

А. М. Филенко, А. Собешек, Э. Б. Бабийчук,  
В. С. Омелянюк, В. М. Данилова, Н. Б. Яновская, А. Ю. Бабенко

## НАДМОЛЕКУЛЯРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ И АКТИВНОСТЬ КИНАЗЫ ЛЕГКИХ ЦЕПЕЙ МИОЗИНА ГЛАДКИХ МЫШЦ

*Киназа легких цепей миозина (КЛЦМ) играет ключевую роль в механизмах регуляции сокращения гладких мышц. Полученные нами с помощью лазерной корреляционной спектроскопии данные позволяют утверждать, что неактивированная КЛЦМ из гладких мышц в растворе в условиях близких к физиологическим, существует в виде смеси олигомерных и димерных частиц с гидродинамическими диаметрами ~ 150 и 20 нм соответственно. Эти частицы очевидно находятся в динамическом равновесии. Мы не обнаружили заметных изменений в распределении различных форм киназы в растворе после ее активации при избытке как киназы, так и кальмодулина (СаМ). При значительном избытке киназы по отношению к СаМ ее активность через 5—10 мин уменьшается в несколько раз. По-видимому, наблюдаемое ингибирование киназы перед добавлением субстрата связано с медленными конформационными изменениями активированных молекул киназы, о чем свидетельствуют результаты проведенных нами флюоресцентных исследований. Подобные перестройки отмечаются и при эквимольном соотношении киназы и СаМ, однако в этом случае они характеризуются меньшей глубиной и незначительным понижением активности КЛЦМ. Медленные конформационные перестройки в надмолекулярных структурах активированной киназы скорее всего имеют коллективный характер и связаны с усилением взаимного влияния между молекулами киназы, приводящего к ослаблению связывания  $\text{Ca}^{2+}$ -СаМ. В качестве рабочей гипотезы можно предположить, что в надмолекулярных комплексах активированной киназы устанавливаются взаимодействия псевдосубстратного участка одной молекулы с активным центром соседней с возникновением стерических препятствий для связывания СаМ.*

**Введение.** Недавно было показано, что киназа легких цепей миозина (КЛЦМ) гладких мышц может находиться в растворе и функционировать в форме надмолекулярных структур [1]. При стимуляции гладкомышечной клетки, когда концентрация внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  в ней увеличивается до 0,5 мкМ, последний хелатируется кальмодулином (СаМ). Кальмодулин после связывания кальция ( $\text{Ca}_4^{2+}$ -СаМ) характеризуется большим сродством к киназе и стимулирует ее активацию. Активированная форма киназы ( $\text{Ca}^{2+}$ -СаМ-КЛЦМ) фосфорилирует регуляторную легкую цепь (РЛЦ) гладкомышечного миозина по остатку Сер-19 (и, возможно, Тре-18). Фосфорилированные миозиновые головки, используя энергию АТФ, могут вступать в циклическое взаимодействие с нитями актина, обеспечивая элементарный акт сокращения [2—4]. В неактивную (дефосфорилированную) форму миозиновые молекулы переводит другой фермент — фосфатаза легких цепей миозина [5].

КЛЦМ совершенно неактивна в отсутствие  $\text{Ca}^{2+}$  и СаМ. Результаты многочисленных исследований [6—9] позволяют утверждать, что киназа ингибируется псевдосубстратным доменом, который является частью ее структуры и гомологичен участку фосфорилирования РЛЦ миозина (остатки 1—19). Участок связывания СаМ включает часть псевдосубстратного домена, поэтому при связывании СаМ киназой псевдосубстратный домен удаляется из ее активного центра и ингибирование «снимается». Такое представление об особенностях функционирования КЛЦМ подтверждается исследованиями ее отдельных фрагментов [8, 9]. Так, киназу с частично удаленным участком связывания СаМ невозможно перевести в активную форму, а фрагмент киназы с уда-

© А. М. ФИЛЕНКО, А. СОБЕШЕК, Э. Б. БАБИЙЧУК, В. С. ОМЕЛЯНЮК, В. М. ДАНИЛОВА,  
Н. Б. ЯНОВСКАЯ, А. Ю. БАБЕНКО, 1996

ленным псевдосубстратным доменом проявляет полную активность в отсутствие  $\text{Ca}^{2+}$  и СаМ. Такая модель активации киназы подтверждается и результатами исследований с синтетическими пептидами, аналогичными по первичной последовательности участку связывания СаМ, которые являются потенциальными ингибиторами активности киназы [7]. Кроме автоингибирования, возможны также дополнительные конформационные изменения структуры киназы, о чем свидетельствуют результаты исследований со связыванием мутантных форм кальмодулина [10].

В живой клетке имеются механизмы модификации активности киназы и, следовательно, существует возможность регуляции киназной активности. Так, фосфорилирование КЛЦМ цАМФ-зависимой протеинкиназой приводит к уменьшению сродства КЛЦМ к  $\text{Ca}^{2+}$ -СаМ и, таким образом, к понижению ее активности [5].

Исследования *in vitro* показывают, что при значительном избытке киназы над кальмодулином ее активность в предынкубационный период (перед добавлением субстрата) за 5—10 мин может уменьшиться в несколько раз. Этот процесс, по-видимому, связан с организацией киназы в олигомерные комплексы и медленным изменением ее конформации в таких комплексах после активации [1]. Подобная ситуация при определенных условиях вполне может иметь место *in vivo* и, следовательно, выступать в качестве одного из механизмов регуляции киназной активности.

Целью настоящей работы было исследование особенностей надмолекулярной организации КЛЦМ, а также характера изменений, приводящих к уменьшению ее активности в предынкубационный период, с использованием методов лазерной корреляционной спектроскопии (ЛКС) и флуоресценции.

**Материалы и методы.** КЛЦМ и СаМ получали из мышечного желудка индейки и желудка свиньи, как описано в работах [1, 11]. Концентрацию киназы определяли по поглощению при 278 нм, используя коэффициент адсорбции  $A^{1\%} = 11,4$  [12].

