

Надмолекулярні форми кінази легких ланцюгів міозину гладеньких м'язів.

1. Характеристика і процентний розподіл у розчині

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

НДІ фізіології Київського національного університету ім. Тараса Шевченка
252017, вул. Володимирська, 64

¹ Інститут молекулярної біології Австрійської Академії наук
Зальцбург, Австрія

У даній роботі за допомогою методів світлорозсіювання показано, що апофермент кінази легких ланцюгів міозину гладеньких м'язів існує в розчині як суміш олігомерної, димерної та мономерної форм, відносна концентрація яких при фізіологічній іонній силі (160 мМ солі) складає відповідно 2, 53 та 45 вагових процентів. Після активації кінази кальмодуліном не виявлено помітних змін у їхньому процентному розподілі незалежно від того, кіназа чи кальмодулін були в розчині в надлишку. Аналіз одержаних даних дозволяє зробити висновок, що найімовірнішою структурою олігомера є спірально-звиваний сексамер, розміри якого добре узгоджуються із спіральною структурою самозібраних міозинових філаментів.

Вступ. Кіназа легких ланцюгів міозину (КЛЛМ) — це ключовий регуляторний фермент гладеньких м'язів. При стимуляції м'язової клітини, коли концентрація внутрішньоклітинного кальцію зростає від 0,14 до 0,5—0,7 мМ [1], кальмодулін (CaM) насичується іонами кальцію. При цьому його спорідненість до КЛЛМ зростає приблизно в 10^6 разів, що призводить до утворення активного комплексу Ca^{2+} — CaM — КЛЛМ. Активована кіназа фосфорилує регуляторний легкий ланцюг (РЛЛ) міозину і тільки після цього голівки міозину можуть взаємодіяти з філаментами актину, забезпечуючи скорочення гладеньком'язових клітин [2—5].

КЛЛМ повністю неактивна у відсутності Ca^{2+} та CaM. Результати численних досліджень [6—9] дозволяють стверджувати, що кіназа пригнічується псевдосубстратним доменом, амінокислотна послідовність якого гомологічна ділянці фосфорилування РЛЛ. CaM-зв'язуюча ділянка кінази є частиною псевдосубстратного домена, тому при зв'язуванні

CaM цей домен вилучається із активного центра кінази і остання стає активною. Така гіпотеза регуляції КЛЛМ була підтверджена дослідями на фрагментах КЛЛМ [8, 9]. Так, було показано, що кіназу з частково вилученою ділянкою зв'язування CaM неможливо перевести в активну форму, тоді як фрагменти з вилученим псевдосубстратним доменом повністю активні у відсутності Ca^{2+} та CaM. На активність кінази, окрім самопригнічення псевдосубстратним доменом, можуть впливати також додаткові конформаційні зміни її структури, про що свідчать досліді з використанням мутантних форм кальмодуліну [10].

У живій клітині існують механізми модифікації активності кінази. Один із них — фосфорилування КЛЛМ cAMP-залежною протеїнкіназою, яке призводить до зменшення її активності [11]. Наші попередні дослідження *in vitro* показали, що в разі передінкубації кінази (перед додаванням субстрату) з субстехіометричними концентраціями Ca^{2+} — CaM її активність може зменшуватися в декілька разів. Припускалося, що така модифікація може бути пов'язана із зміною надмолекулярної ор-

ганізації кінази [12]. Модифікації подібного типу можуть мати місце *in vivo*, виконуючи роль тонкої настройки активності ферменту. Метою даної роботи було вивчення особливостей надмолекулярної організації КЛЛМ з використанням методів світлорозсіювання, які практично не вносять змін до структури досліджуваних білкових систем.

Матеріали і методи. Виділення білків. КЛЛМ та СаМ виділяли із м'язового шлунка індики, як описано в роботах [12—14]. Їхні концентрації визначали, користуючись коефіцієнтами поглинання $A_{278}^{1\%} = 11,4$ та $A_{278}^{1\%} = 1,0$ для кінази та СаМ відповідно [15].

У досліджах використовували буфер наступного складу (в ммоль/л): KCl — 60, NaCl — 100, MgCl₂ — 2; дитіосеритритол (ДТЕ) — 0,5 та імідазол — 10; рН буферу доводили до 7,5 при 4 °С. Інші деталі див. у відповідних підписах до рисунків.

Лазерна кореляційна спектроскопія (ЛКС). Прилад, який використовували в досліджах, включав гелій-неоновий лазер («Spectrophysics, США») з довжиною хвилі 632,8 нм, гоніометр ALV/SP-86 («Optimization GmbH», ФРН) і корелятор K7032 («Malvern Instruments Ltd.», Англія). Розсіюване випромінювання збиралося за допомогою системи лінз під прямим кутом до променя лазера. Розчини КЛЛМ перед їх заливкою у кювету приладу очищали від пилу, пропускаючи через фільтр Millipore (0,22 мкм). Отримані дані аналізували на персональному комп'ютері IBM у відповідності до процедури регуляризації, описаної в роботі [16]. Використання даних ЛКС разом з математичною програмою регуляризації дозволяло одержати інформацію про ефективні гідродинамічні діаметри частинок та їх відносний розподіл.

Реєстрація багатокутового світлорозсіювання. У процесі слюції кінази розраховували середньозважені молекулярні маси (M_w) та середньоквадратичні радіуси (СКР) її часток. Для цього використовували систему швидкісної рідинної хроматографії білків (ШРХБ) («Pharmacia», Швеція) разом з багатокутовим фотометром світлорозсіювання Wyatt DAWN, модель F («Wyatt Technology Corporation», США). У приладі як джерело випромінювання використано лазер з довжиною хвилі 632,8 нм. Аналогові сигнали з виходів 18 світлочутливих фотодіодів, розміщених під різними кутами до падаючого лазерного променя, подавалися через 19-канальний аналого-цифровий перетворювач на комп'ютері IBM.

19-й канал використовували для сигналу від датчика ультрафіолетового випромінювання (УФ датчик), чутливого до маси білка, що слюювався.

