

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



**Институт теоретической
и экспериментальной
биофизики РАН
(ИТЭБ РАН)**

Лекция № 12

**Энергетика мышечного сокращения. Ферменты в толстых
нитех поперечно-полосатых мышц позвоночных**

Вопросы для мини-проверки

1. Что такое электромеханическое сопряжение (ЭМС)?
2. Какая концентрация ионов кальция в покое мышечных клетках?
3. Почему необходимо поддерживать низкий уровень кальция в покое?
4. Перечислите механизмы, поддерживающие низкий уровень кальция в покое ?
5. 0,2 микромоля: сколько это наномолей?
6. Для какой мышцы запуск сокращения инициируется входом ионов натрия и кальция?
 - сердечной;
 - скелетной;
 - гладкой.

7. Какова длительность ПД в скелетных мышцах, сердечной и гладких мышцах?

8. Что такое EF-hand белки?

9. Назовите 2 типа регуляции мышечного сокращения.

10. В скелетных мышцах позвоночных какой тип регуляции – основной, а какой – вспомогательный?

Энергетика сокращения

Источником энергии для сокращения и расслабления служит АТФ.

На головках миозина есть каталитические центры, расщепляющие АТФ до АДФ и неорганического фосфата. Т.е., миозин является одновременно структурным белком, сократительным белком и ферментом АТФ-азой.

Активность миозина как АТФ-азы значительно возрастает при его взаимодействии с актином. При каждом цикле взаимодействия актина с головкой миозином расщепляется 1 молекула АТФ. Следовательно, чем больше мостиков переходят в активное состояние, тем больше расщепляется АТФ, тем сильнее сокращение. Для стимуляции АТФ-азной активности миозина требуются ионы кальция, выделяющиеся из саркоплазматического ретикулама (СР), которые способствуют освобождению активных центров актина от тропомиозина.

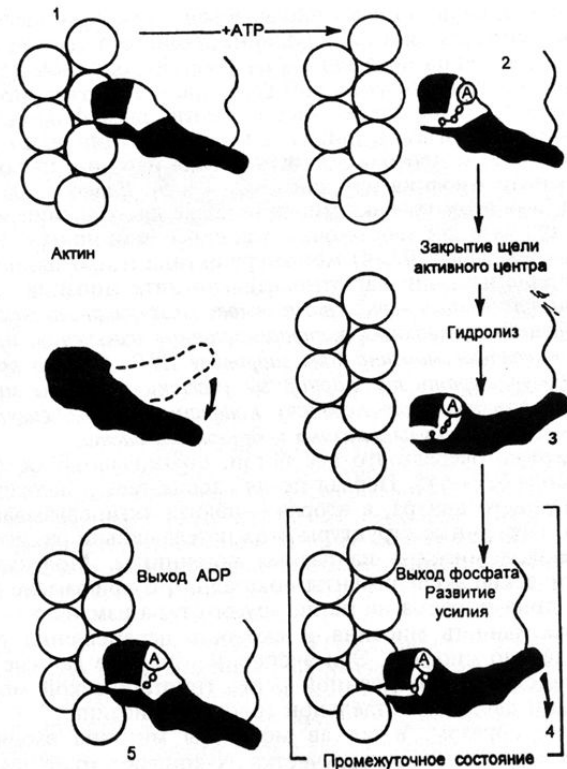


Рис. 102. Одиночный шаг головки миозина по нити актина с иллюстрацией конформационных изменений, происходящих в головке миозина при гидролизе АТФ. Актин изображен в виде гирлянды шариков. В нижней части головки миозина видна щель, разделяющая две части актинсвязывающего центра. В верхней части молекулы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

Запасы АТФ в мышечном волокне ограничены, они обеспечивают выполнение физической нагрузки не более 1-2 с.

При продолжительной мышечной работе АТФ должна восстанавливаться с той же скоростью, с какой расходуется. Энергия, необходимая для ресинтеза АТФ, высвобождается в процессе расщепления энергосубстратов (белков, липидов, углеводов).

Ресинтез (восстановление) АТФ может происходить анаэробно (без участия кислорода в саркоплазме) и аэробно (при участии кислорода в митохондриях):

в клетке имеются фосфагенная, гликолитическая и окислительная энергетическая системы.

1. Фосфагенная энергосистема – первый энергетический резерв мышечного волокна.

К фосфагенам относятся **АТФ и КрФ (креатинфосфат)**.

Креатинфосфат – быстрый источник восстановления АТФ: КрФ анаэробно распадается на креатин (Кр) и остаток фосфорной кислоты (Ф), высвобождаемая энергия немедленно используется на ресинтез АТФ.

Креатинкиназа



На мембране митохондрий происходит следующая реакция: АТФ + креатин = АДФ + креатинфосфат. Эту реакцию контролирует известный всем фермент – креатинфосфокиназа (КФК).

Фосфагенная система обеспечивает мышечные усилия «взрывного» характера (спринтерский бег, прыжки, метание, подъем штанги и т.д.).

Емкость невелика – работа может продолжаться не более **5-6 с** при максимальных мышечных усилиях. Для более продолжительной мышечной работы используется **вторая энергетическая система – гликолиз.**

2. гликолитическая энергосистема.

В основе ее лежит расщепление анаэробно глюкозы или гликогена до молочной кислоты (**выход – 2-3 молекулы АТФ**).

Ферменты гликолиза рассредоточены в саркоплазме мышечных волокон, уровень молочной кислоты по принципу обратной связи регулирует гликолиз.



Энергосистема включается в самом начале мышечной работы и достигает максимальной мощности через 30-40 с. Гликолиз играет решающую роль в энергообеспечении работы большой мощности (в беге на дистанцию 200-800 м, при статических напряжениях, при ускорениях, в самом начале любой работы при недостатке кислорода).

В анаэробном процессе пировиноградная кислота восстанавливается до молочной кислоты (лактата), поэтому в микробиологии анаэробный гликолиз называют молочнокислым брожением.

Лактат далее ни во что не превращается, единственная возможность утилизировать лактат — это окислить его обратно в пируват.

Высокий уровень молочной кислоты и несостоятельность щелочного резерва крови является ведущим звеном в периферических механизмах утомления: затрудняется выход кальция из саркоплазматической сети мышечных волокон, снижается АТФ-азная активность миозина, не происходит присоединения мостиков миозина к актину, в общем, снижаются сократительные способности мышц.

3. Окислительная энергетическая система

Реакции, происходящие с участием кислорода, получили название аэробных.

Окисление – аэробный путь ресинтеза АТФ протекает в митохондриях!

Образование энергии и восстановление запасов АТФ в этом случае происходит за счет окисления углеводов и жиров. При этом образуются углекислый газ и вода.

Часть энергии расходуется на восстановление молочной кислоты в глюкозу и гликоген.

