

Особливості функціонування міозинової АТРази серцевого м'яза

К. І. Богуцька, О. В. Цимбалюк, В. М. Данилова

Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Вул. Володимирська, 64, Київ, 01033, Україна

Досліджено вплив фізіологічно важливих для скоротливих процесів двовалентних катіонів, іонної сили та рН середовища на активність міозинової АТРази серцевого м'яза. Отримані результати порівняно з результатами вивчення міозину інших типів м'язів — скелетних та гладеньких. Обговорюється залежність фізіологічних властивостей м'язів різних типів від фізико-хімічних та структурних особливостей міозину.

Вступ. Скоротливі системи, характерні для різних типів м'язів, відрізняються за силою скорочення, ефективністю перетворення енергії в механічну роботу та іншими параметрами. На молекулярному рівні ці відмінності проявляються у специфіці структурної організації, фізико-хімічних та ферментативних властивостях міозину — основного скоротливого білка м'язів [1—4].

АТРазна активність міозину є головною функціональною характеристикою, за якою можна судити про скорочення, оскільки процес м'язового скорочення є результатом утворення актоміозинового комплексу та його наступних змін за рахунок енергії, що вивільнюється при ферментативному розщепленні АТР міозином. Але для поглиблення уявлень про молекулярний механізм скорочення м'язів у цілому, на наш погляд, важливими є порівняльні дослідження структурно-функціональних властивостей міозину з різних типів м'язів.

Метою наших досліджень було вивчення особливостей АТР-гідролазної активності міозину серцевого м'яза в порівнянні їх з такими для скелетних та гладеньких м'язів.

Матеріали і методи. Міозин серцевого м'яза бика виділяли за методом Маргосян [5]. Актomioзин екстрагували впродовж 1 год розчином, що містив 0,2 М КСl, 0,15 М трис-НСl, рН 8,0, 1 мМ ЕДТА, 5 мМ MgCl₂, 0,2 мМ PMSF, 1 мМ NaN₃, 3,5 мМ АТР. Екстракт відділяли центрифугуван-

ням при 10000 g протягом 40 хв. Актomioзин осаджували з супернатанту додаванням 10 об'ємів холодної дистильованої води, попередньо довівши величину його рН до 6,2 0,1 н оцтовою кислотою. Білок, який випадав в осад внаслідок цієї процедури («грубий» актоміозин), збирали центрифугуванням при 3000 g протягом 15 хв.

Після розчинення в 40 мМ Na₄P₂O₇, рН 7,5, 1 мМ дитіотрейтолі (ДТТ), 1 мМ NaN₃ та діалізу білок центрифугували (1 год, 100000 g), супернатант наносили на колонку з ДЕАЕ-сефарозою (4 × 45 см), зрівноважену тим же буфером. Елюцію з колонки проводили лінійним градієнтом концентрації (0—0,5 М) NaCl. Загальний об'єм градієнта складав 900 мл. Міозин сходив з колонки в межах концентрацій NaCl 0,07—0,14 М. Фракції цього піка збирали та діалізували проти 0,05 М КСl, 5 мМ імідазолу, рН 6,2, 0,5 мМ ДТТ, 1 мМ NaN₃. Осад міозину, який утворився, збирали центрифугуванням та розчиняли в 0,5 М КСl, 5 мМ трис-НСl, рН 7,5, 1 мМ NaN₃, 0,5 мМ ДТТ. Перед дослідженням міозин освітлювали центрифугуванням при 100000 g (30 хв).

Чистоту та якісний склад одержаних препаратів міозину, які використовували для подальших досліджень, визначали методом електрофорезу в поліакриламідному гелі в присутності додецилсульфату натрію [6].

Активність міозинової АТРази вимірювали при температурі 37 °С та при високій і низькій іонній силі в середовищі загальним об'ємом 1,8 мл такого

складу: 20 мМ імідазол, рН 7,5, 5 мМ CaCl₂, 2,5 мМ MgCl₂, 1 мМ ЕДТА, 0,5 мМ ДТТ, 1 мМ АТР, 0,5 або 0,05 М КСl, 0,14 мг/мл білка, при дослідженні рН-залежності Ca²⁺-АТРазної активності міозину — 20 мМ гістидин або імідазол, або трис, або гліцин, або β-аланін.

Кількість утвореного під час гідролізу АТР неорганічного фосфату визначали за методом Фіске-Суббароу [7]. Активність АТРази міозину виражали в мкмоль Р_n · мг білка⁻¹ · хв⁻¹.