В качестве субстрата КЛЦМ использовали миозин и его регуляторную легкую цепь с молекулярной массой 20 000. Миозин выделяли из свежеекстрагированного актомиозина [13] фракционированием в  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  [14] и хранили при  $-70^\circ\text{C}$ . Регуляторную легкую цепь выделяли согласно методу [15] и очищали, как описано ранее [16]. Концентрации миозина и его легкой цепи определяли по биуретовому методу [17].

Для стабилизации и разделения различных олигомерных форм киназу сначала «сшивали», добавляя в раствор 2—5 мМ 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодимида (ЭДК) и выдерживая его 20 мин при  $25^\circ\text{C}$ . Реакцию останавливали добавлением двухмолярного избытка дитиозеритрита (ДТЭ), а затем киназу подвергали гель-фильтрации на колонке (0,6 см  $\times$  100 см), заполненной Сефакрилом S-200, которую уравнивали стандартным буфером, используемым в работе и содержащим дополнительно 0,3 М NaCl. Димеризацию и олигомеризацию киназы анализировали с помощью мини-ДСН-ПААГ-электрофореза, как описано в работе [18].

Скорости фосфорилирования измеряли при  $25^\circ\text{C}$  в буфере следующего состава (мМ): KCl — 60,  $\text{MgCl}_2$  — 2, ДТЭ — 0,5, имидазол — 10; pH буфера доводили до 7,5 при  $4^\circ\text{C}$ . При использовании методов ЛКС и флуоресценции концентрацию KCl в буфере доводили до 180 мМ. Другие детали см. в работах [1, 11] и в соответствующих подписях к рисункам.

Для прямого обнаружения олигомерных форм КЛЦМ в растворе применяли метод ЛКС, который объединяет современную оптику, электронику и компьютерную систему. Измерения проводили на установке, собранной в Лаборатории физико-химической семиотики Ин-та биохимии им. А. А. Палладина НАН Украины. В качестве источника излучения использовали гелий-неоновый лазер с длиной волны 632,8 нм и

мощностью 50 мВт, работающей в одномодовом режиме. Лазерный луч фокусировали при помощи прецизионной оптической системы фирмы Optimation. Излучение, рассеянное исследуемым раствором, собиралось системой линз под углом  $90^\circ$  к направлению луча лазера. Для идентификации частиц киназы проводили также отдельные опыты по зависимости светорассеяния от угла регистрации излучения. В установке использовался гониометр SP-86 фирмы ALV-Laser. Гомодинную автокорреляционную функцию измеряли коррелятором K7032 фирмы MALVERN. Анализ полученных автокорреляционных функций проводили на персональном компьютере фирмы Olivetti. Для этого применяли процедуру регуляризации, описанную в работе [19]. Использование ЛКС совместно с математической программой регуляризации позволяет получить информацию как об эффективном гидродинамическом диаметре частиц, так и об их относительном распределении. Результаты измерений образцов по методу ЛКС представляются в виде гистограмм, отражающих вид функции распределения частиц по размерам. Высота столбиков в гистограмме пропорциональна относительному вкладу частиц данного размера в суммарный спектр рассеяния света в заданном диапазоне. Программа регуляризации восстанавливает функцию распределения по размерам частиц в 32 точках. В связи с большим диапазоном размеров функция распределения для удобства изображения представлена в логарифмическом масштабе. Для очистки от пылевых частиц растворы белка перед заливкой в кювету пропускали через фильтр Micropor с диаметром пор 0,22 мкм.

Флюоресцентный метод изучения конформационных изменений киназы был использован в двух вариантах: а) анализ собственной (триптофановой) флюоресценции КЛЦМ и б) исследование излучения флюоресцентного зонда 9-антроилхолина (9АХ), специфически связывающегося с киназой из гладких мышц [20]. Во втором случае был использован спектрофлуориметр фирмы Hitachi MPF-3. При этом флюоресценцию регистрировали в максимуме спектра излучения зонда (462 нм) при возбуждении в максимуме спектра его поглощения (366 нм). Для определения небольших изменений собственной флюоресценции КЛЦМ в предынкубационном периоде был использован спектрофотометр MPF-4 (производства ГДР), позволяющий прецизионно регистрировать отношение суммарного (не разложенного в спектр) флюоресцентного излучения в двух каналах, один из которых был опорным. При этом длину волны возбуждения выбирали в максимуме спектра поглощения белка (280 нм), и компоненту возбуждающего излучения в суммарном флюоресцентном излучении отсекали фильтром, пропускающим излучение с длиной волны больше 300 нм. В обе кюветы, помещенные в основном и опорном каналах, заливали один и тот же раствор, содержащий КЛЦМ, СаМ и ЭГТА. Затем киназу в основном канале активировали введением  $\text{CaCl}_2$ , а в кювету опорного канала помещали соответствующий объем буфера для коррекции разведения белка в основном канале.

**Результаты и обсуждение.** Ранее было показано, что гладкомышечная киназа активируется СаМ с высокой степенью кооперативности [11]. Такой кооперативности не наблюдается при активации СаМ киназой. Более того, при постоянной концентрации СаМ зависимость активности киназы от ее концентрации двухфазная [1]. Активность киназы постепенно увеличивается с возрастанием ее концентрации до тех пор, пока СаМ, имеющийся в растворе, не насыщается киназой (приблизительно эквимолярное соотношение). Следовало бы ожидать, что после насыщения активность должна оставаться постоянной при дальнейшем увеличении концентрации апофермента, поскольку активная форма киназы в таких условиях определяется концентрацией СаМ. Однако в эксперименте наблюдается понижение киназной активности: при 4—6-кратном избытке апофермента активность уменьшается в несколько раз. После опробования различных вариантов введения в раствор реагентов был сделан вывод о том, что это ингибирование является ре-

зультатом предынкубации КЛЦМ с субстехиометрическими концентрациями  $\text{Ca}^{2+}$ -СаМ до введения в раствор субстрата (РЛЦ или миозина). Наличие в растворе АТФ не влияло на эффект ингибирования. Следовательно, за время предынкубации происходят изменения КЛЦМ, зависящие от СаМ.