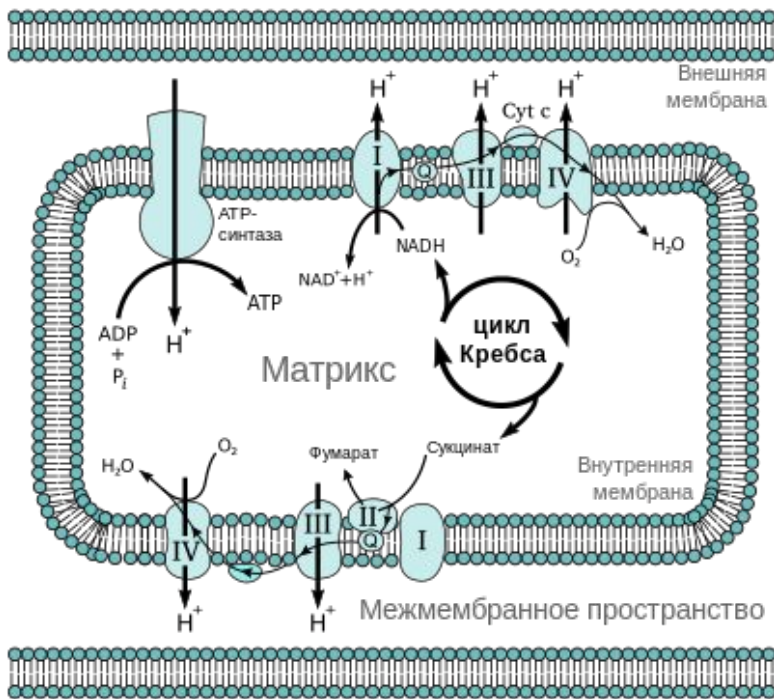
При этом обеспечивается ресинтез АТФ.

При окислении 1 молекулы глюкозы до конечных продуктов (воды и углекислого газа) ресинтезируется 36 молекул АТФ, т. е. емкость окисления почти в 20 раз выше, чем емкость гликолиза.

Окислительная энергосистема обеспечивает возможность выполнения продолжительной по времени мышечной работы до многих часов.

Для преобразования энергии, заключенной в **жирных кислотах**, в энергию связей АТФ существует метаболический путь окисления жирных кислот до CO₂ и воды, тесно связанный с циклом трикарбоновых кислот и дыхательной цепью. Этот путь называется **β-окисление**.

Реакции β-окисления происходят в митохондриях большинства клеток организма (**кроме нервных клеток**). Для окисления используются жирные кислоты, поступающие в цитозоль из крови или появляющиеся при липолизе собственных внутриклеточных ТАГ (триацилглицеролы, триглицериды, триацилглицерины, нейтральные жиры).



Электронно-транспортная цепь митохондрий является местом проведения окислительного фосфорилирования у эукариот. NADH и сукцинат, образовавшиеся в ходе цикла трикарбоновых кислот, окисляются, и их энергия передаётся АТФ-синтазе, которая за её счёт синтезирует АТФ.

Энергия, выделяющаяся при движении электронов по электронно-транспортной цепи (ЭТЦ), используется для транспорта протонов через внутреннюю митохондриальную мембрану в межмембранное пространство. Таким образом накапливается потенциальная энергия, слагающаяся из протонного градиента и электрического потенциала. Эта энергия высвобождается при возвращении протонов обратно в митохондриальный матрикс по их электрохимическому градиенту. Это возвращение происходит через особый белковый комплекс — **АТФ-синтазу**; сам процесс перемещения протонов по их электрохимическому градиенту получил название хемиосмос. АТФ-синтаза использует выделяющуюся при хемиосмосе энергию для синтеза АТФ из АДФ в ходе реакции фосфорилирования. **Эта реакция запускается потоком протонов, которые вызывают вращение части АТФ-синтазы; таким образом, АТФ-синтаза работает как вращающийся молекулярный мотор.**

После смерти содержание АТФ в клетках быстро снижается и когда становится ниже критического, поперечные мостики миозина не могут отсоединиться от актиновых нитей. Возникает трупное окоченение.

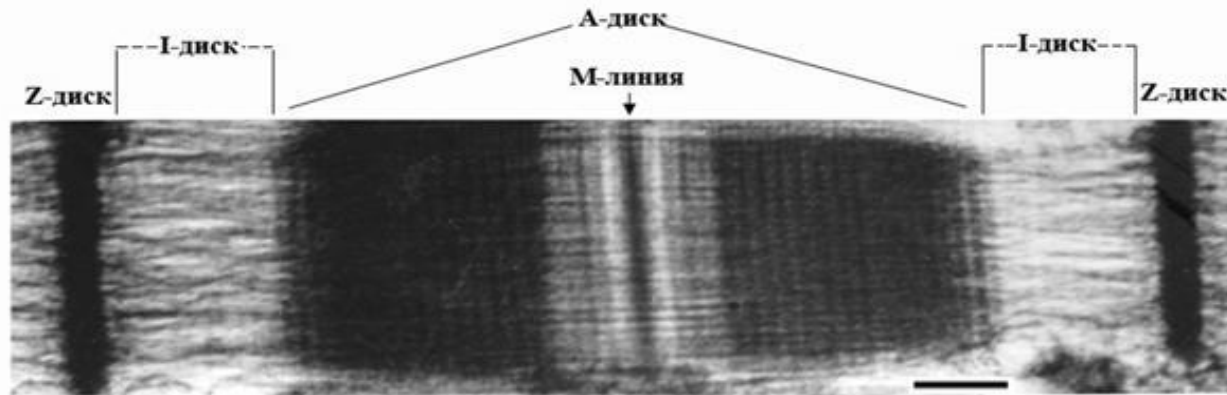
АТФ также необходима для расслабления потому, что обеспечивает работу кальциевого насоса.

Ферменты в толстых нитях поперечно-полосатых мышц позвоночных

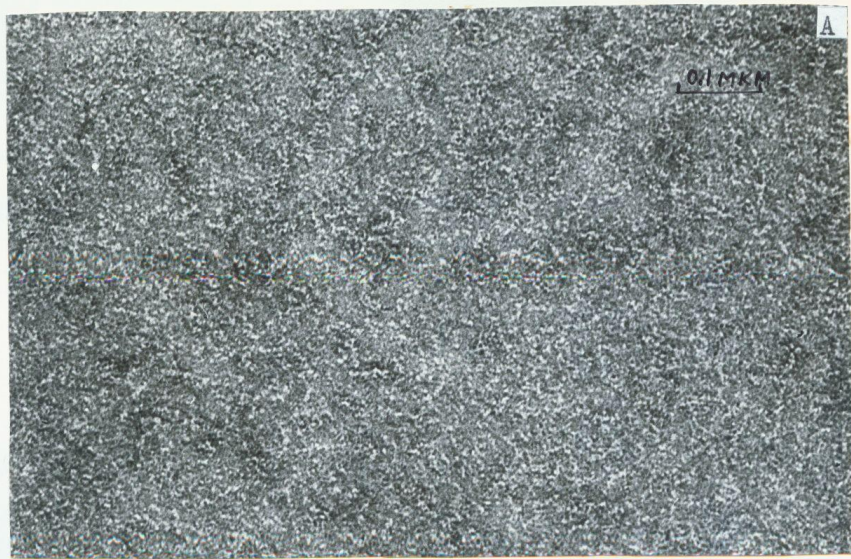
Известно, что толстая (миозиновая) нить поперечно-полосатых мышц позвоночных помимо основного белка миозина содержит ряд белков немиозиновой природы. Их принято называть минорными белками, так как их общее количество не превышает 5-10% от веса миозина.

