ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ՀԱՆԴԵՍ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ АРМЕНИИ

XXXI, 7, 1978

УДК 577.3:591.473:547.962

# ОБ ОСОБЕННОСТЯХ ОРГАНИЗАЦИИ ТРОПОНИН-ТРОПОМИОЗИНОВОГО КОМПЛЕКСА

В. М. АСЛАНЯН, Н. М. ГЕВОРКЯН, М. А. САРКИСЯН

Исследовано влияние температуры, мочевины и ионной силы раствора на стабильность тропонин-тропомиозинового комплекса и его компонентов. Обнаружено существенное повышение резистентности комплекса по сравнению с чистым тропомиозином к действию 1 М мочевины. Делаются некоторые предположения относительно характера взаимодействия тропомиозина с тропонином.

Известно, что процесс мышечного сокращения сопровождается конформационными перестройками в тропонин-тропомиозиновом комплексе (ТН—ТМ), стимулируемыми связыванием тропонином ионов кальция. Однако ряд вопросов, имеющих существенное значение для понимания молекулярных основ обсуждаемого процесса, остается по сей день невыясненным, например, механизм передачи действия этих ионов от места связывания на весь комплекс; факторы, способные влиять на характер взаимодействий, осуществляемых в системе ТН—ТМ; физическое воздействие тех или иных агентов, вызывающих перераспределение сил, стабилизирующих данный комплекс.

Для выяснения механизма работы комплекса ТН—ТМ необходимо исследовать его физическую организацию, т. е. его пространственную структуру, с одной стороны, и взаимодействия, которые приводят непосредственно к образованию комплекса и стабилизируют его—с другой. Изменение конформации должно быть связано с изменением баланса этих взаимодействий. А попытка выявления характера сил, участвующих в формировании функционально важного комплекса ТН—ТМ, является закономерным шагом на пути выяснения механизмов работы всей мышцы как целого и возможностей направленного воздействия на нее.

*Материал и методика.* Сократительные белки выделялись из переходных скелетных мышц кролика. Тропонин выделялся согласно методике Грина и Гергели [1], а тропомиозин—Драбиковского и Гергели [2], после чего оба белка подвергались лиофильной сушке. Методом кругового оптического дихроизма (КД) исследовалось влияние температуры, мочевины и ионной силы на стабильность комплекса, его компонентов и на характер взаимодействий, реализуемых в этой белковой системе.

*Результаты и обсуждение.* В предыдущей работе [3] было показано наличие в структуре суперспирали тропомиозина крупных гидрофобных блоков, а также группировок, чувствительно обогащенных заря-

женными аминокислотными остатками. Подобная гетерогенность наблюдается и в структуре тропонина, глобулу которого можно представить в виде существенно стабилизированного гидрофобными взаимодействиями ядра, окруженного оболочкой с явным превалированием заряженных групп. О такой организации тропониновой глобулы свидетельствуют системы кривых, представленные на рис. 1 и 2. Они характеризуют изменение абсолютного эффекта $\Delta\varepsilon_{220}$ КД при длине 220 нм. Уменьшение этого эффекта под влиянием тех или иных дестабилизирующих агентов указывает на снижение степени регулярности макромолекулы, связанное со снижением содержания α-спиральности в белке. Так, на рис. 1 представлены кривые температурного плавления тропонина в присутствии различных концентраций нейтральных солей (в нашем случае KCl). Почти 3/4 всех структурированных участков

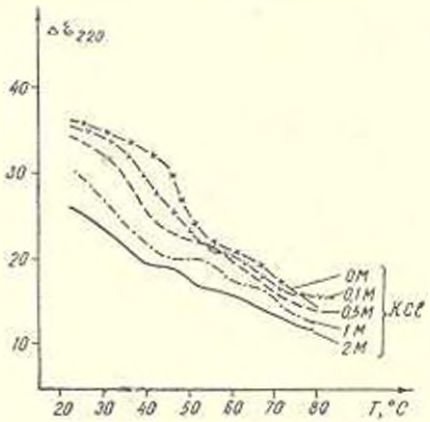



Рис. 1. Температурное изменение абсолютного эффекта КД в зависимости от концентрации KCl. $C_{1\%}$ =0.1 мг/мл, 50 мМ трис-HCl, pH 7,8, $10^{-4}$ М ЭГТА.

