

ВПЛИВ СУЛЬФІДРИЛЬНОГО РЕАГЕНТУ п-ХЛОРМЕРКУРІБЕНЗОАТУ НА АТРАЗНУ АКТИВНІСТЬ АКТОМІОЗИНОВОГО КОМПЛЕКСУ ГЛАДЕНЬКОГО М'ЯЗА

Досліджено вплив блокатора тіолових груп білків п-хлормеркурібензоату (п-ХМБ) на АТРАЗ-ну активність актоміозину міометрію свині в залежності від концентрації інгібітора, в часовому режимі — від 3 до 10 хвилин інкубації. Показано гальмування ферментативної активності при збільшенні концентрації п-ХМБ від 0,1 до 100 мкМ. Одержані дані обговорюються з точки зору зміни структури голівки міозину гладеньких м'язів під дією п-ХМБ як блокатора SH-груп активного центру цього білка.

Вступ

Відомо, що м'язове скорочення та більшість інших проявів біологічної рухливості полягає у циклічній взаємодії голівки міозину з актином, яке супроводжується гідролізом АТР в голівках міозину. Як свідчать сучасні уявлення [1, 2], в основі молекулярного механізму явищ біологічного руху, за що відповідає актоміозин, лежать значні конформаційні зміни у голівці міозину в процесі АТРАЗної реакції. На сьогоднішній механізм м'язового скорочення залишається не до кінця вивченим, хоча за останні 10 років було зроблено значний прогрес у цій галузі [3].

У спрощеному вигляді схему гідролізу АТР міозином можна представити таким чином: $M + ATP \rightleftharpoons M \cdot ATP \rightleftharpoons M \cdot ADP + P_i$, де М — це голівка молекули міозину, а кожна зірка відображає її конформаційні зміни. Ці зміни рееструються за збільшенням інтенсивності триптофанової флуоресценції [4]. Однак пов'язані з цим перебудови в молекулярній структурі молекул міозину і досі залишаються нез'ясованими.

У контролі скорочувальної активності м'язів взагалі, у тому числі міометрію, важлива роль належить іонам Ca^{2+} [5]. Раніше у відділі біохімії м'язів Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України було проведено порівняльні дослідження чутливості кальцієвих pomp гладенького м'яза матки до деяких інгібіторів енергозалежних Ca^{2+} -транспортуючих систем [6]. Мова йде про специфічні інгібітори Ca^{2+} -pomp ендоплазматичного ретикулуму (тапсигаргін, циклопіазонієву кислоту) та плазматичної мембрани (еозин Y), Ca^{2+} -акумуляуючої системи мітохонд-

рій (рутенієвий червоний), а також про неспецифічні інгібітори енергозалежних Ca^{2+} -транспортуючих систем, наприклад, тіолову отруту л-хлормеркурібензоат (л-ХМБ). Ці речовини останнім часом дуже активно використовують у біофізичних та біохімічних дослідах, що проводяться на інтактних гладеньком'язових смужках з метою вивчення взаємозв'язку між Ca^{2+} -гомеостазом та скороченням — розслабленням м'язів.

Проте, не слід виключати, що ці інгібітори можуть модифікувати не лише активність Ca^{2+} -транспортуючих систем, а й скоротливу активність суто актоміозину внаслідок гальмування АТР-гідролізу реакції, що ним каталізується. Тому у відділі біохімії м'язів Інституту біохімії були проведені дослідження дії таких інгібіторів, як тапсигаргін, циклопіазонієва кислота, еозин та л-ХМБ на АТР-гідролізу реакцію актоміозину міометрію [7]. На основі цієї роботи виникла зацікавленість у детальнішому вивченні дії сульфідрильного реагенту л-ХМБ на ферментативну активність гладеньком'язового актоміозину, бо вплив на тіолові групи активного центру цього білка відіграє найважливішу роль у прояві його АТРАЗної активності [8]. Виходячи з вищезазначеного, метою нашої роботи було дослідити вплив л-ХМБ на АТР-гідролізу реакцію, що каталізується актоміозином гладеньких м'язів у залежності від часу інкубації та концентрації цього інгібітора.

