

El mecanismo molecular

de la regulación de la contracción muscular

Raúl Padrón

Departamento de Biología Es+tructural, IVIC, Caracas, VENEZUELA.

Recibido: 20/11/2007

Aceptado: 28/11/2007

Resumen

La estructura de los filamentos gruesos de músculo estriado en el estado relajado ha sido finalmente comprendida a nivel molecular. La estructura revela interacciones intra- e inter-moleculares que mantienen las cabezas de miosina unidas formando hélices adosadas a la superficie del filamento grueso. La fosforilación de las cadenas ligeras reguladoras de la miosina induce el debilitamiento de estas interacciones permitiendo la activación de los filamentos gruesos, produciendo el desorden y la liberación de las cabezas de miosina, y permitiendo su interacción con los filamentos delgados. Estos resultados abren las puertas para la comprensión del mecanismo molecular de la regulación ligada a miosina de la contracción muscular, de relevancia ya que las mutaciones asociadas a la cardiomiopatía hipertrófica medioventricular están ubicadas cercanas al sitio de fosforilación en las cadenas ligeras reguladoras de miosina

Palabras claves: músculo, miosina, regulación, activación, filamento grueso, reconstrucción tridimensional, crio-microscopía electrónica, cadena ligera reguladora, fosforilación.

Abstract

The structure of the thick filaments of striated muscle has been finally understood at the molecular level. The structure reveals intra- and inter-molecular interactions that held the myosin heads forming helices on the thick filament surface. The phosphorylation of the myosin regulatory light chains induces the weakening of these interactions, allowing the activation of thick filaments, and enabling their interaction with the thin filaments. These results open the possibility to the understanding of the molecular mechanism of the myosin-linked regulation of muscle contraction. This is of relevance as the mutations associated with mid ventricular cardiomyopathy are located near the phosphorylation site in the regulatory light chain

Key words: muscle, myosin, regulation, activation, thick filament, three-dimensional reconstruction, cryo-electron microscopy, regulatory light chain, phosphorylation.

El músculo esta formado por el solapamiento de dos conjuntos de filamentos, los filamentos delgados que contienen actina y los filamentos gruesos que contienen miosina. Los filamentos gruesos del músculo estriado son polímeros de miosina II. Los bastones de las moléculas de miosina se empaquetan formando el esqueleto del filamento grueso, mientras que las dos cabezas de cada molécula de miosina se organizan en la superficie formando hélices en el estado relajado. La contracción muscular ocurre cuando estos dos conjuntos se deslizan uno contra el otro de manera activa, acortando el sarcómero. La contracción muscular requiere ser controlada de una manera efectiva de tal manera que esta producción de fuerza pueda ser útil para realizar movimientos programados. La estimulación a través de los nervios causa la liberación de cationes calcio del retículo sarcoplásmico. Los cationes calcio pueden controlar la iniciación de la contracción muscular bien actuando en los filamentos delgados (regulación ligada a actina) y/o actuando en los filamentos gruesos (regulación ligada a miosina).

Las bases moleculares de la regulación ligada a la actina se conocen bien, a raíz de los avances con estudios de difracción de rayos-X y de microscopía electrónica (ME) de la estructura de los filamentos delgados. La regulación de los filamentos delgados es mediada por el enlazamiento de cationes calcio a la troponina C, y envuelve -vía el complejo de troponinas- el movimiento de la tropomiosina hacia el surco del filamento delgado, removiendo el bloqueo estérico que obstaculiza el enlazamiento de las cabezas de miosina a las moléculas de actina. Los filamentos delgados exhiben dos estados estructurales: el estado desactivado, en el cual la tropomiosina bloquea el sitio de enlazamiento de la miosina a las moléculas de actina; y el estado activado en el cual la tropomiosina se mueve fuera del surco descubriendo el sitio de enlazamiento de miosina. Por otra parte, las bases moleculares de la regulación ligada a miosina no se comprenden bien. La regulación ligada a miosina ocurre bien por el enlazamiento directo de cationes calcio a las cadenas ligeras de la miosina (como ocurre en almeja); o por la fosforilación de

las cadenas ligeras reguladoras (CLR) de la miosina (como ocurre en los artrópodos quelicerados, y en el músculo estriado y el liso de vertebrado).

