

На правах рукописи

МАТЮШЕНКО Александр Михайлович

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ МЫШЕЧНЫХ
ИЗОФОРМ Trm1.1 И Trm2.2 РЕКОМБИНАНТНОГО ТРОПОМИОЗИНА
ЧЕЛОВЕКА**

03.01.04 Биохимия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2017

Работа выполнена в лаборатории структурной биохимии белка Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» и на кафедре биохимии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор
Левицкий Дмитрий Иванович

Официальные оппоненты:

Ширинский Владимир Павлович
доктор биологических наук, профессор, Научно-исследовательский институт экспериментальной кардиологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Министерства здравоохранения РФ, заведующий лабораторией клеточной подвижности.

Хайтлина София Юрьевна
доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биологии клетки в культуре.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук

Защита состоится « 22 » июня 2017 г. в 13 часов на заседании диссертационного совета Д 002.247.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 2.

С диссертацией можно ознакомиться в Библиотеке биологической литературы Российской академии наук по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 1 и на сайте <http://fbras.ru/>.

Автореферат разослан « ___ » _____ 2017 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат биологических наук

А.Ф. Орловский

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. К настоящему времени уже не подлежит сомнению, что одну из ключевых ролей в механизме регуляции сокращения скелетной и сердечной мышцы играет тропомиозин (Трп) – актин-связывающий белок, способный перемещаться на поверхности актинового филамента, открывая или закрывая участки взаимодействия актина с головками молекул миозина. Несмотря на интенсивные исследования, многие особенности функционирования Трп остаются до сих пор неясными. Так, например, до конца не ясно, способен ли Трп непосредственно взаимодействовать с миозиновой головкой при ее связывании с актином. Если такое взаимодействие имеет место, то в каком участке молекулы Трп оно происходит и какую природу имеет? Кроме того, остается до конца непонятной роль физических свойств тропомиозинового тяжа в регуляции мышечного сокращения. Поиск ответов на эти вопросы составляет фундаментальную задачу, решить которую стараются многие научные группы во всем мире. Другой весьма актуальной проблемой является выяснение особенностей функционирования Трп при различных патологических состояниях мышц, таких как наследственные миопатии. Подобные заболевания зачастую ассоциированы с точечными мутациями в генах Трп (и, соответственно, с точечными аминокислотными заменами в молекуле Трп) и могут приводить к самым тяжелым последствиям для сердечных и скелетных мышц человека. В последнее время эта проблема привлекает все большее внимание исследователей; это обусловлено значительными успехами в секвенировании генов, ответственных за кодирование мышечных белков у людей, страдающих от мышечных заболеваний. На данный момент в генах Трп насчитывается более ста точечных мутаций, ассоциированных с разными видами миопатий. При этом практически неизвестными остаются пока механизмы развития миопатий, а для многих из них неизвестны даже изменения в структуре и функциональных свойствах Трп, вызываемые соответствующими аминокислотными заменами в его молекуле.

И, наконец, еще одной недавно появившейся и активно развивающейся проблематикой является изучение свойств гетеродимеров Трп. Дело в том, что Трп в мышечной ткани может быть представлен как в виде гомодимеров (в быстрых скелетных мышцах и в сердце это $\alpha\alpha$ -гомодимеры изоформы Трп1.1), так и в виде гетеродимеров (в быстрых скелетных мышцах это $\alpha\beta$ -гетеродимеры изоформ Трп1.1 и Трп 2.2). Свойства гетеродимеров Трп пока почти не изучены; не исключено, что они могут существенно отличаться от свойств гомодимеров. Кроме того, изоформа Трп 2.2 (β -Трп) существует в мышце только в виде $\alpha\beta$ -гетеродимеров, т.к. ее $\beta\beta$ -гомодимеры крайне нестабильны. Особую актуальность этому направлению исследований придает тот факт, что зачастую в мышцах количество гетеродимеров Трп может превышать количество гомодимеров. Следовательно, наиболее корректной моделью изучения эффектов миопатий, вызванных аминокислотными заменами в молекуле Трп, являются именно гетеродимеры. В то же время, почти все работы в этом направлении проводились до настоящего времени лишь на гомодимерах Трп, что было обусловлено большой сложностью получения в чистом виде его гетеродимеров.

Основной целью настоящей работы было изучение структурно-функциональных особенностей различных мышечных изоформ Трп для уточнения его роли в регуляции сокращения скелетных и сердечных мышц как в нормальном состоянии, так и при различных наследственных заболеваниях (миопатиях и кардиомиопатиях), вызванных мутациями в генах Трп. В соответствии с этой целью были поставлены следующие **конкретные задачи**:

1. Установить роль центральной части молекулы Trm в регуляции мышечного сокращения путем введения в эту часть молекулы стабилизирующих аминокислотных замен (G126R и D137L) и последующего детального изучения структуры и функциональных свойств препаратов Trm с такими заменами.
2. Получить рекомбинантные препараты Trm с аминокислотными заменами, соответствующими миопатическим и кардиомиопатическим мутациям в генах Trm, и изучить структурные и функциональные свойства таких препаратов.
3. Изучить структурные и функциональные свойства препаратов гомо- и гетеродимеров Trm с различными аминокислотными заменами лишь в одной из двух цепей молекулы и сравнить их со свойствами гомодимеров, несущих такие замены в обеих цепях молекулы.

Научная новизна. В работе впервые были получены доказательства того, что внесение аминокислотных замен G126R и D137L в центральную часть молекулы Trm стабилизирует не только эту часть молекулы, но и всю молекулу в целом. Эти изменения в структуре молекулы Trm приводят к стабилизации комплекса Trm с актином и увеличению жесткости тонкого филамента (актинового филамента, содержащего Trm и тропонин). В ходе работы впервые были получены данные о изменениях функциональных свойств Trm, вызванных подобной стабилизацией. Так, было показано, что она влияет на чувствительность тонкого филамента к ионам кальция, снижает скорость и степень релаксации миофибрилл, а также изменяет параметры взаимодействия миозина с актиновым филаментом. Помимо этого, была предложена модель взаимодействия Trm с головкой миозина на поверхности актинового филамента. Получены новые данные о влиянии кардиомиопатических мутаций в генах Trm на структуру и функциональные свойства рекомбинантных препаратов Trm, несущих соответствующие аминокислотные замены в различных частях молекулы.

Научно-практическая значимость работы. Представленные в работе данные расширяют представления о функционировании Trm и о его роли в регуляции мышечного сокращения. В частности, становится понятно, что «природная» нестабильность центральной части молекулы Trm необходима для тонкой регуляции мышечного сокращения, т.к. ее стабилизация приводит к значительному усилению сократительных свойств, что по некоторым параметрам превосходит эффекты многих миопатий и может являться пагубным для функционирования мышц. Данные, полученные в ходе изучения препаратов Trm с аминокислотными заменами, ассоциированными с кардиомиопатиями, расширяют представления о их влиянии на сокращение сердечной мышцы и могут быть в дальнейшем использованы для поиска новых препаратов, направленных на лечение этих наследственных заболеваний.

Степень достоверности полученных результатов. Достоверность представленных в диссертации данных и сделанных выводов определяется использованием большого количества современных физико-химических методов исследования белков.

Личный вклад автора заключался в получении всех рекомбинантных препаратов Trm, планировании и проведении научных экспериментов, обработке и интерпретации полученных данных, а также в подготовке материалов научных публикаций.

Связь работы с государственными программами. Работа была поддержана грантами РФФИ (№ 13-04-40099-Н КОМФИ, № 16-34-00654-мол_a, № 15-34-20136-

мол_а_вед и № 14-04-31427-мол_а), грантом РФФИ № 16-14-10199 и Программой «Молекулярная и клеточная биология» Президиума Российской академии наук.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту.

1). Стабилизация центральной части молекулы Тpm путем замены неканонических остатков Gly126 и Asp137 на канонические остатки Arg и Leu приводит к существенному изменению доменной структуры Тpm и к драматическим изменениям в его функциональных свойствах. Такая стабилизация существенно увеличивает изгибную жесткость тонкого филамента (актинового филамента, содержащего Тpm и тропомиозиновый комплекс), повышает чувствительность тонкого филамента к ионам кальция, снижает скорость и степень релаксации миофибрилл, а также изменяет параметры взаимодействия миозина с актиновым филаментом.

2). Показано, что кардиомиопатические мутации в генах Тpm могут оказывать сильное влияние на функциональные свойства рекомбинантных препаратов Тpm, несущих соответствующие аминокислотные замены в различных частях молекулы (в частности, в участках связывания тропонина Т). Многие из таких замен нарушают взаимодействие миозина с актином, регулируемое тропонин-тропомиозиновой системой, что может являться причиной гиперчувствительности тонкого филамента к ионам кальция и приводить к неполной релаксации сердечной мышцы.

3). Показано, что как $\alpha\beta$ -гетеродимеры Тpm, так и $\alpha\alpha$ -гомодимеры, несущие аминокислотные замены лишь в одной из двух цепей, отличаются по своим структурным и функциональным свойствам от $\alpha\alpha$ -гомодимеров, несущих такие замены в обеих цепях молекулы. Использование подобных препаратов может служить в дальнейшем наиболее адекватной моделью для изучения свойств Тpm, несущего аминокислотные замены, ассоциированные с мутациями в его генах.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы были представлены на следующих научных симпозиумах и конференциях: на VI и VII Российских симпозиумах «Белки и пептиды» (Уфа, 2013; Новосибирск, 2015), на международных симпозиумах «Биологическая подвижность» (Пушино, 2012, 2014 и 2016 г.г.), на международной конференции «Ломоносов»-2013 и на 43-й, 44-й и 45-й Европейских мышечных конференциях (Зальцбург, Австрия, 2014; Варшава, Польша, 2015; Монпелье, Франция, 2016).

Публикации. По результатам работы опубликовано 8 статей в журналах, рекомендованных ВАК РФ, и 24 тезиса в материалах отечественных и международных конференций.

Структура и объем работы. Диссертация имеет стандартную структуру и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, заключения, и списка цитируемой литературы (180.ссылок). Диссертация изложена на 139 страницах, содержит 59 рисунков и 8 таблиц.

Список основных сокращений

ДСК – дифференциальная сканирующая калориметрия
КД – круговой дихроизм
ИПС – искусственная подвижная система
Тpm – тропомиозин
F-актин – фибриллярный актин

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы

В обзоре литературы подробно рассмотрены структура молекулы Трм и принципы ее формирования, многообразие изоформ Трм, их распространение и новая номенклатура. Особое внимание уделено взаимодействию Трм с актиновым филаментом и участию Трм в регуляции мышечного сокращения. Отдельно рассмотрены работы, посвященные центральной части Трм, раскрывающие уникальность ее структуры и механизмы ее дестабилизации. Значительное внимание уделено наследственным заболеваниям, ассоциированным с точечными мутациями в генах Трм, обсуждаются морфологические особенности и многообразие этих заболеваний. Подробно рассмотрены те изоформы Трм, в которых встречаются аминокислотные замены, приводящие к патологиям, и обсуждаются существующие на данный момент модели, объясняющие развитие миопатий. Последняя глава обзора литературы посвящена гетеродимерам Трм, их распространению в мышцах, способу их получения *in vitro* и актуальности их использования в качестве моделей для структурно-функциональных исследований препаратов Трм с аминокислотными заменами, вызванными миопатическими мутациями в генах Трм. .