Среди этих белков выявлены как белки **саркомерного цитоскелета** (титинового семейства), так и **ферменты**.

Полосы минорных белков в А-диске



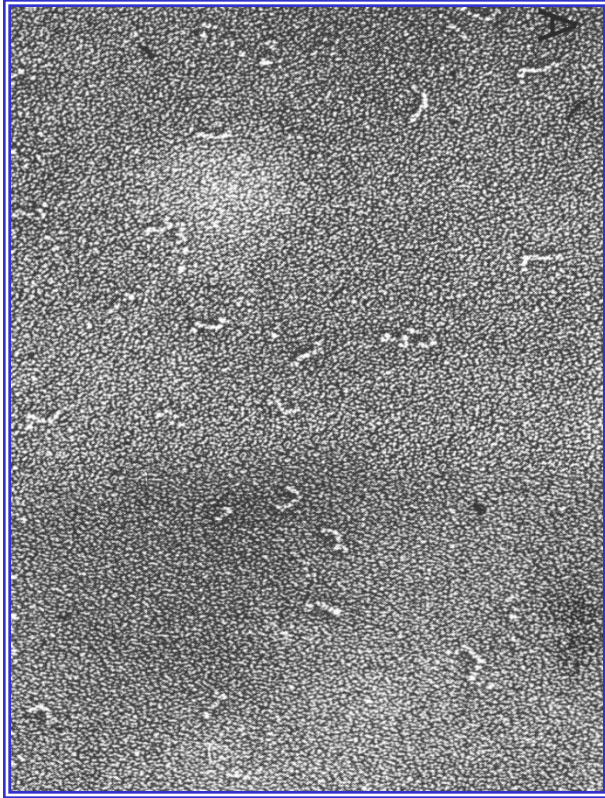
Эти полосы формируют миозин-связанные белки:
С-белок, Х-белок (МуВРС), Н-белок



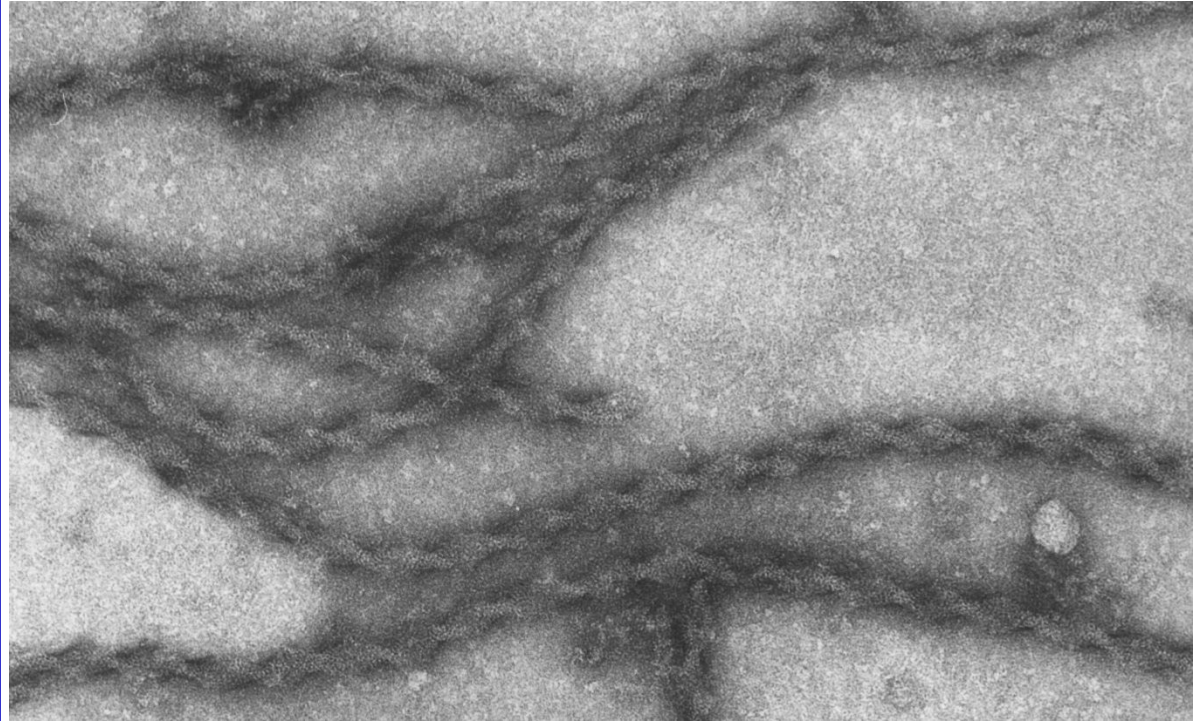
ЭМ исследование формы и размеров молекул С-белка

Рис.79 Микрофотографии С-белка ($C = 0.02-0.05$ мг/мл) в растворе 0.5 М КСI, 0.01 М имидазола, pH 7.1 (А); в растворе 0.5 М формиата аммония, pH 7.0 (Б); в растворе 0.5 М КСI, 0.01 М К-фосфата, pH 5.0 (В) /61/. Окрашивание 1% раствором JA. Увеличение $150000\times$.

Электронные микрофотографии молекулярной формы X-белка и образуемых им фибрилл.