Датчик знаходився між колонкою і проточною кюветою фотометра. Стандартна базова система ШРХБ включала наступні елементи: контролер GP-250, прецизійні помпи P-500, вентиль V-7 з петлею на 500 мл, реєструючий прилад REC-102, УФ датчик UV-1 та колонку. Довжину з'єднуючих трубок між колонкою і фотометром робили якнайменшою заради максимального зменшення об'єму затримки елюента. Ці об'єми затримки складали: 0,10 мл — між колонкою та УФ датчиком і 0,16 мл — між УФ датчиком та проточною кюветою фотометра. В досліджах використовували гел'фільтраційну та СаМ-афінну колонки. Гел'фільтраційну колонку (0,6 × 28 см) заповнювали сефакрилом S-300 («Pharmacia»). СаМ-афінну колонку (0,5 × 4 см) готували із очищеного СаМ, одержаного із м'язового шлунка індики, та CN-Br-активованої сефарози 4B-CL у відповідності з рекомендаціями виробника сефарози («Pharmacia»). Всі розчини перед їх використанням для хроматографії ретельно дегазували і пропускали через фільтр Millipore (0,22 мкм).

Збір даних щодо світлорозсіювання та їх аналіз здійснювали на комп'ютері типу IBM-486 з використанням програм Wyatt ASTRA та Wyatt EASI, які надходили разом з Wyatt-фотометром. При цьому для приросту коефіцієнта заломлення приймали значення $dn/dc = 0,17$ мл/г, а другий віріальний коефіцієнт A_2 приймали рівним нулю.

Результати та обговорення. Розподіл різних форм КЛЛМ у розчині за рівноваги. Метод ЛКС дозволяє виявляти розподіл різних молекул чи надмолекулярних утворень у розчині за їх розмірами. Необхідно однак відмітити, що використана в методі ЛКС програма регуляризації розроблена для частинок сферичної форми. Тому одержані цим методом розміри молекул близькі до справжніх тільки для глобулярних білків. У випадку, коли форма білка далека від сферичної, одержаний гідродинамічний діаметр буде досить умовною величиною. Це в повній мірі відноситься до КЛЛМ, яка, за даними Аузіо та співавт. [17], є стрижневидною молекулою довжиною 50 і діаметром 2,2 нм. Типову картину розподілу часток КЛЛМ за розмірами наведено у попередній роботі [18]. Всі одержані нами дані зібрані у табл. 1. Ці дані свідчать, що в розчині присутні три типи часток кінази з гідродинамічними діаметрами (середньоарифметичні значення) D_{av} 8,8; 20,2 і 158,8 нм. Відмітимо, що за розмірами (60 × 2 нм) субфрагмент-2 (С-2) важкого мероміозину близький до КЛЛМ [19]. За даними методу ЛКС, гідродинамічний діаметр для С-2 становить 10,8 нм [20], що близько до значення $D_{av} = 8,8$ нм для КЛЛМ (див. табл. 1). Це

Таблиця 1

Середні гідродинамічні діаметри (D_{av} , нм) різних форм кінази із м'язового шлунка індика та їхній внесок у світлорозсіювання (%) при різних співвідношеннях кінази і кальмодуліна

№ досліду	№ виміру	D_{av}^*	%	D_{av}^{**}	%	D_{av}^{***}	%
<i>4,9 мкМ КЛЛМ, без СаМ</i>							
1	1	162,0	56	21,2	32	7,5	12
	2	185,4	51	25,8	32	10,1	17
	3	172,4	45	18,6	41	8,2	14
<i>4,9 мкМ КЛЛМ, 0,2 мМ ЕГТА, 12,7 мкМ СаМ</i>							
2	1	155,4	51	19,7	38	8,8	11
	2	157,6	51	18,6	39	7,1	10
	3	126,5	49	21,5	36	6,7	15
<i>+ 0,4 мкМ СаCl₂</i>							
	4	151,3	54	16,9	34	8,9	12
	5	155,7	59	27,1	35	8,5	6
	6	182,2	50	16,6	37	9,4	13
	7	154,5	47	20,3	45	11,3	8
<i>4,9 мкМ КЛЛМ, 0,2 мМ ЕГТА, 1,5 мкМ СаМ</i>							
3	1	161,7	62	16,9	32	6,4	6
	2	151,2	53	24,1	37	9,0	10
	3	140,5	50	18,3	36	7,8	14
<i>+ 0,4 мкМ СаCl₂</i>							
	4	124,6	46	22,7	42	8,2	12
	5	159,0	57	17,9	34	9,9	9
	6	157,0	55	16,3	37	8,9	8
	7	193,8	53	21,5	40	8,9	7
Середньоарифметичне значення		158,8	52,3	20,2	36,9	8,8	10,8

Примітка. D_{av}^* , D_{av}^{**} , D_{av}^{***} — середні гідродинамічні діаметри олігомера, димера і мономера кінази відповідно. Тривалість кожного виміру 2 хв. Виміри від 1 до 3 та від 4 до 7 проводилися неперервно в автоматичному режимі. Введення в кювету СаCl₂ між 3-м і 4-м вимірами в досліджах 2 і 3 займало біля 40 с. Дані щодо процентного вкладу в світлорозсіювання різних часток кінази скоректовано на світлорозсіювання часток пилу.

дозволяє ідентифікувати частку з цим значенням D_{av} як мономер. Димер кінази приблизно в два рази більший від мономера [17], тому ми ідентифікували частку з $D_{av} = 20,2$ нм як димер. Частка з $D_{av} = 158,8$ нм має відповідати олігомерам кінази.

У табл. 1 зібрані дані, одержані методом ЛКС для апоферменту КЛЛМ (СаМ відсутній) і для різних молярних співвідношень між КЛЛМ та СаМ

до і після утворення активного комплексу. Через малі розміри молекул кальмодуліну і невелику його концентрацію внесок цього білка в світлорозсіювання в умовах нашого дослідження практично не виявлявся. У процесі досліджень важливо було в'яснити, як впливає активація кінази та її перерідінкубація (витримування активного комплексу Са²⁺ — СаМ — КЛЛМ без субстрата) на структуру

надмолекулярних комплексів кінрази та їх процентне співвідношення. Оскільки при високих концентраціях кінрази її активність за час передінкубації не пригнічувалася [14], ми обмежили наші виміри відносно низькими концентраціями кінрази і досить короткими інтервалами часу (2 хв). Ці умови далекі від оптимальних для методу ЛКС, внаслідок чого розкид одержаних даних досить великий (див. табл. 1). Однак одержані дані показують, що зв'язування Ca^{2+} —СаМ з кінзозою як при високих, так і при низьких відношеннях КЛЛМ до СаМ, а також передінкубація протягом 8хв практично не впливають на розміри часток ферменту та їхнє процентне співвідношення у розчині.

