Курс лекций по дисциплине «Структурные и функциональные особенности поперечно-полосатых и гладких мышц»

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН (ИТЭБ РАН)

Лекция № 11
Клеточные механизмы запуска мышечного сокращения. Механизмы электромеханического сопряжения в разных типах мышечных волокон.

Вопросы для мини-проверки

1. Назовите три типа нитей в саркомере поперечно-полосатых мышц.

2. Какой белок формирует третий тип нитей?

3. Напишите разные названия третьего типа нитей.

4. Какие функции выполняет титин/тайтин(коннектин)?

5. Каким методом был открыт титин?

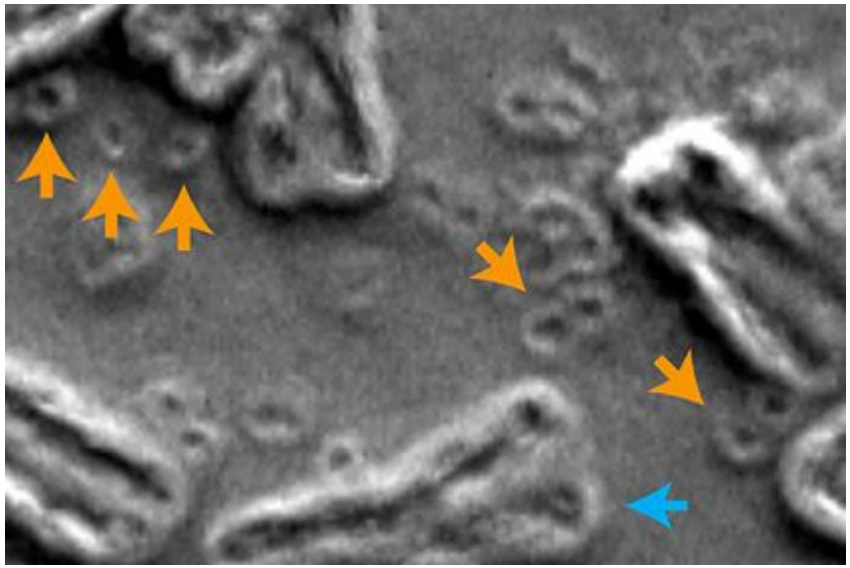
6. Каким образом в лаборатории структуры и функций мышечных белков показали, что титин связывается с актином?

Новости науки

Раскрыта причина непобедимости рака

Ученые Калифорнийского университета в Сан-Диего выяснили, что в опухолевых клетках в изобилии содержатся **кольцевые молекулы внехромосомной ДНК**, которые играют ключевую роль в способности рака сопротивляться лечению. Об этом сообщается в пресс-релизе на сайте MedicalXpress.

Оказалось, что кольцевая ДНК в раковых клетках характеризуется высокой активностью, что способствует синтезу факторов роста и других соединений, способствующих развитию опухолей. Эта форма ДНК напоминает ДНК у бактерий и обнаруживается в **50 процентах случаев рака.**



В 2014 году Пол Мишель (Paul Mischel) и его коллеги обнаружили, что ДНК играет центральную роль в лекарственной устойчивости некоторых опухолей головного мозга. При делении дефектной клетки дочерние клетки получают сразу несколько копий онкогенов, что обеспечивает более быструю эволюцию. Это отличается от обычного митоза, при котором происходит копирование только хромосом.

НОВЫЙ АППАРАТ ОТ **TOSHIBA** ПО КАПЛЕ КРОВИ ВЫЯВЛЯЕТ 13 ВИДОВ РАКА

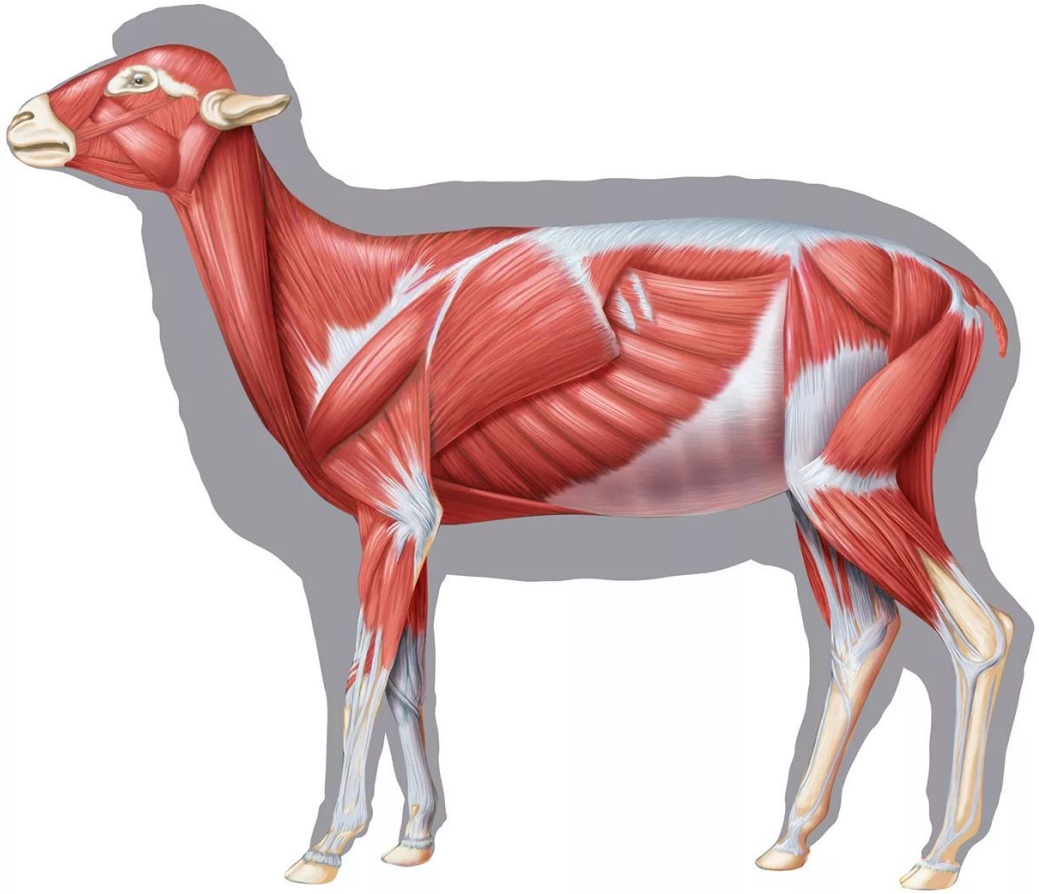
Эксперты из компании Toshiba создали устройство, которое может выявить 13 типов рака с точностью в 99%. И для этого потребуется всего-то одна капля крови.

Новейший тест способен выявить рак желудка, пищевода, легких, печени, поджелудочной железы, желчевыводящих путей, кишечника, яичников, простаты, мочевого пузыря, молочной железы, а также глиому (опухоль из нервных тканей, часто возникающую в головном мозге) и саркому (группа опухолей мягких тканей — жировой, мышечной и так далее).

Цена не превысит 20000 японских иен (**порядка 12 тысяч рублей)**, что для такого широкого спектра выявляемых болезней — просто смехотворная цена.

Сам метод основан на оценке **<u>типа и концентрации молекул микро-РНК раковых клеток</u>**, циркулирующих в периферической крови человека. Дело в том, что все раковые клетки очень часто имеют разную микро-РНК (это часть клетки, которая несет ряд информации о ее особенностях и функционировании). Так вот, данный структурный элемент не просто разнится от клетки к клетке, но и при каждом виде рака концентрация микро-РНК в крови своя.