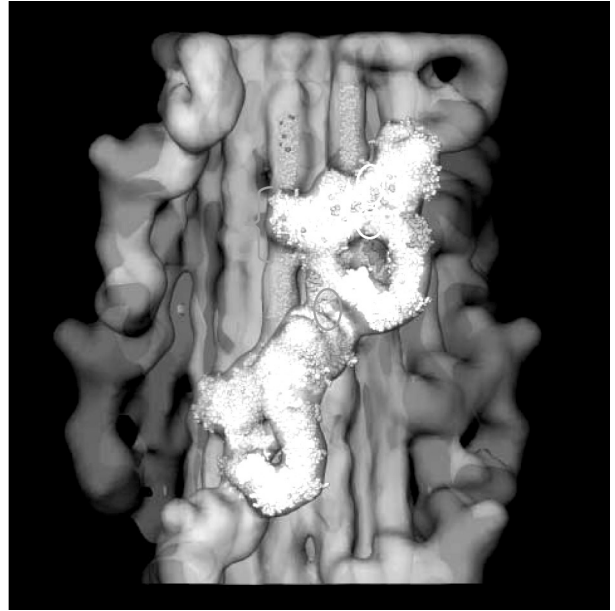
El paso limitante para avanzar en la dilucidación del mecanismo molecular de la regulación ligada a miosina es la determinación de la estructura molecular de los filamentos gruesos. Las especies usadas han sido un factor importante: los filamentos gruesos de músculos estriados de las extremidades de las tarántulas han probado ser los especímenes más fácilmente preservados para estudios estructurales.

A pesar de los avances en la dilucidación del mecanismo molecular de la regulación ligada a actina, el mecanismo molecular de la regulación ligada a miosina ha sido menos abordable a los estudios estructurales, debido a la baja resolución de los mapas tridimensionales disponibles. Una combinación de especímenes adecuados, un método de tinción negativa que preserve las hélices y el uso de técnicas mejoradas de reconstrucción, nos permitió hace 22 años el cálculo de una mapa tridimensional de tarántula a 5 nm de resolución¹. Este mapa tridimensional fue interpretado con la información disponible de la estructura de la cabeza de miosina, pero el ajuste de las estructuras atómicas permaneció ambiguo debido a la limitada resolución.

La crio-microscopía electrónica de los filamentos gruesos congelados-hidratados nos ha permitido recientemente extender la resolución hasta 2,5 nm, y el uso de técnicas de promediación de imágenes de partículas aisladas calcular un mapa tridimensional a esa resolución. Este mapa tridimensional fue interpretado sin ambigüedad ajustando a él la estructura atómica de la meromiosina pesada, conduciendo al modelo atómico del filamento grueso relajado, el cual reveló interacciones intra- e inter-moleculares que mantienen las cabezas de miosina formando hélices cercanas a la superficie del esqueleto²

El nuevo mapa mostró un motivo detallado que se repite a lo largo de la superficie del filamento grueso (fig.1) y que representa el par de cabezas de una molécula de miosina. Este mapa lo interpretamos al darnos cuenta de la cercana similitud que tiene con el modelo de cabezas interactuantes de la meromiosina pesada, obtenido por ME de cristales bidimensionales de músculo liso³. Este modelo atómico de cabezas interactuantes está en el estado desactivado, con las CLR desfosforiladas, y la miosina muestra una interacción asimétrica entre sus dos cabezas, con la región de enlace de actina de una cabeza (cabeza bloqueada) interactuando con las regiones convertidor y cadena ligera esencial de la otra cabeza (cabeza libre). Esta interpretación de "cabezas abajo", apuntando en dirección a la zona desnuda fue una sorpresa inesperada. La estructura de cabezas interactuantes ajusta perfectamente en el mapa como lo confirmamos al ajustar el dominio motor y regulador de ambas cabezas, indicando que esta estructura derivada de músculo liso también está presente en músculo estriado. Las grandes similitudes entre las estructuras de las moléculas de miosina aisladas de músculo liso de pollo y de músculo estriado de tarántula sugieren que la estructura de cabezas interactuantes puede ser un motivo básico y primordial para los filamentos gruesos relajados, extendiéndose sobre un amplio rango de especies.

Figura 1. Modelo atómico del filamento grueso de músculo estriado



El modelo atómico del filamento grueso de tarántula revela tres interacciones intermoleculares, dos entre el dominio de enlace de actina de la cabeza bloqueada (en verde) y la cadena ligera esencial (en morado), y el dominio convertidor (en azul) de la cabeza libre de la misma molécula (elipse amarilla); y, otra entre el dominio de enlace de actina (en verde) y el S2 (en rojo) de la misma molécula (doble flecha amarilla); y dos interacciones intermoleculares, una interacción entre el dominio de enlace de actina (en azul) de la cabeza libre de una cabeza de miosina y la cadena ligera esencial (en anaranjado) de la cabeza bloqueada vecina (elipse roja), con otra interacción entre el bastón de la miosina (en rojo) y el dominio SH3 (en verde) de la cabeza bloqueada vecina (corchete rojo).

