

В. М. Данилова, Н. В. Куликова,
В. С. Трегубов, В. С. Омелянюк, А. М. Филенко

КАЛЬДЕСМОН — Ca^{2+} -РЕГУЛЯТОРНАЯ БЕЛКОВАЯ КОМПОНЕНТА НАТИВНЫХ ТОНКИХ ФИЛАМЕНТОВ ГЛАДКИХ МЫШЦ АОРТЫ

Описана методика выделения и очистки кальдесмона (кальмодулин- и актин-связывающего белка) из гладких мышц аорты свиньи. Установлено, что кальдесмон входит в состав тонких филаментов и препятствует взаимодействию миозина с актином, обесчелываая тем самым ингибирование Mg^{2+} -АТФазной активности реконструированного актомиозина независимо от концентрации Ca^{2+} . Ингибирующий эффект кальдесмона снимается при добавлении кальмодулина в присутствии Ca^{2+} . Методом спектрофлуориметрии показано, что кальмодулин может связываться с кальдесмоном, вызывая конформационные изменения в структуре последнего. На основании полученных результатов и литературных данных сделан вывод о том, что кальдесмон является потенциальным регулятором актомиозиновой системы в гладких мышцах сосудов.

Введение. Известно, что увеличение концентрации внутриклеточного Ca^{2+} инициирует сокращение всех типов мышц, сократительный аппарат которых состоит из параллельных пучков толстых (миозиновых) и тонких (актиновых) филаментов [1]. На молекулярном уровне механизм сокращения во всех типах мышц одинаков: при увеличении концентрации внутриклеточного Ca^{2+} до 10^{-6} М поперечные мостики (головки миозина, или субфрагмент 1) связываются с актином и Mg^{2+} -АТФ, которая гидролизуется в активном центре, а высвобожденная энергия используется на перемещение двух типов филаментов относительно друг друга [2].

На вопрос, как Ca^{2+} контролирует взаимодействие миозина и актина, в настоящее время имеется несколько ответов. Так, в поперечнополосатых мышцах при повышении уровня внутриклеточного Ca^{2+} последний связывается с тропонином С и вызывает конформационные изменения в белках, входящих в состав тонкого филамента (ТФ), в результате чего происходит взаимодействие актина с поперечными мостиками миозина и, следовательно, сокращение [3]. Эта регуляторная система входит в состав структуры тонкого филамента (актин, тропомиозин и тропонины: С, I и Т) и потому названа актиновой регуляцией, или регуляцией, связанной с тонкими филаментами.

В гладких мышцах позвоночных тропонин отсутствует. Это означает, что в них действуют другие, отличные от поперечнополосатых мышц, механизмы контроля актомиозинового взаимодействия. Действительно, используя тесты, предложенные Леманом и Сент-Дьердьи [4], удалось показать, что в гладких мышцах сосудов и висцеральных гладких мышцах Ca^{2+} -контроль связан как с толстыми, так и с тонкими филаментами [1, 5, 6], т. е. имеют место два регуляторных механизма актин-миозинового взаимодействия. Один из них включает фосфорилирование регуляторных легких цепей миозина — это так называемая миозиновая регуляция [7, 8]. На сегодня нет сомнений в том, что Ca^{2+} -кальмодулин-зависимый процесс играет важнейшую роль в актиновой активации Mg^{2+} -АТФазы миозина, циклировании поперечных мостиков и развитии силы гладкими мышцами.

© В. М. ДАНИЛОВА, Н. В. КУЛИКОВА, В. С. ТРЕГУБОВ, В. С. ОМЕЛЯНЮК,
А. М. ФИЛЕНКО, 1995

Однако имеются данные, подтверждающие существование Ca^{2+} -зависимого регуляторного механизма, связанного с тонкими филаментами, в состав которых входят актин, тропомиозин, кальдесмон и Ca^{2+} -чувствительный белковый фактор, родственник кальмодулину, в соотношении 14 : 2 : 1 : 1 [9]. Некоторые препараты содержат также кальпонин [10]. Именно кальдесмон и кальпонин, обнаруженные в гладких мышцах, вероятнее всего, могут претендовать на роль белков, выполняющих регуляторные функции.

После открытия кальдесмона в 1981 г. [11] во многих лабораториях мира проводили детальные исследования его структуры с использованием классических методов белковой химии. Было установлено, что кальдесмон — это термостабильный кислый белок, молекула которого имеет палочкообразную гибкую конфигурацию. Относительная молекулярная масса (о. м. м.) этого белка, определенная методом электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии Ds-Na , равна 120—150 кДа [11—13]. Известна также первичная структура этого белка, на основе анализа которой можно определить его истинную м. м. Она находится в пределах 89 кДа [14].

