

ZENON GRABAREK

Boston Biomedical Research Institute

Watertown, MA 02472, USA

e-mail: grabarek@bbri.org

MECHANIZMY REGULACJI SKURCZU MIĘŚNI POPRZECZNIE PRAŻKOWANYCH

WPROWADZENIE

Mięśnie poprzecznie prążkowane, do których zaliczamy mięśnie szkieletowe i mięsień sercowy, wyróżniają się niesłychanie regularną strukturą oraz mechanizmem regulacji opartym na współdziałaniu białek cienkiego filamentu: aktyny F, tropomiozyny (Tm) i troponiny (Tn). Aktynę zidentyfikowano jako niezależny składnik aparatu skurczu mięśni w 1942 r. (STRAUB 1942), a w sześć lat później BAILEY odkrył tropomiozynę (BAILEY 1948). W tym samym mniej więcej czasie udowodniono, że jony wapnia są czynnikiem aktywującym skurcz (HEILBRUNN i WIERCINSKI 1947). Jednakże udział tropomiozyny w procesie regulacji został doceniony dopiero dziesięć lat później. Ponadto, tylko tzw. „naturalna tropomiozyna” wykazywała zdolność uczulania ATPazy aktomiozynowej na jony wapnia i traciła tę właściwość w miarę oczyszczania (EBASHI 1963). Substancją „zanieczyszczającą” Tm okazało się białko nazwane troponiną (EBASHI i współaut. 1967, EBASHI i ENDO 1968). Wkrótce wykazano, że troponina jest kompleksem trzech białek, z których każde pełni specyficzną rolę w regulacji skurczu. Troponina I (TnI) hamuje ATPazę aktomiozynową, troponina C (TnC) wiąże jony wapnia, a tropo-

nina T (TnT) łączy wszystkie składniki z tropomiozyną (GREASER i GERGELY 1971, 1973). Po połączeniu wszystkich tych białek oraz miozyny i ATP można było obserwować w próbówce proces zwany superprecypitacją, który wykazywał cechy charakterystyczne dla skurczu mięśnia. W ten sposób wykazano, że wymienione składniki są nie tylko niezbędne, lecz również wystarczające do zrekonstruowania podstawowych procesów biochemicznych, które w mięśniach prowadzą do skurczu.

Celem tego artykułu jest krótkie omówienie składników kompleksu regulującego mięśnie szkieletowych, ze szczególnym uwzględnieniem najnowszych informacji na temat ich struktury oraz powiązania pomiędzy strukturą i funkcją. Bardziej szczegółowe informacje zawarte są w pracach przeglądowych na temat TnT (PERRY 1998), TnI (PERRY 1999), TnC (GRABAREK i współaut. 1992) oraz tropomiozyny (PERRY 2001). Niektóre aspekty strukturalne regulacji omawiali GEEVES i HOLMES (1999), a fizjologiczne GORDON i współautorzy (2000). Regulację w mięśniach sercowych omawiali TOBACMAN (1996) oraz GORDON i współautorzy (2001).

STRUKTURA CIENKIEGO FILAMENTU

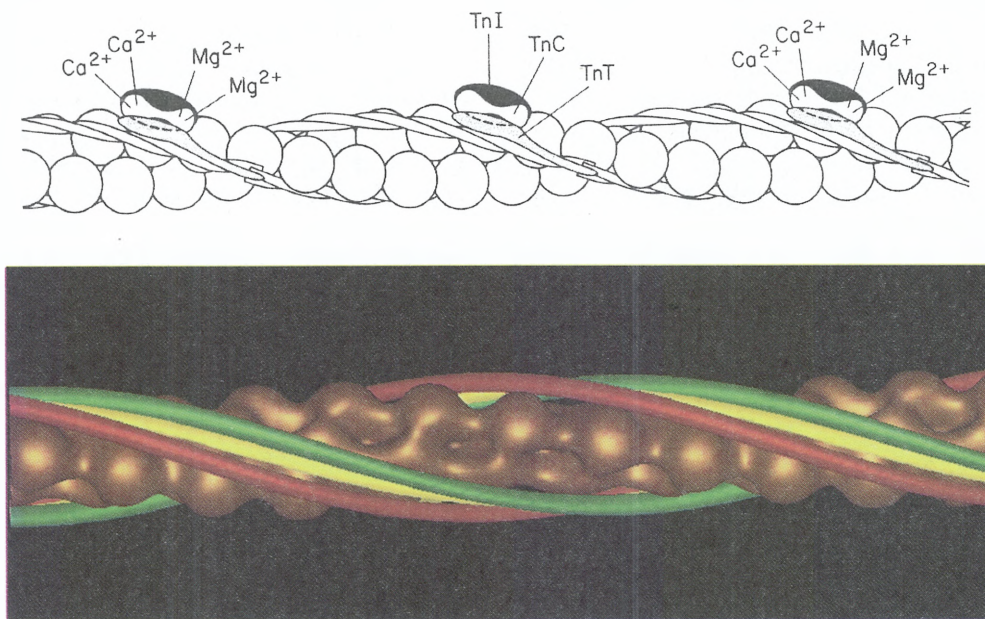
Cienki filament mięśni poprzecznie prążkowanych zawiera jedną cząsteczkę tropomiozyny i jedną troponiny na każde siedem monomerów aktyny (Ryc. 1A). Struktura przestrzenna monomerycznej aktyny jest znana z badań krytalograficznych (KABSCH i współaut. 1990, OTTERBEIN i współaut. 2001). Niestety, metody tej nie udało się dotąd zastosować do całego cienkiego filamentu i jego struktura jest znana ze znacznie niższą rozdzielczością. Najlepszy mo-

del aktyny F uzyskano przez dopasowanie krytalicznej struktury monomeru aktyny do mapy gęstości elektronowej cienkiego filamentu o niskiej rozdzielczości, uzyskanej z dyfrakcji promieni Roentgena na żelach aktyny F (HOLMES i współaut. 1990) (zobacz również art. STRZELECKIEJ-GOŁASZEWSKIEJ w tym numerze KOSMOSU). Aktynę F można traktować jako podwójną, prawoskrętną superhelisę, w której każdy monomer aktyny kontaktuje się z dwoma innymi

w tym samym łańcuchu, jak również z dwoma monomerami z drugiego równoległego łańcucha.

