

Caracterización de la estructura del subfragmento S1 de la miosina

José García de la Torre, Pelayo Mellado Jiménez y María del Carmen López Martínez
Departamento de Química Física, Facultad de Ciencias Químicas y Matemáticas, Universidad de Murcia

Recibido: 7-5-85
Aceptado: 30-10-85

Characterization of the structure of the myosin subfragment S1

Abstract: This work is an attempt to characterize the flexibility of myosin, which plays a central role in muscle contraction. We have first studied the structure of the myosin subfragments S1 («myosin heads»). We have found that an ellipsoidal structure having a hole near one of the ends, explains the experimental values of a number of properties (sedimentation and diffusion coefficients, intrinsic viscosity, radius of gyration, X-ray scattering intensities). Furthermore, this structure explains the shapes observed by electron microscopy as a result of strong dehydration.

Key-words: myosin, head, transport-properties, X-ray scattering, dehydration.

INTRODUCCIÓN

Es bien conocido que la miosina es el agente esencial en un proceso tan importante para la vida como es la contracción muscular. El fundamento de la actual investigación sobre la base molecular de la contracción muscular es el modelo del filamento deslizante de Huxley (1).

De los dos filamentos que aparecen en el músculo, el grueso contiene miosina, y el delgado está formado por actina. Mediante estudios de degradación enzimática se ha demostrado que la miosina está compuesta por cuatro fragmentos. Por microscopía electrónica se observa que la miosina contiene una porción fibrosa, denominada varilla («rod»), existiendo en un extremo de la misma dos porciones globulares denominadas «cabezas» o subfragmentos S1. La varilla es susceptible de ataque proteolítico, dando lugar a los otros dos subfragmentos denominados meromiosina ligera, LMM, y subfragmento S2.

La estructura de la miosina se indica esquemáticamente en la figura 1. La base del mecanismo de Huxley consistió en suponer que las dos zonas que conectan los cuatro subfragmentos se comportan como articulaciones parcial-

mente flexibles. Así, la varilla se puede doblar, entrando en contacto las cabezas de miosina con el filamento delgado. Además, las dos cabezas pueden moverse una respecto a la otra, y ambas respecto al S2, produciéndose de esta manera un desplazamiento neto del filamento delgado respecto al grueso (figura 1).

La flexibilidad de las articulaciones se ha comprobado por varias técnicas. La comprobación más evidente es, quizás, la realizada mediante microscopía electrónica por Elliot y Offer (2). Estos autores observaron en las imágenes del microscopio electrónico que los S1 pueden adoptar una gran variedad de orientaciones respecto al S2, y lo mismo ocurre entre el S2 y la LMM. Sin embargo, tal observación es meramente cualitativa, no siendo posible precisar cuantitativamente el grado de flexibilidad pues, entre otros motivos, la flexibilidad de las articulaciones podría haber sido fuertemente alterada durante la preparación de la muestra.

Se aprecia así el interés de caracterizar la flexibilidad de la miosina en disolución, analizando los múltiples datos disponibles de las propiedades hidrodinámicas mediante la teoría que pretendemos desarrollar para macromoléculas

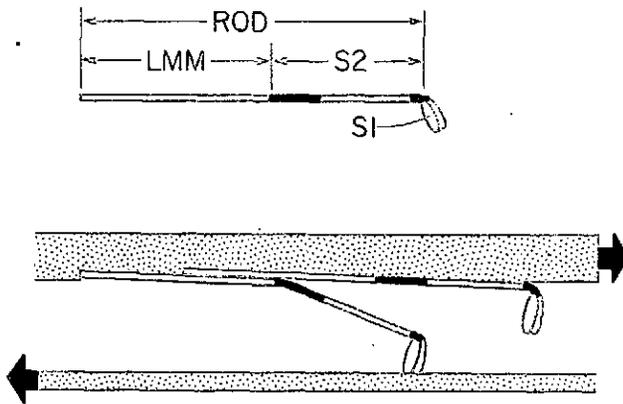


FIGURA 1. Estructura de la miosina, con indicación de los cuatro subfragmentos. En la parte inferior se representa esquemáticamente el mecanismo de contracción de Huxley.