Для определения временных интервалов, за которые такие изменения происходят, выбирали различную продолжительность предынкубации киназы с  $\text{Ca}^{2+}$ -СаМ с последующим измерением скорости фосфорилирования в стандартных условиях. Концентрации КЛЦМ и СаМ при

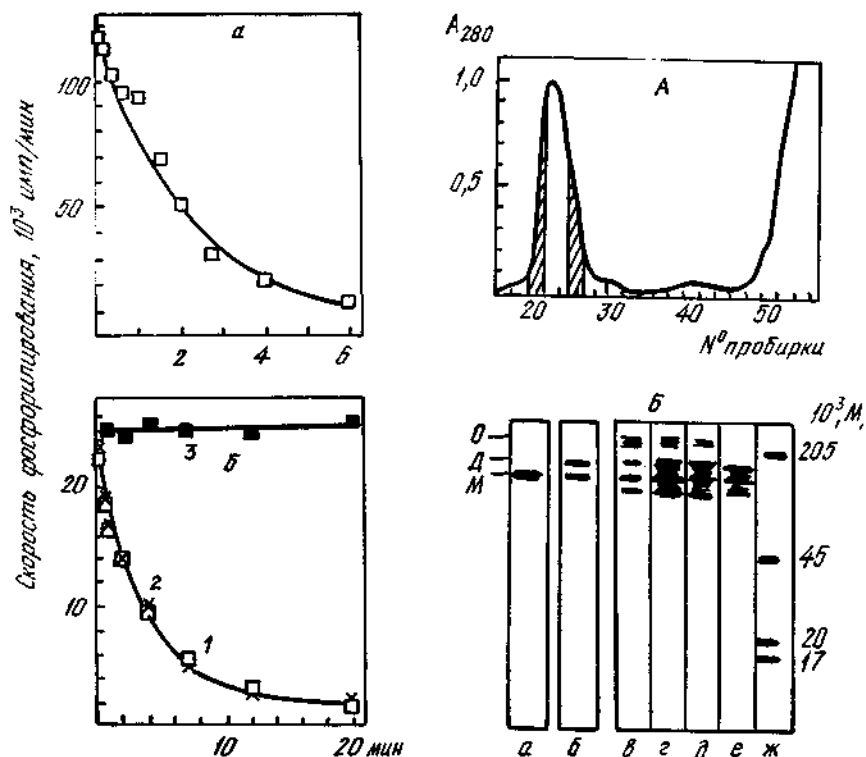


Рис. 1. Зависимость ингибирования КЛЦМ от времени предынкубации с  $\text{Ca}^{2+}$ -СаМ. Скорость фосфорилирования измеряли, добавляя в раствор РЛЦ киназу, предынкубированную с СаМ в течение отрезков времени, отложенных на оси абсцисс: а — киназа и СаМ из желудка свиньи, их концентрации 4,0 и 0,12 мкМ соответственно; б — киназа и СаМ из мышечного желудка индейки, их концентрации 3,5 и 0,65 мкМ соответственно (1). Добавление 2,5 мкМ окарбиновой кислоты не влияло на модификацию киназы в процессе предынкубации (2). Эффект ингибирования не наблюдается после предынкубирования киназы и СаМ при том же молярном соотношении, но концентрациях в 12 раз выше (3)

Рис. 2. Частичное разделение димерной и олигомерной форм КЛЦМ: А — хроматографическое разделение КЛЦМ из мышечного желудка индейки, предварительно «прошитой» ЭДК (условия разделения приведены в «Материалах и методах»); фракции на подъеме и спаде (заштриховано) анализировали на активирование кальмодулином; Б — ДСН-ПААГ-электрофорез различных форм КЛЦМ после их разделения на колонке Сефакирила S-200 (А): а — немодифицированная киназа; б — «прошитая» киназа перед нанесением ее на колонку S-200; в, г, д, е — соответственно пробирки 21, 23, 25 и 27 (см. А); ж — смесь стандартных белков с известными  $M_r$ ; о — олигомер; д — димер; м — мономер

этом поддерживались постоянными и соответствовали очень высокой степени ингибирования. Как видно из рис. 1 (а), для ингибирования КЛЦМ из желудка свиньи требуется время предынкубации с  $\text{Ca}^{2+}$ -СаМ около 4 мин при 25 °С. Как правило, в аналогичных условиях для препаратов из мышечного желудка индейки требуется значительно большее время предынкубации (рис. 1, б), однако не превышающее обычно 10—15 мин.

Поскольку наблюдаемые изменения свойств КЛЦМ имеют место при отсутствии в растворе АТФ, то ковалентные модификации типа фосфорилирования киназы можно исключить. Скорее можно ожидать дефосфорилирования киназы СаМ-зависимой фосфатазой, следы которой могут находиться в препаратах киназы. Однако добавление во время предынкубации 0,7 мкМ микроцистина-LR или 2,5 мкМ ооканиновой кислоты, являющихся ингибиторами фосфатазы, не оказывало влияния на эффект ингибирования (рис. 1, б). Известно также, что киназа подвержена автофосфорилированию, но ранее было показано, что эта форма киназы обладает такими же характеристиками ингибирования, как и нефосфорилированная [1]. Интересным пред-