Badania biochemiczne i strukturalne już w latach 70. dały podstawy do modelu regulacji nazwanego mechanizmem zawady przestrzennej (PARRY i SQUIRE 1973). Model ten zakładał, że w niskim stężeniu jonów Ca^{2+} , czyli w stanie rozkurczu, Tm blokuje na powierzchni aktywności miejsca wiązania główek miozyny, uniemożliwiając w ten sposób skurcz. Po związaniu Ca^{2+} przez Tn następuje przesunięcie Tm do pozycji nieblokującej. Najnowsze badania przy użyciu trójwymiarowej rekonstrukcji obrazów mikroskopowych pozwoliły na wyznaczenie pozycji tropomiozyny na powierzchni aktywności F zarówno w stanie rozkurczu, jak i aktywacji (Ryc. 1B).

do całkowitej aktywacji filamentu potrzebny jest nie tylko udział Ca^{2+} , ale równie istotną rolę odgrywa sama miozyna. Do podobnych wniosków doprowadziły badania biochemiczne (MCKILLOP i GEEVES 1993, LEHRER 1994), z których wynikało, że to właśnie główki miozyny, a nie jony Ca^{2+} , mają decydujący wpływ na pozycję Tm w filamencie. Zaproponowano nazwy: „stan zablokowany”, „stan zamknięty” i „stan otwarty” dla konformacji cienkiego filamentu, w której główki miozyny, odpowiednio, nie wiążą się, wiążą się słabo (S1-ATP, S1-ADP-P_i) lub wiążą się mocno z aktywą (S1-ADP lub S1 bez nukleotydu). Jony Ca^{2+} decydują o względnych proporcjach między tymi trzema stanami, ponadto tylko w obecności Ca^{2+} możliwa jest niezbędna do wytworzenia siły izomeryzacja po-



Ryc. 1. Struktura cienkiego filamentu mięśni poprzecznie prążkowanych.

Góra — schemat ilustrujący rozmieszczenie i stochiometrię składników cienkiego filamentu. Dół — struktura uzyskana metodą trójwymiarowej rekonstrukcji obrazów mikroskopowych (wg CRAIGA i LEHMANA 2001). Pokazana jest powierzchnia aktyny F oraz tropomiozyna w pozycji blokującej (czerwona), zamkniętej (żółta) i otwartej (zielona). Zastosowana metoda nie pozwala na uwidocznienie troponiny (reprodukcja za zgodą autorów).

Wykazano, że w nieobecności jonów Ca^{2+} Tm związana jest z subdomeną I monomerów aktyny na zewnętrznej części filamentu, w odległości 3,8 nm od osi filamentu, w miejscu odpowiedzialnym za wiązanie główek miozyny. Związanie jonów Ca^{2+} przez troponinę powoduje przesunięcie Tm azymutalnie w stosunku do osi filamentu o około 25° , w ten sposób odsłaniając częściowo miejsce wiązania miozyny. Dalsze przesunięcie o 10° następuje pod wpływem mocnego wiązania główek miozyny z aktywą (VIBERT i współaut. 1997, XU i współaut. 1999). A więc należy wyróżnić nie dwa, lecz trzy stany konformacyjne cienkiego filamentu. Ponadto,

między słabym i mocnym wiązaniem główek miozyny. Mocne wiązanie przynajmniej jednej główki miozyny na tzw. pozorną jednostkę kooperatywną (zobacz poniżej) jest konieczne do przejścia filamentu do stanu otwartego. Model ten (tzw. model trzech stanów) wydaje się dość dobrze tłumaczyć większość właściwości cienkiego filamentu z wyjątkiem tzw. potencjacji, czyli zwiększenia aktywności ATPazy aktomiozynowej w pewnych warunkach przez Tm lub kompleks Tm-Tn. Z tego powodu Tobacman zaproponował niedawno alternatywny model regulacji, w którym przypisuje istotną rolę w regulacji bliżej nieokreślonym zmianom konfor-

macyjnym w aktynie F (TOBACMAN i BUTTERS 2000). Jest wysoce prawdopodobne, że do wyjaśnienia tej kontrowersji niezbędna będzie

znajomość atomowej struktury cienkiego filamentu.

STRUKTURA TROPOMIOZYNY

Tropomiozyna występuje we wszystkich rodzajach mięśni, jak również towarzyszy aktynie w komórkach niemięśniowych. Częsteczka Tm zbudowana jest z dwóch łańcuchów polipeptydowych o strukturze α -helisy, skręconych w superhelisę (ang. coiled-coil). W mięśniach poprzecznie prążkowanych występują dwie izoformy, α i β , które tworzą zarówno homo- ($\alpha\alpha, \beta\beta$), jak i heterodimery ($\alpha\beta$). Proporcje izoform α i β zależą od rodzaju mięśnia, organizmu oraz stadium jego rozwoju. Na przykład w mięśniach szkieletowych dorosłego królika α/β = około 4, natomiast mięsień sercowy królika zawiera wyłącznie formę α . Każdy z łańcuchów Tm zawiera 284 aminokwasy (m.cz. około 33000). Choć różnice między sekwencjami izoform są nieznaczne, mają jednak wpływ na zdolność Tm do polimeryzacji oraz do wiązania aktyny. Cały łańcuch Tm zbudowany jest z wielokrotnie powtórzonej charakterystycznej heptady — motywu siedmiu aminokwasów (a-b-c-d-e-f-g) z aminokwasami hydrofobowymi (najczęściej leucyna i alanina) w pozycji a i d oraz aminokwasami hydrofilowymi lub zawierającymi grupy jonowe w pozostałych pozycjach. Po skręceniu łańcucha w prawoskrętną α -helisę (3,6 aminokwasów na 1 skręt α -helisy), aminokwasy te tworzą hydrofobową wstęgę przebiegającą wzdłuż α -helisy monomeru Tm, która pozwala na połączenie dwóch α -helis w superhelisę w sposób przypominający zapinanie suwaka. Wiązania jonowe pomiędzy aminokwasami w pozycjach e i g dodatkowo stabilizują taką strukturę. Mechanizm tworzenia superhelisy przez α -helisy został opisany już w roku 1953 (CRICK 1953), ale jej precyzyjny model o rozdzielczości 1,8 Å stał się dostępny dopiero po rozwiązaniu krystalicznej struktury fragmentu czynnika transkrypcyjnego drożdży (GCN4) (O'SHEA i współaut. 1991). Dość niefortunnie ukuty został przez genetyków molekularnych nowy i popularny obecnie termin na określenie tej struktury: „suwak leucynowy” (ang. leucine zipper). Paradoksalnie, pomimo że Tm tworzy niezliczoną liczbę różnorodnych form krystalicznych i parakrystalicznych, najlepsza opublikowana struktura całej Tm ma rozdzielczość zaledwie 7,0 Å (WHITBY i PHILLIPS 2000). Niedawno Cohen i współpracownicy uzyskali strukturę o wysokiej rozdzielczości (2,0 Å) N-końcowego fragmentu Tm zawierającego 81 aminokwasów

(BROWN i współaut. 2001). Przy takiej rozdzielczości znakomicie widoczne są łańcuchy boczne aminokwasów i większość niekowalencyjnych kontaktów międzyatomowych może być dokładnie określona. Z punktu widzenia funkcji Tm, najważniejsze w tej pracy wydaje się zidentyfikowanie zgrupowań alaniny w hydrofobowym rdzeniu Tm, powodujących nieznaczne przesunięcie (o 1,5 Å) jednego łańcucha względem drugiego. Powoduje to lokalne zaburzenie dwukrotnej symetrii klasycznej superhelisy i jej nieznaczne odkształcenie. Tm zawiera siedem takich grup rozmieszczonych nieregularnie na całej długości cząsteczki. Zdaniem autorów, rola tych grup polega na zwiększeniu elastyczności Tm i umożliwieniu istotnych dla regulacji lokalnych odkształceń Tm na powierzchni filamentu aktynowego.

