



Doctoral Thesis

Charakterisierung der Bindungsstelle der regulatorischen leichten Kette auf der schweren Kette des Myosins im Skelettmuskel

Author(s):

Koch, Daniel

Publication Date:

1994

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000946433> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH Nr. 10669

**Charakterisierung der Bindungsstelle der
regulatorischen leichten Kette auf der schweren
Kette des Myosins im Skelettmuskel**

ABHANDLUNG

zur Erlangung des Titels eines
Doktors der Naturwissenschaften
der
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE
ZÜRICH

vorgelegt von
DANIEL KOCH
Dipl. Natw. ETH Zürich
geboren am 7. November 1964
von Villmergen

Angenommen auf Antrag von
Prof. Dr. K. H. Winterhalter, Referent
Prof. Dr. M. C. Schaub, Korreferent

Zürich 1994

I. Zusammenfassung

Die regulatorische leichte Kette (RLC) im schnellen Skelettmuskel-Myosin des Kaninchens gehört zur Familie der intrazellulären Ca^{2+} -bindenden Signalproteine und ist nicht kovalent mit der schweren Kette des Myosins (MHC) assoziiert. Der mit α -Chymotrypsin oder Thrombin vom Myosin abgespaltene Myosinkopf bindet keine RLC sondern nur eine essentielle leichte Kette, eine ELC-1 oder eine ELC-2. Pap-S1 (Papain-Myosinkopf) enthält zusätzlich noch eine RLC pro Kopf. Im Elektronenmikroskop erscheint Pap-S1 länger (16.4 ± 2.8 nm) verglichen mit Chymo-S1 (13.7 ± 2.3 nm). Die Entfernung der RLC aus dem Kopf durch Behandlung mit DTNB führt zur Aggregation von Pap-S1. In der SDS-PAGE besitzt die schwere Kette (HC) von Pap-S1 ein leicht grösseres scheinbares Molekulargewicht als jene von Thrombin-S1, welche wiederum nur geringfügig grösser ist als die HC von Chymo-S1. Exogene RLC bindet weder an Chymo-S1 noch an Thrombin-S1. Demzufolge ist die im Kaninchen teilweise noch unbekannt Sequenz zwischen den C-Termini der HC von Thrombin-S1 und Pap-S1 für die Bindung der RLC an die MHC unbedingt notwendig. Mit Carboxypeptidase-B konnten wir das C-terminale R-821 der HC von Thrombin-S1 bestimmen, und der an den Kopf anschliessende Abschnitt der MHC wurde von A-822 bis K-843 sequenziert. Damit konnten wir die für die N-terminale Hälfte der RLC notwendige Bindungsstelle der RLC auf der MHC auf eine 22 AS lange Sequenz von A-822 bis K-843, dem bekannten C-Terminus von Pap-S1, einengen. Diese Bindungsstelle ist mit 6 anderen Myosintypen zu 86 % identisch. Ausserdem besitzt sie, verglichen mit der in Richtung C-Terminus anschliessenden gleichlangen AS-Sequenz, einen sehr hohen Anteil an hydrophoben AS, welcher für die Aggregation von RLC-freiem Myosin oder Pap-S1 verantwortlich ist.

In Abwesenheit von zweiwertigen Metallionen können die beiden Cysteine (128 und 157) in der mit Myosin oder Pap-S1 assoziierten RLC mit thiol-spezifischen bifunktionellen Reagenzien mit einer Länge von 2-16 Å miteinander quervernetzt werden, was die Ablösung der RLC vom Myosinkopf zur Folge hat. In einem Mg^{2+} -Milieu ist diese RLC interne Schlaufenbildung nur noch mit einem thiol-spezifischen Quervernetzer von mindestens 6 Å Länge möglich. Mit bifunktionellen Thiolreagenzien von mindestens 8-11 Å Länge kann die RLC mit der HC vernetzt werden. Die Blockierung der beiden reaktiven Cysteine 707 und 697 hatte keinen Einfluss auf die Quervernetzungsreaktion. Endoproteinase Arg-C und Hydroxylamin spalten die HC von Pap-S1 nach K-636 respektive nach N-698. Beide C-terminalen Fragmente, die aus diesen Spaltungsreaktionen am quervernetzten Pap-S1 entstanden, enthielten kovalent gebundene RLC. Dies liess nur noch Cys-794 oder Cys-815 als Reaktionspartner für das Thiolreagens auf der HC zu. Mit RLC quervernetzter Pap-S1 kann durch NTCB immer noch am Cys-794 chemisch gespalten werden. Die Analyse des resultierenden Quervernetzungsproduktes zeigte, dass die RLC an Cys-815 auf der HC von Pap-S1 gebunden wird. Das an der entsprechenden Reaktion beteiligte Cystein auf der RLC ist Cys-128. Die Bindung der RLC auf der HC in der Region der AS 822-843 und das Quervernetzen ihres Cys-128 mit Cys-815 im Pap-S1 vom schnellen Skelettmuskelmyosin des Kaninchens deckt sich mit der kürzlich veröffentlichten 3-dimensionalen Struktur des Pap-S1 aus dem Brustmuskel des Hühnchens (Rayment et al., 1993a).