Розподіл різних форм кінрази в елюаті і їх характеристика. Метод світлорозсіювання під різними кутами було використано для одержання інформації про молекулярну масу та кількісний розподіл різних форм кінрази в процесі її елюції з короткої гелі-фільтраційної колонки. Використана в досліді колонка була занадто короткою, а елюція досить швидкою для повного розділення різних форм кінрази. У цих досліді головна функція колонки, окрім видалення частинок пилу, полягала в одержанні неперервного розподілу кінрази за концентрацією. На рис. 1 наведено характерні профілі елюції, одержані за допомогою УФ датчика, що входить у комплект ШРХБ (крива 1), і фотометра світлорозсіювання Wyatt DAWN (крива 2). Для монодисперсної системи ці криві повинні збігатися з точністю до деякого постійного коефіцієнта [21]. У нашому випадку вони не були ідентичними і мали складну форму внаслідок перекривання кількох піків елюції. Використовуючи результати для монодисперсних систем (полістирол з $M_w = 30$ та $M_w = 200$ кДа і бичачий сироватковий альбумін), ми розклали ці криві на окремі монопіки елюції (рис. 1). Аналогічне розділення на окремі компоненти здійснювали при аналізі складних профілів теплопоглинання [22]. Основні вимоги при цьому такі: монопіки в сумі мають давати вихідну криву елюції, а відповідні один одному монопіки світлорозсіювання та УФ поглинання мають збігатися з точністю до деякого постійного коефіцієнта.

Як видно з рис. 1, профіль УФ поглинання (крива 1) розділяється на три монопіки, що перекриваються між собою, з максимумами при 3,8 (монопик a^0), 5,0 (монопик a^d) і 6,5 мл (монопик a^m). Виходячи з їх положення на кривій елюції, ці монопіки слід віднести відповідно до олігомерної, димерної та мономерної форм кінрази. На профілі світлорозсіювання їм відповідають монопіки s^0 , s^d та s^m . Пік s^L обумовлений світлорозсіюванням великих агрегатів кінрази або/і «уламків» наповнюва-

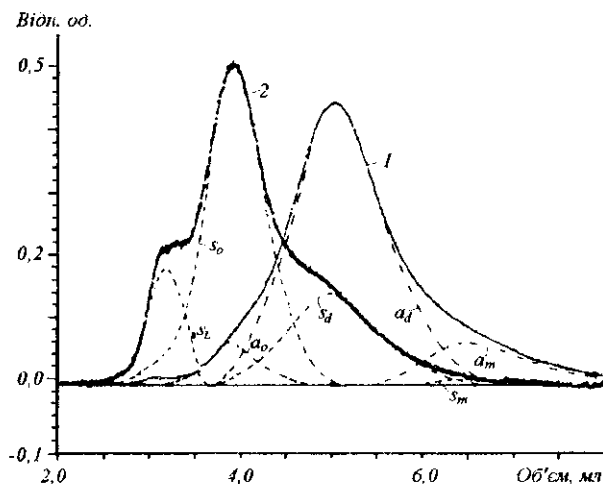


Рис. 1. Профілі елюції КЛЛМ на гелі-фільтраційній колонці, одержані за допомогою УФ поглинання та світлорозсіювання, та їх розділення на монопіки (внески від окремих форм кінрази). Коротку колонку, наповнену сефакрилом S-300, було з'єднано послідовно з УФ датчиком та фотометром DAWN Wyatt (деталі див. у розділі «Матеріали і методи»: 1 — УФ поглинання; 2 — світлорозсіювання під кутом 90° ; a та s — монопіки поглинання та світлорозсіювання відповідно, де індексами позначено олігомери (o), димери (d) чи мономери (m). На колонку наносили 0,56 мг (500 мкл) кінрази. Тут та для інших рисунків, якщо не застережено окремо, швидкість елюції 0,25 мл/хв

ча колонки, оскільки він елює у порожньому об'ємі. На кривих елюції можна виділити невеликі ділянки, де монопіки не перекриваються. Вони відповідають чистим внескам олігомера (3,7—3,8 мл), димера (5,1—5,6 мл) і мономера (6,8—7,5 мл). Ці ділянки можна використати для розрахунку відносного вкладу окремих форм кінрази в світлорозсіювання. Однак точніші результати ми одержали з відношення площ відповідних монопиків (табл. 2).

Як видно з табл. 2, при однакових концентраціях (у ваг.%) олігомер розсіює світло у 35 разів сильніше від димера, а світлорозсіювання мономера приблизно втричі слабкіше, ніж димера. Великий вклад олігомерів у криві світлорозсіювання добре видно також з рис. 1, де на виході з колонки світлорозсіювання олігомерів переважає, хоча їхній процентний вклад складає тільки 5,26 проти 81,51 і 13,23 для димерів та мономерів відповідно. Використовуючи дані методу ЛКС щодо процентного внеску окремих форм кінрази у світлорозсіювання при рівноважному стані (див. табл. 1) та значення

Таблиця 2

Внесок різних форм кінази в профілі елюції для гелі-фільтраційної колонки

Тип часток кінази	Олігомер	Димер	Мономер
Площа монопіка розсіювання (s^i)*	122,0	53,6	3,0
Площа монопіка УФ поглинання (a^i)*	11,0	170,6	27,7
Вміст в елюаті (ваг.%)**	5,26	81,51	13,23
Відносний внесок у світлорозсіювання (δ^i)***	35,3	1,0	0,345

Примітка. *Площу монопіків (див. рис. 2) визначали зважуванням. Індекс i приймає значення o (олігомер), d (димер) або m (мономер); **Визначали з площі окремих монопіків УФ поглинання a^i , приймаючи сумарну площу всіх монопіків (рівну площі кривої УФ поглинання) за 100 %; ***Цей параметр, який вираховували із співвідношення δ^i (пл. s^i /пл. a^i):(пл. s^d /пл. a^d), дає відношення світлорозсіювання олігомера та мономера кінази до світлорозсіювання димера за умови, що концентрації усіх трьох форм (у ваг. %) рівні.