Материалы и методы исследования

Молекулярно-генетические конструкции, содержащие аминокислотные точечные замены, были получены методом сайт-направленного мутагенеза на основе плазмид Трм дикого типа, любезно предоставленных д-ром С. Redwood и проф. М. Geeves для конструкций Трм 1.1 и Трм 2.2, соответственно. Всем кодирующим последовательностям Трм предшествовала последовательность 5'-GCTAGC-3', соответствующая дипептиду Ala-Ser, который имитировал N-концевое ацетилирование [Monteiro *et al.*, 1994], необходимое для взаимодействия Трм с F-актином. Мутации были внесены с использованием пары перекрывающихся праймеров, содержащих необходимые замены, или методом клонирования с мега-праймером. Корректность нуклеотидной последовательности и наличие исследуемых мутаций проверяли с помощью секвенирования в коммерческой организации «Евроген».

Получение препаратов белков. Экспрессию рекомбинантных препаратов Трм и его мутантных форм проводили в клетках *E. coli* штамма С41(DE3). Бактериальный клеточный лизат для избавления от большого количества балластных белков подвергали тепловой обработке (6 минут при 85°C), затем охлаждали на льду и центрифугировали, после чего супернатант подвергали изоэлектрическому осаждению; осадок растворяли и проводили очистку ренатурированного Трм методом ионообменной хроматографии на колонке HiTrap QHP (GE Healthcare) с использованием хроматографической системы ProStar 3250 (Varian Inc.). Очистку рекомбинантного β -Трм (изоформа Трм 2.2), содержащего N-концевой His-tag, проводили методом металло-аффинной хроматографии на колонке His-Trap HP.

Препараты $\alpha\beta$ -гетеродимеров Трм получали согласно описанной ранее методике [Kalyva *et al.*, 2012] с некоторыми введенными нами модификациями. $\alpha\alpha$ -Гомодимеры Трм (с введенными аминокислотными заменами или без них) смешивали с $\beta\beta$ -гомодимерами, содержащими N-концевой His-tag, смесь прогревали до 65°C для разделения димеров на отдельные мономеры, после чего охлаждали до 25°C и инкубировали при этой температуре для реассоциации цепей Трм с образованием димеров. Полученную смесь $\alpha\alpha$ - и

$\beta\beta$ -гомодинеров и $\alpha\beta$ -гетеродинеров Трм подвергали металло-аффинной хроматографии на колонке His-Trap HP, на которой удерживаются лишь $\alpha\beta$ -гетеродинеры и $\beta\beta$ -гомодинеры, содержащие His-tag в β -цепи, которые впоследствии разделяли градиентом имидазола. На последней стадии His-tag удаляли из β -цепи $\alpha\beta$ -гетеродинеров Трм, обрабатывая их протеазой Fxа. Применение этой методики позволяло получать чистые препараты $\alpha\beta$ -гетеродинеров Трм. Препараты $\alpha\alpha$ -гомодинеров Трм с аминокислотными заменами только в одной из двух α -цепей проводили по той же схеме, используя вместо $\beta\beta$ -гомодинеров $\alpha\alpha$ -гомодинеры, содержащие N-концевой His-tag.

Актин, тропониновый комплекс и изолированные головки миозина (субфрагмент 1 миозина, S1) получали из скелетных мышц кролика по стандартным методикам [Spudich and Watt, 1971; Greaser and Gergely, 1971; Weeds and Taylor, 1975].

Экспериментальные методы и подходы

Круговой дихроизм (КД). Спектры КД для препаратов Трм были получены при 5°C на приборе Chirascan Circular Dichroism Spectrometer (Applied Photophysics) в ЦКП «Промышленные биотехнологии» ФИЦ биотехнологии РАН в кварцевой кювете с длиной оптического пути 0.2 мм. Температурные зависимости средней остаточной эллиптичности при 222 нм (θ_{222}) регистрировали в интервале от 5°C до 70°C при скорости нагрева 1°C/мин. Эксперименты проводили в 20 мМ Na-фосфатном буфере (pH 7,3), содержащем 100 мМ NaCl.

Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК). Калориметрические исследования проводили методом ДСК на дифференциальном адиабатическом сканирующем микрокалориметре ДАСМ-4М (Институт биологического приборостроения РАН, Пушкино) в 20 мМ Na-фосфатном буфере (pH 7,3), содержащем 100 мМ NaCl, при скорости нагрева 1 К/мин. Обработку результатов и процедуру деконволюции (т.е. разложение кривых теплопоглощения на отдельные калориметрические домены) проводили, используя программу Origin 1.16 ("MicroCal").

Исследования стабильности комплексов Трм с F-актином проводили путем измерения температурных зависимостей их диссоциации, регистрируемой по снижению светорассеяния при 350 нм под углом в 90° [Kremneva *et al.*, 2004] на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian), оборудованном специальным термоблоком, позволяющим поддерживать постоянную скорость нагрева при постоянной регистрации температуры. Метод основан на том, что комплекс Трм с F-актином имеет большее светорассеяние, чем свободный F-актин, в то время как свободный Трм вовсе не рассеивает свет в выбранных условиях. Таким образом, по уменьшению светорассеяния можно судить о диссоциации Трм с поверхности актина, а температура, при которой происходит этот процесс, может в свою очередь служить относительной мерой стабильности комплексов Трм с F-актином.

Определение сродства Трм к F-актину проводили методом соосаждения. Пробы, содержащие 10 μ М F-актин, стабилизированный фаллоидином (15 мкМ), и Трм в концентрации от 0,25 до 6 μ М, центрифугировали 40 мин на Airfuge TL100A (Beckman) при 100000 g, после чего супернатанты и осадки анализировали при помощи SDS-PAGE электрофореза.

Эксперименты в искусственной подвижной системе (*in vitro motility assay*) проводили совместно с сотрудниками лаборатории биологической подвижности (руководитель – д.б.н. С.Ю. Бершицкий) к.б.н. Г.В. Копыловой и к.б.н. Д.В. Щепкиным в Институте иммунологии и физиологии УрО РАН (г. Екатеринбург). При разных концентрациях кальция регистрировали скорость АТФ-зависимого движения ("скольжения") тонких филаментов (актиновых филаментов, содержащих Трм и

тропониновый комплекс) по поверхности, покрытой миозином. Зависимость скорости скольжения тонких филаментов от концентрации кальция анализировали с помощью уравнения Хилла; при этом определяли pCa_{50} (кальциевую чувствительность), т.е. то значение pCa , при котором достигается полумаксимальная скорость скольжения филаментов.

Кроме описанных выше методов в работе были использованы и другие методы и подходы: ограниченный протеолиз препаратов Трм трипсином; регистрация температурных зависимостей эксимерной флуоресценции пиренил-меченого Трм; SDS-PAGE электрофорез; определение АТФазной активности субфрагмента 1 миозина (S1) в присутствии реконструированных тонких филаментов; измерение вязкости растворов Трм; измерения изгибной жесткости тонких филаментов, выполненные с помощью метода оптической ловушки совместно с С.Р. Набиевым (Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, г. Екатеринбург); молекулярное моделирование (совместно с д.ф.-м.н. А.К. Цатуряном (Институт механики МГУ имени М.В. Ломоносова) и эксперименты, проведенные на реконструированных миофибриллах совместно с сотрудниками кафедры физиологии Университета Флоренции (Италия).

Основные результаты исследования и их обсуждение

1. Стабилизация центральной части молекулы Трм

Одной из целей нашей работы было установление роли центральной части молекулы Трм в регуляции мышечного сокращения. Дело в том, что достаточно давно было известно, что одним из самых нестабильных мест в молекуле Трм является его центральная часть [Brown *et al.*, 2005; Ueno *et al.*, 1986; Pato *et al.*, 1981]. Однако до сих пор не до конца понятна роль такой дестабилизации в функционировании Трм. В центральной части молекулы имеется множество дестабилизирующих остатков [Minakata *et al.*, 2008]; наше внимание, однако, было сконцентрировано на двух «неканонических» остатках, расположенных в этой области – Gly126 и Asp 137. Ранее было показано, что замена этих остатков на канонические остатки Leu или Arg, соответственно, приводит к значительной стабилизации центральной части молекулы Трм и к изменению некоторых его функциональных свойств [Sumida *et al.*, 2008; Nevzorov *et al.*, 2011]; следовательно, эти замены могут являться отличной моделью стабилизации центральной части для изучения ее функциональной роли в молекуле Трм. Мы получали препараты Трм с аминокислотными заменами G126R и D137L, которые присутствовали в молекуле Трм как по отдельности, так и одновременно. Кроме того, все эти препараты имели также аминокислотную замену C190A, которая предотвращала образование дисульфидной связи в молекуле Трм и имитировала восстановленное состояние SH-групп остатков Cys190. Эта замена не изменяла вторичную структуру Трм, что было показано методом КД (данные не приведены), и не оказывала особого влияния на характер тепловой денатурации Трм (рис. 1); поэтому мы решили, что Трм с заменой C190A вполне может быть использован в работе в качестве белка дикого типа (Трм WT).

Для подтверждения и оценки стабилизирующего эффекта аминокислотных замен G126R и D137L мы воспользовались методом ограниченного протеолиза трипсином (рис. 2). Показано, что внесение этих замен в центральную часть Трм приводит к эффективному подавлению протеолитического расщепления трипсином, что свидетельствует о значительной стабилизации центральной части молекулы Трм, т.к. первичной сайт

протеолиза находится после остатка Arg133, который расположен как раз в центре молекулы. Особенно ярко этот эффект был выражен для препарата Трм G126R/D137L, несущего две стабилизирующие замены одновременно (рис. 2).

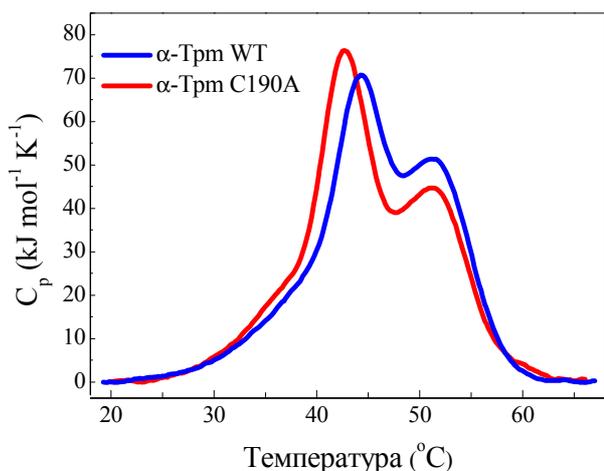


Рис. 1. Термограммы ДСК для препарата Трм WT с восстановленными SH-группами остатков Cys190 (синяя кривая) и препарата с аминокислотной заменой C190A (красная кривая). Эксперименты проводили при концентрации Трм 2 мг/мл и постоянной скорости нагрева 1 К/мин.

