

Бр 182
761

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
НАУЧНЫЙ ЦЕНТР БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ
ИНСТИТУТ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ

ПРЕПРИНТ

В.И.ДЕЩЕРЕВСКИЙ

РЕГУЛЯЦИЯ
ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ
АКТОМИОЗИНОВЫХ СИСТЕМ

Модель регуляции состояния актина
нативным тропомиозином и стационарная кинетика
гидролиза АТФ неструктурированными
актомиозиновыми системами

ПУЩИНО-на-ОКЕ

1973

Бр $\frac{182}{761}$

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
НАУЧНЫЙ ЦЕНТР БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ
ИНСТИТУТ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ

ПРЕПРИНТ

В.И.ДЕЩЕРЕВСКИЙ

РЕГУЛЯЦИЯ
ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ
АКТОМИОЗИНОВЫХ СИСТЕМ

Модель регуляции состояния актина
нативным тропомиозином и стационарная кинетика
гидролиза АТФ неструктурированными
актомиозиновыми системами

ПУЩИНО-на-ОКЕ

1973



УДК 577.3

Предложена кинетическая схема актомиозиновой АТФазы, регулируемой нативным тропомиозином. Модель основана на кооперативном характере взаимодействия тропонин-тропомиозинового комплекса с F-актином и на циклическом механизме актомиозиновой АТФазы. Рассчитаны эксперименты Бремеля, Вебера /21/ по зависимости стационарной скорости АТФазы актосубфрагмента - 1 от концентрации Mg АТФ. Показана неэквивалентность актина и миозина в гидролитическом цикле, которая не вытекает из схемы Лимна-Тейлора /22/ актомиозиновой АТФазы.



Известно, что активация кальцием АТФазной активности и сократимости естественного актомиозина обусловлена в основном тем, что Ca предотвращает субстратное ингибирование этих процессов высокими концентрациями Mg АТФ /3-8/. Ингибирующее действие субстрата и чувствительность препаратов к кальцию проявляются только в том случае, если они содержат нативный тропомиозин /9-13/.

Обычно считается, что субстратное ингибирование функциональной активности сократительных систем обусловлено отрицательной кооперативностью между двумя АТФ-связывающими центрами /8,14-18/, вероятно двумя центрами на миозиновой молекуле /19/. Однако недавно Айзенберг и Килли /20/ установили, что нативный тропомиозин в присутствии высокой концентрации АТФ и в отсутствие Ca ингибирует АТФазную активность акто- S_1 точно так же, как акто-НММ, и что ингибирование снимается добавлением Ca . Бремель и Вебер /21/ непосредственно показали, что зависимость АТФазной активности акто- S_1 от концентрации субстрата в отсутствие кальция имеет колоколообразную форму, типичную для других актомиозиновых систем. Эти две работы демонстрируют, что наличие на миозиновой молекуле двух центров взаимодействия с субстратом и актином несущественно для механизма субстратного ингибирования и снятия этого ингибирования кальцием.

Поскольку в области низких концентраций субстрата Ca не влияет на функциональную активность актомиозиновых систем, Бремель и Вебер предположили, что ингибирующее влияние нативного тропомиозина на взаимодействие актина с миозином может блокироваться не только кальцием, но и "ригорным комплексом", т.е. комплексом свободного от нуклеотида миозина с актиновым мономером. Согласно Эбаши /12/ одна тропонин-тропомиозиновая пара контролирует участок тонкой нити, содержащий 7 актиновых мономеров, "отключая" весь блок от взаимодействия с миозином. Бремель и Вебер считают, что если число "ригорных комплексов" в данном блоке достигает критической величины (вероятно, 4 или 5), то остальные мономеры этого блока оказываются "включенными". Поэтому при низкой концентрации субстрата, когда "ригорных комплексов" много, весь актин оказывается включенным, и добавка кальция не приводит к дополнительному увеличению активности. Напротив, при высокой концентрации субстрата доля "ригорных комплексов" ничтожна и актиновые мономеры в основном включены, если тропонин не заблокирован кальцием. Этот механизм может объяснить колоколообразную зависимость АТФазной активности от концентрации субстрата.

Целью настоящей работы является формулировка математической модели, которая позволила бы одновременно описать ферментативные и сократительные свойства актомиозиновых систем с учетом влияния регуляторных белков и установить связь между механически существенными состояниями актомиозинового комплекса и его химическими превращениями. Эта задача решается в три стадии. Сначала формулируется математическая модель ингибирования нативным тропомиозином взаимодействия актина с миозином. В основе ее лежит механизм, предложенный Бремель и Вебер /21/, однако в

отличие от этих исследователей мы предполагаем, что характер актомиозинового комплекса не играет существенной роли и что критическое число актомиозиновых комплексов в блоке равно 1, т.е. мы будем считать, что выключение участка тонкой нити невозможно, если на нем есть хотя бы один актомиозиновый комплекс, свободный или связанный с нуклеотидом. Поэтому в предлагаемой нами модели при определении доли включенного актина оказывается существенным только отношение времен жизни актинового мономера в комплексе с миозином и в свободном состоянии, т.е. отношение эффективных констант скоростей образования (γ) и распада (δ) актомиозинового комплекса.

Во второй части работы устанавливается связь параметров γ и δ с концентрацией субстрата для "неструктурированных актомиозиновых систем" (акто-НММ, акто-S₁) и вычисляется скорость гидролиза АТФ этими системами. В основе вычисления лежит предположение о "циклическом механизме актомиозиновой АТФазы" /1/.

В третьей части работы рассматривается ферментативная и сократительная стационарная кинетика "структурированных актомиозиновых систем" (начальная скорость сулерпреципитации актомиозинового геля, скорость изотонического сокращения и изометрическое натяжение мышечных волокон с удаленной мембраной в зависимости от концентраций субстрата и кальция). Основой рассмотрения является предложенный ранее с целью объяснения динамики сокращения нативной мышцы цикл актомиозинового мостика из трех существенных состояний /2/. Устанавливается связь этих механически существенных состояний с химическими стадиями ферментативного цикла актомиозина.

В настоящем препринте публикуются результаты первых двух частей работы.

I. Модель регуляции состояния актина нативным тропомиозином

Пусть каждая тропонин-тропомиозиновая пара контролирует участок тонкой нити, на котором расположено ℓ актиновых центров, способных одновременно образовать комплексы с миозиновыми молекулами. Этот участок вместе с регуляторной парой молекул будем называть блоком. Состояние блока, в котором все актиновые центры "выключены", обозначим через R^ℓ , состояния с "включенными" актиновыми центрами будем обозначать через a_i^ℓ , где индекс i показывает, сколько из ℓ актиновых центров в блоке образуют комплекс с миозиновыми молекулами, и принимает значения от 0 до ℓ . Блок может находиться в одном из $(\ell + 2)$ состояний и переходы допустимы только между соседними по i состояниями:

$$R^\ell \xrightleftharpoons[\beta_-]{\beta_+} a_0^\ell \xrightleftharpoons[\delta]{\gamma} a_1^\ell \xrightleftharpoons[2\delta]{(\ell-1)\gamma} \dots \xrightleftharpoons[i\delta]{(\ell-i+1)\gamma} a_i^\ell \xrightleftharpoons[(i+1)\delta]{(\ell-i)\gamma} \dots \xrightleftharpoons[\ell\delta]{\gamma} a_\ell^\ell \quad (1)$$

Константа ингибирования $\beta = \frac{\beta_-}{\beta_+}$ определяет равновесие между "выключенными" и "включенными" блоками в отсутствие взаимодействия с миозином; γ и δ - эффективные константы скоростей образования и распада актомиозинового комплекса для включенного актинового центра. Зависимость этих констант от физико-химических условий будет подробно рассмотрена ниже. Пока отметим только, что β уменьшается с ростом концентрации Са, а δ увеличивается с ростом концентрации Mg АТФ.

