

ESTUDIO POR DIFRACCION DE RAYOS-X DE LOS CAMBIOS ESTRUCTURALES QUE ACOMPAÑAN LA FOSFORILACION DE LOS FILAMENTOS GRUESOS DE MUSCULO DE TARANTULA

Nelly Panté,* Hernando Sosa* y Raúl Padrón.
Laboratorio de Biofísica del Músculo.
IVIC-Biofísica. Apartado Postal: 21827.
Caracas 1020-A, Venezuela.

RESUMEN

Microscopía electrónica de filamentos gruesos de músculo de tarántula teñidos negativamente, revela que la fosforilación de las cadenas ligeras regulatorias (P-LC) va acompañada de la pérdida del orden en hélice que las cabezas de miosina mantienen en la superficie del filamento grueso, y que las cabezas sobresalen por fuera del esqueleto del filamento grueso. Este desorden implica un movimiento de masa en la sección transversal del filamento, el cual hemos detectado a través de la sección ecuatorial del patrón de difracción de rayos-X. Hemos obtenido patrones ecuatoriales de rayos-X de músculos de *Avicularia* sp en el estado relajado (P-LC no fosforiladas) y en el estado fosforilado (en la ausencia de calcio para evitar la contracción) mediante el uso de una quinasa de cadena ligera de miosina (MLCK) calcio-insensitiva. La fosforilación se hizo en presencia de 1 mM ATP- δ -S a objeto de producir una tiosfosforilación irreversible de las cadenas ligeras. La fosforilación de las cadenas ligeras se verificó por electroforesis en geles de urea/glicerol. Los patrones de difracción de rayos-X ecuatoriales mostraron una disminución en la intensidad de la reflexión (10) y un incremento en la (11) y la (20) luego de la fosforilación. En los mapas bidimensionales de densidad electrónica calculados mediante síntesis de Fourier, usando estas tres reflexiones, fue posible obtener la distribución de masa para el retículo hexagonal y el cambio que ocurre luego de la fosforilación. Los mapas de densidad electrónica muestran que luego de la fosforilación ocurre una disminución de masa en la superficie de los filamentos gruesos. Tal disminución ha sido interpretada en términos de un aumento en la separación promedio entre los subfragmentos S-1 de las moléculas de miosina y el esqueleto del filamento grueso, de al menos 6 nm.

* Dirección actual: Department of Biology,
Rosenstiels Basic Medical Sciences Research Center,
Brandeis University, Waltham, Mass. 02254, USA.

X-RAY DIFFRACTION STUDY OF THE STRUCTURAL CHANGES ACCOMPANYING THE PHOSPHORYLATION OF TARANTULA MUSCLE THICK FILAMENTS

ABSTRACT

Electron microscopy of negatively stained thick filaments of tarantula muscle reveals that regulatory light chain (P-LC) phosphorylation is accompanied by a loss of the helical ordering that the myosin heads form on the thick filament surface, and that some heads project away from the filament backbone. This disordering implies a mass movement in the transverse section of the filaments, which we have detected through the equatorial X-ray patterns of *Avicularia* sp muscles in the relaxed state (P-LCs non phosphorylated) and in the phosphorylated state (in the absence of calcium to avoid contraction) by using a calcium-insensitive myosin light chain kinase (MLCK). The phosphorylation of the P-LCs was verified by urea/glycerol gel electrophoresis. Equatorial X-ray patterns showed a decrease in the intensity of the (10) reflection and an increase in (11) and (20) after phosphorylation. In the bidimensional electron density maps calculated by Fourier synthesis, using these three reflections, it was possible to obtain the mass distribution in the hexagonal lattice and the changes that occurs after phosphorylation. The electron density maps shows that there is a decrease of mass in the surface of the thick filaments. Such decrease of mass has been interpreted as an increase in the average separation between S-1 subfragments of the myosin heads and the thick filament backbone, of at least 6 nm.

INTRODUCCION

En ciertos tipos de músculos, la actividad contráctil es controlada por la fosforilación de las cadenas ligeras regulatorias (P-LC) de las moléculas de miosina (ver figura 1-a). En estado relajado las cadenas ligeras regulatorias no están fosforiladas e inhiben la interacción actina-miosina, mientras que en la activación [$Ca^{2+} > 10^{-6}$ M], el calcio se une a la calmodulina, y este complejo activa a la quinasa de cadenas ligeras (MLCK) de la miosina, la cual fosforila las P-LC ocurriendo la interacción actina-miosina y, por lo tanto, el movimiento (ver figura 1-b). Cuando el nivel de calcio disminuye, el complejo calmodulina-calcio se disocia de la quinasa, la cual se inactiva y las P-LC se desfosforilan por la acción de una fosfatasa de cadenas ligeras independientes de calcio (ver figura 1-b).

Las bases estructurales de la regulación asociada a miosina por fosforilación de las P-LC son desconocidas, pero recientemente se ha propuesto una hipótesis según la cual cuando las P-LC se encuentran desfosforiladas las cabezas de miosina se disponen en una conformación que no les permite interactuar con los filamentos de actina^{3,4,8} (figura 2a). Esta hipótesis se basa en la estructura de la superficie del filamento grueso de músculo de tarántula en el estado relajado, la cual ha sido determinada a 5 nm de resolución mediante reconstrucción tridimensional de micrografías electrónicas,^{5,9} siendo éste el filamento grueso en el cual la estructura de su superficie se conoce a mayor resolución espacial en la actualidad. En estudios recientes por microscopía electrónica,^{3,4,8}

se ha determinado que la fosforilación de las P-LC en filamentos gruesos aislados de músculo estriado de tarántula, produce un desorden masivo del arreglo ordenado que forman las cabezas de miosina en la superficie del filamento grueso (figura 2b). Es posible que dicho desordenamiento sea inducido por el procedimiento de tinción negativa. Una técnica estructural alternativa que permitiría verificar los resultados de microscopía electrónica, evitando la posibilidad de cualquier artefacto de tinción, con la ventaja de no ser destructiva y permitir cuantificar los cambios, es la difracción de rayos-X.

En trabajos previos,^{11,12} hemos calculado teóricamente los cambios que deberían observarse en la sección ecuatorial del patrón de difracción de rayos-X cuando el arreglo en hélice de las cabezas de miosina se desordena. El objetivo del presente trabajo es el de verificar experimentalmente en músculos estriados de tarántula, cuáles son los cambios en el patrón ecuatorial de difracción de rayos-X inducidos por la fosforilación de las P-LC.