Cząsteczki Tm tworzą liniowe polimery dzięki wiązaniom pomiędzy końcami N i C. Wiadomo, że w wiązanie to zaangażowanych jest około 8–9 aminokwasów, ale mechanizm wiązania jest nieznan. Wykazano, że brak grupy acetylowej na α -aminowej grupie N-końcowego aminokwasu, co ma miejsce w Tm wytwarzanej przez ekspresję w *E. coli*, albo usunięcie czterech aminokwasów z końca C, powoduje utratę zdolności do polimeryzacji. Z drugiej strony, przedłużenie łańcucha o dwa aminokwasy na końcu N, nawet w nieobecności N-końcowej grupy α -acetyloaminowej, przywraca tę zdolność. A więc polimeryzacja Tm wymaga bardzo specyficznego rozkładu grup funkcyjnych, a zwłaszcza ładunków elektrycznych na obu końcach cząsteczki. Polimery Tm związane są symetrycznie po obu stronach filamentu aktynowego, przy czym każda cząsteczka Tm wiąże się z siedmioma monomerami aktyny. W oparciu o analizę sekwencji aminokwasowej Tm (MCLACHLAN i STEWART 1976) oraz badania strukturalne (PHILLIPS i współaut. 1986), w cząsteczce Tm zidentyfikowano siedem segmentów — potencjalnych miejsc wiązania aktyny. Udział każdego z tych miejsc w wiązaniu aktyny i w mechanizmie regulacji nie jest równocenny. Hitchcock i współpracownicy wykazali, że usunięcie miejsc II, III i IV ma stosunkowo niewielki wpływ na właściwości regulacyjne Tm, natomiast usunięcie każdego z pozostałych segmentów, a zwłaszcza segmentów N- i C-końcowych powoduje utratę tych właściwości (HITCHCOCK-DE-

GREGORI i współaut. 2001, MORACZEWSKA i współaut. 1999).

Badania strukturalne przy użyciu mikroskopii elektronowej i krystalografii, jak również szereg obserwacji biochemicznych wykazały, że cząsteczka Tm zaangażowana jest w wiązanie TnT na znacznej długości. Miejsce wiązania obejmuje w przybliżeniu jedną trzecią, C-końcową część cząsteczki, jak również krótki odcinek z końca N. Takie wiązanie zwiększa stabilność Tm oraz wzmacnia oddziaływanie pomiędzy końcami C i N sąsiadujących cząsteczek Tm w cienkim filamencie, co z kolei zwiększa koope-

ratywność aktywacji skurczu. Analiza sekwencji TnT wykazała, że fragment wiążący Tm (aminokwasy 71–151) ma wysoki potencjał tworzenia α -helisy, a więc wiązanie pomiędzy Tm i TnT najprawdopodobniej oparte jest na tworzeniu potrójnej superhelisy, zawierającej dwie równoległe α -helisy Tm i przeciwrównoległą α -helisę TnT. Model taki został teoretycznie przewidziany już w 1980 r. (NAGANO i współaut. 1980, 1982), ale w dalszym ciągu brak danych krystalograficznych pozwalających na jego weryfikację.

TROPONINA I

Cząsteczka TnI z mięśni szkieletowych królika zawiera 181 aminokwasów. TnI wiąże się bezpośrednio z aktyną i wiązanie to jest wystarczające do zahamowania aktywności ATPazy aktomiozynowej *in vitro* w nieobecności innych składników kompleksu regulującego. Jednakże w takich warunkach niezbędne są równomolowe ilości TnI w stosunku do aktyny. W obecności Tm hamujący efekt TnI jest wielokrotnie wzmocniony i już przy stosunku molowym TnI do aktyny 1:7 następuje prawie całkowite zahamowanie ATPazy. Zakłada się, że podstawową rolą TnI jest utrzymywanie Tm na powierzchni filamentu aktyny w tzw. „pozycji blokującej” wiązanie główek miozyny w nieobecności jonów Ca^{2+} . W ten sposób jedna cząsteczka Tn reguluje aktywność wielu monomerów aktyny. Pomiarzy przy użyciu znaczników fluorescencyjnych wprowadzonych do Tm, prowadzone zarówno w stanie równowagi, jak i metodami kinetycznymi, wykazały, że rzeczywista jednostka kooperatywna, czyli liczba monomerów aktyny jednocześnie „włączanych” i „wyłączanych” przez cząsteczkę Tm, jest inna niż jednostka strukturalna. W nieobecności troponiny wynosi ona 5–6 monomerów aktyny, podczas gdy w obecności Tn wzrasta do 10–12 monomerów aktyny niezależnie od stężenia Ca^{2+} (GEVES i LEHRER 1994). Ponadto, jest ona zależna od rodzaju tropomiozyny (MAYTUM i współaut. 1999).

W chwili obecnej znamy strukturę przestrzenną tylko niektórych fragmentów TnI, jednakże intensywne badania biochemiczne oraz przy użyciu jądrowego rezonansu magnetycznego (NMR) pozwoliły na zlokalizowanie miejsc odpowiedzialnych za funkcje tego białka. TnI posiada zasadniczo dwa miejsca wiązania TnC. Czterdzieści aminokwasów od końca N tworzy α -helisę, która wiąże się specyficznie i z wysoką stałą równowagi wiązania (NGAI i HODGES 1992;

