

Надмолекулярні форми кінази легких ланцюгів міозину гладеньких м'язів.

2. Кінетика взаємних переходів

А. М. Філенко, В. М. Данилова, А. Собешек¹

Київський університет ім. Тараса Шевченка, НДІ фізіології
252033, Київ, вул. Володимирська, 64

¹ Інститут молекулярної біології Австрійської Академії наук
5020, Зальцбург, вул. Більрогштрассе, 11

У попередній роботі за допомогою методів світлорозсіювання нами було показано, що кіназа легких ланцюгів міозину гладеньких м'язів існує в розчині як рівноважна суміш олігомерної, димерної та мономерної форм, відносна концентрація яких при фізіологічній іонній силі (160 мМ солі) складає відповідно 2, 53 та 45 вагових процентів. У процесі фосфорилування міозину in vivo співвідношення між цими формами кінази, що, ймовірно, відрізняються за своєю активністю, може суттєво змінюватися. У зв'язку з цим важливо знати часові характеристики переходу між ними. Враховуючи той факт, що гель-фільтраційна чи афінна колонки сильно зсувають рівновагу в бік надмолекулярних форм кінази, ми зупиняли елюцію в точках, де переважала одна форма, завдяки чому змогли оцінити час переходу її до рівноважного стану. Одержані дані показують, що олігомер, димер та мономер кінази є досить стабільними структурними одиницями, взаємний перехід між якими в процесі наближення до рівноваги займає час до 10 хв.

Вступ. На відміну від скелетних м'язів регуляція скорочення гладеньких м'язів пов'язана з товстими міозиновими філаментами. Скорочення стає можливим тільки після фосфорилування міозинових молекул кіназою легких ланцюгів міозину гладеньких м'язів (КЛЛМ) — ключовим регуляторним ферментом гладеньких м'язів [1—4].

Раніше за допомогою методів світлорозсіювання нами було показано [5], що КЛЛМ існує в розчині як рівноважна суміш олігомерної, димерної та мономерної форм, відносна концентрація яких при фізіологічній іонній силі (160 мМ солі) складає відповідно 2, 53 та 45 вагових процентів. У разі передінкубації кінази (тобто витримуванні її в активній формі без додаванням субстрату) з субстехіометричними концентраціями кальмодуліну (CaM) її активність зменшується в декілька разів [6], що може бути пов'язане із зміною організації надмолекулярних форм кінази та кількісним пере-

розподілом між ними. Подібні модифікації можуть мати місце також in vivo. В такому випадку важливо знати часові характеристики переходу між різними формами згаданого ферменту. Для цього ми використали той факт, що гель-фільтраційна та CaM-афінна колонки сильно зсувають рівновагу в бік надмолекулярних форм кінази, тому, зупиняючи елюцію в точках, де переважала одна форма, ми змогли оцінити час її переходу в інші форми у процесі наближення до рівноважного стану. Одержані дані вказують на те, що олігомер, димер та мономер кінази є досить стабільними структурними одиницями, взаємний перехід між якими при наближенні до рівноваги займає час до 10 хв.

Матеріали та методи. Виділення білків. КЛЛМ та CaM виділяли із м'язового шлунка індики, як описано в роботах [6—8]. Їхні концентрації визначали, користуючись коефіцієнтами поглинання $A_{278}^{1\%} = 11,4$ та $A_{278}^{1\%} = 1,0$ відповідно для кінази та CaM [9].

Регстрація світлорозсіювання. Зміну світло-

розсіювання елюата в часі на виході з хроматографічної колонки реєстрували, зупиняючи елюцію у певних точках. Використані в досліді хроматографічні колонки та фотометр світлорозсіювання докладно описані в нашій попередній роботі [5]. У досліді використовували буфер наступного складу (в ммоль/л): KCl — 60, NaCl — 100, MgCl₂ — 2; дитіоеритритол (ДТЕ) — 0,5 та імідазол — 10; рН буферу доводили до 7,5 при 4 °С. Інші деталі див. у відповідних підписах до рисунків.