Кальдесмон легко переваривается как при хранении, так и при ограниченном гидролизе протеолитическими ферментами (α -химотрипсином, тромбином и др.), в результате чего образуются фрагменты с разной м. м. и функциональной нагрузкой [14, 15]. Исследования протеолитических фрагментов, а также их мутантных форм, полученных методами генной инженерии, показали, что его функциональные домены расположены на обоих концах молекулы. Так, если С-концевой фрагмент отвечает за связывание актина [15—17], тропомиозина [18] и кальмодулина [19], то N-концевой фрагмент содержит специфический центр для связывания миозина [18] и, возможно, второй центр связывания с тропомиозином [18] и кальмодулином [20]. Все эти результаты свидетельствуют о том, что кальдесмон — мультифункциональный белок.

Уже в первых работах, посвященных изучению кальдесмона, было показано, что он обладает ингибирующим действием на АТФазную активность актомиозина, которое снимается кальмодулином в присутствии Ca^{2+} [11, 12].

Это позволило высказать предположение о том, что *in vivo* кальдесмон участвует в регуляции (или модуляции) сократительной активности гладких мышц в дополнение к механизмам Ca^{2+} -кальмодулин-зависимого фосфорилирования миозина [7, 14].

Целью настоящей работы было выделение, очистка, идентификация кальдесмона из гладких мышц сосудов и изучение его роли в механизмах регуляции АТФазной активности актомиозина. Для реконструкции актомиозинового комплекса использовали выделенные нами индивидуальные сократительные и регуляторные белки: актин, миозин, тропомиозин, кальдесмон, кальмодулин и тонкую филаменту.

Материалы и методы. Выделение белковых препаратов. Кальдесмон выделяли из гладких мышц аорты свиньи, применяя методику из работы [22] с некоторыми модификациями. Для этого аорту очищали от внутреннего и внешнего слоев, оставляя средний мышечный слой [23]. Полоски аорты размельчали сначала ножом, а затем, используя гомогенизатор типа Polytron, гомогенизировали в шести объемах экстрагирующего буфера следующего состава (ммоль/л): KCl — 300; ЭГТА — 2; MgCl_2 — 2; фенил-метил-сульфонил-флюорид (ФМСФ) — 0,25; 2-меркаптоэтанол или дитиотреитол (ДТТ) — 0,5; имидазол (рН 7,0) — 50. После центрифугирования при 13 000 g (40 мин) супернатант нагревали на водяной бане при 85 °С в течение 4 мин для денатурации большинства белков. Затем образцы охлаждали на льду до 4 °С, и термостабильные белки отделяли от денатурированных центрифугированием в течение 40 мин при 13 000 g. Кальдесмон был выделен из супернатанта высаливанием с помощью MgCl_2

(25 ммоль/л) и сульфата аммония при насыщении 33—55 %. Осадок суспендировали в буфере такого состава (ммоль/л): имидазол (рН 7,0) — 20; ЭГТА — 1; β -меркаптоэтанол — 1; 0,05 %-й NaN_3 (из расчета 100 мл буфера на каждый 1 мл осадка) и наносили на колонку ДЕ-52, уравновешенную тем же буфером. Элюцию осуществляли линейным градиентом NaCl (0,05—0,25 моль/л). Фракции, содержащие кальдесмон, объединяли и концентрировали с помощью мембраны «Amicon» либо лиофилизировали для хранения и дальнейшего использования. Перед началом работы лиофилизированный кальдесмон переводили диализом в нужный буфер и исследовали спектр поглощения в диапазоне длин волн D_{220} — D_{320} нм.

Тропомозиин получали его элюцией из той же колонки, но в градиенте 0,25—0,4 моль/л NaCl . Фракции, которые содержали тропомозиин (около 0,32 моль/л NaCl), объединяли, добавляли NaCl до конечной концентрации 1 моль/л и β -меркаптоэтанол — до 1 ммоль/л и с помощью HCl доводили значение рН до изоэлектрической точки (4,5—4,6). Раствор выдерживали в течение 2 ч при 4 °С и центрифугировали 45 мин при 15 000 g; осадок растворяли в минимальном объеме 1 ммоль/л NaHCO_3 , доводили значение рН до 7,8—7,9 и нерастворенный белок устранили центрифугированием при 15 000 g в течение 45 мин. Для работы белок диализовали против 0,1 моль/л KCl с добавлением 1 ммоль/л β -меркаптоэтанола.

Нагивные тонкие филаменты (ТФ) выделяли из аорты свиньи методами, описанными в работе [23], актин и миозин — согласно методам [24] и [25] соответственно.