Очевидно, что вероятность присоединения молекулы миозина к блоку a_i^ℓ пропорциональна числу свободных актиновых центров в нем, т.е. $(\ell - i)$, вероятность отсоединения от него одной молекулы миозина пропорциональна числу актомиозиновых комплексов в блоке, т.е. i . Поэтому эффективные константы скоростей перехода из состояния a_i^ℓ в a_{i+1}^ℓ и в a_{i-1}^ℓ равны, соответственно, $(\ell - i)\gamma$ и $i\delta$.

Стационарные концентрации блоков всех сортов R^ℓ и a_i^ℓ , концентрации актомиози-

новых комплексов α и свободных включенных актиновых центров \mathcal{L} могут быть определены из схемы (1) как функции констант равновесия $\beta = \frac{\beta_-}{\beta_+}$ и $g = \frac{\gamma}{\delta}$ для разных ℓ . Число образующихся и распадающихся в 1 сек актомиозиновых комплексов ω , очевидно, равно $\delta\alpha$ или $\gamma\mathcal{L}$. Мы будем считать в соответствии с "циклическим механизмом актомиозиновой АТФазы" /1/, что каждый цикл образования и распада актомиозинового комплекса сопряжен с гидролизом одной молекулы АТФ. Поэтому в рамках рассматриваемой модели ω представляет стационарную скорость гидролиза АТФ актомиозином.

Для стационарных концентраций α_i^ℓ из (1) вытекают рекуррентные соотношения:

$$R^\ell = \beta\alpha_0^\ell, \quad \alpha_1^\ell = \lg\alpha_0^\ell, \quad \alpha_2^\ell = \frac{\ell-1}{2}g\alpha_1^\ell, \dots, \alpha_i^\ell = \frac{\ell-i+1}{i}g\alpha_{i-1}^\ell, \dots \quad (2)$$

Суммарная концентрация блоков всех типов равна A/ℓ , где A - концентрация актиновых центров. Пользуясь соотношениями (2), выразим суммарную концентрацию всех блоков через α_0^ℓ :

$$\begin{aligned} R^\ell + \sum_{i=0}^{\ell} \alpha_i^\ell &= \alpha_0^\ell \left\{ \beta + \left[1 + \frac{\ell}{1!}g^1 + \frac{\ell(\ell-1)}{2!}g^2 + \dots + \frac{\ell!}{\ell!}g^\ell \right] \right\} = \\ &= \alpha_0^\ell \left\{ \beta + (1+g)^\ell \right\} = \frac{A}{\ell}. \end{aligned} \quad (3)$$

Аналогично выразим концентрацию актомиозиновых комплексов α :

$$\begin{aligned} \alpha &= \sum_{i=0}^{\ell} i\alpha_i^\ell = \alpha_0^\ell \left\{ \lg \left[1 + \frac{\ell-1}{1!}g + \frac{(\ell-1)(\ell-2)}{2!}g^2 + \dots + \frac{(\ell-1)!}{(\ell-1)!}g^{\ell-1} \right] \right\} = \\ &= \alpha_0^\ell \lg(1+g)^{\ell-1}. \end{aligned} \quad (4)$$

В качестве пояснения заметим, что выражения в квадратных скобках в формулах (3) и (4) представляют биномиальные ряды $(1+g)^\ell$ и $(1+g)^{\ell-1}$, соответственно. Подставляя в (4) выражение для α_0^ℓ из (3), получим:

$$\alpha = A \frac{g(1+g)^{\ell-1}}{\beta + (1+g)^\ell}, \quad (5)$$

$$\omega = \delta\alpha = A\gamma \frac{(1+g)^{\ell-1}}{\beta + (1+g)^\ell}, \quad (6)$$

и поскольку одновременно $\omega = \gamma\mathcal{L}$, то

$$\mathcal{L} = A \frac{(1+g)^{\ell-1}}{\beta + (1+g)^\ell}. \quad (7)$$

Отметим, что произведение $A\gamma$ (6) представляет максимальную скорость ω_{\max} гидролиза АТФ актомиозином при насыщающих концентрациях субстрата и кальция.

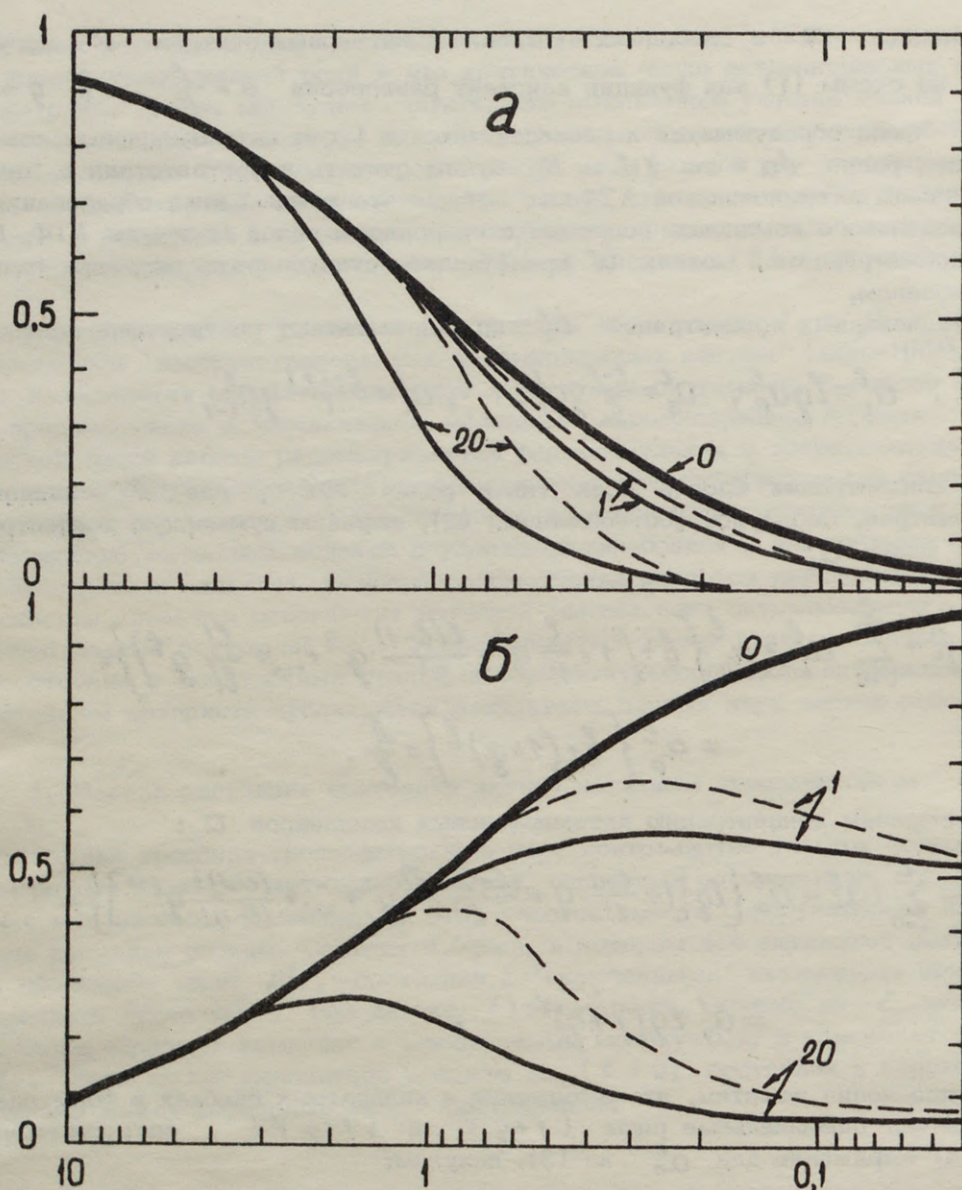


Рис. 1. Модель регуляции состояния актина нативным тропомиозином. а - зависимость (5) доли актиновых центров, образующих комплексы с миозином, α/A , от равновесной константы ассоциации актомиозина g . б - зависимость (7) доли свободных "включенных" актиновых центров, λ/A , от g . Числа около кривых обозначают величины β -зависимого параметра ингибирования β , для сплошных кривых параметр кооперативности $l = 4$, для пунктирных $l = 7$, при $\beta = 0$ величина l не имеет значения.