З'єднуючі трубки між хроматографічними колонками і фотометром підбирали по змозі мінімальної довжини з тим, щоб об'єми затримки елюата були мінімальними. Ці об'єми були такі: 0,10 мл — між колонкою та УФ датчиком і 0,16 мл — між УФ датчиком та проточною кюветою фотометра.

Результати та обговорення. Як відзначалося вище, об'єм трубок, що з'єднували вихід колонки з проточною кюветою фотометра, складав біля 0,26 мл. Це означає, що при швидкості елюції 0,25 мл/хв порція елюата, яка виходила з колонки, досягала кювети фотометра приблизно через 1 хв. Одержані в нашій попередній роботі результати [5] свідчать, що різні форми кінази, розділені колонкою (олігомери, димери, мономери), практично зберігаються за цей час. Для детальнішого вивчення їх стабільності ми провели ряд дослідів з зупинкою елюції. На рис. 1 показано зміну світло-

розсіювання елюата на виході з гелі-фільтраційної колонки при зупинці елюції у точках, що відповідають 5 і 4 мл. При координаті елюції 5 мл з колонки виходить практично чистий димер [5]. Отже, зупинка елюції у цій точці дозволяє спостерігати процес переходу димерної форми КЛЛМ у рівноважний стан з утворенням рівноважних кількостей усіх трьох форм кінази. Як видно з рис. 1 (а), цей процес триває біля 10 хв, що вказує на стабільність димерів. Цікаво порівняти результати, одержані при зупинці елюції, з розрахунковими даними. Реєстрація світлорозсіювання порції елюата, що досягає кювети фотометра, починається приблизно через 1 хв після її виходу з колонки. Екстраполяція кривої, наведеної на рис. 1 (а), до моменту виходу елюата з колонки дає початковий рівень світлорозсіювання (що відповідає чистому димеру) $I_n = 0,160$. Крива світлорозсіювання виходить на постійний рівень $I_p = 0,215$, що дорівнює приросту інтенсивності світлорозсіювання $\Delta I = (0,215 - 0,160)/0,160 \cdot 100 = 34\%$. Цей рівень відповідає встановленню в розчині рівноваги між трьома формами кінази. При цьому i -та форма кінази дає вклад у світлорозсіювання $(0,160 \cdot B^i \cdot \delta^i)/100$, де B^i — кількість i -тої форми у вагових процентах, а δ^i — її відносний внесок у світлорозсіювання [5]. Узавши значення цих величин з роботи [5], знаходимо, що вклади олігомера, димера та мономера становлять 0,117, 0,085 і