Кальмодулин из мозга телят выделяли по методике [26].

Реконструированный актомиозин получали смешиванием миозина скелетных мышц кролика и ТФ аорты при концентрациях 0,5 мг/мл миозина и 0,5 мг/мл ТФ в буфере такого состава (ммоль/л): KCl — 600; имидазол (рН 7,0) — 10; MgCl_2 — 5; NaN_3 — 10; ДТТ — 0,2 либо при условиях, приведенных в подписях к рисункам. Смесь оставляли на 6 ч для полной гибридизации белков, затем диализовали в течение ночи против АТФазного буфера (ммоль/л): KCl — 60; имидазол (рН 7,0) — 10; MgCl_2 — 2,5; NaN_3 — 10; ДТТ — 0,2; АТФ — 1; CaCl_2 — 0,1 или ЭГТА — 1.

Для реконструкции Ca^{2+} -регулируемых тонких филаментов использовали актин скелетных мышц кролика, тропомозиин и кальдесмон гладких мышц аорты и кальмодулин из мозга телят при концентрации (мг/мл) 0,5; 0,15; 0,1; 0,1 соответственно.

Аналитические методы. Концентрацию белка определяли по биуретовой реакции или по методике Брэдфорд [27].

Об АТФазной активности миозина и реконструированного актомиозина судили по количеству отщепленного неорганического фосфата, которое определяли по методу Фиске и Суббароу.

Чистоту и гомогенность выделенных белков определяли методом электрофореза в однородной трис-боратной буферной системе с DS-Na в градиенте концентрации 6—30 % ПААГ, как это описано в работе [28].

Спектры собственной триптофановой флюоресценции записывали на спектрофотометре Spexord M-40 (Германия) при длине волны возбуждения 297 нм.

Результаты и обсуждение. Все электрофореграммы, схематически представленные на рис. 1, свидетельствуют о том, что выделенные нами белковые препараты по электрофоретической подвижности и о. м. м. были типичными для соответствующих мышечных белков.

Препараты тонких филаментов из аорты свиньи были мутными, но не вязкими. Сами по себе они не обладали АТФазной активностью, но активировали миозиновую АТФазу при 10^{-4} М Ca^{2+} (рис. 2). Стандартный синтетический реконструированный актомиозин, содержащий 1 мг/мл тонких филаментов и 0,5 мг/мл миозина, имел АТФазную активность 115 ± 10 нмоль P_i на 1 мг миозина за 1 мин, в то время как

один миозин обладал активностью 13 ± 5 нмоль P_n -мг миозина $^{-1} \times$ \times мин $^{-1}$. Активность АТФазы увеличивалась почти линейно в ряду возрастания отношения тонкие филаменты: миозин (рис. 2, кривая 1), Самая высокая активность (500 нмоль P_n -мг миозина $^{-1} \cdot$ мин $^{-1}$) была при весовом отношении 10 : 1.

Нам удалось показать, что активация миозина тонкими филаментами зависела от влияния Ca^{2+} . Стандартный реконструированный актомиозин (0,5 мг/мл миозина плюс 1 мг/мл тонких филаментов) в отсутствие и присутствии Ca^{2+} имел активность порядка 50 и 115 нмоль

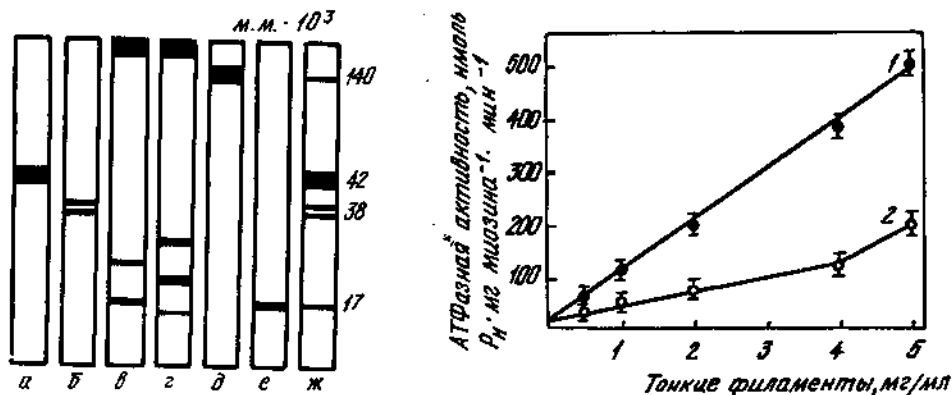


Рис. 1. Схематическое изображение электрофореграмм выделенных белковых препаратов: актин (а) и миозин (z) из скелетных мышц кролика; тропомиозин (б), миозин (e), кальдесмон (d) и тонкие филаменты (ж) из гладких мышц аорты свиньи; кальмодулин (e) из мозга телянка. Условия электрофореза: градиент (6—30 %) полиакриламидного геля в присутствии 0,1 % DS-Na [28]