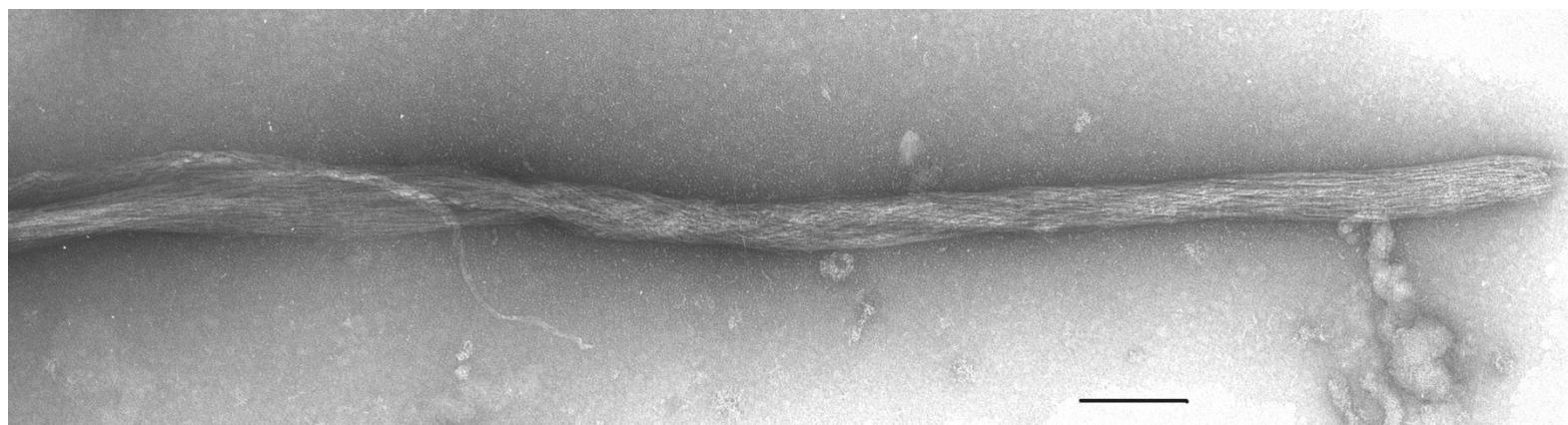
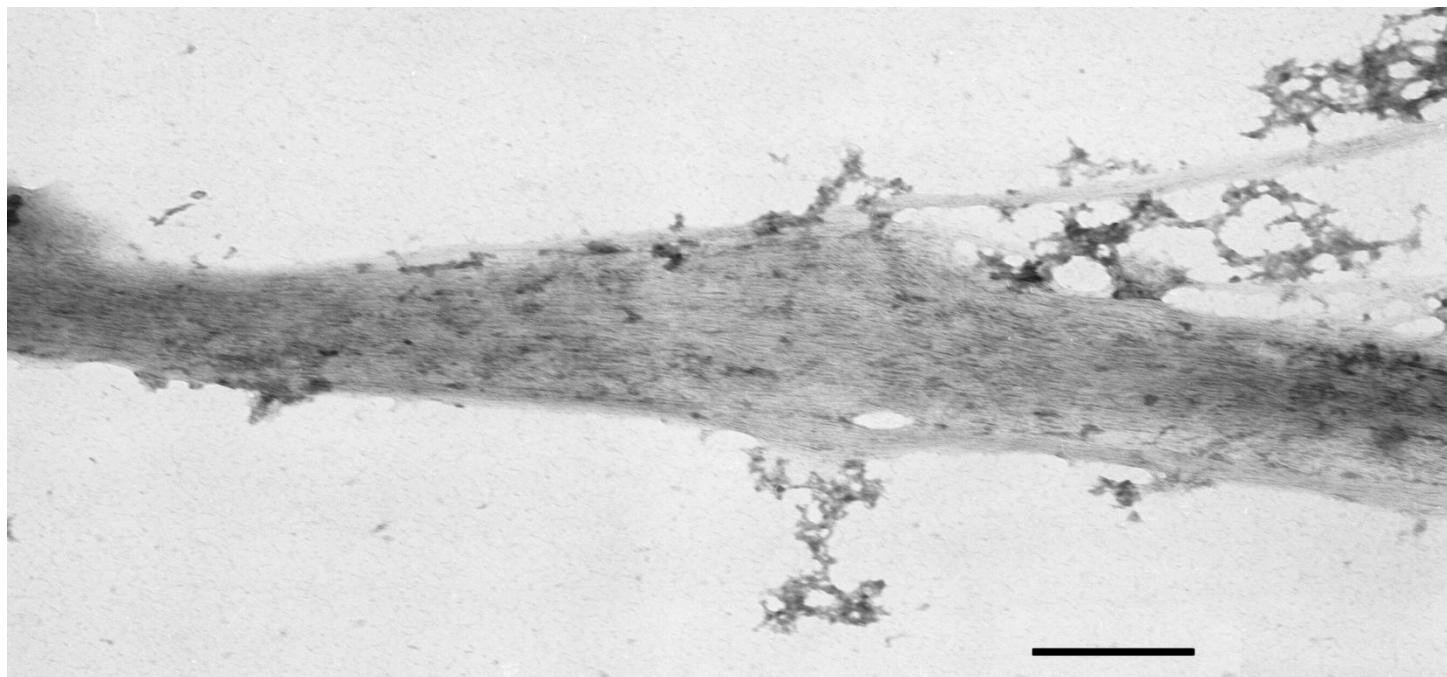


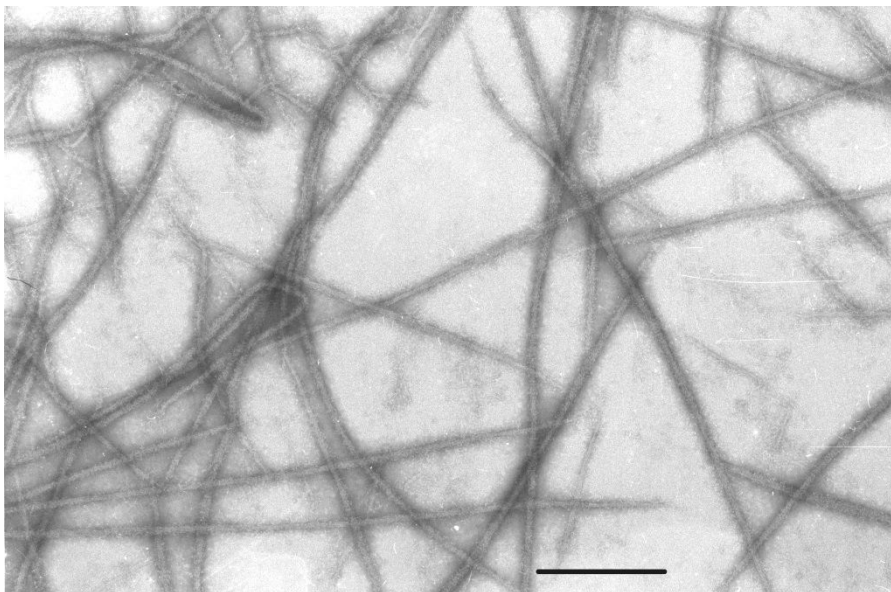
X-белок в молекулярной форме в растворе, содержащем 0.3М KCl, 10 мМ К-фосфат, рН 7.0.