La comparación de los resultados experimentales con los cálculos teóricos previos,^{11,12} permite concluir que cuando las P-LC de músculo de tarántula se fosforilan ocurre un movimiento de los subfragmentos S-1 desde la superficie del esqueleto del filamento grueso, del orden de al menos 6 nm. Un reporte preliminar de este trabajo ha sido publicado recientemente.¹⁷

MATERIALES Y METODOS

Especímenes:

Se utilizaron arañas *Avicularia* sp, a las cuales se les disecaron los músculos largos que van de articulación a articulación en el primer segmento proximal (fémur) de las extremidades. Durante la disección y hasta el momento de comenzar el desmembramiento, los músculos fueron mantenidos en solución fisiológica de araña ($t = 4^\circ\text{C}$).¹⁴

Soluciones:

Solución "Ringer tarántula": 190 mM de NaCl, 2 mM de KCl, 4 mM de MgCl_2 y 1 mM de solución tampón de fosfato (Na). pH = 7,8.¹⁴

Solución relajadora: 100 mM KAc, 5 mM MgAc, 5 mM EGTA, 15 mM KH_2PO_4 , 2% p/v PVP-40, 5 mM NaN_3 , 5 mM ATP, pH = 7,2, 8°C .

Solución de rigor: Similar a la solución relajadora pero sin ATP.

Solución fosforilante: Similar a la solución de rigor, pero con 25 $\mu\text{g/ml}$ de quinasa de cadenas ligeras de miosina (MLCK) insensibilizada al calcio, 15 $\mu\text{g/ml}$ de calmodulina de cerebro de bovino y 1 mM de ATP- γ -S.

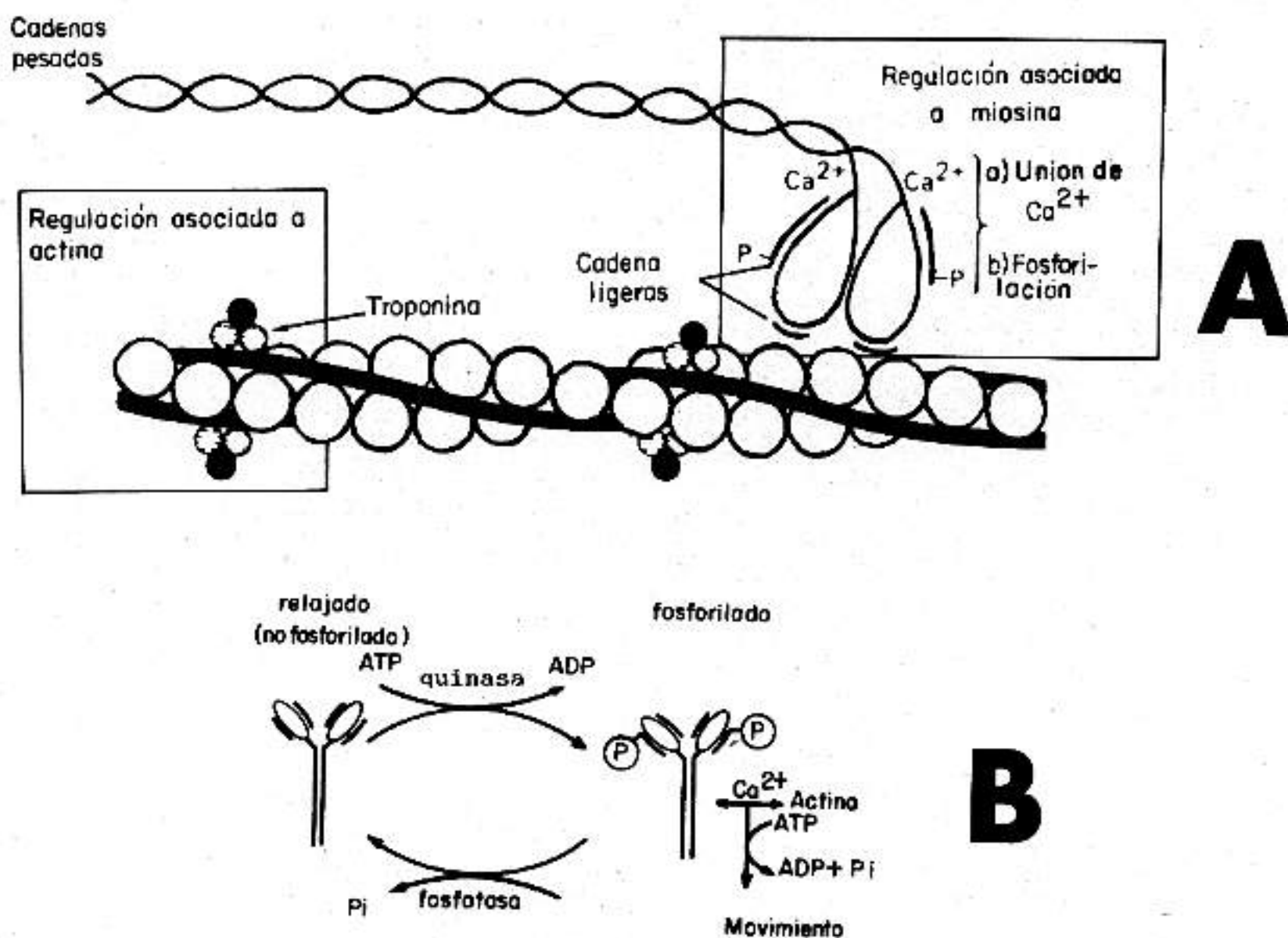


Figura 1. (a) Representación diagramática de los tres sistemas de regulación descritos en músculo: regulación asociada a actina y regulación asociada a miosina (bien sea por unión directa de Ca^{2+} o por fosforilación de las P-LC). (b) Diagrama mostrando la regulación asociada a miosina por fosforilación de las cadenas ligeras regulatorias. La contracción es activada por una quinasa dependiente de calcio y calmodulina.