Рис. 2. Активация АТФазы миозина скелетных мышц кролика тонкими филаментами гладких мышц аорты в присутствии (1) и в отсутствие (2) Ca^{2+} . Условия опыта: 0,5 мг/мл миозина, 0,5 мг/мл тонких филаментов, АТФазный буфер следующего состава (ммоль/л): KCl — 60; имидазол (pH 7,0) — 10; $MgCl_2$ — 2,5; АТФ — 1; $CaCl_2$ — 0,1 или ЭГТА — 1; NaN_3 — 10; ДТТ — 0,5. Время инкубации 3 мин при 37 °С

P_n на 1 мг миозина за 1 мин соответственно, что составляет чувствительность к Ca^{2+} 56—60 %. Чувствительность к Ca^{2+} определяли по формуле:

$$\frac{\{\text{АТФаза} (10^{-4} \text{ моль/л } Ca^{2+})\} - \{\text{АТФаза} (10^{-8} \text{ моль/л } Ca^{2+})\} \cdot 100\%}{\{\text{АТФаза} (10^{-4} \text{ моль/л } Ca^{2+})\}}$$

Активация АТФазы миозина тонкими филаментами была регулируема Ca^{2+} при всех выбранных отношениях ТФ : миозин (рис. 2). Это служит доказательством того, что ТФ гладких мышц аорты свиньи являются Ca^{2+} -регулируемыми.

При анализе полученных белков с помощью электрофореза в присутствии DS-Na было показано, что очищенные ТФ аорты (рис. 1, ж) содержат актин, тропомиозин, белок с м. м. 140 кДа и низкомолекулярную белковую компоненту с м. м. 17 кДа, которая близка по этому параметру таким Ca^{2+} -рецептивным белкам, как тропонин С и кальмодулин (рис. 1, e). Мы сравнили электрофоретическую подвижность белка с м. м. 140 кДа из аорты в наших экспериментах с таковой очищенного кальдесмона из гизарда цыпленка [11] и пришли к заключению, что они идентичны. В работе Марстона [29] было также показано, что препараты тонких филаментов из различных типов гладких мышц (второй желудок птиц, желудок свиньи, трахея) содержат актин, тропомиозин и белок с м. м. 120—140 кДа, который является мощным ингибитором АТФазной активности актомиозина. С помощью пептидного картирования и иммунологических реакций эти авторы показали, что он идентичен кальдесмону.

Поэтому следующим этапом наших исследований было выделение и очистка кальдесмона из гладких мышц аорты и исследование его роли.

Относительная молекулярная масса полученного нами препарата кальдесмона из аорты (рис. 1, *д*), определенная с помощью DS-На-электрофореза, равна приблизительно 140 кДа, что согласуется с литературными данными [11, 15].

Эффект кальдесмона на АТФазную активность актомиозина, реконструированного из скелетномышечных миозина (рис. 1, *г*) и актина (рис. 1, *а*), а также тропомиозина аорты (рис. 1, *б*) при весовом

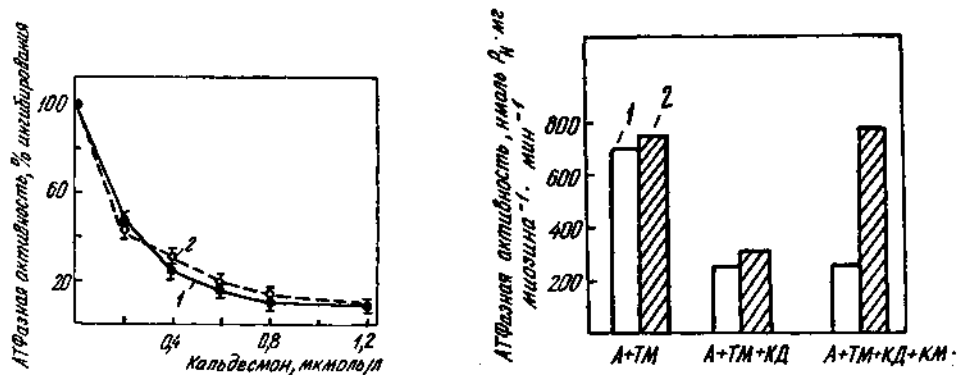


Рис. 3. Влияние кальдесмона на Mg^{2+} -АТФазную активность реконструированного актомиозина в присутствии (1) и в отсутствие (2) Ca^{2+} . Условия опыта: 0,125 мг/мл миозина скелетных мышц, 0,5 мг/мл актина и 0,15 мг/мл тропомиозина аорты; остальные условия см. рис. 2. За 100 % принята активность актомиозина в отсутствие кальдесмона

