

Біохімічні механізми регуляції скорочення гладеньких м'язів

В. М. Данилова

НДІ фізіології Київського університету імені Тараса Шевченка
252017, Київ, вул. Володимирська, 64

В огляді проаналізовано останні досягнення в області біохімії і молекулярної фізіології регуляції скорочувальних процесів в гладеньких м'язах. Скорочення гладенького м'яза потребує фосфорилування міозину. Цей процес пов'язаний з внутрішньоклітинним викидом Ca^{2+} і наступним утворенням Ca^{2+} - кальмодулінового комплексу та активацією кінрази легких ланцюгів міозину. Розслаблення забезпечується дефосфорилуванням міозину за допомогою фосфатази легких ланцюгів міозину. Існує припущення, що дефосфорилування не регулюється. Інші можливі механізми регуляції включають зв'язані з тонкими філаментами білки, такі як кальдесмон і кальпонін.

Вступ. Історично склалося так, що дослідження на гладенькому м'язі (ГМ) найчастіше будувалися на основі його порівняння із скелетним м'язом. Було виявлено схожість з багатьох важливих моментів. Обидва типи м'язів активуються підвищенням концентрації внутрішньоклітинного кальцію [Ca^{2+}]. У гладеньких м'язах, так само як і в скелетних, важливу роль відіграє саркоплазматичний ретикулум як джерело Ca^{2+} [1]. Існують передумови стосовно того, що основний механізм скорочення в усіх типах м'язів є аналогічним, і він включає механізм ковзання філаментів. Напряга розвивається в результаті взаємодії товстих (міозинових) і тонких (актинових) філаментів, а скорочення досягається внаслідок ступеневого переміщення двох типів філаментів один відносно другого без зміни їх довжини. Для функціонування цього механізму необхідні певні структурні елементи. Останні чітко ілюструються саркомерною організацією смугастих (скелетних і серцевого) м'язів.

Не дивлячись на те, що така структурна організація менш очевидна для ГМ, суттєві елементи саркомерної організації мають місце і для цього типу м'язів. Товсті філаменти було виявлено як в розслаблених, так і в скорочених ГМ, а тонкі філаменти прикріплено до аналогів Z-ліній, які названо «dense bodies» [2]. Така структура дозволяє передавати напругу уздовж м'язової клітини. Напряга генерується внаслідок циклічної взаємодії з актином міозинових головок (поперечних містків), які виступають з товстого філаменту, і гідролізу аденозинтрифосфату (АТР), що супроводжує цю взаємодію. Вважається, що швидкість м'язового скорочення (при нульовому навантаженні) пропорційна такій циклічного утворення поперечних містків, а сила, яку розвиває м'яз, відображує число поперечних містків, діючих паралельно влюбий заданий момент часу.

Незважаючи на таку схожість основного механізму скорочення, між цими типами м'язів є цілий ряд відмінностей. Найбільший подив викликає багатогранність поведінки ГМ. У ГМ-системах використовується багато

різних нейромедіаторів і гормонів, що свідчить про різноманітність рецепторів на плазматичній мембрані ГМ. Слід відмітити, що деякі ГМ стимулюються при відсутності деполяризації мембрани. Цей механізм, який, на відміну від електромеханічного, названо фармакомеханічним спряженням, включає гідроліз фосфоліпідів мембрани з утворенням інозитол-1,4,5-трифосфату. Останній діє як вторинний посередник і викликає вивільнення Ca^{2+} із саркоплазматичного ретикулума. Така складність ГМ посилюється наявністю різних іонних каналів у їх плазматичній мембрані. Головна роль цих численних механізмів зводиться до регуляції скорочення і розслаблення через зміни внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} .

Підвищення внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} ініціює скорочення, що супроводжується взаємодією між актином і поперечним містком. У найпростішому уявленні регуляція такої взаємодії є функцією регуляторних компонентів скорочувального апарату, які розпізнають зміни $[\text{Ca}^{2+}]$ у клітині, що призводить в результаті до зменшення або збільшення кількості контактів поперечних містків з актином.

Механізм(и), завдяки якому(им) ці зміни концентрації Ca^{2+} в ГМ поєднані зі скорочувальним процесом, є дуже важливою характеристикою, що лежить в основі відмінностей між гладенькими і скелетними м'язами. Обговоренню цього питання і присвячено даний огляд, але попередньо нагадаємо про деякі властивості головних білків скорочувального апарату ГМ.

Білки скорочувального апарату гладеньких м'язів. *Міозин*. Всі клітини ГМ містять такі скорочувальні білки, як актин, міозин і тропоміозин [3—5]. Фермент міозин є головним білком товстого філаменту ГМ. Імунологічно він відрізняється від міозину скелетних м'язів [6] і складається з двох високомолекулярних субодиниць, або важких ланцюгів (ВЛ), і двох типів низькомолекулярних субодиниць, або легких ланцюгів (ЛЛ) (рис. 1). Молекулярна маса (м. м.) кожної важкої субодиниці ≈ 200 кДа, а легких — ≈ 20 та 17 кДа відповідно [7, 8].

Використовуючи папаїн або хімотрипсин як свого роду протеолітичні «ножі», міозинову молекулу можна розщепити на два фрагменти (рис. 1): 1) легкий мероміозин (ЛММ), який утворює «хвостову» суперспіральну частину молекули, і 2) важкий мероміозин (ВММ), до складу якого входять два важких поліпептидних ланцюги, утворюючи «шийку» молекули, названу субфрагментом 2 (ВММ-С2, або С2), та дві глобулярні головки, названі субфрагментом 1 (ВММ-С1, або С1) [9, 10].

У нативній гексамерній формі спіральна частина молекули збирається у товстий філамент, а дві глобулярні головки виступають з товстого філаменту через певні інтервали, утворюючи таким чином поперечні містки (див. рис. 1). Ця частина молекули міозину містить актинзв'язуючі центри та каталітичні центри для гідролізу АТФ; на них також розташовано і центри зв'язування з легкими ланцюгами та декілька ділянок зв'язування двовалентних катіонів [8, 11].

Одна головка міозину містить по одному легкому ланцюгу кожного типу (ЛЛ₁₇ та ЛЛ₂₀). На сьогодні відома амінокислотна послідовність кожного з них, яку визначено для міозину м'язового шлунка птахів. ЛЛ₁₇ містить 150, а ЛЛ₂₀ — 171 амінокислотний залишок [12, 13]. ЛЛ₁₇ належить до загального класу легких ланцюгів, які одержали назву «суттєвих» ЛЛ, а ЛЛ₂₀ відносять до класу «регуляторних» легких ланцюгів [14]. Регуляторний легкий ланцюг з м. м. 20 кДа (РЛЛ₂₀) викликає особливий інтерес, тому що він фосфорилується кіназою легких ланцюгів міозину (КЛЛМ) і відіграє важливу роль у регуляторному механізмі.

І, нарешті, дуже важливою характеристикою міозину є його АТРазна активність. Кожна «головка» міозину має активний центр для гідролізу

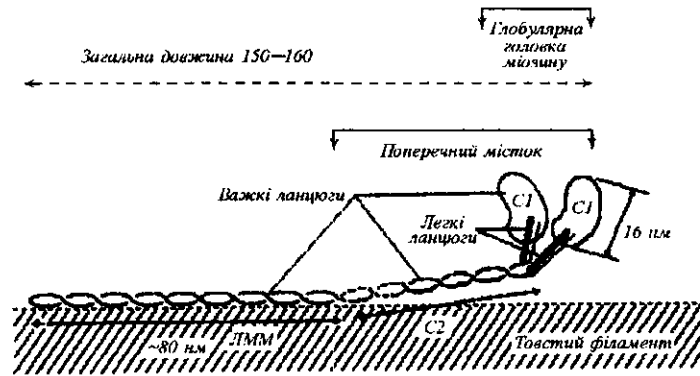


Рис. 1. Схематичне уявлення про структурну організацію міозинової молекули. Товстий філамент формується з легкого мероміозину (ЛММ); з товстого філаменту стирчать міозинові «головки» — субфрагмент 1 (C1) та субфрагмент 2 (C2), які разом утворюють поперечний місток. Кожний C1 містить центр гідролізу АТР та центр зв'язування з актином і є N-кінцевою частиною важкого ланцюга міозину. Субдинічний склад молекули міозину: два важких ланцюги з м. м. 200 кДа та чотири легких ланцюги по два на кожній «головці» з м. м. 17 та 20 кДа. Можливе розташування легких ланцюгів вказано в місці з'єднання «головки—шийки» [11]

АТР. Встановлено, що в цілому АТРазна активність міозину ГМ нижча від такої скелетних м'язів [4, 7, 9]. Найчастіше вимірюються три різні АТРази активності міозину: у присутності Ca^{2+} -АТР або Mg^{2+} -АТР, або K^{+} -АТР як субстрату. Але тільки Mg^{2+} -АТРазна активність міозину при взаємодії з актином має фізіологічне значення. Тому саме про неї слід поговорити докладніше. Mg^{2+} -АТРазна активність очищеного міозину ГМ така сама, як і міозину скелетних м'язів (≈ 2 нмоль $\text{P}_n \cdot \text{мг}^{-1}$ міозину $\cdot \text{хв}^{-1}$). Обидва міозини мають схожі профілі рН-залежності Mg^{2+} -АТРадної активності з максимумами при слабкокислих (≈ 5) та лужних (≈ 10) значеннях рН [15]. Оптимум рН актинової активації для обох типів міозинів виявлено при нейтральних рН [15] і це узгоджується з оптимумом рН для розвитку напруги в гліцеринованих артеріальних фібрилах [16]. Але найбільші розбіжності в Mg^{2+} -АТРазній активності міозинів із гладеньких і скелетних м'язів проявляються в ефекті актину. Для міозину ГМ активація актином значно нижча в порівнянні із скелетними м'язами. Показано, що активація зовсім незначна, якщо препарати актину і міозину очищені [7, 9, 15, 17, 18]. І навпаки, Mg^{2+} -АТРазна активність актоміозину, екстрагованого із м'язів у вигляді комплексу, тобто в неочищеній формі, значно вища. Для пояснення такої розбіжності свого часу було висунуто припущення, що активація актином Mg^{2+} -АТРадної активності міозину ГМ потребує додаткових факторів. На сьогодні до цих факторів, у першу чергу, відносять фосфорилування ЛЛ₂₀ міозину за допомогою Ca^{2+} -кальмодулін-залежної кінази легких ланцюгів міозину [19]: і кальмодулін (CaM), і КЛЛМ найчастіше ізолюються разом з актоміозинним комплексом. За деяких умов тропоміозин також підвищує актин-активовану АТРаду активність міозину гладеньких м'язів [20, 21]. Можливі й інші активатори, такі, наприклад, як лейотонін.