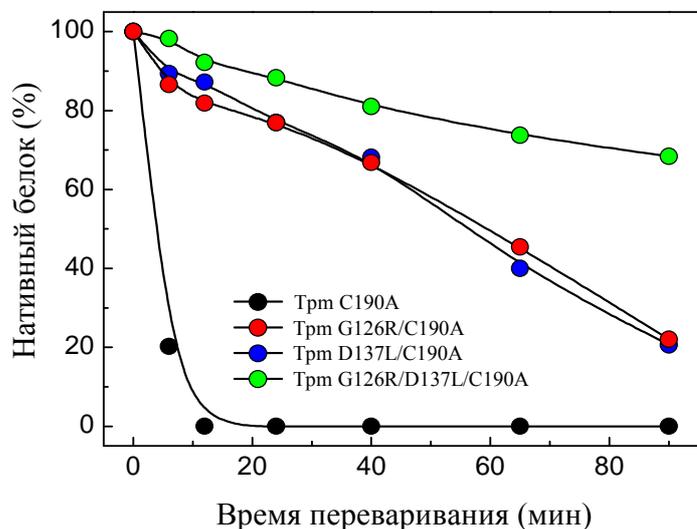
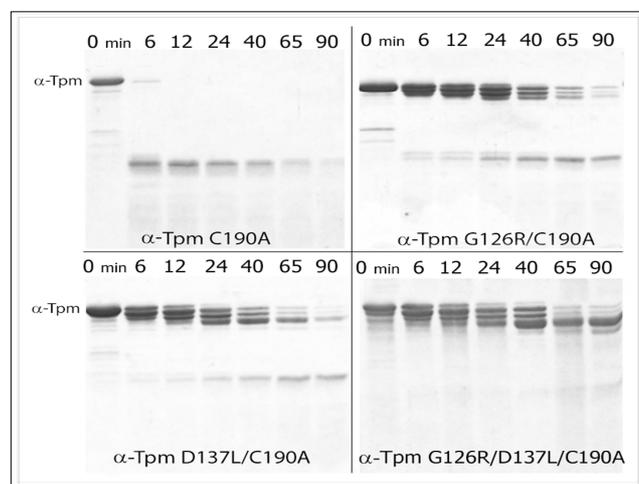


Рис.2. Ограниченный протеолиз трипсином препаратов Трм с аминокислотными заменами в центральной части молекулы: G126R (красный), D137L (синий) и G126R/D137L (зеленый). Черная кривая – контрольный препарат Трм C190A. Эксперименты проводили при 30°C при весовом соотношении трипсина к Трм, равном 1:150. На электрофореграмме (слева) цифры соответствуют минутам, при которых отбирались пробы для анализа методом SDS-PAGE. Справа представлена кинетика протеолитического расщепления Трм трипсином.

Для того чтобы оценить влияние стабилизирующих аминокислотных замен на структуру всей молекулы Трм, мы использовали метод ДСК. Оказалось, что внесение этих замен оказывает существенное влияние на структуру молекулы (рис. 3). Это выразилось не только в повышении термостабильности Трм (т.е. в смещении кривых теплоемкости на термограммах ДСК в сторону более высоких температур), но и в изменениях доменной структуры молекулы Трм (под доменом в данном случае понимается калориметрический домен – область молекулы, которая плавится независимо и кооперативно). И в этом случае наиболее яркий эффект наблюдался для препарата Трм G126R/D137L, для которого, в частности, был выявлен совершенно новый пик на кривых избыточного теплопоглощения, расположенный в области 65°C (рис. 3).

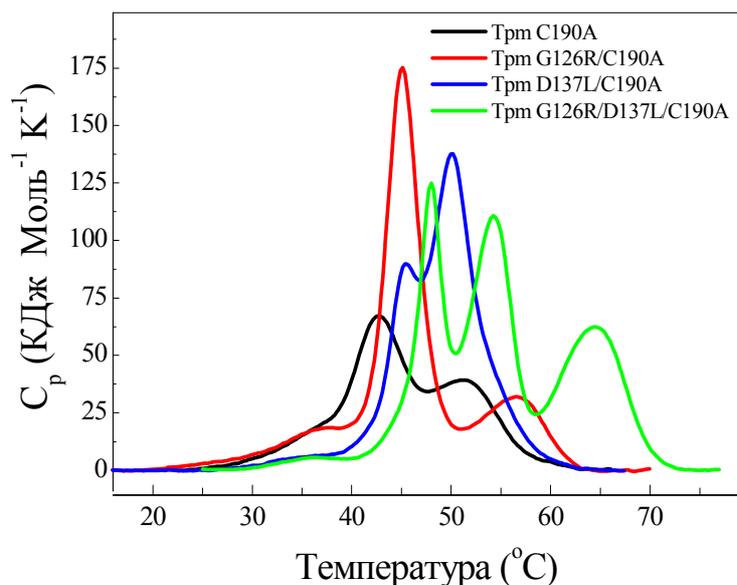


Рис. 3. Температурные зависимости избыточного теплопоглощения, полученные методом ДСК для препаратов Trm C190A (черная кривая), Trm C190A/G126R (красная кривая), Trm C190A/D137L (синяя кривая) и Trm C190A/G126R/D137L (зеленая кривая).

Столь значительные изменения в характере тепловой денатурации Trm с заменами G126R и D137L, включая появление новых тепловых переходов на кривых ДСК, привело нас к необходимости провести идентификацию калориметрических доменов для этих препаратов. Для этого мы применили два независимых методических подхода, которые требовали наличия единственного остатка цистеина в определенной части молекулы Trm. Мы использовали как Trm WT, содержащий остаток Cys190 в С-концевой части молекулы, так и Trm S36C/C190A, в котором остаток цистеина был «перемещен» из С-концевой части молекулы в ее N-концевую часть. Один из этих подходов – исследование температурной зависимости тушения эксимерной флуоресценции пиреновой метки, присоединенной к остатку Cys36 или Cys190 в молекуле Trm, и ее сопоставление с соответствующей кривой ДСК, а другой – образование дисульфидной связи между двумя цепями молекулы Trm, которое приводит к значительной стабилизации той части молекулы, где находится остаток цистеина. На рисунках 4 и 5 приведены примеры применения этих подходов для идентификации калориметрического домена, соответствующего плавлению N-концевой части молекулы Trm, где был локализован остаток Cys36. Тушение флуоресценции эксимеров пирена коррелировало с тепловой денатурацией самого термостабильного калориметрического домена 3 (рис. 4). Следовательно, этот домен соответствует плавлению N-концевой части молекулы Trm, где локализован остаток Cys36. Это подтвердилось и при использовании другого подхода: было показано, что образование дисульфидной связи между остатками Cys36 в двух цепях молекулы Trm резко повышает термостабильность домена 3 (рис. 5).

С использованием двух описанных выше подходов нам удалось идентифицировать калориметрические домены для всех препаратов Trm со стабилизированной центральной частью. На основании полученных данных было сделано заключение, что аминокислотные замены D137L и G126R (и особенно двойная замена D137L/G126R) в центральной части Trm оказывают значительное влияние на доменную структуру молекулы Trm и стабилизируют не только эту часть молекулы, но и другие ее части, включая N- и С-концевые домены. Таким образом, стабилизация центральной части молекулы Trm при замене неканонических остатков Asp137 и Gly126 на канонические остатки Leu и Arg, соответственно, может передаваться на большое расстояние вдоль всей длины двойной спирали Trm, стабилизируя, таким образом, и другие участки его молекулы.

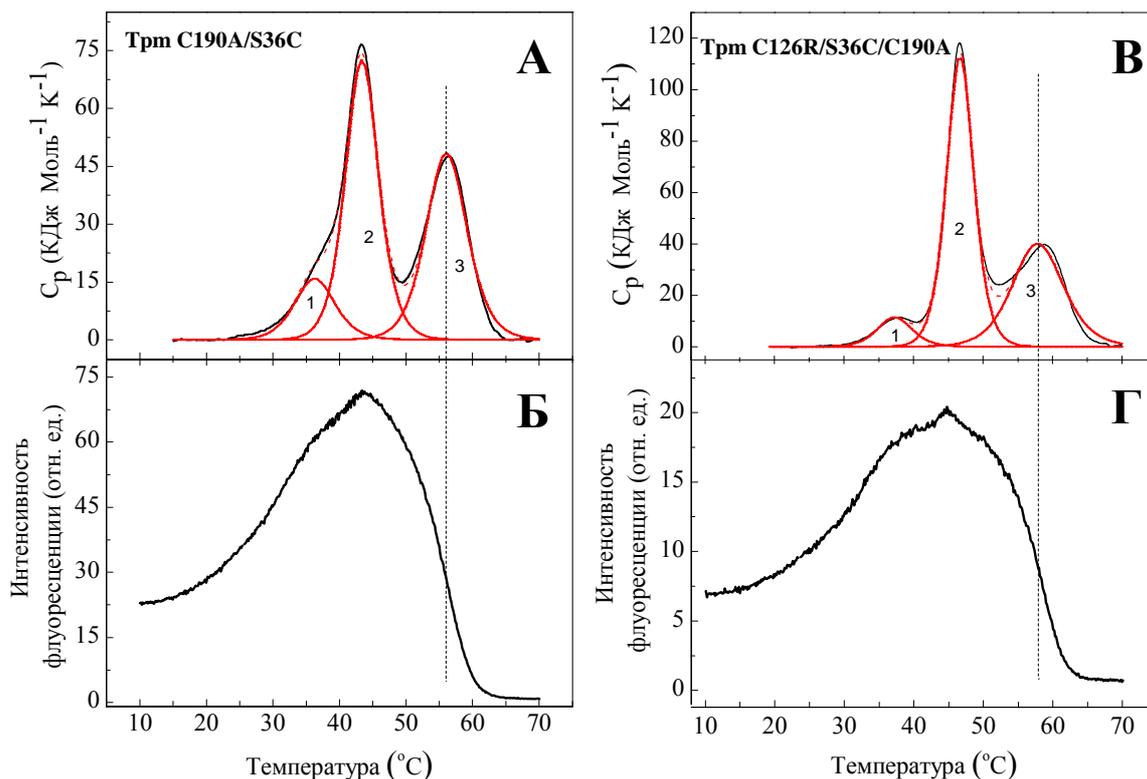


Рис. 4. Сравнение результатов деконволюции кривых избыточного теплопоглощения, полученных методом ДСК (А,В), и температурных зависимостей эксимерной пиреновой флуоресценции (Б, Г) для препаратов Trp S36C/C190A (А, Б) и Trp S36C/G126R/C190A (В, Г). Полупереходы на температурных зависимостях падения интенсивности эксимерной флуоресценции соответствуют максимуму наиболее термостабильного калориметрического домена 3 на кривых ДСК.