Ну теперь к нашим баранам…



Три основных события, необходимых для реализации сокращения любой мышцы:

1. Деполяризация мышечной мембраны и генерация потенциала действия (ПД);

2. Повышение концентрации свободного ионизированного кальция в саркоплазме вблизи сократительных белков;

3. Кальций-зависимое взаимодействие белков актиномиозинового комплекса, приводящее к сокращению клетки.

Сложный каскад реакций от момента деполяризации мембраны до повышения уровня внутриклеточного кальция вблизи сократительных белков получил название **электромеханического сопряжения (ЭМС).**

Внутриклеточный метаболизм ионов кальция

Внутриклеточный кальций присутствует в мышечных клетках в основном в связанном состоянии, и только небольшая его часть находится в цитоплазме в свободном (ионизированном) состоянии.

Уровень кальция в клетке можно определить с помощью **ионоселективного микроэлектрода**.

Посчитаем!

Таблица 5. **Концентрация ионов Ca^{2+} в покоящихся мышечных клетках и волокнах**

Животные	Тип мышцы	Ca^{2+}, мкмоль/л
Ракообразные Balanus	Мышца-ретрактор	0,1
Лягушка Rana pipiens	M.semimembranosus	0,16
Хорек	Кардиомиоциты (желудочка сердца)	0,26
Овца	Кардиомиоциты (волокна Пуркинье)	0,3
Жаба Bufo marinus	Гладкая мышца желудка	0,14

Т.о., мышечные клетки и волокна в состоянии покоя имеют ~ одинаковый уровень ионов кальция в миоплазме = 0,1-0,3 микромоля/л, т.е. ~10 (в минус 7 степени) Моля.

Механизмы, поддерживающие низкий уровень кальция в покое (кстати, зачем?)

1. кальций-зависимая АТРаза мембраны клетки – кальциевый насос (10 в минус восьмой Моля, связывает ионы кальция при такой концентрации). Из миоплазмы – наружу.

2. кальций-зависимая АТРаза саркоплазматического ретикулума.

3. Натрий-кальциевый транспортер – выводит ионы кальция из клетки, но только при 10-кратном и более превышении их нормального уровня в миоплазме.
4. Кальций-связывающие белки цитоплазмы (напр., кальмодулин) играют роль внутриклеточных буферов кальция.

5. Митохондрии способны закачивать ионы кальция (до 0,6 на 10 в минус 3 степени Моля). Участвуют в закачке кальция при патологии или гипоксии.

Повышение уровня кальция при сокращении

В покое концентрация ионов кальция в миоплазме = ~ 5х10 (в минус 8) – 5х10 (в минус 7) М., а снаружи клетки – 5х10 (в минус 3) М.

Во сколько раз разница?

Откуда берется кальций?

Из цистерн саркоплазматического ретикулума (СР), а также из ядра и митохондрий (внутри клетки),

а также из наружной среды клетки по кальциевым каналам, по механочувствительным или стреч-каналам,

+ за счет инвертированной работы натрий-кальциевого транспортера.

У скелетных волокон и кардиомиоцитов главным источником прироста кальция, запускающего сокращение, является СР.

В СР есть кальций-связывающий белок – кальсеквестрин.
В мембране СР есть кальциевые каналы (кальций-высвобождающие каналы), получившие название рианодиновых рецепторов (РиР).

<u>Скелетное мышечное волокно – единственный тип мышечных элементов, который не нуждается в притоке кальция снаружи для развития сокращения</u>.

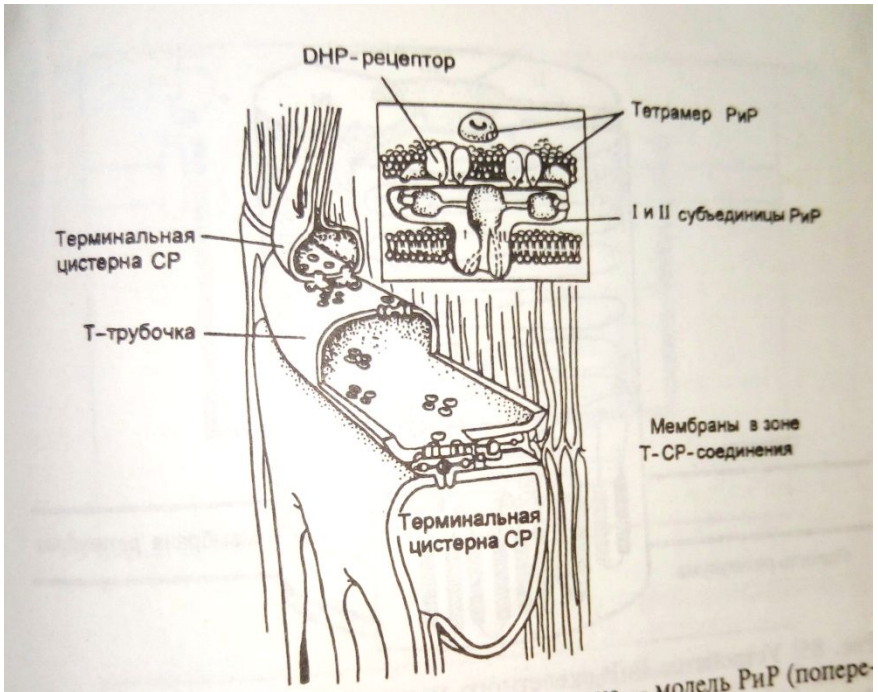


Рис. 84. Триада скелетного волокна. На врезке — модель РиР (поперечный разрез).

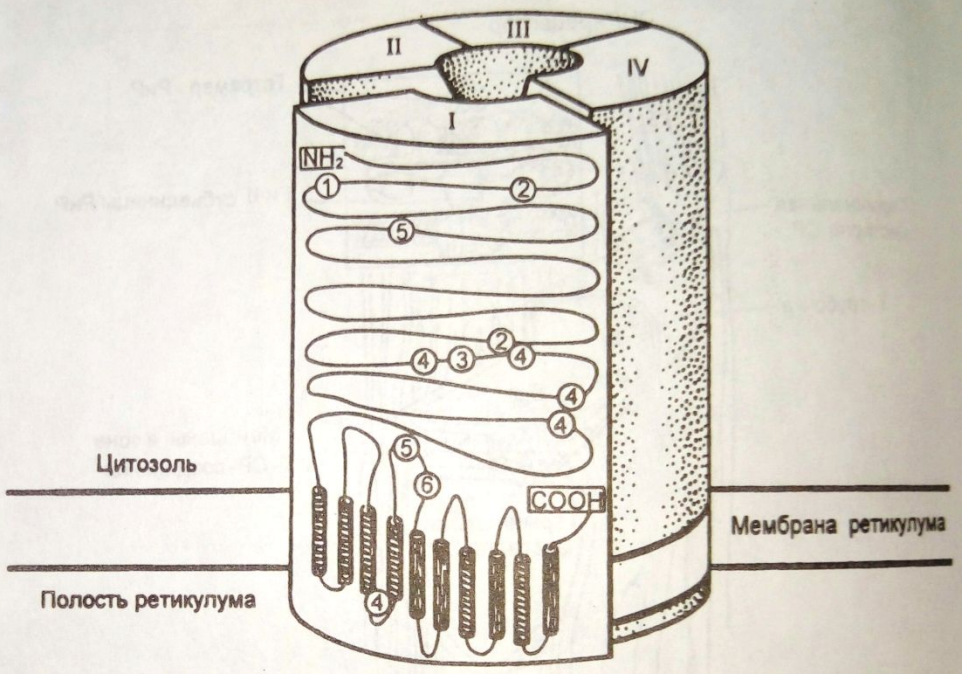
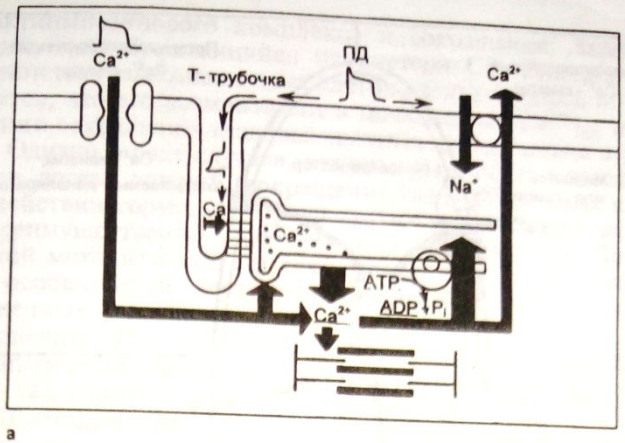