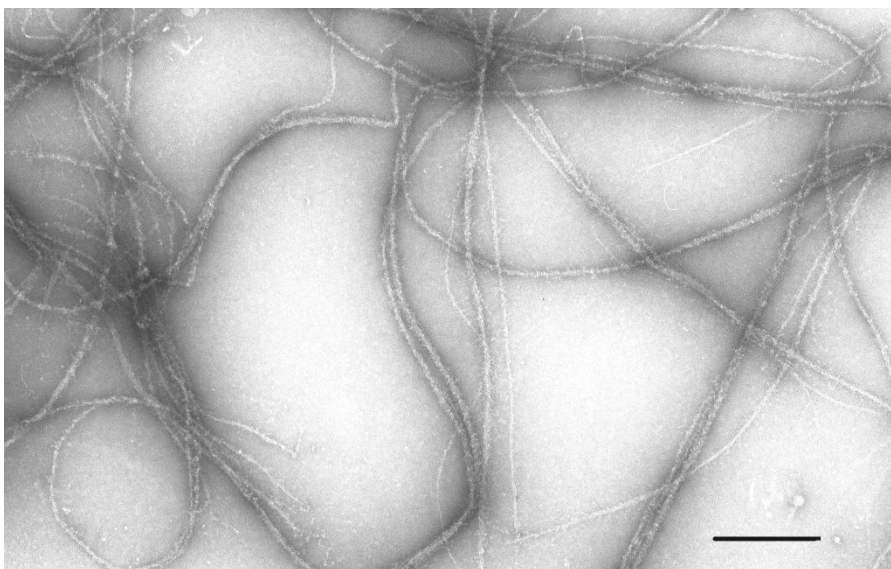
Спиральные ленточные фибриллы X-белка, образующиеся в растворах, содержащих 30 - 70 мМ KCl, 10 мМ имидазол-HCl, рН 7.0.

**Линейные агрегаты X-белка скелетных мышц кролика (А) и суслика (Б)
в растворе 0.1 М КСl, 10 мМ имидазол, рН 7.0. Шкала 200 нм**





Контрольные нити миозина



**Влияние С-белка на
структуру миозиновых
нитей**

Ферменты, связанные с толстыми нитями

**Как оказалось, толстые нити - это
биологическая подложка для
ферментативных систем,
сопряженных с АТФазой миозина!**

Первый фермент – Креатинкиназа

Фермент, катализирующий реакцию переноса фосфорильного остатка с креатинфосфата на АDP, в результате

Креатинкиназа



Известны 4 изоформы КК:

-ММ – в скелетных мышцах и сердце

-ВВ – в мозге и сердце

-МВ – в сердце

-МіМі – митохондриальная форма, катализирует реакцию образования креатинфосфата.

Локализация креатинкиназы: в цитоплазме и М-линии саркомера.

-предполагается, что фермент может связываться по всей длине толстых нитей.

-А зачем это? Какое физиологическое значение такого связывания?

-Т.о., креатинкиназа – *ambiquitous* фермент, присутствует не только в растворенной форме (в цитоплазме), но и в связанной (с миозиновыми нитями), находясь у стратегически важных участков мышечной клетки.

Функции креатинкиназы:

1. Структурная (в М-линии)
2. Ферментативная, заключающаяся в обеспечении быстрого ресинтеза АТФ.

Активация креатинкиназы начинается после накопления АDP и H⁺, при повышении работы АТФазы миозина.

А по мере расходования креатинфосфата начинают активироваться и другие системы ресинтеза и синтеза АТФ
Например, **аденилаткиназа**, катализирующая реакцию:



Второй фермент – АМФ-дезаминаза (тоже *ambiquitous* фермент)

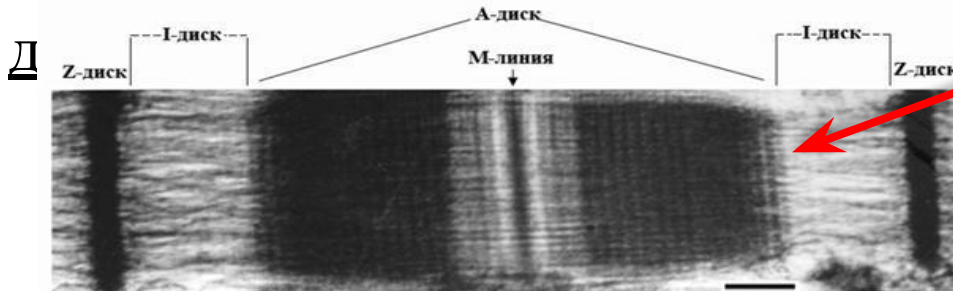
Катализирует реакцию дезаминирования (процесс удаления аминогрупп NH₂) адениловой кислоты до инозиновой с выделением аммиака



Её активность особенно высока в скелетных мышцах.

Но также обнаружен в эритроцитах, сердце, мозге, печени.

По данным ЭМ фермент связывается с миозиновыми нитями по всей их длине в саркомере, кроме «голой» зоны, но больше всего связывается на концах миозиновых нитей на каждом краю в А-

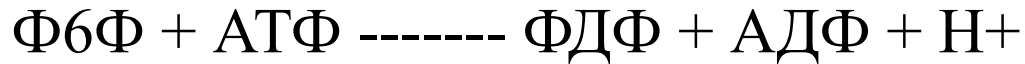


Функциональное значение АМФ-дезаминазы не ясно.
Возможно этот фермент участвует в цикле пуриновых нуклеотидов (АТФ, АДФ, АМФ, поддержании их баланса).

Аммиак может регулировать активность фосфофруктокиназы и пируваткиназы – основных ферментов гликолиза.

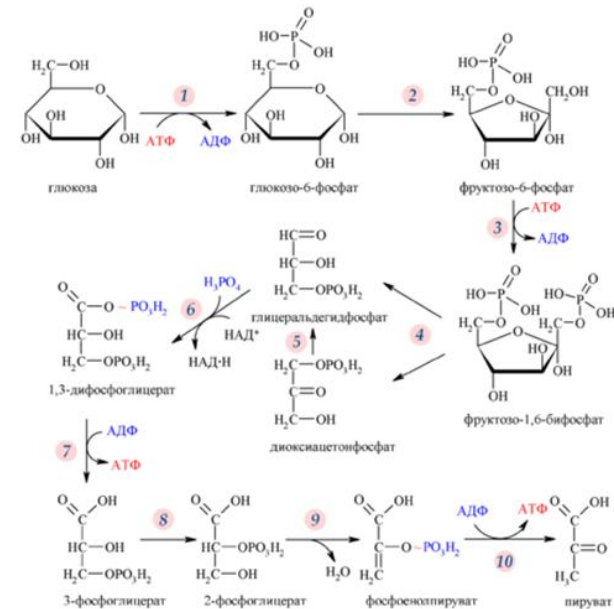
Третий фермент – фосфофруктокиназа или F-белок (тоже ubiquitous фермент).