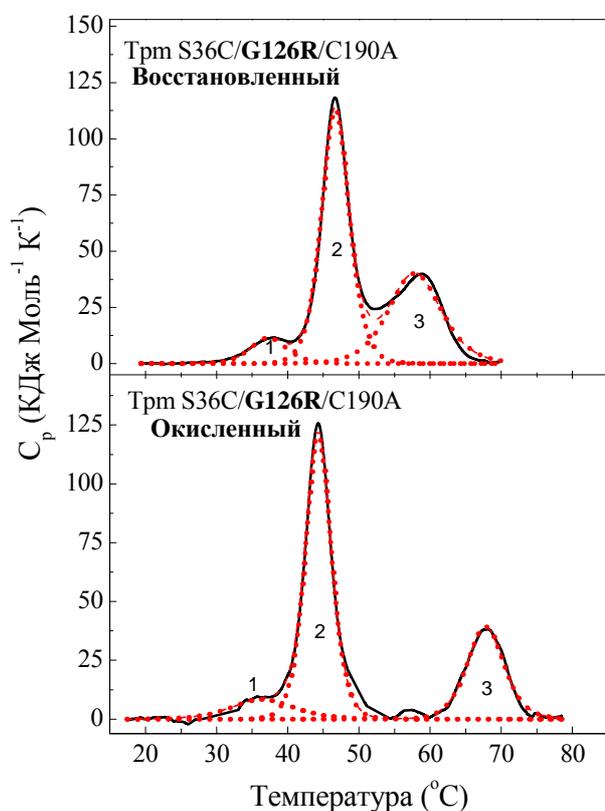


Рис. 5. Деконволюция кривых избыточного теплопоглощения, полученных методом ДСК для препарата Trp S36C/G126R/C190A. Сверху приведены данные для препарата с восстановленными SH-группами остатков Cys36, а снизу – для препарата с дисульфидной связью между этими остатками. Цифрами обозначены номера калориметрических доменов – слева направо по мере увеличения температуры их плавления. Сплошными черными линиями обозначены экспериментальные кривые, а красными пунктирными линиями – результаты их деконволюции на отдельные калориметрические домены.

Мы предположили, что столь сильные структурные изменения в молекуле Трм должны оказывать достаточно серьезное влияние на его функциональные свойства. В первую очередь мы решили оценить влияние стабилизирующих аминокислотных замен на сродство Трм к F-актину, применив для этого метод соосаждения Трм с F-актином. Полученные результаты свидетельствуют о том, что введение стабилизирующих замен в центральную часть молекулы Трм не оказывает особого влияния на взаимодействие Трм с актином (рис. 6), и доказывают несостоятельность гипотезы о том, что дестабилизация центральной части Трм является необходимым условием для его связывания с актиновым филаментом.

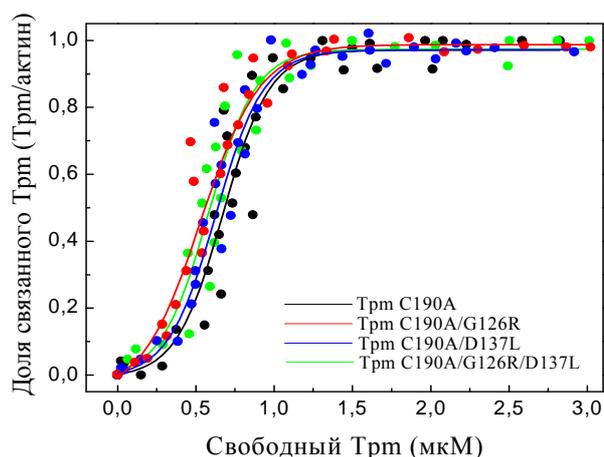


Рис. 6. Связывание различных препаратов Трм с F-актином в экспериментах по соосаждению. Представлены зависимости степени насыщения актинового филамента молекулами Трм от концентрации свободного Трм, остающегося в супернатанте после центрифугирования комплексов Трм с F-актином. Видно, что стабилизирующие замены G126R, D137L и G126R/D137L не оказывают заметного влияния на взаимодействие Трм с F-актином.

С другой стороны, стабилизация центральной части молекулы Трм оказывала сильное влияние на стабильность его комплексов с F-актином, что было показано при анализе температурных зависимостей диссоциации таких комплексов, регистрируемой по снижению светорассеяния (рис. 7). Как видно из этого рисунка, аминокислотные замены D137L и G126R (и особенно двойная замена D137L/G126R) в центральной части Трм значительно повышают температуру диссоциации комплексов Трм с F-актином по сравнению с контрольным Трм C190A, что свидетельствует об увеличении их прочности.

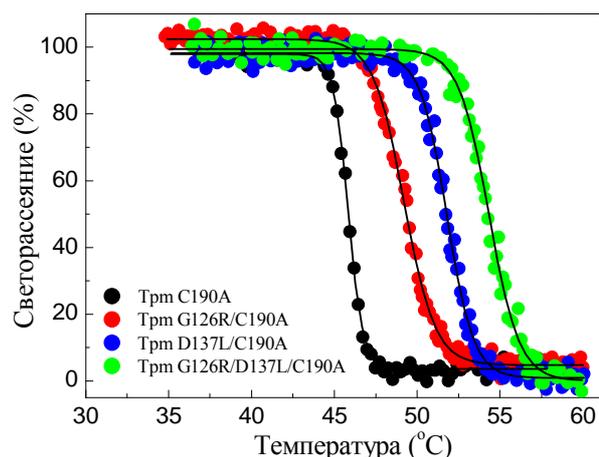


Рис. 7. Нормализованные температурные зависимости диссоциации комплексов Трм с F-актином, регистрируемой по снижению интенсивности светорассеяния. Черная кривая соответствует контрольному препарату Трм C190A, красная – Трм G126R, синяя – Трм D137L и зеленая – Трм G126R/D137L. Концентрация F-актина составляла 20 мкМ, Трм – 10 мкМ. Скорость прогрева – 1°C/мин.

Подобное увеличение прочности комплексов Трм с F-актином приводит не только изменению их свойств, но и к увеличению жесткости всего тонкого филамента (т.е. филамента состоящего из актина, Трм и тропонинового комплекса), что было установлено при измерениях изгибной жесткости таких филаментов методом оптической ловушки (Таблица 1). Как видно из результатов, приведенных в этой таблице, стабилизация центральной части молекулы Трм приводит к практически двукратному увеличению

жесткости тонкого филамента, тем самым значительно изменяя его биофизические свойства.

Таблица 1. Изгибная жесткость, измеренная методом оптической ловушки для F-актина и реконструированных тонких филаментов, содержащих тропонин и контрольный Трм С190А или Трм с аминокислотными заменами G126R/D137L в центральной части молекулы.

Филаменты	Изгибная жесткость, $K \times 10^{26} \text{ Н} \times \text{м}^2$, значение $\pm \text{SE}$	
	F-актин	4.4 \pm 0.7
Тонкий филамент, содержащий Трм и тропонин	+Ca²⁺	-Ca²⁺
Трм С190А (контроль)	5.4 \pm 0.6	4.9 \pm 0.8
Трм G126R/D137L/C190А	9.3 \pm 1.0	8.3 \pm 1.3

В последующих экспериментах мы исследовали влияние стабилизации центральной части Трм на его регуляторные свойства, т.е. на его способность осуществлять вместе с тропониновым комплексом регуляцию ионами кальция АТФ-зависимого взаимодействия миозина с тонкими филаментами. Оказалось, что при высоких концентрациях Ca^{2+} такая стабилизация молекулы Трм приводила к значительному увеличению АТФазной активности субфрагмента 1 миозина в присутствии реконструированных тонких филаментов. Стоит отметить, что подобный эффект может приводить к увеличенному расходу АТФ, что может иметь неблагоприятные последствия для сокращения мышц.

Наиболее яркие результаты были получены в искусственной подвижной системе (*in vitro* motility assay, ИПС) (рис. 8) и в экспериментах, проведенных на реконструированных миофибриллах, содержащих рекомбинантные препараты Трм со стабилизирующими аминокислотными заменами в центральной части молекулы (рис. 9). В экспериментах, проведенных в ИПС, было показано, что стабилизация центральной части Трм приводит к увеличению скорости перемещения (скольжения) тонких филаментов (рис. 8А) и повышает Ca^{2+} -чувствительность актин-миозинового взаимодействия, обеспечивающего такое скольжение (рис. 8В). В экспериментах на реконструированных миофибриллах, проведенных совместно с итальянскими коллегами, было показано, что стабилизация центральной части Трм приводит к значительному ухудшению релаксационных свойств миофибрилл: она заметно увеличивает время их релаксации при снижении концентрации Ca^{2+} (рис. 9) и приводит к снижению длины саркомера (с 1,97 мкм для контрольного Трм С190А до 1,72 мкм для Трм D137L/G126R/C190А). Это однозначно свидетельствует о том, что миофибриллам, содержащим Трм со стабилизирующими заменами в центральной части молекулы, не удастся достигнуть полного расслабления.

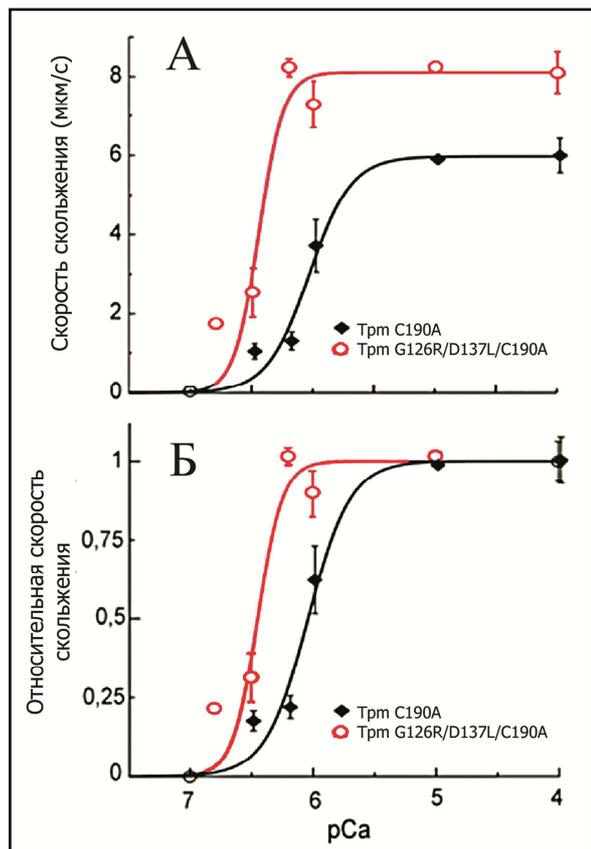


Рис. 8. Влияние стабилизирующих замен в центральной части молекулы Trm на Ca^{2+} -зависимую скорость перемещения («скольжения») реконструированных тонких филаментов в искусственной подвижной системе (ИПС, *in vitro* motility assay). Красная кривая соответствует препарату Trm с заменами G126R/D137L/C190A, черная кривая – контрольному препарату Trm C190A. **А** – ненормализованные данные, скорость представлена в мкм/с; **Б** – данные, нормализованные по максимальной скорости.