articuladas. Esto implica un requisito previo: conocer con precisión la estructura (tamaño y forma) de los subfragmentos rígidos. No hay grandes dificultades en los casos de S2 y LMM, por tratarse de estructuras helicoidales con un aspecto global aproximadamente cilíndrico. Sin embargo, el conocimiento actual de las cabezas (S1) es muy escaso, existiendo de hecho una fuerte controversia acerca de su estructura, como expondremos en el apartado II.1.

ESTRUCTURA DEL SUBFRAGMENTO S1 («CABEZA») DE MIOSINA

ANTECEDENTES

Son muchas las propiedades físicas del S1 que se han determinado experimentalmente: peso molecular, M ; volumen específico parcial, \bar{V} ; viscosidad intrínseca, $[\eta]$; coeficiente de sedimentación, s ; coeficiente de difusión rotacional, D_r ; radio de giro, R_G ; diagrama de dispersión de rayos X, etc. Algunos de estos datos se encuentran reunidos en la tabla I.

A pesar de tan abundante información acerca de las propiedades, hay actualmente una fuerte controversia sobre la estructura de S1. Uno de los motivos fundamentales es que, como después mostraremos, la S1 es una proteína muy hidratada. Elliot y Offer (2), observaron la S1 por microscopía electrónica, encontrando que presentaba un aspecto similar al de una pera, con un tamaño en la dirección de máxima elongación de casi 200Å. No es probable, sin embargo, que esa forma se dé en disolución o en el músculo, pues durante la preparación de la muestra para microscopía electrónica, la S1 tiene necesariamente que distorsionarse al sufrir una fuerte deshidratación.

Yang y Wu (3), analizaron datos hidrodinámicos de S1 en disolución en términos de estructuras elipsoidales, encontrando que las propiedades hidrodinámicas de S1 podrían corresponder desde un elipsoide alargado de relación axial 5, a un achatado con relación axial de 9. Además, su análisis indicaba que la hidratación, δ (gramos de agua por gramo de proteína, g/g), podía alcanzar valores tan altos como 1.5. Si bien el trabajo de estos autores no es concluyente en lo que se refiere a la estructura, sí parece serlo, al menos, en lo relativo a la elevada hidratación de la S1.

Mendelson y Kretschmar (4) han estudiado dos propiedades de equilibrio, el radio de giro y el diagrama de dispersión de rayos X, encontrando que ni la forma de pera ni los elipsoides dan lugar a un buen acuerdo con el diagrama experimental de dispersión. Hay que notar que estos autores no hicieron uso de las propiedades hidrodinámicas.

Con todo esto, resulta claro que no existía hasta ahora ningún modelo capaz de justificar satisfactoriamente las propiedades de equilibrio y transporte de la cabeza de miosina.

MODELO Y MÉTODOS

Los modelos elipsoidales son extraordinariamente útiles para analizar propiedades hidrodinámicas de proteínas globulares, pues se dispone para ellos de ecuaciones relativamente sencillas (Yang, (5)). Aunque la estructura terciaria de cualquier proteína no es exactamente elipsoidal, la capa de hidratación desdibuja en buena medida los entrantes y salientes típicos de la estructura terciaria. Así, el elipsoide