Фермент, катализирующий центральную реакцию гликолиза:

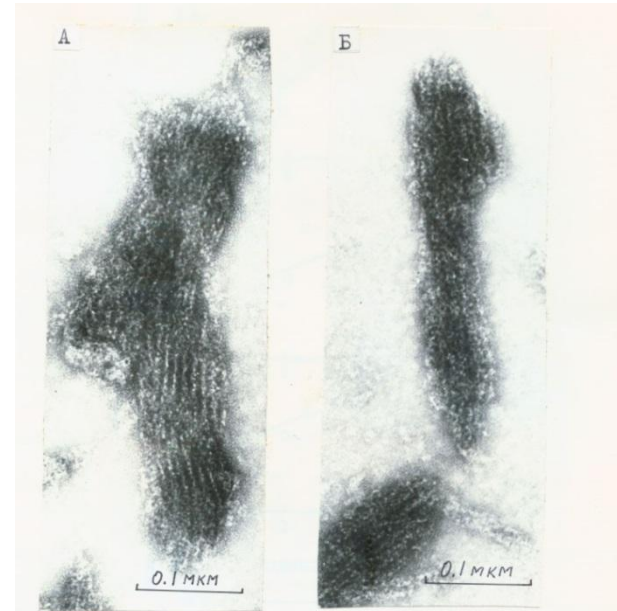


Было показано, что ФФК является постоянной примесью препаратов миозина и в виде минорного F-белка отделяется от миозина в процессе хроматографической очистки.

Как выглядит F-белок?



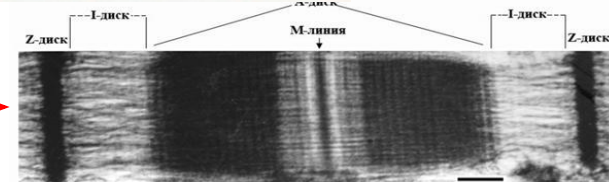
F-белок – фосфофруктокиназа (димер, 4нм)



Г Упорядоченные линейные агрегаты F-белка (0.05 мг/мл) в 0.2 М KCl, pH 6.3 (A,B), в 0.3 М KCl, pH 7.0 (B) /65/. Окрашивание 1% раствором UA. Увеличение: A, B – 248000x; B – 144000x.

89 Микрофотографии частиц F-белка. А – С = 0.1 мг/мл в 0.01 М KH_2PO_4 , pH 5.5. Б – С=0.2 мг/мл в 0.1 М KCl, 0.002 М Hepes, pH 6.0. В – С=0.06 мг/мл в 0.4 М KCl, 0.002 М Hepes, pH 8.0. Отмечается агрегация F-белка в олигомеры /65/. Окрашивание 1% раствором UA. Увеличение: А,Б – 210000x; В – 150000x.

Где расположен в саркомере ? →



F-белок связывается с миозином

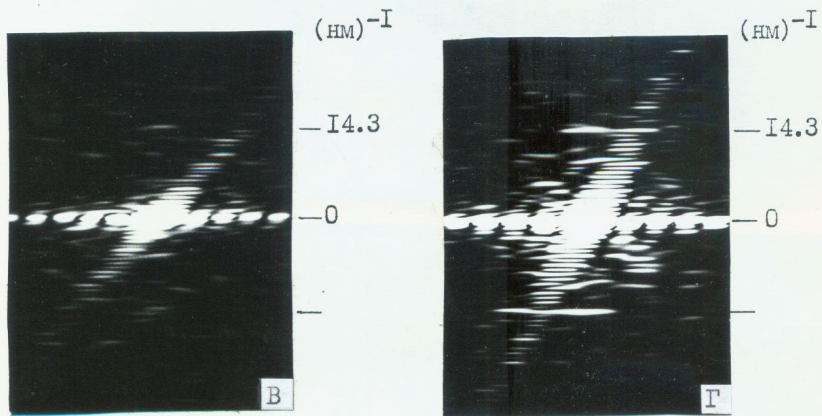
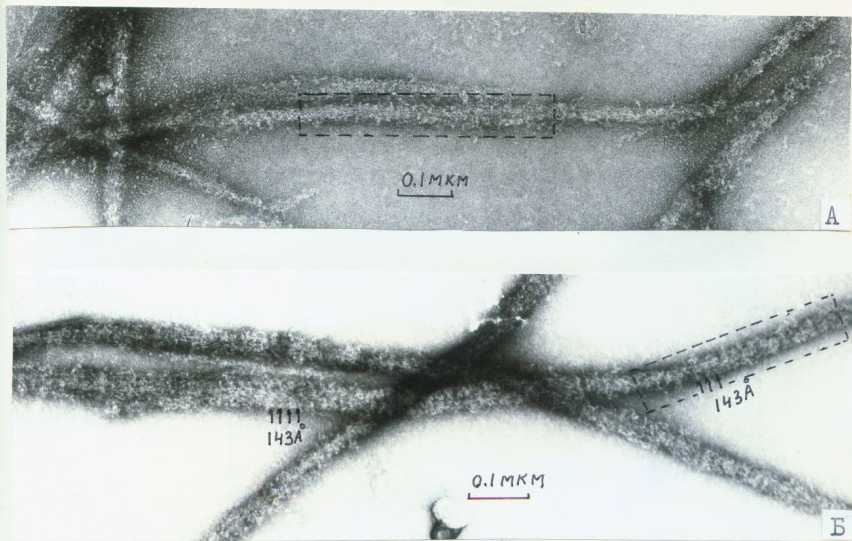


Рис.93 Микрофотографии нитей, формируемых миозином без F-белка в 0.1 М KCl, 0.01 М К-фосфатном буфере, pH 6.5 /68,69/ (А) и миозином с F-белком в весовом отношении 1:1 (общая концентрация 0.3 мг/мл) в том же растворе (Б). Отчетливо виден период ~143Å (Б). Окрашивание 1% раствором JA. Увеличение 120000x. В,Г - Картины оптической дифракции, полученные от участков миозиновых нитей, отмеченных, соответственно, на снимках А и Б. В отличие от (В) на картине (Г) виден сильный меридиональный рефлекс 14,3нм.