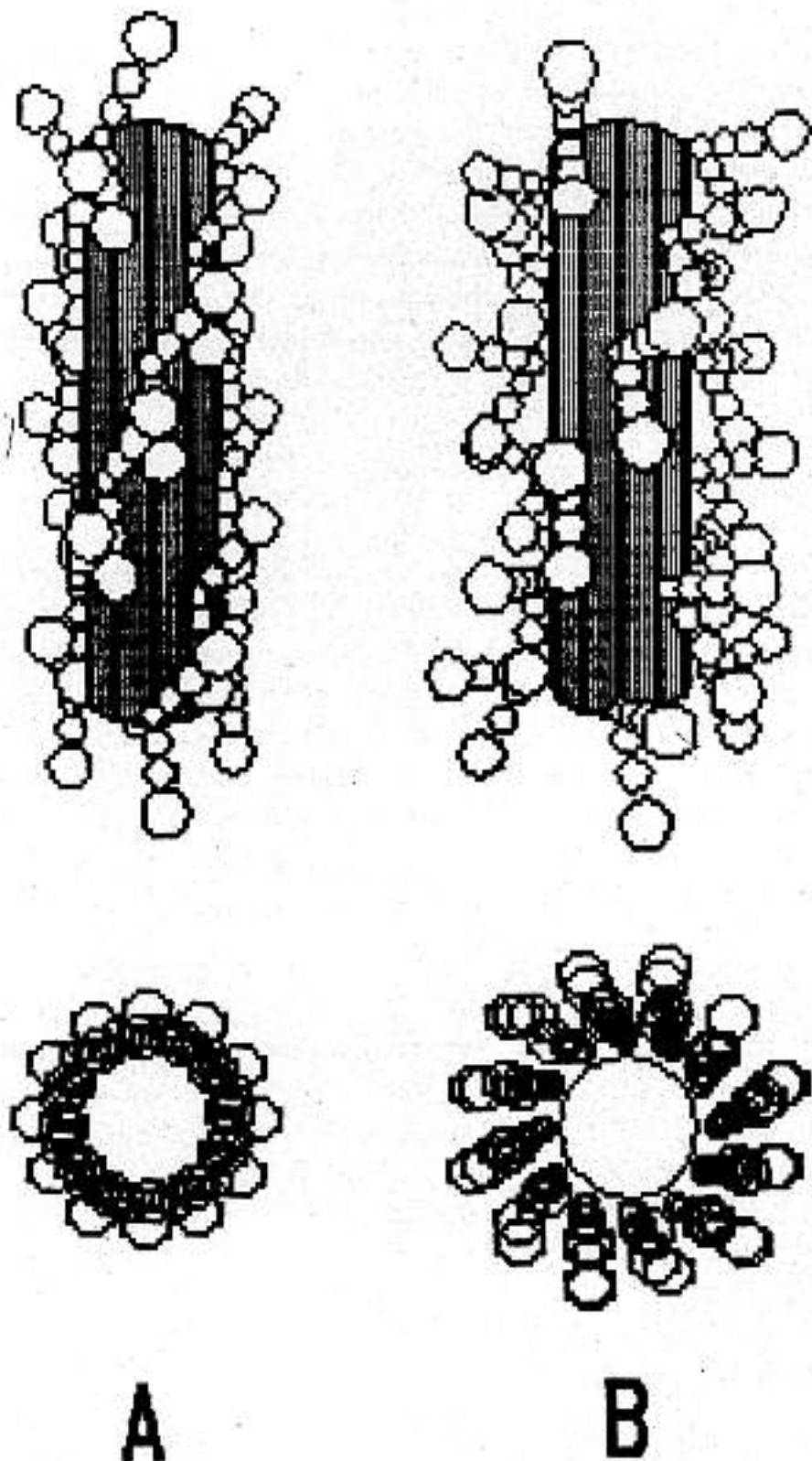


Figura 2. Modelo del filamento grueso de músculo de tarántula basado en la reconstrucción tridimensional de dicho filamento (refs. 5 y 9) y usando siete esferas contiguas para modelar cada par de cabezas de 15 nm (ref. 12). La parte superior de cada dibujo muestra una perspectiva lateral, mientras que la parte inferior muestra la correspondiente proyección axial sobre un plano perpendicular al eje del filamento. (a) Estado relajado (según refs. 5 y 9), mostrando las cabezas de miosina muy cerca del esqueleto del filamento grueso. (b) Estado "desordenado" hipotético que pudieran adquirir las cabezas de miosina luego de la fosforilación de las P-LC, según la hipótesis de Crowther y col. (ref. 5) y según datos de microscopía electrónica (refs. 3, 4 y 8). Estos gráficos se realizaron a escala en el computador, utilizando los siguientes datos de la bibliografía:

Radio del esqueleto del filamento = 10 nm (ref. 5).
Eje largo de cada cabeza de miosina = 15 nm (ref. 5).

Insensibilización de la quinasa al Ca^{++} :

Para evitar la ocurrencia de contracción debida a la presencia de Ca^{++} , la fosforilación fue inducida mediante una quinasa de cadenas ligeras de miosina (MLCK), previamente insensibilizada al Ca^{++} mediante digestión triptica en presencia de Ca^{++} y calmodulina.¹ Una solución de 2,5 mg/ml de MLCK de músculo liso de pollo (cedida por el doctor

J. Kendrick-Jones) fue diluida hasta 0,5 mg/ml y se adicionó 0,2 mM de Ca^{++} y exceso de calmodulina para activar la MLCK. Después se agregó tripsina (Sigma T-8128) a una proporción proteína/tripsina de 250/1 y se mantuvo la solución en hielo durante una hora. La digestión fue terminada por la adición de un exceso de inhibidor de tripsina (Sigma T-9253, proporción 10:1).

Desmembramiento:

Para poder difundir la quinasa dentro del retículo de miofilamentos se utilizó un método de desmembramiento químico desarrollado para esta preparación.¹⁶ Los músculos a ser utilizados en los experimentos de rayos-X fueron, luego de disecados, introducidos en un "vial" con solución relajadora (pH = 6,3 y $t = 4^{\circ}C$) en presencia de 0,5% (v/v) de TRITON X-100^{10,16} y agitados a 60 rpm durante 3 horas. El músculo fue luego lavado con solución relajadora (pH = 7,2) para eliminar el TRITON X-100 y comenzar los experimentos.

Longitud del sarcómero:

La longitud del sarcómero de los músculos fue medida a partir de sus correspondientes patrones de difracción ópticos. Estos fueron obtenidos utilizando un láser de He-Ne ($\lambda = 0,6382 \mu m$).

Registro mecánico:

La tensión del músculo fue medida isométricamente con un transductor de tensión de puente resistivo UFI, el cual fue conectado a un preamplificador y éste al sistema de registro.¹⁶

Rayos-X:

Para obtener los patrones de difracción ecuatoriales de los músculos se utilizó un generador de rayos-X de ánodo de cobre (Siemens Kristaloflex 810). El haz fue monocromatizado ($\lambda = 0,154 \text{ nm}$) y enfocado horizontalmente mediante un cristal de cuarzo cortado asimétricamente a 7° . Los patrones de difracción fueron registrados en película fotográfica para rayos-X CEA-VERKEN. El tiempo de exposición necesario para registrar los patrones fue de 5 a 14 horas, dependiendo del tamaño del músculo. Las películas, una vez expuestas, fueron densitometradas en un microdensitómetro Joyce-Lochl, modelo MK-III, y el área bajo el pico de cada reflexión (intensidad) fue estimada por pesada, luego de eliminar el fondo.