Зависимости α/A и $w/w_{max} = \lambda/A$ от g приведены на рис. 1. Поскольку g убывает с увеличением концентрации субстрата, а уменьшение β соответствует увеличению кальциевой активации, то эти зависимости свидетельствуют о качественном согласии рассматриваемой модели с экспериментальными данными.

Поведение АМ-системы в значительной мере определяется уровнем ее структурной организации. В работе /1/ было предложено деление АМ-систем на "структурированные" и "неструктурированные" в зависимости от того, упакованы в них миозиновые молекулы в фибриллярные структуры или нет. Дальнейший анализ будет проведен отдельно для систем этих двух типов.

II. Неструктурированные актомиозиновые системы

К этим системам относятся актомиозин при высокой ионной силе ($\Gamma > 0,3$), акто-НММ и акто- S_1 . Неструктурированные АМ-системы не обладают способностью к сокращению. Мы рассмотрим зависимость ферментативной активности таких систем от концентрации Mg АТФ и Ca^{++} и влияние на эту зависимость некоторых физико-химических условий. С этой целью необходимо найти связь констант "регуляторной" модели (1), рассмотренной в общем виде в предыдущем разделе, с экспериментальными параметрами.

Зависимость константы ингибирования β от концентрации Ca одинакова для неструктурированных и структурированных систем, поскольку она отражает взаимодействие регуляторных белков с актиновыми нитями. Максимальное значение β в отсутствие ионов кальция может быть оценено по степени ингибирования АТФазной активности высокими концентрациями субстрата, когда $g < 1$. Из формулы (6) вытекает, что в этом случае

$$\beta_{max} \approx \frac{W_{max}}{W_0} - 1, \quad (8)$$

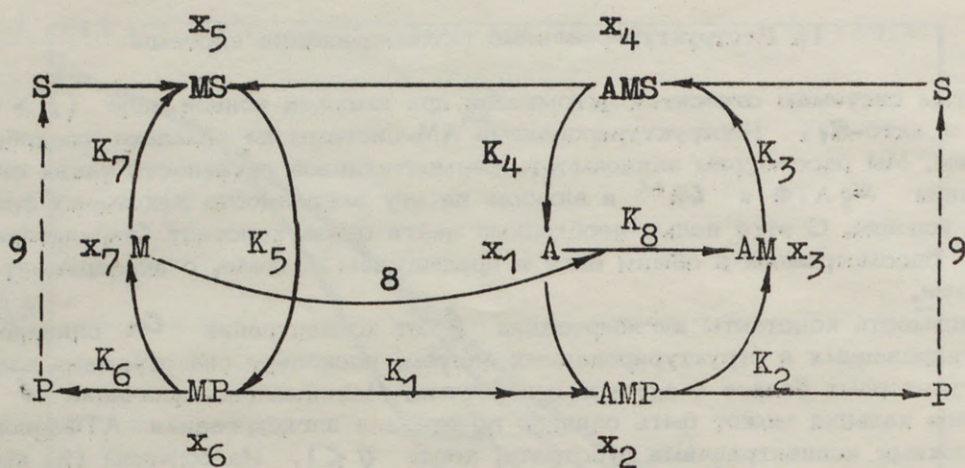
где W_{max} и W_0 представляют скорости АТФазы актомиозинового типа при насыщающей концентрации кальция и в его отсутствие, соответственно, при высокой концентрации Mg АТФ /предельные значения: $W_{max} = A\gamma$ и $W_0 = A\gamma/(1+\beta)/$.

Для миофибрилярного белка величина W_0/W_{max} не превышает 10% /5/, так что $\beta_{max} \approx 10$. В нативной мышце β_{max} , вероятно, значительно выше, а в реконструированных белковых системах величина этой константы уменьшается. Например, из опытов Айзенберга и Килли /20/ следует, что эффективная концентрация актина, оцениваемая по активации АТФазы НММ, при добавлении нативного тропомиозина в отсутствие кальция уменьшается в шесть раз /18/, что соответствует $\beta = 5$. В присутствии насыщающей концентрации кальция регуляторные белки оказывают уже не ингибирующее, а заметное активирующее действие на АТФазу акто-НММ и акто- S_1 /13,20/. Это означает, что комплекс нативного тропомиозина с ионами кальция не только перестает блокировать взаимодействие актина с миозином ($\beta = 0$), но и влияет на константы скоростей этого взаимодействия (вероятно, увеличивает γ). Пренебрегая пока этим влиянием, мы будем считать, что константа β может изменяться от 20 до 0 при изменении концентрации кальция от пренебрежимо малой до насыщающей.

Молекулы миозина в неструктурированных АМ-системах находятся в диспергированном состоянии и могут присоединиться к любому актиновому мономеру. Так как одна тропонин-тропомиозиновая пара контролирует участок тонкой нити из 7 мономеров /10/, то значение параметра "кооперативности" для этих систем, вероятно, близко к 7. Эффективные константы скоростей образования и распада актомиозинового комплекса в отсутствие регуляторных белков для акто-НММ могут быть определены двумя независимыми способами.

1. Оценка γ и δ из схемы Лимна и Тейлора. Для неструктурированных АМ-систем вероятность присоединения к данному актиновому центру какой-либо молекулы миозина пропорциональна концентрации свободного миозина μ . Эффективные константы скоростей γ и δ могут быть рассчитаны при некоторых предположениях из схемы Лимна и Тейлора /22/. Схема гидролиза АТФ акто-НММ и величины констант скоростей прямых реакций из работы /22/ приведены на рис. 2 (обозначения и нумерация стадий изменены по сравнению с оригинальной работой). Мы будем считать, что обратными реакциями можно пренебречь для всех стадий, кроме второй.