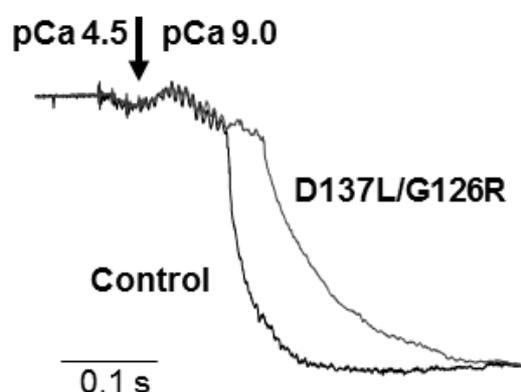


Рис. 9. Кинетика расслабления реконструированных миофибрилл, содержащих рекомбинантные препараты Trm со стабилизирующими аминокислотными заменами G126R/D137L в центральной части молекулы, по сравнению с миофибриллами, содержащими контрольный Trm C190A. Стрелкой на рисунке обозначен момент внесения раствора с низкой концентрацией кальция (pCa 9), соответствующий началу релаксации.

На основе анализа литературных данных о структуре комплекса актин-Trm-миозин [Behrmann *et al.*, 2012] было высказано предположение, что столь серьезные физиологические эффекты исследуемых аминокислотных замен в молекуле Trm могут быть обусловлены не только стабилизацией Trm и всего тонкого филамента, но и влиянием этих замен на взаимодействия между центральной частью Trm и определенными участками головки миозина. В результате была предложена модель подобного взаимодействия, согласно которой замены D137L и G126R в центральной части Trm оказывают влияние на электростатические взаимодействия остатков 126 и 137 в Trm с остатками K399 и R371 миозиновой головки, находящимися в непосредственной близости от этих остатков Trm (рис. 10).

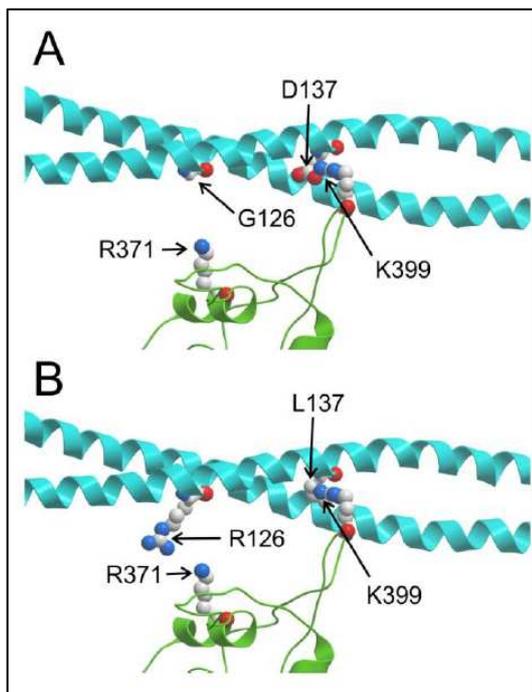


Рис. 10. Структурная модель области контакта миозиновой головки с Трп на поверхности актинового филамента при связывании миозина с актином. Показаны только участки миозиновой головки, прилегающие к остаткам 126 и 137 в центральной части Трп (актин и остальные части миозина и Трп не показаны). Сегменты двойной α -спирали Трп показаны голубыми лентами, а участки головки миозина – зеленым. В атомном представлении показаны неканонические аминокислотные остатки G126 и D137 в молекуле Трп, нарушающие структуру двойной спирали Трп в этой области (А), и замены этих остатков на канонические остатки R126 и L137, стабилизирующие центральную часть Трп (В), а также заряженные остатки миозиновой головки K399 и R371, находящиеся в непосредственной близости от этих остатков Трп.

Завершая этот раздел, можно сделать вывод, что дестабилизация центральной части Трп неканоническими остатками G126 и D137 играет достаточно важную роль в функционировании Трп и необходима, по-видимому, для тонкой регуляции актин-миозинового взаимодействия при мышечном сокращении.

2. Структурно-функциональные исследования рекомбинантных препаратов Трп с аминокислотными заменами, соответствующими кардиомиопатическим мутациям в генах Трп

Существует множество мутаций в генах Трп, которые могут приводить к тяжелым наследственным заболеваниям. В нашей работе мы сосредоточили внимание на изучении тех из них, которые ассоциированы с кардиомиопатиями, и исследовали свойства препаратов Трп с аминокислотными заменами в области контакта Трп с тропонином Т, вызываемыми такими мутациями (рис. 11).

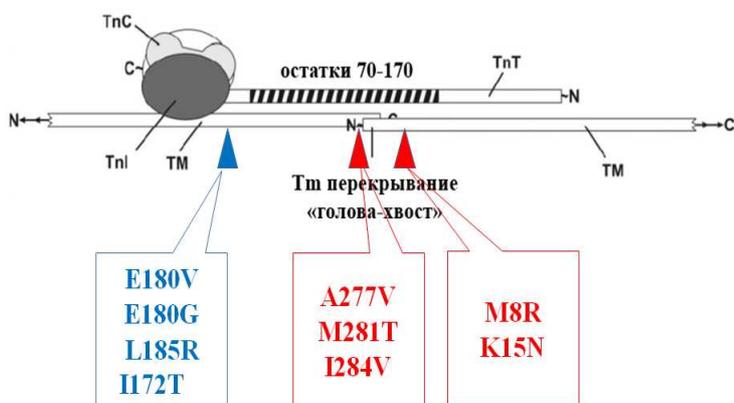


Рис. 11. Схематические изображения контактов Трп с тропонином Т в составе тропонинового комплекса в области остатка Cys190 в молекуле Трп (синий треугольник) и в области перекрытия N- и C-концов двух соседних молекул Трп на поверхности актинового филамента (красные треугольники). В выносках приведены изучаемые в данной работе аминокислотные замены в Трп.

В качестве первых объектов изучения нами были выбраны образцы Trm, содержащие аминокислотные замены в области остатка Cys190. Чтобы показать, какие структурные изменения вносят подобные замены, мы использовали метод КД. На температурных зависимостях плавления Trm, полученных этим методом, хорошо видно, что все изменения затрагивают лишь первый, наименее термостабильный пик, который соответствует плавлению С-концевой части молекулы Trm (рис. 12). При этом аминокислотная замена E180V стабилизирует эту часть молекулы Trm, тогда как замены E180G и I172T дестабилизируют ее, а замена L185R не оказывает влияния на стабильность молекулы Trm. Такие же результаты были получены и методом ДСК. Неудивительно, что все изменения затрагивали именно С-концевой участок молекулы, т.к. все замены располагаются именно в этой области. Однако обращает на себя внимание противоположное действие двух замен, расположенных в одном и том же положении (E180G и E180V). Это кажущееся противоречие можно объяснить следующим образом. Аминокислотный остаток Glu180 является в определенном смысле «неканоническим», поскольку в структуре двойной α -спирали молекулы Trm его партнером в соседней цепи является остаток Asp, который также является отрицательно заряженным. Между этими одинаково заряженными остатками происходит электростатическое отталкивание, дестабилизирующее данный участок молекулы. В то же время остаток валина не несет на себе заряда и обладает достаточно хорошей спиралеобразующей способностью, поэтому замена E180V предотвращает дестабилизацию Trm в этой области и приводит к стабилизации С-концевого домена молекулы. Напротив, остаток глицина нарушает структуру α -спирали и дестабилизирует двойную суперспираль в этой области, поэтому замена E180G приводит к значительной дестабилизации С-концевого домена молекулы Trm.

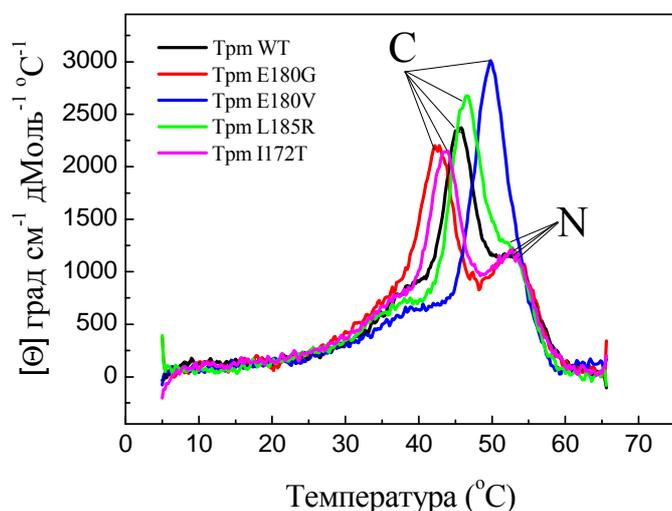


Рис. 12. Первые производные температурных зависимостей молярной эллиптичности при 222 нм, полученные методом КД для препаратов Trm с заменами в области остатка Cys190. Черная кривая соответствует препарату Trm WT, красная – Trm с заменой E180G, синяя – E180V, зеленая – L185R, фиолетовая – I172T. Буквами С и N обозначены пики, соответствующие плавлению С- и N-концевых участков молекулы Trm.

Методом соосаждения показано, что исследуемые замены в области остатка Cys190 приводят лишь к незначительному снижению сродства Trm к F-актину. С другой стороны, эти замены оказывали заметное влияние на стабильность его комплексов с F-актином, что было показано при анализе температурных зависимостей диссоциации таких комплексов, регистрируемой по снижению светорассеяния (рис. 13). Замены E180G и I172T дестабилизировали комплексы Trm с F-актином, понижая температуру их диссоциации, замена L185R не оказывала существенного влияния на стабильность таких комплексов, в то время как замена E180V сильно повышала температуру их диссоциации по сравнению с контрольным Trm C190A. Как и при изучении тепловой денатурации препаратов Trm

(рис. 12), мы сравнили между собой препараты Трм с заменами E180V и E180G по стабильности их комплексов с F-актином. Оказалось, что эти препараты очень сильно отличаются друг от друга: разница в температурах диссоциации их комплексов с F-актином составляет 6°C (рис. 13). Это хорошо коррелирует с большой разницей между этими препаратами по термостабильности С-концевого домена молекулы Трм (рис. 12). Из этого можно сделать вывод, что стабильность комплексов Трм с актином может зависеть от стабильности С-концевой части молекулы Трм.

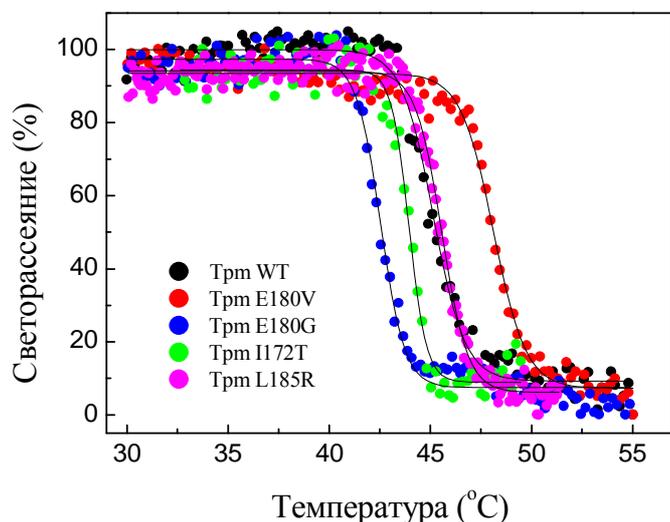


Рис. 13. Нормализованные температурные зависимости диссоциации комплексов Трм с F-актином, регистрируемой по снижению интенсивности светорассеяния. Черная кривая соответствует препарату Трм WT, красная – Трм E180V, синяя – Трм E180G, зеленая – Трм I172T и фиолетовая – Трм L185R. Концентрация F-актина составляла 20 μM , Трм – 10 μM . Скорость прогрева – 1°C/мин.