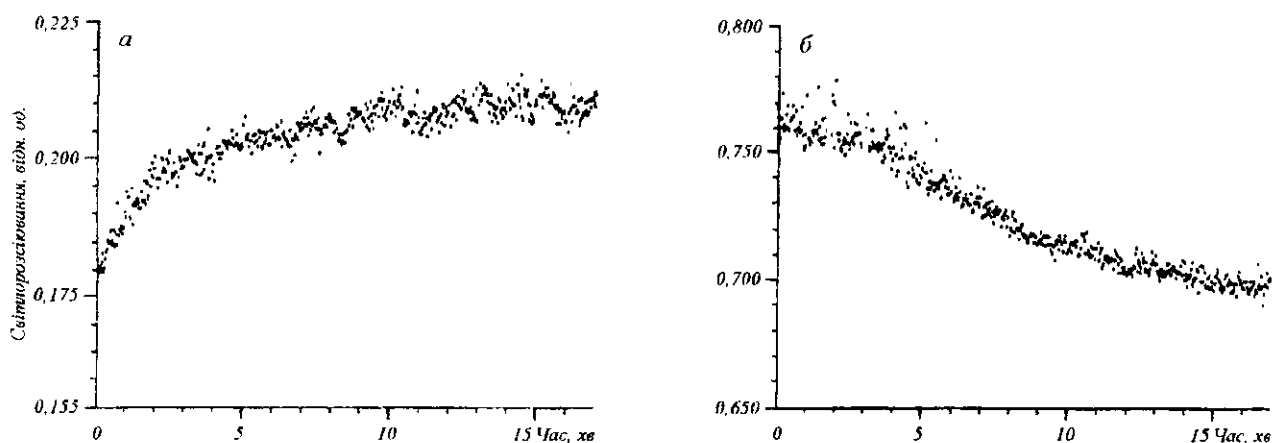


Рис. 1. Криві зміни світлорозсіювання елюата в часі після зупинки елюції на гелі-фільтраційній колонці [5] при координатах елюції: а — 5 мл (чистий димер); б — 4 мл (еквімолярна суміш олігомера і димера). Швидкість елюції 0,25 мл/хв. Порція елюата досягала проточної кювети фотометра приблизно через 1 хв після її виходу з колонки. Світлорозсіювання реєстрували під кутом 90° до падаючого лазерного випромінювання

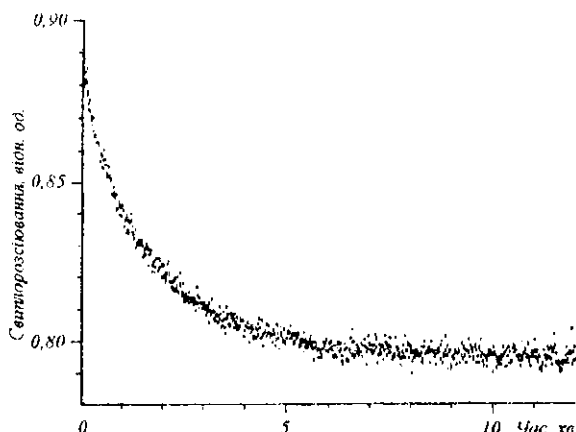


Рис. 2. Залежність в часі світлорозсіювання елюата, що виходить з СаМ-афінної колонки [5], після зупинки елюції в точці 4,5 мл. Швидкість елюції 0,1 мл/хв. Порція елюата досягала проточної кювети фотометра приблизно через 2,5 хв після її виходу з колонки. До стандартного буфера (див. «Матеріали і методи») при завантаженні колонки додавали 0,1 мМ СаCl₂, а при елюції — 2 мМ ЕГТА. Світлорозсіювання реєстрували під кутом 90° до падаючого лазерного випромінювання

0,025. Таким чином, сумарний рівень світлорозсіювання при рівновазі повинен бути 0,227. Це відповідає приросту світлорозсіювання відносно вихідного рівня $[(0,227 - 0,160) / 0,160] \cdot 100 = 42 \%$, що добре узгоджується з експериментальним значенням 34 %.

Попередні спостереження показали, що олігомери стабільніші від димерів. Дійсно, зупинка елюції в точці 4 мл, де в елюаті містяться рівні вагові кількості димерів та олігомерів, але в світлорозсіюванні проявляється практично олігомерна форма [5], дає процес досить повільного зменшення інтенсивності світлорозсіювання (рис. 1, б). Навіть через 17 хв після зупинки елюції світлорозсіювання зменшувалося тільки на 11 %, що вказує на перехід відносно невеликих кількостей олігомера в інші форми кінлази.

Слід, однак, відмітити, що олігомер з меншою в 20 разів молекулярною масою, який елюює з СаМ-афінної колонки [5], характеризується значно нижчою стабільністю (рис. 2), близькою до стабільності димерів (рис. 1, а). Останнє, скоріш за все, вказує на те, що олігомери, які утворюються у процесі гель-фільтрації, об'єднуються в більш стійкі агрегатні структури. Поки що неясно, чи такі структури мають місце в рівноважному стані.

Таким чином, одержані нами дані свідчать, що олігомер, димер та мономер кінлази є досить стабільними структурними одиницями, взаємний перехід між якими при наближенні до рівноваги займає час до 10 хв.

Цю роботу виконано за часткової підтримки Державного фонду фундаментальних досліджень при Міністерстві України у справах науки і технології, проект № 5.4/11.