TABLA I
Valores experimentales de las propiedades del subfragmento S1

	$s_{4,0}^0(S)$	$10^{-5} \theta^0(\text{sec}^{-1})$	$[\eta](\text{cm}^3/\text{g})$	$M(\text{daltons})$	$R_G(\text{Å})$	$\bar{V}_d(\text{mL/g})$
<i>min</i>	3.25 ^a	6.00 ^b	5.90 ^c	107000 ^a	32.0 ^j	0.717 ^o (26°C)
<i>media</i>	3.30 ^a	6.90 ^b	6.44 ^c	110300	33.0	0.728
<i>max</i>	3.35 ^a	8.00 ^b	7.10 ^c	115000 ^a	35.0 ^k (?)	0.740 ^q (?)
otros valores		6.67 ^e (20°C)	6.40 ^f (20°C)	108000 ^a	32.8 ^s	0.735 ^q (?)
		7.58 ^g (20°C)		110000 ^h	32.4 ^l	0.729 ^q (?)
		10.22 ^g (20°C)		109000 ^s	32.7 ^m	0.720 ^h
				113000 ⁱ		0.730 ^l

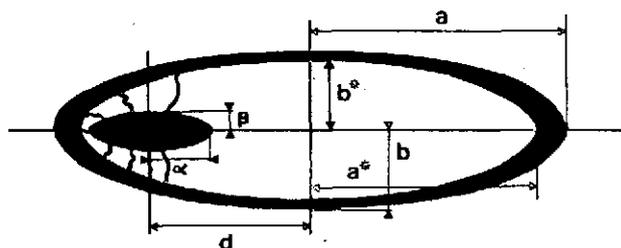


FIGURA 2. Modelo propuesto en este trabajo para el subfragmento S1. Las zonas oscuras representan el agua de hidratación.

es, al menos, un modelo adecuado desde el punto de vista de las propiedades hidrodinámicas. Teniendo en cuenta que, por otra parte, el elipsoide falla en la predicción del diagrama de dispersión, es necesario introducir en él alguna peculiaridad. A la vista de la elevada hidratación, en este trabajo hemos supuesto que dentro del elipsoide hay un hueco lleno de agua, que permanece unida a la proteína. Parece lógico que el hueco se encuentre próximo a uno de los extremos, comunicándose con el exterior bien directamente (por estar precisamente en el extremo) o bien a través de pequeños canales que atraviesan una zona hidrofílica de la proteína.

El modelo se encuentra representado esquemáticamente en la figura 2. Suponemos que se trata de un elipsoide alargado, con semiejes a^* y b^* . La envolvente de la capa de hidratación es también elipsoidal, con semiejes a y b . El hueco, también elipsoidal, tiene unos semiejes α y β y su centro está situado a una distancia d del centro del elipsoide mayor. Suponemos que la relación axial es la misma para los tres casos, esto es,

$$a/b = a^*/b^* = \alpha/\beta = p > 1$$

Para el cálculo de propiedades hidrodinámicas, el hueco interno no interviene, ya que no está expuesto al disol-

vente exterior, excepto en lo relativo a la cantidad de agua de hidratación. Por ello, el análisis de estas propiedades puede efectuarse mediante las ecuaciones de Yang que permiten, a partir de un par de propiedades, y supuesto un valor para p , calcular a y δ .

Las dimensiones del elipsoide no son mutuamente independientes. Así, a y b por un lado, y a^* y b^* por otro, están relacionadas a través de la hidratación, δ . La fórmula que hemos obtenido para expresar esta relación es

$$b^{*3} = b^3 [V_{sp}/(\bar{V} + \delta V_1^0)] + \beta^3$$

siendo V_{sp} y V_1^0 los volúmenes específicos de la proteína y del agua libre, respectivamente. V_{sp} puede obtenerse fácilmente a partir de los datos experimentales del peso molecular y volumen.

Existe además la evidente restricción geométrica de que el hueco debe estar completamente comprendido en el interior de la proteína, esto es,

$$d \leq a^* - \alpha$$

Desde el punto de vista de la dispersión de rayos X (radio de giro y diagrama de dispersión), el agua de hidratación, tanto externa como interna, no cuenta, de manera que las únicas variables a considerar son b^* , β , d y p .