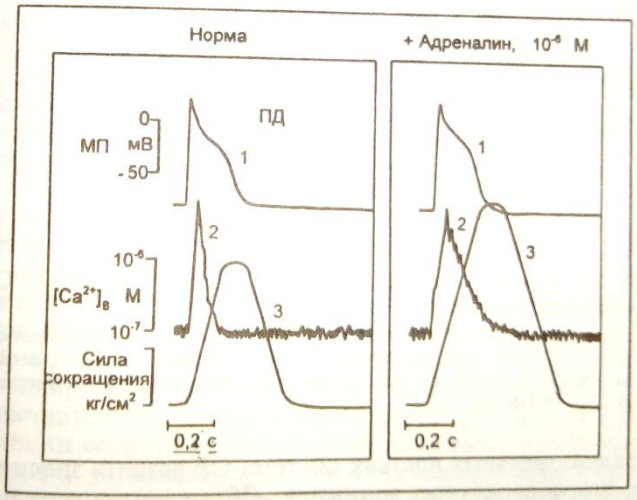
Рис. 85. Устройство РиР скелетного мышечного волокна млекопитающих.

Субъединицы I, II, III, IV РиР формируют тетрамерный комплекс. Показана цитоплазматическая часть молекулы (ножка) и 10 трансмембранных фрагментов: 1, 2 — участки возможных мутационных изменений молекулы, приводящие к мышечным патологиям; 3 — участки фосфорилирования; 4 — участки связывания кальмодулина; 5 — участки связывания нуклеотидов; 6 — участки связывания ионов Ca^{2+}.

Открывание кальциевого канала в составе молекулы рианодинового рецептора происходит при действии на РиР <u>ионов кальция</u> (в микромолярных концентрациях) и <u>АТФ</u> (в миллимолярных концентрациях).



а



б

Рис. 86. Механизм сокращения кардиомиоцита.
а — схема механизмов, ответственных за повышение уровня ионов Ca^{2+}. Показаны вход ионов Ca^{2+} через потенциалактивируемые Ca^{2+}-каналы и активируемый выброс кальция из СР; б — временной ход последовательно развивающихся процессов: генерации ПД (1) повышения уровня цитоплазматического кальция (2) и сокращения сердечной клетки (3). При действии адреналина увеличивается фаза плато ПД (отражающая вход кальция в клетку), что значительно усиливает амплитуду сокращения кардиомиоцита.

В кардиомиоцитах акт сокращения также запускается за счет высвобождения кальция из цистерн СР.

Но!

Важным источником повышения уровня кальция в миоплазме кардиомиоцитов является его регулярное поступление снаружи внутрь клетки по потенциалзависимым кальциевым каналам.

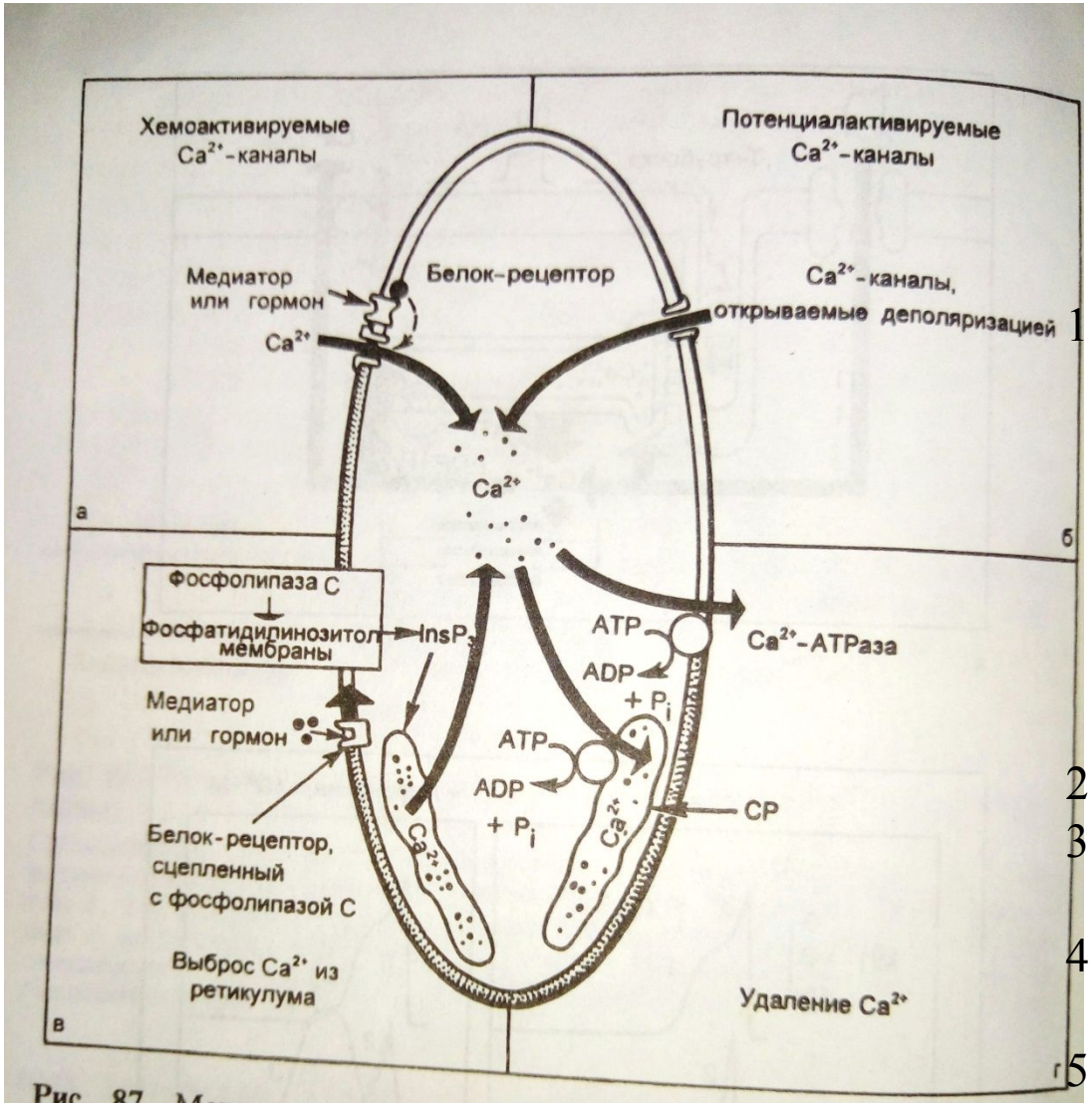


Рис. 87. Механизмы, способные повышать уровень ионов Ca^{2+} в гладкомышечной клетке.