Актин. Із трьох головних скорочувальних білків тільки актин, ізолюваний із різних джерел, виявляє найменшу варіабельність. Більшість добре відомих властивостей актину скелетних м'язів схожа з властивостями актину ГМ [22]. Це, перш за все, його здатність взаємодіяти з міозином і активувати Mg^{2+} -залежну АТРаду міозину скелетних м'язів, здатність

зв'язуватися з тропоміозином, а також полімеризуватися із глобулярної форми (G-актину) у фібрилярну (F-актин). Обидві форми можуть трансформуватися одна в одну в залежності від іонної сили, температури, наявності інших білків. Але тільки F-актин є функціонально активною формою. G-актин складається з простого поліпептидного ланцюга з відомою амінокислотною послідовністю (375 або 374 залишки) та м. м. 42,3 кДа [23, 24].

За допомогою ізоелектрофокусування було показано, що між актинами різного походження існують досить незначні відмінності і було ідентифіковано три ізоелектричних варіанти актину — α , β та γ [25, 26]. Найкислішу α -форму виявлено в скелетних та серцевому м'язі, нем'язовий актин містить β - та γ -форми, а актин ГМ комігрує з γ -формою, яка є найосновнішою [25, 26]. Різниця в ізоелектричних точках обумовлена невеликою кількістю замінів в N-кінцевій частині молекули [27], а решта послідовностей залишається дуже схожою.

F-актин складається з двох лінійних полімерів G-актинових молекул, які утворюють подвійну суперспіраль з кроком повторювання 36—38 нм, і складають основу тонкого філаменту (ТФ) (рис. 2). Є докази того, що ТФ (5—8 нм діаметром) у гладеньких м'язі дуже схожі з такими скелетних м'язів [28]. Довжина тонких філаментів у ГМ не визначена, але є припущення, що вони дещо довші в порівнянні з ТФ скелетних м'язів.

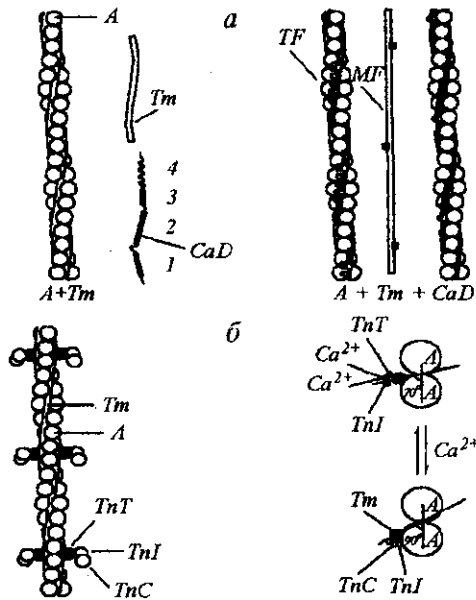


Рис. 2. а — модель тонкого філаменту гладеньких м'язів: А — актин; ТМ — тропоміозин; CaD — кальдесмон (цифрами позначено його домени); ТФ — тонкий філамент (актиновий); МФ — товстий філамент (міозиновий). Особливості цієї моделі опубліковано Марстоном і Редвудом [42]. б — загальноприйнята модель тонкого філаменту скелетних м'язів (ліворуч) і вплив Ca^{2+} на комплекс тропоніну (праворуч): А — актин; ТМ — тропоміозин; ТnC, ТnI, ТnT — Ca^{2+} -зв'язуючий, інгібіторний та тропоміозинзв'язуючий компоненти тропоніну відповідно

Останнім часом з'явилося багато повідомлень про білки, які зв'язуються з актином або можуть модифікувати полімеризацію актинових філаментів [29, 30]. Багато з них, без сумніву, є в гладеньких м'язі. До них можна віднести тропоміозин, α -актинін, кальдесмон, кальпонін, кіназу легких ланцюгів міозину, лейтонін і, можливо, деякі інші регуляторні компоненти. Слід відмітити, що тропонін у тонких філаментах гладеньких м'язів не виявлено [31].

Тропоміозин. Вже протягом багатьох років відомо, що тропоміозин є компонентом скорочувального апарату гладеньких м'язів [22]. Стосовно головних фізичних параметрів є підстави вважати, що тропоміозини із різних м'язів дуже схожі. Молекула його асиметрична, майже повністю

спіралізована і складається з двох субодиниць, які формують спіраль-спіральну конфігурацію. За умов низької іонної сили тропоміозин утворює полімер «кінець-до-кінця», і існує припущення, що саме в такій формі (структурі) він розташований на тонкому філаменті, коли одна смужка тропоміозину зв'язана з кожною із двох актинових смужок (див. рис. 2) [32]. Параметри зв'язування тропоміозину ГМ з актином схожі з такими тропоміозину скелетних м'язів, а стехіометрія наступна: одна молекула тропоміозину на сім молекул G-актину [33, 34]. Це було доведено при утворенні гібридних систем з тропоміозину та актину, ізолюваних із різних м'язів.

Спорідненість зв'язування тропоміозину з актином підвищується у присутності тропоніну [28], і якщо тропонін в ГМ відсутній, то слід чекати, що тропоміозин дисоціює з тонких філаментів ГМ легше в порівнянні із скелетними м'язами. Саме цим можна пояснити, що тропоміозин екстрагується з ГМ за дещо інших умов.

Існують деякі інші відмінності між тропоміозинами з різних джерел, детальний аналіз яких зроблено в роботі [35]. Але вважається, що тропоміозини з гладеньких та скелетних м'язів можуть бути взаємозамінними. Винятком є робота Ебаші з співавт., у якій тропоміозини гладеньких м'язів надаються специфічні властивості [36].

До складу тонких філаментів ГМ входять кальдесмон і кальпонін, які, на думку деяких авторів, можна віднести до регуляторних білків скорочувального апарату [37, 38].

Кальдесмон — це термостабільний білок, який спочатку був ізолюваний із гладеньких м'язів м'язового шлунка курчат як кальмодулін- та актинзв'язуючий білок [39]. Наступні роботи показали, що він взаємодіє також із тропоміозином та міозином гладеньких, але не скелетних м'язів [40, 41]. За фізичними параметрами, це тонка, витягнута молекула довжиною ≈ 76 та діаметром 2 нм з відносною м. м. ≈ 150 кДа [42]. Базуючись на амінокислотній послідовності, передбачуваній вторинній структурі та протеолітичній деградації кальдесмону, ці автори запропонували чотирьохдоменну модель його структури (див. рис. 2, а). Він представлений у тонкому філаменті в співвідношенні 1 моль на 14—28 мономерів актину [37, 42].

При взаємодії з актином кальдесмон інгібує актин-активовану АТРаду фосфорильованого міозину як гладеньких, так і скелетних м'язів [43, 44]. На цій підставі зроблено висновок, що кальдесмон може бути включеним до регуляторного механізму в гладеньких м'язах [45, 46].

Кальпонін — це другий термостабільний білок, який зв'язується з кальмодуліном і актином. Вперше його було виділено із м'язового шлунка курчати [47]. Кальпонінова молекула має форму витягнутого еліпсоїда довжиною 16,2 і діаметром 2,6 нм [48], достатнього для перекриття трьох мономерів актину уздовж актинового філамента. Інгібування кальпоніном АТРадної активності перехресно зшитих препаратів акто-субфрагмент 1 дозволяє віднести цей білок до регуляторного механізму в гладеньких м'язах [49].

Регуляція скорочувального апарату. Вимоги до регуляції. Зміни в концентрації внутрішньоклітинного Ca^{2+} [Ca^{2+}] викликають або скорочення, або ж розслаблення м'язів. У наступних розділах ми розглянемо ті компоненти скорочувального апарату, які розпізнають ці зміни [Ca^{2+}] і модифікують скорочувальну відповідь.

У смугастих м'язах зв'язок між змінами концентрації внутрішньоклітинного [Ca^{2+}] та скорочувальним апаратом відбувається через тропонін С [50]. При підвищенні рівня [Ca^{2+}] у клітині він зв'язується з тропоніном С і викликає конформаційні зміни білків тонкого філамента (див. рис. 2, б),

що призводить до взаємодії актину з поперечними мітками міозину і, отже, до скорочення. Ця регуляторна система включає нековалентні модифікації; вона вбудована в структуру тонкого філаменту (актин+тропоміозин+тропоніновий комплекс: С, І, Т) і тому її часто називають регуляцією, пов'язаною з актином або з тонкими філаментами. Але при дослідженні гладеньких м'язів тропонін, аналогічний такому скелетних м'язів, не був виявлений ні в Ca^{2+} -чутливому актоміозині [15, 51], ні в тонких філаментах [15, 31].

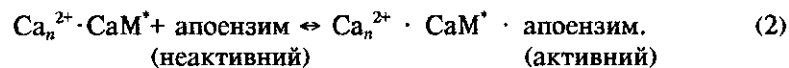
Прогрес в розумінні регуляторного механізму в гладеньких м'язах хребетних було досягнуто після того, як Сент-Дьорді з колегами виявили в м'язах моллюсків регуляцію, пов'язану з міозиною молекулою, зокрема, з легкими ланцюгами [52, 53]. Застосування простого і елегантного методу, запропонованого Леманом [54] для розпізнавання актин- чи міозинзв'язаної регуляції, виявило, що в гладеньких м'язах шлунка курчати [55], судин [56], шлунка свині [57] контроль актин-міозинової взаємодії також зв'язаний з міозиною молекулою. Але цей тип регуляції відрізнявся від такого, що спостерігався у безхребетних, тому що для активації Mg^{2+} -АТРазної активності міозину актином необхідний був не тільки Ca^{2+} в мікромольних концентраціях, але й певна модифікація міозину. Пізніше було чітко встановлено, що ця модифікація пов'язана з фосфорилуванням легкого ланцюга міозину з м. м. 20 кДа (РЛЛ₂₀) [58—60]. Більшість дослідників вважають, що фосфорилування міозину і є відповідальним за активацію АТРазної активності.