Fosforilación:

Los músculos eran fosforilados incubándolos a $28^{\circ}C$, durante una hora, en una solución que contenía 25 $\mu g/ml$ de MLCK previamente insensibilizada a calcio por digestión triptica y 1 mM ATP- γ -S.¹ Se usó el análogo de ATP (ATP- γ -S) para obtener un estado de fosforilación irreversible⁷ y garantizar que, durante la exposición a los rayos-X, las P-LC estén fosforiladas.

Verificación del estado de fosforilación:

El estado de fosforilación de las P-LC se verificó por electroforesis en geles de urea/glicerol según la técnica de Perrie y Perry.¹³ Para las electroforesis los músculos fueron procesados según el método de Kendrick-Jones y col.⁶

Determinación de las estructuras:

La función densidad electrónica de la proyección axial del retículo miofilamentoso fue obtenida por síntesis de Fourier, usando las tres primeras reflexiones de los patrones de difracción ecuatorial.¹⁸ Las intensidades fueron corregidas por el factor de Lorentz ($\sqrt{h^2 + k^2 + hk}$) y los factores de estructura F_{hk} fueron calculados a partir de estas ($F_{hk} = \sqrt{I_{hk}}$). Se asumió centrosimetría en la estructura de manera que las fases posibles de cada reflexión se redujeran a dos: 0 ó π . La densidad electrónica fue calculada, entonces, según la expresión: $\rho(x, y) = 1/A \sum_h \sum_k \pm |F_{hk}| \cos 2\pi(hx + ky)$.

Todos los cálculos fueron hechos en la computadora VAX 11-780 del IVIC y en una IBM PC-AT.

RESULTADOS

Se obtuvieron patrones ecuatoriales de difracción de rayos-X de los músculos de tarántula en estado relajado (P-LC no fosforiladas) y fosforilados (P-LC fosforiladas) con registros mecánicos simultáneos.

Patrones de difracción de rayos-X:

Al fosforilar los músculos, se encontró que la reflexión 10 disminuía en intensidad, mientras que las reflexiones 11 y 20 aumentaban. La tabla I presenta las intensidades de las tres primeras reflexiones ecuatoriales de los patrones de difracción de rayos-X (referidas a la reflexión 10 de cada caso) para los músculos relajados y fosforilados.

TABLA I

INTENSIDADES RELATIVAS DE LAS TRES PRIMERAS REFLEXIONES ECUATORIALES PARA MUSCULO DE TARANTULA (relajado y fosforilado)

REFLEXION	CONDICION	
	Relajado	Fosforilado
I_{10}	100	100
I_{11}	78 ± 10	180 ± 10
I_{20}	64 ± 12	150 ± 8
I_{10}/I_{11}	1,28 ± 0,05	0,55 ± 0,04
I_{10}/I_{20}	1,54 ± 0,13	0,66 ± 0,07

Valores promedio de 6 experimentos ± el error estándar de la media. En cada condición la intensidad de las reflexiones están referidas a la de la reflexión 10, a la cual se le asignó el valor arbitrario de 100.

Para descartar la posibilidad de que los cambios observados en el patrón de difracción de rayos-X se deban a la ausencia de ATP en la solución fosforilante, se obtuvieron patrones de difracción de rayos-X de músculo de tarántula en solución fosforilante que contenía 5 mM ATP además de 1 mM ATP- β -S y 25 μ g/ml de MLCK insensible a calcio. Los resultados de estos experimentos fueron similares a los encontrados en la solución fosforilante que no contenía ATP, descartando así esta posibilidad y demostrando que los cambios observados en el patrón de difracción de rayos-X se deben a la fosforilación de las P-LC.

Registros mecánicos:

La respuesta mecánica de los músculos de tarántula fosforilados se muestra en la figura 3-a, pudiéndose observar allí, un pequeño aumento de la tensión cuando el músculo se transfiere de la solución relajadora (5 mM ATP) a la solución fosforilante (1 mM ATP- β -S), pero insignificante (8%) si se compara con la tensión generada por el músculo en presencia de calcio (figura 3-b). Si el músculo es transferido de la solución relajadora a una solución fosforilante con 5 mM de ATP, éste no desarrolla tensión (figura 3-c).

Fosforilación de las P-LC:

En la figura 4 se muestra una corrida electroforética de músculo de tarántula relajado (no fosforilado) y fosforilado, indicándose las diferencias entre las P-LC fosforiladas y no fosforiladas. Puede verse que cuando se induce la fosforilación la banda correspondiente a las P-LC migra más rápidamente, evidenciando que éstas, efectivamente, se encuentran fosforiladas.

Síntesis de Fourier:

Se calcularon los mapas bidimensionales de densidad electrónica para músculo de tarántula en estado relajado y fosforilado, haciendo la síntesis de Fourier incluyendo los factores de estructura (F_{hk}) de las reflexiones (10), (11) y (20) registradas en el patrón ecuatorial, suponiendo que la estructura era centrosimétrica y asumiendo las fases de las reflexiones como (0), (0), (0), ya que las otras combinaciones de fases no coincidían con resultados de microscopía electrónica.¹¹ Las síntesis fueron realizadas independientemente para cada pareja de datos correspondientes a un mismo músculo, primero en el estado relajado y después en el fosforilado. En la figura 5 se muestran los perfiles de densidad electrónica a lo largo de los planos (10) y (11) para ambos estados. Para comparar dichos perfiles se consideraron dos posibilidades: Los perfiles de la figura 5A fueron normalizados haciendo coincidir los picos correspondientes al esqueleto del filamento grueso (cuya densidad electrónica no debería alterarse con la fosforilación de las P-LC), mientras que en la figura 5B se hizo coincidir los picos correspondientes al esqueleto del filamento grueso y los correspondientes a los filamentos de actina simultáneamente (cuya densidad electrónica, en principio, tampoco debería alterarse con la fosforilación).