Рис. 4. Реконструкция Ca^{2+} -чувствительного тонкого филамента гладких мышц аорты и его действие на АТФазную активность миозина в отсутствие (1) и в присутствии (2) Ca^{2+} (10^{-4} М). А — актин (0,5 мг/мл); ТМ — тропомиозин (0,15 мг/мл); КД — кальдесмон (0,1 мг/мл); КМ — кальмодулин (0,1 мг/мл). Условия определения АТФазной активности см рис. 2

отношении 1 : 4 : 1,02, показан на рис. 3. Как и другие авторы [15, 30], мы наблюдали эффективное ингибирование АТФазной активности актомиозина, которое практически не зависело от концентрации Ca^{2+} . Как видно из рисунка, это ингибирование в присутствии тропомиозина достигало 80–90 %. В то же время другими исследователями показано, что и в отсутствие тропомиозина наблюдается ингибирование АТФазной активности актомиозина, но оно значительно ниже (до 40 %) [15]. Механизм тропомиозин-зависимого ингибирования является высококооперативным и, как показано в работе [30], степень кооперативности зависит, скорее всего, от типа тропомиозина, а не кальдесмона. Такое поведение кальдесмона по отношению к тропомиозину и актину очень напоминает тропонин [30].

На основании полученных результатов и литературных данных мы пришли к заключению о том, что кальдесмон является ингибирующей составляющей регуляторного механизма, которая в условиях *in vitro*, как правило, является Ca^{2+} -нечувствительной.

Однако результаты, представленные на рис. 2, показали, что нативные тонкие филаменты сосудов чувствительны к Ca^{2+} ; в их состав, кроме актина, тропомиозина и кальдесмона, входит небольшое количество белка с м. м. 17 кДа, напоминающего тропонин С или кальмодулин (рис. 1, *е*, *ж*). Поскольку многие исследователи для очистки кальдесмона используют метод аффинной хроматографии на колонке с кальмодулином, логично было предположить, что роль Ca^{2+} -чувствительного компонента в тонких филаментах может выполнять кальмодулин.

Мы попытались реконструировать Ca^{2+} -регулируемые ТФ, используя четыре белка: скелетномышечный актин, тропомиозин и кальдесмон

ворты, а также в качестве Ca^{2+} -связывающего белка — кальмодулин мозга, и показали, что ингибиторный эффект кальдесмона на актомнозную АТФазу снимается кальмодулином в присутствии Ca^{2+} (рис. 4). Этот эксперимент в общих чертах демонстрирует механизм Ca^{2+} -зависимой регуляции, связанной с ТФ сосудов. Кальдесмон ингибирует активную активацию Mg^{2+} -АТФазы миозина, тропмиозин распространяет это ингибирование, включая большее число мономеров актина, на это взаимодействие (кооперативный эффект) и, наконец, Ca^{2+} -связывающий белок — кальмодулин взаимодействует с кальдесмоном и снимает его ингибиторный эффект.

О способности кальдесмона связываться с кальмодулином свидетельствуют результаты, полученные нами при исследовании триптофановой флуоресценции (рис. 5). Из

Рис. 5. Изменение триптофановой флуоресценции кальдесмона (КД) при добавлении кальмодулина (КМ) в присутствии и в отсутствие Ca^{2+} . Молярное отношение кальмодулина к кальдесмону равно 1:1. I — интенсивность флуоресценции

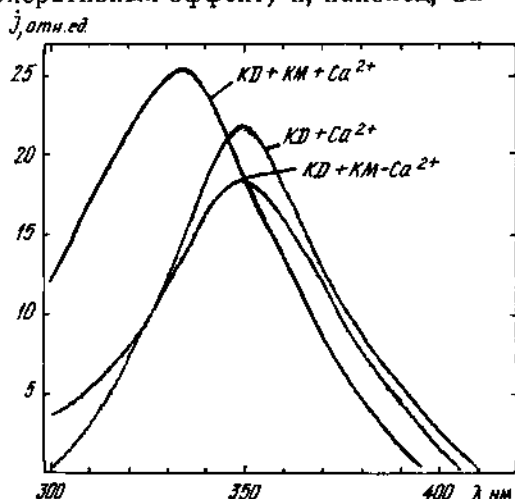
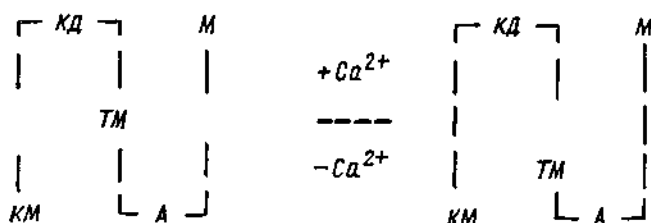


рис. 5 видно, что кальмодулин влияет на собственную триптофановую флуоресценцию кальдесмона, изменяя ее интенсивность и смещая максимум спектра в коротковолновую область. Это связывание модифицирует структуру кальдесмона и имеет место только в присутствии Ca^{2+} .