разрушается при температурах ниже 55°, а последняя четверть начинает плавиться только при температуре выше 60°. Первая ступень чрезвычайно чувствительна к возрастанию концентрации соли — уже 0,1 — 0,5М существенно дестабилизирует выплавляемые в этой области α-спиральные участки. При этом интересно, что высокотемпературная ступень во всей этой серии кривых оказывается практически неуязвимой, что выражается в постоянстве ее высоты. Эту особенность можно объяснить наличием в тропонине упомянутого выше гидрофобного ядра, содержащего ~25% α-спиральных участков. Таким образом, качественно независимо от концентрации соли в растворе (вплоть до 1М KCl) в первую очередь раскручиваются именно поверхностные α-спиральные участки, в стабилизации которых преобладающую роль играют электростатические взаимодействия.

Для дальнейшей проверки наших представлений было рассмотрено влияние второго агента — мочевины, являющейся, с одной стороны, антигидрофобным фактором, а с другой — фактором, понижающим ди-

электрическую проницаемость воды и тем самым несколько усиливающим электростатические взаимодействия. В конкуренции же за образование водородных связей с пептидной группой она незначительно отличается от воды, поэтому прямое действие на водородные связи, участвующие в стабилизации регулярной структуры белка, можно не рассматривать. При сравнении кривой температурного плавления свободного от мочевины раствора белка с раствором, содержащим ее в концентрации 0,5 М (рис. 2), бросаются в глаза четкое проявление

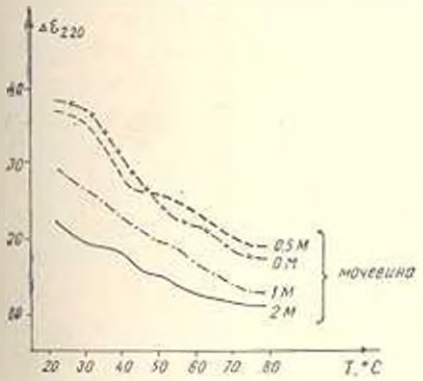



Рис. 2.

Рис. 3.

Рис. 2. Температурное изменение абсолютного эффекта КД в зависимости от концентрации мочевины. $C_{TH}$ — 0,1 мг/мл, 0,1 М KCl, 50 мМ трис-HCl, pH 7,8, $10^{-4}$ М ЭГТА

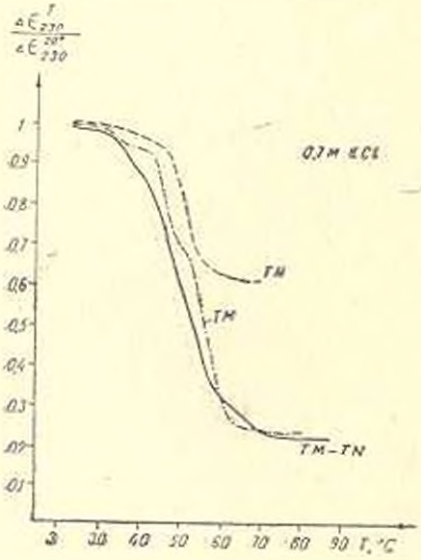
Рис. 3. Конформационные перестройки в тропонине при комнатной температуре в зависимости от содержания мочевины в растворе белка с 50 мМ трис-HCl, pH 7,45.

ступеней в последнем случае и явное смещение второй ступени вверх и влево. Это можно объяснить следующим образом. Наверняка α-спиральные участки на поверхности глобулы в определенной мере поддерживаются и гидрофобными взаимодействиями. Таким образом, на участках, расположенных вблизи поверхности глобулы, гидрофобный фактор ослаблен. И если этот эффект не компенсируется достаточным усилением электростатики, поддерживающей α-спиральную структуру, будет иметь место общая дестабилизация этих α-спиральных участков. Но те из них, на которых электростатическое притяжение превышает гидрофобный фактор, окажутся в присутствии мочевины стабилизированными. Им соответствует начальная часть кривой плавления чистого белка, которая в 0,5М мочевине смещается влево. Дальнейшее повышение содержания мочевины приводит к деструкции почти всех α-спиральных участков, соответствующих первой ступени кривой плавления в 0,5М мочевине. Кривая зависимости эффекта КД от температуры из ступенчатой превращается в размытую волнистую, что связано с потерей кооперативности, свидетельствующей о дестабилизации всей молекулы в целом. Интересно, что в присутствии 0,7М KCl даже в растворах с высокой концентрацией мочевины электростатические