а — поступление ионов Ca^{2+} по хемоактивируемым каналам; б — поступление ионов Ca^{2+} по потенциалактивируемым Ca^{2+}-каналам; в — $InsP_3$-зависимый выброс ионов Ca^{2+} из СР; г — механизмы удаления кальция из миоплазмы с помощью Ca^{2+}-АТФазы.

В гладких мышечных клетках СР развит слабо.

Пути повышения концентрации кальция в миоплазме:

1. Поступление в клетку снаружи по кальциевым каналам мембраны клетки (хемоактивируемые и потенциалактивируемые) – активация кальмодулина – активация белков актинмиозинового комплекса – сокращение.
2. Кальций из СР.
3. Через механочувствительные каналы.
4. Инверсия натрий-кальциевого транспортера.
5. Через Инозитолтрифосфат-активируемые кальциевые каналы.

Особенности генерации потенциала действия (ПД) в разных типах мышечных клеток

В скелетных мышечных волокнах позвоночных восходящая фаза ПД обусловлена входящим натриевым током за счет открывания **потенциалактивируемых натриевых каналов**.

Вторя – нисходящая фаза ПД , вызвана выходящим калиевым током по **потенциалактивируемым калиевым каналам.**

Длительность ПД в скелетных мышцах = 4-6 мс.

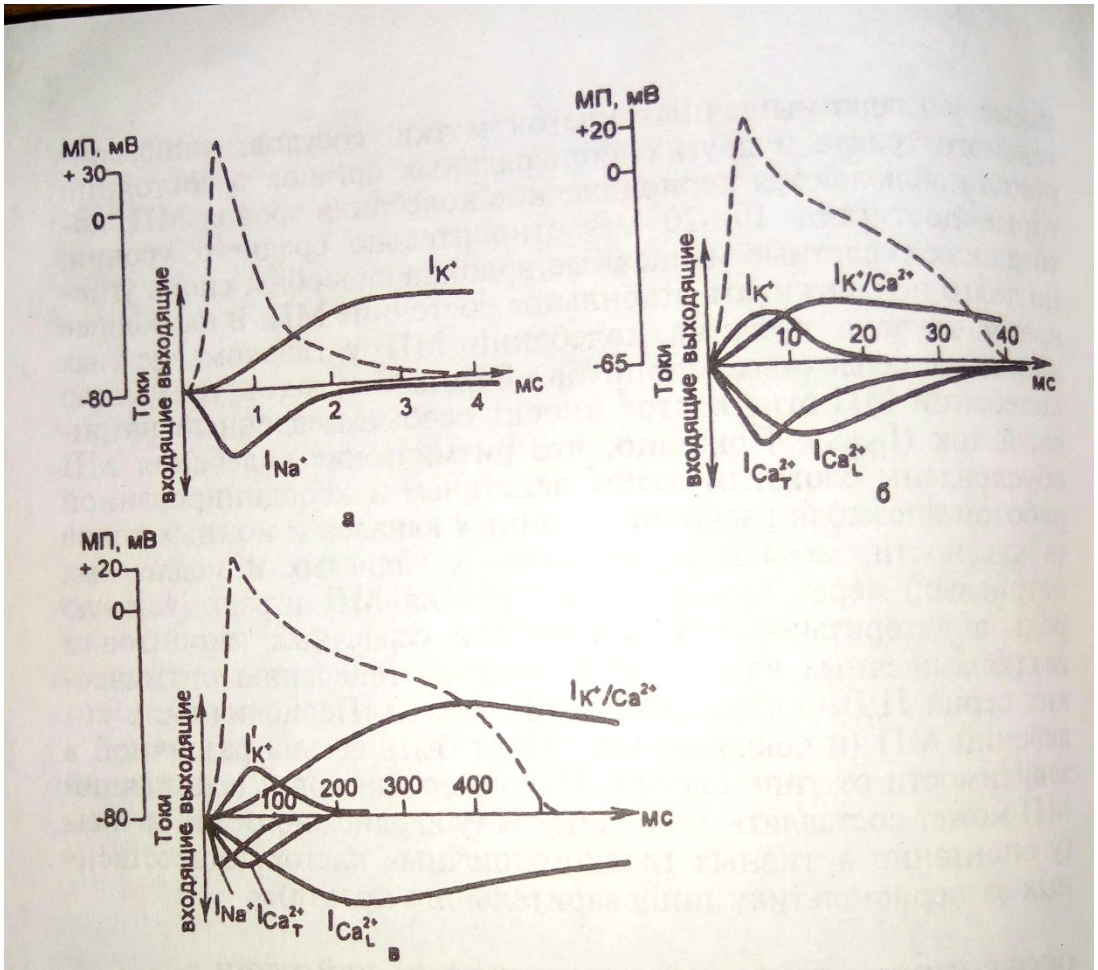


Рис. 88. Токи, участвующие в генерации ПД в скелетном волокне (а), гладкомышечной клетке (б) и кардиомиоците (в).

Сплошными линиями указан временной ход ионных токов, пунктирной – временной ход ПД и сдвиг МП мышечных клеток; I_{Na^+} — натриевый ток; I_{K^+} — калиевый ток задержанного выпрямления; $I_{Ca^{2+}_T}$ — быстрый кальциевый ток (Т-ток); $I_{Ca^{2+}_L}$ — медленный кальциевый ток (L-ток); $I^f_{K^+}$ — быстрый калиевый ток; $I_{K^+/Ca^{2+}}$ — Ca^{2+}-активируемый калиевый ток. Обратить внимание на различия в шкалах времени.

В сердечных миоцитах восходящая фаза ПД обусловлена входящим <u>натриевым током</u> и!!! <u>кальциевым током</u>! Имеется фаза «плато ПД». В этой фазе сохраняется долго кальциевый ток (long lasting – долго длящийся) – L-ток. Длительность ПД = 300-400 мс.

Реполяризация мембраны сердечной клетки связана с закрытием кальциевых каналов L-типа и доминированием выходящего калиевого тока по особым **<u>кальций-активируемым калиевым каналам</u>**!

У гладкомышечных клеток, как и у кардиомиоцитов, ПД имеет три фазы: деполяризацию, плато и реполяризацию.

Длительность ПД – 10-100 мс.
I фаза ПД в гладкомышечных клетках обусловлена быстрым входящим **кальциевым током Т-типа**, а фаза плато – кальциевым током L-типа. (<u>но не натриевым током</u>!!!!)

<u>Реполяризация:</u> закрытие кальциевых и открытие калиевых каналов, в том числе кальций-активируемых и калиевых каналов задержанного выпрямления!