Результати і обговорення. Особливості функціонування різних типів м'язів у значній мірі визначаються фізико-хімічними властивостями та структурою білків скоротливого апарату м'язів. У проведених нами дослідженнях показано відмінності для АТРазної активності міозину в присутності двовалентних катіонів. АТРазну активність міозину вимірювали при високій та низькій іонній силі середовища в присутності іонів кальцію або магнію або за їх відсутності (K⁺, ЕДТА-АТРазна активність). В таблиці наведено відповідні показники активності АТРази міозину серцевого м'яза в порівнянні з міозином скелетних та гладеньких м'язів [3].

Слід відмітити, що за абсолютними величинами АТРазної активності в присутності іонів кальцію міозини з серцевого та скелетних м'язів практично не відрізняються. Але, як видно з даних, наведених у таблиці, АТРазна активність міозину гладеньких м'язів у присутності Ca²⁺ була значно нижчою (в 5 разів), ніж міозину скелетних та серцевого м'язів, і вона, на відміну від смугастих м'язів, підвищувалася із зростанням іонної сили середовища. Тобто, порівняно з міозином серцевого та скелетних м'язів, для яких АТРазна активність вища при низькій іонній силі, для гладеньком'язового міозину вона вища при високій іонній силі. Для міозину з досліджуваних типів м'язів загальною рисою є те, що його АТРазна активність у присутності іонів кальцію відрізняється від такої в присутності іонів магнію більш ніж на два порядки:

іони магнію, на відміну від Ca²⁺, пригнічують АТРазну активність у присутності низьких концентрацій КСl (дані таблиці). Ці два види активності мають і багато спільного — подібну форму рН-залежності, здатність активуватися низькими концентраціями різних модифікаторів [3].

Значні відміни між міозинами з цих типів м'язів ми також спостерігали при дослідженні АТРазної активності у присутності високих концентрацій КСl та ЕДТА, тобто за відсутності двовалентних катіонів (таблиця). Таку активність міозинової АТРази називають K⁺, ЕДТА-активованою АТРазною активністю [8]. Це стан високоактивного ферменту, що за багатьма параметрами імітує стан міозину як ферменту в актоміозиновому комплексі [8].

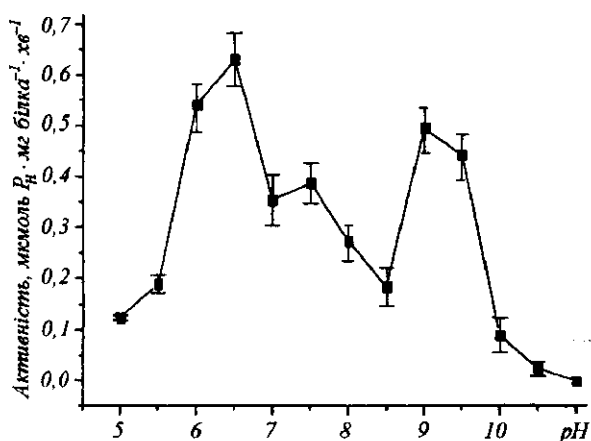
З літератури відомо, що швидкість м'язового скорочення контролюється саме рівнем АТРазної активності міозину [9, 10]. Крім того, АТРазна активність та генерація сили в м'язі також взаємопов'язані: відношення АТРаза/сила є пропорційним швидкості дисоціації генеруючих силу міозинових містків. Воно зменшується впродовж активації кальцієм: АТРаза активується меншими концентраціями Ca²⁺, ніж необхідно для генерації сили [11, 12].

Відомо, що іони кальцію відіграють важливу роль в активації скорочення м'язів, включаючись безпосередньо в реакцію гідролізу АТР. Крім того, вони діють на іон-зв'язуючі ділянки міозину, модулюють актин-міозинову взаємодію, змінюючи функціональні характеристики скоротливого комплексу [1, 4, 11].

Між проявом Ca²⁺-залежності АТРазних властивостей міозину та Ca²⁺-залежним рухом містків існує кореляція [13]. Зокрема, збільшення рухливості містків та їхній відхід від поверхні міозинових ниток при збільшенні концентрації Ca²⁺ корелюють з підвищенням активності актин-активованої АТРази міозину. Вважається, що така взаємозалежність згаданих властивостей — зв'язок між Ca²⁺-за-

АТРазна активність міозину (мкмоль Р_n · мг білка⁻¹ · хв⁻¹, M ± m, n = 9)

Умови	Міозин		
	Скелетних м'язів	Серцевого м'яза	Гладеньких м'язів
5 мМ CaCl ₂ , 50 мМ КСl	0,71 ± 0,049	0,69 ± 0,035	0,12 ± 0,02
5 мМ CaCl ₂ , 0,5 М КСl	0,6 ± 0,025	0,4 ± 0,012	0,23 ± 0,03
2,5 мМ MgCl ₂ , 50 мМ КСl	0,017 ± 0,0038	0,009 ± 0,0018	0,006 ± 0,001
1 мМ ЕДТА, 0,5 М КСl	0,89 ± 0,07	0,52 ± 0,026	0,12 ± 0,01



рН-залежність Ca²⁺-АТРазної активності міозину серцевого м'язу бика

лежними властивостями актин-активованої АТРАзи міозину та рухом містків на поверхні міозинових ниток — може мати суттєве значення для генерації сили та її регуляції у м'язі. Існує класифікація м'язових волокон у залежності від АТРазної активності міозину в присутності Ca²⁺ [14].