DISCUSION

Las intensidades del patrón ecuatorial de rayos-X (tabla I) cambian cuando el músculo pasa del estado relajado al fosforilado. Estos cambios son causados por la fosforilación de las P-LC, como lo demuestran las movibilidades diferentes de las P-LC en las electroforesis en geles de urea/glicerol¹³ (figura 4). Dicha técnica permite detectar la fosforilación de las P-LC simplemente en base a la mayor movilidad de las P-LC fosforiladas en comparación con la de las no fosforiladas; esto ha sido verificado previamente por autorradiografía.^{3,4,8}

Los registros de tensión mecánica muestran que la presencia de 1 mM ATP- β -S en la solución fosforilante, es capaz de generar una pequeña tensión (ver figura 3a), pero la magnitud de ésta es insignificante si se compara con la tensión generada en una contractura de Ca²⁺ (figura 3b). Este pequeño aumento se puede deber a que la velocidad de hidrólisis del ATP- β -S por parte de la miosina es muchísimo más lenta que para el ATP,² por tal razón, cuando está presente el ATP- β -S, algunas cabezas de miosina se encontrarían en estado de rigor, y por ello podrían desarrollar tensión. Esto se demuestra en la figura 3c, donde se presenta el registro mecánico de músculo de tarántula en una solución fosforilante que contiene 5 mM ATP y 1 mM ATP- β -S simultáneamente. La presencia de ATP produce un estado relajado, donde no se produce tensión, pero como la MLCK y el ATP- β -S están presentes, las P-LC están fosforiladas.

Los perfiles de densidad electrónica (figura 5) muestran claramente que cuando las P-LC se fosforilan, ocurren cambios en la distribución de masa. Sin embargo, la interpretación estructural de dichos cambios depende de la normalización seleccionada. Se pueden considerar dos interpretaciones estructurales para estos cambios: que los mismos ocurran a nivel de la zona de puentes de miosina y en la zona de los filamentos de actina (figura 5A), o que ocurran solamente a nivel de la zona de los puentes (figura 5B). En el primer caso se obtendría un estado parecido al de rigor y se esperaría observar generación de tensión en el registro mecánico. Los registros mecánicos (figura 3) muestran que esto no es así; por lo tanto descartamos esta normalización (figura 5A), pudiéndose concluir que cuando las P-LC son fosforiladas ocurren cambios sólo en las zonas correspondientes a los puentes de miosina, tal como se muestra en la figura 5B.

Los cambios esperados en el patrón de difracción ecuatorial cuando se altera el arreglo en hélice de las cabezas de miosina en la superficie del esqueleto del filamento grueso de músculo de tarántula, fueron calculados previamente de forma teórica.^{11,12} Comparando dichos cálculos con la magnitud de los cambios en las intensidades de las reflexiones ecuatoriales observados experimentalmente en el presente trabajo, cuando los músculos pasan del estado relajado al fosforilado, se concluye que cuando las P-LC son fosforiladas los subfragmentos S-1 se separan al menos a 6 nm del esqueleto del filamento grueso.

Estos resultados apoyan la hipótesis propuesta por Crowther y col.,⁵ de que en estado relajado las cabezas de las moléculas de miosina se encuentran interactuando con el esqueleto del filamento grueso, manteniendo el arreglo en hélice, y cuando las cadenas ligeras se fosforilan los S-1 se separan del filamento grueso y quedan listas para interactuar con la actina. Estos resultados, además, descartan la posibilidad de que los

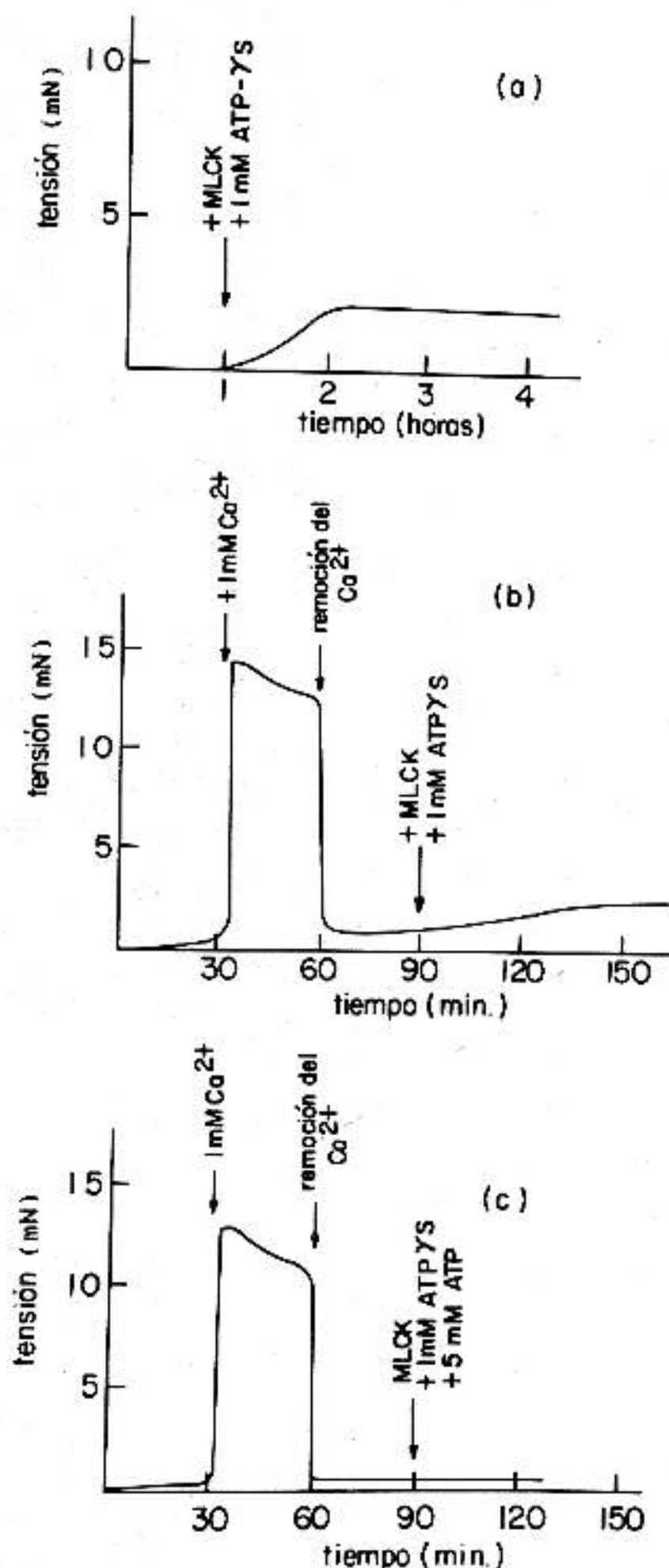


Figura 3. Registro temporal de la tensión mecánica: (a) Para el ciclo relajado-fosforilado. (b) Para el ciclo relajado-calcio-relajado-fosforilado. (c) Igual que en b pero con 5 mM ATP además de 1 mM de ATP- γ -S. Longitud del sarcómero: 7,2 μ m, pH = 7,2, t = 4 °C, tensión medida en condiciones isométricas.