Оценим сначала величины отношений стационарных концентраций M и MS к MP . На основании схемы рис. 2 можно записать:



$$K_1 = 3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{cek}^{-1}$$

$$K_3 = 10^6 \text{ M}^{-1} \text{cek}^{-1}$$

$$K_5 = 100-150 \text{ cek}^{-1}$$

$$K_2 = 10-20 \text{ cek}^{-1}$$

$$K_4 > 1000 \text{ cek}^{-1}$$

$$K_6 = 0,05 \text{ cek}^{-1}$$

$$K_7 = 2 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{cek}^{-1}$$

Рис. 2. Кинетическая схема гидролиза АТФ акто-НММ (схема Лимна-Тейлора /22/, нумерация стадий и констант скоростей изменена по сравнению с оригинальной работой). Сокращенные обозначения реагентов даны на стр. 16; K_i - константа скорости i -ой стадии в прямом направлении, x_i - концентрация соответствующего реагента. Пунктиром указаны быстрые стадии регенерации субстрата при наличии АТФ-регенерирующей системы.

$$\dot{x}_6 = K_5 x_5 - K_6 x_6 - K_1 x_1 x_6 = 0 \rightarrow x_5/x_6 = \frac{K_6 + K_1 x_1}{K_5} < \frac{K_6 + K_1 A}{K_5}, \quad (9)$$

$$\dot{x}_7 = K_6 x_6 - K_7 S x_7 - K_8 x_1 x_7 = 0 \rightarrow \frac{x_7}{x_6} = \frac{K_6}{K_7 S + K_8 x_1} < \frac{K_6}{K_7 S} \quad (10)$$

Подставляя численные значения констант в (9) и (10), получим, что

$$x_5/x_6 < 0,1 \text{ при } A < 50 \mu\text{M} \text{ и } x_7/x_6 < 0,1 \text{ при } S > 0,25 \mu\text{M}. \quad (11)$$

(S означает концентрацию свободного Mg АТФ), т.е. при обычных экспериментальных условиях концентрации миозинсубстратного комплекса и свободного миозина малы по сравнению с концентрацией миозин-продуктного комплекса. Поэтому можно пренебречь путем 8 (рис. 2) образования АМ. В том случае, когда полная концентрация миозина M значительно превышает концентрацию актина A и выполнены условия (11), можно считать, что $[MP] = \mu = M$ и $\gamma = K_1 M$ являются константами, не зависящими от концентрации субстрата.

Эффективная константа скорости диссоциации δ может быть оценена по времени жизни актина в комплексе с миозином, которое представляет сумму времен жизни АМР, АМ и АМС. В том случае, когда обратной реакцией на стадии 2 можно пренебречь, $1/\delta = 1/K_2 + 1/K_3 S + 1/K_4 \approx 1/K_2 + 1/K_3 S$

$$\text{и } \delta = \frac{K_2 K_3 S}{K_2 + K_3 S}, \quad (12)$$

так как $K_4 \gg K_2$, и можно считать, что АМ-комплекс после соединения с субстратом распадается мгновенно.

Влияние обратной реакции на стадии 2 можно учесть, рассчитав отношение суммы стационарных концентраций актомиозиновых комплексов $x_2 + x_3$ к концентрации свободного актина x_1 , которое очевидно равно отношению соответствующих времен жизни. Из схемы рис. 2, пренебрегая временем быстрой стадии 4, имеем:

$$\dot{x}_1 = K_3 S x_3 - K_1 \mu x_1 = 0 \rightarrow x_3/x_1 = \frac{K_1 \mu}{K_3 S}$$

$$\dot{x}_3 = K_2 x_2 - (K_{-2} P + K_3 S) x_3 = 0 \rightarrow \frac{x_2}{x_1} = \frac{x_2}{x_3} \times \frac{x_3}{x_1} = \frac{(K_{-2} P + K_3 S) K_1 \mu}{K_2 K_3 S}$$

$$q = \frac{y}{\delta_P} = \frac{K_1 \mu}{\delta_P} = \frac{x_2 + x_3}{x_1} = K_1 \mu \left(\frac{1}{K_3 S} + \frac{K_{-2} P + K_3 S}{K_2 K_3 S} \right);$$

$$\delta_P = \frac{K_2 K_3 S}{K_2 + K_{-2} P + K_3 S}. \quad (12^*)$$

Из сравнения (12*) и (12) видно, что действие продукта на константу скорости диссоциации эквивалентно снижению концентрации субстрата: если одинаковые значения

δ и δ_P достигаются при концентрациях Mq АТФ S и S_P , то $\frac{S_P}{S} = 1 + \frac{K_{-2} P}{K_2}$.

Таким образом, если $K_{-2} \approx K_3 \approx 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ сек}^{-1}$, то при концентрации АДФ и Φ_M $2 \mu\text{M}$ требуется в 100 раз более высокая концентрация Mq АТФ, чтобы получить ту же самую величину константы скорости диссоциации, что и в отсутствие продуктов.

2. Циклический механизм АТФазы актомиозина. Кинетическая схема под таким названием была предложена как простейшая интерпретация данных Муса, Айзенберга и др. /23-25/ в работе /1/. Изложим ее в наших обозначениях. Согласно основному предположению каждый цикл ассоциации-диссоциации актомиозинового комплекса АМ сопряжен с гидролизом одной молекулы АТФ, и поэтому кинетика гидролиза может быть описана "циклом" из двух существенных состояний, которому соответствует следующая кинетическая схема:



(Для сопоставления с результатами /23-26/ рассматривается случай, когда концентрация актина много больше концентрации миозина: $A \gg M$). Стационарная скорость

гидролиза АТФ, w , в расчете на 1 молекулу миозина, и величина, обратная ей, согласно (13) равны:

$$w = \frac{\delta \alpha}{M} = \frac{\delta K_1 A}{\delta + K_1 A}, \quad 1/w = \frac{1}{\delta} + \frac{1}{K_1 A}. \quad (14)$$

Таким образом, зависимость обратной скорости от обратной концентрации актина должна быть линейной, что и наблюдается в экспериментах /23-26/. По пересечению прямой $1/w$ с осями ординат и абсцисс легко определить δ и K_1 и их зависимости от концентрации Mg АТФ, от ионной силы и температуры в том диапазоне изменения этих параметров, который исследован в работах /23-26/. Очевидно, что константа δ нашей модели равна $K_1 \mu$ (для неструктурированных АМ-систем), а δ соответствует константе K' работы /1/.

Зависимости δ и K_1 от Mg АТФ при двух концентрациях K_{ce} , рассчитанные с помощью формулы (14) из графиков работы /23/, приведены на рис. 3 а. На том же рисунке показана зависимость $\delta(S)$, рассчитанная по формуле (12) для $K_2 = 20 \text{ сек}^{-1}$ и $K_3 = 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ сек}^{-1}$. Видно качественное сходство этой кривой и кривых $\delta(S)$, определенных по данным Айзенберга и Муса /23/. Оказывается, что эмпирические кривые 1 и 2 рис. 3а хорошо аппроксимируются формулой (12) при соответствующем подборе констант K_2 и K_3 : для кривой 1 $K_2 = 25 \text{ сек}^{-1}$ и $K_3 = 4,6 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ сек}^{-1}$, для кривой 2 $K_2 = 24 \text{ сек}^{-1}$ и $K_3 = 4,0 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ сек}^{-1}$. Количественное расхождение в величинах этих констант, определенных двумя независимыми способами, объясняется разными условиями, при которых были выполнены эксперименты Айзенберга-Муса /23/ и Лимна-Тейлора /22/, прежде всего различной концентрацией K_{ce} .

Из рис. 3б видно, что с увеличением ионной силы K_2 уменьшается. Кривые, приведенные на этом рисунке, рассчитаны на основании экспериментов /24,26/, выполненных при 25°C. Константа K_2 уменьшается примерно в 2 раза при понижении температуры на 5°C (максимальная скорость АТФазы акто-НММ w_{max} лимитируется этой константой, а энергия активации w_{max} равна 28 ккал/моль /25/). Поэтому концентрации K_{ce} 0,05-0,1 М и температуре 20°C соответствует $K_2 = 19-12 \text{ сек}^{-1}$, что коррелирует с данными Лимна и Тейлора /22/, согласно которым при этих условиях $K_2 = 10-20 \text{ сек}^{-1}$.