А. М. Филенко, В. М. Данилова, А. Собешек

Надмолекулярные формы киназы легких цепей миозина гладких мышц. 2. Кинетика взаимных переходов

Резюме

В предыдущей работе с помощью методов светорассеяния нами было показано, что киназа легких цепей миозина гладких мышц существует в растворе как равновесная смесь олигомерной, димерной и мономерной форм, относительная концентрация которых при физиологической ионной силе (160 мМ соли) составляет соответственно 2, 53 и 45 весовых процентов. В процессе фосфорилирования миозина *in vivo* соотношение между этими формами киназы, которые, вероятно, отличаются по своей активности, может существенно изменяться. В связи с этим важно знать временные характеристики перехода между ними. Учитывая тот факт, что гель-фильтрационная или аффинная колонки сильно сдвигают равновесие в сторону надмолекулярных форм киназы, мы останавливали элюцию в точках, где преобладала одна форма, благодаря чему смогли оценить время перехода ее в равновесное состояние. Полученные данные показывают, что олигомер, димер и мономер киназы являются довольно стабильными структурными единицами, взаимный переход между которыми в процессе приближения к равновесию составляет время до 10 мин.

А. М. Filenko, V. M. Danilova, A. Sobieszek

Supramolecular species of smooth muscle myosin light chain kinase. 2. Kinetics of mutual transitions

Summary

In a previous work we have shown using light scattering methods that myosin light chain kinase (MLCK) exists in solution as an equilibrium mixture of oligomeric, dimeric and monomeric species, which relative concentrations at physiological ionic strength constitute correspondingly 2, 53 and 45 weight percent. During myosin phosphorylation *in vivo* the relationship between these kinase species which are possibly different by their activity may significantly change causing the necessity of perceiving time dependent characteristics of the transition between them. To perform the last we used the fact that gel filtration and CaM-affinity columns largely shift the equilibrium towards supramolecular MLCK species. Therefore, by interrupting the elution in the points where the only species was prevailing we could make for this species an estimate of transition time into the equilibrium state. Data obtained have shown that the kinase oligomer, dimer and monomer were rather stable structures so that the mutual transition between them when approaching to the equilibrium took time up to 10 min.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Kamm K. E., Stull J. T. The function of myosin and myosin light chain phosphorylation in smooth muscle // Ann. Rev. Pharmacol and Toxicol.—1985.—25.—P. 593—620.

2. *Marston S. B.* The regulation of smooth muscle contractile proteins // *Progr. Biophys. Mol. Biol.*—1982.—41.—P. 1—41.
3. *Adelstein R. S., Eisenberg E.* Regulation and kinetics of the actin-myosin-ATP interaction // *Ann. Rev. Biochem.*—1980.—19.—P. 921—956.
4. *Small J. V., Sobieszek A.* The contractile apparatus of smooth muscle // *Int. Rev. Cytol.*—1980.—64.—P. 241—306.
5. *Філенко А. М., Данилова В. М., Собешек А.* Надмолекулярні форми кінрази легких ланцюгів міозину гладеньких м'язів. I. Характеристика і процентний розподіл в розчині // *Біополімери та клітина*.—1997.—13.—№ 6.—С. 460—463.
6. *Sobieszek A., Strobl A., Ortner B., Babychuk E.* Ca²⁺-calmodulin-dependent modification of smooth-muscle myosin light chain kinase leading to its co-operative activation by calmodulin // *Biochem. J.*—1993.—295.—P. 405—411.
7. *Sobieszek A., Barylko B.* Enzymes regulating myosin phosphorylation in vertebrate smooth muscle // *Smooth Muscle Contraction* / Ed. N. L. Stephens.—New York: Marcel Dekker, 1984.—P. 283—316.
8. *Sobieszek A.* Regulation of smooth muscle myosin light chain kinase. Allosteric effects and co-operative activation by calmodulin // *J. Mol. Biol.*—1991.—220.—P. 947—957.
9. *Adelstein R. S., Klee C. B.* Purification and characterization of smooth muscle myosin light chain kinase // *J. Biol. Chem.*—1981.—256.—P. 7501—7509.

Надійшла до редакції 13.03.9