Таблиця 3

Вміст різних форм кінази в розчині у стані рівноваги

Тип часток кінази	Олігомер	Димер	Мономер
Внесок у світлорозсіювання (I^i) при рівновазі, %*	52,3	36,9	10,8
Відносний внесок у світлорозсіювання (δ^i)**	35,3	1,0	0,345
Вміст у розчині (B^i) при рівновазі (ваг.%)***	2,13	52,95	44,92

Примітка. *Дані, що є середньоарифметичними значеннями 17 дослідів, взято з табл. 1. Значення індексів i див. примітку до табл. 2; **Дані взято з табл. 2; ***Концентрації різних форм кінази при рівновазі у вагових процентах розраховували із співвідношення $B^i = [(I^i/\delta^i):(I^o/\delta^o + I^d/\delta^d + I^m/\delta^m)] \cdot 100$.

δ^i їхніх відносних вкладів у світлорозсіювання (див. табл. 2), ми розраховали вміст цих форм (у ваг. %) при рівновазі (табл. 3).

Залежність M_w та СКР від координати елюції. На рис. 2 наведено залежності M_w та СКР від координати елюції (криві 1), розраховані за допомогою програм Wyatt ASTRA та Wyatt EASI. Ці криві мають характерну S-подібну форму. Розрахунки для інтервалу елюції 6,3—7,0 мл менш надійні внаслідок слабого світлорозсіювання, та все ж вони свідчать про наявність мономерів з відомою для кінази молекулярною масою 110 кДа. Одержані дані, однак, не дозволяють знайти СКР для мономера. Розрахунки, отримані для кожного зрізу елюції в інтервалі від 3 до 5,2 мл, через перекривання піків олігомера та димера дають середньозважені значення M_w та СКР. Ці величини поступово змінюються вздовж профілю елюції відповідно до зміни вагового співвідношення між ди-

мером та олігомером. Характерною особливістю цих кривих є швидке зростання M_w (приблизно в 100 разів) при зменшенні координати елюції від 5,2 до 3,8 (див. рис. 2, а), що супроводжується відносно невеликим збільшенням СКР — від 22 до 80 нм (див. рис. 2, б). Це, очевидно, вказує на існування форм кінази, що дуже сильно різняться за молекулярною масою при досить близьких розмірах. Наші оцінки M_w та СКР для олігомера та димера кінази (табл. 4) ґрунтуються на даних для інтервалів елюції, що відповідають одній формі кінази (див. рис. 1), і на результатах, наведених на рис. 2. Слабке світлорозсіювання мономера не дозволило одержати для нього таких оцінок.

На рис. 1 та 2 ілюструються дані для неактивного апоферменту кінази (без CaM). Однак результати, одержані для різних співвідношень апоферменту і CaM, виразно свідчать про те, що зв'язування CaM кіназою мало впливає як на профілі

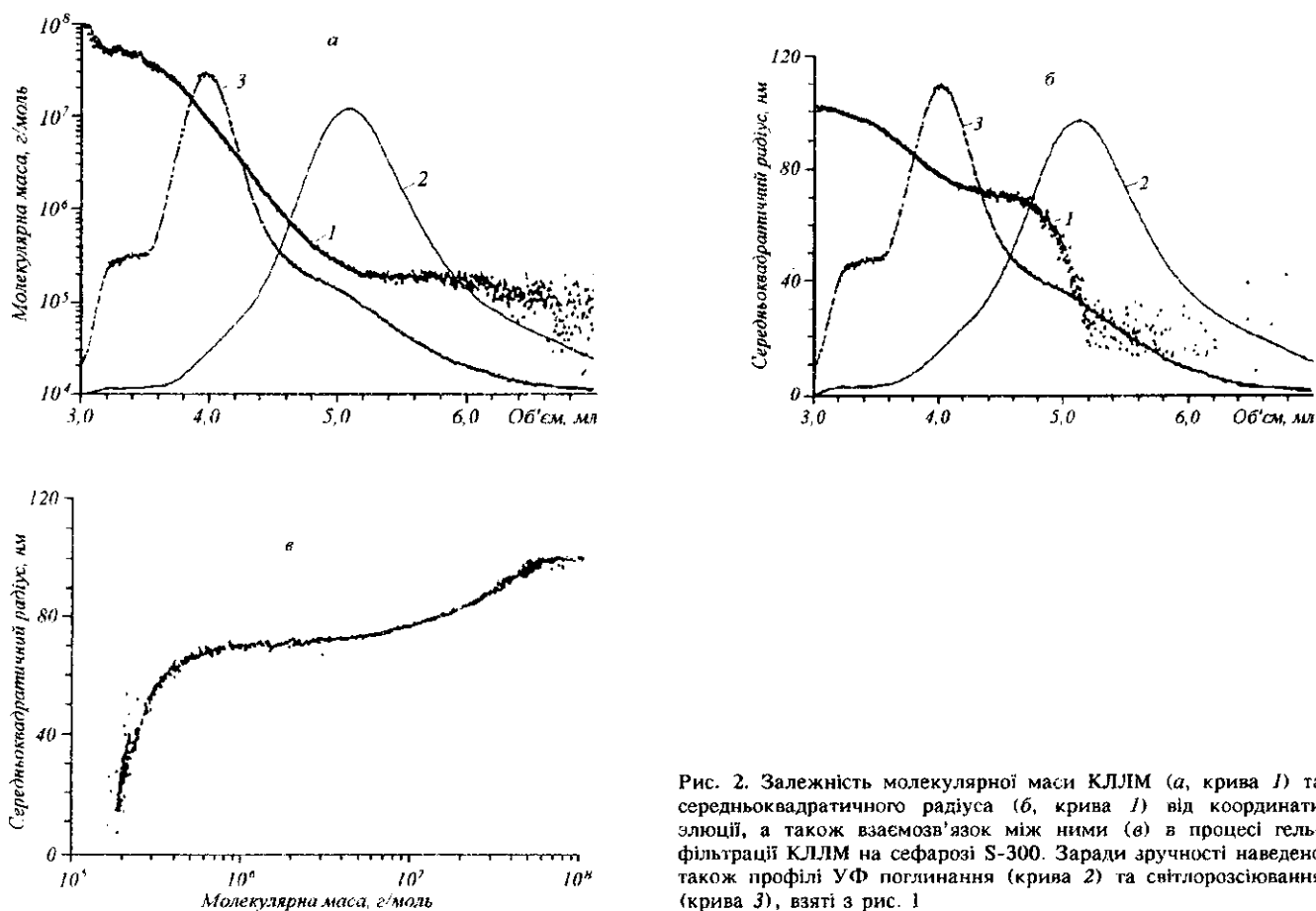


Рис. 2. Залежність молекулярної маси КЛЛМ (а, крива 1) та середньоквадратичного радіуса (б, крива 1) від координати елюції, а також взаємозв'язок між ними (в) в процесі гел'єфільтрації КЛЛМ на сефарозі S-300. Заради зручності наведено також профілі УФ поглинання (крива 2) та світлорозсіювання (крива 3), взяті з рис. 1