Механізм фосфорилування. 20 років тому Адельстайн і Конті [61] показали, що фосфорилування міозину тромбоцитів збільшувало його актин-активовану АТРазну активність. Для гладеньких м'язів про це вперше сповістили Собешек [60, 62] і Бремел з співавт. [63], а пізніше аналогічні дані були одержані для міозину з різних гладеньких м'язів [19, 20, 58, 59, 64].

Ключовим моментом цього механізму є те, що фосфорилування кожного з двох легких ланцюгів міозину з м. м. 20 кДа призводить до збільшення актин-активованої Mg^{2+} -АТРазної активності міозину. Як правило, фосфорилується при цьому серин-19, але може бути і додаткове фосфорилування по треоніну-18 (рис. 3). Оскільки ділянки генерації сили є місцями взаємодії між актином і міозином, то таке підвищення ферментативної активності прирівнюється до активації скорочувального апарату та ініціації процесу скорочення. Ферментом, який відповідає за фосфорилування міозину, є кіназа легких ланцюгів міозину (КЛЛМ). Їй притаманна важлива властивість — регулювання широко розповсюдженим Ca^{2+} -зв'язуючим білком кальмодуліном (СаМ) [65]. Така залежність від СаМ обумовлює зв'язок між внутрішньоклітинною концентрацією Ca^{2+} і скорочувальною активністю (рис. 4).

Константи зв'язування Ca^{2+} з СаМ (точніше, з комплексом СаМ — КЛЛМ) і з тропоніном С в тропоніновому комплексі визначають активаційні порогові для Ca^{2+} в гладеньких і смугастих м'язах відповідно.

Механізм активації КЛЛМ кальмодуліном схожий для багатьох, якщо не для всіх, цитоплазматичних кальмодулінзалежних ферментів, а також кальмодулінзв'язуючих білків. Ці процеси можуть бути записані у вигляді наступних рівнянь:



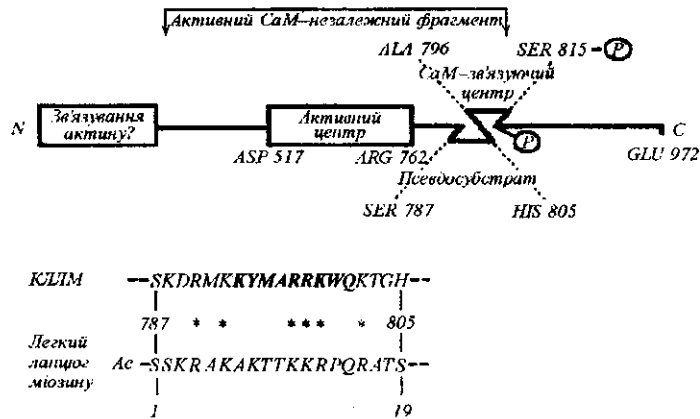


Рис. 3. Кіназа легких ланцюгів міозину (КЛЛМ): локалізація різних її доменів. Послідовність кінази в псевдосубстратній області порівнюється з NH₂-кінцевою послідовністю 20 кДа — легкого ланцюга міозину [N-кінець ацетильовано (Ac.)]. Основні залишки відмічено зірочкою, а залишки, які є критичними для інгібування у псевдосубстратній послідовності, — виділено напівжирним шрифтом. Показано також структуру триптичного активного CaM-незалежного фрагмента. Вказано два центри фосфорилування (SER 815 та SER 828) для cAMP-залежної протеїнкінази. P — фосфат; C — COOH-кінець; N — NH₂-кінець [11]

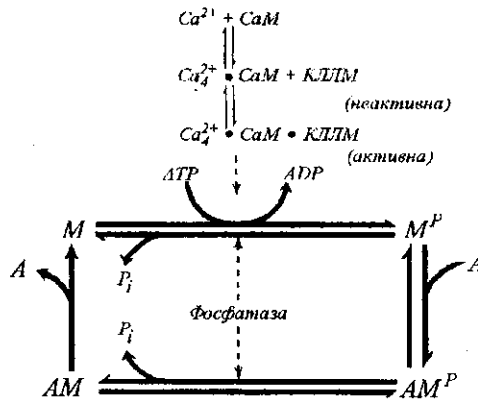


Рис. 4. Схематичне узагальнення механізму фосфорилування — дефосфорилування міозину. M і M^P — дефосфорильований і фосфорильований міозин відповідно; КЛЛМ — кіназа легких ланцюгів міозину; А — актин; АМ і АМ^P — дефосфорильований і фосфорильований актоміозин відповідно; CaM — кальмодулін

Збільшення концентрації внутрішньоклітинного Ca²⁺ до приблизно мілімолярних рівнів призводить до його зв'язування з кальмодуліном (1). Кальмодулін містить чотири центри зв'язування Ca²⁺, і зайняття вже двох з них викликає значні конформаційні зміни в молекулі кальмодуліну [38], які відмічено в рівняннях зірочкою. Очевидно, ці конформаційні зміни супроводжуються відкриванням «гідрофобної кишені» на поверхні [66], яка зв'язується з апоензимом, що і обумовлює наступну взаємодію кальмодуліну із своїм партнером (2).

Інактивація КЛЛМ має місце тоді, коли концентрація внутрішньоклітинного Ca²⁺ падає майже втричі від потрібної для зв'язування Ca²⁺ з CaM; тоді Ca²⁺ дисоціює з кальмодуліну і перестає взаємодіяти з апоензимом. Константа дисоціації для кальмодуліну і КЛЛМ знаходиться в наномолярному інтервалі, але ця величина підвищується при фосфорилуванні КЛЛМ. Слід відзначити, що кальмодулін є розчинним у цитоплазмі, де його концентрація дорівнює приблизно 30 мкМ в порівнянні з ≈4 мкМ для КЛЛМ [67].

Недавно було показано, що на додаток до КЛЛМ кальмодулінзалежна протеїнкіназа II (CaM-кіназа II) може також фосфорилувати серин-19 легких ланцюгів міозину [68], але роль цієї кінази в скорочувальному процесі ще невідома.

Очевидно, якщо фосфорилування міозину ініціює актин-активованій гідроліз АТР і розвиток напруги, то слід постулювати, що дефосфорилування діє у зворотному напрямку і призводить до розслаблення. Але такий простий постулат не є зовсім коректним, хоча дійсно в розслаблених м'язах міозин знаходиться у дефосфорильованому стані і швидкість розслаблення корелює із змінами фосфатазної активності [69, 70]. До цього часу регуляція процесу дефосфорилування не була продемонстрована експериментально і тому багато дослідників вважають, що цей процес може мати місце як у присутності, так і у відсутності Ca^{2+} . Можливо, *in vivo* процес дефосфорилування є Ca^{2+} -залежним, але довести це дуже важко з кількох причин: труднощі при виділенні фосфатаз, лабільність їх ензиматичної активності та мультисубодиничний склад. Активність фосфатази легких ланцюгів міозину (ФЛЛМ) була виявлена в різних гладеньких м'язах: м'язовому шлунку індики [71], аорті бика [72] та інших. Додавання цих фосфатаз до Ca^{2+} -чутливого актоміозину приводило до зниження його АТРазної активності, а також зменшувало ступінь фосфорилування легких ланцюгів міозину. І цей факт корелює з гіпотезою, що фосфорилування обох ланцюгів міозину потрібне для максимальної активації актином його АТРазної активності [73]. Але відомостей про ФЛЛМ до цього часу зовсім небагато, оскільки ідентифікація специфічної фосфатази, що призводить до розслаблення ГМ через дефосфорилування міозину, досить ускладнена багатьма факторами, про що мова йшла вище.

Молекулярні зміни, які мають місце при фосфорилуванні міозину, досі невідомі. Як вже зазначалося раніше, центри гідролізу АТР і зв'язування з актином розташовані в області глобулярних головок на кожному з важких ланцюгів міозину (див. рис. 1). Отже будь-які зміни легких ланцюгів внаслідок фосфорилування мають передаватися на головки міозину. Одна з гіпотез стверджує, що фосфорилування ЛЛ збільшує рухливість в місці сполучення «голівки» і «шийки» міозинової молекули і робить можливим її взаємодію з актином [74]. У дефосфорильованому стані головки (поперечні містки) знаходяться в менш рухливому стані. На наш погляд, це уявлення спекулятивне і досить спрощене. Але інтерес викликає той факт, що самі ізольовані головки не регулюються фосфорилуванням, і це є аргументом на користь важливої ролі області «шийки» міозинової молекули. Додаткове підтвердження важливої ролі цієї області отримано в експериментах при дослідженні впливу фосфорилування на перехід мономерного міозину ГМ із скрученої в витягнуту конформацію (10S — 6S-перехід) [74].

Кореляція теорії фосфорилування з фізіологічними характеристиками. Найпростіша інтерпретація цієї теорії передбачає, що фосфорилування міозину активує скорочувальний апарат, а дефосфорилування інактивує його [5]. Суттєвим тут є те, що фосфорилування — дефосфорилування діє як «вимикач — вимикач» («on-off switch») процесу скорочення (див. рис. 4). Виходячи з такої інтерпретації, підвищення рівня фосфорилування буде призводити до утворення більшої кількості поперечних містків і відповідно до збільшення сили скорочення. Дійсно, досить часто під час початкової фази скорочення має місце лінійна кореляція між силою і фосфорилуванням, але пізніше в період скорочення в стаціонарному стані такої простої залежності між силою і фосфорилуванням не спостерігається [5]. Вперше таке відхилення від лінійності залежності сили від фосфорилування спостерігали в класичній роботі Діллон з співавт. [75]. На прикладі сонної артерії свині, яку стимулювали K^+ , було показано, що силу скорочення

можна підтримувати при низьких рівнях фосфорилування завдяки повільному циклюванню поперечних містків. Ці містки одержали назву «містки на клямці» («latch bridges»). Авторами було висловлено припущення, що ці «містки» утворюються шляхом дефосфорилування вже приєднаних до актину поперечних містків, і що після цього дисоціація міозину від актину іде повільно. В цих дослідках було показано, що фосфорилування корелює із швидкістю скорочення, але не з розвитком і підтриманням сили.

Наступні дослідження [76] показали, що процес фосфорилування відповідає рівням $[Ca^{2+}]$ у клітині: спочатку генерується пік $[Ca^{2+}]$, але в період підтримання сили, у фазі стаціонарного скорочення, концентрація Ca^{2+} падає до рівнів, які зовсім незначно перевищують рівень $[Ca^{2+}]$ у спокої.