Матеріали і методи

Одержання гладеньком'язового актоміозину з матки свині проводили за методом Вагану з де-

якою модифікацією [9]. Концентрацію білка визначали спектрофотометрично за оптичною щільністю його розчину при довжині хвилі 280 нм по кривій концентраційної залежності поглинання, стандартизованої за альбуміном сироватки бика. Чистоту білкового препарату контролювали по спектру поглинання в УФ зоні. Одночасно проводився контроль на наявність домішки нуклеїнових кислот по реєстрації відношення

$$\frac{D_{280}}{D_{260}}$$

АТРаЗну активність актоміозину досліджували в середовищі інкубації об'ємом 1 мл, яке містило 5мМ трис-НСІ буфер (рН 7,2), 150 мМ КСІ, 0,01 мМ Ca^{2+} та 1 мМ Mg^{2+} , 2 мМ АТР та 2 мкг білка. Температура інкубації дорівнювала 37°C . Час інкубації складав 3,5 та 10 хвилин.

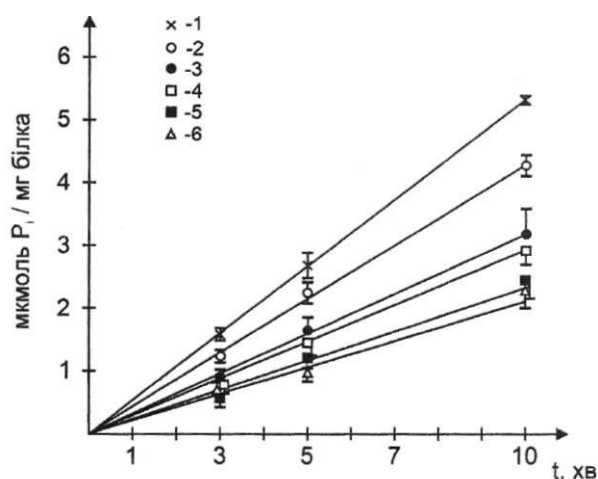


Рис. 1. КІНЕТИЧНА ЗАЛЕЖНІСТЬ КІЛЬКОСТІ НЕОРГАНІЧНОГО P_i — ПРОДУКТУ АТР-ГІДРОЛАЗНОЇ РЕАКЦІЇ, ЩО КАТАЛИЗУЄТЬСЯ АКТОМІОЗИНОМ МІОМЕТРІЮ ($\text{L} = 6$).

КОНЦЕНТРАЦІЯ Л-ХМБ: / — КОНТРОЛЬ; 2, 3, 4, 5 та 6— 0,1 мкМ, 1 мкМ, 5 мкМ, 10 мкМ ТА 100 мкМ ВІДПОВІДНО.

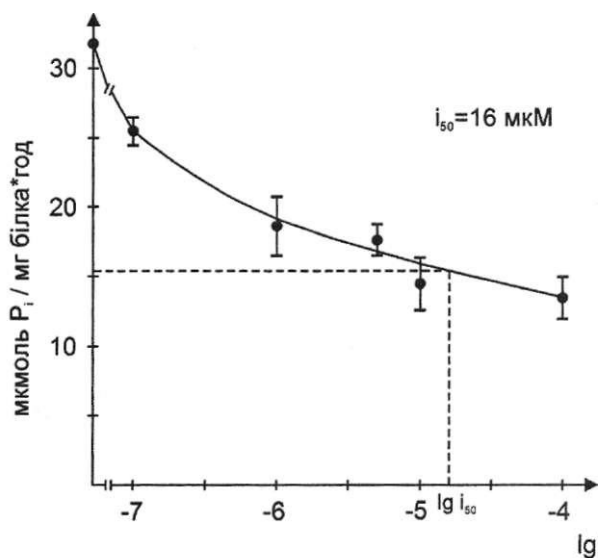


Рис. 2. КОНЦЕНТРАЦІЙНА ЗАЛЕЖНІСТЬ ІНГІБІТОРНОГО ВПЛИВУ Л-ХМБ НА АТР-ГІДРОЛАЗНУ АКТИВНІСТЬ АКТОМІОЗИНУ МІОМЕТРІЮ ($\text{L} = 6$).