Особенности ЭМС в разных мышцах (обобщение и дополнение)

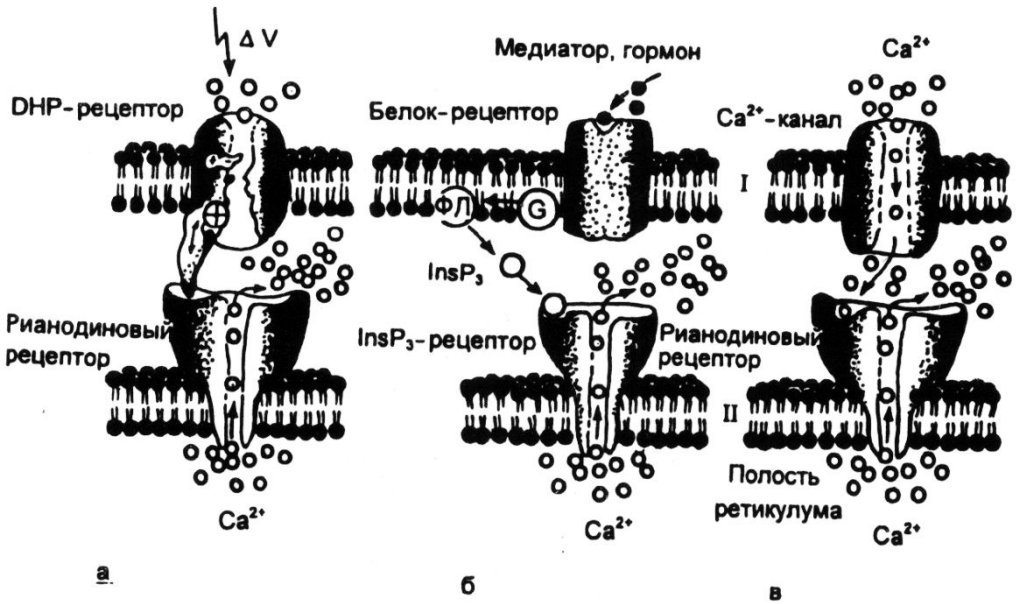
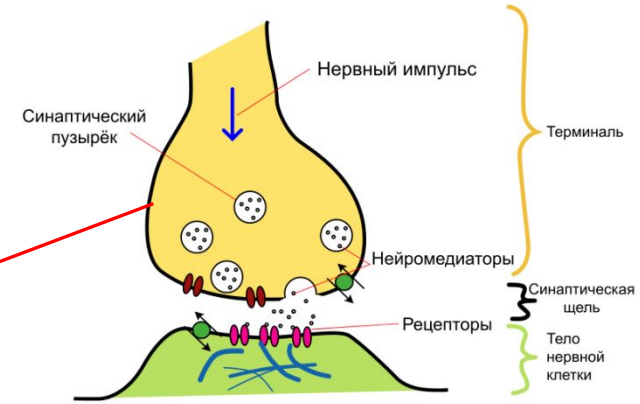


Рис. 91. Механизмы ЭМС и фармакомеханическое сопряжение.
а — "электромеханическая" модель, характерная для ЭМС скелетных мышечных волокон. Деполяризация мембраны Т-трубочки (Δ V) приводит к конформации в молекуле DHP-рецептора, что передается (электростатически или механически) на молекулу РиР и вызывает открывание Ca^{2+}-канала РиР и выход ионов Ca^{2+} из полости СР; б — $InsP_3$-зависимый механизм фармакомеханического сопряжения, характерный для гладкомышечных клеток. Действие медиатора или гормона на соответствующий белок-рецептор мышечной мембраны приводит к активации внутримембранных G-белков и фосфолипазы (ФЛ) с образованием посредников $InsP_3$. $InsP_3$, действуя на $InsP_3$-рецептор, вызывает высвобождение ионов Ca^{2+} из ретикулума; в — механизм Ca^{2+}-зависимого выброса ионов Ca^{2+} из цистерн СР для сердечных миоцитов и гладкомышечных клеток; I — наружные мембраны мышечных клеток и волокон; II — мембраны СР.



1 – потенциалзависимый выброс кальция в скелетных мышцах

2. CICR-кальцийзависимый выброс кальция в сердечной мышце

3. InsP3-зависимый механизм фармакомеханического сопряжения в гладких мышцах.
Но может быть и CICR-механизм, поскольку находят в гладких мышцах и рианодиновые рецепоры.

Фармако-механическое сопряжение в гладких мышцах

ионов Ca^{2+} из внутриклеточных депо, инициирующих сокращения. Гормон или медиатор, действуя на специфические мембранные рецепторы, вызывает конформационные перестройки в молекуле рецептора, способствующие активации периферического GTP-связывающего белка мембраны — G-белка. Активированные субъединицы G-белка в свою очередь могут переводить в активное состояние другой внутримембранный белок — фосфолипазу С. Фосфолипаза С — это фермент, способный при его активации расщеплять фосфоинозитиды мембраны с образованием двух продуктов — диацилглицерола и инозитолтрифосфата $InsP_3$. Образующийся $InsP_3$ высвобождается из состава мембраны, поступает в миоплазму и диффундирует к цистернам СР (рис. 91,б). На мембране СР гладкомышечных клеток имеются $InsP_3$-рецепторы. При воздействии $InsP_3$ на соответствующий высокоаффинный участок молекулы $InsP_3$-рецептора изменяется конформация этой молекулы. Это изменение сопровождается открыванием Ca^{2+}-канала, находящегося в составе молекулы $InsP_3$-рецептора, и выходом кальция из СР в миоплазму.

Как уже

Регуляция взаимодействия актина и миозина на уровне сократительного аппарата

Миозин - наномотор,
гидролиз АТФ в моторном домене и развитие усилия

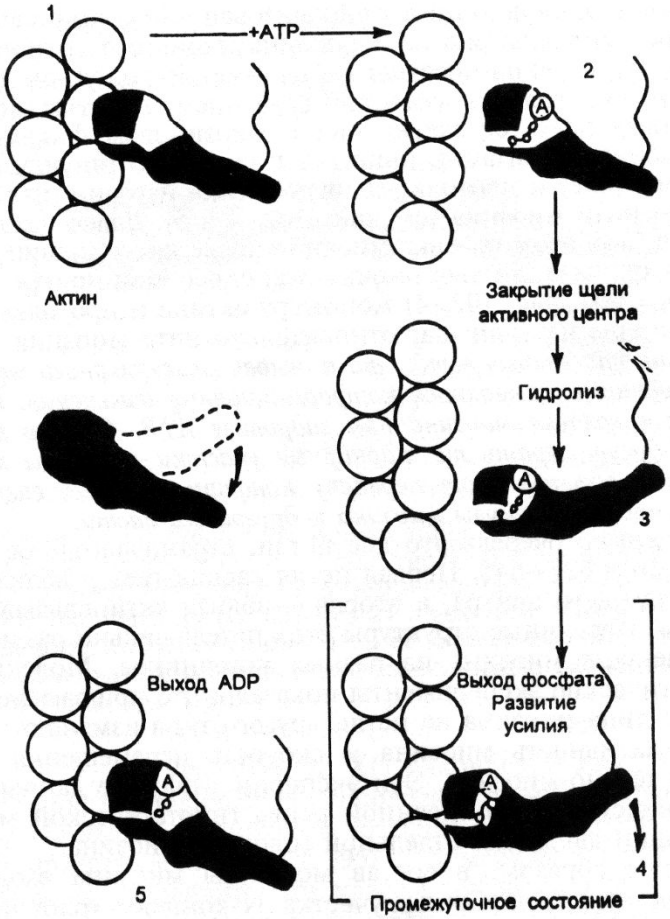
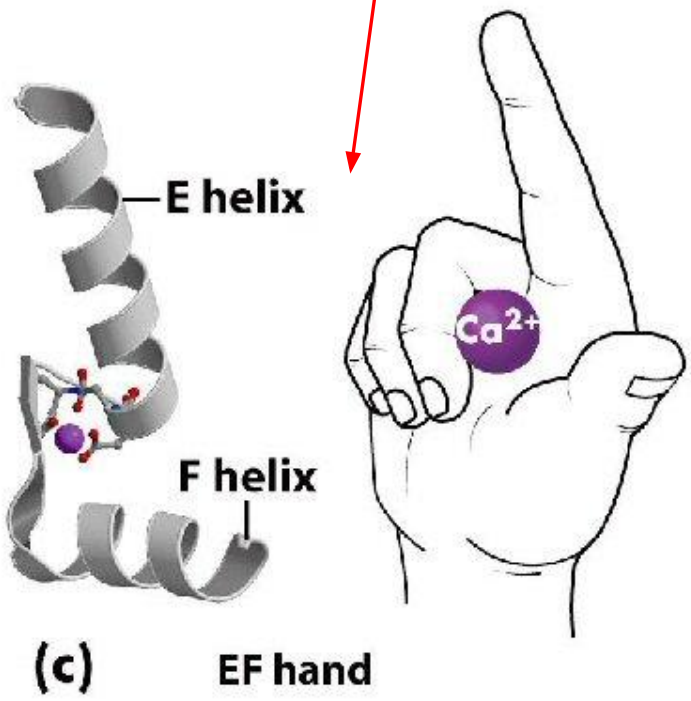