Відомо також, що ізольовані легкі ланцюги-2 серцевого м'яза можуть зв'язувати Ca²⁺ [15]. При цьому відбувається зміна їхньої конформації, що суттєво впливає на характер зв'язування з актином. А оскільки в кожній міозиновій голівці є дві ділянки зв'язування з актином, то зв'язування кальцію може визначати, якою саме ділянкою голівка буде взаємодіяти з актином.

Незважаючи на те, що вивчення природи залежності функціональних властивостей м'язів від рН є предметом досліджень вже досить давно, питання про механізм впливу рН на взаємодію міозинових та актинових філаментів ще до кінця не з'ясовано. Тому наступним етапом нашої роботи було дослідження залежності Ca²⁺-АТРазної активності міозину серцевого м'яза від рН середовища та порівняння її з даними літератури стосовно гладеньких та скелетних м'язів. З рисунка видно, що міозинова АТРаза міокарду має два максимуми активності: при рН 6,0—6,5 та 9,0—9,5. Якщо порівнювати ці значення з аналогічними для міозинів з гладеньких та скелетних м'язів, то вони збігаються: характер зміни Ca²⁺-АТРазної активності в залежності від рН однаковий. Відмінності спостерігаються лише за абсолютними значеннями активності: при рН 6,0—6,5 Ca²⁺-АТРазна активність міозину з гладеньких та серцевого м'язів

практично збігається, для міозину із скелетних м'язів за цих умов вона дещо нижча. При рН 9,0—9,5 Ca²⁺-АТРазна активність вища для міозину зі скелетних м'язів, максимум АТРазної активності для міозину міокарду займає проміжне положення між скелетном'язовим та гладеньком'язовим міозинами [3]. Таке варіювання в максимумах АТРазної активності, найвірогідніше, обумовлене амінокислотним складом міозинів з цих типів м'язів. Так, при дослідженні препаратів міозину з гладеньких м'язів показано, що амінокислотна послідовність його легких ланцюгів дещо відрізняється від такої міозину скелетних м'язів та серця [16]. Властивості міозину переважно корелюють з певним складом його легких ланцюгів і це в деякій мірі визначає специфіку особливостей міозину в різних м'язових клітинах.

Таким чином, спираючись на літературні дані і отримані нами результати, можна стверджувати, що в загальних рисах структурна організація міозину з гладеньких, серцевого та скелетних м'язів подібна: молекула міозину ферментативно розщеплюється на легкий та важкий мероміозини, може дисоціювати на важкі та легкі ланцюги, які мають приблизно однакову молекулярну масу, константу седиментації для всіх типів м'язів. Але є й суттєві відмінності за кількістю легких ланцюгів, їхнім амінокислотним складом, значеннями АТРазної активності в присутності двовалентних катіонів. Різниця також виявляється в електрофоретичній рухливості нативних міозинових молекул, конформаційній стабільності міозину, а також інтермедіатних станах при взаємодії з АТФ [3, 6, 17]. Всі ці розбіжності можуть проявлятися у функціонуванні міозинових молекул з різних типів м'язів, на основі чого правомірне припущення стосовно існування певних відмін у структурі активного центра міозинових АТРаз різного походження. Виходячи з цього ми також припускаємо, що особливості тонкої структурної організації і функціонування міозинової молекули, в свою чергу, обумовлюють специфіку функціонування серцевого, скелетних та гладеньких м'язів. А дослідження особливостей скоротливої активності м'язів різних типів є необхідним для розробки нових фармакологічних препаратів, дія яких спрямована на корекцію можливих м'язових патологій.

K. I. Bogutska, O. V. Tsimbalyuk, V. M. Danilova

Peculiarities of cardiac muscle myosin ATPase functioning

Summary

The influence of divalent cations physiologically important for contraction, ionic strength and pH of medium on the cardiac muscle

myosin ATPase activity has been investigated. The results obtained have been compared with those for myosin of other muscle types such as skeletal and smooth. The dependence of physiological properties of different muscle types on physical, chemical and structural peculiarities of myosin is discussed.