II. Summary

The regulatory light chain (RLC) of rabbit fast skeletal muscle myosin is a member of the intracellular Ca^{2+} -binding signalling protein family, and is non-covalently associated with the myosin heavy chain (MHC). Chymotryptic or thrombin subfragment-1 (S1; myosin head) does not bind RLC but only one essential light chain, either ELC-1 or ELC-2. Pap-S1 (papaic myosin head) contains in addition one RLC per head. In the electron microscope pap-S1 (length 16.4 ± 2.8 nm) has an elongated shape compared to chymo-S1 (length 13.7 ± 2.3 nm). Removal of RLC by treatment with DTNB leads invariably to aggregation of the Pap-S1. The apparent molecular mass of the heavy chain (HC) of pap-S1 in SDS-PAGE is slightly larger than that of the HC of thrombin-S1, which again is slightly larger than the HC of Chymo-S1. Exogenous RLC does not bind neither to chymo-S1 nor to thrombin-S1. Hence, the MHC between the C-termini of thrombin-S1 and pap-S1 whose sequence is not entirely known for the rabbit myosin, is essential for the binding of the RLC to the MHC. With carboxypeptidase-B we determined the C-terminal R-821 on the HC of thrombin-S1. The following C-terminal portion in the MHC was sequenced from the adjacent A-822 to K-843. Thus the binding site of the MHC for the N-terminal half of the RLC is narrowed down to a stretch of 22 AA running from A-822 to K-843 which represents the C-terminus of pap-S1. Comparison of this sequence with six other sarcomeric myosins shows 86 % identity. The RLC binding site is also characterized by a high content of hydrophobic residues when compared to the adjacent sequence of the same length running downstream towards the C-terminus. The hydrophobic nature of the RLC binding region is responsible for the aggregation of RLC-removed myosin and pap-S1.

The two cysteins (128 and 157) of RLC in myosin or pap-S1 can be crosslinked by bifunctional thiol-specific reagents with a length of 2-16 Å in the absence of divalent metal ions. As a consequence this leads to the removal of the RLC from the HC. In the presence of Mg^{2+} thiol-specific crosslinkers with a length of at least 6 Å are able to form such a loop. For crosslinking the RLC with the HC bifunctional reagents of 8-11 Å are required. Prior blocking of the two reactive cysteins 707 and 697 on the HC did not influence the crosslinking of the RLC. Endoproteinase Arg-C and hydroxylamine split the HC of pap-S1 after K-636 and N-698 respectively. Both C-terminal fragments which we obtained from these two splitting reactions in crosslinked pap-S1 contained the bound RLC. This leaves only cys-794 or cys-815 on the HC to become crosslinked with the RLC. Pap-S1 can still be chemically split by NTCB at cys-794 when the RLC is crosslinked to its HC. Analysis of the originating crosslink product indicates that the RLC is crosslinked to the cys-815 in pap-S1. The RLC was shown to participate with its cys-128 in the crosslinking reaction with the HC. The binding of the RLC to the AA-region 822-843 on the HC and the crosslinking of its cys-128 to cys-815 in pap-S1 of rabbit fast skeletal muscle myosin is fully consistent with the recently published 3-dimensional structure of pap-S1 from pectoral muscle myosin in the chicken (Rayment et al., 1993a).