Таблиця 4

Молекулярна маса та середньоквадратичний радіус (СКР) для олігомера та димера КЛЛМ

Тип часток	Інтервал на кривій елюції, мл	Молекулярна маса, Да	СКР, нм
Олігомер	3,7—3,8	$2,00 \cdot 10^7$	80
Димер	5,2—5,7	$2,00 \cdot 10^5$	22

елюції (рис. 3, суцільні криві), так і на характер залежності M_w (див. рис. 3) та СКР (даних не наведено) від координати елюції.

Залежність M_w та СКР від координати елюції для СаМ-афінної колонки. На рис. 4 показано профілі елюції та залежності M_w та СКР від координати елюції для СаМ-афінної колонки. При наявності іонів Ca^{2+} КЛЛМ зв'язується з СаМ, ковалентно зшитим з матрицею колонки. Елюцію кінази здійснювали розчином, що містив EGTA. Як

видно з рис. 4, а, обидва профілі елюції (УФ поглинання і світлорозсіювання) майже збігаються. Це вказує на те, що в елюаті присутня практично одна форма кінази. Залежність, наведена на рис. 4, б, дозволяє зробити висновок, що ця форма відповідає олігомеру з СКР біля 80 нм. Це близько до відповідної величини, одержаної для гел'єфільтраційної колонки. Однак молекулярна маса цього олігомера виявилася відносно постійною (див. рис. 4, а) і приблизно в 10 разів меншою від максималь-

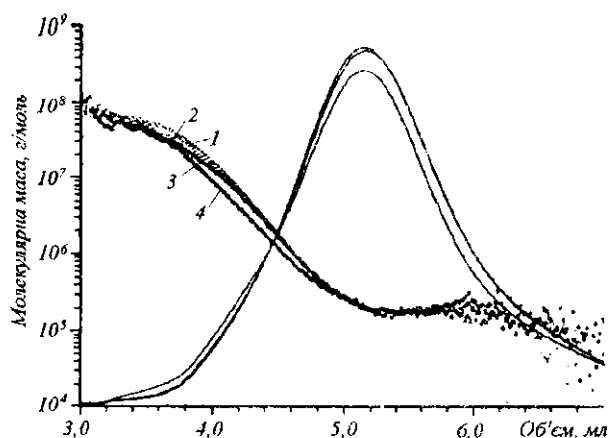


Рис. 3. Профілі елюції та залежності молекулярної маси від координати елюції, одержані в процесі гель-фільтрації при різних молярних співвідношеннях кінрази до СаМ: 10:1 (1), 5:1 (2), 1:1,5 (3) і без СаМ (4). В усіх випадках на колонку наносили 0,56 мг (500 мкл) кінрази, а в буфер для елюції додавали 0,1 мМ СаСl₂

ного значення M_w , одержаного для олігомера з гель-фільтраційної колонки (див. рис. 2, а).

Олігомерна організація КЛЛМ. Відомо, що ферменти функціонують у живій клітині, організуючись у надмолекулярні структури, такі як димери, тетрамери чи полімери з більшим числом молекул [23]. Зовсім недавно алостеричні ефекти олігомерного типу було виявлено для двох СаМ-за-

лежних ферментів, а саме: для фосфофруктокінази із скелетних м'язів [24–26] і Са²⁺-АТРази із еритроцитів [27]. У більшості робіт КЛЛМ із гладеньких м'язів розглядається як мономерний білок [28–30]. Однак ряд властивостей цього ферменту вказує на наявність олігомерних форм. Наявність димерів у розчинах КЛЛМ вперше було показано за допомогою методу ультрацентрифугування [17], а раніше в роботах Собешака і співавт. [14] припускалося існування гексамерів і цим пояснювалася позитивна кооперативність при активації КЛЛМ кальмодуліном [12].

У дослідях Бабійчука і співавт. [31] димеризацію та олігомеризацію КЛЛМ із м'язового шлунка індика виявлено за допомогою DS-Na-ПААГ-електрофорезу з використанням методу поперечних зшивок нульової довжини. У цій роботі ми фактично вперше за допомогою прямих методів підтверджуємо наявність трьох форм кінрази, тобто олігомерів, димерів і мономерів. У наших дослідях із світлорозсіювання було використано випромінювання в червоній області спектра, яке не призводить до будь-яких змін у досліджуваній білковій системі [32]. Тому одержані результати мають високу достовірність.

За нашими даними, молекулярна маса димера становить біля 200 кДа (див. рис. 2, а), що добре узгоджується із величиною 105,5 кДа, вирахованою Олсоном і співавт. [33] для мономерної форми, виходячи з амінокислотної послідовності. Дані Аузіо та співавт. [17] з аналітичного ультрацентрифугування свідчать, що молекула КЛЛМ має

