. Biol. Chem. 271 : 28 161—28 167.
- Fajer P. G., Fajer E. A., Matta J. J., Thomas D. D. 1990. Effect of ADP on the orientation of spin-labeled myosin heads in muscle fibers: a high-resolution study with deuterated spin labels. Biochemistry. 29 : 5865—5871.
- Fiske C. H., Subbarow Y. 1925. The colorimetric determination of phosphorus. J. Biol. Chem. 66 : 375—400.
- Gimona M., Small V. J. 1996. Calponin. In: Biochemistry of smooth muscle contraction. San Diego: Acad. Press. 91—103.
- Horiuchi K. Y., Chacko S. 1991. The mechanism for the inhibition of actin-activated ATPase of smooth muscle heavy meromyosin by calponin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 176 : 1487—1493.
- Jaworowski U., Anderson K. I., Arner A., Engstrom M., Gimona M., Strasser P., Small V. J. 1995. Calponin reduces shortening velocity in skinned taenia coli smooth muscle fibers. FEBS Lett. 365 : 167—171.
- Lu F. W., Freedman M. V., Chalovich J. M. 1995. Characterization of calponin binding to actin. Biochemistry. 34 : 11 864—11 871.
- Marston S. B. 1991. Properties of calponin isolated from sheep aorta thin filaments. FEBS Lett. 292 : 179—182.
- Miki M. 1989. Interaction of Lys-61 labeled actin with myosin subfragment 1 and the regulatory proteins. J. Biochem. (Tokyo). 106 : 651—655.
- Miki M., Walsh M. P., Hartshorne D. J. 1992. The mechanism of inhibition of the actin-activated myosin MgATPase by calponin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 187 : 867—871.
- Nichei T., Mendelson R., Botts J. 1974. Use of fluorescence polarization to observe changes in attitude of S-1 moieties in muscle fibers. Biophys. J. 14 : 236—242.
- Obara K., Szymanski P. T., Tao T., Paul R. J. 1996. Effects of calponin on isometric force and shortening velocity in permeabilized taenia coli smooth muscle. Amer. J. Physiol. 270 : C481—C487.
- Okamoto Y., Sekine T. 1985. A streamlined method of subfragment one preparation from myosin. J. Biol. Chem. 98 : 1143—1145.
- Ponomarev M. A., Timofeev V. P., Levitsky D. I. 1995. The difference between ADP-beryllium fluoride and ADP-aluminum fluoride complexes of the spin-labeled myosin subfragment 1. FEBS Lett. 371 : 261—263.
- Rayment I., Holden H. M., Whittaker M., Yohn C. B., Lorenz M., Holmes K. C., Milligan R. A. 1993. Structure of the ac-

tin—myosin complex and its implications for muscle contraction. *Science*. 261 : 58—65.

Roopnarine O., Thomas D. D. 1996. Orientation of intermediate nucleotide states of indandione spin-labeled myosin heads in muscle fibers. *Biophys. J.* 70 : 2795—2806.

Spudich J. A., Watt S. 1971. Regulation of rabbit skeletal muscle contraction. 1. Biochemical studies of interaction of tropomyosin-troponin complex with actin and proteolytic fragments of myosin. *J. Biol. Chem.* 246 : 4866—4871.

Szent-Gyorgyi A. G. 1949. Free-energy relations, contraction of actomyosin. *Biol. Bull.* 96 : 140—161.

Takahashi K., Hiwada K., Kokobu T. 1986. Isolation and characterization of a 34,000-dalton calmodulin- and F-actinbinding

protein from chicken gizzard smooth muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 141 : 20—26.

Takahashi K., Nadal-Ginard B. 1991. Molecular cloning and sequence analysis of smooth muscle calponin. *J. Biol. Chem.* 266 : 13 284—13 288.

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

Winder S. J., Walsh M. P. 1990. Smooth muscle calponin: inhibition of actomyosin MgATPase and regulation by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 265 : 10 148—10 155.

Поступила 7 V 2014

MODULATION OF S-1 CONFORMATION AND INHIBITION OF THE SKELETAL MUSCLE S-1-ATPASE BY CALPONIN OF THE MUSSEL

V. V. Sirenko,¹ A. H. Simonyan,¹ A. V. Dobrzhanskaya,² N. S. Shelud'ko,² Yu. S. Borovikov^{1, *}

¹ Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, and

² A. V. Zhirmunsky Institute of Marine Biology, Far Eastern Branch of the RAS, Vladivostok;

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

A novel 40 kDa protein has been detected in native thin filaments from catch muscles of the mussel *Crenomytilus grayanus*. In this study, using skeletal muscle actin and S-1, we investigated the effects of the mussel 40-kDa actin-binding protein on the acto·S-1 ATPase activity. On increasing the 40-kDa actin-binding protein (CaP-40) concentration, the actin-activated ATPase activity decreased, and was inhibited 80 % at a CaP-40 to actin ratio of 0.5. Polarized fluorimetry technique and glycerinated muscle fibers were used to study effects of CaP-40 on the orientation and mobility of fluorescent label 1.5-IAEDANS specifically bound to Cys-707 of myosin subfragment-1 in the absence of nucleotide, and in the presence of MgADP or MgATP. We have concluded that CaP-40 binding to actin affects the strong binding of myosin to actin but has no effect on the weak binding. Thus, the influence of the CaP-40 on the formation of strong actomyosin binding forms A·M and A·M·ADP manifests itself by a decrease in the relative content of myosin cross-bridges strongly bound with actin, which probably results in a decrease in the relative content of «switch on» actin monomers in thin filaments. This suggests that, as calponin CaP-40 selects its target the phase of strong actomyosin binding which preceded by a phase generating power stroke.

Key words: calponin-like protein, conformational change of myosin S-1, fluorescence polarization.