Влияние аминокислотных замен в области остатка Cys190 молекулы Трм на регуляторные свойства Трм исследовали в ИПС, определяя при разных концентрациях Ca^{2+} скорость скольжения реконструированных тонких филаментов, содержащих Трм с такими заменами, и анализируя полученные зависимости « $p\text{Ca}$ -скорость». Оказалось, что эти аминокислотные замены не влияют на максимальную скорость скольжения тонких филаментов (при $p\text{Ca}$ 4), но изменяют кальциевую чувствительность скорости скольжения, увеличивая (в случае замен L185R, E180V и E180G) или уменьшая ее (в случае замены I172T) (рис. 14). Особенно важно отметить, что все эти замены, кроме I172T, препятствовали полному ингибированию движения тонких филаментов при низких концентрациях кальция (при $p\text{Ca}$ 7.5–8.0) (рис. 14), т.е. в условиях расслабления мышцы. Все эти эффекты могут оказывать серьезное влияние на регуляцию сокращения сердечной мышцы, делая ее гиперчувствительной к ионам кальция и предотвращая ее полное расслабление при кардиомиопатии.

Подобные эксперименты были проведены и для препаратов Трм с аминокислотными заменами в области перекрытия N- и С-концов двух соседних молекул Трм на поверхности актинового филамента, причем как в N-концевой части молекулы Трм (замены M8R и K15N), так и в ее С-концевой части (замены A277V, M281T и I284V) (см. рис. 11). Методом КД было показано, что все эти аминокислотные замены не оказывали заметного влияния на характер тепловой денатурации Трм и на доменную структуру его молекулы, за исключением замены A277V, которая приводила к некоторой стабилизации С-концевого домена Трм. Тем не менее, эти замены приводили к существенным изменениям функциональных свойств Трм. Так, например, замены, расположенные поблизости от N-конца молекулы Трм (M8R и K15N), сильно снижали сродство Трм к актину (рис. 15). Особенно ярко этот эффект проявлялся в случае Трм с заменой M8R, который практически утрачивал способность связываться с актиновым

филаментом (рис.15). Замены в С-концевой области молекулы Трм (A277V, M281T и I284V) также снижали сродство Трм к актину, но в значительно меньшей степени.

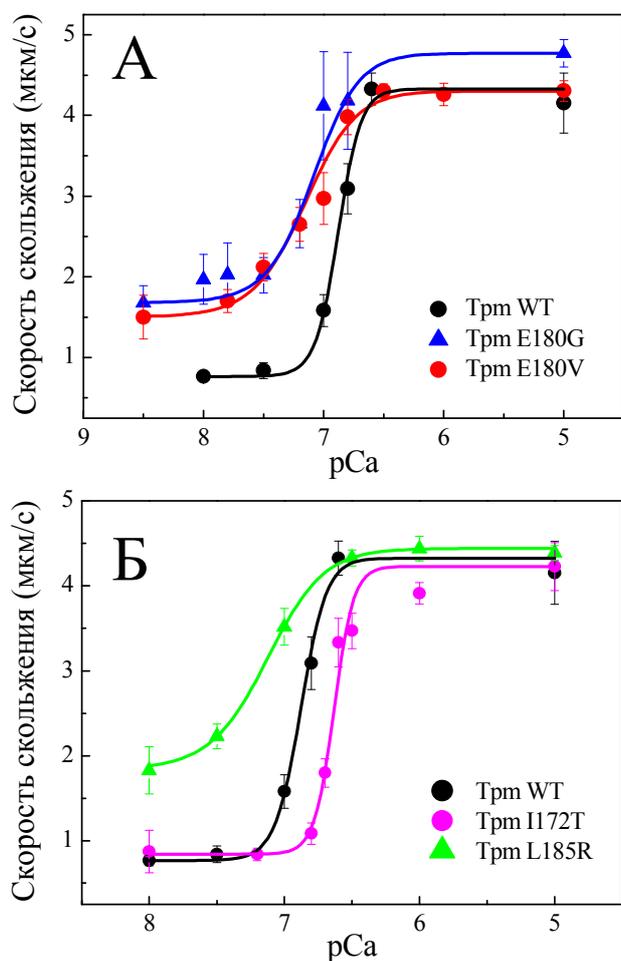


Рис.14. Влияние аминокислотных замен в области остатка Cys190 молекулы Трм на зависимость скорости перемещения («скольжения») реконструированных тонких филаментов в ИПС от концентрации кальция. Черная кривая соответствует контрольному препарату Трм WT, синяя – Трм E180G, красная – Трм E180V, зеленая – Трм L185R и фиолетовая – Трм I172T. Значения pCa_{50} составили 6.87 ± 0.03 , 6.66 ± 0.04 , 7.14 ± 0.04 , 7.08 ± 0.03 и 7.10 ± 0.05 для препаратов Трм WT, I172T, L185R, E180G и E180V, соответственно.

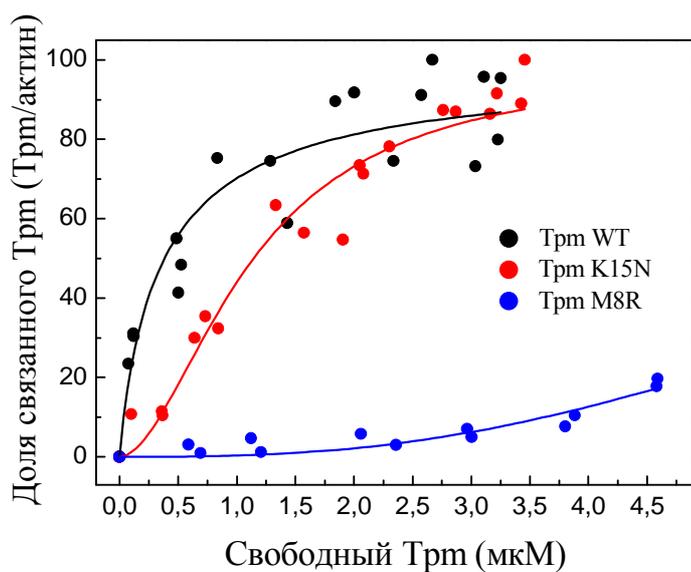


Рис. 15. Связывание с F-актином препаратов Трм, несущих замены M8R или K15N в N-концевой области молекулы. Результаты экспериментов по соосаждению Трм с F-актином представлены в виде зависимостей степени насыщения актинового филамента молекулами Трм от концентрации свободного Трм, остающегося в супернатанте после центрифугирования комплексов Трм с F-актином. Черным цветом показаны данные для контрольного Трм WT, синим – для Трм с заменой K15N, красной – для Трм с заменой M8R. Видно, что замена K15N значительно снижает сродство Трм к F-актину, а Трм с заменой M8R практически утрачивает способность связываться с F-актином.

Мы предположили, что наблюдаемое снижение сродства Трм к актину может быть обусловлено ослаблением взаимодействия между N- и С-концами молекул Трм, которое необходимо для формирования тропомиозинового тяжа на поверхности актинового

филамента. Для проверки этого предположения мы использовали метод вискозиметрии, поскольку известно, что вязкость раствора Трм зависит от прочности взаимодействия между N- и C-концами его молекул. Наше предположение полностью подтвердилось. Было показано, что замены в области N- и C-концевых участков молекул Трм снижали вязкость препаратов Трм, причем особенно ярко этот эффект был выражен у препаратов с заменами в области N-конца молекулы (M8R и K15N) (рис. 16). Примечательно, что данные вискозиметрии (рис. 16) хорошо согласуются с результатами экспериментов по соосаждению (рис. 15); это свидетельствует о том, что именно ослабление концевых взаимодействий, вызываемое аминокислотными заменами в C- и особенно в N-концевой области Трм, приводит, видимо, к снижению сродства препаратов Трм к актину. Эти данные также хорошо согласуются с результатами экспериментов по температурной диссоциации комплексов Трм с актином, в которых было показано, что стабильность таких комплексов была тем ниже, чем ниже вязкость раствора Трм. Исключение составлял лишь препарат Трм с заменой A277V, которая не оказывала заметного влияния ни на вязкость раствора Трм (рис. 16), ни на сродство Трм к актину и на стабильность его комплексов с актином.

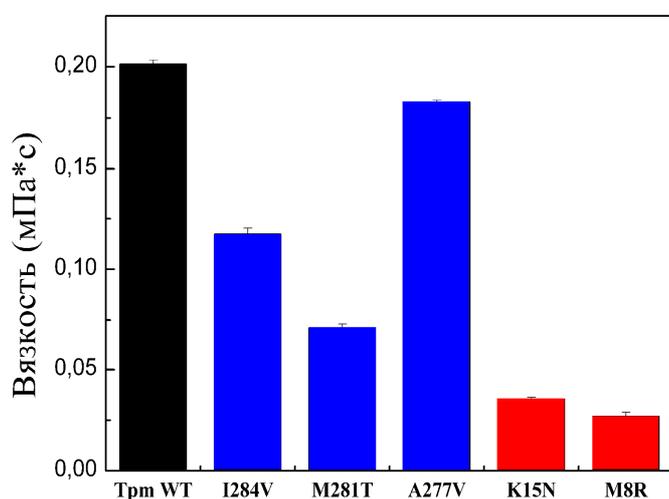


Рис. 16. Значения вязкости раствора для препаратов Трм с аминокислотными заменами в области N- и C-концов молекул Трм. Черный столбец на диаграмме соответствует вязкости препарата Трм WT, синие – Трм с заменами в C-концевой области, красные – Трм с заменами в N-концевой области. Значения вязкости приведены после вычитания вязкости буферного раствора. Значения составили $0,2014 \pm 0,002$, $0,1173 \pm 0,003$, $0,0711 \pm 0,002$, $0,1827 \pm 0,001$, $0,0353 \pm 0,001$ и $0,0269 \pm 0,002$ для препаратов Трм WT, I284V, M281T, A277V, K15N и M8R, соответственно.

Мы также оценили влияние аминокислотных замен в области перекрывавния C- и N-концов молекул Трм на регуляторные свойства Трм, анализируя полученные в ИПС зависимости скорости скольжения тонких филаментов от концентрации Ca^{2+} (рис. 17). Оказалось, что разные аминокислотные замены в этой области по-разному влияли на различные параметры таких зависимостей « pCa -скорость». Так, C-концевые замены M281T и I284V увеличивали максимальную скорость скольжения тонких филаментов при высоких концентрациях Ca^{2+} (pCa 5) и повышали кальциевую чувствительность такого скольжения (т.е. снижали значения pCa_{50}), но при этом значительно снижали кооперативность кривых « pCa -скорость», уменьшая коэффициент кооперативности Хилла практически в 2 раза (рис. 17).