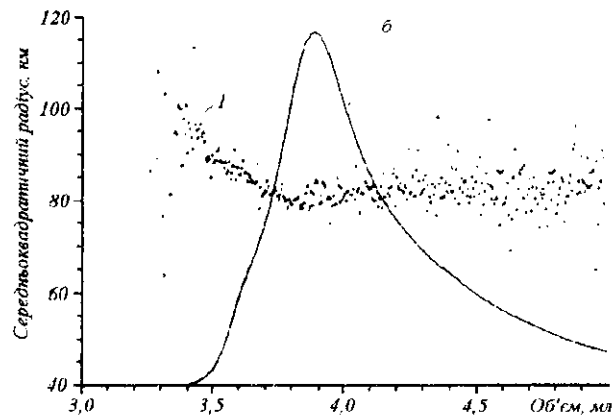
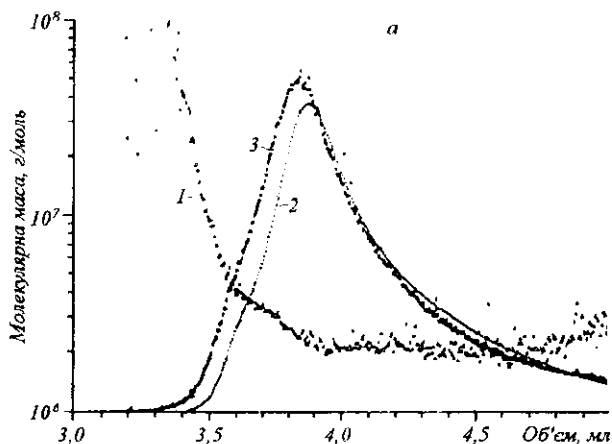


Рис. 4. Залежності молекулярної маси КЛЛМ (а) та її середньоквадратичного радіуса (б) від координати елюції для СМ-афінної колонки (1). Загальна маса нанесеної кінрази 0,53 мг. Буфер завантаження містив 0,1 мМ СаСl₂, який заміщали при елюції на 2 мМ ВГТА. Швидкість елюції 0,15 мл/хв. Заряди зручності на а приведено також криві УФ поглинання (2) та світлорозсіювання (3); на б — тільки крива УФ поглинання (суцільна лінія)

форму стрижня довжиною 50 і діаметром 2,15 нм. Середньоквадратичний радіус для такої структури становить 14,4 нм. Розрахунки з використанням даних цих авторів показують, що СКР для димера КЛЛМ має становити біля 24 нм, що добре узгоджується з одержаним нами значенням 22 нм (див. табл. 4). Аузіо та співавт. [17] не виявили олігомерів кінази, оскільки вони проводили свої дослідження при більших іонних силах (0,2 М NaCl) та за наявності в розчині високих концентрацій сахарози. Ці фактори сильно послаблюють іонні та гідрофобні взаємодії, котрі, в основному, відповідають за організацію надмолекулярних структур такого типу.

Важливо відмітити, що хоча M_w олігомера на два порядки більша від M_w димера (див. рис. 2, а), його СКР (80 нм) тільки в 4 рази перевищує цей параметр для димера (див. рис. 2, б). Це дозволяє інтерпретувати олігомер як спіральну структуру, в якій молекули кінази з'єднані між собою за способом «голова до хвоста». Граничними конфігураціями для такої структури можуть бути кільце або довгий стрижень. Неважко показати, що для спіралі середньоквадратичний радіус вираховується за формулою $R_g^2 = R^2 + (cN)^2/12 = R^2 + H^2/12$, де R , c , N та H відповідно радіус, крок, число витків та висота спіралі.

Висновок стосовно того, що молекули КЛЛМ при утворенні надмолекулярних структур зв'язуються між собою за способом «голова до хвоста», а не «голова до голови» чи «хвіст до хвоста», було зроблено на основі спостережень, які доводять, що кіназа зв'язується з катіоно- і аніонообмінними гелями (даних не наведено). Це вказує на наявність двох рознесених на значну відстань доменів молекули, які несуть протилежні заряди, що й зумовлює можливість об'єднання у структури типу ланцюга.

Активация КЛЛМ кальмодуліном і ефект пригнічення. Як було показано раніше, майже повне пригнічення активності кінази спостерігається після її передінкубації при субстехіометричних мольярних співвідношеннях з CaM [14]. Таке пригнічення пояснювалося перерозподілом між різними формами кінази за час передінкубації до початку вимірів її активності [12]. Дані цієї роботи показують, що співвідношення між різними формами кінази до активації залишається практично незмінним після її активації. Отже, пригнічення КЛЛМ в передінкубаційний період не можна пояснити перерозподілом різних форм кінази. Ми не можемо повністю виключити кількісною перерозподілу між димерною та мономерною формами в межах 5—10 ваг.%, але цим не можна пояснити

майже повного пригнічення активності цього ферменту. Наші флюоресцентні дані (відсутні в цій роботі) свідчать, що пригнічення, яке супроводжується зниженням у кілька разів спорідненості Ca^{2+} до комплексу CaM — КЛЛМ, має бути в основному зв'язане з конформаційними змінами молекули кінази.

Олігомеризація і локалізація КЛЛМ. Олігомер при його концентрації в розчині біля 2 ваг.% (див. табл. 3), очевидно, не може відігравати суттєвої ролі в передінкубаційному ефекті, якщо тільки його активність не перевищує в декілька разів активності інших форм кінази. Однак ми вважаємо, що олігомер кінази може відігравати важливу роль *in vivo* і ось чому. Локальні концентрації олігомера КЛЛМ у живій клітині можуть бути набагато більшими від його концентрації в наших дослідах *in vitro*. Непрямою вказівкою на таку можливість є той факт, що гель-фільтраційна колонка сильно зсуває рівновагу в бік надмолекулярних структур. Це має бути наслідком сильного обмеження трансляційної рухливості молекул кінази в матриці геля. Така ситуація може мати місце також у невеликих компартментах в цитоплазмі гладеньком'язової клітини. Результати, одержані з CaM-афінною колонкою (див. рис. 4), вказують на іншу, більш цікаву можливість. Дійсно, всі молекули кінази, іммобілізовані на CaM, зшитому з наповнювачем колонки, утворюють олігомери. Дані попередніх досліджень свідчать, що КЛЛМ із гладеньких м'язів міцно зв'язується з товстими філаментами міозину [34, 35]. Отже, КЛЛМ, іммобілізована всередині гладеньком'язової клітини на міозинових філаментах, може з великою ймовірністю існувати у формі олігомерів, аналогічних тим, що елюють з гель-фільтраційної чи CaM-афінної колонок.