Из сопоставления кривых 1 и 2 рис. 3а следует, что K_3 также уменьшается с ростом ионной силы и экстраполяция к $[K_{ce}] = 0,1 \text{ M}$ дает величину $1,6 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ сек}^{-1}$, что также не сильно отличается от значения, приводимого Лимном и Тейлором.

Константа K_1 слабо зависит от Mg АТФ (рис. 3а), но существенно уменьшается с ростом $[K_{ce}]$ (рис. 3б). Энергия активации этой константы при $[K_{ce}] = 0,05-0,1 \text{ M}$ близка к 30 ккал/моль /1/, что соответствует уменьшению K_1 в 2,3 раза при понижении температуры на 5°C. Вводя эту температурную поправку, получим из кривой 2 рис. 3б $K_1 = (1,5-0,3) \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ сек}^{-1}$ для 20°C и $[K_{ce}] = 0,05-0,1 \text{ M}$, что заметно меньше величины, приводимой Лимном и Тейлором: $K_1 = 3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ сек}^{-1}$. Вероятно, это расхождение обусловлено различием рН в экспериментах /22/ и /24,26/, (рН 8 и 7, соответственно) и высокой чувствительностью данной константы к концентрации водородных ионов, что согласуется с сильной зависимостью ее от $[K_{ce}]$.

Интересно отметить следующее обстоятельство. При определении зависимостей K_1 и K_2 от ионной силы были использованы данные двух работ /24,26/. Оказалось, что результаты обеих работ хорошо согласуются для константы K_2 - соответствующие точки ложатся на одну плавную кривую, в то время как кривая для K_1 получается немонотонной. Однако если построить зависимость K_1 от концентрации K_{ce} , а не от суммарной ионной силы, то точки, определенные по данным этих же двух работ, уже укладываются на одну плавную кривую (рис. 3б). Это может означать, что для скорости ассоциации миозин-продуктного комплекса с актином существенна

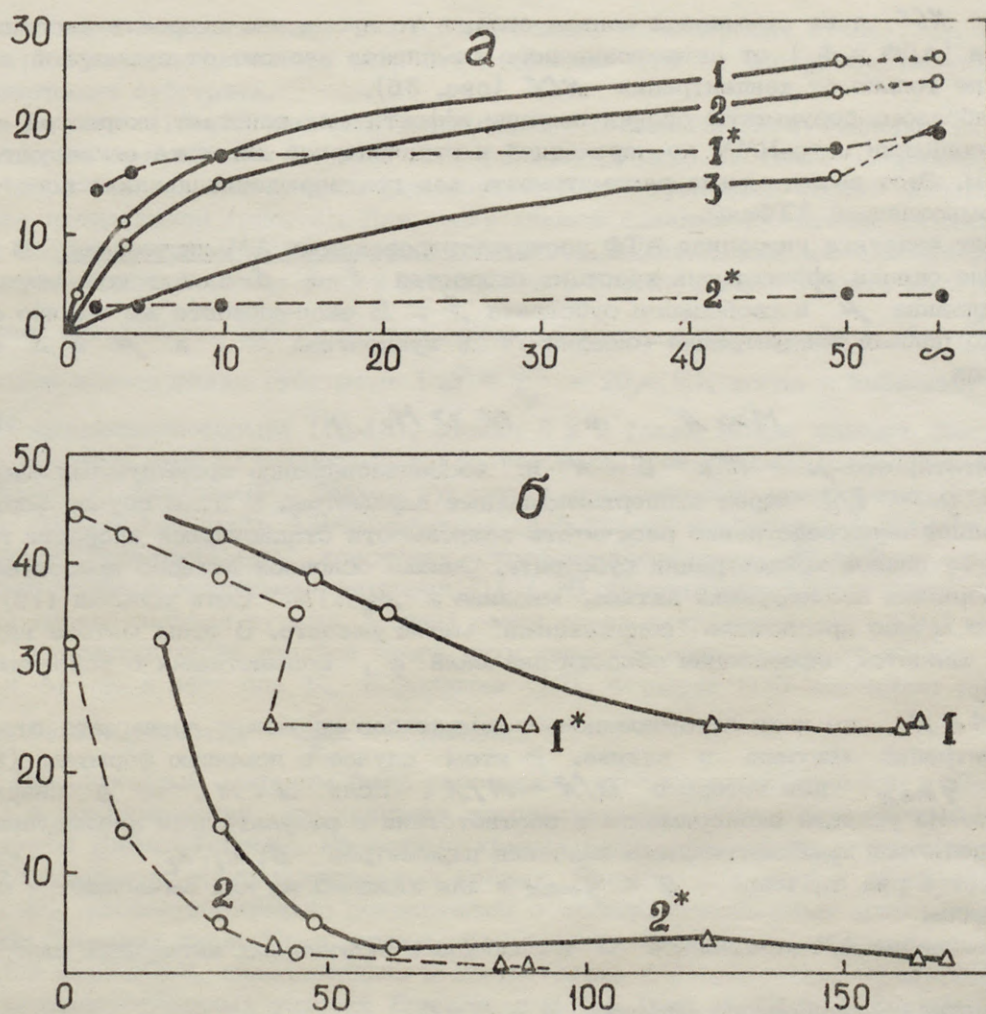


Рис. 3. Оценка эффективных констант скоростей образования и распада АМ-комплекса. а - зависимости константы диссоциации σ (сплошные кривые) и константы ассоциации K_1 (пунктир) от концентрации Mg АТФ, кривые 1, 1* и 2, 2* получены из данных /23/ для двух концентраций KCl (0 и 20 мМ, соответственно), кривая 3 - расчет по формуле (12). Ось абсцисс: концентрация Mg АТФ в μM ; ось ординат: для сплошных кривых - величина мономолекулярной константы σ в $сек^{-1}$, для пунктирных кривых - величина бимолекулярной константы K_1 в $10^5 M^{-1} сек^{-1}$. б - зависимости константы диссоциации продуктов (Φ_H и АДФ) от актомиозинового комплекса K_2 (кривые 1 и 1*) и константы ассоциации K_1 (кривые 2 и 2*) от ионной силы (сплошные кривые) и концентрации KCl (пунктир) при насыщающей концентрации Mg АТФ (1-2 мМ); \circ - построены по данным /24/, Δ - по данным /26/; ось абсцисс - концентрация KCl или суммарная ионная сила в мМ, ось ординат: для 1 и 1* - величина мономолекулярной константы K_2 в $сек^{-1}$, для 2 и 2* - величина бимолекулярной константы K_1 в $10^5 M^{-1} сек^{-1}$.

концентрация K_{ce} , а не суммарная ионная сила, в то время как скорость диссоциации продуктов (АДФ и Φ_H) от актомиозинового комплекса зависит от суммарной ионной силы, а не только от концентрации K_{ce} (рис. 36).

Таким образом, результаты оценки величин эффективных констант скоростей ассоциации и диссоциации акто-НММ по переходной и стационарной кинетике согласуются друг с другом. Этот вывод можно рассматривать как подтверждение циклического механизма актомиозиновой АТФазы.

3. Расчет кинетики гидролиза АТФ неструктурированными АМ-системами. В приведенные выше оценки эффективных констант скоростей γ и δ входят концентрации свободного миозина μ и свободного субстрата S . В эксперименте же обычно задаются только полные концентрации миозина M и нуклеотида N , а μ и S неизвестны. Если

$$M \gg A \quad \text{и} \quad N \gg M, \quad (15)$$

то можно считать, что $\mu = M$ и $S = N$ и, воспользовавшись предыдущими оценками, выразить $q = \gamma/\delta$ через экспериментальные параметры. В этом случае формула (6) позволяет непосредственно рассчитать зависимость стационарной скорости гидролиза АТФ от полной концентрации субстрата. Однако основной интерес представляют случаи соизмеримых концентраций актина, миозина и $MgATP$. Если условия (15) не выполнены, то можно предложить "сопряженный" метод расчета. В этом методе исходным пунктом является определение области значений q , совместимых с условиями эксперимента.