Исходя из полученных результатов мы предполагаем, что в отсутствие Ca^{2+} кальдесмон прочно взаимодействует с актином и блокирует его взаимодействие с миозином, а в присутствии Ca^{2+} кальмодулин взаимодействует с кальдесмоном и обеспечивает его диссоциацию из актинового филамента, тем самым снимая ингибирование АТФазы актомнозина. Такой механизм вписывается в модель, предложенную в работе [31], которая получила название «flip-flop»-гипотезы:



Механизм, посредством которого кальдесмон индуцирует ингибирование актин-активируемой АТФазы, до сих пор остается предметом дискуссий. Так, используя С-концевой фрагмент кальдесмона, лишенный миозин-связывающего центра, было показано, что ингибирование актомнозиновой АТФазы коррелирует с уменьшением связывания комплекса миозин — АТФ с актином независимо от источника миозина. При этом было высказано предположение о том, что кальдесмон ингибирует АТФазу, конкурируя с миозином за общий связывающий центр на актине [32]. Действительно, с помощью ^1H NMR-спектроскопии, перекрестной сшивки и иммунологических экспериментов было обнаружено, что кальдесмон занимает центры на субдоменах 1 и 2 актлина, которые имеют отношение также к связыванию миозиновых головок [33—35]. При использовании поляризации флуоресценции также было показано, что кальдесмон влияет на структуру актлина и приводит к ослабле-

йню его связывания с субфрагментом 1 [36]. Все это дало возможность предложить механизм, согласно которому кальдесмон блокирует центры на актине, предназначенные для прикрепления поперечных мостиков, необходимых для развития силы [37].

Другой механизм ингибирования актомиозиновой АТФазы кальдесмоном был предложен Марстоном с сотр., которые постулируют, что кальдесмон, подобно тропонину I, замедляет этап, лимитирующий скорость гидролиза АТФ, т. е. высвобождение неорганического фосфата. Такой механизм может иметь место только в присутствии тропомиозина, распространяющего ингибиторный сигнал (уменьшение V_{max}) от 1 до 14 контактов кальдесмона с актином на тонком филаменте [38, 39].

Анализируя эти, на первый взгляд, альтернативные механизмы и исходя из полученных результатов, можно сделать однозначный вывод о том, что кальдесмон способен стерически блокировать взаимодействие миозина с актином и тем самым обеспечивать ингибирование АТФазной активности актомиозина. Он также может взаимодействовать с кальмодулином, при этом последний вызывает конформационные изменения в структуре кальдесмона, вследствие чего устраняется стерическое блокирование и актин приобретает способность взаимодействовать с миозином.

Работа выполнена при частичной поддержке Государственного фонда фундаментальных исследований при ГКНТ Украины.

В. М. Данилова, Н. В. Куликова, В. С. Трегубов, В. С. Омелянюк, О. М. Філенко

КАЛЬДЕСМОН — Ca^{2+} -РЕГУЛЯТОРНА БІЛКОВА КОМПОНЕНТА НАТИВНИХ ТОНКИХ ФІЛАМЕНТІВ ГЛАДЕНЬКИХ М'ЯЗІВ АОРТИ

Резюме

Описано методику виділення та очищення кальдесмону — білка, здатного зв'язуватися з актином та кальмодуліном. Встановлено, що він входить до складу тонких філаментів гладеньких м'язів аорти і перешкоджає взаємодії міозину з актином, що призводить до інгібування Mg^{2+} -АТФазної активності реконструйованого актомиозину незалежно від концентрації Ca^{2+} . Інгібуючий ефект кальдесмону знімається при додаванні кальмодуліну в присутності Ca^{2+} . За допомогою спектрофлуориметрії показано, що кальмодулін може зв'язуватися з кальдесмоном, призводячи до конформаційних змін в структурі останнього. Виходячи з одержаних результатів та літературних даних, зроблено висновок про те, що кальдесмон є потенційним регулятором актомиозинової системи в гладеньких м'язах судин.