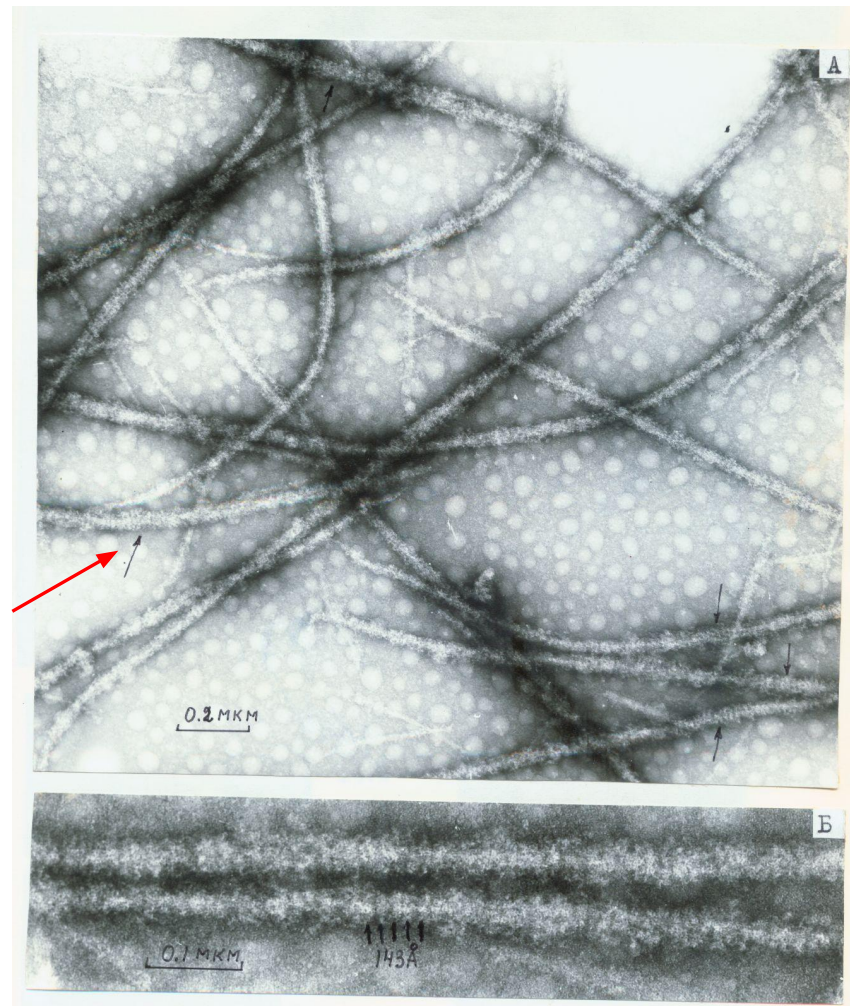


Рис.94 Микрофотографии нитей миозина декорированных F-белком в 0.1 М KCl, 0.005 трис-НСl буфере, pH 7.2 (0.3 мг/мл; весовое отношение M:F = 1:1). Хорошо виден период декорации F-белком (~ 143Å). Окрашивание 1% раствором JA. Увеличение: А - 70000x; Б - 190000x.

Связывание F-белка с актином

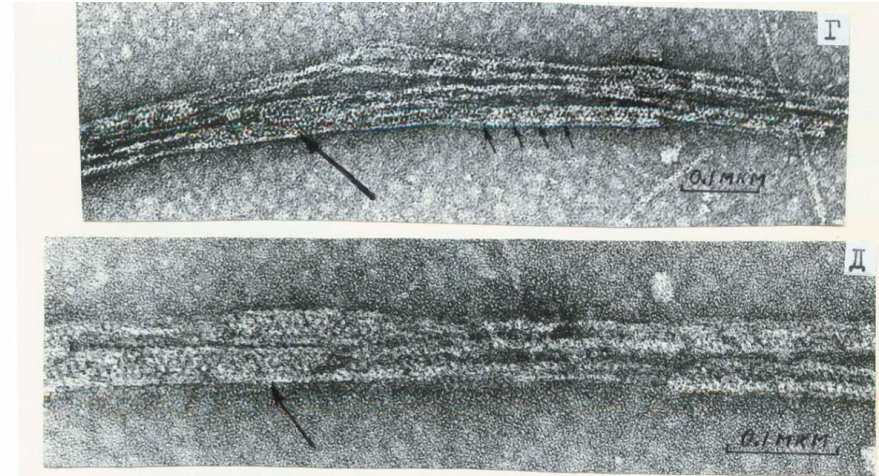
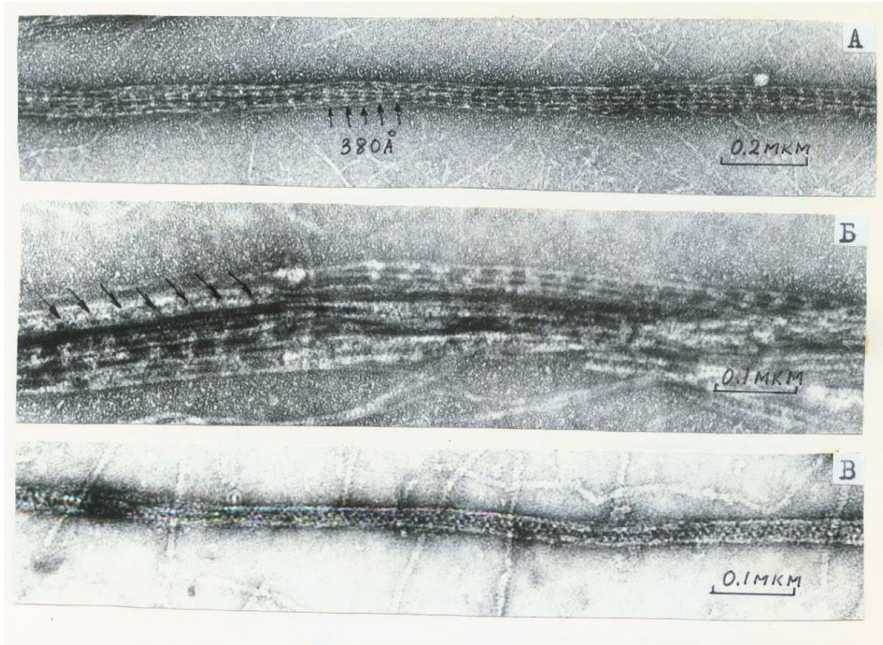


Рис.97 Пучки F-актина (А-В) и РТН (Г,Д) образующиеся в присутствии F-белка в растворе 0.1 М КС1, 10 мМ К-фосфата, рН 6.5 /73/. Молярное отношение F-актина к F-белку 4:1 (А), 1:1 (Б,В), 1:1,5 (Г,Д) в расчете на вес димера F-белка (160000). Короткие стрелки указывают на периодическое распределение F-белка в пучках (узкие и широкие мостики). Длинные стрелки - сплошное заполнение F-белком пространства между актиновыми нитями. Окрашивание 1% раствором УА. Увеличение: А - 83000х; Б,В - 150000х; Г - 130000х; Д - 280000х.

Связывание F-белка в саркомере – в районе первых 2-х поперечных полос из 11-ти.

**Но!
Возможно фермент связывается и по всей длине толстых нитей.**

+ связывается с актиновыми нитями.