Para el radio de giro de un elipsoide hueco, utilizando el teorema de Steiner de los momentos de inercia, hemos obtenido la siguiente expresión:

$$R_G^2 = [(p^2 + 2)/5](b^{*5} - \beta^5)/(b^{*3} - \beta^3) - d^2 \beta^3 (b^{*3} - 2\beta^3)/(b^{*3} - \beta^3)^2$$

Para el cálculo del diagrama de dispersión de rayos X, seguimos un procedimiento similar al de Mendelson y Kretzschmar (4), consistente en sustituir el modelo continuo por una versión discreta del mismo. Para ello, el elipsoide se «rellena» mediante simulación en ordenador de pequeñas esferas empaquetadas al máximo (naturalmente, el hueco se deja vacío). La intensidad de radiación X dispersada se calcula en términos de la variable hR_G , donde

TABLA II
Valores de a deducidos para cada propiedad hidrodinámica

p	[η]			s^0			θ^0			$2\bar{a}$ (Å)	Δ_s (Å)	$2a^*$ (Å)
	min	media	max	min	media	max	min	media	max			
1.0	94	97	101	93	103	112	100	105	110	102	100-101	100.5
1.5	121	125	131	120	133	145	122	129	135	129	120-131	125.5
2.0	142	146	152	142	157	171	138	145	152	149	142-152	147.0
2.3	152	156	163	154	167	183	144	152	159	158	154-159	156.5
2.5	159	163	171	162	174	191	148	156	163	164	162-163	162.5
3.0	172	176	185	177	191	211	156	164	172	177	—	—
3.5	183	187	198	187	207	226	163	171	179	188	—	—
4.0	193	197	207	198	219	239	167	175	181	197	—	—



$$h = (4\pi/\lambda)\text{sen}(\theta/2)$$

siendo λ la longitud de onda de la radiación empleada y θ el ángulo de observación. Para dicho cálculo se emplea la conocida ecuación de Debye, en la que además de h interviene únicamente las distancias entre los pares de esferas. El tamaño de las esferas que hemos utilizado para esta versión discreta del modelo es de $2,3\text{\AA}$, lo cual supone que el número de esferas es próximo a 2.000.

RESULTADOS

Mediante el procedimiento de Yang, hemos calculado los valores de $2a$ y δ para cada una de las propiedades hidrodinámicas. Los resultados están presentados en las tablas II y III. En ellas se ha repetido el proceso para los valores experimentales máximo, mínimo y medio, dando lugar a los valores de $2a$ indicados como «max», «min» y «mean». $2\bar{a}$ representa al promedio de los tres valores medios. Δ_s es la intersección de los tres rangos de variación, y $2a^+$ es el punto medio de la intersección, representando el valor más probable de $2a$. Es este el valor que damos como resultado final del análisis de datos hidrodinámicos. El mismo procedimiento y la misma notación se emplean para δ en la tabla III.

De las tablas II y III se desprende que p está comprendido entre 1.0 ($2a=100\text{\AA}$, $\delta=2.0\text{ g/g}$) y 2.5 ($2a=162$, $\delta=1.24$). Nótese que este procedimiento tiene el inconveniente de no dar un valor de p sino un rango de posibles valores.

Consideremos a continuación el radio de giro, R_G . Supongamos en primer lugar elipsoides sin hueco. En tal caso, la expresión de R_G se reduce a

$$R_G = b^* [(p^2+2)/5]^{1/2}$$

donde b^* viene dado por

$$b^* = b[V_{sp}/\bar{V} + \delta V^0]^{1/3}$$

Tomamos $b=a/p$, eligiendo para a el \bar{a} de la tabla II, y lo mismo para δ . De esta manera, al tabular R_G en función de p se aprecia que tan sólo valores entre 3,0 y 3,5 dan resultados para R_G comprendidos dentro del rango de valores experimentales ($32-35\text{\AA}$, según tabla I). Este rango de p no coincide con el que se obtiene de datos hidrodinámicos.

Además, hemos calculado las curvas de dispersión, $I(hR_G)$ para $p=3$ y $3,5$, encontrando que discrepan fuertemente de las curvas experimentales. Por todo ello podemos afirmar que el elipsoide sin hueco no es un modelo adecuado para el subfragmento S1.