V. M. Danilova, N. V. Kulikova, V. S. Tregubov, V. S. Omelyanuk, A. M. Filenko

CALDESMON IS A Ca^{2+} -REGULATORY PROTEIN COMPONENT OF NATIVE AORTA SMOOTH MUSCLE FILAMENTS

Summary

The techniques of preparation and purification of calmodulin- and actin-binding protein caldesmon (CaD) from pig aorta smooth muscle is described. It is established that CaD prevents the interaction of myosin and actin thus inhibiting the Mg^{2+} -ATPase activity of actomyosin irrespectively of Ca^{2+} concentration. The inhibitory effect of CaD is cancelled at addition of calmodulin in the presence of Ca^{2+} . With the help of spectrofluorimetry it is shown that calmodulin may bind to caldesmon causing conformational changes in its structure. Both the results obtained and the data known from literature suggest CaD to be a likely regulator of vascular smooth muscle actomyosin system.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Marston S. B. The regulation of smooth muscle contractile proteins // *Progr. Biophys. and Mol. Biol.*— 1982.— 41.— P. 1—41.
2. Marston S. B., Taylor E. W. Comparison of the myosin and actomyosin ATPase mechanism of the four types of vertebrate muscle // *J. Mol. Biol.*— 1980.— 139.— P. 573—600.

3. *Ebashi S.* Regulation of muscle contraction // *Proc. Roy. Soc. Lond B.*—1980.—207.—P. 259—286.
4. *Lehman W., Szent-Gyorgyi A. G.* Regulation of muscle contraction. Distribution of action control and myosin control in the animal kingdom // *J. Gen. Physiol.*—1975.—66.—P. 1—30.
5. *Marston S. B., Treveit N. M., Walters M.* Calcium-ion-regulated thin filaments from vascular smooth muscle // *Biochem. J.*—1980.—185.—P. 355—365.
6. *Данилова В. М.* Регуляция актин-миозинового взаимодействия в гладких мышцах позвоночных // *Механизмы контроля мышечной деятельности.*—Л.: Наука, 1985.—С. 128—147.
7. *Walsh M. P.* Calcium-dependent mechanism of regulation of smooth muscle contraction // *Biochem. Cell Biol.*—1990.—69.—P. 771—800.
8. *Хохлова В. С., Куликова Н. В., Трегубов В. С., Данилова В. М.* Роль фосфорилирования миозина гладких мышц в регуляции актин-миозинового взаимодействия // *Молекуляр. генетика и биофизика.*—1991.—16.—С. 74—78.
9. *Marston S. B., Smith C. W. J.* The thin filaments of smooth muscles // *J. Muscle Res. Cell. Motil.*—1985.—6.—P. 669—708.
10. *Lehman W.* Calponin and composition of smooth muscle thin filaments // *Ibid.*—1991.—12.—P. 221—224.
11. *Sobue K., Muramoto Y., Fujita M., Kakiuchi S.* Purification of a calmodulin-binding protein from chicken gizzard that interacts with F-actin // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1981.—78.—P. 5652—5655.
12. *Bryan J.* Caldesmon, acidic amino acid and molecular weight determinations // *J. Muscle Res. Cell. Motil.*—1989.—10.—P. 95—96.
13. *Yamazaki K., Itoh K., Sobue K. et al.* Purification of caldesmon and myosin light chain (MLC) kinase from arterial smooth muscle: comparisons with gizzard caldesmon and MLC kinase // *J. Biochem.*—1987.—101.—P. 1—9.
14. *Marston S. B., Redwood Ch. S.* The molecular anatomy of caldesmon // *Biochem. J.*—1991.—279.—P. 1—16.
15. *Szpacenko A., Dabrowska R.* Functional domain of caldesmon // *FEBS Lett.*—1986.—202.—P. 182—186.
16. *Fujii T., Imai M., Rosenfeld G. C., Bryan J.* Domain mapping of chicken gizzard caldesmon // *J. Biol. Chem.*—1987.—262.—P. 2757—2763.
17. *Bartegi A., Fatoum A., Derancourt J., Kassab R.* Characterization of carboxyl-terminal 10 kDa cyanogen bromide fragment of caldesmon as actin-calmodulin-binding region // *Ibid.*—1990.—265.—P. 15231—15238.
18. *Katayama E., Horiuchi K. Y., Chacko S.* Characteristics of myosin and tropomyosin binding regions of smooth muscle caldesmon // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1989.—160.—P. 1315—1322.
19. *Yazawa M., Yagi K., Sobue K.* Isolation and characterization of a calmodulin binding domains at the C-terminus of caldesmon // *FEBS Lett.*—1989.—247.—P. 411—414.
20. *Mabuchi K., Wang C.-L.* Electron microscopic studies of chicken gizzard caldesmon and its complex with calmodulin // *J. Muscle Res. Cell. Motil.*—1991.—12.—P. 145—151.
21. *Dabrowska R., Goch A., Galazkiewicz B., Osinska H.* The influence of caldesmon on ATPase activity of the skeletal muscle actomyosin and bundling of actin filaments // *Biochem. et biophys. acta.*—1985.—842.—P. 70—75.
22. *Bretscher A.* Smooth muscle caldesmon: rapid purification and F-actin cross-linking properties // *J. Biol. Chem.*—1984.—259.—P. 12873—12880.
23. *Хохлова В. С., Трегубов В. С., Данилова В. М.* Два типа Ca²⁺-зависимой регуляции актин-миозинового взаимодействия в гладких мышцах желудка свиньи // *Молекуляр. генетика и биофизика.*—1986.—11.—С. 28—33.
24. *Хайтлина С. Ю.* Методы выделения и очистки актина. Оценка чистоты и нативности // *Биофиз. и биохим. методы исследования мышечных белков.*—Л.: Наука, 1978.—С. 122—141.
25. *Данилова В. М., Трегубов В. С.* Сравнительное изучение структурно-функциональных свойств миозина гладких и скелетных мышц млекопитающих // *Молекуляр. генетика и биофизика.*—1988.—13.—С. 12—21.
26. *Teo T. S., Wang T. H.* Purification and properties of the protein activator of bovine heart cyclic adenosine-3',5'-monophosphate phosphodiesterase // *J. Biol. Chem.*—1973.—248.—P. 588—595.
27. *Bradford M. M.* A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Analyt. Biochem.*—1976.—72.—P. 248—254.
28. *Трегубов В. С., Сопин Г. Е.* Универсальная электрофоретическая система для разделения белков с высоким разрешением // *Молекуляр. генетика и биофизика.*—1988.—13.—С. 125—129.
29. *Marston S. B., Lehman W.* Caldesmon is a Ca²⁺-regulatory component of native smooth muscle thin filaments // *Biochem. J.*—1985.—231.—P. 517—522.
30. *Marston S. B., Redwood Ch. S.* The essential role of tropomyosin in cooperative regulation of smooth muscle thin filament activity by caldesmon // *J. Biol. Chem.*—1993.—268.—P. 12317—12320.
31. *Sobue K., Kanda K., Tanaka T., Ueki N.* Caldesmon: a common actin-linked regulatory protein in the smooth muscle and non-muscle contractile system // *J. Cell. Biol.*—1988.—37.—P. 317—325.