2001) z hydrofobową kieszenią w C-końcowej domenie TnC (VASSYLYEV i współaut. 1998). Wprawdzie to wiązanie wymaga obecności Ca^{2+} lub Mg^{2+} , ale nie ulega dysocjacji w zakresie stężeń Ca^{2+} , w którym zachodzi aktywacja skurczu, a więc ma znaczenie tylko strukturalne. Drugie miejsce rozpoznane zostało początkowo w peptydzie zawierającym aminokwasy 96–116 (SYSKA i współaut. 1976), ale nowsze badania wykazały, że przedłużenie tego peptydu o fragment 117–131, oraz w mniejszym stopniu 132–148, znacznie podnosi specyficzność i siłę wiązania (MCKAY i współaut. 1999). A więc ten rejon TnI zawiera elementy albo bezpośrednio zaangażowane w wiązanie TnC, albo pośrednio wpływające na wiązanie fragmentu 96–116 poprzez stabilizację jego struktury. Badania przy użyciu krótkich fragmentów TnI otrzymanych metodami chemicznymi, jak również dłuższych fragmentów otrzymanych przez ekspresję w *E.coli* doprowadziły do sprzecznych wniosków odnośnie miejsca wiązania TnI (jej reszt 96–116) w strukturze TnC. Jest jednak pewne, że zaangażowana jest hydrofobowa kieszeń w N-końcowej domenie TnC. Segment 96–116 TnI wiąże się również z aktyną, najprawdopodobniej z jej N-końcowym fragmentem (GRABAREK i GERGELY 1987, LEVINE i współaut. 1988) i ma zdolność hamowania ATPazy aktomiozynowej w podobny sposób jak cała troponina I. Podobnie jak w przypadku wiązania z TnC, oprócz segmentu 96–116 co najmniej dwa inne miejsca w C-końcowym rejonie TnI wydają się być zaangażowane w regulację (TRIPET i współaut. 1997, VAN EYK i współaut. 1997). Tak więc, zasadniczy etap w procesie aktywacji skurczu polega na dysocjacji fragmentu inhibitorowego położonego w C-końcowym fragmencie TnI (aminokwasy 96–148) z miejsc wiązania na aktynie.

Oprócz TnC i aktyny, TnI wiąże również TnT, jak wykazano metodami dichroizmu kołowego

(HORWITZ i współaut. 1979), chromatografii powinowactwa i chemicznego sieciowania (HITCHCOCK i LUTTER 1975). W wiązanie to zaangażowany jest fragment łańcucha polipeptydowego pomiędzy miejscami wiązania TnC, najpra-

wdopodobniej obejmujący aminokwasy 48–100. Ten rejon TnI wykazuje wysoki potencjał tworzenia α -helisy i charakterystyczny rozkład grup hydrofobowych co 3 i 4 aminokwasy, co wskazuje na zdolność tworzenia superhelisy.

TROPONINA T

TnT jest największą podjednostką troponiny. Główna izoforma TnT z mięśni szkieletowych królika zawiera 260 aminokwasów i ma masę cząsteczkową 30620. Za podstawową funkcję TnT, to znaczy wiązanie Tm, odpowiedzialny jest fragment w N-końcowej części TnT (aminokwasy 71–151). Fragment ten ma wysoki potencjał tworzenia α -helisy. Inny fragment α -helikalny, z charakterystyczną heptadą hydrofobową wskazującą na tendencję do tworzenia

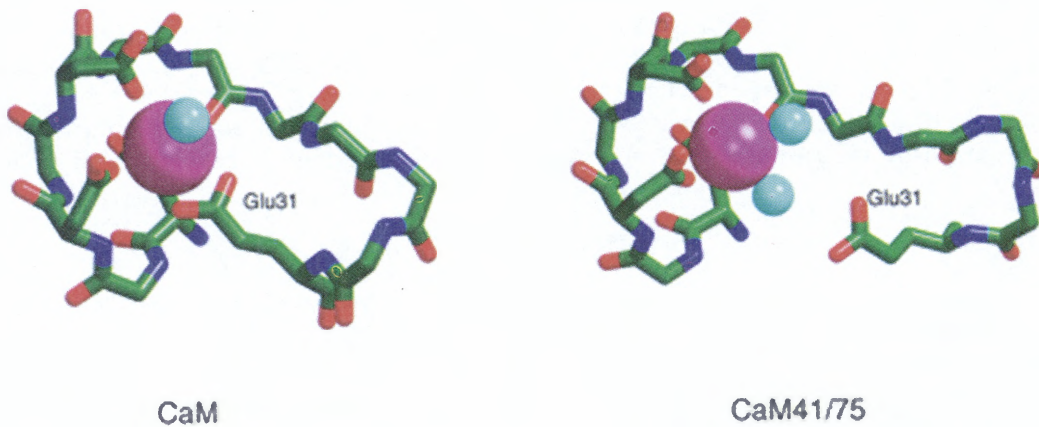
superhelisy, zlokalizowany jest w rejonie 159–227. Segment ten wiąże się z TnI przez utworzenie superhelisy (STEFANCSIK i współaut. 1998). TnT zarówno w stanie oczyszczonym, jak również w kompleksie z TnI i TnC ulega szybkiej degradacji w wyniku działania chymotrypsyny i innych enzymów proteolitycznych. Tworzą się dwa fragmenty: T1 (aminokwasy 1–151) i T2 (aminokwasy 159–260). Fragment T2 tworzy trwały kompleks z TnI i TnC.

TROPONINA C

TnC zajmuje kluczową pozycję w regulacji skurczu ze względu na zdolność specyficznego wiązania jonów wapnia w zakresie ich stężeń mikromolowych, występujących wewnątrz komórki mięśniowej w stanie aktywacji. Właściwość tę nadaje temu białku charakterystyczny motyw helisa-pętla-helisa zwany EF-hand, po raz pierwszy rozpoznany w strukturze parwalbuminy — wiążącego wapń niskocząsteczkowego białka mięśni szkieletowych ryb (KRETSINGER i NOCKOLDS 1973). Dwa motywy EF-hand tworzą strukturalną domenę. Podobne domeny występują w ogromnej liczbie spokrewnionych ewolucyjnie białek o różnorodnych funkcjach regulujących (NAKAYAMA i KRETSINGER 1994). TnC zawiera dwie domeny połączone długą α -helisą. C-końcowa domena wiąże jony Ca^{2+} z wyższą stałą równowagi wiązania i wiąże również jony Mg^{2+} (POTTER i GERGELY 1975), których stężenie wewnątrzkomórkowe jest stałe, w zakresie milimolowym. Z tego względu przyjmuje się, że C-końcowa domena jest zawsze wysyciona jonami metalu (Mg^{2+} lub Ca^{2+}) i pełni rolę strukturalną. Kluczowym argumentem na poparcie tej hipotezy były pomiary kinetyczne wykazujące, że szybkość wiązania Ca^{2+} , która jest ograniczona dysocjacją Mg^{2+} , jak również szybkość dysocjacji Ca^{2+} z C-końcowej domeny (odpowiednio 8 s^{-1} i 2 s^{-1}), są znacznie wolniejsze niż szybkości aktywacji i relaksacji skurczu znane z pomiarów fizjologicznych (ROBERTSON i współaut. 1981). Natomiast kinetyka wiązania i dysocjacji Ca^{2+} w N-końcowej domenie jest odpowiednia i to właśnie ta domena jest odpowiedzialna za regulację skurczu. Badania krytalograficzne dostarczyły struktury TnC o wy-

sokiej rozdzielczości zarówno w konformacji odpowiadającej stanowi rozkurczu (HERZBERG i JAMES 1988), jak i w stanie aktywacji (HOUDUSSE i współaut. 1997). Porównanie tych struktur pozwoliło na precyzyjny opis mechanizmu zmian konformacyjnych w TnC indukowanych przez jony wapnia i na zweryfikowanie modelu zaproponowanego wcześniej przez HERZBERG i współaut. (1986). W nieobecności Ca^{2+} N-końcowa domena ma „zamkniętą” strukturę o dobrze zdefiniowanym rdzeniu hydrofobowym utworzonym przez cztery helisy (EF-hands I i II). Wiązanie Ca^{2+} z ligandami w pętlach powoduje zmianę kąta między helisami w obu motywach EF-hand i wyeksponowanie kieszeni hydrofobowej. W tej kieszeni wiąże się segment inhibitorowy troponiny I, który w nieobecności Ca^{2+} związany jest z aktyną F.