Если $M < A$, то доля актомиозиновых комплексов не может превышать отношение концентраций миозина и актина. В этом случае с помощью формулы (5) определяется q_{max} , для которого $a/A = M/A$. Если $A < M$, то q сверху не ограничено. Из условий эксперимента в соответствии с результатами предыдущего раздела определяются приблизительные значения параметров b, k_1, k_2 и k_3 . Затем выбирается ряд значений $q < q_{max}$ и для каждого из них вычисляются следующие величины:

1. Концентрация АМ-комплексов a и свободных включенных актиновых центров α - (5) и (7).

2. Концентрация свободного миозина $\mu = M - a$.

3. Эффективная константа скорости образования АМ-комплекса $\gamma = k_1 \mu$.

4. Эффективная константа скорости диссоциации АМ-комплекса $\delta = \frac{\delta}{q}$.

5. Скорость гидролиза АТФ $w = \gamma \alpha$.

6. Концентрация свободного субстрата для найденного δ в соответствии с формулой (12):

$$S = \frac{k_2 \delta}{k_3 (k_2 - \delta)}.$$

7. Эффективные константы ассоциации K_+ и диссоциации K_- нуклеотида и миозина и концентрация связанного нуклеотида β :

$$K_+ = (k_3 a + k_7 \mu) / M, \quad (16)$$

$$K_- = k_6 + k_1 \alpha, \quad (17)$$

$$\beta = \frac{k_+ S}{K_- + K_+ S} M \quad (18)$$

(пояснение см. ниже).

8. Полная концентрация нуклеотида в системе $N = S + \beta$.

Таким образом, в соответствии с условиями эксперимента может быть определена область допустимых значений q , а каждому q из этой области поставлены в

соответствие скорости гидролиза АТФ и полная концентрация нуклеотида, т.е. может быть построена зависимость скорости гидролиза АТФ от экспериментально задаваемой концентрации субстрата.

Формулы (16-18) получены на основании схемы Лимна и Тейлора /22/. Нетрудно видеть, что при наличии быстрой АТФ-регенерирующей системы (например, фосфокреатин + креатинкиназа в достаточной концентрации) нуклеотид-фосфат испытывает циклические превращения (рис. 2). Для целей нашего анализа достаточно считать, что этот цикл состоит из двух существенных состояний: свободного и ассоциированного с белком нуклеотида. В схеме рис. 2 стадии 4 и 9 всегда можно считать быстрыми по сравнению с остальными. При не слишком высокой концентрации актина ($A < \frac{K_2}{K_1} \approx 50 \mu M$) и низкой концентрации субстрата ($S < \frac{K_2}{K_3} = 20 \mu M$), когда и возникает необходимость применения формул (16-18), стадии 5 и 2 также можно считать быстрыми. Отсюда следует, что: 1) свободный нуклеотид находится преимущественно в форме Mg АТФ; 2) связанный с белком нуклеотид представляет миозин-продуктный комплекс; 3) большая часть АМ-комплексов свободна от нуклеотида и поэтому K_+ представляет "средневесовую" константу скорости ассоциации Mg АТФ с миозиновым и актомиозиновым активными центрами (16); 4) диссоциация АДФ с белка происходит двумя параллельными путями, причем после образования комплекса АМР она идет быстро, и лимитирующей стадией этого пути является образование комплекса АМР из МР и А, что и дает для K_- выражение (17). Формула (18) описывает равновесие в цикле белок+нуклеотид $\frac{K_+}{K_-}$ комплекс.

Предложенным методом были рассчитаны эксперименты Бремель и Вебер (рис. 3 /21/) в предположении, что кинетика гидролиза АТФ акто-субфрагментом-1 описывается схемой Лимна-Тейлора. Расчетные кривые воспроизводят качественные особенности соответствующих экспериментальных кривых. Расчеты для случая $A = 9 \mu M$ и $M = 1 \mu M$ (рис. 4б) удовлетворительно согласуются с экспериментальными кривыми при нескольких комбинациях параметров, причем их величины близки к значениям тех же параметров для акто-НММ, определенным в соответствии с результатами предыдущего раздела для экспериментальных условий Бремель и Вебер (рис. 3 /21/: $25^\circ C$, $pH 7$, $\Gamma = 0,04$, $KCl = 0,02 M$): $\nu = 6$ или 7 , $K_1 = (0,4 \pm 0,5) \times 10^6 M^{-1} \text{сек}^{-1}$, $K_2 = (40 \div 50) \text{сек}^{-1}$, $K_3 = K_7 = (2 \div 3) \times 10^6 M^{-1} \text{сек}^{-1}$, $K_6 = (0,05 \pm 1) \text{сек}^{-1}$, $\nu = 0$ для кривых с 10 mM Са ЭГТА и $\nu = 10-20$ для кривых с 10 mM ЭГТА.

Однако при тех же значениях параметров невозможно получить количественное согласие с экспериментальными кривыми в случае $A = 2 \mu M$ и $M = 20 \mu M$. Удельная активность, рассчитанная на 1 моль актиновых субъединиц, оказывается в 3 раза ниже наблюдаемой. Чтобы получить приближенное количественное согласие, приходится увеличить K_1 в 3-5 раз, а K_2 в 5-10 раз по сравнению со случаем $M \ll A$. Этот результат свидетельствует о неравноправном участии миозина и актина в ферментативном цикле.

Кинетическое неравноправие миозина и актина является очевидным уже потому, что актин в отличие от миозина сам по себе не обладает ферментативными свойствами и более того, расщепление фосфатной связи АТФ даже в актомиозиновой системе происходит на свободном миозине, а не на актомиозиновом комплексе /22/. Однако, основываясь на схеме Лимна и Тейлора /22/, можно утверждать следующее: если скорость АТФазы актомиозинового типа, во-первых, существенно превышает скорость миозиновой АТФазы при тех же условиях и, во-вторых, существенно ниже, чем константа скорости гидролиза фосфатной связи в миозин-субстратном комплексе ($K_6 \ll \omega \ll K_5$ - см. схему Лимна и Тейлора - рис. 2), то неравноправие актина и миозина становится несущественным. Оба эти условия, очевидно, выполнены в обсуждаемых экспериментах Бремель и Вебер /21/, и тем не менее избыток актина оказывается неэквивалентным избытку S_1 . Это должно означать, что схема Лимна и Тейлора неточно описывает