Veamos a continuación lo que ocurre para el elipsoide con hueco. De la ecuación general de R_G es posible despegar d en función de b^* , β y p . Para R_G tomamos el valor experimental de $33,0\text{\AA}$. Resulta que únicamente se obtienen valores de d compatibles con la condición de que $d+\alpha$ sea menor que b^* para p menor que 3,2.

Hemos efectuado un buen número de cálculos de la función (hR_G variando la posición y dimensiones del hueco. Observamos la interesante circunstancia de que para hR_G menor que 4, la curva depende fuertemente de p pero varía muy poco con las características del hueco. Esto nos permitió ajustar el valor óptimo de p , que se obtuvo igual a 2,3. Fijando este p , variamos a^* y la anterior ecuación nos suministró una serie de valores para las magnitudes del hueco, que están reunidas en la tabla IV. Para cada uno de los conjuntos de valores de esta tabla hemos calculado la función de dispersión $I(hR_G)$, obteniendo los resultados representados en la figura 3, en la cual las líneas continuas corresponden a los valores calculados y la discontinua es la curva experimental. El mejor acuerdo parece corresponder a la curva 4. Concluimos entonces que los mejores parámetros estructurales de S1 según el modelo del elipsoide con hueco son los correspondientes a esta curva:

$$\begin{array}{lll} a^* = 59,5\text{\AA} & b^* = 25,9\text{\AA} & d = 20,5\text{\AA} \\ \alpha = 39,0\text{\AA} & \beta = 17,0\text{\AA} & \end{array}$$

Conociendo de esta manera el tamaño del hueco, podemos deducir que de los 1.4 g/g de hidratación total, las cantida-

TABLA III
Valores de δ deducidos para cada propiedad hidrodinámica

p	$\delta(\text{g/g})$								$\bar{\delta}(\text{g/g})$	$\Delta\delta(\text{g/g})$	$\delta^+(\text{g/g})$	
	$[\eta]$		s^0		θ^0							
	mín	máx	mín	máx	mín	máx						
1.0	1.62	1.85	2.12	1.65	2.34	3.70	1.92	2.49	3.10	2.22	1.92-2.12	2.02
1.5	1.50	1.72	1.98	1.55	2.21	3.51	1.92	1.92	2.41	1.94	1.55-1.98	1.77
2.0	1.28	1.49	1.72	1.37	1.96	3.15	1.03	1.41	1.82	1.61	1.37-1.72	1.54
2.3	1.15	1.35	1.36	1.24	1.83	2.92	0.81	1.15	1.51	1.44	1.24-1.51	1.37
2.5	1.07	1.25	1.46	1.16	1.73	2.78	0.66	0.97	1.31	1.31	1.16-1.31	1.24
3.0	0.86	1.04	1.21	1.00	1.50	2.50	0.40	0.64	0.91	1.06	—	—
3.5	0.68	0.83	1.00	0.86	1.31	2.24	0.21	0.42	0.42	0.85	—	—
4.0	0.53	0.65	0.81	0.71	1.12	1.96	0.05	0.22	0.41	0.66	—	—