Reimpreso de Padrón, R. y Alamo, L. Review: The use of negative staining and cryo-electron microscopy to understand the molecular mechanism of myosin-linked regulation of striated muscle contraction. *Acta Microsc.* 13: en prensa, con permiso.

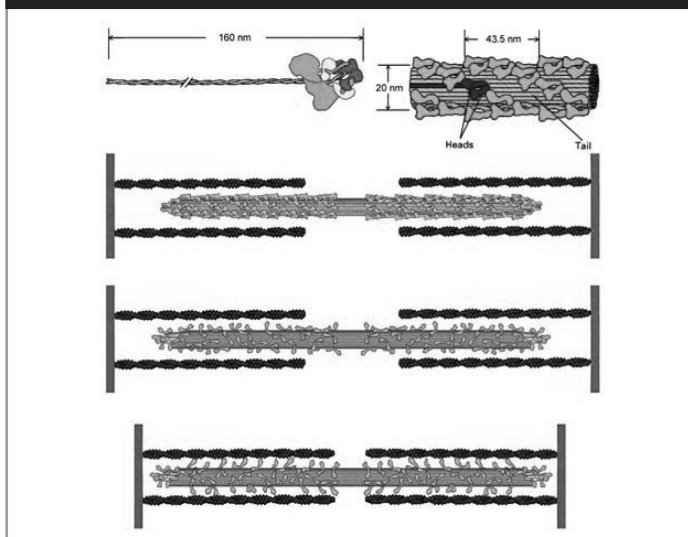
La figura 2 muestra nuestra visión sobre la estructura de los filamentos gruesos de músculo estriado de tarántula en el estado relajado. Las moléculas de miosina, con sus dos cabezas en la configuración asimétrica de cabezas interactuantes, están empacadas formando cuatro hélices de pares de cabezas de miosina las cuales forman el filamento grueso relajado.

¿Por qué las cabezas de miosina forman hélices en el estado relajado? Las cabezas de miosina forman hélices porque están en la conformación desactivada en la cual se establecen interacciones específicas entre ambas cabezas al formarse tres interacciones intramoleculares, estabilizando los pares de cabezas de miosina; y porque pares de cabezas interactuantes vecinas interactúan entre ellos formando dos interacciones intermoleculares. Por lo tanto, debido a estas interacciones, los filamentos gruesos exhiben las cabezas de miosina organizadas en hélices, adosadas en la superficie del esqueleto, lejos de los filamentos delgados.

¿Como este mayor conocimiento de la estructura atómica de los filamentos gruesos de tarántula puede ayudarnos a comprender el mecanismo molecular de la regulación ligada a miosina de la contracción muscular? ¿Como se activan los filamentos gruesos? Nosotros pensamos que la determinación de la estructura molecular de estos filamentos gruesos puede ayudar a comprender las bases moleculares de la

regulación ligada a la miosina via fosforilación. Para que una molécula de miosina interactúe con los filamentos delgados, produciendo fuerza, los filamentos gruesos deben primero activarse. Las evidencias de ME y difracción de rayos-X sugieren que la fosforilación de las CLR esta envuelta en el debilitamiento de las interacciones, activando los filamentos gruesos al desordenarse y liberarse las cabezas, permitiendo su interacción con los filamentos delgados. Nosotros visualizamos la activación de los filamentos gruesos como la liberación fisiológica de las cabezas de la superficie del filamento grueso antes de la producción de fuerza, conduciendo a la interacción entre las cabezas activadas y los filamentos delgados, y produciendo la contracción y el acortamiento del sarcómero. En el músculo de tarántula aun no esta completamente dilucidado si la fosforilación de las CLR regula directamente (como en músculo liso de vertebrado y en músculo estriado de *Limulus*) o solo modula el número de cabezas que se activan. Este último mecanismo pudiera ser una vía para modular el número de cabezas envueltas activamente en la producción de fuerza luego de una serie de sacudidas simples en una contracción tetánica.