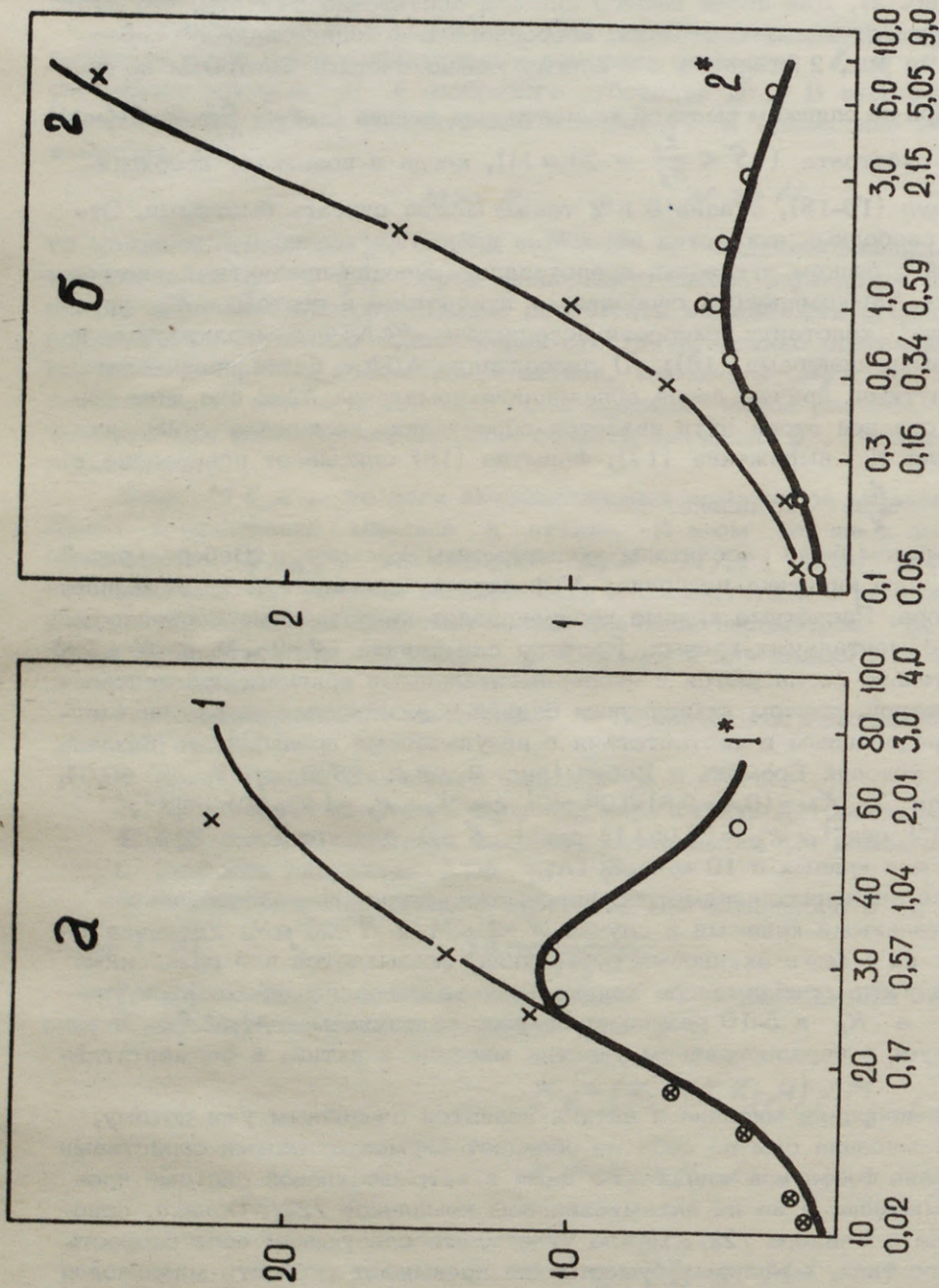


Рис. 4. Субстратное ингибирование АТФазы акто- S_1 . + и 0 - экспериментальные данные Бремеля и Вебера (1/21/рис. 3). +: кривые с 1 мМ Са ЭТА; 0: кривые с 1 мМ ЭТА. 1,1* и 2,2* - расчетные кривые; для 1 и 2 $\beta = 0$, для 1* и 2* $\beta = 20$, $\ell = 7$; для 1 и 1* $K_1 = 1,4 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ сек}^{-1}$, $K_2 = 500 \text{ сек}^{-1}$, $K_3 = K_7 = 3 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ сек}^{-1}$; $K_6 = 1 \text{ сек}^{-1}$; для кривых 2 и 2* $K_1 = 0,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ сек}^{-1}$; $K_2 = 40 \text{ сек}^{-1}$, $K_3 = K_7 = 2 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ сек}^{-1}$, $K_6 = 1 \text{ сек}^{-1}$. Ось абсцисс: верхний ряд чисел - полная концентрация Mg АТФ в μM , нижний ряд чисел - концентрация свободной Mg АТФ, поделенная на концентрацию S_1 (расчеты); а - $A = 2 \mu\text{M}$, $M = [S_1] = 20 \mu\text{M}$, ось ординат - число молей гидролизованной АТФ на моль актиновых мономеров в 1 сек; б - $A = 9 \mu\text{M}$, $M = [S_1] = 1 \mu\text{M}$, ордината - число молей гидролизованной АТФ на моль S_1 в 1 сек.

механизм АТФазы акто-субфрагмента-1, причем отклонения становятся существенными, когда концентрация субфрагмента-1 выше, чем актина. Возможно, что эти отклонения свидетельствуют о существовании взаимодействия между соседними актиновыми центрами: при соединении одного из актиновых центров с субфрагментом-1 сродство одного или обоих его соседей к S_1 повышается (возрастает K_1) и, кроме того, сродство комплекса акто- S_1 к продуктам уменьшается, если соседний с ним активный центр актина также образует комплекс с S_1 (для парных комплексов акто- S_1 K_2 выше, чем для одиночных).

Кооперативность этого типа, возможно, не обусловлена действием регуляторных белков. Во всяком случае она должна проявляться, даже если тропонин насыщен кальцием. Представляет интерес следующий вопрос: может ли зависимость АТФазы акто- S_1 от концентрации субстрата иметь колоколообразную форму в отсутствие регуляторных белков, если $[S_1]$ соизмерима или больше $[A]$. АТФаза акто-НММ не должна обладать такой кинетической особенностью, если порядок кооперативности не выше 2. Однако, если область кооперативности распространяется на три или более актиновых центра, то субстратное ингибирование возможно и в этом случае, хотя оно будет менее выражено, чем на акто- S_1 .

Заслуживает анализа также возможность существования неравновесного состояния актинового центра (A^*), возникающего в результате диссоциации комплекса AM_S и релаксирующего в равновесное состояние A . Для объяснения результатов Бремель и Вебер достаточно предположить, что A^* имеет более высокое сродство к МР, чем A , а образующийся комплекс A^*MP имеет меньшее сродство к продуктам, чем AMP . Такая модификация схемы Лимна и Тейлора не предполагает субстратного ингибирования АТФазы акто- S_1 или акто-НММ в отсутствие нативного тропомиозина или при насыщающей концентрации кальция.

Построение более сложной математической модели, более полно описывающей результаты Бремель и Вебер [21], не представляет принципиальных трудностей. Однако оно вряд ли имеет смысл до того, как будут экспериментально решены обсуждавшиеся выше вопросы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Букатина А.Е., Дещеревский В.И., Биофизика, 17, 738 (1972).
2. Дещеревский В.И., Биофизика, 13, 928 (1968).
3. Weber A., J. Biol. Chem., 234, 2764 (1959).
4. Weber A., Winicur S., J. Biol. Chem., 236, 3198 (1961).
5. Weber A., Herz R., J. Biol. Chem., 238, 599 (1963).
6. Levy H.M., Ryan E.M., Nature, 205, 703 (1965).
7. Reuben J.P., Brandt P.W., Berman M., Fed. Proc., 29, 846 (1970).
8. Reuben J.P. et al., J. Gen. Physiol., 57, 385 (1971).
9. Ebashi S., Nature, 200, 1010 (1963).
10. Maruyama K., Ishikawa Y., Ebashi S., J. Biochem. (Tokyo), 55, 581 (1964).
11. Ebashi S., Ebashi F., J. Biochem. (Tokyo), 55, 604 (1964).
12. Ebashi S., Endo M., Ohtsuki I., Quart. Rev. Biophys., 2, 351 (1969).
13. Stewart J.M., Levy H.M., J. Biol. Chem., 245, 5764 (1970).
14. Tonomura Y., Yoshimura J., Arch. Biochem. Biophys., 90, 73 (1960).
15. Weber A., Herz R., Reiss I., Proc. Roy. Soc., B160, 489 (1964).
16. Watanabe S., Sargeant T., Angleton M., Amer. J. Physiol., 207, 800 (1964).
17. Levy H.M., Ryan E.M., J. Gen. Physiol., 50, 2421 (1967).
18. White D.C.S., J. Physiol. (London), 208, 583 (1970).
19. Lowey S., et al., J. Mol. Biol., 42, 1 (1969).