В то же время C-концевая замена A277V не оказывала влияния на характеристики зависимости « pCa -скорость». Замены, находящиеся на N-конце молекулы Трм (K15N и M8R), не влияли на кальциевую чувствительность скорости скольжения тонких филаментов, но при этом оказывали противоположные эффекты на максимальную скорость скольжения: замена K15N ее сильно увеличивала, а замена M8R сильно уменьшала (рис. 17). Важно отметить, что некоторые из таких замен (M281T и K15N) в значительной степени препятствовали ингибированию движения тонких филаментов при

низких концентрациях кальция (при pCa 8.5) (рис. 14), т.е. в условиях расслабления сердечной мышцы. Подобные замены в Трм могут оказывать серьезное влияние на регуляцию сокращения сердечной мышцы, предотвращая ее полное расслабление при кардиомиопатии.

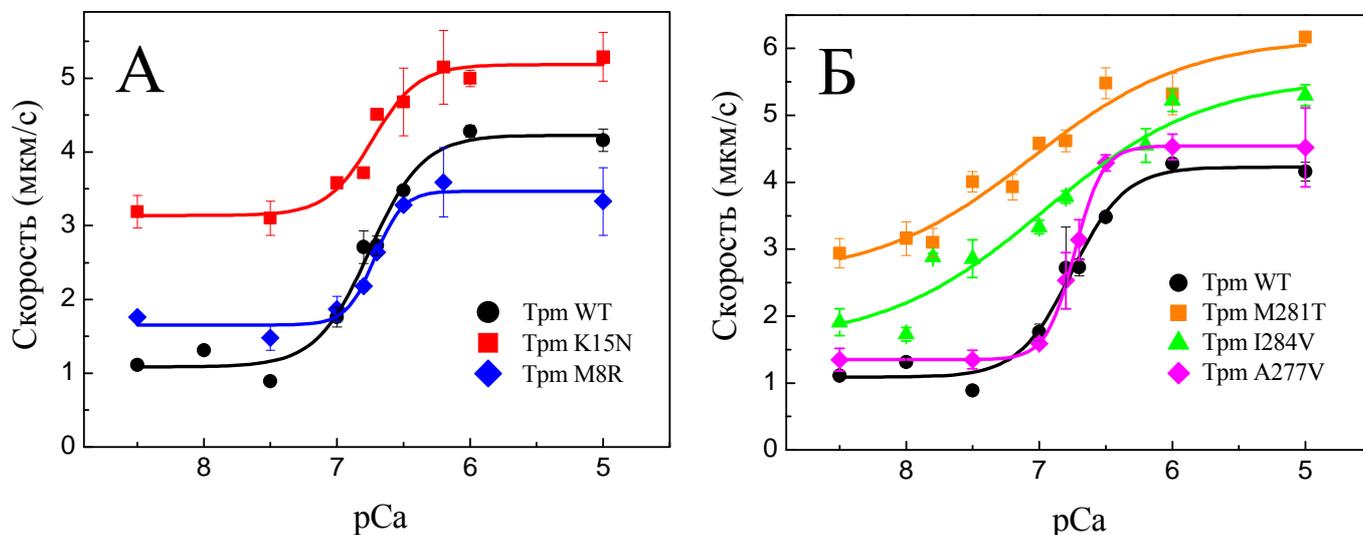


Рис. 17. Влияние аминокислотных замен в области С- и N-концов молекулы Трм на зависимость скорости скольжения реконструированных тонких филаментов в ИПС от концентрации кальция. Черная кривая соответствует контрольному препарату Трм WT, синяя – Трм M8R, красная – Трм R15N, зеленая – Трм I284V и рыжая – Трм M281T.

Завершая этот раздел, можно заключить, что в результате проведенных экспериментов нами было накоплено большое количество данных о влиянии кардиомиопатических мутаций в генах Трм на структуру и свойства его молекулы, которые могут быть в дальнейшем использованы для выяснения механизмов развития кардиомиопатий, а в более далекой перспективе – для создания препаратов для их профилактики и лечения. Практически каждая из исследованных аминокислотных замен, вызываемых в молекуле Трм такими мутациями, обладала своими индивидуальными характеристиками, что, по-видимому, говорит о многообразии причин и механизмов развития кардиомиопатий. В ходе работы нам удалось отметить ряд общих тенденций для разных групп мутаций, но говорить об установлении какой-то общей характеристики, которая бы объединяла их все, мы пока не можем.

3. Исследования гетеродимеров Трм с аминокислотными заменами в одной из двух цепей молекулы.

В мышечной ткани Трм может существовать не только в форме гомодимера, но и способен образовывать гетеродимеры. В быстрых скелетных мышцах доминирующими формами существования Трм являются $\alpha\alpha$ -гомодимеры (димеры изоформы Трм 1.1 или α -Трм) и $\alpha\beta$ -гетеродимеры – димеры изоформ α -Трм и β -Трм (Трм 2.2). Стоит отметить, что $\beta\beta$ -гомодимеры Трм крайне нестабильны и поэтому не встречаются в мышечной ткани.

В данном разделе будут приведены результаты, полученные для $\alpha\beta$ -гетеродимеров Трм с аминокислотными заменами G126R и D137L в α -цепи молекулы. При этом мы сопоставляли свойства таких $\alpha\beta$ -гетеродимеров со свойствами $\alpha\alpha$ -гомомеров Трм, несущих данные замены в обеих α -цепях молекулы, которые были подробно описаны выше, в разделе 1.

Сначала мы оценили стабильность $\alpha\beta$ -гетеродимеров Трм, полученных из белков дикого типа. В результате экспериментов, проведенных методом КД, было установлено, что термостабильность $\alpha\beta$ -гетеродимеров Трм заметно выше, чем у $\beta\beta$ -гомомеров, но при этом несколько (хотя и незначительно) ниже, чем у $\alpha\alpha$ -гомомеров. Однако отличия $\alpha\beta$ -гетеродимеров Трм как от $\beta\beta$ -гомомеров, так и от $\alpha\alpha$ -гомомеров становились гораздо ярче при внесении стабилизирующих аминокислотных замен D137L или G126R в центральную часть α -цепи. Самый выразительный эффект наблюдался в случае одновременной замены обоих этих остатков D137L/G126R (рис. 18). В этом случае термостабильность $\alpha\beta$ -гетеродимеров была намного выше, чем у $\beta\beta$ -гомомеров, но при этом все-таки заметно ниже, чем у $\alpha\alpha$ -гомомеров. Таким образом, замены D137L и G126R в центральной части α -цепи Трм стабилизируют не только $\alpha\alpha$ -гомомеры Трм, но и $\alpha\beta$ -гетеродимеры.

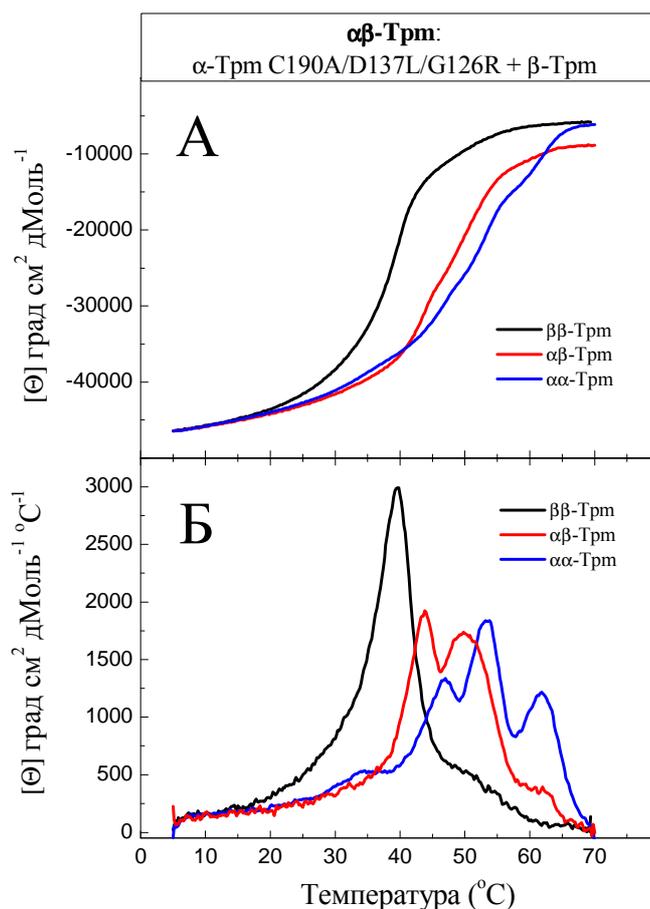


Рис. 18. (А) Температурные зависимости молярной эллиптичности при 222 нм, полученные методом КД для $\alpha\alpha$ -гомомеров Трм с заменами C190A/D137L/G126R в обеих α -цепях (синяя кривая), $\beta\beta$ -гомомеров Трм (черная кривая) и $\alpha\beta$ -гетеродимеров Трм, полученных из α -Трм с заменами C190A/D137L/G126R и β -Трм (красная кривая). Концентрация белка – 1 мг/мл, скорость прогрева – 1°C/мин. (Б) – Первые производные от зависимостей, представленных на (А).

Мы также оценили стабильность комплексов, образуемых $\alpha\beta$ -гетеродимерами Трм с F-актином, анализируя температурные зависимости их диссоциации, регистрируемой по снижению светорассеяния. И в этом случае комплексы, образуемые F-актином с $\alpha\beta$ -гетеродимерами Трм, были более стабильны, чем комплексы с $\beta\beta$ -гомомерами, но

менее стабильны, чем комплексы с $\alpha\alpha$ -гомодимерами. Как и в случае с термостабильностью $\alpha\beta$ -гетеродимеров Трм (рис. 18), этот эффект особенно ярко проявлялся для $\alpha\beta$ -гетеродимеров с заменой D137L/G126R в центральной части α -цепи молекулы (рис. 19). Таким образом, замены D137L, G126R и особенно двойная замена D137L/G126R в центральной части α -цепи Трм стабилизируют комплексы Трм с F-актином не только в случае $\alpha\alpha$ -гомодимеров Трм, но и в случае его $\alpha\beta$ -гетеродимеров.

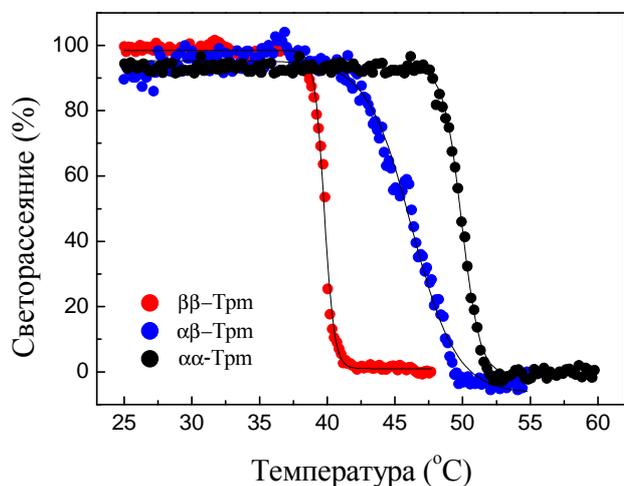


Рис. 19. Нормализованные температурные зависимости диссоциации комплексов Трм с F-актином, регистрируемой по снижению интенсивности светорассеяния. Приведены данные для $\alpha\alpha$ -гомодимеров Трм с заменами C190A/D137L/G126R в обеих цепях (обозначены черным цветом), $\beta\beta$ -гомодимеров Трм (красным цветом) и $\alpha\beta$ -гетеродимеров Трм, полученных из α -Трм с заменами C190A/D137L/G126R и β -Трм (синим цветом). Концентрация F-актина составляла 20 μ M, Трм – 5 μ M. Скорость прогрева – 1°C/мин.