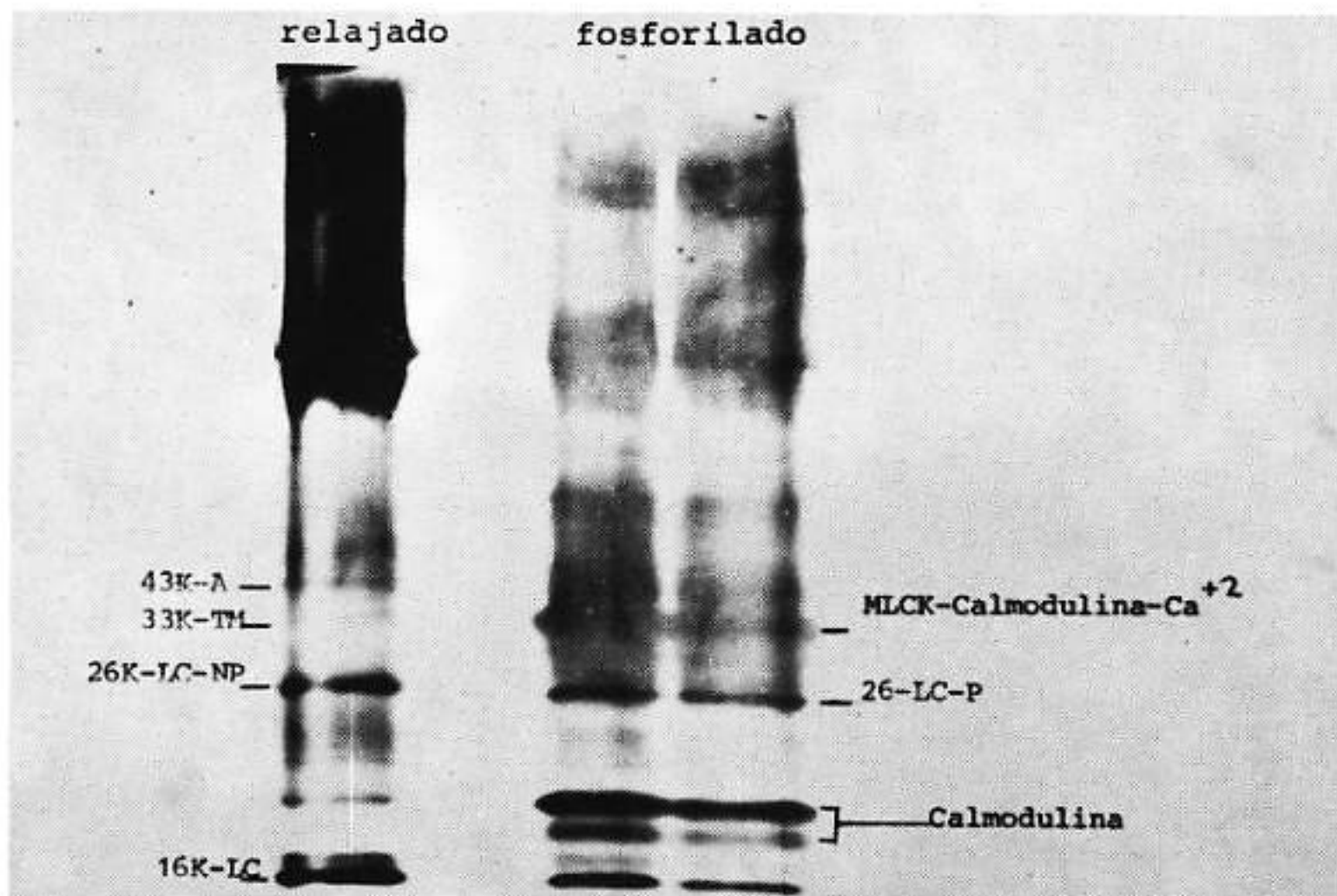


Figura 4. Verificación de la fosforilación de las cadenas ligeras regulatorias en músculo de tarántula por electroforesis en geles de poliacrilamida urea/glicerol (ref. 13).
 Abreviaturas: LC-NP: Cadenas ligeras no fosforiladas. LC-P: Cadenas ligeras fosforiladas. A: Actina. TM: Tropomiosina. MLCK: Quinasa de cadenas ligeras.