Ці та інші дослідження на різних гладеньких м'язах [77] продемонстрували, що сила може підтримуватися при низьких рівнях фосфорилування і зниженій швидкості скорочення. Результатом цього є невеликі витрати енергії у зв'язку із зниженою АТРазною активністю утвореного актоміозинового комплексу. А відтак, такий механізм є економічним, що є дуже важливим для підтримання сили в тонічних м'язах, таких, наприклад, як більшість артерій.

Як видно з вищенаведеного, гіпотеза «latch bridge» не зовсім сумісна з моделлю «on-off switch» механізму фосфорилування, і за останні роки було виявлено інші приклади відхилень від цієї моделі. Так, було зареєстровано порівняно невелику силу скорочення при відносно високому рівні фосфорилування [77, 78]. Важливим моментом є те, що різні відповіді до деякої міри відображують різні методи стимулювання. Наприклад, сила, яка генерується при однакових рівнях Ca^{2+} , може змінюватися в залежності від форми стимулювання [78]. Такі властивості ГМ, можливо, пояснюються тим, що утворення «latch bridge» є характерною особливістю скорочувального апарату ГМ (скоріш за все, це властивість міозинової молекули), тому що для їх утворення не є обов'язковою участь рецепторів, тобто «latch bridge» можуть утворюватися і після стимуляції K^+ [75].

На додаток до механізму «latch bridge» у гладеньких м'язах може існувати механізм, який залежить від рецепторів і який здатний впливати на баланс кіназа — фосфатаза або іншу частину скорочувального апарату. Зміни балансу фосфорилування можуть бути також відповідальними за зміни в залежності сили від Ca^{2+} . Дослідники із кількох лабораторій недавно висунули припущення, що в модуляції Ca^{2+} -чутливості важливу роль відіграє механізм, пов'язаний з G-білками [2].

Докази на користь теорії фосфорилування. 1. Численні дослідження *in vitro* (див. огляди [1, 4]) показали, що фосфорилування міозину збільшує його актин-активовану АТРазну активність. Беручи до уваги експериментальні дані, які свідчать про кореляцію між АТРазною активністю і швидкістю укорочення м'язів [79], зроблено висновок про те, що фосфорилування міозину може ініціювати скорочувальну відповідь. Наступні дослідження на скінованих та інтактних фібрилах ГМ показали, що, дійсно, розвиток напруги супроводжується підвищенням ступеню фосфорилування міозину [64, 80].

2. Застосування антагоністів кальмодуліну виявилось дуже корисним для висвітлення його ролі в процесах фосфорилування [58, 81, 82]. На простих системах *in vitro* було встановлено, що зв'язування антагоністів з кальмодуліном впливає на рівень фосфорилування міозину, а відтак, і на скорочувальний процес.

3. Застосування 5'-О-(3-тіотрифосфату) (АТР γ S) виявилось дуже плідним для вивчення багатьох протеїнкіназ, у тому числі і КЛЛМ [83, 84].

У тіофосфорильованому стані, який стійкий для дії фосфатаз, міозин може бути проаналізований за різних експериментальних умов (плюс або мінус Ca^{2+} та ін.), коли рівень фосфорилування міозину постійний. Так, на скінованих фібрилах [85] було показано, що тіофосфорилування призводило до втрати ними контролю з боку Ca^{2+} , але одночасно і до генерації сили. Тобто, якщо міозин зафосфорильований, то він залишається активним незалежно від присутності або відсутності Ca^{2+} . В інших дослідженнях [86] спостерігали Ca^{2+} -залежний ефект при зміні умов експерименту (співвідношення рівнів Mg^{2+} та Ca^{2+}). На основі цих даних можна зробити висновок, що процес фосфорилування адекватний процесу скорочення, а додаткове зв'язування Ca^{2+} з компонентами, які відрізняються від тих, що належать системі КЛЛМ, може модулювати відповідь фосфорильованого міозину.

4. Експерименти з Ca^{2+} -незалежною формою КЛЛМ привели до того ж висновку, що і з АТРγS. Обмежений протеоліз КЛЛМ супроводжується утворенням активного фрагменту КЛЛМ, який не залежить ні від Ca^{2+} , ні від кальмодуліну (див. рис. 3) [87]. Така модифікована кінза зберігає високий рівень субстратної специфічності і фосфорилує тільки легкі ланцюги міозину. При додаванні модифікованої кінзи до препаратів актоміозину [87] при відсутності Ca^{2+} підвищувалася їх АТРазна активність, а скіновані фібрили скорочувалися за цих умов [88].

5. Інгібітори фосфатази, такі як ооадаїнова кислота, калікулін А або мікроцистін-LR, викликають скорочення інтактних або скінованих фібрил гладеньких м'язів [89]. Ці дослідження дозволили зробити висновок, що фосфорилування міозину є достатнім для ініціювання скорочення і що ніякий інший домінуючий механізм не був інгібуючим при низьких концентраціях Ca^{2+} , тобто немає інших обов'язкових механізмів «вимикання» скорочення.

Таким чином, наведені вище докази є достатніми для ствердження, що фосфорилування міозину є ключовим компонентом регуляторного механізму в гладеньких м'язах. Але різноманітність фізіологічних властивостей ГМ і очевидна недостатність механізму фосфорилування для пояснення цієї різноманітності свідчать про те, що повинні існувати інші додаткові механізми, які можуть діяти незалежно або комплементарно до механізму фосфорилування. Нижче ми зупинимося на деяких з них.

Інші регуляторні механізми, орієнтовані на міозин. З в'язування Ca^{2+} з м і о з и н о м. Встановлено, що у відповідних умовах міозин із усіх типів м'язів, у тому числі і гладеньких, може зв'язувати Ca^{2+} [89]. Але тільки у випадку м'язів молюсків та деяких інших безхребетних зв'язування Ca^{2+} з міозином обов'язкове для актин-активованої АТРадної активності [54]. Протягом останніх років дані про роль Ca^{2+} , який зв'язується з міозином гладеньких м'язів, були досить суперечливими. Як вже відзначалося раніше, актин-активована АТРадна активність фосфорильованого або тіофосфорильованого міозину не залежить від Ca^{2+} [86, 90]. В інших дослідженнях спостерігали зниження актин-активованої АТРадної активності фосфорильованого міозину [91] або фосфорильованого ВММ [92] при відсутності Ca^{2+} . До того ж є повідомлення, що актин-активована АТРадна активність повністю фосфорильованого міозину є Ca^{2+} -незалежною, на відміну від АТРази частково фосфорильованого міозину, яка є Ca^{2+} -залежною [93].

Внаслідок цього було висловлено припущення, що в ГМ Ca^{2+} не діє як «вимикач—вимикач» скорочення, а впливає на властивості тільки частково інгібованої форми фосфорильованого міозину, аналогічної 10S-конформації, і не має ефекту на повністю фосфорильований (6S-конформація) або дефосфорильований міозин [94].

Фосфорилування міозину іншими кіназами. Окрім КЛЛМ, лише дві протеїнкінази (протеїнкіназа С та СаМ-кіназа II) фосфорилують інтактний міозин. Протеїнкіназа С каталізує включення 2 моль фосфату на 1 моль міозину в місцях, які відрізняються від таких для КЛЛМ [95]. Послідовне фосфорилування кіназою легких ланцюгів міозину і протеїнкіназою С призводить до включення 2 моль фосфату на 1 моль легкого ланцюга і до зниження АТРазної активності фосфорильованого ВММ [95]. Але фізіологічне значення цих процесів неясне.

Деяко відмінну ситуацію виявлено для СаМ-кінази II, яка фосфорилує міозин ГМ в тому самому місці, що й КЛЛМ (Ser-19) [68], і активує АТРазну активність міозину. Але невідомо, чи має ця система фізіологічне значення відносно функції гладеньких м'язів.

Фосфорилування КЛЛМ. У роботі Адельстайна з співавт. [96] вперше було показано, що КЛЛМ є субстратом для сАМР-залежної протеїнкінази. Фосфорилування КЛЛМ сАМР-залежною протеїнкіназою по серину-815 (див. рис. 3) зменшує спорідненість її до Ca^{2+} -СаМ. K_m при цьому змінюється приблизно у 10 разів. Це, в свою чергу, призводить до зсуву Ca^{2+} -залежності у бік вищих концентрацій Ca^{2+} за умови, що концентрація вільного кальмодуліну набагато перевищує K_{CaM} .

Згідно з цими уявленнями, підвищення концентрації сАМР викликає фосфорилування КЛЛМ, підвищення K_m і, як наслідок, зменшення кіназної активності завдяки дисоціації комплексу КЛЛМ — СаМ [96, 97]. Підтвердженням цієї теорії є такі факти, як інгібування АТРазної активності актоміозину ГМ [98], процесів фосфорилування міозину [99] та розвитку напруги в скінованих фібрилах ГМ [100], які спостерігалися при додаванні сАМР-залежної протеїнкінази.

Стал із співавт. [101] недавно дійшли висновку, що фосфорилування КЛЛМ може відігравати важливу роль у зниженні чутливості (десенситизації) скорочувальної системи ГМ, тобто цей процес може бути включений до регуляторного механізму *in vivo*.

Регуляторні системи, пов'язані з тонкими філаментами Як вже зазначалося, у смугастих м'язах домінуючою регуляторною системою є тропонін-тропоміозиновий комплекс. Ці білки зв'язані з двотяжовою спіраллю F-актину і утворюють тонкий філамент із стехіометрією: 7 мономерів актину:1 тропонін:1 тропоміозин (див. рис. 2, б). У гладенькому м'язі тропоміозин знаходиться у такому самому співвідношенні до актину, але тропонін відсутній (див. рис 2, а). Однак регуляторний механізм, пов'язаний з тонкими філаментами і в ГМ, найчастіше наводиться як альтернативний або додатковий по відношенню до механізму фосфорилування [102]. Білками-претендентами, які можуть виконувати такі функції, є кальдесмон і кальпонін.