Figura 2. Como se activan y desactivan los filamentos gruesos de músculo estriado



Nuestra interpretación actual de la estructura de los filamentos gruesos de músculo estriado de tarántula formado por moléculas de miosina II (arriba a la izquierda) con sus cabezas orientadas hacia el bastón de la miosina cuando están en el estado relajado desactivado (CLR desfosforiladas). Esta estructura desactivada del filamento grueso garantiza que las cabezas de miosina se mantengan adosadas a la superficie del esqueleto (arriba a la derecha), de manera tal que no puedan interactuar con los filamentos delgados, como se muestra en el sarcómero relajado. Cuando los cationes de calcio, vía calmodulina, y la quinasa de la cadena ligera de la miosina fosforilan la CLR, activan las cabezas de miosina las cuales se vuelven flexibles y se desordenan, separándose de la superficie del filamento, sobresaliendo y acercándose a los filamentos delgados, y activando el filamento grueso. Los filamentos activados pueden interactuar con los filamentos delgados, en caso de que ellos también estén activados, produciendo fuerza y el deslizamiento de ambos conjuntos de filamento uno contra el otro, acortando el sarcómero, como se muestra en el sarcómero en contracción (abajo).

Reproducido de Investigación y Ciencia (versión en Español de Scientific American). Padrón, R. El modelo atómico del filamento de miosina. (En prensa), con permiso de Prensa Científica, S. A.

¿Por qué al activarse las cabezas de miosina luego de la fosforilación de las CLR estas se desordenan y sobresalen fuera de la superficie del filamento grueso? Las moléculas

de miosina aisladas de músculo estriado de almeja en el estado desactivado tienen sus dos cabezas plegadas sobre su respectivo bastón formando una estructura rígida con poca actividad ATPásica, y cuando se activan por el enlazamiento de cationes calcio en sus cabezas, se flexibilizan alrededor de la unión cabeza-bastón. En filamentos gruesos de tarántula pudiera ocurrir una situación similar, sugiriendo también que las interacciones intra- e inter-moleculares se debilitarían luego de la fosforilación de las CLR. Por tanto, las interacciones cabeza-cabeza previamente observadas en moléculas aisladas, sugestivas de ser el mecanismo por el cual la ATPasa actomiosínica se desactiva, pudiera ser también una característica clave del filamento relajado nativo. Experimentos adicionales en los cuales se logre aumentar lo suficiente la resolución del mapa tridimensional de tarántula usando crio-microscopía electrónica a 300 KV con cañón de emisión de campo y tomografía electrónica debería ayudar a definir de manera más precisa la naturaleza específica de las interacciones intra- e inter-moleculares envueltas en el mecanismo de activación.

En resumen, la estructura de los filamentos gruesos de músculo estriado en el estado relajado ha sido finalmente comprendida a nivel molecular. La estructura revela interacciones intra- e inter-moleculares que mantienen las cabezas unidas formando hélices adosadas a la superficie del filamento grueso. La fosforilación de las CLR induce el debilitamiento de estas interacciones permitiendo la activación de los filamentos gruesos, produciendo el desorden y la liberación de las cabezas, y permitiendo su interacción con los filamentos delgados. Estos resultados abren las puertas para la comprensión del mecanismo molecular de la regulación ligada a miosina de la contracción muscular, de relevancia ya que las mutaciones asociadas a la cardiomiopatía hipertrofica medioventricular están ubicadas en las CLR cercanas al sitio de fosforilación.

Financiado en parte por el Instituto Médico Howard Hughes (HHMI) de los EE.UU. y por el FONACIT, Venezuela. The research of Raúl Padrón was supported in part by an International Research Scholar grant from the Howard Hughes Medical Institute, U. S. A.

Referencias

1. Crowther R. A., Padrón R. y Craig R. "Arrangement of the heads of myosin in relaxed thick filaments from tarantula muscle" *J Mol Biol* 1985; 184: 429-439.
2. J. Woodhead, F. Zhao, R. Craig, E. Egelman, L. Alamo y Padrón R. Atomic model of a myosin filament in the relaxed state. *Nature* 2005; 436: 1195-1199.
3. Liu J., Wendt T., Taylor D., y Taylor, K. "Refined model of the 10S conformation of smooth muscle myosin by cryo-electron microscopy 3D image reconstruction" *J Mol Biol* 2003; 329: 963-972.
4. Padrón, R. y Alamo, L. Review: The use of negative staining and cryo-electron microscopy to understand the molecular mechanism of myosin-linked regulation of striated muscle contraction. *Acta Microsc.* 13: en prensa.
5. Padrón, R. El modelo atómico del filamento de miosina. Investigación y Ciencia (versión en Español de Scientific American). En prensa.