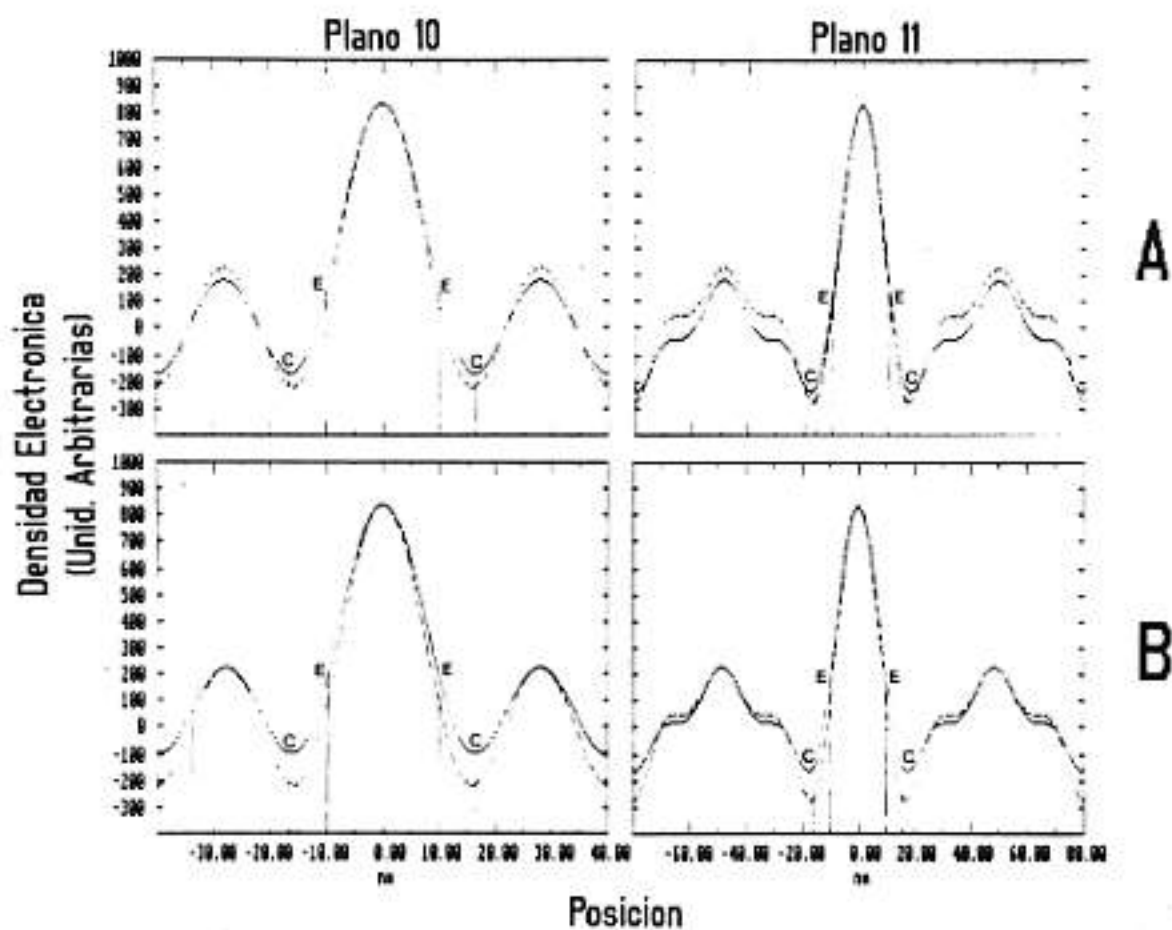


Figura 5. Perfiles de densidad electrónica a lo largo de los planos 10 (izquierda) y 11 (derecha). El punto en 0 nm corresponde al eje central del filamento grueso y las dos líneas verticales a ambos lados señalan el radio del esqueleto (E) y el radio externo de la zona de cabezas de miosina (C) en el estado relajado, según datos de la reconstrucción tridimensional del filamento grueso de tarántula (ref. 5). La curva continua corresponde a músculo relajado y la discontinua a músculo fosforilado. En A) las curvas correspondientes al estado fosforilado fueron normalizadas haciendo coincidir los picos del esqueleto del filamento grueso. En B) las curvas correspondientes al estado fosforilado fueron normalizadas trasladándolas verticalmente, de manera que coincidieran los picos de actina y del esqueleto del filamento grueso. Los registros mecánicos mostrados en la figura 3, los cuales indican que prácticamente no se genera tensión en los músculos fosforilados, señalan que la interpretación de los cambios en la densidad electrónica mostrada en B es la correcta.

datos obtenidos por tinción negativa^{3,4,8} sean artefactuales, indicando que la modificación observada por microscopía electrónica ocurre también en músculos no sometidos a técnicas potencialmente artefactuales.

CONCLUSIONES

La fosforilación de las cadenas ligeras regulatorias en músculo de tarántula induce un desplazamiento de masa de las cabezas de miosina del esqueleto del filamento grueso, el cual fue detectado por el cambio de las intensidades de las reflexiones en los patrones ecuatoriales de difracción de rayos-X confirmando las evidencias previas de microscopía electrónica. Tales cambios pueden ser interpretados en términos de un aumento en la separación promedio entre los subfragmentos S-1 y el esqueleto del filamento grueso, de al menos 6 nm.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al doctor John Kendrick-Jones, del MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge (Inglaterra), por suministrarnos la quinasa (MLCK) utilizada para estos experimentos.

Nelly Panté fue becaria del CONICIT durante la realización del presente trabajo.

Hernando Sosa fue becario del Centro de Estudios Avanzados (CEA), del IVIC, durante la realización de este trabajo.

Este trabajo fue financiado por el CONICIT (Proyectos: S1-1460 a Raúl Padrón y S1-1148 a Carlo Caputo) y por la Muscular Dystrophy Association (MDA), de USA, a Raúl Padrón.

REFERENCIAS

1. Aldestein, R. S. y Klee, C. B.: "Purification and characterization of smooth muscle myosin light chain kinase". *J. Biol. Chem.* 256: 7501-7509, 1981.
2. Bagshaw, C. R.; Eccleston, J. F.; Trentham, D. R. y Yates, D. W.: "Transient kinetic studies of the Mg⁺⁺-dependent ATPase of myosin and its proteolytic subfragments". *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 37: 127-135, 1973.
3. Craig, R.; Padrón, R. y Kendrick-Jones, J.: "Structural changes accompanying phosphorylation of tarantula muscle thick filaments". *Biophys. J.* 47: 469a, 1985.
4. Craig, R.; Padrón, R. y Kendrick-Jones, J.: "Structural changes accompanying phosphorylation of tarantula muscle myosin filaments". *J. Cell Biol.* 105: 1319-1327, 1987.
5. Crowther, R. A.; Padrón, R. y Craig, R.: "Arrangement of the heads of myosin in relaxed thick filaments from tarantula muscle". *J. Mol. Biol.* 184: 429-439, 1985.
6. Kendrick-Jones, J.; Cande, W. Z.; Tooth, P. J.; Smith, R. C. y Scholey, J. M.: "Studies on the effect of phosphorylation of the 20,000 M light chain of vertebrate skeletal smooth muscle myosin". *J. Mol. Biol.* 165: 139-162, 1983.
7. Morgan, M.; Perry, S. V. y Ottaway, J.: "Myosin light-chain phosphatase". *Biochem. J.* 157: 687-697, 1976.
8. Padrón, R.; Craig, R. y Kendrick-Jones, J.: "Cambios estructurales que acompañan la fosforilación de los filamentos gruesos de músculo de tarántula". 2da. Jornadas de Microscopía Electrónica, UCV, Caracas, Venezuela, 1986.
9. Padrón, R.; Crowther, R. A. y Craig, R.: "Three-dimensional reconstruction of native tarantula muscle thick filaments". *Biophys. J.* 45 (2): 10a, 1983.
10. Padrón, R. y Huxley, H. E.: "The effect of the ATP analogue AMPPNP on the structure of crossbridges in vertebrate skeletal muscles: X-ray diffraction and mechanical studies". *J. Musc. Res. and Cell Motility.* 5: 613-655, 1984.
11. Panté, N.: "Estudio por difracción de rayos-X de los cambios estructurales causados por la activación de la contracción muscular". M.Sc. Tesis. Centro de Estudios Avanzados (CEA), IVIC, Caracas, Venezuela, 1986.
12. Panté, N.; Sosa, H. y Padrón, R.: "Predicción de cambios relativos en el patrón de difracción de rayos-X de músculo estriado causados por la activación de la contracción muscular". *Act. Cient. Venez.* 37: 223-225, 1986.
13. Perrie, W. T. y Perry, J. V.: "An electrophoretic study of the low molecular weight components of myosin". *Biochem. J.* 119: 31-38, 1970.
14. Schartau, W. y Leidescher, T.: "Composition of hemolymph of the tarantula *Eurypelma californicum*". *J. Comp. Physiol.* 152 (1): 73-77, 1983.
15. Sellers, J. R.: "Phosphorylation dependent regulation of *Limulus* myosin". *J. Biol. Chem.* 250: 9274-9278, 1981.
16. Sosa, H.: "Estudio por difracción de rayos-X de la estructura de los filamentos contráctiles en músculos estriados de tarántula". Tesis de Lic. en Biología. Universidad Central de Venezuela (UCV), 1986.
17. Sosa, H.; Panté, N. y Padrón, R.: "X-ray diffraction study of the structural changes associated with phosphorylation of tarantula muscle thick filaments". *Biophys. J.* 51: 472a, 1987.
18. Sosa, H.; Panté, N. y Padrón, R.: "Análisis de la sección ecuatorial del patrón de difracción de rayos-X de músculos estriados de tarántula en diferentes condiciones experimentales". *Act. Cient. Venez.* 39 (1): 51-59, 1988.