Роль кальдесмону і кальпоніну. Обидва ці білки при взаємодії з актином інгібують актин-активовану АТРазу фосфорильованого міозину як гладеньких, так і скелетних м'язів [43—45, 103], а також ковзання актинових філаментів уздовж міозинових *in vitro* [104]. Цього інгібіторного впливу кальдесмону і кальпоніну можна уникнути за допомогою надлишку Ca^{2+} -кальмодуліну [43, 45, 46, 103], який робить їх зв'язок з актином слабкішим, або ж (*in vitro*) за допомогою фосфорилування згаданих білків Ca^{2+} -кальмодулін-залежною протеїнкіназою II та протеїнкіназою С [44, 105, 106]. Але слід відмітити, що, якщо кальдесмон-індуковане інгібування АТрази і ковзання тонких філаментів потенціюється тропоміозином, то інгібування кальпоніном не залежить від тропоміозину.

При використанні С-кінцевих фрагментів кальдесмону, які не мають міозин-зв'язуючого центра, показано, що інгібування актоміозинової АТрази корелює із зменшенням зв'язування комплексу міозин — АТР з актином

незалежно від джерела міозину [107]. Більш того, було висловлено припущення, що кальдесмон інгібує АТРаду, конкуруючи з міозином за загальний зв'язуючий центр на актиновій молекулі. Дійсно, дослідження з використанням ^1H -ЯМР-спектроскопії, перехресного зшивання та імунологічні спроби виявили, що кальдесмон займає центри на субдомени 1 та 2 актину, які включають N-кінцеві амінокислотні залишки 1–7, 18–24, 28–40 та C-кінцеву ділянку (358–373) і які мають також відношення до зв'язування міозинових головок [108–110].

З другого боку, електронно-мікроскопічні дослідження виявили існування в умовах ригору третичного комплексу кальдесмон — актин — субфрагмент 1 (або ВММ) [111]. Подальші дослідження показали, що утворення цього комплексу супроводжується змінами у взаємодії актину з міозином [112]. При цьому ковалентне зв'язування 50 кДа домена субфрагмента 1 з N-кінцевою частиною актину розривається і тільки зв'язок з 20 кДа доменом субфрагмента 1 зберігає весь комплекс. Ці спостереження узгоджуються з результатами дослідження поляризації флюоресценції, які показали, що кальдесмон впливає на структуру актину, що й призводить до послаблення його зв'язку з субфрагментом 1 міозину [113].

Паралельне інгібування активної сили і жорсткості релаксованої фібрили в скелетних м'язах під впливом кальдесмону, яке спостерігали Чалович з співавт. [114], привело авторів до висновку, що кальдесмон блокує центри, придатні для слабкого прикріплення поперечних містків, які, як відомо, необхідні для розвитку сили [115].

Альтернативний механізм інгібування актоміозинової АТРази кальдесмоном було запропоновано Марстоном і Редвудом [116, 117], які постулюють, що кальдесмон, як і тропонін 1, уповільнює етап, лімітуючий швидкість гідролізу АТР, тобто вивільнення неорганічного фосфату (P_i). Такий механізм може мати місце лише в присутності тропоміозину, який розповсюджує інгібіторний сигнал (зменшення V_{\max}) від 1 до 14 контактів кальдесмону з актином на тонкому філаменті [117, 118].

Аналіз послідовності амінокислот у кальпоніні виявив гомологію його актинзв'язуючої ділянки (залишки 146–171) з інгібіторним пептидом тропоніну 1 та фрагментом кальдесмону, який містить центри слабкого зв'язування з актином (залишки 498–520). Але, незважаючи на цю гомологію, кальпонін, на відміну від тропоніну 1 та кальдесмону, не взаємодіє з N-кінцевими кислими амінокислотними залишками актину [119]. Сегмент кальпоніну (залишки 142–147), який розпізнає зв'язуючий центр на актині [119], має амінокислотну послідовність, гомологічну такій більшості актинзв'язуючих білків [120]. Досліди з перехресної зшивки показали, що кальпонін взаємодіє з C-кінцевою частиною актину (залишки 326–355) [119], яка є можливою областю для зв'язування міозину і тропоніну [121].

Інгібування кальпоніном АТРадної активності перехресно зшитих препаратів акто — субфрагмент 1 свідчить про те, що кальпонінова регуляція не включає механізму простого стеричного блокування [49]. Найімовірнішим є пояснення, що зв'язування кальпоніну з актином викликає конформаційні зміни в актиновій молекулі, які призводять до зменшення його здатності активувати АТРаду при взаємодії з міозином. З цим положенням узгоджуються результати дослідження кінетичних механізмів інгібування АТРази кальпоніном: він значно зменшує V_{\max} і майже зовсім не зменшує $K_{\text{АТРаза}}$ [122]. Це свідчить про те, що кальпонін в основному контролює каталітичний етап (можливо, вивільнення P_i) при гідролізі АТР актоміозином. У присутності актоміозину ефект кальпоніну на V_{\max} зменшувався [122] завдяки прямій взаємодії цих двох білків або ж непрямому ефекту одного з них на конформацію актинового філаменту.

Незважаючи на те, що функціональні властивості кальдесмону і кальпоніну *in vitro* підтверджують їх важливу роль у механізмах регуляції скорочення гладеньких м'язів, є багато біохімічних проблем стосовно цієї регуляції, які потребують подальшого висвітлення. Фізіологічні ж експерименти, у яких показано, що кальдесмон викликає розслаблення хімічно скінтованих фібрил [123, 124], узгоджуються з їх інгібіторним ефектом на актоміозинову АТРаду. У всякому випадку, на сьогодні можна стверджувати, що кальдесмон регулює скорочення гладеньких м'язів шляхом базального інгібування їх активності, яке має місце в процесах підтримання тривкого тонуусу цих м'язів.

Роль тропоміозину. У смугастих м'язах тропоміозин є основним компонентом регуляторного механізму і в асоціації з тропоніном утворює контрольну систему, зв'язану з тонкими філаментами. У гладеньких м'язах його роль не настільки очевидна, тому що тропоніно-подібні білки в цих м'язах не виявлені. Винятком є лейотонінова система регуляції, запропонована Ебаші з співавт. [125], яка потребує обов'язкової участі тропоміозину. Але ця теорія не набула широкого визнання. Однак є досить багато експериментальних фактів, які свідчать про те, що тропоміозин потрібний для повної активації актоміозинової АТРади гладеньких м'язів [19—21, 126]. Тропоміозин не активує дефосфорильований міозин [21, 126] і, таким чином, його ефект спрямовано на підвищення АТРадної активності фосфорильованого або активованого міозину, можливо, через потенціацію взаємодії поперечних містків з тонкими філаментами.

Тропоміозин також впливає на взаємовідношення між актин-активованою АТРадною активністю і рівнем фосфорильовання міозину [127]. При відсутності тропоміозину відношення між АТРадною активністю і фосфорильованням має нелінійний характер, і активація спостерігається тільки при високих рівнях фосфорильовання [128]. І навпаки, в присутності тропоміозину взаємовідношення між АТРадною активністю і фосфорильованням має більш лінійний характер, і значна активація спостерігається вже при відносно низьких рівнях фосфорильовання [127].

Таким чином, спряження між фосфорильованням міозину і актин-активованою АТРадною активністю може модифікуватися тропоміозином. Але невідомо, як ці ефекти тропоміозину реалізуються; опосередковано через актиновий філамент чи, можливо, має місце пряма взаємодія між тропоміозином і міозином.

Лейотонінова регуляція. Як видно із попередньої дискусії, фосфорильовання є найпопулярнішим механізмом регуляції актин-міозинової взаємодії. Але Ебаші із співавт. запропонували альтернативний механізм, який названо лейотоніновою регуляцією [129, 130]. Обидва ці механізми схожі в тому, що для активації актоміозинової АТРади потребують присутності Ca^{2+} . Але вони і відрізняються між собою з багатьох аспектів. Найбільші відмінності, на думку цих авторів, зводяться до того, що активації АТРадної активності лейотоніном може бути досягнуто без фосфорильовання міозину [131].

Як і тропонін, лейотонін локалізовано на тонкому філаменті, але при молярному відношенні до актину $\approx 1:100$ [128]. Така стехіометрія відрізняється від стехіометрії тропонін:актин у скелетних м'язах (1:7) і саме тому цей механізм не можна вважати «тропоніно-подібним» [128]. Лейотонін було розділено на два білкові компоненти з м. м. 80000 та 18000 Да і названо лейотоніном А і лейотоніном С відповідно [129]. Останній є кислим білком, схожим з кальмодуліном, але не ідентичним йому. Наприклад, лейотонін С не містить триметиллізину і не активує фосфодіестеразу [129].

У зв'язку з тим, що лейотонін С дисоціює з лейотоніну А у відсутності

Ca^{2+} [125], цікавими є дослідження спорідненості лейотоніну А до лейотоніну С та кальмодуліну. Загальна концентрація кальмодуліну (20—50 мкМ) значно вища від концентрації лейотоніну С і, якщо зв'язування лейотоніну С з лейотоніном А не набагато міцніше від такого для кальмодуліну і лейотоніну А, то слід очікувати, що кальмодулін буде ефективно конкурувати за лейотонін А і заміщати лейотонін С.

Механізм дії лейотоніну на сьогодні невідомий. Оскільки кількість лейотоніну, потрібна для регуляції, дуже мала, то у такому аспекті його роль не може бути структурною на відміну від тропонін-тропоміозину в скелетних м'язах. Можливо, механізм його дії включає ензиматичну функцію. Але це потрібно експериментально обґрунтувати.

Узагальнення. У цьому огляді зроблено спробу проаналізувати останні досягнення в області біохімії і молекулярної фізіології регуляції скорочувальних процесів у гладеньких м'язах. Останні продовжують викликати жвавий інтерес дослідників перш за все тому, що вони вистелюють такі життєво важливі органи як кровоносні та лімфатичні судини, матка, трахея, сечовід, шлунково-кишковий тракт та ін. Слід відмітити, що біохімічні характеристики скорочувальних білків не зазнали значних змін за останні кілька років. Винятком є виявлення конформаційних переходів (перехід 10S → 6S) міозинової молекули гладеньких м'язів при її фосфорилуванні, що слід розглядати не просто як біофізичний феномен, а як можливість глибше зрозуміти механізм дії міозинових головок: існують експериментальні докази ефекту фосфорилування на конформацію міозинової молекули в області «головка—шійка».

На сьогодні є чіткі експериментальні докази впливу процесу фосфорилування міозину і на Mg^{2+} -АТРазну активність актоміозину, а тому широко розповсюджено уявлення про те, що цей процес є важливим компонентом циклу скорочення — розслаблення гладеньких м'язів. Успіхів у розвитку теорії фосфорилування — дефосфорилування було досягнуто завдяки глибшому вивченню кінази і фосфатази легких ланцюгів міозину. Але, на жаль, до цього часу не встановлено, одна чи, може, більше фосфатаз включені до процесу дефосфорилування міозину.