32. *Velaz I., Ingraham R. H., Chalovich J. M.* Dissociation of the effect of caldesmon on the ATPase activity and on binding of smooth heavy meromyosin to actin by partial digestion of caldesmon // *J. Biol. Chem.*—1990.—265.—P. 2929—2934.
33. *Levine B. A., Moir A. J. G., Audemard E. et al.* Structural study of gizzard caldesmon and its interaction with actin-binding involves residues of actin also recognized by myosin subfragment 1 // *Eur. J. Biochem.*—1990.—193.—P. 687—696.
34. *Bartegi A., Fattoum A., Kassab R.* Cross-linking of smooth muscle caldesmon to NH₂-terminal region of skeletal F-actin // *J. Biol. Chem.*—1990.—265.—P. 2231—2237.
35. *Adams S., Das Gupta G., Chalovich J. M., Reister E.* Immunochemical evidence for the binding of caldesmon to the NH₂-terminal segment of actin // *Ibid.*—P. 19652—19657.
36. *Nowak E., Borovikov Yu. S., Dabrowska R.* Caldesmon weakens the binding between myosin heads and actin in ghost fibers // *Biochim. et biophys. acta.*—1989.—999.—P. 289—292.
37. *Chalovich J. M., Yu L. C., Brenner B.* Involvement of weak binding crossbridges in force production in muscle // *J. Muscle Res. Cell. Motil.*—1991.—12.—P. 503—506.
38. *Marston S.* Aorta caldesmon inhibits actin activation of phosphorylated heavy meromyosin Mg²⁺-ATPase activity by slowing the rate of product released // *FEBS Lett.*—1988.—238.—P. 147—150.
39. *Marston S. B., Redwood Ch. S.* Inhibition of actin-tropomyosin activation of myosin MgATPase activity by the smooth muscle regulatory protein caldesmon // *J. Biol. Chem.*—1992.—267.—P. 16796—16800.

НИИ физиологии Киев. ун-та им. Тараса Шевченко

Получено 23.03.95