гібітор (л-ХМБ) використовували у концентраціях від 0,1 до 100 мкМ. АТРаЗну реакцію ініціювали додаванням у середовище інкубації аликвоти розчину АТР. Кількість продукту реакції — неорганічного фосфату P_i — визначали за методикою Rathbun та Betlach [10]. Величина питомої АТРаЗної активності в середовищі інкубації без інгібітора складала 30,8 — 31,75 мкмоль P_i на 1 мг актоміозину за 1 годину. Контролем на неферментативний гідроліз АТР були проби, які не містили білок. Отримані дані оброблені статистично.

Результати й обговорення

Ми вивчали вплив л-ХМБ на АТР-гідролазну активність актоміозину гладеньких м'язів в залежності від часу інкубації та концентрації цього інгібітора. На рис. 1 представлені кінетичні графіки накопичення неорганічного фосфату P_i — продукту АТР-гідролазної реакції, що каталізується гладеньком'язовим актоміозиним. Як можна побачити, ферментативне вивільнення P_i у реакції, що каталізується актоміозиним, у контрольних пробах зростає лінійно зі збільшенням часу інкубації. Це свідчить, що накопичення P_i в контролі відбувалось у режимі початкової швидкості, який зберігався також і при додаванні в середовище інкубації 0,1–100 мкМ л-ХМБ. Середня величина початкової швидкості в контролі складала $31,45 \pm 1,43$ мкмоль P_i на 1 мг актоміозину за 1 годину.

На рис. 2 відображені результати каталітичного титрування АТРази актоміозину міометрію SH-реагентом л-ХМБ у режимі початкової швидкості реакції (час інкубації складав 10 хвилин). Дані, що наведені на цьому рисунку, свідчать про гальмування АТРаЗної активності актоміозину, яке монотонно зростає при підвищенні концентрації інгібітора. За цими даними була вирахована уявна константа інгібування — концентрація інгібітора (i_{50}), яка зумовлює гальмування активності АТРази актоміозину на 50 % відносно контролю. Величина i_{50} складає 16 мкМ.

Отримані дані (рис. 1 та 2) свідчать про гальмування АТРаЗної активності актоміозину, яке зростає при підвищенні концентрації л-ХМБ. Це слід розглядати з точки зору впливу л-ХМБ на АТРгідролазну активність актоміозину гладеньких м'язів шляхом взаємодії інгібітора з високо-реактивними сульфгідрильними групами цього

ферменту. На сьогодні встановлено, що міозин має дві важливі високореактивні SH-групи залишків цистеїну — Cys 697 (SH1) та Cys 707 (SH2). Вони розташовані у ймовірному місці згину міозинової голівки між основою нуклеотидзв'язуючої кишені та шліною, залученою у зв'язування актину [8, 11, 12].

Було показано [8], що здатність актину та міозину генерувати силу в м'язевих волокнах та гідролізувати АТР у фізіологічних умовах є високочутливою до модифікації цих сульфгідрильних груп. Тому зниження АТРадної активності актоміозину гладеньких м'язів при зростанні концентрації інгібітора може бути пов'язаним зі взаємодією л-ХМБ з SH1 та SH2. Цей механізм дії л-ХМБ не заперечують також інші дослідники, які використовували такий SH-реагент, як N-фенілmaleїмід [8].

Результати детальніших досліджень актоміозинового комплексу скелетних [11] та гладеньких [12] м'язів вказують на значення високореактивних SH-груп — SH1 та SH2 для м'язового скорочення. Справді, виявлено консервативний залишок гліцину — Gly 699 — на згині, що зв'язує дві спіралі, які містять ці високореактивні та мобільні залишки цистеїну. Ці роботи [11, 12] показали значення Gly 699 для руху доменів го-

лівки міозину, тобто для конформаційних змін в її нуклеотид- та актинзв'язуючих центрах.

Однак, визначаючи можливий механізм дії л-ХМБ, слід також враховувати той факт, що підвищення концентрації інгібітора викликає більшу можливість неконтрольованого процесу — інактивації білка.