Pozostaje do wyjaśnienia, dlaczego chelowanie Ca^{2+} przez ligandy w pętlach wiążących wapń pociąga za sobą przesunięcie sąsiadujących helis. Bezpośredniej odpowiedzi na to pytanie dostarczyła określona niedawno w pracowni autora tego artykułu struktura mutantu kalmoduliny — białka regulującego homologicznego do troponiny C. W mutancie tym otwarcie N-końcowej domeny przez jony Ca^{2+} zostało uniemożliwione przez utworzenie mostka dwusiarczkowego łączącego helisy. Pozwoliło to na zaobserwowanie struktury przejściowej, w której jony Ca^{2+} są już związane z pętlami, ale domena jest jeszcze w konformacji zamkniętej (GRABAREK 2001). Przyczyną zmiany orientacji α -helis pod wpływem wiązania jonów Ca^{2+} okazuje się być szczególnie rola ostatniego liganda pętli — kwasu glutaminowego w pozycji 12.



Ryc. 2. Struktura pierwszej pętli wiążącej jony Ca^{2+} w kalmodulinie naturalnej oraz w mutancie, w którym N-końcowa domena jest zablokowana w konformacji zamkniętej przez mostek dwusiarczkowy pomiędzy resztami cysteiny w pozycjach 41 i 75 (poza obszarem rysunku). Proszę zwrócić uwagę na różnicę w położeniu kwasu glutaminowego w pozycji 12 pętli (Glu 31) w odniesieniu do jonu wapnia. Podobna różnica istnieje w pętli II. Udział Glu w pozycji 12 obu pętli w wiązaniu wapnia jest możliwy po otwarciu całej domeny i wyeksponowaniu kieszeni hydrofobowej. Podobny mechanizm działa w TnC.

Grupa γ -karboksylowa tego aminokwasu dostarcza dwa atomy tlenu do sfery koordynacyjnej jonów Ca^{2+} . Jednocześnie aminokwas ten jest integralną częścią α -helisy F w EF-hand, to znaczy jego łańcuch główny jest połączony wiązaniami wodorowymi z innymi aminokwasami tej helisy. Struktura pętli wiążącej wapń (Ryc. 2) jest taka, że wszystkie inne ligandy są we właściwej pozycji aby związać Ca^{2+} bez konieczności zmian konformacji łańcucha głównego, natomiast Glu-12 jest o około 2 Å za daleko. Zamknięcie sfery koordynacyjnej jonu

Ca^{2+} nie jest możliwe bez przesunięcia Glu-12 o 2 Å, co pociąga za sobą przesunięcie helisy F w sposób zgodny z geometrią sfery koordynacyjnej jonów Ca^{2+} i w konsekwencji otwarciu domeny. Mechanizm ten jest zgodny z wynikami NMR dla mutantu TnC z mięśnia szkieletowego, w którym Glu-41, aminokwas w pozycji 12 pierwszego motywu EF-hand, został zastąpiony alaniną. W efekcie N-końcowa domena tego białka pozostaje w konformacji zamkniętej nawet po związaniu Ca^{2+} z niezmiennym miejscem II (GAGNE i współaut. 1997, LI i współaut. 1997).

STRUKTURA TROPONINY

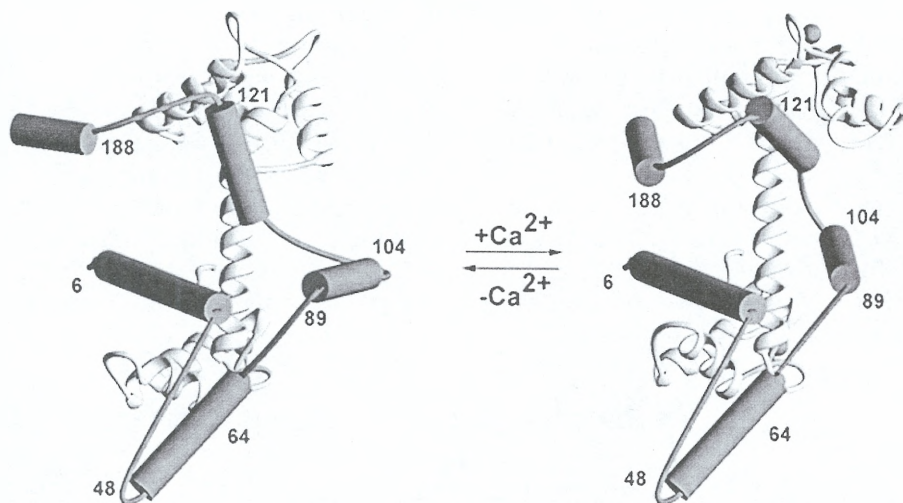
Troponina pozostaje ostatnim białkiem aparatu kurczliwego mięśni, którego struktura atomowa jest w dalszym ciągu nieznaną. Z obrazów w mikroskopie elektronowym wiadomo, że troponina posiada domenę globularną oraz elastyczny „ogon” (FLICKER i współaut. 1982, OHTSUKI i współaut. 1988). Część globularna zawiera TnC, TnI i około 100 C-końcowych aminokwasów TnT (fragment T2). Część elastyczna to N-końcowy fragment TnT (T1). Część globularna znajduje się w cienkim filamencie w pobliżu Cys-190 tropomiozyny, natomiast rejon T1 wiąże się z C-końcowym fragmentem Tm. W oparciu o wyniki chemicznego sieciowania, pomiary

odległości między wybranymi miejscami w TnC i TnI metodą rezonansowego przeniesienia energii fluorescencji (FRET), jak również kompilacji dostępnych informacji literaturowych, LUO i współaut. (2000) zaproponowali niedawno model kompleksu TnC-TnI, jak również zmiany jego struktury pod wpływem Ca^{2+} (Ryc. 3). Na konferencji w Harima (Hyogo) w Japonii, która odbyła się w listopadzie tego roku, Yuichiro Maeda i współpracownicy zaprezentowali strukturę krystaliczną części globularnej troponiny z mięśnia sercowego. Według nieopublikowanych jeszcze informacji struktura ta jest w dużej mierze zgodna z modelem Luo i współpracowników.