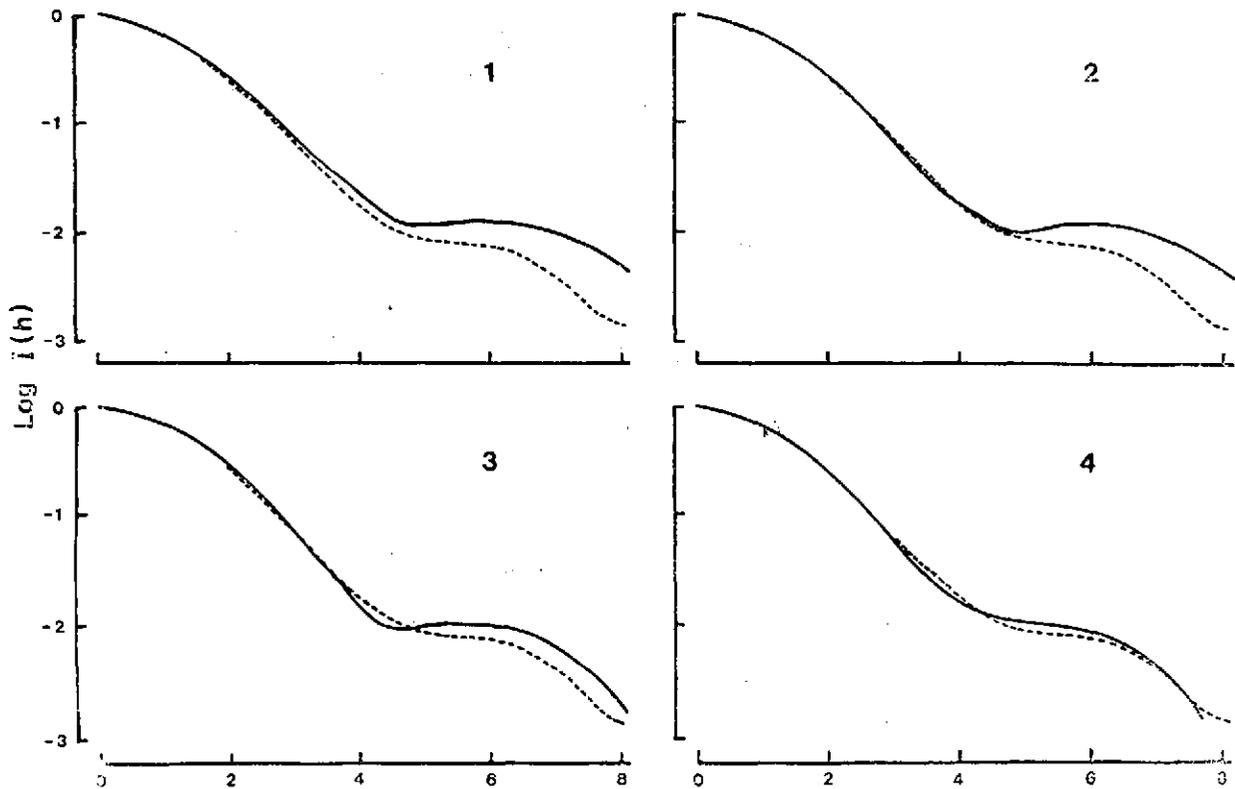


FIGURA 3. Curvas de dispersión de rayos X, $I(hR_G)$, correspondientes a los cuatro conjuntos de parámetros estructurales contenidos en la Tabla IV.

TABLA IV

Dimensiones del modelo acordes con las propiedades hidrodinámicas y radio de giro

	a*(Å)	b*(Å)	d(Å)	α (Å)	β (Å)
(1)	58.0	25.2	0	35.0	15.2
(2)	58.5	25.4	11.3	36.3	15.8
(3)	59.0	25.7	18.6	37.7	16.4
(4)	59.5	25.9	20.5	39.0	17.0

des correspondientes a hidratación externa e interna son, respectivamente, 1,2 y 0,2.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El grado de hidratación que hemos encontrado para el subfragmento S1, 1,4g/g, es apreciablemente mayor que el de muchas proteínas globulares, que suelen presentar valores de 0,3-0,5. Esta circunstancia, de hecho, ya había sido observada por Yang y Wu (3). Cuando el S1 se somete a

las manipulaciones necesarias para preparar la muestra para microscopía electrónica, debe sufrir una deshidratación prácticamente total. Al verse privada del agua de hidratación que llena el hueco, la macromolécula se comprimirá apreciablemente en el extremo donde el hueco está situado. (Nótese que los parámetros estructurales que hemos obtenidos indican que el hueco está situado prácticamente sobre uno de los extremos del elipsoide). De esta manera, el S1 puede aparecer perfectamente con una forma de pera, como observaron Elliot y Offer (2).