20. Eisenberg E., Kietley W.W., Biochem. Biophys. Res. Comm., 40, 50 (1970).
21. Bremel R.D., Weber A., Nature, New Biol., 238, 97 (1972).
22. Lymn R.W., Taylor E.W., Biochemistry, 10, 4617 (1971).
23. Eisenberg E., Moos C., J. Biol. Chem., 245, 2451 (1970).
24. Rizino A.A., et al., Biochemistry, 9, 2402 (1970).
25. Barouch W.W., Moos C., Biochim. Biophys. Acta, 234, 138 (1971).
26. Eisenberg E., Moos C., Biochemistry, 7, 1486 (1968).

СОКРАЩЕНИЯ И СИМВОЛЫ (ABBREVIATIONS AND SYMBOLS)

- A - актин (actin).
- A - концентрация актиновых мономеров (actin monomer concentration).
- M - миозин (myosin).
- M - концентрация миозиновых центров (myosin site concentration).
- HMM - тяжелый меромиозин (heavy meromyosin).
- S_1 - субфрагмент-1 HMM (subfragment-1 of HMM).
- AM - актомиозин (actomyosin).
- a - концентрация актомиозиновых комплексов (actomyosin complex concentration).
- a - концентрация свободных включенных актиновых центров (free "switched on" actin sites concentration).
- μ - концентрация свободных молекул миозина (free myosin sites concentration).
- w - скорость актомиозиновой АТФазы (rate of actomyosin ATPase).
- γ - эффективная константа скорости первого порядка превращения A в AM (apparent first order rate constant for transition A in AM).
- d - эффективная константа скорости диссоциации AM-комплекса (apparent rate constant of AM complex dissociation).
- g - эффективная равновесная константа ассоциации AM-комплекса (apparent equilibrium constant of AM complex association).
- l - параметр кооперативности, равный числу актиновых центров на участке тонкой нити, контролируемом одной тропонин-тропомиозиновой парой (в функциональном блоке) /parameter of cooperation which is the number of actin sites in the thin filament region, controlled by one troponin-tropomyosin pair (in "functional unit")/.
- R^l - функциональный блок, в котором все l актиновых центров "выключены" (functional unit in which all l actin sites are "switched off").
- a_i^l - функциональный блок, в котором все l актиновых центров включены и i из них образуют AM-комплексы (functional unit in which all l actin sites are "switched on" and i sites from them form AM-complexes).
- b - Ca-зависимая константа ингибирования (Ca-dependent inhibition constant).
- S - концентрация свободного субстрата (Mg АТФ) (free substrate (MgATP) concentration).
- s - концентрация связанного нуклеотида (bound nucleotide concentration).
- N - полная концентрация нуклеотида (total nucleotide concentration).
- P - концентрация продуктов (АДФ и Фн) (product concentration (ADP and Pi)).
- K_i - константа скорости i -ой стадии в схеме гидролиза АТФ акто-НММ по Лимну и Тейлору, (см. рис. 2) (rate constant of i -step in Lymn's and Taylor's scheme of ATP hydrolysis by acto-HMM (see Fig. 2)).

REGULATION OF FUNCTIONAL ACTIVITY OF ACTOMYOSIN SYSTEMS

THE MODEL OF ACTIN REGULATION BY NATIVE TROPOMYOSIN AND STEADY-STATE KINETICS OF ATP HYDROLYSIS BY UNSTRUCTURATED ACTOMYOSIN SYSTEMS

V.I. Descherevsky

Institute of Biological Physics of Acad. Sci. of the USSR,
Pushchino-on-Oka

Summary

The kinetic scheme of actomyosin ATPase regulated by native tropomyosin is proposed. It is supposed that in the absence of calcium troponin-tropomyosin pair can "switch off" the thin filament "functional unit" containing l actin sites if only none of these l sites forms complex with myosin (AM or AM-ADP-Pi complex). Model gives proportions of "switched on" actin sites and actomyosin complexes as functions of calcium-dependent inhibition constant b , "cooperativity" parameter l , and apparent rate constants of association γ and dissociation d of myosin and "switched on" actin site.

Estimations of these parameters and calculation of ATP hydrolysis rate are based on the cyclic mechanism of actomyosin ATPase (Bukatina A.E., Descherevsky V.I., *Biofizika*, 17, 738 (1972): each hydrolytic act is coupled with whole A and M association-dissociation cycle.

The cycle from two states of A site (free and linked with M) is used for the description of unstructured AM systems (acto-HMM and acto-S1). Apparent rate constants γ and d are determined by two independent methods for acto-HMM: from kinetic scheme of acto-HMM ATPase (Lymn R.W. and Taylor E.W., *Biochemistry*, 10, 4617 (1971) and from the dependence of steady-state acto-HMM ATPase rate upon the actin concentration. Both methods give similar results. The method of AM ATPase steady-state rate dependence from substrate concentration is suggested. It is valid at any actin, myosin and MgATP concentration ranges.

Calculations of Bremel's and Weber's experiments (Bremel R.D. and Weber A., *Nature New Biol.*, 238, 97, Fig.3 (1972) on acto-S1 ATPase substrate inhibition are given. Calculated curves are in a good accordance with experimental one when actin is in excess ($[A] \gg [S1]$). When $[S1] \gg [A]$ the model simulates qualitatively the behaviour of the experimental curves but gives specific activity 3 times lower than real one. Quantitative accordance is achieved if rate constants of A and M association and products dissociation from AMP complex are in the second case in 3-5 times and 5-10 times higher than corresponding constants in the first case.

This result means inequality of actin and myosin in hydrolytic cycle which does not follow from Lymn's and Taylor's scheme. Possible versions of this scheme specification and recommendations for their experimental testing are suggested here.

СОДЕРЖАНИЕ

I. Модель регуляции состояния актина нативным тропомиозином.	4
II. Неструктурированные актомиозиновые системы.	7
1. Оценка γ и δ из схемы Лимна и Тейлора.	7
2. Циклический механизм АТФазы актомиозина.	9
3. Расчет кинетики гидролиза АТФ неструктурированными АМ-системами.	12

CONTENTS

I. Model of regulation of actin state by native tropomyosin.	4
II. Unstructured actomyosin systems.	7
1. Estimation of γ and δ from Lymn's-Taylor's scheme.	7
2. Cyclic mechanism of actomyosin ATPase.	9
3. Calculations of kinetics of ATP hydrolysis by unstructured AM-systems.	12

В.И.Дешеревский

Регуляция функциональной активности актомиозиновых систем. Модель
регуляции состояния актина нативным тропомиозином и стационарная
кинетика гидролиза АТФ неструктурированными актомиозиновыми
системами

Редактор М.Б.Бодрова

T17503 Подписано к печати 12/10-1973 г. Уч.изд.л. 1,7
Тираж 100 Заказ 1390P

Отпечатано на ротаприте в Научном центре биологических исследований АН СССР
в Пущине.