Рис. 102. Одиночный шаг головки миозина по нити актина с иллюстрацией конформационных изменений, происходящих в головке миозина при гидролизе АТР. Актин изображен в виде гирлянды шариков. В нижней части головки миозина видна щель, разделяющая две части актинсвязывающего центра. В верхней части молекулы миозина изображен нуклеотидсвязывающий центр. Аденозин обозначен А, а фосфаты — в виде маленьких кружочков [Rayment I. et al., 1993].

Кальций-связывающие белки (EF-hand) – обеспечивают инициацию сокращения в поперечно-полосатых и гладких мышцах



EF-hand-белки условно подразделяются на группы, члены которых содержат в своем составе 2, 3, 4 и 6 катион-связывающих центров.

Самые простые по строению кальций-связывающие белки содержат в своем составе только **2 EF-hand домена:**
S-100 (из мозга), кальтропин и кальгицарин (гладкие мышцы);
Функции: регуляция клеточного цикла, регуляция сократительной активности;

Самая обширная группа представлена белками, содержащими в своем составе 4 кальций-связывающих центра:
Кальмодулин, тропонин С, легкие цепи миозина,
а также кальпаины – кальций-зависимые протеазы, + кальцинейрин – Са-кальмодулинзависимая протеинфосфотаза;
+ парвальбумины (в быстросокращающихся быстрых мышцах у рыб), участвуют, по-видимому, в быстром удалении ионов кальция от сократительного аппарата.

К EF-hand-белкам относятся также:
альфа-актинин, дистрофин!

Группа белков, содержащая 6 и более центров связывания ионов кальция – кальретинин, кальбиндин (в кишечнике у птиц).

Вопрос?
А ионы магния могут связываться с EF-hand-белками?

Ионы магния имеют меньший радиус, чем ионы кальция. Вследствие этого они м**енее прочно связываются в катионсвязывающих центрах** и вызывают заметно меньшие конформационные изменения в общей структуре анализируемых белков.

EF-hand-белки участвуют в регуляции сократительной активности поперечно-полосатых и гладких мышц!

Эти белки связаны в мышце либо с миозином, либо с актином. Поэтому различают 2 типа регуляции мышечного сокращения: <u>миозиновый и актиновый</u>

1. **Самый простой тип миозиновой регуляции основан на <u>связывании ионов кальция в области шейки миозина</u> (кальций-связывающийся центр формируется при участии 2-х легких и одной тяжелой цепи миозина).**

При этом происходят конформационные изменения в актин- и АТФ-связывающих центрах головки миозина в результате чего миозин способен взаимодействовать с актином.
<u>Этот тип регуляции характерен для поперечно-полосатых мышц моллюсков</u>.

<u>2 Тип</u> миозиновой регуляции – конформационные изменения в области шейки головки формируются путем фосфорилирования регуляторных легких цепей миозина (ЛЦ2).
Фосфорилирование по Ser и Thr

Фосфорилирует <u>кальций-кальмодулинзависимая киназа легких цепей миозина.</u>
Дефосфорилируют легкие цепи – протеинфосфотазы 1 и 2А (их активность не зависит от концентрации ионов кальция).

Этот тип регуляции присущ гладким мышцам, немышечным клеткам, но и, как дополнительный (модулирующий) тип регуляции, характерен и для поперечно-полосатых мышц.

<u>Актиновый тип регуляции</u> - основной тип регуляции мышечного сокращения в поперечно-полосатых мышцах животных. В основе этого типа сокращения лежат конформационные изменения в тропонин-тропомиозиновом комплексе на тонких нитях.

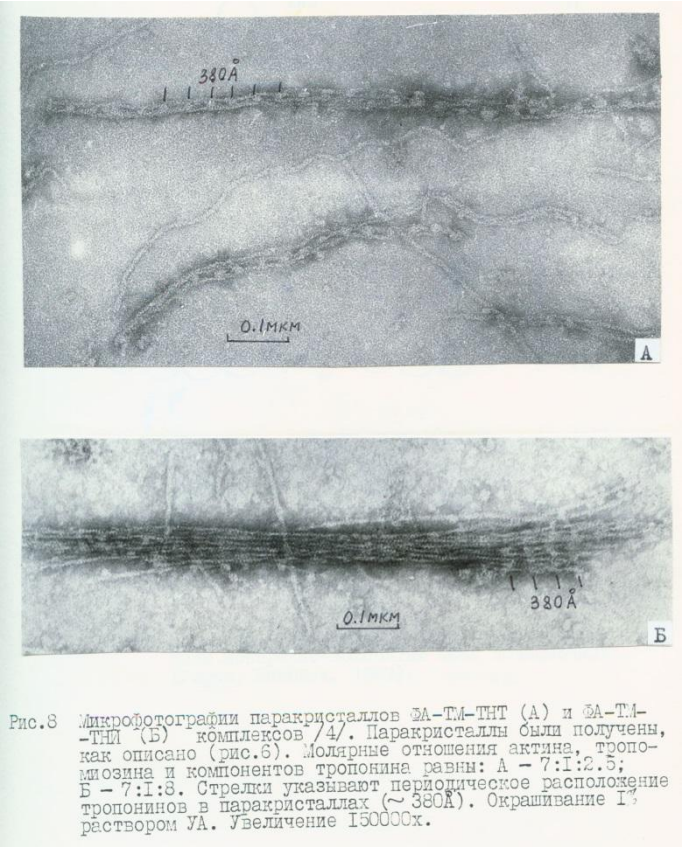


Рис.8 Микрофотографии паракристаллов ФА-ТМ-ТНТ (А) и ФА-ТМ-ТНИ (Б) комплексов /4/. Паракристаллы были получены, как описано (рис.6). Молярные отношения актина, тропомиозина и компонентов тропонина равны: А – 7:I:2.5; Б – 7:I:8. Стрелки указывают периодическое расположение тропонинов в паракристаллах (~ 380Å). Окрашивание I% раствором УА. Увеличение I50000х.