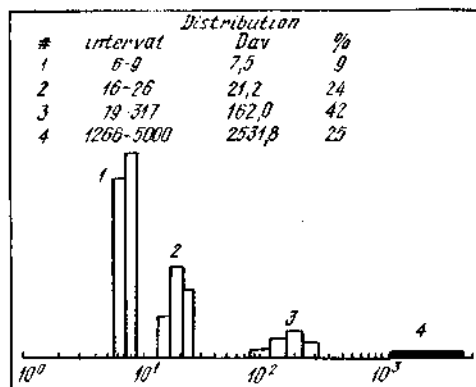


Рис. 3. Распределение частиц по размерам в растворе КЛЦМ из мышечного желудка индейки, полученное методом ЛКС. Условия опыта: концентрация киназы 4,9 мкМ; состав буфера (мМ): имидазол — 10;  $MgCl_2$  — 2;  $KCl$  — 180; ДТЭ — 0,2; pH 7,5 при 4°C. По оси абсцисс в логарифмическом масштабе отложен гидродинамический диаметр частиц  $D$  в нм

ставляется обнаруженный факт, свидетельствующий о том, что ингибирование киназы зависит от ее концентрации. Так, при увеличении последней в 10—15 раз и предынкубации с СаМ (при том же отношении КЛЦМ/СаМ) ингибирования не наблюдалось (рис. 1, б). Это может косвенно подтверждать связь ингибирования киназы с образованием олигомерных состояний. Наличие олигомеров в растворе киназы было показано в опытах по «сшивке» с использованием «сшивателя» нулевой длины ЭДК, который обычно применяют в исследовании актин-миозиновых взаимодействий [21]. Использование 2—5 мМ ЭДК позволило частично «зафиксировать» различные формы киназы (олигомеры, димеры) в растворе.

Для частичного разделения различных форм киназы ее препараты после «сшивки» пропускали через гель-фильтрационную колонку, заполненную Сефакрилом S-200 (рис. 2, А). На основании данных ДСН-ПААГ-электрофореза показано (рис. 2, Б), что киназа из фракций на подъеме пика была обогащена олигомерами, тогда как фракции на спаде пика содержали в основном димеры и мономеры. Полного разделения этих форм киназы добиться невозможно, однако характер активации кальмодулином двух полученных фракций четко различался [1]. Фракция на подъеме активировалась по гиперболической зависимости, при этом фракция на спаде характеризовалась положительной кооперативностью.

Приведенные биохимические результаты свидетельствуют о наличии в растворе киназы олигомеров и димеров. Для более четкого представления о надмолекулярной организации киназы и оценки распределения ее частиц по размерам мы использовали метод ЛКС. Этот метод не вносит практически никаких пертурбаций в раствор исследуемого белка [22]. На рис. 3 приведена типичная картина распределения частиц в растворе киназы по размерам. Рассеяние в интервале 1266—5000 нм связано с наличием в растворе небольшого количества частичек пыли, от которой трудно полностью избавиться фильтрованием. Остальные компоненты рассеяния связаны с частицами киназы, что подтверждается характером зависимости рассеяния этих частиц от угла рассеяния (данные не приведены).

Киназа по молекулярной массе (110 000) и форме молекулы близка к субфрагменту I миозина, гидродинамический диаметр которого ра-

вен приблизительно 10 нм [23]. Поэтому мы полагаем, что частицы киназы в интервале 16—26 нм со средним диаметром  $D_{av}=21,2$  нм соответствуют димерной форме этого белка, а частицы с  $D_{av}=162$  нм в интервале 79—317 нм представляют собой крупные олигомеры. Что же касается частиц с  $D_{av}=7,2$  нм в интервале 6—9 нм, то это, по всей видимости, крупные протеолитические фрагменты КЛЦМ. По данным электрофореза, таких фрагментов может быть до 10 % от общей концентрации этого белка.

Результаты исследования методом ЛКС растворов киназы без кальмодулина, а также при различных соотношениях КЛЦМ и СаМ до и после сборки активной формы фермента приведены в таблице. Следует отметить, что из-за малых размеров молекул кальмодулина и небольшой его концентрации светорассеяние этого белка в условиях нашего эксперимента не обнаруживалось. Как ранее отмечалось, эффект ингибирования активированного фермента в процессе его предынкубации проявляется при достаточно малых концентрациях киназы в первые 5—10 мин после активации. Поэтому для обнаружения возможных изменений в параметрах частиц за время предынкубации мы выбирали небольшие концентрации киназы и минимальное время измерения (2 мин). Эти условия далеки от оптимальных при исследовании методом ЛКС, поэтому, как видно из таблицы, разброс полученных в опытах значений достаточно большой. И все же приведенные данные свидетельствуют о том, что связывание киназы с  $\text{Ca}^{2+}$ -СаМ как при избытке киназы, так и при избытке СаМ, а также предынкубирование полученной активной формы киназы на протяжении более 8 мин практически не влияют на

*Средние гидродинамические диаметры ( $D_{av}$ ) различных форм киназы из мышечного желудка индейки и их долевое участие (%) в светорассеянии при различных соотношениях киназы и кальмодулина*

№ опыта	№ измерения	$D_{av}^*$	%	$D_{av}^{**}$	%	$D_{av}^{***}$	%
1		4,9 мкМ КЛЦМ, без СаМ					
	1	162,0	56	21,2	32	7,5	12
	2	128,5	48	25,7	43	7,7	9
	3	172,4	45	18,6	41	8,2	14
2		4,9 мкМ КЛЦМ, 0,2 мМ ЭГТА, 12,7 мкМ СаМ					
	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
		+0,4 мМ $\text{CaCl}_2$					
	4	151,3	56	17,9	41	5,7	3
	5	155,7	59	27,1	35	8,5	6
	6	182,2	50	16,6	37	9,2	13
	7	154,5	47	20,3	45	7,4	8
3		4,9 мкМ КЛЦМ, 0,2 мМ ЭГТА, 1,5 мкМ СаМ					
	1	161,7	51	21,3	37	6,4	11
	2	151,2	53	24,1	38	9,0	10
	3	140,5	50	18,3	36	7,8	14
		+0,3 мМ $\text{CaCl}_2$					
	4	124,6	46	22,7	42	5,9	12
	5	159,0	57	17,9	36	7,3	7
	6	167,0	55	16,3	37	8,9	8
	7	198,8	53	21,5	40	8,9	7

Примечание. Состав буфера см. подпись к рис. 3. Длительность каждого измерения 2 мин. Во всех опытах измерения следовали друг за другом непрерывно в автоматическом режиме. Введение в кювету  $\text{CaCl}_2$  между 3-м и 4-м измерениями в опытах 2 и 3 занимало около 40 с. Данные по долевого участию в светорассеянии различных частиц киназы скорректированы на светорассеяние частиц пыли. \* Олигомерная, \*\* димерная и \*\*\* мономерная (фрагменты) формы киназы.