Із рис. 2 видно, що олігомер кінази характеризується практично постійним середньоквадратичним радіусом для дуже широкого інтервалу значень M_w ($6 \cdot 10^5$ — 10^7 Да). Отже, мінімальний олігомер має відповідати гексамеру ($6 \cdot 10^5$ Да). Різке зростання M_w в цьому інтервалі (див. рис. 2, а) може бути наслідком агрегації таких «мінімальних» олігомерів у паралельні структури, оскільки значного зростання СКР при цьому не спостерігається (див. рис. 2, б). Структуру такого гексамеру у вигляді спіралі наведено на рис. 5, а. Вона повинна добре узгоджуватися із спіральною структурою міозинового філамента, встановленою із оптичної дифракції негативно пофарбованих самозібраних філаментів [36, 37], оскільки якраз ці філаменти зв'язують КЛЛМ з виключно високою спорідненістю [36].

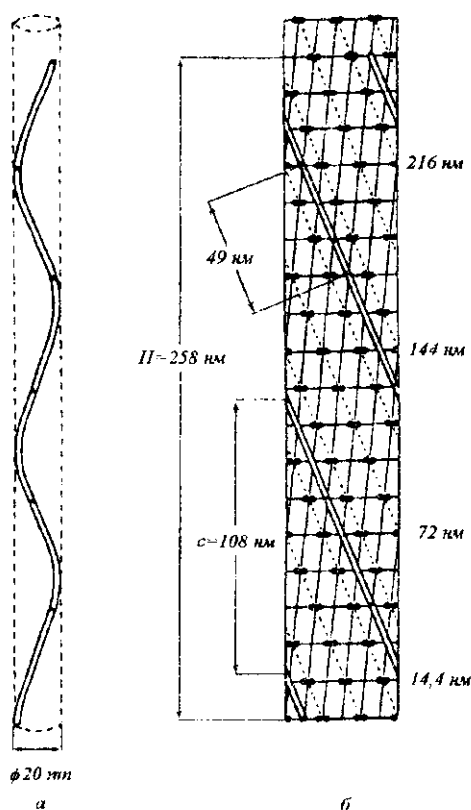


Рис. 5. Запропонована на основі експериментальних даних структура гексамера КЛЛМ (а) та її зв'язок із спіральною структурою самозібраних філаментів міозину (б). Деталі див. у тексті

На нашій моделі показано поверхнєве розміщення міозинових головок на стрижні філаменту (див. рис. 5, б). Із моделі видно, що гексамерну спіраль кіннази довжиною 258 нм можна легко узгодити із спіральною структурою філаменту, яка характеризується повтором 72 і кроком 108 нм. При діаметрі стрижня філаменту біля 18 нм [38] і радіусі молекули кіннази 1 нм діаметр спіралі гексамера має бути біля 20 нм. СКР такої структури дорівнює 75 нм (із розрахунку за формулою $R_g = \sqrt{R^2 + H^2/12}$), що добре узгоджується із величиною 80 нм, одержаною із наших даних по світло-розсіюванню.

Необхідно відмітити, що запропонована модель застосовна до локалізації КЛЛМ тільки в умовах розслаблення, тобто при відсутності $\sqrt{Ca^{2+}}$, коли CaM і кінназа зв'язані з філаментом міозину з високою спорідненістю і незалежно одне від одного

[36]. Активація кіннази, як відомо, супроводжується зниженням спорідненості активного комплексу CaM — КЛЛМ до міозину [34, 36], що може призводити до зміни його розташування на філаменті. Подальше зниження цієї спорідненості має місце після фосфорилування міозину, в результаті чого кінназа може легко переміщуватися і фосфорилувати інші головки міозину на поверхні філаменту. У процесі переміщення кіннази вздовж товстого філаменту можуть брати участь такі асоційовані з тонкими філаментами CaM-зв'язуючі білки, як кальдесмон і кальпонін.

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

Надмолекулярные формы киназы легких цепей миозина гладких мышц.

1. Характеристика и процентное распределение в растворе

Резюме

В данной работе с помощью методов светорассеяния показано, что апофермент киназы легких цепей миозина гладких мышц существует в растворе как смесь олигомерной, димерной и мономерной форм, относительная концентрация которых при физиологической ионной силе (160 мМ соли) составляет соответственно 2, 53 и 45 весовых процентов. После активации киназы кальмодулином не обнаружено заметных изменений в их процентном распределении независимо от того, киназа или кальмодулин были в растворе в избытке. Анализ олученных данных позволяет сделать вывод о том, что наиболее вероятной структурой олигомера является спиралевидный гексамер, размеры которого хорошо согласуются со спиральной структурой самособранных миозиновых филаментов.

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

Supramolecular species of smooth muscle myosin light chain kinase.

1. Characterization and percent distribution in solution

Summary

It is shown by the light scattering methods that inactive (calmodulin-free) myosin light chain kinase (MLCK) exists in solution as a mixture of oligomeric, dimeric and monomeric species, which relative concentrations at physiological ionic strength constitute correspondingly 2, 53 and 45 weight percent. After kinase activation by calmodulin (CaM) we could not detect any appreciable changes in the kinase species distribution when either kinase or CaM were present in molar excess. Analysis of the data obtained indicates that the kinase oligomer structure may be interpreted as a kind of flexible spiral in which MLCK molecules associate in head-to-tail fashion with the limiting configurations being a ring, and a long rod. It is important to point out that the spiral-like oligomer fits very well to the helical structure of self-assembled myosin filaments.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Williams D. A., Fay F. S. Calcium transients and resting levels in isolated smooth muscle cells monitored with quin 2 // Amer. J. Physiol.—1986.—250.—P. 779—791.
2. 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.
3. Marston S. B. The regulation of smooth muscle contractile