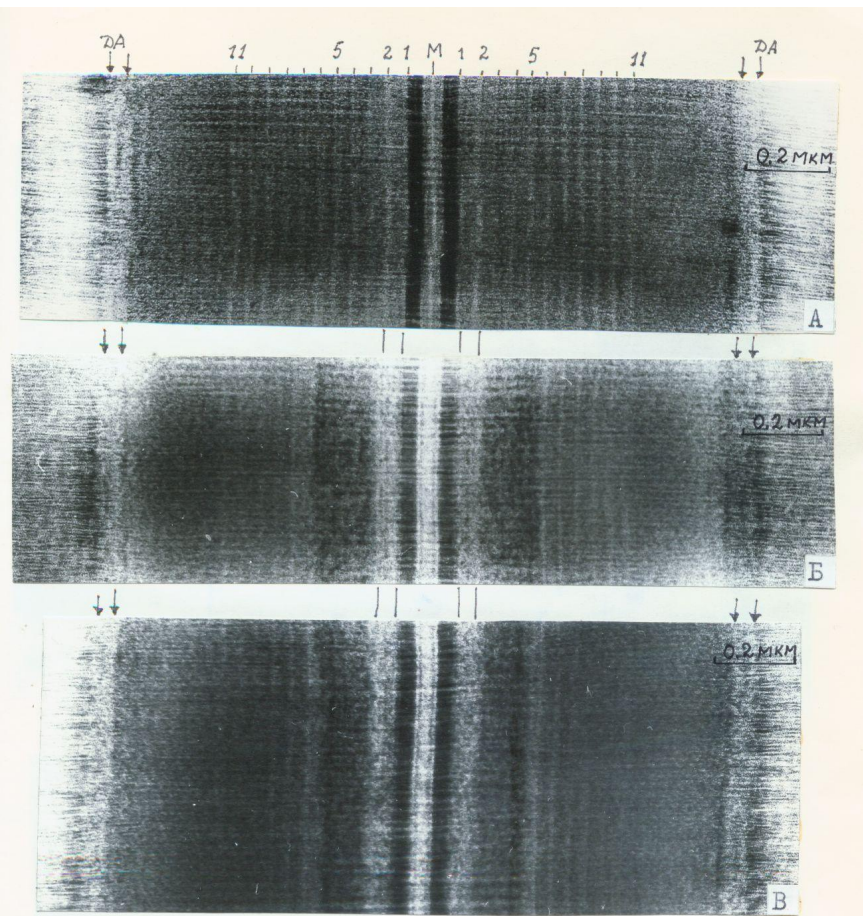


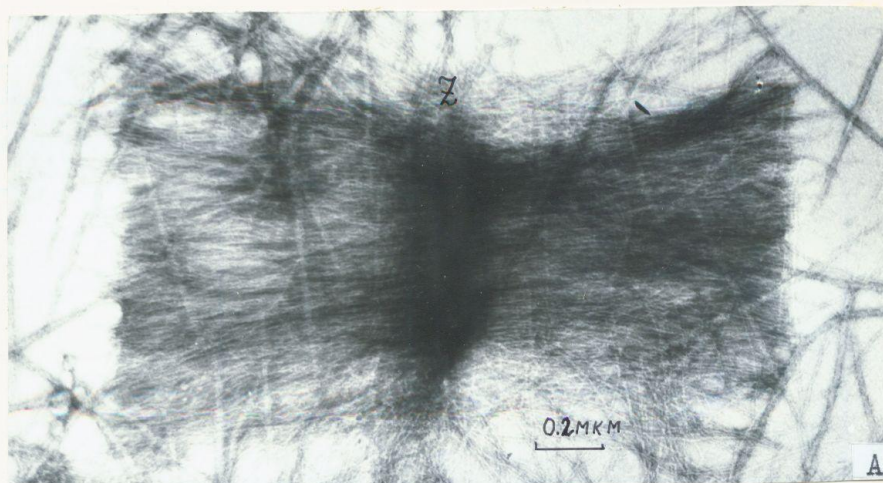
Рис.96 Локализация F-белка в А-дисках миофибрилл, изолированных из поясничной мышцы кролика /68/. А – контрольные миофибриллы. Отчетливо видны полосы минорных белков в М-, Р- и С-зонах. На каждом крае А-диска видны две светлые полосы, одна из которых (краевая) – полоса локализации АМФ-деаминазы (ДА). Б, В – миофибриллы, обработанные на электронно-микроскопической сетке поликлональными антителами к F-белку. IgG-Фракция антисыворотки к F-белку (1мг/мл) находилась в растворе, содержащем 85 мМ К-ацетата, 5 мМ Mg-ацетата, 5 мМ ЭГТА, 15 мМ трис-НСI, pH 7.0. Обработку миофибрилл проводили в течении 30мин при 20°C. Затем миофибриллы фиксировали 2,5% раствором глутаральдегида, промывали несколькими каплями 0.1 М ацетата аммония и окрашивали 1% раствором молибдата аммония. Увеличение белковой плотности (светлые широкие полосы) отмечается между двумя первыми полосками в Р-зоне (возле М-линии). Увеличение 77000х. Антитела к F-белку были найдены в этой же области А-дисков и на продольных срезах поясничной мышцы кролика /51/.

Итак, резюме:

Значение адсорбции ферментов, участвующих в метаболизме энергии (т.е., не только трёх вышеупомянутых), на толстых нитях состоит в максимальном их приближении к местам потребления АТФ, т.е. к головкам миозина; этим достигается уменьшение времени доставки «макроэргов» для сокращения.

Толстую нить можно рассматривать как высокоорганизованный мультиферментный комплекс, состав которого может изменяться в зависимости от функционального состояния мышечной клетки.

**Благодарю
за
внимание!**



**Убедительное
доказательство
связывания С-белка
с актином**

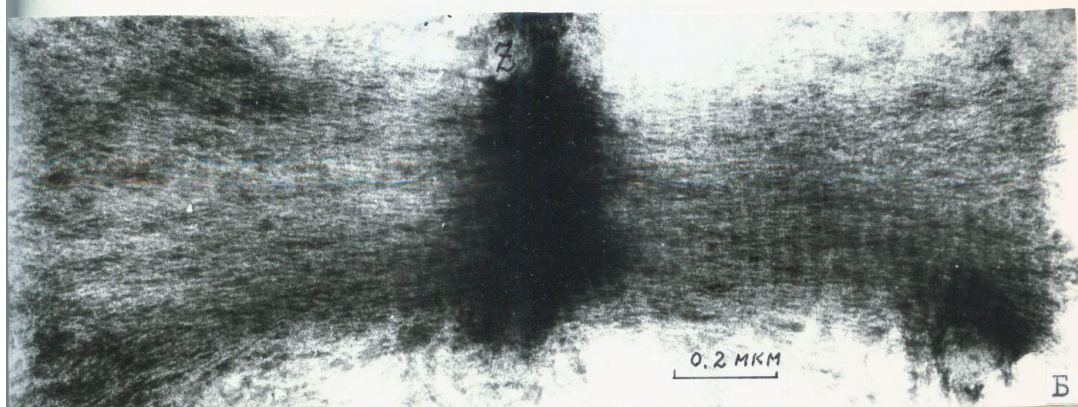


Рис. 83 Микрофотографии изолированных I-дисков ("Z-щетки") в растворе 0.1 М КСI, 0.01 М $MgCl_2$, 0.001 М ЭГТА, 0.001 М дитиотрейтола, 0.005 М АТФ, 0.007 М К-фосфата, рН 6.9 до (А) и после обработки их С-белком (Б). Связывание С-белка приводит к появлению осевой периодичности ($\sim 385\text{\AA}$) в "Z-щеткаx". Изолированные I-диски получали по методу, описанному в работе /78/. Окрашивание 1% раствором УА. Увеличение: А - 55000x; Б - 87000x.