Наиболее любопытные данные были получены при исследованиях $\alpha\beta$ -гетеродимеров Трм в ИПС. Нам удалось показать, что замены G126R и D137L в α -цепи $\alpha\beta$ -гетеродимеров Трм не только не увеличивают скорость перемещения реконструированных тонких филаментов в этой системе, как это было показано для $\alpha\alpha$ -гомодимеров Трм с такими заменами (рис. 8), но, напротив, заметно снижают ее (Таблица 2).

Таблица 2. Значения максимальной скорости скольжения в ИПС (V_{\max}) при высоких концентрациях кальция (pCa 4), полученные для реконструированных тонких филаментов, содержащих тропонин и различные препараты Трм ($\beta\beta$ -гомодимеры, $\alpha\alpha$ -гомодимеры и $\alpha\beta$ -гетеродимеры с заменами C190A, G126R, D137L и D137L/G126R в α -цепи).

Препараты Трм	V_{\max} (μ m/s) \pm SD
$\alpha\alpha$ -Трм (α -Трм C190A – α -Трм C190A)	4,5 \pm 0,18
$\beta\beta$ -Трм	3,8 \pm 0,13
$\alpha\beta$ -Трм (β -Трм – α -Трм C190A)	4,4 \pm 0,3
$\alpha\beta$ -Трм G126R (β -Трм – α -Трм C190A/G126R)	3,8 \pm 0,1
$\alpha\beta$ -Трм D137L (β -Трм – α -Трм C190A/D137L)	3,0 \pm 0,35
$\alpha\beta$ -Трм (β -Трм – α -Трм C190A/G126R/D137L)	3,3 \pm 0,5

В заключение следует отметить, что полученные нами данные впервые наводят на мысль о том, что функциональные свойства $\alpha\beta$ -гетеродимеров Трп с заменами остатков в α -цепи могут очень сильно отличаться от свойств $\alpha\alpha$ -гомомеров Трп с такими заменами – вплоть до того, что функциональные эффекты подобных замен даже могут быть прямо противоположными, приводя к появлению у гетеродимеров совершенно новых свойств. Это в дальнейшем необходимо учитывать при исследованиях влияния различных аминокислотных замен в Трп на его свойства, которые до настоящего времени проводились почти исключительно с использованием $\alpha\alpha$ - и $\beta\beta$ -гомомеров Трп с заменами в обеих цепях молекулы. Особенно актуальным представляется в дальнейшем использование гетеродимеров Трп в качестве наиболее адекватной модели для исследования эффектов аминокислотных замен, вызванных миопатическими мутациями в генах Трп.

Выводы

- 1). Показано, что замены неканонических остатков Asp137 и Gly126 в центральной части молекулы тропомиозина на канонические остатки Leu или Arg (а в особенности – обоих этих остатков двойной заменой G126R/D137L) способны стабилизировать не только эту часть молекулы, но и другие ее части, включая N- и C-концевые домены.
- 2). Стабилизация молекулы тропомиозина существенно увеличивает изгибную жесткость тонкого филамента (актинового филамента, содержащего тропомиозин и тропонин).
- 3). Стабилизация молекулы тропомиозина увеличивает максимальную скорость скольжения тонких филаментов в искусственной подвижной системе при высоких концентрациях Ca^{2+} и повышает Ca^{2+} -чувствительность актин-миозинового взаимодействия, обеспечивающего такое скольжение. Помимо этого, она значительно ухудшает релаксационные свойства миофибрилл.
- 4). Показано, что большинство исследованных кардиомиопатических мутаций в генах тропомиозина оказывают заметное влияние на функциональные свойства рекомбинантных препаратов тропомиозина, несущих соответствующие аминокислотные замены в различных частях молекулы. Для многих из них были выявлены нарушения взаимодействия миозина с актином, регулируемого тропонин-тропомиозиновой системой, что может являться причиной гиперчувствительности тонкого филамента к Ca^{2+} и приводить к неполной релаксации сердечной мышцы.
- 5). Показано, что как $\alpha\beta$ -гетеродимеры тропомиозина, так и $\alpha\alpha$ -гомомеры, несущие аминокислотные замены лишь в одной из двух цепей, отличаются по своим структурным и функциональным свойствам от гомодимеров, несущих такие замены в обеих цепях молекулы.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах:

1. Щепкин Д.В., **Матюшенко А.М.**, Копылова Г.В., Артемова Н.В., Бершицкий С.Ю., Цатурян А.К., Левицкий Д.И. «Стабилизация центральной части Тм изменяет чувствительность актин-миозинового взаимодействия к ионам кальция». *Acta Naturae*, 2013, Т. 5, № 3(18), С. 130–133.
2. **Matyushenko A.M.**, Artemova N.V., Shchepkin D.V., Kopylova G.V., Bershtitsky S.Y., Tsaturyan A.K., Sluchanko N.N., Levitsky D.I. “Structural and functional effects of two stabilizing substitutions, D137L and G126R, in the middle part of α -tropomyosin molecule”. *FEBS Journal*, 2014, v. 281, p. 2004–2016.
3. **Matyushenko A.M.**, Artemova N.V., Sluchanko N.N., Levitsky D.I. “Effects of two stabilizing substitutions, D137L and G126R, in the middle part of α -tropomyosin on the domain structure of its molecule”. *Biophysical Chemistry*, 2015, v. 196, № 1, p. 77–85.
4. Nabiev S.R., Ovsyannikov D.A., Kopylova G.V., Shchepkin D.V., **Matyushenko A.M.**, Koubassova N.A., Levitsky D.I., Tsaturyan A.K., Bershtitsky S.Y. “Stabilizing the central part of tropomyosin increases the bending stiffness of the thin filament”. *Biophysical Journal*, 2015, v.109, p.373–379.
5. **Матюшенко А.М.**, Артемова Н.В., Щепкин Д.В., Копылова Г.В., Левицкий Д.И. «Влияние стабилизирующих мутаций в центральной части α -цепи Тм на структурные и функциональные свойства его $\alpha\beta$ -гетеродимеров». *Биофизика*, 2016, том 61, № 5, с. 844–851.
6. Копылова Г.В., Щепкин Д.В., Боровков Д.И., **Матюшенко А.М.** «Влияние кардиомиопатических мутаций Тм на кальциевую регуляцию актин-миозинового взаимодействия в скелетной мышце». *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*, 2016, том 162, № 7, с. 50–53.
7. **Matyushenko A.M.**, Shchepkin D.V., Kopylova G.V., Popruga K.E., Artemova N.V., Pivovarova A.V., Bershtitsky S.Y., Levitsky D.I. “Structural and functional effects of cardiomyopathy-causing mutations in troponin T-binding region of cardiac tropomyosin”. *Biochemistry*, 2017, v. 56, p. 250–259.
8. Scellini B., Piroddi N., **Matyushenko A.M.**, Levitsky D.I., Poggesi C., Lehrer S.S., Tesi C. “Relaxation properties of myofibrils are compromised by amino acids that stabilize α -tropomyosin”. *Biophysical Journal*, 2017, v. 112, p. 376–387.

Избранные тезисы докладов на научных конференциях, конгрессах и симпозиумах:

1. **Матюшенко А.М.**, Артемова Н.В., Случанко Н.Н., Щепкин Д.В., Копылова Г.В., Левицкий Д.И. «Влияние стабилизирующих аминокислотных замен в центральной части α -тропомиозина скелетных мышц на его структуру и функциональные свойства» *Тезисы VI Российского симпозиума «Белки и пептиды»* (г. Уфа, 11–15 июня 2013 г.), С. 237.
2. **Matyushenko A.M.**, Artemova N.A., Shchepkin D.V., Kopylova G.V., Bershtitsky S.Y., Tsaturyan A.K., Sluchanko N.N., and Levitsky D.I. “Structural and functional effects of two stabilizing substitutions, D137L and G126R, in the middle part of α -tropomyosin molecule”. *Abstracts of International Symposium "Biological Motility: New facts and hypotheses"* (Pushchino, Moscow Region, May 12-14, 2014), p. 181–183. (устный доклад)

3. **Matyushenko A.M.**, Artemova N.V., Shchepkin D.V., Kopylova G.V., Bershitsky S.Y., Tsaturyan A.K. and Levitsky D.I. “Structural and functional studies on tropomyosin with stabilizing substitutions D137L and G126R in the middle part of its molecule” *Abstracts of 43th European Muscle Conference* (Salzburg, Austria, September 10–14th, 2014), p. 60.
4. **Матюшенко А.М.**, Артемова Н.В., Попруга К.Э., Левицкий Д.И. «Влияние стабилизирующих аминокислотных замен в центральной части молекулы тропомиозина на структуру и свойства его гетеродимеров». *Тезисы VII Российского симпозиума «Белки и пептиды»* (Академгородок СО РАН, г. Новосибирск, 12–17 июля 2015 г.), с. 304.
5. **Matyushenko A.M.**, Shchepkin D.V., Kopylova G.V., Popruga K.E., Pivovarova A.V., Levitsky D.I. “Effects of structural changes in the region of residues Glu180–Cys190 of tropomyosin on the properties of its molecule” *Abstracts of 44th European Muscle Conference* (Warsaw, Poland, September 21–25, 2015), p. 100.
6. **Matyushenko A.**, Artemova N., Shchepkin D., Kopylova G., Bershitsky S., Levitsky D. “Effects of interchain crosslinking of tropomyosin via disulfide bond formation on its functional properties”. *Abstracts of the International Symposium “Biological motility”* (Pushchino, Moscow region, Russia, May 12–14, 2016), p. 147–148. (устный доклад)
7. **Matyushenko A.M.**, Popruga K.E., Shchepkin D.V., Kopylova G.V., Pivovarova A.V., Levitsky D.I. “Structural and functional properties of cardiac tropomyosin with cardiomyopathy-associated mutations in the troponin T-binding regions”. *Abstracts of 45th European Muscle Conference* (Montpellier, France, September 2–6, 2016), p. 95.
8. **Матюшенко А.М.**, Попруга К.Э., Щепкин Д.В., Копылова Г.В., Левицкий Д.И. «Структурно-функциональные исследования сердечного тропомиозина, несущего кардиомиопатические мутации в гене *TPM1*». *Научные труды V Съезда биохимиков России* (Сочи-Дагомыс, Россия, 4–8 октября 2016 г.), спецвыпуск журнала «Acta Naturae», том 2, стр. 65–66. (устный доклад).