REGULACJA W MIĘŚNIU SERCOWYM

Mechanizm regulacji skurczu w mięśniu sercowym jest pod wieloma względami bardzo

podobny do regulacji w mięśniu szkieletowym. Bardziej istotne różnice występują na poziomie



Ryc. 3. Model kompleksu TnC-TnI ilustrujący zmiany strukturalne pod wpływem jonów Ca^{2+} (wg LUO i współaut. 2000). W konstrukcji tego modelu autorzy wykorzystali struktury atomowe TnC oraz liczne informacje biochemiczne i spektroskopowe. Wstęga reprezentuje TnC, a TnI jest przedstawiona w postaci cylindrów reprezentujących segmenty o strukturze α -helikalnej oraz elementów łączących o nieregularnej strukturze. W obecności Ca^{2+} N-końcowa domena TnC (górną rysunku) jest „otwarta” i pozostaje w kontakcie z fragmentem inhibitorowym TnI. W nieobecności Ca^{2+} domena ta jest zamknięta”, co powoduje przesunięcie fragmentu inhibitorowego TnI. Struktura C-końcowej domeny TnC (dół rysunku) nie ulega zmianie (reprodukcja za zgodą autorów).

fizjologicznym. Przede wszystkim, skurcz jest aktywowany nie przez neurony motoryczne, lecz przez spontaniczną akcję komórek rozrusznikowych. Ponadto, występuje szereg dodatkowych mechanizmów modulujących siłę wytwarzaną przez mięsień sercowy w odpowiedzi na zmienne wymagania układu krążenia (GORDON i współaut. 2001). Na poziomie molekularnym różnice polegają na obecności innych izoform białek regulujących.

Troponina C w mięśniu sercowym ma podobną do TnC mięśni szkieletowych długość łańcucha polipeptydowego (161 aminokwasów) i podobną strukturę przestrzenną. Jednakże, tylko jedno regulujące miejsce wiązania Ca^{2+} w N-końcowej domenie jest aktywne. W rezultacie domena ta pozostaje zamknięta nawet po związaniu Ca^{2+} w aktywnym miejscu II (SIA. i współaut. 1997) i ulega otwarciu pod wpływem TnI (LI

i współaut. 1999) lub niektórych leków (LI i współaut. 2000). Obecność tylko jednego aktywnego miejsca wiązania Ca^{2+} w N-końcowej domenie powoduje, że kooperatywność aktywacji jest niższa, co widoczne jest również w pomiarach fizjologicznych (TOBACMAN 1996).

TnI z mięśnia sercowego ma dodatkowy segment trzydziestu aminokwasów na końcu N. Segment ten zawiera dwie reszty seryny, które mogą ulegać fosforylacji przy udziale kinazy zależnej od cAMP (REIFFERT i współaut. 1996). Efektem fosforylacji jest obniżenie czułości na jony Ca^{2+} , czyli przesunięcie krzywej aktywacji w kierunku wyższych stężeń Ca^{2+} (REIFFERT i współaut. 1999, KENTISH i współaut. 2001). Podobne przedłużenie łańcucha polipeptydowego na końcu N występuje w izoformie TnT z mięśnia sercowego. Znaczenie tego segmentu dla fizjologicznej roli TnT nie jest znane.

PODSUMOWANIE

Jak wynika z powyższych informacji, regulacja skurczu mięśnia prążkowanego polega na zmianie struktury cienkiego filamentu, w którą zaangażowane są wszystkie składniki filamentu. W niskich stężeniach jonów Ca^{2+} pętla inhibitorowa TnI jest związana z aktyną, utrzymując w ten sposób Tm wraz z Tn na powierzchni aktyny F w tzw. pozycji blokującej, uniemożli-

wiającej wiązanie główek miozyny. Zmiany struktury filamentu zapoczątkowane są przez zamknięcie sfery koordynacyjnej jonów wapnia przez ostatnie dwa ligandy — atomy tlenu grup γ -karboksylowych kwasu glutaminowego w pozycji 12 w pętlach wiążących wapń w N-końcowej domenie TnC. Pociąga to za sobą otwarcie tej domeny i udostępnienie miejsca wiązania

dla pętli inhibitorowej TnI, która odłączając się od aktynej zwalnia Tm z pozycji blokującej. Następuje nieznaczne przesunięcie kompleksu Tm-Tn do tzw. pozycji zamkniętej, umożliwiając związanie z aktyną główek miozyny oraz przejście do następnego etapu cyklu ATPazowego — stanu silnego wiązania. Powoduje to dalsze przesunięcie kompleksu Tm-Tn do pozycji otwartej, czyli stanu pełnej aktywacji.

Trudno oprzeć się pokusie stwierdzenia, że regulacja skurczu mięśnia na najbardziej ele-

mentarnym poziomie zależy od utworzenia dwóch (w mięśniu sercowym) lub czterech (w mięśniu szkieletowym) wiązań pomiędzy atomami tlenu i jonami wapnia. Stwierdzenie takie wprawdzie nie jest fałszywe, z pewnością jednak jest zbyt wielkim uproszczeniem. Warto jednak choć przez chwilę spojrzeć na zagadnienie regulacji skurczu mięśnia właśnie w taki sposób, by uświadomić sobie w pełni z jak niezwykle precyzyjną i skomplikowaną maszyną mamy do czynienia.

MECHANISMS OF REGULATION IN STRIATED MUSCLES

Summary

Recent advances in understanding the structure of the troponin-tropomyosin complex are discussed within the framework of the three-state model of thin filament regulation. Changes in the structure of the thin filament are initiated by Ca^{2+} binding to the N-terminal domain of troponin C, which causes opening of a hydrophobic pocket in this domain. The inhibitory segment of troponin I disso-

ciates from actin and binds to the open N-terminal domain of TnC, thus allowing movement of Tm from the "blocked" to the "closed" position on F-actin. Further cooperative movement of Tm to the "open", fully active position is caused by the strong binding of myosin heads to actin. Details of the intermolecular interactions involved in the activation process are discussed.