Е. И. Богуцкая, О. В. Цимбалюк, В. М. Данилова

Особенности функционирования миозиновой АТФазы сердечной мышцы

Резюме

Исследовано влияние физиологически важных для сократительных процессов двухвалентных катионов, ионной силы и рН среды на активность миозиновой АТФазы сердечной мышцы. Проведено сравнение полученных результатов с результатами изучения миозина других типов мышц — скелетных и гладких. Обсуждается зависимость физиологических свойств мышц разных типов от физико-химических и структурных особенностей миозина.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Поглазов Б. Ф., Левицкий Д. И. Миозин и биологическая подвижность.—М.: Наука, 1982.—160 с.
2. Sieck G. C., Regnier M. Invited review: Plasticity and energetic demands of contraction in skeletal and cardiac muscle // J. Appl. Physiol.—2001.—90, N 3.—P. 1158—1164.
3. Данилова В. М., Трегубов В. С. Сравнительное изучение структурно-функциональных свойств миозина скелетных и гладких мышц млекопитающих // Молекуляр. генетика и биофизика.—1988.—№ 13.—С. 88—95.
4. Gordon A. M., Homsher E., Regnier M. Regulation of contraction in striated muscle // Physiol. Rev.—2000.—80, N 2.—P. 853—924.
5. Margossian S. S. Reversible dissociation of dog cardiac myosin regulatory light chain and its influence on ATP hydrolysis // J. Biol. Chem.—1985.—260, N 25.—P. 13747—13754.
6. Дубонос В. М., Данилова В. М., Галушко В. О., Трегубов В. С., Богач П. Г. Порівняльні електрофоретичні дослідження нативного та обробленого додецилсульфатом натрію міозину з гладеньких і скелетних м'язів // Укр. біохім. журн.—1977.—49, № 5.—С. 109—114.
7. Fiske C. H., Subbarou I. J. The colometric determination of phosphorus // J. Biol. Chem.—1925.—66, N 6.—P. 375—400.

8. Петушкова Е. В., Гришин М. Н., Баранова Л. А., Гуляев Н. Н. О повышении избирательности к структуре субстрата при переходе от Ca^{2+} -активируемой к K^{+} , ЭДТА-активируемой нуклеозидтрифосфатазной активности тяжелого меромиозина // Биохимия.—1988.—53, № 1.—С. 143—149.
9. Lienne C., Travers F., Barman T. Mechanochemical coupling in muscle: attempts to measure simultaneously shortening and ATPase rates in myofibrils // Biophys. J.—1996.—70.—P. 887—895.
10. Lienne C., Stehle R., Travers F., Barman T. Cryoenzymic studies on an organized system: myofibrillar ATPases and shortening // Biochemistry.—1999.—38, N 26.—P. 8512—8520.
11. Allen K., Xu Y. Y., Kerrick W. G. Ca^{2+} measurements in skinned cardiac fibers: effects of Mg^{2+} on Ca^{2+} activation of force and fiber ATPase // J. Appl. Physiol.—2000.—88, N 1.—P. 180—185.
12. Brenner B., Eisenberg E. The rate of force generation in muscle: correlation with actomyosin ATPase in solution // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1986.—83.—P. 3542—3546.
13. Подлубная З. А., Малышев С. Л., Лукоянова Н. А., Вишневецкая З. И., Удальцов С. Н., Степковский Д., Конколь Н. Корреляция между Ca -зависимым движением мостиков в миозиновых нитях и Ca -чувствительностью актин-активируемой АТФазы миозина скелетных мышц // Биофизика.—1996.—41, № 1.—С. 58—63.
14. Schaub M. C., Brunner U. T., Scheethess C. V., Neidhart M., Baumann H. Adaptation of contractile protein in human heart and skeletal muscle // Biomed. et biochim. acta.—1989.—48, N 5/6.—P. S306—S312.
15. Metzger J. M., Moss R. L. Myosin light chain 2 modulates calcium-sensitive cross-bridge transitions in vertebrate skeletal muscle // Biophys. J.—1992.—63.—P. 460—468.
16. Левицкий Д. И. Легкие цепи миозина и их роль в регуляции мышечного сокращения // Успехи биол. химии.—1986.—27.—С. 74—100.
17. Богач П. Г., Зима В. Л., Данилова В. М., Минченко П. Г., Куликова Н. В. Структурные и функциональные изменения миозина из гладких и скелетных мышц при взаимодействии с АТФ и двухвалентными ионами // Укр. биохим. журн.—1981.—53, № 5.—С. 9—12.

УДК 577.3

Надійшла до редакції 24.07.01