- proteins // *Progr. Biophys. and Mol. Biol.*—1982.—41.—P. 1—41.
4. *Adelstein R. S., Eisenberg E.* Regulation and kinetics of the actin-myosin-ATP interaction // *Ann. Rev. Biochem.*—1980.—19.—P. 921—956.
 5. *Small J. V., Sobieszek A.* The contractile apparatus of smooth muscle // *Int. Rev. Cytol.*—1980.—64.—P. 241—306.
 6. *Ito M., Guerriero V., Jr., Chen X., Hartshorne D. J.* Determination of the inhibitory domain of smooth muscle myosin light chain kinase by site directed mutagenesis // *Biochemistry.*—1991.—30.—P. 3498—3503.
 7. *Kemp B. E., Pearson R. B., Guerriero V., Jr. et al.* The calmodulin binding domain of chicken smooth muscle myosin light chain kinase contains a pseudosubstrate sequence // *J. Biol. Chem.*—1987.—262.—P. 2542—2548.
 8. *Pearson R. B., Wettenhall E. H., Means A. R. et al.* Autoregulation of enzymes by pseudosubstrate prototypes: myosin light chain kinase // *Science.*—1988.—241.—P. 970—973.
 9. *Pearson R. B., Ito M., Morrice N. A. et al.* Proteolytic cleavage sites in smooth muscle myosin light chain kinase and their relations to structural and regulatory domains // *Eur. J. Biochem.*—1991.—200.—P. 723—730.
 10. *VanBercum M. F. A., Means A. R.* Three amino acid substitutions on domain I of calmodulin prevent the activation of chicken smooth muscle myosin light chain kinase // *J. Biol. Chem.*—1991.—266.—P. 21488—21495.
 11. *Conti A. M., Adelstein R. S.* The relationship between calmodulin binding and phosphorylation of smooth muscle myosin kinase by the catalytic subunit of 3':5'cAMP-dependent protein kinase // *Ibid.*—1981.—256.—P. 3178—3181.
 12. *Sobieszek A., Strobl A., Ortner B., Babiychuk 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.
 13. *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.
 14. *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.
 15. *Adelstein R. S., Klee C. B.* Purification and characterization of smooth muscle myosin light chain kinase // *J. Biol. Chem.*—1981.—256.—P. 7501—7509.
 16. *Braginskaya T. G., Dobichin P. D., Ivanova M. A.* Analysis of the polydispersity by photon correlation spectroscopy // *Phys. Scripta.*—1983.—26.—P. 309—315.
 17. *Ausio J., Malencik D. A., Anderson S. R.* Analytical sedimentation studies of turkey gizzard myosin light chain kinase // *Biophys. J.*—1992.—61.—P. 1656—1663.
 18. *Филенко А. М., Собошек А., Бабичук Э. Б. и др.* Надмолекулярная организация и активность киназы легких цепей миозина гладких мышц // *Биополимеры и клетка.*—1995.—11, № 2.—С. 57—68.
 19. *Lowey S., Goldstein L., Cohen C., Luck S. M.* Proteolytic degradation of myosin and the meromyosins by a water-insoluble polyanionic derivative of trypsin. Properties of a helical subunit isolated from heavy meromyosin // *J. Mol. Biol.*—1967.—23.—P. 287—307.
 20. *Carlson F. D., Fraser A. B.* Intensity fluctuation autocorrelation studies of the dynamics of muscular contraction // *Photon correlation and light beating spectroscopy* / Eds H. Z. Cummins, E. R. Pike.—New York: Plenum press, 1974.—P. 519—532.
 21. *Wyatt P. J.* Light scattering and absolute characterization of macromolecules // *Anal. chim. acta.*—1993.—272.—P. 1—40.
 22. *Privalov P. L.* Stability of proteins. Proteins which do not present a single cooperative system // *Adv. Protein Chem.*—1982.—35.—P. 1—101.
 23. *Шульц Г., Ширмер Р.* Принципы структурной организации белков.—М.: Мир, 1982.—316 с.
 24. *Mayr G. W., Heilmeyer L. M. J., Jr.* Skeletal muscle myosin light chain kinase. A refined structural model // *FEBS Lett.*—1983.—157.—P. 225—231.
 25. *Mayr G. W.* Interaction of calmodulin with muscle phosphofructokinase // *Eur. J. Biochem.*—1984.—143.—P. 513—520.
 26. *Mayr G. W.* Interaction of calmodulin with muscle phosphofructokinase // *Ibid.*—P. 521—529.
 27. *Koşk-Kosicka D., Bzdega T., Wawrzynow A. et al.* Erythrocyte Ca²⁺-ATPase: activation by enzyme oligomerization versus by calmodulin // *Calcium binding proteins in normal and transformed cells* / Eds R. Pochet et al.—New York: Plenum Publ. Corp., 1990.—P. 169—174.
 28. *Edelman A. M., Blumenthal D. K., Krebs E. G.* Protein serine/threonine kinases // *Annu. Rev. Biochem.*—1987.—56.—P. 567—613.
 29. *Hartshorne D. J.* Role of myosin light chain kinase in gastrointestinal smooth muscle // *Physiology of the Gastrointestinal Tract* / Ed. L. A. Johnson.—New York: Raven press, 1987.—Vol. 1.—P. 423—432.
 30. *Stull J. T., Tansey M. G., Tang D.-C. et al.* Phosphorylation of myosin light chain kinase: a cellular mechanism for Ca²⁺ desensitization // *Mol. Cell. Biochem.*—1993.—127/128.—P. 229—237.
 31. *Babiychuk E. B., Babiychuk V. S., Sobieszek A.* Modulation of smooth muscle myosin light chain kinase activity by Ca²⁺-calmodulin dependent, oligomeric-type modifications // *Biochemistry.*—1995.—34.—P. 6366—6372.
 32. *Nicoli D. F., McKenzie D. C., Wu J.-S.* Application of dynamic light scattering to particle size analysis of macromolecules // *Int. Lab.*—1992.—24.—P. 32—37.
 33. *Olson N. J., Pearson R. B., Needleman D. S. et al.* Regulatory and structural motifs of chicken gizzard myosin light chain kinase // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1990.—87.—P. 2284—2288.
 34. *Sellers J. R., Pato M. D.* The binding of smooth muscle myosin light chain kinase and phosphatases to actin and myosin // *J. Biol. Chem.*—1984.—259.—P. 7740—7746.
 35. *Sobieszek A.* Smooth muscle myosin as a calmodulin binding protein // *J. Muscle Res. Cell Motil.*—1990.—11.—P. 114—124.
 36. *Sobieszek A.* Cross-bridges on self-assembled smooth muscle myosin filaments // *J. Mol. Biol.*—1972.—70.—P. 741—744.
 37. *Sobieszek A.* Vertebrate smooth muscle myosin: Enzymatic and structural properties // *The Biochemistry of Smooth Muscle* / Ed. N. L. Stephens.—Baltimore: Univ. Park press, 1977.—P. 413—443.
 38. *Xu J.-Q., Harder B. A., Uman P., Craig R.* Myosin filament structure in vertebrate smooth muscle // *J. Cell Biol.*—1996.—134.—P. 53—66.

Надійшло до редакції 18.03.97