размеры частиц фермента и их процентное соотношение в растворе. Таким образом, можно полагать, что неактивированная киназа (апофермент) существует в растворе в виде двух форм — димеров и олигомеров, между которыми, по-видимому, существует динамическое равновесие. Активация практически не влияет на это равновесие. Учитывая эти данные, мы считаем, что мономерная форма КЛЦМ, обнаруженная при электрофорезе (рис. 2), является результатом диссоциации «непрощитых» надмолекулярных структур (олигомеров, димеров) в присутствии ДСН.

На основании результатов, полученных с помощью метода ЛКС, мы полагаем, что инактивацию киназы в предынкубационном периоде следует объяснять не перераспределением различных форм этого белка

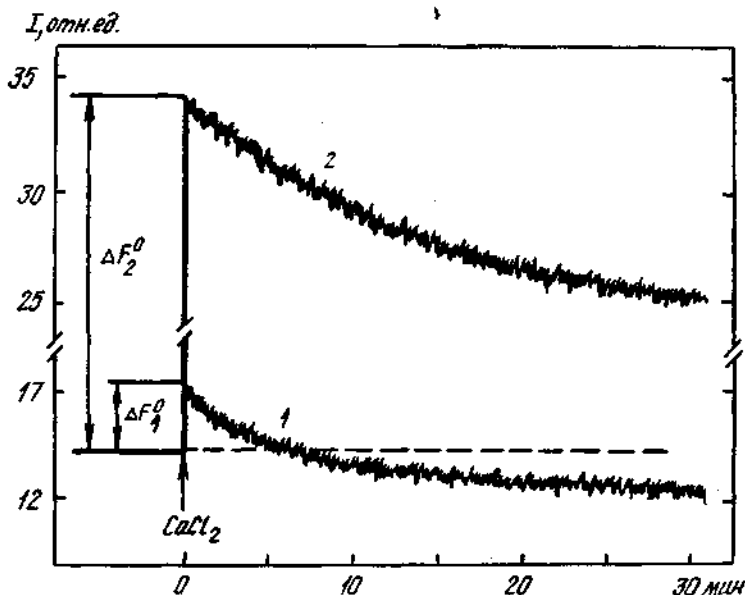


Рис. 4. Уменьшение во времени флуоресценции зонда 9АХ (1, отн. ед.), связанного с киназой из мышечного желудка индейки, после образования активного комплекса  $\text{Ca}^{2+}$ -СаМ—КЛЦМ: 1—при избытке киназы (1,2 мкМ) над кальмодулином (0,3 мкМ); 2—при избытке кальмодулина (3,6 мкМ) над киназой (1,2 мкМ). Состав буфера см. подпись к рис. 3. Концентрации других компонентов: 9АХ—20 мкМ; ЭГТА—0,2 мМ;  $\text{CaCl}_2$ —0,4 мМ. Сборку активного комплекса инициировали введением в раствор  $\text{CaCl}_2$ ;  $\Delta F^0$ —прирост интенсивности флуоресценции, наблюдаемый при этом. Исходный уровень флуоресценции приведен на рисунке слева до введения в раствор  $\text{CaCl}_2$ . Температура в кювете 15 °С. Возбуждение 366 нм, регистрация излучения при 462 нм

(олигомеры  $\rightleftharpoons$  димеры), а изменением его конформации. Для обнаружения таких конформационных изменений мы использовали методы флуоресценции. По данным Маленчика и сотр. [20], флуоресцентный зонд 9АХ специфически связывается с киназой, при этом его флуоресценция возрастает в несколько раз. Еще более резкое усиление флуоресценции зонда наблюдается при активации киназы. Таким образом, прирост интенсивности флуоресценции 9АХ при образовании активного комплекса в большой степени отражает степень сродства  $\text{Ca}^{2+}$ -СаМ к апоферменту. Уменьшение этого сродства должно вызывать снижение прироста флуоресценции. На рис. 4 приведены кривые изменения интенсивности флуоресценции зонда, связанного с киназой, после ее активации в отсутствие в растворе субстрата (предынкубационный период). Сборку активного комплекса инициировали введением ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в раствор, содержащий киназу, СаМ, 9АХ и ЭГТА. Уровень флуоресценции зонда до введения  $\text{Ca}^{2+}$  приведен на рис. 4 слева. При постоянной концентрации 9АХ и отсутствии свободного  $\text{Ca}^{2+}$  он определяется концентрацией киназы. Концентрация СаМ на него практически не влияет.

Кривая 1 получена при избытке в растворе киназы ( $[КЛЦМ]/[CaM] = 4$ ). Начальный прирост флюоресценции после введения  $Ca^{2+}$  составляет около 20%. С течением времени в предынкубационном периоде прирост флюоресценции зонда понижается и приблизительно через 6 мин (для различных экспериментов от 4 до 18 мин) достигает исходного уровня, отмеченного на рис. 4 пунктирной линией. Отметим, что исходный уровень флюоресценции, регистрируемый в контрольной кювете, не содержащей свободных ионов  $Ca^{2+}$ , оставался на протяжении всего эксперимента практически неизменным. В первом приближении можно полагать, что прирост флюоресценции зонда  $\Delta F_1^0$  пропорционален концентрации активного комплекса. Это означает, что приблизительно через 6 мин после его сборки (т. е. с момента введения  $Ca^{2+}$ ) в условиях избытка киназы активный комплекс в растворе практически исчезает, что коррелирует с результатами изменения активности КЛЦМ (см. рис. 1).