За останні кілька років значно збільшилася кількість експериментальних даних, одержаних на інтактних та скінованих фібрилах гладеньких м'язів, виходячи з яких можна стверджувати, що поки не існує єдиної гіпотези чи теорії, яка була б здатна адекватно пояснити гнучкість циклу скорочення — розслаблення в ГМ. Фосфорилування міозину є одним з компонентів регуляторного механізму, але сам по собі він не може пояснити всієї варіабельності відповідей, які продемонстровано на фізіологічному рівні. Загальноприйнято вважати, що скорочення ГМ потребує фосфорилування міозину і що на початку скорочувальної відповіді підвищуються і рівень фосфорилування, і напруга. Але протягом тривкого скорочення рівень фосфорилування падає, у той час як напруга підтримується на високому рівні. У цьому випадку роль фосфорилування залишається неясною і його неможливо безпосередньо зв'язати з рівнем розвитку напруги. Тому теорію фосфорилування можна прийняти у наступному вигляді: фосфорилування міозину корелює із швидкістю укорочення або швидкістю циклювання поперечних містків, у той час як підтримання напруги забезпечується іншими факторами, які повинні бути також Ca^{2+} -залежними.

Біохімічні підходи надали можливість запропонувати деякі вторинні, або додаткові до фосфорилування міозину, Ca^{2+} -залежні регуляторні механізми, які працюють одночасно або послідовно в залежності від умов і потреб організму. Це, перш за все, пряме зв'язування Ca^{2+} з міозином, фосфорилування КЛЛМ сАМР-залежною протеїнкіназою, фосфорилування

міозину іншими, відмінними від КДЛІМ, кіназами та ін. Цілком імовірним уявляється припущення про те, що Ca^{2+} -залежність пари кіназа — фосфатаза легких ланцюгів міозину змінюється за певних умов і це може бути підставою для того, щоб говорити про регуляцію через механізм, пов'язаний з G-білками. Кальдесмон і кальпонін — білки, зв'язані з тонкими філаментами, — також можуть бути включеними до деяких аспектів регуляції. Але тільки теорія фосфорилування міозину має найсерйозніше експериментальне обґрунтування; даних же про роль інших можливих механізмів *in vivo* поки що немає. Тому зрозуміло одне — потрібно провести ще багато досліджень, щоб отримати цілісну картину функціонування гладеньких м'язів.

В. М. Данилова

Биохимические механизмы регуляции сокращения гладких мышц

Резюме

В обзоре сделан анализ последних достижений в области биохимии и молекулярной физиологии регуляции сократительных процессов в гладких мышцах. Сокращение гладкой мышцы требует фосфорилирование миозина. Этот процесс связан с внутриклеточным выбросом Ca^{2+} с последующим образованием Ca^{2+} -кальмодулинового комплекса и активацией киназы легких цепей миозина. Расслабление обеспечивается дефосфорилированием миозина с помощью фосфатазы легких цепей миозина. Предполагается, что процесс дефосфорилирования не регулируется. Другие возможные механизмы регуляции включают связанные с тонкими филаментами белки, такие как кальдесмон и кальпонин.

V. M. Danilova

Biochemical mechanisms of smooth muscle contraction regulation

Summary

In the review the analysis of the last achievement in the field of biochemistry and molecular physiology of contraction processes in smooth muscle are presented. Smooth muscle contraction involves myosin phosphorylation. This process is associated with intracellular Ca^{2+} influx followed by Ca^{2+} -calmodulin complex formation and myosin light chain kinase activation. The relaxation is provided by dephosphorylation of myosin through the agency of myosin light chain phosphatase. Dephosphorylation process is suggested not to be regulated. Other possible regulatory mechanisms include such thin filament linked proteins as caldesmon and calponin.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Hartshorne D. J. Biochemistry of the contractile process in smooth muscle // Physiology of the gastrointestinal tract / Ed. L. R. Johnson.— New York: Raven press.—1987.—P. 423—482.
2. Somlyo A. P., Somlyo A. V. Smooth muscle structure and function // The heart and cardiovascular system / Eds H. A. Fozzard et al.— New York: Raven press.— 1986—P. 845—861.
3. Adelstein R. S., Eisenberg E. Regulation and kinetics of the actin-myosin-ATP interaction // Ann. Rev. Biochem.—1980.—49.—P. 921—956.
4. Hartshorne D. J. Phosphorylation of myosin and the regulation of smooth muscle actomyosin // Cell and muscle motility / Ed. R. M. Dowben.—New York, 1982.—Vol. 2.—P. 185—220.
5. Kamm K. E., Stull J. T. The function of myosin and myosin light chain kinase phosphorylation in smooth muscle // Ann. Rev. Pharmacol. and Toxicol.—1985.—25.—P. 593—620.
6. Groschel-Stewart U., Drenckhahn D. Muscular and cytoplasmic contractile proteins // Collagen Rel. Res.—1982.—2.—P. 381-463.
7. Данилова В. М. Методи получения и характеристика гладкомышечного миозина // Биофиз. и биохим. методы исследования мышечных белков.—Л.: Наука, 1978.—С. 76—90.
8. Harrington W. F., Rodgers M. E. Myosin // Ann. Rev. Biochem.—1984.—53.—P. 35—73.
9. 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.

10. Margossian S. S., Lowey S. Interaction of myosin subfragments with F-actin // *Biochemistry*.—1978.—17.—P. 5431—5439.
11. Hartshorne D. J., Kawamura T. Regulation of contraction-relaxation in smooth muscle // *NIPS*.—1992.—7.—P. 59—64.
12. Maita T., Chen J.-I., Matsuda G. Amino-acid sequence of the 20000-molecular-weight light chain of chicken gizzard-muscle myosin // *Eur. J. Biochem.*—1981.—117.—P. 417—424.
13. Matsuda G., Maita T., Kato Y. et al. Amino acid sequences of the cardiac L-2A, L-2B and gizzard 17000-M_r light chains of chicken muscle myosin // *FEBS Lett.*—1981.—135.—P. 232—236.
14. Kendrick-Jones J., Scholey J. M. Myosin-linked regulatory systems // *J. Muscle Res. Cell Motil.*—1981.—2.—P. 347—372.
15. Driska S., Hartshorne D. J. The contractile proteins of smooth muscle. Properties and components of a Ca²⁺-sensitive actomyosin from chicken gizzard // *Arch. Biochem. and Biophys.*—1975.—167.—P. 203—212.
16. Mrwa U., Achtig I., Ruegg J. C. Influences of calcium concentration and pH on the tension development and ATPase activity of the arterial actomyosin contractile system // *Blood Vessels*.—1974.—11.—P. 277—286.
17. Barany M., Barany K., Gaetjens E., Bailin G. Chicken gizzard myosin // *Arch. Biochem. and Biophys.*—1966.—113.—P. 205—221.
18. Yamaguchi M., Miyazawa Y., Sekine T. Preparation and properties of smooth muscle myosin from horse esophagus // *Biochim. et biophys. acta.*—1970.—216.—P. 411—421.
19. Chacko S., Conti M., Adelstein R. S. Effect of phosphorylation of smooth muscle myosin on actin activation and Ca²⁺-regulation // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1977.—74.—P. 129—133.
20. Chacko S. Effects of phosphorylation, calcium ion, and tropomyosin on actin-activated adenosine 5'-triphosphatase activity of mammalian smooth muscle myosin // *Biochemistry*.—1981.—20.—P. 702—707.
21. Sobieszek A., Small J. V. Regulation of the actin-myosin interaction in vertebrate smooth muscle: Activation via a myosin light-chain kinase and the effect of tropomyosin // *J. Mol. Biol.*—1977.—112.—P. 559—576.
22. Hartshorne D. J., Gorecka A. Biochemistry of the contractile proteins of smooth muscle // *Handbook of physiology. The cardiovascular system* / Eds D. F. Bohr, A. P. Somlyo, H. V. Sparks.—Bethesda: Amer. physiol. Soc, 1980.—Vol. 2.—P. 93—120.
23. Etzinger M., Collins J. H., Kuchl W. M., Adelstein R. S. Complete amino acid sequence of actin of rabbit skeletal muscle // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1973.—70.—P. 2687—2691.
24. Vanderkerkhove J., Weber K. Actin sequences. Comparison of actins from calf thymus, bovine brain, and SV-transformed mouse 3T3 cells with rabbit skeletal muscle actin // *Eur. J. Biochem.*—1978.—90.—P. 451—462.
25. Rubenstein P. A., Spudich J. A. Actin microgeneity in chick embryo fibroblasts // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1977.—74.—P. 120—123.
26. Whalen R. G., Butler-Browne G. S., Gross F. Protein synthesis and actin heterogeneity in calf muscle cells in culture // *Ibid.*—1976.—73.—P. 2018—2022.
27. Vanderkerkhove J., Weber K. Chordate muscle actin differ distinctly from invertebrate muscle actins // *J. Mol. Biol.*—1984.—179.—P. 391—413.
28. Hanson J., Lowy J. The structure of F-actin and of actin filaments isolated from muscle // *J. Mol. Biol.*—1963.—6.—P. 46—60.
29. Korn E. D. Actin polymerization and its regulation by proteins from nonmuscle cells // *Physiol. Rev.*—1982.—62.—P. 672—737.
30. Weeds A. Actin-binding proteins-regulators of cell architecture and motility // *Nature*.—1982.—296.—P. 811—816.
31. Sobieszek A., Small J. V. Myosin-linked calcium regulation in vertebrate smooth muscle // *J. Mol. Biol.*—1976.—102.—P. 75—92.
32. Murray J. M., Weber A. The cooperative action of muscle proteins // *Sci. Amer.*—1974.—230.—P. 58—71.
33. Dabrowska R., Nowak E., Drabikowski W. Comparative studies of chicken gizzard and rabbit skeletal tropomyosin // *Comp. Biochem. Physiol. (B)*.—1980.—65.—P. 75—83.
34. Sanders C., Smillie L. B. Chicken gizzard tropomyosin: head-tail assembly and interaction with F-actin and troponin // *Can. J. Biochem. Cell Biol.*—1984.—62.—P. 443—448.
35. Sanders C., Smillie L. B. Amino acid sequence of chicken gizzard β -tropomyosin. Comparison of the chicken gizzard, rabbit skeletal and equine platelet tropomyosins // *J. Biol. Chem.*—1985.—260.—P. 7264—7275.
36. Ebashi S., Nononura Y., Toyooka T., Katayama E. Regulation of smooth muscle contraction by the calcium-troponin-tropomyosin system // *Calcium in biological systems* / Ed. C. J. Duncan.—London: Cambridge Univ. press, 1976.—P. 349—360.
37. Marston S. B., Smith C. W. Purification and properties of Ca²⁺-regulated thin filaments and F-actin from sheep aorta smooth muscle // *J. Muscle Res. Cell Motil.*—1984.—5.—P. 559—575.