Mendelson y Kretzschmar (4) encontraron que ni los elipsoides (sin hueco) ni el modelo de pera ajustaban bien la función $I(hR_G)$ experimental. Sin embargo, sí obtenían un buen acuerdo para un modelo basado en una reconstrucción tridimensional de las imágenes en microscopía electrónica de paracrístales de actina «decorados» con S1. Nosotros encontramos dos inconvenientes en ese modelo. En primer lugar, dichos autores no comprobaron si el modelo predice correctamente las tres propiedades hidrodinámicas. Creemos que esto es un requisito esencial para juzgar si un modelo es o no realista para el S1 en disolución o condiciones fisiológicas. En segundo lugar, es muy problemático comparar datos experimentales en disolución (tanto los hidrodinámicos como los de dispersión de r-X)

con valores calculados para un modelo basado en microscopía electrónica, especialmente para proteínas tan hidratadas como el S1.

En resumen, podemos afirmar que el modelo que hemos propuesto en este trabajo, además de justificar la forma de pera observada microscópicamente por Elliot y Offer, predice correctamente tres propiedades hidrodinámicas (coeficiente de sedimentación, viscosidad intrínseca y coeficiente de difusión rotacional) y dos propiedades de equilibrio (radio de giro y diagrama de dispersión de rayos X). Ninguno de los modelos considerados en trabajos anteriores da lugar a un mejor acuerdo con los datos experimentales de todas estas propiedades.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Dr. Jean Morel (Service de Biophysique, Centre D'Etudes Nucleaires de Saclay, Francia) la colaboración prestada en este trabajo, que fue financiado mediante una Ayuda del Comité Mixto de Investigación Diputación - Universidad de Murcia, y una Subvención de la Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica al Proyecto 555/81.

BIBLIOGRAFÍA

- 1 HUXLEY, H. E.: *Science*, **164**, 1356, (1969).
- 2 ELLIOT, A. y OFFER, G.: *J. Mol. Biol.*, **123**, 505 (1978).
- 3 YANG, J. T. y WU, C.C.: *Biochemistry*, **16**, 5785 (1977).
- 4 MENDELSON, R. M. y KRETZSCHMAR, K. M.: *Biochemistry*, **19**, 4103, (1980).
- 5 YANG, J. T.: *Adv. Protein Chem.* **16**, 323, (1961).
- 6 MOREL, J. E. y GARRIGOS, M.: *Biochemistry*, **21**, 26-29 (1982).
- 7 KOBAYASHI, S. y TOTSUKA, T.: *Biochim. Biophys. Acta*, **376**, 375 (1975).
- 8 THOMAS, D. D.; SEIDEL, J. C., HYDE, J. S. y GERGELY, J.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**, 17-29 (1975).
9. YANG, comunicación personal.
- 10 LOWEY, S.; SLAYTER, H. S.; WEEDS, A. G. y BAKER, H.: *J. Mol. Biol.*, **42**, 1 (1969).
- 11 MARGOSSIAN, S. S. y STAFFORD, W. H.: *Biochemistry*, **20**, 2151, (1981).
- 12 MARGOSSIAN, S. S. y STAFFORD, W. H. *Biophys. J.*, **25**, 20a, (1979).
- 13 SQUIRE, J. en «Structural Basis of Muscular Contraction», Plenum Press, Nueva York, p. 240, (1981).
- 14 KRETZSCHMAR, K. M., MENDELSON, R. M. y MORALES, M. F.: *Biochemistry*, **17**, 2314, (1978).
- 15 MENDELSON, R. M.: *Nature*, **298**, 665 (1982).
- 16 PARRISH, R. G. y MOMMAERTS, W. F. H. M.; *J. Biol. Chem.*, **209**, 901 (1954).
- 17 GARCÍA DE LA TORRE, J. y BLOOMFIELD, V. A.: *Biochemistry*, **19**, 5118 (1980).
- 18 SAKURA, J. O. y REITHEL, F. J.: *Meth. Enzymology*, **26**, 207 (1972).