Изменения, происходящие с активированной КЛЦМ во времени, имеют, по-видимому, сложный характер. Кроме уменьшения сродства  $CaM$  к киназе, а, возможно, и вследствие этого, должны иметь место также другие процессы, приводящие к дополнительному уменьшению связывания зонда 9АХ с киназой. На это указывает тот факт, что с течением времени (для кривой 1 через 6 мин) интенсивность флюоресценции активного комплекса становится ниже исходного уровня. Зонд 9АХ, как известно, связывается в основном с участком связывания АТФ [20], причем константы его диссоциации для активного комплекса и апофермента равны 6,4 и 20 мкМ соответственно. Таким образом, уменьшение сродства  $Ca^{2+}$ - $CaM$  к апоферменту должно вызывать уменьшение сродства зонда к АТФазному центру и вследствие этого понижение интенсивности флюоресценции активного комплекса, в крайнем случае, до исходного уровня. Снижение интенсивности флюоресценции ниже этого уровня, наблюдаемое в нашем опыте, можно объяснить возникновением дополнительных стерических ограничений в области связывания АТФ, сопровождающихся дополнительным уменьшением сродства зонда к этой области. Такие ограничения могут быть следствием коллективных конформационных перестроек надмолекулярных комплексов киназы.

Приведенная на рис. 4 кривая 2 получена при избытке кальмодулина ( $[CaM]/[КЛЦМ] = 3$ ). Концентрация активного комплекса по сравнению с таковой в описанном ранее опыте (кривая 1) в этом случае в 4 раза выше. Соответственно и прирост флюоресценции  $\Delta F_2^0$  в несколько раз больше. Понижение интенсивности флюоресценции наблюдалось и в этом случае, однако оно было намного меньше. Так, через 6 мин после введения в раствор  $Ca^{2+}$   $\Delta F_2$  понижается только на 9%. Это свидетельствует о том, что и в случае эквимольного соотношения между киназой и  $CaM$  (или при избытке последнего) в предынкубационном периоде имеют место конформационные перестройки надмолекулярных комплексов киназы, которые, по-видимому, также должны приводить к снижению ее активности.

Результаты исследования собственной флюоресценции активного комплекса КЛЦМ (рис. 5) согласуются с данными, полученными при исследовании флюоресценции зонда 9АХ. Как известно, связывание  $Ca^{2+}$ - $CaM$  киназой из гладких мышц приводит к сдвигу максимума собственной (триптофановой) флюоресценции этого белка от 331 до 327 нм и увеличению квантового выхода на 7% [20].  $CaM$ , не содержащий триптофанилов, не влияет на флюоресценцию. Известно, что в структуре киназы имеются четыре триптофанила [24]. Три из них находятся внутри активного центра на участке связывания РЛЦ (остатки 700, 733 и 773). Их гидрофобное окружение и флюоресценция, характеризуемая максимальным коротковолновым сдвигом спектра, по-видимому, практически не изменяются при связывании  $Ca^{2+}$ - $CaM$ . Четвертый триптофанил (Трп-800) находится в псевдосубстратном домене (остатки 787—807) на поверхности молекулы КЛЦМ [24] и, следовательно, дол-



жен характеризоваться максимумом спектра флюоресценции около 340 нм [25]. При активации киназы часть псевдосубстратного участка, включающего этот триптофанил, связывается с  $\text{Ca}^{2+}$ -СаМ. Псевдосубстратный домен при этом удаляется из активного центра, а Трп-800 «прикрывается» кальмодулином, что приводит к коротковолновому

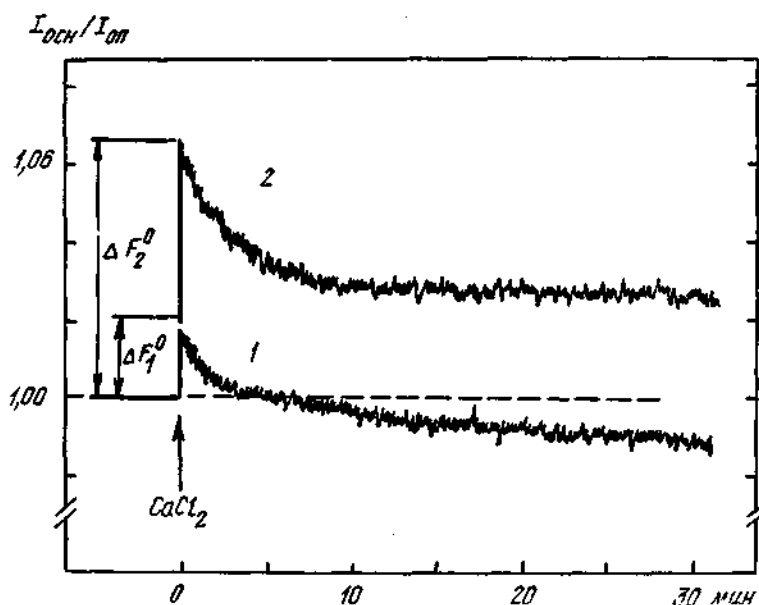


Рис. 5. Уменьшение во времени собственной (триптофановой) флюоресценции киназы из мышечного желудка индейки после ее активации. На оси ординат представлено отношение интенсивности излучения в основном канале ( $I_{очн}$ ) к таковой в опорном канале ( $I_{оп}$ ), регистрируемое в автоматическом режиме: 1 — при избытке киназы (1,1 мкМ) над кальмодулином (0,32 мкМ); 2 — при избытке кальмодулина (3,0 мкМ) над киназой (1,1 мкМ). Состав буфера см. подпись к рис. 3. Концентрации других компонентов в растворе (мМ): ЭГТА — 0,2;  $\text{CaCl}_2$  — 0,4. Сборку активного комплекса инициировали введением в раствор  $\text{CaCl}_2$ ;  $\Delta F^0$  — прирост интенсивности флюоресценции, наблюдаемый при этом. Исходный уровень флюоресценции приведен на рисунке слева до введения в раствор  $\text{CaCl}_2$ . Температура в кювете 18 °С. Возбуждение 280 нм. Регистрировали суммарное (не разложенное в спектр) флюоресцентное излучение белка в области 300—600 нм; возбуждающее излучение отсекалось фильтром, пропускающим излучение с длиной волны больше 300 нм

сдвигу его спектра и увеличению квантового выхода и в результате к сдвигу спектра и увеличению интенсивности суммарной флюоресценции белка.