взаимодействия достаточно сильны, чтобы при комнатной температуре стабилизировать компактную структуру глобулы. Так, существенное уменьшение степени спиральности белка при концентрациях мочевины до 3М сопровождается значительным уменьшением вязкости (рис. 3). Похоже, что такая, более компактная, но с пониженной степенью спиральности конформация более или менее стабильна в области от 2 до 4М мочевины. Дальнейшее повышение концентрации мочевины вызывает набухание тропонинновой глобулы, о чем свидетельствует рост вязкости более чем в два раза при переходе от 2 к 7М раствору мочевины.

Далее оказывается, что по-разному организованные участки молекул тропомиозина и тропонина, обладая различной стабильностью, претерпевают интересные и весьма существенные конформационные перестройки в процессе формирования белкового комплекса, и вопрос в том, как реализуются и коррелируют свойства обоих компонентов в этом процессе.

Обратимся к рис. 4. Здесь кривая плавления комплекса (в присутствии 0,7М KCl) расположена левее двух его компонентов. Во всяком случае, плавление комплекса начинается при заметно более низких тем-



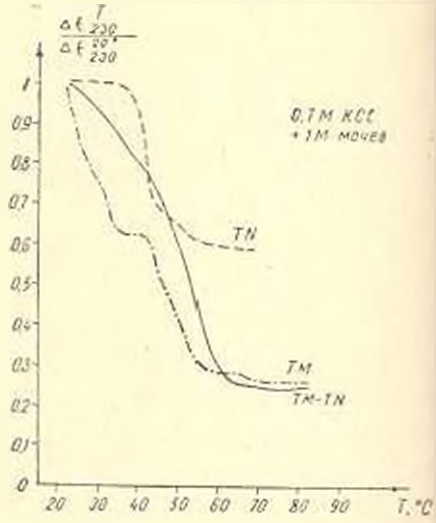




Рис. 4

Рис. 5.

Рис. 4. Температурное изменение относительного эффекта КД (0,7 М KCl, трис-HCl, pH 7,45, $10^{-4}$ М ЭГТА).

Рис. 5. Температурное изменение относительного эффекта КД (1 М мочевина, 0,7 М KCl, трис-HCl, pH 7,45, $10^{-4}$ М ЭГТА).

пературах, чем у тропомиозина. Температуры плавления комплекса, тропомиозина и тропонина равны соответственно 49, 53 и 50°. Далее, на рис. 5 представлены кривые температурного плавления комплекса ТН—ТМ в присутствии 1М мочевины. На фоне существенной чувствительности как тропомиозина, так и тропонина к мочевине поражает уди-

вительная инертность к ней комплекса. Об этом свидетельствует и температура плавления комплекса, которая не претерпевает изменений и остается равной 49°. Происходит лишь частичный сдвиг влево верхней части кривой плавления комплекса, что определяется дестабилизацией гидрофобных участков, но в значительно меньшей степени, чем у тропомиозина (с кривой плавления которого и имеет в основном смысл сравнивать ее, так как тропонин в степень спиральности комплекса вносит незначительный вклад).

Чем обусловлены столь существенные изменения в характере кривых плавления при переходе от комплекса к его компонентам? С уверенностью можно сказать, что образование комплекса сопровождается общей дестабилизацией тропомиозина, т. е. повышением его лабильности. Кроме того, оно связано со значительными конформационными изменениями, трансформирусмыми вдоль всей молекулы тропомиозина, а не носит локального характера, как можно было бы ожидать исходя из компактности молекулы тропонина. В пользу этого говорит также тот факт, что взаимодействие ТН—ТМ влечет за собой агрегацию тропомиозиновых молекул [4, 5] за счет образования связи между его электростатически липкими концами [6, 7], в то время как связывание тропонина с тропомиозином происходит на значительном расстоянии от конца тропомиозиновой палки [8, 9].