38. *Walsh M. P.* Calmodulin and the regulation of smooth muscle contraction // *Mol. and Cell. Biochem.*—1994.—135.—P. 21—41.
39. *Sobue K., Muramoto Y., Fujita M., Kakiuchi S.* Purification of calmodulin-binding protein from chicken gizzard that interacts with F-actin // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1981.—78.—P. 5652—5655.
40. *Horiuchi K. Y., Chacko S.* Interaction between caldesmon and tropomyosin in the presence and absence of smooth muscle actin // *Biochemistry.*—1988.—27.—P. 8388—8393.
41. *Ikebe M., Reardon S.* Binding of caldesmon to smooth muscle myosin // *J. Biol. Chem.*—1988.—263.—P. 3055—3058.
42. *Marston S. B., Redwood C. S.* The molecular anatomy of caldesmon // *Biochem. J.*—1991.—279.—P. 1—16.
43. *Dabrowska R., Goch A., Galazkiewicz B., Osinska A.* The influence of caldesmon on ATPase activity of the skeletal muscle actomyosin and bundling of actin filaments // *Biochim. et biophys. acta.*—1985.—842.—P. 70—75.
44. *Ngai P. K., Walsh M. P.* Inhibition of smooth muscle actin-activated myosin Mg²⁺-ATPase activity by caldesmon // *J. Biol. Chem.*—1984.—259.—P. 13656—13659.
45. *Данилова В. М., Куликова Н. А., Трегубов В. С. и др.* Кальдесмон — Ca²⁺-регуляторная белковая компонента нативных тонких филаментов гладких мышц аорты // *Биополимеры и клетка.*—1995.—11, № 5.—С. 28—36.
46. *Sobue K., Morimoto M., Inui M. et al.* Control of actin-myosin interaction of gizzard smooth muscle by calmodulin- and caldesmon-linked flip-flop mechanism // *Biomed. Res.*—1982.—3.—P. 188—196.
47. *Takahashi K., Hiwada K., Kokubu T.* Isolation and characterization of a 34000-dalton calmodulin- and F-actin binding protein from chicken gizzard smooth muscle // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1986.—141.—P. 26—26.
48. *Stafford W. F., Mabuchi K., Takahashi K., Tao T.* Physical properties of calponin // *Biophys. J.*—1993.—64.—P. A 31.
49. *Miki M., Walsh M. P., Hartshorne D. J.* The mechanism of inhibition of the actin-activated myosin MgATPase by calponin // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1992.—187.—P. 867—871.
50. *Ebashi S., Kodama A., Ebashi F.* Troponin. 1. Preparation and physiological function // *J. Biochem.*—1966.—64.—P. 465—477.
51. *Sobieszek A., Bremel R. D.* Preparation and properties of vertebrate smooth-muscle myofibrils and actomyosin // *Eur. J. Biochem.*—1975.—55.—P. 49—60.
52. *Kendrick-Jones J., Lehman W., Szent-Gyorgyi A. G.* Regulation in molluscan muscles // *J. Mol. Biol.*—1970.—54.—P. 313—326.
53. *Szent-Gyorgyi A. G., Szentkiralyi E. M., Kendrick-Jones J.* The light chains of scallop myosin as regulatory subunits // *Ibid.*—1973.—74.—P. 179—203.
54. *Lehman W., Szent-Gyorgyi A. G.* Regulation of muscular contraction. Distribution of actin control and myosin control in the animal kingdom // *J. Gen. Physiol.*—1975.—66.—P. 1—30.
55. *Bremel R. D.* Myosin linked calcium regulation in vertebrate smooth muscle // *Nature.*—1974.—252.—P. 405—407.
56. *Mrwa U., Ruegg J. C.* Myosin-linked calcium regulation in vascular smooth muscle // *FEBS Lett.*—1975.—60.—P. 81—84.
57. *Хохлова В. С., Трегубов В. С., Данилова В. М.* Два типа Ca²⁺-зависимой регуляции актин-миозинового взаимодействия в гладких мышцах желудка свиньи // *Молекуляр. генетика и биофизика.*—1986.—11.—С. 28—33.
58. *Хохлова В. С., Куликова Н. В., Трегубов В. С., Данилова В. М.* Роль фосфорилирования миозина гладких мышц в регуляции актин-миозинового взаимодействия // *Там же.*—1991.—16.—С. 74—78.
59. *Ikebe M., Onishi H., Watanabe S.* Phosphorylation and dephosphorylation of a light chain of the chicken gizzard myosin molecule // *J. Biochem.*—1977.—82.—P. 299—302.
60. *Sobieszek A.* Ca²⁺-linked phosphorylation of a light chain of vertebrate smooth muscle myosin // *Eur. J. Biochem.*—1977.—73.—P. 477—483.
61. *Adelstein R. S., Conti M. A.* Phosphorylation of platelet myosin increases actin-activated myosin ATPase activity // *Nature.*—1975.—256.—P. 597—598.
62. *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.
63. *Bremel R. D., Sobieszek A., Small J. V.* Regulation of actin-myosin interaction in vertebrate smooth muscle // *Ibid.*—P. 533—549.
64. *Barron J. T., Barany M., Barany K.* Phosphorylation of the 20000-dalton light chain of myosin of intact arterial smooth muscle in rest and in contraction // *J. Biol. Chem.*—1979.—254.—P. 4954—4954.
65. *Walsh M. P.* Calmodulin-dependent myosin light chain kinases // *Cell Calcium.*—1981.—2.—P. 335—382.

66. Burger D., Cox J. A., Comte M., Stein E. A. Sequential conformational changes in calmodulin upon binding of calcium // *Biochemistry*.—1984.—23.—P. 1966—1971.
67. Ngai P. K., Carruthers C. A., Walsh M. P. Isolation of the native form of chicken gizzard myosin light chain kinase // *Biochem. J.*—1984.—218.—P. 863—870.
68. Edelman A. U., Lin W.-H., Osterhout D. J. et al. Phosphorylation of smooth muscle myosin by type II Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase // *Mol. Cell. Biochem.*—1990.—97.—P. 87—98.
69. DiSalvo J., Gifford D., Bialojan C., Ruegg J. C. An aortic spontaneously active phosphatase dephosphorylates myosin and inhibits actin-myosin interaction // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1983.—111.—P. 906—911.
70. Ruegg J. C., DiSalvo J., Paul R. J. Soluble relaxation factor from vascular smooth muscle: A myosin light chain phosphatase // *Ibid.*—1982.—106.—P. 1126—1133.
71. Pato M. D., Adelstein R. S. Dephosphorylation of the 20000-dalton light chain of myosin by two different phosphatases from smooth muscle // *J. Biol. Chem.*—1980.—255.—P. 6535—6538.
72. Werth O. K., Haeberle J. R., Hathaway D. R. Purification of a myosin phosphatase from bovine aortic smooth muscle // *Ibid.*—1982.—257.—P. 7306—7309.
73. Bialojan C., Ruegg J. C., DiSalvo J. Phosphatase-mediated modulation of actin-myosin interaction in bovine aortic actomyosin and skinned porcine carotid artery // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*—1985.—178.—P. 36—45.
74. Ikebe M., Hartshorne D. J. Proteolysis and actin-binding properties of 10S and 6S smooth muscle myosin: identification of a site protected from proteolysis in the 10S conformation and by the binding of actin // *Biochemistry*.—1986.—25.—P. 6177—6185.
75. Dillon P. F., Aksoy M. O., Driska S. P., Murphy R. A. Myosin phosphorylation and the cross-bridge cycle in arterial smooth muscle // *Sci. Wash. DC.*—1981.—211.—P. 495—497.
76. Morgan J. P., Morgan K. G. Vascular smooth muscle: The first recorded Ca^{2+} -transients // *Pflugers Arch.*—1982.—395.—P. 75—77.
77. Stull J. T., Gallagher P. J., Herring B. P., Kamm K. E. Vascular smooth muscle contractile elements: cellular regulation // *Hypertension Dallas.*—1991.—17.—P. 723—732.
78. Morgan K. G. The role of calcium in the control of vascular tone as assessed by the Ca^{2+} indicator aequorin // *Cardiovasc. Drugs Ther.*—1990.—4.—P. 1355—1362.
79. Barany M. ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening // *J. Gen. Physiol.*—1967.—50, Suppl. 1, pt 2.—P. 197—218.
80. Driska S. P., Aksoy M. O., Murphy R. A. Myosin light chain phosphorylation associated with contraction in arterial smooth muscle // *Amer. J. Physiol.*—1981.—240.—P. 222—233.
81. Hidaka H., Naka M., Yamaki T. Effect of novel specific myosin light chain kinase inhibitors on Ca^{2+} -activated Mg^{2+} -ATPase of chicken gizzard actomyosin // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1979.—90.—P. 694—699.
82. Sheterline P. Trifluoperazine can distinguish between myosin light chain kinase-linked and troponin C-linked control of actomyosin interaction by Ca^{2+} // *Ibid.*—1980.—93.—P. 194—200.
83. Gergely P., Vereb G., Bot G. Triphosphate-activated phosphorylase kinase as a probe in the regulation of phosphorylase phosphatase // *Biochim. et biophys. acta.*—1976.—429.—P. 809—816.
84. Gratecos D., Fischer E. H. Adenosine 5'-O(3-thiophosphate) in the control of the phosphorylase activity // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1974.—58.—P. 960—967.
85. Cassidy P. S., Hoar P. E., Kerrick W. G. Irreversible thiophosphorylation and activation of tension in functionally skinned rabbit ileum trips by [^{35}S]ATPyS // *J. Biol. Chem.*—1979.—254.—P. 11148—11153.
86. Sherry J. M. F., Gorecka A., Aksoy M. O. et al. Role of calcium and phosphorylation in the regulation of the activity of gizzard myosin // *Biochemistry*.—1978.—17.—P. 4411—4418.
87. Walsh M. P., Dabrowska R., Hinkins S., Hartshorne D. J. Calcium-independent myosin light chain kinase of smooth muscle. Preparation by limited chymotryptic digestion of the calcium ion dependent enzyme, purification and characterization // *Ibid.*—1982.—21.—P. 1919—1925.
88. Walsh M. P., Bridenbaugh R., Kerrick W. G. L., Hartshorne D. J. Phosphorylation-dependent activated tension in skinned gizzard muscle fibers in the absence of Ca^{2+} // *J. Biol. Chem.*—1982.—257.—P. 5987—5990.
89. Gong M.C., Cohen P., Kitazawa T. et al. Myosin light chain phosphatase activities and the effect of phosphatase inhibitors in tonic and phasic smooth muscle // *Ibid.*—1992.—267.—P. 14662—14668.
90. Small J. V., Sobieszek A. Myosin phosphorylation and Ca^{2+} -regulation in vertebrate smooth muscle // *Excitation-contraction coupling in smooth muscle* / Eds R. Casteels, T. Cooldraind, J. C. Ruegg.— Amsterdam: Elsevier, 1977.—P. 385—393.
91. Chacko S., Rosenfeld A. Regulation of actin-activated ATP hydrolysis by arterial myosin // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1982.—79.—P. 292—296.
92. Kaminski E. A., Chacko S. Effects of Ca^{2+} and Mg^{2+} on the actin-activated ATP hydrolysis by