datos obtenidos por tinción negativa^{3,4,8} sean artefactuales, indicando que la modificación observada por microscopía electrónica ocurre también en músculos no sometidos a técnicas potencialmente artefactuales.

CONCLUSIONES

La fosforilación de las cadenas ligeras regulatorias en músculo de tarántula induce un desplazamiento de masa de las cabezas de miosina del esqueleto del filamento grueso, el cual fue detectado por el cambio de las intensidades de las reflexiones en los patrones ecuatoriales de difracción de rayos-X confirmando las evidencias previas de microscopía electrónica. Tales cambios pueden ser interpretados en términos de un aumento en la separación promedio entre los subfragmentos S-1 y el esqueleto del filamento grueso, de al menos 6 nm.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al doctor John Kendrick-Jones, del MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge (Inglaterra), por suministrarnos la quinasa (MLCK) utilizada para estos experimentos.

Nelly Panté fue becaria del CONICIT durante la realización del presente trabajo.

Hernando Sosa fue becario del Centro de Estudios Avanzados (CEA), del IVIC, durante la realización de este trabajo.

Este trabajo fue financiado por el CONICIT (Proyectos: S1-1460 a Raúl Padrón y S1-1148 a Carlo Caputo) y por la Muscular Dystrophy Association (MDA), de USA, a Raúl Padrón.

REFERENCIAS

1. Aldstein, R. S. y Klee, C. B.: "Purification and characterization of smooth muscle myosin light chain kinase". *J. Biol. Chem.* 256: 7501-7509, 1981.
2. Bagshaw, C. R.; Eccleston, J. F.; Trentham, D. R. y Yates, D. W.: "Transient kinetic studies of the Mg⁺⁺-dependent ATPase of myosin and its proteolytic subfragments". *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 37: 127-135, 1973.
3. Craig, R.; Padrón, R. y Kendrick-Jones, J.: "Structural changes accompanying phosphorylation of tarantula muscle thick filaments". *Biophys. J.* 47: 469a, 1985.
4. Craig, R.; Padrón, R. y Kendrick-Jones, J.: "Structural changes accompanying phosphorylation of tarantula muscle myosin filaments". *J. Cell Biol.* 105: 1319-1327, 1987.
5. Crowther, R. A.; Padrón, R. y Craig, R.: "Arrangement of the heads of myosin in relaxed thick filaments from tarantula muscle". *J. Mol. Biol.* 184: 429-439, 1985.
6. Kendrick-Jones, J.; Cande, W. Z.; Tooth, P. J.; Smith, R. C. y Scholey, J. M.: "Studies on the effect of phosphorylation of the 20,000 M light chain of vertebrate skeletal smooth muscle myosin". *J. Mol. Biol.* 165: 139-162, 1983.
7. Morgan, M.; Perry, S. V. y Ottaway, J.: "Myosin light-chain phosphatase". *Biochem. J.* 157: 687-697, 1976.
8. Padrón, R.; Craig, R. y Kendrick-Jones, J.: "Cambios estructurales que acompañan la fosforilación de los filamentos gruesos de músculo de tarántula". 2das. Jornadas de Microscopía Electrónica, UCV, Caracas, Venezuela, 1986.
9. Padrón, R.; Crowther, R. A. y Craig, R.: "Three-dimensional reconstruction of native tarantula muscle thick filaments". *Biophys. J.* 45 (2): 10a, 1984.
10. Padrón, R. y Huxley, H. E.: "The effect of the ATP analogue AMPPNP on the structure of crossbridges in vertebrate skeletal muscles: X-ray diffraction and mechanical studies". *J. Musc. Res. and Cell Motility.* 5: 613-655, 1984.
11. Panté, N.: "Estudio por difracción de rayos-X de los cambios estructurales causados por la activación de la contracción muscular". M.Sc. Tesis. Centro de Estudios Avanzados (CEA), IVIC. Caracas, Venezuela, 1986.
12. Panté, N.; Sosa, H. y Padrón, R.: "Predicción de cambios relativos en el patrón de difracción de rayos-X de músculo estriado causados por la activación de la contracción muscular". *Act. Cient. Venez.* 37: 223-225, 1986.
13. Perrie, W. T. y Perry, J. V.: "An electrophoretic study of the low molecular weight components of myosin". *Biochem. J.* 119: 31-38, 1970.
14. Schartau, W. y Leidescher, T.: "Composition of hemolymph of the tarantula *Eurypelma californicum*". *J. Comp. Physiol.* 152 (1): 73-77, 1983.
15. Sellers, J. R.: "Phosphorylation dependent regulation of *Limulus* myosin". *J. Biol. Chem.* 250: 9274-9278, 1981.
16. Sosa, H.: "Estudio por difracción de rayos-X de la estructura de los filamentos contráctiles en músculos estriados de tarántula". Tesis de Lic. en Biología, Universidad Central de Venezuela (UCV), 1986.
17. Sosa, H.; Panté, N. y Padrón, R.: "X-ray diffraction study of the structural changes associated with phosphorylation of tarantula muscle thick filaments". *Biophys. J.* 51: 472a, 1987.
18. Sosa, H.; Panté, N. y Padrón, R.: "Análisis de la sección ecuatorial del patrón de difracción de rayos-X de músculos estriados de tarántula en diferentes condiciones experimentales". *Act. Cient. Venez.* 39 (1): 51-59, 1988.