Почему же комплекс столь инертен к действию мочевины? Очевидно, в результате того, что присутствие 0.7М KCl по крайней мере дестабилизирует структуру глобулярной оболочки, гидрофобное ядро тропонина становится более доступным. Это и приводит к прямому взаимодействию его с одним или несколькими участками, насыщенными гидрофобными остатками, на молекуле тропомиозина. Логично предположить, что ядро тропонина взаимодействует с тем( или с теми) участком макромолекулы тропомиозина, который в отсутствие тропонина плавится уже при комнатной температуре в растворе 1М мочевины.

Итак, образование связи тропомиозина с тропонином сводится к взаимодействию гидрофобного ядра тропониновой глобулы с предполагаемым гидрофобным блоком на макромолекуле тропомиозина. В то же время раздвинутые в стороны от участка взаимодействия с тропомиозином электростатические аминокислотные остатки тропонина могут, с большой вероятностью, дополнительно укреплять эту связь за счет электростатического притяжения заряженных групп, расположенных на суперспирали тропомиозина. Это, по нашим представлениям, и приводит к суммарному эффекту, выражающемуся в повышении упорядоченности белкового комплекса.

Ереванский государственный университет.
кафедра молекулярной физики и биофизики

Поступило 30.V 1978 г.

## ՏՐՈՊՈՆԻՆ–ՏՐՈՊՈՄԻՈԶԻՆ ԿՈՄՊԼԵՔՍԻ ԿԱԶՄԱԿԵՐՊՄԱՆ ԱՌԱՆՁՆԱՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ՄԱՍԻՆ

Վ. Մ. ԱՍԼԱՆՅԱՆ, Ն. Մ. ԳԵՎՈՐԳՅԱՆ, Մ. Ա. ՍԱՐԳՍՅԱՆ

*Հետազոտված է ջերմաստիճանի, միզանյութի և լուծույթի իոնային ուժի ազդեցությունը տրոպոնին-տրոպոմիոզին կոմպլեքսի և նրա բաղադրիչների կայունացման վրա։ Հայտնաբերված է մեկ միզանյութի ազդեցության նկատմամբ կոմպլեքսի դիմադրելիության զգալի մեծացում, մաքուր տրոպոմիոզինի համեմատությամբ։ Դա հնարավորություն է տալիս որոշ ենթադրություններ անել տրոպոմիոզինի տրոպոնինի հետ փոխազդեցության բնույթի մասին։*

## ON THE FEATURES OF TROPONIN-TROPOMYOSIN COMPLEX ORGANIZATION

W. M. ASLANIAN, N. M. GEVORKIAN, M. A. SARKISSIAN

In the present paper stability of tropomyosin-troponin complex and its components as a function of temperature in the presence of urea and at different ionic strength has been investigated.

These studies show the rise of resistance of the complex, as compared to tropomyosin alone, to the action of 1 M urea.

The results obtained give a chance to make some suppositions about the nature of tropomyosin-troponin interaction.

### ЛИТЕРАТУРА

1. *Greaser M. L., Gergely J.* J. Biol. Chem., *248*, 6, 1973.
2. *Drabikowski W., Gergely J.* JBC, *237*, 4312, 1962.
3. *Асланян В. М., Геворкян Н. М., Туманян В. А.* Биофизика (в печати)
4. *Hitchcock S.* J. Mol. Biol., *81*, 409—413, 1973.
5. *Yamamoto K. et al.* J. Bioch., *73*, 1111—1114, 1972.
6. *Асланян В. М.* и др. Биофизические основы и регуляция мышечного сокращения. Мат-лы Всесоюзн. симп., Пущино, 1972.
7. *William D. et al.* J. Bioch., *47*, 1969.
8. *Ebashi S.* Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol., *37*, New York, 1973.
9. *Stewart M.* Proc Roy. Soc., *190*, 1099, 257—266, 1975.