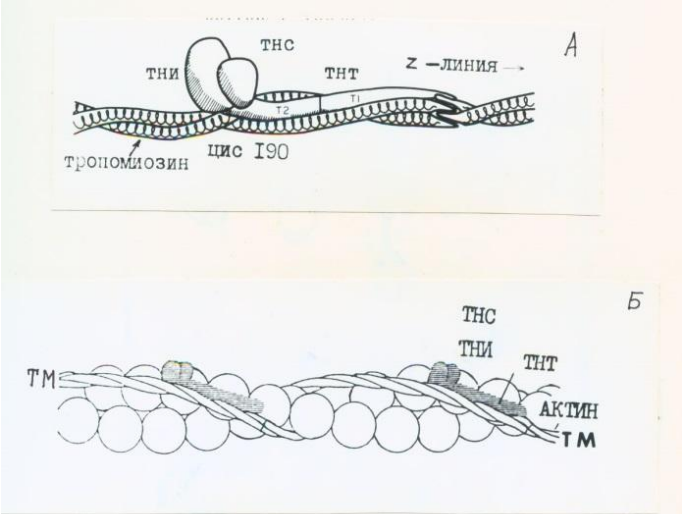
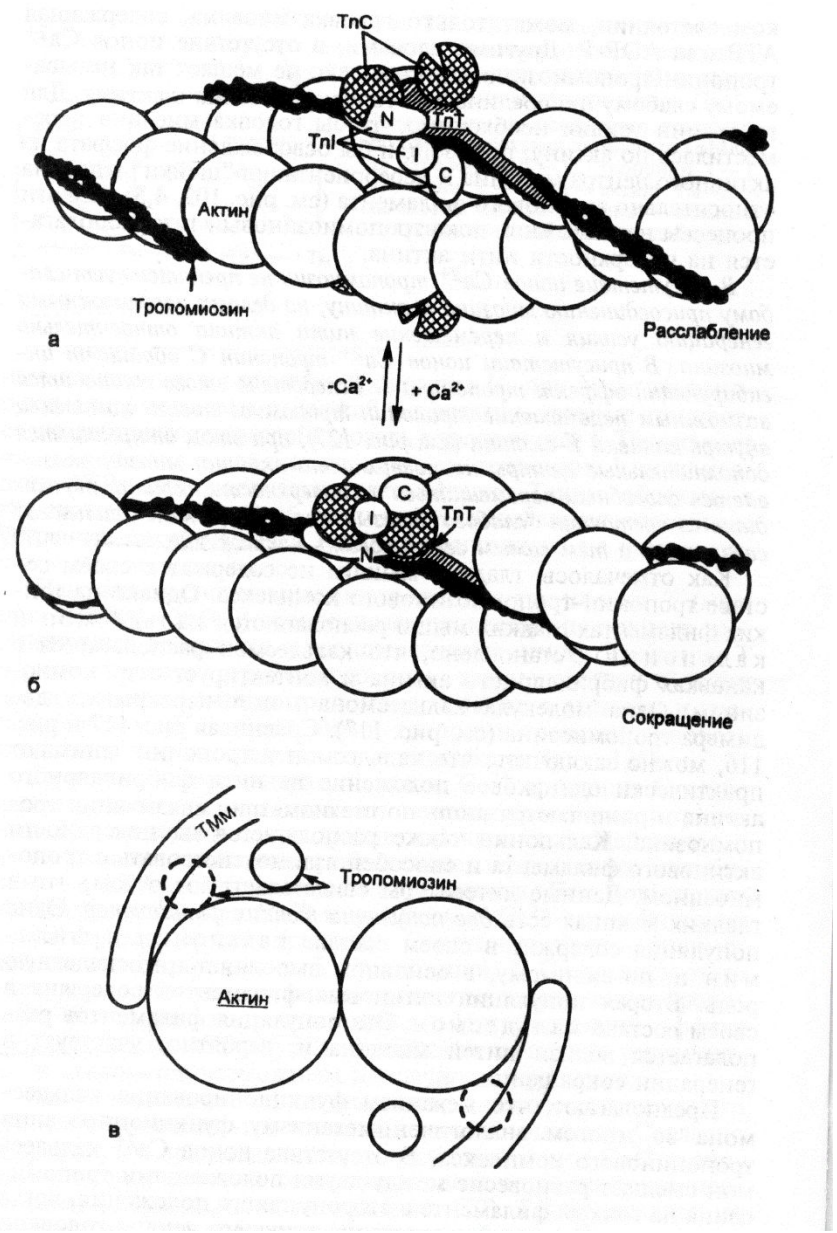


Рис.9 А – Схема расположения комплекса тропонина на тропомиозиновом тяже (ТМ). ТНИ – тропонин-И; ТНС – тропонин-С; ТНТ – тропонин-Т и его протеолитические фрагменты – T_2 и T_I. (Flicker et al., I982). С – концевая часть ТНТ (фрагмент T_2) связывается вблизи остатка цис-I90 тропомиозина. N -концевая часть ТНТ (фрагмент T_I) располагается вдоль С-концевой половины тропомиозина. Б – Схема строения тонкой нити поперечно-полосатых мышц позвоночных (Payne, Rudnick, 1989).

<u>Актиновый тип регуляции</u> - свойственен и для гладких мышц!

Только у них вместо тропонина – кальдесмон!

Механизм функционирования кальдесмона, предполагается, аналогичен механизму функционирования тропонинового комплекса в поперечно-полосатых мышцах.



Таким образом, регуляторные системы могут располагаться как на миозиновом, так и на актиновом филаментах. Миозиновый тип регуляции играет главную роль в мышцах моллюсков, а также в гладких мышцах высших животных и в ряде клеток, обладающих немышечной подвижностью. В поперечнополосатых мышцах миозиновый тип регуляции (фосфорилирование легких цепей миозина) может участвовать в тонкой подстройке (модуляции) сокращения.

Актиновый тип регуляции (тропонин-тропомиозиновый комплекс) является основным в инициации сокращения поперечнополосатых и сердечных мышц. В гладких мышцах актиновый тип регуляции играет вспомогательную роль и обеспечивает модуляцию взаимодействия миозина с актином.

Ca^{2+} с миозином. Этот тип регуляции характерен для мышц некоторых видов моллюсков. Миозин двустворчатого моллюска морского гребешка, как и миозин высших животных, представляет собой гексамер и состоит из 2 тяжелых и 4 легких цепей (см. рис. 94). В то же время АТРазная активность миозина гребешка активируется актином только в присутствии ионов Ca^{2+}, а АТРазная активность миозина кролика — независимо от концентрации ионов Ca^{2+} в окружающей среде. Если учесть, что АТРазная активность актомиозина в той или иной мере отражает процессы, протекающие в ходе сокращения мышц (см. рис. 102), то можно сделать вывод, что в

нет

Journal of Structural Biology **131**, 225–233 (2000)
doi:10.1006/jsbi.2000.4265, available online at http://www.idealibrary.com on IDEAL®

Truncation of Vertebrate Striated Muscle Myosin Light Chains Disturbs Calcium-Induced Structural Transitions in Synthetic Myosin Filaments

Z. A. Podlubnaya,*,[1] I. Kąkol,† A. Moczarska,† D. Stępkowski,† and S. Udaltsov*

*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS, Pushchino, Moscow Region, 142290, Russia; and †Nencki Institute of Experimental Biology PAS, 02-093 Warsaw, Poland