На рис. 5 приведены кривые изменения собственной флюоресценции киназы после ее активации при различных соотношениях киназы и СаМ. Прирост флюоресценции киназы при ее трехкратном избытке над СаМ небольшой (около 2 %), поскольку активируется при этом только треть ее молекул. Этот прирост приблизительно через 5 мин понижается до исходного уровня и в дальнейшем становится ниже его (кривая 1), что коррелирует с инактивацией киназы (см. рис. 1, б). В случае избытка кальмодулина (кривая 2) также наблюдается уменьшение флюоресценции активированной киназы, однако кривая до исходного уровня не опускается, что соответствует частичной инактивации белка. Таким образом, характер изменения собственной флюоресценции активированной киназы аналогичен таковому связанного с этим белком зонда 9АХ. Отметим, однако, что два различных подхода с использованием флюоресцентных методов дают разную информацию о конформационных перестройках активированной киназы. Действительно, зонд 9АХ связывается с КЛЦМ в области центра связывания АТФ и конкурирует с последним за взаимодействие с этим центром [20]. Следовательно, понижение интенсивности флюоресценции зонда свидетельствует

уєт об зменшенні його сродства (і, значить, сродства АТФ) к названому центру. В принципі, це може бути обумовлено виникненням певних стерических обмежень в області зв'язування АТФ, носити локальний характер і не обов'язково бути наслідком зменшення сродства СаМ к КЛЦМ. Пониження власної флуоресценції активованої кинази, свідечуюче про збільшення доступності Трп-800, «прикриваємого» кальмодуліном, безпосередньо вказує на зменшення сродства Са<sup>2+</sup>-СаМ к киназі. Тому тільки на основі флуоресцентних даних, отриманих з допомогою цих двох підходів, ми можемо однозначно зробити висновок про те, що зменшення сродства зонда 9АХ к АТФазному центру також є наслідком зменшення сродства СаМ к КЛЦМ.

Таким чином, отримані нами результати дозволяють ствердити, що неактивована КЛЦМ із гладких м'язів в розчині в умовах, близьких до фізіологічних, існує в вигляді суміші олігомерних і димерних частинок з гідродинамічними діаметрами близько 150 і 20 нм відповідно. Ці частинки, по-видимому, знаходяться в динамічній рівновазі. Можливо, димер — це вихідна форма існування кинази в розчині, і олігомери утворюються через полімеризацію цієї форми. Во всякому випадку, якщо перехід між олігомером і димером здійснюється через мономер, то останній представляє собою нестабільну, короткоживучу форму, яка в розчині в помітних кількостях не накопичується. Після активації кинази кальмодуліном як при її надлишку, так і при надлишку СаМ ми не виявили помітних змін у розподілі різних форм кинази. Отже, інгібування кинази при субстехіометричних кількостях Са<sup>2+</sup>-СаМ в передінкубаційний період (перед додаванням субстрата) пов'язано з повільними конформаційними змінами активованих молекул кинази, о чому свідечують результати флуоресцентних досліджень. Такі конформаційні перебудови мають місце і в разі еквімолярних співвідношень кинази і СаМ, однак вони характеризуються меншою глибиною і незначительним зниженням активності КЛЦМ. Повільні конформаційні перебудови в надмолекулярних структурах кинази після її активації, скорше за все, мають колективний характер і пов'язані з посиленням взаємного впливу молекул кинази одна на одну, що призводить до послаблення зв'язування кальмодуліна. Сущість виявлених конформаційних перебудов залишається незрозумілою і потребує подальшого вивчення, оскільки може мати пряме відношення до функціонування КЛЦМ *in vivo*. Як робочу гіпотезу можна передположити, що в надмолекулярних комплексах активованої кинази встановлюється взаємодія псевдосубстратного участку однієї молекули з активним центром сусідньої з виникненням стерических перешкоджень для зв'язування кальмодуліна.

Ця робота виконана при частковій підтримці Державного фонду фундаментальних досліджень при ГКНТ України.

О. М. Філенко, А. Собешек, Е. Б. Бабійчук, В. С. Омелянюк  
В. М. Данилова, Н. Б. Яновська, А. Ю. Бабенко

#### НАДМОЛЕКУЛЯРНА ОРГАНІЗАЦІЯ І АКТИВНІСТЬ КІНАЗИ ЛЕГКИХ ЛАНЦЮГІВ МІОЗІНА ГЛАДЕНЬКИХ М'ЯЗІВ

##### Резюме

Кіназа легких ланцюгів міозина (КЛЛМ) відіграє ключову роль у механізмах регуляції скорочення гладеньких м'язів. Отримані нами за допомогою лазерної кореляційної спектроскопії дані дозволяють стверджувати, що неактивована КЛЛМ із гладеньких м'язів у розчині за умов, близьких до фізіологічних, існує у вигляді суміші олігомерних і димерних частинок з гідродинамічними діаметрами ~150 і 20 нм відповідно. Ці частинки, очевидно, знаходяться у динамічній рівновазі. Ми не виявили

помітних змін у розподілі різних форм кінази у розчині після її активації як при надлишку кінази, так і кальмодуліну (CaM). При значному надлишку кінази відносно CaM її активність через 5—10 хв. зменшується у декілька разів. Може бути, що спостережене пригнічення кінази перед внесенням субстрата пов'язане з повільними конформаційними змінами активованих молекул кінази, про що свідчать результати здійснених нами флуоресцентних досліджень. Подібні перебудови відмічаються і при еквімолярному співвідношенні кінази і CaM, проте в цьому випадку вони менш глибокі і характеризуються незначним зниженням активності КЛЛМ. Повільні конформаційні перебудови в надмолекулярних структурах активованої кінази, скоріш за все, мають колективний характер і пов'язані з підсиленням взаємного впливу між молекулами кінази, який призводить до ослаблення зв'язування  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM. Спираючись на вищевикладене, можна припустити, що у надмолекулярних комплексах активованої кінази мають місце взаємодії псевдосубстратної ділянки однієї молекули з активним центром сусідньої, що супроводжується появою стеричних перешкод для зв'язування CaM.

