

УДК 577.353.2

С.С.Хаймина (5 курс, каф. ФХОМ), Ю.С.Боровиков, д.б.н., зав. лаб. МОКП

## ВЛИЯНИЕ НУКЛЕОТИДОВ НА КОНФОРМАЦИОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ F-АКТИНА, ИНДУЦИРОВАННЫЕ СВЯЗЫВАНИЕМ СУБФРАГМЕНТА 1 МИОЗИНА В ОТСУТСТВИИ И В ПРИСУТСТВИИ КАЛЬДЕСМОНА

В основе мышечного сокращения лежит взаимодействие актина, миозина и аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ). Это взаимодействие сопровождается гидролизом АТФ. Химическая энергия АТФ преобразуется в механическую энергию продольного перемещения актиновых и миозиновых филаментов относительно друг друга. Было показано, что регуляция мышечного сокращения в гладких мышцах осуществляется фосфорилированием легких регуляторных цепей миозина. В работах последних лет было установлено, что белок тонких нитей кальдесмон также принимает участие в этой регуляции [1]. Существуют данные о том, что кальдесмон, связываясь с актином своим С-концевым участком и с миозином N-концевым участком, способен ингибировать АТФ-зависимую активность актомиозинового комплекса [2-4]. Однако молекулярные механизмы регуляции сокращения гладких мышц кальдесмоном изучены недостаточно. Целью настоящей работы было исследование влияния нуклеотидов (MgADP, MgATP, MgAMP-PNP, MgATP $\gamma$ S) на конформационные перестройки актина, индуцированные связыванием субфрагмента 1 миозина, в отсутствие и в присутствии кальдесмона.

Объектом исследования служили теневые волокна, т.е. волокна, из которых избирательно были экстрагированы все белки, кроме Ф-актина. Ф-актиновые нити теневого мышечного волокна модифицировали флуоресцентным красителем FITC-фаллоидином, декорировали тропомиозином, субфрагментом 1 миозина, и часть из них - кальдесмоном. Конформационные изменения актина в мышечных волокнах изучали с помощью адекватного для таких исследований метода поляризационной микрофлуориметрии [5]. Углы ориентации осцилляторов поглощения ( $\Phi_A$ ) и излучения ( $\Phi_E$ ), а также количество хаотически расположенных флуорофоров (N) определяли модель-зависимым методом [6]. Изменение значений  $\Phi_A$ ,  $\Phi_E$  и N рассматривали как показатель конформационных изменений F-актина.

Как следует из рис. 1, в присутствии MgADP или MgAMP-PNP значения угла  $\Phi_E$  уменьшались. Это указывает на то, что под влиянием нуклеотидов мономеры актина вращаются по направлению к оси тонкой нити [7]. Согласно интерпретации, предложенной ранее, такие изменения пространственной организации тонких нитей свидетельствуют о формировании между актином и миозином сильной формы связывания [6,8]. В противоположность этому, MgATP $\gamma$ S и MgATP вызывали увеличение  $\Phi_E$  и N. Следовательно, в этих экспериментах мономеры актина поворачивались от оси волокна, что указывает на формирование между актином и миозином слабой формы связывания.

Кальдесмон заметно модулирует эффекты нуклеотидов. В отсутствие нуклеотидов кальдесмон уменьшает значения угла  $\Phi_E$  и увеличивает N. Похожие значения этих параметров мы наблюдали без кальдесмона, в присутствии MgAMP-PNP. Таким образом, кальдесмон сдвигает структурное состояние актина в актомиозиновом комплексе от сильной формы связывания к слабой форме связывания, стабилизируя структуру актина в этом состоянии.

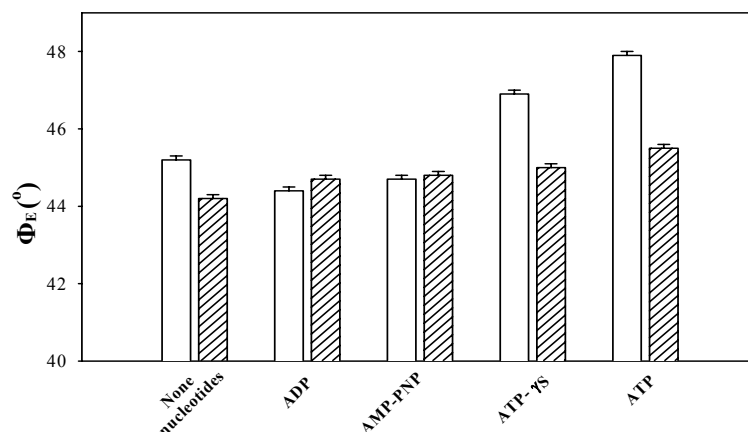


Рис. 1. Влияние нуклеотидов на величину  $\Phi_E$  в присутствии и отсутствие кальдесмона

Таким образом, результаты, полученные в работе, указывают на то, что:

1. Каждому интермедиальному состоянию головки миозина в цикле гидролиза АТФ соответствует определенное структурное состояние актина.
2. Кальдесмон, стабилизируя структуру актина в состоянии, характерном для слабой формы связывания, ингибирует движение мономеров актина на всех стадиях цикла гидролиза АТФ.

#### ЛИТЕРАТУРА:

1. Sobue K., Muramoto Y, Fujita M & Kakiuchi S. (1981) Proc Natl Acad Sci U S A 78, 5652-5.
2. Marston S. B. & Smith C.W.J. (1985) J. Muscle Res. Cell Motil. 6, 669-708.
3. Chalovich J.M., Cornelius P., Benson C.E. (1987) J.Biol. Chem. 262, 571-5716.
4. Marston S. B. & Redwood C. S. (1992) J. Biol. Chem. 267, 16796-16800.
5. Borovikov Yu. S. (1999) Int. Rev. Cytol. 189, 267-301.
6. Borovikov Y S., Kuleva, N V. & Khoroshev, M I. (1991) Gen. Phys. Biophys. 10, 441-459.
7. Bretscher A. (1984) J Biol Chem 259, 12873-80.
8. Prochniewicz-Nakayama E., Yanagida T., Oosawa F. (1983) J. Cell Biol. 97 1663-1667.