Received August 16, 1999, and in revised form March 16, 2000

Electron microscopy and negative staining techniques have been used to show that the proteolytic removal of 13 amino acids from the N-terminus of essential light chain 1 and 19 amino acids from the N-terminus of the regulatory light chain of rabbit skeletal and cardiac muscle myosins destroys Ca^{2+}-induced reversible movement of subfragment-2 (S2) with heads (S1) away from the backbone of synthetic myosin filaments observed for control assemblies of the myosin under near physiological conditions. This is the direct demonstration of the contribution of the S2 movement to the Ca^{2+}-sensitive structural behavior of rabbit cardiac and skeletal myosin filaments and of the necessity of intact light chains for this movement. In muscle, such a mobility might play an important role in proper functioning of the myosin filaments. The impairment of the Ca^{2+}-dependent structural behavior of S2 with S1 on the surface of the synthetic myosin filaments observed by us may be of direct relevance to some cardiomyopathies, which are accompanied by proteolytic breakdown or dissociation of myosin light chains. © 2000 Academic Press

Key Words: **skeletal and cardiac myosins; myosin heads; subfragment-2; truncated light chains; synthetic filaments; Ca^{2+}-induced transition; electron microscopy.**

INTRODUCTION

The contractile force developed by muscles is the result of the repetitive interaction of thick (myosin-containing) and thin (actin-containing) filaments coupled with ATP hydrolysis by myosin ATPase and regulated by Ca^{2+}. The molecule of myosin, the major protein of the thick filament, is composed of two heavy chains folded together in a coiled-coil tail at the C-terminus, and separately in two globular heads at the N-terminus, and of four light chains. Each head contains the heavy chain and an essential (ELC) and a regulatory (RLC) light chain. Vertebrate fast skeletal muscle myosins contain two isoforms of the essential light chains, LC1 and LC3. In rabbit, they have identical sequences over their 141 C-terminal residues, while LC1 has a characteristic additional sequence of 41 residues on its N-terminus. In contrast, vertebrate cardiac myosin does not contain LC3 (for review see Moss, 1992; Stępkowski, 1995). Thick filaments of vertebrate striated muscle consist of bipolar arrays of myosin molecules. The tails of the molecules form the backbone of the filament, while the heads (subfragments-1, S1) and the adjacent part of the tail of each myosin molecule (subfragment-2, S2) are located on the filament surface. In relaxed muscle, the heads are arranged close to the filament backbone, interacting with each other and with the backbone and forming crowns with a period of 14.5 nm. Upon activation of the muscle, the myosin heads move away from the backbone and bind to actin, thereby forming cross-bridges required to produce force and relative sliding of the filaments. In the model of Huxley (1969) it was supposed that not only the heads but also S2 portions of the myosin molecules can move away from the backbone during contraction to bridge the distance between contractile filaments and to maintain the correct orientation of head binding to actin for force generation.

In accordance with the three-dimensional structure of S1 determined at the atomic level (Rayment *et al.,* 1993) each myosin head consists of the motor domain (N-terminus of the S1 heavy chain), containing the nucleotide- and actin-binding sites, and of a regulatory domain (RD, or the so-called "neck" region between the heads and the tail) composed of 8.5

[1] To whom correspondence should be addressed. Fax: 007-0967-790553. E-mail: podlubnaya@venus.iteb.serpukhov.su.

1047-8477/00 $35.00
Copyright © 2000 by Academic Press
All rights of reproduction in any form reserved.

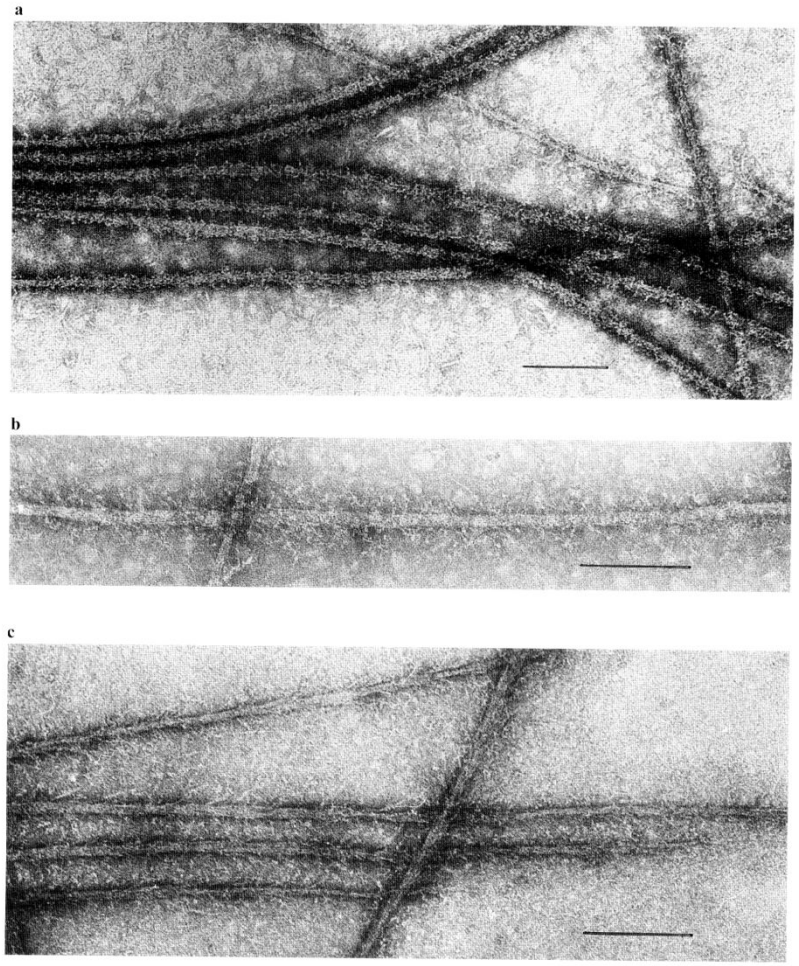


FIG. 1. Electron micrographs of control synthetic filaments of nonphosphorylated skeletal muscle myosin. Compact structure of the filaments with ordered arrangement of the "crowns" of the myosin heads disposed close to the filament shaft is seen in (a) but is absent in the spread filaments (b, c) due to the movement of the filamentous projections (likely myosin S2 parts with the heads) from the filament shaft. Similar transitions were observed in synthetic filaments of nonphosphorylated cardiac muscle myosin (data not shown). Bar, 200 nm. Rabbit skeletal muscle myosin was prepared in phosphorylated and nonphosphorylated forms according to Babiychuk *et al.* (1991). The extents of phosphorylation for phosphorylated and nonphosphorylated skeletal myosins were 95–100% and 0–5%, correspondingly, as evaluated by electrophoresis in 8 M urea on 8% gels with the following densitometry (Perrie and Perry, 1970). DEAE–Sephadex column-purified nonphosphorylated cardiac myosin was prepared from rabbit hearts by the method of Margossian (1985). Myosin filaments were formed by dialysis against solutions containing 120 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, and 10 mM imidazole buffer (pH 7.0) in (a) the absence of Ca^{2+} (1 mM EGTA) and (b and c) the presence of Ca^{2+} (0.1 mM $CaCl_2$) at 4°C. Filaments were placed on collodion carbon-coated grids, negatively stained with 1% aqueous uranyl acetate, and examined in a JEM-1200EX at an accelerating voltage of 80 kV with a 50-μm objective aperture. The sediments of samples used for EM were checked by SDS–electrophoresis on 5/15% gels (Laemmli, 1970) for the integrity of LCs before and after dialysis. Only myosin preparations with the full complement of LCs were used for the above EM observations.

Т.о., актиновый и миозиновый типы регуляции свойственны для всех типов мышц!

Следующая лекция

Благодарю
за
внимание!