- phosphorylated heavy meromyosin from arterial smooth muscle // *J. Biol. Chem.*—1984.—259.—P. 9104—9108.
93. *Cole H. A., Patchell V. B., Perry S. V.* Phosphorylation of chicken gizzard myosin and the Ca^{2+} -sensitivity of the actin-activated Mg^{2+} -ATPase // *FEBS Lett.*—1983.—158.—P. 17—20.
 94. *Ikebe M., Hartshorne D. J.* Effects of Ca^{2+} on the conformation and enzymatic activity of smooth muscle myosin // *J. Biol. Chem.*—1985.—260.—P. 13146—13153.
 95. *Nishikawa M., Shirakawa S., Adelstein R. S.* Phosphorylation of smooth muscle myosin light chain by protein kinase C. Comparative study of the phosphorylated sites // *Ibid.*—P. 8978—8983.
 96. *Adelstein R. S., Conti M. A., Hathaway D. R., Klee C. B.* Phosphorylation of smooth muscle myosin light chain kinase by the catalytic subunit of adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase // *Ibid.*—1978.—253.—P. 8347—8350.
 97. *Conti M. A., Adelstein R. S.* Phosphorylation by cyclic adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase regulates myosin light chain kinase // *Fed. Proc.*—1980.—39.—P. 1569—1573.
 98. *Mrwa U., Troschka M., Ruegg J. C.* Cyclic AMP-dependent inhibition of smooth muscle actomyosin // *FEBS Lett.*—1979.—107.—P. 371—374.
 99. *Silver P. J., DiSalvo J.* Adenosine-3':5'-monophosphate-mediated inhibition of myosin light chain phosphorylation in bovine aortic actomyosin // *J. Biol. Chem.*—1979.—254.—P. 9951—9954.
 100. *Kerrick W. G. L., Hoar P. E.* Inhibition of smooth muscle tension by cyclic AMP-dependent protein-kinase // *Nature.*—1981.—292.—P. 253—255.
 101. *Stull J. T., Hsu L. -C., Tansey M. G., Kamm K. E.* Myosin light chain kinase phosphorylation in tracheal smooth muscle // *J. Biol. Chem.*—1990.—265.—P. 16683—16690.
 102. *Marston S. B., Smith C. W. J.* The thin filaments of smooth muscle // *J. Muscle Res. Cell Motil.*—1985.—6.—P. 669—708.
 103. *Abe M., Takahashi K., Hiwada K.* Effect of calponin on actin-activated myosin ATPase activity // *J. Biochem.*—1990.—108.—P. 895—898.
 104. *Haeblerle J. R., Trybus K. M., Hemric M. E., Warsaw D. M.* The effects of smooth muscle caldesmon on actin filaments motility // *J. Biol. Chem.*—1992.—267.—P. 23001—23006.
 105. *Scott-Woo G. C., Sutherland C., Walsh M. P.* Kinase activity associated with caldesmon in Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase II // *Biochem. J.*—1990.—268.—P. 367—370.
 106. *Winder S. J., Walsh M. P.* Smooth muscle calponin: inhibition of actomyosin MgATPase and regulation by phosphorylation // *J. Biol. Chem.*—1990.—265.—P. 10148—10155.
 107. *Velaz I., Ingraham R. H., Chalovich J. M.* Dissociation of the effect of caldesmon on the ATPase activity and on binding of smooth heavy meromyosin to actin by partial digestion of caldesmon // *Ibid.*—P. 2929—2934.
 108. *Adams S., Das Gupta G., Chalovich J. M., Reisler E.* Immunochemical evidence for the binding of caldesmon to the NH_2 -terminal segment of actin // *Ibid.*—P. 19652—19657.
 109. *Bartegi A., Fattoum A., Kassab R.* Cross-linking of smooth muscle caldesmon to NH_2 -terminal region of skeletal F-actin // *Ibid.*—P. 2231—2237.
 110. *Levine B. A., Moir A. J. G., Audemard E. et al.* Structural study of gizzard caldesmon and its interaction with actin-binding involves residues of actin also recognized by myosin subfragment I // *Eur. J. Biochem.*—1990.—193.—P. 687—696.
 111. *Galazkiewicz B., Belagyi Y., Dabrowska R.* The effect of caldesmon on assembly and dynamic properties of actin // *Ibid.*—1989.—181.—P. 607—614.
 112. *Harricane M.-C., Fabbriozio E., Arpin E., Mornet D.* Involvement of caldesmon at the actin-myosin interface // *Biochem. J.*—1992.—287.—P. 633—637.
 113. *Nowak E., Borovikov Yu. S., Dabrowska R.* Caldesmon weakens the binding between myosin heads and actin in ghost fibers // *Biochim. et biophys. acta.*—1989.—999.—P. 289—292.
 114. *Brenner E., Yu L. C., Chalovich J. M.* Parallel inhibition of active force and relaxed fiber stiffness in skeletal muscle by caldesmon: Implication for the pathway to force generation // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1991.—88.—P. 5739—5743.
 115. *Chalovich J. M., Yu L. C., Brenner B.* Involvement of weak binding crossbridges in force production in muscle // *J. Muscle Res. Cell Motil.*—1991.—12.—P. 503—506.
 116. *Marston S. B.* Aorta caldesmon inhibits actin activation of thiophosphorylated heavy meromyosin Mg^{2+} -ATPase activity by slowing the rate of product released // *FEBS Lett.*—1988.—238.—P. 147—150.
 117. *Marston S. B., Redwood Ch. S.* Inhibition of actin-tropomyosin activation of myosin MgATPase activity by the smooth muscle regulatory protein caldesmon // *J. Biol. Chem.*—1992.—267.—P. 16796—16800.
 118. *Horiuchi K. Y., Samuel M., Chacko S.* Mechanism for inhibition of acto-heavy meromyosin ATPase by the actin/calmodulin binding of caldesmon // *Biochemistry.*—1991.—30.—P. 712—717.
 119. *Mezgueldi M., Fattoum A., Derancourt J., Kassab R.* Mapping of the functional domains in amino-terminal region of calponin // *J. Biol. Chem.*—1992.—267.—P. 15943—15951.

120. *Vancompernelle K., Vanderkerkhove J., Bubb M. R., Korn D.* The interfaces of actin and *Acanthamoeba* actobindin. Identification of a new actin-binding motif // *Ibid.*—1991.—266.—P. 15427—15431.
121. *Kabsch W., Mannherz H. G., Suck D. et al.* Atomic structure of the actin: DNase I complex // *Nature.*—1990.—347, N 6288.—P. 37—44.
122. *Horiuchi K. Y., Chacko S.* The mechanism for the inhibition of the actin-activated ATPase of smooth muscle heavy meromyosin by calponin // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1991.—176.—P. 1487—1493.
123. *Szpacenko A., Wagner J., Dabrowska R., Ruegg J. C.* Caldesmon-induced inhibition of ATPase activity of actomyosin and contraction of skinned fibers of chicken gizzard smooth muscle // *FEBS Lett.*—1985.—192.—P. 912.
124. *Taggart J. M., Marston S.* The effects of vascular smooth muscle caldesmon on force production by sensitized skeletal muscle fibers // *Ibid.*—1988.—242.—P. 171—174.
125. *Nonomura Y., Ebashi S.* Calcium regulatory mechanism in vertebrate smooth muscle // *Biomed. Res.*—1980.—1.—P. 1—14.
126. *Данилова В. М.* Регуляция актин-миозинового взаимодействия в гладких мышцах позвоночных // *Механизмы контроля мышечной деятельности.*—Л.: Наука, 1985.—С. 128—147.
127. *Merkel L., Meisheri K. D., Pfitzer G.* The variable relation between myosin light-chain phosphorylation and actin-activated ATPase activity in chicken gizzard smooth muscle. Modulation by tropomyosin // *Eur. J. Biochem.*—1984.—138.—P. 429—434.
128. *Persechini A., Hartshorne D. J.* Phosphorylation of smooth muscle myosin: Evidence for cooperativity between the myosin heads // *Science.*—1981.—213.—P. 1383—1385.
129. *Ebashi S., Mikawa T., Hirata M. et al.* Regulatory proteins of smooth muscle // *Excitation-contraction coupling in smooth muscle* / Eds R. Casteels, T. Godfraind, J. C. Ruegg.—Amsterdam: Elsevier, 1977.—P. 325—334.
130. *Mikawa T., Nonomura Y., Hirata M. et al.* Involvement of an acidic protein in regulation of smooth muscle contraction by the tropomyosin-leiotonin system // *J. Biochem.*—1978.—84.—P. 1633—1636.
131. *Mikawa T., Nonomura Y., Ebashi S.* Does phosphorylation of myosin light chain have direct relation to regulation in smooth muscle? // *Ibid.*—1977.—82.—P. 1789—1781.