Таким чином, у представленій роботі вивчався вплив л-ХМБ на АТР-гідролізну реакцію, що каталізується актоміозином гладеньких м'язів в залежності від часу інкубації та концентрації цього інгібітора. Кінетика гідролізу АТР вищезгаданим ферментом задовольняла критеріям реакції нульового порядку як у контролі, так і в присутності 0,1–100 мкМ л-ХМБ. Була показана блокуюча АТРадно активність актоміозину гладеньких м'язів дія інгібітора — сульфгідрильного реагента л-ХМБ, яка залежить від концентрації цієї сполуки. Величина уявної константи інгібування ім складала 16 мкМ. Можна вважати, що в основі такого інгібування лежить механізм модифікації високореактивних сульфгідрильних груп голівки міозину під дією л-ХМБ. Отримані дані можуть бути корисними для проведення комплексних досліджень зв'язку між гомеостазом Ca^{2+} та механічною роботою м'язів.

1. Росткова Е. В., Моисеева Л. Н., Теплова М. В., Николеева О. П., Левицкий Д. И. Использование стабильных аналогов промежуточных состояний АТРадной реакции миозина для кинетических исследований "слабого" связывания головок миозина с актином // Биохимия.— 1999.— Т. 64, № 8.— С. 1043–1051.

2. Spudis J. A. How molecular motors work // Nature.— 1994.— Vol. 372, N 6506.— P. 515–518.

3. Goldman Y. E. Wag the tail: structural dynamics of actomyosin // Cell.— 1998.— Vol. 93, N 1.— P. 1–4.

4. Bagshaw C. R., Trentham D. R. The characterization of myosin-product complexes and of product-release steps during the magnesium ion-dependent adenosine triphosphatase reaction // The Biochemical Journal.— 1974.— Vol. 141, N 2.— P. 331–349.

5. Костерин С. А. Транспорт кальция в гладких мышцах.— К.: Наукова думка, 1990.— 216 с.

6. Костерин С. А., Браткова Н. Ф., Бабич Л. Г., Шинлова О. П., Слинченко Н. Н., Шлыков С. Г., Зимица В. П., Ровенец Н. А., Веклич Т. А. Влияние ингибиторов энергозависимых Ca^{2+} -транспортирующих систем на кальциевые насосы гладкомышечной клетки // Украинский биохимический журнал.— 1996.— Т. 68, № 6.— С. 50–61.

7. Костерин С. А., Таран Т. Т., Зимица В. П. Влияние ингибиторов энергозависимых Ca^{2+} -транспортирующих систем на АТР-гидролазную активность актоміозина гладкой мышцы // Украинский биохимический журнал (работа в печати).

8. Ling Xie, Schoenberg M. Binding of SH1–SH2-modified myosin subfragment-1 to actin // Biochemistry.— 1998.— Vol. 37, N 22.— P. 8048–8053.

9. Barany M., Barany K., Gaefjens E., Bailin G. Chicken gizzard myosin // Archives of Biochemistry and Biophysics.— 1966.— Vol. 113, N 1.— P. 205–221.

10. Rathbun W.B., Bellach M. V. Estimation of enzymically produced orthophosphate in the presence of cysteine and adenosine triphosphate // Analytical Biochemistry.— 1969.— Vol. 28, N 1–3.— P. 436–445.

11. Kinose F., Wang S. X., Kidambi U. S. Glycine 699 is pivotal for the motor activity of skeletal muscle myosin // The Journal of Cell Biology.— 1996.— Vol. 134, N 4.— P. 895–909.

12. Dominguez R., Frey zon Y., Try bus, K.M., Cohen C Crystal structure of a vertebrate smooth muscle domain and its complex with the essential light chain: visualization of the pre-power stroke state // Cell.— 1998.— Vol. 94, N 5.— P. 559–571.

Taran T. T., Mischuk D. O.

THE EFFECT OF P-CHLOROMERCURIBENZOATE ON ATPASE ACTIVITY OF SMOOTH MUSCLE ACTOMYOSIN COMPLEX

The effect of *p*-chloromercuribenzoate on ATPase activity of actomyosin from pig's uterus smooth muscle was investigated in dependence on inhibitor concentrations in temporal conditions from 3 to 10 minutes of incubation. The inhibition of enzyme activity was demonstrated to be dependent on the increase of *p*-chloromercuribenzoate concentration from 0.1 to 100 μ M. Obtained data are discussed from the point of view of structural changes in smooth muscle myosin heads that take place under the impact of *p*-chloromercurybenzoate on sulfhydryl groups from the active site of the protein.