*A. M. Filenko, A. Sobieszek, E. B. Babyichuk, V. S. Omelyanuk,  
V. M. Danilova, N. B. Yanovskaya, A. Yu. Babenko*

#### SUPRAMOLECULAR ORGANISATION AND ACTIVITY OF SMOOTH MUSCLE MYOSIN LIGHT CHAIN KINASE

##### Summary

The data received by the use of lazer correlation spectroscopy (LCS) suggest that inactive MLCK under conditions close to the physiological exists as mixture of oligomeric and dimeric particles with hydrodynamic diameters about 150 and 20 nm, respectively. These particles should be in dynamic equilibrium. We could not discover noticeable alteration in different kinase species distribution at both kinase or calmodulin excess in solution. At considerable excess of kinase over calmodulin the activity of the former is decreased several times after 5 to 10 min from the moment of its activation. Observed kinase inhibition in the preincubation time (before addition of substrate) must be connected with slow conformational rearrangements of activated kinase molecules which is directly confirmed by the results of our fluorescent studies. Such conformational rearrangements accompanied by the reduction of MLCK towards CaM affinity take place also at equimolar ratios of kinase to CaM, but in this case they are characterised by the lesser depth and insignificant MLCK activity decrease. Slow conformation changes in supramolecular structures of activated kinase are believed to have collective character and to be connected with intensification of mutual influence of kinase molecules leading to reduction of CaM binding.

##### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Sobieszek A., Strobl A., Ortner B., Babyichuk E.*  $\text{Ca}^{2+}$  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.
2. *Kamm K. E., Stull J. T.* The function of myosin and myosin light chain kinase phosphorylation in smooth muscle // *Ann. Rev. Pharmacol. 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 actin-myosin-ATP-interaction // *Ann. Rev. Biochem.*—1980.—19.—P. 921—956.
5. *Hartshorne D. J., Kawamura T.* Regulation of contraction-relaxation in smooth muscle // *NIPS.*—1992.—7.—P. 59—64.
6. *Ito M., Guerriero V. Gr., Chen X., Hartshorne D. J.* Definition 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 relation to structural and regulatory domains // *Eur. J. Biochem.*—1991.—200.—P. 723—730.

10. *Van Bercum M. F. A., Means A. R.* Three amino acid substitutions in domain 1 of calmodulin prevent the activation of chicken smooth muscle myosin light chain kinase // *J. Biol. Chem.*—1991.—266.—P. 21488—21495.
11. *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.
12. *Adelstein R. S., Klee C. B.* Purification and characterization of smooth muscle myosin light chain kinase // *J. Biol. Chem.*—1981.—256.—P. 7501—7509.
13. *Sobieszek A., Bremel R. D.* Preparation and properties of vertebrate smooth muscle myofibrils and actomyosin // *Eur. J. Biochem.*—1975.—55.—P. 49—60.
14. *Sobieszek A.* Phosphorylation reaction of vertebrate smooth muscle myosin: an enzyme kinetic analysis // *Biochemistry.*—1985.—25.—P. 1266—1274.
15. *Perrie W. T., Perry S. V.* An electrophoretic study of the low-molecular-weight components of myosin // *Biochem. J.*—1970.—119.—P. 31—38.
16. *Sobieszek A.* Bulk isolation of the 20000-Da light chain of smooth muscle myosin: separation of the unphosphorylated and phosphorylated species // *Anal. Biochem.*—1988.—172.—P. 43—50.
17. *Gornall A. G., Bardawill C. J., David M. M.* Determination of serum proteins by means of the Biuret reaction // *J. Biol. Chem.*—1949.—177.—P. 751—766.
18. *Matsudaira P., Burgess D. R.* SDS microslab linear gradient polyacrylamide gel electrophoresis // *Anal. Biochem.*—1978.—87.—P. 386—396.
19. *Braginskaya T. G., Dobichin P. D., Ivanova M. A. et al.* Analysis of the polydispersity by photon correlation spectroscopy // *Physica Scripta.*—1983.—26, N 3.—P. 309—315.
20. *Malencik D. A., Anderson S. R., Bohnert J. L., Shalitin Y.* Functional interactions between smooth muscle myosin light chain kinase and calmodulin // *Biochemistry.*—1982.—21.—P. 4031—4039.
21. *Mornet D., Bonet A., Audemard E., Bonicel J.* Functional sequences of myosin head // *J. Muscle Res. Cell Motil.*—1989.—10.—P. 10—24.
22. *Nicoli D. F., McKenzie D. C., Wu J.-S.* Application of dynamic light scattering to particle size analysis of macromolecules // *Int. Lab.*—1992.—May.—P. 32—37.
23. *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.
24. *Knighton D. R., Pearson R. B., Sowadski J. M. et al.* Structural basis of the intrasteric regulation of myosin light chain kinases // *Science.*—1992.—258.—P. 130—135.
25. *Буриштейн Э. А.* Собственная люминесценция белка (Природа применения) // *Итоги науки и техники.*—М.: ВИНТИ, 1977.—190 с.—(С. Биофизика; Т. 7).

ІІІІ фізіології Кієв. ун-та ім. Тараса Шевченка  
 Ін-т молекуляр. біології Австрійської АН, Зальцбург  
 Ін-т біохімії ім. А. В. Палладіна НАН України, Кієв

Получено 20.10.94