LITERATURA

- BAILEY K., 1948. *Tropomyosin, a new asymmetric protein component of the muscle fibril*. *Biochem. J.* 43, 271-279.
- BROWN J. H., KIM K. H., JUN G., GREENFIELD N. J., DOMINGUEZ R., VOLKMAN N., HITCHCOCK-DEGREGORI S. E., COHEN C., 2001. *Deciphering the design of the tropomyosin molecule*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 8496-8501.
- CRAIG R., LEHMAN W., 2001. *Crossbridge and tropomyosin positions observed in native, interacting thick and thin filaments*. *J. Mol. Biol.* 311, 1027-1036.
- CRICK F. H. C., 1953. *The packing of alpha helices, simple coiled coils*. *Acta Crystallogr.* 6, 689-697.
- EBASHI S., 1963. *Third component participating in the superprecipitation of „natural actomyosin“*. *Nature (London)* 200, 1010.
- EBASHI S., EBASHI F., KODAMA A., 1967. *Troponin as the Ca^{2+} -receptive protein in the contractile system*. *J. Biochem.* 62, 137-138.
- EBASHI S., ENDO M., 1968. *Calcium ion and muscle contraction*. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 18, 123-183.
- FLICKER P. F., PHILLIPS G. J., COHEN C., 1982. *Troponin and its interactions with tropomyosin. An electron microscope study*. *J. Mol. Biol.* 162, 495-501.
- GAGNE S. M., LI M. X., SYKES B. D., 1997. *Mechanism of direct coupling between binding and induced structural change in regulatory calcium binding proteins*. *Biochemistry* 36, 4386-4392.
- GEEVES M. A., HOLMES K. C., 1999. *Structural mechanism of muscle contraction*. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 687-728.
- GEEVES M. A., LEHRER S. S., 1994. *Dynamics of the muscle thin filament regulatory switch — the size of the cooperative unit*. *Biophys. J.* 67, 273-282.
- GORDON A. M., HOMSHER E., REGNIER M., 2000. *Regulation of contraction in striated muscle*. *Physiol. Rev.* 80, 853-924.
- GORDON A. M., REGNIER M., HOMSHER E., 2001. *Skeletal and cardiac muscle contractile activation, tropomyosin "rocks and rolls"*. *News Physiol. Sci.* 16, 49-55.
- GRABAREK Z., 2001. *Structure of calmodulin in the transition state*. *Biophys. J.* 80, 92a.
- GRABAREK Z., GERGELY J., 1987. *Location of the TnI binding site in the primary structure of actin*. *Acta Biochim. et Biophys. Hung.* 22, 307-316.
- GRABAREK Z., TAO T., GERGELY J., 1992. *Molecular mechanism of troponin-C function*. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 13, 383-393.
- GREASER M. L., GERGELY J., 1971. *Reconstitution of troponin activity from three protein components*. *J. Biol. Chem.* 246, 4226-4233.
- GREASER M. L., GERGELY J., 1973. *Purification and properties of the components from troponin*. *J. Biol. Chem.* 248, 2125-2133.
- HEILBRUNN L. V., WIERCINSKI F. J., 1947. *The action of various cations on muscle protoplasm*. *J. Cell. Comp. Physiol.* 29, 15-32.
- HERZBERG O., JAMES M. N., 1988. *Refined crystal structure of troponin C from turkey skeletal muscle at 2.0 Å resolution*. *J. Mol. Biol.* 203, 761-779.
- HERZBERG O., MOULT J., JAMES M. N., 1986. *A model for the Ca^{2+} -induced conformational transition of troponin C. A trigger for muscle contraction*. *J. Biol. Chem.* 261, 2638-2644.
- HITCHCOCK S. E., LUTTER L. C., 1975. *Study of troponin with cleavable protein crosslinkers*. *FEBS Lett.* 57, 172-174.
- HITCHCOCK-DEGREGORI S. E., SONG Y., MORACZEWSKA J., 2001. *Importance of internal regions and the overall length of tropomyosin for actin binding and regulatory function*. *Biochemistry* 40, 2104-2112.
- HOLMES K. C., POPP D., GEBHARD W., KABSCH W., 1990. *Atomic model of the actin filament*. *Nature* 347, 44-49.
- HORWITZ J., BULLARD B., MERCOLA D., 1979. *Interaction of troponin subunits. The interaction between the inhibitory and tropomyosin-binding subunits*. *J. Biol. Chem.* 254, 350-355.
- HOUDUSSE A., LOVE M. L., DOMINGUEZ R., GRABAREK Z., COHEN C., 1997. *Structures of four Ca^{2+} -bound troponin C at 2.0 Å resolution, further insights into the Ca^{2+} -switch in the calmodulin superfamily*. *Structure* 5, 1695-1711.
- KABSCH W., MANNHERZ H. G., SUCK D., PAI E. F., HOLMES K. C., 1990. *Atomic structure of the actin: DNase I complex*. *Nature* 347, 37-44.

- KENTISH J. C., McCLOSKEY D. T., LAYLAND J., PALMER S., LEIDEN J. M., MARTIN A. F., SOLARO R. J., 2001. Phosphorylation of troponin I by protein kinase A accelerates relaxation and crossbridge cycle kinetics in mouse ventricular muscle. *Circ. Res.* 88, 1059–1065.
- KRETSINGER R. H., NOCKOLDS C. E., 1973. Carp muscle calcium binding protein. II. Structure determination and general description. *J. Biol. Chem.* 248, 3313–3326.
- LEHRER S. S., 1994. The regulatory switch of the muscle thin filament, Ca^{2+} or myosin heads? *J. Muscle Res. Cell Motil.* 15, 232–236.
- LEVINE B. A., MOIR A. J., PERRY S. V., 1988. The interaction of troponin-I with the N-terminal region of actin. *Eur. J. Biochem.* 172, 389–397.
- LI M. X., GAGNE S. M., SPYRACOPOULOS L., KLOKS C., AUDETTE G., CHANDRA M., SOLARO R. J., SMILLIE L. B., SYKES B. D., 1997. NMR studies of Ca^{2+} binding to the regulatory domains of cardiac and E41A skeletal muscle troponin C reveal the importance of site I to energetics of the induced structural changes. *Biochemistry* 36, 12519–12525.
- LI M. X., SPYRACOPOULOS L., SYKES B. D., 1999. Binding of cardiac troponin-I147-163 induces a structural opening in human cardiac troponin-C. *Biochemistry* 38, 8289–8298.
- LI Y., LOVE M. L., PUTKEY J. A., COHEN C., 2000. Bepridil opens the regulatory N-terminal lobe of cardiac troponin C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 5140–5145.
- LUO Y., WU J. L., LI B., LANGSETMO K., GERGELY J., TAO T., 2000. Photocrosslinking of benzophenone-labeled single cysteine troponin I mutants to other thin filament proteins. *J. Mol. Biol.* 296, 899–910.
- MAYTUM R., LEHRER S. S., GEEVES M. A., 1999. Cooperativity and switching within the three-state model of muscle regulation. *Biochemistry* 38, 1102–1110.
- McKAY R. T., TRIPET B. P., PEARLSTONE J. R., SMILLIE L. B., SYKES B. D., 1999. Defining the region of troponin-I that binds to troponin-C. *Biochemistry* 38, 5478–5489.
- McKILLOP D. F. A., GEEVES M. A., 1993. Regulation of the interaction between actin and myosin subfragment-1 — evidence for 3 states of the thin filament. *Biophys. J.* 65, 693–701.
- McLACHLAN A. D., STEWART M., 1976. The 14-fold periodicity in alpha tropomyosin and the interaction with actin. *J. Mol. Biol.* 103, 271–298.
- MORACZEWSKA J., NICHOLSON-FLYNN K., HITCHCOCK-DeGREGORI S. E., 1999. The ends of tropomyosin are major determinants of actin affinity and myosin subfragment 1-induced binding to F-actin in the open state. *Biochemistry* 38, 15885–15892.
- NAGANO K., MIYAMOTO S., MATSUMURA M., OHTSUKI T., 1980. Possible formation of a triple-stranded coiled-coil region in tropomyosin-troponin T binding complex. *J. Mol. Biol.* 141, 217–222.
- NAGANO K., MIYAMOTO S., MATSUMURA M., OHTSUKI I., 1982. Prediction of a triple-stranded coiled-coil region in tropomyosin-troponin T complex. *J. Theor. Biol.* 94, 743–782.
- NAKAYAMA S., KRETSINGER R. H., 1994. Evolution of the EF-hand family of proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 23, 473–507.
- NGAI S. M., HODGES R. S., 1992. Biologically important interactions between synthetic peptides of the N-terminal region of troponin I and troponin C. *J. Biol. Chem.* 267, 15715–15720.
- NGAI S. M., HODGES R. S., 2001. Characterization of the biologically important interaction between troponin C and the N-terminal region of troponin I. *J. Cell Biochem.* 83, 99–110.
- O'SHEA E. K., KLEMM J. D., KIM P. S., ALBER T., 1991. X-ray structure of the GCN4 leucine zipper, a two-stranded, parallel coiled coil. *Science* 254, 539–544.
- OHTSUKI I., ONOYAMA Y., SHIRAISHI F., 1988. Electron microscopic study of troponin. *J. Biochem.* 103, 913–919.
- OTTERBEIN L. R., GRACEFFA P., DOMINGUEZ R., 2001. The crystal structure of uncomplexed actin in the ADP state. *Science* 293, 708–711.
- PARRY D. A., SQUIRE J. M., 1973. Structural role of tropomyosin in muscle regulation, analysis of the X-ray diffraction patterns from relaxed and contracting muscles. *J. Mol. Biol.* 75, 33–55.
- PERRY S. V., 1998. Troponin T, genetics, properties and function. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 19, 575–602.
- PERRY S. V., 1999. Troponin I, inhibitor or facilitator. *Mol. Cell. Biochem.* 190, 9–32.
- PERRY S. V., 2001. Vertebrate tropomyosin, distribution, properties and function. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 22, 5–49.
- PHILLIPS G. N. J., FILLERS J. P., COHEN C., 1986. Tropomyosin crystal structure and muscle regulation. *J. Mol. Biol.* 192, 111–131.
- POTTER J. D., GERGEY J., 1975. The calcium and magnesium binding sites on troponin and their role in the regulation of myofibrillar adenine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* 250, 4628–4633.
- REIFFERT S. U., JAQUET K., HEILMEYER L. M. G., RITCHIE M. D., GEEVES M. A., 1996. Bisphosphorylation of cardiac troponin I modulates the Ca^{2+} -dependent binding of myosin subfragment S1 to reconstituted thin filaments. *FEBS Lett.* 384, 43–47.
- REIFFERT S., MAYTUM R., GEEVES M., LOHMANN K., GREIS T., BLÜGGELM., MEYER H. E., HEILMEYER L. M. G., JAQUET K., 1999. Characterization of the cardiac holotroponin complex reconstituted from native cardiac troponin T and recombinant I and C. *Eur. J. Biochem.* 261, 40–47.
- ROBERTSON S. P., JOHNSON J. D., POTTER J. D., 1981. The time-course of Ca^{2+} exchange with calmodulin, troponin, parvalbumin, and myosin in response to transient increases in Ca^{2+} . *Biophys. J.* 34, 559–569.
- SIA S. K., LI M. X., SPYRACOPOULOS L., GAGNE S. M., LIU W., PUTKEY J. A., SYKES B. D., 1997. Structure of cardiac muscle troponin C unexpectedly reveals a closed regulatory domain. *J. Biol. Chem.* 272, 18216–18221.
- STEFANCIK R., JHA P. K., SARKAR S., 1998. Identification and mutagenesis of a highly conserved domain in troponin T responsible for troponin I binding, Potential role for coiled coil interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 957–962.
- STRAUB B. F., 1942. Actin. [W:] *Studies from the Institute of Medical Chemistry University of Szeged*. SZENT GYÖRGYI A. (red.), S. Karger, Basel, New York, 2, 3–15.
- SYSKA H., WILKINSON J. M., GRAND R. J., PERRY S. V., 1976. The relationship between biological activity and primary structure of troponin I from white skeletal muscle of the rabbit. *Biochem. J.* 153, 375–387.
- TOBACMAN L. S., 1996. Thin filament-mediated regulation of cardiac contraction. *Annu. Rev. Physiol.* 58, 447–481.
- TOBACMAN L. S., BUTTERS C. A., 2000. A new model of cooperative myosin-thin filament binding. *J. Biol. Chem.* 275, 27587–27593.
- TRIPET B., VAN EYK J. E., HODGES R. S., 1997. Mapping of a second actin tropomyosin and a second troponin C binding site within the C terminus of troponin I, and their importance in the Ca^{2+} -dependent regulation of muscle contraction. *J. Mol. Biol.* 271, 728–750.
- VAN EYK J. E., THOMAS L. T., TRIPET B., WIESNER R. J., PEARLSTONE J. R., FARAH C. S., REINACH F. C., HODGES R. S., 1997. Distinct regions of troponin I regulate Ca^{2+} -dependent activation and Ca^{2+} sensitivity of the acto-S1-TM ATPase activity of the thin filament. *J. Biol. Chem.* 272, 10529–10537.
- VASSILYEV D. G., TAKEDA S., WAKATSUKI S., MAEDA K., MAEDA Y., 1998. Crystal structure of troponin C in complex with

- troponin I fragment at 2.3-Å resolution*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 4847-4852.
- VIBERT P., CRAIG R., LEHMAN W., 1997. *Steric-model for activation of muscle thin filaments*. J. Mol. Biol. 266, 8-14.
- WHITBY F. G., PHILLIPS G. N. Jr., 2000. *Crystal structure of tropomyosin at 7 Angstroms resolution*. Proteins 38, 49-59.
- XU C., CRAIG R., TOBACMAN L. S., HOROWITZ R., LEHMAN W., 1999. *Tropomyosin positions in regulated thin filaments revealed by cryoelectron microscopy*. Biophys. J. 77, 985-992.